

## HİPEROKSALÜRİK SIÇANLARDA MAGNEZYUM, SİTRAT, POLİFOSFAT VE PRİDOKSİN'İN İNTRATÜBÜLER KRİSTALİZASYONA ETKİSİ

THE EFFECTS OF MAGNESIUM, CITRATE, POLYPHOSPHATES AND PRIDOXIN ON INTRATUBULAR CRYSTALLIZATION IN HYPEROXALURIC RATS

ESEN, T\*., AKINCI, M\*\*., AYTEKİN, Y\*\*\*., ALTUĞ, T\*\*\*\*., HEKİM, N\*\*\*\*.

- \* İstanbul Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı
- \*\* İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı
- \*\*\* İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Ünitesi
- \*\*\*\* Pakize Tarzi Biokimya Laboratuvarı

### ÖZET

24 Wistar albino soyu erkek sıçan 4'er li 6 grup halinde incelenmiş, I. grup kontrol olarak seçilmiş, II. gruba içme suyuna % 1'lik olacak şekilde etilenglikol verilmiştir. Diğer 5 grupta ise etilenglikole ilaveten gavajla, sitrat, magnezyum, ortofosfat ve pridoksin uygulanmıştır. 24 saatlik idrar analizlerinde 15 gün içinde oksalatın tüm gruplarda kontrolden çok, II. gruptan az olduğu, ve  $Mg^{++}$ , sitrat, fosfat, B6 sırasıyla inhibe edildiği görülmüştür. İdrar kalsiyumu ise  $Mg^{++}$  ve B6 tarafından kontrolün da altına inecek şekilde inhibe edilmiştir. 15 gün içinde etilenglikol grubunda tüm sıçanlarda intratübüler kristalizasyon görülmüş, diğer gruplarda ise kalsiyum oksalat depozisyonu izlenmemiştir. Bu sonuçlar özellikle magnezyum ve sitratın sadece kristalizasyon değil, aynı zamanda litojenik madde ekskresyon inhibitörü de olduklarını göstermektedir.

### SUMMARY

24 Wistar albino strain male rats, forming 6 groups a 4 animals, served for the experiment, where the first group was control, and second group animals received 1 % ethyleneglycol in drinking water. Groups III through VI received in addition to ethyleneglycol, citrate, magnesium, orthophosphate and pridoxin by orogastric feeding. 24 hour urinalysis revealed, that the average oxalate was lower than group II but higher than control in all groups. Urinary oxalate was inhibited by the order,  $Mg^{++}$ , citrate  $PO_4$  and B6. Urinary calcium levels in magnesium and B6

groups were even lower than the controls, though not significantly. At the end of 15 days all rats in group II developed intratubular crystallization, where no calciumoxalate deposition was present in other groups. These results show that especially  $Mg^{++}$  and citrate are not only potent crystalligenic substance markedly.

### GİRİŞ

Taş hastalığında son yıllardaki araştırmalar etyopatogenezde çok önemli rol oynadığı kabul edilen bazı inhibitör maddelerin varlığını ortaya koymuştur. Bunlar içinde üzerinde en fazla durulan ve klinikle korelasyonu en fazla olanlar magnezyum, sitrat ve pirofosfattır. Pridoksin ise litojenik bir madde olan oksalatın idrarla aşırı atılımını inhibe etmekte ve bu nedenle yıllardır hiperoksalüri tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır. Artifiyel idrar deneyleri olduğu kadar oluşturulan hayvan modelleri de bu gelişmelerin bilimsel temelini oluşmasında rol oynamıştır. Bu amaçla yıllardır en çok kullanılan deney hayvanı sıçandır. Sıçanlarda spontan ürolitiazis ve özellikle kalsiyum oksalat taşı son derece nadir görülmektedir. Sıçanlarda eksperimental olarak taş hastalığı oluşturulması için bugüne kadar birçok yöntem bildirilmiştir. Oral etilenglikol, intraperitoneal 4-L hidroksiprolin, D3 vitamini, yine oral askorbik asit ve miniosmotik pompalar bu yöntemlerin bazılarıdır (8, 9, 11, 13). Bütün yöntemlerde ana mekanizma oksalat veya bir prekürsörünün diete ilave edilmesi veya intraperitoneal enjeksiyonudur. Biz de eksperimental çalışmamızda oral etilenglikol vererek hiperoksalürik yaptığımız sıçanlarda, bilinen dört önemli kalsi-

