

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

AİLESEL TAŞ HASTALIĞINDA OSTEOPONTİN
GEN BÖLGESİ MUTASYON TARAMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Cihanser YURTSEVEN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kemal SARICA

GAZİANTEP - 2003

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
KISALTMALAR	IV
TABLO VE GRAFİK LİSTESİ	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Böbrek Anatomisi	4
2.1.1. Arter Sistemi	5
2.1.2. Ven Sistemi	6
2.1.3. Lenfatik Sistem	6
2.1.4. Nefronun Anatomik Yapısı	6
2.2. Böbrek Fizyolojisi	7
2.2.1. Böbreklerin Endokrin Fonksiyonu	7
2.2.2. Böbreklerin İdrar Oluşturma Fonksiyonu	7
2.2.3. İdrar Oluşum Mekanizması	7
2.2.3.1. Glomerüler Filtrasyon	8
2.2.3.2. Tubüler Reabsorbsiyon ve Sekresyon	9
2.2.3.3. Tubüli Segmentlerinin Absorbsiyon Yetenekleri	9
2.3. Üriner Sistem Taş Hastalığı Etiyolojisi	12
2.3.1. Süpersatürasyon - Kristalizasyon Teorisi	13
2.3.2. İnhibitör Ajanların Eksikliği Teorisi	13
2.3.3. Matriks - Nükleasyon Teorisi	14
2.3.4. Epitaksi Teorisi	14
2.3.5. Kombine Teoriler	14
2.3.6. Taş Hastalığında Risk Faktörleri	15
2.3.7. Hiperkalsiüri	15
2.3.8. Hiperokzalüri	15
2.3.9. Hipositratüri	16
2.3.10. Hipomagnezüri	16
2.4 Osteopontin	16
2.4.1. Osteopontin Gen İfadesinin Düzenlenmesi	17
2.4.2. Osteopontin ve İnflamasyon	17
2.4.3. Osteopontin ve Hasta Surveyi	17
2.4.4. Osteopontin ve İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentetaz Regülasyonu	18
2.4.5. Osteopontinin Diğer Biyolojik Fonksiyonları	18
2.4.6. Osteopontin ve Patolojik Mineralizasyon	18
2.5. Polimeraz Zincir Tepkimeleri	21
2.5.1. Polimeraz Zincir tepkimeleri Bileşenleri	21
2.5.1.1. DNA Zincirlerinin Ayrılması	22
2.5.1.2. Primer Yapışması	22

2.5.1.3.	Primerle Tanımlanan DNA Parçasının Çoğaltılması	23
2.5.2.	Oligonükleotidlerin Tasarımı	23
2.5.3.	Elektroforez	24
2.5.4.	Poliakrilamid Jeller	24
2.5.5.	Gümüş Boyama	24
3.	MATERYAL VE METOD	25
3.1.	Hasta Seçimi	25
3.2.	Kimyasal Maddeler	25
3.3.	Çözeltiler	26
3.4.	Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi	28
3.5.	Camların Hazırlanması	28
3.5.1.	Kaygan Cam ve Jel Bağlama Camının Hazırlanması	28
3.6.	Örneklerin Gümüş Nitrat ile Boyanması	30
3.7.	DNA Analizi	31
3.7.1.	DNA Eldesi	31
3.7.2.	Osteopontin Genomik DNA Analizi	31
3.7.3.	Elde Edilen Genomik DNA'dan Osteopontin Gen Bölgesinin PZT ile Çoğaltılma koşulları	31
4.	BULGULAR	34
4.1.	Klinik Bulgular	34
4.2.	Osteopontin Gen Bölgesinin DNA Analiz Tasarımı	34
5.	TARTIŞMA	43
6.	SONUÇ	49
7.	ÖZET	51
8.	SUMMARY	52
9.	KAYNAKLAR	53

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım başta Üroloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Faruk YAĞCI, tez hocam Prof. Dr. Kemal SARICA, Doç. Dr. Ahmet ERBAĞCI, Uz. Dr. M.Sakıp ERTURHAN olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma ve tez çalışmalarım süresince bana yardımını esirgemeyen Tbp. Ütğ. M.Özgür ÖZHAN'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım esnasında değerli katkıları bulunan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet ARSLAN, Arş. Gör. Bülent GÖĞEBAKAN'a beni her zaman destekleyen aileme ve eşim Sibel YURTSEVEN'e sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

KISALTMALAR

ADH	:	Antidiüretik Hormon
Bç	:	Baz Çifti
Fp	:	Formation Product
HCO₃	:	Karbonik asit
IL	:	İnterlökin
INF	:	İnterferon
INOS	:	İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentetaz
MDCK	:	Madine – Darby Canin Kidney
NCBI	:	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center For Biotechnology Information)
NO	:	Nitrik oksit
Opn	:	Osteopontin
PTH	:	Parathormon
PZT	:	Polimeraz Zincir Tepkimesi
RGD	:	Arginin–Glisin–Asparagin
Sp	:	Solubility Product
SVVYGLR	:	Serin–Valin–Valin–Tirozin–Glisin–Lösin–Arginin
TEMED	:	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamin
TNF	:	Tümör Nekroz Faktörü
tGF_β	:	Transforming Büyüme Faktörü (Beta)

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

<u>Tablo Listesi</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 : Poliakrilamid jel hazırlanması (% 6'lık)	28
Tablo 2 : Örneklerin gümüş nitrat ile boyanması	30
Tablo 3 : Osteopontin geni promotor bölgesi primerler listesi, PTZ'nin ürün büyüklüğü,yapışma ısısı, uzama zamanı ve PTZ koşulu	31
Tablo 4 : Osteopontin gen bölgesi primer listesi, PTZ'nin ürün büyüklüğü, yapışma ısısı, uzama zamanı ve PTZ koşulu	32
Tablo 5 : Opn P, Opn1 ve Opn 3 Opn 5 gen bölgeleri için PTZ karışımı ve şartları	33
Tablo 6 : Opn 2-4 gen bölgeleri için PTZ karışımı ve şartları	33
Tablo 7 : Opn P1-7, Opt 6 Opn 7a-f gen bölgeleri için PTZ karışımı ve şartları	33

<u>Şekil Listesi</u>	<u>Sayfa</u>	
Şekil 1 :	Osteopontin 5. ekson PZT şartlarının optimizasyonu için yapılan aşamalı PZT çalışması	35
Şekil 2 :	Osteopontin 6. ekson PZT şartlarının optimizasyonu için yapılan aşamalı PZT çalışması	35
Şekil 3 :	Osteopontin 7a ekson PZT şartlarının optimizasyonu için yapılan aşamalı PZT çalışması	36
Şekil 4 :	G ailesinin pedigrisi	37
Şekil 5 :	A ailesinin pedigrisi	38
Şekil 6 :	K ailesinin pedigrisi	39
Şekil 7 :	Osteopontin geni	41
Şekil 8 :	Opn IV. Ekson için yapılan PZT'nin poliakrilamid denatüre jel elektroforezi	42
Şekil 9 :	Opn I. Ekson için yapılan PZT'nin poliakrilamid denatüre jel elektroforezi	42

GİRİŞ ve AMAÇ

Üriner sistem taş hastalığı, hayatın her döneminde oluşabilen, tek bir nedene bağlı olmayan, kompleks ve birbiri ile ilişkili birçok faktörün beraberce meydana getirdiği olaylar dizisidir (1).

Üriner sistem taş hastalığı, üriner enfeksiyonlar ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemi en sık etkileyen üçüncü patolojidir. Ürolitiazis M.Ö. 4800' lü yıllardan beri varlığı bilinen ve endüstriyel toplumların %1-5'inde oluşan bir hastalıktır (1).

Üriner sistem taş hastalığı en çok 30 ile 60 yaşları arasında görülür. Yetişkin beyaz erkeklerde ömür boyu taş gelişimi riski %20'dir. Bu oran yetişkin bayanlarda %5-10'dur. Ürolitiazisli hastalarda rekürrens oranı ilk taş oluşumdan itibaren 5 yıllık süre içerisinde %50'den fazladır. Kadın idrarında sitrat seviyesi yüksektir ve taş oluşumunda koruyucu faktör olarak rol almaktadır. Bununla birlikte çocuklarda testosteron nedeniyle karaciğerde yapılan endojen okzalat miktarı az olduğundan her iki cinste görülme insidansında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (1, 2).

Üriner sistem taş hastalığının tanı ve tedavisindeki gelişmeler etyolojik çalışmaların önüne geçmiştir. Klinik ve deneysel çalışmaların ışığında, taşın kimyasal ve morfolojik yapısı, içeriği hakkında oldukça detaylı bilgiler elde edilmiş fakat teknolojiye bütün ilerlemelere rağmen taş oluşum mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır (1, 2).

Taş hastalığının etyolojisinde hereditenin rolü üzerinde durulmuş, renal tubüler asidozis, sistinüri gibi familial hastalıklar saptanmıştır. Sistinüride aynı miktarda sistin eliminasyonuna rağmen bazı hastalarda taş oluşmaması bir polijenik defekt

olduğunu göstermiştir. Taş hastalığının bazı coğrafi bölgelerde daha sık görüldüğü saptanmış ve dünya taş haritası çıkarılmıştır. Bu ülkelerde taş hastalığının sık görülmesinde iklim, beslenme alışkanlığı ve ailesel faktörlerin etkisi vardır (1, 3).

Pürin, okzalat, kalsiyum ve fosfat içeren maddelerin diyet ile aşırı alınması idrarda bu maddelerin yüksek konsantrasyonda bulunmasına ve taş oluşumuna sebep olabilmektedir. Ancak aynı risk faktörlerine sahip kişilerde aynı oranda taş hastalığının oluşmaması bu problemin etyolojisindeki aydınlatılmamış karanlık noktadır (3).

Üriner sistem taş hastalığında bazı predispozan faktörler mevcuttur. Bunlar;

- 1- İdrar pH'sındaki değişiklikler.
- 2- Fokal veya yaygın üriner enfeksiyonlar.
- 3- Konjenital anomaliler (Posteriyor üretral valv, üretero-pelvik darlık vs.).
- 4- Üriner obstrüksiyon ve staz.
- 5- Nefrokalsinozis.
- 6- Üriner sistemdeki yabancı cisimler.
- 7- Üriner sistemle ilişkili fistüller.
- 8- Üriner sistem tümörleri dir (1).

Üriner sistem taş hastalığında en sık kalsiyum okzalat ve kalsiyum okzalat - kalsiyum fosfat karışımı mikst taşlardır. Erişkin hastalarda taşların %65–70'i saf kalsiyum okzalat taşları olmakla beraber mikst olarak bütün taşların %80'inde bulunur (1, 3).

Üriner sistem taş hastalığının oluşumunda renal tubüler epitel hasarı tubüler lümendeki membranöz hücresel yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İdrarda çözünebilen kalsiyum okzalatın bu membranlara maruziyetiyle kalsiyum okzalat kristallerinin heterojen nükleasyonu ortaya çıkabilmektedir. Buna göre, hiperoksalüri kalsiyum okzalatın kristalizasyonunu sadece kalsiyum okzalatın süpersatürasyonunu arttırarak değil, aynı zamanda renal tubüler epiteli tahrip ederek ve heterojen nükleasyon için substrat sağlayarak yapmaktadır (4).

Böbrek taşı oluşumu kompleks bir süreç olup, kristal nükleasyonu, büyüme, agregasyon ve renal tüplerde kristal tutulumu gibi evreleri içermektedir. Bu süreç üriner taş matriksinin majör bir elemanı olan ve potansiyel olarak pozitif veya negatif yönde taş oluşumunu etkileyebilen üriner proteinler gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir (osteopontin, bikülin, Tamm - Horsfall) (5).

Bu çalışmamızda Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin üriner sistem taş hastalığında endemik bir bölge olması, taş hastalığının her yaş grubunda karşımıza çıkması, familyal taş hastalığının sık görülmesi ve taş hastalığının etyolojisinin tam anlamıyla aydınlatılamamış olması sebebiyle taş oluşumunda inhibitör bir protein olan osteopontinin familyal taş hastalığında ki muhtemel yerini saptamak için taşlı olgularda osteopontin gen bölgesi mutasyonunu araştırmayı uygun bulduk.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 : Böbrek Anatomisi

Böbrekler retroperitonyumun en büyük organları olup 12. torakal ve 3. lomber vertebra arasında yer alır. Longitudünel düzlemde inferiyor ve laterale, transvers düzlemde posteriyor ve laterale, sagittal düzlemde ise lateralizedir. Ortalama 3x6x12 cm büyüklüğünde olup, erkekte 150 g kadında 135 g ağırlığındadır. Yeni doğanlarda böbrek ağırlığının vucut ağırlığına oranı 1/80, erişkinde ise 1/240'dır. Sağ böbrek sola nazaran daha kısa, kalın ve inferiyor yerleşimlidir (6).

Sol böbrek; üstte sürrenal bezi, üst-dışta dalak, ön-üstte mide, hilum bölgesinde pankreas kuyruğu, arkada arka karın duvarı ve diafragma, altta jejunum ve kolon ile komşuluk gösterir. Sağ böbrek; üstte sürrenal bezi, altta kolon, önde karaciğer, arkada arka karın duvarı ve diafragma, hilum bölgesinde duodenum ve vena kava inferiyor ile komşudur (7).

Böbrek dışını örten fibröz kapsül sinüs renalis içine dönerek papillaya kadar uzanır ve apse, hematoma gibi böbrek içi olayların dışı yada dıştaki olayların içe yayılmasını önleyen bariyer oluşturur. Renal kapsülün dışında sırasıyla perirenal yağ dokusu, renal fasya (Gerota), pararenal yağ dokusu mevcuttur. Gerota fasyası iki yapraktan oluşur. Posteriyorda daha kalınken anteriorde incedir ve peritonea yapışiktır. Her iki yaprak lateral ve süperiyorda birleşir, medialde ise büyük damarlar düzeyinde füzyona uğrarlar böylece hem böbreği destekler hemde bir taraf retroperitoneal infeksiyonların diğer tarafa geçmesini önlerler. Gerota fasyası inferiyor bölgede birleşmez (6, 7).

Renal pelvis 5-7 ml kapasiteli konik bir yapıdır. Pelvis renalis 2-3 ana majör kalikse, bunlarda papillalarda sonlanan birçok minör kalikse ayrılır. Kaliks

boyunları infundibulum olarak adlandırılır. Pelvis renalis tamamen böbrek sinüsünün içinde olabildiği gibi (intrarenal), tamamen dışında da olabilir (ekstrarenal). Böbreğe giren ana yapıların yer aldığı bölüm sinüs renalis olarak adlandırılır ve burada arkadan öne doğru renal pelvis, arter ve ven bulunur (7).

Böbrek parankimi, korteks ve medulla olmak üzere iki bölümdür. Medulla 8-18 adet, çizgili görünümlü piramidden oluşur. Piramidlerin tabanı kortekse bakar. Tepeleri papilla adını alır ve minör kalikslere açılır. Papilla yüzeyine 7 ana kollektör kanal açılır (Bellini kanalları) ve bu görünüm nedeniyle area kribroza adı verilir. Piramidlerin tabanlarından korteks içine doğru çizgiler uzanır (Stria medullaris kortisi-Ferrain uzantıları). Renal piramidlerin kesit yüzeyi, birbirine paralel seyreden Henle kolları, kollektör kanallar ve vaza rektalar nedeniyle çizgili görünümündedir (7, 8).

2.1.1 Böbrek Arter Sistemi

Renal arterler 2. lomber vertebra düzeyinde aorta'dan ayrılırlar. Sağ renal arter daha uzun olup sola göre biraz daha yukarıdan aortu terk eder. Renal vasküler yapıda varyasyonlar oldukça yüksektir, bu nedenle standartize etmek zordur. Genellikle tek dal halinde sağ ve sol renal arter olarak ayrılırlar (%70). Böbreğe ulaşmadan sağ renal arter; inferiyor sürrenal, küçük perinefritik, kapsüler ve proksimal üreteral dallar verirler. Aksesuar sağ renal arter olasılığı %30'dur (6,7).

Renal arter ön ve arka olmak üzere iki dala ayrılır. Ön dal daha geniş olup renal pelvis ile renal ven arasında seyrederek. Arka dal ise renal pelvis yada üst infundibulum arkasında yer alır. Bu arterlerden çıkan segmenter arterler, böbreği beş vasküler bölüme ayırır. Bunlar; apikal, ön üst, ön orta, alt ve arka segmentlerdir. Segmenter arterler içerisinde anastomoz yoktur yani her biri endarterdir. Segmenter arterler her piramid için lobar arter olarak devam eder ve 2-3 interlober artere ayrılıp piramidlerin arasında kortekse kadar uzanırlar. Kortikomedüller bölgede interlober arterler piramid tabanına paralel seyretmek üzere dönerek arkuat arter adını alırlar. Arkuat arterlerden kortekse dik uzanan birçok interlobüler arter çıkar. İnterlobüler arterlerin ana dalları afferent glomerüler arteriyolu oluşturur. İnterlobüler arterlerin bir kısmı fibröz renal kapsülü delerek adrenal, gonadal ve frenik damarların yaptığı kapsüler pleksusa katılırlar.

