

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

NEFROLİTİAZİSLİ ÇOCUKLARDA OSTEOPONTİN GEN POLİMORFİZMİNİN
ROLÜ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Gökhan TEKİN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Pelin ERTAN

Manisa, 2010

ÖNSÖZ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık tezimi hazırlamamda emeğini ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Pelin ERTAN'a teşekkür ederim. Pediatri eğitimim boyunca tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım başta Prof. Dr. Ali ONAĞ olmak üzere tüm öğretim üyelerine, uzmanlara, asistan arkadaşlarım ve klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Gönül Dinç Horasan'a ve genetik verilerin elde edilmesi aşamasında emeği geçen Prof. Dr. Afig Berdeli'ye teşekkür ederim.

Hayatımın her evresinde sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme ve kızımız Ece'nin baş mimarı sevgili eşim Neşe TEKİN'e teşekkür ederim.

Dr. Gökhan TEKİN
Manisa,2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	ii
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.NEFROLİTİAZİS.....	2
2.1.1.TAŞ TIPLERİ.....	5
2.1.1.1Kalsiyum Taşları.....	5
2.1.1.1.1.Hiperkalsiüri.....	5
2.1.1.1.2.Hiperokzalüri.....	6
2.1.1.1.3.Hiperürikozüri.....	6
2.1.1.1.4.Hipositratüri.....	6
2.1.1.1.5.Hipomagnezüri.....	7
2.1.1.2.Ürik Asid Taşları.....	7
2.1.1.3.Sistin Taşları.....	8
2.1.1.4.Struvit (Enfeksiyon) Taşları.....	8
2.1.1.5.Ksantin Taşları.....	8
2.1.1.6.Orotik Asid Taşları.....	9
2.1.1.7.İndinavir Taşları	9
2.1.2.TAŞ OLUŞUM MEKANİZMALARI.....	9
2.2.OSTEOPONTİN.....	13
2.2.1.Osteopontinin Fonksiyonları.....	16
2.2.2.Deneysel Renal Hasar Modellerinde Osteopontin.....	19
2.2.3.İnsan Böbrek Hastalıklarında Osteopontin.....	20
2.2.4.Osteopontin Nefrolitiazis İlişkisi	21
3.GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1.OPN-SPP1 Gen DNA Dizi Analizi Yöntemi.....	24
3.2.PCR İşlemleri.....	25

3.3.Üriner Metabolik Risk Faktörlerinin Çalışılma Yöntemi.....	27
3.4.İstatistiksel Analiz.....	28
4.BULGULAR.....	29
5.TARTIŞMA.....	40
6.SONUÇ.....	49
7.ÖZET.....	50
8.İNGİLİZCE ÖZET.....	51
9.KAYNAKLAR.....	53

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Nefrolitiazis multifaktöryel etiyojolojiye sahip, poligenik olarak kalıtılan bir durumdur (1,2). Nefrolitiazis oluşumu kristal formasyonunun sonucunda meydana gelmektedir (3,4). İdrarda kristal formasyonu birçok faktör tarafından inhibe edilmekte veya uyarılmaktadır. Bu faktörler arasında makromoleküler proteinler de bulunmaktadır (5). Makromoleküler proteinler renal epitel hücrelerinde kristallerle etkileşim gösterip, kristallerin nükleasyon, büyüme, agregasyon ve adezyonunu düzenlemektedir (6,7,8). Üriner makromoleküllerin kalitatif ve kantitatif eksiklikleri taş oluşum riskini etkilemekte ve nefrolitiazis patogeneğinde anahtar rol oynamaktadır (9). Tamm-Horsfall proteini, nefrokalsin ve osteopontin başta gelen proteinler olup, taş oluşumunda farklı basamaklarda etki göstermektedir. OPN hem kalsiyum taşlarının yapısında yer alması, hem de taş oluşum mekanizmalarındaki her üç aşamada da olan etkileri ve diğer proteinlere göre daha potent olarak gösterilmesi nedeniyle en önemli rolü oynayan protein olarak göze çarpmaktadır (10). OPN geni üzerinde meydana gelen polimorfizmlerin nefrolitiazis ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (7,8,11).

Bu araştırmada nefrolitiazisli çocuklarda ve kontrol grubunda OPN gen polimorfizminin araştırılarak, nefrolitiazis ve saptanan polimorfizmlerin aralarındaki ilişkinin incelenmesi; hastaların cinsiyet, tanı yaşı, takip süresi, ebeveynler arasında akrabalık durumu, ailede nefrolitiazis öyküsü gibi demografik özellikleri, bilateral ve multipl taş varlığı gibi radyolojik bulguları, üriner metabolik risk faktörlerinin belirlenmesi amacıyla 24 saatlik veya spot idrarda tespit edilen kalsiyum, okzalat, sitrat, ürik asid, sistin, magnezyum ve kreatinin atılımları, taş analizi yapılmış hastaların belirlenmiş taş cinsi ve hastaların takip süresi dahilinde rekürrens durumunun incelenmesi ve bu özelliklerin saptanan genotipik dağılım ile karşılaştırılarak aralarındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.NEFROLİTİAZİS

Ürolitiazis organik bir matriks içinde kristal komponentler içeren, üriner traktusun herhangi bir yerinde oluşabilen anormal bir birikimdir (12). Yüksek morbiditesi ve son dönem böbrek yetmezliği potansiyeli nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur (13). Ürolitiazis Türkiye’de pediatrik ürolojik sorunların en yaygın olanlarından biridir (14). Ürolitiazis özellikle erişkinlerde gözlenmekte ve tüm hayat boyunca görülme oranının yaklaşık %3-12 olduğu belirtilmektedir (1). Çocukluk çağında ise daha nadir görülmekte ve prevalansı %2-3 arasında değişmektedir (15,16). Düşük prevalansına rağmen çocukluk çağında ürolitiazis, yüksek rekürrens oranı ve morbiditeye sahiptir. Rekürrens oranı % 6,5 ile % 54 arasında değişmektedir (1,15). Türk Nefroloji Derneği 2008 yılı içinde renal replasman tedavisine başlanılan kronik böbrek yetmezlikli çocuklarda etyolojinin %3,3’ünü ürolitiazisin oluşturduğunu bildirilmiştir (17). Çocuklarda ürolitiazise bağlı uzun dönem etkiler ve morbiditeyi azaltmak için metabolik nedene yönelik uygun bir yaklaşım gerekmektedir (18).

İnsidans, lokalizasyon ve etiyolojisi coğrafi bölgelere göre değişmektedir (1,19). Bu değişkenliğin iklim, diyet, genetik ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olduğu belirtilmektedir (20,21). Uzak Doğu, Orta Doğu’nun belli alanları ve Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde endemik bir sorundur (5). Türkiyede okul çağı çocuklarında ürolitiazis insidansının %0,8 olduğu belirtilirken; başka bir çalışmada ise 14 yaşın altında bu hastalığın görülme oranının %17 olduğu bildirilmektedir (15,20).

Çocukluk çağında tüm yaş gruplarında ürolitiazis görülebilmektedir; çalışmalarda tanı anındaki ortalama yaş 7,3-9,4 olarak saptanmıştır (20). Cinsiyet açısından değerlendirildiğinde ise belirgin bir farklılık olmamasına rağmen erkeklerde biraz daha fazla gözlendiği bildirilmektedir (5,22). Türkiye’de yapılan çalışmalarda Özokutan ve arkadaşları tarafından 4 kat, Tekin ve arkadaşları tarafından 2 kat, Bak ve arkadaşları tarafından 2.3 kat, Tabel ve arkadaşları tarafından ise 1.6 kat daha fazla erkek üstünlüğü saptanmıştır (23,24,25). Yine Türkiye’de Ece ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada çocuklarda genel olarak eşit oranda ya da erkeklerde biraz daha fazla görülmesine rağmen kız üstünlüğünün saptandığı belirtilmiş; ve bunun nedeni kızlarda daha sık idrar yolu enfeksiyonu görülmesi ile sık oluşan enfeksiyon taşları olarak düşünülmüştür (1).

Çocukluk çağında ürolitiazis multifaktöryel etiyolojiye sahiptir; nedenler arasında üriner sistemin anatomik malformasyonları, metabolik bozukluklar, genetik yatkınlık, çevresel faktörler, nütrisyonel nedenler ve taş oluşumunu kolaylaştırıcı medikal tedaviler sayılmaktadır. Güneydoğu Asya, Türkiye ve Uzakdoğu'da mesane taşları endemik olarak görülmekte ve bunun tahıl bazlı ve düşük protein içerikli beslenme gibi diyetsel faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (1,21,26).

Ailede ürolitiazis öyküsünün varlığı taş oluşum patogeneğinde genetik faktörlerin varlığını destekleyen bir unsurdur (27). Aile öyküsü çeşitli yayınlarda %12-50 oranında bildirilmektedir (14,20). Türkiye'de Özokutan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada idiyomatik hiperkalsiüri saptanan çocukların %70'inde ailede ürolitiazis öyküsü tespit edilmiştir (14). 1 yaş altında tanı alan ürolitiazisli çocuk hastalarda aile öyküsünün varlığı %11.8-78.7 arasında bildirilmiştir (26). Tabel ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ailede ürolitiazis öyküsü %50 hastada tespit edilmiş ve bunun toplumumuzda sık rastlanan akraba evlilikleriyle birlikte genetik yatkınlık ve erken yaşta nefrolitiazis oluşumu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (25).