yum oksalat kristalizasyon inhibitörünün hem intratübüler düzeyde hem de litojenik madde ek- skresyonu üzerindeki etkilerini mukayeseli ola- rak araştırdık. Sonuçlarımız böyle bir deney kurgusuna literatürde rastlanılmamış olmakla birlikte, yapılan diğer hayvan çalışmalarının so- nuçları ile karşılaştırıldı, inhibitör etki ultrastrük- türel ve hazır idrar özellikleri ile tartışıldı.

## MATERYAL VE METOD

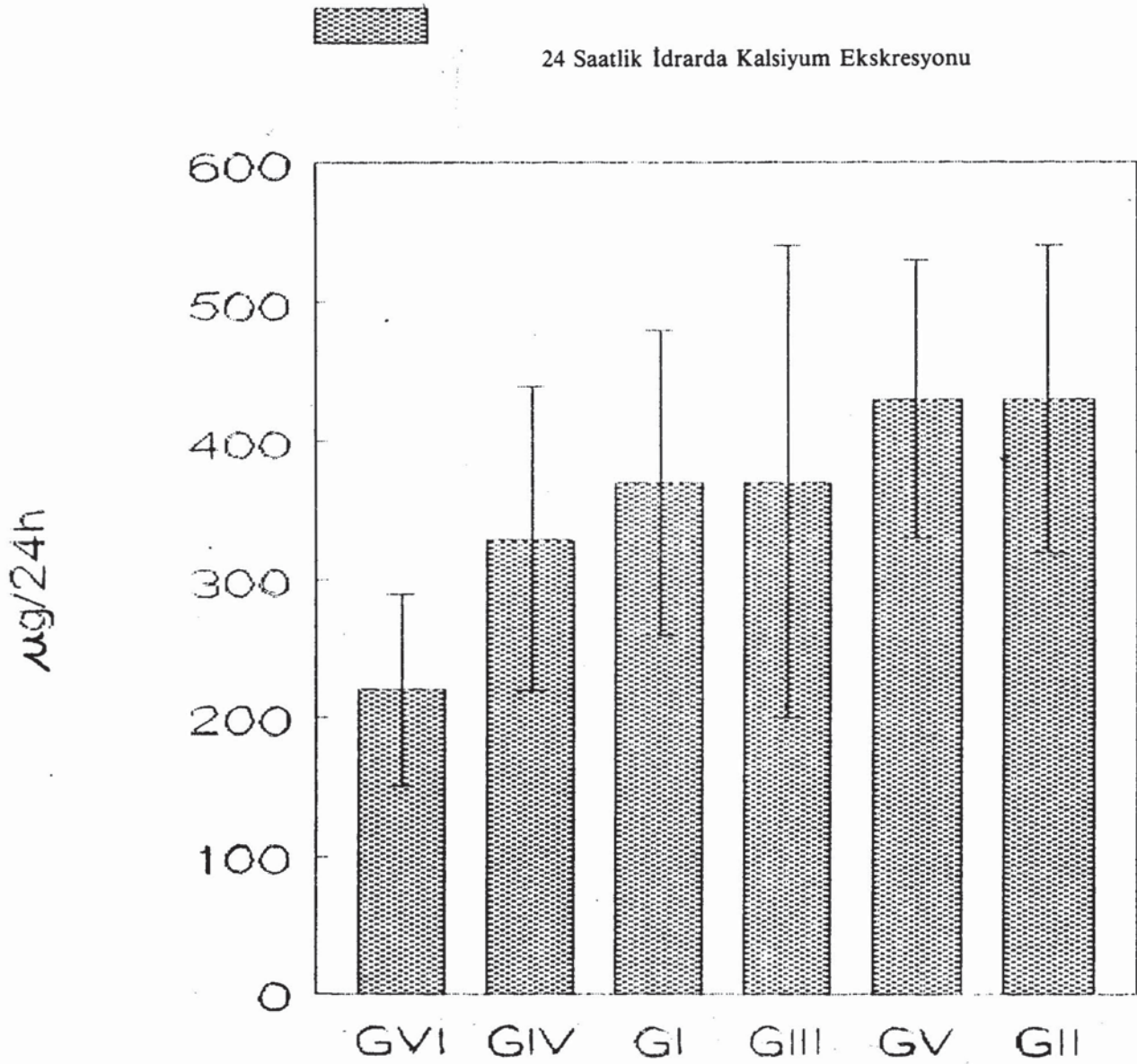
Deney için 24 adet, erkek 5-6 aylık, 200 gr. ağırlığında Wistar albino soyu sıçan kullanılmış- tır. 2'şerli metabolik kafesler içinde izlenen sıçan- lar 4'er hayvandan oluşan 6.gruba ayrılmışlardır.