Glomerüler yumaktan çıkan efferent arteriyol, peritübüler kapiller ağı oluşturarak proksimal ve distal tubuli kontortiyi sarar. Bu kapiller pleksus venöz kapillerle birleşerek interlobüler venlere dökülür. Medullanın beslenmesini vaza rektalar sağlar. Bunların çoğu jukstamedüller glomerülün efferent arteriyolünden (vaza rekta spuriae), az kısmında arkuat yada interlobüler arterlerden doğrudan çıkar (vaza rekta verae). Vaza rekta veraeler iskemik veya toksik olaylarda kısa devre yaparak medullayı korurlar. Vaza rektalar renal medullada aşağı doğru inerlerken henle kulpu ile kollektör kanallar arasında oluşan pleksusa yan dallar verir. Bu pleksusun venöz dönüşüde interlobüler yada arkuat venlerle olur (6–9).

2.1.2 : Ven Sistemi

Venöz dönüş arteryel istikametini tersi yönde oluşturur. İnterlobüler venler arkuat venlere, arkuat venler interlober venlere, interlober venler segmenter venlere dökülür ve en sonunda renal veni oluşturular. Arter sisteminin tersine renal parankimal venler arasında anastomoz mevcuttur. Sağ renal ven kısa olup doğrudan vena kava inferiora açılır. Kol sayısı azdır ve yalnızca aberran gonadal veni alır. Sol renal ven ise lomber venler, hemiazigoz sistem ve küçük paravertebral venlerle birleşerek sirkumaortik pleksusu oluşturur (6–9).

2.1.3 : Lenfatik Sistem

Böbrek ve çevresinde üç lenfatik sistem yer alır. Ana lenfatik pleksus böbrek dokusundan kaynaklanır, renal tubüliller arasında seyrederek 4-5 geniş kanal ile hiluma gelir, renal veni izleyerek ana lenfatik trunkusu oluşturur ve sol tarafta lateral aortik nodüllere açılır. İkinci lenfatik sistem olan subkapsüler pleksus, kapsül altı dokuları drene ederek hilumda ana lenfatik trunkus ile birleşir. Üçüncü lenfatik sistem ise perinefritik pleksus adını alır, subkapsüler pleksus ile birleşerek ya da bağımsız olarak lateral aortik nodüllere açılır (6–9).

2.1.4 : Nefronun Anatomik Yapısı

Böbreğin idrar oluşturması her biri ayrı bir ünite olan nefronlar tarafından sağlanır. Nefron; sıvının filtre edildiği glomerül, filtre edilen sıvının Bowman kapsülünden böbrek papillasına kadar akarken idrar niteliğini kazandığı tubülüslerden oluşur. Nefron her bir böbrekte ortalama 1.5 milyon kadardır. Nefron renal korpüskül (Malpighi cismi) ile başlar. Bu cisim tek tabaka epitelden yapılmış

Bowman kapsülüne invagine olmuş bir glomerül yumağıdır. Korpüskülün afferent arteriyolunun girip efferent arteriyolunun çıktığı kutuba vasküler kutup, Bowman kapsülünün proksimal tubulusa birleştiği kutuba üriner kutup denir. Proksimal tubülüs kıvrımlı ve düz parçaları ile firkete şeklinde seyreden henle kulpu aracılığıyla distal tubülüse, bu da ara parçayla kollektör kanallara bağlanır. Yedi adet ana kollektör kanal (Bellini kanalları), papillanın area kribroza adı verilen yüzeyine açılır. Nefronların çoğunluğunda glomerüller böbrek yüzeyine yakın yerleşimlidir ve bunlara kortikal nefron denir. Glomerülleri medullaya yakın nefronlara ise jukstaglomerüler nefron denir (6, 7).

2.2 : BÖBREK FİZYOLOJİSİ

Böbreklerin endokrin ve egzokrin olmak üzere iki temel görevi vardır (10, 11).

2.2.1 : Böbreğin Endokrin Fonksiyonu

Başlıca endokrin fonksiyonları şunlardır;

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

2.2.2 : Böbreğin İdrar Oluşturma Fonksiyonu

Böbrekler egzokrin fonksiyonlarını idrar oluşturarak gerçekleştirirler. İdrar oluşturulurken aşağıdaki görevleri yerine getirirler.

1. Sıvı elektrolit dengesinin düzenlenmesi
2. Plazma onkotik basıncının düzenlenmesi
3. Asit–baz dengesinin sağlanması
4. Organizma için gereksiz yabancı maddelerin (ilaçlar, metabolitleri vs.) atılımı
5. Metabolizma sonrası oluşan üre, kreatinin, kreatin, ürik asit, sülfatlar, fosfatlar gibi son ürünlerin ve toksik maddelerin atılımı (10, 11).

2.2.3 : İdrar Oluşum Mekanizmaları

İdrarın oluşumu böbreğin en önemli fonksiyonudur. İdrar; glomerüler filtrasyon, tubüler reabsorbsiyon ve tubüler sekresyon sonucu oluşur (10, 11).

2.2.3.1 : Glomerüler Filtrasyon

Glomerülden Bowman kapsülüne filtre olan sıvıya glomerüler filtrat denir. Bu filtratın oluşumu için glomerüllerde efektif filtrasyon basıncının oluşması ve glomerüler membrandan geçmesi gerekmektedir (10, 11).

Böbrekler bütün vücut kitlesinin %1'inden azını oluşturmakla birlikte kalp debisinin %20'sini alırlar. Kan basıncı renal arterde 100 mmHg iken glomerüler düzeyinde 70 mmHg'ya düşer. Efferent arteriyolün çapının afferent arteriyolden daha küçük olması glomerüler kapiller yatağı yüksek basınçlı hale getirir. Glomerüler filtratın oluşumunda ana faktör glomerüler kapiller yataktaki hidrostatik basınçtır. Bu basınç 70 mmHg kadardır. Bu basınca karşı duran güçler vardır. Bunlar; plazma proteinlerinin onkotik basıncı ki 25–30 mmHg civarındadır ve Bowman kapsülü içindeki hidrostatik basınçtır (10–15 mmHg). Bu basınçlar arasındaki farka efektif filtrasyon basıncı denir ve yaklaşık olarak 30 mmHg civarındadır. Sistemik basıncın 70 mmHg'nın altına düştüğü veya intrakapsüler basıncın 50 mmHg'nın üzerine çıktığı durumlarda efektif filtrasyon basıncı sıfıra düşer ve filtrasyon durur (11).

Glomerüler filtrasyonun oluşması için glomerüler membrandan geçmesi gerekmektedir. Glomerüler membran ise kapiller endotel, bazal membran ve epitel tabakasından oluşur. Glomerüler kapiller endotelinde fenestra denilen binlerce delik bulunur. Endotel hücreleri dışındaki bazal membran ise geniş aralar içeren proteoglikan liflerinden yapılmış ağ şeklindedir. Bazal membranın dışını oluşturan epitelde ise filtratın süzülmesi için yarıklar mevcuttur. Bu özellik glomerüler kapillerin geçirgenliğini diğer kapillere göre 100–400 kat artırır. Glomerüler membranın bu yüksek geçirgenliğine rağmen geçirdiği moleküllerin büyüklüğü ve elektiriksel yükleri açısından seçiciliği vardır. Glomerüler membrandan molekül ağırlığı 70 000 daltonun üzerindeki ve membran deliklerinin büyüklüğü 8 nanometre'den (80Å) büyük maddeler geçemez. Filtrattaki maddeler bu moleküler özelliklere sahip olsa bile (albumin) glomerül porlarının yüksek negatif elektiriksel yükünün elektro hidrostatik itici gücü ile karşılaşılır (11, 12).

2.2.3.2 : Tubüler Reabsorbsiyon ve Sekresyon

Her iki böbreğin nefronlarının tümünden 1 dakikada oluşan glomerüler filtratın miktarına glomerüler filtrasyon hızı denir. Normal bireylerde bu hız 120 ml/dak.dır. Glomerüler filtrat 24 saatte yaklaşık olarak 180 L oluşur bunun da %99'u tubüllerden reabsorbe edilir. Geriye kalan 1200–1500 ml filtrat idrar olarak atılır (10, 11).

İdrar oluşumunda tubüler reabsorbsiyon sekresyondan daha büyük rol oynar. Tubüler reabsorbsiyon ve sekresyonda iki mekanizma rol oynar bunlar; aktif ve pasif transporttur. Renal tubüli hücrelerinin lümene bakan yüzü villuslardan oluşur ve yüzey alanını 20 kat artır (10, 11, 12).

Aktif transport, hücre membranında bulunan proteinler ile maddelerin taşınması esasına dayanır ve enerji gerektirir. Burada kullanılan enerji ATP'dan gelir. Aktif transportta uğrayan maddeler; sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, demir, hidrojen, bikarbonat, ürat, fosfat iyonları, glikoz, protein ve aminoasitlerdir (10, 11).

Aktif sekresyonda aktif transport gibi enerji gerektirir tek farkı membranın maddeleri aksi yönde taşımasıdır. Aktif sekresyon ile hidrojen, potasyum ve ürat iyonları taşınır (10, 11).

Pasif transportta herhangi bir enerji sarfı yoktur. Su osmos ile reabsorbe edilirken tubüler sıvıdaki ürenin yarısı geride kalır ve konsantrasyonu artar. İntersitisyumda üre konsantrasyonu düşük olduğundan üre difüzyona uğrar (10, 11).

2.2.3.3 : Tubüli Segmentlerinin Absorbsiyon ve Sekresyon Yetenekleri

Tübüli membranlarının hücresel nitelikleri proksimal tubüli, henle kulpu, distal tubüli ve kollektör kanallarda farklılıklar gösterir (10, 11).

Proksimal tubüli hücreleri tubüler sistemdeki reabsorbsiyon ve sekresyonun %65'ini gerçekleştirir. Proksimal tubüli hücreleri hızlı, aktif transportu sağlayacak şekilde çok sayıda mitokondri içerir. Tubülün lümen epitelinin villus içermesi,

intersitisyel yüzünün bazal kanallar içermesi ve tubüli hücrelerinin birbiri ile sıkı bağlantı oluşturmaması bu fonksiyonunu artırır (10, 11, 12).

Henle kulpu ince ve kalın olmak üzere iki segmente ayrılır. İnce segmenti de inen ve çıkan kol olmak üzere kendi arasında ikiye ayrılır. İnen kolundaki hücrelerde mitokondri çok az bulunur bu sebep ile enerji üretimi sınırlıdır. İnen kol suya yüksek derecede geçirgen, Na^+ ve diğer iyonlara orta derecede geçirgendir. Henle kulpunun çıkan kolu suya çok az geçirgen üreye ise çok geçirgendir. Henle kulpunun kalın segmenti ince kulpun çıkan kolunun epitelinin kalınlaştığı yerden başlar. Bu segment efferent ve afferent arteriyolların arasından geçerek jukstaglomerüler kompleksi oluşturur. Bu kompleks de nefron fonksiyonunda çok önemli bir role sahiptir. Kalın segment epitelinin villusları rudimente, bazal kanalları az ve hücreler arası bağlantıları sıklıdır. Su ve üreye geçirgenliği hemen hemen hiç yoktur. Özellikle Na^+ , K^+ ve Cl^- iyonlarının aktif transportunda rol oynar. Kalın segment idrarın konsantrasyon ve dilüsyon derecesinin düzenlenmesinde önemli role sahiptir (10, 11, 12).

Distal tubüli, henle kulpunun kalın segmentinin jukstaglomerüler kompleksi geçmesi ile başlar. İki kısımdan oluşur 1. kısım sulandırıcı segment ismini alır suya ve üreye geçirgenliği çok azken iyonların çoğunu absorbe eder. İkinci kısmına kortikal toplayıcı tubül denir. Bu kısım üreyi hiç geçirmez, Aldosteron kontrolü altında Na^+ - K^+ ko-transportu ile Na^+ absorpsiyonunu, K^+ sekresyonunu ve Antidiüretik hormon (ADH) varlığında suya geçirgenliği sağlar (10, 11).

Kollektör kanal epitelisi kübik şekilli, az sayıda mitokondri içeren düzgün yüzeyle (villusları olmayan) hücrelerdir. ADH varlığında suya geçirgen olma özellikleri vardır. Üreyi minimal geçirirler. En önemli özelliği ise yüksek H^+ gradientine rağmen lümeneye aktif olarak hidrojen iyon sekresyonu yapabilmeleridir. Vücut asit-baz dengesinde önemli rol oynarlar (10).

Glomerüler filtrattan bir madde ister aktif ister elektrokimyasal gradient ile absorbe edilse tubüler konsantrasyonu azalırken intersitisyumdaki konsantrasyonu artar. Bu da suyun tubülde osmotik difüzyonuna neden olur.

Tübülünin segmentlerindeki su reabsorbsiyon oranı; proksimal tübülde %65, Henle kulpunda %15, distal tübülde %10, kollektör kanallarda %9,3'dür (10, 11).

Sodyum iyonunun reabsorbsiyonu elektrokimyasal gradientlerin etkisi altında ve aktif transport ile olur. Tübülünin segmentlerindeki Na^+ reabsorbsiyon oranı; proksimal tübülde %65, Henle kulpunda %25, distal tübülde %5, kollektör kanallarda %1 dir (10).

Plazma potasyumunun %90'ından fazlası glomerüler filtrasyona uğrar. K^+ reabsorbsiyonunun tamamı proksimal tübül ve henle kulpundan Na^+ - K^+ ATPaz mekanizması ile olur. İdrardaki K^+ ise distal tübüler ve kollektör kanallardan sekrete edilir (10, 11).

Glomerüler filtrattaki klorun %99'u reabsorbe olur. Klorun emilimi proksimal tübülde aktif sodyum emiliminin oluşturduğu negatif elektriksel gradient ile pasif olarak meydana gelirken büyük çoğunluğu distal tübülülerde aktif transport ile sağlanır (10).

Plazma proteinlerine bağlı olmayan kalsiyum glomerüler filtrasyona uğrar ve %98'i reabsorbe olur. Kalsiyum reabsorbsiyonu esas olarak proksimal tübülü ve henle kulpunun çıkan kolunda Na^+ reabsorbsiyonuna paralel olur. Buradaki reabsorbsiyonu parathormon (PTH), siklik AMP, asetazolamid, eksojen sodyum yüklenmesi ve fosfat kaybı ile inhibe olur. Reabsorbsiyonu bu segmentlerde uyaran faktörler; hipokalsemi, metabolik alkalozda HCO_3 artımı, D vitamini ve fosfat yüklenmesidir. Absorbsiyonun daha az kısmı distal tübülü ve kollektör kanallarda aktif transport ile meydana gelir PTH ile uyarılır (10, 11, 12).

Plazma fosfatının %80-90'ı glomerüler filtrasyona uğrar bununda %97'si reabsorbe edilir. Reabsorbsiyonun büyük kısmı proksimal tübülilerden olur. Reabsorbsiyonu PTH inhibe eder (10).

Hidrojen iyonları proksimal, distal tübülü ve kollektör kanallarda aktif transport ile sekresyona uğrar. Bu mekanizma ile asit-baz dengesi sağlanır. Tübüler epitelin bikarbonat iyonlarına olan geçirgenliği sınırlıdır. İntra tübüler HCO_3 , hidrojen iyonu

ile birleşerek karbonik asiti (H_2CO_3) oluşturur. Oluşan H_2CO_3 su ve karbondioksit (CO_2) ayrılır. Yüksek lipofilik özelliği olan CO_2 diffüzyon ile peritübüler alana geçer ve olay tersine işler (10, 11).

Glomerüler filtratta vucut beslenmesi için önemli organik maddeler olan glikoz, protein, aminoasitler bulunur. Bunların tüme yakını proksimal tubülilerde absorbe edilir. Proteinler aktif transport ile taşınamayacak kadar büyük olduklarından proksimal tubüli epitelinde pinostoz ile absorbe edilir (10, 12).

2.3. Üriner Sistem Taş Hastalığı Etiyolojisi

Üriner sistem taş hastalığı, hayatın her döneminde oluşabilen, tek bir nedene bağlı olmayan, kompleks ve birbiri ile ilişkili birçok faktörün beraberce meydana getirdiği olaylar dizisidir (1).

Üriner sistem taş hastalığı, üriner enfeksiyonlar ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemi en sık etkileyen üçüncü patolojidir. Ürolitiazis M.Ö. 4800'lü yıllardan beri varlığı bilinen ve endüstriye toplumların %1-5'inde oluşan bir hastalıktır (1).

Üriner sistem taş hastalığının tanı ve tedavisindeki gelişmeler etyolojik çalışmaların önüne geçmiştir. Klinik ve deneysel çalışmalar ışığında taşların kimyasal ve morfolojik yapısı, içeriği hakkında oldukça detaylı bilgiler elde edilmiş fakat teknolojideki bütün ilerlemelere rağmen taş oluşum mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır (1, 2).