Böbrek taşlarının etyolojisi primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmaktadır. Sekonder nedenler arasında üriner sistem obstrüksiyonu, yineleyen enfeksiyonlar, uzamış yatak bağımlılığı, endokrin bozukluklar, taşa yol açan veya yapısına katılan ilaçlar ve metabolik hastalıklar sayılmaktadır. Diğer vakalar da primer ya da idiyomatik olarak sınıflanmaktadır (28).

Üriner sistem taşları sistemin herhangi bir bölümünde oluşabilir; fakat endüstrileşmiş ve zengin ülkelerde genellikle böbreklere sınırlı kalmaktadır (3). Türkiye'de yapılan çalışmalarda Bak, Tabel ve Alpay üst üriner sistem taşlarının sıklıkla görüldüğünü bildirmişlerdir (25,29,30).

Ürolitiazisli çocuklarda metabolik bozuklukların oranı %12,3 ile %96 arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir (15). Türkiye'de yapılan çalışmalarda çocuklarda anatomik bozukluklar ve enfeksiyon dışında metabolik bozuklukların üriner sistem taşlarında etiyolojinin %20-25'ini oluşturduğu belirtilmiştir (29). İdiyomatik hiperkalsiüri en sık metabolik risk faktörü olarak belirtilmektedir. İdiyomatik hiperkalsiüri insidansı çeşitli çalışmalarda %40-69 olarak bildirilmektedir (15). Türk çocuklarında idiyomatik hiperkalsiürinin prevalansı %2,4 olarak bildirilirken, Manisa ilinde yapılan bir çalışmada idiyomatik hiperkalsiüri sıklığı %4.8, Bursa bölgesinde yapılan bir çalışmada ise %4.7 olarak bulunmuştur (31,32). Bunun yanında hiperkalsiürili çocuklarda %4-17 oranında böbrek taşlarının geliştiği belirtilmektedir (20). Spivacov ve ark. tarafından

yapılan çalışmada İkinci en sık bozukluk olarak hipositratri saptanmıştır (15). Türkiye’de Tefekli ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada %60,6 oranında olan en sık metabolik risk faktörü olarak hipositratri rapor edilmiştir (15). Tekin ve ark. tarafından yüksek sıklıkla görülen hipositratri, lokal diyetsel alışkanlıklara ya da diğer bölgesel faktörlere bağlanmıştır (15). Bak ve ark. tarafından ürolitiazisli hastalarda %33 oranında metabolik nedenler tespit edilirken bunun %54’ünde idiyomatik hiperkalsiüri, %21’inde hiperokzalüri, %8.5’inde sistinüri, %8.5’inde hipositratri, %4’ünde normoürisemik hiperürikozüri, %4’ünde ise ksantinüri saptanmıştır (29). Alpay ve ark. yaptıkları araştırmada hiperkalsiüri %33.8 ve hipositratri %33.1 oranında saptanırken, %13.1 vakada normal metabolik sonuç elde edilmiştir (30). Tabel ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise %59.6 sıklıkla en sık metabolik neden olarak hiperkalsiüri tespit edilmiştir (25). Çocuklarda 24 saatlik ve spot idrarda normal ekskresyon oranları Tablo-1’de verilmiştir

Tablo-1: Çocuklarda 24 saatlik ve spot idrarda normal ekskresyon oranları (24,25,26,33).

24 saatlik idrar		Spot idrar	
Kalsiyum	<4 mg/kg/gün	Kalsiyum/kreatinin (25)	
Okzalit	<40mg/1.73m ² /gün	0-6 ay	<0.8 mg/mg
Ürik asit	<10.7 mg/kg/gün veya < 815 mg/1.73m ² /gün	7-12 ay	<0.6 mg/mg
Sitrat	>400 mg/g kreatinin veya >320 mg/1.73m ² /gün	1-18 yaş	<0.2 mg/mg
Sistin	<75 mg/1.73m ² /gün	Okzalit/kreatinin	
Magnezyum (25)	<88 mg/1.73m ² /gün	<6 ay	<0.3 mg/mg
İdrar miktarı	>20 ml/kg/gün	6 ay-4 yaş	<0.15 mg/mg
		>4 yaş	<0.1 mg/mg
		Ürik asit	
		<0.53 mg/dl GFR	
		Sitrat/kreatinin	
		>0.51 g/g	
		Sistin/kreatinin (33)	
		<0.075 mg/mg	
		Magnezyum/kreatinin (26)	
		>0.12 mg/mg	

2.1.1.TAŞ TIPLERİ

Taş tiplerine baktığımızda kalsiyum okzalat taşları üst üriner sistem taşlarından en sık görülenidir (20). Bak ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kalsiyum okzalat taş sıklığı %74 olarak bildirilirken, kalsiyum fosfat %12, struvit %8, sistin %3, ürik asid %1.5, ksantin %1.5 oranında saptanmıştır (29). Yine Tabel ve Alpay yaptıkları çalışmalarda kalsiyum okzalat taşlarını daha yüksek oranda saptamışlardır (25,30).

2.1.1.1.KALSİYUM TAŞLARI

Çocuklarda üriner sistem taşlarının büyük bir kısmını kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfat taşları oluşturmaktadır ve sıklığı %75'den fazla olarak bildirilmektedir. İdrarın kalsiyum okzalat ile süpersatüre olması kalsiyum, okzalat ve ürik asidin artmış üriner atılımı veya hipositatüri ve hipomagnezüri sonucunda meydana gelmektedir (5,12,34).

2.1.1.1.1.Hiperkalsiüri

Hiperkalsiüri çocuklarda ürolitiazisin en yaygın nedenidir; ve bütün pediatrik taş hastalıklarının %34 ve daha fazlasını kapsamaktadır (5). Hiperkalsiüri üzerinde etkili diğer risk faktörleri olarak üriner volüm ve sitrat konsantrasyonu sayılabilir. Optimal değerlendirme için bu risk faktörlerin etkilerini yansıtan üriner kalsiyum okzalat ve fosfat ölçülmelidir (12,25,34).

Hiperkalsiüri; üç sistemden birinde ya da daha fazlasındaki bozukluk sonucu gelişmektedir. Gastrointestinal kalsiyum absorpsiyonunun artması, kemik formasyonu ve rezorpsiyonunda bozukluk ya da renal kayıp hiperkalsiüriye neden olabilmektedir. Bu sistemlerdeki sekonder değişiklikler sonucu hiperkalsiüri oluşabilmektedir (34).

Hiperkalsiürik kalsiyum taşları, normokalsemik ve hiperkalsemik olarak ayrılmaktadır. Normokalsemik hiperkalsiüride en sık olarak gözlenen idiopatik hiperkalsiüridir; absorptif ve renal hiperkalsiüri olarak gruplanmaktadır (12). İdiopatik hiperkalsiüri tipinin belirlenmesinde oral kalsiyum yükleme testi uygulanmaktadır (35). Diğer normokalsemik nedenler arasında distal renal tübüler asidoz, Bartter sendromu, Dent hastalığı sayılmaktadır. Hiperkalsemik hiperkalsiüri nedenleri

arasında ise rezorptif hiperkalsiüri, D vitamini intoksikasyonu, maligniteler, hiperalimentasyon yer almaktadır (12).

Hiperkalsemik hiperkalsiüride iki önemli grup bulunmaktadır. Bunlar kalsiyum rezorpsiyonuna neden olan rezorptif hiperkalsiüri ve kalsiyumun intestinal sistemden aşırı emilimi sonucu oluşan hiperkalsiürüdür. Rezorptif hiperkalsiürünün en sık nedeni primer hiperparatiroididir (12).

2.1.1.1.2.Hiperokzalüri

Okzalat karaciğerde üretilen bir üründür; böbrekler tarafından primer olarak atılımı sağlanmaktadır. Aynı zamanda diyetten absorbe edilmektedir ve renal atılımı kombine olarak endojen ile ekzojen okzalat yüklerini yansıtmaktadır (5). Hiperokzalüri primer ve sekonder olarak görülebilmektedir (36). Primer hiperokzalüri, otozomal resesif geçişli bir hastalıktır ve iki ayrı enzim defekti ile ilişkili olarak tip1 ve 2 olarak ayrılmaktadır (5,36). Primer hiperokzalüri nefrolitiazisten dramatik sistemik okzalozise kadar değişen geniş bir spektruma yol açabilmektedir (34). Hiperokzalüri ayrıca ince barsak rezeksiyonu veya inflamatuvar barsak hastalığı gibi barsak hastalığına sekonder olarak artan intestinal absorpsiyona veya yüksek okzalat içerikli yiyecekler ya da askorbik asit (C vitamini) gibi okzalat prekürsörlerinin aşırı tüketimine bağlı olarak da görülebilmektedir (12,34).

2.1.1.1.3.Hiperürikozüri

Hiperürikozüri kalsiyum taşına sahip hastaların %10'unda tek başına saptanan anormallik olarak görülmektedir. Hiperürikozüri kalsiyum taşı oluşumunda birçok etkiye sahiptir. Primer mekanizma, ürik asid veya sodyum uratın kalsiyum okzalat çözünürlüğünü azaltarak çökmesini artırmasıdır. Hiperürikozürik çocukların %75'inde ailede ürolitiazis öyküsü mevcuttur (12,34,37).