I. grup kontrol grubu olarak seçilmiş ve her- gün 24 saatlik idrarlar toplanarak, kalsiyum, ok- salat, magnezyum, sitrat ve pirofosfat düzeyleri normal sıçanlar için belirlenmiştir. II. gruptaki 4 hayvana, içme suyuna % 1'lik olacak şekilde etilenglikol (EG) konmuş ve idrar kalsiyum ve ok- salat düzeyleri hergün toplanan idrarlarda tayin edilmiştir. III-VI. gruplar ise inhibitör etkinin gözleneceği gruplar olarak belirlenmiş ve sırayla III. grupta EG'e ilaveten 4 meq/d Sitrat (Uralyt, U<sup>R</sup>), IV. gruba EG ve 25 meq/d MgOH (Mag- nesie Calcinee<sup>R</sup>), V. gruba EG ve 75 mg/d poli- fosfat (Reducto<sup>R</sup>), VI. gruba ise 50 mg/d pridoxin (Benexol<sup>R</sup>) verilmiştir. Toplanan 24 sa- atlik idrarlarda kalsiyum ve oksalat yanı sıra III. grupta sitrat, IV. grupta magnezyum, V. grupta ise pirofosfat tayinleri yapılmıştır. İdrar analiz- leri 15 gün boyunca hergün yenilenmiş ve Parki- ze Tarzi Biokimya Labaratuarında enzimatik- spektrofotometrik yöntemlerle Boehrigen Mannheim ve Sigma kitleri kullanılarak yapılmış- tır. Histopatolojik inceleme için 2 hayvan 7. gün- de, 2 hayvan ise 15. günde sakrifiye edilerek, bilateral nefrektomi piyesleri ışık mikroskopisi için Hematoksilen-Eosin, PAS ve von Kossa yön- temleri ile hazırlanmış ayrıca alınan ince kesitler gluteraldehid ön tesbiti ve osmiyumtetraoksit fik- sasyonundan sonra elektronmikroskopik olarak incelenmiştir. İstatistik analizlerde student-t testi kullanılmıştır.