Üriner sistem taş hastalığında etyopatogenezi açıklamaya yönelik başlıca teoriler şunlardır (1, 2, 3).

- 1- Süpersatürasyon–kristalizasyon teorisi
- 2- İnhibitör ajanların eksikliği teorisi
- 3- Matriks–nükleasyon teorisi
- 4- Epitaksi teorisi
- 5- Kombine teoriler.

2.3.1 : Süpersatürasyon – Kristalizasyon Teorisi

İdrar suya nazaran daha fazla maddeyi eriyik halinde tutabilme yeteneğine sahip olan süpersatüre bir solüsyondur. Belirli bir pH ve sıcaklıktaki suya kristalize olabilen bir element konulduğunda solüsyon halinde kalır ancak bu elementin miktarı artırıldığında belli bir doygunluk noktasına (solubility product) gelir ve eriyik halde kalmaz. Doymuş haldeki madde kristalize olmaya başlar (formation product). Elementlerin idrarda erime ve kristalizasyonunda pH ve sıcaklık çok önemlidir. Bunun yanında poliyonik solüsyonlarda erime noktaları değişir birbirlerinin erimesini artırır aynı zamanda idrarda bulunan sitrat gibi organik maddeler de elementler ile birleşerek erimelerini artırır. İdrarın solubility product (sp) ve formation product'ı (fp) değişkendir. Sp da suda dahi kristalizasyon mümkün değildir ve bu konsantrasyonun altına stabil zone denilir. Stabil zonda kristal nüvesi oluşmaz, varsa gelişmez, tekrar eriyik hale gelebilir fakat agregasyon olabilir. Sp ile fp arasına metastable zone denilir ve bu zonda spontan kristalizasyon oluşmaz, mevcut kristal nüvesi üzerinde taş oluşabilir, tekrar erimesi oldukça zordur, agregasyon olabilir. Satürasyon fp'ı aşmış ise spontan kristalizasyon oluşur, süratle büyür, agregasyon çok hızlı oluşur (1, 2, 3, 12).

2.3.2 : İnhibitör Ajanların Eksikliği Teorisi

Bir çok normal insanın idrarında süpersatürasyon mevcut olup kristalizasyon olmaktadır. Ancak bu kristaller büyüyemez ve kolayca itrah edilir. İnhibitör ajanlar sp ve fp seviyesini aşmış idrarlarda erimeyi artırarak, kristalizasyonun oluşumunu azaltarak, çözünebilen yeni kompleksler oluşturarak, adhezyon ve agregasyonu önleyerek etki ederler (1, 3, 12, 13).

Organik veya inorganik olabilirler. Organik inhibitör ajanlar; düşük molekül ağırlıklı peptidler, yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinler, matriks-A, sülfidril (SH) bağı içeren üromukoidler, alanin, sitrat, üre, Tamm- Horsfall proteinleri, üropontin, nefrokalsin, bikunin, osteopontin, α -1 antitripsin, glikozaminoglikanlar ve lipokortindir. İnorganik inhibitörler; fosfatlar, pirofosfatlar, ortofosfat, magnezyum ve çinkodur (3, 5, 14).

Sitrat; inhibitör maddeler içinde üzerinde en çok çalışılan ve medikal tedavide yerini almış ajandır. Kalsiyum tuzları ile çözünebilen kompleksler oluşturarak Ca^{++}

satürasyonunu azaltır. Kalsiyum tuzlarının kristalizasyonunu direkt olarak inhibe eder, monosodyum üratları azaltarak kalsiyum okzalit taşlarını azaltır (1, 3).

Osteopontin; üriner sistemde taş oluşumunu engelleyici göreve sahiptir. Bunu da kalsiyum tuzlarının üriner sistemde kristalizasyonunu engelleyerek yapar. Osteopontin böbreklerde sentez edildikten sonra Henle kulpu, distal tubüller ve papiller epiteliyumundan idrara sekrete edilir. Osteopontin kalsiyum nükleasyonu, agregasyonu ve kalsiyum okzalit kristalizasyonunu inhibe eder. Ayrıca kalsiyum okzalit kristalleri üzerine bağlanarak doğrudan etki ile çözünmesini sağlar. Kalsiyum okzalit kristalizasyonunda özellikle dihidrat fazını inhibe eder ki bunlar monohidratlara göre renal tubüllere daha fazla adherens gösterirler (15).

2.3.3 : Matriks–Nükleasyon Teorisi

İdrardaki proteinlerin bir ürünü olan matriks; protein, heksan ve heksanaminleri içerir. Matriks bir yandan kristal büyüme ve agregasyonunu önleyerek inhibitör etki yaparken, diğer taraftan taş yapısının %2-10'unu oluşturmaktadır. Kristal kümeleşmesi için küçük kristalleri yapıştıran doğal yapıştırıcı veya çekirdek görevi görebilir. Nadiren taş yapısının tamamını oluşturur. Nükleasyon ise erken süpersatürasyon döneminde oluşan ve ileride taş oluşumu için bir nevi şablon görevi gören yapıların oluşmasıdır. Epitelial hücreler, yabancı cisimler, $\alpha 1$, $\alpha 2$ globülinler bu nükleasyonu oluşturan öğelerdir (2, 3, 12).

2.3.4 : Epitaksi Teorisi

Eğer idrarda kristalizasyon çok fazla oluşmuşsa kalan idrarda kristalize olan maddenin satürasyonu azalır ve kristalizasyon durur. Farklı bir elementin satürasyonu yüksek ise bu kristalin üzerine yapışarak kristal büyümesini sağlar. Buna epitaksi denilir. Ürik asit taşları üzerine kalsiyum okzalit kolaylıkla epitaksi ile tutunur. Sistin ise başka herhangi bir kristal üzerine epitaksi göstermeyen tek maddedir. (2, 3, 12)

2.3.5 : Kombine Teoriler

İlk kristal çekirdeğinin tubüli hücrelerinde başladığı ve idrara atıldığı böylece serbest nükleasyona ihtiyaç duyulmadığı öne sürülen intranefronik fiks nükleasyon teorisi ile süpersatürasyon ve kristalizasyonun serbest olarak idrarda olduğu,

fakat inhibitörlerin kalitatif veya kantitatif defektleri sonucu büyüyerek taş oluşturduğu öne sürülen ekstranefronik serbest partikül nükleasyonu teorisini içerir (1, 2, 3, 12).

2.3.6 : Taş Hastalığında Risk Faktöleri

- 1- Hiperkalsiüri
- 2- Hiperokzalüri
- 3- Hiperürikozüri
- 4- Hipositratüri
- 5- Hipomagnezüri

2.3.7: Hiperkalsiüri

İdrar kalsiyum atılımının 4 mg/kg/gün'ün üzerinde olmasına denir. İdiyopatik kalsiyum taşı olan hastaların %50-70'inin hiperkalsiürisi mevcuttur (1, 3).

Üç ayrı etiyoloji ile gelişebilen bu risk faktörlerinde, absorptif tip en sık görülen şeklidir. Temel bozukluk Ca^{++} 'un intestinal hiperabsorbsiyonudur. Bunun sonunda PTH baskılanır, renal Ca^{++} itrahi artar ve kan seviyesi normal tutulur. Kendi içinde iki tipi vardır, tip 1 de diyetle kalsiyum alımı kısıtlansa dahi regüle olmaz (1, 3).

Renal hiperkalsiüride temel bozukluk renal tubüler reabsorbsiyonun olmaması ve buna sekonder hiperparatiroidinin oluşmasıdır. Serum Ca^{++} 'u normaldir. İdrar kalsiyumu açlık veya diyet ile düşmez, hipokalsemide dahi devam eder (1, 3).

Rezortif tip hiperkalsiüride primer hiperparatiroidizm sorumludur. PTH'un yükselmesi ile Ca^{++} 'un kemiklerden aşırı rezorbsiyonu başlar. PTH 1-25 dihidroksikolekalsiferolün renal sentezini artırarak intestinal Ca^{++} absorpsiyonunu artırır. Renal tubülilerdeki Ca^{++} miktarı maksimal reabsorptif kapasiteyi geçer ve hiperkalsiüri oluşur (1, 2, 3).

2.3.8 : Hiperokzalüri

Hiperokzalüri günlük idrar okzalat atılımının 40 mg'ın üzerinde olmasıdır. Okzalat idrarda Ca^{++} ile birleşir ve erimesi güç olan kalsiyum okzalat tuzunu

oluşturur. Diyet ile alınan okzalatin ancak %3-12'si intestinal sistemden absorbe edilir. Hiperokzalürinin %90'ı endojen kaynaklıdır (1, 2, 3).

Primer hiperokzalüri; otozomal resesif hastalık olup iki tipi mevcuttur. Tip I'de 'Gliokzalat karboligaz' enzimi defektiftir. Tip II'de ise 'D-gliserat dehidrogenaz' enzimi yetersizdir. Günlük idrar okzalat miktarı 100 mg'ın üzerindedir ve patognomoniktir (1).

Enterik hiperokzalüride safra asitleri ve yağ asitlerinin bağırsak mukozasının okzalata geçirgenliğini artırması ve yağ malabsorbsiyonlarında kalsiyum sabun formasyonu oluşturarak okzalat absorbsiyonunu artırması söz konusudur (1, 3).

Diğer hiperokzalüri nedenleri ise yüksek olarak etilen glisikol alımı, askorbik asit alımının günde 5 g'ın üzerinde olması, florlu anestezi ajanı olan 'methoxyflurane' alımı, düşük kalsiyum alımıdır (1).

2.3.9 : Hipositratüri

Sitrat üriner sistem taş hastalığında önemli bir inhibitör ajandır. Sitrat kalsiyum tuzları ile çözünürlüğü yüksek kompleksler oluşturur ve üriner Ca^{++} saturasyonunu azaltır. Sitrat doğrudan Ca^{++} kristalizasyonunu inhibe eder. Böbreklerden sitrat atılımını etkileyen en önemli faktör asit-baz dengesidir. Asidoz sitratın renal reabsorbsiyonunu artırır ve sitrat sentezini azaltır. Kronik diyare ve tiazide tedavisi diğer etkenlerdir (1, 2).

2.3.10 : Hipomagnezüri

Magnezyum üriner sistem taş hastalığında inhibitör ajandır. Kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfat kristalizasyonunun çözünürlüğünü artırır. Kalsiyum okzalat taşlarının büyümesini ve agregasyonunu azaltır. Hipomagnezürinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte diyetdeki eksikliği ön plandadır (1, 2).

2.4 : OSTEOPONTİN

Multifonksiyone bir protein olup en çok kemiklerden yapılmakla birlikte makrofajlar, endotel, düz kas ve epitel hücrelerinden de üretildiği gösterilmiştir.

Osteopontin aside hidrofilik yapıda yaklaşık 300 aminoasit içeren negatif (-) yüklü proteindir. Molekül ağırlığı 44–80 kDa dur. Bir çok fosforilasyon ve glikozilasyon yerine sahiptir. Bu da molekül ağırlık değişikliklerine neden olmaktadır. Osteopontin'in cDNA'sının değişik memeli türlerinde benzer homolojiyi gösterdiği saptanmıştır (15, 16).

2.4.1. Osteopontin Gen İfadesinin Düzenlenmesi

Osteopontin (Opn) sentezinde yüksek tetikleyici faktörler pürin, glukokortikoidler, vitamin-D, interferonlardır. Proinflamatuvar sitokinler de Opn gen transkripsiyonu ve sentezini artırır. Akut inflamasyonun klasik mediatörlerinden TNF α ve IL-1 β da Opn sentezini artırır. Hiperglisemi ve hipoksinin de osteopontin sentezini artırdığı gösterilmiştir (15).

2.4.2. Osteopontin ve İnflamasyon

Osteopontin inflamasyonun akut ve kronik fazında epitel, endotel ve düz kas hücrelerinden ifade edilir. Osteopontin proinflamasyon ve antiinflamasyon aktivitelerinin her ikisi içinde yer alır. Osteopontin makrofaj ve T hücrelerinin inflamasyon bölgesine gelmesini sağlayan kuvvetli kemotaktik ajandır. İnflamasyon başladıktan sonra trombin bölünmesine neden olur ve antiinflamatuvar karakter kazanır. Glomerülonefritte anti osteopontin antikolar verildiği zaman glomerülonefritin önemli derecede azaldığı gösterilmiştir. Tüberküloz, sarkoidoz, silikozis gibi granülatöz hastalıklarda osteopontin gen ifadesi yüksek saptanmıştır. Bu hastalıklarda oynadığı kritik rol Th-1 sitokin sentezini artırıp, Th-2 sitokin sentezini durdurmak şeklindedir. Osteopontin knockout ratlarda defektif Th-1 salınımı sonucunda makrofajlardan IL-2 ve γ -INF yetersiz salınımı ile Herpes simpleks virüs veya Listeria monositogezis enfeksiyonlarında artış saptanmıştır (15).

2.4.3. Osteopontin ve Hasta Surveyi

Osteopontinin hücre ömrüne etkisi ve apoptozise gidişi etkilediği bilinmektedir. Osteopontin knockout ratlarda obstrüksiyon oluşturulan böbreklerde gözlenen makrofaj infiltrasyonu, intersitisyel fibrozis ve tubüler hücre apoptozisinin arttığı saptanmıştır (15).

2.4.4. Osteopontin ve İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentetaz Regülasyonu

Osteopontinin indüklenebilen nitrik oksit sentetaz'ı (INOS) inhibe edici etkisi vardır. Osteopontin knockout ratlarda nitrik oksit (NO) verildiğinde ortaya çıkan iskemi–reperfüzyon injürisinde minimal artış saptanmıştır (15).

2.4.5. Osteopontinin Diğer Biyolojik Fonksiyonları

Kollojen sentezini artırarak yara iyileşmesini hızlandırır. Epitelial tümörlerde malign potansiyeli azaltıcı etkisi vardır (15).

2.4.6. Osteopontin ve Patolojik Mineralizasyon

Osteopontin fizyolojik ve patolojik mineralizasyonun regülasyonunda görev alır. Osteopontin normal kemiklerde hem osteoklast hem de osteoblastlardan eksprese edilir ki bunlar kemiğin remodelingini sağlarlar. Osteoklast kaynaklı Opn hidroksiapatit formasyonunu inhibe ederek kemik rezorbsiyonunu artırır. Osteopontin ekspresyonu distrofik kalsifikasyon, dejeneratif ve ateramatöz vasküler hastalığa sebep olabilir (15).

Moleküler seviyede nefrolitiyazisin gelişim süreci tam anlaşılammıştır. Böbrek taşı oluşumu kompleks bir süreç olup, kristal nükleasyon, büyüme, agregasyon ve renal tüplerde kristal tutulumu gibi evreleri içermektedir. Bu süreç üriner taş matriksinin majör bir elemanı olan ve potansiyel olarak pozitif veya negatif yönde taş oluşumunu etkileyebilen üriner proteinler gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Birçok üriner proteinin taş oluşumunda önemli rol aldığı gösterilmiştir (5).

• Üriner sistem taş hastalığının oluşumunda renal tubüler epitel hasarı tubüler lümendeki membranöz hücresel yıkım ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. İdrarda çözünebilir kalsiyum okzalatin bu membranlara maruziyetiyle kalsiyum okzalat kristallerinin heterojen nükleasyonu ortaya çıkabilmektedir. Buna göre, hiperokzalüri kalsiyum okzalatin kristalizasyonunu sadece kalsiyum okzalatin süpersatürasyonunu arttırarak değil, aynı zamanda renal epitel tahrip ederek ve heterojen nükleasyon için substrat sağlayarak yapmaktadır (4).

Böbrek taşı oluşumu renal tüp epitellerindeki kristallerin nükleasyonu, büyümesi, agregasyonu ve tutulumunu içeren bir dizi olayın sonucudur. Farklı makromoleküller taş oluşumuna farklı basamakları düzenleyerek katkıda bulunurlar ki bunlardan biri osteopontindir (16).

Etilen glikol karaciğerde yıkılır. Etilen glikol yıkım ana ürünleri glikoaldehit, glikolik asit, glioksilik asit ve okzalik asittir. Bunlardan etilen glikol ve glikolil asit renal epitelyal hücrelere zarar vermezler (16).

Okzalat ve kalsiyum okzalat kristalleri epitel hücre cevabını provoke ederler. Düşük miktarda okzalat mitojenikken, yüksek miktarda okzalat ve kalsiyum okzalat renal epiteli tahrip eder. Lipid peroksidasyonu, apoptozis ve nekroza yol açarlar. Yapılan çalışmalarda tahrip olmuş renal hücrelerde osteopontin yapımının artışının spesifik sitokinlerce yapıldığı saptanmıştır (16).

