

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL SIÇAN HİPEROKZALÜRİ MODELİNDE  
KUERSETİN VE RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİLERİ**

**Dr. Sedat YUNUSOĞLU**

**UZMANLIK TEZİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Yrd. Doç. Dr. Taylan OKSAY**

**ISPARTA - 2011**

## TEŞEKKÜR

Asistanı olarak çalıştığım süre içerisinde bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren ve tezimi hazırlamada her türlü desteğini benden esirgemeyen değerli hocam ve abim Yrd. Doç. Dr. Taylan OKSAY'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca her türlü teorik ve pratik bilgi ve deneyimini benimle paylaşan, fikir ve görüşleriyle mesleki ve sosyal ufkomun genişlemesinde büyük payı olan ve bana olan güvenini ve desteğini her zaman arkamda hissettiğim değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Alim KOŞAR'a,

Uzmanlık eğitimimde büyük katkıları olan sayın hocalarım Prof. Dr. Hakkı PERK, Prof. Dr. Tekin Ahmet SEREL, Doç. Dr. Abdullah ARMAĞAN, Doç. Dr. Sedat SOYUPEK'e,

Asistanlığımın başlangıcında başasistanım, başasistan olduğum dönemde hocam ama her dönemde abim olan ve kendisinden çok şey öğrendiğim Yrd. Doç. Dr. Alper ÖZORAK'a,

Tez hazırlık sürecinde beraber çalıştığım Yrd. Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU, Öğr. Gör. İbrahim ONARAN, Yrd. Doç. Dr. Pınar Aslan KOŞAR ve Dr. İbrahim Aydın CANDAN'a ve deney hayvanları laboratuvarı çalışanlarına teşekkürü borç bilirim.

Üroloji kliniğinde yoğun iş ortamında birlikte çalışmaktan her zaman zevk aldığım sevgili doktor, hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan sevgili anneme, babama ve abime, her başarılı erkeğin arkasında bir kadın vardır sözünü doğrulayan sevgili eşim, aynı zamanda meslektaşım Dr. Gülşah Uslu YUNUSOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Taş Oluşumunu Etkileyen Faktörler .....	3
2.1.1. Genetik Faktörler .....	3
2.1.2. Yaş, Irk ve Cinsiyet.....	3
2.1.3. Coğrafi Konum .....	3
2.1.4. Sosyoekonomik Düzey .....	4
2.1.5. Sıvı Alımı .....	4
2.1.6. İklim .....	4
2.1.7. Mesleki Faktörler .....	4
2.1.8. Beslenme .....	5
2.1.9. Eşlik Eden Hastalıklar.....	5
2.2. Taş Oluşumu ile İlgili Teoriler.....	5
2.2.1. Süpersaturasyon-Kristalizasyon Teorisi .....	6
2.2.2. İnhibitör Eksikliği Teorisi .....	7
2.2.3. Matriks Teorisi .....	7
2.2.4. Epitaksi Teorisi .....	8
2.2.5. Kombine Teoriler .....	8
2.3. Yapılarına Göre Üriner Sistem Taşları .....	9
2.3.1. Kalsiyum İçeren Taşlar .....	10
2.3.1.1. Hiperkalsiüri.....	10
2.3.1.2. Hipositratüri .....	12
2.3.1.3. Hiperürikozüri .....	12
2.3.1.4. Hipomagnezüri.....	13
2.3.2. Enfeksiyon (Strüvit/Magnezyum Amonyum Fosfat/Triple Fosfat) Taşları.....	13

2.3.3. Ürik Asit Taşları.....	13
2.3.4. Sistin Taşları .....	14
2.3.5. Ksantin Taşları .....	15
2.3.6. Diğer Taş Tipleri.....	15
2.4. Hiperokzalüri.....	15
2.4.1. Okzalat Metabolizması .....	16
2.4.2. Hiperokzalürinin Oluşturduğu Renal Hasar.....	18
2.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri .....	19
2.5.1. Süperoksit Radikalleri (O <sub>2</sub> .) .....	19
2.5.2. Hidroksil Radikalleri (HO.) .....	20
2.5.3. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	20
2.5.4. Hipoklorik Asit (HOCl).....	20
2.5.5. Singlet O <sub>2</sub> (O <sub>2</sub> ↑↓).....	20
2.5.6. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları.....	20
2.5.6.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları .....	20
2.5.6.2. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları .....	21
2.6. Hiperokzalürinin İndüklediği Oksidatif Stres .....	22
2.6.1. Hiperokzalürinin İndüklediği ROS Oluşumunda Sinyal Yolları .....	23
2.7. Renal Korunma İçin Antioksidanlar .....	24
2.7.1. Enzimatik Antioksidanlar .....	24
2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	25
2.7.2.1. Flavonoidler .....	25
2.7.2.1.1. Kuersetin .....	26
2.7.2.1.2. Resveratrol .....	29
<b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>35</b>
3.1. Deney Hayvanları.....	35
3.2. Kullanılan İlaçlar.....	35
3.3. Deney Grupları.....	35
3.4. Kan Örneklerinin Alınması .....	36
3.5. İdrar Örneklerinin Toplanması.....	36
3.6. Doku Örneklerinin Toplanması.....	37
3.7. Biyokimyasal İnceleme .....	37
3.7.1. Doku Örneklerinin Homojenizasyonu .....	37
3.7.2. Katalaz Tayini .....	37

3.7.2.1. Reaktifler.....	38
3.7.2.2. Ön İşlem.....	38
3.7.2.3. Ölçüm.....	38
3.7.2.4. Sonuçların Hesaplanması.....	38
3.7.3. Doku Lipid Peroksit (MDA) Düzeyinin Ölçülmesi.....	39
3.7.3.1. Reaktifler.....	39
3.7.3.2. Deneyin Yapılışı.....	39
3.7.3.3. Sonuçların Hesaplanması.....	40
3.7.4. İdrar Okzalat Tayini.....	40
3.7.4.1. Deneyin Yapılışı.....	41
3.7.5. Plazma Oksalat Tayini.....	41
3.7.5.1. Deneyin Yapılışı.....	42
3.7.5.1.1. Ön İşlem.....	42
3.7.5.2. Sonuçların Hesaplanması.....	43
3.7.6. İdrar ve Kan Örneklerinde Kreatinin, Kalsiyum ve Üre Ölçümleri.....	43
3.7.7. Kreatinin Klirensi.....	44
3.7.8. İstatistiksel Analizler.....	44
3.8. Histolojik İnceleme.....	44
3.8.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları.....	44
3.8.2. İmmünohistokimya Protokolü.....	45
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>49</b>
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	49
4.2. Histolojik Bulgular.....	54
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	59
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>65</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>72</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>73</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>74</b>

**KISALTMALAR**

<b>COM</b>	: Kalsiyum okzalat monohidrat
<b>PTH</b>	: Parathormon
<b>CaOx</b>	: Kalsiyum okzalat
<b>AGT</b>	: Alanin gliksilat aminotransferaz
<b>PH 1</b>	: <i>Primer hiperoksalüri tip 1</i>
<b>PH 2</b>	: <i>Primer hiperoksalüri tip 2</i>
<b>KBY</b>	: Kronik böbrek yetmezliği
<b>GAG</b>	: Glikozaminoglikan
<b>O2.</b>	: Süperoksit radikalleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>H2O2</b>	: Hidrojen peroksit
<b>HO.</b>	: Hidroksil radikalleri
<b>HOCl</b>	: Hipoklorik Asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>RNS</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>OS</b>	: Oksidatif stres
<b>GST</b>	: Glutasyon S transferaz
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>TBARS</b>	: Tiobarbitürik asit reaktif substans
<b>GAL</b>	: Beta galaktozidaz
<b>NAG</b>	: N-asetil-beta glukozaminidaz
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyon
<b>cGPx</b>	: Hüresel glutasyon peroksidaz
<b>JNK</b>	: c-Jun N-terminal kinaz
<b>MAPK</b>	: Mitojen aktiveted protein kinaz
<b>AP-1</b>	: Aktive protein-1
<b>OPN</b>	: Osteopontin
<b>XO</b>	: Ksantin oksidaz
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein

<b>NOS</b>	: Nitrik oksit sentaz
<b>NFkB</b>	: Nükleer faktör kappa B
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>TNF</b>	: Tümör nekrozis faktör
<b>RES</b>	: Resveratrol
<b>COX</b>	: Siklooksijenaz
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>ET-1</b>	: Endotelin-1
<b>EG</b>	: Etilen glikol
<b>DMAB</b>	: Dimetilamino benzoik asit
<b>MTBH</b>	: 3-metil-2- 2-benzotiazolinon hidrazon
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>GFR</b>	: Glomerüler filtrasyon hızı
<b>SPSS 11.0</b>	: Statistical Package for Social Sciences 11.0
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>KRS</b>	: Kuersetin

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> Üriner sistem taşları .....	9
<b>Tablo 2.</b> Rat böbrek dokusunda katalaz aktivitesi tayininde kullanılan inkübasyon karışımların bileşenleri .....	38
<b>Tablo 3.</b> MDA ölçümünde kullanılan bileşenler ve miktarları .....	39
<b>Tablo 4.</b> MDA ölçümünde ikinci aşamada kullanılan bileşenler .....	40
<b>Tablo 5.</b> Plazma okzalat miktarı tayininde kullanılan bileşenler ve miktarları .....	43
<b>Tablo 6.</b> Çalışma gruplarının ortalama standart sapma değerleri ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları .....	49
<b>Tablo 7.</b> İmmünohistokimyasal olarak gruplar ve boyanma dereceleri .....	59
<b>Tablo 8.</b> Mann Whitney U testine göre p değerleri .....	60



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS veRNS) vücuttaki etkileri.....	22
<b>Şekil 2.</b> Hiperokzalürinin indüklediği hücrel hasarda mitokondriyal olaylar .....	23
<b>Şekil 3.</b> Hiperokzalürinin indüklediği ROS oluşumu ve bunların hücrel fizyoloji ve patoloji üzerine etkisini gösteren şema .....	24
<b>Şekil 4.</b> Kuersetinin kimyasal yapısı.....	27
<b>Şekil 5.</b> Resveratrolün kimyasal yapısı.....	30
<b>Şekil 6.</b> Gruplara göre MDA düzeylerinin dağılımı .....	50
<b>Şekil 7.</b> Gruplara göre katalaz düzeylerinin dağılımı .....	50
<b>Şekil 8.</b> Gruplara göre plazma üre düzeylerinin dağılımı .....	51
<b>Şekil 9.</b> Gruplara göre kreatin klirensi düzeylerinin dağılımı.....	52
<b>Şekil 10.</b> Gruplara göre idrar kalsiyum düzeylerinin dağılımı .....	52
<b>Şekil 11.</b> Gruplara göre plazma okzalit düzeylerinin dağılımı.....	53
<b>Şekil 12.</b> Gruplara göre idrar okzalit düzeylerinin dağılımı.....	53

**RESİMLER DİZİNİ**

<b>Resim 1.</b> Grup 1 (Kontrol Grubu); A. X20, B. X40 (H-E).....	55
<b>Resim 2.</b> Grup 2 (Etilen-Glikol Grubu); A. X10, B. X40 (H-E).....	56
<b>Resim 3.</b> Grup 3 (Etilen-Glikol+Kuersetin Grubu); A. X20, B. X40 (H-E) .....	57
<b>Resim 4.</b> Grup 4 (Etilen-Glikol+Resveratrol Grubu); A. X10, B. X40 (H-E) .....	58
<b>Resim 5.</b> Grup 1 (Kontrol Grubu); A.Kontrol X20, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X40.....	61
<b>Resim 6.</b> Grup 2 (Etilen-Glikol Grubu); A.Kontrol X40, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X40 .....	62
<b>Resim 7.</b> Grup 3 (Etilen-Glikol ve Kuersetin Grubu); A.Kontrol X20, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X20.....	63
<b>Resim 8.</b> Grup 4 (Etilen-Glikol ve Resveratrol Grubu); A.Kontrol X20, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X20.....	64

## 1. GİRİŞ

Üriner sistem taş hastalığı MÖ. 4800'deki Mısır yazıtlarında da rastlanılan oldukça eski bir hastalıktır (1). Böbrek fonksiyon bozukluğu ve kalıcı böbrek hasarına neden olabilir (2). Görülme sıklığı dünyada %12 ile %15 arasında, ülkemizde %14,8 olarak rapor edilmiştir (3,4). Ülkemizin Güney ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde daha sık görülür (1). İlk tanıdan sonra bir yıl içinde tekrarlama oranı %10, yaşam boyu tekrarlama oranı ise %50–100 arasında değişmektedir. Medikal tedavi görmemiş kalsiyum oksalat taşının nüks oranı bir yılda %10, beş yılda %35 ve on yılda ise %50 olarak bildirilmiştir (5).

Üriner sistem taş hastalığı; genetik yatkınlık, metabolik değişiklikler, anatomik, enfeksiyöz, besinsel ve çevresel faktörler gibi farklı nedenlerle ortaya çıkabilir (6). Zaman içerisinde taş hastalığının sadece insidansı değil aynı zamanda lokalizasyonu ve kimyasal yapısı da değişikliğe uğramıştır (7). Böbrek ve üreter taşları daha çok erişkin yaşlarda ve sosyoekonomik seviyesi yüksek ülkelerde görülür. Genelde kalsiyum oksalat ve fosfat taşları oluşur. Mesane taşları ise daha çok Asya ülkelerinde yaygındır ve amonyum urat ve kalsiyum oksalattan oluşur. Yirminci yüzyılın başlarında Avrupa'da daha sık görülen mesane taşlarının insidansı azalarak yerini böbrek ve üreter taşlarına bırakmıştır (8).

Güneydoğu Asya, Türkiye, Hindistan, Güney Amerika, Ortadoğu ve Doğu Avrupa dünyanın taş zonu olarak isimlendirilir (9). Türkiye'de yaşam standartlarındaki artma ile orantılı olarak mesane taşı insidansında düşüş ile beraber mesane taşlarının yerini üst üriner sistem taşlarına bıraktığı bildirilmiştir (10). Üriner sistem taş hastalığı 30-60 yaşları arasında sık görülür. Semptomatik taş oluşum prevalansı erkeklerde %10-15, bayanlarda %5'ir (11). Erkek kadın oranı 2-3 / 1'dir (12).

Kalsiyum taşları renal taşların yaklaşık %75'ini, geri kalan ürik asit, struvit ya da sistin taşları ise %25'ini oluşturur (13). Kalsiyum oksalat taşlarının patogeneğinde, diyetle alınan yüksek oranda protein, rafine karbonhidrat ve sodyumun rolü vardır (8). Kalsiyum taş oluşumu için genetik aktarımın rolü özellikle Dent hastalığı, sistünüri ve primer hiperoksalüri gibi monogenik hastalıklarda açık olarak gösterilmiştir (13,14).

Türkiyede endemik olarak görülen taş hastalarının %17'si 14 yaşın altındadır (15). Çocuklarda taş hastalığının insidansının daha düşük olmasının nedeni olarak, idrar magnezyum, sitrat ve fosfor miktarının ve kalsiyum oksalat kristal inhibitörlerinin çocuklarda erişkinlerden daha fazla olması gösterilmiştir (16). Bir çalışmada pediatrik yaş grubunda idrar makromoleküllerinin, kalsiyum oksalat kristal agregasyonunu ve renal tübüler epitel hücrelerine adezyonunu daha güçlü inhibe ettiğini gösterilmiştir (17). Metabolik anormallikler primer ve tekrarlayan pediatrik taş oluşumlarının önemli bir yüzdesinin nedenidir (18).

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Taş Oluşumunu Etkileyen Faktörler

#### 2.1.1. Genetik Faktörler

Ailesinde taş hastalığı olan bireylerin hastalığa yakalanma ihtimali, aile öyküsü olmayanlardan 2,5 kat daha fazladır (19). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, hastaların %40'ının birinci derece akrabalarında taş hastalığı görüldüğü bildirilmiştir (20). Böbrek taşı olan hastaların %25'inde aile öyküsünün pozitif olması ve taş oluşumuna yol açan ailesel renal tubüler asidoz, sistinüri, primer hiperoksalüri, Lesch–Nyhan sendromu, ksantinüri ve Dent hastalığı gibi birçok hastalığın herediter olması taş hastalığında genetik bozuklukların rolünü ve önemini göstermektedir (21).

#### 2.1.2. Yaş, Irk ve Cinsiyet

Üriner sistem taş hastalığının insidansı erkekler için 20'li yaşlarda yükselmeye başlar, 40-60 yaşlar arasında en yüksek noktaya ulaşır. Kadınlarda ise 20'lerin sonunda yükselen insidans, 50'li yaşlarda azalır. Böbrek taşı hastalığı beyaz kafaalarda, siyahilerden coğrafi alana bağılı olmaksızın daha sıklıkla görülür (7, 22). Taş hastalığının erkek: kadın oranı literatürde 2:1 veya 3:1 olarak bildirilmiştir (20, 23). Ülkemizde yapılan bir çalışmada erkek: kadın oranı 1,5:1 ve en sık görüldüğü yaş grubu 55 yaş üstü olarak rapor edilmiştir (1). Bayanlardaki düşük serum testosteron düzeyleri ve idrarlarındaki sitrat miktarının yüksekliği taş hastalığının erkeklerden daha az görülmesinin nedeni olarak gösterilmektedir (20).

#### 2.1.3. Coğrafi Konum

İskandinavya, Akdeniz Ülkeleri, Kuzey Hindistan, Pakistan, Kuzey Avustralya, Orta Avrupa ve Orta Amerika böbrek taşı hastalığı açısından yüksek insidanslı ülkeler olarak sınıflandırılmaktadır (20). Risk Avrupa'da %5-9, Kanada'da %12, Amerika'da %13-15, Suudi Arabistan gibi bazı Asya ülkelerinde ise %20 dir. Dağlık, çöl ve tropikal bölgelerde taş hastalığı prevalansının yüksek olduğu bildirilmektedir (7).

#### **2.1.4. Sosyoekonomik Düzey**

Gelişmiş ülkelerde kalsiyum oksalat ve kalsiyum fosfat taşı daha sık görülürken, gelişmekte olan ülkelerde amonyum urat ve kalsiyum oksalat taşlarından oluşan mesane taşı oluşumu epeyce yaygındır (7).

#### **2.1.5. Sıvı Alımı**

Üriner sistem taş hastalarının %19'unda yetersiz sıvı alımı tespit edilmiştir (24). Su alımının artırılması idrar hacmini artırarak seyreltik idrar oluşumunu sağlamakta ve diürezi arttırıp kristallerin üriner sistemi daha hızlı terk etmesini sağlayarak taş oluşumunu engellemektedir. Günde 2 litre ve üzerindeki miktarlarda sıvı alımının üriner sistem taş hastalığı oluşumunu önlediği, idrar miktarı ve idrar akım hızını arttırarak idrarda düşük solid konsantrasyonu sağladığı gösterilmiştir (25). Portakal suyu ve limonatanın idrar sitrat miktarını arttırarak taş oluşumunu azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (26). Çay, kahve ve alkollü içeceklerin kalsiyum oksalat taşı için risk faktörü olduğunu belirten çalışmalar mevcuttur (19). Elma ve greyfurt suyunun taş oluşum riskini artırdığı belirtilmiştir (19, 21).

#### **2.1.6. İklim**

Sıcak iklim kuşağında yaşayan bireylerde cilt yoluyla kaybedilen sıvı miktarının artışına bağlı olarak idrar miktarının azalması nedeniyle daha yüksek oranda taş hastalığına rastlanır (7, 23). Daha uzun süre güneş ışığına maruz kalma ile 1,25 dihidroksivitamin D3 üretiminin arttığı ve bundan dolayı artan idrar kalsiyum miktarının taş oluşumunu yaz aylarında hızlandırdığı da ileri sürülmüştür (27).

#### **2.1.7. Mesleki Faktörler**

Sedanter meslek gruplarında beden işi yapanlara göre taş hastalığına daha sık rastlandığını belirtilmiştir (1). İşlerinin içeriği ve buldukları ortam gereği yüksek ısıya maruz kalan bireylerde de (gemi çalışanları, fırın ve döküm işçileri vs.) taş hastalığına daha sık oranda rastlanılmaktadır (19, 23).

### 2.1.8. Beslenme

İdrar bileşimi doğrudan diyetle ilişkili olduğundan etiyolojik faktörlerin önemli bir kısmı diyet yoluyla değiştirilebilir. Böbrek taşı hastalarının beslenmelerinde lifli besin tüketiminin düşük olduğu gözlenmiştir. Diyetteki hayvansal protein miktarındaki artışın oksalat absorpsiyonunu ve üriner sistem taş hastalığı riskini arttırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir (7,11,21,28). Ürik asit ve kalsiyum oksalat taşlarının oluşumu diyetle hayvansal gıda alımından etkilenir. Aşırı tuz alımı nedeniyle böbrek tubuluslarından sodyumun geri absorpsiyonu sonucu kalsiyumun tübüler sekresyonu, hiperkalsiüriye neden olarak taş oluşum riskini artırır. Diyetle aşırı pürin, kalsiyum, oksalat ve fosfat alınması, idrarda bu maddelerin aşırı atılımına neden olarak taş hastalığını kolaylaştırmaktadır (20). Beslenmelerinde günlük 30 g. soya ve buğday tüketen kişilerde böbrek taşı hastalığının tekrarında belirgin bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bir çalışmada günlük kalsiyum tüketiminin 1,050g'dan 600g'a düşürülmesinin taş hastalığının gelişim riskini arttırdığı ispatlanmıştır (20,21).

### 2.1.9. Eşlik Eden Hastalıklar

Vücut kitle indeksinin 25'in üzerinde olması durumu taş hastalığı için risk faktörü olarak belirlenmiştir (1). Vücut kitle indeksinin artışı ile idrardaki ürik asit, sodyum, amonyum fosfat artmakta, idrar pH'sı düşmektedir. İdrarda ürik asitin artması kalsiyum oksalat çözünürlüğünü ve glikozaminoglikanların taş oluşumu üzerindeki inhibitör etkisini azaltmaktadır. Bu iki mekanizma kalsiyum oksalat taşı oluşumu riskini artırır (21). Taş hastalığının mekanizması çok iyi bilinmemesine rağmen özellikle kadınlarda hipertansiyon ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (22,29, 30)

## 2.2. Taş Oluşumu ile İlgili Teoriler

Taşların oluşumu için birçok teori ileri sürülmüşse de bunların hiç biri tek başına yeterli olmaz ve birçok olguda birden fazla teori ile taş oluşumu açıklanır.

### 2.2.1. Süpersaturasyon-Kristalizasyon Teorisi

Belirli bir pH ve sıcaklıktaki sıvıya kristalize olabilen bir element ilave edildiğinde solüsyon halinde kalır ve element konsantrasyonu artırılınca belirli bir seviyeden sonra doymuş haldeki madde kristalize olmaya başlar. Normalde idrarda belirli bir pH ve sıcaklıkta belirli bir maddenin çözünürlüğü sabittir. Eğer idrardaki bu maddelerin miktarlarında artış devam ederse, madde idrarda kristalize olmaya başlar. Bu oluşum süpersaturasyon teorisiyle açıklanır.

Saturasyonun doygunluğa ulaştığı ve kristalizasyonun başladığı konsantrasyona “solubility product” ( $K_{sp}$ ) denir (31).  $K_{sp}$ ; az çözünen bir tuzun doymuş çözeltisinde sıcaklık sabit iken, tuzu oluşturan iyonların molar konsantrasyonlarının çarpımına eşittir. Taş tuzlarının süpersaturasyonu ise idrardaki konsantrasyonun, çözünürlüğüne olan oranı olarak tanımlanır ve 1 üzerindeki her oran o maddenin süpersaturasyonunu ifade eder (32,33,34). Sıcaklık, pH ve içerdiği diğer maddelerden dolayı idrar oldukça kompleks bir sıvıdır ve bu sıvı içinde suya göre daha fazla madde süpersature solüsyon halinde bulunabilmektedir (35).

Kristalizasyondan sonraki aşama nükleizasyon dönemidir(33,36). Nükleizasyon eğer primer olarak benzer kristaller üzerinde olursa homojen nükleizasyon adını alır. Kristalizasyon, ortamda var olan hücrenin debris, epitelyum hücreleri veya ürik asit kristalleri gibi başka bir yüzey üzerinde devam ederse heterojen nükleizasyon adını alır (33,36). İdrarda bulunan epitel hücreler, eritrosit hücreleri ve diğer kristaller heterojen nükleizasyon için yüzey görevi görürler. Nükleasyondan sonra kristal büyüebilir ve bu kristal çekirdekleri birbirlerine bağlanarak agregasyon oluşturabilirler (37). Taş oluşumu için, oluşan agregatların retansiyonu da gerekmektedir. Sonuçta serbestçe idrar içinde veya bir yüzeye tutunarak taş formasyonu meydana gelir.

Taşın komponentlerinin saturasyonu, iyonun konsantrasyonundan olduğu kadar, idrar pH'sından (33) ve idrarda bulunan moleküllerin kompleks yapmasından da etkilenmektedir (38). İdrar pH'sı 6'nın üzerine çıktığında kalsiyum fosfat çözünürlüğünde azalma olurken, ürik asit çözünürlüğünde ise artma olmaktadır (32). Taş oluşumu veya kristalizasyonun oluşması için devamlı ya da aralıklı idrar süpersaturasyonu meydana gelmelidir.



Bir çalışmada kalsiyum ve ürik asit taşı olanların idrar örneklerinde sağlıklı kontrollere göre kolesterol, kolesterol esteri ve trigliserit içeriğinin fazla olduğu, ayrıca kalsiyum oksalat taşı olanlarda asidik fosfolipitlerin daha fazla bulunduğunu bildirilmiştir (39). Buna göre hücre membranı yıkım ürünlerinin kalsiyum oksalat nükleasyonu için uygun substrat olmasının yanında lipitlerin, kalsiyum taşlarının kristalizasyonunu hızlandırmasının söz konusu olabileceği vurgulanmıştır.

Bu teori ile ürik asit, sistin ve magnezyum amonyum fosfat taşlarının oluşumu açıklanabilir (40).

### **2.2.2. İnhibitör Eksikliği Teorisi**

Aynı miktarda ve yapıda kalsiyum, oksalat, ürik asit veya sistin içeren süpersatüre idrarı olan kişilerin hepsinde taş oluşmaması kristalizasyonu inhibe eden moleküllerin varlığını düşündürmüştür (41). Taş oluşumunun saturasyon ve inhibitörler arasındaki balansa bağlı olduğu söylenebilir. İnhibitörler organik ve inorganik yapıda olabilirler (42). Sitrat, pirofosfat, magnezyum, osteopontin, protrombin F1 fragman, inter- $\alpha$ -trypsin inhibitör molekül, bikunin, çinko, alanin, kalgranülin, Tamm-Horsfall glikoprotein gibi proteinler ile RNA ve DNA fragmanları, nefrokalsin ve glikozaminoglikanlar idrar kristalizasyon inhibitörleri olarak tanımlanmışlardır (5,33,34,43-49). Bunlar bioelektrik etkileri yoluyla kristallerin birbiri ile birleşmesini engeller (50,51). Glikozaminoglikanlar aynı zamanda kristallerin yüzeyine bağlanarak da etki gösterebilirler. Bu moleküllerin genelde kalsiyum atomlarına bağlanabilen ve kristal büyümesini önleyen uzun polianyonik zincirleri vardır (34).

Taş oluşan kişilerin normal kişilere göre kristal agregasyon inhibisyonunun daha az olduğu gösterilmiştir(52).

### **2.2.3. Matriks Teorisi**

Üromukoidlerdeki sialik asidin ayrılması sonucu oluşur. Kalsiyum taşlarında %2,5, ürik asit taşlarında %2 ve strüvit taşlarında %1,1 gibi bir oranda bulunmaktadır. Proksimal tüp hücrelerinde yapılan matriksin, çekirdek görevi

görmesi ve diğer kristallerin bu çekirdek etrafına tabakalar halinde yapışması esasına dayanır (33,36,53).

#### **2.2.4. Epitaksi Teorisi**

İdrardaki bir element çok fazla kristalize olursa idrarın kalan kısmında saturasyon azalır ve nüve büyümez. Eğer bir başka element kristalin yüzeyine yapışarak heterojen nükleasyon oluşturursa epitaksi denen olay gerçekleşir. Ürik asit kristalleri üzerine kalsiyum oksalatın epitaksi ile tutunabilmesi bu olaya örnek olarak verilebilir (36,54). Sistin bu şekilde bir taş yapısına katılmaz (5).

#### **2.2.5. Kombine Teoriler**

Üriner sistemde taş oluşumu için teorilerin hepsinin birlikte geçerli olduğu teoridir.

İdrar pH'sındaki değişiklikler, üriner enfeksiyonlar, konjenital anomaliler, ürostaz ile böbrekteki kalsifikasyonlar, üriner sistemdeki yabancı cisimler, üriner sisteme iştiraki olan fistüller, üriner sistem tümörleri ve nekrotik doku parçaları taş oluşumu için predispozan faktörler olup bu teorilere eşlik eder. Bu teorilerle açıklanamayan taş hastalığına ise idiopatik taş hastalığı denir.

Böbrek tübüllerinde veya toplayıcı kanallarda oluşan birçok kristalin bir araya gelmesi, ürotelyuma tutunması, idrar tarafından temizlenememesi ve toplayıcı kanallarda tıkanıklık olması gibi olaylar sonucunda taş oluşur. İdrar akımını engelleyen medüller sünger böbrek, üretero-pelvik bileşkede darlık, tübüler epitelyum kalınlığında artma gibi anatomik anormalliklerin ve üriner sistemi etkileyen idrar yolu enfeksiyonlarının varlığı ve renal hücresel fonksiyon bozukluğu sonucu artmış kalsiyum ve oksalat emilimi de kristalizasyona sebep olur ve bu durum taş oluşumu ile sonuçlanabilir (5).