2.1.1.1.4.Hipositratüri

Kalsiyum taşı olan olgularda düşük üriner sitrat atılımı yaygın bir bulgudur (38). Sitrat kalsiyuma bağlanarak, kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfat kristallerinin

yapışmasını ve büyümesini önleyen önemli bir taş inhibitörüdür (39). Sitrat atılımı proksimal tübülde sitrat emilimi ve metabolizması sonucu ayarlanmaktadır. Her iki durum da sistemik metabolik asidoz, potasyum alımı veya ketojenik diyet gibi durumların neden olduğu proksimal tübülde oluşan hücre içi asidoz tarafından uyarılmaktadır (34). Metabolik asidoz sitratin renal tübüler geri emilimini artırıp, sentezini azaltarak hipositratüriye neden olmaktadır (12). Bakterilerin sitrati metabolize etmesi nedeniyle enfeksiyöz nedenler; çevresel faktörlerden yüksek protein alımı ve aşırı tuz tüketimi hipositratüriye neden olabilmesi nedeniyle göz önünde bulundurulmalıdır (34, 39).

2.1.1.1.5.Hipomagnezürü

Diyetle alınan magnezyumun yetersizliğine bağlı olarak ortaya çıkan hipomagnezürü kalsiyum-okzalat kristalizasyonu için önemli bir risk faktörüdür (12). Magnezyum barsaklarda okzalata bağlanmakta ve emilimi azalmaktadır (40). İdrarda ise magnezyum okzalat ile çözünürlüğü yüksek kompleksler oluşturarak kalsiyum-okzalat kristalizasyonunu süpersaturasyon, büyüme ve nükleasyon aşamalarındaki inhibitör etkisiyle önlemektedir (12,40,41).

2.1.1.2.ÜRİK ASİD TAŞLARI

Ürik asit taşları çocuklardaki tüm böbrek taşlarının %4-8'ini oluşturur (5,39). Ürik asit, pürin metabolizmasının son ürünüdür ve ürik asit taşı oluşumunda ana neden hiperürükozürüdür. Ürik asit taşları konjenital metabolik bozukluklara veya lenfoproliferatif hastalıklara bağlı olarak artmış ürid asit üretimi sonucu oluşmakta, ya da diyetle aşırı pürin alımı, ürikozürük ilaç kullanımı ve buna benzer nedenlerle oluşan hiperürükozürü sonucu meydana gelmektedir (12,39). Ürik asit atılımı yaş ile değişim göstermektedir. En yüksek atılım yenidoğan döneminde görülmekte; yaşla azalmakta ve adolesan dönemde ise erişkin düzeylerde gözlenmektedir (34). Ürik asit taş formasyonundan üç temel faktör sorumludur; bunlar asidik idrar pH'sı, idrarla atılan ürik asit miktarında artış ve düşük idrar volümüdür (34,39).

2.1.1.3.SİSTİN TAŞLARI

Çocuklardaki tüm böbrek taşlarının %1-3'ünü sistin taşları oluşturur (12). Sistinüri otozomal resesif geçişli, proksimal tübülde sistin ve dibazik aminoasitlerin transportunun bozulduğu kalıtsal bir hastalıktır. İnsan sistin transport geninde (SLC3A1) mutasyon tanımlanmıştır. Düşük pH'da, idrarda sistinin çözünürlük derecesi aşılması durumunda taş oluşumu gözlenmektedir. Sistinin zayıf çözünürlüğü nedeniyle %60'a varan sıklıkla rekürren taş oluşumu gözlenmektedir (12,24, 34,42). Sistinüri tip 1, 2 ve 3 olarak alt gruplara ayrılmaktadır ancak bu geleneksel sınıflamadan farklı olarak hastalığın genetik ve fonksiyonel özelliklerine göre yeni bir sınıflama tanımlanmıştır. Bu sınıflama mutasyonun kromozomal lokalizasyonuna göre olmaktadır; tip A kromozom 2, tip B kromozom 19 ve tip AB her iki kromozomda bulunan mutasyonları göstermektedir (42).

2.1.1.4.STRUVİT (ENFEKSİYON) TAŞLARI

Böbrek taşı bulunan çocukların yaklaşık %2-24'ünde struvit (enfeksiyon) taşları görülmektedir (5). Struvit taşları üreaz ile ürenin hidrolizini sağlayan ve bu sayede amonyum ve bikarbonat oluşturan organizmalarla olan enfeksiyonlar nedeniyle meydana gelmektedir (34). Amonyumdan zengin, yüksek pH'daki üriner bileşim magnezyum ve fosfatın çökmesini kolaylaştırarak taş oluşumuna neden olmaktadır (34,37,43). Enfeksiyon taşları üriner sistemde staza neden olan anatomik ve fonksiyonel anormalliği olanlarda daha sık görülmektedir (5,37).

2.1.1.5.KSANTİN TAŞLARI

Ksantinüri nadir görülen, otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. Pürin metabolizmasının son basamağındaki ksantini ürik aside dönüştüren ksantin-oksidad enziminin eksikliği sonucu hipoksantin ve ksantin idrarla atılımı artmaktadır. Ksantinürik hastaların yaklaşık %40'ında ürolitiazis meydana gelmektedir (12).

2.1.1.6. OROTİK ASİD TAŞLARI

Hereditör orotik asidüri pirimidin metabolizmasının nadir rastlanan genetik bir bozukluğudur. Orotik asidin üridin-5-fosfat'a dönüşümünde görevli orotat-fosforibozil-transferaz (OPRT) ve orotidin-5-fosfat-dekarboksilaz (ODC) enzimlerinin eksikliği sonucu idrarla atılımı artan orotik asit kristalleşerek orotik asit taşlarını oluşturur (12).

2.1.1.7. İNDİNAVİR TAŞLARI

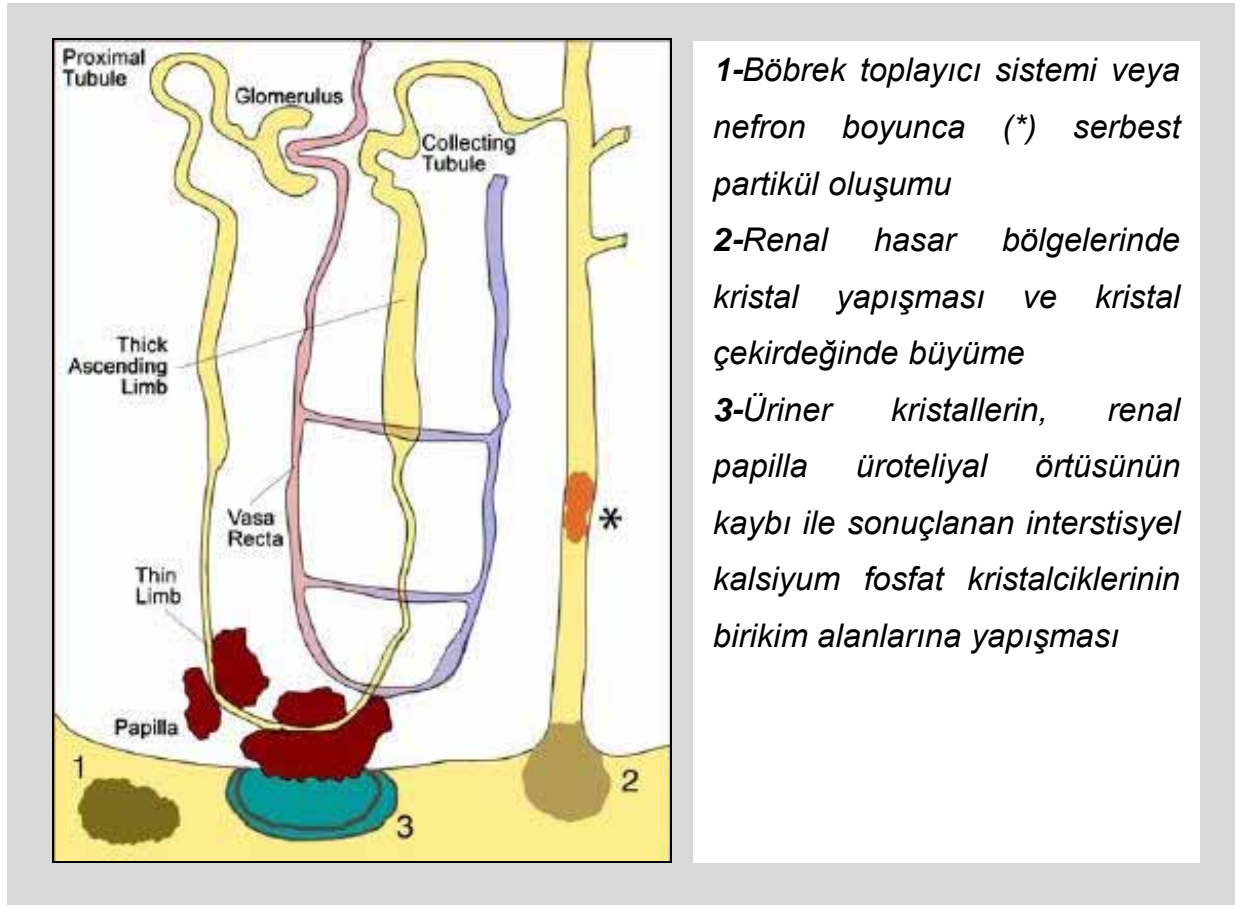
İndinavir sülfat HIV enfeksiyonu tedavisinde kullanılan bir proteaz inhibitörüdür. Bu ilacı kullanan hastaların %4'ünde semptomatik ürolitiazis gelişmektedir (44).

2.1.2. TAŞ OLUŞUM MEKANİZMALARI

Böbrek taşlarının oluşumu böbreklerde kristal formasyonunun bir sonucudur (3,4). İdrarda kristal formasyonu birçok fizikokimyasal ya da anatomik faktörlerce inhibe edilen ya da uyarılan kompleks bir süreçtir. Belirli risk faktörlerinin idrarla atılımı, üriner süpersaturasyon, tübüler akım hızı, üriner pH ve üriner yolun gelişimsel anomalileri bu olaya neden olan faktörler arasında sayılmaktadır (5).