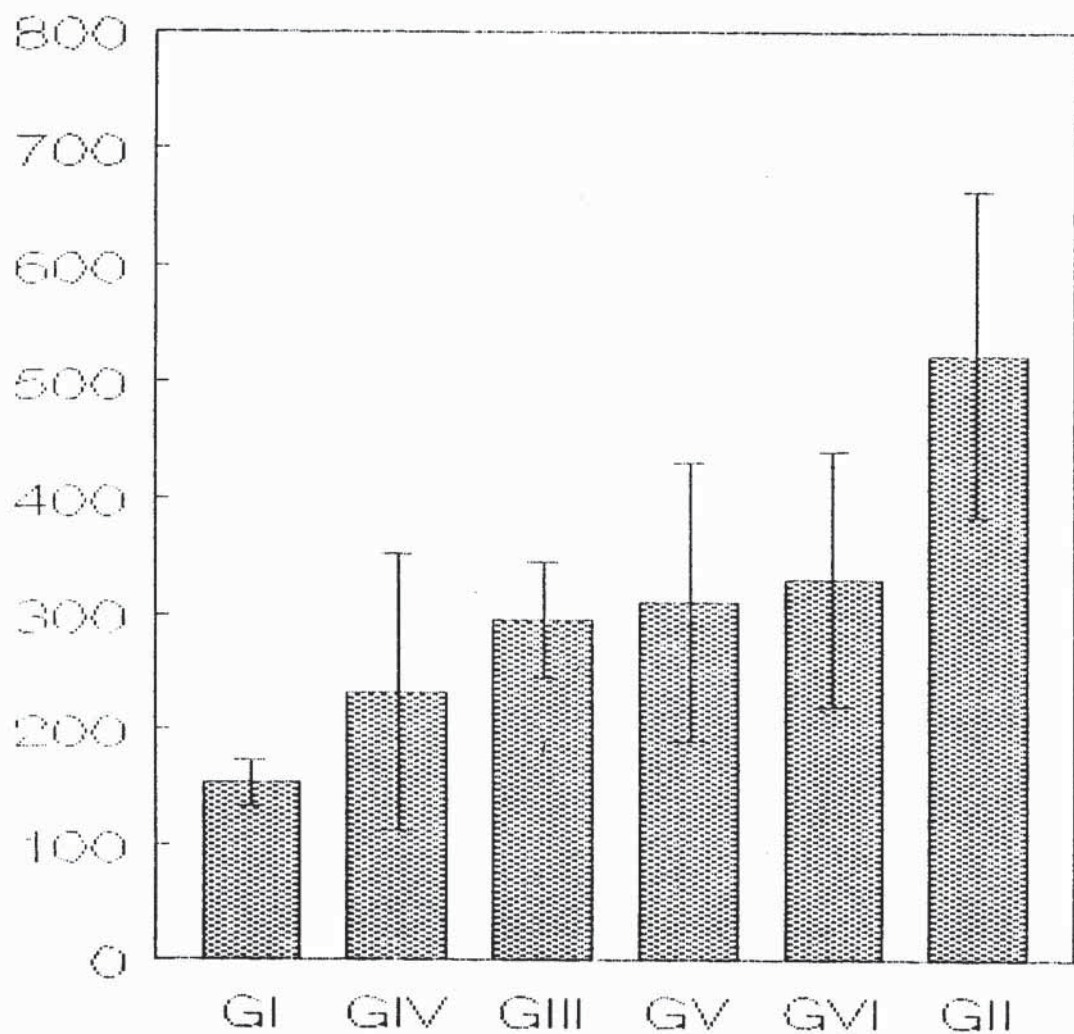
## SONUÇLAR

15 günlük takip süresince tüm hayvanlar ga- vajla verilen maddeleri iyi tolere etmiş, hiçbir

since İstanbul Yem Sanayiince hazırlanmış ve içe- riği Tübitak tarafından analiz edilmiş fare yemi verilmiştir. 15 günlük ortalama idrar oksalat dü- zeyleri incelendiğinde tüm gruplarda kontrole gö- re anlamlı artış olduğu dikkati çekmektedir. Ancak inhibitör alan gruplarda bu artış yine anlamlı olarak sadece etilenglikol verilen grubun al- tında kalmıştır. İdrar oksalat düzeyi, aşağıdan yukarı doğru magnezyum-sitrat-ortofosfat- pridoksin sırası ile sıralanmış, magnezyum gru- bu haricinde diğer gruplar arasında anlamlı fark tesbit edilememiştir (Grafik 1). 24 saatlik orta- lama idrar kalsiyum atılımı incelendiğinde grup- ların kontrolü da ile etilenglikol grubu arasında yer almadığı magnezyum ve pridoksin grupların- da kontrolün da altına inen kalsiyum değerleri tesbit edildiği dikkati çekmiştir. Ancak gruplar arasın- daki farklar anlamsız bulunmuştur. Sonuçlar Grafik II de gösterilmektedir. Oksalat ve kalsi- yum idrar düzeyleri her grup için 15 gün boyun- ca izlendiğinde ilk 2-5 gün içinde her ikisinde yükselmeler olduğu daha sonra ani bir düşme ve 10-15 günlerde de plato çizildiği görülmektedir. İnhibitör ilavesi yapılan gruplar içinde, idrar sit- ratı III. grupta kontrole göre anlamlı yüksek (2.19  $\pm$  0.84 ve 33.5  $\pm$  18.05) IV. grupta idrar magnezyum kontrala göre anlamlı artmış (0.2  $\pm$  0.08 ve 0.49  $\pm$  0.4) ve yine V. grupta idrar piro- fosfatı kontrole göre anlamlı yüksek (0.05  $\pm$  0.02 ve 2.71  $\pm$  1.06) bulundu. Tüm gruplar için p < 0.005 idi. Histopatolojik incelemede 7. gün nefrektomilerine ait piyeslerde gruplar arasında önemli fark saptanmamış, sadece etilenglikol gru- bunda kontrole kıyasla PAS reaksiyon veren, proksimal tubulus bazan lamina glikoproteinle- rinde artış ve çoğalma dikkati çekmiştir. Aynı dö- nem elektron mikroskopisinde de hücre organel- i, organellerinde azalma ve dev mitokondriler gö- rülmüştür (etilenglikol grubu). Buna karşılık 15. gün piyeslerindeki fark çarpıcıdır. Işık ve elek- tronmikroskopisinde etilenglikol grubuna ait yu- karıda sayılan bulgularda artış ve belirginleşme gözlenmiş, ancak daha da önemli olarak yine sa- dece etilenglikol grubunda, tubulus lümeni ve tu- bulus epiteli içinde hücre membranını parçalayan kristalin yapılar (Resim 1) dikkati çekmiştir. Aynı odaklarda kalsiyum spesifik von Kossa boyama ile intrasitoplazmik ve intraluminal kristalin ink- lüzyonları mevcuttur. (Resim 2) Elektronmikros-