Taş oluşumu ve oluşan taşın büyümesi ile ilgili olarak iki temel görüş vardır. Bunlardan birisi serbest parçacık teorisidir. Bu görüşe göre; kristallerin ileri derecede süpersatüre olan idrarda hızla büyüdüğü ve bir araya geldiği, böylece idrarın tübüllerden geçiş zamanından daha kısa bir sürede tübül lümenini tıkayacak büyüklüğe ulaştığı kabul edilir. Bu büyüklüğe ulaşan parçacık, tübül lümeni içinde

takılarak taş oluşumu için bir çekirdek oluşturur. İkinci teori olan sabit parçacık teorisine göre ise; idrarın tübüllerden geçiş süresi içinde kristallerin lümen içine takılacak boyuta ulaşmasının mümkün olmadığına inanılır. Bu nedenle kristallerin büyürken tübül epiteline yapışarak taş oluşumu için çekirdek oluşturduğu düşünülür (33,55,56).

Taş hastalığında renal hücre hasarının mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte bazı çalışmalarda yüksek oksalat düzeylerinin hücre zedelenmesini artırarak COM kristallerinin renal tübüler hücrelere adezyonunu artırdığı gösterilmiştir (57,58). Hücre membranında lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen metabolitlerinin de hücre hasarına yol açtığı ve antioksidant tedavi ile üriner oksalat atılımının azaldığı belirlenmiştir (59,60).

### 2.3. Yapılarına Göre Üriner Sistem Taşları

Üriner sistem taşları çeşitli özelliklerine göre değişik şekillerde isimlendirilmişlerdir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Üriner sistem taşları

Kalsiyum oksalat monohidrat (Whewellite)
Kalsiyum oksalat dihidrat (Weddelite)
Hidroksiapatit
Karbonat-apatit
Kalsiyum hidrojen fosfat dihidrat (Brushite)
Trikalsiyum fosfat (Whitlockite)
Mg amonyum fosfat (Struvite)
Ürik asit
Ürik asit dihidrat
Amonyum ürat
Sodyum ürat monohidrat

Yetişkin taşlarının %65-70'i saf kalsiyum oksalat taşı (monohidrat veya dihidrat) olup kalsiyum oksalat-kalsiyum fosfat karışımı olan miks taşlarla beraber tüm üriner sistem taşlarının %80'ini kalsiyum taşları oluşturmaktadır (2,61). Taşların %10 kadarını magnezyum amonyum fosfat (strüvit), %9'unu ürik asit, %1 kadarını ise sistin veya amonyum ürat ya da ilaçlara bağlı taşlar oluşturmaktadır (34).

### 2.3.1. Kalsiyum İçeren Taşlar

Kalsiyum, diyet ile 600-1200 mg/gün alınır, bunun % 30-45'i (300-400 mg) duodenum ve jejunumdan emilir, ancak 100-200 mg'ı lümene geri sekrete edilir. Barsak lümenindeki fosfat, sitrat, sulfat, okzalat ve yağ asitleri kalsiyum ile kompleks oluşturup emilimini azaltırlar. 1,25-dihİdroksivitamin D3 (kalsitriol) ise barsaktan emilimi stimüle eden en etkin maddedir. Serumda 9,6 mg (%45'i iyonize %55'i proteine bağlı) bulunur. Parathormon (PTH) serumda iyonize kalsiyumun azalması ile salınır ve kalsiyumun kemikten serbestleşmesi ile renal tubuler reabsorbsiyonunu uyarır. Günde yaklaşık 50 gr. glomerülofiltrata geçer ancak ihtiyaca göre önemli bir kısmı reabsorbe olur. İdrara atılan kısım yaklaşık 250 mg.dır (62).

Kalsiyum taşı olan hastalarda, altta yatan metabolik durumlar şunlardır:

Hiperkalsiüri

Hiperokzalüri

Hiperürikozüri

Hipositratüri

Hipomagnezüri

Hiperfosfatüri (63,64).

#### 2.3.1.1. Hiperkalsiüri

Günlük idrar kalsiyum atılımının 4 mg/kg veya erkeklerde 7 mmol'den,kadınlarda 6 mmol'den fazla olması veya 250 mg dan fazla olması hiperkalsiüri olarak tanımlanır (5,38,62). Hiperkalsiüri, kalsiyum taşlarına en sık eşlik eden metabolik bozukluktur. İyonik kalsiyum artmasına bağlı olarak idrardaki kalsiyum miktarı artar. Artmış Ca miktarına bağlı olarak Ca tuzları taş haline dönüşür. Bu dönüşümde idrardaki sitrat ve glikozaminoglikan gibi inhibitör madde miktarlarının az olması da katkıda bulunur (65).

Hiperkalsiüri nedenleri:

a. Absorbtif hiperkalsiüri; en yaygın formdur. Barsaklardan kalsiyum absorpsiyonunun artması ile karakterizedir. Kalsiyum oksalat taşlarının %50-60'ının nedenidir. Olguların yaklaşık yarısında 1,25 dihidroksivitamin D3 seviyesi (kalsitriol) artmıştır. 3 tipi vardır: Tip I, en ciddi form, nisbeten az görülür. Kalsiyum alımı ne olursa olsun hiperkalsiüri vardır. Serum kalsiyumu normal, PTH düzeyi normal veya düşük bulunur (5). Tip II, en yaygın görülür, sadece kalsiyum yüklemesi yapıldığında hiperkalsiüri saptanır. Tip III, nadirdir, böbrekten fosfor kaçağı olur. Böylece serum fosforu düşer ve D vitamini artarak kalsiyumun barsakta emilimi artmış olur.

b. Rezorptif (primer hiperparatiroidizm): Taş hastalarının %4'ünü oluşturur. Poliklinikte hiperkalseminin en sık nedeni primer hiperparatiroidizm iken klinikte malignensilerdir. Hiperparatiroidi nedenleri %80 adenom, %15 hiperplazi ve %5 kanserdir. PTH hem kemik dokudan kalsiyum rezorpsiyonunu uyarır hem de böbrekte kalsitriol sentezini artırarak kalsiyumun barsak emilimini artırır. Dolayısıyla hiperkalsemi, hiperkalsiüri ve bunların yanı sıra hipofosfatemi ve hiperfosfatüri oluşur (tiroid'den salgılanan kalsitonin PTH'nun kemiğe olan etkisini antagonize eder). Yoğun idrar kalsiyum ve fosfat atılımına bağlı multiple taş ve nefrokalsinoz gelişebilir (62).

c. Renal hiperkalsiüri (sekonder hiperparatiroidizm): Taş hastalarının yaklaşık %10'unu oluşturur. Kalsiyumun renal tubuler absorpsiyonu bozulmuştur. Sonuçta kalsiyum kaybı olur ve PTH stimülasyonuna bağlı renal kalsitriol sentezi artarak kalsiyumun hem barsak emilimi hem de kemikten mobilizasyonu artmış olur. Böylece olay daha fazla renal kalsiyum atılımı ile devam eder (2,66).

d. Diğer hiperkalsiüri nedenleri; sarkoidoz ve diğer granülomatöz hastalıklar, addison, renal tubuler asidoz, Paget hastalığı, vitamin D intoksikasyonu, gluokortikoid fazla alımı, sütalkali sendromu, Albright tubuler asidoz, çeşitli paraneoplastik sendromlar, uyarılmış hipofosfatemik durumlar, multipl myelom, lenfoma, özellikle kemiğe metastaz yapmış tümörler, tirotoksikoz ve uzamış immobilizasyon sayılabilir (2,66).

e. İdiyopatik hiperkalsiüri; belli bir etyolojik faktörün ortaya konmaması, normal serum kalsiyum düzeyine karşılık hiperkalsiüri saptanmasıdır (67,68,69). Sağlıklı insanların %5-10'unda ve kalsiyum taşı olan hastaların % 30-60'ında görülür (70,71).

### **2.3.1.2. Hipositratüri**

Sitrat idrarda en fazla bulunan organik anyondur. Genel olarak meyvelerle alınmaktadır ve günde idrarla 116-926 mg (0.6-4.8 mmol) gibi geniş bir oranda atılmaktadır (72). Günlük idrardaki sitrat miktarının 300 mg altında olması hipositratüri olarak adlandırılır (23,65). Hipositratüri kalsiyum taşı hastaların %15-%63'ünde görülmektedir (73). Kalsiyum taşı olan hastaların %20-60'ında hipositratüri risk faktörü olarak tanımlanmıştır. Hipositratürinin en önemli etyolojik nedeni asidozdur. İnflamatur barsak hastalıkları ve kronik diyarede alkali kaybı metabolik asidoza neden olur. Tiyazide bağlı hipopotasemi ve intrasellüler asidoz hipositratürinin diğer nedenleridir. Sitratın primer etki mekanizması; kalsiyum ile çözünürlüğü yüksek bir kompleks oluşturarak ca-okzalat ve ca-fosfatın spontan nükleasyonu, kristal büyümesi ve agregasyonuna engel olmasıdır (74). Ayrıca idrar pH'sını artırarak kalsiyum fosfat ve okzalat presipitasyonunu azaltır (46,75). Alkaloz, alkali diyet, vit D, büyüme hormonu ve PTH idrarda sitrat düzeyini artırır. Ca-okzalat taşlarının en önemli düzeltilebilir nedenidir. İdrarda sitrat, kadınlarda erkeklerden daha yüksek miktarda bulunur. Bu durumun kadınlarda taş hastalığını erkeklere göre daha az görülmesinin önemli sebeplerinden biri olduğu düşünülmektedir (23).

### **2.3.1.3. Hiperürükozüri**

Hiperürükozüri idrarda ürik asit miktarının 24 saatte 600-700 mg'dan fazla olmasıdır (23,65,74). Hiperürükozürinin en sık nedeni diyet ile aşırı miktarda pürin alınmasıdır.

İdrarda ürik asit kristallerinin bulunması kalsiyum oksalat kristallerinin oluşumu için çekirdek görevi görür ve heterojen nükleizasyona yol açar (23). Monosodyum urat idrarda bulunan taş inhibitörlerine bağlanarak kalsiyum oksalat kristalizasyonunu başlatabilmektedir (74,75,76). Hiperürükozürik kalsiyum taşı olan

hastaların, gut ve ürik asit taşı olan hastalardan farklı olarak idrar ürik asit düzeylerinin yanı sıra idrar pH'ları da artmıştır (32).

#### **2.3.1.4. Hipomagnezüri**

Magnezyum, oksalatla birleşerek idrarda çözünürlüğü CaOx'dan daha düşük olan bir madde oluşturmaktadır. Böylece idrarda CaOx saturasyonu düşmektedir. Magnezyum, in vitro kalsiyum oksalat kristal oluşumu ve büyümesini inhibe eder. Ayrıca magnezyum oral yolla alındığında oksalatın barsaktan emilimini azaltır. Hipomagnezürinin en önemli nedeni inflamatuvar barsak hastalıklarıdır. Yurtdışı bir çalışmada CaOx taş hastalığında hipomagnezemi oranı %4,4 bulunurken Türkiye'de bu oran %24,4 olarak saptanmıştır (23,65).

#### **2.3.2. Enfeksiyon (Strüvit/Magnezyum Amonyum Fosfat/Triple Fosfat) Taşları**

Magnezyum amonyum fosfat'dan oluşan strüvit taşları, üreaz enzimini bulunduran Proteus, Providensiya, Pseudomonas, Klebsiella ve Enterokoklar'la oluşan üriner sistem enfeksiyonlarında görülebilmektedir (2, 66). Üriner sistem taşlarının %10-15'ini oluşturan enfeksiyon taşları kadınlarda erkeklerden üç kat daha sık görülür (32,38,61,76). Strüvit taşları, magnezyum amonyum fosfat ve karbonat apatit'den oluşur. Üriner enfeksiyon varlığı, magnezyum amonyum fosfat kristallerinin doymuş olarak idrarda bulunması ve idrar pH'sının 7,2'nin üzerinde olması mekanizmayı tetiklemektedir (23,37,65,77). Mikroorganizmaların etrafında ve toplayıcı sistemde, kaliklerde ve pelviste strüvit ile beraber kalsiyum karbonat presipitatları oluşur ve genellikle kalikslerin yapısına benzer şekilde böbreğin tüm toplayıcı sistemini dolduracak şekilde geyik boynuzu (staghorn) taşlar oluşur (78).

#### **2.3.3. Ürik Asit Taşları**

Ürik asit pürin metabolizmasının son ürünü olup idrarla atılır. Normalde idrarın 1 litresinde 500-600 mg, günlük olarak 600-800 mg ürik asit atılır. Günde 750 mg'dan fazla atıldığında taş oluşum riski artar. Ürik asit kristalizasyonunun belirleyicisi idrar pH'sıdır. Ürik asit zayıf asittir ve pKa'sı 5.5'dir (79). Ürik asit taşları tüm taş hastalarının %5-10'unda görülürken diabetik taş hastalarında bu oran

%30-40'a kadar yükselmektedir (80). Bu olgularda insülin rezistansına sekonder olarak gelişen amonyum sentezindeki azalma, idrar pH'sını düşürerek ürik asit taşı oluşumunu artırmaktadır (32,81). Ürik asit taşlarının oluşması için gerekli şartlar;

Hiperürikozüri

Persistan idrar asiditesi (<5.5 pH)

Düşük idrar volümü

Hiperürisemi (olguların %50'de serum ürik asiti yüksektir) (2,37,66).

Fazla proteinli gıda alan ve alkol tüketiminin yoğun olduğu zengin, endüstriyel ülkelerde ürik asit taşları daha sıktır (23). İdrar miktarı azaldıkça günlük toplam çıkan ürik asit miktarı azalmakla beraber, litredeki konsantrasyonu daha yüksek hale gelir. Bu nedenle sıcak iklimlerde yaşayan dehidratasyonu olan insanlarda daha kolay ürik asit taşı oluşur(23). Serum ürik asit miktarı %7'nin üzerine çıktığında süpersatürasyon meydana gelir ve kristal formasyonu artar. Kandaki ürik asit %7-8 mg'ın üzerine çıkınca taş oluşmaya başlar (65).

Hiperürikozüri hastalarda kalsiyum oksalat taş riski artar. Ürik asit purinden oluştuğu için hiperürikozürinin en yaygın nedeni aşırı purin içeren diyetler (kırmızı et, balık ve kümes hayvanları). Serum ürik asit düzeyini artıran nedenler; gut, Lesch-Nyhan sendromu (hiperürisemi, gut, koreoa, mental retardasyon ve kişilik bozukluğu), myeloproliferatif hastalıklar, kemoterapiye bağlı tümör lizisi ve radyoterapi olarak sıralanabilir. Bu hastalarda %25 ürik asit taşı gelişme riski vardır. Aşırı şişman ve/veya alkol bağımlısı kişiler, salisilat ve probenesid gibi ilaç kullananlarda da hiperürikozüri görülür. Sekonder olarak da dışkı ile alkali kaybının asit idrara neden olduğu kronik diyare durumlarında ürik asit taşları görülür (38,70,76). İdrarın alkalizasyonu daha fazla ürik asidin ürata dönüşümüne neden olur ve dolayısı ile çökeltme riskini azaltır.

#### **2.3.4. Sistin Taşları**

Sistinüri nadir görülen otozomal resesif (2p,19q genetik defekt) bir hastalıktır (82). Sistin taşları sadece sistinürisi olan hastalarda görülür ve üriner sistemde taş oluşumu ile karakterize kalıtsal hastalıklar arasında en sık görülenidir



(23). Bütün taşların %1-4'ünü sistin taşları oluşturur (61). Sistin taşları dibazik amino asitler ve sisteinin reabsorbsiyonunu sağlayan transport proteinlerindeki genetik defekt sonucunda idrarla artmış lizin, ornitin, arjinin ve sisteinin atılımı sonucunda oluşmaktadır (83). Sistin diyetle alınabildiği gibi, metiyoninden dönüşümle de oluşabilir. Normalde idrarla günde 30 mg kadar sistin atılmaktadır. Homozigot tip sistinüri (şiddetli tip) idrar sistin düzeyi >400 mg, heterozigot tipde ise 100–400 mg. arasında saptanır. Sistinüride taş oluşumu ve buna bağlı komplikasyonlara daha çok 20-30'lu yaşlarda rastlanır (37). Tanıda çocukluk çağında taş öyküsü, sık tekrarlayan taş öyküsü, ailede taş öyküsü, kristalüri saptanması ve nitroprussid testi yararlıdır (2,66). Sistinin çözünürlüğü PH 7,5'den sonra hızlıca artmaktadır. İdrar pH'sını yükselten ve sistin çözünürlüğünü artıran ajanlar bu hastalarda tedavi seçeneklerindedir (32 ).

### **2.3.5. Ksantin Taşları**

Ksantin oksidaz noksanlığı ile karakterize, otosomal resesif kalıtım gösteren dogumsal metabolizma hastalığı sonucunda ksantin taşları görülebilir (84,85). Ksantinden ürik asit oluşamaz ve ksantin birikir, enzim eksikliği olan %25 olguda taş oluşmaktadır. Sarı renkte ve radyolüsendir. Tedavide sıvı artırılır, alkalizasyon, allopurinol ve purinden fakir diyet önerilir (2).

### **2.3.6. Diğer Taş Tipleri**

Adenin fosforiboziltransferaz enziminin konjenital defektine bağlı olarak dihidroksiadenin (86,87), triamteren alımına bağlı olarak triamteren (88), silica içeren antasitlere bağlı olarak silica, AIDS'li indinavir kullanan hastalarda indinavir (89,90) ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olarak amonyum ürik asit taşları oluşabilmektedir (2).

## **2.4. Hiperokzalüri**

Üriner sistem taşlarının içeriğine bakıldığında en sık görülen taşlar Ca-okzalat taşları olup ve idiyopatik Ca-okzalat taşları için en önemli risk faktörü de hiperokzalüridir. Khan ve ark. (12) yaptıkları deneysel çalışmada tavşanların içme sularını %0.25, %0.50 ve %0.75'lik etilen glikol içecek şekilde hazırladıklarında,

normal distile su ile beslenen kontrol grubuna göre üriner okzalat içeriğinin sırasıyla %62, %105 ve %206 oranında artmış olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada kristalüri ve renal papillalarda oluşan nefrolitiazis ile hiperokzalurik diyet arasında pozitif korelasyon bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan birçok çalışmada etilen glikol içeren diyetle beslenen hayvanlarda değişik oranlarda hiperokzalurü olduğu gösterilmiştir (13,14).

#### **2.4.1. Okzalat Metabolizması**

Plazma oksalat konsantrasyonu 1-2.4 mg/mL olup, idrarla atılımı günlük 17.5-35.1 mg'dır (72). Metabolizma içerisindeki okzalatın %10-15'i diyetle alınırken geri kalan %85-90'ı endojen kaynaklı okzalatır. Normal diyetle alınan okzalat 80-2000 mg olup bunun sadece %10-15'i incebarsaklardan emilirken geri kalanı kolonda bakteriyel çözünmeye uğrayarak dışkıyla atılır. Barsak lümeninde Ca'un varlığı emilen okzalat miktarını etkileyen önemli bir faktördür. Barsaktan emilen okzalat oldukça çözünür olup tamamı böbreklerden atılır. İdrarla günlük atılan okzalat miktarı 40 mg olup bu değerini üzeri hiperokzalurü olarak kabul edilir (19,23,65,76). Hiperokzalurü 3 nedene bağlı ortaya çıkar.

Artmış okzalat üretimi: Primer hiperokzalurü ve artmış karaciğer dönüşümü.

Artmış okzalat absorpsiyonu.

İdiyopatik hiperokzalurü (15).

Primer hiperoksalüri tip 1 (PH 1) glioksilat metabolizmasındaki defekt sonucu oluşan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Karaciğere spesifik peroksizomal, pridoksal fosfat bağımlı alanin glioksilat aminotransferaz (AGT) enziminin yokluğu veya düzeyinin düşük olması sonucu kan ve idrar oksalat düzeyi artar (77,78). Böbrek taşı, nefrokalsinozis ve böbrek yetmezliği klinik bulguları olup semptomlar erken yaşlarda görülür (32). Perkütan yolla fetal karaciğer biyopsisi ile veya koryonik villusların DNA analizi ile prenatal tanı konabilir, aksi halde fatal seyrederek ve genelde 20 yaşlarında hastalar yaşamlarını kaybederler.

Primer hiperoksalüri tip 2 (PH 2) ise daha az sıklıkta görülmesine rağmen, üriner sistemde daha çok taş oluşumu ile karakterize bir metabolik bozukluktur. PH 2, dokuzuncu kromozomda bulunan glioksilat redüktaz (GR)/hidroksipiruvat

redüktaz (HPR) genindeki mutasyon sonucunda GR/HPR enzim aktivitesi olan sitozolik bir proteinin düzeylerinde ve aktivitelerinde azalma ve oksalat birikimi ile karakterizedir (77).

Her iki tipte erken çocukluk çağında nefrokalsinozis, tubulointerstisyel nefropati ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) ortaya çıkar. Tedavisinde yüksek doz (200-400 mg) piridoksin verilerek üriner okzalata atılımı ve karaciğer üretimi azaltılabilir. Oral sitrat, tiazidler, nötral fosfatlar ve Magnezyum (Mg)-glukonat ile hiperoksalüri kısıtlı düzeyde önlenebilir. Bu hastalarda karaciğer transplantasyonu deneme aşamasındadır (9,11).

Artmış hepatik dönüşüm: En sık 3 durumda görülür:

Piridoksin eksikliği

Etilen glikol zehirlenmesi

Metoksifluran anestezisi

Piridoksin (Vitamin B6), gliokzalata glisine transaminasyonunda rol oynayan bir koenzim olup eksikliği durumunda aşırı biriken gliokzalata dönüşmektedir. Piridoksin eksikliğinin rat ve kedilerde hiperoksalüri ve okzalata taşlarına neden olduğu gösterilmiştir (12). Piridoksin eksikliği sadece hiperoksalüriye neden olmayıp ayrıca üriner kalsiyum atılımında artırmaktadır. Nörominidaz ve diğer lizozomal enzimlerin aktivitesini artırmaktadır. Nörominidaz enzimi glikozaminoglikan (GAG)'ların önemli bir üyesi olan sialik asiti yıkmak suretiyle üriner sitrat düzeyinin azalmasına neden olur. Sitrat, kalsiyum okzalata kristalizasyonunu inhibe eden en önemli ajanlardan biridir (16). Artmış hepatik dönüşüm nedeni diğer iki faktör nadir görülmektedir. Motorlu araçlarda sıvıların donmasını engellemek amaçlı kullanılan antifrizin yanlışlıkla alımında karaciğerde yüksek oranda okzalata dönüşmektedir. Yine bir inhalasyon anestezisi olan metoksifluranın uzun süre verilmesi durumunda karaciğerde okzalata yıkılıp hiperoksalüriye neden olabilmektedir (12).

Enterik hiperoksalüri: Hiperoksalürinin en yaygın nedenidir. Diyetle alınan oksalatın değişik barsak patolojileri (Crohn, ülseratif kolit, intestinal yağ emilim

bozukluğu) nedeniyle bağlanamaması ve serbest halde emilmesi sonucunda meydana gelir (80,81).

Hafif Metabolik Hiperokzalüri: Bir çok çalışma idiyopatik kalsiyum okzalat taşlarının patogeneğinde, hafif hiperokzalürinin en az hiperkalsiüri kadar önemli olduğunu bildirmiştir. Kalsiyum taşlı hastaların %0.3-50'sinde üriner okzalat atılımı artmıştır. Eritrosit anomalisi olan hastaların %50'sinden azında hafif metabolik hiperokzalürisi saptanması üzerine; okzalatın membrandan değişmiş transportu (okzalat olmadan hiperokzalüri olması) idiyopatik kalsiyum okzalat taşı etiolojisinde görülen en sık defekt olabileceği öne sürülmüştür. Hafif metabolik hiperokzalürisi olan hastalarda Piridoksinin, okzalat ekskresyonunu %50 azalttığı bilinmektedir (3).

İdiyopatik hiperoksalüri: herhangi bir barsak hastalığı olmaksızın artmış intestinal absorpsiyon olmasıdır. (79).

İdrardaki oksalat konsantrasyonu artışıyla ve kalsiyum ile süpersatürasyonunu etkileyerek kristal oluşumunu tetikler, taş oluşumunda anahtar rol oynar. Ayrıca oksalatın lipit peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikallerini artırarak, böbrek tubül hücre zedelenmesine ve böylece kristallerin büyümesi ve tubül epiteline tutunmasına aracılık ettiği de gösterilmiştir (58,75). Kristalizasyon üzerinde kalsiyuma göre okzalatın on kat daha güçlü etkisi vardır. Oksalattan zengin gıdalar çay, kahve, bira, ravent, kakao, çikolata, buğday kepeği ıspanak ve diğer yeşil sebzelerdir (37). Diyetteki Ca miktarının kısıtlanması barsaklarda oksalatın Ca'a bağlanmasını azaltır ve barsaklarda oksalat emiliminin artmasına neden olur. Ayrıca aşırı C vitamini alımında, hücre içinde askorbat oksalata çevrildiği için oksalat miktarı artabilir (65). Oksalat; glisin ve glioksilat yıkımının son ürünüdür.

#### **2.4.2. Hiperokzalürinin Oluşturduğu Renal Hasar**

Okzalat metabolizmanın doğal bir ürünüdür ve normal insanlarda zararsızca vücuttan atılır. Ancak okzalatın artmış üriner ekskresyonu olarak tanımlanan hiperokzalüri fizyolojik pH da kristalizasyona sebep olup böbrekte kalsiyum okzalat kristal birikimine yol açabilir. Bu kristaller renal tübüleri bloke ederek hücre fonksiyonları bozar ve hücre ölümüne yol açar. Hiperokzalüri hangi nedene bağlı

olursa olsun renal patolojik etkileri benzerdir: Ürolitiazis, nefrokalsinozis, metabolik asidoz, hematüri, pyelonefrit, hidronefroz ve renal yetmezlik (91).

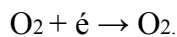
Okzalrat renal epitelyal hücrelerde düşük konsantrasyonlarda mitojenik etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda CaOx kristalleri oluşturarak toksik etki gösterir. Böbrekte CaOx kristal birikimi enflamasyonu başlatan ve fibrozise yol açan bazı makromoleküllerin senteziyle sonuçlanır (92,93). Hayvan çalışmalarında ve renal epitelyal hücre kültürlerinde hiperokzalüri ve CaOx kristal oluşumuna reaksiyon olarak serbest radikal formasyonu gösterilmiştir (94,95). Antioksidanlar hiperokzalüri ve CaOx kristal toksisitesini engeller (96,97).

## 2.5. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

En dış yörüngede eşlenmemiş bir elektronu bulunan molekül ya da molekül gruplarına “radikal” adı verilmektedir ve molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle gösterilir (R., R-). Oksijen 8 atom numaralı doğada dioksijen (O<sub>2</sub>) olarak bulunan kararsız bir elementtir. Oksijenin aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitalin birine ters dönüşlü iki elektron veya ikisine ters dönüşlü iki elektron daha gelirse “oksijen radikali” elde edilir (98).

### 2.5.1. Süperoksit Radikalleri (O<sub>2</sub>.)

Süperoksit radikalleri (O<sub>2</sub>.), hücrelerde redükte elektron taşıyıcılarının otooksidasyonu ile üretilmektedirler. Zayıf bir oksidan olan süperoksit radikalının kendi başına önemli hücre hasarlarına yol açması mümkün görülmemektedir. Ancak süperoksit radikalleri oksidatif strese yol açabilen bir dizi reaksiyonları başlatabilir (99). Süperoksit radikalleri çok kısa bir yarı ömre sahip olup dismutasyon reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve oksijen üretirler. Dismutasyon reaksiyonu spontan olarak meydana gelmekte ve reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenmektedir. O<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> demir varlığında etkileşerek oldukça reaktif olan hidroksil (HO.) radikallerini oluşturmaktadırlar.



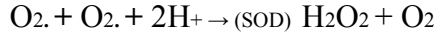
### 2.5.2. Hidroksil Radikalleri (HO.)

Hidroksil radikali (HO.), biyolojik sistemlerde bulunan en güçlü serbest radikaldir. HO. Radikalleri oldukça reaktif olup lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) gibi yapılarla reaksiyonlara girerek önemli hasarlara yol açabilmektedir (100).



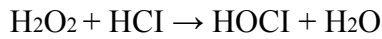
### 2.5.3. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektrona sahip olmadığından aslında bir radikal değildir. Ancak reaktif oksijen türleri içinde yer alır.



### 2.5.4. Hipoklorik Asit (HOCl)

Hipoklorik asit de radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) içinde yer almaktadır. Fagositik hücrelerin bakterileri öldürmesinde önemli rol oynarlar. Aktive olan nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller süperoksit radikallerini (O<sub>2</sub>·) üretirler.



### 2.5.5. Singlet O<sub>2</sub> (O<sub>2</sub>↑↓)

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmadığından serbest radikal değil ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattıklarından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir.