Osteopontinin hücre peroksidasyon seviyelerini azalttığı, nitrik oksit üretimini baskıladığı ve hipoksiye direnci arttırdığı belirlenmiştir. Osteopontin üretimi hasara karşı bir savunma mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır. Kristal depolanmasıyla ilişkili osteopontin sentezi tubüler tıkanma ve mekanik gerilime cevap olarak ortaya çıkıyor olabilir. Çünkü deneysel hidronefroza proksimal tubüllerdeki osteopontin üretimi artışı tubüler tıkanmadaki gerilim artışı sonrası oluşmuştur (16).

Osteopontin esas olarak üriner sistemde taş oluşumunu engelleyici bir göreve sahiptir. Bunu da kalsiyum tuzlarının üriner sistemde kristalizasyonunu engelleyerek yaptığı bildirilmiştir. Osteopontin böbreklerde sentez edildikten sonra Henle kulpu, distal tubüller ve papiller epitelyumundan idrara sekrete edilir. Osteopontin kalsiyum nükleasyonu, agregasyonu ve kalsiyum okzalat kristalizasyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca kalsiyum okzalat kristalleri üzerine bağlanarak doğrudan etki ile çözünmesini sağlayan osteopontin, kalsiyum okzalat kristalizasyonunda özellikle dihidrat fazını inhibe eder ki bunlar monohidratlara göre renal tubüllere daha fazla adherens gösterirler (15).

Okzalit ve kalsiyum okzalit kristallerine maruziyete cevap olarak renal epitel hücreleri kalsiyum okzalit nefrolitiazisinde belirgin rol oynayan osteopontinin üretimini arttırmaktadırlar. Hayvan deneylerinde ekspresyonun heterojen olduğu gösterilmiştir. Henle kulbunun çıkan kolu, distal tüp ve maküla densada osteopontin bulunmaktadır. Buna karşın proksimal tüp, inen Henle kulbu, toplayıcı tüpler ve glomerüllerde bulunmamıştır. Yeni çalışmalarda ise en çok Henle kulbunun ince kolu ve kaliksiyel fornixin papiller yüzey epitelinde bulunduğunu göstermektedir. Yaşlanma ile birlikte Opn'nin bulunduğu yerlerin proksimaline doğru glomerüllere kadar kaydığı da gözlenmektedir (16).

Taş hastalığı olanlarda osteopontin üretimi daha az olmaktadır. Çünkü büyüyen taşlarda osteopontin taş yapısına inkorpore olmaktadır. Okzalit ile hasarlanan yüzeylerde osteopontin salgılanarak hasarlanan yüzeyin tamamı Opn proteini ile örtülür ve okzalitin yapışma ve büyümesini sınırlandırılır. Böylece okzalit artışı sonucu ortaya çıkan kristaller küçük kalır ve üriner ekskresyonla elimine edilir. Primer hiperokzalüri veya hiperokzalürinin sporadik epizodları durumlarında ise durum daha farklıdır. Bu durumda osteopontin gibi koruyucu elemanlar yetersiz kalmakta, kristal oluşumu sınırlanamamakta, kristalleşen yüzeyler tam olarak sarılamamakta, dolayısıyla açıktaki alanlara agregasyon olmaktadır. Bu kristaller ise endositoza uğrayıp, lizozomlara transport olarak çözünmeye uğrarlar. Bunun yanında hasarlanan hücrede kristal adezyonu, agregasyonu devam eder. Bunun sonucunda renal epitel hücreler tarafından ifade edilen osteopontin intersitisyuma ve makrofajlara monosit infiltrasyonunu sağlamakta ve kalsiyum okzalit nefrolitiazisli rat böbreklerinin interstisyumlarında kalsiyum okzalit kristalleri içeren dev hücreler oluşmaktadır (16).

Osteopontin ifadesi hiperokzalüri sonrası belirgin olarak artar ve bu artış kalsiyum okzalit kristallerinin böbreklerde depozisyonundan sonra da devam eder. Üriner sistem taş hastalığı olan ve normal bireylerin idrar Opn düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir. Osteopontin düzeyleri ürolitiazisli hastaların bazılarında normal bazılarında düşük olarak saptanmıştır (15, 16).

2.5. Polimeraz Zincir Tepkimesi

Polimeraz zincir tepkimesi (PZT), iki oligonükleotid primerlerle tanımlanan iki bölge arasında ki DNA bir DNA polimeraz tarafından katalizlenen bir seri sentetik tepkimelerin sonucunda çoğaltma esasına dayanır. Bu oligonükleotidler tanımlanacak DNA parçasının 5' ucu ve 3' ucu ile eşleşebilen özgünlüktedir. Yüksek ısıyla diğer zincirden ayrılır. Tepkime karışımı, daha sonra kalıp dizilerine oligonükleotid primerlerinin yapışmasına imkan veren bir ısıya düşürülür. Yapışmış primerler uygun bir ısıya çıkarılarak DNA polimeraz ile uzatılır. Zincirlerin birbirinden ayrılması, yapışma ve DNA sentezi döngüsü sonradan birçok kez tekrarlanır. Çoğaltılmanın bir aşamasının ürünü sonraki için kalıp işlevi gördüğünden dolayı her başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar (17, 18).

Bu şekilde artan tepkimenin temel ürünü; sonunun oligonükleotidin 5' ucu tarafından belirlendiği ve uzunluğunun primerler arasındaki mesafe tarafından oluşturulduğu bir çift zincir DNA parçasıdır (17, 18).

Polimeraz zincir tepkimesinin özgün yöntemi, yapışmış oligonükleotid primerleri arasında kalan DNA parçasının çoğaltılmasını katalizlemek için *Thermus aquaticus*'tan saflaştırılan ısıya dayanıklı DNA polimeraz kullanılmasıdır. 95 °C'lık sıcaklıklarda bile uzun süre canlı kalabilen bu enzim DNA'nın 2 zincirinin ayrılması basamağındaki ısıyla etkisizleştirilememekte ve çoğaltılma döngüsünün her aşamasında tepkimeye yeniden kolayca eklenebilmektedir. Oligonükleotidlerin yapışma ve uzamasını yüksek ısılarla başarabildiğinden dolayı hatalı dizilimleme büyük oranda azalmıştır. Yüksek etkinliğe rağmen hedef dizilerin üssel çoğaltılması sınırsız bir işlem değildir. Döngü sayısı arttıkça hatalı nükleotid eklenmesi olasılığı da artar (17, 18).

2.5.1. Polimeraz Zincir Tepkimesinin Bileşenleri

Polimeraz zincir tepkimesinin kesin koşulları ve döngünün her bir basamağının zamanı; örnek, çoğalacak bölgenin uzunluğu ve primer dizisi tarafından belirlenir. Tepkimenin sahip olduğu yüksek doğruluk ile 20 döngü, kalıbın 1.000.000 kez

çoğaltılmasına neden olur. Etkinliğin düzeyleri %85-90 arasında olduğundan gerçek çoğaltma yalnızca yaklaşık olarak 250.000 kezdir. Tepkime koşulları değişken olup en yüksek duyarlılık için dikkatlice yönetilmeye ve en verimli hale getirilmeye gereksinim duyar. Bu nedenle en uygun koşullar, aşağıda sıralanmış PZT bileşenlerinde yapılacak düzenlemeler ile sağlanır. Enzim (Taq DNA polimeraz), deoksinükleotid trifosfatlar (dNTPs), magnezyum derişimi, tampon, oligonükleotid (Primer), hedef diziler, ısılar ve döngü sayısı (17, 18).

Polimeraz zincir reaksiyonu 3 aşamadan meydana gelir; DNA zincirlerinin ayrılması primerin hedef diziye yapışması ve sınırları tanımlanmış DNA dizininin sentezlenerek kopyalanmasıdır (17, 18).

2.5.1.1. DNA Zincirlerinin Ayrılması

Çift sarmalın birbirinden ayırılması için gereklidir. Sarmalların birbirinden ayrılamaması PZT'nin başarısızlığının nedenlerinden birisidir. Hedef kalıbın ve/veya PZT ürününün yetersiz ayrıştırılmasıdır. Tam olmayan ayrıştırma DNA zincirlerinin kopmalarına neden olarak ürün verimini azaltır. Taq DNA polimeraz etkinliğinin yarı ömrü 92,5, 95 ve 97 °C'de sırasıyla 2 saatten fazla, 40 dakika ve 5 dakika olması nedeniyle çok yüksek ve/veya çok uzun olan ayrıştırma basamakları enzim etkisinin gereksiz kayıplarına yol açmaktadır (17, 18).

2.5.1.2. Primer Yapışması

Oligonükleotid primerlerinin ayrılmış sarmalların 5' ve 3' uçlarına eşleşerek bağlanması ile çalışarak DNA parçası belirlenir. Primer yapışması için gerekli zamanın uzunluğu, ısı, çoğaltmaya yardımcı olan primerlerin baz içeriğine, uzunluğuna ve derişimine bağlıdır. Taq DNA polimeraz, ısıların sınır aralıkları içinde etkili olduğundan primer uzaması yapışma basamağını da kapsayan düşük ısılarda oluşacaktır. En iyi sonuçlar 55-72 °C arasındaki yapışma ısıları ile alınır. Yapışma ısısının artırılması, yanlış olarak yapışmış primerlere karşı ayırt etme yeteneğini artırır ve primerlerin 3' ucundaki yanlış nükleotidlerin hatalı uzamasını azaltır (17, 18).

2.5.1.3. Primerle Tanımlanan DNA Parçasının Çoğaltılması

Polinükleotid sentezlendiği aşamadır. Uzama zamanı hedef dizinin uzunluğuna, nükleotid içeriğine ve ısıya bağlıdır. Daha fazla uzama zamanları, dNTP'nin çok derişik olduğu erken döngülerde ve ürün derişiminin enzim derişimini aştığı geç döngülerde yararlı olabilmektedir (17, 18).

Temel olarak diğer değişkenlerin en elverişli olduğu koşullarda uygun döngü sayısı, hedef DNA'nın başlangıç derişimlerine bağlı olacaktır. Yaygın hata çok fazla döngü uygulamasıdır. Bu durum özgül olmayan arka plan ürün miktarını ve karmaşıklığını artırabilir, ayrıca ürün verimini de düşürür. Bu yüzden tercih edilen döngü sayısı 20-35 arasında değişir (17, 18).

2.5.2. Oligonükleotidlerin Tasarımı

Primerin 0,1 ile 0,5 µM arasındaki derişimi genellikle en elverişli olanıdır. Daha yüksek primer derişimleri hatalı dizilimlemeye neden olabilmektedir. Ayrıca, özgül olmayan ürünün birikmesi primer-dimer olarak adlandırılan bir kalıptan bağımsız artıkların meydana gelme olasılığını artırabilir. Özgül olmayan ürünler ve primer-dimer artıkları, kendi kendilerine PZT için substrat işlevi görürler. Bu ürünler enzim, dNTP'ler ve primerler için istenilen ürün ile yarışarak bu ürünün daha düşük verimine neden olurlar (17, 18).

Bazı basit kurallar etkili primer tasarımı için yardımcı sağlamaktadır. Belirgin olarak primerler %50-60 G+C bileşimine sahip 18-28 baz uzunluğundaki nükleotidlerdir. Bir primer çiftinin hesaplanmış yapışma ısı dengelenmiş olmalıdır. Bu amaç için pratik olarak A veya T için 2 °C, G veya C için 4 °C'lik hesaplama kullanılabilir. Erime sıcaklığı (T_m) $T_m = 2x(A+T) + 4x(G+C)$ formülüyle de hesaplanabilir. Uygulamaya bağlı olarak T_m 55 °C ile 80 °C arasında istenilir. Primer-dimer artıklarının oluşumuna neden olması ve istenilen ürün verimini azaltılması nedeniyle primer çiftlerinin 3' uçlarındaki eşleşmeden sakınılmalıdır. Ayrıca primerlerin 3' uçlarında C ve G'lerin serbestçe kullanımı (3 ya da daha fazla) G+C'den zengin dizilerde hatalı dizilimler oluşturabilir. Mümkünse

primer dizileri içinde sağdan ve soldan okunduğunda aynı içeriği olan palindromik dizilerden de sakınılmalıdır (17, 18).

2.5.3. Elektroforez

Elektroforez, yüklü moleküllerin (protein, nükleik asit, vs.) elektromanyetik alanda göçüdür. Göç etme oranı elektrik alanın gücü, net yükü, molekül şekli ve büyüklüğü, iyonik güç, pH, akışkanlık ve kullanılan tampon tarafından belirlenir. Elektroforez düzeneği yatay veya dikey olabileceği gibi jeller tüplerde veya cam plakalar arasında olabilir (17, 18).

2.5.4. Poliakrilamid jeller

Elektroforeze tabi tutulacak moleküllerin büyüklüklerine göre agaroz jel, poliakrilamid jel, denatüre poliakrilamid jel, vb.'leri tercih edilir. Di, tri, tetra ve pentanükleotidler için genellikle denatüre poliakrilamid jel kullanılır. Büyük DNA moleküllerinin elektrik alanda hareketi küçük DNA parçalarının hareketine göre daha yavaştır. Poliakrilamid jeller akrilamid ve bisakrilamidin polimerize olmasıyla meydana gelir. Poliakrilamid çapraz bağlayıcı eleman olan metilen grubu tarafından bağlanan 2 akrilamid molekülüdür. Amonyum persülfat ve N, N, N', N'-tetrametiletilediamin'in (TEMED) eklenmesiyle bu polimerizasyon başlatılır. TEMED serbest radikal veren persülfat iyonunun ayrıştırılmasını katalizler. Jelin por genişliği ve fiziksel özellikleri ise polimerizasyonun derecesi ve jeldeki poliakrilamidin oranı tarafından kontrol edilir. Bu da DNA moleküllerinin hareketinde etkilidir. Denatüre poliakrilamid jeller ise jele yüksek düzeyde üre ve formamid eklenmesiyle elde edilir. Bu şekilde DNA denatüre edilerek doğrusal ve tek sarmallı olarak iki ayrı alleli gözlemek imkanı sağlar ve bu sayede elektrik alandaki gerçek uzunluğunun hareketine bakılır (19, 20).

2.5.5. Gümüş Boyama

Elektroforez sonucu elektrik alanda göç eden DNA parçalarını görünür hale getirmek için kullanılan bir yöntemdir. Boyama işlemi gümüş nitratla gerçekleştirilir. Diğer işaretleme yöntemlerinin ve düzeneklerinin pahalı olması, radyoaktif olmaması, nanogram düzeyinde nükleik asitlerin yüksek duyarlılıkla tanımlanması, kolay hazırlanması, istenilen aşamada müdahale edilebilmesi nedeniyle gümüş boyama tercih edilir (21).

3. MATERYAL VE METOD

Bu araştırma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Genetik ve Metabolik Hastalıklar Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Hasta Seçimi

Bu çalışmada Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nın Pediatrik Üroloji polikliniğinde takip ve tedavi edilen 151 çocuk hasta, taş polikliniğinde takip ve tedavisi devam eden 100 hasta ve Üroloji Anabilim Dalı'nın diğer polikliniklerinde tedavi ve takibi süren 100 hasta değerlendirildi.

Pediatrik hastalar ailesel geçişli ürolitiazis açısından değerlendirildi. Birinci derecede yakınlarında (anne, baba, kardeş) taş hastalığı olanlar saptandı. Çocuk hastalar retrospektif olarak metabolik değerlendirilmeye alındı. Olgulardan hiperoksalürik, hipostratürik hastalar seçildi ve hastaların pedigrileri çıkarıldı. Recessif X kromozom (G) ailesi, otozomal dominant (A) ailesi, otozomal ressesif (K_1 ve K_2) ailesi **grup I (n = 20)** olarak saptandı.

Taş polikliniğine baş vuran hastalar değerlendirildi, içlerinden birinci derecede yakınlarında taş hastalığı olmayanlar **grup II (n = 20)** olarak saptandı.

Kendisi ve birinci derecede yakınlarında taş hastalığı olmayan hastalar kontrol grubu olarak saptandı **grup III (n = 20)**.

Çıkarılan pedigrilere göre kan örnekleri 10 ml olarak 0.5 molar EDTA içeren tüplere alındı ve DNA eldesi yapılmaya kadar -20°C de saklandı.

3.2. Kimyasal Maddeler

Akrilamid (Sigma, A-9099), amonyum persülfat (Sigma, A-3678), asetik asit (Carlo Erba, 302011), borik asit (Carlo Erba, 302177), bromofenol mavisi (Merck,

L 516522), di-sodyum hidrojen fosfat (Merck, TA509365), dNTP (Fermentas-GM0651), EDTA (Merck, 1.08421.1000), etanol 96% (Merck), etidiyum bromid (10 mg/ml) (Sigma solüsyon, E-1510), formaldehid 37% (Birpa, 2-28), formamid (Sigma, F-7508), gümüş nitrat (Sigma, S-0139), HCl (Merck, 1.00314.2500), KCl (Carlo Erba, 471177), kloroform (Merck, 1.02431.2500), lauril sulfat (SDS-%10 solüsyon) (Sigma, L-4522) yükleme boyası (Promega, DV4371), marker (Invitrogen, G1741), N,N' metilen bisakrilamide (Sigma, M7256), NaCl (Merck, 1.06400.1000), proteinaz K (Sigma, R 6556), sigma coat (Sigma, SL-2), sodyum dihidrojen fosfat (Merck, K10741145), sodyum hidroksit (Merck, 1.06462.1000), taq- DNA polimeraz (Fermentas, D-2812), tris (Merck, 1.08387.0500), tris-HCl (Sigma, T-3253), üre (Merck, 8487.0500), ksilen siyanol FF (Sigma, X-4126).