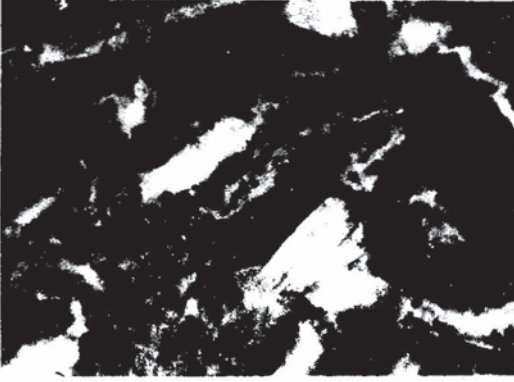


24 Saatlik İdrarda Oksalat Ekskresyonu

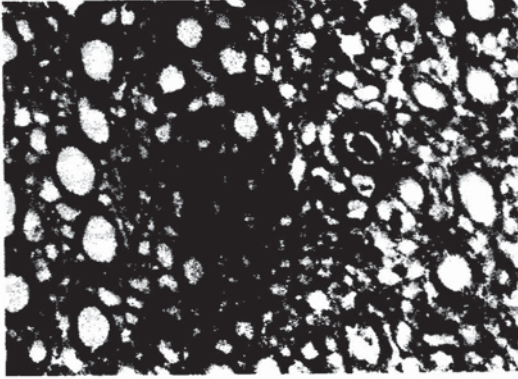


## TARTIŞMA

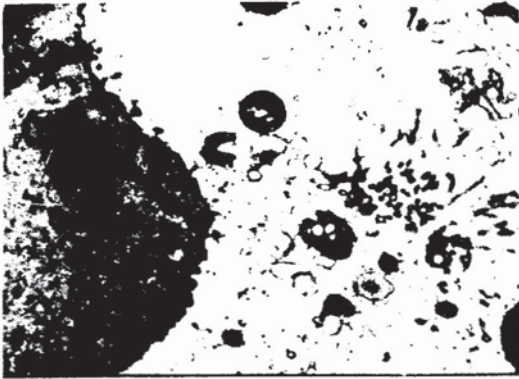
kopunda da öncü kristalin yapılar sadece etilenglikol grubunda izlenmiştir (Resim 3).