### 2.5.6. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

#### 2.5.6.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Mitokondriyal Elektron Transport Sistemi

Endoplazmik Retikulum

Redoks Döngüsü

Araşidonik Asit Metabolizması

Fagositoz

Otooksidasyon

Oksidan Enzimlerin Reaksiyonları

### **2.5.6.2. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları**

Radyasyon

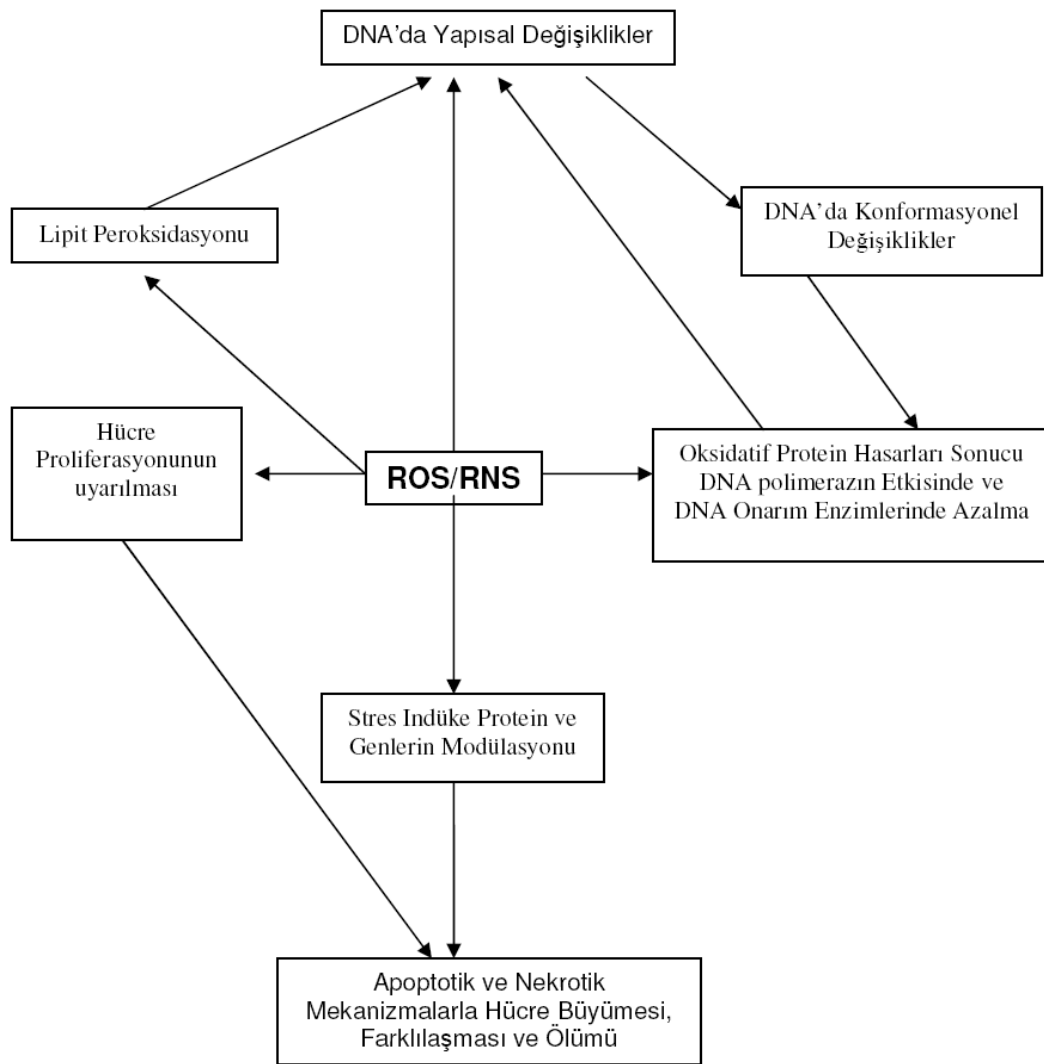
Sigara dumanı

Zehirli gazlar

Bazı ilaçlar

Kanserojen maddeler

Pestisitler (101).



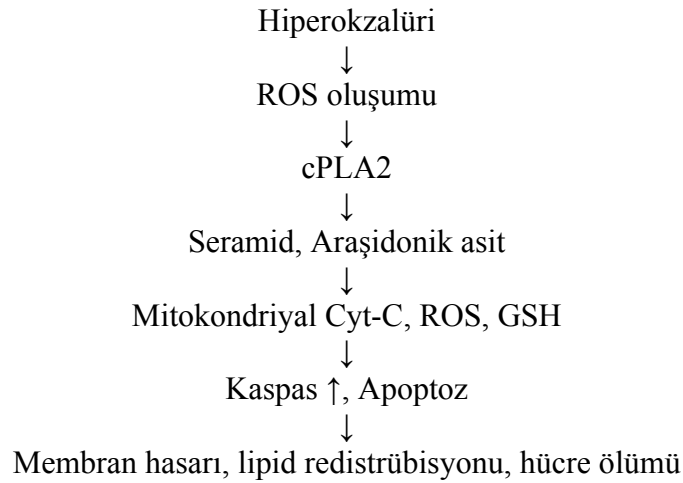
**Şekil 1.** Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (ROS veRNS) vücuttaki etkileri (Topal U, Yeni E, Taş hastalarında böbreğe ESWL uygulanmasının oksidatif stres indeksine etkisi. Üroloji uzmanlık tezi, Harran Üniversitesi 2009).

## 2.6. Hiperoksalürinin İndüklediği Oksidatif Stres

Son çalışmalarda taş hastalarında böbrekte oksidatif stres (OS) geliştiği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinin sonuçları göstermiştir ki CaOx böbrek taşı hastaları idrarlarında önemli oranda fazla miktarda alfa glutatyon S transferaz (alfa-GST), malondialdehit (MDA) ve tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) ekskrete etmektedir. Bu da böbreklerdeki OS in göstergesidir (102). Aynı çalışmada beta galaktozidaz (GAL) ve N-asetil-beta glukozaminidazın (NAG) üriner ekskresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Bu enzimlerin üriner ekskresyonu renal epitelyal hasarın göstergesidir. Benzer şekilde başka bir güncel çalışmada taş



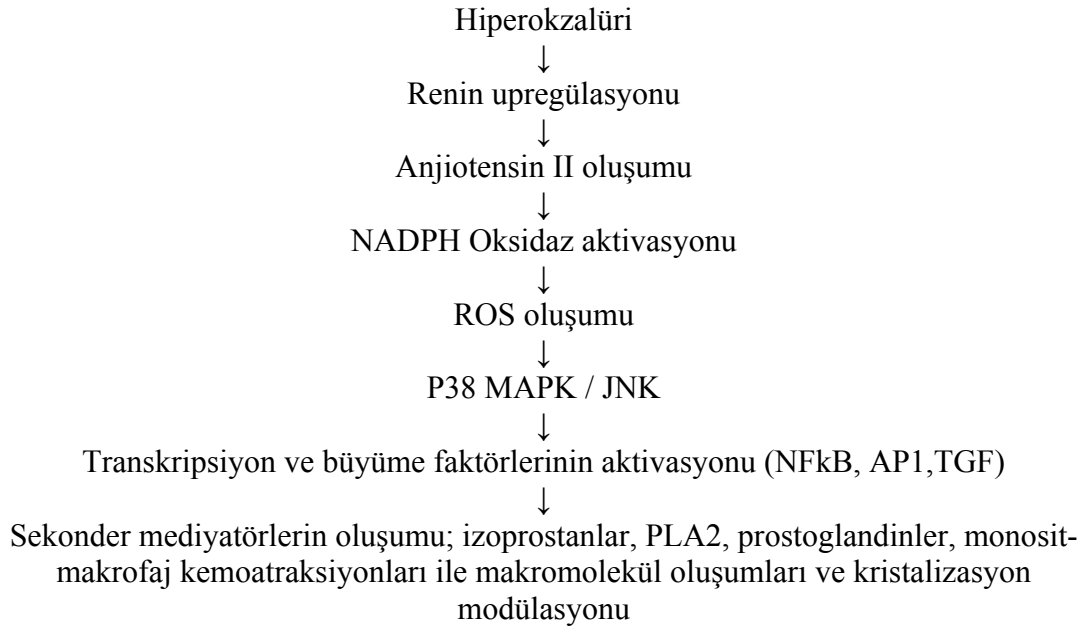
hastalarının artmış oksidatif stres ve renal tübüler hücre hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (103). Normal kontrollerle karşılaştırıldığında taş hastalarında daha yüksek plazma MDA, üriner MDA ve daha yüksek üriner NAG aktivitesi görülürken; daha düşük redükte glutatyon (GSH) ve hücresele glutatyon peroksidaz (cGPx) aktivitesi, protein tiol ve vitamin E görülür.



**Şekil 2.** Hiperokzalürinin indüklediği hücresele hasarda mitokondriyal olaylar (Khan SR. Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urol Res* 2005; (33): 349-357).

### 2.6.1. Hiperokzalürinin İndüklediği ROS Oluşumunda Sinyal Yolları

Ox ve CaOx kristallerinin yüksek konsantrasyonları renal hücreleri de uyarak inflamatuvar yolağın çeşitli mediyatörlerinin, ekstrasellüler matriks oluşumunun ve kristalizasyon modulatörlerinin artışına yol açar (92,93,104). Reaktif oksijen türleri protein kinaz C (PKC), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojen aktive protein kinaz (MAPK) gibi sinyal moleküllerini aktive ederek NF-kappa B ve aktive protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini etkiler. Bu transkripsiyon faktörlerinin uyarılması gen upregülasyonuna ve OPN, bikunin ve alfa-1-mikroglobulin gibi kristalizasyon modulatörlerinin üretimine yol açar (92,93,104). Bunlar da nefrolitiazisin kristal formasyonu, büyümesi, agregasyonu ve böbreklerde birikimini içeren tüm görünümünü etkiler.



**Şekil 3.** Hiperokzalürinin indüklediği ROS oluşumu ve bunların hücrel fizyoloji ve patoloji üzerine etkisini gösteren şema (Khan SR. Hyperoxaluria-induced oxidative stres and antioxidants for renal protection. Urol Res 2005; (33): 349-357).

## 2.7. Renal Korunma İçin Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemi” adı verilen birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Savunma sistemlerini serbest radikal tutucuları ve bazı enzimler oluşturmaktadır.

### 2.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz

Katalaz

Glutasyon Peroksidaz

Glutation-S-Transferazlar

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

## 2.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Askorbik Asit

$\beta$ -Karoten

Vitamin E ( $\alpha$ -Tokoferol)

Transferin ve Laktoferrin

Seruloplazmin

Albümin

Ürik Asit

Bilirubin

Polifenoller (105).

### 2.7.2.1. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan yararlı biyokimyasal ve antioksidan etkileri olan bileşiklerdir. 15 C atomlu 2 fenilbenzopiron (difeniil propan) yapısı gösterirler (106). Bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak adlandırılırlar. Yapısal olarak genellikle CS-C3-CS karbon iskeleti ve A, B, C halkaları vardır. Flavonoidler moleküler yapılarına göre başlıca antosiyoninler, flavanlar, flavanonlar, flavonlar, flavonoller ve isoflavonoidler şeklinde sınıflandırılır. Yaklaşık olarak 4000'den fazla flavonoid türü belirlenmiştir (107). Flavonoidler başlıca sebzeler, meyveler, kırmızı şarap, çay, soğan baklagillerde bulunur ve çoğu çiçeklerin, meyvelerin rengini verir (108). Flavonoidlerin en önemli etkilerinden birisi serbest radikalleri temizleme özellikleridir (107). Serbest radikallerin üretim artışı endojen temizleyici bileşiklerin (süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler) kullanılıp azalmasına yol açar. Hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanmış özelliği antioksidan kapasiteleridir ve flavonoidlerin direkt radikal temizleme özellikleri vardır (107,109,110).

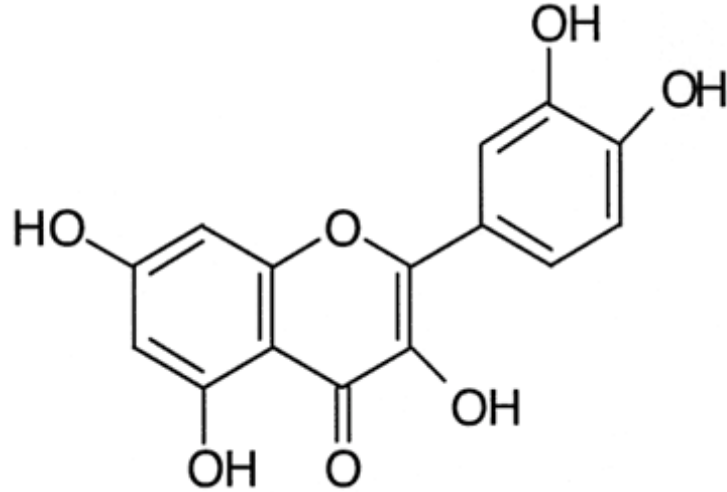
Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme özelliklerine ilave olarak antiinflamatuar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik, antiaterosklerotik,

anatitümöral etkileri içeren çeşitli biyolojik özellikleri de vardır (107,109,110). Flavonoidler, XO (ksantin oksidaz), fosfolipaz-A2, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellik gösterirler.

Flavonoidlerin kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkileri epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir ve flavonoid alımının mortalite ile ters ilişkili olduğu bulunmuştur. Radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada flavonoidlerin etkin bir rol oynayabileceği düşünülebilir (107,109).

#### **2.7.2.1.1. Kuersetin**

Kuersetin (3, 3', 4', 5,7- pentahidroksiflavon), birçok bitki ve bitkisel besin kaynaklarında yaygın olarak bulunan bir bioflavonoidtir. Sık tüketilen yiyeceklerin çoğunda; elma, soğan, çay, kiraz ve çilek gibi yumuşak kabuklu meyveler, lahana, brokoli gibi yeşil yapraklı sebzelerde, domates, yeşil çay, yeşil bezelyede, çoğu tohumda, yemişlerde, çiçekler, kabuklar ve yapraklarda, kırmızı şarapta hatta medikal bitkiler; Ginkgo biloba, hypericum perforatum (St. John's Wort), Sambucus canadensis (Elder)'de bulunmaktadır. Flavonoidler ve kuersetin gıdalarda genellikle glikozid şeklinde bulunan büyük molekülü yapılarıdır. Bu özelliklerinden dolayı barsaklarda emilmeleri zordur. Gastrointestinal sistemde serbest fenolik kısım ayrılır (107). Çünkü bunların barsaktan emilebilmesi için küçük molekül ağırlıklı formlara dönüşmeleri gerekir. % 98 oranında proteinlere bağlı olarak taşınır. Plazma seviyesi 20-40 dakikada çok azalır, 54 dakikada tespit edilemeyecek seviyeye düşer (111). Barsaklarda bulunan mikroorganizmalar, flavonoid glikozidlerinin çözülmesini gerçekleştirirler. Yaklaşık %1'i bozulmadan, büyük bir kısmı ise çeşitli hidroksi aromatik asitlere dönüştürülerek böbreklerden atılır. Kuersetinin distribüsyon yarı ömrünün 3.8 saat, eliminasyon yarı ömrünün 16.8 saat olduğu bildirilmiştir (110). Kuersetinin 3. ve 4. pozisyonlarda bir şeker grubu içeren iki farklı formu vardır. Kuersetinin 3. pozisyonunda şeker grubu içeren 3-O- $\beta$ -glucosid formu 4. pozisyonunda bir şeker grubu içeren 4'-O- $\beta$ -diglukosid formuna göre doğada daha yaygın olarak bulunmaktadır (112).



**Şekil 4.** Kuersetinin kimyasal yapısı (Han, D-H., Tachibana, H., Yamada, K.: Inhibition of Environmental Estrogen- Induced Proliferation of Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells by Flavonoids. *In Vitro Cell Developmental Biology-Animal* 37, 275-282, (2001).)

Kuersetin insan diyetinde major bioflavonoiddir. Günlük diyetle alınan miktarın 25-1000 mg olduğu tahmin edilmektedir (113). Total alımın %61'ini çayın oluşturduğu saptanmıştır (114). Özellikle soğanda 200-600 mg/kg gibi yüksek değerlerde olduğunu gösterilmiştir.

Kuersetin hücrelerde serbest oksijen radikallerinin oluşumunu önler ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlar (115). Ayrıca antibakteriyal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik etkileri vardır (116). Kuersetinin anti-kanser aktivitesi, protein tirozin kinazları baskılayarak, tümör hücrelerinin apoptozunu uyarak, DNA sentezi ve farklı insan karsinoma hücrelerinde hücre büyümesini baskılayarak, sinyal iletim yollarını down-regüle ve modifikasyon ederek gerçekleşir.

Kuersetin apoptozu indükler, tümör gelişimini engeller, fosfolipaz A2 ve protein kinazları inhibe eder, membran akışkanlığını artırır. Kuersetin farelerde eritrosit membranlarını oksidatif hasara karşı korur (117). Kuersetin gibi flavonoidler lipid peroksidasyonunu engellerler, NO (nitrik oksit) seviyesini artırarak vazodilatasyona neden olurlar. Engellenen lipid peroksidasyonu ve artan NO seviyesiyle birlikte meydana gelen vazodilatasyon ateroskleroza ve kardiovasküler hastalıklara karşı koruma sağlar (118). Motoyama ve ark., fareler üzerinde yaptıkları çalışmada uyguladıkları kuersetinin farelerdeki aterosklerotik alanların gelişimini

inhibe ettiğini belirtmişlerdir (119). Kuersetin hücre döngüsünü düzenler, tümör gelişimini inhibe eder, göğüs kanseri, kan kanseri ve kolon kanseri gibi pek çok kötü huylu kanser türünde ısı şok proteinlerinin üretimini inhibe eder. Ras protoonkogenindeki mutasyon diğer pek çok tümör tipinde olduğu gibi kolon kanserlerinin de %50'sinden fazlasında gözlenmiştir, kuersetin p21-ras onkogeninin ekspresyonunu inhibe ederek anti-tümör aktivitesi gösterir (120).

Kuersetinin de arasında bulunduğu flavonoidler LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) oksidasyonunu engelleyerek ve de NOS (nitrik oksit sentaz) aktivitesini takiben vazodilatasyona neden olan NO (nitrik oksit) seviyesini arttırarak atherosklerotik lezyonların ilerlemesini engellerler (121). Antioksidan özellikleri fenolik bileşiklerin reaktivitesinden kaynaklanmaktadır. Bu yolla serbest radikal türlerini daha az reaktif olan fenoksi radikallere dönüştürmektedirler (122).

Kuersetinin hücre büyümesini (123), glikolizisi (124), laktat dehidrogenaz salınımını (125), nitrik oksit üretimini (126), mRNA indüklenmesini bloke eden metallothionein'i (127) ve makromolekül sentezini inhibe ettiği gözlenmiştir (128). Kuersetin, hücre döngüsünü uygulanan hücrenin tipine bağlı olarak kontrol noktalarında durdurarak (129,130) ve apoptozisi indükleyerek (131,132) malignan tümör hücrelerinin büyümesini inhibe edebilmektedir. Lösemi hücreleri (133), meme kanseri (131), kolon adenokarsinoması (134), prostat kanseri (135) ve endometriyal kanser (136) gibi insan kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Reseptör kinazlar, protein kinaz C, siklin-bağımlı kinazlar (Cdk) ve MEK-ERK sinyal iletim yoluyla etkileşebilmektedir (137, 138,139). Kuersetin güçlü bir mutajendir (140). DNA'ya bağlandığında tek zincir kırıklarına (141), DNA da yeniden düzenlenmelere (142) ve kromozomal hasara neden olabilmektedir (143).

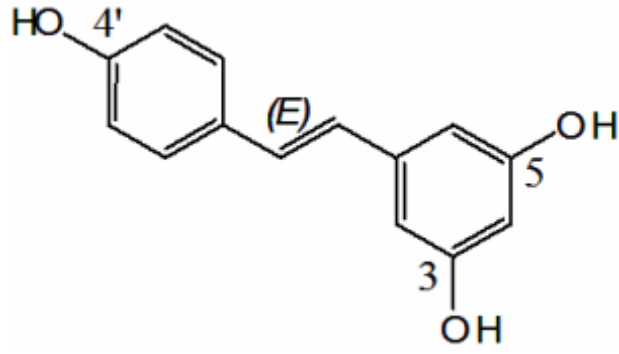
Kuersetin'in anti-inflamatuar etkisi ise, inflamasyon oluşturan enzimler (cyclooxygenase, lipoxygenase) üzerine baskılayıcı etkisinden ileri gelir (144, 145). Glukozun sorbitole dönüşümünü katalizleyen aldoz redüktaz enzimi, göz için önemli olup, diyabetik katarakt oluşumunda rol oynar. Kuersetin insan lens aldoz redüktaz'ın etkili bir inhibitörüdür (146).

Kuersetin kompleman aktivasyonunu ve endoteldeki inflamatuvar hücrelerin adhezyonunu azaltır ve bu inflamatuvar cevapta azalma ile sonuçlanır. Kuersetinin bir başka etkisi peroksidasyon salınımının redüksiyonudur. Bu redüksiyon nötrofiller yolu ile ve  $\alpha$ 1-antitripsin aktivasyonu interferansı yoluyla ROS'un oluşumunu inhibe eder. Nötrofiller için de proteolitik enzimlerin progresif inaktivasyonu tanımlanmıştır. Kuersetinin enzim sistemleri üzerine diğer bir ilginç etkisi araşidonik asit metabolizmasını inhibe etmesidir. Bu sonuç kuersetine antiinflamatuvar ve antitrombojenik özellik kazandırır. Araşidonik asit salınımı genel inflamatuvar cevabı başlatır. Nötrofiller arşidonik asitten kemotaktik bileşikler üreten lipooksijenazı içerirler (147,148).

Kuersetin gibi flavonoidler Vit. C ve Vit. E 'den daha etkili antioksidanlardır. Kuersetin hidroksil radikali, peroksil ve süperoksit anyona karşı diğer flavonoidlere kıyasla en yüksek seviyede antiradikal özellik sergiler (149). Kuersetin, ksantin oksidaz aracılığıyla süperoksit anyon üretimini inhibe eder (150), singlet oksijen ve hidroksil radikallerini temizler (151). Peroksil radikalini ve alkoksil radikalini yakalar ve lipid peroksil zincirini kırar (152), siklooksigenaz ve lipoksigenaz enzim aktivitelerini inhibe eder (151), demir ve bakır gibi geçiş metallerini şelatlar (153), laktat transportunu engeller (154), Vit. C absorpsiyonunu artırır (155). Kuersetinin bu özellikleri yapısındaki 3 aktif kimyasal grubun varlığından kaynaklanır. Bu gruplar B halkasındaki o-hidroksil (katekol) yapısı, 4-oxo fonksiyonu ile konjugasyondaki 2, 3 çift bağ ve her iki 3- ve 5- hidroksil gruplarıdır (149).

### 2.7.2.1.2. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-trihidroksistilben, C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>, M.A: 228,25 gram) kimyasal olarak flavonoid yapıda, polifenolik, steroid olmayan bir bileşik olup östrojen benzeri biyolojik aktiviteye sahiptir. Resveratrol üzüm, dut, çam, yer fıstığı, yaban mersini çay, ananas, taze meyve ve sebzelerde bulunduğu gösterilmiştir (156,157, 158). Ancak en iyi kaynağının üzüm olduğu ve en yüksek oranda renkli üzümlerde bulunduğu tespit edilmiştir. Asıl kaynağı Vitis Vinifera, Labrusca ve Mucadine üzümüdür. Resveratrolün üzümün kabuğunda yüksek bir derişimde olduğu tespit edilmiştir. Resveratrolün bitkilerce patojenlere karşı bir savunma mekanizması olarak sentezlendiği gösterilmiştir (159, 160, 161,162).



**Şekil 5.** Resveratrolün kimyasal yapısı (Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A, Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999;25:115-120)

Resveratrolün cis ve trans izomerleri mevcuttur. Üzüm ekstralarında cis formu bulunmamaktadır. Kırmızı üzüm kabuğu ile birlikte fermentasyona uğratıldığı için kırmızı sarapta yaklaşık 5 g/l bulunmasına rağmen beyaz sarapta çok daha az miktarda bulunur. Bunun sebebi olarak beyaz sarap yapımında kabukların ayrılarak üzümün fermentasyona bırakılması gösterilir (163). Literatürde *Poligonum Cuspidatum* ismiyle anılan ve Japonya’da Kojoto olarak bilinen doğal ilacın köklerinde de resveratrol tespit edilmiştir. Fransızlarda yüksek yağlı beslenmeye rağmen koroner kalp hastalığına düşük oranda rastlanması Fransız paradoksu olarak adlandırılmış ve kırmızı şarap tüketiminin dolayısıyla resveratrol tüketiminin fazla olmasına bağlanmıştır (164).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda oral olarak verilen resveratrolün barsaklardan hızla absorbe edilip sistemik dolaşıma girdiği yaklaşık 15-30 dakika sonra plazmada en yüksek konsantrasyona ulaştığı, kalp ve karaciğere yüksek afinite gösterdiği (165) ve yarı ömrü yaklaşık 1,5 saat olan glukuronidlere metabolize edildiği gösterilmiştir (166). Sıçan perfüze ince barsaklarında yapılan bir çalışmada resveratrolün biyoyararlanımı % 20.5 olarak bulunmuştur (167). Sıçanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre oral alınan resveratrolün plazmadan eliminasyon yarı ömrününün 12-15 dakika olduğu gösterilmiştir (166,168,169).

NFKB inhibisyonu, siklooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, NO oluşumu ve salınımının engellenmesi gibi başlıca üç nokta ile antiinflamatuvar bir etki ortaya çıkar. NO, NOS enzimi ile sentezlenen bir maddedir. i NOS monosit ve makrofaj gibi birçok hücrede bulunmakta ve yüksek düzeylerde NO salınımını sağlamaktadır.



NO iskemi - reperfüzyon, akut – kronik inflamasyon, vazodilatasyon gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alır. Ateroskleroz, sepsis, artrit ve diabet patogenezinde fazlaca olusan NO'in peroksinitritlere dönüserek sitotoksik etki gösterdiği ve DNA'da hasarlanma olusturarak mutajenik ve kanserojenik etkilere yol açabildiği gösterilmiştir. Patolojik durumlarda iNOS artarak, fazlaca NO salınımına neden olmaktadır. Proinflamatuvar ajanlar TNF $\alpha$ , IL-1, LPS'ler bu salınımı daha da artırmaktadır. LPS ile ortaya çıkarılan iNOS aktivitesi resveratrol ile belirgin olarak baskılanmıştır. Resveratrolün LPS ve TNF $\alpha$  ile uyarılan NF $\kappa$ B aktivitesini ve de NO salınımını baskıladığı gösterilmiştir (170). Resveratrolün antiinflamatuvar aktivitesinin proteazlar, kompleman sistemi, bradikininler, NO, sitokinler, adezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi inflamasyondan sorumlu tutulan maddelerin oluşumunu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir (171,172). Bir çalışmada invitro olarak üretilen TNF- $\alpha$ , interlökin 1 $\beta$  ve interlökin 6'nın resveratrol ile baskılandığı gösterilmiştir (173). İnvitro bir çalışmada trans-resveratrolün naturel killer hücrelerinin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T lenfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü gösterilmiştir (174). Fare karaciğer perfüzyon modeli ve böbrek perfüzyon modelinde (175) resveratrolün tirozin kinaz aktivitesini inhibe ederek, permeabiliteyi azalttığı ve antiinflamatuvar etki gösterdiği düşünülmüştür.

Resveratrol, güçlü bir antioksidandır. En çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden daha etkilidir. RES; OH. ve O<sub>2</sub> .- radikallerini süpürür, OH. radikalinin neden olduğu lipit peroksidasyonu inhibe eder, OH. ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in neden olduğu DNA hasarını önler. Protein oksidasyonunu engeller. Serum antioksidan kapasitesini artırır (176). RES, düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanarak lipoprotein peroksidasyonunu inhibe eder. RES'ün serbest radikal süpürücüsü ve enzim düzenleyici özelliklerinden dolayı oksidatif stresin neden olduğu çeşitli böbrek hasarlarına karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (177). Nöronal oksidatif stres ve nöroblastoma hücrelerindeki mitokondriyel hasara karşı koruyucudur (178). Resveratrolün bakır selasyon kapasitesi yüksektir. LDL'nin de bakır bağlama kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Resveratrolün bakır selasyon kapasitesinin yüksekliği, antioksidan özelliği ve radikal süpürücü etkisi birbirleri ile örtüşmektedir (179). Bakır ile uyarılan lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisini; "epicatecin", "catechin" ve "quercetin" gibi başka fenollerle karşılaştırıldığı bir

çalışmada resveratrolün daha potent bir madde olduğu bulunmuştur (180). Serbest radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir. Bir çalışmada resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur (181). Resveratrolün koroner damar hastalıklarına karşı koruyucu etki mekanizmalarının çözülmesinde; düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyici etkisinin bulunması, çok önemli bir dönüm noktası olmuştur (182). Orta serebral arterin tıkanmasıyla oluşturulan lokal beyin iskemisinde resveratrol tedavisinin infarkt olusan alanı azalttığı gösterilmiştir. Bunun ise antitrombosit, damar gevsetici ve antioksidan özelliklerine bağlı olabileceği belirtilmektedir (183). Kronik etanol kullanımının beyin dahil bir çok organda reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyonu ile oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir. Bir çalışmada dopaminerjik nöronal hücreler olan PC12 hücrelerinde; etanolün lipid peroksidasyonunu artırarak hücre ölümüne yol açtığı, ancak resveratrol verilirse etanolün bu etkilerinin oluşmadığı gözlenmiştir (184).