3.3. Çözeltiler (22)

10XTBE çözeltisi	Tris Base (108 g) Borik asit (55.0 g) EDTA (Disodyum tuzu) (8.3 g)
Koşturma çözeltisi (1XTBE)	10XTBE (100 ml) Distile H ₂ O (900 ml)
TE çözeltisi (pH=8.0)	Tris-HCl (10 mM) EDTA (1 mM)
EDTA	0,5 M
Tris-HCl	0,5 M
PBS (pH=7.4) (Fosfat Tuz çözeltisi)	NaCl (8g) KCl (0,4g) Na ₂ HPO ₄ (1g) NaH ₂ PO ₄ (0,2g) Distile H ₂ O (1000 ml)

Beyaz Kan Hücrelerini

Parçalama çözeltisi (10X) (pH=7.5)	NaCl (300 mM)
	EDTA (10 mM)
	Tris-HCl (10 mM)

Üreli Parçalayıcı çözelti

Üre	(4,2 g)
Beyaz Kan Hücrelerini Parçalama çözeltisi (10X)	(1 ml)
Distile H ₂ O	(10 ml)

SDS (%20)

20 g SDS
100 ml Distile H ₂ O

Akrilamid (%50)

Akrilamide (118,75 g)
N,N'-methylene bis-akrilamide (6,25 g)
distile H ₂ O (250 ml)

Amonyum Persülfat (%15 W/V)

Amonyum Persülfat (0,150 g)
distile H ₂ O (1 ml)

(Polimerazyondan hemen önce hazırlanır ve kullanılır)

Durdurma çözeltisi (%10 Asetik asit)

Glasiyel Asetik asit (200 ml)
Distile H ₂ O (1800 ml)

Geliştirme çözeltisi

Sodyum Karbonat (60 g)
Formaldehid (%37) (3 ml)
Sodyum Tiyosülfat (400µl)
Distile H ₂ O (2000 ml)

Boyama çözeltisi

Gümüş Nitrat (2 g)
Formaldehid (%37) (3 ml)
Distile H ₂ O (2000 ml)

2X DPAGE Yürütme çözeltisi	Formamide (%95) NaOH (10mM) Bromofenol mavisi (%0,05) Xylene cyanol (%0.05)
Yapıştırma Çözeltisi (Bind Silane)	Etil alkol (%95) (1 ml) Glasiyel Asetik Asit (5 µl) Binding Silane (3 µl)
Sigma Coat (Ayrırma çözeltisi)	1,5 ml

3.4. Denatüre Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Tablo 1: % 6'lık poliakrilamid jel hazırlanması

Solüsyonlar	Miktar
Üre	36 g
Distile H ₂ O	52 ml
10XTBE	10 ml
%50 Akrilamid/bisakrilamid (19:1)	10 ml
Amonyum persülfat (%15)	500 µl
TEMED	70 µl

3.5. Camların Hazırlanması

1 adedi düz ve 1 adedi U şeklinde olan 45cm x 35cm x 4 mm ölçüsünde 2 adet ısıya dayanıklı cam kullanıldı.

3.5.1 Kaygan cam ve jel bağlama camının hazırlanması

- Her defasında aynı yüzeyi kullandığımızdan emin olmak için camlar kalemle işaretlendi. Kaygan cam %95'lik etil alkolle 3 defa silindi. Temizleme işlemi kağıt peçete ile yapıldı.

- 750 µl Sigma Coat pipetle damla damla eşit olarak cam üzerine dağıtıldı ve kağıt peçeteyle yüzey iyice kuru hale gelene kadar silindi, 10 dakika beklendi. İkinci defa 750 µl Sigma Coat pipetle damla damla eşit olarak damlatıldı ve kağıt peçeteyle yüzey iyice kuru hale gelene kadar silindi.
- Diğer camın 10 dak beklenmesi esnasında jel bağlama camı dediğimiz U şeklindeki diğer cam 3 defa %95'lik etil alkol ile silindi. Jel bağlama çözeltisi 1 ml'lik pipet ile cam üzerine eşit dağıtıldı. Temiz kağıt peçete ile kuruyana kadar silindi. Kaygan camın süresi dolana kadar jel bağlama camı da bekletildi.
- Kaygan camın 10 dak'sı dolduğunda iki camda %95'lik etil alkolle 3 defa silindi.
- Kaygan camının üzerine dolgu plastikleri yerleştirildi. Jel bağlama camının temizlenen yüzeyi kaygan camın temizlenen yüzeyi üzerine gelecek şekilde yerleştirildi. Kıskaçlarla tespit edilerek camların altı, sağ ve solu paket bandıyla kapatıldı ve bandın içinde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi.
- Camların işi bittikten sonra tablo 1'de verilen akrilamid-bisakrilamid-üre çözeltisine APS ve TEMED ilave edilerek 50 ml'lik enjektöre çekildi (hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi).
- Sızıntı şeklinde camlar arasına enjekte edildi. Tarak, dişleri yukarı gelecek şekilde camlar arasına yerleştirildi.
- Dört mm inceliğindeki akrilamid jelin oluşumu için (polimerizasyonu) yaklaşık 1 saat beklendi.

Donduğundan emin olduktan sonra alt bant söküldü ve tarak jeli yırtmadan dikkatlice çıkarıldı. Camlar elektroforez düzeneğine yerleştirildi, alt ve üst hazneye 1X TBE buffer konuldu, kuyular bu çözelti ile enjektör yardımıyla temizlendi. Tarak dikkatlice yerleştirildi. Camın ısı 55 °C'ye gelme sırasında PZT sonucu oluşan üründen 7 µl alınarak 3 µl yürütme boyası eklendi ve 94 °C'de 5 dak DNA zincirlerini ayırma işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem bittikten sonra tüpler hemen buz

üzerine alındı, eppendorf pipetle her örnekten 3 µl kuyulara uygulandı. 90 watt'da yürüme boyası jelden çıkana kadar yürütüldü.

3.6. Örneklerin Gümüş Nitrat ile Boyanması

Poliakrilamid jel elektroforezinin bitimine 1 saat kala gümüş nitrat çözeltisi hazırlanarak ışık almaması için koyu renkli bir şişeye konuldu ve karanlık ortamda muhafaza edildi. Daha sonra %10'luk asetik asit çözeltisi hazırlandı. Son olarak sodyum karbonat için 2 L distile su buzdolabına konuldu. Kullanıma kadar bekletildi. Kullanımdan hemen önce sodyum karbonat soğuk 2 L distile suda çözülerek 400 µl (10 mg/ml) tiosülfat ve 3 ml (%40) formaldehit eklendi.

Elektroforezden sonra tanktaki 1XTBE boşaltıldı ve jeli tutan mandallar çıkarıldı. Cam levhalar masa üzerine taşınarak tarak ve yandaki dolgu plastikleri çıkarılıp birbirinden ayrılması sağlandı. Üzerinde jel bulunan cam tablo 2'de verilen aşağıdaki çözeltilerden sırasıyla geçirildi.

Tablo 2: Örneklerin gümüş nitrat ile boyanma aşamaları.

Adım	Çözelti	Zaman
1	Durdurma çöz.	20 dak
2	Distile su	2 dak
3	Adım 2, 2 kez tekrarlanır	2x2 dak
4	Boyama çözeltisi	45 dak
5	Distile su	Daldır-çıkart
6	Geliştirme çöz.	Bantlar açık kahverengi olana kadar (2 dak)
7	Geliştirme çöz.	Bantlar koyu kahverengi olana kadar (2 dak)
8	Deiyonize su	2 dak.
9	Asetik asit	Direkt deiyonize suyun içine boşaltılır (2 dak)
10	Deiyonize su	6 dak

En son olarak jel laminar flowda kurumaya bırakıldı. Cam kurduktan sonra siyah-beyaz film üzerine kontakt baskı ile jel fotoğraflandı. Fotoğraf 1200 dpi çözünürlüğe sahip tarayıcıda taranarak bilgisayara aktarıldı (23, 24, 25).

3.7 : DNA Analizi

3.7.1 : DNA Eldesi

Hastaların bilgisi dahilinde toplanan kan örneklerinden derişik tuz- kloroform ve etanol çökeltme yöntemi ile DNA'lar elde edilmiştir (26).

3.7.2 Osteopontin Genomik DNA Analizi

Osteopontin genine ait primerleri promotor bölgesi ve gen bölgesi (7 ekson) insan 4. kromozomu D14813 gen bank numarası esas alınarak hazırlandı (Tablo 3, 4).

3.7.3 : Elde Edilen Genomik DNA'dan Osteopontin Gen Bölgesinin PZT İle Çoğaltılma Koşulları

Osteopontin geni ve promotor bölgesine ait primerlerin tasarımı (27) numaralı kaynakta bulunan program kullanılarak yapıldı. PTZ şartlarındaki primer yapışma sıcaklığı üretici firmanın öngördüğü değerler esas alınarak yapıldı. Osteopontin promoter ve gen bölgesine ait primerlerin baz dizisi, ürün büyüklüğü, PTZ şartları ve karışımı (Tablo 3-8)'de verilmiştir.

Tablo 3: Osteopontin geni promotor bölgesi primerler listesi, PTZ'nin ürün büyüklüğü, yapışma ısı, uzama zamanı ve PTZ koşulu

primerler	Primer Baz Dizisi	PTZ'nin ürün büyüklüğü (bç)	PZT karışımı ve şartları
Opn P1 Fw	5'-AGA AGT CGG GAA GGA GAC AA-3'	326	TABLO : 7
Rw	5'-CCA TAC GAC CCT TTA CAG GAC-3'		
Opn P2 Fw	5'-GTT CAT CTC AAG ATG GCT GG-3'	347	TABLO : 7
Rw	5'-TTG GAT GTA TTC CAG ATG AAT TG-3'		
Opn P3 Fw	5'-CAT CCA ATT TAA GGG AGA CA-3'	353	TABLO : 7
Rw	5'-GCA GAA TTC AGG GAT AGC AGA-3'		
Opn P4 Fw	5'-AAT ATT CGG ACT TTC CCT GT-3'	349	TABLO : 7
Rw	5'-ATG CAA ATG CTC TGC GTA TC-3'		
Opn P5 Fw	5'-TAC AAT TCG TGA CTG CCT GC-3'	233	TABLO : 7
Rw	5'-CTG ACC TGT GCA ACC TTG G-3'		
Opn P6 Fw	5'-CAC AGG TCA GCA GTG ACA CA-3'	255	TABLO : 7
Rw	5'-TCA GAA AAC TTG CCT CTG TCC-3'		
Opn P7 Fw	5'-AAC TCC TTG CAG GCT TGA AC-3'	317	TABLO : 7
Rw	5'-CCC CTC TGG TTT TGT GGT TA-3'		

Tablo 4 : Osteopontin gen bölgesi primer listesi, PTZ'nin ürün büyüklüğü, yapışma ısısı, uzama zamanı ve PTZ koşulu

Primerler	Primer Baz Dizisi	PTZ'nin Ürün Büyüklüğü(bç)	PTZ Karışımı ve Şartları
Opn P F	5'-TTAACCACAAAACCAGAGGG-3'	164	TABLO : 5
R	5'-CTCTGCCTCCTCCTGCTG-3'		
Opn 1 F	5'-GGAGGGCTTGGTTGTCTAG -3'	129	TABLO : 5
R	5'-CCCAGTAGCAAAGCTG -3'		
Opn 2 F	5'-TGAAGATGTCAGCTATTCCTTTGA-3'	130	TABLO : 6
R	5'-TTTCTTTAAGATGCAACTGTAAGCTCA -3'		
Opn 3 F	5'-GCTTCCATGTGCTAGGAGGA-3'	157	TABLO : 5
R	5'-GCACCTCTCGCCATAATTGA-3'		
Opn 4 F	5'-CCATTCATCCCTACATTTCTTTTT-3'	184	TABLO : 6
R	5'-GGCTATCTTTCATCACTGTAGTTAAT-3'		
Opn 5 F	5'- ACA CGT GCC ATT CCT TCT TC-3'	95	TABLO 5
R	5'- ACA CGT GCC ATT CCT TCT TC-3'		
Opn 6 F	5'- CCC GGC CAT CTT AAT TTT C-3'	370	TABLO : 7
R	5'- CCC GGC CAT CTT AAT TTT C-3'		
Opn 7a F	5'-ATTCTTCATTTGTGCCGTGA-3'	356	TABLO : 7
R	5'-TTTTGGGGTCTACAACCAGC-3'		
Opn 7b F	5'-GCCATGAAGATATGCTGGTTG -3'	285	TABLO : 7
R	5'-TTTCCATGAAGCCACAAACT -3'		
Opn 7c F	5'-TTTAGTTTGTGGCTTCATGG -3'	348	TABLO : 7
R	5'-AAGGTTATGTTTTATTAATTGCTGG -3'		
Opn 7d F	5'-CACGTTGTCCAGCAATTA-3'	354	TABLO : 7
R	5'-GGATGAGGGGAGGTTAGTCA-3'		
Opn 7e F	5'-CCATTGACTAACCTCCCCTC -3'	354	TABLO : 7
R	5'-TCTTCTTTGAGAAATGTCTATTCA-3'		
Opn 7f F	5'-AAAATGGGCACAAATCTGAA-3'	320	TABLO : 7
R	5'-TCAGCAGTGGGATTGCTAAA -3'		

Tablo 5: Opn P, Opn1, Opn 3 ve Opn 5 gen bölgeleri için PTZ karışımı ve şartları

PTZ karışımı		PTZ şartları	
dH ₂ O	35,8 µl		
10XTampon	5,0 µl	94 °C	5 dak.
MgCl ₂	5,0 µl	94 °C	1 dak.
dNTP	1,0 µl	57 °C	30 sn.
Primer ileri (Fw)	1,0µl	72 °C	30 sn.
Primer geri (Rw)	1,0 µl	72 °C	7 dak.
Taq DNA polimeraz	0,2 µl		
Kalıp DNA	1,0 µl		

Tablo 6: Opn 2 ve Opn 4 gen bölgeleri için PTZ karışımı ve şartları

PTZ karışımı		PTZ şartları	
dH ₂ O	36,8 µl		
10XTampon	5,0 µl	94 °C	5 dak.
MgCl ₂	4,0 µl	94 °C	1 dak.
dNTP	1,0 µl	55 °C	30 sn.
Primer ileri (Fw)	1,0µl	72 °C	30 sn.
Primer geri (Rw)	1,0 µl	72 °C	7 dak.
Taq DNA polimeraz	0,2 µl		
Kalıp DNA	1,0 µl		

Tablo 7: Opn P1-7, Opt 6, Opn 7a-f gen bölgeleri için PTZ karışımı ve şartları

PTZ karışımı		PTZ şartları	
dH ₂ O	34,6 µl		
10XTampon	5,0 µl	94 °C	5 dak.
MgCl ₂	5,0 µl	94 °C	1 dak.
dNTP	3,0 µl	57 °C	45 sn.
Primer ileri (Fw)	0,6µl	72 °C	45 sn.
Primer geri (Rw)	0,6 µl	72 °C	7 dak.
Taq DNA polimeraz	0,2 µl		
Kalıp DNA	1,0 µl		

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Grup I'in multiparemetrik incelenmesinde; yaş aralığı 2-624 ay ortalama 256 ay saptandı. Grup I'in 11'i erkek (%55), 9'u kadın (%45) bulundu. Bunların içindeki 11 erkeğin 6'sında (%54.5) ve 9 kadının 5'inde (%55,5) üriner sistem taş hastalığı mevcuttu. Taş hastalığı 11 hastada (%55) müspet saptandı. Taş hastalığı olan 11 hastanın 8'i (%72) pediatrik popülasyondaydı.

