



T.C.
YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

*HİPEROKSALÜRİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA BÖBREK
DOKUSUNDAKİ FGF23/KLOTHO EKSPRESYON
PROFİLİNİN ÜROLİTİYAZİS PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI*

Dr. Cihangir Yavuz Pars

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Hasan AYDIN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince yalnızca bilgisi ve deneyimi ile değil tüm hoşgörüsü ile benden desteğini esirgemeyen, tez çalışmalarım sırasında büyük katkı ve özveri gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Hasan Aydın'a teşekkürü borç bilirim.

Eğitimime büyük katkı sağlayan ve her konuda yardımcı olan İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gülçin Kantarcı'ya ve İç Hastalıkları anabilim dalında görev alan değerli hocalarım Prof. Dr. Yaşar Küçükardalı, Prof. Dr. Başak Oyan Uluç, Doç. Dr. Müge

Bıçakçıgil Kalaycı, Doç. Dr. Zehra Eren, Doç. Dr. Hasan Atilla Özkan, Doç. Dr. Orhan Önder Eren, Doç. Dr. Meltem Ergün ve Doç. Dr. Atakan Yeşil'e yakın ilgi ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Tezimin planlanması ve yürütülmesi sırasında yaptıkları değerli katkılardan dolayı, Yeditepe Üniversitesi Deneysel hayvanları Araştırma Merkezi çalışanlarına, patoloji örneklerinin incelenmesinde emeği geçen Prof. Dr. Ferda Özkan'a ve tüm patoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük keyif ve onur duyduğum, iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan asistan arkadaşlarıma ve bütün Anabilim Dalı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatımda vazgeçilmez bir yere sahip olan canım anneme ve kardeşime her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Cihangir Yavuz Pars

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ÖZET	x
ABSTRACT	xii
1. Genel bilgiler	
1.1. Üriner Taş Hastalığının Epidemiyolojisi	1
1.2. Üriner Taşların Moleküler Biyoloji ve Genetiği	6
1.3. Ürokristalizasyon ve Üriner Taş Oluşumunun Fizikokimyasal Yönleri	10
1.4. Obezite, Metabolik Sendrom ve Taşlar	21
1.5. FGF23 ve Klotho	25
1.5.1. Fibroblast Growth Factor Ailesi	25
1.5.2. FGF 23	29
1.5.3. FGF 23 İşlevleri	36
1.5.4. Klotho	40
1.5.5. Klotho İşlevleri	42
1.6. FGF 23/Klotho aksı Patofizyolojisi ve Hastalık İlişkileri	45
1.6.1. FGF 23 Gen Mutasyonları	45
1.6.2. FGF 23 ve Kronik Böbrek Yetersizliği	46
1.6.3. FGF 23 ve Ekstrarenal Patofizyolojisi	49
1.6.4. Klotho ve Kronik Böbrek Yetersizliği	54
1.6.5. Klotho ve Kardiyovasküler Hastalıklar	55
1.6.6. Klotho ve Metabolizma	58

1.6.7.Klotho ve Kanser	60
1.6.8.Klotho ve Diğer Hastalık İlişkileri	61
2. FGF23,Klotho ve Üriner Taş Hastalığı	62
3.Gereç ve Yöntemler	68
3.1.Kalsiyum Oksalat Nefrolitiazisi Hayvan Modeli	68
3.2.DeneySEL Hiperoksalürik Sıçan Modellerinin İncelenmesinde İmmünohistokimyanın rolü	68
3.3. Hiperoksalüri Oluşturulmuş Sıçanlarda Böbrek Dokusundaki FGF23/Klotho Ekspresyon Profilinin Ürolitiazis Patogenezindeki Rolünün Araştırılması	71
3.3.1.Deney Hayvanları	71
3.3.2.Sıçan Grupları ve Etilen Glikol Uygulaması	71
3.3.3.Patolojik İnceleme	72
3.3.4.İstatistiksel Analiz	72
4.Bulgular	73
4.1. FGF23 ve Klotho Doku Ekspresyon Değerlendirme Tablosu	73
4.2. Grupların Normal Dağılım Analizleri	74
4.3. Gruplar Arası Çoklu Ortalama Karşılaştırma Analizleri	74
4.4. Gruplar Arasında İkili Ortalama Karşılaştırma Analizleri	74
5. Tartışma	86
6. Sonuç ve Öneriler	91
7.Kaynaklar	92

TABLO LİSTESİ

Tablo No:	Sayfa No:
Tablo 1. Üriner taş oluşumunda etkili bazı sistemik hastalıklar etyolojik faktörler	11
Tablo 2. Taş oluşumunu etkileyebilen baskılayıcı üriner maddeler	18
Tablo 3. Klotho'nun biyolojik işlevleri	45
Tablo 4. Sıçan böbrek kesitlerinin immünohistokimyasal boyanması ile elde edilen preparatlarda FGF23 ve Klothonun boyanma yüzdesi ve şiddetini gösteren sonuç tablosu	73
Tablo 5. Gruplararası analiz tablosu	74
Tablo 6. Gruplararası ikili analizler	75
Tablo 7. Kortikal Tübüler Bölgede Klotho ekspresyonunun gruplara göre dağılımı	76
Tablo 8. Medüller tübüler bölgede klotho ekspresyon dağılımı	77
Tablo 9. Glomerüler bölgede klotho ekspresyon dağılımı	78
Tablo 10. Kortikal Tübüler Bölgede Gruplara Göre FGF23 Dağılımı	79
Tablo 11. Medüller Tübüler Bölgede Gruplar Arası FGF23 Dağılımı	80
Tablo 12. Glomerüler Bölgede Gruplara Göre FGF 23 Dağılımı	81

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No:	Sayfa No:
Şekil 1. Taş oluşum süreci	14
Şekil 2. İnsan FGF si filogenetik ağacı	25
Şekil 3. Endokrin FGF/Klotho aksları	26
Şekil 4. Endokrin fibroblast büyüme faktörleri FGF 19 ve FGF 21 in karbonhidrat metabolizması ile ilişkili rolleri	27
Şekil 5. FGF 21 in doku spesifik koruyucu etkileri	28
Şekil 6. FGF 23 ün yapısı	30
Şekil 7. FGF-23, α -Klotho ve FGFR1c nin oluşturduğu heterodimer kompleks	31
Şekil 8. İntrarenal parakrin bir faktör olarak klotho	32
Şekil 9. FGF 23 ün klotho bağımlı fosfatürük etkisine aracılık eden intrarenal parakrin sistem	32
Şekil 10. Fosfat ve kalsiyum metabolizmasının endokrin regülasyonu	33
Şekil 11. FGF uyarıcıları	34
Şekil 12. FGF 23 ün böbrek ve paratiroid üzerindeki etkileri ile FGF 23-Klotho yolağının bir sinyal kaskadı	35
Şekil 13. FGF 23 ve Klotho tarafından renal distal tübüllerde apikal TRPV5 regülasyonu	37
Şekil 14. FGF 23 ün distal tübüllerde klotho bağımlı sodyum transportu regülasyonu üzerindeki etkileri	38
Şekil 15. Paratiroid hücrelerinde FGF 23 sinyalizasyonu	39
Şekil 16. Mitolojide "Klotho"	40
Şekil 17. Klotho ailesi	41
Şekil 18. Klotho defektif farelerin majör fenotipleri ve klotho eksprese eden majör dokular	42
Şekil 19. Klothonun solüt kanal ve taşıyıcıları ile vitamin D metabolizması üzerindeki etkileri	44
Şekil 20. Klothonun distal tübüllerden potasyum attırıcı etkisi	44
Şekil 21. Fosfat homeostazının normal fizyolojisi	47
Şekil 22. Fosfat toksisitesi	47
Şekil 23. FGF 23 ün kardiyak hipertrofi üzerine etkisi	50
Şekil 24. FGF 23 ün RAAS üzerindeki etkileri	51

Şekil 25. Sağlıklı kişiler ve kronik böbrek hastalığı olanlarda FGF23/klotho aksı,RAAS ve vitamin D ilişkileri	51
Şekil 26. Yüksek FGF 23 düzeyleri ile ortaya çıkan patolojik bulgular ve altta yatan mekanizmalar	53
Şekil 27. FGF 23 ün kronik böbrek hastalığında görülen renal ve ekstrarenal etkileri	54
Şekil 28. Klothonun kardiyovasküler hastalıklardaki koruyucu rolü	57
Şekil 29. TRPC6 nın klotho aracılı inhibisyonu ve kardiyoproteksiyon	57
Şekil 30. Farelerde klotho inaktivasyonu ve yağ dokusu birikiminde azalma	58
Şekil 31. Klotho ve adiposit gelişimi	59
Şekil 32. Klothonun karaciğer yapısı üzerindeki etkileri	59
Şekil 33. Hiperoksalürik sıçan böbreğinin çeşitli biyomoleküllere ilişkin immünohistokimyasal boyama kesidi	70
Şekil 34. A grubuna (7. Gün) ait bir sıçan preparatı örneğinde FGF 23 ün x200 büyütme ile kortikal dağılımı	82
Şekil 35. A grubuna (7. Gün) ait bir sıçan preparatı örneğinde FGF 23 ün x200 büyütme ile medulladaki dağılımı	83
Şekil 36. Kortikal sahada klothonun intranükleer boyanması	84
Şekil 37. Glomerüler alanlarda klothonun mezangial ve periferik birikimi	85

SİMGELER ve KISALTMALAR

CaSR	Calcium sensing receptor
VDR	Vitamin D receptor
sAC	Soluble Adenylyl Cyclase
NPT2	Sodium-phosphate Co-Transporter 2
NHERF1	Sodium-hydrogen antiporter 3 regulator-1
TRPV5	Transient receptor Potential Vanilloid 5
FGF 23	Fibroblast Growth Factor 23
PTH	Parathormon
HHRH	Otosomal dominant hereditary hypercalciuric, hypophosphatemic rickets
FP	Formation Product
ROS	Reactive Oxygen Species
CaP	Calcium Phosphate
CaOx	Calcium Oxalate
ESWL	Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy
THP	Tamm-Harsfall Proteini
EPS	Ekzopolisakkarid
UPJ	Ureteropelvic Junction
BMI	Body Mass Index
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIT-1/2	Phosphate transporter 1/2
CYP	Cytochrome p450
PHEX	Phosphate Regulating Neutral Endopeptidase, X-linked

DMP-1	Dentin matrix protein
FAM20c	Golgi Associated Secretory Pathway Kinase
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinases
sKL	Solubl Klotho
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
FRS-2 α	Fibroblast growth factor receptor substrate 2 alpha
EGR-1	Early growth response protein 1
TIO	Tumor Induced Osteomalasia
NCC	Sodium/Chlorur Co-Transporter
WNK-4	with-no-lysine-kinase-4
KLPH	Klotho/Lactase-Phlorizin Hydrolase Related Protein
RIG	Retinoic Acid Inducible Gene
ADAM	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
INF- γ	Interferon- γ
IGF-1	Insulin Like Growth Factor 1
WNT	Derived from Wingless gene,the Drosophila melanogaster segment-polarity gene, and Integrase-1, the vertebrate homologue
ROMK-1	Renal outer medullary potassium channel
RAAS	Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
ADHR	Otozomal dominant hipofosfatemik rikets
GALNT-3	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-3
XLH	X-Linked Hypophosphatemia
MAPK	Mithogen Activated Protein Kinase
SHPT	Sekonder Hiperparatiroidizm
SVH	Sol Ventrikül Hipertrofisi
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinucleotide Phosphate Hydrogen
PLC- γ	Fosfolipaz C-Gamma

ACE-2	Angiotensin Converting Enzyme 2
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor-1
Pit-1/2	Sodium-Phosphate co transporter 1/2
NO	Nitric Oxide
ET-1	Endothelin-1
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
DAG	Diacyl Glycerol
PI3K	Phosphoinositid 3 Kinase
OETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
EG	Ethylene Glycol
OPN	Osteopontine
GRHPR	Glyoxylate Reductase/hydroxy Pyruvate Reductase
MCP-1	Monocyte-Macrophage Chemotactic Protein-1
NF- $\kappa\beta$	Nuclear factor Kappa/Beta
PMDA	Plazma Malondialdehid

ÖZET

Amaç: Ürolitiazis, toplumdaki yüksek insidans ve prevalansının yanısıra mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte obezite, diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz ve metabolik sendrom gibi hastalıklara da sıkça eşlik etmektedir. Temelde fosfatürik etkili bir hormon olan FGF23 ve onun kofaktörü olmasına ilave olarak, bilinen renoprotektif, antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri bulunan klotho düzeyleri bu hastalıklarla ilişkili bulunmuştur. Söz konusu proteinlerin ürolitiazis patogenezindeki rollerinin değerlendirilmesi taş oluşumu ve sistemik hastalıklar arasındaki birlikteliğin mekanizmasını aydınlatmaya yardımcı olacaktır. Genetik bazı çalışmalar dışında literatürde FGF23/Klotho sisteminin üriner taş oluşumu ile ilişkisini saptamaya yönelik yeterli yayın yoktur.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya dahil edilen toplamda 35 adet erkek wistar sıçanı randomize olarak sayıca 5 eşit gruba ayrıldı. 1. grup kontrol grubu olarak değerlendirildi ve 24 saatlik takibin ardından sakrifiye edildi. Diğer sıçanlara ise hiperoksalüri oluşturmak amacıyla içme suyunda 28 gün süre ile %0,75 etilen glikol verildi. İkinci grup 7. gün, 3. grup 14. gün, 4. grup 21. gün ve 5. grup ise 28. gün sonunda sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen tüm sıçanların sağ böbrekleri histopatolojik inceleme amacıyla ekstrakte edildi. FGF23 ve Klotho doku ekspresyonu immünohistokimya yöntemi ile değerlendirildi.

Bulgular: Yedinci günde kortikal, medüller ve glomerüler alanlarda FGF23 ile güçlü boyanma görülmesine karşın 14. ve 21. günlerde boyanma giderek azalmış ve 28. günde FGF23 ekspresyon düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Klotho için de benzer şekilde 7. günde kortikal ve glomerüler alanlarda güçlü boyanma görülmüş ancak boyanma şiddeti giderek azalarak 28. günde klotho ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük saptanmıştır ($p<0,05$). Medüller bölgede ise sadece 7. günde diğer gruplara göre düşük ekspresyon düzeyi olması ve diğer gruplarda yakın boyanma şiddeti görülmesine karşın bu durum istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır ($p>0,05$).

Sonuç: FGF23 ve klotho ekspresyonu ile artan hiperoksalüri arasında ters bir korelasyon mevcuttur. Bu durum FGF23 ve klothonun ürolitiazis patogenezine katılma ihtimalini

göstermektedir. Özellikle sistemik düzeyleri primer olarak böbrek kaynaklı olan klothonun, oksidatif hasarın ortak bir patogenez unsuru olduğu obezite, diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz ve metabolik sendrom gibi klinik durumlardaki azalışı da göz önüne alındığında, ürolitiazis sürecinin bu hastalıkların gelişiminde nedensel bir rolü olduğu düşünülebilir.



ABSTRACT

Purpose: Besides the high incidence and prevalence of urolithiasis, it is commonly seen in diseases like obesity, diabetes, hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome although association mechanisms is not fully understood. Systemic levels of FGF23 which has mainly phosphaturic effect and klotho which has renoprotective, anti-oxidant, anti-inflammatory properties in addition to its cofactor role for FGF23, are associated with these diseases. Evaluation of the roles of those proteins in the pathogenesis of urolithiasis may help explain the mechanism of association between urinary stone formation and systemic diseases. To our knowledge, there is not enough investigation to determine their roles in kidney stone formation except some genetic trials.

Materials and Methods: A total of 35 male wistar rats which were included into the study are randomly divided into five groups equally in number (n=7). Group 1 remained as control group and was sacrificed after 24 hour follow up. Rats in all other groups were given ethylene glycol in drinking water for a period of 4 week to induce hyperoxaluria. Each group were also sacrificed at the end of each week; day 7 for group 2, day 14 for group 3, day 21 for group 4 and day 28 for group 5, respectively. Right kidneys of all rats that were sacrificed were extracted for histopathological evaluation. Immunohistochemistry was used for FGF23 and Klotho tissue expression.

Results: Although FGF23 had a strong expression in cortical, medullary and glomerular sites at day 7, staining intensity decreased gradually at day 14 to day 21 and FGF23 expression level was statistically significantly lower than control group at day 28 ($p < 0,05$). Klotho also had a strong expression in cortical and glomerular sites at day 7 similarly to FGF23 but staining density decreased gradually and expression level was statistically significantly lower than control group at day 28 ($p < 0,05$). Although klotho had a weak expression in medullary region only at day 7 and other groups had close expression levels, it was not statistically significant ($p > 0,05$).

Conclusion: FGF23 and Klotho expressions had a strong inverse correlation with hyperoxaluria. This may show us their involvement in the pathogenesis of urolithiasis. It can

be speculated that urolithiasis process has a causative aspect for diseases sharing oxidative damage in their pathogenesis as a common feature like obesity, diabetes, hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome especially when well-known decrement of klotho in those diseases considered.



1. Genel Bilgiler

1.1 Üriner Taş Hastalığının Epidemiyolojisi

Nefrolitiazis yaygın ve kompleks bir bozukluktur. Epidemiyolojik çalışmalar hastalık yükünün ortaya konmasını ve ilişkili risk faktörlerinin aydınlatılmasını sağlayarak üriner taş oluşumu patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasını ve riskin azaltılmasını sağlamaktadır. Prevalans 20. yüzyılın son çeyreğinde erkek ve kadınlar ile beyaz ve siyah ırk için artış göstermiştir.¹ Prevalanstaki artış kısmen radyolojik çalışmaların artan kullanımı ve sensitivitesi ile özellikle asemptomatik üriner taşların saptanmasından da kaynaklanmaktadır. Nefrolitiazis prevalansı yaşla birlikte artış göstermektedir. A.B.D de yapılan "The National Health and Nutrition Examination Survey" (NHANES) çalışmasının 2007-2010 yıllarını içeren bir güncellemesinde üriner taş oluşum prevalansı erkeklerde %10,6 kadınlarda ise %7,1, genelde ise %8,8 olarak saptanmıştır.² 1988-1994 yılları arasında yapılan NHANES 3 çalışmasında elde edilen sonuçlarla kıyaslandığında prevalansta %3,3 lük bir artış sözkonusudur.² İnsidans için de prevalansta olduğu gibi beyaz erkeklerde daha yüksek oranlar sözkonusudur. Erkeklerde 20 yaştan itibaren insidans artış göstermeye başlar,40-60 yaş arası pik oluşur ve sonrasında azalma gözlenir. Kadınlarda ise 20 li yaşların sonunda en yüksektir,50 yaşa yaklaştıkça azalmaya başlar. İnsidansın erkek ve kadınlar için genel olarak azalmaya başladığını gösteren çalışmalar da mevcut olmakla birlikte daha fazlasına ihtiyaç vardır.Olgu serilerinde, tedavi edilmeyen kişilerde ilk atak sonrası 5 sene içerisinde %30-40 civarında tekrar üriner taş oluşum oranı saptanmıştır.³ Randomize çalışmalar göstermiştir ki çeşitli girişimler rekürrens oranlarını %50 veya daha fazla düşürebilmiştir.^{4,5,6}

Risk Faktörleri

1)Diyetsel olmayan risk faktörleri

Taş oluşum riski taş hastalığı aile öyküsü olan kişilerde 2 kat daha fazladır.⁷ Artmış riskte olasılıkla hem genetik predispozisyon hem de diyetsel faktörler gibi benzer çevresel maruziyetlerin birlikte etkisi sözkonusudur. Nefrolitiazisin sistinüri, dent hastalığı gibi nadir formlarının genetik nedenleri bilinmekle birlikte daha yaygın formların oluşumuna katkıda

Açıklamalı [hp1]:

bulunan bilinen gen sayısı sınırlıdır. Kanada da yapılan bir çalışma Arap, batı Hindistanlı, batı Asya'lı ve latin Amerikalılarda Avrupa'lılara göre daha fazla sayıda taş oluşturunca rastlanmıştır.⁸ Genel popülasyonda Afrika kökenli Amerikalılarda üriner taş sıklığının daha az olduğu, bununla birlikte son dönem böbrek yetersizlikli hastalar içerisinde ise Afrika kökenli Amerikalıların beklenenden daha fazla taş hastalığı prevalansına sahip olduğu anlaşılmıştır.⁹

Nefrolitiazisin sistemik bir hastalık olduğunu gösteren önemli ölçüde kanıt bulunmaktadır. Renal tübüler asidoz, primer hiperparatiroidizm ve crohn hastalığı kalsiyum içeren üriner taşlarla ilişkisi olduğu bilinen sistemik uzantıları olan hastalık örnekleridir. Obezite, gut ve diyabetes mellitusun da yakın zamanda ikna edici biçimde taş oluşumuyla ilişkili sistemik hastalıklar olduğu ortaya konmuştur. Body mass index artışı, diyeti de içeren diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak üriner taş oluşum riskini arttırmaktadır.¹⁰ Henüz yeterince açık olmayan nedenler dolayısıyla bu durum kadınlarda erkeklere göre daha belirgindir. BMI artışı üriner kompozisyon üzerine de etkilidir.¹¹ Daha yüksek BMI daha fazla üriner oksalat miktarı ve daha düşük üriner pH ile ilişkilidir. Ailede gut hastalığı öyküsünün oluşu diyet, kilo ve medikasyonlardan bağımsız olarak nefrolitiazis riskini 2 kata kadar arttırmaktadır.¹² Bu ilişki insülin rezistansı ve asidifikasyon defektleri gibi mekanizmalarla bağlantılı görünmektedir. Diyabetes Mellitus ta benzer şekilde diyet ve BMI dan bağımsız olarak artmış taş oluşumu ile ilişkilidir.¹³ Prospektif olarak yapılmış bazı çalışmalarda DM öyküsü oluşunun erkeklerin aksine kadınlarda %30-50 oranında artmış taş oluşumu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.¹⁴ Çeşitli mesleki durumlar ile hissedilemeyen su kaybının olduğu sıcak ortam gibi bazı çevresel faktörler de atmış taş oluşum riski ile ilişkilidir.

2) Diyetel Faktörler

Diyet içeriği üriner kompozisyonu ve böylelikle nefrolitiazis riskini modifiye eder. Bu bakımdan özellikle vurgulanabilecek besinsel öğeler kalsiyum, hayvansal proteinler¹⁵, oksalat¹⁶, sodyum¹⁷, sükröz¹⁸, früktoz¹⁹, magnezyum²⁰ ve potasyumu²¹ içerir. Diyetel faktörler ve üriner taş oluşumu arasındaki ilişkiyi prospektif olarak inceleyen üç büyük kohort çalışma bulunmaktadır. Health Professionals Follow-Up Study (HPFS), 40-75 yaş arası 45000 erkek sağlık elemanını, Nurses' Health Study 1 (NHS-1) 34-59 yaş arası 80000 den fazla kadın hemşireyi ve NHS-2 çalışması da 80000 den fazla 27-44 yaş arası kadın hemşireyi

değerlendirmektedir. Bu çalışmaların öncesinde diyetle fazlaca kalsiyum alımının üriner taş oluşum riski artışıyla kuvvetle ilişkili olduğu düşünülmekteydi, ancak ilgili kohort çalışmaları ile diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak diyetle yüksek kalsiyum alımının aslında daha düşük nefrolitiazis riskiyle ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır.²² Diyetle daha az kalsiyum alınması diyetel oksalat absorpsiyonunu arttırarak aynı zamanda üriner oksalate ekskresyonunu arttırmaktadır.²³ Diğer bir etken özellikle süt ve süt ürünleri ile alınan koruyucu faktörler olabilir. Nefrolitiazis aile öyküsü bulunan bireyler arasında bile diyetle düşük kalsiyum alımının üriner taş oluşum riskinde artış ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.²⁴

Kalsiyum oksalat taşı öyküsü olan ve mevcut artmış idrar kalsiyum düzeyi bulunan erkek hastaların, 400 mg/gün düşük kalsiyumlu ve 1200 mg/gün yüksek kalsiyumlu ancak hayvansal protein ile sodyumdan fakir 2 farklı diyet almaları sağlanacak şekilde randomize edilmeleriyle yapılan bir çalışmada yüksek kalsiyum alımının olduğu grubun rekürrens riskinin %50 daha düşük olduğu saptanmıştır.²⁵ Elde edilen kanıtlar, alınan kalsiyumun kısıtlanmasının yararlı olmadığı hatta aksine üriner taş oluşumu ve kemik kayıpları açısından zararlı olduğunu göstermektedir.²⁵

Diyetel kalsiyuma zıt olarak takviye amaçlı alınan kalsiyumun erkekler ve genç yaş kadınlarda üriner taş oluşum riskini azaltmadığı, hatta ileri yaş kadınlarda bu riski arttırabileceği ortaya konmuştur ancak takviye kalsiyum preparatlarında bulunan vitamin D içeriği ve preparatların yemekle birlikte alınıp alınmamasının sonuçlar üzerine etkisi de gözönünde bulundurulmalıdır.²⁶

Üriner oksalatın da kalsiyum oksalat taşı oluşumu açısından açıkça önemli bir risk faktörü olduğu bilinmesine karşın, diyetel oksalatın nefrolitiazisteki rolü yeterince açık değildir.²⁷ Absorbe edilen diyetel oksalat %10-50 arasındadır.²⁷ Başta kalsiyum olmak üzere bazı diyetel içerikler, genetik ve intestinal flora oksalat absorpsiyonunu etkileyen faktörler arasındadır. Üriner oksalatın diğer bir kaynağı da glisin, glikolat, hidroksiprolin ve vitamin-C nin endojen metabolizmasıdır.

Kalsiyum oksalat nefrolitiazisi öyküsü olan kişilerde yapılan bir çalışmada bu kişilerin oksalatı degrade ettiği bilinen oxalobacter formigenes isimli intestinal bir bakteri türü ile daha az oranda kolonize olduğu tespit edilmiştir.²⁸ İlginç olarak diyetel oksalatın üriner taş oluşumu riski üzerine etkisi erkek ve genç kadınlarda minimal iken, genç yaş kadınlarda tespit edilememiştir.²⁹

Çeşitli besin öğelerinin, boyutu yaş, cinsiyet ve BMI gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte,üriner taş oluşumu üzerine etkisi sözkonusudur. Sözelimi fazlaca hayvansal protein alımı, üriner kalsiyum atılımını arttırıp üriner sitrat atılımını azaltarak taş oluşumunu arttırmaktadır.³⁰ Prospektif nitelikte bazı çalışmalarda ise fazla hayvansal protein alımının erkeklerde taş oluşum riskini arttırıp kadınlarda arttırmadığı gözlenmiştir.³¹ Ayrıca erkeklerde artmış bu riskin BMI'nin 25 altı olduğu grupta daha fazla olduğu da saptanmıştır.³² Diyetteki potasyum erkek ve yaşlı kadınlarda muhtemelen üriner kalsiyum ekskresyonunu azaltarak riski azaltır.³¹ Sodyum,sükroz ve früktoz,kalsiyum ekskresyonunu kalsiyum alımından bağımsız olarak arttırmaktadır.^{17,18,19} Özellikle tahıllarda bulunan "fitat" ın genç yaş grubu kadınlarda olasılıkla direk yolla kalsiyum oksalat kristal formasyonunu inhibe ederek üriner taş oluşumunu azalttığı saptanmıştır.³³ Prospektif gözlemsel çalışmalarda diyetle alınan magnezyumun erkeklerde üriner taş oluşum riskini azalttığı anlaşılmıştır.³² Magnezyum diyetel oksalat absorpsiyonunu azaltmasına karşın bu etki magnezyum preparatlarında yeterince gözlenememiştir.

Oksalatın endojen bir kaynağının Vitamin C olabileceğini belirtmiştik. Prospektif gözlemsel bir çalışmada günlük 1000 mg veya daha fazla takviye vitamin C alan erkeklerin önerilen diyet miktarı olan 90 mg/gün dozunda vitamin C alımı olan erkeklere nazaran %40 daha fazla üriner taş oluşum riskine sahip olduğu anlaşılmıştır.³² Bununla birlikte Vitamin C içeren çoğu besinde taş oluşumunu engelleyici faktörlerde olduğundan diyetle Vitamin C'nin kısıtlanması önerilmez. Takviye preparatların kullanımından ise kaçınılmalıdır. Vitamin B6'nın üriner taş oluşum riskini azalttığı ortaya konulmuştur.^{34,35} Prospektif çalışmalarda çay,kahve,bira ve şarabın üriner taş oluşum riskinde azalma sağladığı saptanmıştır.^{36,37} Üriner sitrat artışı ile teorik olarak taş oluşum riskini azaltması beklenen narenciye suları³⁸ arasında portakal suyu ve taş oluşumu arasında belirgin ilişki saptanmamışken,greyfurt için belirgin şekilde artmış risk sözkonusudur.^{36,37} Greyfurtun bazı intestinal enzimleri etkilediği bilinmesine karşın üriner

taş oluşumu ile ilgili baskın mekanizmalar bilinmemektedir.^{36,37} Şekerli soda tüketimi ile artmış risk sözkonusu değildir.^{36,37} Süt alımı ise üriner kalsiyum taşlarının oluşum riskini azaltmaktadır.

Hiperoksalüri tipik olarak üriner oksalat ekskresyonunun 45 mg/gün üzerinde olması ile karakterizedir. Yüksek üriner oksalat düzeylerine erkeklerde kadınlara nazaran 4 kat daha fazla rastlanır.³⁹ Oksalat taş oluşumu için açıkça bağımsız bir risk faktörüdür. Bazı çalışmalarda hiperürükozüri üriner kalsiyum taş oluşum riski ile ilişkili bulunmuştur.⁴⁰ Hipositratüri taş oluşum riskini arttırmaktadır.⁴¹ Üriner sitrat artışı risk açısından koruyucu etki gösterir. Total idrar volümünün artışı üriner taş oluşumu riskini azaltmaktadır.⁴²

1.2. ÜRİNER TAŞLARIN MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİĞİ

Son dekat içerisinde nefrolojik araştırmalar kalsiyum nefrolitiazisinin genetik nedenlerini ortaya koymaya yönelmiştir. Nefrolitiazisin hipertansiyon,diyabet,osteoporozis gibi multifaktöryel patogeneze sahip kompleks hastalıklardan olduğu düşünüldüğünde, taş oluşumu açısından tespit edilen genlerin tek başına nedensel faktör olmaktan ziyade çevresel faktörlerle etkileşimi gözönünde bulundurulmalıdır.

Genetik çalışmalarla, Calcium sensing receptor (CaSR), vitamin D receptor (VDR),bicarbonate-sensitive adenyl cyclase (sAC), sodium-phosphate reabsorption carrier (NPT2), caveolin-1, sodium-hydrogen antiporter 3 regulator-1 (NHERF1), oseopontin, Tamm-Harsfall gibi proteinlere ait genlerin üriner taş oluşumu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

GENETİK ÇALIŞMALAR

Hiperkalsiüri ve böbrek taş öyküleri bulunan 3 ailede 1q23.3-q24 kromozomları ile hiperkalsiüri arasında ilişki saptanmıştır.⁴³

Paralel olarak yapılan bir diğer çalışmada bikarbonata duyarlı Soluble Adenilat Siklaz (sAC) geninde tespit edilen 6 adet polimorfizmin hiperkalsiüri ve düşük kemik mineral kitlesi ile ilintili olduğu anlaşılmıştır.⁴⁴ sAC in fonksiyonu henüz bütünüyle ortaya koyulamamakla birlikte böbrek,barsak,kemik,SSS nde bulunduğu ve bikarbonat ile aktive edilip bivalan katyonlarla modüle edildiği bilinmektedir.⁴⁵ Ancak 9 aileyi içine alan avrupadaki bir çalışmada sAC geni ve hiperkalsiüri arasında güçlü bir ilişki ortaya konulamamıştır.⁴⁶

Herhangi bir kişiyi taş oluşturucu olarak nitelendirmek ve sınıflandırmaya çalışmak aslında zordur. Gerçekte böbrek taşı herhangi bir yaşta gelişebilir ve sessiz kalarak tespit edilemeyebilir. Predispoze bir genetik profile sahip olduğu düşünülen kişilerde diğer bazı antilitojenik gen veya diyetel faktörlerin üstün gelmesi nedeniyle taş oluşumu gözlenmeyebilir.⁴⁷ Hiperkalsiürik kişilerde düşük sodyum içerikli diyetin taş oluşum potansiyelini azaltması buna verilebilecek bir örnektir.⁴⁸

VDR geninde, kalsiyum böbrek taş oluşumuna yatkınlık, hayatın erken dönemlerinde taş oluşumu, daha agresif üriner taş oluşumu ve daha düşük üriner sitrat ekskresyon düzeyleri ile ilişkili polimorfizmler saptanmıştır.^{49,50,51} VDR-Vitamin D kompleksi barsaklarda kalsiyum absorpsiyonunu aktive eder. Bununla birlikte VDR-Vitamin D kompleksi aynı zamanda üriner sitrat ekskresyonunu azaltma kapasitesine sahiptir. VDR-Vitamin D kompleksi bunu proksimal tübül hücrelerinin lümenal membranında yer alıp sitrat ekskresyonunu azaltmak suretiyle işlev gören sitrat reabsorpsiyon taşıyıcısını stimüle eden fosfoenolpirüvat karboksil kinaz ekspresyonunu, baskılanmayı ortadan kaldırma yoluyla arttırarak sağlamaktadır.

Paratiroid bezinde kalsiyum ile aktive olarak PTH salınımını azaltan böbreklerde ise sodyum,potasyum,klor ve kalsiyum reabsorpsiyonunu inhibe eden CaSR (Kalsiyum Duyarlı Reseptör) gen analizlerinde de benzer sonuçlar alınmıştır. CaSR geninin 7. Exon, ilk intron ve transkripte edilmeyen promotore yakın 5' gibi bölgelerinde saptanan belli polimorfizmlerin hiperkalsiüri ve böbrek taşları ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Bunlardan exon 7 de yer alan Arg990Gly polimorfizmi böbrek taşı olan ya da olmayan kişilerde hiperkalsiüri ile bağlantılıdır. Arg990gly polimorfizmi CaSR genine fonksiyon kazandırıcı niteliktedir.^{52,53} Arjinin alelini taşıyanlarda diğerlerine göre daha yüksek serum PTH düzeyi saptanmıştır.⁵⁴ 990 kodonundaki glisin alleli ise, henle kulpunun çıkan kolundaki kalsiyum reabsorpsiyonu açısından daha az inhibe edici özellik kazandırarak taşıyıcıları daha yüksek kalsiyum ekskresyonuna yatkın hale getirir,ancak ilginç olarak aynı aleli taşıyan kişilerin hepsi hipokalsemik değildir, buna neden olarak Arg990Gly polimorfizminin paratiroid ve böbrek hücrelerinde kullanılan sinyalizasyon sistemleri üzerine farklı etkilerinin olduğu düşünülebilir. Primer hiperparatiroidizmdeki hiperkalsemik ve üriner taş oluşumunun eşlik ettiği hiperkalsiürik durum belirtilen polimorfizmin önemini açıklar niteliktedir. Başlangıç intronu ve transkripte edilmeyen promotore yakın 5' bölgelerinde yapılan çalışmalarda tespit edilen polimorfizmlerin ise aminoasit değişikliklerine bağlı fonksiyonel değişimlerden ziyade ,özellikle promotor alana yakınlıkları dolayısıyla daha çok CaSR geninin transkripsiyonunun ve eksprese edileceği renal papilladaki tubuler lokalizasyonunun modifikasyonu yoluyla üriner taş oluşumuna yatkınlığı arttırabilecekleri saptanmıştır.⁵⁵ Dolayısıyla papillada yüksek kalsiyum konsantrasyonu varlığında CaSR nin farklı bir hücresel ekspresyonu kalsiyum tuzlarının presipitasyonu ve oksalat taşı oluşumunu hızlandırabilir.⁵⁶

Nefrolitiazisle ilişkili olduğu ortaya konan diğer bir polimorfik gen, intestinal mukozada eksprese edilen bir kalsiyum kanalını kodlayan TRPV6 dır. Bu gendeki aktive edici mutasyonlar intestinal kalsiyum absorpsiyonunun artışı yoluyla nefrolitiazis ile ilişkili hale gelir.⁵⁷

GENETİK BOZUKLUK TAŞIYAN HAYVAN MODELLERİ

Knockout fareler belirli bir genin ekspresyonunun engellenmesi amacıyla genetik olarak programlanmış deney hayvanlarıdır. Elde edilmeleri göreceli olarak kolay ve yararlı bilgi kaynaklarıdır, ancak genellikle araştırmalar açısından bir dönüm noktası niteliği taşımazlar. Elde edilen bilgileri farelerden insanlara uyarlamak ilgili proteinlerin insan fizyolojisindeki biyolojik özelliklerinin de bilinmesini gerektirir. Nefrolitiazis örneğinde bir knockout fare neslinin fenotipinde böbrek taşının gelişimi, ilgili susturulmuş genin taş oluşumunun önlenmesinde rol alabileceğini göstermektedir.

Slc26a13 knockout fareler oksalatı intestinal lümene taşıyan bir taşıyıcıdan yoksundurlar. Organizmada biriken ve renal ekskresyonu artış gösteren oksalat ,taş oluşumuna neden olur.⁵⁸ Kalsiyum pompası, CaSR, VDR gibi hücrel fonksiyon açısından önemli proteinlerin toplandığı plasma membran invajinasyonlarının meydana gelmesini sağlayan caveol proteininin üretiminden sorumlu caveolin-1 geninden yoksun knockout farelerde de hiperkalsüri, tübüler kalsiyum-fosfat depozitleri ve üriner taş oluşumu gözlenmiştir.⁵⁹ NHERF1 knockout farelerde sodyum, kalsiyum ve ürik asit reabsorpsiyonunu modüle eden bir proteinin kaybı ve sonuçta taş oluşumu sözkonusudur.⁶⁰ Tamm-Horsfall ve osteopontin proteinlerinin her ikisinin de inaktive edildiği double knockout farelerin %39 unda kalsiyum tuzlarının presipitasyonunun inhibisyonundaki yetersizlik nedeni meydana geldiği düşünülen papiller interstisyel depozitler gözlenmiştir.⁶¹ Sözkonusu iki proteinin sinerjistik antilitojenik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir, öyle ki herhangi birisinin tek başına bloke edildiği knockout farelerdeki interstisyel papiller depozit saptanma oranı %10-15 lere düşmektedir.⁶¹ İnsanlarda proksimal tübülde fosfat reabsorpsiyonu amacıyla %85 oranında NPT2 (sodyum fosfat kotransporter-2) ve %15 oranında ise NPT1 kullanılmaktadır. Fosfat alım, PTH ve FGF23 lüminal membranda NPT2 ekspresyonunu internalizasyon ve lizozomal lizis yoluyla bloke ederek fosfatürik etki sağlamaktadır. Renal sodyum fosfat kotransporter (NPTa) knockout

fareler, renal fosfat kaybına sekonder hipofosfatemi, artmış renal vitamin D sentezi, hiperkalsiüri ve renal taş oluşumu ile karakterizedir ki bu tablo otozomal dominant herediter hiperkalsiürik, hipofosfatemik rikets (HHRH) sendromlu hastalarınınkine benzemektedir.^{62,63} Halihazırda NPT2a knockout fareler, HHRH li hastalardaki renal bozukluk için bir model teşkil etmektedir.⁶³ İlginç olarak yine HHRH li kişilerde NPT2a da gen mutasyonu saptanmamıştır. Bunun yerine proximal tübül NPT2c sinde mutasyonlara rastlanmıştır. Farelerde proksimal fosfat reabsorpsiyonu için NPT2a kullanılırken insanlarda NPT2c kullanılmaktadır. İki fosfat taşıyıcısı fonksiyonel olarak farklılık gösterir, NPT2a 3 sodyum iyonu ve 1 fosfatı içeren elektrojenik kotransport özelliğine sahipken, NPT2c 2 sodyum iyonu ve 1 fosfatın reabsorbe edilmesini sağlayan elektronötral kotransport mekanizmasına sahiptir. NPT2a ve NPT2c eksiklikleri kemik üzerinde de farklı etkiler gösterir, fare fenotipinde insanlarda gözlenen rikets yoktur. Bu durumda her iki fosfat taşıyıcısının kemikteki farklı ekspresyon profilleri rol alır. Özellikle NPT2a osteoklastlarda eksprese edildiğinden NPT2a knockout fareler daha az sayıda ve daha az aktif osteoklastlara sahiptir.⁶⁴

Nefrolitiazis ile ilgili genetik çalışmalarda araştırılacak genlerin seçilmesinde özellikle kalsiyum metabolizması üzerinde rol alan genlere odaklanılmıştır. Sözkonusu genler primer hiperkalsiüri ve osteoporozis sürecinde önem taşırlar ve bu sebeple belirtilen durumların nefrolitiazis ile ilişkisi, hiperkalsiürinin patojenik bir faktör olduğunu ortaya koymakla birlikte kalsiüri düzeylerine bakılmaksızın taş oluşturuçular içinde osteoporozisin yüksek sıklığını da açıklar niteliktedir. Kalsiyum metabolizmasına ilave olarak renal elektrolit metabolizmasının diğer yönleri de taş oluşumu patogenezinde ayrıca pay sahibi olabilir. sAC geni için yapılan çalışmalar bu duruma örnektir. Genom çalışmaları da yeni hipotezlerin formüle edilebilmesi ve yeni araştırma perspektiflerinin kazanılabilmesi açısından fırsatlar sunmaktadır.

Esasen mevcut çalışmalar genellikle tek bir geni göz önüne almakta iken böbrek taşlarının gelişiminde farklı genler ile genler ve çevre arasındaki etkileşimler böbrek taşı gelişiminde belirleyici majör faktördür. Gen-çevre etkileşimi farklı yollarla olabilmesine karşın en dikkat çekici tarafı epigenetik boyutudur.⁶⁵

Epigenetik açıdan çevresel etkiler genotipi değiştirmeden fenotipi kararlı ve sonraki jenerasyonlara aktarılacak şekilde değiştirebilir. Gen ekspresyonunun modifikasyonu çeşitli mekanizmalar yoluyla olabilirken en yaygını promotör gen alanlarının metilasyonudur. Hiper ya da hipometilasyon genin aktifliğini düzenler.⁶⁶ Fetal ya da perinatal hayatta dahi farklı çevresel koşullar yenidoğanın kronik hastalıklara eğilimini belirleyen epigenetik değişimlere yol açar.