Resveratrol hücre farklılaşmasını inhibe ederek kanserin ilerlemesini kontrol altına alabilmektedir. Resveratrolün maymun deri kanseri modelinde preneoplastik lezyon gelişimini ve tümör oluşumunu engellediği gösterilmiştir (185). Resveratrolün insan meme epitel hücresinde zaman ve doz bağımlı olarak proliferasyonu durdurduğu gösterilmiştir (186). Resveratrol tedavisi ile COX oluşumunun protein kinaz C yolu üzerinden inhibisyonu ile yasayabilir hücre sayısının azaltıldığı ve hipertrofi gelişiminin önlendiği gösterilmiştir (186). Bir çalışmada prostat spesifik antijen proteini ve mRNA'sında resveratrolün inhibitör etkileri tespit edilmiştir (187). Baksa bir çalışmada ise resveratrolün lenfoblast hücrelerinde apoptozisi artırdığı bilinen p53 aktivitesini ve p53 protein artışı bariz şekilde artırdığı ortaya konmuştur (188). Yapılan bir çalışma insan meme kanseri hücrelerinde dioksin ve benzopirinlerin arilhidrokarbon (sitokrom P450) aracılı kanserojenik etkilerinin resveratrol ile azaltılabildiğini göstermiştir (189). Resveratrolün kalsiyum fosfatidilgliserin ile uyarılma sonucu artan PKC aktivasyonunu belirgin baskıladığı gösterilmiştir (182). NFkB'nin karsinojenik etkileri dışında inflamatuvar ve hücre büyümesini düzenleyici etkileri vardır. Tümör oluşumu ve metastazında NFkB'i aktive ederek etki gösteren AP-1'dir. Bir çalışmada NFkB ve AP-1'in resveratrol tarafından çok bariz baskılandığı ortaya konulmuştur (190). Birçok insan

kanserlerinde NOS aktivitesinin arttığı da bilinmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada LPS ile uyarılmış peritoneal eksuda makrofajlarının NO oluşturmaları resveratrol ile baskılanmıştır. Ayrıca DNA sentezini baskıladığı, apoptozisi indüklediği ve hücre siklusunda hücreleri G0/G1 fazında durdurma gibi etkileri saptanmıştır (191).

Resveratrol trombin ve ADP ile aktive edilmiş olan trombosit adezyonunu anlamlı olarak inhibe etmektedir. Etki mekanizması olarak ise agregasyon aşamasında artmış olan hücre içi kalsiyum miktarını azaltması gösterilmiştir. Buna benzer bir çalışmada ise kollajen, trombin ve ADP ile uyarılmış olan insan trombosit agregasyonunun resveratrol ile inhibe edildiği ve oluşan Tromboksan A2 miktarının anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (192).

Resveratrolün vazodilatatör etkisinin nitrik oksit antagonizması yolu ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Resveratrolün damar tonusunu düzenleme, endotel fonksiyonunu sürdürme gibi etkileri tespit edilmiştir (193).

Resveratrolün kardiyovasküler sisteme etkileri ve etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Resveratrolün uyarı sonrası damarda doku faktörlerinin ve sitokinlerin artısını anlamlı olarak baskıladığını gösterilmiştir (194). Ateroskleroz patogenezinde plazma ve matriks proteinlerinin önemli rolleri vardır. Resveratrolün kardiyovasküler yararlı etkilerinden vasküler “remodeling”in önlenmesinin sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (195). Aterosklerozda endotel fonksiyonlarının bozulduğu; NO salınımının azaldığı ve endotelin-1 (ET-1)’in oluşumunun ve salınımının arttığı bilinmektedir. İnsan aortik düz kas hücreleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildiğinde prepro ET-1 mRNA’sında artış olduğu ve ET-1 proteinindeki artışın oksidatif hasar için işaret olarak kullanılabileceği bildirilmektedir. Resveratrol prepro ET-1 mRNA’sındaki ve ET-1 proteinindeki artışı anlamlı olarak inhibe etmiştir (196). Resveratrol fibrinolitik proteinlerin düzeyini artırarak fibrinolitik aktiviteyi artırır ve koroner kalp hastalıklarındaki koruyucu etkilerinde bunun katkısı olduğu düşünülmektedir (197). Adenozin kendine özgü reseptörlere bağlanarak hücre içi protein kinazları aktive eden ve kalsiyum hareketlerini düzenleyen çok kısa yarılanma ömrüne sahip nükleotiddir. Egzersiz, doku hipoksisi, dipridamol verilmesi adenozin nükleotidlerin hücresel alınımını artırmaktadır. Oral olarak verilen tek doz

resveratrolün (1.5mg/kg) kan adenozin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (198). İskemi öncesi verilen resveratrolün ise iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği, bunu da adenozin salınımını artırarak yaptığı sıçan kalbinde ortaya konmuştur (199).

Sıçanlarda hiperokzalüri modelinde sağlanan oksidatif stres hasarı ve enflamasyonda biyokimyasal ve histopatolojik parametreler belirlenerek antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanser etkileri içeren geniş ve çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip olan polifenollerden kuersetin ve resveratrolün profilaktik olarak kullanılmasının hiperokzalürinin yol açtığı nefrolitiazis ve nefrokalsinoziste muhtemel koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanlar laboratuvarından sağlanan, ağırlıkları 250 -300 gram arasında değişen 4 aylık, 32 adet, erkek, Wistar-Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar deney öncesinde laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmış olup yem ve su tüketimleri sınırlandırılmamıştır. Deneysel çalışma için ratlar randomize olarak bir adet kontrol grubu (n:8) ve üç adet çalışma grubu (n:8) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Sıçanlara ilaç ya da çözücü uygulaması, 16.00-17.00 saatleri arasında yapılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan İlaçlar

Etilen glikol

Kuersetin

Resveratrol

Etilen glikol içme suyu ile %1'lik çözeltileri hazırlanarak kontrol grubu hariç sıçanlara 5 hafta süreyle içme suyu olarak verildi ve ad libitum beslenme yapıldı (92). Grupların olduğu kafeste verilen içme suyu günlük olarak kontrol edildi. Kuersetin ve resveratrolün günlük olarak içme suyu ile hazırlanan çözeltileri 10 mg/kg/gün olacak şekilde uygulandı.

#### 3.3. Deney Grupları

**1. Grup I:** Standart Yemle beslenen gruptur (Kontrol grubu, n=8). Ortalama ağırlıkları 254 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. Bu grup deney sonunda başlangıçtaki sayılarını korumuştur. Standart diyet (pellet yem) ile 5 hafta süresince beslenmişlerdir.

**2. Grup II:** İçme suyuna karıştırılan % 1 etilen glikol (EG) ile hiperoksalüri oluşturulan gruptur (n=8). Ortalama ağırlıkları 262 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. Etilen glikol sıçanların günlük içme suyuna karıştırıldı ve ad libitum beslenme yapıldı. Grupların olduğu kafeste verilen içme suyu günlük kontrol edildi.

**3. GrupIII:** İçme suyuna karıştırılan % 1 EG ile birlikte oral olarak gavaj yoluyla günlük 10 mg/kg kuersetin verilen gruptur (n=8). Ortalama ağırlıkları 259 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. 10 mg/kg kuersetin 1 ml su içinde dilüe edilerek 5 hafta süreyle her gün saat 16:00-17:00 arasında gavaj yoluyla verildi. Gruptaki ratların ağırlıkları her hafta kaydedildi. Verilecek doz grubun ortalama ağırlıklarının haftalık ölçümleri ile ayarlandı.

**4. Grup IV:** İçme suyuna karıştırılan % 1 EG ile birlikte oral olarak gavaj yoluyla günlük 10 mg/kg resveratrol verilen gruptur (n=8). Ortalama ağırlıkları 258 gr olan ratlardan oluşturulmuştur. 10 mg/kg resveratrol 1 ml su içinde dilüe edilerek 5 hafta süreyle her gün saat 16:00-17:00 arasında gavaj yoluyla verildi. Gruptaki ratların ağırlıkları her hafta kaydedildi. Verilecek doz grubun ortalama ağırlıklarının haftalık ölçümleri ile ayarlandı.

### 3.4. Kan Örneklerinin Alınması

Deney gruplarındaki ratlar, 5 haftalık çalışma süresi sonunda, sabah açlığında 10 mg/kg Xylazine HCl ve 90 mg/kg Ketamin HCl intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi altına alınmış, daha sonra 5ml'lik heparinli enjektörlerle kan vena cava inferiordan alınarak heparinli tüplere aktarılmıştır. Kan örnekleri soğutmalı ortamda 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrılarak 1.5 ml'lik endorf tüplere alınmıştır. Plazma örneklerinde BUN, kreatinin ölçümleri için her hangi bir ön işleme tabi tutulmaksızın analiz zamanına kadar -80° C'de bekletilmiştir. Okzalat ölçümü yapılacak olan plazma numuneleri ise deproteinizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Deproteinizasyon işleminde plazma örnekleri 1 ml plazma başına 12 M'lık HCl çözeltisinden 10 µl ilave edilerek 5000 g'de 10 dakika santrifüjlenerek protein fraksiyonu ayrılmıştır. Santrifüjleme sonrası oluşan süpernatant kısımları ayrı bir endorf tüpe alınarak -80° C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.5. İdrar Örneklerinin Toplanması

İlaç verilmeye başlamadan önce (0. gün) ve ilaç verilmesini takip eden 15. ve 30. günlerde hayvanlar metabolik kafeslere yerleştirilerek 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Toplanan idrar örneklerinin hacimleri belirlendikten sonra 1500 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan idrar sedimentinden 1 damla lam

üzerine alınarak mikroskopik incelemesi yapıldı. İdrar örnekleri tekrar homojen hale getirmek üzere alt üst edildikten sonra 2 ml'lik ependorf tüplere alındı. Okzalit tayini yapılacak olan idrar örneklerine 12 M'lık HCl'den mL başına 10 µl ilave edilerek asidifiye edilmiş ve analiz zamanına kadar -80° C'de muhafaza edilmiştir. İdrar kreatinin, kalsiyum, magnezyum ve ürik asit analizleri için her hangi bir ön işleme tabi tutulmadan analiz zamanına kadar -80° C'de bekletilmiştir.

### **3.6. Doku Örneklerinin Toplanması**

Sıçanlar 5 haftalık deney süresi sonunda sakrifiye edilerek her iki böbrek dokusu hızlıca eksize edildi. Sıçanların sağ böbrekleri tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit içine alındı. Sıçanların sol böbrekleri ise soğuk % 0.9'luk sodyum klorür çözeltisiyle yıkandı ve homojenizasyona kadar -80°C' de saklandı.

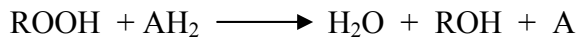
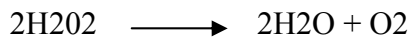
### **3.7. Biyokimyasal İnceleme**

#### **3.7.1. Doku Örneklerinin Homojenizasyonu**

Böbrek dokusu örnekleri doku homojenizatöründe (IKA Ultra-Turrax T25 Basic) ile 30mM PBS, 120mM KCl, pH 7.4' de, +4°C' de (1/10 w/v) ile homojenize edildi. Homojenatlar 800 x g'de, +4°C' de 10 dakika dakika santrifüj edilerek pellet kısımları uzaklaştırıldı. Supernatan kısımları ayrı bir tüpe alınarak süpernatanda yapılacak analizler için +4°C'de saklandı.

#### **3.7.2. Katalaz Tayini**

Katalaz aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



CAT aktivitesi Aebi (1964) tarafından tanımlanan metoda göre ölçüldü (200). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> UV bölgede absorbans verir. Aktivite ölçümü ortamındaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin CAT vasıtasıyla H<sub>2</sub>O'ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Harcanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarından CAT aktivitesi aşağıda bahsedilen yöntemle göre hesaplanmıştır.

### 3.7.2.1. Reaktifler

50 mM potasyum fosfat tamponu

30 mM hidrojen peroksit

Triton x-100

### 3.7.2.2. Ön İşlem

Enzim çözeltisine (sitozolik) %1'lik triton X-100 ilave edilerek 10 dakika inkübasyona bırakılır (On kat dilüsyon 1 örnek/9 triton X-100). On kat triton x-100 ile seyreltilerek oluşan karışım 50 mM fosfat tamponuyla 200-300 kat seyreltilir (toplam dilüsyon 2000 kat).

### 3.7.2.3. Ölçüm

2 ml seyreltilmiş numune kuvars küvete konarak üzerine 1 ml 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilir ve hidroje peroksit ilavesine müteakip 240 nm'de absorbansdaki azalma 1 dakika boyunca takip edilir. Absorbansdaki azalma 1 ml 50 mM fosfat tamponu ihtiva eden kör tüpüne göre kaydedilir. Doku homojenatlarında protein miktarları ise Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (201). Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler ve pipetlemeler Tablo 2'ye göre yapıldı.

**Tablo 2.** Rat böbrek dokusunda katalaz aktivitesi tayininde kullanılan inkübasyon karışımların bileşenleri

Bileşenler	Stok çözelti	Küvete konan hacim	3 mL kuvarz küvette son konsantrasyon
200 X seyreltilmiş potasyum fosfat tamponu pH=7.0	50 mM	2 mL	0,166 mM
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	30 mM	1 mL	10 mM

### 3.7.2.4. Sonuçların Hesaplanması

Ölçümlerde lineer olarak absorbans azalması olan aralıktan dakika başına absorbans azalması olarak hesaplandı. Enzim aktivitesi molar ekstinsiyon sabiti (0.0364  $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak bir dakikada 1 mg sitozolik protein tarafından hidrojen peroksitin parçalanmış miktarı olarak hesaplanır. Spesifik enzim aktivitesi



zaman birimi başına 240 nm’de absorbandsdaki değişimden aşağıdaki formüle göre hesaplandı hesaplanır.

$E (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}) = (\text{OD}_{\text{test}} - \text{OD}_{\text{kör}} / \epsilon_{340} \times b) \times \text{Tüp dilüsyonu} (3/2) \times \text{dilüsyon faktörü} 2000 \times 1/\text{mg protein}$

### 3.7.3. Doku Lipid Peroksit (MDA) Düzeyinin Ölçülmesi

MDA, lipid peroksidasyonunun önemli bir belirleyicisidir. MDA tayini spektrofotometrik olarak Okhava ve arkadaşları tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı (202). Bu metod, lipid peroksidasyonunun önemli son ürünlerinden biri olan MDA’nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan rengin 532 nm’de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

#### 3.7.3.1. Reaktifler

%8.1’lik SDS çözeltisi

%20’lik asetik asit çözeltisi (pH=3.5)

%0.8’lik tiyobarbitürik asit çözeltisi

n-bütanol

Piridin

#### 3.7.3.2. Deneyin Yapılışı

**Tablo 3.** MDA ölçümünde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Numune (mL)	Kör
%10’luk (w/v) doku homojenatı	0.2	-
SDS	0.2	0.2
%20’lik Asetik asit (pH=3.5)	1.5	1.5
%8’lik TBA	1.5	1,5
dH <sub>2</sub> O	0.6	0,8

Tablo 3'e göre pipetlemeler yapıldıktan sonra tüpler 95°C'de 60 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Tüpler soğutulduktan sonra tüplere tablo 4'e göre pipetlemeler yapıldı

**Tablo 4.** MDA ölçümünde ikinci aşamada kullanılan bileşenler

dH <sub>2</sub> O	1.0	1.0
n-bütanol/piridin (15:1, v/v)	5.0	5.0

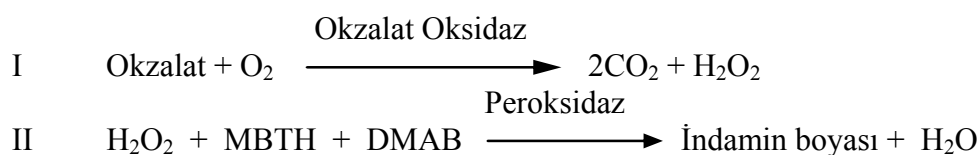
Tüpler alt üst edilip n-bütanol/piridin ile karışımı sağlandıktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek organik faz ayrıldı ve 532 nm'de numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı absorbanslar spektrofotometrede okundu. Doku homojenatlarında protein miktarları Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre belirlendi (201).

### 3.7.3.3. Sonuçların Hesaplanması

Sonuçlar, MDA-TBA kompleksinin 532 nm'deki ekstinsiyon katsayısından ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) yararlanılarak nanomol/mg protein olarak hesaplandı.

### 3.7.4. İdrar Okzalot Tayini

Trinity Biotech Oxalate (Trinity Biotech pic, St. Louis USA) kiti ile enzimetik olarak tayin edildi. Kit bileşenleri olarak 3,2 mM DMAB, 0,22 mM MTBH, tampon (pH=3,1 ± 0,1), nonrekaktif bileşikler ve stabilizerler ihtiva eden Reaktif A; 3000 u/L okzalot oksidaz ve 100.000 u/L peroksidaz ihtiva eden Reaktif B ve 10mM EDTA ve tampon (pH=7,6 ± 0,1) ihtiva eden numune dilüenti kullanıldı. Okzalot, okzalot oksidaz tarafından CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parçalanır (reaksiyon I). Oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> MBTH (3-methyl-2- 2-benzothiazolinone hydrazone) ve DMAB (3-dimethylamino benzoic acid) ile peroksidazın mevcudiyetinde indinamin boyası oluşturur (reaksiyon II). Oluşan renk örnekteki okzalot miktarı ile doğru orantılıdır.



1. Oxalate kiti (Trinity Biotech Plc, Wicklow, Ireland; Cat No: 591-D)

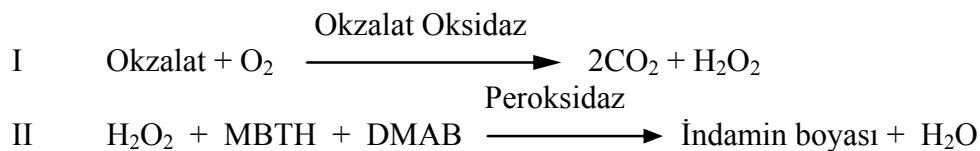
- a. Reaktif A: 3,2 mM DMAB, 0,22 mM MTBH, tampon (pH=3,1 ± 0,1), nonrekaktif bileşikler ve stabilizerler.
  - b. Reaktif B: 3000 u/L okzalit oksidaz ve 100.000 u/L peroksidaz
  - c. Numune dilüenti: 10mM EDTA ve tampon (pH=7,6 ± 0,1)
  - d. Aktifleştirilmiş kömür ihtiva eden numune saflaştırma tüpleri
2. Okzalit idrar kontrol reaktifi (Elevated; Trinity Biotech Plc, Wicklow, Ireland; Cat No: O 6502)
  3. Okzalit standart seti (Trinity Biotech Plc, Wicklow, Ireland; Cat No:591-11)

#### 3.7.4.1. Deneyin Yapılışı

İdrar örneklerinin toplanması, hazırlanması, okzalit tayini ve okzalit konsantrasyonlarının hesaplanması okzalit tayin kitinde belirtilen protokole göre yapıldı.

#### 3.7.5. Plazma Okzalit Tayini

Plazma okzalit miktarları Ladwig ve arkadaşlarının (2005) tarif ettikleri yöntemin modifikasyonu ile yapıldı (203). Bu yöntemde okzalit enzimatik olarak okzalit oksidaz reaksiyonu ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub>'ye okside olur (reaksiyon I). Oluşan hidrojen peroksit peroksidaz katalizörlüğünde MBTH ve DMAB ile reaksiyona girerek indamin boyası oluşturur (reaksiyon II). İndamin boyası 590 nm'de maksimum absorbanı verir. Oluşan rengin şiddeti okzalit konsantrasyonu ile direkt olarak orantılıdır.



1. Oxalate reagent A (Trinity Biotech Plc, Wicklow, Ireland; Cat No: 591-10)
2. Oxalate reagent B (Trinity Biotech Plc, Wicklow, Ireland; Cat No: 591-2)
3. 0.01 M ve 12 M HCl
4. 10 mol/L NaOH

5. 0.66 M stok sitrat tamponu (0.1 M potasyum sitrat; 0.23 M sitrik asit; 0.005 M EDTA: pH = 3.3)
6. 0.33 M sitrat çalışma tamponu (stok sitrat tamponunundan hazırlanır)
7. 5 mM Sodyum nitrit çözeltisi: Sitrat çalışma tomponu ile hazırlanır.
8. Fosfat/EDTA tamponu (500 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10mM EDTA: pH = 7.3)
9. Tamponlanmış aktif kömür çözeltisi (Fosfat-EDTA tamponu:aktif kömür, 1:10 (v/w))
10. 1 M stok oksalat çözeltisi
11. Okzalat çalışma standartları: 1 M'lık stok okzalat çözeltisi 0.01 M HCl asit çözeltisi ile seyreltilerek 50.0, 10.0, 5.0, 2.5 ve 1.0 µmol/L'lik okzalat kalibratörleri hazırlanır.
12. Okzalat yüksek ve düşük kontrol çözeltileri: Oxalate Urine Control Elevated (Trinity Biotech Plc, Wicklow, Ireland; Cat No: O 6502) reaktifi 1:50 ve 1:500 oranında 0.01 M'lık HCl çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanır.

### **3.7.5.1. Deneyin Yapılışı**

#### **3.7.5.1.1. Ön İşlem**

Antikoagulan madde olarak heparin ihtiva eden kan örnekleri +4°C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazma örneklerine 100:1 (v/v) oranında 12 M'lık HCl ilave edildi. Asidifiye edilen plazma örnekleri 20°C'de 1000 g'de 2 saat santrifüjlenerek protein fraksiyonu ayrıldı. Deproteinize plazma 1:1 oranında tamponlanmış aktif kömür süspansiyonu ile 10 dakika vortekslenerek karıştırıldı ve karışım 0.22 µm por çaplı filtreden (Millex-GS filters, Millipore, Molsheim, France) süzüldü. Filtratlar (500 µL), kontrol, kalibratörler ve HCl kör numuneleri 5mM sodyum nitrit ihtiva eden sitrat çalışma tamponundan 30 µL ilave edilerek numunelerdeki askorbatın dehidroksi askorbata dönüşümleri sağlandı. Asidifiye, deproteinize ve nitrit ile muamele edilen plazma filtratları tablo 5'e göre pipetlemeler yapılarak plazma okzalat miktarları belirlendi.

**Tablo 5.** Plazma okzalot miktarı tayininde kullanılan bileşenler ve miktarları

Reaktifler	Numune (mL)	Kör (mL)	Standart (mL)	Kontrol (mL)
Filtrat	0.3	-	-	-
Oksalat standartları (50.0, 10.0, 5.0, 2.5 ve 1.0 µmol/L)	-	-	0.3	-
Kontrol	-	-	-	0.3
0.01 M HCl	-	0.3	-	-
Oksalat reaktifi A	1	1	1	1
Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona müteakip 590 nm'de okunur (A okuması)				
Oksalat reaktifi B	0.05	0.05	0.05	0.05
Oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona müteakip 590 nm'de okunur (B okuması)				

### 3.7.5.2. Sonuçların Hesaplanması

Numune, standart, kontrol ve körün A okumaları (590 nm'de) B okumalarından (590 nm'de) çıkarılır. A ve B okumaları çıkartılmış olan kör absorbansları tekrar numune, kontrol ve standartan çıkarılır. Numunedeki okzalot miktarları kalibrasyon okumalarından faydalanılarak aşağıdaki eşitliğe göre belirlenir:

$$C_{\text{numune}} = \frac{\Delta A_{\text{numune}}}{\Delta A_{\text{standart}}} \times C_{\text{standart}} \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

### 3.7.6. İdrar ve Kan Örneklerinde Kreatinin, Kalsiyum ve Üre Ölçümleri

Plazma ve idrar örneklerinde kreatinin tayini Jaffe yöntemine göre kolorimetrik olarak, plazma üre konsantrasyonları üreaz ve glutamat dehidrogenaz reaksiyonları ile kinetik-kolorimetrik olarak, idrar kalsiyum miktarları ise schwarzenbach ile o-cresolphthalein kompleks yöntemine göre otoanalizörde yapıldı.

### 3.7.7. Kreatinin Klirensi

Kreatinin endojen olarak oluştuğundan ve vücut sıvılarına sabit bir hızla salındığından, plazma düzeyleri dar sınırlar içinde korunduğundan, renal klirensi GFR'nin bir göstergesi olarak ölçülmektedir. Kreatinin klirensi ölçmek için zamanlı idrar ve kan örnekleri alındı. İdrarın hacmi (V) mL olarak, kreatinin hem idrar (U) hem de serum (S) örneklerinde mg/dL olarak ölçüldü ve kreatinin klirensi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Klirens (mL/dak)} = U \text{ (mg/dL)} \times \frac{V \text{ (mL/dak)}}{S \text{ (mg/dL)}}$$

### 3.7.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences 11.0 (SPSS 11.0) paket programı kullanılarak yapıldı. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi. Biyokimyasal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu tek örneklem Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. Gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için tek yönlü varyans analizi ve farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemede Duncan testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık için  $P < 0.05$  olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

## 3.8. Histolojik İnceleme

### 3.8.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları

Sıçanların sağ böbrekleri tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit (Merck) içine alındı. Fikse olmaları için 24-48 saat beklendikten sonra doku takip işlemine başlandı. Öncelikle bir gece boyunca akarsuda yıkama yapıldı. Fiksatiften arındırılan dokular yükselen derecelerdeki alkollerden (Merck) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra şeffaflaşmaları için ksilol (Merck) içerisinde bekletildi. Gömme işlemi için 65°C'lik etüvde, 1:1 oranında ksilol-parafin ve parafin içerisinde bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Takip sırasında kullanılan kimyasallar ve süreleri şu şekildedir:

<u>Kullanılan kimyasal</u>	<u>Süre</u>
Çeşme suyunda yıkama	1 gece
%50'lik etil alkol	2 saat
%70'lik etil alkol	1 saat
%80'lik etil alkol	1 saat
%90'lık etil alkol	1 saat
%96'lık etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
%100'lük etil alkol	1 saat
Ksilol	1-10 dk
Ksilol-Parafin	1-10 dk
Parafin	3 saat

Elde edilen parafin bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için normal lamlara, immünohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysine kaplı lamlara (Thermo Scientific) alındı.

Rutin histolojik incelemeler için dokular Hematoksilen-Eosin boyaları ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. 10X, 20X ve 40X büyütmelerde damarlarda konjesyon (medulla tabakasında ve korteksteki glomerüllerde), mononükleer hücre infiltrasyonu ve tubüler lümen özellikleri değerlendirildi.

### **3.8.2. İmmünohistokimya Protokolü**

İmmünohistokimya için lizinli lamlara alınan dokular kuruduktan sonra bir gece 56°C'lik etüvde bekletildi. Ertesi gün ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek hidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde çözünmüş %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck) solüsyonunda bekletilen dokular PBS'te (Fosfat tamponlu salin) (Sigma) yıkandı. Ardından Sitrata tamponuna (Thermo Scientific) alınan dokular ısı aracılığıyla epitop açığa çıkarma işlemi için mikrodalga fırında iki kez ısıtılıp soğutuldu ve yine PBS'te yıkandı.

Kullanılacak kimyasalların birbirine karışması ve fazla kimyasal kullanılmasının engellenmesi için bu aşamadan itibaren lamların üzerindeki doku

örneklerinin çevresi hidrofobik PAP pen kalem ile çizildi ve boyama süresinde bu işlem gerektikçe tekrarlandı. Nonspesifik antikor bağlanmasını engellemek için Ultra V Block (Thermo Scientific) solüsyonu damlatılan dokular PBS-Tween 20 (Thermo Scientific) solüsyonunda yıkandı.

Bloklamanın ardından inkübasyon kabına alınan lamlar üzerine ilk sıradaki kesite NF-kB/p65 antikorunu (Santa Cruz, sc-109), ikinci sıradaki kesite MAPK/p38 antikorunu (Santa Cruz, sc-7149) sonraki kesite/kesitlere kontrol amaçlı sekonder antikor (Goat anti-polyvalent, Thermo) damlatılarak +4 °C’de bir gece bekletildi. Buraya kadarki aşamalar aşağıda özetlenmiştir:

<u>Kullanılan kimyasal</u>	<u>Süre</u>
Ksilol-1	10 dk
Ksilol-2	10 dk
% 100’lük Etil Alkol	5dk
% 100’lük Etil Alkol	5dk
% 90’lık Etil Alkol	5dk
% 80’lik Etil Alkol	5dk
% 70’lik Etil Alkol	5dk
Distile Su	5dk
% 3’lük H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 - 10 dk
PBS’te yıkama	5 dk x 3 kez
Sitrat tamponunda mikrodalga fırında	1,5 - 2 dk
Oda ısısında soğutma	20 dk
Sitrat tamponunda mikrodalga fırında	1 dk
Oda ısısında soğutma	20 dk
PBS’te yıkama	5 dk x 3 kez
Ultra V Block	5 - 10 dk
PBS-Tween 20	5 dk x 3 kez



Primer antikor (+4 °C'de)

1 gece

Boyama işleminin geri kalanına ABC Staining Kit (Santa Cruz, sc-2018) kullanılarak devam edildi. Firmanın talimatlarına göre hazırlanan solüsyonlar aşağıdaki sırayla kesitlere uygulandı:

<u>Kullanılan kimyasal</u>	<u>Süre</u>
PBS'te yıkama	5 dk x 3 kez
Biyotinli sekonder antikor	30 dk
PBS'te yıkama	5 dk x 3 kez
AB enzyme reagent	30 dk
PBS'te yıkama	5 dk x 3 kez
Peroksidaz substrat	2 - 8 dk
Distile suda yıkama	5 dk x 3 kez
Hematoksilen (Mayer)	20 sn - 1 dk
Distile suda yıkama	5 dk x 3 kez
% 70'lik Etil Alkol	5dk
% 80'lik Etil Alkol	5dk
% 90'lık Etil Alkol	5dk
% 100'lük Etil Alkol	5dk
Ksilol-1	10 dk
Ksilol-2	10 dk
Kapatma	

Entellan kullanılarak lamel ile kapatılan dokular kuruduktan sonra ışık mikroskopunda inceleme için saklandı.