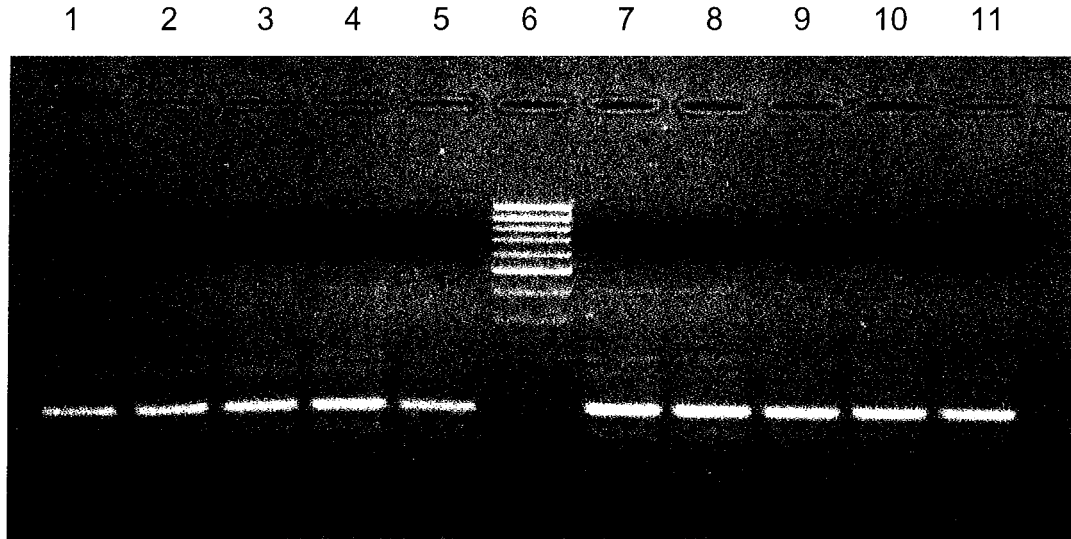
Grup I'de üriner sistem taş hastalığı olanların 4'ü taşlarını spontan olarak düşürdü (%36), 4'ü opere edildi (%36), 3'üne operasyon planlanmadı (%28), spontan olarak taş düşüren hastaların 2'sinde taş hastalığı nüks etti (%50), opere olan hastaların 2'sinde rezidü taşlarda büyüme saptandı (%50). Opere edilen hastaların hiçbirinde üriner sistem taş hastalığının predispozan faktörleri (obstrüksiyon, yabancı cisim, konjenital anomali, üriner fistül, üriner tümör vs.) bulunmadı.

Grup I hastaların metabolik değerlendirilmesinde hiperokzalüri ve hipositratüri saptandı. Bu hastalara okzalattan fakir diyet planlandı ve Ürocid K (K- citrat 30 meq/gün) ile metaflaksiye alındı. Hastaların 1'inde ürocid K tedavisi bağırsaktan emilememeye üzerine sonlandırıldı. Grup II vakalar klinik olarak değerlendirilmeye alınmadı.

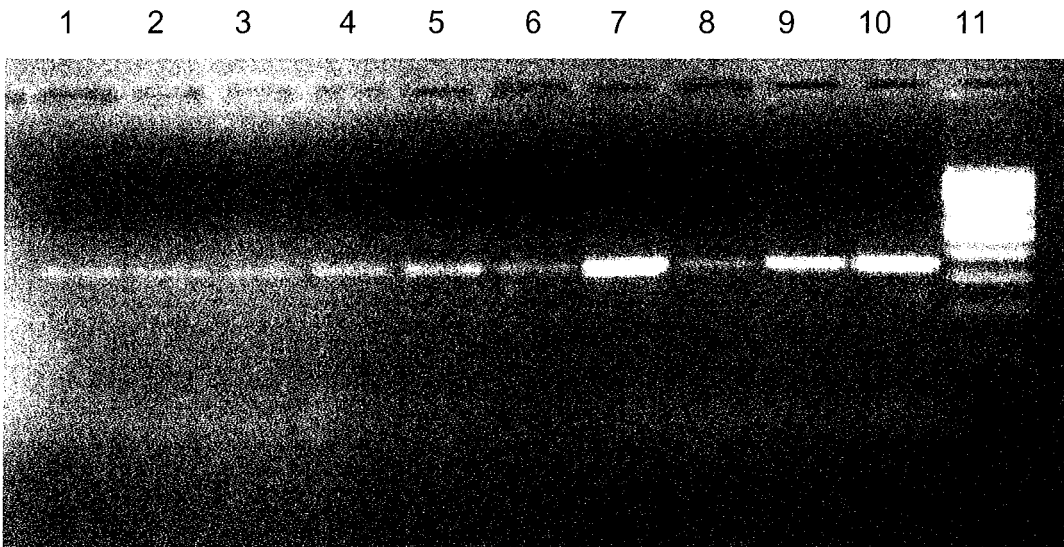
4.2. Osteopontin Gen Bölgesinin DNA Analiz Tasarımı

NCBI (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) gen bankası (GenBank) numarası D14813 olan nükleotid dizi verisi ekrana çıkarıldı, üzerine osteopontin geni cDNA'sı renkli olarak üst üste getirilerek osteopontin geninin promotor, ekson ve intron bölgeleri belirlendi. Bu web sayfasında belirtilen tek mutasyon yerleride işaretlendi. Bu yapı dikkate alınarak promotor ve ekson bölgelerinde analiz edilecek yerler belirlendi. analiz edilecek yerlerin 5' ve 3' uçlarından takriben 20-25 nükleotidlik bölgeler belirlenerek primerler tanımlandı (Tablo 3 ve Tablo 4).

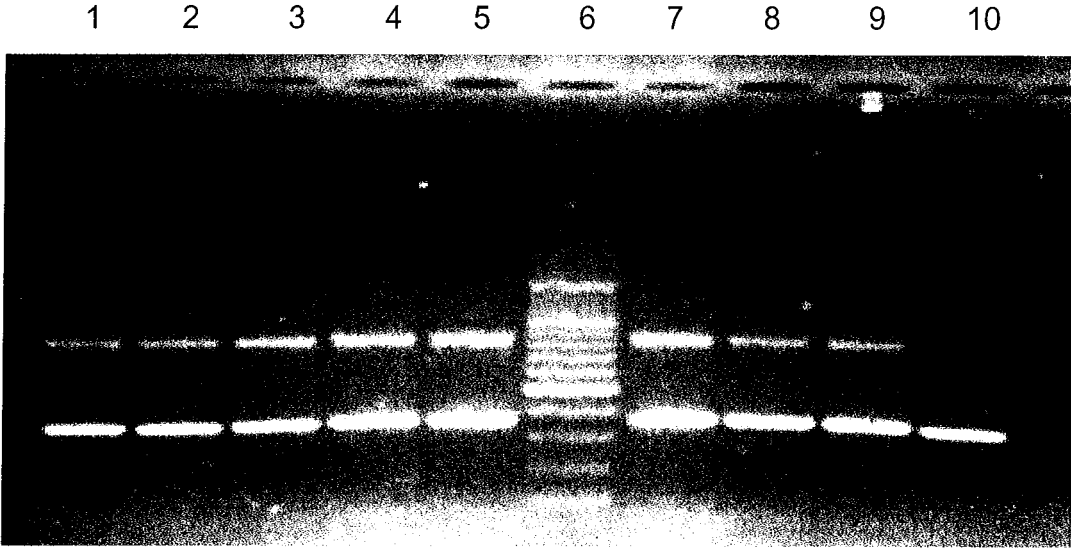
Bu primerlerin ve tanımladıkları ekson bölgelerinin kabaca Guanin, Sitozin içerikleri dikkate alınarak primerlerin erime sıcaklıkları tayin edildi. Bu erime sıcaklıkları temel alınarak PZT çalışma koşullarını ortaya koyabilmek için çeşitli PZT koşulları tasarlanarak denendi (Şekil 1, 2, 3).



Şekil 1 : Osteopontin 5. ekson PZT şartlarının optimizasyonu için yapılan aşamalı PZT çalışması (53,1-56,9°C arası).

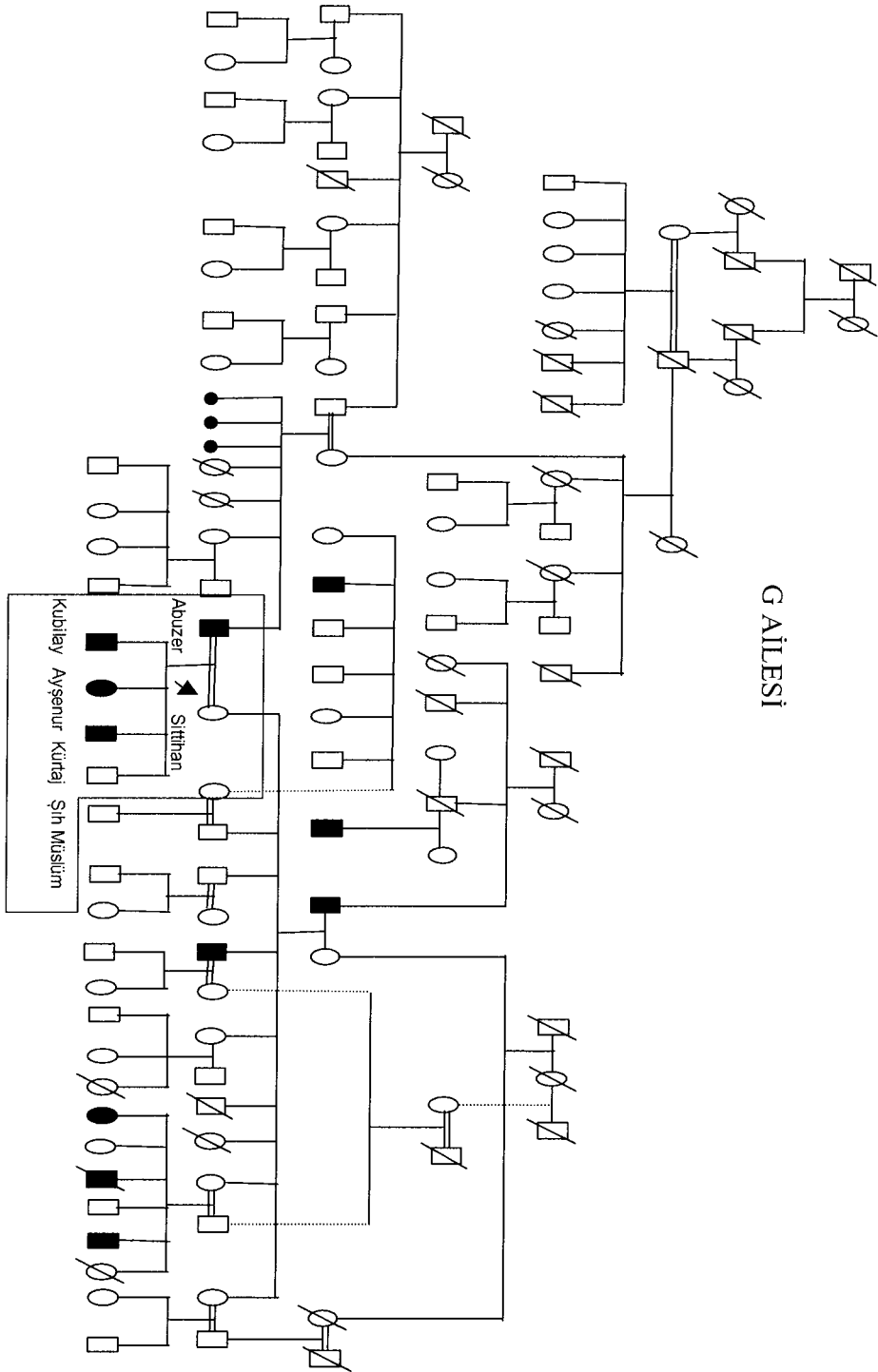


Şekil 2 : Osteopontin 6. ekson PZT şartlarının optimizasyonu için yapılan gradiyent çalışması (53,1-57,0°C arası).

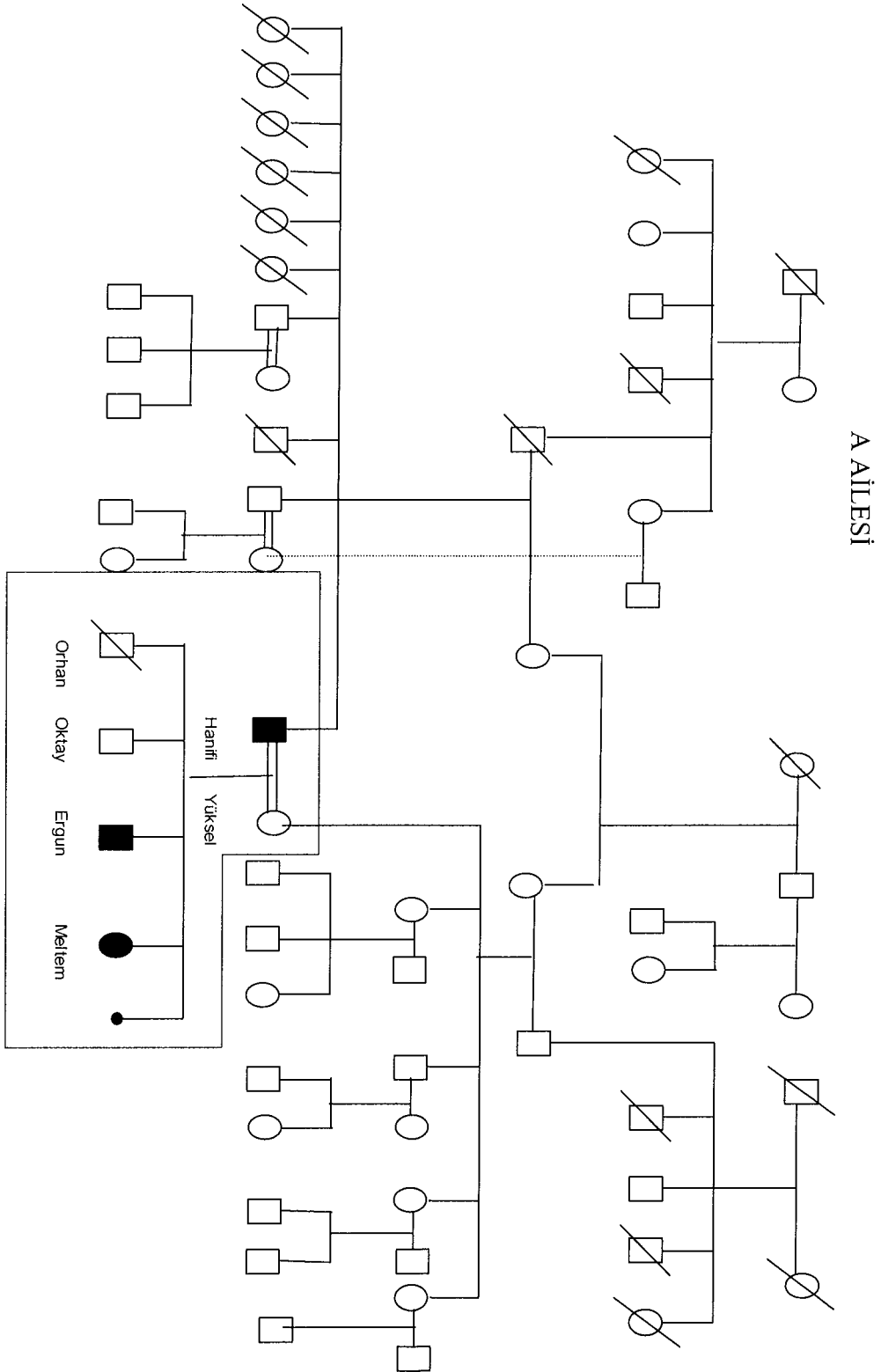


Şekil 3 : Osteopontin 7a. ekson PZT şartlarının optimizasyonu için yapılan aşamalı PZT çalışması (52,1-56,9°C arası). 11 numaralı örnek 56,9 °C.

Ailesel geçiş gösteren taş hastarında G ve A çekirdek ailelerinde akraba evliliği saptandı. Akraba evlilikleri G ailesinde diğer ailelere nazaran daha yaygın bulundu (Şekil 4, 5, 6).