Taş oluşum mekanizması üç ayrı hipotez doğrultusunda seyir göstermektedir (Şekil-1). Kalsiyum okzalat taşlarının büyük çoğunluğu Randall plaklarına yapışma sonucu oluştuğu kabul edilmektedir. Bunun dışında serbest partikül modelinde süpersaturasyonun artması ile lümende oluşmuş olan kristal çekirdeği büyümekte ve tübüler segmentte obstrüksiyon oluşturmaktadır. Diğer bir hipoteze göre ise kristal hücre etkileşimi ile hasarlanmış epitele kristal çekirdeği yapışmakta ve süpersature ultrafiltrat nedeniyle büyümektedir (45).

Şekil-1: Taş oluşum mekanizmalarında üç hipotez (45)



Randall ilk olarak böbrek papillasının önemini vurgulamış, taş oluşumunda üriner süpersatürasyonun ve renal tübüler hasarının rol oynadığını gösteren bir teori kurmuştur (3). Kristalizasyon için hareket ettirici güç çöken tuza bağlı olarak süpersatürasyon gelişimidir. İdrar, kalsiyum ve okzalat ile etkileşen ve kristalizasyonu sağlayan çeşitli iyonlar ile makromolekülleri içeren kompleks bir solüsyondur (4). Çeşitli üriner iyonlar ile makromolekülleri etkileyen herhangi bir hücresel disfonksiyon kalsiyum okzalat süpersatürasyonunu ve böbreklerde kristalizasyonu etkileyebilmektedir. Süpersatürasyonun gelişiminde etkili olabilecek milyonlarca üriner kristal atılımı günlük olarak gerçekleşmektedir. Bunun az bir kısmı böbrek taşı oluşturmaktadır; bunun nedeni olarak kristal formasyonuna neden olabilecek üst sınırlar ve sitrat, magnezyum ve üriner proteinler gibi önleyici faktörlerin arasındaki dengenin varlığı, kristallerin böbrekte oluşmaması ya da oluşanların orada kalmaması gösterilmektedir (3,46). Böbreklerden 5-10 dakikalık bir geçiş zamanı nükleasyon ve yeterince büyüme için yeterli olmamaktadır. Renal tübüllerin çeşitli segmentlerinin iç çapı 15 ile 60 μm arasında değişmektedir. Kalsiyum-okzalat

kristalleri 1-2 $\mu\text{m}/\text{dk}$ hızında büyümektedir; daha fazla büyüme gözlenemediği için taş oluşumuna yol açmadan idrarla atılım gerçekleşmektedir. Kristaller agregasyonu olmadığında böbrekler içinde kalmamakta ve hastalığa neden olmadan atılmaktadır. Bu kristalüri olarak tanımlanmaktadır. Sonuç olarak kristaller süpersaturasyon gerçekleşmeden oluşmamaktadır. Fakat süpersaturasyon sadece kristalizasyonu sağlayabilmektedir. Bu bulgu bazı olgulardaki yüksek süpersaturasyona bağlı olarak sadece kristalürinin olmasını ve taş oluşumunun olmamasını açıklamaktadır (3,4).

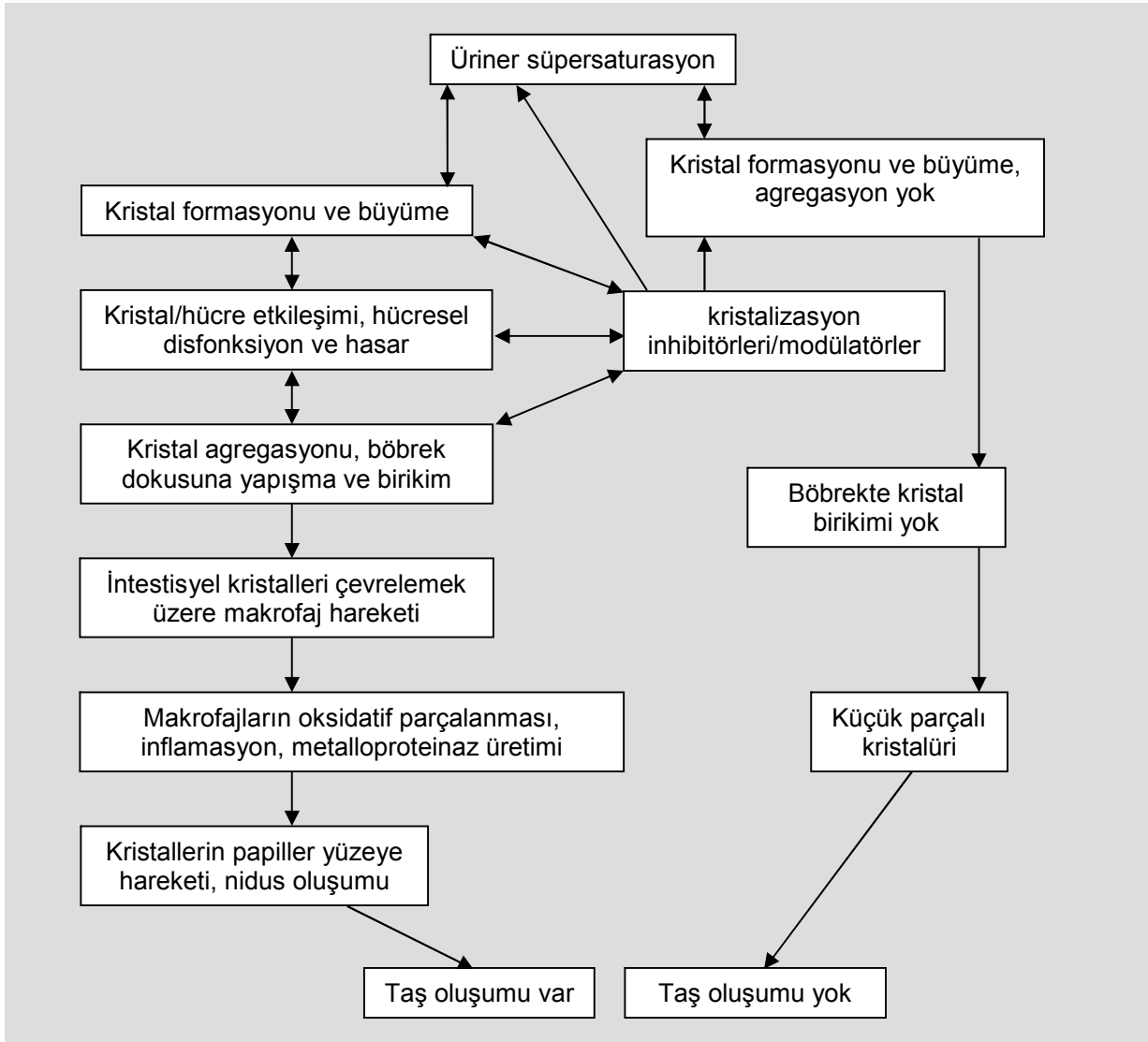
Taş oluşumundaki kristal formasyonu, kristal-hücre etkileşimi, hücresel disfonksiyon ve hücre hasarı için gereklidir. Böbrek hücrelerindeki yanıt aktif kristalizasyon inhibitörlerinin üretimini yol açan fizyolojik yanıt ya da kristal agregasyonu ile bağlanmasını sağlayan defektif inhibitörleri üreten patolojik yanıt şeklinde olabilir. Hücrelerdeki hasar hücrenin kristal çekirdeği ile bağlanmasına yol açmaktadır. İyonik ve makromoleküler kristalizasyon modülatörleri kalsiyum ile okzalatı bağlayarak süpersaturasyonu etkileyebilmektedir. Taş oluşumunda en kritik durum interstisyel kristal depozitlerinin inflamatuvar hücreler ve metalloproteinazların üretimi ile düzenlenen papiller yüzeye migrasyonudur. Papillar yüzeyde oluşan kristal depolarizasyonu plak oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Kristalizasyona karşı oluşan inflamatuvar yanıt nidus formasyonu için gereklidir (3,4,46) (Şekil-3).

İdiopatik kalsiyum okzalat taşlarının gelişiminin şematik sunumu şekil-2'de verilmiştir.

Şekil-2: İdiopatik kalsiyum okzalat taşlarının gelişiminin şematik sunumu (45)



Şekil-3: Taş oluşum mekanizması (3)



İdrar pH'sı kritik risk faktörlerinden biri olarak gösterilmektedir. Taş oluşumunu sağlayan bazı maddelerin çözünürlüğünü değiştirmektedir. Asidik idrar ürik asit ve sistinin çözünürlüğünü azaltmaktadır, alkali idrar ise struvit ile kalsiyum taşlarının oluşumundan sorumludur (5).

Taş oluşumunda bir diğer kolaylaştırıcı faktör de düşük idrar volümüdür. Yetersiz sıvı alımı ve buna bağlı dehidratasyon bunun aşikar nedenlerinden biri olarak gösterilirken, tekrarlayan ataklar taş oluşumu için risk oluşturmaktadır (47).

İdrarda hiperkalsiüri, hiperokzalüri, hiperürikozüri gibi belli risk faktörlerinden başka organik ve inorganik inhibitörlerde bulunmaktadır. Bunlar arasında magnezyum, sitrat, pirofosfat, glikozaminoglikanlar, Tamm-Horsfall proteini, β 2

mikroglobulin ve osteopontin (OPN) ve nefrokalsin sayılmaktadır (5). Üriner sitrat ve magnezyum atılımının azalması ürolitiazis oluşumuna neden olabilmektedir (12).