Işık mikroskopuyla incelemede boyanma yoğunluğuna bağlı olarak kesitler şu şekilde derecelendirildi:

( - ) skor (negatif skor): boyanma yok.

( + ) skor (1 pozitif skor): hafif derecede.

( ++ ) skor (2 pozitif skor): orta derecede.

( +++ ) skor (3 pozitif skor): Tam boyanma var.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

Sıçanlarda etilen glikol uygulanmasıyla oluşturulan deneysel hiperokzalüri modeli, 4 grupta 32 sıçan üzerinde çalışıldı. 5 haftalık çalışma periyodu sonunda anestezi altında sıçanların kan ve doku örnekleri alındı. Çalışma boyunca rat kaybı olmadı. Ratların çalışma başlangıcında vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında tüm gruplar benzer olarak ölçüldü. Çalışma bitiminde, kesimden hemen önce yapılan tartı kontrolünde ağırlık artışları yine benzerdi.

Çalışma gruplarının değişkenlere ait istatistik verileri Tablo 6'da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** Çalışma gruplarının ortalama standart sapma değerleri ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

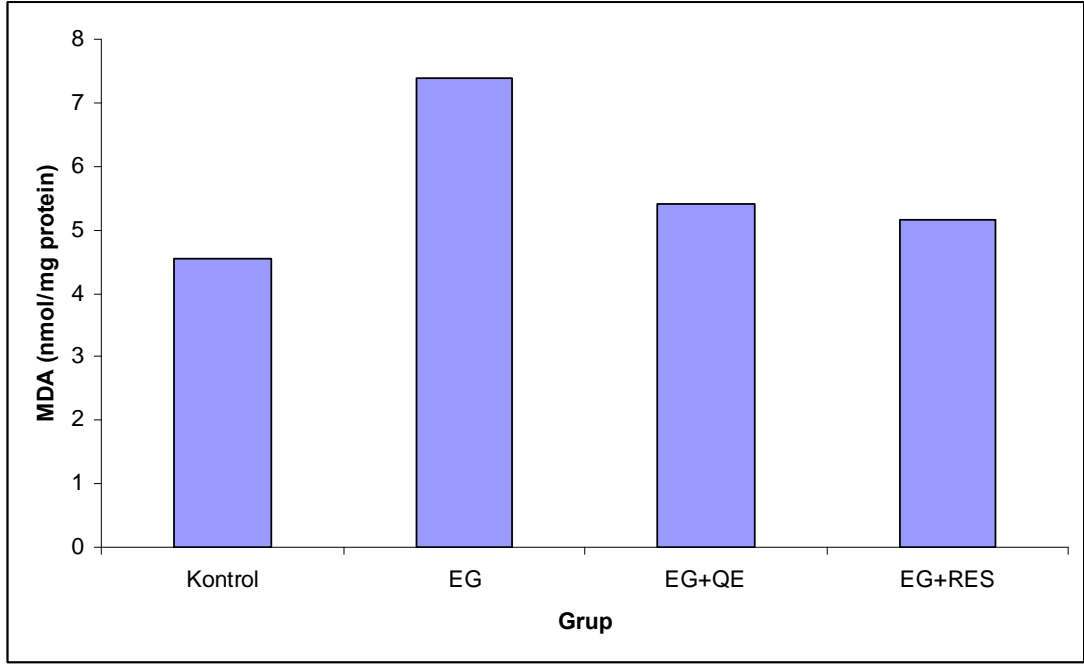
Parametreler	Grup 1 (N= 8)	Grup 2 (N= 8)	Grup 3 (N= 8)	Grup 4 (N= 8)	p*
<b>MDA (nmol/mg protein)</b>	4,53±0,89 <sup>a</sup>	7,40±1,64 <sup>b</sup>	5,41±0,82 <sup>a</sup>	5,18±0,63 <sup>a</sup>	0,0001
<b>CAT(μmol/min/mg)</b>	118,41 ± 26,02 <sup>a</sup>	119,48 ± 16,55 <sup>a</sup>	131,06 ± 28,99 <sup>a</sup>	136,82 ± 22,88 <sup>a</sup>	0,360
<b>P<sub>üre</sub> (mg/dl)</b>	42,37 ± 3,37 <sup>a</sup>	86,75 ± 61,44 <sup>b</sup>	51,62 ± 19,97 <sup>a</sup>	43,25 ± 16,06 <sup>a</sup>	0,040
<b>Kalsiyum (mg/dL)</b>	12,90 ± 3,37 <sup>a</sup>	8,38 ± 3,39 <sup>b</sup>	9,58 ± 5,59 <sup>b</sup>	7,60 ± 2,12 <sup>b</sup>	0,046
<b>Kreatin klirensi (mL/dak)</b>	0,26 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,28 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,42 ±0,17 <sup>a</sup>	0,174
<b>P<sub>Okzalit</sub> (μmol/L)</b>	32,18 ± 19,28 <sup>a</sup>	71,92 ± 61,83 <sup>a</sup>	47,48 ± 20,09 <sup>a</sup>	36,95 ± 9,02 <sup>a</sup>	0,117
<b>İ<sub>Okzalit</sub> (μmol/24 h)</b>	2,72 ± 0,36 <sup>a</sup>	10,14 ±4,13 <sup>b</sup>	6,81 ± 2,26 <sup>c</sup>	7,01 ±2,01 <sup>c</sup>	0,0001

\*Tek yönlü varyans analizi (Anova)

\*Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. Farklı harf ile gösterilen veriler P< 0.05 düzeyinde önemlidir.

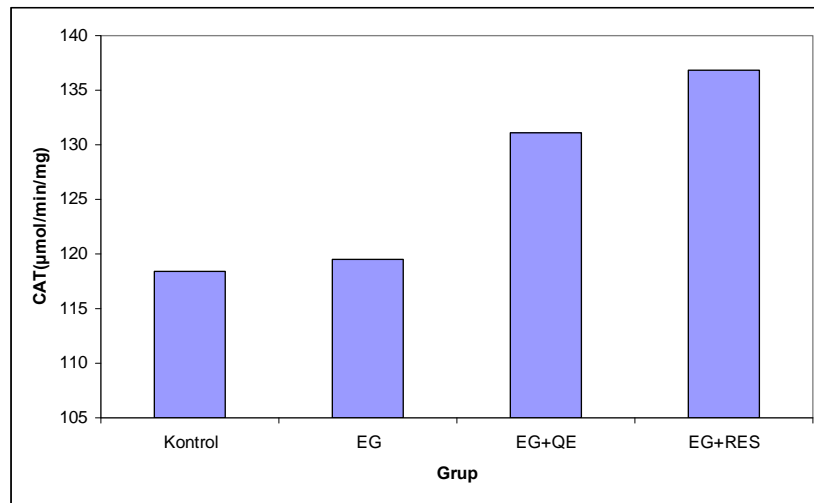
Gruplar arası MDA düzeyinde tek yönlü varyans analizine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (p=0.001). 2. grupta MDA düzeyi kontrole göre

anlamli olarak yuiksek bulunurken, 3. ve 4. grupta MDA duzeyleri 2. gruba gore anlamli olarak dusuk bulundu. MDA duzeylerinin Anova ve Duncan coklu karsilastirma testi sonuclari Tablo 6'de, gruplara gore dagilim Sekil 6'da gosterilmisttir.



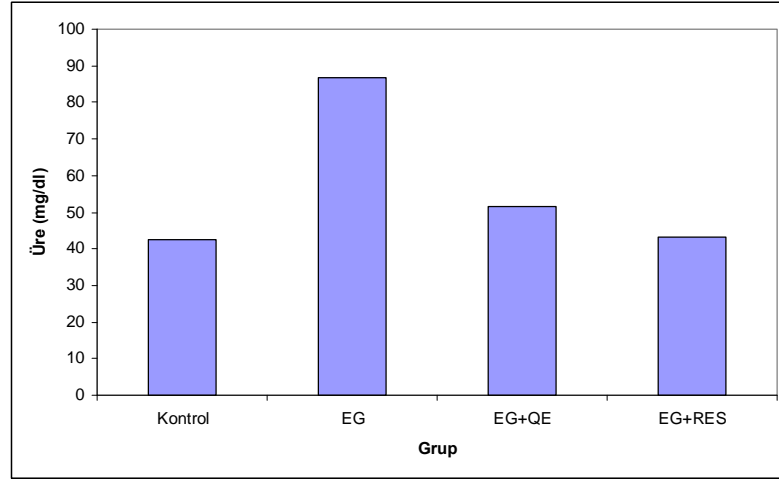
**Şekil 6.** Gruplara göre MDA duzeylerinin dagilimi

1. ve 2. grupta katalaz duzeyleri 2. ve 3. gruptakinden dusuk olmalarina ragmen gruplar arasi katalaz seviyelerinde istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamadi ( $p>0.05$ ). Katalaz duzeylerinin Anova ve Duncan coklu karsilastirma testi sonuclari Tablo 6'da, gruplara gore dagilim Sekil 7'de gosterilmisttir.



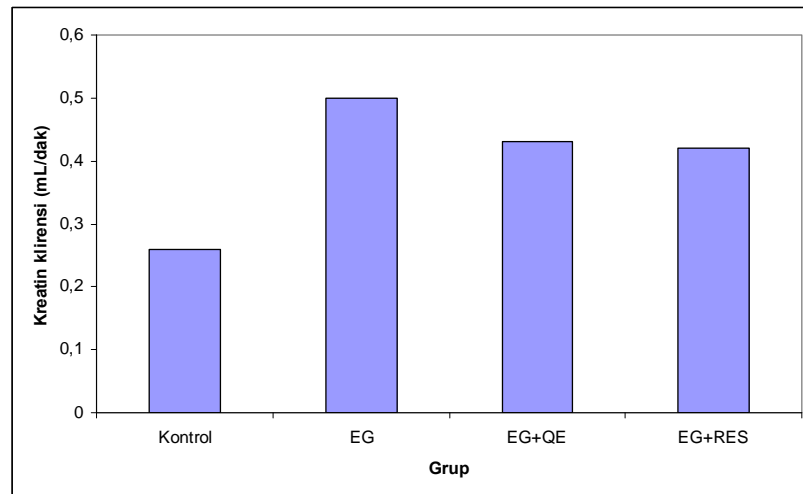
**Şekil 7.** Gruplara göre katalaz duzeylerinin dagilimi

Gruplar arası  $P_{\text{üre}}$  düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Gruplar arası  $P_{\text{üre}}$  düzeyleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak değerlendirildiğinde  $P_{\text{üre}}$  2. grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, 3. ve 4. gruplarda da 2. gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Plazma üre düzeylerinin Anova ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Tablo 6'da, gruplara göre dağılım Şekil 8'de gösterilmiştir.



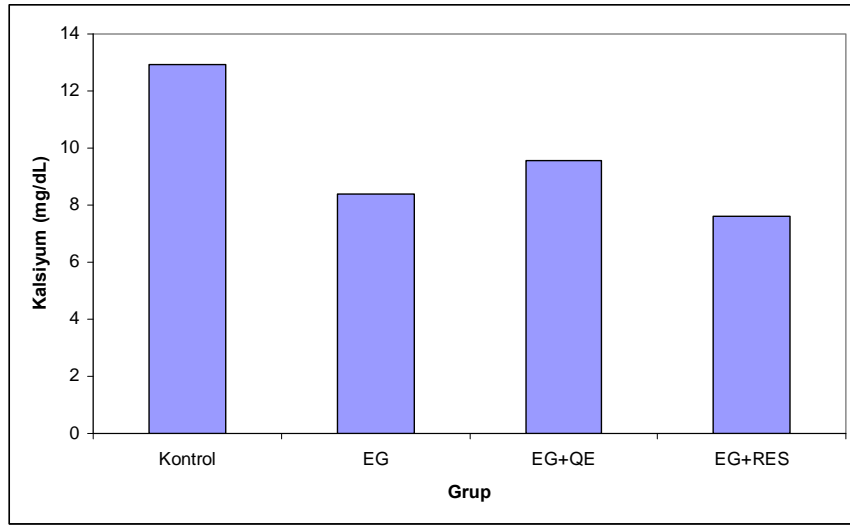
**Şekil 8.** Gruplara göre plazma üre düzeylerinin dağılımı

1. grupta kreatin klirensi diğer gruplara göre düşük olmasına rağmen gruplar arası kreatin klirensi düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ) Etilen glikol verilen 2. grupta kreatin klirensi diğer gruplara göre yüksek bulundu fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Kreatin klirensi düzeylerinin Anova ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Tablo6'da, gruplara göre dağılımı Şekil 9'da gösterilmiştir.



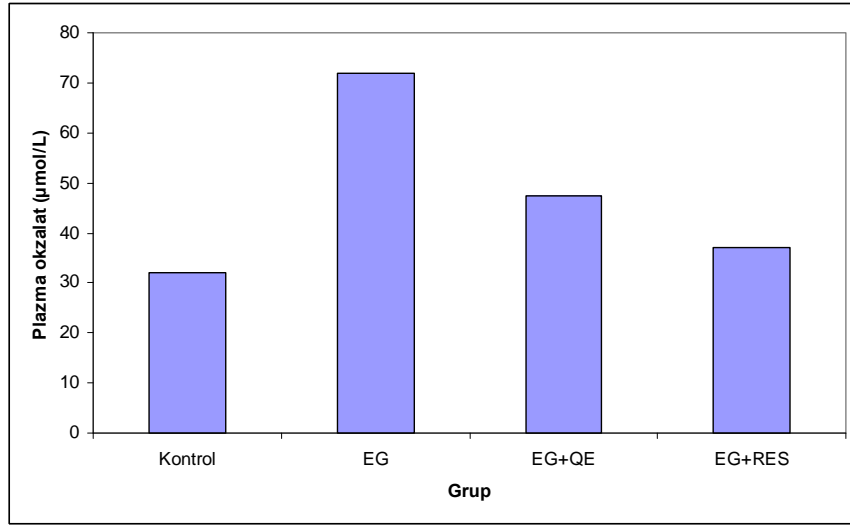
**Şekil 9.** Gruplara göre kreatin klirensi düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası idrar kalsiyum düzeylerinde tek yönlü varyans analizine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.05$ ). Duncan testine göre yapılan çoklu karşılaştırmada gruplar arası idrar kalsiyumu 2, 3 ve 4. gruplarda 1. gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu. Ancak bu gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ( $p > 0.05$ ). İdrar kalsiyum düzeylerinin Anova ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Tablo 6’da, gruplara göre dağılım Şekil 10’da gösterilmiştir.



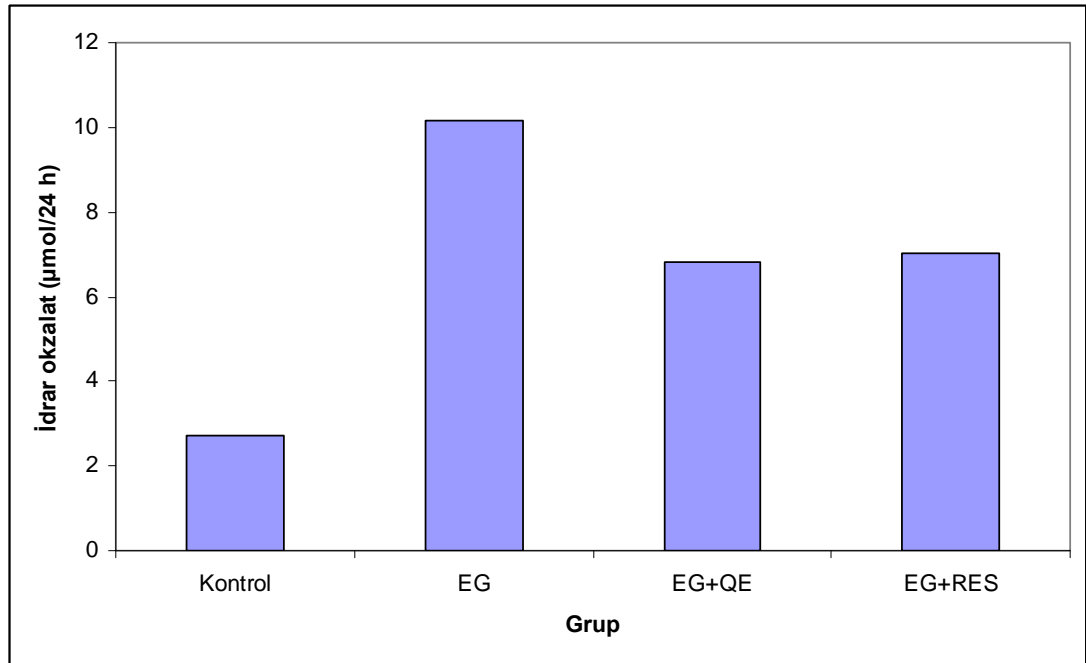
**Şekil 10.** Gruplara göre idrar kalsiyum düzeylerinin dağılımı

Çalışma gruplarından etilen glikol verilen grup olan 2. grupta plazma okzalat seviyesi diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen gruplar arası plazma okzalat düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ). Yine etilen glikol ile birlikte resveratrol ve kuersetin verilen 3. ve 4. gruplarda plazma okzalat seviyeleri kontrol grubuna göre yüksek, sadece etilen glikol verilen 2. gruba göre ise düşük bulundu fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0,05$ ). Plazma okzalat düzeylerinin Anova ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Tablo 6’da, gruplara göre dağılımı Şekil 11’de gösterilmiştir.



**Şekil 11.** Gruplara göre plazma okzalata düzeylerinin dağılımı

Gruplar arası idrar okzalata düzeylerinde tek yönlü varyans analizine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0.001$ ). 2. grupta idrar okzalata düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu. 3. ve 4. gruplarda da idrar okzalata düzeyleri 2. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu. İdrar okzalata düzeylerinin Anova ve Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Tablo 6'da, gruplara göre dağılım Şekil 12'de gösterilmiştir.



**Şekil 12.** Gruplara göre idrar okzalata düzeylerinin dağılımı

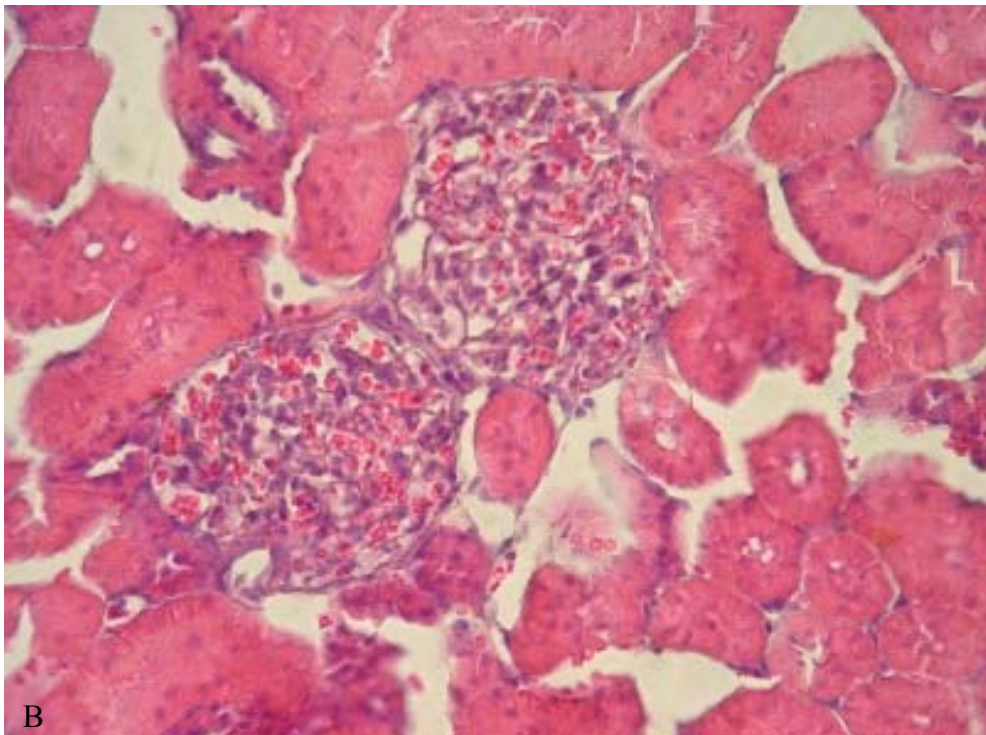
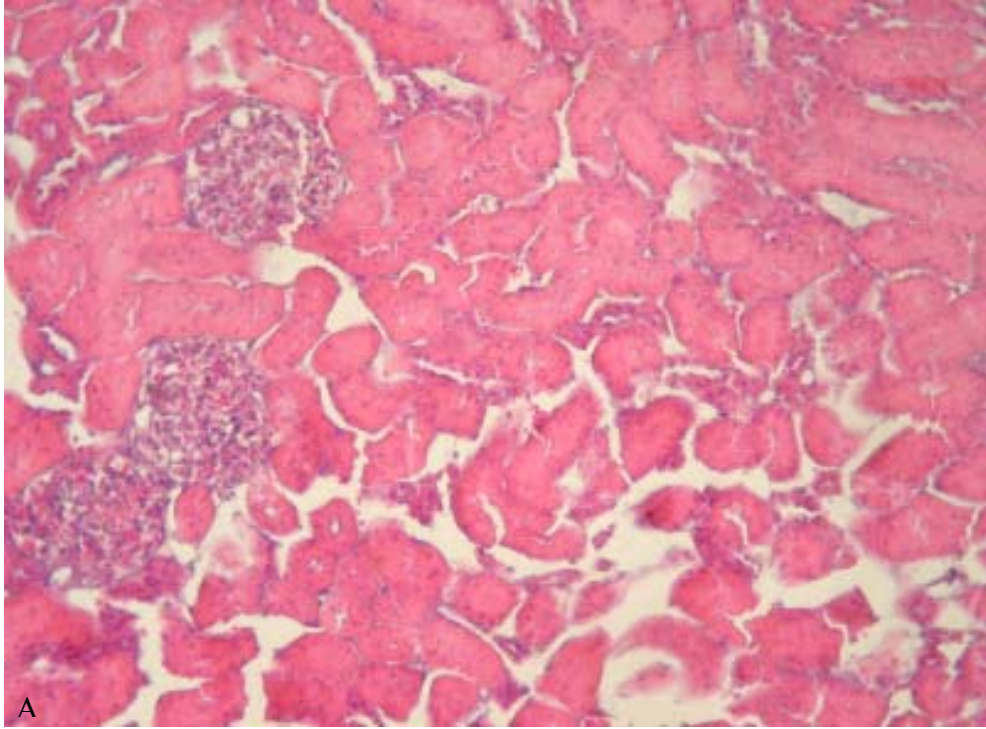
#### 4.2. Histolojik Bulgular

Işık mikroskopunda yapılan değerlendirmede kontrol grubu sıçanlara ait böbrek dokusu kesitlerinin histolojik incelenmesinde, bu organa ait normal histolojik yapılar dışında herhangi bir bulguya rastlanmadı (Resim 1).

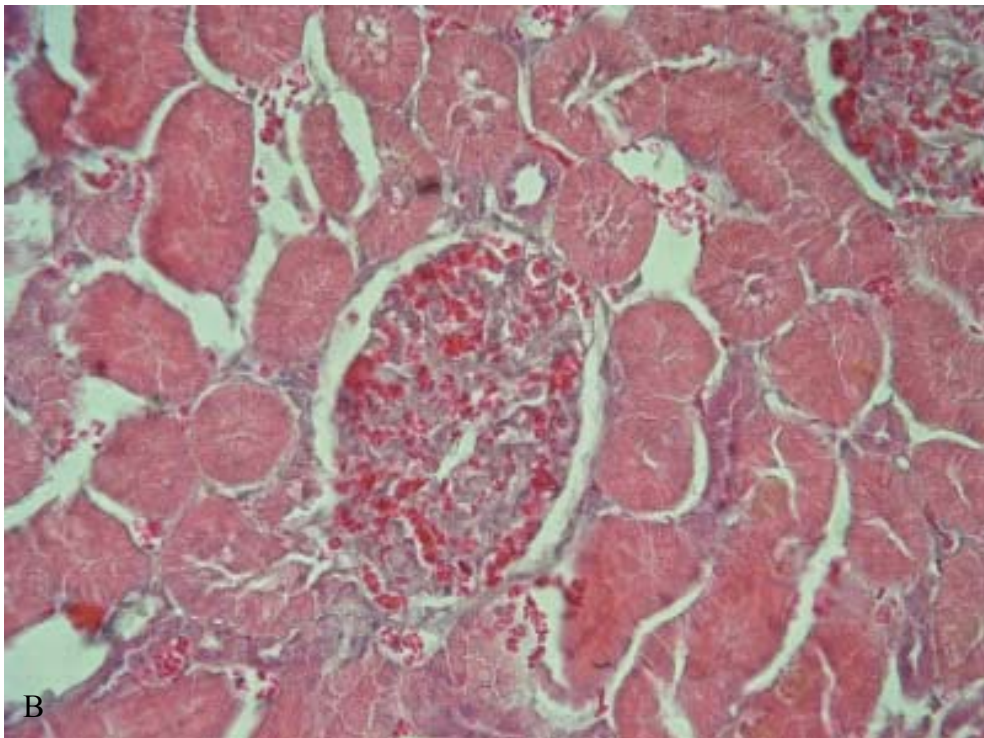
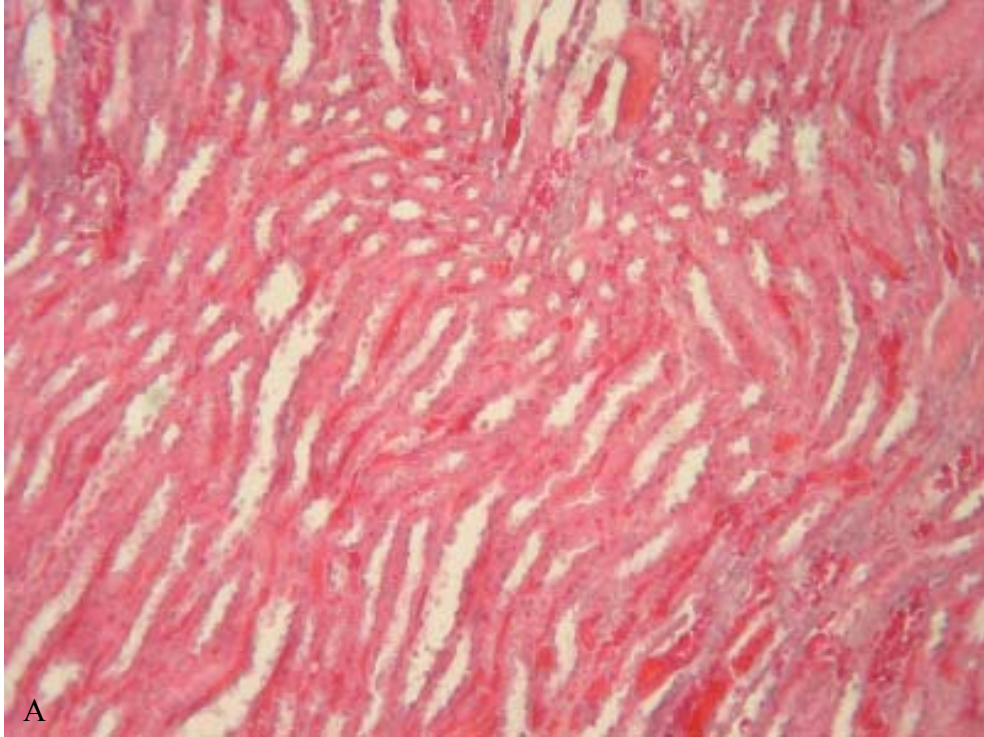
Sadece etilen glikol verilen Grup 2 de böbrek medulla ve korteks tabakalarındaki glomerüler damarlarda konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu ve özellikle proksimal tübüllerde olmak üzere tübüllerde lümenlerin oldukça daraldığı gözlemlendi (Resim 2).

Etilen glikolle beraber kuersetin ve resveratrol verilen Grup 3 ve 4 de ise grup 2 ye benzer histopatolojik bulgulara rastlanmakla beraber bulguların daha hafif olduğu gözlemlendi (Resim 3 ve 4).