1. Tubuluslumeninde hücre membranını parçalayan kristalin yapılar Hematoxyline-Eosin



2. Intraluminal kristal yapıları, Von Kossa



3. Elektronmikroskopik olarak intratubuler parakristalin yapılar

Üriner sistem taş hastalığı etyopatogenezinin izahında eskiden beri kabul edilen hipersaturasyon, kristalizasyon ve nükleasyon teorilerine son yıllarda inhibitör eksikliği de önemli bir faktör olarak eklenmiş bulunmaktadır. Bu inhibitörlerin, taş hastalarının belli bir kısmında eksik olduğu gösterilmiş, uygun metaflaksi programları ile inhibitörler yerlerine konduğunda taş nüks oranlarında anlamlı düşüşler gözlenmiştir (2, 12). Bizim 122 vakalık serimizde de inhibitör eksikliği ve özellikle hipositratürik ve hipomagnezürük taş hastalığı insidensi % 58 gibi çok yüksek bir düzeyde bulunmuştur. Klinik çalışmalar öncesinde, hayvan modelinde de inhibitör etki araştırılmış ve özellikle ilgi magnezyum üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk çalışmalarda aşırı oral magnezyum verilen hayvanlarda hiperokalsürinin inhibe edildiği ve yine artırılan dozlarda magnezyum verilen hayvanlarda düşük dozlarda görülen kristalizasyon riski ve yüksek oksalat düzeylerinin, doz arttıkça gözlenmediği bildirilmiştir (1, 3, 4, 7, 14). Daha sonraki çalışmalar deney düzeninde değişiklik yaparak magnezyumun etkisini eksikliği halinde gözlemiş, böyle bir deneysel çalışmada, magnezyumdan fakir beslediği sıçanlarda Rushton (10, 11), kontrole kıyasla çok daha hızlı ve belirgin kalsiyum oksalat kristalizasyonu gördüğünü bildirmiştir.

Magnezyumla beraber fosfatın inhibitör etkisi de farelerde araştırılmıştır (3, 6). Polifosfatların oral alınımında barsaktan ortofosfat olarak emildiği ve idrarda pirofosfatlar halinde atıldığı, bunun da kalsiyum oksalat kristalizasyon inhibitörü olduğu 1962 de Fleisch ve Bisaz tarafından gösterildiğinden beri, özellikle rekürren taş hastalığı metaflaksisinde fosfat ve selüloz fosfat geniş kullanım alanı bulmuştur. Sıçanlarda hiperoksalüri üzerindeki etkisi tartışmalı olmakla birlikte kristalizasyonu inhibe ettiği bildirilmiştir (3). Pridoksin, özellikle sekonder hiperoksalüride yoğun biçimde kullanılan bir vitamindir. Rekürren taş hastalarının metaflaksisinde hiperokalsüri olmadıkça kullanılmamaktadır. Gershof hiperokalsürik sıçanlar-

da yaptığı çalışmada magnezyumla birlikte pridoksinin de kalsiyum oksalat birikimini inhibe ettiğini bildirmiştir (5, 6).

Bizim serimizde dikkati çeken hem hiperkalsiüri hem de hiperoksalürinin inhibisyonunda magnezyumun etkinliğidir. Bu noktada pridoksin grubunda anlamlı olmamakla birlikte etilenglikol grubundan sonra en yüksek idrar oksalat düzeylerinin elde edilmiş olması ilginçtir. Buna karşılık kalsiyum itrahi B6 grubunda önemli ölçüde inhibe edilmiş hatta kontrolün altına düşmüştür. Ancak daha kesin inhibisyon intratübüler düzeyde görülmüştür. Böyle bir deney düzeninde 15 günlük sürenin manifest kristal oluşumu için yeterli olmadığı düşünülse de, bulgular oldukça objektiftir. Etilenglikol grubu haricinde hiçbir grupta intratübüler kristalizasyon görülmemiş olması, hatta etilenglikolün destrüktif etkisinin de yalnızca bu grupta görülmesi inhibitör etkinin güçlülüğünü ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar genel olarak tüm gruplarda litojenik madde ekskresyonundaki inhibisyonla da korele etmektedir. Tek tek değerlendirildiklerinde klinik sonuçları teyid edersesine, hayvan modelinde de magnezyum ve sitratın en etkin inhibitörler oldukları ortaya çıkmaktadır. Özellikle bu gruplarda idrar sitrat ve magnezyumunun anlamlı olarak artmış olması, böyle metaflaksi protokollerine şüpheyle bakanları, tatmin edecek düzeyde bir gelişmedir.