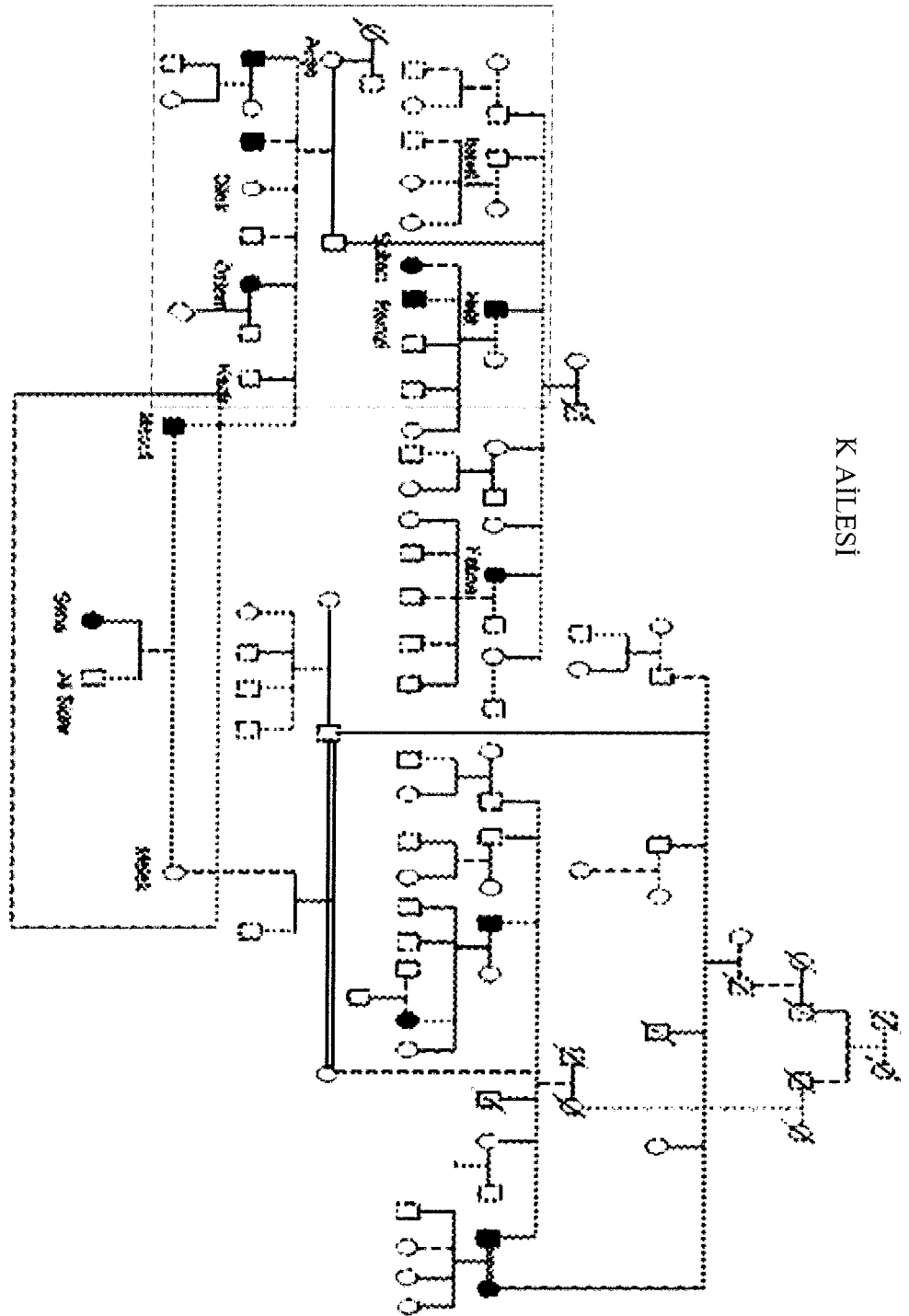


Şekil 4 : G ailesi pedigrisi



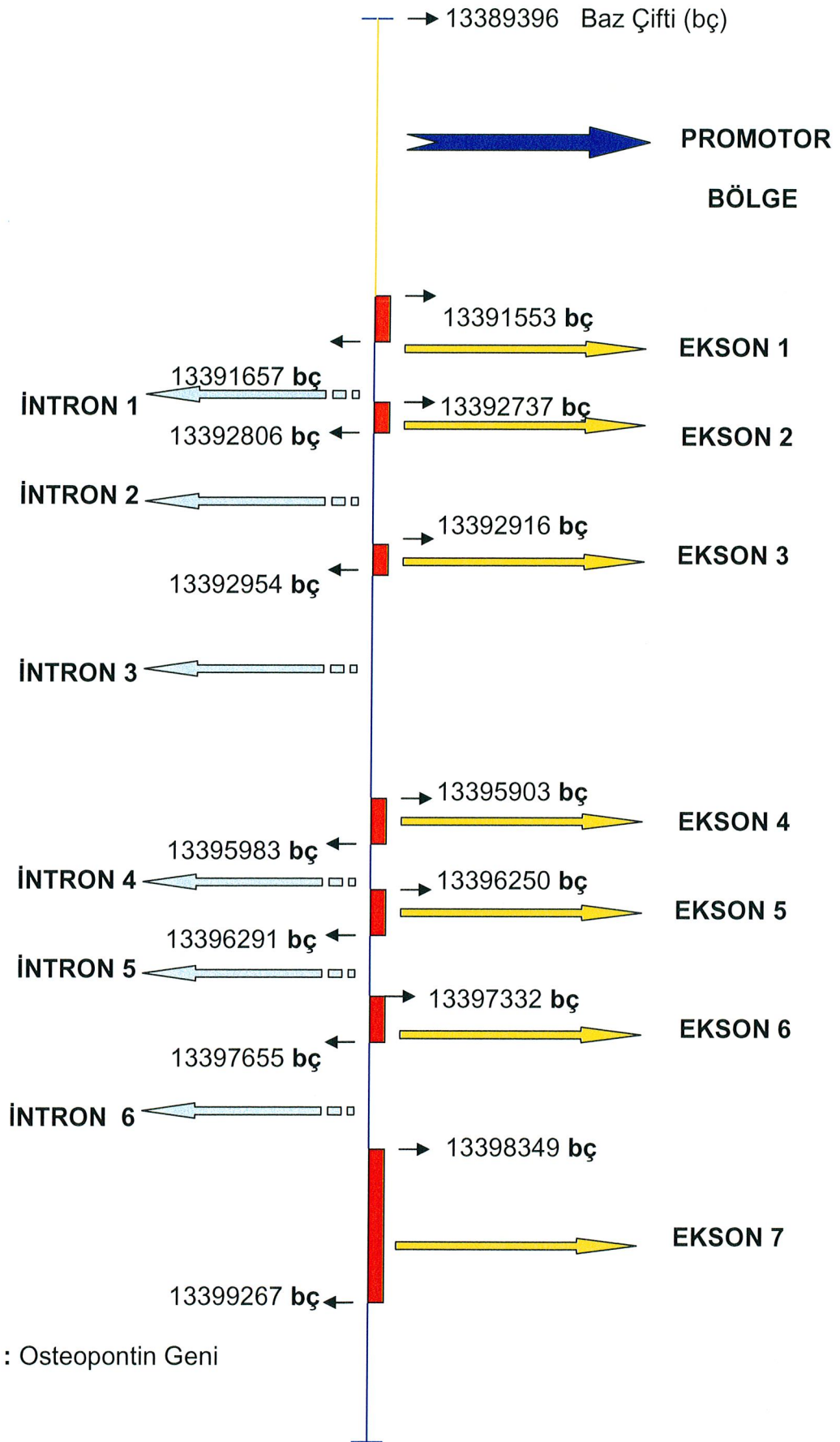
Şekil 5 : A ailesi pedigrisi

K AİLESİ



Şekil 6 : K ailesinin pedigrisi

Osteopontin gen bölgesi çok uzun bir promotor (2157 baz çifti) ve 7 eksondan oluşmuş 9871 baz çifti uzunluğunda olan bir gendir (Şekil 7). Promotor bölgeside dahil olmak üzere bütün ekson bölgeleri muhtemel mutasyon için tarandı. Beklenen mutasyonlar ailesel geçiş gösteren hastaların ressesif X kromozom geçişli ve otozomal ressesif karakterli olması sebebiyle osteopontin bölgesinde farklı mutasyonların olabileceği beklenildi.



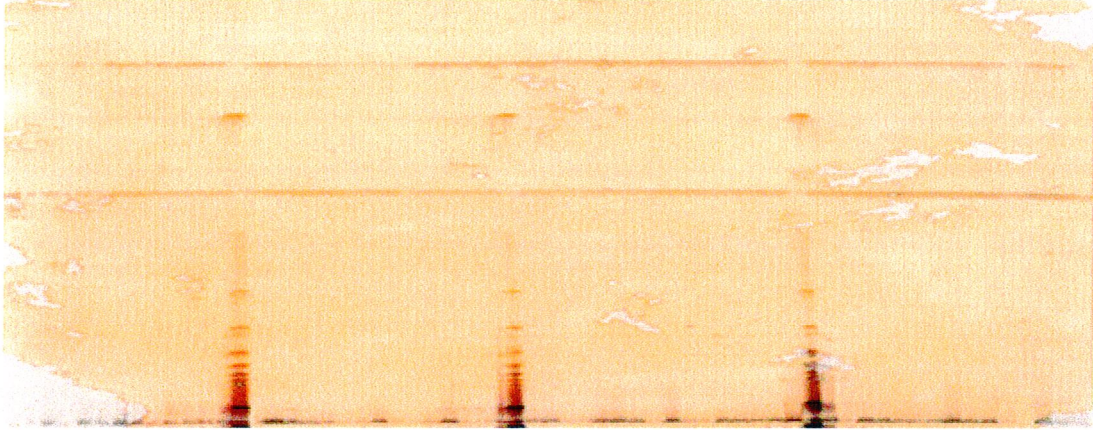
Şekil 7 : Osteopontin Geni

Ekson I ve Ekson IV gen bölgelerinin mutasyon taramaları örnek olarak gösterilmiştir. Yedi ekson ve promotor bölgesinde göze çarpan bir mutasyon görülmemiştir (Şekil 8, 9). Yalnız 184 baz çifti uzunluğundaki ekson IV'de ailesel geçiş göstermeyen sporadik taş hastalarında homozigozite gözlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8 : Osteopontin ekson IV için yapılan PZT'nin poliakrilamid denatüre jel elektroforezi

*: Oklar homosigozisi işaretlemektedir.



Şekil 9 : Osteopontin ekson I için yapılan PZT'nin poliakrilamid denatüre jel elektroforezi.

5. TARTIŞMA

Üriner sistem taş hastalığı varlığı binlerce yıldır bilinen, hayatın her döneminde oluşabilen, tek bir nedene bağlı olmayan, kompleks ve birbiri ile ilişkili birçok faktörün beraberce meydana getirdiği olaylar dizisidir. Üroloji pratiğinde sık karşılaşılan bu hastalıkta taş oluşum mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamışken mevcut çok iyi uygulanan cerrahi tedaviler ile sonuca yönelik yaklaşım uygulanmaktadır.

Hiperokzalüri idiyopatik taş hastalığı oluşumunda en önemli risk faktörüdür. Daha önce bu konuda yapılmış deneysel çalışmalarda renal tubüler epiteliyal hücreler ile kalsiyum-okzalat kristallerinin ya da tek başına okzalat iyonunun etkileşimi ile renal tubüler hücrelerde hasar oluşturulduğu bulunmuş ve taş hastalığının oluşumunda kritik rol oynadığı gösterilmiştir (4, 12, 28, 29).

Osteopontin aside hidrofilik yapıda yaklaşık 300 aminoasit içeren negatif (-) yüklü proteindir. Molekül ağırlığı 44–80 kDa dur. Osteopontin çok yönlü işlevi olan bir protein olup genellikle kemiklerde daha yaygın olarak bulunmakla birlikte makrofaj, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve epitel hücrelerinde de sentezlenir. Osteopontin organizmada bir çok fizyolojik ve fizyopatolojik durumda görev alan düzenleyici bir gendir (15).

Osteopontin; kolejen sentezini artırarak yara iyileşmesini hızlandırır, epiteliyal tümörlerin malign potansiyelini azaltır, anti-inflamatuar ve travma sonrası programlanmış hücre ölümünü azaltıcı fonksiyonu vardır (15).

Osteopontin kemik, dentin, otolitiyazis gibi fizyolojik kalsifikasyonlarda veya kanser hücreleri kalsifikasyonu, böbrek taşları ve arteriyosklerozis gibi patolojik kalsifikasyonlarda önemli rol oynayan bir moleküldür (30).

Günümüzde kalsiyum taşı oluşumunu engelleyen nefrokalsin, kristal matriks proteini, bikunin ve tamm-horsfall proteini gibi inhibitörler tanımlanmıştır (15).

Osteopontin esas olarak üriner sistemde taş oluşumunu engelleyici bir göreve sahiptir. Bunu da kalsiyum tuzlarının üriner sistemde kristalizasyonunu engelleyerek yaptığı bildirilmiştir. Osteopontin böbreklerde sentez edildikten sonra henle kulpu, distal tubüller ve papiller epitelyumundan idrara sekrete edilir. Osteopontin kalsiyum nükleasyonu, agregasyonu ve kalsiyum okzalat kristalizasyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca kalsiyum okzalat kristalleri üzerine bağlanarak doğrudan etki ile çözünmesini sağlayan osteopontin, kalsiyum okzalat kristalizasyonunda özellikle dihidrat fazını inhibe eder ki bunlar monohidratlara göre renal tubüllere daha fazla adherens gösterirler (15).

Hücreler osteopontine çoklu integrin alıcı proteinler yoluyla bağlanır bunlar vitronektin alıcı proteinleri ($\alpha_v\beta_3$) ve çeşitli β_1 , β_5 integrinleridir (15).

Osteopontinin integrinlere bağlanması arginin-gilisin-asparagin dizisine (RGD) bağımlı bağlantı veya RGD'den bağımsız yolla serin-valin-valin-tirozins-glisin-lösin-arjinin lineer sentetik peptit (SVVYGLR) yoluyla bağlanabilir. Opn. standart CD 44 proteinlerine bağlanmazlar fakat çeşitli CD 44 izoformlarına bağlanabilirler (15, 31).

Osteopontin gen ifadesinin düzenlenmesi tam olarak anlaşılacakla birlikte; osteopontinin promotor bölgesi pürin zengin diziler, ets – benzeri diziler, glukokortikoid ve vitamin D'ye hassas elementler ve interferon uyaran elementleri içerir. İnflamasyon öncesi ilgili sitokinler osteopontin gen transkripsiyonunu ve ifadesini uyarırlar. Makrofajların lipopolisakkarid ve nitrik oksit ile uyarılması opn gen ifadesini ve opn protein salınımını tetikler. İnflamasyonun akut faz reaktanları $TNF\alpha$ ve interlökin 1β gibi ara metabolitler opn gen ifadesini güçlü bir şekilde desteklerler. Hipoksi ve hiperglisemi ile anjiotensin II, transforming büyüme faktörü β (tGF β) osteopontin gen ifadesini düzenlerler (15).

Osteopontin aspartik asitçe zengin protein süper ailesine mensup olup, özel RGD yüzeyel kalsiyum kristali bağlanma dizisine sahip bir moleküldür. Osteopontin'in aspartik asitçe zengin olması kalsiyum bağlanmasındaki ve dolayısı ile kalsiyum-okzalit taş oluşumunda ki görevini açıklar. Bu yüzden osteopontin taş ve kristallerin yapıları içerisinde bulunur. Kimilerine göre taş oluşturulan sıçanlarda Opn mRNA'nın artması doğrudan doğruya taş oluşumu ile ilgilidir. Bu görüşü destekleyen çalışmalardan birisi de kalsiyum okzalit kristallerinin Madin-Darby canine kidney (MDCK) hücrelerine bağlanmasını Opn'in hızlandırmış olmasıdır. Diğerlerine göre de Opn'nin in-vitro koşullarda kalsiyum okzalit kristallerinin oluşumu, yığılması ve büyümesi üzerinde önleyici etkisi olmasıdır. Bu durumda böbrek taşı oluşumunda osteopontinin önleyicisi yoksa tetikleyicisi olduğu sorusu ortaya çıkmaktadır. Üriner taşların oluşumu renal tübüler hücrelerinde osteopontinin kalsiyum-okzalit kristallerine bağlanması, kristal yığılmasını yoksa çözünürlüğünü artırdığı sorusuna Konya ve arkadaşları (32) yeni bir deneysel yaklaşımla çözüm aramışlardır. Bunun için Opn'li ve Opn'siz kollejen granülleri üzerinde taş kristallerinin oluşumunu incelemişlerdir. Sonuç olarak; osteopontinli kollejen granülleri üzerinde kristal nüvelerinin bağlanması ve yığılmasının arttığını saptayarak osteopontinin kalsiyum-okzalit kristalizasyonunu artırdığı sonucuna varmışlardır. Bunun yanı sıra RGD dizilerine sahip olan fibronektin, Tamm-Horsfall glikoproteinleri, vitronektin ve laminin ile hazırlanmış kollejen granüllerinde kalsiyum-okzalit kristalizasyonunun gelişmediğini saptamışlardır (30-36).

Osteopontinin kalsiyum okzalit kristalizasyonunu uyardığını izah etmek için oluşturulan deneysel çalışmada allopürinol tedavisi uygulanmış ve bu grupta kristalizasyonun azalması saptamış ve osteopontin mRNA ekspresyonunun azalması ile birlikteliğini gösterilerek allopürinolün osteopontin üzerinden kristalizasyonu önlediği sonuna varmışlardır (37).

Lieske ve ark (38). benzer bir çalışmada MDCK epitel hücrelerini kalsiyum okzalit monohidrat ile muamele etmiş ve osteopontin mRNA ekspresyonunun arttığını bulmuş fakat aynı artışın 3T3 fibroblast kültürlerinde saptayamamışlardır. Lieske ve ark. bu deney sonuçlarından osteopontin glikoproteininin artması ile

kristallerin renal tubüli hücrelerine bağlanmasını önlediğini ve / veya yüksek kristalüri ile birlikte artan osteopontin mRNA ekspresyonunun renal intersitisyel fibrozisi oluşturacağı iddasında bulunmuşlardır (38).

Bunun yanında osteopontin mRNA ekspresyonu renal taşların oluşumu ile ilişkili olduğu pek çok çalışmalarda gösterilmiş fakat osteopontin molekülünün artışının taş oluşumunu önlediği veya uyardığı konusunda ki yorumlar tartışmalıdır (39, 40).