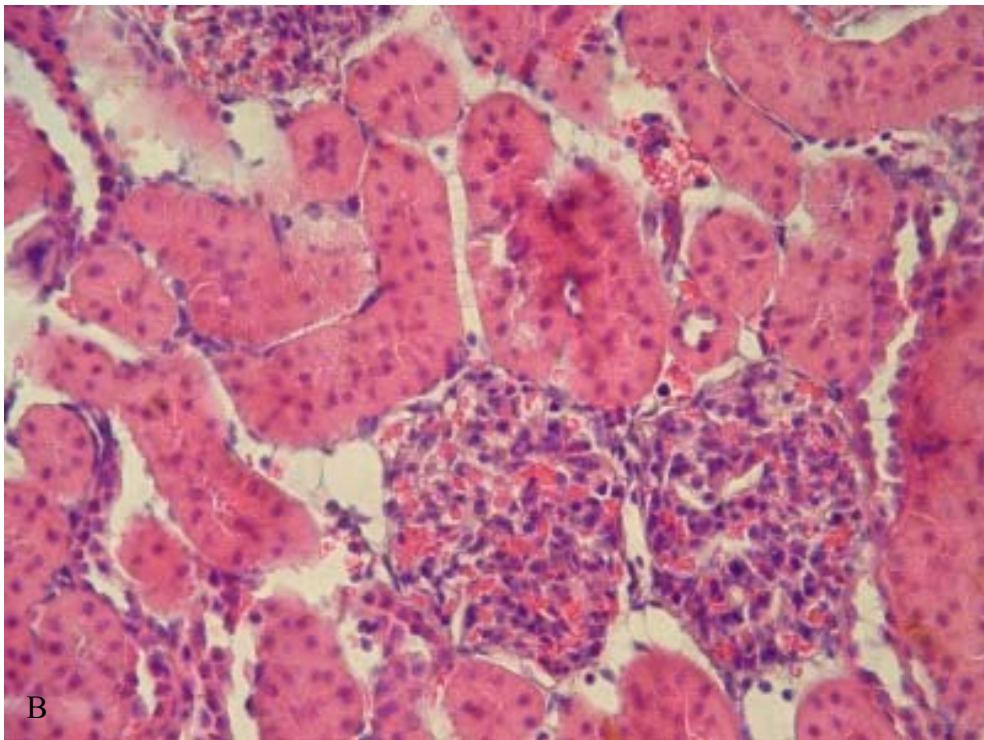
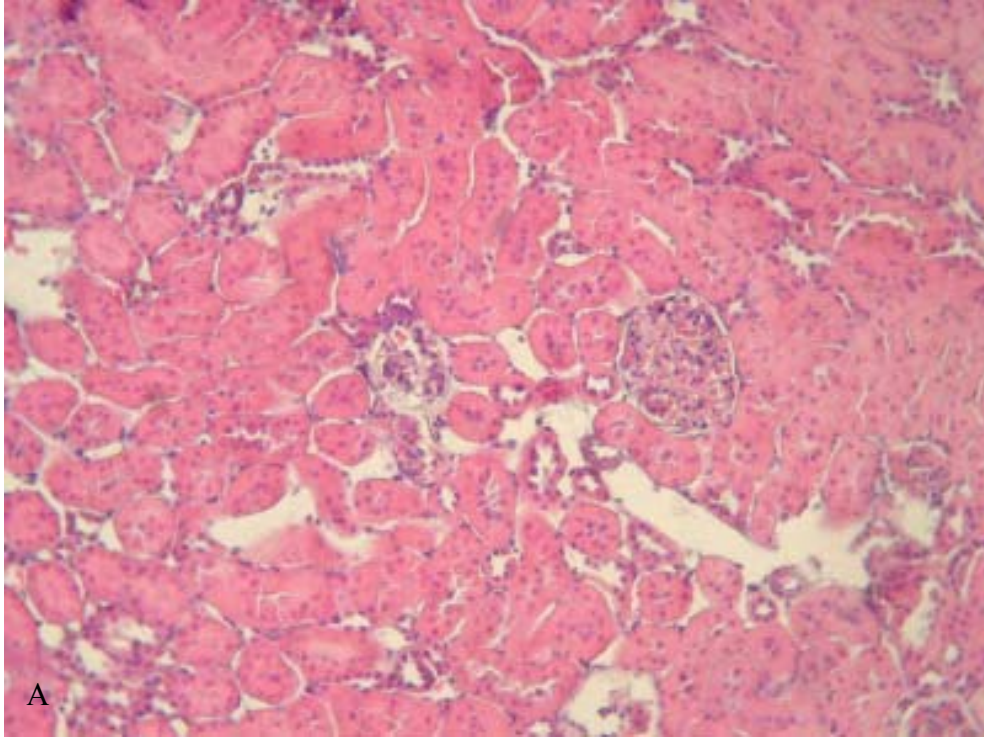




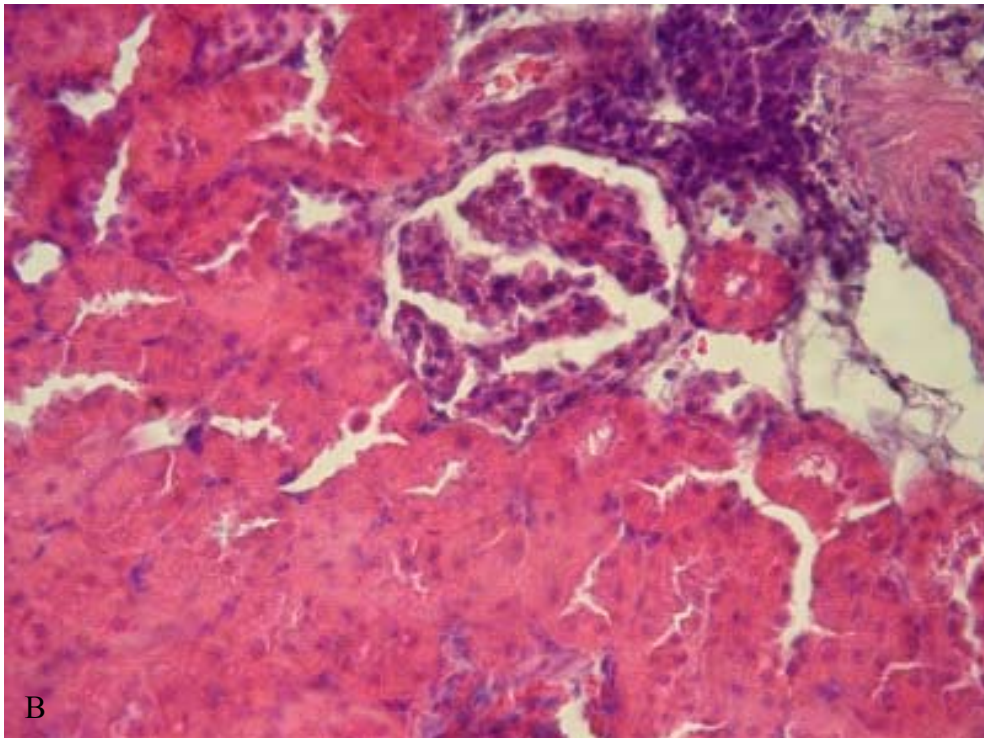
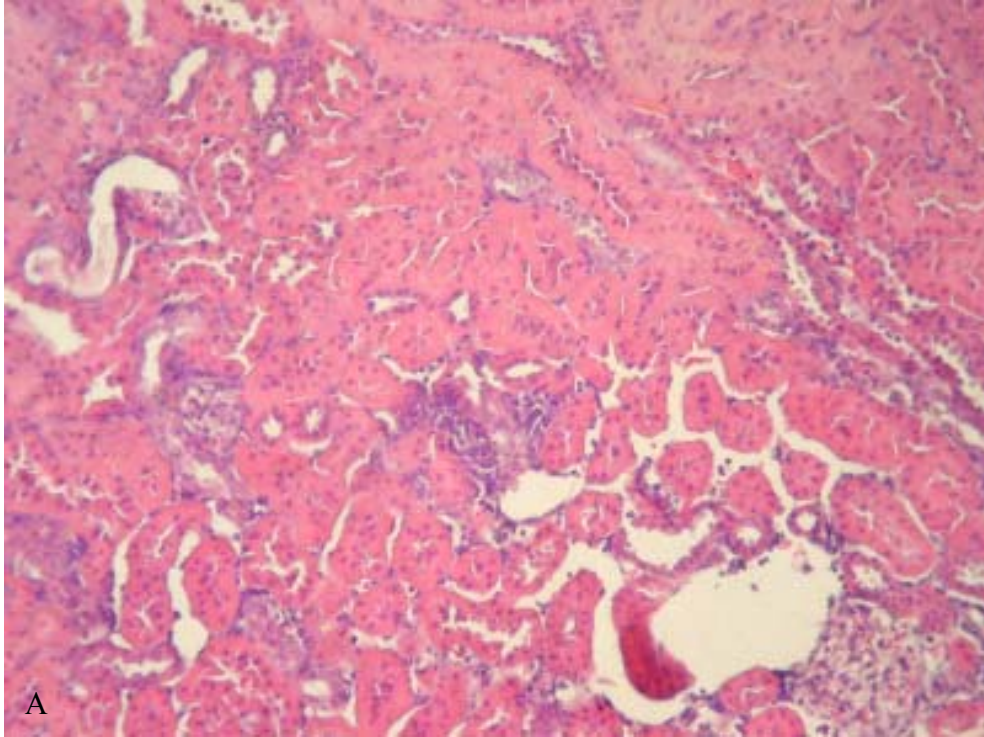
**Resim 1.** Grup 1 (Kontrol Grubu); A. X20, B. X40 (H-E)



**Resim 2.** Grup 2 (Etilen-Glikol Grubu); A. X10, B. X40 (H-E)



**Resim 3.** Grup 3 (Etilen-Glikol+Kuersetin Grubu); A. X20, B. X40 (H-E)



**Resim 4.** Grup 4 (Etilen-Glikol+Resveratrol Grubu); A. X10, B. X40 (H-E)

### 4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Deneysel parametrelerin immünohistokimyasal boyanma derecelerinin değerlendirilmesi skorlandı.

( - ) skor (negatif skor): boyanma yok,

( + ) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,

( ++ ) skor (2 pozitif skor): orta derecede,

( +++ ) skor (3 pozitif skor): Tam boyanma var

**Tablo 7.** İmmünohistokimyasal olarak gruplar ve boyanma dereceleri

İmmunohistokimya boyanma dereceleri	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
<b>P38 MAPK</b>				
1	-	+++	+	++
2	-	+	-	+
3	+	++	+	++
4	+	+++	++	++
5	-	++	+	++
6	-	++	+	+
7	+	++	+	+
8	-	+++	+	++
<b>NFkB</b>				
1	-	+	+	++
2	+	++	+	+
3	-	+	-	+
4	-	+	+	+
5	-	++	+	++
6	-	+	-	-
7	+	+++	+	+
8	++	++	++	++

Yukarıdaki tabloya göre değerlere **Kruskal-Wallis Testi** uygulandı. Kruskal-Wallis Testine göre 4 grup arasında p38 ve NFkB değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p değerleri p38 için <0.001, nfkb için p=0.035).

p için anlamlı değerimiz Kruskal-Wallis Testi sonucunda anlamlı bulundu. Post hoc test olarak Bonferanans düzeltilmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık için sınır değeri olarak p=0,005 alındı.

**Tablo 8.** Mann Whitney U testine göre p değerleri

	1.ve 2. Grup karşılaştırması	1.ve 3. Grup karşılaştırması	1. ve 4. Grup karşılaştırması	2.ve 3. Grup karşılaştırması	2.ve 4. Grup karşılaştırması	3.ve 4. Grup karşılaştırması
<b>p38 MAPK</b>	p<0,001	p>0,036	p<0,002	p<0,004	p>0,069	p>0,036
<b>NFkB</b>	p<0,001	p>0,227	p>0,057	p>0,054	p>0,0366	p>0,266

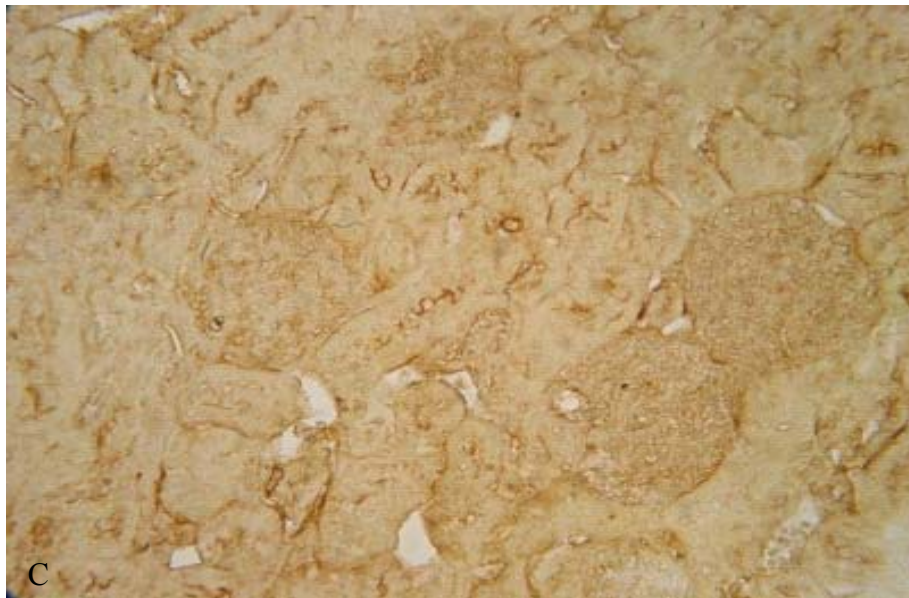
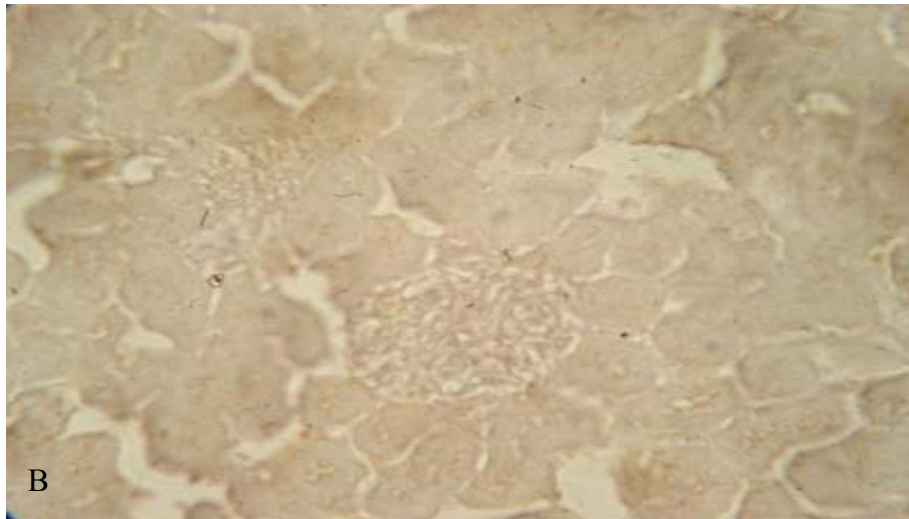
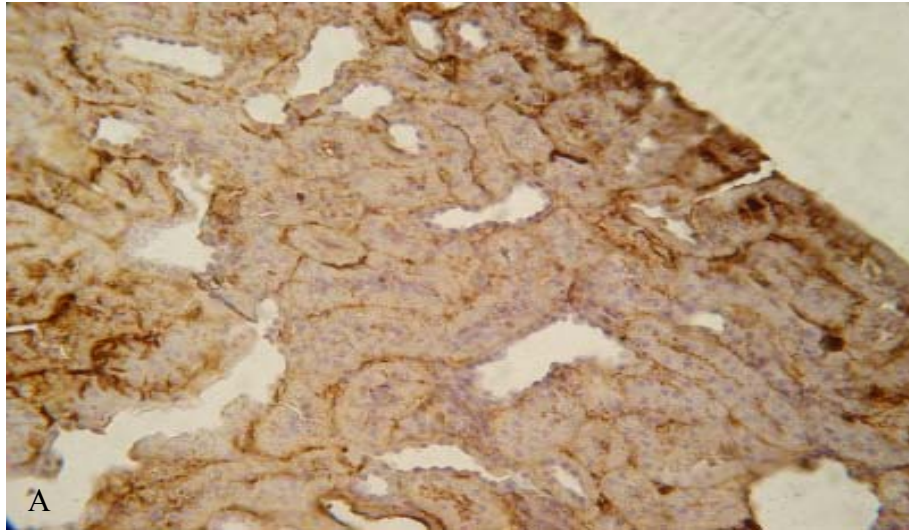
Tablo 8'e göre p38 MAPK gruplarının karşılaştırılması neticesinde EG grubu kontrole göre anlamlı olarak yoğun boyandı ( $p<0,001$ ). Buna göre EG grubunda p38 MAPK aktivasyonunun kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edildi.

p38 MAPK, KRS grubunda EG grubuna göre anlamlı olarak daha az boyandı ( $p<0,004$ ). Buna göre KRS in p38 MAPK aktivitesini azalttığı gözlemlendi ve istatistiksel olarak da tespit edildi.

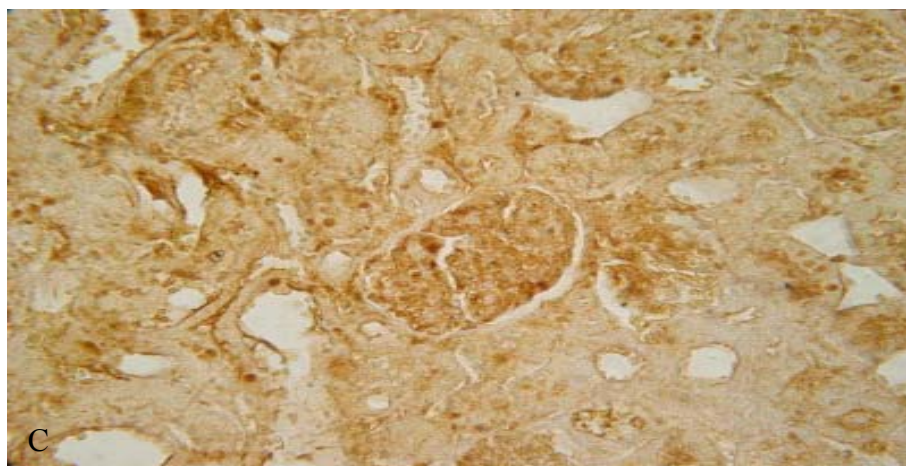
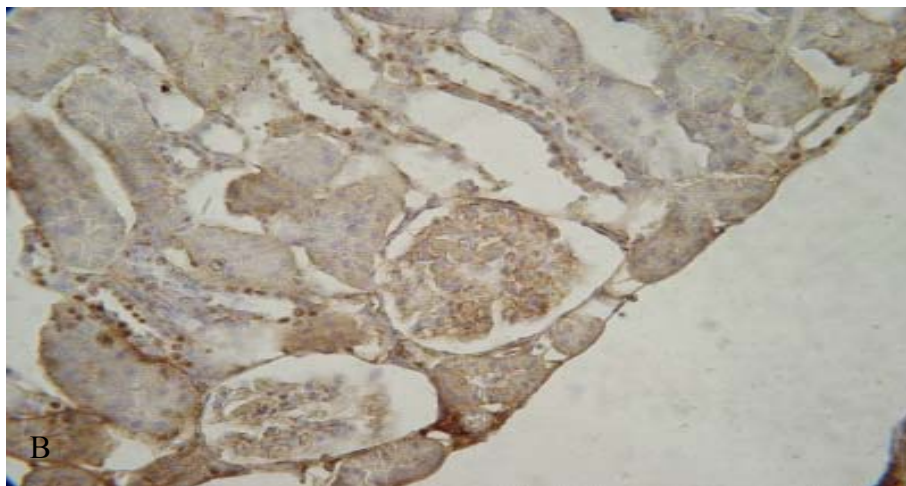
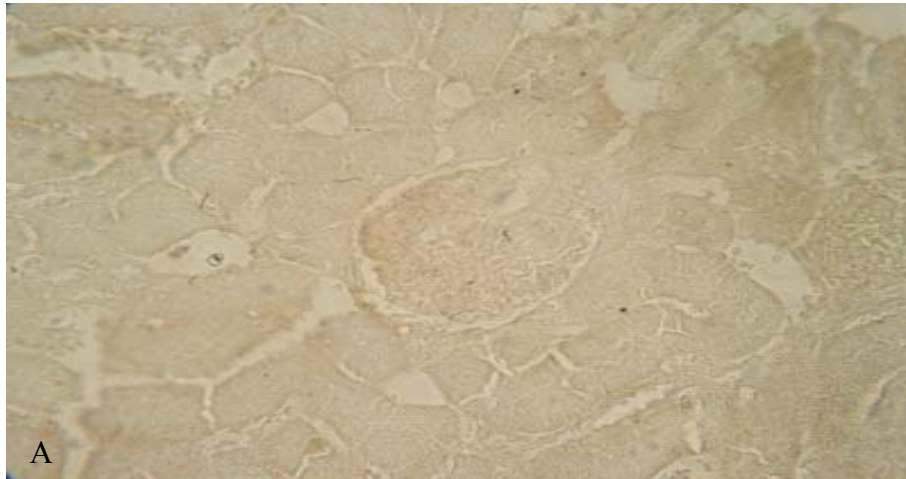
P38 MAPK, RES grubunda EG grubuna göre daha az boyanmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı etki gözlenemedi ( $p>0,069$ ). Ancak p38 MAPK, RES grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yoğun boyandı ( $p<0,002$ ).

Diğer gruplar arasında  $p>0,005$  olduğu için anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

Tablo 8'e göre NF-kB gruplarının karşılaştırılması neticesinde EG grubu kontrole göre anlamlı olarak yoğun boyandı ( $p<0,001$ ). anlamlı bulundu. Buna göre EG grubunda NF-kB aktivasyonunun kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Diğer gruplar arasındaki karşılaştırmalar  $p>0,005$  olduğu için anlamlı kabul edilmedi.

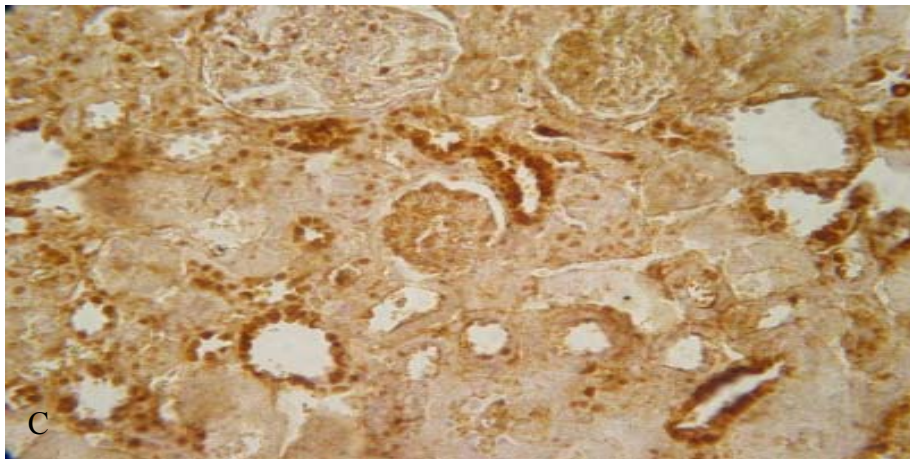
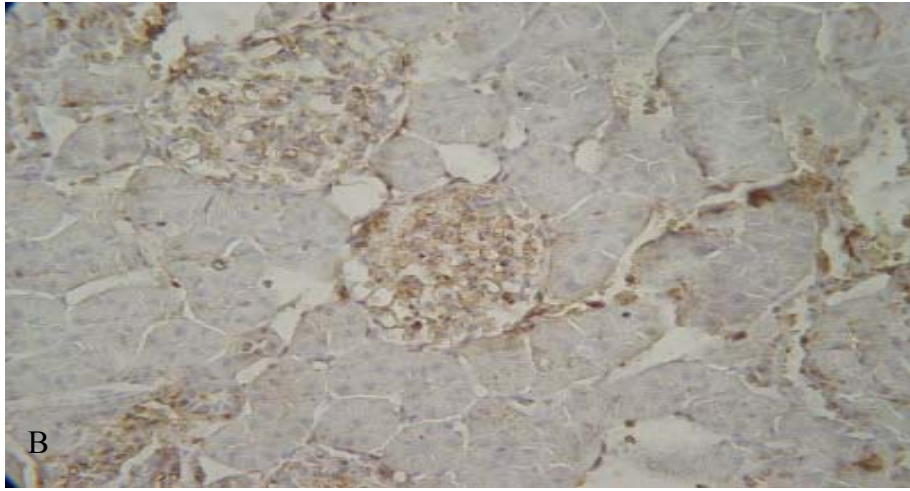
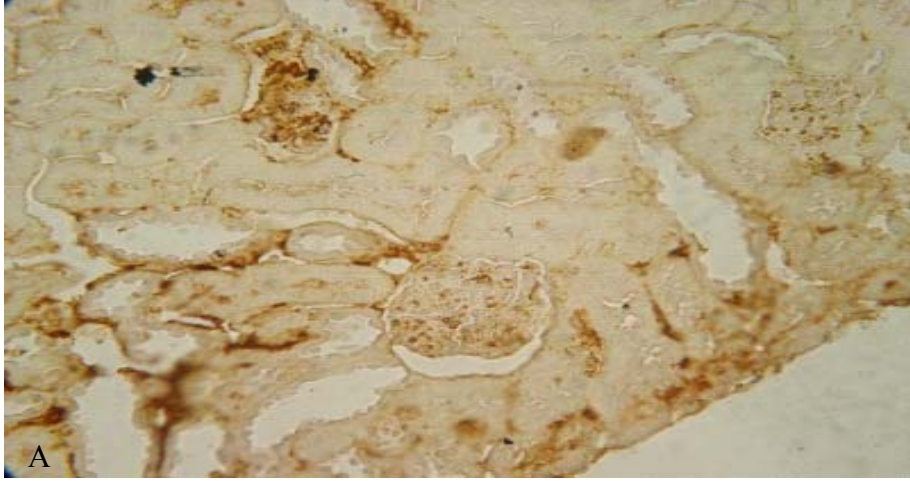


**Resim 5.** Grup 1 (Kontrol Grubu); A.Kontrol X20, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X40

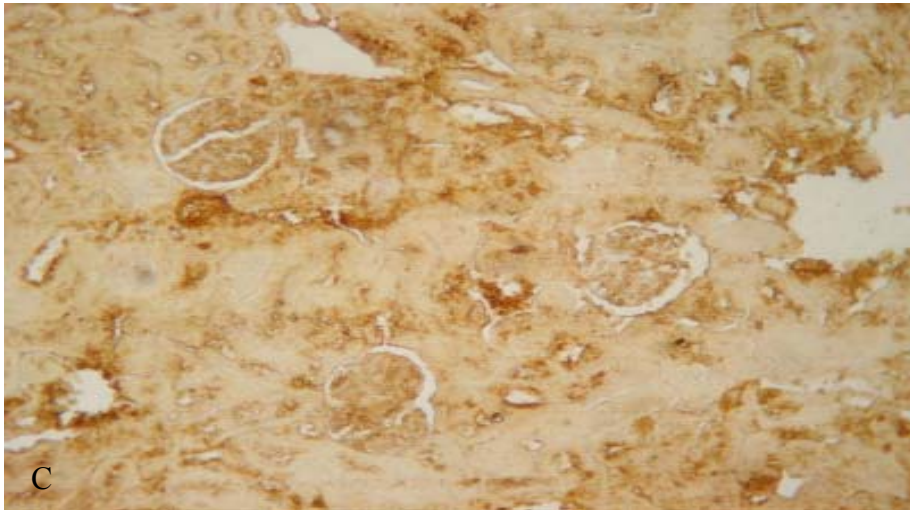
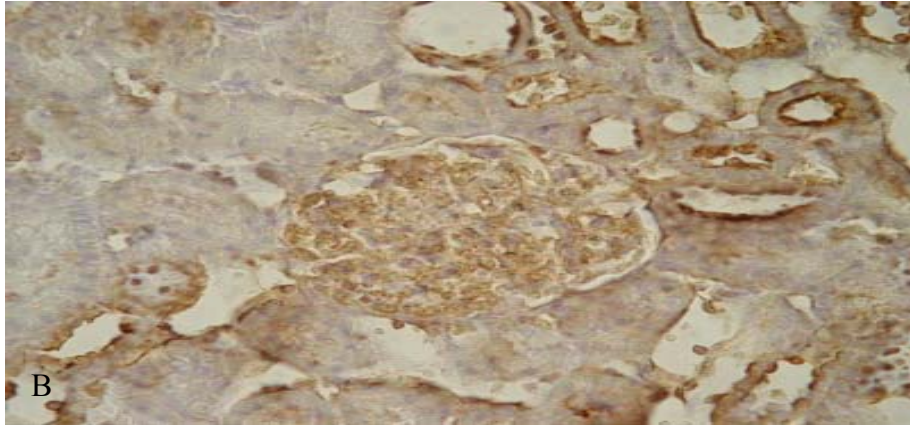
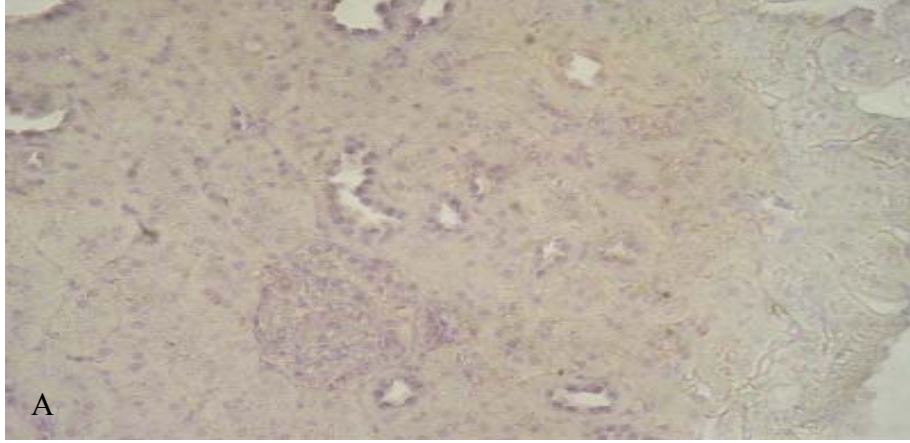


**Resim 6.** Grup 2 (Etilen-Glikol Grubu); A.Kontrol X40, B.NFκB X40, C.p38 MAPK X40





**Resim 7.** Grup 3 (Etilen-Glikol ve Kuersetin Grubu); A.Kontrol X20, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X20



**Resim 8.** Grup 4 (Etilen-Glikol ve Resveratrol Grubu); A.Kontrol X20, B.NFkB X40, C.p38 MAPK X20

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Üriner sistem taş hastalığı yaklaşık 4000 yıldır varlığı bilinen ve günümüzde hala üroloji pratiğinde en sık karşılaşılan hastalıklardan birisidir. Sık görülmesine ve çeşitli cerrahi tedavi seçeneklerine rağmen, gerek olayın fizyopatolojisinin tam olarak aydınlatılamamış olması ve gerekse medikal tedavinin istenen düzeyde başarılı sonuçlar ortaya koyamamış olması nedeniyle, üzerinde araştırmaların mutlaka devam etmesi gereken önemli patolojilerden birisidir.