Sonuç olarak, kristalizasyon inhibisyonunun hayvan modelinde incelenmesinde deney hayvanı olarak sıçan ve hiperoksalüri provokatörü olarak da oral etilenglikol çok uygun seçimlerdir. Normal yemlerinde tüm inhibitörlerden kendi organizmaları için yeterli miktarda alan hayvanların, oral inhibitör alımı ile kristalizasyonun önlenip önlenmediğinin belirlenmesi için, daha uzun süre gözlenmesi gerektiği açıktır. Buna karşılık özellikle magnezyumdan fakir diyetle çok daha kısa sürede bu sonuca ulaşılabilecektir.

Bizim modelimizde deney süresinin uzatılması, aspirasyonla elde edilecek mesane idrarında kristalüri çalışmasının eklenmesi ve intratübüler kristallerin X-ışını difraksiyon metodu ile analizi çalışmayı tamamlayıcı faktörler olarak düşünülmeyle birlikte, sonuçta özellikle

magnezyum ve sitratın inhibitör etkilerinin gözlenmesi ve objektivizasyonu, halen kliniğimizde uyguladığımız metaflaksi programlarının haklılığını ortaya koyması bakımından, çalışma son derece anlamlı olmuştur.

## KAYNAKLAR

1. **Borden, T.A., Lyon, E.S.:** The effects of magnesium and pH on experimental calcium oxalate stone disease. *Invest. Urol.*, 6:412, 1969.
2. **Drach, S.W., Perin, R., Jacobs, S.:** Outpatient evaluation of patients with calcium urolithiasis. *J. Urol.*, 121:564, 1979.
3. **Fragalla, F.F., Gershoff, S.N.:** Interrelations among magnesium, vitamin B6, sulfur and phosphorous in the formation of kidney stones in the rat. *J. Nutrition*, 81:60, 1963.
4. **Fischer, G., Hirneth, H., Classon, H.G.:** Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen im Nieren von Ratten nach Verfütterung von Diäten mit ansteigenden Konzentrationen von Magnesium 1- Aspartat-Hydrochlorid. *MagneSium Bulletin*, 4:147, 1984.
5. **Gershoff, S.N., Andrus, S.B.:** Effect on vitamin B6 and magnesium on renal deposition of calcium oxalate induced by ethylene glycol. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 109:99, 1962.
6. **Gershoff, S.N., Andrus, S.B.:** Dietary magnesium, calcium and Vitamin B6 and experimental nephropathies in rats: Calciumoxalate calculi, apatite nephrocalcinosis. *J. Nutr.*, 73:308, 1961.
7. **Oliver, J., McDowell, M., Whang, R., Welt, L.G.:** The renal lesions of electrolyte imbalance. IV. The intranephronic calculus of experimental magnesium depletion. *J. Exptl. Med.*, 124:263, 1966.
8. **Öner, P., Eryürek, F., Altuğ, T., Çoçulu, S.:** The role of ascorbic acid administration in stone formation in guinea pigs. *IRCS Med. Sci.* 13:338 1985.
9. **Khan, S.R., Finlayson, B., Hackett, R.L.:** Experimental induction of crystalluria in rats using mini-osmotic pumps. *Urol. Res.*, 11:199, 1983.
10. **Rushton, H.G.:** Crystal deposition in the renal tubules of hyperoxaluric and hyomagnesiuric rats. *Scan. Elec. Mic.* 1980. Editör O. Johari Chicago, sayfa 387, 1980.
11. **Effects of magnesium deficiency on intratubular calcium oxalate formation and crystalluria in hyperoxaluric rats.** Rushton, H.G., Spector, M.: *J. Urol.*, 127:598, 1982.
12. **Pack, C.:** Medical Management of Nephrolithiasis in Dallas. Update 1987. *J. Urol.*, 140:461, 1988.
13. **Tawashi, R., Cousineau, M., Sharkawi, M.:** Calcium oxalate crystal formation in the kidneys of rats injected with 4-hydroxy-proline. *Urol. Res.*, 8:121, 1980.
14. **Whang, R., Welt, L.G.:** Observation in experimental magnesium depletion. *J. Clin. Invest.* 42:305, 1963.