Sonuç olarak nefrolitizyazis sürecinin aydınlatılması açısından taş oluşumunda rol alabilecek genlere ilişkin olduğu kadar gen-çevre etkileşimi ile epigenetik anlamda da konvansiyonel, epidemiyolojik ve hayvan modelli ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

1.3. ÜROKRİSTALİZASYON ve ÜRİNER TAŞ OLUŞUMUNUN FİZİKOKİMYASAL YÖNLERİ

Taş oluşumu kristalizasyon ile başlayan, kristal büyümesi, agregasyon ve adezyon ile kristal formasyonuna giden kompleks bir süreçtir. Bu süreçlerde uyarıcı veya baskılayıcı nitelik taşıyan faktörlerin de etkisi söz konusudur. İdrar pH sı ve iyonik güçler bunlara birer örnektir. Alkali pH kalsiyum içeren taşlarla ilişkili iken, asidik idrar ürik asit ve sistin taşları ile ilişkilidir. İdrar sıklıkla kalsiyum oksalat, kalsiyum fosfat veya sodyum urat ile süpersatüre durumdadır. Baskılayıcı faktörlere örnek olarak sitrat, magnezyum, pirofosfatlar, glikozaminoglikanlar ve nefrokalsin verilebilir. Yine birçok çalışmada sistemik hastalıklar ile taş oluşumu arasındaki patofizyolojik mekanizmalar araştırılmıştır ancak halen patofizyolojiden sorumlu mekanizmalar net değildir ve ileri araştırmalara gereksinim vardır. Tablo 1 de taş oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülen sistemik hastalıklar ve bazı etyolojik faktörler listelenmiştir.

Tablo 1: Üriner sistem taş oluşumunda sistemik hastalıklar ve etyolojik faktörler.

ETYOLOJİ	MEKANİZMALAR
VASKÜLER HASTALIKLAR	
Myokard enfaktüsü-MI	Ateroskleroz, Randall plak oluşumunda vasküler teori
Ateroskleroz	Ateroskleroz, Randall plak oluşumunda vasküler teori
Hipertansiyon	Magnezyum ve oksalatın idrar miktarı, kalsiyum metabolizması bozuklukları, ↑ paratiroid gland aktivitesi, ↑ idrar siklik AMP, ↑ intestinal kalsiyum emilimi. ↑ idrar ürik asit, ↓ idrar sitrat, diyet, ↑ diyetle sodyum miktarı
OBEZİTE (BMI >30)	Hipositratüri, hiperürikozüri, idrar kimyasalları, ↑ idrar oksalat/ürük asit ekskresyonu, fosfat/sodyum/sülfat/ sistein, diabetes mellitus
DIABETES MELLİTUS	ürük asit taş oluşumu, ↓ interstisyel hücrelerin fonksiyonu/ nöral doku / üreteral peristaltizm, üriner staz, İnsülin direnci ↓ renal ammoniagenezis sonucunda asidik idrar, ↑ proksimal tubulusta ürik asit geri emilimi / hiperurisemi. ↑ idrar kalsiyum ve oksalat ekskresyonu.
DISLİPİDEMİ	Kalsiyum oksalat ve ürik asit taşında total kolesterol seviyesi, atorvastatin anti-inflamatuar uygulaması / antioksidatif etki ile renal tubular hücre hasarının önlenmesi (1- renal tubular hücre hasarında biyo-ışaretleyleyicilerin idrar seviyesi (N-asetil glukozamidaz) /oksidatif stres (8-OHdG) ↓, 2- ↓ renal tubular hücrelerde apoptoz), inflamasyon ve renal tubular hücrelerde hücresel hasar.
METABOLİK SENDROM (bozulmuş açlık glikoz seviyesi, ↑ kan basıncı, santral obezite, dislipidemi (↑ serum trigliserid veya ↓ HDL kolesterol seviyesi) (bu özelliklerinden en az üçü)	Hipertansiyon, idrar kimyasının toplam etkisi, vasküler teori, inflamasyon ve doku hasarının sistemik işlevsel bozukluğu
İNTESTİNAL KALSİYUM ABSORBSİYONU	Hiperkalsüri, intestinal hiperkalsüride fraksiyonel kalsiyum emilimi, diyetle ve destek kalsiyumu, ↓ oksalata bağlanan intestinal kalsiyum (kanda oksalat ↑), ↑ üriner taş hastalığında osteoporotik kırıklar. Metabolik asidoz, genetik faktörler, hiperkalsürik taşlarda anormal kemik yeniden şekillenmesi, ↑ vitamin D seviyesi anormal lokal sitokin ve büyüme faktörü sinyalleri
AĞIR METALLER	Stronsiyum, kalsiyuma benzer, benzer olarak divalen katyon biyomineralizasyon, stronsiyum hidroksiapatit -çekirdeği, karbapatitde artmış çinko seviyesi.
KALSİFİYE NANOPARTİKÜLLER (CNPs)	Nanobakteri (canlı kendini çoğaltabilen yapılar / mineralo-protein komplekslerin oluşumunda cansız fizikokimyasal fenomen, CNP'ler aterosklerotik plaklarda yaygın
GENETİK İLİŞKİLER	primer hiperoksalüri- AGXT geni, sistinüri- SLC3A1/ SLC7A9 genleri, ksantinüri- XDH geni. Kalsiyum duyarlı reseptörleri kodlayan genler (CASR geni- ↑ interstisyel kalsiyuma yanıt olarak assendan kısımda ↓ kalsiyum emilimi. primer hiperparatiroidizm), osteopontin (OPN geni- idrar kristalizasyon inhibitörü) vitamin D reseptörü (VDR geni- ↓ sitrat geri emilimi), ve claudin ailesinin genleri (CLDN14 geni- kalsiyum ekskresyonu)
ÇEVRESEL FAKTÖRLER	Diyet, etilen glikol, taş oluşumunda promotörler veya inhibitörler, antilitojenik ajanlar-potasyum sitrat, hiperoksalüri

TAŞ OLUŞUM MEKANİZMALARINI

Süpersatürasyon : Birinci mekanizma çözücü niteliği taşıyan idrarın çözünen bir madde ile aşırı doyunluğudur. Süpersatürasyonun temel mekanizması tüm taşlar için ortak olmasına rağmen taş bileşimini belirleyen çözünenin türü ve düzeyi kişiden kişiye değişir. Spontan taş oluşumu için gerekli çözünen miktarının tekrarlayan taş hastalığı olan kişilerde daha düşük

olduğu gösterilmiştir.^{67,68} İdrardaki litojenik tuzların süpersatürasyon değerleri konsantrasyonlarının çözünürlüklerine oranı ile hesaplanır.⁶⁹ Bu oran “1” değerinin altında ise solüsyon satürasyon değerinin altındadır ve çözünme gerçekleşecektir. Oran “1” değerini aştığı takdirde ise spontan kristalizasyon oluşabilir ve idrarın bu durumu metastable olarak adlandırılır.⁷⁰ İdrarda süpersatürasyon oluşumunun mekanizması taş bileşimine göre farklılıklar gösterir. Kalsiyum, %60 kadar oksalat ya da %20 kadar fosfat ile birleşerek tüm böbrek taşlarının %80 kadarını oluşturur.⁷¹ Taşların %10 kadarı ise ürik asit yapısındadır.⁷² DM, obezite, metabolik sendrom ve gut hastalığı artmış ürik asit taşı oluşumu riski ile ilişkilidir. İdrar pH sınırı 5,5 un altında olduğu durumlarda idrar zayıf çözünürlüğe sahip ürik asit ile süpersatüre hale gelir ve ürik asit çöker. Bu durum ürik asit taşlarının oluşumunun önlenmesi ve tedavisinde örneğin potasyum sitrat gibi bir bileşikle idrar alkalinizasyonu yönteminin temelini oluşturur. Sistin taşları epitelyal hücrelerdeki ilgili transporter ların bozukluğu dolayısıyla sistinin idrarda yüksek miktarda atılmasından kaynaklanır. Sistinüri otozomal çekinik geçen kalıtsal bir hastalıktır. Sistinin çözünürlüğü alkalinizasyon ile arttığı için profilaksi sitrat alımı ve hidrasyonun artışıyla sağlanır.

Nükleasyon (Çekirdek oluşumu)

Taş oluşumu öncesinde doymuş idrarda kristaller oluşur ve çöker. Bu sürecin ilk basamağı nükleasyondur. Nükleasyon, stabil solid faza sahip olan daha büyük kristallere kendiliğinden büyüme yeteneği gösteren çökeltinin ilk partiküllerinin oluşumudur. Kristal çekirdekler, sistemde bulunan solid partiküller tarafından (heterojen nükleasyon) veya süpersatüre solüsyonda spontan olarak (homojen nükleasyon) oluşturulabilir. Heterojen nükleasyon, hücrel atıklar, eritrositler ve silendirler gibi yabancı yüzeylerin varlığından daha düşük süpersatürasyon seviyelerinde oluşur.⁷³ Homojen nükleasyon mekanizması kalsiyum oksalat kristal oluşumu mekanizmasını, gerçekleşmesine yetecek düzeyde süpersatüre olmaması nedeniyle tam açıklayamamaktadır.⁷⁴ Nükleasyonu sağlamak için gerekli olan süpersatürasyon miktarı “oluşum ürünü” (formation product; FP) olarak adlandırılır. Süpersatürasyon düzeyi bu seviyenin altına düşer ancak metastabil bölgede kalırsa, önceden var olan kristallerin boyutu artabilir, fakat spontan nükleasyon artık oluşamaz.

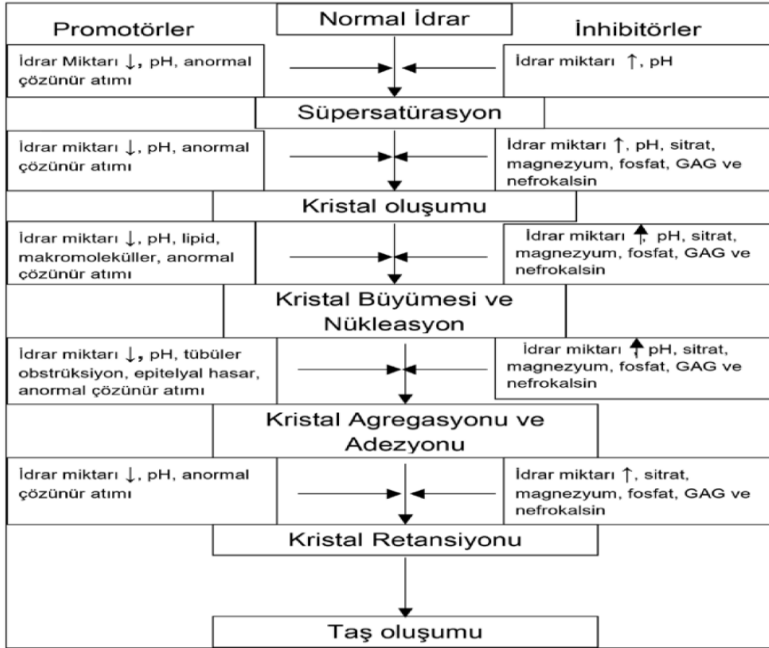
Kristalizasyon

Nükleasyon oluştuğunda, idrar, çökelen tuzlar bakımından süpersatüre kaldığı sürece, kristal gelişimi devam eder. Taş analizinde taşların yapısında birden fazla kristalin bulunduğu gösterilmiştir ve yaklaşık 2/3'sinde karma bir yapı söz konusu olup, en sık kalsiyum oksalat ve apatit bileşimi görülmektedir.⁷⁵ Farklı moleküler yapılarıdaki kristallerin hangi mekanizmalar ile etkileşime girdiği ve birbirine bağlandığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Belli kristallerin bir arada bulunma eğilimine bağlı olarak epitaksi kavramı öne sürülmüştür.⁷⁶ Eğer bir kristalin yapısı bir diğerine benziyorsa, ikinci kristal ilkinin üzerinde çekirdek oluşumu sağlayıp, büyüebilir. Bu durum kristallerin birbiri üzerinde yönlendirilmiş biçimde aşırı büyümesine yol açar. Bu süreç hem yapısal, hem de kimyasal uyuma bağlıdır. Epitaksinin rolü taş oluşumunda yoğun olarak araştırılmaktadır.⁷⁷ Özellikle, epitaksinin katkısını değerlendiren deneysel modellerin çoğu, saf inorganik kristaller arasındaki etkileşim üzerine kurulmuştur. Bu çalışmaların eksikliği, kristallerin organik matrisle ilişkili olarak şekillendiği idrar ortamını tam olarak yansıtamamalarıdır.⁷⁵ Kalsiyum oksalat taşlarında osteopontin ve albümin gibi idrar proteinlerinin, membran lipidleri ve membran yıkım ürünlerinin, metastabil bir solüsyonda heterojen nükleasyonu uyardıkları düşünülmektedir. Bu organik maddelerin kalsiyum oksalat ve fosfat kristalleri için yüksek ilgilerinin olduğu gösterilmiştir.^{78,79} İdrarda oluşan ufak kristaller, kimyasal ve elektriksel güçlerinin bileşimi ile toplanırlar. Bu işlem "agregasyon" veya "aglomerasyon" olarak adlandırılır ve kristal büyümesinden sorumlu olabilir.⁸⁰

Kristal Retansiyonu

Tüm bireylerde distal renal tübülüs kalsiyum ve oksalat içeriği olarak süpersatüredir. Nükleasyon ve kristalizasyona rağmen kristalüri az sayıda insanda taş oluşturur.⁸¹ Oluşan kristaller kolayca atılacağından ana mekanizma renal tübüllerde kristallerin büyümesi olana kadar yeterince uzun süre kristal retansiyon yeteneğidir.⁸¹ Kristal retansiyonunda ve taş oluşumunda serbest ve sabit partikül teorilerini de kapsayan üç mekanizma ileri sürülmüştür.⁸² Serbest partikül teorisi, süpersatüre tübüler sıvı varlığında nükleasyon ve kristal oluşumunun tübüler lümen içinde gerçekleştiğini öne sürmektedir. Kristaller daha sonra papiller toplayıcı kanallarda sıkışıp kalabilirler. Diğer yandan tübüler akımın fizyolojik

çalışmaları normal koşullarda kristal oluşumu ve Bellini kanallarını tıkamaya yetecek kadar büyümesi için yeterli zamanın olmadığını göstermiştir.⁸³ Sabit partikül teorisinde, kristaller ile renal tübüler epitel hücreleri arasında bir etkileşim olduğu ileri sürülmektedir.⁸⁴ Osteopontin ve hyaluronan gibi bazı bağlayıcı moleküller üzerinde yoğun olarak çalışılmıştır.^{85,86} Özellikle kalsiyum oksalat taşlarında hiperoksalürinin renal epitelyal hücrelerde hasara sebep olduğu ve bunun da kristal retansiyonuna katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Hiperoksalürinin epiteldeki etkileri oksidatif stres ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile ilişkilendirilmiştir.^{87,88} Epitel hasarı varlığında kalsiyum oksalat kristallerinin yüzeye yapışmasının arttığı gösterilmiştir.⁸⁹ Bu mekanizma vasküler sistemde görülen endotel hasarı ya da; aterosklerotik plak erozyonu varlığında trombositlerin agregasyonuna benzemektedir. İdiopatik kalsiyum oksalat taşlı hastalardan alınan papiller biyopsi örneklerinde suprafizyolojik düzeylerdeki oksalat varlığını destekleyici kanıtlar elde edilememiştir.⁸⁴ Şekil 1 taş oluşum sürecini göstermektedir.



Şekil-1 : Taş oluşum süreci

İnterstisyel Apatit (Randall) Plakları

Papiller kalsiyum birikimi (Randall plakları) subepitelyal (tip 1) veya intratübüler (tip 2, hidroksiapatit veya karbapatit) olarak sınıflandırılır. Renal papillada interstisyel kalsiyum fosfatın (Randall plağı) kristallerine idrardaki kristaller tutunabilir. Bu teoriye göre interstisyel plaklar ile başlangıçtaki lezyonlar aynı lokalizasyondadır. İnflamasyon nadir olup, birikintiler tübüler bazal membranla birlikte interstisyel kollajen materyaline esas oluşturacak şekilde yerleşir. Bu taşlar papillalara tutunmuştur. Randall plakları en çok idiopatik kalsiyum oksalat taşları ile karakterizedir. Otopsi çalışmalarında kalsiyum birikimi %20 renal papillada bulunmuş ve bu kişilerin 1/3'ünde o yerleşimde primer böbrek taşı saptanmıştır. Histoloji çalışmalarında birikimlerin nefron lümeninin içinden daha çok nefronun segmentlerine yakın papillanın interstisyel dokularında olduğu gösterilmiştir. Randall teorisine göre bu plaklar taş oluşumu için çekirdek görevi görür. Plaklar papillanın iç derinliklerine, vasa rektanin ve toplayıcı kanalların bazal membranına uzanır. Bu teoriye göre hasarlı papiller damarlar onarım sürecinde aterosklerotik benzeri etkiyle kalsifiye olmakta ve birikim renal papiller interstisyumdan papillanın derinliklerine ulaşmaktadır. Randall plaklarının vasküler teorisi 3 renal fiziyojiye dayanmaktadır. Birincisi bu alanda 'türbülans akım' vardır ve inflamasyon ile aterosklerotik değişikliklere zemin hazırlar. Genelde aterosklerotik plaklar arterlerin bifurkasyon yerlerinde oluşmaktadır. Öte yandan laminar kan akımı renal papillanın tepesinde türbülans akıma değişir, değişim aterosklerozdaki gibi ardından oluşacak plak oluşumu için ortam sağlar. İkinci olarak renal korteks ve papillanın tepesinde 'osmolalite' 10 kat veya daha fazla artar. Bu hiper ozmolar mikroçevrede, mevcut inflamatuvar sitokinler ve proteinler vasküler hasara cevap olarak plak agregasyonunu uyarır. Üçüncü olarak renal korteksten papillaların uçlarına doğru kan damarlarının 'oksijen taşıma kapasitesi'ndeki azalma eğilimi ileri sürülmüştür. Diabetes mellitus gibi ciddi vakalarda papiller nekroz, obstrüksiyon ve mikroçevrede inflamasyona sebep olur. Bu üç aterosklerotik inflamasyona benzer cevap ile perivasküler kalsifikasyon, Randall plak oluşumuna sebep olur. Aterosklerotik süreçteki esterleşmiş kolesterolün etkisi, kalsiyum oksalat taşlarının kolesterolle ilişkisinin araştırılmasına neden olmuştur. Artmış renal kan akımı ile artan türbülans, inflamasyon elemanlarının birikimine ve dolayısıyla taş oluşumuna öncülük eden vasküler olaylara sebep olur. Artmış kan akımı yanı sıra hiperfiltrasyona bağlı artmış çözünür madde yükü ve birikimi taş oluşumuna katkı sağlayabilir. Plak kapsamı idrarın kalsiyum atımı,

idrar miktarı ve pH'sı ile ilişkilidir. Apatit kristallerinin çevrelediği organik matriks ve kristaller laminar tarzda tabakalı halde gösterilmiştir. Papiller subepitelyal ve intratübüler kalsiyum fosfat (CaP) birikimleri kalsiyum oksalat (CaOx) taş oluşumunda önemlidir. Tüm taşların %70'i CaP içerir. Heterojen CaP nükleasyonunda majör uyarıcı faktör olarak fosfolipidler gösterilmiştir ve oksidatif stres sonucu proksimal tübüllerin fırçası kenarlarından salınır. Bütün makromoleküller taş oluşumu için uyarıcı faktör olan kalsiyum bağlayan bölge içerir. CaOx kristalleri CaP kristallerinin yüzeyinde gelişir. Heterojen nükleasyonun (spontan kristalizasyon) süpersatürasyon seviyesi homojen nükleasyonun seviyesine göre daha azdır. Taş oluşumundaki üç mekanizmanın birincisinde, idiopatik kalsiyum oksalat taşlarında Randall plaklarının rolü ortaya konulmaktadır.⁸² Plakların sayısı ve papillaların plak ile kaplı yüzeyinin yeri doğrudan kalsiyum oksalat taşlarının sayısı ve yeri ile ilişkilidir.⁹⁰ Plak ile kaplı yüzey, idrarda kalsiyum atılımı ile doğru, buna karşın idrar volümü ve pH değeri ile ters bir ilişki içindedir.⁹¹ Tipik olarak yüksek sıvı alımı, tiazid grubu diüretikler hiperkalsüriyi azaltmak için tedavide kullanılmaktadır. Mikroskopik düzeyde plaklar Henle kulbunun ince kolundaki bazal membranda oluşurlar.⁹² Birikintiler ürotelyumun bazal yüzeyine yakın bölgeye göç eder. Kalsiyum oksalat taşlarının oluşumundaki plaklar daima kalsiyum fosfat (apatit) yapısındadır.⁹² Tipik olarak plakların etrafında inflamatuvar reaksiyon yoktur. Araştırmalarda birbirini takip eden kristal ve organik matriksten oluşan katlı bir yapı oluşturmak üzere apatit kristallerini çevreleyen organik matriksin varlığı ortaya konulmuştur.⁸⁴ Apatit-organik tabaka birleşim yüzeyinde saptanan ve kalsiyum oksalat nükleasyonuna katkıda bulunabilecek osteopontin dışında organik matriksin yapısı henüz net olmayıp, potansiyel bir tedavi hedefini oluşturmaktadır.⁹³ Endoskopik görüntüleme sıklıkla Randall plaklarını örtecek biçimde araya giren ince bir ürotelyum tabakası gösterilmiştir. Bu karmaşık glikoprotein tabakası farklı glikozaminoglikanları içerir.⁹⁴ Apatit kristalleri, organik matriks ve glikoprotein tabakanın, kristal tutulumu ve formasyonunu uyaracak şekilde birbirleriyle hangi mekanizma ile etkileşim içinde oldukları henüz net değildir.⁸⁴ İkinci mekanizmada renal tübüler kristal depozisyonu (çökmesi) ileri sürülmüştür. Kalsiyum fosfat ile ilişkili olarak ortaya çıkan plakların yapısı ve yeri, kalsiyum oksalat taş hastalığında görülenden farklıdır. Kalsiyum fosfat taşlarının ("brushite" -kalsiyum mono hidrojen fosfat) prevalansı gittikçe artmaktadır.⁹⁵ ESWL'nin yaygın olarak kullanılması ile birlikte kalsiyum fosfat taş hastalığının prevalansı artmıştır.⁷⁰ Mekanizması net olmasa da, ESWL'nin papiller ve medüller hasara yol açabildiği

ileri sürülmektedir.⁹⁵ Hiperkalsüriye ek olarak kalsiyum fosfat taşları genellikle yüksek idrar volümü ve pH değeri ile ilişkilidir.⁹⁶ Mikroskopik seviyede brushite taşları iç medüller toplayıcı kanallar ve Bellini kanallarının lümenini dolduran apatit tıkaçları ile karakterizedir, plak duktal dilatasyona sebep olur ve renal toplayıcı sisteme protrüze olur.⁸² Bu durumda interstisyel inflamasyon ve fibrozis ile sonuçlanan epitelyal hücresel hasarı vardır. Buna karşın kalsiyum oksalat taşı oluşturanlarda Randall plakları, intratübüler kristallerin olmaması ve apatit plaklar etrafında inflamatuvar yanıtın bulunmaması ile karakterizedir. Endoskopik olarak plaklar subötelyal alanda yerleşmiş veya toplayıcı sisteme uzanan büyük, sarı birikintiler olarak görülürler. Primer hiperparatiroidizm ve distal renal tubüler asidoz varlığında iki mekanizmanın kombinasyonu ileri sürülmüştür. Tubüler ve interstisyel apatit plakları ile bunlarda interstisyel fibrozis gösterilmiştir.⁸² Artan obezite oranlarının taş hastalığının prevalansındaki artış ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Obezitenin idrar parametrelerini, ürik asit, kalsiyum, oksalat ve sodyum atılımının artması ile olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir.⁹⁷ Obezitedeki bariatrik cerrahi, yüksek hiperoksalüri oranları ve 5 yıl içinde kalsiyum oksalat taşı gelişimi ile ilişkilendirilmektedir.⁹⁸ İdiyopatik oksalat taşı oluşturanlardan farklı olarak intestinal diversiyon yapılan hastalarda Randall plakları nadiren görülür.⁹² Bu gibi hastaların biyopsileri intratübüler apatit kristal çökmesi olduğunu göstermektedir. Bu hasta grubunda hiperoksalüriye rağmen plaklar oksalat içermez. Apatit ile duktal obstrüksiyon ve ardından gelişen interstisyel fibrozisin pH regülasyonunu bozduğu öne sürülmektedir.⁹⁹ Üçüncü mekanizma olarak serbest solüsyonda kristalizasyon ileri sürülmüştür. Bu mekanizmanın en iyi örneği sistinüri hastalarıdır. Bu otozomal resesif (OR) durum dibazik aminoasitlerin (arginin, lizin, ornitin, sistin) transportundaki aksaklığa bağlı olarak aşırı sistin atılımı ile sonuçlanmaktadır.¹⁰⁰ Sistin taşı olanlarda Bellini kanalları ve intramedüller toplayıcı kanallarda sistin ve apatit tıkaçlarının her ikisinin de bulunduğunu göstermiştir.¹⁰¹ Sistin taş hastalığının patogenezinde apatit plaklarının rolü ve sistin kristallerinin yapışmasındaki etkileri henüz netleşmemiştir. Taş oluşumunda serbest partikül teorisine destek olarak idrarda söz konusu yüksek konsantrasyonlarda sistinin bellini kanallarında kristalize olup, renal pelvise uzanabileceği düşünülmektedir. Tip 1 ve tip 2 primer hiperoksalüri otozomal resesif (OR) özellikte kalıtsal hastalıklardır. Oksalatın aşırı üretimi hiperoksalüriye ve sistemik oksalozis ile kalsiyum oksalat taş oluşumuna sebep olur.

Taş Oluşumu ve Büyümesinin Baskılayıcı ve Uyarıcıları

Tablo 2’de böbrek taşı oluşumunu baskıladığı düşünülen çeşitli maddeler listelenmiştir.⁹⁶ Taş oluşumunun, idrar süpersatürasyonu ile idrardaki inhibitör maddeler arasındaki bir dengesizlikten kaynaklandığı ileri sürülmüştür.¹⁰² Kalsiyuma bağlanarak süpersatürasyonunu azaltan ve kalsiyum içeren

Tablo 2: Taş oluşumunu etkileyebilen baskılayıcı üriner maddeler.

- Albumin
- Kalgranulin
- Sitrat
- Glukozaminoglikanlar
- İnter- α -inhibitör
- Magnezyum
- Nefrokalsin
- Osteopontin
- Protrombin F1 fragman
- Pirofosfat
- Renal litostatin
- RNA / DNA parçacıkları
- Tamm-Horsfall protein

taşların önlenmesinde potasyum sitrat şeklinde kullanılan sitrat dışında diğer inhibitör maddelerin hiçbirinin bugün için tedavi amacıyla kullanımı yoktur. Kalsiyum oksalat monohidrat kristal agregasyonunun önemli bir inhibitörüdür. Tamm-Horsfall proteinin (THP) fonksiyonu idrar pH’sı ve konsantrasyonuna bağlıdır. İdrar pH’sı düşük ve konsantrasyonu yüksek olduğunda THP’nin kristallerin agregasyonunu uyardığı düşünülmektedir. Tersine konsantrasyonu düşük, alkali idrarda ise THP, kristal agregasyonu ve büyümesinde inhibitör etkiye sahiptir.¹⁰³ İnhibitör moleküllerin çoğu, anyonik bağlarla

kalsiyum atomlarına bağlanır ve bu sebeple kristal büyümesini önlerler. Glikozaminoglikanlar gibi makromoleküller kristal agregasyonu ve büyümesini baskılar, kristal nükleasyonunu ise uyarır. Nefrokalsin genellikle taş oluşumunu baskılayıcı etki göstermesine rağmen, bazı kalsiyum oksalat monohidrat taşlarında bireylerde nefrokalsin moleküllerinde γ -karboksik glutamikasidin bulunmadığı ve bunun da taş oluşumunu baskılayıcı fonksiyonların kaybı ile sonuçlandığı gösterilmiştir.¹⁰⁴ Staz / obstrüksiyon, nörojenik mesane işlev bozukluğu, konjenital anatomik anomaliler ve kalıcı kateterler gibi yabancı cisimlerin varlığında üriner enfeksiyon gelişebilir, bu ise taş oluşumunda litojenik substrat olarak önemli bir faktördür.¹⁰⁵ Magnezyum amonyum fosfat (struvite) taşlarını oluşturan üreaz üreten bakteriyel enfeksiyonların (klebsiella, proteus, pseudomonas, stafilokok) rolü kanıtlanmıştır. Bu enfeksiyonlarda idrardaki üre, amonyak ve karbondioksit yığılır, ardından amonyum iyonları ve bikarbonata hidrolize olur. Daha sonra katyonlara bağlanmasıyla magnezyum amonyum fosfat ve karbonat apatitin oluşması ile sonuçlanır.¹⁰⁶ Sitrata kalsiyum gibi üriner katyonlarla kompleks oluşturabilme yeteneğine bağlı olarak koruyucu rol oynar. Üriner enfeksiyonların varlığında sitratin bakteriler tarafından metabolize edilmesiyle baskılanma daha az olur.¹⁰⁷

Kristalizasyonda, agregasyon için matriks oluşumu bakterinin içinde veya etrafında lokal inflamasyon ve salgılanan mukusla olur. Ürenin yıkım ürünleri ise bakteriyel adheransı artırabilen ürotelyal hasarı uyarabilir. Bakteriyel enfeksiyonun tedavisi bakteriyel biyofilmler nedeniyle oldukça zordur. Biyofilmlerin içindeki bazı organizmaların planktonik bakterileri eradike etmek için gerekli olan dozlardan 1000 kat daha fazla antibiyotik konsantrasyonlarında yaşayabildikleri gösterilmiştir.¹⁰⁸ Biyofilm, ekzopolisakkarid (EPS) matriksi, diğer biyolojik bileşenlerle kaplanmış ve sıvı-yüzey ara yüzüne tutunmuş mikroorganizmalar topluluğu olarak tanımlanabilir.¹⁰⁹ Biyofilmdeki direncin 3 mekanizmayla oluştuğu düşünülmektedir. Birincisinde biyofilmlerin EPS matriksi, şelasyon, yıkım ve doğrudan blokaj destrüksiyon yoluyla antimikrobiyal ilaçların penetrasyonunu önler. İkinci olarak biyofilm içerisinde bazı antibiyotiklerin etkisini bozacak anaerobik, değişmiş pH ve/veya kimyasal yapı içeren mikro çevreler gelişebilir.¹¹⁰ Sonuncu mekanizmada ise antibiyotik tedavisine ileri derecede dirençli hücrelerin gelişimi söz konusudur. Bu gibi hücreler antibiyotik tedavisi varlığında uyku durumuna geçip, antibiyotikler subterapötik seviyelere düştüğünde patojenik fonksiyonlarını tekrar kazanma yeteneğine sahiptirler.¹¹⁰ At

nalı böbrek, UPJ obstrüksiyonu, kaliks divertikülü ve medüller sünger böbrek gibi bir dizi konjenital veya kazanılmış anatomik anomalisi olan böbrek taşları gelişimi bakımından üriner staz etkisiyle risk oluşturur.¹¹¹ Staz üriner enfeksiyona zemin hazırlar ve kristal retansiyonunu uyarır. Bazı araştırmacılar bu hastalarda daha yüksek oranlarda metabolik anomalilerin olduğunu da ileri sürmüşlerdir.¹¹² Büyük olasılıkla bu faktörlerin hepsinin kombinasyonu taş oluşumuna katkı yapmaktadır.

1.4. OBEZİTE,METABOLİK SENDROM ve TAŞLAR

Obezite tüm dünyayı etkileyen epidemik bir sorundur. Avrupa ülkelerinde obezite görülme sıklığı erkeklerde %10-27, kadınlarda %38 civarındadır.¹¹³BMI 30 kg/m² nin üzeri olarak değerlendirildiğinde A.B.D de obez erişkinlerin oranı 2013-2014 CDC verilerine göre %37 olarak saptanmıştır. Amerikan erişkin popülasyonunun %5 ten fazlasında morbid obezite mevcuttur.¹¹⁴ Dünya genelinde 300 milyondan fazla insanın obez olduğu düşünülmektedir.¹¹³

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda daha yüksek BMI, kilo fazlalığı ve bel çevresindeki artış gibi faktörlerin artmış renal taş oluşumu ile ilgili olduğu anlaşılmıştır.¹¹⁵ Gerçekten de 6000 taş oluşturuca kişi üzerinde yapılan bir çalışmada 120 kilonun üzerinde olanlarda 100 kilonun altında olanlarla kıyaslandığı zaman kalsiyum, oksalat ve ürik asidin üriner ekskresyonunun önemli ölçüde artmış olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte 2176 erkek ve kadın taş oluşturuca ile 1097 sağlıklı erkek ve kadın grubu ile yapılan HPFS (Health Professionals Follow Up) ve NHS (Nurses Health Studies) 1-2 çalışmalarda BMI ve üriner kalsiyum arasındaki pozitif ilişkinin, özellikle diyetdeki tuz ve protein içeriği ile üriner sodyum ve fosfat düzeyinin değiştirilmesi sonrası ortadan kalktığı gösterilmiştir.¹¹⁶ Diğer taraftan üriner pH BMI ile ters yönde ilişkilidir, daha obez kişiler daha düşük üriner pH a sahiptir.¹¹⁷ Obez kişilerde özellikle ürik asit nefrolitiazisinde artış sözkonusudur.

Abdominal ya da santral obezite, metabolik sendromun anahtar özelliklerinden birisidir. Avrupada yaşayanlar için bel çevresinin erkeklerde 94,kadınlarda 80 cm nin,Amerikalılar içinse erkeklerde 102, kadınlarda 88 cm nin üzerinde oluşu santral obeziteyi tanımlamaktadır. Obezite ve metabolik sendromun dünyada artan prevalansı ,başlıca patofizyolojik mekanizması, idrar pH sında azalmaya paralel olarak meydana gelen ürik asit oluşumundaki artış olan bir nefrolitiazis epidemisinin kendisini takip edebileceğini düşündürmektedir. Sıkça yapılan bariatrik cerrahiler sonrası gerçekleşen hiperoksalüri yoluyla da kalsiyum oksalat taşlarının prevalansında artış gözlenmektedir.

PATOFİZYOLOJİ

Düşük pH lı idrarda ürik asit primer olarak zayıfça çözülebilir dissosiyeye olmamış ürik asit formunda bulunur.¹¹⁸ Bu durumda ürik asit ekskresyonu tamamen normal olsa dahi kristalizasyon ve taş oluşumu meydana gelebilir. Düşük idrar pH sının primer gut hastalarında sıkça görülmesi başlangıçta idiyopatik ürik asit nefrolitiazisinin primer gut hastalığı belirtisi olduğunun kabul edilmesine yol açmıştır.¹¹⁹ Ancak bunu takiben yapılan iki çalışmada normoürükozürik ürik asit oluşturucu birçok hastada tespit edilen düşük idrar pH sının başlıca nedeninin azalmış renal amonyum ekskresyonu olduğu saptanmıştır.¹²⁰ Ayrıca ürik asit oluşturucu kişilerde asit yüklenmesi sonrası üriner amonyum ekskresyonundaki artışın kalsiyum taşı oluşturucular ya da sağlıklı kontrollere göre 5-7 kat daha düşük oranda olduğu da anlaşılmıştır.¹²¹

A.B.D de 5000 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada vücut ağırlığı ve idrar pH ı arasında ters bir ilişki olduğu anlaşıldı.¹¹⁷ Çalışma sonuçlarına göre daha obez kişiler belirgin biçimde daha düşük üriner pH değerlerine sahipti, ek olarak kalsiyum taşı oluşturucuların veya sağlıklı kontrollerin hiçbiri diyabetik özellik taşımazken, ürik asit oluşturucuların 3 te 1 inde diyabet saptandı.¹²¹ Benzer şekilde yapılan farklı bir çalışmada¹²² düşük üriner pH değerleri ve azalmış üriner amonyum ekskresyonu olan ürik asit oluşturuculara insülin direncinde artış, belirgin biçimde daha fazla bel çevresi değerleri ile daha yüksek kan basıncı, açlık kan glukozu, trigliserid değerleri ve daha düşük HDL kolesterol düzeyleri olduğu gözlenmiştir. Daha düşük üriner pH daha yüksek insülin direnciyle ilişkili olup asit atılımına eşlik eden amonyum ekskresyonu da öncelikle insülin sensitivite düzeyleriyle korele gibi görünmektedir.¹²² Hayvan çalışmalarında insülinin renal proximal tübülde L-glutamin den amonyak üretimini arttırdığı ve amonyağın tübüler lümene salgılanmasını sağlayan Na⁺/H⁺ antiporter ını uyardığı saptanmıştır.¹²² İnsülin direnci ile ortaya çıkan amonyagenezisteki azalma beraberinde düşük idrar pH ını getirir. Sonuç olarak ürik asit oluşturucular metabolik sendrom tanısı için gereken kriterleri taşımaya daha yatkın olup sağlıklı kontrollere göre daha düşük üriner amonyak düzeyi ve daha düşük üriner pH değerlerine sahiptirler.