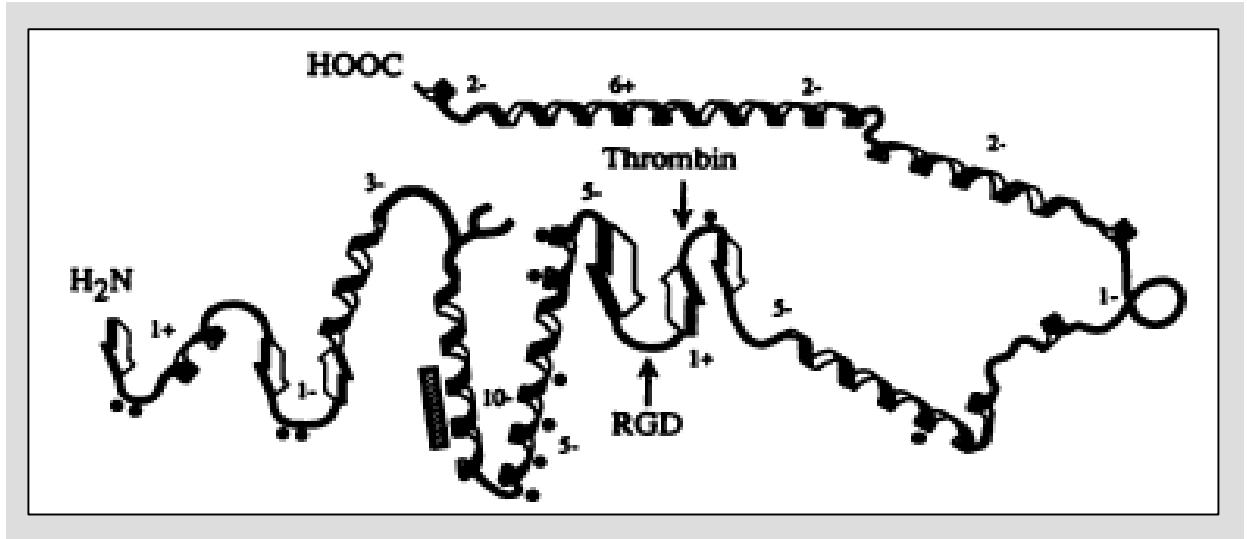
Ürolitiazis poligenik bir durumdur ve neden olabilecek genetik varyasyonlar araştırılmaktadır (2). Çözülebilir adenilat siklaz (sAC), vitamin D reseptör (VDR), kalsiyum bağlanma reseptörü (CaSR), sodyum fosfat kotransporter-2 (NPT-2), klorid kanal-5 (CLC-5), geçici reseptör potansiyel katyon kanalı V (TRPV 5) ve Claudin-16 genleri hiperkalsiüri ve idipatik nefrolitiazis ile ilişkilidir (4). Vitamin D metabolizmasını etkileyen vitamin D reseptöründe (VDR) Taq I polimorfizmi özellikle pediatrik ürolitiaziste görülebilmektedir. Bunun yanında interlökin 1'in (IL-1) kemik metabolizması ve hiperkalsiüri üzerindeki etkilerinin olması varyasyonel IL-1 reseptör antagonistlerinin de çocuklarda nefrolitiazis ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (2). Kalsiyum duyarlı reseptörler, nefrokalsin, osteopontin, üromodulin (Tamm-Horsfall protein), protrombin fragman 1, glukozaminoglikanlar, α 1 mikroglobulin, CD44, Calgranulin, osteonektin, fibronektin, matriks G1a protein ve bikunin gibi protein yapılarıdaki genetik değişiklikler ürolitiazis için risk oluşturmaktadır (4,48). Okzalit metabolizmasında görevli homolog alanin-gliokzalit amino transferaz (Agxt), Band3 anyon transport protein (Slc4a1) ve solut bağlantılı taşıyıcı 26 ailesi (Slc26) mutasyonları hiperokzalüri ve okzalit taşı oluşumu için risk oluşturmaktadır. Sodyum-sitrat kotransporter-1 (NaDc-1) gen polimorfizmi ise hipositratüri nedenidir. (4).

2.2.OSTEOPONTİN

Osteopontin (OPN) başta kemik olmak üzere makrofaj, endotelial hücreler, düz kas hücreleri ve epitelial hücreler gibi çeşitli hücre tiplerinde üretilen çok fonksiyonlu bir proteindir (49,50). 1986'da Oldberg ve ark. tarafından adlandırılmıştır. Kemik matriks, böbrek, gastrointestinal sistem epitel hücreleri, safra kesesi, pankreas, ürogenital sistem, akciğer, meme, tükürük bezleri, ter bezleri, iç kulak, beyin, plasenta, arterler, süt ve idrar gibi vücut sıvılarında bulunmaktadır (50). İmmünite ve inflamasyonda görevli bir sitokindir. Sitokin Eta-1 (early T-lenfosit activation 1) olarak da adlandırılmaktadır. Anne sütünde lactopontin, idrarda ise üropontin adı ile anılmaktadır (51,52). OPN, SPP-1 geni tarafından kodlanmaktadır. OPN geni insanlarda 4q21-25 kromozomunda, farelerde ise Ric geni olarak 5. kromozomda bulunmaktadır (52,53,54). OPN negatif yüklü, asidik hidrofilik, 44 kDa büyüklüğünde bir proteindir. 7 ekzon içermektedir. Yapısında 48 aspartik asid, 27 glutamik asid, 42

serin ve 14 treonin taşıdığı bildirilmektedir (55). Yaklaşık olarak 298-317 aminoasid rezidüsü içermektedir (50,53,55). OPN yapısı şekil-4'de görülmektedir (54). Molekül posttranslasyonel modifikasyona uğramakta fosforile ve glikozile olmaktadır. Arjinin-glisin-aspartik asid hücre bağlanma sırası, kalsiyum bağlanma yeri ve iki heparin bağlanma alanı bulunmaktadır. Hücreler OPN'i vitronektin reseptör içeren çoklu integrin reseptörleriyle bağlanmaktadır. OPN trombine bağlanarak fonksiyonel kemotaktik parçalar gibi yeni bağlanma alanları oluşturmaktadır (49,55,56,57). OPN etkisini integrin ve CD44 aileleri içeren reseptörler aracılığıyla gerçekleştirmektedir (49,50). CD44, OPN'in kemotaktik fonksiyonlarından sorumlu reseptördür (58).

Şekil-4: Osteopontinin yapısı (54)

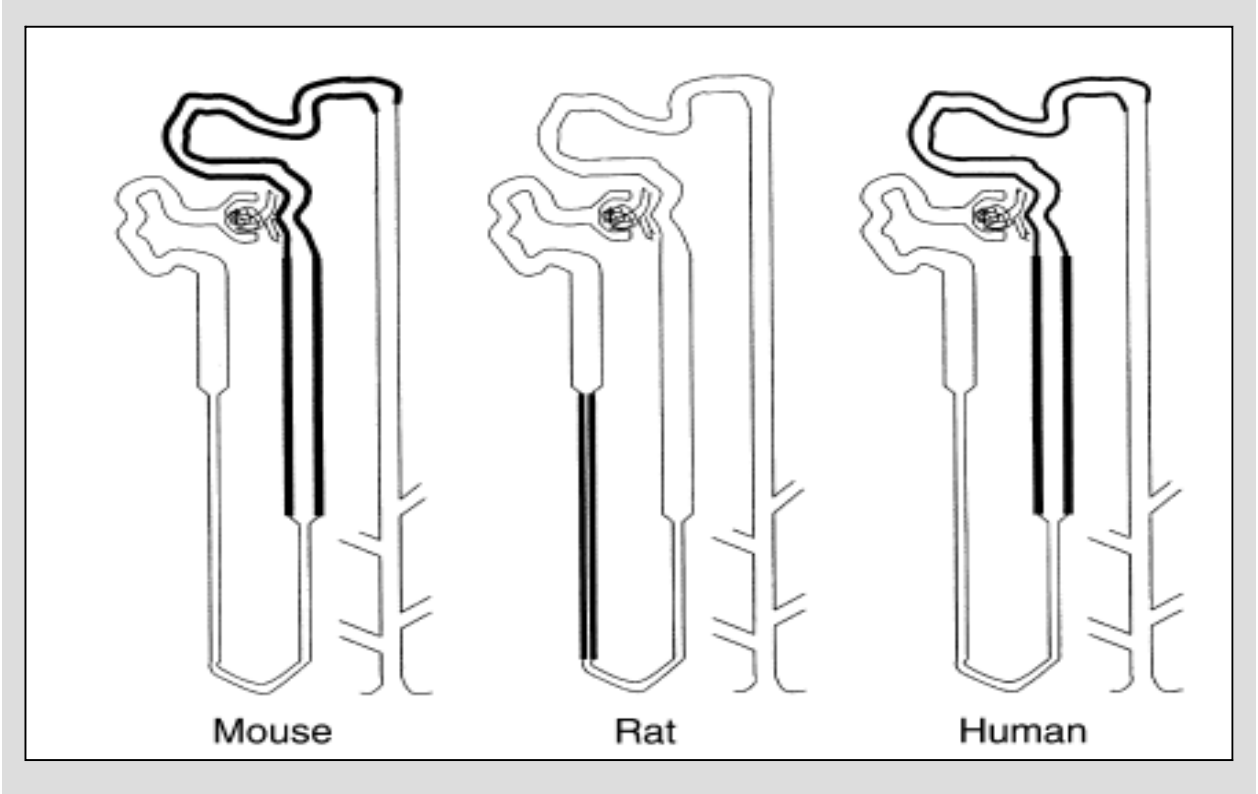


*Ok işareti ile gösterilen alanlar; Thrombin: Trombin bağlanma bölgesini, RGD: arjinin-glisin-aspartik asid bağlanma bölgesini göstermektedir.