Çeşitli yeni moleküler biyolojik metod ve teknolojilerin hızlı gelişimi ve uygulanabilirliği klinisyenlere pek çok hastalıkların teşhisi, etiyojisi ve tedavinin seyri hakkında daha doğru yaklaşımlar sunmaktadır.

Osteopontin proteininin kalsiyum metabolizmasında ki bilinen düzenleyici rolü sebebi ile genotip-fenotip (üriner sistem taş hastalığı) arasındaki ilişkiyi ortaya koyacağı düşünülerek çalışma planlandı. Bu çalışmada yaygın üriner sistem taş hastalığının sebebi moleküler yöntemler ile ortaya konulmaya çalışıldı. Deneysel in-vivo hayvan ve hücresele in-vitro modeller yerine doğrudan doğruya ailesel geçişli ve geçişsiz üriner sistem taş hastalarından alınan kan örneklerinden elde edilen DNA'larda osteopontin gen bölgesi (Şekil 7) esas alınarak primer tasarımı hazırlandı (Tablo 3, 4) ve mutasyon taraması DNA analizi bu tablolara göre yapıldı. Klasik yöntemlere nazaran PZT'ye dayalı analiz metodlarının basit, duyarlı, özgün, hızlı ve uygulanabilirliğinin kolay olması sebebiyle klinik teşhis ve yorumlar için kullanıldı.

Osteopontin gen bölgesinin promotor bölgesi 2157 bç uzunluğu ile bilinen pek çok genden farklı olarak çok büyüktür (şekil 7). Promotor bölgesi genin ifadesinde yani proteinin yapısında yer almamaktadır. Bunun yanında promotor bölge, genlerin düzenleyici bölgesi olması sebebiyle gen bölgesi kadar önemlidir. Bu kadar uzun promotor bölgesinin önemi osteopontin mRNA'sının sentezinin ne kadar hassas olarak düzenlendiğini gösterir. Osteopontin proteini kalsiyum metabolizmasının girdiği pek çok gelişme ve büyüme ile ilgili fizyolojik ve fizyopatolojik durumlarda önemli role sahiptir. Bu yüzden osteopontin promotor ve gen bölgeleri ayrı ayrı analiz edilmiştir.

Promotor bölgesinin primer tasarımı ile 7 ayrı bölge PZT ile çoğaltılarak mutasyon taraması yapıldı. Bu bölgelerin hiç birisinde kullanılan yöntemle kontrollere göre hasta gruplarında ekleme veya çıkarma tipi bir mutasyona rastlanmadığı gibi transversiyonel tip (pürin→primidin, primidin→pürin) mutasyonlar da görülmedi.

Osteopontin gen bölgesi 7 ekson ve 6 introndan ibaret 7714 bp uzunluğundadır. Osteopontin gen promotor bölgesinin çok uzun olmasına karşın gen bölgesi bilinen pek çok genden çok kısadır. Osteopontin gen bölgesinin 7 eksonu üzerinde tanımlanan primerlere göre mutasyon taramaları yapıldı. Bu taramalar sonunda kontrol grubuna göre hasta gruplarında ekleme veya çıkarma tipi bir mutasyona rastlanmadığı gibi transversiyonel tip (pürin→primidin, primidin→pürin) mutasyonlar da görülmedi.

Bu çalışma literatür bilgilerimize göre ilk çalışma olmakla birlikte, osteopontinin analiz edilen gen bölgeleri mutasyona karşı çok dirençli bir gen olarak görülmektedir. Japon multipl skleroz hastaları üzerinde yapılan osteopontin polimorfizm çalışmasında 3 bölgede polimorfizm bulunmuştur. Bunlardan ilk olan 8090 (ekson 6) bölgesindeki C/C, C/T, T/T polimorfizmleridir ve bunlar arasında en yaygın olanı C/C tipi polimorfizmdir (%77.6). İkinci polimorfizm 9250 (ekson 7) bölgesinde C/C, C/T, T/T polimorfizmleridir ve bunlar arasında C/T ve T/T tipi polimorfizmleri daha yaygın olup sırasıyla %41.3 ve %39.6'dır. Üçüncü tip polimorfizm 9583 (ekson 7) bölgesinde G/G, G/A, A/A polimorfizmleridir ve bunlar arasında G/A ve A/A tipi polimorfizmleri daha yaygın olup sırasıyla %51.7 ve %34.5'dir (41).

Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) insan osteopontin gen promotor bölgesinde mutasyonların bulunmadığı ve Opn gen bölgesinde mevcut transizyonel tip mutasyonları farklı eksonlarda göstermektedir.

Bu alışmalar osteopontin gen bölgesindeki mutasyonların transizyonel tip (pürin→pürin, primidin→pirimidin) mutasyonlar olduğunu dolayısıyla üriner sistem taş hastalarında olası mutasyonları bulamayışımızı, var ise mutasyonların transizyonel tip olabileceğini desteklemektedir. Kullandığımız analiz metodu da transizyonel tip mutasyonlar için seçici değildir.

6. SONUÇ

Üriner sistem taş hastalarını klinik olarak gözlemlediğimizde; her hangi bir predispozan faktöre sahip olan veya olmayan (darlık, obstrüksiyon, yabancı cisim vs.) hastalarda metabolik bozukluklar mevcutken veya değilken (hiperokzalüri, hipostratüri vs.) cerrahi ve medikal tedavi sonrası taştan yoksun hale gelenlerde veya rezidü küçük taşı kalanlarda taş hastalığının tekrar ortaya çıktığını veya rezidü taşın büyüme gösterdiğini saptadık.

Üriner sistem taş hastalığının oluşumunda bikünin, nefrokalsin, kristal matriks proteini ve Tamm-Horsfall proteini gibi inhibitör ajanlar bilinmektedir.

Organizmadaki fizyolojik veya fizyopatolojik durumlarda düzenleyici görevi olan osteopontin taş oluşumunda da önleyici olabildiği gibi taşın parçasıda olmaktadır

Kristalüri veya hiperokzalürinin renal tübülilerde hasar oluşturması ile organizmada osteopontin geni uyarılmakta ve mRNA sentezi artarak osteopontin proteini eksprese olmaktadır. Osteopontin proteininin miktarı uyarının şiddet ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Osteopontin proteini kalsiyum okzalat kristallerine bağlanır ve çözünürlüğünü artırırken renal tübülü yüzeylerini örterek kristallerin tübülilere tutulumunu engeller. Yüksek osteopontin protein ekspresyonunda ise kalsiyum okzalat kristallerine bağlanması yüksek olmakta ve taş oluşumunda matriks görevi görmektedir..

Önceki çalışmalarda in-vitro hücre kültürü ve in-vivo deney hayvan modellerinde osteopontin proteininin taş hastalığının oluşum mekanizmasındaki düzenleyici rolü araştırılmıştır.

Bu çalışmada da taş hastalığı ile ilgili cerrahi tedavi geçirmiş, metabolik tedavisi düzenlenmiş ve buna rağmen üriner sistem taş hastalığı nüks etmiş veya büyüme göstermiş ailesel geçiş gösteren hastaları değerlendirilerek ailesel geçiş gösteren taş hastalarında osteopontin geninin promotor ve gen bölgelerinde olabilecek mutasyonlar araştırıldı.

Kullandığımız mutasyon analiz yöntemi ile transversiyonel, ekleme ve çıkartma tipi mutasyonların olmadığı bulunmuştur.

Taş hastalığının fizyopatolojisinde osteopontin protein ekspresyonunun rolü halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bu arada osteopontin gen polimorfik yapısının taş hastalarında olma sıklığı ile bir ilişkisi olup olmadığının ortaya konulması fenotipin aydınlanmasında klinik olarak önemli olacaktır. Daha farklı yöntemler kullanılarak fenotipin (taş hastalığı) moleküler genetik temellerinin araştırılması osteopontin protein ekspresyonunun fizyopatolojik durumdaki rolünü aydınlatacaktır.

7. ÖZET

Üriner sistem taş hastalığı etiyolojisi halen tam olarak ortaya konulamamış bir patolojidir. Üriner sistemde taş oluşumunu engelleyen organik, inorganik inhibitör ajanlar bilinmektedir.

Bu çalışmada ailesel geçiş gösteren üriner sistem taş hastalarında osteopontin gen ifadesini etkileyen bir mutasyon bulunup bulunmadığını araştırmayı uygun bulduk.

Ailesel geçiş gösteren taş hastalığı olan (grup I, n= 20), kendisinde taş hastalığı olup ailesinde olmayan (grup II, n= 20) ve kendisi ve ailesinde taş hastalığı olmayan bireylerden (grup III, n= 20) kan örnekleri alındı. Toplanan örneklerden osteopontin geni izole edilip mutasyon olup olmadığı araştırıldı.

Yaygın olarak üroloji pratiğinde karşılaştığımız üriner sistem taş hastalığının etiopatoloji için insanda yapılan, moleküler düzeydeki bu analizde; ekleme, çıkarma ve transversiyonel tip mutasyon saptanmadı. Uygulanan teknik itibarı ile muhtemel transizyonel tip mutasyon değerlendirilemedi.

Üriner sistem taş hastalığında osteopontin gen ifadesinin yerinin tam olarak anlaşılabilmesi için moleküler ve klinik yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir.

8. SUMMARY

The exact etiology of urinary system stone disease remained unclarified for along period of time. Although there are well known organic and inorganic inhibitory agents to prevent stone growth and/or recurrence; the clear interactions between risk and inhibitory factors are still to be outlined..

In this present prospective study we aimed to study a possible mutation in the osteopontin gene expression for familial stone disease.

Patients included into the study group have been divided into three groups. **Group I** : Patients suffering from stone disease and at least one of the family members demonstrated stone disease. **Group II** : Patients suffering from stone disease without any family anamnesis. **Group III** : Patients with no evidence and anamnesis of stone disease with no affected family members. Osteopontin gene mutation has been studied in all blood samples obtained from three group patients.

Although osteopontin has been shown to have a close relationship as well as inhibitory effect on stone disease; our results did not reveal any mutation like duplication, deletion and transversional type in osteopontin gene expression. We couldn't detect any transversional type mutation due insufficiency of our technique.

However, we believe that further molecular and clinical studies with other certain parameters are certainly needed to clarify the exact role of osteopontin gene expression in urinary stone disease .

9 KAYNAKLAR

- 1- Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1. Baskı), Güneş kitapevi, Ankara 1998: 561-604
- 2- Tanagho E, Mc Anindo J. Smith's General Urology, (14^{ed.}), London. Prentice-Hall International Inc., 1995: 276-305
- 3- Walsh P, Retik A, Vaughan D, Wein A. Campbell's urology (7^{ed.}), Philadelphia, WB. Saunders Com. 1985: 528-560
- 4- Khan S, Hackett LR. Hyperoxaluria, Enzymuria and Nephrolithiasis. J Kidney 1993; 101: 190-193
- 5- Katsuma S, Shiojima S, Hirasawa A, Takagari K, Kaminishi Y, Koba M et al. Global analysis of differentially expressed genes during progression of calcium oxalate nephrolithiasis. Biochem, Biophys Res. Commun 2002; 296: 544-552
- 6- Dere F. Anatomi Ders Kitabı (2. Baskı), Okullar Pazarı Kitapevi, Ankara 1990: 655-656
- 7- Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1. Baskı), Güneş kitapevi, Ankara 1998: 3-10
- 8- Tanagho E, Mc Anindo J. Smith's General Urology, (14^{ed.}), London. Prentice-Hall International Inc., 1995. 3-4
- 9- Walsh P, Retik A, Vaughan D, Wein A. Campbell's urology (7^{ed.}), Philadelphia, WB. Saunders Com. 1985: 49-69

- 10- Anafarta K, Göğüş O, Bedük Y, Arıkan N. Temel Üroloji, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi (1. Baskı), Güneş kitapevi, Ankara 1998: 39-54
- 11- Guyton A. Textbook of Medical physiology (7^{ed.}), WB Saunders Com., London 1986: 569-590
- 12- Erturhan MS: Hayvan modelinde, hiperokzalüriye bağlı gelişen renal tubüler hücre apoptozisi üzerine değişik antioksidan ajanların etkileri. Uzmanlık tezi, Gaziantep Üniv. Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı 2003, 6-15
- 13- Jenkins AD. Adult and Pediatric Urology (3^{ed.}), St. Lois Mosley Year Book, New York 1996: 461-505
- 14- Cotran S, Kumar V, Collins T. Obstructive Uropaty, pathology basis of Disease (6^{ed.}), Philadelphia, WB. Saunders Com. 1998: 988-989
- 15- Mazzali M, Kıpır T, Ophascharoensuk V, Wesson J, Johnson R, Hughes J. Osteopontin-a molecule for all seasons. QJ Med 2002; 95: 3-13
- 16- Khan S, Johnson J, Peck BA, Cornellijs GJ, Glenton AP. Expression of osteopontin in rat kidneys: Induction During ethylene glycol inducate calcium oxalate nephrolithiasis. J Urol 2002; 168: 1173-1181
- 17- Taylor GR. Polymerase chain reaction; Basic principles and automation. In; PCR A Practical approach (Pherson MJ, Qureke P, Taylor GR ed) IRL Press Oxford, 1991; 1-14
- 18- Old RW, Primrose SB, Principles of gene manuplation. An introduction to genetic engineering (5^{ed.}), New York 1994: 378-383
- 19- Research genetics. <http://www.resgen.com>. 13/02/2003
- 20- Electrophoretic separation of DNA molecules. <http://www.sicience.kennesaw.edu/~mascati/bio/4445/electrophoresisbkgnd.htm> 13/02/2003

- 21- Robertson JM. Evaluation of native and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis for short tandem repeat analysis. *Adv Forensic Haemogenet*, 1994; 5: 320-322
- 22- Sambrook J, Russel DV. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. (3^{ed.}), bank CSHL Press 2001; appendix: 1217-1530
- 23- Lins AM, Sprecher CJ, Puers C, Schumm JW. Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci silver stain and fluorescence detection. *Bio Techniques* 1996; 20: 882-889
- 24- Geneprint STR systems (silver stain detection) custom protocol PROMEGA
- 25- Arslan A. Bilinmeyen gen bölgelerinin mikrosatellit polimorfizm analizleriyle tanımlanması. 7. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi özet kitabı, 2001; 26-29
- 26- Yıkılmaz M. P53 geni polimorfizminin çeşitli kanser tiplerinin olma sıklığı ile ilişkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimler Enstitüsü, Gaziantep Üniversitesi. 2002:39
- 27- <http://workbench.sdsc.edu/> 13/02/2003
- 28- Khan S. Pathogenesis of oxalate urolithiasis; Lessons from experimental studies with rats. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 389-401
- 29- Tiselius Hg, Larsson L, Helgren E, Allison K. Clinical results of allopurinol treatment in prevention of calcium oxalate stone formation. *J Urol* 1986; 136: 50-53
- 30- Takemoto M, Yakote K, Nishimura M, Shigematsu T, Hasegawa T, Kon S. et al. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 664-668
- 31- Yokosaki Y, Matsuura N, Sasaki T, Murakami I, Schreider H, Higashiyama S. et al. The integrin $\alpha_9 \beta_1$ Binds to a novel recognition sequens(SVVGLR) in the trombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin. *J Biol Chem* 1999; 274: 36328-36334

- 32- Konya E, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *Eur Urol* 2003; 294: 1-8
- 33- Yakamate T, Umekawa T, Amasaki N, Ishikawa Y, Iguchi M, Kohri K. et al. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to MDCK cells. *Eur Urol* 1996; 30: 388-393
- 34- Yakamate T, Umekawa T, Iguchi M, Kohri K, Kurita T. Osteopontin antisense oligonucleotide inhibits adhesion of calcium oxalate crystals in MDCK cells. *J Urol* 1998; 160: 1506-1512
- 35- Hayer JR, Otvos JrL, Urge L. Osteopontin in urinary stone formation. *Ann NY Acad Sci* 2001; 97: 257-265
- 36- Umekawa T. Structural characteristics of osteopontin for calcium oxalate crystal. *Jpn J Urol* 1999; 90: 436-444
- 37- Yasui T, Sato M, Fujita K, Ito Y, Nomura S, Kohri K. Effects of allopurinol on renal stone formation and osteopontin expression in rat urolithiasis model. *Nefron* 2001; 87: 170-176
- 38- Lieske JC, Hammes MS, Hoyer JR, Toback FG. Renal cell osteopontin production is stimulated by calcium oxalate monohydrate crystals. *Kidney Int* 1997; 51: 679-686
- 39- Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Eksperssion, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001; 60: 1645-1657
- 40- Wesson JA, Johnson RJ, Mazzali M, Beshensky AM, Stietz S, Giachelli C. et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 139-147
- 41- Masaaki N, Seiji K, Toshiyuku F, Ichiro Y , Kunio T. Genetic polymorphism of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 2003; 136: 125-129