Kalsiyum oksalat taş oluşum mekanizmaları ürik asit taşlarınınkinden daha kompleks olup genel olarak düşük idrar volümü, hiperkalsiüri, hiperürükozüri, hipositratüri, hiperoksalüri ve idrar pH düzeyindeki anormallikleri içerir. Bunlar içerisinde hiperkalsiüri, kalsiyum litojenezi açısından en önemli faktördür. Yüksek sodyum düzeyi kalsiyum tuzlarının kristalizasyonuna

ve bu yolla sitrat düzeyinde azalmaya yol açarak ürolitiazise zemin hazırlar.¹³⁶ Sistemik asidoz ve protein fazlalığı ya da yüklenmesi de hiperkalsiüri nedeni olabilirler.¹³⁶ Hiperoksalüri saturasyonu arttırarak dolaylı yoldan kalsiyum içeren taş oluşumunu arttırır. Esansiyel yağ asitleri omega 3 ve omega 6 arasındaki sistemik dengesizlik hiperoksalüri ve hiperkalsiüriden sorumlu olan fosfolipid arasıdonik asit yüksekliğine neden olur.¹³⁷ Kalsiyum fosfat taşı oluşumu ise kalsiyum oksalat taşı oluşumundan mekanizma olarak farklılık gösterir. Kalsiyum fosfat taşı iç medüller toplayıcı kanallarda apatit kristallerinin deposizyonu ile karakterizedir. Henlenin kalın çıkan kolunda anormal bikarbonat reabsorpsiyonu idrar pH'ında yükselmeye ve kalsiyum fosfat taşı oluşumuna yol açar.¹³⁸ Kalsiyum oksalat taşı oluşumu riski metabolik sendrom varlığında daha fazladır. Normal şartlarda östrojenin üriner süpersaturasyonu önleyici etkisi ve daha yüksek üriner sitrat düzeyleri gibi nedenlerle böbrek taşı hastalığı gelişimi açısından, erkeklere nazaran % 4-9 civarında daha düşük prevalansa sahip olmalarına karşın metabolik sendrom durumunda risk kadınlarda erkeklere göre daha fazla görünmektedir.¹⁰ Metabolik sendrom modeli oluşturulmuş sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada¹²³ insülin direncinde artışla birlikte düşük üriner pH, azalmış sitrat atılımı ve artmış kalsiyum atılımı gibi nedenlere bağlı kalsiyum oksalat taş oluşumunda artış gözlenmiştir. Benzer şekilde metabolik sendromlu bir sıçan modelinde insülin direncinin üriner taş oluşum riskini arttırdığı saptanmıştır.¹³⁹ Metabolik sendromun sıklığı ve böbrek taşlarının %80 civarının kalsiyum oksalattan oluştuğu düşünüldüğünde taş oluşumuyla ilişkili üriner risk faktörleri ve metabolik sendrom özellikleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların yapılması kritiktir. Kalsiyum oksalat taşı saptanan 198 hastanın, ürolitiazis öyküsü bulunmayan 200 katılımcıdan oluşan kontrol grubuyla birlikte antropometrik karakteristikleri ve biyokimyasal profilleri yönünden değerlendirildiği retrospektif nitelikli bir çalışmada BMI >30 üzeri olanların <30 olanlara kıyasla 2,54 kat daha fazla kalsiyum taşı gelişim riskine sahip oldukları ve obezitenin erkek ve kadınlarda kalsiyum taşı riskini arttırdığı saptanmıştır.¹²⁴

Aynı çalışmada diyabetik erkeklerde kalsiyum oksalat taş hastalığı riski belirgin derecede daha fazladır. Benzer şekilde hipertansiflerde de normotansiflere nazaran kalsiyum oksalat taşı hastalığı riski önemli ölçüde artmıştır. Sarıca ve arkadaşları, vücut ölçülerindeki artışın oksalat, kalsiyum ve sitrat gibi üriner taş oluşturucu risk faktörlerinin ekskresyonunu da arttırdığını ortaya koymuştur.¹²⁵ BMI değeri yüksek olan idiopatik kalsiyum oksalat taşı

oluşturucularında üriner taş promotörleri önemli ölçüde artmıştır.¹²⁶ Diyabetik hastalarda böbrek taşı öyküsü ve tekrarlayan taş hastalığı epizodları daha sıktır.^{127,128}

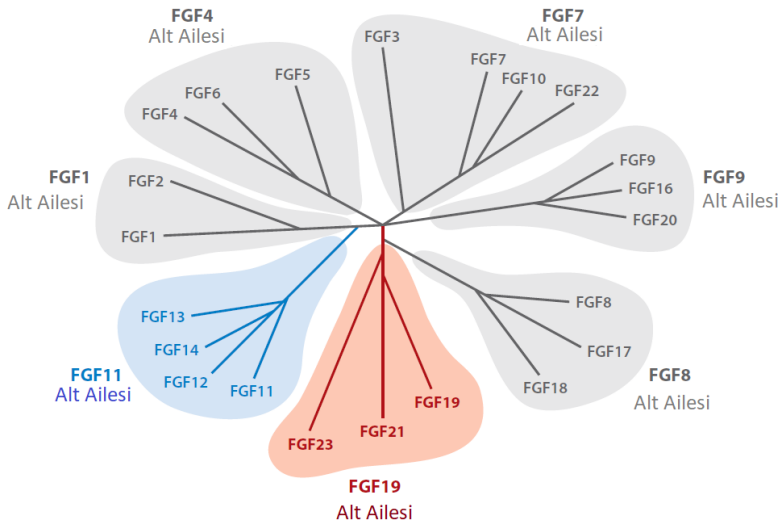
Böbrek taşı hastalığı olanlarda hipertansiyona daha sık rastlanmaktadır.^{132,133} Hipertansiyon ve üriner taşlar arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik hayvan çalışmalarında hipertansif rodent modellerinde hiperkalsiüri ve metabolik asidoz saptanmıştır.¹²⁹ Klinik bir çalışmada hipertansif hastalarda artmış hiperkalsiüri gösterilmiştir.¹³⁰ Hiperkalsiürinin yanısıra metabolik asidoza bağlı olabileceği düşünülen hipositatüri de hipertansif hastalardaki artmış üriner taş oluşumunun nedenleri arasında gösterilebilir. Dislipidemi de , obezite ve diyabet gibi diğer metabolik sendrom komponentlerinden bağımsız olarak artmış böbrek taşı insidansı ile ilişkili olabilir.¹³⁴ Bu durum özellikle ürik asit taşları ve bir dereceye kadar kalsiyum oksalat dihidrat taşları için geçerlidir. Lipid profilindeki değişiklikler üriner taş oluşum riskini etkileyebilir. Yüksek total kolesterol ve trigliserid düzeyleri ile düşük HDL düzeyi daha asidik idrar ve üriner taş oluşumuyla ilişkilidir. Hiperlipidemik diyetle beslenen sıçanlarda da nefrokalsinozis ortaya konmuştur.¹³⁵

Metabolik sendromu belirleyen özelliklerin birlikteliği de eşlik eden böbrek taşı hastalığının şiddetini etkilemektedir.¹³¹ Her birey için bu özelliklerin daha fazla sayıda birlikte oluşu aynı zamanda hiperkalsiüri, hiperürükozüri, hipositatüriyi ve daha az oranda da olsa hiperoksalüriyi arttırmıştır.¹³¹

1.5. FGF-23 ve KLOTHO

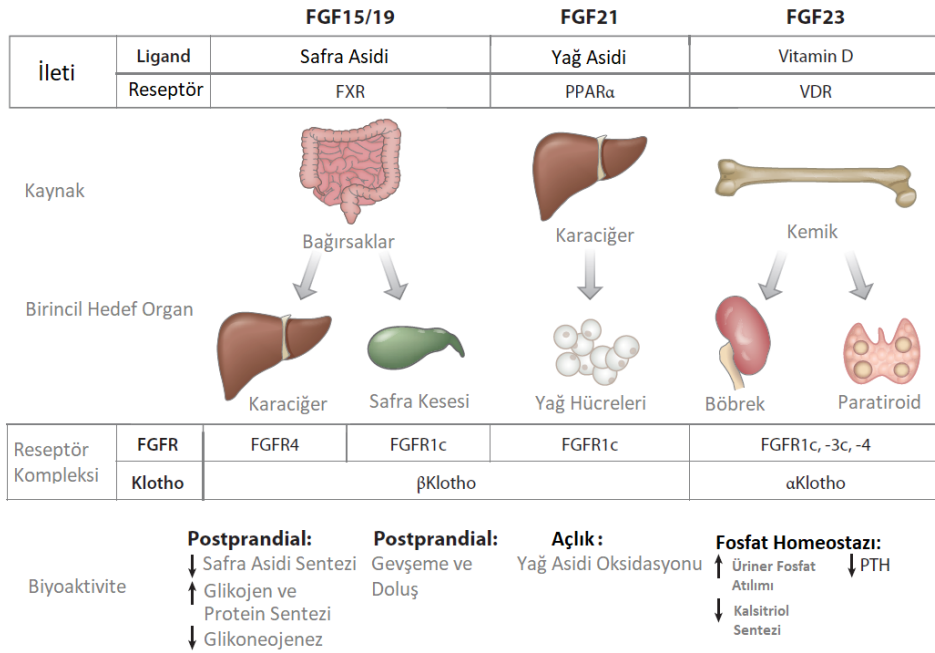
1.5.1. Fibroblast Growth Factor Ailesi

FGF ler embriyonik gelişim, organogenez, anjiyogenez, yara iyileşmesi ve metabolizmanın da içerisinde olduğu geniş bir biyolojik süreç spektrumu üzerinde pleiotropik etki potansiyeline sahip peptidlerden oluşan büyük bir süperailedir.¹⁴⁰ Bu ailenin üyeleri β -üçlü yonca yapısı ile karakterize FGF homoloji bölgesi taşırlar.¹⁵² Fibroblast büyüme faktörü olarak değerlendirilebilecek ilk protein aktivitesi ilk kez 1973 te sığır hipofizinde gösterilmiştir.¹⁵⁸ İnsanlarda filonenik olarak 7 alt aileye ait toplamda 22 FGF tespit edilmiştir.¹⁴⁰ Bunlar, FGF1 (fgf 1 (asidik FGF)-fgf 2 (Bazık FGF)) , FGF4 (fgf4,5,6), FGF7 (fgf 3,7,10,22), FGF 9 (fgf9,16,20), FGF 8 (fgf8,17,18) , FGF11 (fgf 11,12,13,14) ve FGF 19 (fgf 19,21,23) alt aileleridir.(Şekil 2) 1, 4, 7, 8 ve 9. alt aileler otokrin ve parakrin etkili FGF lerdir.



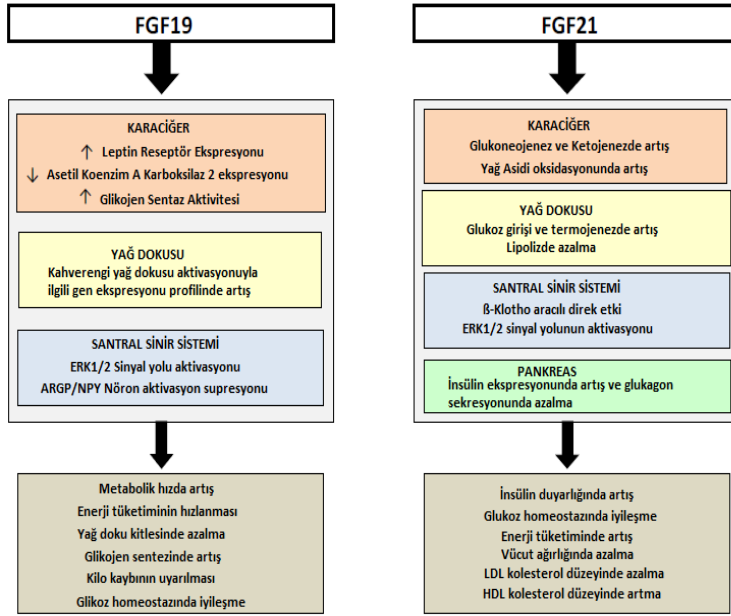
Şekil 2: İnsan FGF filogenetik ağacı. Dalların uzunluğu her bir genin diğerine evrimsel uzaklığını ortaya koyar.

FGF 11 alt ailesi FGF reseptörüne bağlanmaksızın intrasellüler medyatörler olarak fonksiyon görürler, bu yüzden nükleer ya da iFGF olarak isimlendirilirler. FGF 15 farelerdeki insan FGF 19 eşdeğeri olup insan FGF 15 i bulunmamaktadır. FGF 19 alt ailesi ise sirküle eden ve diğer FGF lerin lokal etki profilinin aksine sistemik etkilere sahip "Endokrin FGF" lerdir. Normalde FGF ler heparan bağlayıcı proteinler olup bu durum FGF sinyal iletiminde önem arzeder. Endokrin FGF grubu üyeleri ise aktif heparan sülfat bağlama bölgesi olmadığı için heparan sülfattan zengin ekstrasellüler matris ile hidrojen bağları kuramamakta, bu durum kan dolaşımına karışmalarına imkan sağlamaktadır. Endokrin FGF'lerin bu özelliği aynı zamanda FGF reseptörlerine affinitelerinin düşük olmasına neden olmakta, reseptörlerine bağlanmak ve aktive etmek için heparan sülfat yerine bir kofaktörü zorunlu hale getirmektedir ki bunlar klotho proteinleridir. FGF-23 için kofaktör α -Klotho iken diğerleri için Beta-Klothodur.¹⁴⁰

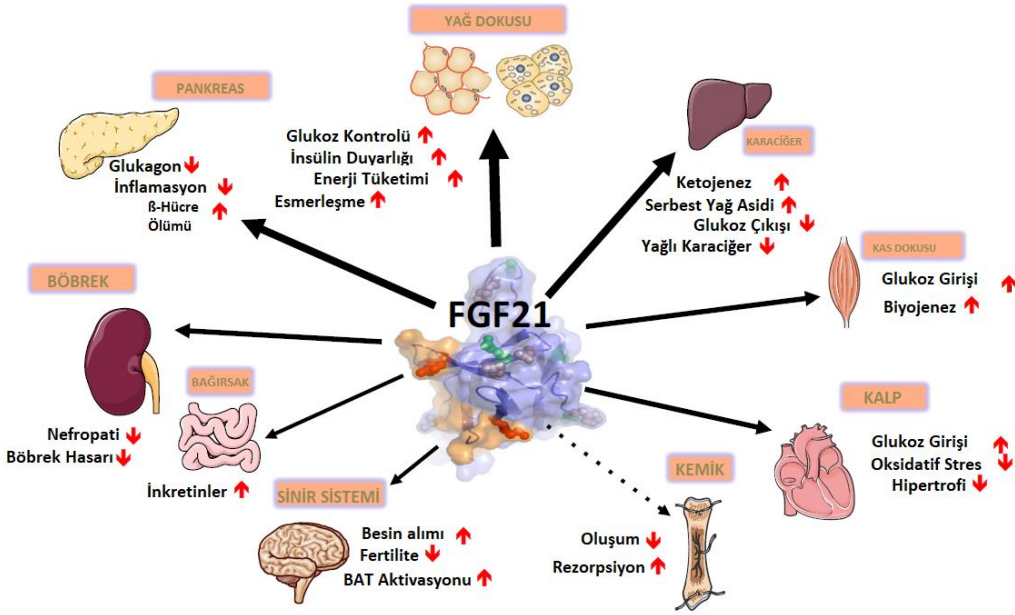


Şekil-3 : Endokrin FGF-Klotho aksları.

FGF 19 alt ailesi endokrin etkilerini esasen enerji ve mineral metabolizması üzerinde gösterir (Şekil-3,4,5). Primer olarak sırasıyla ince barsak, karaciğer ve kemikte eksprese edilirler.



Şekil-4 :Endokrin fibroblast büyüme faktörleri FGF 19 ve FGF 21 in karbonhidrat metabolizması ile ilişkili rolleri



Şekil-5: FGF 21 in doku spesifik koruyucu etkileri

FGF ligandlarının bağlanmasıyla aktive edilen FGF reseptörleri, çeşitli sitozolik adaptör proteinleri ile RAS-MAPK,PI3-AKT,PLCγ ve STAT gibi bazı hücre içi sinyalizasyon yollarıyla etkileşime aracılık edecek spesifik tirozin rezidülerini fosforile ederler.¹⁴¹

Fibroblast Growth Factor reseptör ailesi temelde 4 üyeden oluşur; FGFR1, FGFR2, FGFR3 ve FGFR4.¹⁴¹ FGFreseptörleri immünglobulin süperailisine ait transmembran tirozin kinazlardır.¹⁴² Reseptörler ekstrasellüler alanda 3 Ig-tip bölge (D1,D2,D3),1 single-span (membranı bir kez kateden) transmembran bölge ve 1 adet intrasellüler tirozin kinaz bölgesine sahiptirler. İlk Ig benzeri bölge olan D1, reseptör oto-inhibisyonunda rol alırken, D2 ve D3 alanları FGF ligandlarının bağlanma alanlarıdır. D3 ayrıca, ligand bağlanma spesifitesini belirleyici özelliğe de sahiptir, heparan sülfat bağlantısı D3 aracılığıyla

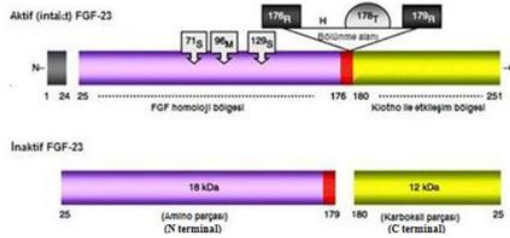
sağlanır.¹⁴¹ Alternatif mRNA splicing ile FGF reseptörlerinin farklı (b,c) varyantları meydana gelir ki bu mekanizmayla 7 FGFR alt tipi oluşur.¹⁴¹ Herbir alt tip belirli FGF alt gruplarını bağlar. FGF1, 7 reseptör çeşidini de bağlaması açısından bu açıdan prototip bir üniversal ligand olma niteliği taşır. Yakın zamanda FGFR ailesinin 5. bir üyesi daha keşfedilmiştir: FGFR5 (FGFRL1).¹⁴³ FGFR5, tirozin kinaz bölgesinden yoksun olup ,hücresele proliferasyon üzerinde inhibitör,differensiyasyon üzerinde ise promotör etkiyi iletir.¹⁴³

FGF ler yukarıda da belirttiğimiz gibi multifonksiyonel proteinler olup öncelikle mitojenik ve ek olarak düzenleyici, morfolojik ve endokrin etkilere sahiptirler. FGF hem omurgalı hem de omurgasızların gelişim sürecinde rol alır ve disfonksiyonları çeşitli gelişimsel defektlere yol açar.^{144,145} FGF1 ve 2 nin önemli bir fonksiyonu endotelial hücre proliferasyonunu ve endotel hücrelerinin tüp benzeri formasyona dönüşümünü,dolayısıyla anjiyogenezisi uyarmasıdır. FGF1-2 , VEGF ve PDGF den daha potent anjiyojenik faktörlerdir.¹⁴⁶ FGF1 ve 2 nin bu anjiyojenik etkisini kalpte de gösterdiği ortaya konulmuştur.¹⁴⁷ Yara iyileşmesinde de FGF 1 ve 2 nin damarlar ve fibroblast proliferasyonu üzerine etkileri granülasyon dokusunun oluşması açısından önem taşırken, aynı zamanda keratinocyte growth factor leri olarak ta bilinen FGF7 ve FGF10, doku remodelizasyonunda epitelyal kemotaktik etkilere sahiptir. Santral sinir sistemi gelişiminde FGF ler nöral kök hücre, nörojenez, axon gelişimi ve diferensiyasyonu açısından önemli rol oynarlar. FGF sinyalizasyonu gelişmekte olan serebral kortekste, nöronal diferensiyasyonu azaltıp kortikal progenitör hücrelerin yenilenmesini sağlayarak yüzey alanının büyümesini tetikler.¹⁴⁸ Fare beyni üzerinde yapılan bir hayvan çalışmasında FGF2 verilmesi ile kortikal girifikasyon sağlanmıştır.¹⁴⁹ Diğer bir FGF aile üyesi FGF8, serebral korteks fonksiyonel alanlarının büyüklük ve yerleşimini düzenleyici etkiye sahiptir.¹⁵⁰ FGF ler yetişkin beyin fonksiyonlarının idamesinde de aktif rol oynar. Yetişkinlerdeki hipokampal nörojenez de önemli ölçüde FGF2 bağımlıdır. FGF 1-2 ,öğrenme ve hafızayla ilgili hipokampal fonksiyonlara katılırlar.¹⁵¹

1.5.2. FGF-23

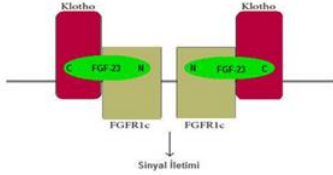
FGF23, endokrin FGF ler olarak ta adlandırılan FGF19 alt ailesinin bir üyesidir. FGF23 ilk olarak fare beyinde ventrolateral talamik nükleusta saptanmıştır.¹⁵³ Bunun yanısıra timüs,ince barsaklar ve kalpte de doku ekspresyonları saptanan FGF23 ün esas kaynağı

kemikte osteosit ve osteoblastlardır. Kodlayıcı geni Kromozom 12p13.3 te bulunan FGF 23, kemik tarafından ilk olarak 251 aminoasit uzunluğunda bir propeptid olarak sentezlenmektedir (Şekil-6). Bu propeptid 24 aminoasitlik bir sinyal peptidi ve dolaşıma salınan yaklaşık 227 aminoasitlik FGF 23 proteininden oluşmaktadır. Sinyal peptidi dolaşıma salınmadan uzaklaştırılmaktadır.¹⁵⁴ 32 kD ağırlığındaki FGF 23 proteini ise uğradığı O-glikozilasyon sonucu parçalanmaya karşı korunmaktadır. Biyolojik olarak aktif FGF 23 molekülünde üç adet O-glikozilasyon bölgesi bulunmaktadır. O-glikanların bir ya da iki olması proteolitik enzim etkisine açık hale gelmesine neden olmakta ve inaktif parçaların oluşumuna yol açmaktadır. O-glikozilasyonun engellenmesi sonucunda intakt FGF 23 sekresyonunda azalma gözlenirken C-terminal FGF 23 düzeylerinin normal veya yüksek olduğu belirlenmiştir.¹⁵⁵ FGF homoloji bölgesi amino uç (N-terminal) bölgesinde yer alır. Karboksil uç (C-Terminal) bölgesi ise kendine özgüdür ve FGF 23 ün sistemik etkilerinden sorumludur. Fgf 23 ün amino parçası FGFR 1 c ile etkileşime girerken, karboksil parçası ko-reseptörü alfa-klothoyu bağlamaktadır. Her iki etkileşim de FGF 23 ün in-vivo ve in-vitro aktivitesi için önem arz etmektedir.¹⁵⁶



Şekil-6: FGF 23 yapısı görülmektedir.

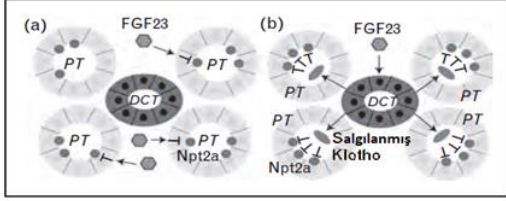
FGF 23 sentezinin en önemli uyarıcıları P ve D₃ vitamindir. Demir bileşikleri gibi bazı maddeler de FGF 23 sentezini arttırabilmektedir. Etkilerini en belirgin olarak FGFR 1c üzerinden gerçekleştirmekte ve α-klotho ko-reseptörüne ihtiyaç duymaktadır.¹⁵⁷



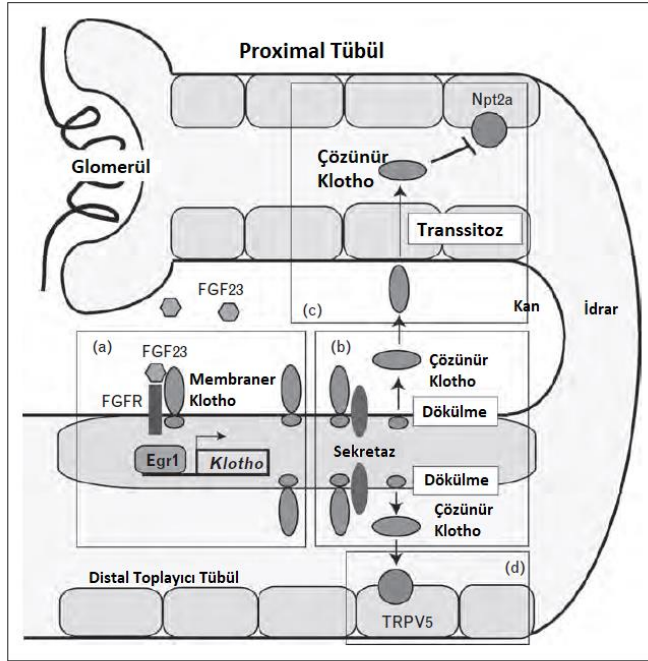
Şekil-7: FGF-23, α -Klotho ve FGFR1c nin oluşturduğu heterodimer kompleks

FGF 23 : Regülasyon ve Sinyalizasyon

FGF 23 endokrin bir hormon gibi fonksiyon görmektedir, başlıca kemik tarafından üretilmekte ve asıl etkisini özgün reseptörleri vasıtasıyla böbrekler üzerinde göstermektedir. FGF 23, olasılıkla serum fosfat ve kalsitriol düzeylerinin en önemli regülatörüdür. Esasen fosfatürik etkili olan FGF 23, bu etkisini proksimal tübülde Na bağımlı P ko-transporter ları olan NPT-2a, NPT-2c ve Pit-2 yi inhibe ederek gösterir.^{159,160} FGF 23 aynı zamanda aktif vitamin D sentezi için gerekli olan 1α -hidroksilazı kodlayan Cyp27b1 geninin ekspresyonunu azaltıp, vitamin D degradasyonunu sağlayan 24α -hidroksilazı kodlayan gen olan Cyp24 ün gen ekspresyonunu da artırarak kan vitamin D düzeylerini düşürmektedir. İlginç olarak FGF 23 proksimal tübül üzerine etkili gibi görünmekle birlikte, klotho ekspresyonu distal tübüllerde daha fazladır.¹⁶¹ Bir olasılık, düşük düzeylerde de olsa proksimal tübülde de klotho ekspresyonu bulunduğu için¹⁵⁹ FGF 23 ün proksimal tübülde etkileşime girerek az miktarda FGFR-Klotho kompleksi ile fonksiyonları düzenlemesi, diğer bir olasılık ise FGF 23 ün, klothonun bol miktarda ekspresye edildiği distal tübüllere etki etmesiyle meydana gelen olası parakrin faktörler aracılığıyla komşu proksimal tübülde fonksiyonların oluşmasıdır¹⁶¹ (Şekil 8,9). D vitamini metabolizması üzerindeki etkisine ek olarak FGF23 , paratiroid bezlerinden PTH üretimini baskılayıcı özelliğe sahiptir. Paratiroid bezinde distal renal tübüller gibi bol miktarda klotho ekspresyonu mevcuttur ki bu da paratiroidin FGF 23 için bir hedef organ olduğuna işaret eder¹⁶². D vitamini ve PTH ise kemik, böbrek ve paratiroid bezleri arasındaki feedback döngüler ile FGF 23 ün gen ekspresyonunu ve/veya kemikte sekresyonunu arttırmaktadır^{163,164,165} (Şekil 10).



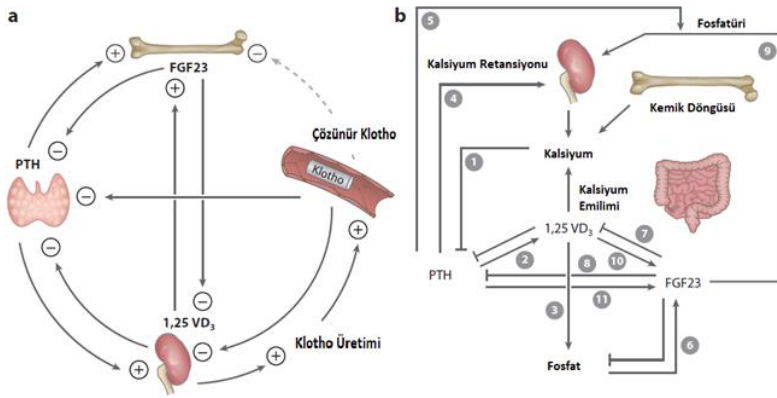
Şekil-8: Intrarenal parakrin bir faktör olarak klotho



Şekil-9: FGF 23 ün klotho bağımlı fosfatürük etkisine aracılık eden intrarenal parakrin sistem

Osteosit ve osteoblastlarda sentezlenen FGF23 için bilinen regülatörler PHEX (Phosphate Regulating Neutral Endopeptidase, X-linked), dentin matrix protein (DMP-1), fosfat yükü, yüksek vitamin D₃, düşük klotho düzeyleri, PTH ve etkinliği yakın zamanda tespit edilen

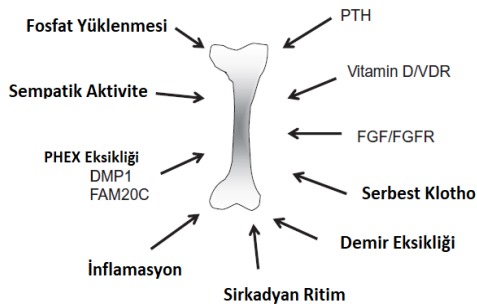
kalsiyumdur.^{166,167} PTH, FGF 23 ün aksine Cyp27b1 ekspresyonunu arttırarak kan aktif vitamin D düzeyini yükseltir. PTH, FGF 23 e benzer biçimde ancak ondan bağımsız olarak fosfatürik etkiye de sahiptir.¹⁶⁸ Vitamin D, VDR aracılığıyla FGF 23 ekspresyonunu arttırır. Fosfat, vitamin D den bağımsız bir şekilde FGF23 düzeylerini arttırmaktadır. Kan fosfat düzeylerindeki hızlı yükselişler FGF23 te artışa neden olmazken, diyetle kronik fosfat yüklenmesi kan plazma fosfat düzeyinde değişime yol açmaksızın FGF 23 te artışa neden olur.^{169,170} Bu konudaki gözlemler FGF 23 düzeyini regüle eden faktörün plazma fosfat olmadığını düşündürmüştür. Osteosit ya da osteoblastların fosfor metabolizmasına duyarlılık biçimleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Çok yüksek FGF 23 düzeyleri primer klotho eksikliğinde (genetik delesyon, mutasyonel hipomorf) ve çok daha yaygın olan öncelikle kronik böbrek yetersizliğine bağlı sekonder klotho eksikliğinde görülmektedir.¹⁷¹ Klothonun kemikte FGF 23 üretimini etkiliyor olabileceği ya da membrana yerleşik klothonun eksikliğine bağlı direnç nedeniyle FGF23 seviyesinin artabileceği düşünülmektedir.



Şekil-10: Fosfat ve kalsiyum metabolizmasının endokrin regülasyonu

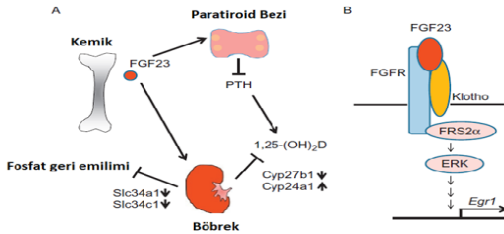
Sirkadyan ritimler ve sempatik aktivitenin de FGF 23 regülasyonunda rol aldığı düşünülmektedir.^{172,173} Sirküle eden fosfor düzeylerinin ritmik paternler gösterdikleri bilinmektedir. Fosfor metabolizması sirkadyan ritmlerin kontrolü altında olabilir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada kemiklerdeki FGF 23 ekspresyonunun sirkadyan ritm göstererek, karanlık fazda gerçekleşen ekspresyon düzeylerindeki piklere sahip olduğu ve

aynı fazda idrarla fosfat atılımında önemli artışın eşlik ettiği ortaya konulmuştur.¹⁷³ FGF 23 ekspresyonunun sempatik aktiviteyle olan ilişkisi henüz yeterince ortaya konamamış olsa da bu sistem myokard enfarktüsü ve KBY gibi durumlarda saptanan FGF 23 yüksekliği ile bağlantılı görünmektedir.¹⁷⁴ FGF reseptörlerinin de FGF 23 regülasyonunda rol aldığı belirlenmiştir. Non-ossifiye kemik lezyonları ve anormal mineral metabolizması ile karakterize Osteoglofonik displazi hastalığında FGFR1 deki heterozigot missense (kayıp) mutasyonları yüksek FGF 23 düzeylerine yol açmaktadır.¹⁷⁵ Fare modellerinin in-vivo analizi de FGFR1 sinyal kaskadının FGF 23 regülasyonunda rol aldığını ortaya koymuştur.¹⁷⁶ FGFR1 in FGF 2 tarafından aktivasyonu FGF 23 ekspresyonunu arttırmaktadır.¹⁷⁷ FGF 23 regülasyonunu özellikle sentez basamaklarında sağlayan bir diğer faktör demirdir. Demirin intakt FGF 23 ün degradasyonunda görev alan bazı enzimlerin kofaktörü olduğu ve degrade edilen bazı parçaların atılımında rol aldığı düşünülmektedir.^{179,180,181} Demir, intakt FGF 23 ün degradasyonunu inhibe eder. Dolayısıyla ferritinin yüksek oluşu C-terminal FGF 23 fragman düzeyinin düşük oluşuna yolaçar ve bu durum demir eksikliğinde FGF 23 artışını açıklar.¹⁸² FGF 23 düzeyleri, yukarıda belirtilen regülatör faktörlerin yanısıra leptin¹⁹⁷, östrojen¹⁹⁸ gibi hormonlar ve başta inflamasyon olmak üzere, insülin rezistansı, miyokard infarktüsü ve metabolik asidoza ilişkin çeşitli biyomarker lar ile pozitif biçimde ilişkilidir, ancak oluşan FGF 23 indüksiyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz yeterince açıklığa kavuşturulmamıştır. Şekil 11 de çeşitli FGF 23 uyarıcıları resmedilmiştir.



Şekil-11: FGF uyarıcıları

Belirttiğimiz gibi osteoblast ve özellikle osteositler büyük miktarda FGF 23 sentezlerler. Bunun yanısıra ince barsak,kalp,akciğerler,ventrolateral talamik nükleus,timus,kemik iliği venöz sinüzoidleri ve lenf nodlarında da FGF 23 sentezi yapılmasına karşın bu dokularda meydana gelen sentezin fizyolojik önemi bilinmemektedir.¹⁸³ FGF 23 ün reseptörüne bağlanabilmesi için primer yolak klotho proteini varlığını gerektirir ki bu anlamda FGF 23 hedef dokuları Klotho eksprese eden dokulardır. FGF 23, klotho ile birlikte FGFR 1c, 3c veya 4 ile kompleks oluşturur.¹⁸⁴ FGF 23,Klotho ve FGFR kompleksi oluşumu sonrası ERK (Extracellular Signal Regulated Kinases)/EGR-1 (Early Growth Response-1) gibi yolları içeren çeşitli sinyalizasyon şelaleleri aktive olur (Şekil 12). FGF 23 bu sinyal yolağını solubl klotho (sKl) ile de aktive edebilir. Membrana bağlı Klothoya benzer olarak sKl nun da FGFR ve FGF 23 ile protein kompleksi oluşturabileceği gösterilmiştir.¹⁸⁵ Ancak sKl ile FGFR ünün bağlanma ve sinyalizasyon kaskadlarını aktive etme gücü membran bağımlı klothoya göre daha düşüktür. sKl nun FGF 23 sinyalizasyonundaki in-vivo rolü, aşırı klotho eksprese eden bir fare modelinde gösterilmiştir.¹⁸⁶ Bu çalışmada kondrojenik hücrelerde FGF 23/sKl/FGFR3 kompleksinin kondrosit proliferasyonunu suprese ettiğinin gösterilmesinin yanısıra membran bağımlı klothonun eksprese edilmediği hücrelerde sKl nun FGF 23 etkilerine aracılık ettiği de ortaya konmuştur.Artan miktarda kanıt FGF 23 ün etkilerini klothonun yokluğunda da meydana getirebileceğini göstermektedir. Faul ve ark. FGF 23 ile uyarılmış sol ventrikül hipertrofinin klothodan bağımsız FGFR ve Calcineurin-NFAT sinyal yolağı ile başarıldığını göstermiştir.¹⁸⁷ Benzer şekilde FGF 23 yine klothodan bağımsız bir şekilde Calcineurin-NFAT yolağı ile PTH yı suprese edebilmektedir.¹⁸⁸ Fazla miktarda FGF 23 ün klotho eksprese etmeyen osteoblastik hücrelerde osteogenezisi baskıladığı gösterilmiştir. Mevcut çalışma ve kanıtlara karşın FGF 23 ün klotho yokluğunda FGFR ünü aktive etme mekanizmaları açıklığa kavuşturulmayı bekleyen sorular arasındadır.¹⁸⁹



Şekil-12: FGF 23 ün böbrek ve paratiroid üzerindeki etkileri ile FGF 23-Klotho yolağının bir sinyal kaskadı

1.5.3. FGF-23 : İşlevleri

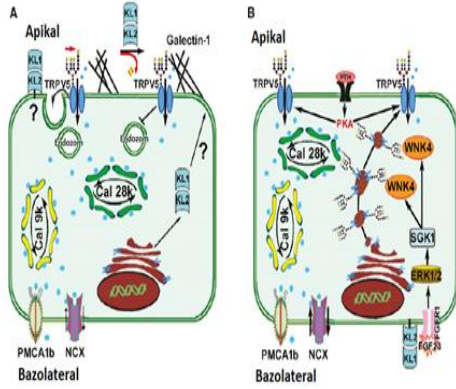
Fosfor Metabolizmasındaki rolü

FGF 23 fosfor homeostazının önemli bir regülatörüdür. İlk olarak 2000 yılında fare embriyosu beyni ventrolateral talamik nükleusunda doku ekspresyonu tespit edilen¹⁹⁰ FGF 23 ün fosfat metabolizmasındaki esas rolü, yine 2000 yılında, kendisi ile ilişkili bir fonksiyon kazanım mutasyonuna bağlı otozomal dominant hipofosfatemik rikets tablosunun ortaya konması¹⁹¹ ve hipofosfateminin eşlik ettiği, tümöre bağlı osteomalazi (TİO) tablolarında renal fosfat ekskresyonu nedeni olarak tespit edilmesi¹⁹² sonrası anlaşılmıştır. Daha önce de belirttiğimiz gibi FGF 23, özellikle FGFR1c üzerinden ve α -klotho varlığında renal proksimal tübüllerde NPT2a ve NPT2c yi azaltarak fosfatürük etki göstermektedir. FGF 23 ün vitamin D yi suprese etmesi de NPT2b aracılı¹⁹³ intestinal fosfat absorpsiyonunu azaltarak regülasyonun farklı bir yolağını teşkil eder.

Kalsiyum Metabolizmasındaki Rolü

FGF 23 özellikle D vitamini ve PTH üzerine olan etkileri nedeniyle fosfat yanısıra kalsiyum homeostazı açısından da regüle edicidir. 1,25 D₃ ün FGF 23 tarafından baskılanması kalsiyum emilimini de azaltmaktadır. PTH nın 1,25 D₃ ü arttırıcı etkisi düşündüğünde aşırı kalsiyumun FGF 23 ü stimüle ettiği varsayılabilir ancak kesin tanımlanmış bir geri-besleme döngüsü henüz yoktur. 4 hafta süresince PTH ve D vitamini verilen veya 9 hafta boyunca yüksek kalsiyum, yüksek fosfatlı diyetle beslenen farelerle yapılan bir çalışmada iFGF 23 ve serum kalsiyum düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.¹⁹⁴ Farklı bir çalışmada infüzyonundan 5 dakika sonra artan serum kalsiyumu PTH represyonu sağlarken, kalsiyum injeksiyonundan 5 saat kadar sonra ılımlı düzeyde başlayan ve tedaviden 12 saat sonrasına kadar artış göstererek devam eden bir FGF 23 yüksekliği yanıtı alınmıştır.¹⁹⁵ Kalsiyum ve vitamin D den yoksun diyet verilen sıçanlarda yüksek PTH düzeylerine rağmen FGF 23 oldukça düşük olarak saptanmıştır. PTH veya CaSR ünün genetik ablasyonu kalsiyumun FGF 23 ü uyarıcı etkisini engelleyememiştir.¹⁹⁶ Buna zıt biçimde, 1,25 D₃ ün eksikliği nedeniyle hipofosfatemik olan Cyp27b1 knockout farelerde bolus kalsiyum enjeksiyonu sonrasında FGF 23 artışı görülmemiştir. Bu durum diğer in vivo çalışmalara paralel olarak düşük fosfat

düzeylerinin kalsiyumun FGF 23 ü uyarma yeteneğini bloke ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Quinn ve ark.nın yaptığı bir çalışmada, mineral homeostazi ile ilgili dokularda kalsiyum düzeyine duyarlı CaSR knockout farelerde kalsiyumun FGF 23 ü uyarıcı etkisinin devam ettiği dolayısıyla CaSR nin bu uyarıya aracılık etmediği anlaşılmıştır.¹⁹⁶ Aynı çalışmada kalsiyumun FGF 23 ü uyarabilmesi için en az 5 mg/dl fosfor düzeyine gereksinim olduğu ve kalsiyum 8 mg/dl nin altında iken fosforun FGF 23 ü regüle edebilirliğinin ortadan kalktığı saptanmıştır. Aslında bu çalışmada FGF 23 düzeylerinin Ca ve P çarpımıyla, Ca ve P için ayrı ayrı olana göre daha iyi korelasyon gösterdiği anlaşılmaktadır.¹⁹⁶ Fosforda olduğu gibi diyetle alınan kalsiyuma yanıt olarak FGF 23 akut değil ancak tedrici bir şekilde artar.¹⁹⁹ Kalsiyumun FGF 23 ekspresyonunu modüle edici etkisinin yanısıra, FGF 23 te kalsiyum homeostazını regüle edici etkiye sahiptir²⁰⁰ (Şekil 13). Fosfatürik etkisini proksimal tübülde gösteren FGF 23, distal tübülde TRPV5 in ekspresyonunu arttırarak kalsiyumun reabsorpsiyonunu sağlamaktadır.²⁰¹ TRPV5 böbreklerde kalsiyum tutulumunda görev alan önemli bir glikoproteindir. Klothonun, sialidaz özelliği sayesinde TRPV5 in epitelyal hücrelerdeki aktivasyon ve trafiğini kontrol ettiği gösterilmiştir.^{202,203} Solubl Klotho bu şekilde renal kalsiyum transportunu regüle etmektedir.²⁰⁴

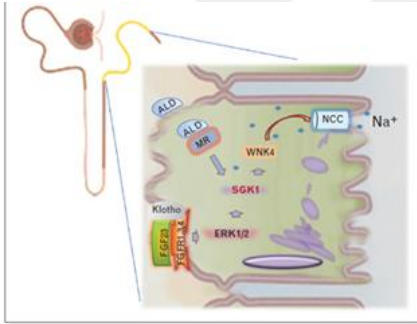


Şekil-13: FGF 23 ve Klotho tarafından renal distal tübüllerde apikal TRPV5 regülasyonu

Kalsiyum ve fosfor metabolizması birbirine yakın ilişkili olup FGF 23/Klotho aksı bu linki sağlayan önemli bir sistemdir.

Sodyum Metabolizması ve Kan basıncı Regülasyonu

FGF23 distal tübüllerde α -Klotho bağımlı olarak NCC (Sodyum/Klorür Ko-transporter) miktarını regüle etmektedir²⁰⁷ (Şekil 14). Buradaki sinyal yolağında keşfedilen anahtar bir molekül WNK-4 (with-no-lysine-kinase-4) tür.²⁰⁸ Renal sodyum reabsorpsiyonu ve NCC distal tübüler membran ekspresyonunun FGF23 ve klotho knockout fare modellerinde azaldığı, aşırı FGF 23 fenotipli fare modellerinde ise NCC miktarının artış gösterdiği, volüm ekspansiyonu ve kalpte hipertrofinin meydana geldiği gözlenmiştir.²⁰⁷ NCC inhibitörü klorotiyazid ile FGF 23 ile uyarılmış volüm ekspansiyonu ve kalp hipertrofisi engellenmiştir.²⁰⁷ Benzer çalışmalar da FGF 23 ün sodyum tutucu rolünü ortaya çıkarmaktadır. Ayrıca diyetle alınan fazla fosfatın, FGF 23 artışıyla birlikte oluşan sodyum tutulumuna yol açmasıyla hipertansiyon için zemin oluşturduğu çıkan sonuçlar arasındadır.



Şekil-14:FGF 23 ün distal tübüllerde klotho bağımlı sodyum transportu regülasyonu üzerindeki etkileri

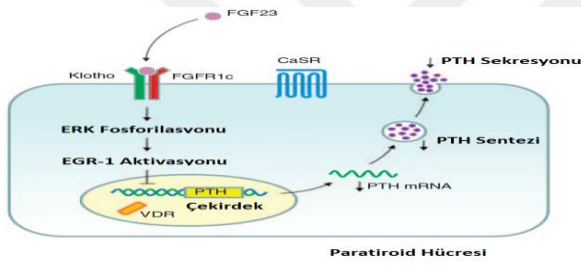
Vitamin D Metabolizmasındaki Rolü

FGF 23 1,25-(OH)₂D ün sentezini klotho bağımlı olarak regüle etmektedir. FGF 23 bu regülasyonu aktif vitamin D sentezinden sorumlu 1 α hidroksilazı kodlayan Cyp27b1 geninin ekspresyonunu suprese etme ve vitamin D inaktivasyonundan sorumlu 24 α hidroksilazı kodlayan Cyp24a1 geninin ekspresyonunu uyarma yoluyla sirküle eden aktif vitamin D düzeylerini azaltarak sağlar.

Vitamin D ise VDR bağımlı mekanizmalarla kemikte FGF 23 üretimini tetikler. Bu açıdan FGF 23 D vitamini için counter-regulatuvar bir hormondur. Vitamin D aynı zamanda FGF 23 ün fosfat regülasyonunu da modüle eder. VDR knockout fare modellerinde diyetle artan fosfata FGF 23 yanıtı yoktur.²⁰⁵ FGF 23 PTH üzerine olan etkisiyle de indirek olarak D vitamini sentezini regüle etmektedir.²⁰⁶

Parathormon Sentez ve Sekresyonunun Regülasyonu

FGF 23 paratiroid bezlerine FGFR1-3 ve klotho bağımlı olarak etki eder ve PTH supresyonuna yol açar (Şekil 15). FGF 23 paratiroid bezinde klotho miktarını artırır.



Şekil-15: Paratiroid hücrelerinde FGF 23 sinyalizasyonu

Supresyondaki iki ana mekanizma doğrudan PTH ekspresyonu azaltılması ve Cyp27b1 ekspresyonunun baskılanmasıdır. FGF 23 paratiroid glandı üzerine direkt etkisiyle PTH yı azaltması yanısıra aktif vitamin D yi azaltarak PTH yı indirekt yolla arttırır.