OPN fare böbreğinde henle tübünün kalın çıkan kolu ve distal kıvrımlı tübülde, rat böbreğinde henle tübünün inen ince kolunda, insanda ise primer olarak distal nefronda, yoğun olarak henle tübünün kalın çıkan kolunda salınmaktadır (50) İnsan, fare ve rat böbreğinde OPN salınım alanları Şekil-5'de gösterilmiştir. OPN transkripsiyon ve ekspresyonu proinflamatuvar sitokinler, hasarlanma ve inflamasyon, fibrozis, mineralizasyon ve kemik, böbrek, kalp, damarlar gibi birçok doku ve hücrenin iyileşme faaliyetleri tarafından düzenlenmekte; büyüme faktörleri, sitokinler, parathormon, vitamin D₃, kalsiyum, fosfat ve ilaçlar gibi birçok faktör tarafından uyarılmaktadır (49,50). OPN ekspresyonunu uyarıcı sitokinler arasında anjiyotensin II, TNF α , trombosit derive büyüme faktörü (PDGF), epitelial büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktörü β (TGF β), interlökin 1 (IL-1), interlökin 2 (IL-2),

endotelin-1 ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) gibi mediyatörler bulunmaktadır (50,59). Dişi seks hormonları (östrojen, östradiol ve progesteron), alendronat, enalapril, ramipril, verapamil, valsartan, düşük tuz oranı gibi faktörler de OPN salınımını inhibe etmektedir (50).

Şekil-5: Fare, rat ve insan böbreğinde OPN salınımı (50)



***Siyah ile işaret bölgeler OPN salınımının yapıldığı alanları göstermektedir.**

İnsanlarda renal karsinomlar, esansiyel hipertansiyon, progresif idiopatik membranöz nefropati, kresentik glomerulonefrit, immunglobulin A nefropatisi, diffüz proliferatif lupus nefriti, minimal lezyon nefrotik sendromu ve renal allograftlarda OPN ekspresyonu bildirilmiştir (50). Farelerde yaratılan deneysel nefrit ve akut iskemik renal hasar, interstisyel inflamasyon ve fibrozis, hidronefroz, hipertansiyon ve akut tübüler nekroz tablolarında OPN mRNA ve OPN düzeyinin yükseldiği gözlenmiştir (50). Ateroskleroz, valvular stenoz, hipertrofik myokard infarktüsü ve kalp yetmezliği gibi kardiyovasküler hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir (51). OPN immün regülasyonda görevlidir. Multipl skleroz (MS), romatoid artrit ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi otoimmün hastalıklarda OPN ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Psöriazis

patogenezinde rol almaktadır. Literatürde hipertansiyon ve diyabet ile ilişkili olduğunu belirten yayınlar mevcuttur (52,58).

OPN glomerüler hastalıklarda rol oynamaktadır. Doku hasarında bölgeye makrofaj göçünde ve glomerulonefrite eşlik eden tübulointerstisyel hasar patogenezinde rol almaktadır. OPN'in deneysel böbrek hastalılarındaki rolü araştırılmaktadır. Anjiotensin ile oluşturulan tübulointerstisyel nefrit, ünilateral üretral obstrüksiyon, anti-Thy 1 glomerulonefriti (mezenjial proliferatif nefrit), puromisin nükleozid nefroz (fokal segmental skleroz), aşırı protein yüküne bağlı proteinüri, Heyman nefriti (membranöz nefropati) ve siklosporin nefropatisinde OPN ekspresyonu gösterilmiştir (59,60). Literatürde kresentik glomerulonefritlerde kresent çevresinde yerleşimli OPN aktivasyonunu bildiren yayınlar mevcuttur (61).

2.2.1.Osteopontinin Fonksiyonları

OPN fizyolojik ve patolojik mineralizasyonun düzenlenmesinde görev almaktadır. Kemik dokuda hem osteoblast hem de osteoklastlar tarafından salgılanmaktadır. Normal kemik oluşumunda osteoklast kaynaklı OPN hidroksiapatit oluşumunu inhibe etmektedir. OPN -/- farelerde normal kemik yapısının gözlenmesi OPN'in kemik rezorpsiyonundaki görevini işaret etmektedir. Bu fareler overektomi sonrası kemik kaybına karşı korunmaktadır. Parathormona bağlı olan kemik rezorpsiyonu OPN bağımlı olarak gerçekleşmektedir (49,62).

OPN ektopik kalsifikasyonu inhibe etmektedir. Dejeneratif ve distrofik kalsifikasyon alanlarında, aortik, koroner ve karotik aterosklerotik plaklarda artmış OPN ekspresyonu gözlenmiştir. İn vitro modellerde düz kas hücre kalsifikasyonunda OPN'in engelleyici etkileri gösterilmektedir. OPN bu kalsifikasyonlarda koruyucu ve sınırlayıcı görev üstlenmektedir (49,53,62,63).

OPN kalsiyum taş matriksinde yer alan en önemli komponentlerden biridir ve özellikle distal tübülde taş hastaları ve deneysel modellerde salınımının uyarıldığı gösterilmektedir (50). OPN, özellikle kalsiyum okzalat olmak üzere böbrek taşı oluşumuna karşı üriner sistemin korunmasında görevlidir. Suyun doğal bileşiminden dolayı normal idrar da kristaller içermekte ve süpersatüre olmaktadır. Fizyolojik mekanizmalar kalsiyum tuzlarının kristalizasyonunu inhibe etmektedir. OPN kalsiyum okzalat kristallerinin nükleasyon, büyüme ve agregasyonunu inhibe ettiği gibi direkt

olarak kalsiyum okzalit kristallerinin böbrek epitel hücrelerine bağlanmasını da inhibe etmektedir. OPN kalsiyum okzalit kristalizasyonunu kalsiyum okzalit monohidrat fazı yerine renal tübül epitel hücrelerine tutunması daha az olan kalsiyum okzalit dihidrat fazına çevirmektedir (49). Osteopontinin taş oluşum mekanizmasındaki etkileri Şekil-7 'de görülmektedir.

OPN akut ve kronik inflamasyonda rol oynamaktadır. Epitel, düz kas hücreleri makrofaj ve T hücreleri tarafından eksprese edilmektedir. Makrofaj ve T hücrelerin inflamasyon alanlarında toplanmasında, T hücre proliferasyonunda görevlidir (49). Glomerülonefritli farelere anti-OPN antikollarının verilmesi ile T hücre aktivitesi ve gecikmiş aşırı duyarlılık yanıtının inhibe olduğu gözlenmiştir. Hayvan modellerinde glomerülonefrit, hipertansif glomerüloskleroz ve siklosporin nefropatisi, insanda kresentik glomerülonefrit gibi akut ve kronik renal hasar durumlarında OPN ekspresyonunun makrofaj infiltrasyonu ile korele olduğu gösterilmiştir. Renal hastalıklarda OPN'in önemli bir rolü de akut glomerülonefritli fare modellerinde anti-OPN antikollarını bloke etmesidir. Glomerüller ve tübül makrofaj infiltrasyonu ve akümüülasyonu azalmaktadır (49). OPN hasarlanmış karaciğerde kupffer hücreleri ve stellat hücreleri tarafından salgılanmakta ve nekrotik alanlara makrofaj migrasyonunu sağlamaktadır. Mochida ve ark. tarafından 443. pozisyonda tek gen polimorfizmi kronik hepatit C hastalarında hepatit aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur (64).

OPN'in tuberkuloz, sarkoidoz ve silikoz gibi granülomatöz lezyonlarda eksprese olduğu bildirilmektedir. Bu hastalıklarda granülom formasyonu ile ilişkilidir. Mikobakteriyal enfeksiyonlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır. T hücreli immün cevaba katkıda bulunmakta, Th1 sitokin ekspresyonunu uyarırken, Th2 sitokin ekspresyonunu inhibe etmektedir. OPN -/- farelerde Herpes simplex virusu ve *Listeria monocytogenes* gibi enfeksiyonlara karşı defektif Th1 cevabı mevcuttur. Bu defektif cevap interleükin-12 ve interferon-g'nin makrofajda üretimini azaltması ve interleükin-10 (IL-10) üretimini artırması ile ilişkilidir (49,52).

Artmış OPN düzeyi, OPN'in B hücrelerinde poliklonal aktivasyona ve dolayısıyla immünglobulin üretimine neden olarak otoimmünite patogenezinde rol alması ile otoimmün hastalık modellerinde beklenen bir durumdur (49). Forton ve ark. tarafından OPN'in SLE'de böbrek hastalığı patogenezinde rol aldığı ve hipergamaglobulinemiden sorumlu olduğu bildirilmiştir (58). Niino ve ark. ise yaptıkları çalışmada OPN'in otoimmün bir hastalık olan Multipl Skleroz (MS)

patogenezinde önemli rol oynadığını bildirmiştir. 6. exonda 8090. pozisyondaki C/C polimorfizmi MS ile ilişkili olarak bulunmuştur (65).