Üriner sistem taş hastalığının yüksek oranda nüks etmesi, işgücü ve maddi kayba yol açması, cerrahi yöntemlerin nüks hızını azaltmaması gibi sebeplerden dolayı, daha az invaziv metodların araştırılması ve rekürrensi engelleyici tedavi uygulanması üriner sistem taş hastalığı için önem kazanmıştır (204).

Bugün için taşın kimyasal ve strüktürel yapısı ile ilgili birçok bilgi sağlanmakla birlikte, üriner sistem taş hastalığının etiyojisi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Çünkü taş hastalığı tek bir nedene bağlı olmayıp kompleks, birbiriyle ilişkili birçok faktörün rol oynadığı olaylar dizisidir.

Hücre hasarına cevap, artmış hücre proliferasyonu ve konsantrasyonu ile birlikte yine artmış hücre ölümü şeklinde gelişmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda bu hücre ölümünün nekroz şeklinde geliştiği öne sürülmüşken, son yıllarda yapılan çalışmalar bunun basit bir hücre nekrozu şeklinde değil de programlanmış hücre ölümü şeklinde geliştiği gösterilmiştir (205). Renal epitelyal hücrelerde bazal membran kaybıyla birlikte hücre ölümü neticesinde, kristal veya iyonların daha kolay depozisyonu gerçekleşmektedir. Hiperokzalürik diyet verilen hayvan modellerinde enzimüri, proteinüri ve membranürinin gösterilmesi bu görüşü desteklemektedir (206).

Literatürde yapılan geniş serili çalışmalarda taşların % 65-70' ini saf kalsiyum okzalat taşlarının oluşturduğu saptanmıştır. Kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfat içerikli mikst taşlar da dahil olmak üzere kalsiyum tüm taşların yaklaşık % 80 'inin yapısında bulunmaktadır. Kalsiyum taşları sıklıkla idrarda kalsiyum, ürik asit, okzalat artışı veya sitrat azalması ile birlikte dir. Kalsiyum taşlı hastaların % 30 unda

hiperkalsiüri, % 24 ünde hiperürükozüri, % 21'inde hiperokzalüri ve % 27'sinde hipositratüri tek başına veya diğer bulgularla birlikte bulunmaktadır (62).

Yapılan çalışmalarda idiyopatik kalsiyum okzalit taşlarının gelişiminde en önemli risk faktörünün hiperokzalüri olduğu gösterilmiştir. Daha önce bu konuda yapılmış deneysel çalışmalarda renal epitelyal hücrelerle CaOx kristallerinin ya da tek başına okzalit iyonlarının renal tübül epitelyal hücrelerinde oluşturduğu hasarın üriner sistemde taş oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir (205).

Çalışmamızda deneysel olarak sıçanlara % 1'lik etilen glisikol verilerek tübül hücrelerde bu maddeye maruziyetin süresiyle orantılı olarak değişik oranda kristal birikimi ve hücre hasar gözlenmiş olup literatür bilgilerine yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Okzalit metabolizmanın doğal bir ürünüdür ve normal insanlarda zararsızca vücuttan atılır. Ancak okzalitin artmış üriner ekskresyonu olarak tanımlanan hiperokzalüri fizyolojik pH da kristalizasyona sebep olup böbrekte kalsiyum okzalit kristal birikimine yol açabilir. Bu kristaller renal tübülleri bloke ederek hücre fonksiyonları bozar ve hücre ölümüne yol açar. Hiperokzalüri hangi nedene bağlı olursa olsun renal patolojik etkileri benzerdir. Bu etkiler Ürolitiazis, nefrokalsinozis, metabolik asidoz, hematüri, pyelonefrit, hidronefroz ve renal yetmezlik olarak özetlenebilir (91).

Okzalit renal epitelyal hücrelerde düşük konsantrasyonlarda mitojenik etki gösterirken yüksek konsantrasyonlarda CaOx kristalleri oluşturarak toksik etki gösterir. Böbrekte CaOx kristal birikimi enflamasyonu başlatan ve fibrozise yol açan bazı makromoleküllerin senteziyle sonuçlanır (92,93). Hayvan çalışmalarında ve renal epitelyal hücre kültürlerinde hiperokzalüri ve CaOx kristal oluşumuna reaksiyon olarak serbest radikal formasyonu gösterilmiştir (94,95).

0.75%–1% EG uygulanması ile hiperokzalüri indüklendiğinde 2 gün içinde Ox ın üriner ekskresyonunda artma olur, 3 gün içinde hiperokzalüri gözlenir, 2 hafta içinde CaOx kristalürisi görülür ve 4-6 hafta içinde CaOx nefrolitiazisi gelişir. Üriner pH ve sitratın ekskresyonu önemli derecede düşer. Diğer üriner faktörler ve renal kreatin klirensi normal aralıklarda kalır (91).

Son çalışmalarda taş hastalarında böbrekte OS geliştiği gösterilmiştir. Bu çalışmalardan birinin sonuçları göstermiştir ki CaOx böbrek taşı hastaları idrarlarında önemli oranda fazla miktarda alfa glutatyon S transferaz (alfa-GST), malondialdehit (MDA) ve tiobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) ekskrete etmektedir. Bu da böbreklerdeki OS in göstergesidir (102). Aynı çalışmada beta galaktozidaz (GAL) ve N-asetil-beta glukozaminidazın (NAG) üriner ekskresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Bu enzimlerin üriner ekskresyonu renal epitelyal hasarın göstergesidir. Benzer şekilde başka bir güncel çalışmada taş hastalarının artmış oksidatif stres ve renal tübüler hücre hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (103). Normal kontrollerle karşılaştırıldığında taş hastalarında daha yüksek plazma MDA, üriner MDA ve daha yüksek üriner NAG aktivitesi görülürken; daha düşük redükte glutatyon (GSH) ve hücrel glutatyon peroksidaz (cGPx) aktivitesi, protein tiol ve vitamin E görülür.

Serbest radikallere hedef yapılardan birisi hücre membranı lipidleridir. Lipid peroksidasyonu; serbest radikaller tarafından başlatılan, membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipid yapısını değistirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan bir olaydır. Hücre membranlarının oksijen radikallerine maruz kalması lipid peroksidasyon reaksiyonlarını uyarır.

Hücre membranlarında meydana gelen lipid peroksidasyonu, membran organizasyonunu bozarak hücrenin yapısının bozulmasına neden olur. Peroksidasyon sırasında oluşan lipid peroksitler, hücrel hasara yol açan, metabolizmayı değiştiren ve dokulardaki kan akımını azaltan güçlü kimyasal maddelerdir. Bu ürünler, lipidlerin dışında karbonhidratların, proteinlerin ve DNA'nın yapısını da etkileyerek denatürasyonuna, enzim inaktivasyonuna, DNA sarmal kırıklarına ve baz modifikasyonuna neden olur. Bu değisiklikler de birçok patolojik olaylara zemin hazırlar.

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesi ile sonlanır. Bu ürünlerin başlıcaları MDA ve 4-hidroksinonenal'dir. Meydana gelen aldehitlerden en önemlisi olan MDA, lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sık olarak kullanılır (63,64).

Antioksidan bir enzim olan katalaz hücrelerin peroksizomlarında lokalize olan ve yapısında dört hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşmuş olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radikal olmamasına karşın, en reaktif radikallerden birisi olan OH• radikalinin öncüsüdür. Bu nedenle birçok reaktif oksijen ürününden daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi su ve moleküler oksijene dönüştürür (207).

Flavonoidler, bitkisel gıdalarda bol ve yaygın olarak bulunan yararlı biyokimyasal ve antioksidan etkileri olan bileşiklerdir. Yaklaşık olarak 4000'den fazla flavonoid türü belirlenmiştir (107). Flavonoidler başlıca sebzeler, meyveler, kırmızı şarap, çay, soğan baklagillerde bulunur (108). Flavonoidlerin en önemli etkilerinden birisi serbest radikalleri temizleme özellikleridir (107). Serbest radikallerin üretim artışı endojen temizleyici bileşiklerin (süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzimler) kullanılıp azalmasına yol açar. Hemen her flavonoid grubunun en iyi tanımlanmış özelliği antioksidan kapasiteleridir ve flavonoidlerin direkt radikal temizleme özellikleri vardır (107,109,110).

Flavonoidlerin serbest radikalleri temizleme özelliklerine ilave olarak antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik, antiaterosklerotik, anti-tümöral etkileri içeren çeşitli biyolojik özellikleri de vardır (107,109,110). Flavonoidler XO (ksantin oksidaz), fosfolipaz-A<sub>2</sub>, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu, lökosit adhezyonunun ve aktivasyonunun azaltılması, mast hücresi degranülasyonunun inhibisyonu gibi etkileriyle antiinflamatuvar özellik gösterirler.

Radikal aracılı hasar sonucu oluşması muhtemel pek çok hastalıktan korunmada flavonoidlerin etkin bir rol oynayabileceği düşünülebilir (107,109).

Yapılan bir çalışmada yeşil çaydaki katekin maddesinin sıçan böbreğinde renal tübüler hücrelerde oksidatif hasarı ve CaOx birikimini azalttığı gösterilmiştir (208). Benzer sonuçlar okzalatin indüklemesiyle taş oluşturulan grupta kıyaslanan katekin tedavili okzalat indüktif taş oluşturulan grupta da gözlenmiştir (209). İn vivo ve in vitro çalışmalar göstermiştir ki; hücre kültürlerinde okzalat tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu potansiyel antioksidan etkili bir flavonoid olan kuersetin tarafından azaltılmıştır (210).

Daha duyarlı görünen proksimal tübül hücreleri en erken değişikliklerin saptandığı yapılardır. Renal hasar birçok epitelyal hücrenin ölümü ve ayrılmasıyla sonuçlanır. Bu da bazal laminanın ortaya çıkmasını sağlar. Kristallerin çoğu intraluminaldir ve hücresel yıkım ürünleriyle değişik derecelerde birliktelik gösterir. Bu da CaOx kristallerinin membran uyarılı nükleasyonu olasılığını gösterir. Kristal birikimi inflamasyonla ilişkilidir. Monosit, makrofaj ve polimorfonükleer lökositler gibi inflamatuvar hücreler interstisyumun kenarına birikir ve interstisyel kristallerin genellikle makrofaj ve dev hücreler tarafından çevrelendiği görülür. (211)

Ox ve CaOx kristallerinin yüksek konsantrasyonları renal hücreleri de uyarak inflamatuvar yolağın çeşitli mediyatörlerinin, ekstrasellüler matriks oluşumunun ve kristalizasyon modulatörlerinin artışına yol açar (92,93,104). Reaktif oksijen türleri protein kinaz C (PKC), c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 mitojen aktivited protein kinaz (MAPK) gibi sinyal moleküllerini aktive ederek NF-kappa B ve aktive protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerini etkiler. Bu transkripsiyon faktörlerinin uyarılması gen upregülasyonuna ve OPN, bikunin ve alfa-1-mikroglobulin gibi kristalizasyon modulatörlerinin üretimine yol açar (92,93,104). Bunlar da nefrolitiazisin kristal formasyonu, büyümesi, agregasyonu ve böbreklerde birikimini içeren tüm görünümünü etkiler.

Ürolitiazis böbrekte promotör ve inhibitörlerin dengesizliği ile oluşan kompleks bir olaydır (212). Ateroskleroz, iskemi-reperfüzyon hasarı, inflamatuvar hastalıklar, kanser ve yaşlanma gibi geniş bir hastalık grubunda ROS rolü olduğu kanıtlanmıştır (213). Benzer şekilde serbest radikallerin ürolitiazisle de ilişkisi olduğu gösterilmiştir (214).

Ratlarda EG-uyarılı ürolitiazisin patofizyolojisinde ROS nin rolü hakkında birçok deneysel çalışma yapılmış olup bu çalışmalarda böbrekte CaOx kristal birikimini önlemek için bazı antioksidan ajanlar denenmiştir. Limon suyu (sitrata, vit C, vit E, eriositrin ve hesperetin gibi flavonoidler nedeniyle yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir), yeşil çay (% 13 katekin içerir), *Orthosiphon grandiflorum* (java çayı) (öpatörin, sinensetin, salvejenin, ladanein, vomifoliol gibi flavonoidler içerir), nar suyu (Vit C, Vit B), *Berberis vulgaris* kökü (kadın tuzluğu olarak bilinen dikenli bir çalı bitkisi) bunlardan bazılarıdır (208,209,211,215-218).

Bu çalışmayı planlarken hipotezimiz KRS ve RES ün böbrekteki CaOx kristal birikimini renal tübüler membran yüzeyindeki hiperokzalüri uyarılı peroksidatif hasarı engelleyerek önleyebileceği şeklindeydi. Böylece böbrek taşı oluşumu önlenmiş olacaktı.

Oksidatif stres parametrelerine ek olarak çalışmamızda redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri olan NF-kB ve p38 MAPK ekspresyonlarını immunohistokimyasal olarak değerlendirdik. P38 MAPK ve NF-kB sistemlerinin oksidatif stres ile aktive olabildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. P38-MAPK ve NF-kB yolaklarının antiglomeruler bazal membran nefriti, üreter obstruksiyonu, endotoksemi ve immun kompleks nefriti gibi renal enflamatuvar hastalıklarda aktive olduğu gösterilmiştir (219-222). Çalışmamızda hiperokzalüri grubunda bu yolakların aktivasyonunu gösterdik.

Selektif p38-MAPK inhibitörlerinin inflamatuvar moleküllerin üretimini bloke edebildiği, apoptotik hücre ölümünü azalttığı ve akut renal hasarı düzelttiği anti- GBM glomerulonefrit ve iskemi/reperfüzyon gibi renal hastalıkların hayvan modellerinde gözlenmiştir (223,224). Lokal olarak üretilen ROS nin TNF üretilip p38 MAPK yoluyla NF-kB yi aktive ederek postrenal hasarı tetiklediği gösterilmiştir (225). P38 MAPK aktivasyonu NF-kB aktivasyonunu ve inflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu indükler (226). TNF- $\alpha$  ve ROS NF-kB yi aktive eder (227).

Hücre kültürü çalışmalarında NF-kB üzerine resveratrolün değişik etkileri gösterilmiştir. Bazı sonuçlar resveratrolün NF-kB aktivitesine pozitif etkilerini gösterirken diğerleri negatif etki veya etki olmadığı yönündedir. Bazı farklılıklar konsantrasyon farkına ve/veya inkübasyon zamanlarına bağlı olabilirken diğer bir sebep resveratrolün hücre tipine spesifik etkileridir (228).



Literatür incelendiğinde kuersetin ve resveratrolün idrar okzalatu üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda hem kuersetin hem de resveratrol verilen gruplarda idrar okzalatu düzeyi anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Bu alışma sonucunda kalsiyum okzalatu kristallerinin renal epitelyal hücrelerde p38 MAPK sinyal yolağını aktive ettiğini ve artmış p38 MAPK aktivitesinin NF-kB aktivasyonuna yol açarak inflamasyonda önemli rol oynadığını söyleyebiliriz. Elimizdeki bilgiler NF-kB ve p38 MAPK sinyal yolunun kalsiyum okzalatu depozitlerinin yol açtığı inflamatuvar olayda tedavide önemli bir hedef olabileceği yönündedir. NF-kB ve p38 MAPK aktivasyonunun antioksidan ajanlarla blokajı primer okzalozis veya sekonder hiperokzalüri gibi tübülointerstisyel hasara yol açan hiperokzalrik olaylarda ürolitiazis profilaksi ve tedavisi için etkin bir strateji olabilir.

Hiperokzalüri gibi renal hasarda rolü bilinen etmenlerin, renal parankimal hücrelere olumsuz etkilerini önleyebilecek ajanlar dışında antioksidan, antiinflamatuvar özellikleri olan kuersetin ve resveratrolün de koruyucu etkisini histopatolojik olarak gösterdik. Üriner sistem taş hastalığı tedavisinde; hangi tedavi metodolojisi uygulanırsa da değişmeyen gerçek, taşın tekrarlama özelliğinin kaçınılmaz olduğudur. Bunu minimize etmek için ise, üriner taş risk faktörlerinin ortaya konması, tedavide kullanılan yöntemlerde renal hasarın minimize edilmesi ve taştan arınma sonrası önleyici yöntemlerin ve tedavilerin uygulanmasından geçmektedir.

Çalışmamızda kuersetin ve resveratrolün hiperokzalriyi önlediği gösterilmiştir. Ancak kuersetin p38 MAPK aktivitesini azaltırken bu iki antioksidan madde NFkB yolağını anlamlı olarak inhibe edememişlerdir. Bu konuda mevcut verilerin desteklenmesi için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

## ÖZET

### **Deneysel Sıçan Hiperokzalüri Modelinde Kuersetin ve Resveratrolün Koruyucu Etkileri**

Böbrek hücrelerinin kalsiyum okzalit kristallerine maruz kalması reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açarak hasar ve enflamasyonla sonuçlanan oksidatif strese neden olur. Kuersetin (KRS) ve resveratrol (RES) antioksidan, antiinflamatuvar, antitümöral, antiviral, antialerjik, antitrombolitik ve antiaterosklerotik etkileri içeren geniş ve çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip olan polifenollerdir. Bu tezde bu iki antioksidan maddenin hiperokzalürinin yol açtığı nefrolitiazis ve nefrokalsinozisi engellemedeki olası etkileri araştırıldı.

**Yöntemler:** Deneşte 32 adet ortalama 14 haftalık 250 gr wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Ratlar sekizerli eşit dört gruba ayrıldı. Grup I kontrol grubu, grup II içme suyuna karıştırılan % 1 etilen glikol ile hiperoksalüri oluşturulan grup (EG grubu), grup III etilen glikole ek olarak gavaj yoluyla günlük 10 mg/kg kuersetin verilen grup (EG+KRS grubu), grup IV etilen glikole ek olarak gavaj yoluyla günlük 10 mg/kg resveratrol verilen grup (EG+RES grubu) olarak düzenlendi. Çalışmanın başlangıcında ve beşinci haftanın sonunda dört grubun her birinden günde iki sıçan olacak şekilde 24 saat boyunca metabolik kafeslere yerleştirildi ve idrarları toplandı. Beşinci haftanın sonunda ratlar sakrifiye edilerek vena kava inferiordan kanları alındı. Sağ böbrek biyokimyasal, sol böbrek immunohistokimyasal çalışma için alındı. Kan, idrar ve böbrek dokularında malondialdehit, katalaz, üre, kalsiyum, okzalit ve kreatin klirensi çalışıldı, rutin histolojik değerlendirme ve p38 MAPK, NFkB'yı değerlendiren immunohistokimyasal çalışmalar yapıldı.

**Sonuçlar:** EG grubunda idrar okzalit düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). EG+KRS ve EG+RES gruplarında idrar okzalit düzeyleri EG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük tespit edildi. EG grubunda MDA düzeyi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, EG+KRS ve EG+RES gruplarında MDA düzeyleri EG grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Doku kesitlerinin immunohistokimyasal incelemesinde EG grubunda p38 MAPK aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek gözlemlendi. EG+KRS grubundaki p38 MAPK aktivitesi EG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunurken ( $p<0.004$ ), EG+RES ve EG grupları arasında p38 MAPK aktivitesi açısından anlamlı fark gözlenmedi ( $p>0.069$ ). Yine EG grubunda NF-kB aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken ( $p<0.001$ ), EG+KRS ve EG+RES gruplarında EG grubuna göre NF-kB aktivitesi açısından anlamlı fark gözlenmedi.

**Çıkarımlar:** Hiperokzalüri böbrek dokusunda oksidatif stresi arttırmaktadır. Antioksidan aktiviteleriyle hem KRS hem de RES hiperokzalüriye bağlı artan doku MDA seviyelerini düşürmüş, katalaz aktivitesini arttırmıştır. Ancak KRS antiinflamatuvar etkiyle p38 MAPK aktivitesini azaltırken RES de bu gözlenememiş ve bu iki madde NFkB aktivitesini anlamlı olarak inhibe edememişlerdir. Bu maddelerin üriner taş oluşumunu engellemedeki olası yararlarını tespit etmek için daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmaktadır

**Anahtar kelimeler:** hiperokzalüri, kuersetin, resveratrol, sıçan, etilen glikol, kalsiyum okzalit

## ABSTRACT

### The Preventive Effects of Quercetin and Resveratrol in Experimental Rat Hyperoxaluria Model

Renal cellular exposure to calcium oxalate crystals leads to the production of reactive oxygen species, development of oxidative stress followed by injury and inflammation. Quercetin (QRS) and resveratrol (RES) are the flavanoids which have wide and various biological functions include antioxidant, antiinflammatory, antitumoral antiviral, antiallergic, antithrombotic and antiatherosclerotic effects. In our study, we aimed to investigate preventing hyperoxaluria induced nephrolithiasis and nephrocalcinosis by these molecules in an animal model.

**Methods:** In this model 32, mean 14 week, 250 gr male, wistar albino rats were used. Rats were divided equally 4 groups: Group I control, group II rats which were added 1 % ethylene glycol (EG) in drinking water to produce hyperoxaluria, group III were given 10 mg/kg/day QRS additionally to EG, group IV were given 10 mg/kg/day RES additionally to EG. Two rats from each of the four groups placed in metabolic cages for four days and 24-hour urine was collected every day, at the beginning of the study and at the end of the fifth week. Rats were sacrificed and the blood of inferior vena cava and right kidney for biochemical study and left kidney for immunohistochemical study were taken, at the end of the fifth week. Malondialdehyde (MDA), catalase, urea, calcium, oxalate and creatinine clearance, routine histological evaluation and immunohistochemical studies which evaluated p38 MAPK, NF-kB were evaluated in blood, urine and kidney tissue.

**Results:** Urinary oxalate levels were found statistically significant high in EG group according to control group and low in EG+QRS and EG+RES groups according to EG group ( $p < 0.05$ ). Tissue MDA levels were found statistically significant high in EG group according to control group and low in EG+QRS and EG+RES groups according to EG group ( $P < 0.05$ ). P38 MAPK activity was found statistically significant high in EG group according to control group with immunohistochemistry staining of tissue sections. P38 MAPK activity was found statistically significant low in EG+QRS group according to EG group ( $p < 0.004$ ), and there was no statistically significant difference between EG+RES and EG groups ( $p > 0.069$ ). NF-kB activity was found statistically significant high in EG group according to control group ( $p < 0.001$ ), and there were no statistically significant differences between EG+QRS and EG, EG+RES and EG groups.

**Conclusion:** Hyperoxaluria induce oxidative stress in renal tissue. Both of QRS and RES have reduced hyperoxaluria induced MDA levels and have raised catalase activity with their antioxidant activities. However QRS has reduced p38 MAPK activity with antiinflammatory effect but this effect was not seen with RES and these antioxidants have not inhibited the NF-kB activity. Further studies have required to find the preventing effects of QRS and RES on stone formation.

**Keywords:** Hyperoxaluria, quercetin, resveratrol, rat, ethylene glycol, calcium oxalate

## KAYNAKLAR

1. Adayener C., İşeri C., Şenkul T., Kardemir K., Baykal K., Erden D., (2002) Tekrarlayan Taş Hastalığı: Epidemiyolojik Bir Araştırma Türk Üroloji Dergisi 28 (4): 428-436
2. Menon M, Resnick MI. Urinary Lithiasis: Etiology, diagnosis and medikal management. In: Walsh PC, Retik TA, Vaughen ED, eds. Campbells Urology. Company, eighth edit., 2005; Vol 4:3229-3293.
3. Kim HH, Jo MK, Kwak C, Park SK. Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. Urology 2002; 59: 517-521.
4. Akıncı M, Esen T, Tellaloğlu S. Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. Eur Urol 1991; 20: 200-203.
5. Menon M, Koul H. Clinical review 32: Calcium oxalate nephrolithiasis. J Clin Endocrinol Metab. 1992; 74: 703-710.
6. Gambaro G, Vezzol G, Casari G, Rampoldi L, Angelo AD, Borghi L. Genetics of hypercalciuria and calcium nephrolithiasis: from the rare monogenic to the common polygenic forms. Am J Kidney Dis. 2004; 44:963-986.
7. López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. Pediatr Nephrol. 2008; 25: 49-59.
8. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis. Arch Ital Urol Androl. 1996; 68: 203-249.
9. Bak M, Ural R, Agin H, Serdaroglu E, Calkavur S. The metabolic etiology of urolithiasis in Turkish children. Int Urol Nephrol. 2009; 4: 453-460
10. Ozokutan BH, Küçükaydin M, Gündüz Z, Kabaklioğlu M, Okur H, Turan C. Urolithiasis in childhood. Pediatr Surg Int. 2000; 16: 60-63
11. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. JAMA. 2005; 293: 455-462.
12. Tiselius HG. Stone incidence and prevention. Braz J Urol 2000; 26: 452-462
13. Coe FL, Parks JH, Asplin JH: The pathogenesis and treatment of kidney stones. N Engl J Med 1992; 327: 1141-1152.
14. Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J. A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. Kidney Int 2005; 67: 1053-1061.
15. Tellaloğlu R, Ander H. Stones in children. Türk J Pediatr 1984; 26: 51-60.
16. Miyake O, Yoshimura K, Tsujihata M, et al. Possible causes for the low prevalence of pediatric urolithiasis. Urology. 1999; 53: 1229-1234.
17. Miyake O, Kakimoto K, Tsujihata M, Yoshimura K, Takahara S, Okuyama A. Strong inhibition of crystal-cell attachment by pediatric urinary macromolecules: a close relationship with high urinary citrate secretion. Urology. 2001; 58: 493-497.
18. Tefekli A, Esen T, Ziylan O, et al. Metabolic risk factors in pediatric and adult calcium oxalate urinary stone formers: is there any difference. Urol Int. 2003; 70:273-277.
19. Curhan G.,(2007) Epidemiology of Stone Disease (2009) Urol Clin North Am. August; 34(3): 287-293

20. Tefekli A., Tok A., Altunrende F., Barut M., Berberoğlu Y., Müslümanoğlu A., (2005) Üriner sistem taş hastalarında yaşam tarzı ve beslenme alışkanlıkları Türk Üroloji Dergisi: 31 (1): 113-118
21. Demirel A. (Ed). (2009). *Üroloji*, Türkiye Klinikleri Üriner Sistem Taş Hastalığı Özel Sayısı
22. Elaine M. Worcester MD., Fredric L. Coe MD. (2008) Nephrolithiasis Prim Care. 35(2): 369–vii.
23. Müslümanoğlu A., Esen T. ve Tefekli A. (2007). *Üriner Sistem Taş Hastalığı*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
24. Embon OM, Rose GA, Rosenbaum T. (1990) Chronic dehydration stone disease Br J Urol. Oct;66(4):357-62.
25. Bellizzi V, De Nicola L, Minutolo R, Russo D, Cianciaruso B, Andreucci M, Conte G, Andreucci V (1999). Effects of water hardness on urinary risk factors for kidney stones in patients with idiopathic nephrolithiasis Nephron.81 Suppl 1:66-70
26. Wabner CL, Pak CY.( 1993 ) Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors J Urol. Jun;149(6):1405-8.
27. Parry ES, Lister IS. Sunlight and hypercalciuria. *Lancet*. 1975 May 10;1(7915):1063–1065.
28. Fromberg M. Diet and calcium Stones. Can Med Assoc Journal, 1992;146 (11):1894.
29. Strazzullo P, Cappuccio FP.(1995) Hypertension and kidney stones: hypotheses and implications Semin Nephrol. Nov;15(6):519-25.
30. Cappuccio F., Strazzullo., Mancini M. (2005)Kidney stones and hypertension population based study of an independent clinical association 1990;300:1234
31. Meyer JL. Nucleation kinetics in the calcium oxalate-sodium urate mono-hydrate system. Invest Urol 1981;19:197-201.
32. Worcester EM, Coe FL. Nephrolithiasis. Prim Care. 2008; 35: 369-390.
33. Miller NL, Evan AP, Lingeman JE. Pathogenesis of renal calculi. Urol Clin North Am. 2007; 34: 295-313.
34. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. J Clin Invest 2005; 115:2598–2608.
35. Pak CY. Hypercalciuric calcium nephrolithiasis. In Resnick MI, Pak CY (eds). Urolithiasis. A Medical and Surgical Reference. Philadelphia WB Saunders 1990 pp 79-88.
36. Özkeçeli R, Satar N, Doran Ş ve ark. Üriner Sistem Taş Hastalığı. İçinde: Anafarta K, Göğüş A, Bedük Y, Arıkan N, (Ed). Temel Üroloji. Ankara. Güneş Kitabevi. 1998.
37. Macfarlane T. (2006). *Üroloji*. (3. Baskı). Güneş Kitabevi.
38. Bushinsky DA. Nephrolithiasis. J Am Soc Nephrol. 1998; 9: 917-924
39. Khan SR, Maslamani SA, Atmani F et al. Membranes and their constituents as promoters of calcium oxalate crystal formation in human urine. Calcif Tissue Int. 2000; 66: 90-96.
40. Welshman SG, McGeown MG. The relationship of the urinary cations, calcium, magnesium, sodium and potassium, in patients with renal calculi. Br J Urol 1975;47:237-242.