1.5.4. KLOTHO

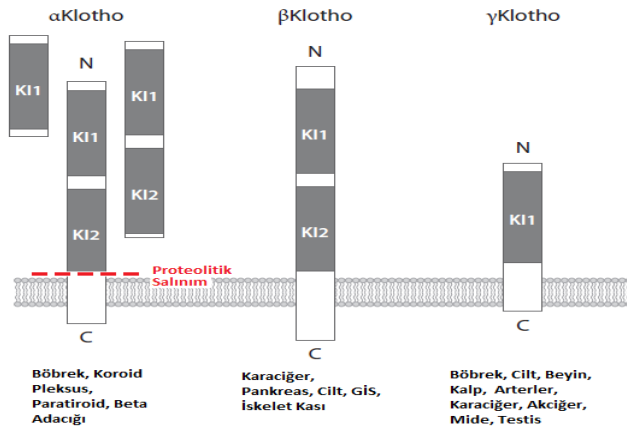
1997 yılında yapılan bir çalışmada prematür yaşlanma özellikleri gösteren kısa yaşam süreli bir fare modeli geliştirildi.²⁰⁹ Bu fenotipten sorumlu gene ise yunan mitolojisinden esinlenilerek Zeus ve Themisin kader tanrıçası kızları Moira lardan biri olan ve hayat ipliğini eğiren “Klotho” nun ismi verilmiştir²⁰⁹ (Şekil 16,18).



Şekil-16: Mitolojide “Klotho”

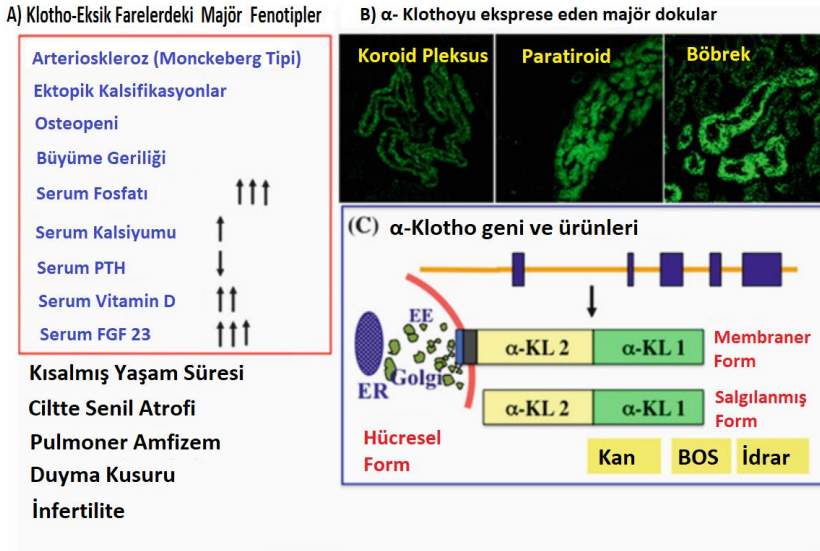
Sonrasında klotho ile benzer homoloji taşıyan iki protein daha tespit edilmiştir. Bunlar β -Klotho ve Klotho/Lactase-Phlorizin Hydrolase Related Proteindir (KLPH, γ -Klotho), (Şekil 17). Yaşlanma baskılayıcı gen olarak başlangıçta tespit edilen esas klotho sıklıkla α -klotho olarak anılır.²¹⁰ α ve β klotho genleri %41 aminoasit benzerliği taşıyan tip-1 tek geçişli transmembran proteinlerdir. Sitoplazmik parçaları ekstrasellüler parçalarına göre daha küçük ve fonksiyonel bölge içermezler. Ekstrasellüler parça ise β -glukozidaz homolojisi taşıyan iki internal tekrardan meydana gelir.²¹⁰ γ -Klotho daha kısa yine tek geçişli transmembran proteini olup tek β -Glukozidaz özellikli internal tekrara ve kısa bir sitoplazmik kuyruğa

sahiptir.²¹¹Glikozidazlar patojen defans sistemleri,detoksifikasyon,sinyal transdüksiyonu ile hormon modifikasyonu gibi durumlarda rol alan oligosakkarid ve polisakkaridlerin sentez ve yıkımında görev yapmaktadır.



Şekil-17: Klotho ailesi

1012 aminoasitten oluşan 130 kD ağırlığında Tip 1 membran proteini olmasına karşın α-klotho, intrasellüler alanda da bol miktarda tespit edilmiştir.²¹¹ Ek olarak transmembran parçası N-terminal bölgesinden yarıklanarak ortaya,dolaşıma katılarak kan, idrar ve BOS ta tespit edilebilen “Salgılanmış (Solubl) Klotho” çıkar. α-Klotho esas olarak böbrek,paratiroid bezleri ve koroid pleksusta eksprese edilir. Böbrek ve paratiroid glandlarda FGFR1c,3c ve 4 ile kompleks oluşturarak FGF 23 etkilerine aracılık eder. β-Klotho ise karaciğer,pankreas ve yağ dokusunda FGFR1c ve 4 ile kompleks oluşturup metabolik etkilerle ilişkili FGF19-21 sinyalini sağlar. γ-Klothonun ise gözler,böbrek ve yağ dokusuna (özellikle kahverengi yağ dokusu) ait kültür hücrelerinde FGFR1b,1c,2c ve 4 reseptörleri ile etkileşime girerek FGF19 aktivitesini artırması dışında diğer fonksiyonları bilinmemektedir.^{210,211}



Şekil-18:Klotho defektif farelerin majör fenotipleri ve klotho eksprese eden majör dokular.

1.5.5. Klotho: İşlevleri

Son dönemlerde α -klothonun sialidase aktivitesine sahip olduğu ve hücre yüzeyinde yer alan çok sayıda glikoprotein oligosakkarit zincirinden terminal sialik asiti uzaklaştırdığı kabul görmüştür. İntrasellüler yerleşimli α -Klotho, böbrek, paratiroid glandı ve koroid pleksusta Na/K ATPase kompleksine bağlanır.²¹⁴ Bu kompleksler hücre dışında azalan kalsiyum düzeylerine yanıt olarak golgi ağı ve endozomlar vasıtasıyla hızla membrana taşınır. Eş zamanlı olarak α -klotho ekstrasellüler boşluğa salınır. Membrana yerleşen Na/K ATPase aktivitesiyle meydana gelen elektrokimyasal gradyan Na/Ca değiştiricisinin de çalışmasını sağlayarak koroid pleksusta kalsiyumun kandan BOS a geçişini, böbreklerde distal tübüllerden kalsiyum reabsorpsiyonunu ve paratiroid bezinde PTH sekresyonunun regülasyonunu sağlar.²¹⁴ İntrasellüler klothonun diğer bir işlevi ise hücre yaşlanmasıyla ilgili bazı süreçlerin inhibisyonudur. Yaşlanmanın, IL-6 ve IL-8 gibi bazı proinflatuvar sitokinlerin, RIG (Retinoic Acid Inducible Gene) aracılı artmış ekspresyonuyla ilişkili olduğu iyi

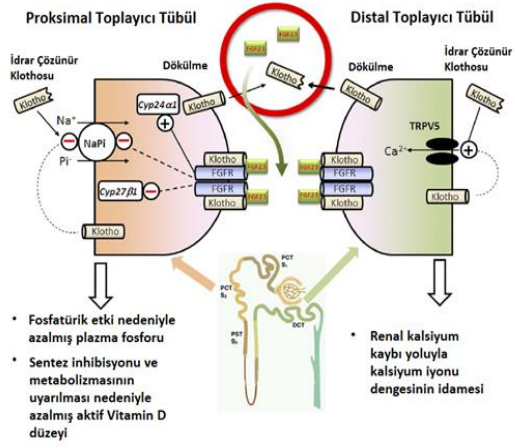
bilinmektedir. Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada klothonun RIG-1 i bağladığı ve multimerizasyonunu bloke ettiği ortaya konmuştur.²¹²

Membrana yerleşik α -Klotho temelde FGFR ile kompleks oluşturarak FGF 23 ün etkilerine aracılık etmektedir. FGFR/ α -Klotho kompleksi FGF 23 ü yalnız FGFR veya yalnız α -Klothoya göre çok daha yüksek afinite ile bağlar. Bu nedenle eksikliğinde FGF 23 ün çok yüksek düzeylerinde bile reseptör düzeyinde yanıtızlık mevcuttur.

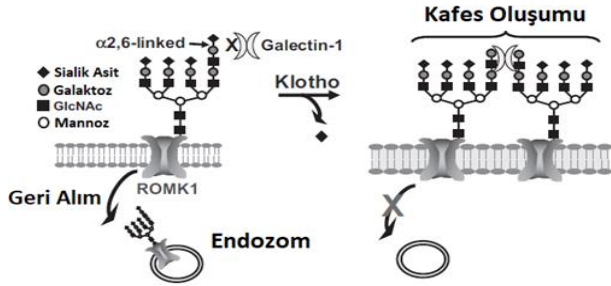
Klothonun ekstrasellüler parçası, ADAM10 ve ADAM17 (α -sekretazlar) gibi membran protezlarınca yıkılarak diğere bir form olan "Solubl Klotho" oluşur.^{159,213} Membran klothonun aksine solubl klotho FGF 23 için solubl bir reseptör değildir. Biyolojik etkilerini FGF 23 ten bağımsız olarak yürütür. sKlotho pleiotropic etkilere sahip olup, yaşlanma karşıtı ve organ koruyucu fonksiyonları mevcuttur. Dolaşımdaki bu çözünür form, insülin, TGF- β , INF- γ ve IGF-1 gibi büyüme faktörleri ve sitokinlerin sinyalizasyonlarını azaltır.^{215,216} Klothonun aşırı ekspresyonu farelerde insülin ve IGF-1 sinyalleriyle ortaya çıkabilen reaktif oksijen türlerini azaltarak yaşam süresini uzatmıştır.^{217,218} Benzer şekilde klotho knockout farelerde Wnt, TNF- α , INF- γ sinyalizasyonunda artış ve hızlanmış yaşlanma süreci gözlenmiştir.^{215,219} TNF- α ve INF- γ klothoyu baskılamakta ve bu durum da klothonun anti-inflamatuvar özelliğini vurgulamaktadır. Artmış Wnt sinyalizasyonu kök ve progenitör hücrelerde disfonksiyon ve azalmaya yolaçarak yaşlanmaya katkıda bulunur. Klotho ise Wnt proteinlerini suprese etmektedir.²¹⁹ sKl iyon kanalları ve transporter ları regüle ederek iyon homeostazına da katkıda bulunur (Şekil 19). Sialidaz özelliği sayesinde TRPV5 in epitelyal hücrelerdeki aktivasyon ve trafiğini kontrol eder ve böylece kalsiyumun intestinal emilimi ve böbrekten geri emilimini arttırır.^{202,203,204} Benzer enzimatik aktivitesini renal dış medüller K kanalı ROMK-1 üzerinde de gösterir ve distal tübüllerden potasyum atılımını arttırır²²⁰ (Şekil 20). sKlotho aynı zamanda NaPi-2a proteininin deglikozilasyonu ile sayı ve aktivitesini azaltarak fosfor transportunu da düzenler. Böylece FGF-23 ten bağımsız olarak ta fosfatüriye yolaçmaktadır.^{159,221}

α -Klotho ve vitamin D arasındaki ilişki komplekstir. Vitamin D α -klotho aktivitesini α -klotho üretimini arttırarak pozitif yönde, α -klotho ise D₃ vitamin sentezini 1 α -hidroksilaz gen ekspresyonunu baskılayarak negatif yönde etkilemektedir (Şekil 19). Renin-anjiyotensin-

aldosteron sistemi de (RAAS) α -Klothoyu böbrekte azaltan bir etmendir.^{222,223} Tablo 3 klotho proteininin biyolojik fonksiyonlarını özetlemektedir.



Şekil-19: Klothonun solüt kanal ve taşıyıcıları ile vitamin D metabolizması üzerindeki etkileri



Şekil-20: Klothonun distal tübüllerden potasyum attırıcı etkisi

Klotho Proteininin Başlıca Biyolojik Fonksiyonları				
Klotho Formu	Çekirdek	Hücre İçi	Membran	Hücre Dışı
Lokalizasyon	Çekirdek	Sitoplazma	Hücre Yüzeyi	İdrar ve BOS
Domen	Bilinmiyor	KL1 veya tam uzunlukta	Tam uzunlukta	KI 1 ve KI 2 içeren ektodomen
Biyolojik Fonksiyon	Yaşlanma Karşıtı Etkiler	Sitokin üretiminde azalma Yaşlanma karşıtı etkiler Na/K ATPase Modülasyonu PTH salınımı Kalsiyum homeostazi	(1) FGF-23 Bağımlı : Yaşlanma karşıtı etkiler Anti-IGF Kalsiyum ve fosfor regülasyonu PTH ve Vitamin D Süpresyonu (2) FGF 23 Bağımsız : Çözünür Klotho Salınımı	(1) FGF -23 Bağımlı : Transmembran formu ile aynı ancak endokrin ya da parakrin biçimde (2) FGF- 23 Bağımsız : Antioksidasyon Renal iyon kanallarının modülasyonu Anti-WNT Sinyali Anti-Apoptoz Anti-Senil Anti-RAAS

Tablo-3:Klothonun biyolojik işlevleri

1.6. FGF-23/Klotho AKSI PATOFİZYOLOJİSİ ve HASTALIK İLİŞKİLERİ

1.6.1. FGF23 Gen Mutasyonları

Otozomal dominant hipofosfatemik rikets (ADHR), idrarla aşırı fosfat atılımıyla birlikte, rikets,osteomalazi, kısa boy,kemik ağrıları ve dental apselerle karakterize bir bozukluktur. Bu klinik duruma FGF 23 genindeki R176Q mutasyonunun neden olduğu anlaşılmıştır.²²⁴ Belirtilen mutasyon fonksiyon kazandırıcı nitelikte olup FGF 23 ün proteolitik yarıklanmasını engellemekte ve aşırı intakt FGF 23 aktivitesine neden olmaktadır. Demir FGF 23 yarıklanmasında kofaktör olması nedeniyle yüksek doz demir tedavisi verilen ADHR hastalarında rikets kliniği gerilemiştir.²²⁵Hiperfosfatemik familyal tümoral kalsinoziste ise GALNT3 genindeki mutasyon ^{233,234} proteolitik yarıklanmada artışa neden olduğu için fonksiyonel intakt FGF 23 düzeyleri azalırken C-terminal FGF 23 düzeyleri artmıştır. X-linked hipofosfatemik riketste fosfat regüle eden PHEX genindeki fonksiyon kaybettiren mutasyona bağlı olarak dolaşan FGF 23 düzeyleri artmıştır.²²⁶ XLH ta oluşan rikets ve kısa boy gibi klinik semptomların esasen aşırı FGF 23 düzeyleri ile ilişkili olması FGF 23 antikorları ile tedavi çalışmalarını gündeme getirmiştir. Bu hastalara aylık olarak FGF 23 blokeri olan KRN 23 uygulanması hipofosfatemiyi başarılı bir biçimde düzeltmiş,1,25 vitamin D₃ seviyesini arttırmıştır.²²⁷ Otozomal resesif hipofosfatemik rikets 1-2 de sırasıyla DMP-1 (Dentin Matrix Proteini-1) ve ENPP-1 (Ektonükleotid pirofosfat/fosfodiesteraz --1) genleri mutata olup her iki tabloda da artmış FGF 23 mevcuttur.²²⁸ Kinaz aktivitesine sahip sekreteruar bir protein olan FAM20C genindeki bir mutasyonun da hipofosfatemi,dental anomaliler ve ektopik kalsifikasyonlarla bağlantılı olduğu ortaya konmuştur.²²⁹ FAM20C proteini FGF 23 ü de

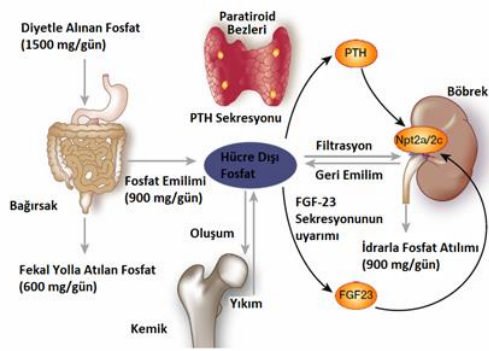
fosforilemekte ve FGF 23 ün yarıklanmasını hızlandırmaktadır. McCune Albright sendromunda aktive edici GNAS gen mutasyonu FGF 23 düzeylerini arttırır.²³⁰ Osteoglofonik displazide FGFR 1 mutasyonu¹⁷⁵ ile FGF 23 artışı vardır. Tümör Induced Osteomalasia (TIO,paraneoplazi)²³¹ ve Jansen Metafizel Displazisi²³² de FGF 23 elevasyonu görülen diğer durumlardır. Kawasaki sendromu özellikle çocukluk çağında görülen vasküler ,inflamatuvar bir hastalık olup kardiyak patoloji gelişimi riski taşır. Hastaların %33 kadarında kardiyak anomalilerle ilişkili FGF23 polimorfizmi ve FGF 23 elevasyonu mevcuttur.²³⁵

1.6.2. FGF 23 ve Kronik Böbrek Yetersizliği

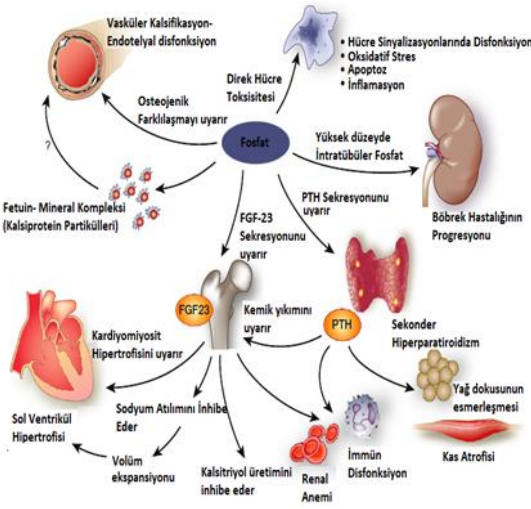
Fosfat Toksisitesi

Fosfat homeostazının idamesi organizma açısından hayatiyet taşır ve toksisitesinin sonuçları anlaşılma devam etmektedir (Şekil 21,22). Enterik fosfat yükünün nefrotoksik potansiyel taşıdığı hayvan çalışmalarında açıkça gösterilmiştir.^{236,237} İnsanlarda barsak temizliği amacıyla kullanılan oral sodyum fosfat solüsyonları ile akut böbrek hasarı ve kronik böbrek yetersizliğine gidış görülebilmektedir.²³⁸ Kronik böbrek yetersizliğinde fosfat yüksekliği artmış mortalite ile ilişkili bulunduğundan^{239,240} anti fosfat tedaviler ortaya çıkmış ve sonuçlarda düzelme sağlamıştır. A.B.D. de kişi başına fosfat tüketimi son 4 dekatta progresif olarak artmış ve günlük alınan doz önerilenin %260 kadarına ulaşmıştır.²⁴¹ Diyet öğelerinin doğal fosfor içeriğinin yanısıra çeşitli amaçlarla ve katkı maddeleriyle meydana gelen ek bir fosfor içeriği de mevcuttur. Bu katkı diyetle alınan fosforu önemli ölçüde arttırabilmektedir.²⁴² Besinlerle alınan doğal fosforun intestinal biyoyararlanımı %0-60 arasında değişebilirken katkı maddeleri ile gelen fosforun absorpsiyon oranı %100 e yaklaşabilmektedir.²⁴³ GFR deki azalmadan bağımsız olarak bile artmış diyetel fosfat yükü mortalite artışına yol açmaktadır.²⁴⁴ Fosfor artışının çeşitli mekanizmalarla böbrek hasarı oluşturabileceği ileri sürülmüştür. Fosfor konsantrasyonu 1 den 2-5 mM ye yükseldiğinde MAPK aktivasyonu, reaktif oksijen türlerinde artış,kalsifikasyon,hücre siklus arresti ve hücre ölümü gibi hücrel yanıtlar gözlenmiştir.^{245,246} Özellikle 1000 nm nin altındaki kalsiyum fosfat kristallerinin osteopontin ve BMP-2 yi arttırarak kalsifikasyonu başlatacak şekilde önemli derecede

biyoaktiviteye sahip olduğu saptanmıştır.²⁴⁷ CaPi nanokristalleri endositoz edilebilir ve lizozomlarda çözünür. Sonuçta kalsiyum sitozole sızar ve apoptoz tetiklenir. Ayrıca bu kristaller renal proksimal tübül hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin oluşumuna ve oksidatif hüresel hasara yol açar.²⁴⁸ Fosforun diğer faktörlerden bağımsız olarak yaşlanmayla ilişkili olduğu ortaya konmuştur.²⁴⁹



Şekil-21:Fosfat homeostazının normal fizyolojisi



Şekil-22:Fosfat toksisitesi

FGF23 ve Kronik Böbrek Hastalığı

FGF 23 KBY de Ca-P dengesinin sağlanmasına katkıda bulunur. Fosfatürik etkisiyle KBY nin erken dönemdeki hastalarda fosfor düzeyinin normal sınırlarda tutulmasında büyük rol oynar. Ek olarak yüksek FGF 23 düzeyleri hızlı böbrek hasarı ilerlemesinin bir öngörücüsüdür.¹⁵⁷ FGF 23 düzeylerinin genel popülasyonda KBY gelişim riskini belirleyebileceğini gösteren çalışmalar mevcut olmakla birlikte ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.²⁵⁰

FGF 23 düzeyleri KBY nin erken evrelerinden itibaren normal sınırların üzerindedir. Böbrek fonksiyonları henüz nispeten yeterli iken meydana gelen yükseklik esasen osteositler tarafından fazla üretime bağlıdır. Bu yükseklik serum fosfor düzeyinde belirgin bir yükseklik ve vitamin D₃ düzeylerinde bir azalma olmaksızın gerçekleşir. Dolayısıyla serum FGF 23 düzeylerinin ölçümü klinik uygulamada önem taşıyacaktır. Erken evre KBY de FGF 23 düzeyleri PTH artışından da önce yükselir. FGF 23 daha önce de belirttiğimiz üzere PTH salınımını paratiroid hücrelerine direkt etki ile azaltır. Bununla beraber FGF 23 vitamin D₃ ün böbrekteki üretimini de azaltarak PTH üzerindeki inhibitör etkinin ortadan kalkmasına bağlı sekonder hiperparatiroidizm (SHPT) gelişiminde rol oynamaktadır.²⁵¹ SHPT li hastaların paratiroid dokusunda FGFR ve α -klotho ekspresyonu azalmış olup FGF 23 yüksek düzeylerinde dahi PTH düzeylerindeki yükselmeyi engelleyememektedir. FGF 23 en yüksek düzeylerine evre 4-5 te ulaşır.²⁵² Diyaliz hastalarında sağlıklı bireylere göre 1000 kata yakın FGF 23 artışı olabilir.²⁵³ KBY de görülen bu FGF 23 artışı yükselen fosforun normal sınırlarda tutulması için kompanzatuvar bir yanıt olabileceği gibi yine KBY de belirgin şekilde izlenen α -Klotho eksikliğine bağlı bir end-organ direncini yansıttığını savunan alternatif hipotezler de mevcuttur. Son dönem böbrek yetersizliği olan hastalarda FGF 23 düzeyleri anormal kemik metabolizması, sol ventrikül kitle indeksi, SVH, vasküler kalsifikasyon ve artmış mortalite ile ilişkilidir. Dolayısıyla FGF 23 KBY sürecinde de fosfor dengesi yanısıra kardiyovasküler sistem hastalıkları açısından hassas bir biyobelirteç olmaya adaydır.¹⁵⁷ Başarılı böbrek transplantasyonu sonrası KBY sürecinde meydana gelen anormalliklerin çoğu düzelmektedir. Ancak ısrarcı hiperparatiroidizm devam etmekte ve FGF 23 düzeyleri de posttransplantasyon uzun süre yüksek seyrederek PTH dan bağımsız bir biçimde hipofosfatem ve vitamin D₃

düşüklüğüne neden olmaktadır. FGF 23 ün uzun dönem graft işlevlerini tahmin etmek için kullanılabileceği de öne sürülmektedir.²⁵³

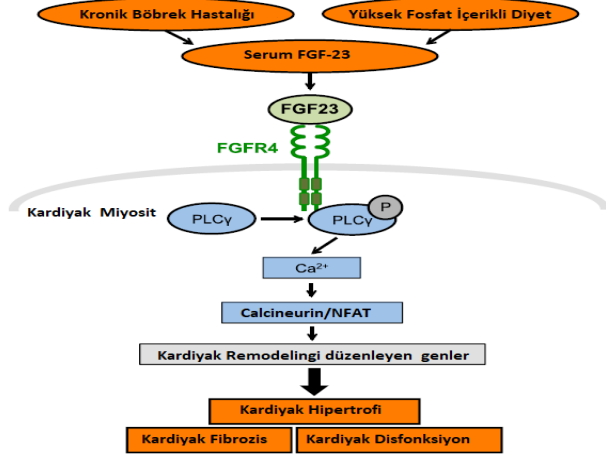
1.6.3. FGF 23 ve Ekstrarenal Etkileri

Endotelial Disfonksiyon

Endotelial disfonksiyon; hipertansiyon, dislipidemi, hiperhomosisteinemi gibi bilinen risk faktörlerinin olmadığı durumlarda bile KBY li hastalarda saptanabilir ilk kardiyovasküler anormallik olarak tespit edilmiştir.²⁵⁴ Bu patolojik durum, ortamda erişilebilir nitrik oksit ile NADPH oksidaz upregülasyonu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu arasındaki dengesizlik ile karakterizedir.²⁵⁵ Yılmaz ve ark. evre 3 ve 4 183 KBY li erişkin hastayla yaptıkları bir çalışmada artmış serum FGF 23 düzeylerinin bağımsız bir şekilde endotelial disfonksiyonla ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.²⁵⁶ FGF 23 süperoksit düzeylerini arttırıp nitrik oksit erişimini azaltma yoluyla direk olarak endotelial disfonksiyonu bozabilmektedir.²⁵⁷ KBY de FGF 23 artışı yanısıra kazanılmış klotho deplesyonunda görülmesi ve klothonun bilinen endotelial fonksiyonları koruyucu etkileri göz önüne alındığında FGF 23, Klotho, FGFR ve endotel gibi komponentler arasındaki ilişkileri açıklayacak ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.²⁵⁸

Sol Ventrikül Hipertrofisi

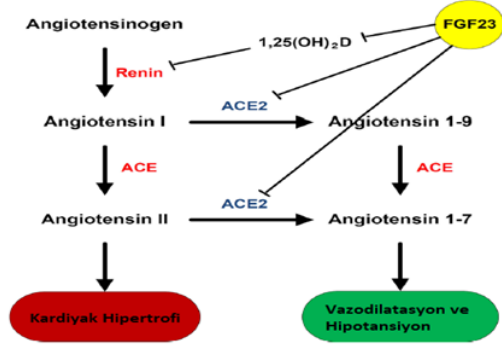
Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalar FGF 23 düzeyinin diğer faktörlerden bağımsız olarak sol ventrikül hipertrofisi ile ilişkili olduğu ortaya koymuştur.^{187,259,260,261} Klotho knockout farelerde yüksek FGF 23 düzeyleri konsantrik tipte hipertrofi ile daha belirgin olmak üzere sol ventrikül hipertrofisi ile koreledir. Dolayısıyla FGF 23 ün kardiyak myositler üzerindeki hipertrofik etkisi klotho dan da bağımsızdır.²⁶¹ FGF 23 ün bu patolojik etkisine FGFR4 ve PLC γ -Calcineurin-NFAT sinyal yolağı aracılık eder^{259,262} (Şekil 23).



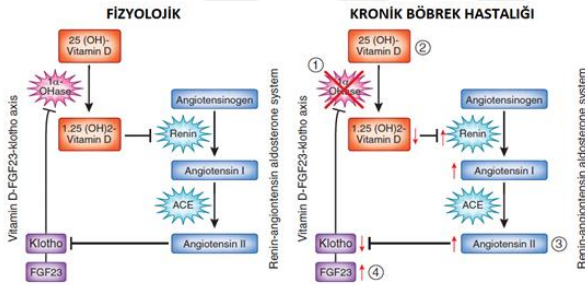
Şekil-23:FGF 23 ün kardiyak hipertrofi üzerine etkisi

Son dönem böbrek yetersizliği olan pediatrik bir hasta grubunun postmortem otopsisinde LVH + hastalarda LVH – lere göre kardiyak myositlerde FGF 23 ve FGFR4 mRNA ekspresyonu önemli ölçüde daha fazla tespit edilmiştir. ²⁶³

FGF 23 ün kardiyak hipertrofiyi tetiklemesindeki diğer bir mekanizma ise indirek olarak RAAS aktivasyonu yapmasıdır. ^{222,264} FGF 23 anjiyotensin-1 ve 2 yi vazodilatatör ve hipotansif etkili anjiyotensin-1-7 ye dönüştüren ACE-2 enzimini bloke eder (Şekil 24). Ayrıca normal koşullarda aktif vitamin D renal renin üretimini süprese eder²²² ve FGF 23 ün arttığı durumlarda vitamin D düzeyi düşer (Şekil 25). KBY de buna nefron kaybı ve klotho eksikliği de neden olur. Anjiyotensin-2 artışı ve renin supresyonunun azalması beraberinde myokardial hipertrofiyi getirir. ^{222,258}



Şekil-24:FGF 23 ün RAAS üzerindeki etkileri



Şekil-25:Sağlıklı kişiler ve kronik böbrek hastalığı olanlarda FGF 23/klotho aksı,RAAS ve vitamin D ilişkileri

İnflamasyon ve İmmün sistem

İnflamasyon, direk etkisiyle ve HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) in rol aldığı demir dengesine ilişkin bir mekanizma yoluyla kemikten FGF 23 salınımını arttırmaktadır.²⁶⁵ Kronik inflamasyon halinin belirgin olduğu KBY li hastalarda FGF 23 düzeylerinin inflamasyon ve oksidatif stres belirteçleri ile kuvvetli biçimde ilişkili olduğu ortaya konmuştur.^{266,267} FGF 23 ün proinflamatuvar makrofajlarda ektopik olarak eksprese edildiği ve TNF- α yı arttırdığı da gösterilmiştir.²⁶⁸ Yakın zamanda yapılan bir çalışmada Rossain ve ark. KBY li hastalarda FGF 23 ün nötrofil integrin deaktivasyonu yaparak migrasyonu bozduğu anlaşılmıştır.²⁶⁹ FGF 23, konak yanıtının negatif regülatörü olarak davranan bir anti-inflamatuvar gibi görünmektedir. İnflamatuvar hastalıklar yönünden terapötik potansiyeli araştırılmalıdır.

Ateroskleroz ve Vasküler Kalsifikasyon

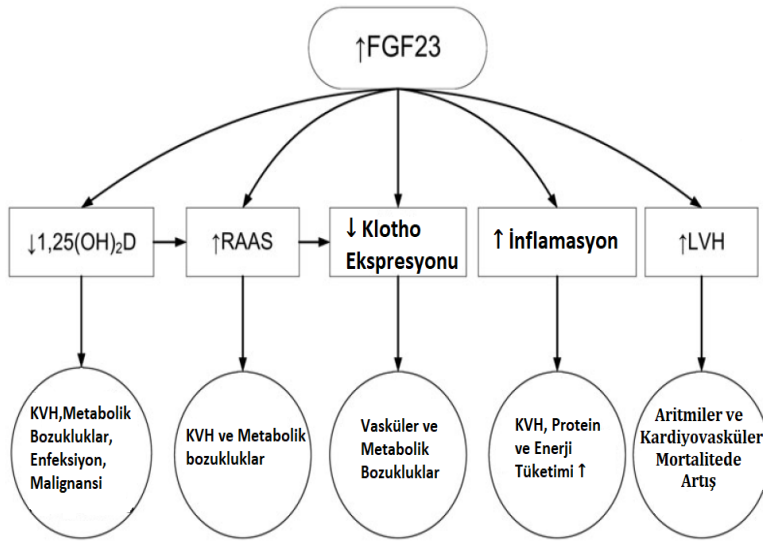
FGF 23 ve vasküler komplikasyonlar arasındaki ilişkiyi açıklayan çeşitli mekanizmalar mevcuttur. FGF 23 artışı ve α -Klotho eksikliği vasküler kalsifikasyonla ilişkili görünmektedir. FGF 23 hemodiyaliz hastalarında aortik kalsifikasyonla bağımsız olarak ilişkili bulunmuştur.²⁷⁰ Benzer şekilde yüksek serum fosforu ve yüksek FGF 23 düzeyleri koroner kalsifikasyonların progresyonuyla ilişkili olarak saptanmıştır.²⁷¹ Endotelial disfonksiyona yol açması yanı sıra, FGF 23 artışına eşlik eden klotho eksikliği,PTH artışı,vitamin D eksikliği,hiperfosfatemi ve hiperkalsemi gibi diğer bazı durumlar da vasküler kalsifikasyona eğilim oluşturmaktadır. Klothonun vasküler yapılarda da eksprese edildiğinin gösterilmesi aşırı FGF 23 ün direk endokrin yolakla damarlar üzerinde zararlı etki oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Santral Sinir sistemi

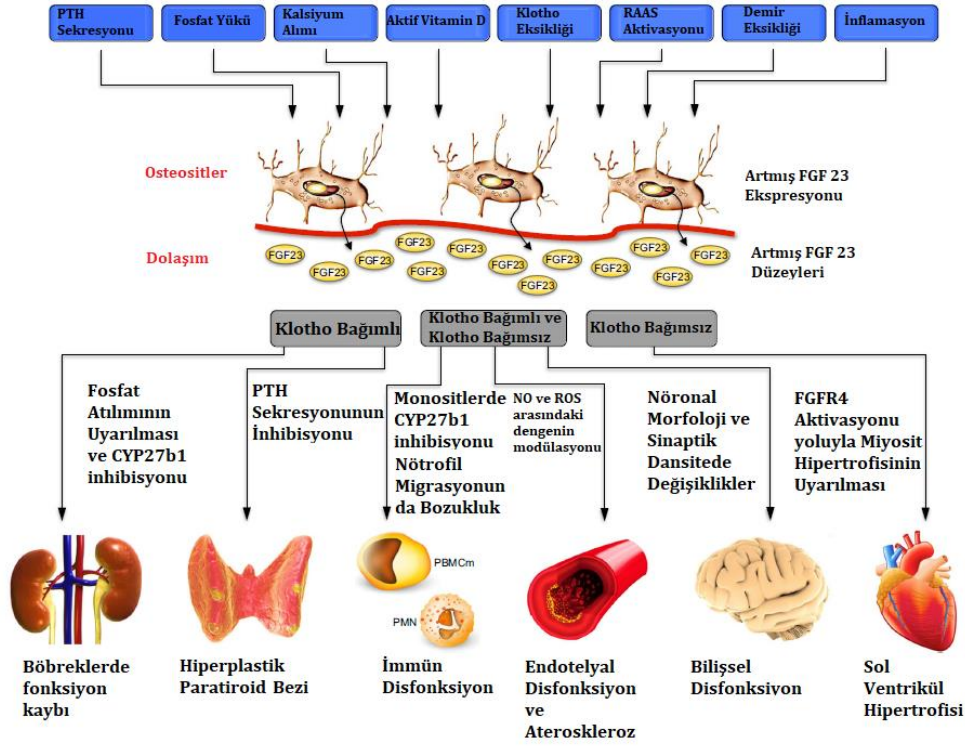
Yakın zamanda yapılan çalışmalar santral sinir sisteminin de FGF 23 için hedef organ olduğunu göstermektedir.²⁷² FGF 23 ün korteks,kaudat putamen,hipokampus,amigdala ve hipotalamusta,klothonun koroid pleksus ependimal hücrelerinde ve FGFR lerinin serebrum, serebellum, beyin sapı,hipotalamus ve hipofiz bezinde eksprese edildiği gösterilmiştir. FGF 23 ve klothonun moleküler ağırlıkları sırasıyla 32 ve 130 kDa kadar olup her ikisi de kan-beyin bariyerinden geçebilmektedir. Ventrotalamik nükleusta FGF 23 ekspresyonu en fazladır ve

BOS taki FGF 23 ün esas kaynağı olabilir. Kronik böbrek yetersizliğinde aşırı FGF 23 kan beyin bariyerini geçerek SSS disfonksiyonuna neden olur.^{273,274,275} Bu disfonksiyon özellikle kognitif ve hafızayı ilgilendiren süreçlere aittir.

Şekil 26 ve 27 FGF 23 ün fizyolojik ve patofizyolojik etkilerini özetlemektedir.



Şekil-26: Yüksek FGF 23 düzeyleri ile ortaya çıkan patolojik bulgular ve altta yatan mekanizmalar.



Şekil-27:FGF 23 ün kronik böbrek hastalığında görülen renal ve ekstrarenal etkileri

1.6.4. Klotho ve Kronik Böbrek Yetersizliği

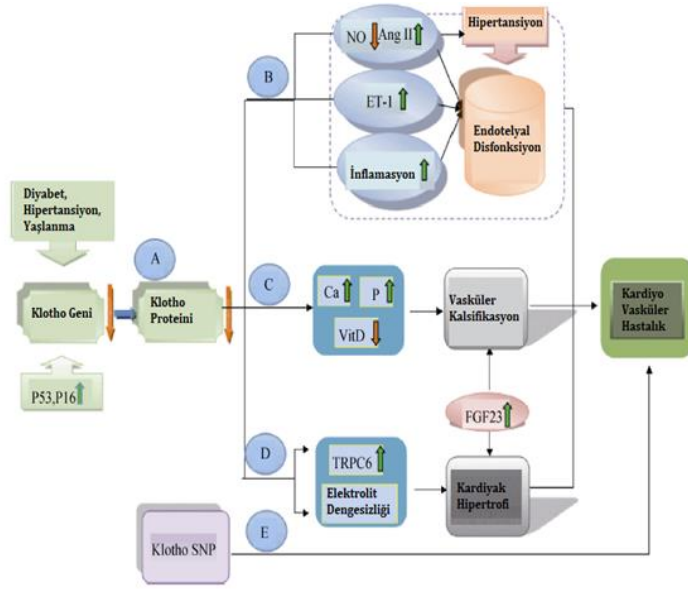
Kronik böbrek yetersizliği sistemik bir α -klotho eksikliği olarak görülmektedir. KBY evresi arttıkça böbrek işlevlerindeki azalmaya paralel olarak FGF 23 düzeylerinde artış, α -klotho düzeylerinde ise azalma meydana gelmektedir. KBY hastalarından alınan böbrek biyopsi örneklerinde klotho mRNA ekspresyonları önemli derecede düşük saptanmıştır. KBY ve SDBY de plazma α -klotho düzeyleri de düşer. Bu azalmanın KBY nin erken evrelerinde fosfor metabolizmasındaki değişikliklere yanıt olarak meydana gelen erken değişikliklerden biri

olabileceği öne sürülmektedir. Yüksek FGF-23 düzeyleri böbrek D3 vit üretiminde azalmaya yol açar. α -Klotho'nun düşük plazma düzeyleri ve üremik paratiroid bezde FGFR ve α -klotho ekspresyonunda azalma paratiroid hücrelerini FGF-23'ün baskılayıcı etkisine karşı dirençli hale getirmekte ve sekonder hiperparatiroidizm (SHPT) gelişimini tetiklemektedir. KBY de hiperfosfatemi, plazmadaki yüksek FGF-23 ve PTH ile birlikte düşük α -klotho düzeylerine katkıda bulunmaktadır. Yüksek plazma PTH, P, FGF-23 ile düşük plazma D3 vit ve α -klotho düzeyleri hep birlikte SHPT, kardiyomyopati, vasküler kalsifikasyon ve metabolik kemik hastalıklarının gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca dolaşıma salınan α -klotho yalnızca böbrekteki P geri emiliminden sorumlu NaPi-2a co-transporter sistemini değil aynı zamanda NaPi-2c ve yaygın olarak epitel, barsak, karaciğer, akciğer, kalp ve düz kas hücrelerinde eksprese edilen NaPi tip 3 (Pit-1 ve Pit-2) co-transporter sistemini de inhibe etmektedir. Benzer şekilde α -klotho'nun damar düz kas hücre kültürüne eklendiğinde Pit-1 ekspresyonunu azalttığı ve P ile ilişkili kalsifikasyonu engellediği gözlenmiştir. α -Klotho'nun damarlarda Pit-1 ve Pit-2 ekspresyonunu inhibe ederek vasküler kalsifikasyona karşı koruyucu olabileceği düşünülmektedir. KBY de D3 vit eksikliği, RAAS aktivasyonu, FGF-23 yüksekliği ve böbrekte α -klotho ekspresyonunda azalma böbrek hasarının ilerlemesi ve kardiyovasküler komplikasyonlar ile ilişkili bulunmuştur.