OPN, hücreleri apoptozise karşı korumaktadır. Nitrik oksid (NO), doku hasarı ile ilişkili bir mediatördür. OPN, iNOS ekspresyonunu makrofaj ve renal tübüler epitel hücrelerde inhibe etmekte ve çevre dokularda faydalı etkiler yaratmaktadır.(49,50,62)

OPN, doku onarımı ve hücreyel yenilenme için önemlidir (49). İskemik dokularda OPN ekspresyonunun arttığı gösterilmektedir. Meller ve Doyle tarafından ekzojen OPN verilmesinin beyin dokusunu iskemik hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (66). OPN'in ayrıca mikrogliya ve makrofajları aktive ederek nöroblastların lateral migrasyonunda rol oynadığı bildirilmektedir (66). Artmış OPN'in iskemik beyinde postiskemik gliosis gelişiminde rol oynadığı bildirilmekte ve bunun sonucu olarak da endojen OPN'in serebral iskemi sonrası doku remodelinginin sağlanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (66). OPN, vasküler düz kas hücreleri ve glomerüler mezenjial hücrelerde hipoksinin sebep olduğu proliferasyon ile ilişkilidir (49). Farelerde iskemi ile oluşturulan akut böbrek yetmezliğinde görevli bir mediatör olan endotelin-1 etkisi ile OPN mRNA düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir (67). İnsan tübüler epitel hücrelerinin OPN ekspresyon kapasitesi böbreğin yaşı ile azalmaktadır. Bu yaşlanmış böbreğin iskemi-reperfüzyon hasarına artmış hassasiyeti ile açıklanmıştır (49,54).

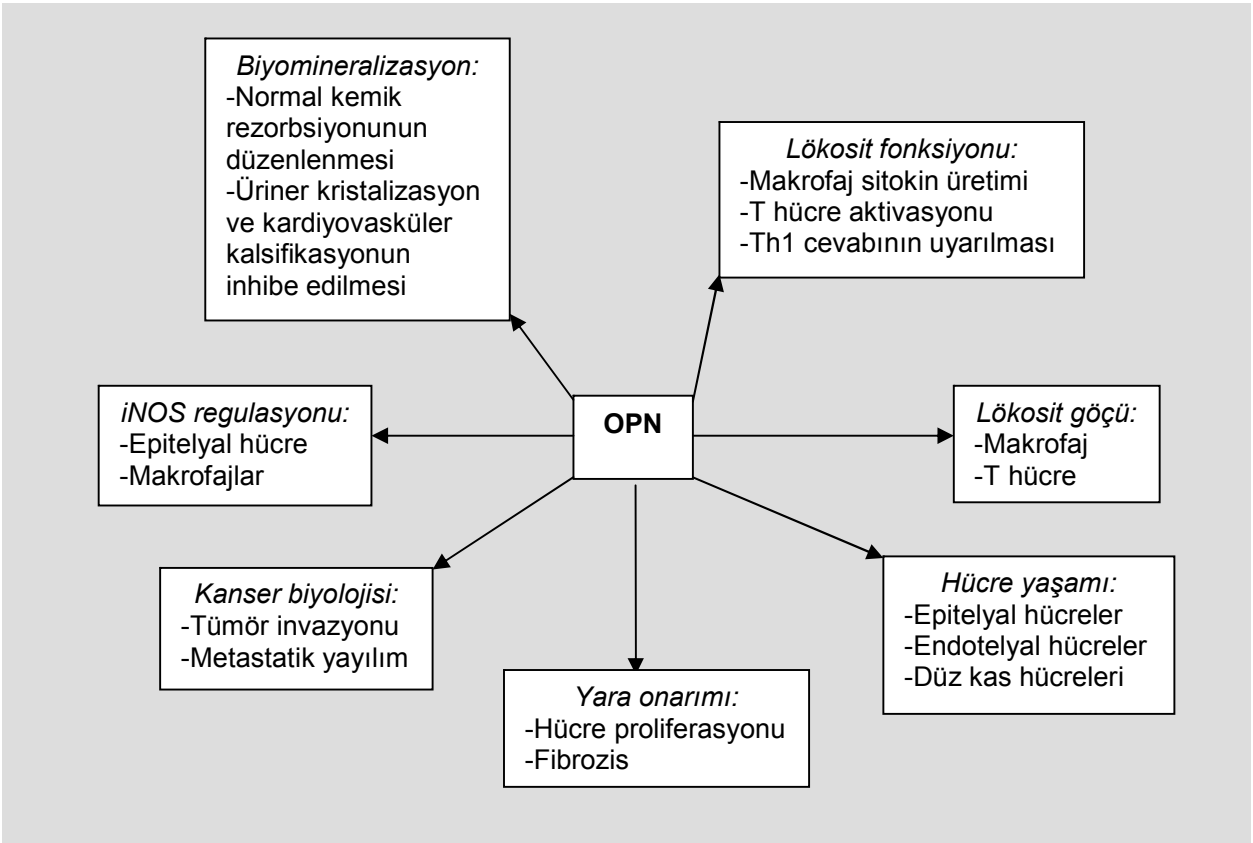
OPN, doku skarlanması ve fibrozis ile ilişkilidir. OPN ve doku fibrozisi ilişkisi eşlik eden makrofaj infiltrasyonu ve TGF β üretiminden kaynaklanmaktadır (49). Deneysel hidronefroz oluşturulan farelerde renal kortikal OPN ekspresyonunda artış gözlenmiştir (68). Giachelli ve ark. tarafından anjiotensin infüzyonu sonrasında böbrek distal kortikal tübüleri ve Bowman kapsülünde artmış fokal OPN mRNA ve protein ekspresyonu saptanmıştır (68). Tübülointerstisyel hasarda hasar derecesi ile orantılı olarak monosit ve makrofaj infiltrasyonu ve OPN ekspresyonu bildirilmektedir. Dolayısı ile OPN tübüler hasarda bir gösterge; monosit ve makrofaj toplanmasında kemotaktik ve adeziv faktör olarak rol almaktadır (69).

OPN tümör hücre biyolojisi için önemlidir. OPN malign transformasyona uğrayan epitelial ve fibroblastik hücrelerden izole edilmiştir. (49,50) Tümör genetiği, tümör invazyonu ve metastaz açısından prognostik faktör olarak kabul edilmektedir. Tümör belirteci olarak kabul görmektedir. OPN yapısında bulunan CD44 reseptörü ile ekstrasellüler matrikste hyaluronata bağlanarak migrasyonun uyarılması ile tümör hücrelerinde metastatik potansiyeli artırmaktadır. Bu genin ekspresyonu meme,

akciğer, prostat, kolon, over, servikal ve mide kanserlerinde artış gösterir (70,71,72,73). OPN'in vasküler düz kas, malign astrositom, myelom ve melanom hücrelerinde migrasyonu uyardığı bildirilirken (66), Mandelin ve ark. tarafından artmış OPN düzeyinin meme, prostat, karaciğer, baş ve boyun tümörlerinde artmış metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (74).

OPN'nin temel fonksiyonları şekil-6'da gösterilmiştir.

Şekil-6: OPN'in fonksiyonları (49)



2.2.2.Deneysel Renal Hasar Modellerinde Osteopontin

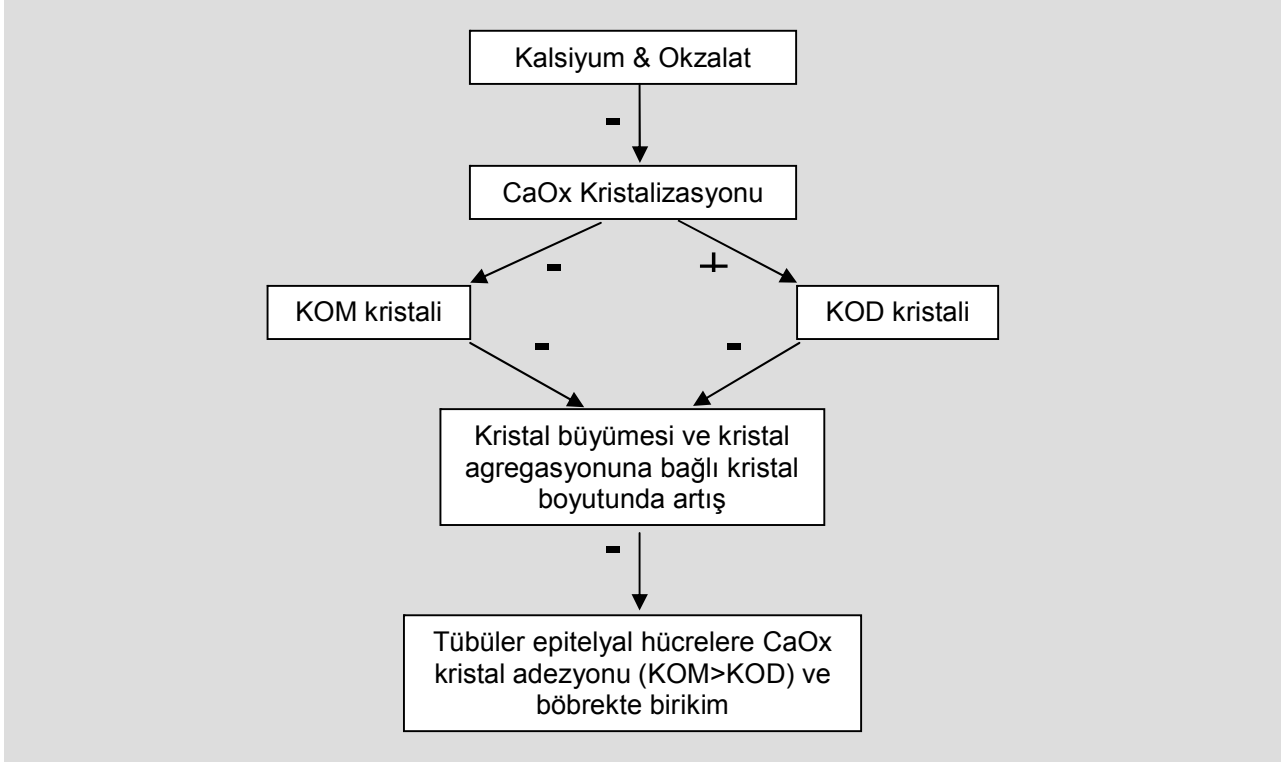
Kalsiyum okzalat taşlarının protein yapısı analiz edildiğinde Kohri ve arkadaşları tarafından taş yapısında OPN varlığı gösterilmiştir (75). Gliksilik asid uygulanarak taş oluşumu uyarılan ratlarda (76), anjiotensin II ile oluşturulan tübülointerstisyel nefritte (77), puromisin nefriti (59), aminonükleozid nefrozu (minimal lezyon hastalığı/fokal segmental glomerüloskleroz), anti-Thy-1 nefriti (mezenjial proliferatif nefrit) (69) ve Heymann nefriti (membranöz nefropati) (69) gibi