41. Göğüs O. Üriner sistem taş hastalığı. Müftüoğlu YZ, Özdiler E (edt), Klinik üroloji Öncü Limited, Ankara 1998, 231-264.
42. Jenkins AD. Calculus formation. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Mitchell ME (eds), *Adult and pediatric urology* (4nd ed.) Lipincott Williams Wilkins, Philadelphia 2002, pp, 355-392
43. Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial.* 2007; 20: 113-121.
44. Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL. Urine protein markers distinguish stoneforming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291:530-536.
45. Højgaard I, Tiselius HG. Crystallization in the nephron. *Urol Res.* 1999; 27: 397-403.
46. Orson W Moe. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet.* 2006; 367: 333-344.
47. Ito H, Coe FL. Acidic peptide and polyribonucleotide crystal growth inhibitors in human urine. *Am J Physion* 1977;233:455-463.
48. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. In vitro precipitation of calcium oxalate in the presence of whole matrix or lipid components of the urinary stones. *J Urol* 1988;139:418-422.
49. Grover PK, Marshall VR, Ryall RL. Tamm-Horsfall mucoprotein reduces promotion of calcium oxalate crystal aggregation induced by urate in human urine in vitro. *Clin Sci* 1994;87:137-142.
50. Kumar V, Lieske JC. Protein regulation of intrarenal crystallization. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15: 374-380.
51. Marangella M, Bagnis C, Bruno M, Vitale C, Petrarulo M, Ramello A. Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis. *Urol Int.* 2004; 72: 6-10.
52. Tiselius HG, Bek-Jensen H, Fornander AM, Nilsson MA. Crystallization properties in urine from calcium oxalate stone formers. *J Urol.* 1995; 154: 940-946.
53. Rahman MA, Rahman B, Perveen S. Studies on serum mucoproteins in patients with urinary calculi. *Biomed Pharmacother* 1986;40:311-313.
54. Srinivasan S, Kalaiselvi P, Varalakshmi P. Epitaxial deposition of calcium oxalate on uric acid rich stone matrix is induced by a 29 kDa protein. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 267-274.
55. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2009.
56. Hess B, Ryall RL, Kavanagh JP, et al. Methods for measuring crystallization in urolithiasis research: why, how and when? *Eur Urol.* 2001; 40: 220-230.
57. Tei N, Tsujihata M, Tsujikawa K, Yoshimura K, Nonomura N, Okuyama A. Hepatocyte growth factor has protective effects on crystal-cell interaction and crystal deposits. *Urology.* 2006; 67: 864-869.
58. Jonassen JA, Kohjimoto Y, Scheid CR, Schmidt M. Oxalate toxicity in renal cells. *Urol Res.* 2005; 33: 329-339.

59. Khand FD, Gordge MP, Robertson WG, Noronha-Dutra AA, Hothersall JS. Mitochondrial superoxide production during oxalate-mediated oxidative stress in renal epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 1339-1350.
60. Thamilselvan S, Selvam R. Effect of vitamin E and mannitol on renal calcium oxalate retention in experimental nephrolithiasis. *Indian J Biochem Biophys.* 1997;34: 319-323.
61. Rutchik SD, Spirnak JP, Resnick MI. Calculous disease of the urinary tract. In: Pollack HM, McLennan BL (eds), *Clinical urography* (2nd ed), W.B.Saunders Company, USA 2000, pp, 2137-2145
62. Pak CY, Oata M, Lawrence EC, Snyder W. The hypercalciurias. Causes, parathyroid functions and diagnostic criteria. *J Clin Invest* 1974;54:387-400.
63. Marangella M, Vitale C, Bagnis C, Bruno M, Ramello A. Idiopathic calcium nephrolithiasis. *Nephron.* 1999; 8: 38-44.
64. Laminski NA, Meyers AM, Kruger M, et al. Hyperoxaluria in patients with recurrent calcium oxalate calculi: dietary and other risk factors. *J Urol.*1991;68(5): 454-8
65. Yapanoğlu T., ve Okyar G. (2009)Kalsiyum Oksalat Taş Hastalığı,; 2(3):20-5
66. Tekgül S.Urinary stone disease in children. ESPU Educational Committee, Pediatric Urology Course Book Cappodocia 2003 pp 291-301.
67. Coe FL, Bushinsky DA. Pathophysiology of hypercalciuria (review). *Am Jphysiol* 1984;247:1-13.
68. Holmes RP, Goodman HD, Assimos DG. The distribution of urinary calcium excretion in individuals on controlled diets. *J Urol* 1995a;153:350.
69. Kahri K, Garside J, Blacklock NJ. The role of magnesium in calcium oxalate urolithiasis. *Br J Urol.*1998; 61(2): 107-15
70. Worcester EM, Coe FL. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria. *Semin Nephrol.* 2008; 28: 120-132.
71. Menon M, Resnick MI. Üriner sistem taş hastalıkları: etyoloji, teshis ve medikal tedavi. In: Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, Anafartalar MK, Yaman MÖ (eds), *Campell Üroloji Güneş Kitapevi, Ankara* 2005, 3229-3305.
72. Delanay MP, Price CP, Newman DJ, Lamb E. Kidney Disease. İçinde: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* USA. Elsevier saunders. 2006: 1671-1745.
73. Wicham JEA., Kellett MJ. Percutaneous nephrolithotomy. *Br J Urology* 1981; 53:297.
74. Macfarlane T. (2006). *Üroloji.* (3. Baskı). Güneş Kitabevi.
75. Park S, Pearle MS. Pathophysiology and management of calcium stones. *Urol Clin North Am.* 2007; 34: 323-334.
76. Colella J, Kochis E, Galli B, Munver R. Urolithiasis/nephrolithiasis: what's it all about? *Urol Nurs.* 2005; 25: 427-448.
77. Hautmann R. Primary hyperoxaluria familial oxalosis. In: Kaufman JJ (eds), *Current urologic therapy* W.B.Saunders Company, USA 1980, pp,123-147
78. Lerner PS. Infection stones *J Urol.* 1989; 141: 753-8
79. Cameron MA, Sakhaee K. Uric acid nephrolithiasis. *Urol Clin North Am.* 2007;34: 335-346.

80. Daudon M, Lacour B, Jungers P. High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone formers. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20: 468-469.
81. Abate N, Chandalia M, Cabo-Chan AV Jr, Moe OW, Sakhaee K. The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int* 2004; 65: 386–392.
82. Pak CY. Classification of nephrolithiasis. In: Wilson JD, Foster DW (eds), *Williams textbook of endocrinology* (8th ed), W.B.Saunders Company, USA 1992, pp, 1521-1536
83. Daudon M, Cohen-Solal F, Barbey F, Gagnadoux MF, Jungers P. Cystine crystal volume determination: a useful tool in the management of cystinuric patients. *Urol Res* 2003; 31:207-211
84. Jenkins AD. Calculus formation. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW, Mitchell ME (eds), *Adult and pediatric urology* (2nd ed), Mosby Year Book, 1991, pp, 403-443
85. Rebentisch G, Stolz S, Muche J. Xanthinuria with xanthine lithiasis in a patient with Lesch-Nyhan syndrome under allopurinol therapy. *Aktuelle Urol*.2004; 35(3): 215-21
86. Simmonds HA. 2,8-Dihydroxyadenine lithiasis. *Clin Chim Acta* 1986;160(2):103-8
87. Engle SJ, Stockelman MG, Chen J, et al. Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; (93):5307-5312
88. Ettinger B, Oldroyd NO, Sorgel F. Triamteren nephrolithiasis. *JAMA*. 1980; 224(21):2443-5
89. Corman JM, Krieger JN. Urologic Aspects of AIDS and HIV Infection. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Mitchell ME (eds), *Adult and pediatric urology* (4th ed), Lippincott Williams Wilkins, USA 2002, pp,1883-1893
90. Kopp JB, Miller KD, Mican JA, et al. Crystalluria and urinary tract abnormalities associated with indinavir. *Ann Intern Med*.1997 J; 127(2):119-25
91. Khan SR. Hyperoxaluria-induced oxidative stress and antioxidants for renal protection. *Urol Res* 2005; (33): 349-357.
92. Khan SR (2004) Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models, and tissue culture studies. *Clin Exp Nephrol* 8: 75
93. Khan SR (2004) Role of renal epithelial cells in the initiation of calcium oxalate stones. *Nephron Exp Nephrol* 98: 55
94. Scheid CR, Koul H, Hill WA, Lubner-Narod J, Kennington L, Honeyman T, Jonassen J, Menon M (1996) Ox toxicity in LLC-PK1 cells: role of free radicals. *Kidney Int* 49: 413
95. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR (1997) Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and CaOx nephrolithiasis. *J Urol* 157: 1059
96. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR (2000) Free radical scavengers catalase and superoxide dismutase provide protection from oxalate associated injury to LLC-PK1 and MDCK cells. *J Urol* 164: 224
97. Thamilselvan S, Khan SR, Menon M (2003) Oxalate and calcium oxalate mediated free radical toxicity in renal epithelial cells: effect of antioxidants. *Urol Res* 31: 3
98. Southorn P, Powis G. Free radical in medicine I. Chemical nature and biological reactions. *J Mayo Clin Proc* 1988;63:381-388.



99. Brent JA, Rumack HH. Role of free radicals in toxic hepatic injury. *J Free Radical Chemistry J Clinical Toxicology* 1993;49:481-493.
100. Dizdaroğlu M. Mechanisms of oxidative DNA damage, lesion and their measurement. *Kluwer Academic/Plenum Publishers* 1999;302:67-87.
101. Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK. *J Cancer Res* 1994; 54:12-15.
102. Huang H-S, Ma M-C, Chen C-F, Chen J (2003) Lipid peroxidation and its correlations with urinary levels of oxalate, citric acid, and osteopontin in patients with renal calcium oxalate stones. *Urology* 61: 1123
103. Tungsanga K, Sriboonlue P, Futrakul P, Yachantha C, Tosukhowong P. Renal tubular cell damage and oxidative stress in renal stone patients and the effect of potassium citrate treatment. *Urol Res* 2005 Feb;33(1):65-9.
104. Khan SR, Kok DJ (2004) Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci* 9: 1450
105. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harpers biochemistry*. 2nd edition. Typo 1991.
106. Peterson J, Dwyer J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 1998; 18: 1995-2018.
107. Nijveldt RJ, Nood E, Hoorn OEC, Boelens PG, Noreen K, Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *Clin Nutr* 2001; 74: 418-25.
108. Chi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Rad A Res* 2000; 33: 809-17.
109. Elliott M, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 2000; 52: 673-751.
110. Schroeter H, Spencer JPE, Rice-Evans C. Current status of the potential role of flavonoids in neuroprotection. *Critical reviews of oxidative stress and aging: advances in basic science, diagnostics and intervention*, Cutler RG, Rodriguez H, Vol. I, World Scientific Publis Singapore, 2003; 137.
111. Gugler R., Leschik M., Dengler H.J. (1975) Disposition of Quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* 9, 229-234.
112. Murota K., Terao J., Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 417 (1): 12 -17. 2003
113. İnal M.E., Kahraman A. (2000) The Protective Effect of Flavonol Quercetin Against Ultraviolet A Induced Oxidative Stress in Rats. *Toxicology*, 154: 21-29
114. Cimen M.B.Y. (1999) Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri. *T. Klin. Tıp Bilimleri*, 19: 296-396
115. Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., "Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat Pancreas", *Pharmacological Research*, 51: 117-123 (2005).
116. Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C., "Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen", *AJP - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277: 120-126 (1999).

117. Pawlikowska-Pawlega, B., Gruszecki, W.I., Misiak, L.E., Gawron, A., "The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes", *Biochemical Pharmacology*, 66: 605-612 (2003).
118. Benito, S., Buxaderas, S., Mitjavila, M.T., "Flavonoid metabolites and susceptibility of rat lipoproteins to oxidation", *AJP – Heart and Circulatory Physiology*, 287: 2819-2824 (2004).
119. Motoyama, K., Koyama, H., Moriwaki, M., Emura, K., Okuyama, S., Sato, E., Inoue, M., Shioi, A., Nishizawa, Y., "Atheroprotective and plaque-stabilizing effects of enzymatically modified isoquercitrin in atherogenic apoE-deficient mice", *Nutrition*, 25: 421-427 (2009).
120. Lamson, D.W., Brignall, M.S., "Antioxidants and cancer III: quercetin", *Alternative Medicine Review*, 5: 196-208 (2000).
121. Benito, S., Lopez, D., Saiz, M.P., Buxaderas, S., Sanchez, J., Puig-Parellada, P., Mitjavila, M.T., "A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta", *British Journal of Pharmacology*, 135: 910-916 (2002).
122. Davis W, Lamson MS, ND and Matthew S, Brignall ND, 2000, 'Antioxidants and Cancer III: Quercetin'. *Altern Med Rev.* 5 (3): 196-208.
123. Duthie SJ, Johnson W, Dobson VL, 1997, 'The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells'. *Mutat Res.* 390: 141–151.
124. Nass-Arden L, Breitbart H, 1990, 'Modulation of mammalian sperm motility by quercetin'. *Mol Reprod Dev.* 25: 369–373.
125. Volk C, Kempfski B, Kempfski OS, 1997, 'Inhibition of lactate export by quercetin acidifies rat glial cells in vitro'. *Neurosci Lett.* 223: 121–124.
126. Soliman KF, Mazzio EA, 1998, 'In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds'. *Proc Soc Exp Biol Med.* 218: 390–397.
127. Conklin DR, Tan KH, Aschner M, 1998, 'Dimethyl sulfoxide, but not acidosis induced metallothionein mRNA expression in neonatal rat primary astrocyte cultures is inhibited by the bioflavonoid, quercetin'. *Brain Res.* 794: 304–308.
128. Huang Z, Fasco MJ, Kaminsky LS, 1997, 'Inhibition of estrone sulfatase in human liver microsomes by quercetin, other flavonoids'. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 63: 9–15.
129. Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K and Uchida A, 1994, 'Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein'. *Cancer Res.* 54: 4952-4957.
130. Hosokawa N, Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Aoike A, Kawai K and Nagata K, 1992, 'Inhibition of the activation of heat shock factor *in vivo* and *in vitro* by flavonoids'. *Mol Cell.* 12: 3490-3498.
131. Choi JA, Kim JY, Lee JY, Kang CM, Kwon HJ *et al.*, 2001, 'Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin'. *Int J Oncol.* 19:837-844.
132. Iwao K. and Tsukamoto I, 1999, 'Quercetin inhibited DNA synthesis and induced apoptosis associated with increase in c-fos mRNA level and the upregulation of p21WAF1/CIP1 mRNA and protein expression during liver regeneration after partial hepatectomy'. *Biochim Biophys Acta.* 1427: 112-120.

133. Kang TB and Liang NC, 1997, 'Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukaemia cells'. *Biochem Pharmacol.* 54: 1013-1018.
134. Salucci M, Stivala LA, Maiani G, Bugianesi R and Vannini V, 2002, 'Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells (Cacco2)'. *Br J Cancer.* 86: 1645-1651.
135. Kobayashi T, Nakata T and Kuzumaki T, 2002, 'Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells'. *Cancer Lett.* 176: 17-23.
136. Kaneuchi M, Sasaki M, Tanaka Y, Sakuragi N, Fujimoto S and Dahiya R, 2003, 'Quercetin regulates growth of Ishikawa cells through the suppression of EGF and cyclin D1'. *Int J Oncol.* 22: 159-164.
137. Ferriola PC, Cody V, Middleton EJR, 1989, 'Protein-kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationship'. *Biochem Pharmacol.* 38: 1617-1624.
138. Casagrande F, Darbon JM, 2001, 'Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1'. *Biochem Pharmacol.* 61: 1205-1215.
139. Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H, 2004, 'The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells'. *Carcinogenesis.* 25: 647-659.
140. Bjeldanes, LF, Chang, G.W, 1977, 'Mutagenic activity of quercetin and related compounds'. *Science.* 197: 577-578.
141. Fazal F, Rahman A, Greensill J, Ainley K, Hadi SM, Parish JH, 1990, 'Strand scission in DNA by quercetin and Cu(II): identification of free radical intermediates and biological consequences of scission'. *Carcinogenesis.* 11: 2005-2008.
142. Suzuki S, Takada T, Sugawara Y, Muto T, Kominami R, 1991, 'Quercetin induces recombinational mutations in cultured cells as detected by DNA fingerprinting'. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 1061-1064.
143. Ishidate Jr, M, Harnois, MC, Sofuni T., 1988, 'A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures'. *Mutat. Res.* 195: 151-213.
144. Gee, J.M., Jhonson, I.T.: Polyphenolic Compounds: Interactions with the Gut and Implications for Human Health. *Current Medicinal Chemistry.* 8, 1245-1255, (2001)
145. Lamson, D.W., Brignal, M.S.: Antioxidants and Cancer III. *Alternative Medicine Review* 5, 196-208, (2000).
146. Cornish, K.M., Williams, G., Sanderson, J.: Quercetin Metabolism in The Lens: Role in Inhibition of Hydrogen Peroxide Induced Cataract. *Free Radical Biology Med* 1, 63-70, (2002)
147. Robert J. N., Els N., Danny EC. H., Petra G. B., Klaske N., Leeuwen AM. P. Et al (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74, 418-443.
148. Elliott M. Jr., Chithan K. et al (1994). Free radical scavenging and antioxidant of plant flavonoids. *Plenum Pres. New York, 1994*

149. Casagrande R., Georgetti S.R., Jabar J.R., Santas A.C., Fonseca M.J.V. (2006) Evaluation of Functional Stability of Quercetin as a Raw Material and in Different Topical formulations by its Antilipoperoxidative Activity. *AAPS Pharm Sci Tech* 7(1), Article 10
150. Moskaug J.Q., Carlsen H., Myhrstad M., Blomhoff R. (2004) Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mechanisms of ageing and development* 125, 315-324
151. Bors W., Heller W., Michel C., Saran M. (1990) Flavonoid as antioxidant: determination of radical scavenging efficiencies. *Method in Enzymology* 186,343-355.
152. Groot H., Rauen U. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 12, 249-55
153. Formica J.V., Regelson V. (1995) Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd Chem Toxic* 33, 1061-1080
154. Booth A.N., Murray C.W., Cones F.T., Dees F. (1956) The Metabolik fate of rutin and quercetin in the animal body. *Federation Proc* 18, 251-257
155. Kandaswami C., Middleton E. (1994) Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In: Armstrong A. (ed) *Free Radical in Diagnostics Medicine*. Plenum Press, New York
156. Tokusoglu O, Unal MK, Yemis F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem*. 2005 Jun 15;53(12):5003-9.
157. Siemann H.E. and Creasy L.L.. *Am J. Enol. Vitic.* 1992; 43:49.
158. Sobolev V.S. and Cole R.J.. trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47:1435-1439.
159. Acar C, Jebara VA, Portoghese M, Beyssen B, Pagny JY, Grare P, Chachques JC, Fabiani JN, Deloche A, Guermontprez JL. Revival of the radial artery for coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg.* 1992 Oct;54(4):652-9; discussion 659-60.
160. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000 Jan 14;66(8):663-73.
161. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997 Jan 10;275(5297):218-20.
162. Schoppner A, Kindl H. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J Biol Chem.* 1984 Jun 10;259(11):6806-11
163. <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
164. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol.* 1998 Jun;138(6):619-20.
165. Bertelli, A., Berteli, A.A., Gozzini, A., Giovannini, L.: Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity,. *Drugs Exptl. Clin. Res.*, 24(3),133-138. (1998a)
166. Marier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.P., Ducharme, M.P.: Metabolism and disposition of resveratrol in rats; Extent of absorption, glucuronidation and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model, *JPET.*, 302, 369-373. (2002)

167. Andlauer, W., Kolb, J., Siebert, K., Furst, P.: Assessment of resveratrol bioavailability in the perfused small intestine of the rat, *Drugs Exp. Clin. Res.*, 26, 47-55. (2000)
168. Juan, M.E., Buenafuente, J., Casals, I., Planas, J.M.: Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats, *Food Res. Int.*, 35,195-199. (2002a)
169. Asensi, M., Medina, I., Ortega, A., Carretero, J., Bano, M.C., Obrador, E., Estrela J.M.: Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability, *Free Radic. Biol. Med.*, 33, 387-398. (2002)
170. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol.* 2000 Apr 1;59(7):865-70.
171. Kimura, Y, Okuda H, Arichi S. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 834: 275–278
172. Jang DS, Kang BS, Ryu SY, Chang IM, Min KR, and Kim Y. *Biochem. Pharmacol.* 1999;57:705–712
173. Jean-Francois M, Keguan C, Peter P, George S, Jerome RE del C, Pascal V. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-,interleukin-1, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 2005;69:151–154
174. Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 2001;70:81–96.
175. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React.* 1996;18:67-71
176. Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Haris, G.K., Shi, X.: Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochem Bioph Res Co* 309, (4), 1017-102, 2003
177. Rodrigo, R., Bosco, C.: Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney- A review. *Com Biochem Phys A* 142, 317-327, 2006
178. Lee, S.R., Kwak, J.H., Kim, H.J., Pyo, S.: Neuroprotective effects of kobophenol A against the withdrawal of tropic support, nitrosative stress, and mitochondrial damage in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Bioorg Med Chem Lett* 17, (7), 1879-1882, 2007
179. Nigdikar SV, Williams NR, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr.* 1998 Aug;68(2):258-65.
180. Fulgenzi A, Bertelli AA, Magni E, Ferrero E, Ferrero ME. In vivo inhibition of TNFalpha-induced vascular permeability by resveratrol. *Transplant Proc.* 2001 May;33(3):2341-3.
181. Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxylradical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Sep 15;381(2):253-63.
182. Stewart JR, Ward NE, Ioannides CG, O'Brian CA. Resveratrol preferentially inhibits protein kinase C-catalyzed phosphorylation of a cofactor-independent, arginine-rich protein substrate by a novel mechanism. *Biochemistry.* 1999 Oct 5;38(40):13244-51.

183. Huang SS, Tsai MC, Chih CL, Hung LM, Tsai SK. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci.* 2001 Jul 20;69(9):1057-65.
184. Sun AY, Chen YM, James-Kracke M, Wixom P, Cheng Y. Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells. *Neurochem Res.* 1997 Oct;22(10):1187-92.
185. Juan ME, Lamuela-Raventos RM, de la Torre-Boronat MC, Planas JM. Determination of trans-resveratrol in plasma by HPLC. *Anal Chem.* 1999 Feb 1;71(3):747-50.
186. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science.* 1997 Jan 10;275(5297):218-20.
187. Mitchell SH, Zhu W, Young CY. Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1999 Dec 1;59(23):5892-5.
188. Huang C, Ma WY, Goranson A, Dong Z. Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway. *Carcinogenesis.* 1999 Feb;20(2):237-42.
189. Casper RF, Quesne M, Rogers IM, Shirota T, Jolivet A, Milgrom E, Savouret JF. Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity. *Mol Pharmacol.* 1999 Oct;56(4):784-90.
190. Rotondo S. Red wine, aspirin and platelet function. *Thrombosis and haemostasis* 1994;72:818-9
191. Gusman J, Malonne H, Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol. *Carcinogenesis.* 2001 Aug;22(8):1111-7.
192. Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM. Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelet in whole blood. *Blood Cells Mol Dis.*; 2000; 26(2):144-50.
193. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone? *Clins Biochem.* 1997;30:91-113
194. Pendurthi UR, Williams JT, Rao LV. Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999 Feb;19(2):419-26.
195. Mizutani K, Ikeda K, Yamori Y. Resveratrol inhibits AGEs-induced proliferation and collagen synthesis activity in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jul 21;274(1):61-7.
196. Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature.* 2001 Dec 20-27;414(6866):863-4.
197. Li HF, Chen SA, Wu SN. Evidence for the stimulatory effect of resveratrol on Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> current in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2000 Mar;45(4):1035-45.

198. Blardi P, De Lalla A, Volpi L, Di Perri T. Stimulation of endogenous adenosine release by oral administration of quercetin and resveratrol in man. *Drugs Exp Clin Res.* 1999;25(2-3):105-10.
199. Bradamante S, Piccinini F, Barenghi L, Bertelli AA, De Jonge R, Beemster P, De Jong JW. Does resveratrol induce pharmacological preconditioning? *Int J Tissue React.* 2000;22(1):1-4.
200. Aebi H., 1974, Catalase; Method of enzymatic analysis, New York: Academic Press 673-684.
201. Lowry O, Rosebrough N, Farr L, Randall R. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 193, 265-275. (1951)
202. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358 (1979)
203. Ladwig PM, Liedtke RR, Larson TS, Lieske JC. Sensitive spectrophotometric assay for plasma oxalate. *Clin Chem* 51: 2377–2380, 2005.
204. Karlsen SJ, Berg JK. Acute changes in renal function following extracorporeal shock wave lithotripsy in patient with a solitary functioning kidney. *J Urol.*1991; 145: 353-356
205. Koul H, Kenington L, Nair G, Honeyman T. Oxalate induced initiation of DNA synthesis in LLC-PK1 cells, a line of renal epithelial cells. *Biochem Biology Res. Comm.* 1994; 205: 1632
206. Wilbert D, Bichler KH, Strohmaier WL, Flüchter SH. Glomerular and tubular damage after extracorporeal shock wave lithotripsy assessed by measurement of urinary proteins. *J Urol.* 1993; 32(5): 426-431
207. Mathes SJ, Nahai F: *Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique.* Volume 11997, 39-46.
208. Jeong BC, Kim BS, Kim JI, Kim HH (2006) Effects of green tea on urinary stone formation: an in vivo and in vitro study. *J Endourol* 20(5):356–361
209. Itoh Y, Yasui T, Okada A et al (2005) Preventive effects of green tea on renal stone formation and the role of oxidative stress in nephrolithiasis. *J Urol* 173(1):271–275
210. Park HK, Jeong BC, Sung MK, Park MY et al (2008) Reduction of oxidative stress in cultured renal tubular cells and preventive effects on renal stone formation by the bioflavonoid quercetin. *J Urol* 179(4):1620–1626
211. Akanae W, Tsujihata M, Yoshioka I, Nonomura N, Okuyama A. *Orthosiphon grandiflorum* has a protective effect in a calcium oxalate stone forming rat model. *Urol Res* (2010) 38:89–96
212. Jungers P, Daudon M. Epidemiology of kidney calculi. *Presse Med* 1990; 19:1655-1657
213. Halliwell B, Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* 1987; 213:9-14
214. Selvam R, Kalaiselvi P. Studies on calcium oxalate binding proteins: effect of lipid peroxidation. *Nephron* 2001; 88:163-167.
215. Touhami M, Laroubi A, Elhabazi K, et al. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Urol* 2007; 7:18-26.

216. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Cekmen M, Somay A, Tasci AI. Effects of pomegranate juice on hyperoxaluria-induced oxidative stress in the rat kidneys. *Ren Fail.* 2009;31(6):522-31.
217. Tugcu V, Kemahli E, Ozbek E, Arinci YV, Uhri M, Erturkuner P, Metin G, Seckin I, Karaca C, Ipekoglu N, Altug T, Cekmen MB, Tasci AI. Protective effect of a potent antioxidant, pomegranate juice, in the kidney of rats with nephrolithiasis induced by ethylene glycol. *J Endourol.* 2008 Dec;22(12):2723-31.
218. Bashir S, Gilani AH, Siddiqui AA, Pervez S, Khan SR, Sarfaraz NJ, Shah AJ *Berberis vulgaris* Root Bark Extract Prevents Hyperoxaluria Induced Urolithiasis in Rats *Phytother. Res.* 24: 1250–1255 (2010)
219. Wendt T, Zhang YM, Bierhaus A, et al. Tissue factor expression in an animal model of hydronephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10:1820-1828.
220. Khachigian LM, Collins T, Fries JW. N-acetyl cysteine blocks mesangial VCAM-1 and NF-kappa B expression in vivo. *Am J Pathol* 1997; 151:1225-1229.
221. Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, et al. Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol* 1998; 161:430-439.
222. Goligorsky MS, Brodsky SV, Noiri E. Nitric oxide in acute renal failure: NOS versus NOS. *Kidney Int* 2002; 61:855-861.
223. Kumar S, Boehm J, Lee JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:717-726.
224. Stambe C, Atkins RC, Tesch GH, et al. Blockade of p38alpha MAPK ameliorates acute inflammatory renal injury in rat anti- GBM glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:338-351.
225. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, et al. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 1999; 162:196-203.(51).
226. Polat A, Parlakpınar H, Tasdemir S, et al. Protective role of aminoguanidine on gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Acta Histochem* 2006; 108:365-371
227. Juan SH, Chen CH, Hsu YH, et al. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:732-739.
228. The effects of resveratrol on cell cycle, apoptosis, and NF-kB activation. Master's Thesis by Ulrik Stervbo Department of Life Sciences and Chemistry, Roskilde University, Roskilde, Denmark. 11 May 2005