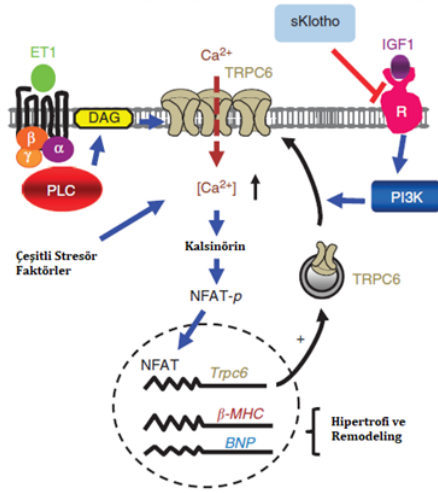
1.6.5. Klotho ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Fizyolojik fonksiyonların progresif olarak gerilediği multifaktöryel bir süreç olan yaşlanmayla birlikte diyabet, hipertansiyon ve kronik böbrek hastalığı gibi kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi arttıran risk faktörleri de artış gösterir. Klotho geninin ekspresyonu yaşlanma sürecinde azalmakta ve bu durumun kardiyovasküler hastalıklara katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ayrıca yaşlanma dışında diyabet ve hipertansiyon gibi faktörlerin kendileri de klothoyu azaltır. Ritter ve ark.ları, vasküler yapılarda klotho ekspresyonunu göstermiştir.²⁷⁶ Membrana yerleşik ve özellikle de solubl klotho vasküler proteksiyonda önemli rol oynar (Şekil 28). Klotho eksikliğinde NO sentezi azalır, endotelin (ET-1) artar, insülin/IGF1 sinyalizasyonu bozulur, dolayısıyla oksidatif stres artar, endotelial disfonksiyon meydana gelir. Endotelial disfonksiyona ilave olarak klothonun azalmasına eşlik eden FGF 23 düzeylerinde artış, aktif vitamin D eksikliği, vasküler düz kas hücrelerinde Pit-1 ve 2 supresyonunun azalmasına bağlı hiperfosfatemi ile WNT aracılı osteojenik konversiyona

karşı koruyucu etkinin ortadan kalkması ve hiperkalsemi vasküler kalsifikasyonu tetiklemektedir. Klotho gen polimorfizmleri de çeşitli kardiyovasküler olaylarla birliktelik göstermektedir.²⁷⁷Hipertansiyonlu bir hasta grubunda belli klotho gen polimorfizmleri karotid ateroskleroza ile ilişkili saptanmıştır.²⁷⁸Klothonun fonksiyonel KL-VS varyantı erken başlangıçlı gizli kardiyovasküler hastalık ile ilişkili bulunmuştur.²⁸⁴ Farklı bir çalışmada KL-VS homozigositesi ile 40 yaş altı iskemik inme arasında pozitif ilişki saptanmıştır.²⁸⁵ 395A varyantı ise klotho ekspresyonunu arttırarak esansiyel hipertansiyona karşı koruyucu etki sağlıyor olabilir.²⁸⁶ Tip 1 DM li hastalarda klothonun ateroskleroza karşı koruyucu bir faktör olduğu gösterilmiştir.²⁷⁹ İtalyanın tuscanı bölgesinde yapılan InCHIANTI çalışmasında düşük plazma klotho düzeyinin kardiyovasküler risk faktörlerinin ve kardiyovasküler olayların artmış insidansı ile birlikte olduğu gözlenmiştir. Koroner anjiyografileriyle değerlendirilen 2948 katılımcılı prospektif bir kohort çalışması olan Ludwigshafen Kardiyovasküler Risk (LURIC) çalışmasında ise yüksek solubl klotho düzeylerinin uzun dönemli mortalite riski ile ilişkisi olmadığı ve kardiyovasküler risk biyomarkeri olamayacağı sonucuna varılmıştır.²⁸⁰ Hipertansif sıçanlarda yapılan bir çalışmada klotho, hipertansiyon ve kalp hasarı progresyonunu zayıflatmıştır.²⁸¹ Klotho, kardiyak hipertrofi ve remodelinge karşı koruyucu etkiye sahiptir. Patolojik kardiyak hipertrofi ve remodeling sürecinde anahtar bir basamak, anormal kalsiyum sinyalizasyonu nedeniyle kalmodulin bağımlı kalsinörin aktivasyonudur. Kalbi de içeren birçok dokuda eksprese edilen TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) kalsiyum kanal ailesi, kalsinörin sinyal yolağı ile birlikte hücre içine kalsiyum akışına yol açarak kardiyak hipertrofide önemli rol oynar.²⁸² Solubl Klotho kardiyak TRPC-6 kanallarını inhibe ederek hipertrofi ve remodelinge karşı kardiyoproteksiyon sağlar²⁸³ (Şekil 29).



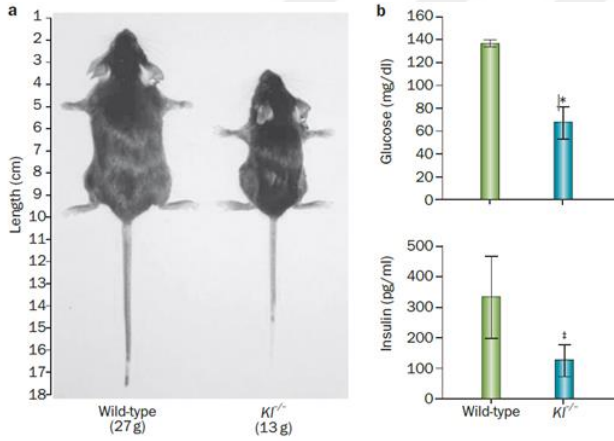
Şekil-28: Klothonun kardiyovasküler hastalıklardaki koruyucu rolü



Şekil-29: TRPC6'nın klotho aracılı inhibisyonu ve kardiyoproteksiyon

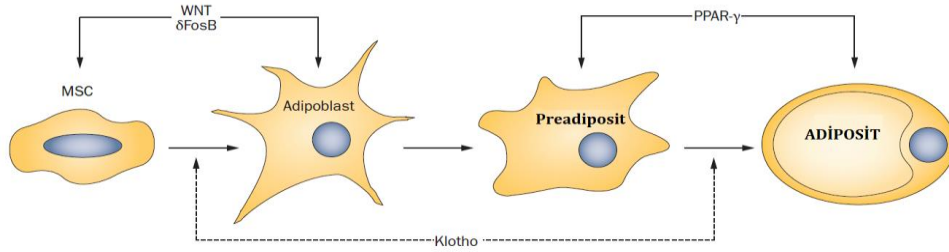
1.6.6. Klotho ve Metabolizma

Klothonun adiposit matürasyonu ve sistemik glukoz metabolizmasında rolü olduğu düşünülmektedir. Enerji metabolizmasının önemli bir regülatörü olan PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) ailesinin bir üyesi olan PPAR- γ , klotho ekspresyonunun güçlü bir uyarıcısıdır.²⁸⁷ Benzer şekilde klothonun da PPAR- γ ve FABP4,CCAAT-enhancer binding protein gibi diğer bazı adipojenik faktörleri uyarabildiği in-vitro olarak gösterilmiştir.²⁸⁸ PPAR- γ agonistleri (thiazolidinedionlar) ile yapılan tedavi klotho düzeylerini arttırmaktadır.²⁸⁷ Bir metabolik sendrom hayvan modeli olan Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) sıçanlarının böbreklerinde klotho ekspresyonu azalmıştır.²⁸⁹ Bu sıçanlara yine bir PPAR agonisti olan troglitazon verilmesi sonrası renal klotho ekspresyonu artmıştır. İlginç olarak KI aktivitesinden yoksun $KI^{-/-}$ farelerin adipoz dokuları normal olanlara kıyasla belirgin derecede azalmıştır^{290,291} (Şekil 30).



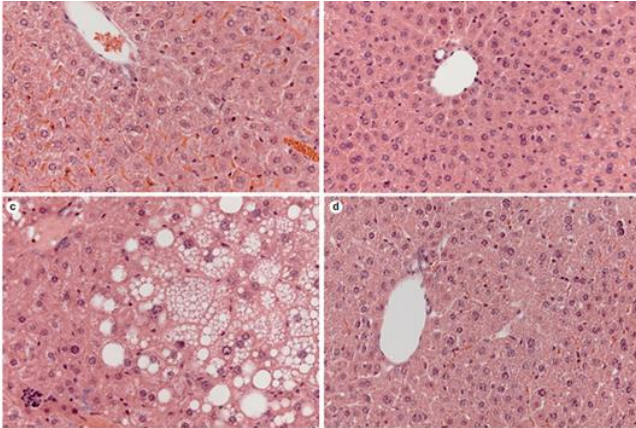
Şekil-30: Farelerde klotho inaktivasyonu ve yağ dokusu birikiminde azalma

Klotho eksikliği beyaz adipoz dokuyu azaltırken aynı farelerde esmer yağ dokusunda değişiklik gözlenmemiştir.²⁹² $KI^{-/-}$ farelerde azalmış karaciğer glikojeni ve pankreas insülin düzeyleri de tespit edilmiştir.²⁹² $KI^{-/-}$ farelerde görülen bu etkiler ve klothonun in vitro adiposit uyarıcı etkisi bu proteinin adiposit matürasyonu ve intrasellüler lipid birikiminde katkısı olduğunu düşündürmektedir (Şekil 31).



Şekil-31:Klotho ve adiposit gelişimi

Obezite ve tip-2 diyabetes mellitus hayvan modellerine benzerlik taşıyan leptin mutant obez farelerde ($Lep^{ob/ob}$) klothonun da elimine edilmesiyle ortaya çıkan $Kl^{-/-} Lep^{ob/ob}$ double knockout farelerin hepatic intrasellüler lipid birikimi suprese olmuştur²⁹³ (Şekil 32). Yüksek yağ içerikli diyet verilen $Kl^{-/-}$ farelerde normal diyet verilenlere kıyasla vücut ağırlığında bir artış görülmemiştir.²⁹³ Klotho fonksiyonunun in vivo manipülasyonu glukoz metabolizmasını da etkilemektedir.^{293,294} Klotho defektif ($Kl^{kl/kl}$) farelerde pankreatik insülin içeriği azalmıştır ancak insülin sensitivitesinde artış nedeniyle hipoglisemiler görülmektedir.



Şekil-32: Klothonun karaciğer yapısı üzerindeki etkileri

Aşırı klotho eksprese eden transgenik farelerde insülin rezistansının biyokimyasal özellikleri saptanmıştır.²¹⁷ Klotho, insülin sensitivitesini azaltıyor görünmektedir. Yaş ilerledikçe diyabet sıklığı azalmaktadır. Benzer şekilde yaşa bağlı düzeyleri gerileyen klothonun da yeni diyabet vakalarının insidansını azaltmada etkili olabileceği araştırma konusudur. Farklı çalışmalarda çözünür klothonun IGF-1 üretimi ve/veya insülin sinyalizasyonunda herhangi bir etkiye sahip olmadığı ve klotho düzeylerinin insülin direnci gelişimiyle korele olmadığı saptanmıştır.²⁹⁵ Bununla birlikte insülinin membran klothosunun ekstrasellüler parçasının (soluble klotho) dolaşıma dökülmesini sağladığı gösterilmiştir.²⁹⁶ Yukarıda değindiğimiz OLETF sıçanlarına ek olarak diyabet ve hipertansiyonlu hayvan modellerinde de klotho belirgin olarak düşük saptanmıştır.^{297,298} Metabolik sendromun da KBY ye benzer biçimde ve hatta böbrek hasarı oluşmadan önce genel bir klotho eksikliği durumu olduğu öngörülmektedir.

Az dikkat çeken başka bir konu da elektrolit homeostazi (özellikle fosfat) ve enerji metabolizması arasındaki ilişkidir. $Kl^{-/-}$ farelerde fosfat toksisitesi gözlenen diğer bir bulgudur. Düşük serum fosfat düzeylerinin ise azalmış insülin aktivitesi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.^{299,300} Non-diyabetik 881 hastayla yapılan bir çalışmada yaş,cinsiyet,yağ dokusunun vücuttaki dağılımı,serum kalsiyumu ve kreatinin gibi faktörlerden bağımsız olarak serum fosfat düzeyleri insülin sensitivitesi ile pozitif biçimde korele bulunmuştur.³⁰¹

Şimdiye kadar belirttiklerimiz α -klotho ile ilgili olup metabolizma ve termoregülasyon açısından önemli rolleri olan FGF-21 in etkilerine aracılık eden β -klotho nun da gözardı edilmemesi ve klotho ve β -klothonun birbirlerinin regülasyon ve fonksiyonlarını etkileyip etkilemediğinin de ortaya konması gerekmektedir.^{302,303} Böbrekte klotho ekspresyonunun modülasyonu gelecekte önemli bir tedavi opsiyonu olacaktır.

1.6.7. Klotho ve Kanser

Son zamanlarda yapılan çalışmalar klothonun tümörrijenez,kanser progresyonu ve prognozu ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.³⁰⁴ Klotho çeşitli kanser türlerinde özellikle IGF-1, p53/p21 ve WNT gibi sinyal yollarını bloke ederek bir tümör süpresör faktör olarak davranmaktadır. Klothonun bu rolü ilk kez 2008 de Wolf ve ark. ları tarafından meme kanserinde saptanmıştır.³⁰⁵ Duktal karsinoma in-situ doku örneklerinde normal meme

dokusuna kıyasla klotho ekspresyonu düşüktür (%17-%90). Klotho ekspresyonu Ki-67 ile karakterize edilen daha düşük proliferatif indeksle doğru orantılıdır. Meme kanserinde klotho ekspresyonu histon deasetilasyonu ve metilasyon gibi epigenetik mekanizmalarla baskılanmaktadır.³⁰⁶ Disfonksiyonel bir klotho gen varyantı olan KL-VS, artmış meme kanseri riski ile bağlantılıdır.³⁰⁷ Akciğer kanseri hücre kültürlerinde yapılan çalışmalarda klotho ekspresyonu indüksiyonu ile ve doz bağımlı olarak neoplastik hücre proliferasyonunda baskılanma ve apoptozda artış meydana gelmektedir. Wang ve ark.nın bir çalışmasında düşük klotho düzeylerinin akciğer kanserinde sisplatin ile yapılan kemoterapiye direnç oluşturduğu gözlenmiştir.³⁰⁸ Yüksek klotho düzeyleri çeşitli akciğer kanser tiplerinde daha iyi prognozla ilişkilidir.^{309,310} Hepatosellüler kanserde de klotho düzeylerinin arttırılmasıyla malign komponentte otofaji ve apoptozda artış olmuştur.³¹¹

Kolon,mide,pankreas,over,melanoma ve benzeri birçok kanser çeşidinde de yine IGF-1/IGF1R, WNT/ β -Catenin gibi sinyal yollarının inhibisyonu, bazı FGFR lerinin aktivasyonu ve epigenetik mekanizmalar ile klothonun evrensel olarak tümör süpresör aktivite gösterdiği anlaşılmıştır.³¹² Tüm veriler ışığında klotho, önemli bir klinik bir biyomarker olması ve hedeflenmiş epigenetik veya direk klotho aktivasyonu bazlı onkoterapilerin geliştirilmesi açısından potansiyel bir seçenektir.

1.6.8. Klotho ve Diğer Hastalık İlişkileri

Organ koruyucu fonksiyonları nedeniyle klothonun birçok sistemik hastalıkta önem taşıdığı düşünülmektedir. Bu anlamda çeşitli örnekler verilebilir. Multiple skleroz gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarda BOS ta klotho düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir.³¹³ Hipofiz bezinde de eksprese edilen klothonun serum düzeyleri GH üreten pitüiter adenom varlığında ve akromegali tablosunda artış göstermektedir.³¹⁴ Klotho pulmoner epiteli oksidatif hasara karşı korumakta ve azalması çeşitli pulmoner komplikasyonların oluşumuna eğilimi arttırabilmektedir.^{315,316,317}

2. FGF 23, KLOTHO ve ÜRİNER TAŞ HASTALIĞI

Üriner taş oluşumuna katkıda bulunan birçok faktörün FGF 23 ve klotho sistemi ile yakın ilişkisi bulunmaktadır. FGF 23 ve klotho genleri idiyopatik ürolitiazisin sınırlı sayıda genetik risk faktörleri arasında tespit edilmiştir.³¹⁸ Taş oluşturuca hastalarla yapılan bir çalışmada FGF 23 genine ait fonksiyonel bir allelik varyantın kalsiyum nefrolitiazisi ve renal fosfat kaçığıyla ilişkili olduğu anlaşılmıştır.³¹⁹

Dünyanın çeşitli bölgelerinde yapılan çalışmalarda bazı klotho gen polimorfizmlerinin kalsiyum oksalat taşlarıyla birlikteliği ortaya konmuştur.^{322,323,324,325} Bu çalışmalardan birinde GG genotipli G395A klotho gen polimorfizmi taşıyan üriner taş hastalıklı kişilerde β -glukuronidaz aktivitesindeki değışikliğe bağılı olarak renal tübüllerde azalmış kalsiyum reabsorpsiyonu nedeniyle idrarda aşırı miktarda kalsiyum atılımı olduğu 24 saatlik idrarda artmış kalsiyum değerleri saptanarak ortaya konmuştur. Genetik çalışmalar aynı zamanda klotho geninin insülin ve IGF-1 gibi medyatörlerle ilişkili sinyal yolları ile oksidatif stresi baskılayarak kalsiyum ve fosfor homeostazını etkilemek suretiyle de taş oluşumunu engellediğini düşündürmektedir.³²⁶ Taş oluşumu gözlenen bazı genetik hastalıklardaki fizyopatolojik mekanizmalar FGF 23 ve klotho işlevleri ile yakınlık göstermektedir. Genetik bir nefrolitiazis nedeni olan otozomal dominant herediter hiperkalsiürik, hipofosfatemik rikets (HRRH) sendromlu hastalarda NPT2c mutasyonu mevcut olup FGF 23 ün bilinen fosfatürik etkisi de NPT2a,2c gibi kanal proteinlerinin inhibisyonuna bağılıdır. İntak FGF 23 ün dolaşıma salınmasından sorumlu GALNT3 mutasyonu ile karakterize hiperfosfatemik familial tümoral kalsinoziste nefrokalsinosiz ortaya çıkar.³³⁷

FGF 23-klotho sistemi, üriner taş oluşumu için de birçok nedensel faktörü içinde barındıran merkezi bir role sahip kalsiyum-fosfat metabolizmasının önemli bir düzenleyicisidir.³²⁷

Hiperkalsiüri kalsiyum oksalat taşlarının oluşum mekanizmaları içerisindeki en baskın faktördür. Aşırı protein alımı ve sistemik asidoz, hiperkalsiüriye yolaçmaları nedeniyle kalsiyum oksalat taş oluşumuyla ilişkili bulunmuşlardır. Randall plakları en fazla bu taşların oluşumuyla karakterize olup daima kalsiyum fosfat (apatit) yapısındadır. Glomerülden filtre edilen kalsiyumun ortalama %1-3 ü idrarla atılır. Kalsiyum reabsorpsiyonu %60-65 proksimal

tübülde, %25-30 henle kulpunun çıkan kalın kolunda ve %8-10 civarında ise distal toplayıcı tübülde gerçekleşir.³²⁸Distal tübüldeki apikal emilim TRPV5 tarafından sağlanmaktadır.³²⁹FGF 23 ve klotho TRPV5 ekspresyonunu artırır. Ekspresyonu etkileyen diğer bazı ajanlar kallikrein ve PTH tır.^{328,340}Membrana yerleşik TRPV5 aktivitesi ise kalsiyum ve magnezyum gibi iyonlar ile pH tarafından regüle edilir. Ekstrasellüler alkalinizasyon TRPV5 etkinliğini artırırken asidifikasyon azaltır. Bununla birlikte pH takı 0,2-0,5 gibi azalmalar kalsiyum atılımını %10 kadar artırırken TRPV5 ekspresyonundaki kıyaslanabilir azalma kalsiyum atılımını çok daha fazla arttırmaktadır. Aşırı FGF 23 varlığında ise tübül hücresi membranında NCC artışı ile birlikte sodyum tutulumunda da artış olur. Bu durum hücre içi kalsiyumun artışı ve TRPV5 kanal aktivitesinde azalmayı beraberinde getirerek hiperkalsiüriye zemin hazırlar. Lümendeki yüksek sodyum düzeyinin kendisi de kalsiyum tuzlarının kristalizasyonu ve sitrat düzeyinde azalmaya yol açan bir etmendir. Sodyum tutulumunun fazlaca olduğu hipertansif hastalarda hiperkalsiüriye sıklıkla rastlanır. TRPV5 genindeki L530R varyasyonu nefrolitiazis ve rekürren taş oluşumu ile ilişkili bulunmuştur.³³⁸ Benzer bir başka çalışmada rs4236480 tek nükleotid gen polimorfizminin nefrolitiazisi olan hastalarda taş çeşitliliğinin artışıyla karakterize olduğu anlaşılmıştır.³³⁹Sonuç olarak TRPV5 regülasyonu hiperkalsiüri ve böbrek taşı oluşumunun engellenmesi açısından önem arzeder ve FGF 23/Klotho sistemi bu bakımdan iki önemli düzenleyicidir. Taş oluşumu için bir diğer olası faktör fosfor ve dolayısıyla fosfatüridir. Rendina ve ark. larının yaptığı bir çalışmada kalsiyum nefrolitiazisi ve serum fosfat kaçağı olan hastaların serumlarında da FGF 23 düzeyleri önemli seviyede yüksek saptanmıştır.³²⁰ Fosfatürik etkisi nedeniyle FGF 23, kalsiyum fosfatın üriner süpersatürasyonunu arttırarak böbrek taşı oluşumuna katkıda bulunuyor olabilir.³²¹Taş oluşturucu 1068 hastanın idrar biyokimyalarının analiz edildiği bir çalışmada bu kişilerde kontrol grubuna nazaran %95 oranında daha fazla hiperfosfatüri saptanmıştır.³³⁰Hiperfosfatürik taş oluşturucu grup içerisinde de diğerlerine kıyasla %23 oranında daha fazla taş oluşum rekürrensi mevcuttur. Kronik aşırı fosfatüri ve renal fosfat kaçağı D vitamini düzeyini arttırır ve bu durum barsaklardan fosfat ve kalsiyum emiliminde de artışa yol açar.³³⁰Her iki elektrolit düzeyindeki eş zamanlı artış diğer uygun şartların varlığında tübüllerde kalsiyum fosfat kristallerinin oluşumuna neden olur. Bu kristaller özellikle proksimal ve toplayıcı tübüllerde reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesiyle epitel hasarına neden olur. Hasarlanmış epitel alanındaki kristaller kalsiyum fosfat taşlarına ilerleyebilir ya da kalsiyum oksalat kristallerinin

nükleasyon,retansiyon ve taşlarının gelişimine yataklık eder.³³¹Serum konsantrasyonuna bağlı olmaksızın tamamı glomerülden serbestçe filtre edilen fosfatın %80 kadarının proksimal tübüldeki geri emiliminden sorumlu NPT2a ve NHERF-1 gibi renal fosfat taşıyıcı ve düzenleyicilerindeki genetik varyasyonlar³³²ve bozukluklar da fosfatüri ve taş oluşumunun bir nedeni olarak tespit edilmiştir.³³³Örneğin NHERF-1 knockout farelerde sodyum,kalsiyum,fosfat ve ilginç olarak ürik asit atılımında artış ve kalsiyum veya ürik asit taş oluşumu ortaya çıkmaktadır.³³⁴ Renal fosfat atılımının atılımının çeşitli yollarla manipülasyonu fosfat ve taş ilişkisini ortaya koymaktadır. Örnek olarak tiyazid grubu diüretikler kalsiyum ve fosfat atılımını önemli ölçüde azaltırken oksalat atılımını belirgin şekilde arttırır. Bu durum kalsiyum-fosfat süpersatürasyonunu azaltarak rekürren kalsiyum oksalat taş oluşumunun engellenmesine yardımcı olur.³³⁵ Fosfatüri kontrolü rekürren üriner taş oluşumu açısından güvenilir prediktif bir faktör olabilir.³³⁶FGF 23/Klotho sisteminin, bilinen fosfatürik etki potansiyeline karşın fizyolojik koşullarda özellikle D vitamini oluşumunu inhibe etmesi nedeniyle hiperkalsiüri ve nefrolitiazise neden olması beklenmez. Ancak renal fosfat taşıyıcı sistemi üzerindeki patolojik aktivitesi hiperfosfatüri ve dolayısıyla taş oluşumuna katkıda bulunuyor olabilir.

D vitamini ve PTH, FGF 23 ve klotho tarafından inhibe edilen ve üriner taş oluşumu gözlenen çeşitli durumlarda patofizyolojik rollere sahip ,kalsiyum-fosfor metabolizmasının iki önemli düzenleyici hormonudur. Klotho knockout farelerde aşırı vitamin D ekspresyonu yanısıra idiyopatik hiperkalsiüri ve ektopik kalsifikasyonlar görülmektedir.²⁰⁹ İntestinal kalsiyum reabsorpsiyonunu arttırması ve renal kalsiyum atılımı üzerindeki etkileri nedeniyle vitamin D hiperkalsemi ve hiperkalsiüri ile yakın ilişkilidir.³⁴¹ Özellikle genetik yatkınlığı olan kişilerde kalsiyum ile kombine alınan yüksek dozda vitamin D, toksisiteye ve ek bir sonuç olarak böbrek taşı oluşumuna neden olabilir.^{342,343} Bir meta-analizde aktif vitamin D düzeyi ürolitiazisli kişilerde kontrollere göre belirgin biçimde yüksek saptanmıştır.³⁴⁶Vitamin D reseptörüne ait bazı gen polimorfizmleri de nefrolitiazise yatkınlık nedeni olarak belirlenmiştir. Yine vitamin D reseptörünün artmış aktivitesi ya da kalsitriole aşırı yanıtılığı taş oluşumuyla bağlantılıdır.³⁴⁴ Standart dozda yapılan vitamin D replasmanı genel popülasyon için belirgin hiperkalsiüri açısından risk oluşturmuyor görünmektedir.³⁴³ Hiperkalsiüri taş oluşturuca kişilerin %60 kadarında görülmekte ve bu grupta renal kalsiyum ve ona eşlik eden fosfat sızıntısı aktif vitamin D düzeyini arttırmaktadır^{354,355}ancak vitamin D

nin depo formunun düzeyi hiperkalsiüri ile korele değildir. Yaygın kanının aksine aslında yakın dönemde yapılan birçok çalışma ise taş oluşturuvcu kişiler arasında vitamin D eksikliğinin yaygın olduğunu göstermekte.^{345,347,348} Dimkovich ve ark. ları düşük 25-hidroksi vitamin D düzeylerinin taş oluşumu açısından riskli olduğunu saptamıştır.³⁴⁹ Litojeneze yatkın olunduğu düşünülen postmenopozal süreçteki sağlıklı kadınlarla yapılan bir çalışmada ise vitamin D replasmanının hiperkalsiüriyi ve taş oluşumu riskini arttırmadığı anlaşılmıştır.³⁵⁰ Vitamin D eksikliğiyle oluşan hipokalsemi nedeniyle PTH düzeyi artarak sekonder hiperparatiroidizm meydana gelir. PTH etkisiyle kalsiyum tutulumu artar ancak normokalsemiye rağmen hipofosfatemi oluşur. Sekonder nedenlerin yokluğu, yüksek serum PTH düzeyi ve normal serum kalsiyumu ile karakterize “Normokalsemik Primer Hiperparatiroidizm” tablosunda düşük aktif vitamin D seviyesi ve semptomatik olgularda sıkça osteopeni ve böbrek taşı oluşumu gözlenmektedir.^{351,352,353} Bu tabloda vitamin D depo formu normal sınırlarda olmalıdır ve hiperkalsiüri dışlama kriterleri arasındadır. Düşük vitamin D düzeyi saptanan taş oluşturuvcuların da serum biyokimyasal özellikleri kısmen de olsa normokalsemik hiperparatiroidizmdekine benzemektedir. Belirtilen hasta gruplarında belirgin vitamin D yüksekliği ya da renal hiperkalsiüri olmayışına karşın üriner taşların önemli semptomlardan biri oluşu akla vitamin D ve PTH sentezi ile kalsiyum-fosfat metabolizmasını düzenleyen FGF 23-Klotho sisteminin patogenetik rolünü getirmektedir.^{348,349}

FGF23/Klotho sistemi üriner taş oluşumunda etkili bazı inhibitör ve promotörler üzerinde etki göstermektedir. Osteoblastlarda ve böbrekte henle kulpunun çıkan kalın kolunda üretilen, inflamatuvar bir kemokin olmasının yanısıra kalsiyuma yüksek affinitesi dolayısıyla kristal matrixin majör bir komponenti olan ve kristal büyümesinin etkin bir inhibitörü niteliği taşıyan osteopontinin önemli bir düzenleyicisi FGF23 tür.³²²

FGF 23 ün, oksidatif hasarı azalttığı ve kas dokusunda egzersiz performansını arttırdığı tespit edilen bir çalışmada aynı zamanda sitrat sentazı aktive ettiği saptanmıştır³⁶⁹. Benzer bir indüksiyon böbreklerde taş oluşumunu engelleyen sitrat düzeyinin artışı sağlıyor olabilir.

Kalsiyum oksalat taşlarının oluşumunda bir diğer önemli faktör oksidatif strestir. Klothonun renal anti-inflamatuvar ve anti-oksidatif koruyucu etkinliğinde azalma kalsiyum oksalat taşlarının tübüler hasar etki eşliğini düşürüyor olabilir. Hiperoksalürik sıçanlar üzerinde

yapılan iki ayrı çalışmada E vitamini kalsiyum oksalat kristalizasyonunu azaltmıştır.^{356,357}

Benzer biçimde hidroksi-L-Proline ile uyarılmış hiperoksalürik sıçan modelinde klotho düzeylerinde azalma, oksidatif belirteçlerde artış ve vitamin E ve vitamin C replasmanı ile bu durumlarda düzelme gözlenmiştir.³⁵⁸ Çalışmada ilginç olarak klotho doku protein düzeyleri azalırken mRNA düzeylerinde ise artış saptanmıştır. Bu durum adaptif bir yanıtın işareti olabilir. Eksojen olarak verilen klotho proteini akut hasarlı böbreklerde oksidatif stres ve apoptozu azaltmıştır.^{359,360} Dolayısıyla doku klotho düzeyinin, taş oluşumunda önemli bir hasar göstergesi potansiyeline ya da aktif koruyucu bir role sahip olduğu düşünülebilir.

Suprafizyolojik düzeylerdeki kalsiyum oksalatın yolaçtığı renal tübüler epitel hasarının diğer bir boyutu endotel disfonksiyonudur. Epitel hasarı sonucu ortaya çıkan çeşitli modülatör makromoleküller kristal oluşumuna katkıda bulunmanın yanısıra inflamasyon gelişimine de katkıda bulunurlar.³⁶¹ Endotel hücrelerinin tübüler epitel hücreleriyle yakın ilişkisi gözönüne alındığında bu medyatörlerin inflamatuvar aktivitenin bir parçası olarak endotel hücrelerinde de modülasyon ve disfonksiyona yolaçabileceği düşünülebilir. İnsan hücrelerinin sitoplazmasında bulunan ve protein modifikasyon süreçlerinin metabolik bir yan ürünü olan Asimetrik dimetil arjinin (ADMA) bu medyatörlerden biri olup özellikle nitrik oksit sentazın kompetitif inhibisyonu yoluyla endotel disfonksiyona sebebiyet verir. Etilen glikol ile kalsiyum oksalat taş hastalığı modeli oluşturulan sıçanlarla yapılan bir çalışmada hiperoksalüri oluşumunun ilk 24 saati içerisinde artmış plazma düzeyleri tespit edilmiştir.³⁶² Aynı çalışmada kalsiyum oksalat taşı rekürrensini azalttığı bilinen verapamilin verildiği sıçan grubunda kristal depozisyonu, üriner oksalat ekskresyonu ve plazma ADMA düzeylerinde belirgin azalma gözlenmiştir. Sistemik endotel disfonksiyonun ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon ve metabolik sendrom gibi durumlarda önemli rol oynadığı düşünüldüğünde, hiperoksalüri kaynaklı yüksek plazma ADMA düzeyinin sistemik endotel disfonksiyona yolaçmasının³⁶³ nefrolitiazis ve sistemik hastalıklar arasında eksik bir bağlantı için güçlü bir örnek teşkil ettiğini söylemek yanlış olmaz. Bu durum bize anti-oksidan, anti-inflamatuvar ve sistemik endotel koruyucu özellikleri başta olmak üzere pleiotropik etki potansiyeline sahip klotho proteininin kalsiyum oksalat taş oluşumu sürecinde renal ekspresyon profili, idrar ve kan düzeyleri gibi parametrelerinin değişiklikleri ile çeşitli oksidatif ve metabolik parametrelerin değişimi arasındaki ilişkileri ortaya çıkarmanın da oksalat nefrolitiazisi ve sistemik hastalıklar arasında önemli eksik halkalardan

birini yerine koyabileceğini düşündürmüştür. Nefrolitiazis ve metabolik sendrom arasındaki direk bir yolağa ışık tutar nitelikte farklı bir çalışmada ise etilen glikol ile hiperoksalürik hale getirilen sıçanlarda, metabolik sendrom ve diyabet gibi sistemik hastalıklar üzerinde olumlu etkilere sahip bir PPAR-γ agonisti olan pioglitazonun renal kristal depozisyonunu, oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığı saptanmıştır.³⁶⁴ Çalışmada etilen glikol+pioglitazon grubunda hipertrigliserideminin azaldığı³⁶⁵, idrar volümünün daha düşük olduğu, üriner pH, Mg, P ve Ca atılımının ise kontrol grubuna göre önemli değişiklik göstermediği anlaşılmıştır. Bu durum pioglitazon ve dolayısıyla PPAR-γ aktivitesinin farklı yollar üzerinden taş oluşumunu baskılıyor olabileceğini göstermektedir. Klotho nun PPAR-γ yı aktive edici özelliği ise böyle bir yolağın taş oluşum sürecinin endojen bir düzenleyicisi olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim statinler ve klotho arasındaki yakın ilişkiyi vurgulayan farklı çalışmalar da mevcuttur.^{366,367,368} Belirttiğimiz örneklerin de işaret ettiği gibi FGF 23/klotho sistemi, üriner taş oluşumu ile metabolik sendrom gibi bazı sistemik hastalıklar arasındaki ilişkiyi açıklayan ve bu hastalıkların tedavisinde önemli ipuçları sağlayacak bir köprü olabilir. Bu açıdan her üç komponenti bir arada değerlendirebilecek yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

3-GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Kalsiyum Oksalat Nefrolitiazisi Hayvan Modeli

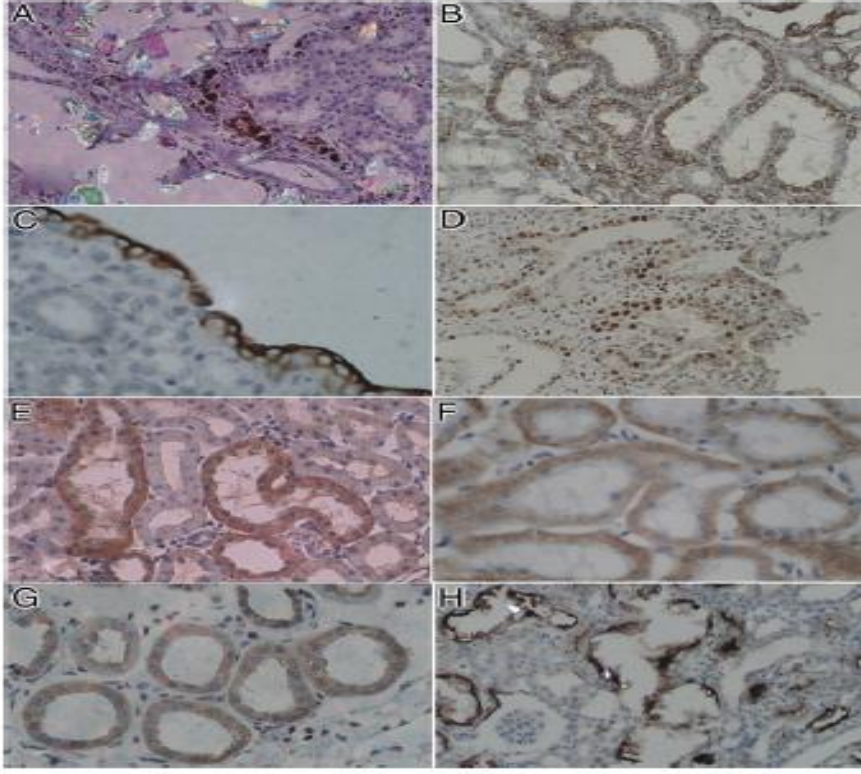
İntrarenal kristal formasyonunun patofizyolojisini ortaya çıkarmak için çeşitli rodent modelleri geliştirilmiştir. Etilen glikol uygulaması iyi bilinen ve yaygın olarak kullanılan bir nefrokalsinozis modelidir. Oral alımını takiben EG, glikolat, glioksilat ve oksalata metabolize olur. 0,75 Vol/vol oranında EG içerikli içme suyu alan sıçanlarda başlangıçtan 1 gün sonrası itibarıyla hiperkalsiüri ve hiperoksalüri gelişir. Yine bu sıçanlarda 1 gün kadar kısa bir süre içerisinde böbrek medulla ve korteks bölgelerinde tübüler hasar, dilatasyon, rejenerasyon ve interstisyel inflamasyonun eşlik ettiği intratübüler kristal depozisyonu tespit edilebilmektedir. EG ürünü oksalatın kristal oluşumunda temel metabolit olması yanısıra glikolat ve glioksilat metabolitlerinin de normal tübüler epitelin kristal bağlayıcı hale gelmesinde rol oynadıkları tespit edilmiştir.^{370,371} Bu süreçte başta OPN, bikunin ve Tamm-Harsfall proteini olmak üzere çeşitli kalsifikasyon promotör ve inhibitörleri aktive olmaktadır.³⁷¹ Özellikle erkek wistar sıçanları ile yapılan çalışmalarda EG ile başlangıçta tetiklenen nefrokalsinozise ilerleyen günlerde nefrolitiazis te eklenir. Diğer bazı nefrokalsinozis ve/veya nefrolitiazis modelleri; subkütanöz osmotik potasyum oksalat "minipump" ları^{372,373}, intraperitoneal sodyum oksalat uygulaması³⁷⁴, bir oksalat prekürsörü olan hidroksi-L-prolin uygulaması³⁷⁵, THP, NPT2a, GRHPR (glyoxylate reductase/hydroxy pyruvate reductase) gibi protein veya enzimlerin genetik modifikasyonları^{375,376}, genetik hiperkalsiüri jenerasyonların seçilmesi³⁷⁷, yüksek doz vitamin D veya glikolik asit ya da vitamin B6 dan yoksun diyet verilmesi^{378,379,380} ve ileal rezeksiyon ya da bypasstır.³⁸¹

3.2 DENEYSEL HİPEROKSALÜRİK SIÇAN MODELLERİNİN İNCELENMESİNDE İMMÜNOHİSTOHİSTOKİMYANIN ROLÜ

Yukarıda belirttiğimiz sıçan modelleri üriner taş oluşumunda rol alan kristal büyümesi, klirensi, kristal-epitel ilişkileri, promotör ve inhibitör makromoleküller gibi konular hakkında bilgi sağlamanın yanısıra immünohistokimya gibi ek olarak kullanılan bazı yöntemler yardımıyla nefrolitiazis üzerinde etkili endojen veya eksojen faktörlerin etki şekilleri ve mekanizmalarının ortaya çıkarılmasında ve çeşitli biyokimyasal, metabolik ya da

sistemik hastalık süreçlerine ilişkin parametrelerin yine nefrolitiazis ile ilişkilerinin saptanmasında büyük faydalar sağlamaktadır. Tamilselvan ve ark. nın yaptığı bir çalışmada³⁸² EG ile hiperoksalürik hale getirilen sıçanlarda, eksojen olarak verilen vitamin E tedavisinin dokunun oksidan durumunu iyileştirerek kristal depozisyonunu azalttığı histolojik örneklerin ışık mikroskopisiyle incelenmesi sonrası ortaya konabilmiştir. Taguchi ve ark. larının bir çalışmasında³⁸³ yine EG ile hiperoksalüri oluşturulmuş sıçanlarda PPAR- α ve PPAR- γ nın kristal formasyonu üzerine olan farklı etkileri immünohistokimyasal incelemeyle değerlendirilmiştir. Okamoto ve ark.larının bir çalışmasında³⁸⁴ ise bir metabolik sendrom modeli olan Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) sıçanlarında EG ile uyarılan hiperoksalürik koşullarda artmış kristal depozisyonu ve bununla ilişkili OPN ve MCP-1 gibi faktörlerin doku ekspresyonu ışık mikroskopisi ile histolojik inceleme ve immünohistokimya kullanılarak değerlendirilmiştir.

Şekil-33 te hiperoksalürik sıçan böbreğinin çeşitli biyomoleküllere ilişkin immünohistokimyasal boyama kesidi görülmektedir.



Şekil-33. A) Kalsiyum oksalat kristal birikiminin olduğu tübüllere komşu interstisyumda monosit-makrofaj infiltrasyonuna işaret eden ED-1 pozitif kahve-siyah renkli alan B) Kristal matriks komponentleri olan OPN, hyaluronan ve kollajen gibi bazı ligandlar açısından reseptör vazifesi gören CD44 için pozitif boyanan tübül epitel hücreleri C) OPN için belirgin boyanma gösteren renal forniksteiki papilla yüzey epitel D) Proliferatif ve rejeneratif hücresel aktiviteyi gösteren tübüler epitelyal boyanma E) Kristal oluşumunun fazlaca olduğu renal kortikal tübüllerde kuvvetli OPN pozitif boyanma F) Hücre adezyonu için önemli rol sahip E-Cadherin(+) renal kortikal tübüler epitel hücreleri G) İnflamasyon ve hücresel hasar göstergesi olan NF- κ β pozitif tübül epitel H) Kristal depozisyonunun yoğun olduğu alanlarda böbrek hasar belirteçleri açısından yoğun boyanma gösteren tübül epitel

3.3 HİPEROKSALÜRİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA BÖBREK DOKUSUNDA FGF23/KLOTHO EKSPRESYON PROFİLİNİN ÜROLİTİYAZİS PATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

3.3.1 Deney Hayvanları

Çalışmamızda uluslararası deney hayvanları bakım ve kullanım standartlarına uygun nitelikte 35 adet 200-300 gram ağırlığında ve tahminen 6-8 haftalık ya da bu ağırlıktaki yaşlara uyan sağlıklı erkek Wistar sıçanları kullanılmıştır. Sıçanların tamamı Yeditepe Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilmiş olup çalışma için Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik kurulundan izin alınmıştır. Sıçanlar patojensiz metabolik kafeslerde ortalama 22-24 derecelik sıcaklıkta ve %50-60 civarı nem oranıyla barındırılmıştır. Buldukları ortamın 12 saat boyunca ışık alması ve 12 saat karanlık olması sağlanmıştır.

3.3.2 Sıçan Grupları ve Etilen Glikol Uygulaması

Mevcut 35 sıçan 7 şerli 5 farklı gruba ayrıldı. A,B,C ve D grubundakilere etilen glikol verilmesi, E grubunun ise kontrol grubu olarak kalması planlandı. Çalışmamızda sıçanlarda hiperoksalüri oluşturabilmek için etilen glikol kullandık. Birçok çalışmada etilen glikolün içme suyuna karıştırılarak deney hayvanlarının serbest erişimine bırakılmasına karşın,biz tüm hayvanların aynı dozda etilen glikol aldığından emin olmak amacıyla feeding tüp kullanarak gavaj yoluyla etilen glikolün hayvanlara verilmesini sağladık. Hiperoksalüri oluşumu için gereken doz farklı çalışmalardaki uygulamalar da baz alınarak 0,12 ml. %5 lik etilen glikolün 1 ml. normal suda çözüldürülerek 0,75 lik Volüm/volüm oranı sağlanmak suretiyle günde iki kez verilmesi olarak belirlendi. Hiperoksalüri amacıyla etilen glikol dışında ek olarak farklı bir model kullanılmadı. EG uygulamamız dışında hayvanlar normal su ve yiyecek ile beslenmeye devam ettirildi. EG verilenler içerisinde A grubu 7. gün, B grubu 14. gün, C grubu 21. gün ve D grubu ise 28. gün sonunda anestezi altında dekapitasyon yoluya sakrifiye edilerek sağ böbrekleri patolojik inceleme için ekstrakte edildi. E grubundaki kontrol sıçanları ise 24 saatlik normal beslenme ve takibin sonunda sakrifiye edilmiştir. 28 günlük deney süresince hiçbir hayvanda enfeksiyon ya da önemli hastalık bulgusu ve sakrifikasyon öncesi ölüm ile kayıp gözlenmedi.

3.3.3 Patolojik İnceleme

Parafine gömülü olarak saklanan sıçan böbreklerinden 3 µm kalınlığında kesitler elde edilmiş sonrasında xylene ile deparafinize edilip dereceli etanol serisinden geçirilerek fosfat tamponlu salin içerisine bırakılmıştır. Sonrasında FGF 23 (St. John's Laboratory,lot: B7101) ve Klotho (GeneTex, Lot: 821700243) antikör kit leri kullanılarak immünohistokimyasal (Bond-Max-Leica marka cihaz ve immünohistokimya kit leri ile) boyama yapılmıştır. FGF23 ve klotho için ayrı ayrı elde edilen her sıçan böbrek kesiti preparatında, kortikal, medüller ve glomerüler alanlardaki ekspresyon oranları boyanma yüzdesi ve yoğunluğu üzerinden ayrı ayrı değerlendirildikten sonra yine her sıçan preparatı için, belirtilen histolojik alanlarda bu iki veriyi içeren tek bir ekspresyon skoru oluşturuldu. Boyanma yüzdesi 4, yoğunluğu ise 3 aşamada skorlandı. Boyanma yüzdesi hiç boyanma göstermeyen veya %25 ve altında bir alanda boyanma gösteren olgular için 1, %25-%50 'lik bir alanda boyanma gösteren olgular için 2, %50-%75 arasında boyananlarda 3 ve %75'ten daha yaygın boyanma gösteren olgular için 4 olarak skorlandı. Benzer şekilde bir skorlama boyanma yoğunluğu için de uygulandı. Boyanma olmayan ya da hafif yoğunlukta boyanma gösteren olgular Skor 1, orta düzeyde boyanma gösteren olgular Skor 2, şiddetli boyanma gösteren olgular Skor 3 kategorisine dâhil edildi. Boyanma yüzdesi ve şiddetini birlikte hesaplayan ekspresyon skoru ise her olguda boyanma yüzdesi ve şiddetinin çarpımı ile elde edildi. Bu çarpım sonucu 1 ile 12 arasında değişen ekspresyon skorlarına ulaşıldı. Çalışma grubundaki sıçan sayısı göz önüne alınarak, istatistiksel anlam analizi yapabilmek amacı ile olgular ekspresyon skoru 6'dan düşük ile 6 ve üzeri olanlar şeklinde iki gruba ayrıldı.

3.3.4 İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi için SPSS 20.0 paket programı kullanılmıştır. Değerlendirmede 1 kontrol 4 deney grubu olmak üzere 7'şerli toplam 5 sıçan grubu arasında, kortikal, medüller ve glomerüler olmak üzere 3 farklı bölgede Klotho ve FGF23 değişkenlerine ait skor ortalamaları arasında fark olup olmadığı analiz edilmiştir. Karşılaştırmalar, Kruskal Wallis ve Dunn's testleri kullanılarak yapılmış olup tüm analizlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. FGF23 ve Klotho Doku Ekspresyon Değerlendirme Tablosu

		KONTROL						A Grubu (7. Gün)						B Grubu (14. gün)					
		Kortikal Tübül		Medüller Tübül		Glomerül		Kortikal Tübül		Medüller Tübül		Glomerül		Kortikal Tübül		Medüller Tübül		Glomerül	
		B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite	B. Yüzdesi	İntensite
KLOTHO	1	70	2	80	1	80	3	30	3	20	1	50	3	40	3	20	1	60	2
	2	50	3	50	1	50	3	30	3	20	1	30	3	20	2	5	1	70	2
	3	30	3	40	1	40	3	40	3	20	1	30	3	20	2	2	1	40	2
	4	30	3	20	1	30	3	40	2	5	1	40	3	40	3	5	1	60	3
	5	20	3	10	1	10	3	30	3	10	1	40	3	40	3	30	1	30	3
	6	20	3	10	1	20	3	20	2	0	0	10	3	40	3	20	2	60	3
	7	20	3	20	1	20	3	30	3	10	1	50	3	50	2	30	2	50	2
FGF 23	1	80	1	80	1	70	2	30	1	80	2	10	1	80	1	70	2	30	2
	2	90	1	90	3	30	2	20	2	90	1	50	3	0	0	0	0	50	2
	3	30	1	90	1	80	2	90	1	100	3	5	1	20	1	30	2	50	2
	4	80	1	80	1	80	2	30	1	90	2	30	2	30	2	10	1	20	2
	5	90	1	90	1	50	2	80	2	90	1	70	2	20	1	30	2	20	2
	6	80	1	80	2	60	2	80	1	100	1	50	3	10	1	20	1	30	2
	7	30	2	90	1	60	2	5	1	5	1	5	1	10	1	20	2	30	1
KLOTHO	1	50	2	30	2	40	2	10	1	20	2	30	1	20	2	30	1	30	1
	2	30	2	20	1	30	2	20	1	10	1	10	1	10	1	30	1	30	1
	3	50	2	20	2	50	2	20	2	20	2	20	2	20	2	10	2	10	2
	4	30	2	20	1	50	2	30	2	30	2	20	2	20	2	30	1	30	1
	5	20	1	10	1	50	1	10	1	10	1	20	1	20	1	10	1	10	1
	6	30	2	10	1	20	1	10	1	10	1	20	2	20	2	30	1	30	1
	7	20	1	10	1	10	1	10	1	10	1	20	2	20	2	10	1	10	1
FGF 23	1	1	1	50	1	10	1	10	1	10	1	30	2	5	1	5	1	10	1
	2	10	1	20	2	10	1	2	1	30	1	10	1	10	1	10	1	10	1
	3	10	1	10	1	10	1	2	1	10	2	5	1	10	1	10	1	10	1
	4	30	1	20	2	10	1	30	2	20	3	10	1	10	1	10	1	10	1
	5	5	1	30	2	10	1	5	1	5	1	10	1	10	1	10	1	10	1
	6	10	1	20	2	10	1	1	1	20	2	1	1	20	2	1	1	10	1
	7	3	1	70	1	2	1	10	1	30	2	10	1	10	1	10	1	10	1

Tablo 4. Sıçan böbrek kesitlerinin immünohistokimyasal boyanması ile elde edilen preparatlarda FGF23 ve Klothonun boyanma yüzdesi ve şiddetini gösteren sonuç tablosu

4.2. Grupların Normal Dağılım Analizleri

Skorlama sonrası parametrik testlerden ANOVA'nın şartlarından biri olan tüm grupların normal dağılıma uyması maddesini incelediğimizde, tüm bölgelerde normal dağılmayan en az bir grubun olduğunu görülmüştür ($p < 0,05$). Glomerül bölgesinde FGF23 skorlarında Kontrol, A ve B grupları normal dağılsa dahi C ve D gruplarında tüm deneklerin skorları 1 olduğu için normal dağılım zaten söz konusu değildir. Bu nedenle tüm karşılaştırmalar ANOVA'nın alternatifi olan Kruskal-Wallis testi ile yapılacaktır.

4.3. Grupların Arasında Çoklu Ortalama Karşılaştırma Analizleri

Değişken	Grup	Kruskal Wallis Testi	
		Ki-Kare	Anlamlılık Değeri (p)
Klotho	Kortikal Tübüler	14,032	0,007*
	Medüller Tübüler	7,536	0,110
	Glomerül	18,787	0,001*
FGF23	Kortikal Tübüler	16,740	0,002*
	Medüller Tübüler	10,665	0,031*
	Glomerül	23,122	0,000*

Tablo 5. Gruplararası analiz tablosu

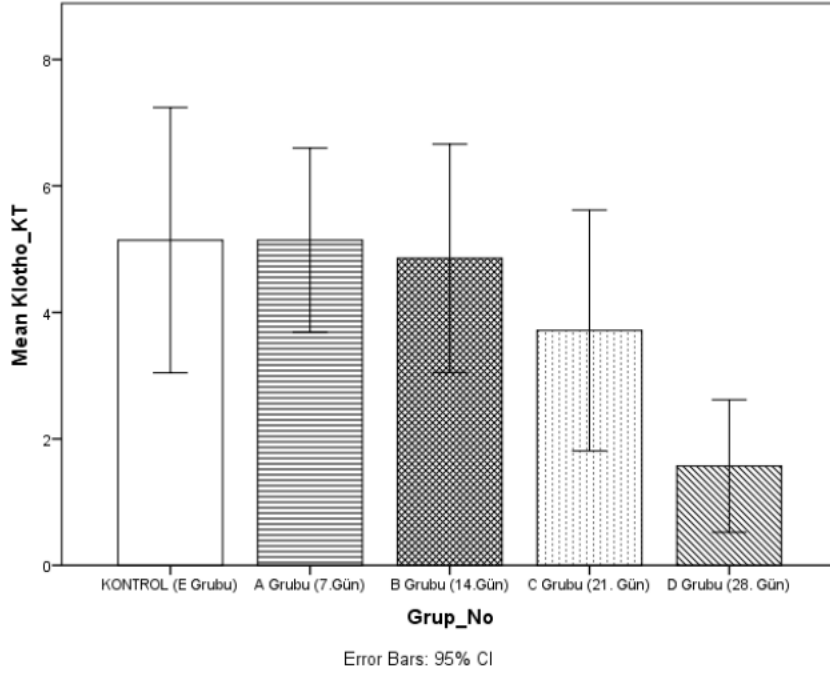
Kruskal Wallis testlerinin sonuçları incelendiğinde medüller tübül bölgesinde grupların klotho skor ortalamaları arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$). Kortikal tübüler alanda ve glomerüler bölgede hem klotho hem de FGF23 skorları için, medüller tübül bölgede ise FGF23 skorları için grup ortalamaları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Fark bulunan bölgelerde farkın hangi gruplardan kaynaklandığını bulmak amacıyla parametrik olmayan Dunn's Testi kullanılmıştır.

4.4. Gruplar Arasında İkili Ortalama Karşılaştırma Analizleri

Değişken	Bölge	Grup	Dunn's Testi			
			Test Değeri	Anlamlılık (p)		
Klotho	Kortikal Tübüler	Kontrol Grubu – A Grubu	-0,929	1,000		
		Kontrol Grubu – B Grubu	0,143	1,000		
		Kontrol Grubu – C Grubu	6,000	1,000		
		Kontrol Grubu – D Grubu	15,500	0,030*		
		A Grubu – B Grubu	1,071	1,000		
		A Grubu – C Grubu	6,929	1,000		
		A Grubu – D Grubu	16,429	0,017*		
		B Grubu – C Grubu	5,857	1,000		
		B Grubu – D Grubu	15,357	0,033*		
		C Grubu – D Grubu	9,500	0,689		
		Klotho	Glomerül	Kontrol Grubu – A Grubu	-2,857	1,000
				Kontrol Grubu – B Grubu	-3,429	1,000
Kontrol Grubu – C Grubu	7,714			1,000		
Kontrol Grubu – D Grubu	15,714			0,032*		
A Grubu – B Grubu	-0,571			1,000		
A Grubu – C Grubu	10,571			0,476		
A Grubu – D Grubu	18,571			0,005*		
B Grubu – C Grubu	11,143			0,368		
B Grubu – D Grubu	19,143			0,003*		
C Grubu – D Grubu	8,000			1,000		
FGF23	Kortikal Tübüler			Kontrol Grubu – A Grubu	4,143	1,000
				Kontrol Grubu – B Grubu	13,714	0,067
		Kontrol Grubu – C Grubu	16,286	0,013*		
		Kontrol Grubu – D Grubu	15,143	0,027*		
		A Grubu – B Grubu	9,571	0,583		
		A Grubu – C Grubu	12,143	0,163		
		A Grubu – D Grubu	11,000	0,296		
		B Grubu – C Grubu	2,571	1,000		
		B Grubu – D Grubu	1,479	1,000		
		C Grubu – D Grubu	-1,143	1,000		
		FGF23	Medüller Tübüler	Kontrol Grubu – A Grubu	1,429	1,000
				Kontrol Grubu – B Grubu	11,857	0,260
Kontrol Grubu – C Grubu	11,857			0,260		
Kontrol Grubu – D Grubu	12,000			0,243		
A Grubu – B Grubu	10,429			0,503		
A Grubu – C Grubu	10,429			0,503		
A Grubu – D Grubu	10,571			0,472		
B Grubu – C Grubu	0,000			1,000		

Tablo 6. Gruplararası ikili analizler

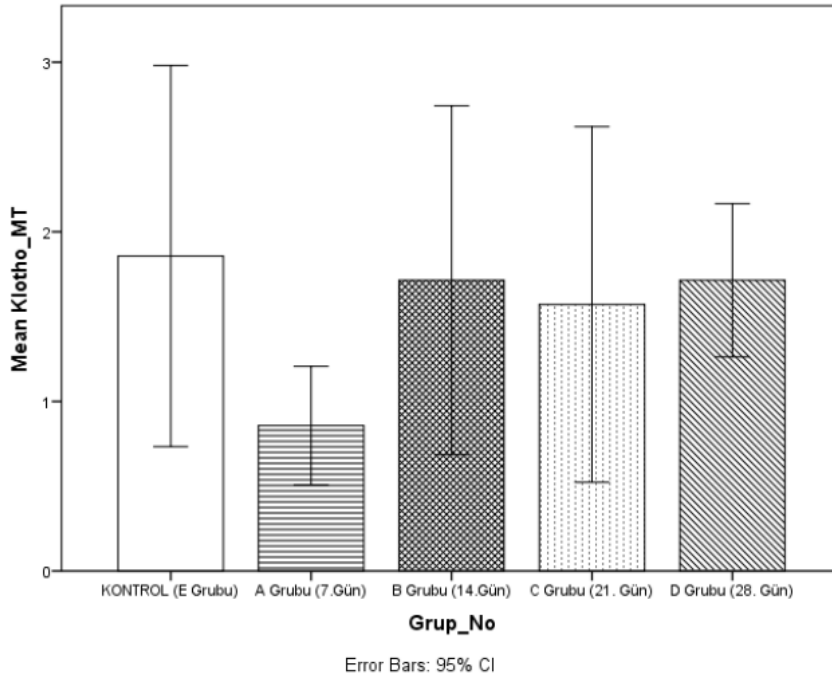
Değişken	Bölge	Tanımlayıcı İstatistikler			
		Grup	n	Ortalama(M)	Standart Sapma(SD)
Klotho	Kortikal Tübüler	KONTROL (E Grubu)	7	5,14	2,268
		A Grubu (7.Gün)	7	5,14	1,574
		B Grubu (14.Gün)	7	4,86	1,952
		C Grubu (21. Gün)	7	3,71	2,059
		D Grubu (28. Gün)	7	1,57	1,134



Tablo 7. Kortikal Tübüler Bölgede Klotho ekspresyonunun gruplara göre dağılımı

Kortikal alanda klotho ekspresyonu 7. Günden itibaren azalma eğilimi göstererek 28. Günde (D Grubu) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha düşük tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

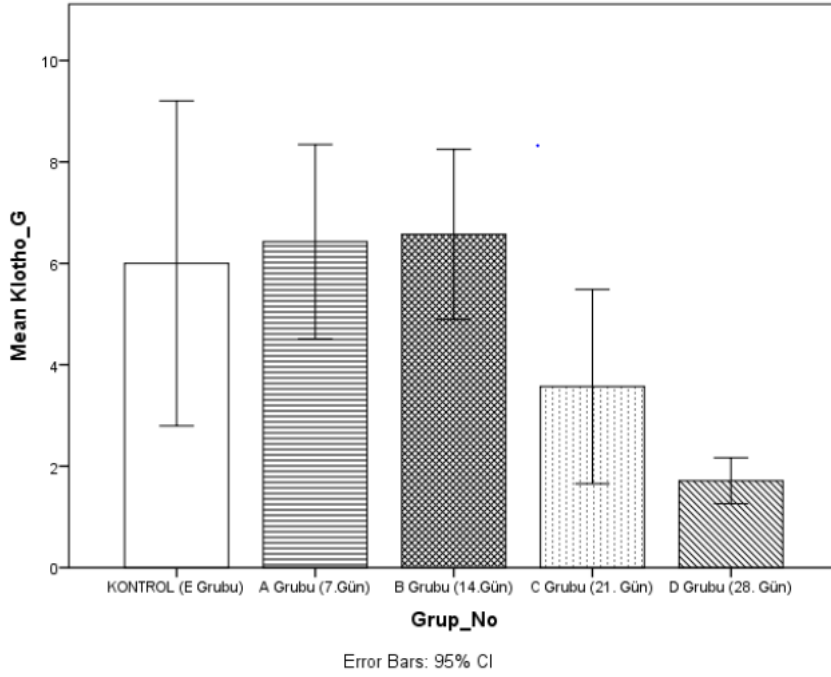
Değişken	Bölge	Tanımlayıcı İstatistikler			
		Grup	n	Ortalama(M)	Standart Sapma(SD)
Klotho	Medüller Tübüler	KONTROL (E Grubu)	7	1,86	1,215
		A Grubu (7.Gün)	7	0,86	0,378
		B Grubu (14.Gün)	7	1,71	1,113
		C Grubu (21. Gün)	7	1,57	1,134
		D Grubu (28. Gün)	7	1,71	0,488



Tablo 8. Medüller tübüler bölgede klotho ekspresyon dağılımı

Medüller Tübüler bölgede beş grup arasında klotho ekspresyon skor karşılaştırması yapıldığında Kruskal Wallis testi sonucunda p değeri 0,110 olarak saptanmıştır. Buna göre 5 grubun skorları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,05$). Nitekim grafikte de ortalamaların birbirine çok yakın olduğu görülmektedir.

Değişken	Bölge	Tanımlayıcı İstatistikler			
		Grup	n	Ortalama(M)	Standart Sapma(SD)
Klotho	Glomerül	KONTROL (E Grubu)	7	6,00	3,464
		A Grubu (7.Gün)	7	6,43	2,070
		B Grubu (14.Gün)	7	6,57	1,813
		C Grubu (21. Gün)	7	3,57	2,070
		D Grubu (28. Gün)	7	1,71	0,488

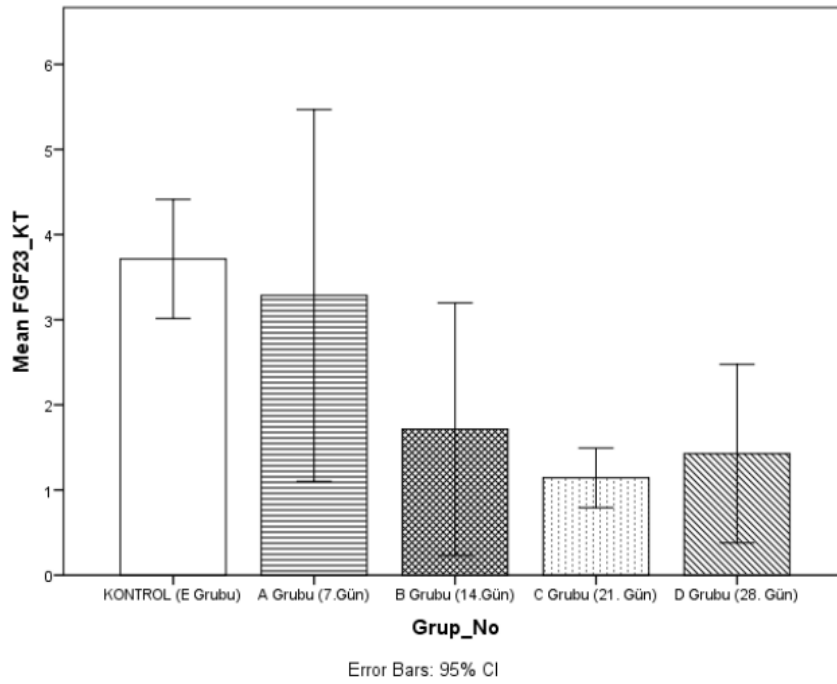


Tablo 9. Glomerüler bölgede klotho ekspresyon dağılımı

Glomerül bölgesinde beş grup arasında klotho ekspresyon skoru karşılaştırması yapıldığında D ve A grubu arasında, D ve B grubu arasında, D ve kontrol grubu arasındaki skor ortalaması farkı anlamlıdır ($p < 0,05$). Buna göre D grubunun skor ortalaması olan 1.71, bu 3 grubun skor ortalamalarından istatistiksel olarak farklı ve daha düşüktür. D grubu haricindeki diğer 4 grup arasındaki ikili karşılaştırmalardaki farklar ve D ile C grubu arasındaki ortalama farklılıkları

anlamlı değildir ($p>0,05$). Diğer bir deyişle bu bölgede kontrol grubu ile deney grubu arasındaki skor farklılıkları, ancak 28. günde tespit edilebilmiştir. Ayrıca deney gruplarında, 7. günden itibaren başlayan azalma 28. Günde anlamlı bir fark oluşturacak noktaya ulaşmıştır.

Değişken	Bölge	Tanımlayıcı İstatistikler			
		Grup	n	Ortalama(M)	Standart Sapma(SD)
FGF23	Kortikal Tübüler	KONTROL (E Grubu)	7	3,71	0,756
		A Grubu (7.Gün)	7	3,29	2,360
		B Grubu (14.Gün)	7	1,71	1,604
		C Grubu (21. Gün)	7	1,14	0,378
		D Grubu (28. Gün)	7	1,43	1,134

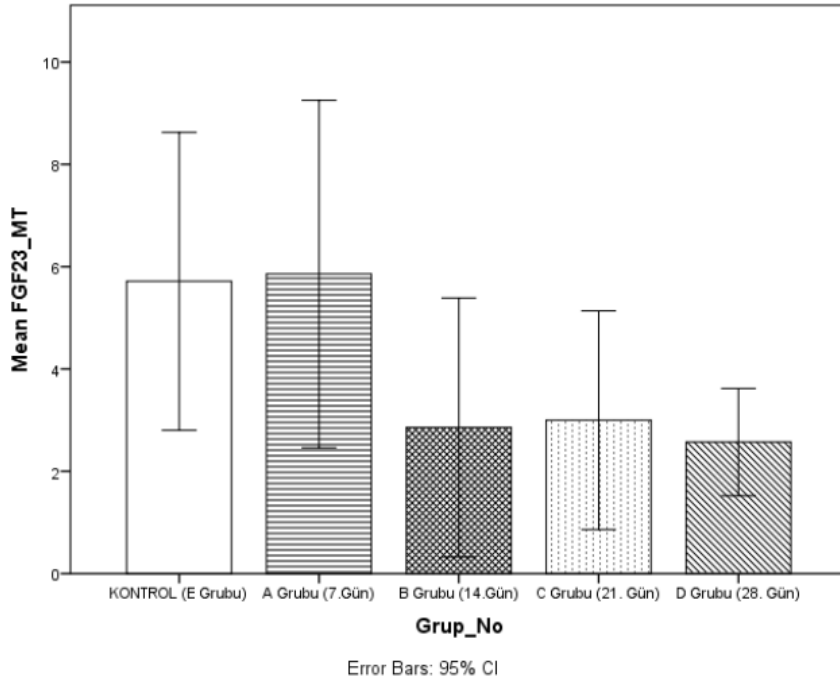


Tablo 10. Kortikal Tübüler Bölgede Gruplara Göre FGF23 Dağılımı

Kortikal Tübüler bölgede beş grup arasında FGF23 ekspresyon skoru karşılaştırması yapıldığında D ile kontrol grubu arasında ve C grubu ile kontrol grubu arasındaki skor

ortalaması farkı anlamlıdır ($p < 0,05$). Buna göre D grubunun skor ortalaması (1,43) ve C grubunun skor ortalaması (1,14) kontrol grubu ortalamasından (3,71) istatistiksel olarak farklı ve daha düşüktür ($p > 0,05$). Diğer bir deyişle bu bölgede deney ve kontrol grubu arasındaki anlamlı skor farklılıkları, 21. günde tespit edilebilmiştir. Bu günden sonra da fark artarak devam etmiştir.

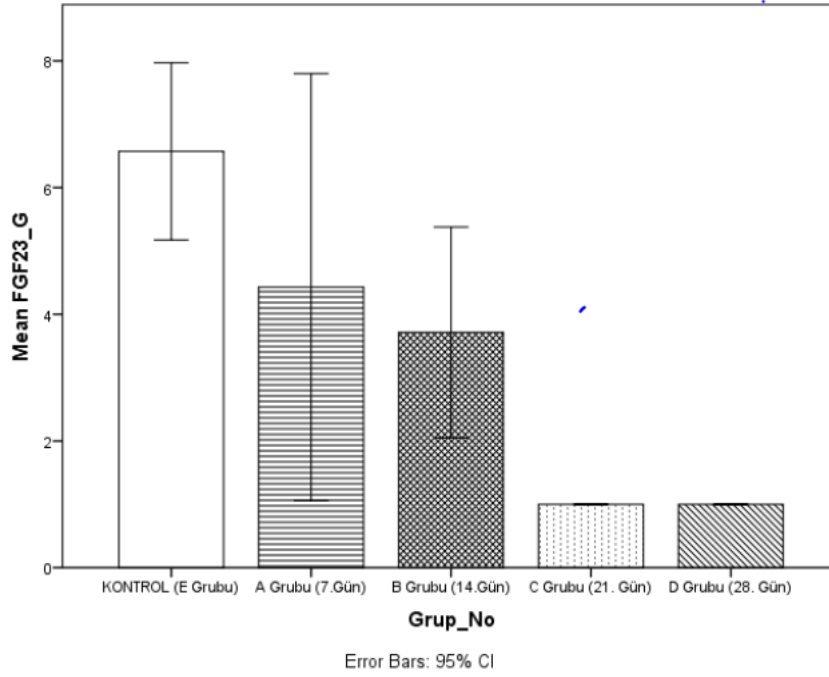
Değişken	Bölge	Tanımlayıcı İstatistikler			
		Grup	n	Ortalama(M)	Standart Sapma(SD)
FGF23	Medüller Tübüler	KONTROL (E Grubu)	7	5,71	3,147
		A Grubu (7.Gün)	7	5,86	3,671
		B Grubu (14.Gün)	7	2,86	2,734
		C Grubu (21. Gün)	7	3,00	2,309
		D Grubu (28. Gün)	7	2,57	1,134



Tablo 11. Medüller Tübüler Bölgede Gruplar Arası FGF23 Dağılımı

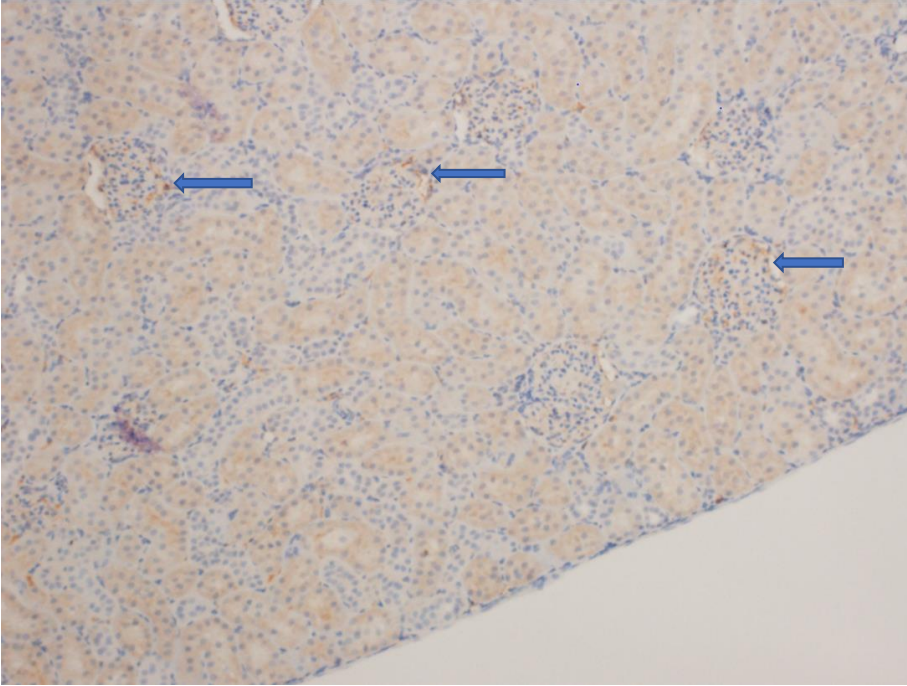
Medüller Tübül bölgesinde beş grup arasında FGF23 ekspresyon skoru karşılaştırması yaptığımızda, toplu karşılaştırmada Kruskal Wallis'in anlamlılık değeri 0,05'in altında çıkmasına rağmen ikili karşılaştırmalarda herhangi 2 grubun arasında anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Buna göre medüller tübüler alanda gruplar arasında FGF23 skor ortalamaları arasındaki farklar anlamlı değildir.

Değişken	Bölge	Tanımlayıcı İstatistikler			
		Grup	n	Ortalama(M)	Standart Sapma(SD)
FGF23	Glomerül	KONTROL (E Grubu)	7	6,57	1,512
		A Grubu (7.Gün)	7	4,43	3,645
		B Grubu (14.Gün)	7	3,71	1,799
		C Grubu (21. Gün)	7	1,00	0,000
		D Grubu (28. Gün)	7	1,00	0,000

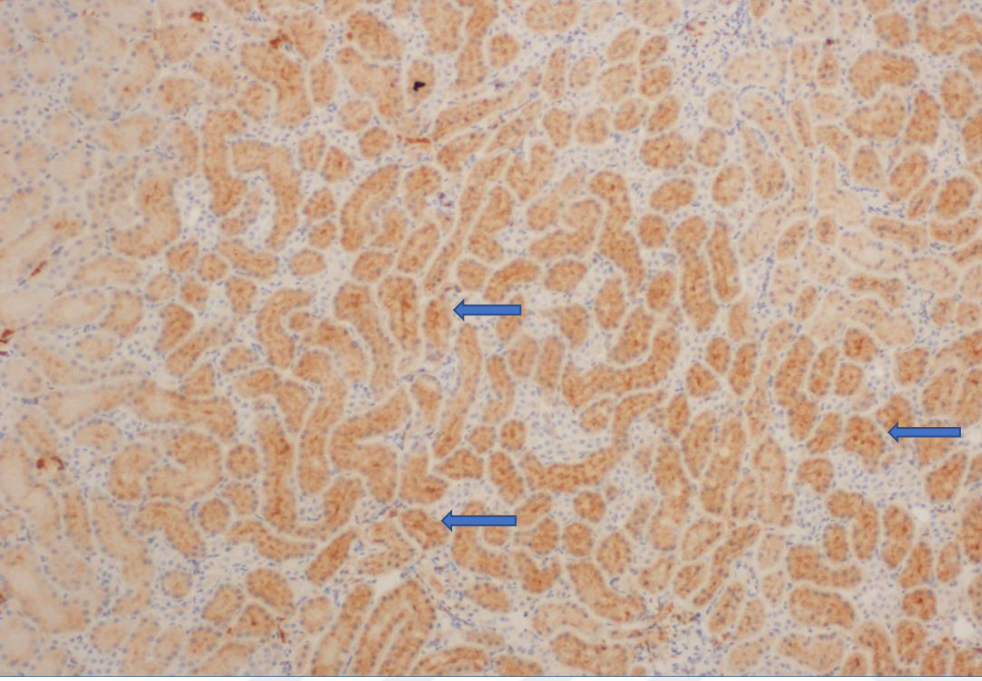


Tablo 12. Glomerüler Bölgede Gruplara Göre FGF 23 Dağılımı

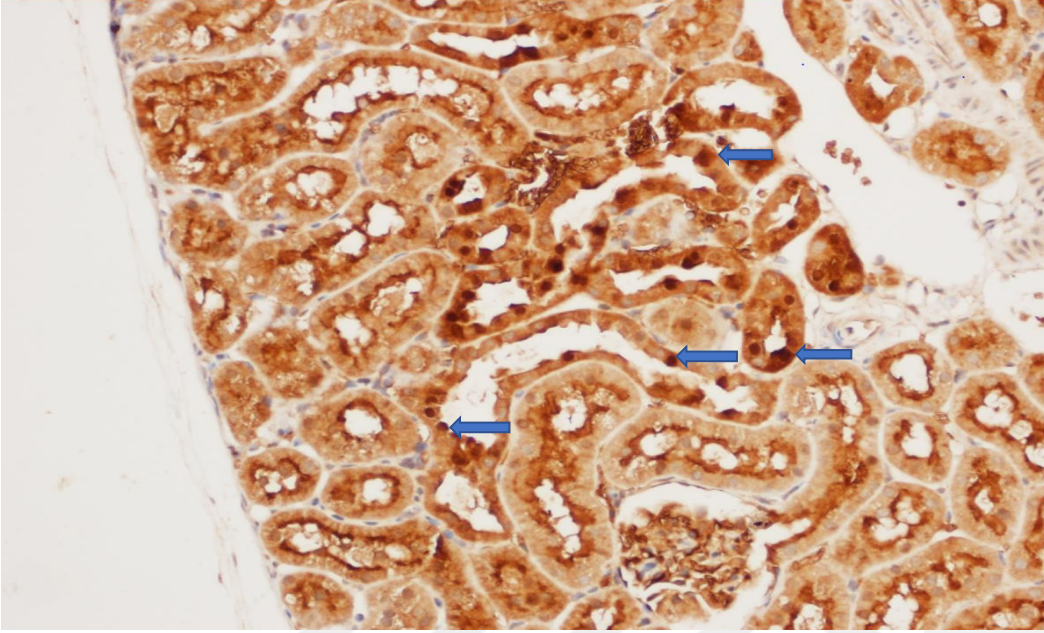
Glomerül bölgesinde beş grup arasında FGF23 ekspresyon skoru karşılaştırması yaptığımızda D ile kontrol grubu ve C grubu ile kontrol grubu arasındaki skor ortalaması farkı anlamlıdır ($p < 0,05$). Buna göre D ve C grubunun eşit olan skor ortalamaları (1,00) kontrol grubu ortalamasından istatistiksel olarak farklı ve daha düşüktür. Diğer gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalarda skor farklılıkları anlamlı değildir ($p > 0,05$). Diğer bir deyişle bu bölgede deney ve kontrol grubu arasındaki anlamlı skor farklılıkları, 21. günde tespit edilebilmiştir. 4 deney grubu arasında fark bulunmamaktadır.



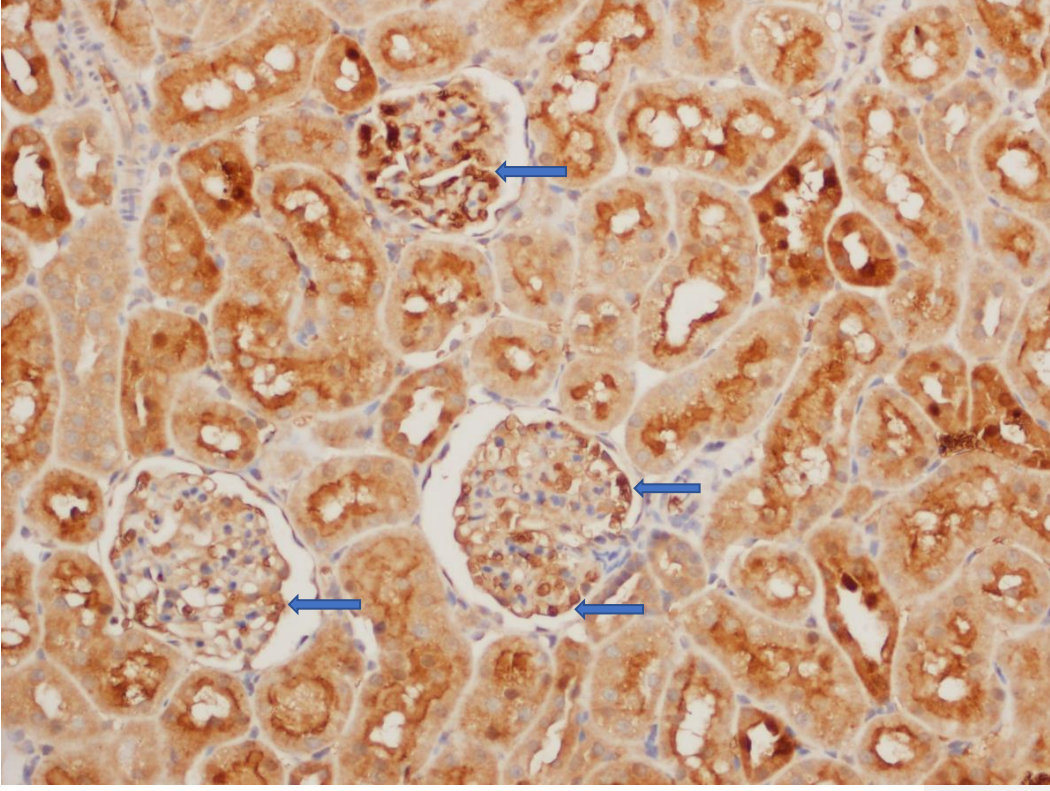
Şekil-34. 7. Güne ait bir sıçan preparatı örneğinde FGF 23 ün x200 büyütme ile kortikal tübüler ve glomerüler dağılımı. Birikimin glomerüllerde daha belirgin olması dikkat çekicidir (Mavi oklar)



Şekil-35. 7. Güne ait bir sıçan preparatı örneğinde FGF 23 ün x200 büyütme ile medulladaki dağılımı (oklar)



Şekil 36. Kortikal sahada klothonun intranükleer boyanması



Şekil 37. Glomerüler alanlarda klothonun mezangial ve periferik (podositler?) birikimi (mavi oklar)

5. TARTIŞMA

Üriner taş oluşumunda klotho ve FGF23 proteinlerinin rolünü değerlendiren çalışma sayısı sınırlıdır. Daha önce çeşitli ilişkilerle belirttiğimiz gibi bu sistem, üriner taş oluşumunun sistemik hastalık yönlerinin daha fazla aydınlatılmasını sağlayabilir. Akut üriner taş oluşumu sürecinde, FGF 23 ve Klotho renal doku ekspresyon profilinin ortaya konması, bu proteinlerin, artış gösteren hiperoksalürik ortamdaki davranış değişikliğini görmemizi sağlayarak ürolitiazis patogenezindeki rollerini değerlendirmemize yardımcı olacaktır. Deneyimiz, özellikle klothoyu içeren çeşitli doku ekspresyon çalışmalarının çokça bulunmasına karşın klotho yanısıra fizyolojik etkileri açısından kendisiyle yakın ilişkili olan FGF23 ün birlikte değerlendirilmesini sağlaması bakımından da üriner taş hastalığının bilinen metabolik ve vasküler hastalık ilişkilerine katkıda bulunabilir.

Çalışmamızda meydana getirdiğimiz hiperoksalürik süreç içerisinde FGF 23 ve klothonun ekspresyon değişikliklerini yorumlamadan önce normal şartlarda bu proteinlerin böbrekteki sentez, etki lokalizasyonu ve klirens biçimlerini gözden geçirmek gerekir.

α -Klotho nun en fazla eksprese edildiği organ böbrektir. Farelerde yapılan bir çalışmada α -Klotho nun renal tübül spesifik delesyonu ile serum klotho düzeylerindeki belirgin düşüş böbreğin, endokrin solubl α klotho nun esas kaynağı olduğunu düşündürmüştür.³⁹¹ Böbreklerden olan bu salınım ADAM 10 ve 17 isimli α ve β sekretazlar tarafından sağlanır. Klirensde de temelde böbreğin rol oynadığının ortaya koyulmasına karşın eksojen verilen klotho karaciğer ve dalakta da saptanmıştır. α -Klotho proksimal renal tübüllerde transsitozis yoluyla hücre içerisine girip çıkabilir ancak burada trafik tek yönlü olup bazalden alınma ve apikal lümeneye çıkış şeklindedir, apikal lümeneden içeriye girebilen klotho bazalden dolaşıma girmez. Böbrekte klotho en güçlü şekilde korteksteki distal tübüllerde eksprese edilirken, daha değişken yoğunlukta 7yine kortikal proksimal tübüllerde, vasküler yataktaki küçük arterlerde ve iç toplayıcı kanallarda daha belirgin olmak üzere medullada da eksprese edilmektedir.^{159,392,393}

FGF23 ise kemikte osteositler tarafından sabit bir hızla sentezlenir ve dolaşıma katılır. Başta fosfatüri olmak üzere temel etkilerini böbrek distal tübüllerindeki FGF reseptörü/klotho

kompleksi üzerinden proksimal tübüllerde gösterir. Ortalama yarı ömrü 1 saat kadardır ve eliminasyonu da büyük ölçüde yine böbrek tarafından glomerüler filtrasyon yoluyla sağlanır.³⁹⁴ Böbrek fonksiyonu bozuldukça FGF23 düzeyi artar. FGF23 ün, kalp, karaciğer, timüs, dalak ve barsaklar gibi diğer bazı dokuların yanısıra böbrekte de az miktarda da olsa sentezlendiği saptanmıştır.³⁹⁵

Çalışmamızın histopatolojik incelemesinde klotho ve FGF23 ün tübüler alanlardaki ekspresyon dağılımı homojen nitelikte görünmektedir. Klothonun bilinen membranöz, intrasitoplazmik ve soluble formlarının yanısıra hücre çekirdeğindeki yerleşimi de dikkat çekmiştir (Şekil 36). Bu yerleşime ilişkin olarak literatürde sınırlı sayıda çalışma vardır.⁴⁰⁹ Klotho ekspresyonu açısından dikkat çekici diğer bir alan glomerüllerdir. Bu durum öncelikle soluble klothonun glomerüler geçişini (klirensini) düşündürmekle birlikte proksimal veya distal tübülde üretilen soluble klothonun glomerüle geçişinin katkısı da sözkonusu olabilir. Klothonun mezangial ekspresyonu yoktur ya da sadece marjinal olarak saptanmıştır ve LPS (lipopolisakkarid) uyarısı gibi durumlarda artıp azalabilir.^{410,411,412} Klotho, diyabetik farelerde renal hipertrofi ve glomerüler hasarı azaltmıştır.⁴¹³ Ji-Hee ve ark. larının bir çalışmasında klothonun, podositlerdeki TRPC6 kanallarını suprese ederek proteinüriyi düzelttiği gösterilmiştir.⁴¹⁴ Bu, klothonun glomerular filtrat üzerine olan direk koruyucu etkisini gösterir. Çalışmamızdaki histopatolojik örneklerde de glomerüler filtrasyonda önemli rol alan podositlerin yerleşim alanlarına uyabilecek boyanmalar göze çarpmaktadır (Şekil 37). Klothonun renin-anjiyotensin sistemini modüle edici etkisi ile de kan basıncını normalize edebilmesi ve böbrek hasarı ve fibrozisi azaltması glomerüler patogeneizde rolü olduğunu da ortaya koymuştur.⁴²¹

Deneyimizde klotho ekspresyonları bölgesel olarak değerlendirildiğinde, kortikal alanda ancak 28. günde anlamlı düşüş saptanmıştır. Medüller alanda ise 7. günde kontrol grubuna göre daha düşük ekspresyon oranları olmasına karşın 14., 21 ve 28. günlerde ekspresyon düzeyleri yüksek seyretmiş ve gruplararası anlamlı fark bulunamamıştır. Glomerüler bölgede de kortikal sahadakine benzer bir biçimde ekspresyon düzeylerinde anlamlı düşüş 28. günde gözlenmiştir. FGF23 ekspresyonları ise kortikal alanda 7 ve 14. günler için yüksek seyrederken 21. günden itibaren düşmeye başlamış, 28. günde ise 21. güne göre yüksek ancak kontrol grubuna göre yine anlamlı biçimde düşük kalmıştır. Medüller bölgede FGF 23

ekspresyon oranları 14.,21. ve 28. günler için daha düşük gözlenmekle birlikte anlamlı fark saptanamamıştır. Glomerüler alanda ise FGF23 ekspresyonları 7. günden başlayarak 28. güne kadar kararlı biçimde düşüş sergilemiştir.FGF23 ekspresyon düzeyleri klotho ekspresyonlarına paralel azalmış ancak klothodaki düşüş daha geç olmuş görünmektedir. Bu durumun bir nedeni normal şartlarda da görülen FGF23 ün böbrekte klothoyu arttırıcı etkisi⁴¹⁵ ve kronik böbrek yetersizliğinde olduğu gibi azalan FGF 23 ün klotho mRNA düzeylerini arttırması olabilir. Ayrıca böbrek hasarına bağlı olarak sistemik FGF23 düzeylerinin artışı beklenirken, burada sentezi olmayışına rağmen renal ekspresyonu tedrici olarak azalmıştır. Diğer bazı inflamasyon durumlarında olduğu gibi, etilen glikol ile oluşan renal inflamasyon da FGF23 ekspresyonunu baskılamış olabilir. Genel olarak FGF23 ve klotho ekspresyonları EG dozu ve zamana bağımlı bir biçimde down-regüle olmuştur.

FGF23 ve klotho birlikte azalmak suretiyle üriner taş oluşumuna katkıda bulunuyor görünmektedir. Bunun bir nedeni kalsiyum metabolizması üzerine olan etkileri olabilir. Nefrolitiazis oluşumunda etkili majör bir faktör olan hiperkalsiürinin erken diyabetik nefropatili farelerde α -klotho azalmasına bağlı biçimde arttığı saptanmıştır.⁴¹⁶

Hiperoksalüri maruziyeti artmasına karşın klotho ekspresyonunun yüksek seyretmesi öncelikle klothonun koruyucu etkilerini hatırlatmaktadır. Metabolik sendromlu bir sıçan modelinde etilen glikol ilişkili renal hasarın bu sıçanlarda sadece etilen glikol verilen kontrollere göre daha fazla olduğu ve daha fazla kristal depozisyonu gözlenmesi³⁹⁹ çalışmamız açısından sağlıklı sıçan gruplarındaki koruyucu faktörlerden birinin klotho olduğunu düşündürür. Klothonun apoptoz ve oksidatif hasara karşı önemli bir direnç faktörü olduğunu destekleyen birçok çalışma literatürde mevcuttur.^{218,401,402,403,404,405} Hiperoksalüri beraberinde oksidatif stresi getirir.^{396,400} Hiperoksalürik bir sıçan modelinde hızlanmış oksidatif stres süreci, artış gösteren PMDA (Plazma malondialdehid) düzeyleri ile gösterilmiştir.³⁹⁷Süpersatürasyon ya da kristalizasyon sonrasında meydana geldiği düşünülen oksidan hasar, üriner taş oluşumunda kritik bir basamaktır. Vitamin E ve benzeri antioksidanların diyetle ilave edilmesi sıçanlarda kristal depozisyonunu azaltmıştır.⁴⁰⁶ Benzer bir şekilde ancak farklı bir çalışmada, HLP ile uyarılmış hiperoksalüri ve MDA,SOD gibi artan oksidatif hasar parametreleri ile birlikte klotho ekspresyonunda bilinen antioksidan özelliğine karşın azalma meydana gelmiş ancak E ve C vitamini verilen grupta klotho düzeylerinde artış

olmuştur.³⁵⁸ Mitobe ve ark. larının fareler ile yaptığı bir çalışmada, iç medüller toplayıcı kanal hücre serisinde H₂O₂ (Hidrojen peroksit) ile oluşturulan oksidatif stres klotho ekspresyonunu azaltmıştır. Çalışmamızda klothonun FGF23 ile paralel olarak azalma göstermesi normalde bağımsız olan bu antioksidan etkisinin patolojik süreçlerde FGF23 gibi faktörlerden etkileniyor olabileceğini düşündürmüştür. İlginç olarak kendisi de sekonder ve sistemik bir klotho eksikliği nedeni olan kronik böbrek yetersizliği süreci, sıçanlarda sadece oxalate diyeti ile modellenebilmiştir.⁴⁰⁸ Dolayısıyla KBY de klothonun azaldığı dikkate alındığında, deneyimizde saptanan klotho azalmasının etilen glikol ile oluşturulan hiperoksalürik modelin kronik böbrek yetersizliği açısından da bir prototip olabileceğini düşünmek gerekir. KBY örneğine ek olarak obezite,diyabet,hipertansiyon, ateroskleroz ve metabolik sendrom gibi çeşitli hastalıklara ait sıçan modellerinde de klotho ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir.^{405,407} Belirttiğimiz rahatsızlıklarda oksidatif stres, ortak bir patogenetik parametre olmasının yanısıra hastalıkların ortaya çıkışı açısından nefrolitiazis ile aralarında eksik bir bağlantı olabileceği³⁸⁸ gibi deneyimizin de gösterdiği üzere klotho da antioksidan özelliği ile bu potansiyeli taşımaktadır. Söz konusu hastalıklar için diğer bir ortak patogenez faktörünün sistemik endotelial disfonksiyon olduğu düşünülmüştür. Daha önce değindiğimiz gibi bu durumu destekleyen bir molekül nitrik oksit sentetazın potent bir inhibitörü ve endotel disfonksiyon belirteci olan ADMA dır.⁴¹⁷ Sistemik ADMA düzeyleri taş oluşumunda da yükselmektedir.³⁶² Klotho ise sistemik olarak NO sentezini stimüle ederken ET-1 i baskılar ve inflamasyonu engelleyici etkiye sahiptir. Dolayısıyla klothonun da ADMA gibi⁴²⁰ ürolitiazis ile kardiyovasküler hastalıklar ve metabolik sendrom süreçler arasında önemli bir bağlantı olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda bazı sınırlayıcı faktörler mevcuttur.

1) Kristal depozisyonu yönünden boyama yapılmamıştır⁴¹⁸ ,ancak etilen glikol etkisi ve artan hiperoksalüri düzeylerinin oksidatif stres,inflamasyon, endotelial disfonksiyon ve epitel hasarı gibi süreçlerin gelişimine yolaçacağı öngörülebilir.^{387,388,389,390} Normal şartlarda kronik etilen glikol uygulanan sıçanlarda ortalama 12. günde ısrarlı kristalüri, 3. hafta sonrasında ise renal kristal depozitleri görülmeye başlar.³⁹⁸ Ancak deneysel hiperoksalürinin uyarıldığı

birçok sıçanda kalsiyum oksalat kristal depozisyonu görülmesine karşın özellikle farelerde hiperoksalüri tek başına interstisyel ya da inratübüler kristal oluşumu için yeterli olmayabilir.³⁸⁵ Belirgin renal depozit olmasa da idrarda kalsiyum fosfat ve sınırlı sayıda kalsiyum oksalat kristali görülebilmektedir.³⁸⁵ Hiperoksalüriye ek olarak hiperkalsiürinin bulunması nefrolitiazis olasılığını arttıran bir etmendur. Etilen glikol dozu ve verilme süresi de kristal depozisyonunu belirleyen bir faktördür. Düşük EG dozuyla,renal hasar ve kristal depozisyonu meydana gelmeden sadece hiperoksalürik süreç oluşturulabilir.⁴¹⁹ Sıçan türleri arasında da etilen glikol uygulamasına bağlı kalsiyum oksalat kristali oluşumu açısından da fark bulunmaktadır. Li ve ark.larının yaptığı bir çalışmada wistar sıçanlarında F344 sıçanlarına göre belirgin şekilde daha fazla kristal oluşumu saptanmıştır.³⁸⁶

2-Çalışmamızda oksidatif stres parametreleri değerlendirilmemiştir, ancak literatürde hiperoksalüri nedenli oksidatif stres oluşumunu kanıtlayan yeterli çalışma mevcuttur.

3-Son olarak hayvanlarla yapılan deneylerde gözlenen değişikliklerin her zaman insanlardakiyle aynı olmayacağı gözönünde bulundurulmalıdır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. FGF23 ekspresyonu kortikal,medüller ve glomerüler alanlarda, 28. günde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktür.
2. Klotho ekspresyonu,28. günde kortikal ve glomerüler alanlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük saptanmış ancak medüller alanda sadece 7. günde diğer gruplara göre düşük ekspresyon düzeyi olmasına karşın bu durum istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmamıştır.
3. Genel olarak FGF23 ve klotho ekspresyonu artan hiperoksalüri ve oksidatif hasar sürecinde etilen glikol dozu ve zamana göre down-regülasyona uğramıştır.
4. Klotho oksidatif hasarın bir indikatörü olabilir.
5. Elde ettiğimiz anlamlı ekspresyon değişiklikleri bize FGF23 ve klothonun ürolitiyazis patogeneze katıldığını göstermektedir.
6. Sistemik etkileri düşünüldüğünde klothonun patogenezinde yer alması, ürolitiyazisin aslında sistemik bir hastalık olduğunu destekler niteliktedir.
7. Klotho sentezinin esasen böbrekte olması ve bilinen yaygın antioksidan,antiinflamatuvar ve endotel disfonksiyonunu engelleyici etkileri; diyabet,hipertansiyon,metabolik sendrom ve ateroskleroz gibi hastalık süreçlerindeki klinik ve deneysel çalışmalarla kanıtlanmış olumlu rolleri ile birlikte gözönüne alındığında,klothonun ürolitiyazis patogeneze katılmasının ürolitiyazisi, bu hastalıklara eşlik etmesinin yanısıra, ortaya çıkışlarında da nedensel bir faktör haline getirebileceğini hipotezimize edebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney Int.* 2003;63(5):1817-1823.
2. Shoag J, Tasian GE, Goldfarb DS, Eisner BH. The New Epidemiology of Nephrolithiasis. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2015;22(4):273-278
3. Johnson CM, Wilson DM, O'Fallon WM, Malek RS, Kurland LT. Renal stone epidemiology: a 25-year study in Rochester, Minnesota. *Kidney Int.* 1979;16(5):624-631.
4. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med.* 2002;346(2):77-84.
5. Ettinger B, Citron JT, Livermore B, Dolman LI. Chlorthalidone reduces calcium oxalate calculous recurrence but magnesium hydroxide does not. *J Urol.* 1988;139(4):679-684.
6. Ettinger B, Pak CY, Citron JT, Thomas C, Adams-Huet B, Vangessel A. Potassium-magnesium citrate is an effective prophylaxis against recurrent calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol.* 1997;158(6):2069-2073.
7. Curhan G, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:1568-1573
8. Mente A, Honey RJ, McLaughlin JR, Bull SB, Logan AG. Ethnic differences in relative risk of idiopathic calcium nephrolithiasis in North America. *J Urol.* 2007;178(5):1992-1997.
Discussion 1997
9. Stankus N, Hammes M, Gillen D, Worcester E. African American ESRD patients have a high pre-dialysis prevalence of kidney stones compared to NHANES III. *Urol Res.* 2007;35(2):83-87

10. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *Jama*. 2005;293(4):455-462.
11. Taylor EN, Curhan GC. Body size and 24-hour urine composition. *Am J Kidney Dis*. 2006;48(6):905-915.
12. Kramer HJ, Choi HK, Atkinson K, Stampfer M, Curhan GC. The association between gout and nephrolithiasis in men: The Health Professionals' Follow-Up Study. *Kidney Int*. 2003;64(3): 1022-1026.
13. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2005;68(3):1230-1235
14. Lieske JC, de la Vega LS, Gettman MT, et al. Diabetes mellitus and the risk of urinary tract stones: a population-based case-control study. *Am J Kidney Dis*. 2006;48(6):897-904.
15. Robertson WG, Peacock M, Hodgkinson A. Dietary changes and the incidence of urinary calculi in the U.K. between 1958 and 1976. *J Chron Dis*. 1979;32:469-476.
16. Larsson L, Tiselius HG. Hyperoxaluria. *Miner Electrolyte Metab*. 1987;13(4):242-250.
17. Muldowney FP, Freaney R, Moloney MF. Importance of dietary sodium in the hypercalciuria syndrome. *Kidney Int*. 1982;22(3):292-296.
18. Lemann J Jr, Piering WF, Lennon EJ. Possible role of carbohydrate induced calciuria in calcium oxalate kidney-stone formation. *N Engl J Med*. 1969;280(5):232-237.
19. Taylor EN, Curhan GC. Fructose consumption and the risk of kidney stones. *Kidney Int*. 2008;73(2):207-212.
20. Johansson G, Backman U, Danielson BG, Fellström B, Ljunghall S, Wikström B. Biochemical and clinical effects of the prophylactic treatment of renal calcium stones with magnesium hydroxide. *J Urol*. 1980;124:770-774.

21. Lemann J Jr, Pleuss JA, Gray RW, Hoffmann RG. Potassium administration reduces and potassium deprivation increases urinary calcium excretion in healthy adults [corrected]. *Kidney Int* 1991;39(5):
22. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med.* 1993;328:833-838.
23. Bataille P, Charransol G, Gregoire I, et al. Effect of calcium restriction on renal excretion of oxalate and the probability of Stones in the various pathophysiological groups with calcium stones. *J Urol.* 1983;130(2):218-223.
24. Curhan G, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:1568-1573.
25. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med.* 2002;346(2):77-84.
26. Curhan G, Willett WC, Speizer FE, Spiegelman D, Stampfer MJ. Comparison of dietary calcium with supplemental calcium and other nutrients as factors affecting the risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med.* 1997;126:497-504.
27. Holmes RP, Assimos DG. The impact of dietary oxalate on kidney stone formation. *Urol Res.* 2004;32(5):311-316.
28. Kaufman DW, Kelly JP, Curhan GC, et al. Oxalobacter Formigenes May Reduce the Risk of Calcium Oxalate Kidney Stones. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(6):1197-1203.
29. Taylor EN, Curhan GC. Oxalate intake and the risk for nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(7):2198-2204.
30. Breslau N, Brinkley L, Hill KD, Pak CY. Relationship of animal protein-rich diet to kidney stone formation and calcium metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;66:140-146.

31. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of dietary calcium and other nutrients and the risk of symptomatic kidney stones. *N Engl J Med.* 1993;328:833-838.
32. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in men: new insights after 14 years of follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(12):3225-3232.
33. Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. Dietary factors and the risk of incident kidney stones in younger women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* 2004;164(8):885-891.
34. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Intake of vitamins B6 and C and the risk of kidney stones in women. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(4):840-845.
35. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. A prospective study of the intake of vitamins C and B6, and the risk of kidney stones in men. *J Urol.* 1996;155(6):1847-1851.
36. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Stampfer MJ. Prospective study of beverage use and the risk of kidney stones. *Am J Epidemiol.* 1996;143(3):240-247.
37. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Beverage use and risk for kidney stones in women. *Ann Intern Med.* 1998;128(7):534-540.
38. Wabner C, Pak C. Effect of orange juice consumption on urinary stone risk factors. *J Urol.* 1993;149:1405-1409.
39. Curhan GC, Taylor EN. 24-h uric acid excretion and the risk of kidney stones. *Kidney Int.* 2008;73(4):489-496.
40. Coe FL. Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int.* 1978;13(5):418-426.
41. Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. *Miner Electrolyte Metab.* 1994;20(6):371-377.

42. Borghi L, Meschi T, Amato F, Briganti A, Novarini A, Giannini A. Urinary volume, water and recurrences in Idiopathic calcium nephrolithiasis: a 5-year randomized prospective study. *J Urol.* 1996;155:839-843.
43. Reed BY, Heller HJ, Gitomer WL, et al. Mapping a gene defect in absorptive hypercalciuria to chromosome 1q23.3-q24. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:3907-3913.
44. Reed BY, Gitomer WL, Heller HJ, et al. Identification and characterization of a gene with base substitutions associated with the absorptive hypercalciuria phenotype and low spine bone density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:1476-1485.
45. Geng W, Wang Z, Zhang J, et al. Cloning and characterization of the human soluble adenyl cyclase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:C1305-C1316.
46. Muller D, Hoenderop JGJ, Vennekens R, et al. Epithelial Ca²⁺ channel (ECAC1) in autosomal dominant idiopathic hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1614-1620.
47. Wright A, Charlesworth B, Rudan I, et al. A polygenic basis for late-onset disease. *Trends Genet.* 2003;19:97-106.
48. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *N Engl J Med.* 2002;346:77-84.
49. Soylemezoglu O, Ozkaya O, Gonen S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism in hypercalciuric children. *Pediatr Nephrol.* 2004;19:724-727
50. Rendina D, Mossetti G, Viceconti R, et al. Association between vitamin D receptor gene polymorphisms and fasting idiopathic hypercalciuria in recurrent stone-forming patients. *Urology.* 2004;64:833-838.
51. Relan V, Khullar M, Singh SK, et al. Association of vitamin D receptor genotypes with calcium excretion in nephrolithiatic subjects in northern India. *Urol Res.* 2004;32:236-240.

52. Vezzoli G, Tanini A, Ferrucci L, et al. Influence of calcium-sensing receptor gene on urinary calcium excretion in stone-forming patients. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:2517-2523.
53. Vezzoli G, Terranegra A, Arcidiacono T, et al. R990G polymorphism of calcium-sensing receptor does produce a gain-of-function and predispose to primary hypercalciuria. *Kidney Int.* 2007;71:1155-1162.
54. Corbetta S, Eller-Vainicher C, Filopanti M, et al. The A990G Polymorphism of calcium sensing receptor gene (CaSR) is associated with nephrolithiasis in patients with primary hyperparathyroidism (PHPT). *Eur J Endocr.* 2006;155:687-692.
55. Terranegra A, Arcidiacono T, Biasion R, et al. Calcium-sensing receptor (CaSR), a candidate gene for calcium kidney stone disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(suppl 4):292.
56. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest.* 2003;111:602-605.
57. Suzuki Y, Pasch A, Bonny O, et al. Gain of function haplotype in the epithelial calcium channel TRPV6 is a risk factor for renal calcium stone formation. *Hum Mol Genet.* 2008;17(11):1613-8.
58. Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, et al. Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. *Nat Genet.* 2006; 38:474-478.
59. Cao G, Yang G, Timme TL, et al. Disruption of the caveolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am J Pathol.* 2003;162:1241-1248.
60. Weinman EJ, Mohanlal V, Stoycheff N, et al. Longitudinal study of urinary excretion of phosphate, calcium, and uric acid in mutant NHERF-1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290:F838-843.

61. Mo L, Liaw L, Evan AP, et al. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking osteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293:F1935-1943.
62. Chau H, El-Maadawy S, McKee M, et al. Renal calcification in mice homozygous for the disrupted type II Na/Pi cotransporter gene *Npt2*. *J Bone Miner Res.* 2003;18:64-657.
63. Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Eckstein G, et al. Hereditary hypophosphatemic rickets with hypercalciuria is caused by mutations in the sodium-phosphate cotransporter gene *SLC34A3*. *Am J Hum Genet.* 2006;78:193-201.
64. Gupta A, Tenenhouse HS, Hoag HM, et al. Identification of the type II Na⁺-Pi cotransporter (*Npt2*) in the osteoclast and the skeletal phenotype of *Npt2*^{-/-} mice. *Bone.* 2001;29:467-476.
65. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Rev Genet.* 2007;8:253-262.
66. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet.* 2005;6:597-610.
67. Asplin JR, Parks JH, Nakagawa Y et al. Reduced crystallization inhibition by urine from women with nephrolithiasis. *Kidney Int;* 61: 1821-1829, 2002.
68. Asplin JR, Parks JH, Coe FL. Dependence of upper limit of metastability on supersaturation in nephrolithiasis. *Kidney Int;* 52: 1602-1608, 1997.
69. Brown CM, Purich DL. Physical-chemical processes in kidney stone formation. In: Coe FL, Mavus MJ; eds. *Disorders of bone and mineral metabolism.* New York: Raven Pr;; 613-624, 1992.
70. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest;* 115: 2598-2608, 2005.

71. Park S, Pearle MS. Pathophysiology and management of calcium stones. *Urol Clin N Am*; 34: 323-334, 2007.
72. Mandel NS, Mandel GS. Urinary tract stone disease in the United States veteran population II. Geographical analysis of variations in composition. *J Urol*; 142: 1516-1521, 1989.
73. Garside J. Nucleation. In: Nancollas GH, editor. *Biological mineralization*. New York: Springer-Verlag; 23-25, 1982.
74. Finlayson B. Physico-chemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int*; 13: 344-360, 1978.
75. Khan SR. Calcium phosphate/ calcium oxalate crystal association in urinary stones: implications for heterogeneous nucleation of calcium oxalate. *J Urol*; 157:376-383, 1997.
76. Lonsdale K. Human stones. *Science*; 159: 1199, 1968.
77. Srinivasan S, Kalaiselvi P, Varalakshmi P. Epitaxial deposition of calcium oxalate on uric acid rich stone matrix is induced by a 29 kDa protein. *Clin Chim Acta*; 364: 267-274, 2006.
78. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W et al. Osteopontinhydroxyapatite interactions in-vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin gel. *Bone Miner*; 22: 147-159, 1993.
79. Atmani F, Opalko FJ, Khan SR. Association of urinary macromolecules with calcium oxalate crystals induced in vitro in normal human and rat urine. *Urol Res*; 24: 45-50,1996 80. Kok DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int*; 37: 51-56, 1990.
81. Hess B, Kok DJ. Nucleation, growth and aggregation of stone forming crystals. In: Coe FL; ed. *Kidney stones: medical and surgical management*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.

82. Coe FL, Evan AP, Worcester EM et al. Three pathways for human kidney stone formation. *Urol Res*; 38: 147-160, 2010.
83. Finlayson B, Reid S. The expectation of free and fixed particles in urinary stone disease. *Invest Urol*; 15: 442-448, 1978.
84. Evan A, Lingeman J, Coe FL et al. Randall's plaque: pathogenesis and role in calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney Int*; 69: 1313-1318, 2006.
85. Verkoelen CF. Crystal retention in renal stone disease: a crucial role for the glycosaminoglycan hyaluronan? *J Am Soc Nephrol*; 17: 1673-1687, 2006
86. Yamate T, Kohri K, Umekawa T et al. Interaction between osteopontin on madin darby canine kidney cell membrane and calcium oxalate crystal. *Urol Int*; 62: 81-86, 1999.
87. Khan SR. Crystal-induced inflammation of the kidneys: results from human studies, animal models and tissue culture studies. *Clin Exp Nephrol*; 8: 75-88, 2004.
88. Khan SR. Renal tubular damage/ dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res*; 34: 86-91, 2006.
89. Verkoelen CF, Van Der Boom BG, Houtsmuller AB et al. Increased calcium oxalate monohydrate crystal binding to injured renal tubular epithelial cells in culture. *Am J Physiol*; 274: 958-965, 1998.
90. Kim SC, Coe FL, Tinmouth WW et al. Stone formation is proportional to papillary surface coverage by Randall's plaque. *J Urol*; 173: 117-119, 2005.
91. Kuo RL, Lingeman JE, Evan AP et al. Urine calcium and volume predict coverage of renal papilla by Randall's plaque. *Kidney Int*; 64: 2150-2154, 2003.
92. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *J Clin Invest*; 111: 607-616, 2003.

93. Evan AP, Coe FL, Rittling SR et al. Apatite plaque particles in inner medulla of kidneys of calcium oxalate stone formers: osteopontin localization. *Kidney Int*; 68:145-154, 2005.
94. Hurst RE. Structure, function and pathology of proteoglycans and glycosaminoglycans in the urinary tract. *World J Urol*; 12: 3-10, 1994
95. Parks JH, Worcester EM, Coe FL et al. Clinical implications of abundant calcium phosphate in routinely analyzed kidney stones. *Kidney Int*; 66: 777-785, 2004.
96. Miller NL, Evan AP, Lingeman JE. Pathogenesis of renal calculi. *Urol Clin N Am*; 34: 295-313, 2007.
97. Ekeruo WO, Tan YH, Young MD et al. Metabolic risk factors and the impact of medical therapy on the management of nephrolithiasis in obese patients. *J Urol*; 172: 159-163, 2004.
98. Nelson WK, Houghton SG, Milliner DS et al. Enteric hyperoxaluria, nephrolithiasis, and oxalate nephropathy: potentially serious and unappreciated complications of Roux-en-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis*; 1: 481-485, 2005.
99. Evan AP, Coe FL, Lingeman JE et al. Insights on the pathology of kidney stone formation. *Urol Res*; 33: 383-389, 2005.
100. Nagakawa Y, Asplin JR, Goldfarb DS et al. Clinical use of cysteine supersaturation measurements. *J Urol*; 164: 1481- 1485, 2000.
101. Matlaga BR, Williams JC Jr, Kim SC et al. Endoscopic evidence of calculus attachment to Randall's plaque. *J Urol*; 175: 1720-1724, 2006
102. Robertson WG, Peacock M, Marshall RW et al. Saturation inhibition index as a measure of the risk of calcium oxalate stone formation in the urinary tract. *N Engl J Med*; 294: 249-252, 1976.

103. Resnick MI, Boyce WH. Spherical calcium bodies in stoneforming urine. *Invest Urol*; 15: 449-451,1978.
104. Kaiser ET, Bock SC. Protein inhibitors of crystal growth. *J Urol*; 141: 750-752, 1989.
105. Bichler KH, Eipper E, Naber K et al. Urinary infection stones. *Int J Antimicrob Agents*; 19: 488-498, 2002.
106. Healy KA, Ogan KO. Pathophysiology and management of infectious staghorn calculi. *Urol Clin N Am*; 34: 363-374, 2007.
107. Hesse A, Heimbach D. Causes of phosphate stone formation and the importance of metaphylaxis by urinary acidification: a review. *World J Urol*; 17: 308-315, 1999.
108. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*; 358: 135-138, 2001.
109. Costerton JW. *The Biofilm Primer*. Hiedelberg: Springer; 2007.
110. Cadieux PA, Wignall GR, Carriveau R, Denstedt JD. Implications of biofilm formation on urological devices. In: Evan AP, Lingeman JE, McAteer, Williams JC Jr; eds. *Renal Stone Disease 2, 2nd International Urolithiasis Research Symposium*. New York: American Institute of Physics; 147-163, 2008.
111. Gambaro G, Fabris A, Puliatta D et al. Lithiasis in cystic kidney disease and malformations of the urinary tract. *Urol Res*; 34: 102-107, 2006.
112. Raj GV, Auge BK, Assimos D et al. Metabolic abnormalities associated with renal calculi in patients with horseshoe kidneys. *J Endurol*; 18: 157-161, 2004.
113. DeMaria EJ. Bariatric surgery for morbid obesity. *N Engl J Med*. 2007;356:2176-2183.

114. Flum DR, Khan TV, Dellinger EP. Toward the rational and equitable use of bariatric surgery. *JAMA*. 2007;298:1442. commentary.
115. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA*. 2005;293:455-462.
116. Taylor EN, Curhan GC. Body size and 24-hour urine composition. *Am J Kidney Dis*. 2006;48:905-915
117. Maalouf NM, Sakhaee K, Parks JH, Coe FL, Adams-Huet B, Pak CYC. Association of urinary pH with body weight in nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2004;65:1422-1425.
118. Hess B. Acid-base metabolism: implications for kidney stone formation. *Urol Res*. 2006;34:134-138.
119. Pak CYC, Sakhaee K, Peterson RD, Poindexter JR, Frawley WH. Biochemical profile of idiopathic uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2001;60:757-761.
120. Kamel KS, Cheema-Dhadli S, Halperin ML. Studies on the pathophysiology of the low urine pH in patients with uric acid stones. *Kidney Int*. 2002;61:988-994.
121. Sakhaee S, Adams-Huet B, Moe OW, Pak CYC. Pathophysiologic basis for normouricosuric uric acid nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2002;62:971-979.
122. Abate N, Chandalia M, Cabo-Chan AV Jr, Moe OW, Sakhaee K. The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int*. 2004;65:386-392.
123. Okamoto M, Kohjimoto Y, Iba A, Saji F, Hara I, Shigematsu T. Calcium oxalate crystal deposition in metabolic syndrome model rat kidneys. *Int J Urol*. 2010;17(12):996-1003.
124. Polat EC, Ozcan L, Cakir SS, Dursun M, Temur AO, Ozbek E. Relationship between Calcium Stone Disease and Metabolic Syndrome. *Urol J*. 2015;12(6):2391-2395.

125. Sarica K, Altay B, Erturhan S. Effect of being overweight on stone forming risk factors. *Urology*. 2008;71:771-4.
126. Siener R, Glatz S, Nicolay C, Hesse A. The role of overweight and obesity in calcium oxalate stone formation. *Obes Res*. 2004;12:106-13.
127. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Diabetes mellitus and the risk of nephrolithiasis. *Kidney Int*. 2005;68:1230-5.
128. Lieske JC, de la Vega LS, Gettman MT, et al. Diabetes mellitus and the risk of urinary tract stones: a population-based case-control study. *Am J Kidney Dis*. 2006;48:897-904.
129. Battle DC, Sharma AM, Alsheikha MW, Sobrero M, Saleh A, Gutterman C. Renal acid excretion and intracellular pH in salt sensitive genetic hypertension. *J Clin Invest*. 1993;91:2178-84.
130. Eisner BH, Porten SP, Bechis SK, Stoller ML. Hypertension is associated with increased urinary calcium excretion in patients with urolithiasis. *J Urol*. 2010;183:576-9.
131. Kohjimoto Y, Sasaki Y, Iguchi M, Matsumura N, Inagaki T, Hara I. Association of metabolic syndrome traits and severity of kidney stones: Results from a nationwide survey on urolithiasis in Japan. *Am J Kidney Dis*. 2013;61(6):923-929.
132. Cappuccio FP, Siani A, Barba G, et al. A prospective study of hypertension and the incidence of kidney stones in men. *J Hypertens*. 1999;17(7):1017-1022.
133. Borghi L, Meschi T, Guerra A, et al. Essential arterial hypertension and stone disease. *Kidney Int*. 1999;55(6):2397-2406.
134. Torricelli FCM, De SK, Gebreselassie S, Li I, Sarkissian C, Monga M. Dyslipidemia and kidney stone risk. *J Urol*. 2014;191(3):667-672. doi:10.1016/j.juro.2013.09.022.

135. Schmedl A, Schulle PO, Bonucci E et al: Nephrocalcinosis and hyperlipidemia in rats fed a cholesterol- and fat-rich diet: association with hyperoxaluria, altered kidney and bone minerals, and renal tissue phospholipid-calcium interaction. *Urol Res* 2000; 28: 404.

136. J. Lemann Jr., D. A. Bushinsky, and L. L. Hamm, "Bone buffering of acid and base in humans," *The American Journal of Physiology—Renal Physiology*, vol. 285, no. 5, pp. F811–F832, 2003.

137. G. Gambaro, P. M. Ferraro, and G. Capasso, "Calcium nephrolithiasis, metabolic syndrome and the cardiovascular risk," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 27, no. 8, pp. 3008–3010, 2012.

138. F. L. Coe, A. Evan, and E. Worcester, "Pathophysiology-based treatment of idiopathic calcium kidney stones," *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 6, no. 8, pp. 2083–2092, 2011.

139. Iba A, Kohjimoto Y, Mori T, et al. Insulin resistance increases the risk of urinary stone formation in a rat model of metabolic syndrome. *BJU International*. 2010;106(10):1550–1554.

140. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:503-533.

141. Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015;4(3):215-266

142. Hallinan N, Finn S, Cuffe S, Rafee S, O'Byrne K, Gately K. Targeting the fibroblast growth factor receptor family in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2016;46:51–62

143. Trueb B. Biology of FGFR1, The fifth fibroblast growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(6):951-964.

144. Borland CZ, Schutzman JL, Stern MJ. Fibroblast growth factor signaling in *Caenorhabditis elegans*. *BioEssays*. 2001;23(12):1120-1130.
145. Coumoul X, Deng CX. Roles of FGF Receptors in Mammalian Development and Congenital Diseases. *Birth Defects Res Part C – Embryo Today Rev*. 2003;69(4):286-304.
146. Cao R, Brakenhielm E, Pawliuk R, Wariaro D, Post MJ, Wahlberg E, Leboulch P, Cao Y. Angiogenic synergism, vascular stability and improvement of hind-limb ischemia by a combination of PDGF-BB and FGF-2. *Nat Med* 9: 604-613
147. Stegmann TJ. Heart Disease Induction of Neovascularisation by Growth Factors. 1999;11(5):301-308.
148. Rash B, Lim H, Breunig J, Vaccarino F. FGF Signaling Expands Embryonic Cortical Surface Area by Regulating Notch-Dependent Neurogenesis. *J Neurosci*. 2011;31(43):15604–15617.
149. Rash B, Tomasi S, Lim H, Suh C, Vaccarino F. Cortical Gyrification Induced by Fibroblast Growth Factor 2 in the Mouse Brain. *J Neurosci*. 2013;33(26):10802–10814.
150. Fukuchi-Shimogori T, Grove E. Neocortex Patterning by the Secreted Signaling Molecule FGF8. *Science*. 2001;294(5544):1071–1074.
151. Woodbury M, Ikezu T. Fibroblast Growth Factor-2 Signaling in Neurogenesis and Neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharm*. 2014;9(2):92–101.
152. Eriksson A, Cousens L, Weaver L, Matthews B. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc National Acad Sci*. 1991;88(8):3441–3445.
153. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277:494.

154. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumorinducedosteomalacia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(11):6500-6505.
155. Bergwitz C, Banerjee S, Abu-Zahra H, Kaji H, Miyauchi A, Sugimoto T, Jüppner H. Defective O-glycosylation due to a novel homozygous S129P mutation is associated with lack of fibroblast growth factor 23 secretion and tumoral calcinosis. *J ClinEndocrinol Metab* 2009; 94(11):4267-4274.
156. Saito T, Fukumoto S. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and disorders of phosphate metabolism. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009; 2009:496514.
157. Jüppner H, Wolf M, Salusky IB. FGF-23: More than a regulator of renal phosphate handling? *J Bone Miner Res* 2010; 25(10):2091-2097.
158. Armelin HA. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, 70:2702–2706.
159. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, et al. 2010. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J.* 24:3438–50
160. Gattineni J, Bates C, Twombly K, et al. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297(2):F282-F29
161. Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. 2009. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20:955–60
162. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and Klotho: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:503-533.

163. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007;117(12):4003-4008.
164. Ramon I, Kleynen P, Body JJ, Karmali R. Fibroblast growth factor 23 and its role in phosphate homeostasis. *Eur J Endocrinol* 2010; 162(1):1-10.
165. Lopez I, Rodriguez-Ortiz ME, Almaden Y, Guerrero F, de Oca AM, et al. 2011. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.*80:475–82
166. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Forster R, Saini R, et al. 2011. The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 13:57–69
167. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Munoz-Castaneda JR, Martinez-Moreno JM, Ramirez AP, et al. 2012. Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23:1190–97
168. Yuan Q, Sato T, Densmore M, Saito H, Schuler C, et al. 2011. FGF-23/Klotho signaling is not essential for the phosphaturic and anabolic functions of PTH. *J. Bone Miner. Res.* 26:2026–35
169. Ito N, Fukumoto S, Takeuchi Y, Takeda S, Suzuki H, et al. 2007. Effect of acute changes of serum phosphate on fibroblast growth factor (FGF)23 levels in humans. *J. Bone Miner. Res.* 25:419–22
170. Yu X, Sabbagh Y, Davis SI, Demay MB, White KE. 2005. Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations.
171. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, et al. 2001. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:1015–20

172. Carpenter, T. O., Insogna, K. L., Zhang, J. H., Ellis, B., Nieman, S., Simpson, C., et al. (2010). Circulating levels of soluble klotho and FGF23 in X-linked hypophosphatemia: Circadian variance, effects of treatment, and relationship to parathyroid status. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95, E352–E357.

173. Kawai, M., Kinoshita, S., Shimba, S., Ozono, K., & Michigami, T. (2014). Sympathetic activation induces skeletal Fgf23 expression in a circadian rhythm-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 1457–1466

174. Kinoshita S, Kawai M. The FGF23/KLOTHO Regulatory Network and Its Roles in Human Disorders. Vol 101. 1st ed. Elsevier Inc.; 2016.

175. Farrow, E. G., Davis, S. I., Mooney, S. D., Beighton, P., Mascarenhas, L., Gutierrez, Y. R., et al. (2006). Extended mutational analyses of FGFR1 in osteoglophonic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 140, 537–539.

176. Miyagawa, K., Yamazaki, M., Kawai, M., Nishino, J., Koshimizu, T., Ohata, Y., et al. (2014). Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic Hyp mice. *PLoS One*, 9, e93840.

177. Han, X., Xiao, Z., & Quarles, L. D. (2015). Membrane and integrative nuclear fibroblastic growth factor receptor (FGFR) regulation of FGF-23. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 10447–10459.

178. Durham BH, Joseph F, Bailey LM, Fraser WD (2007) The association of circulating ferritin with serum concentrations of fibroblast growth factor-23 measured by three commercial assays. *Ann Clin Biochem* 44: 463–466.

179. Imel EA, Peacock M, Gray AK, Padgett LR, Hui SL, Econs MJ. Iron modifies plasma FGF23 differently in autosomal dominant hypophosphatemic rickets and healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:3541–9.

180. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC, Allen MR, et al. Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:1146–55.

181. Eser B, Yayar O, Buyukbakkal M, et al. Fibroblast growth factor is associated to left ventricular mass index, anemia and low values of transferrin saturation. *Nefrología*. 2015;35(5):465–472.

182. Durham BH, Joseph F, Bailey LM, Fraser WD (2007) The association of circulating ferritin with serum concentrations of fibroblast growth factor-23 measured by three commercial assays. *Ann Clin Biochem* 44: 463–466.

183. Quarles, L. D. (2012). Skeletal secretion of FGF-23 regulates phosphate and vitamin D metabolism. *Nature Reviews. Endocrinology*, 8, 276–286.

184. Kurosu, H., Ogawa, Y., Miyoshi, M., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., et al. (2006). Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 6120–6123.

185. Kawai, M., Kinoshita, S., Kimoto, A., Hasegawa, Y., Miyagawa, K., Yamazaki, M., et al. (2013). FGF23 suppresses chondrocyte proliferation in the presence of soluble alpha Klotho both in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 2414–2427.

186. Smith, R. C., O'Bryan, L. M., Farrow, E. G., Summers, L. J., Clinkenbeard, E. L., Roberts, J. L., et al. (2012). Circulating alpha Klotho influences phosphate handling by controlling FGF23 production. *Journal of Clinical Investigation*, 122, 4710–4715

187. Faul, C., Amaral, A. P., Oskouei, B., Hu, M. C., Sloan, A., Isakova, T., et al. (2011). FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 4393–4408.

188. Olauson, H., Lindberg, K., Amin, R., Sato, T., Jia, T., Goetz, R. et al. (2013). Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. *PLoS Genetics*, 9, e1003975.

189. Wang, H., Yoshiko, Y., Yamamoto, R., Minamizaki, T., Kozai, K., Tanne, K., et al. (2008). Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23, 939–948
190. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;277:494–498.
191. ADHR Consortium T, White KE, Evans WE, O’ Riordan JLH, Speer MC, Econs MJ, Lorenz-Depiereux B, Grabowski M, Meitinger T, Strom TM. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet*. 2000;26:345–348.
192. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor induced osteomalacia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:6500–6505.
193. Jüppner H. Phosphate and FGF-23. *Kidney Int Suppl*. 2011;79(121):S24-7.
194. David V, Dai B, Martin A, Huang J, Han X, Quarles LD. Calcium regulates FGF-23 expression in bone. *Endocrinology*. 2013;154(12):4469–82. (Using conditional deletions of target genes in parathyroid in combination with diet and in vitro promoter studies, these studies supported a role for calcium-mediated regulation of FGF23 production in bone.)
195. Gravesen E, Mace ML, Hofman-Bang J, Olgaard K, Lewin E. Circulating FGF23 levels in response to acute changes in plasma Ca(2+). *Calcif Tissue Int*. 2014; 95(1):46–53.
196. Quinn SJ, Thomsen AR, Pang JL, Kantham L, Brauner-Osborne H, Pollak M, Goltzman D, Brown EM. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013; 304(3):E310–20.

197. Tsuji K, Maeda T, Kawane T, et al.: Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(8): 1711–23.
198. Carrillo-López N, Román-García P, Rodríguez-Rebollar A, et al.: Indirect regulation of PTH by estrogens may require FGF23. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20(9): 2009–17.
199. di Giuseppe R, Kühn T, Hirche F, et al.: Potential Predictors of Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations: Cross-Sectional Analysis in the EPIC-Germany Study. *PLoS One.* 2015; 10(7): e0133580
200. Rodríguez-Ortiz M, Rodríguez M. FGF23 as a calciotropic hormone. *F1000research.* 2015;4:F1000 Faculty Rev–1472
201. Andrukhova O, Smorodchenko A, Egerbacher M, et al. FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. *Embo J.* 2014;33(3):229–246
202. Wolf MT, An SW, Nie M, et al.: Klotho up-regulates renal calcium channel transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) by intra- and extracellular N-glycosylation-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 2014; 289(52): 35849–57.
203. Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels R, Hoenderop J. The β -glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transpl.* 2008;23(11):3397–3402.
204. Kalaitzidis R, Duni A, Siamopoulos K. Klotho, the Holy Grail of the kidney: from salt sensitivity to chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol.* 2016;48(10):1657–1666.
205. Shimada T, et al. Vitamin D receptor independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289:F1088–F1095.

206. Ben-Dov, I. Z., Galitzer, H., Lavi-Moshayoff, V., Goetz, R., Kuro-o, M., Mohammadi, M., et al. (2007). The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 117, 4003–4008.
207. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *Embo Mol Med*.2014;6(6):744–759. doi:10.1002/emmm.201303716.
208. Erben R, Andrukhova O. FGF23 regulation of renal tubular solute transport. *Curr Opin Nephrol Hy*. 2015;24(5):450.
209. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Ryozo N, Nabeshima Y (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45–51
210. Hu MC, Shiizaki K, Kuro-o M, Moe OW. Fibroblast growth factor 23 and *Klotho*: physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:503-533. 211. Kim J-H, Hwang K-H, Park K-S, Kong ID, Cha S-K. Biological Role of Anti-aging Protein *Klotho*. *J lifestyle Med*. 2015;5(1):1-6.
212. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. *Klotho* suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011;13:254-U396.
213. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of *Klotho* by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19796-801.
214. Sopjani M, Alesutan I, Dërmaku-Sopjani M, et al. Regulation of the Na⁺/K⁺ ATPase by *Klotho*. *Febs Lett*. 2011;585(12):1759–1764.
215. Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, Vandewalle A, Besselsen DG, Muhlbauer M, Jobin C, Kiela PR, Ghishan FK. Tumor necrosis

factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis. *Gastroenterology* 2010;138:1384-U231.

216. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor JV, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-o M. Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 2011;286:8655-65.

217. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005;309:1829-33.

218. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho. *J Biol Chem* 2005;280:38029-34.

219. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM, Liu J, Cao L, Chen J, Malide D, Rovira II, Schimel D, Kuo CJ, Gutkind JS, Hwang PM, Finkel T. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007;317:803-6.

220. Cha S-K, Hu M-C, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang C-L. Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K(+) Excretion by Klotho. *Mol Pharmacol*. 2009;76(1):38-46.

221. John GB, Cheng CY, Kuro-o M. Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(1):127-134.

222. Borst M, Vervloet M, Wee P, Navis G. Cross Talk Between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Vitamin D-FGF-23-klotho in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1603-1609.

223. Zhou Q, Lin S, Tang R, Veeraragoo P, Peng W, Wu R. Role of Fosinopril and Valsartan on Klotho gene expression induced by angiotensin ii in rat renal tubular epithelial cells. *Kidney Blood Press Res* 2010;33:186–92.

224. ADHR consortium (2000). Autosomal dominant hypophosphatemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature Genetics*, 26, 345–348.

225. Kapelari, K., Kohle, J., Kotzot, D., & Hogler, W. (2015). Iron supplementation associated with loss of phenotype in autosomal dominant hypophosphatemic rickets. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(9), 3388–3392. jc20152391.

226. Jonsson, K. B., Zahradnik, R., Larsson, T., White, K. E., Sugimoto, T., Imanishi, Y., et al. (2003). Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X- linked hypophosphatemia. *New England Journal of Medicine*, 348, 1656–1663.

227. Carpenter, T. O., Imel, E. A., Ruppe, M. D., Weber, T. J., Klausner, M. A., Wooddell, M. M., et al. (2014). Randomized trial of the anti-FGF23 antibody KRN23 in X-linked hypophosphatemia. *Journal of Clinical Investigation*, 124, 1587–1597.

228. Levy-Litan, V., Hershkovitz, E., Avizov, L., Leventhal, N., Bercovich, D., Chalifa-Caspi, V., et al. (2010). Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated with an inactivation mutation in the ENPP1 gene. *American Journal of Human Genetics*, 86, 273–278.

229. Rafaelsen, S. H., Raeder, H., Fagerheim, A. K., Knappskog, P., Carpenter, T. O., Johansson, S., et al. (2013). Exome sequencing reveals FAM20c mutations associated with fibroblast growth factor 23-related hypophosphatemia, dental anomalies, and ectopic calcification. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28, 1378–1385.

230. Riminucci, M., Collins, M. T., Fedarko, N. S., Cherman, N., Corsi, A., White, K. E., et al. (2003). FGF-23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 683–692.

231. Chong, W. H., Molinolo, A. A., Chen, C. C., & Collins, M. T. (2011). Tumor-induced osteomalacia. *Endocrine-Related Cancer*, 18,R53–R77.
232. Brown, W. W., Juppner, H., Langman, C. B., Price, H., Farrow, E. G., White, K. E., et al. (2009). Hypophosphatemia with elevations in serum fibroblast growth factor 23 in a child with Jansen’s metaphyseal chondrodysplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94, 17–20.
233. Ichikawa, S., Baujat, G., Seyahi, A., Garoufali, A. G., Imel, E. A., Padgett, L. R., et al. (2010). Clinical variability of familial tumoral calcinosis caused by novel GALNT3 mutations. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A, 896–903.
234. Ichikawa, S., Gray, A. K., Padgett, L. R., Allen, M. R., Clinkenbeard, E. L., Sarpa, N. M., et al. (2014). Genetic rescue of glycosylation-deficient Fgf23 in the Galnt3 knockout mouse. *Endocrinology*, 155, 3891–3898.
235. Falcini F, Rigante D, Masi L, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) gene polymorphism in children with Kawasaki syndrome (KS) and susceptibility to cardiac abnormalities. *Ital J Pediatr*.2013;39:69.
236. Mackay EM, Oliver J. 1935. Renal damage following the ingestion of a diet containing an excess of inorganic phosphate. *J.Exp. Med.* 61:319–34
237. Haut LL, Alfrey AC, Guggenheim S, Buddington B, Schrier N. 1980. Renal toxicity of phosphate in rats. *Kidney Int.* 17:722–31
238. Ori Y, Herman M, Tobar A, Chernin G, Gafter U, et al. 2008. Acute phosphate nephropathy—an emerging threat. *Am. J. Med. Sci.* 336:309–14
239. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G. 2005. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. *Circulation* 112:2627–33

240. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. 2001. Association of elevated serum PO(4), Ca × PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12:2131–38
241. Hiza H, Bente L, Fungwe T. 2008. Nutrient content of the U.S. food supply, 2005. Home Econ. Res. Rep. No. 58, US Dep. Agric., Washington, DC
242. Uribarri J. 2009. Phosphorus additives in food and their effect in dialysis patients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4:1290–92
243. Uribarri J. 2007. Phosphorus homeostasis in normal health and in chronic kidney disease patients with special emphasis on dietary phosphorus intake. *Semin. Dial.* 20:295–301
244. Wen CP, Cheng TY, Tsai MK, Chang YC, Chan HT, et al. 2008. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet* 371:2173–82
245. Aihara K, Byer KJ, Khan SR. 2003. Calcium phosphate induced renal epithelial injury and stone formation: involvement of reactive oxygen species. *Kidney Int.* 64:1283–9
246. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, et al. 2008. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 294:F1381–87
247. Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL. 2011. Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int.* 79:414–22
248. Aihara K, Byer KJ, Khan SR. 2003. Calcium phosphate-induced renal epithelial injury and stone formation: involvement of reactive oxygen species. *Kidney Int.* 64:1283–91

249. Kuro-o M. Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(11):650–660.

250. Semba RD, Fink JC, Sun K, Cappola AR, Dalal M, Crasto C, Ferrucci L, Fried LP. Serum fibroblast growth factor-23 and risk of incident chronic kidney disease in older community-dwelling women. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7(1):85-91.

251. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(7):2205-2215.

252. Westerberg PA, Linde T, Wikström B, Ljunggren O, Stridsberg M, Larsson TE. Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(11):3202-3207.

253. Bhan I, Shah A, Holmes J, Isakova T, Gutierrez O, Burnett SM, Jüppner H, Wolf M. Posttransplant hypophosphatemia: Tertiary 'Hyper-Phosphatoninism'? *Kidney Int* 2006; 70(8):1486-1494.

254. Kari JA, Donald AE, Vallance DT, Bruckdorfer KR, Leone A, Mullen MJ, Bunce T, Dorado B, Deanfield JE, Rees L (1997) Physiology and biochemistry of endothelial function in children with chronic renal failure. *Kidney Int* 52:468–472

255. Goligorsky MS (2015) Pathogenesis of endothelial cell dysfunction in chronic kidney disease: a retrospective and what the future may hold. *Kidney Res Clin Pract* 34:76–82

256. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, Yaman H, Kilic S, Demirkaya E, Eyileten T, Caglar K, Oguz Y, Vural A, Yenicesu M, Zoccali C (2010) FGF-23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Kidney Int* 78:679–685

257. Silswal N, Touchberry C, Daniel D, et al. FGF23 directly impairs endothelium-dependent vasorelaxation by increasing superoxide levels and reducing nitric oxide bioavailability. *Am J Physiology–Endocrinol Metabolism*. 2014;307(5):E426–E436.

258. Haffner D, Leifheit-Nestler M. Extrarenal effects of FGF23. *Pediatr Nephrol*. 2016;32(5):753–765.

259. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, Gutierrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, Feldman HI, St John Sutton M, Ojo A, Gadegbeku C, Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Tiemann K, Brand M, Hill JA, Moe OW, Kuro OM, Kusek JW, Keane MG, Wolf M (2011) FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 121:4393–4408

260. Mirza MA, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE (2009) Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis* 207:546–551

261. Seeherunvong W, Abitbol CL, Chandar J, Rusconi P, Zilleruelo GE, Freundlich M (2012) Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in children on dialysis. *Pediatr Nephrol* 27:2129–2136

262. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, Li J, Shehadeh LA, Hare JM, David V, Martin A, Fornoni A, DiMarco GS, Kentrup D, Reuter S, Mayer AB, Pavenstadt H, Stypmann J, Kuhn C, Hille S, Frey N, Leifheit-Nestler M, Richter B, Haffner D, Abraham R, Bange J, Sperl B, Ullrich A, Brand M, Wolf M, Faul C (2015) Activation of cardiac fibroblast growth factor receptor 4 causes left ventricular hypertrophy. *Cell Metab* 22:1020–1032

263. Leifheit-Nestler M, Grosse Siemer R, Flasbart K, Richter B, Kirchhoff F, Ziegler WH, Klintschar M, Becker JU, Erbersdobler A, Aufricht C, Seeman T, Fischer DC, Faul C, Haffner D

(2016) Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 31:1088–1099

264. Dai B, David V, Martin A, Huang J, Li H, Jiao Y, Gu W, Quarles LD (2012) A comparative transcriptome analysis identifying FGF23 regulated genes in the kidney of a mouse CKD model. *PLoS One* 7:e44161

265. David, V.; Martin, A.; Isakova, T.; Spaulding, C.; Qi, L.; Ramirez, V.; Zumbrennen-Bullough, K.B.; Sun, C.C.; Lin, H.Y.; Babitt, J.L.; et al. Inflammation and functional iron deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.* 2016,89,135–146.

266. Munoz Mendoza J, Isakova T, Ricardo AC, Xie H, Navaneethan SD, Anderson AH, Bazzano LA, Xie D, Kretzler M, Nessel L, Hamm LL, Negrea L, Leonard MB, Raj D, Wolf M, Chronic Renal Insufficiency C (2012) Fibroblast growth factor 23 and Inflammation in CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7:1155–1162

267. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Osman NA, Fayad T, Nassef A, Salem MM, Sharaf El Din UA (2013) The association between fibroblast growth factor-23 and vascular calcification is mitigated by inflammation markers. *Nephron Extra* 3:106–112

268. Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, Adams JS, Salusky IB, Hewison M (2013) Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res* 28:46–55

269. Rossaint J, Oehmichen J, Van Aken H, Reuter S, Pavenstadt HJ, Meersch M, Unruh M, Zarbock A (2016) FGF23 signaling impairs neutrophil recruitment and host defense during CKD. *J Clin Invest* 126:962–974

270. Nasrallah MM, El-Shehaby AR, Salem MM, Osman NA, El Sheikh E, Sharaf El Din UA (2010) Fibroblast growth factor-23 (FGF-23) is independently correlated to aortic calcification in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 25:2679–2685

271. Srivaths PR, Goldstein SL, Krishnamurthy R, Silverstein DM (2014) High serum phosphorus and FGF 23 levels are associated with progression of coronary calcifications. *Pediatr Nephrol* 29:103–109
272. Hensel N, Schon A, Konen T, Lubben V, Forthmann B, Baron O, Grothe C, Leifheit-Nestler M, Claus P, Haffner D (2016) Fibroblast growth factor 23 signaling in hippocampal cells: Impact on neuronal morphology and synaptic density. *J Neurochem* 137:756–76
273. Drew DA, Tighiouart H, Scott TM, Lou KV, Fan L, Shaffi K, Weiner DE, Sarnak MJ (2014) FGF-23 and cognitive performance in hemodialysis patients. *Hemodial Int* 18:78–86
274. Hartmann H, Hawellek N, Wedekin M, Vogel C, Das AM, Balonwu K, Ehrich JH, Haffner D, Pape L (2015) Early kidney transplantation improves neurocognitive outcome in patients with severe congenital chronic kidney disease. *Transpl Int* 28:429–436
275. Sarnak MJ, Tighiouart H, Scott TM, Lou KV, Sorensen EP, Giang LM, Drew DA, Shaffi K, Strom JA, Singh AK, Weiner DE (2013) Frequency of and risk factors for poor cognitive performance in hemodialysis patients. *Neurology* 80:471–480
276. Ritter C, Zhang S, Delmez J et al. Differential expression and regulation of Klotho by paricalcitol in the kidney, parathyroid, and aorta of uremic rats. *Kidney Int* 2015; 87:1141–1152.
277. Donate-Correa J, Martín-Núñez E, Martínez-Sanz R, et al. Influence of Klotho gene polymorphisms on vascular gene expression and its relationship to cardiovascular disease. *J Cell Mol Med.* 2016;20(1):128–133.
278. Oguro R, Kamide K, Kokubo Y, et al. Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension. *Geriatrics Gerontology Int.* 2010;10(4):311–318.
279. Semba R, Cappola A, Sun K, et al. Plasma Klotho and Cardiovascular Disease in Adults. *J Am Geriatr Soc.* 2011;59(9):1596–1601.

280. Brandenburg VM, Kleber ME, Vervloet MG, et al. Soluble klotho and mortality: The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):483-489

281. Li BS, Ma HX, Wang YJ, et al. Klotho gene attenuates the progression of hypertension and heart damage in spontaneous hypertensive rats. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2012; 29: 662–668. [Article in Chinese].

282. Eder P, Molkentin JD. TRPC6 channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circulation* 2011; 108: 265–272.

283. Xie J, Cha SK, An SW, et al. Cardioprotection by klotho through downregulation of TRPC6 channels in the Mouse heart. *Nat Commun* 2012; 3: 1238.

284. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, et al. Klotho allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1154–1161.

285. Majumdar V, Nagaraja D, Christopher R. Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 403:412–416.

286. Rhee EJ, Oh KW, Yun EJ, et al. Relationship between polymorphisms G395A in promoter and C1818T in exon 4 of the klotho gene with glucose metabolism and cardiovascular risk factors in Korean women. *J Endocrinol Invest* 2006; 29: 613–618.

287. Zhang, H. et al. Klotho is a target gene of PPAR- γ . *Kidney Int*. 74, 732–739 (2008)

288. Chihara, Y. et al. Klotho protein promotes adipocyte differentiation. *Endocrinology* 147, 3835–3842 (2006)

289. Yamagishi, T. et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal Klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens. Res*. 24, 705–709 (2001)

290. Nakatani, T., Ohnishi, M. & Razzaque, M. S. Inactivation of Klotho function induces hyperphosphatemia even in presence of high serum fibroblast growth factor 23 levels in a genetically engineered hypophosphatemic (Hyp) mouse model. *FASEB J.* 23, 3702–3711 (2009).
291. Kuro-o, M. et al. Mutation of the mouse Klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51 (1997).
292. Mori, K. et al. Disruption of Klotho gene causes an abnormal energy homeostasis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 665–670 (2000).
293. Ohnishi, M., Kato, S., Akiyoshi, J., Atfi, A. & Razzaque, M. S. Dietary and genetic evidence for enhancing glucose metabolism and reducing obesity by inhibiting Klotho functions. *FASEB J.* 25, 2031–2039 (2011).
294. Utsugi, T. et al. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the Klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism* 49, 1118–1123 (2000).
295. Lorenzi, O. et al. Evidence against a direct role of Klotho in insulin resistance. *Pflugers Arch.* 459, 465–473 (2010)
295. Lorenzi O, Veyrat-Durebex C, Wollheim C, et al. Evidence against a direct role of klotho in insulin resistance. *Pflügers Archiv-European J Physiology.* 2010;459(3):465–473.
296. Chen CD, Podvin S, Gillespie E, Leeman SE, Abraham CR. Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:19796-801.
297. Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, et al. Decreased renal alpha-Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int.* 2012;81:539-47
298. Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension.* 2009;54:810-7.

299. Fadda, G. Z. & Massry, S. G. Impaired glucose-induced calcium signal in pancreatic islets in chronic renal failure. *Am. J. Nephrol* 11,475–478 (1991).
300. Zhou, X. J., Fadda, G. Z., Perna, A. F. & Massry, S. G. Phosphate depletion impairs insulin secretion by pancreatic islets. *Kidney Int.* 39, 120–128 (1991).
301. Haap, M. et al. Association of serum phosphate levels with glucose tolerance, insulin sensitivity and insulin secretion in non-diabetic subjects. *Eur.J. Clin. Nutr.* 60, 734–739 (2006).
302. Sinha, J. et al. β -Klotho and FGF-15/19 inhibit the apical sodium-dependent bile acid transporter in enterocytes and cholangiocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G996–G1003 (2008)
303. Tomiyama, K. et al. Relevant use of Klotho in FGF19 subfamily signaling system in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 1666–1671 (2010)
304. Zhou X, Wang X. Klotho: a novel biomarker for cancer. *J Cancer Res Clin.* 2015;141(6):961–969. doi:10.1007/s00432-014-1788-y
305. Wolf I et al (2008) Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. *Oncogene* 27:7094–7105
306. Rubinek T et al (2012) Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133:649–657.
307. Wolf I et al (2010) Functional variant of KLOTHO: a breast cancer risk modifier among BRCA1 mutation carriers of Ashkenazi origin. *Oncogene* 29:26–33
308. Wang Y et al (2013) Klotho sensitizes human lung cancer cell line to cisplatin via PI3k/Akt pathway. *PLoS One* 8:e57391

309. Usuda J et al (2011) Klotho predicts good clinical outcome in patients with limited-disease small cell lung cancer who received surgery. *Lung Cancer* 74:332–337.
310. Usuda J et al (2011b) Klotho is a novel biomarker for good survival in resected large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 72:355–359
311. Shu G et al (2013) Restoration of klotho expression induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Oncol (Dordr)* 36:121–129
312. Rubinek T, Wolf I. The Role of Alpha-Klotho as a Universal Tumor Suppressor. *Vitam Horm.* 2016;101:197-214
313. Aleagha M, Siroos B, Ahmadi M, et al. Decreased concentration of Klotho in the cerebrospinal fluid of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2015;281:5–8
314. Schmid, C., Neidert, M. C., Tschopp, O., Sze, L., & Bernays, R.L. (2013). Growth hormone and Klotho. *Journal of Endocrinology*, 219(2)
315. Ravikumar, P., Ye, J., Zhang, J., Pinch, S. N., Hu, M. C., Kuro-o, M. Moe, O. W. (2014). - Klotho protects against oxidative damage in pulmonary epithelia. *AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology*, 307(7), L566–L575.
316. Doi K, Ishizu T, Fujita T, Noiri E. Lung injury following acute kidney injury: kidney-lung crosstalk. *Clin Exp Nephrol* 15: 464–470, 2011.
317. Turcios NL. Pulmonary complications of renal disorders. *Paediatr Respir Rev* 13: 44–49, 2012.

318. Taguchi K, Yasui T, Milliner D, Hoppe B, Chi T. Genetic Risk Factors for Idiopathic Urolithiasis: A Systematic Review of the Literature and Causal Network Analysis. *European Urology Focus*.2017;3(1):72–81.
319. Rendina D, Esposito T, Mossetti G, et al. A Functional Allelic Variant of theFGF23Gene Is Associated with Renal Phosphate Leak in Calcium Nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2012;97(5):E840–E844.
320. Rendina D, Mossetti G, Filippo G, Cioffi M, Strazzullo P. Fibroblast Growth Factor 23 Is Increased in Calcium Nephrolithiasis with Hypophosphatemia and Renal Phosphate Leak. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2006;91(3):959–963.
321. Taylor E, Hoofnagle A, Curhan G. Calcium and Phosphorus Regulatory Hormones and Risk of Incident Symptomatic Kidney Stones. *Clin J Am Soc Nephro*. 2015;10(4):667–675.
322. Ali, A., Tursun, H., Talat, A., Abla, A., Muhtar, E., Zhang, T., & Mahmut, M. Association Study of Klotho Gene Polymorphism With Calcium Oxalate Stones in The Uyghur Population (2017). *Materials and methods*, 13(2016), 2939–2944.
323. Xu C, Song R, Yang J, et al. Klotho gene polymorphism of rs3752472 is associated with the risk of urinary calculi in the population of Han nationality in Eastern China. *Gene*. 2013;526(2):494–497.
324. Xu C, Song R, Yang J, Jiang B, Wang X, Wu W et al (2013) Klotho gene polymorphism of rs3752472 is associated with the risk of urinary calculi in the population of Han nationality in Eastern China. *Gene* 526(2):494–497
325. Telci, Dogan AU, Ozbek, et al.KLOTHO Gene Polymorphism of G395A Is Associated with Kidney Stones. *Am J Nephrol*. 2011;33(4):337–343.

326. Gürel A, Üre İ, Temel H, et al. The impact of klotho gene polymorphisms on urinary tract stone disease. *World J Urol.* 2016;34(7):1045–1050.
327. Taylor, E. N., Hoofnagle, A. N., & Curhan, G. C. (2015). Calcium and phosphorus regulatory hormones and risk of incident symptomatic kidney stones. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(4), 667–675.
328. Hou J. The Role of Claudin in Hypercalciuric Nephrolithiasis. *Curr Urology Reports.* 2013;14(1):5–12.
329. Bonny, O., & Edwards, A. (2013). Calcium reabsorption in the distal tubule: regulation by sodium, pH, and flow. *AJP: Renal Physiology*, 304(5), F585–F600.
330. Ha Y-S, Tcheu D-U, Kang H, et al. Phosphaturia as a Promising Predictor of Recurrent Stone Formation in Patients with Urolithiasis. *Korean J Urology.* 2009;51(1):54–59.
331. Bushinsky DA. Nephrolithiasis: site of the initial solid phase. *J Clin Invest* 2003;111:602-5.
332. Lapointe JY, Tessier J, Paquette Y, et al. NPT2a gene variation in calcium nephrolithiasis with renal phosphate leak. *Kidney Int* 2006;69:2261–7.
333. Levi M, Breusegem S. Renal Phosphate–Transporter Regulatory Proteins and Nephrolithiasis. *New Engl J Medicine.* 2008;359(11):1171–1173.
334. Weinman EJ, Mohanlal V, Stoycheff N, Wang F, Steplock D, Shenolikar S, et al. Longitudinal study of urinary excretion of phosphate, calcium, and uric acid in mutant NHERF-1 null mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F838-43.

335. Bushinsky DA, Asplin JR. Thiazides reduce brushite, but not calcium oxalate, supersaturation, and stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:417-24.
336. Kim Y-J, Kim T-H, Yun S-J, Kim M, Kim W-J, Lee S-C. Renal Phosphate Control as a Reliable Predictive Factor of Stone Recurrence. *J Urology*. 2009;181(6):2566–2572.
337. Bergwitz C, Jüppner H. FGF23 and syndromes of abnormal renal phosphate handling ; *Endocrine FGFs and Klothos* ; 2012:41-64.
338. Wang L, Holmes R, Peng J-B. The L530R variation associated with recurrent kidney stones impairs the structure and function of TRPV5. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;492(3):362–367.
339. Khaleel, A., Wu, M. S., Wong, H. S. C., Hsu, Y. W., Chou, Y. H., & Chen, H. Y. (2015). A single nucleotide polymorphism (rs4236480) in TRPV5 calcium channel gene is associated with stone multiplicity in calcium nephrolithiasis patients. *Mediators of Inflammation*, 2015.
340. Negri A. Is the renal kallikrein-kinin system a factor that modulates hypercalciuria? *Nefrología Engl Ed*. 2017;37(1):5–8.
341. Tebben, P. J., Singh, R. J., & Kumar, R. (2016). Vitamin D-mediated hypercalcemia: Mechanisms, diagnosis, and treatment. *Endocrine Reviews*, 37(5), 521–547.
342. Tang J, Chonchol M. Vitamin D and kidney stone disease. *Curr Opin Nephrol Hy*. 2013;22(4):383.
343. Goldfarb D. Does Vitamin D Supplementation Cause Kidney Stones? *J Urology*. 2017;197(2):280–281.

344. Yao J, Kathpalia P, Bushinsky DA, Favus MJ. Hyperresponsiveness of Vitamin D Receptor Gene Expression to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. A New Characteristic of Genetic Hypercalciuric Stoneforming Rats. *Journal of Clinical Investigation* 1998;101:2223–2232.
345. Ticinesi A, Nouvenne A, Ferraro P, et al. Idiopathic Calcium Nephrolithiasis and Hypovitaminosis D: A Case-control Study. *Urology*. 2016;87:40–45.
346. Hu H, Zhang J, Lu Y, et al. Association between Circulating Vitamin D Level and Urolithiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2017;9(3):301.
347. Johri N, Jaeger P, Ferraro P, et al. Vitamin D deficiency is prevalent among idiopathic stone formers, but does correction pose any risk? *Urolithiasis*. 2016:1–9.
348. Pipili C, Oreopoulos DG. Vitamin D Status in Patients with Recurrent Kidney Stones. *Nephron Clin Pract*. 2013;122(3-4):134–138.
349. Dimkovic NB, Wallele AA, Oreopoulos DG: Renal stone disease, elevated iPTH level and normocalcemia. *Int Urol Nephrol* 2002; 34:135–141.
350. Penniston KL, Nakada SY, Hansen KE: vitamin D repletion does not alter urinary calcium excretion in healthy postmenopausal women. *BJU Int* 2009; 104: 1512–1516.
351. Maruani G, Hertig A, Paillard M, Houillier P. Normocalcemic primary hyperparathyroidism: evidence for a generalized target-tissue resistance to parathyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4641–4648.
352. Amaral L, Queiroz D, Marques T, et al. Normocalcemic versus hypercalcemic primary hyperparathyroidism: more stone than bone? *J Osteoporos* 2012; 2012: Article 128352.

353. Pawlowska, M., & Cusano, N. E. (2015). An overview of normocalcemic primary hyperparathyroidism. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 22(6), 413–421.

354. Williams CP, Hudson PR, Soysa LD, Davies GK, Davies MG, De Bolla AR: Inappropriate phosphate excretion in idiopathic hypercalciuria: the key to a common cause and future treatment? *J Clin Pathol* 1996; 49: 881–888.

355. Lau YK, Westby GR, Bosanac P, Grabie M, Mitnick P, Slatopolsky E, Goldfarb S, Agus ZS: Proximal tubular defects in idiopathic hypercalciuria: resistance to phosphate administration. *Miner Electrolyte Metab* 1982; 7: 237–249.

356. Thamilselvan S, Menon M. Vitamin E therapy prevents hyperoxaluria-induced calcium oxalate crystal deposition in the kidney by improving renal tissue antioxidant status. *Bju Int*. 2005;96(1):117–126.

357. Raman M. Hyperoxaluria: The role of N-acetyl-L-cysteine and Vitamin E on lithogenic factors and urinary markers in ameliorating calcium oxalate crystallization. *Int J Clin Exp Physiology*.2016;3(2):82–91.

358. JATURAKAN O, BURANAKARL C, DISSAYABUTRA T, CHAIYABUTR N, KIJTAWORN RAT A, RUNGSIPIPAT A. Changes of Klotho protein and Klotho mRNA expression in a hydroxy-L-proline induced hyperoxaluric rat model. *J Vet Med Sci*.2017:17–0340.

359. Banerjee, S., Zhao, Y., Sarkar, P.S., Rosenblatt, K.P., Tilton, R.G. and Choudhary, S. 2013. Klotho ameliorates chemically induced endoplasmic reticulum (ER) stress signaling. *Cell Physiol. Biochem*.31: 659-672.

360. Liu, Q.F., Ye, J.M., Deng, Z.Y., Yu, L.X., Sun, Q. and Li, S.S. 2015. Ameliorating effect of Klotho on endoplasmic reticulum stress and renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *Iran J. Kidney Dis*. 9:291-297.

361. Khan SR and Kok DJ: Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci* 2004; 9: 1450.
362. Aydın H, Yencilek F, Mutlu N, Çomunoğlu N, Koyuncu H, Sarıca K. Ethylene Glycol Induced Hyperoxaluria Increases Plasma and Renal Tissue Asymmetrical Dimethylarginine in Rats: A New Pathogenetic Link in Hyperoxaluria Induced Disorders. *J Urology*.2010;183(2):759–764.
363. Assar M, Angulo J, Santos-Ruiz M, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) elevation and arginase up-regulation contribute to endothelial dysfunction related to insulin resistance in rats and morbidly obese humans. *J Physiology*. 2016;594(11):3045–3060.
364. Taguchi K, Okada A, Yasui T, et al. Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Agonist, Decreases Renal Crystal Deposition, Oxidative Stress and Inflammation in Hyperoxaluric Rats.*J Urology*. 2012;188(3):1002–1011.
365. Kang H, Seo S, Kim W, et al. Hypertriglyceridemia Is Associated With Increased Risk for Stone Recurrence in Patients With Urolithiasis. *Urology*. 2014;84(4):766–771.
366. Kuwahara, N., Sasaki, S., Kobara, M., Nakata, T., Tatsumi, T., Irie, H., Hushiki, S. (2008).HMG-CoA reductase inhibition improves anti-aging klotho protein expression and arteriosclerosis in rats with chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *International Journal of Cardiology*, 123(2), 84–90.
367. Xia W, Zhang A, Jia Z, Gu J, Chen H. Klotho Contributes to Pravastatin Effect on Suppressing IL-6 Production in Endothelial Cells. *Mediat Inflamm*. 2016;2016:1–6.
368. Yoon HE, Lim SW, Piao SG, Song J-H, Kim J, Yang CW. Statin Upregulates the Expression of Klotho, an Anti-Aging Gene, in Experimental Cyclosporine Nephropathy. *Nephron Exp Nephrol*. 2012;120(4):e123–e133.

369. Li D-J, Fu H, Zhao T, Ni M, Shen F-M. Exercise-stimulated FGF23 promotes exercise performance via controlling the excess reactive oxygen species production and enhancing mitochondrial function in skeletal muscle. *Metabolism*. 2016;65(5):747–756.

370. Vervaet BA, D'Haese PC, De Broe ME, Verhulst A. Crystalluric and tubular epithelial parameters during the onset of intratubular nephrocalcinosis: illustration of the 'fixed particle' theory in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 3659-3668

372. Marengo SR, Chen D, MacLennan GT, Resnick MI, Jacobs GH. Minipump induced hyperoxaluria and crystal deposition in rats: a model for calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 2004; 171:1304-1308 [PMID: 14767338]

373. Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. Experimental induction of crystalluria in rats using mini-osmotic pumps. *Urol Res* 1983; 11:199-205 [PMID: 6659210]

374. Khan SR, Finlayson B, Hackett RL. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in the rat. Role of the renal papilla. *Am J Pathol* 1982; 107: 59-69

375. Khan S, Glenton P, Byer K. Modeling of hyperoxaluric calcium oxalate nephrolithiasis: Experimental induction of hyperoxaluria by hydroxy-L-proline. *Kidney Int*. 2006;70(5):914–923.

376. Knight J, Holmes RP, Cramer SD, Takayama T, Salido E. Hydroxyproline metabolism in mouse models of primary hyperoxaluria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 302: F688-F693

377. Frick K, Asplin J, Favus M, Culbertson C, Krieger N, Bushinsky D. Increased biological response to 1,25(OH)2D3 in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Am J Physiology - Renal Physiology*. 2013;304(6)

378. Liu, J., Cao, Z., Zhang, Z., Zhou, S., & Ye, Z. (2007). A Comparative Study on Several Models of Experimental Renal Calcium Oxalate Stones Formation in Rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 27(1), 83–87.
379. Holmes RP, Assimos DG. Glyoxylate synthesis, and its modulation and influence on oxalate synthesis. *J Urol* 1998;160: 1617-1624
380. Andrus SB, Gershoff SN, Faragalla FF, Prien EL. Production of calcium oxalate renal calculi in vitamin B6-deficient rats. Study of the influence of urine pH. *Lab Invest* 1960; 9: 7-27
381. O'Connor RC, Worcester EM, Evan AP, Meehan S, Kuznetsov D, Laven B, Sommer AJ, Bledsoe SB, Parks JH, Coe FL, Grynepas M, Gerber GS. Nephrolithiasis and nephrocalcinosis in rats with small bowel resection. *Urol Res* 2005; 33: 105-115
382. Thamilselvan, S., & Menon, M. (2005). Vitamin E therapy prevents hyperoxaluria-induced calcium oxalate crystal deposition in the kidney by improving renal tissue antioxidant status. *BJU International*, 96(1), 117–126.
383. Taguchi, K., Okada, A., Hamamoto, S., Unno, R., Kobayashi, T., Ando, R., Yasui, T. (2016). Differential Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α and Receptor- γ on Renal Crystal Formation in Hyperoxaluric Rodents. Hindawi Publishing Corporation, PPAR Research. Volume 2016
384. Okamoto M, Kohjimoto Y, Iba A, Saji F, Hara I, Shigematsu T. Calcium oxalate crystal deposition in metabolic syndrome model rat kidneys. *Int J Urol*. 2010;17(12):996–1003.
385. Khan S, Glenton P. Experimental Induction of Calcium Oxalate Nephrolithiasis in Mice. *J Urology*. 2010;184(3):1189–1196.
386. Li Y, McMartin K. Strain differences in urinary factors that promote calcium oxalate crystal formation in the kidneys of ethylene glycol-treated rats. *Am J Physiology - Renal Physiology*. 2009;296(5):F1080–F1087.

387. YAMAGUCHI S, WIESSNER J, HASEGAWA A, HUNG L, MANDEL G, MANDEL N. Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *Int J Urol*. 2005;12(3):290–298.
388. Khan, S. R. (2012). Is oxidative stress, a link between nephrolithiasis and obesity, hypertension, diabetes, chronic kidney disease, metabolic syndrome? *Urological Research*, 40(2), 95–112
389. Pragasam V, Kalaiselvi P, Sumitra K, Srinivasan S, Varalakshmi P. Counteraction of oxalate induced nitrosative stress by supplementation of l-arginine, a potent antilithic agent. *Clin Chim Acta*. 2005;354(1-2):159–166.
390. McMartin K. Are calcium oxalate crystals involved in the mechanism of acute renal failure in ethylene glycol poisoning? *Clin Toxicol*. 2009;47(9):859–869.
391. Hu M, Shi M, Zhang J, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating Klotho. *J Am Soc Nephrol*. 2015;27(1):79–90.
392. Kato Y, Arakawa E, Kinoshita S, et al. Establishment of the Anti-Klotho Monoclonal Antibodies and Detection of Klotho Protein in Kidneys. *Biochem Bioph Res Co*. 2000;267(2):597–602.
393. Lim K, Groen A, Molostvov G, et al. α -Klotho Expression in Human Tissues. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2015;100(10):E1308–E1318.
394. Verzola D, Ansaldo F, Milanesi S, et al. Interorgan handling of fibroblast growth factor-23 in humans. *Am J Physiol-renal*. 2017;312(2):F254–F258.
395. Shimada T, Mizutani S, Muto T, et al. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc National Acad Sci*. 2001;98(11):6500–6505.

396. JATURAKAN O, DISSAYABUTRA T, CHAIYABUTR N, et al. Combination of vitamin E and vitamin C alleviates renal function in hyperoxaluric rats via antioxidant activity. *J Vet Med Sci.* 2017;79(5):17–0083.

397. Tsuji H, Wang W, Sunil J, et al. Involvement of renin–angiotensin–aldosterone system in calcium oxalate crystal induced activation of NADPH oxidase and renal cell injury. *World J Urol.* 2016;34(1):89–95.

398. Khan SR (1997) Animal models of kidney stone formation: an analysis. *World J Urol* 15:236–243

399. Sáenz-Medina J, Jorge E, Corbacho C, et al. Metabolic syndrome contributes to renal injury mediated by hyperoxaluria in a murine model of nephrolithiasis. *Urolithiasis.* 2017:1–8.

400. Khan S. Reactive Oxygen Species as the Molecular Modulators of Calcium Oxalate Kidney Stone Formation: Evidence from Clinical and Experimental Investigations. *J Urology.* 2013;189(3):803–811.

401. Ikushima M, Rakugi H, Ishikawa K, et al. Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochem Bioph Res Co.* 2006;339(3):827–832.

402. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl.* 2005;20(12):2636–2645.

403. Sugiura H, Yoshida T, Tsuchiya K, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute renal failure. *Nephrol Dial Transpl.* 2005;20(12):2636–2645.

404. Lin, Y., & Sun, Z. (2015). Antiaging gene klotho attenuates pancreatic β -cell apoptosis in type 1 diabetes. *Diabetes.*

405. Cheng M-F, Chen L-J, Cheng J-T. Decrease of Klotho in the Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:513853.

406. Naghii M, Eskandari E, Mofid M, Jafari M, Asadi M. Antioxidant therapy prevents ethylene glycol-induced renal calcium oxalate crystal deposition in Wistar rats. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(6):1231–1238.
407. Aizawa H, Saito Y, Nakamura T, et al. Downregulation of the Klotho Gene in the Kidney under Sustained Circulatory Stress in Rats. *Biochem Bioph Res Co*. 1998;249(3):865–871.
408. Mulay S, Eberhard J, Pfann V, et al. Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. *Am J Physiol-renal*. 2016;310(8):F785–F795.
409. German D, Khobahy I, Pastor J, Kuro-o M, Liu X. Nuclear localization of Klotho in brain: an anti-aging protein. *Neurobiol Aging*. 2012;33(7):1483.e25–1483.e30.
410. Olauson, H., Mencke, R., Hillebrands, J. L., & Larsson, T. E. (2017). Tissue expression and source of circulating α Klotho. *Bone*, 100(2016), 19–35.
411. Azuma, M., Koyama, D., Kikuchi, J., Yoshizawa, H., Thasinas, D., Shiizaki, K., Kusano, E. (2012). Promoter methylation confers kidney-specific expression of the Klotho gene. *FASEB Journal*, 26(10), 4264–4274.
412. Tsai K, Lee W, Chen W, et al. Upregulation of PRMT6 by LPS suppresses Klotho expression through interaction with NF- κ B in glomerular mesangial cells. *J Cell Biochem*. 2018.
413. Kadoya H, Satoh M, Haruna Y, Sasaki T, Kashihara N. Klotho attenuates renal hypertrophy and glomerular injury in Ins2Akita diabetic mice. *Clin Exp Nephrol*. 2015;20(5):671–678.
414. Kim J-H, Xie J, Hwang K-H, et al. Klotho May Ameliorate Proteinuria by Targeting TRPC6 Channels in Podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2016;28(1):140–151.

415. Takenaka T, Watanabe Y, Inoue T, Miyazaki T, Suzuki H. Fibroblast growth factor 23 enhances renal klotho abundance. *Pflügers Archiv - European J Physiology*. 2013;465(7):935–943.
416. Asai O, Nakatani K, Tanaka T, et al. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int*. 2012;81(6):539–547
417. Aldámiz-Echevarría L, Andrade F. Asymmetric Dimethylarginine, Endothelial Dysfunction and Renal Disease. *Int J Mol Sci*. 2012;13(9):11288–11311
418. Pizzolato P. Histochemical recognition of calcium oxalate. *Clinical Laboratory*. September, 1963
419. Yamaguchi, S., Wiessner, J. H., Hasegawa, A. T., Hung, L. Y., Mandel, G. S., & Mandel, N. S. (2005). Study of a rat model for calcium oxalate crystal formation without severe renal damage in selected conditions. *International Journal of Urology : Official Journal of the Japanese Urological Association*, 12(3), 290–298.
420. UEDA S, YAMAGISHI S, KAIDA Y, OKUDA S. Asymmetric dimethylarginine may be a missing link between cardiovascular disease and chronic kidney disease (Review Article). *Nephrology*. 2007;12(6):582–590.
421. Zhou L, Mo H, Miao J, et al. Klotho Ameliorates Kidney Injury and Fibrosis and Normalizes Blood Pressure by Targeting the Renin-Angiotensin System. *Am J Pathology*. 2015;185(12):3211–3223.



T.C. YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ, DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU
(YÜDHEK)
ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23.12.2016	566	27.09.2016	Hasan AYDIN

'Hiperoksalüri modeli oluşturulmuş sıçanlarda böbrek dokusunda FGF-23/Klotho ekspresyon profilinin ürolitiazis patogenezindeki rolünün araştırılması' adlı bilimsel çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 Yıl	Hayvan Türü ve cinsiyeti: Rat ♂	Hayvan Sayısı: 35
------------------------------------	------------------------------------	----------------------

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	
Raportör	Vet. Hekim Engin SÜMER	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	KATILMADI
Üye	Doç. Dr. Rukset ATTAR	
Üye	Doç. Dr. Soner DOĞAN	
Üye	Doç. Dr. Ediz DENİZ	
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	KATILMADI
Üye	Yrd. Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR	
Üye	Hakan GÖKSEL	
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	

Ek 1: Etik Kurul Onay Formu