glomerülonefrit modellerinde, akut iskemik renal hasar modelinde ve özellikle rejenerasyon döneminde (67,78), hayvan kaynaklı albumin ile oluşturulan interstisyel inflamasyon ve fibrozis modelinde (50), deneysel hidronefroz durumunda (68), kronik siklosporin nefropatisinde (79), diyet ile hiperkolesterolemi yaratılarak oluşturulan interstisyel inflamasyon ve fibrozis modelinde (50), anti-glomerüler bazal membran glomerülonefriti ve buna bağlı kresent oluşumunda (80), deneysel nefrektomi sonrası kalıntı böbrek dokusunda (50,81), streptozosin uyarısı ile oluşturulan diyabet ve buna bağlı diyabetik nefropatide (82), otoimmün lupus nefritinde (50), fenilefrin infüzyonu ile oluşturulan hipertansiyon modelinde (83) ve gentamisin ile uyarılan akut tübüler nekroz modelinde (50) artmış OPN salınımı mRNA ve/veya protein düzeyinde tespit edilmiştir. Çoğu modelde OPN salınımının renal hasara bağlı olarak dokuda makrofaj infiltrasyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (50).

2.2.3.İnsan Böbrek Hastalıklarında Osteopontin

Çeşitli deneysel kanser modellerinde dokudan OPN salınmaktadır. İnsan böbrek karsinomlarında da tümör hücre ve makrofajların OPN salınımı yaptığı gösterilmiştir (50). Makrofajlarda OPN mRNA varlığı tümör kenarında ve tümör nekroz alanlarında olduğundan bahsedilmektedir. Makrofajların OPN'in GRGDS hücre bağlanma noktasıyla tümör hücrelerine bağlanarak salınım yaptığı gösterilmiştir (50). Esansiyel hipertansiyona bağlı arterioskleroz gelişen hastaların renal biyopsilerinde fibroblastlarca salınan α düz kas aktin ve artmış tip 4 kollajen birikimi ile ilişkili olarak OPN mRNA ve protein artmış olduğu gösterilmiştir (50,84). Progresif idiopatik membranöz nefropatili insanlarda tübüler epitelyal hücrelerde T hücre uyarıcı kemokin ve OPN salınımı gözlenmiştir (60). Kresentik glomerülonefritte, makrofaj, pariyetal epitel hücreleri, CD3 pozitif T hücreler ve α düz kas aktin pozitif myofibroblastların OPN protein ve mRNA salınımı yaptığı gösterilmiştir (61). IgA nefropatili ve diffüz proliferatif lupus nefritli hastalarda interstisyel mononükleer hücre, özellikle CD68(+) monosit infiltrasyonu ile paralel olarak OPN salınımı bildirilmiştir. Bununla birlikte myeloperoksidaz-antinötrofil sitoplazmik otoantikor ilişkili mikroskobik polianjitiste tübüler epitel hücrelerde ciddi monosit infiltrasyonuna rağmen OPN artışı gözlenmemiş ve bu durum hastalarda böbrek hastalıklarında OPN salınımının interstisyel monosit infiltrasyonu ve tübülointerstisyel değişiklikler ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (50,85).

Şekil-7: Osteopontinin taş oluşum mekanizmasındaki etkileri (49)



*KOM: kalsiyum okzalate monohidrat; KOD: kalsiyum okzalate dihidrat; (-): inhibe edici etki; (+): uyarıcı etki

2.2.4. Osteopontin Nefrolitiazis İlişkisi

Taş oluşumu bazı maddeler tarafından kristal-kristal ve kristal-hücre etkileşimi inhibe edilerek önlenmektedir (6). Normal idrar fizyolojik inhibitör mekanizmaların olmaması halinde süpersature olarak kristalleşme eğilimindedir (49). Magnezyum, pirofosfat ve sitrat gibi küçük moleküller inhibitör olarak gösterilmesine rağmen kalsiyum okzalate kristalizasyonunun inhibisyonunda en büyük destek idrar protein içeriği tarafından sağlanmaktadır. İdrar proteinlerinden nefrokalsin, kristal matriks protein, bikunin, Tamm-Horsfall protein ve OPN'nin inhibitör etkileri gösterilmiştir (6,49,62). Proteinler kalsiyum okzalate kristalizasyonunda farklı aşamalarda etkilidir. Tamm-Horsfall proteini sadece agregasyonu inhibe ederken, nefrokalsin ve OPN agregasyon, büyüme ve nükleasyon fazlarını inhibe etmektedir. Tamm-Horsfall proteininin agregasyon inhibisyonu, yüksek protein konsantrasyonu, düşük pH ve yüksek sodyumun yol açtığı proteinin kendi kendine agregasyonuna bağlı olarak

azalabilmektedir (10). Üriner sistem taşları analiz edildiğinde ağırlıklarının %1-5'inin protein yapılardan oluştuğu gözlenmekte ve çeşitli yayınlarda proteinlerin taş oluşumundaki önemi vurgulanmaktadır. Özellikle OPN ve kalprotektinin kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfat taşlarında taş matriksinde yer aldığı gözlenmiştir (6,56,57). Bunun yanında kalsiyum okzalat taşlarının albumin, globulin, Tamm-Horsfall protein, nefrokalsin, α 1-mikroglobulin, hemoglobin, nötrofil elastaz, transferin, inter- α -tripsin inhibitör (bikunin), kristal matriks protein (üriner protrombin F1), α 1-antitripsin, litostatin, CD59 protein (protektin), süperoksid dismutaz, kalprotektin, β 2-mikroglobulin, α 1-asid glikoprotein, apolipoprotein A1, retinol bağlayıcı protein gibi makromolekülleri de içerebildiği bildirilmektedir (86).

Ürolitiazisli hastalar ve taş oluşturulan hayvan modellerinde, böbrek distal tübül hücrelerinde şiddetli OPN mRNA ekspresyonu bildirilmiştir. İn vitro olarak ise OPN'in kalsiyum okzalat kristal formasyonunda nükleasyon ve büyümeyi ayrıca kalsiyum okzalat kristallerinin böbrek epitelyum hücrelerine bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (6,62,87). OPN kalsiyum okzalat kristalizasyonunu kalsiyum okzalat monohidrat fazı yerine renal tübüler epitelyum hücrelerine tutunması daha az olan kalsiyum okzalat dihidrat fazına çevirmektedir (49,62).

Yapılan çalışmalarda etilen glikol ile hiperokzalüri yaratılan farelerde distal nefronda OPN ekspresyonunun ciddi biçimde artmış olduğu gözlenirken, OPN -/- farelerde okzalat seviyesinin en yüksek düzeyde olduğu distal nefron ve toplayıcı sistemde taş oluşumu gözlenmiş ancak normal fareler etkilenmemiştir (6,62). Jiang ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda taş oluşturulan fare modellerinde böbrek distal ve toplayıcı tübüler epitel hücrelerinde OPN mRNA ve protein düzeyinde normal farelere göre belirgin artış gözlenmiştir (87). İdrar OPN düzeylerine bakıldığında ürolitiazisli hastalarda OPN düzeyinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu iki mekanizma ile açıklanmıştır; kalsiyum okzalat kristallerinin nükleasyon, büyüme ve agregasyon aşamalarında inhibitör etkili olan OPN'in düşük düzeyde olmasının taş oluşumunda artışa neden olduğu veya OPN sentezinin devam ettiği ancak taş yapısının içinde yer alması nedeniyle idrarla atılan miktarın azaldığı düşünülmüştür. Taş oluşturulan hayvan modellerinde OPN'in renal dokularda artmış ekspresyonunun gösterilmiş olması ve OPN'in hidroksiapatite kuvvetli bağlandığının bilinmesi nedeniyle ikinci mekanizma daha çok kabul görmüştür (6). Yasui ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada deneysel böbrek taşı

oluşturulan farelerde sitratın kalsiyum depozisyonu ve bunun sonucu olarak OPN ekspresyonunu önlediği gözlenmiştir (88).

OPN sağlıklı insanlarda, normal olan böbrekte mevcuttur ancak ürolitiazisli hastalarda miktar ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Normal ve ürolitiazisli hastalarda OPN geni yapısındaki farklılıklar araştırılmıştır. Sinonim olarak tanımlanan Ala-250 GCC>GCT nukleotid değişimi sonucu proteinde yapısal farklılık saptanmazken, Ala-250 kalıtımının ürolitiazisli hastalarda kolaylaştırıcı kalıtımsal faktörler arasında tanısal metod olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (7). Gao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada OPN geninde araştırılan polimorfizmlerde taş oluşum için yüksek ve düşük risk taşıyan birer haplotip gösterilirken (8), başka bir çalışmada ise OPN geninde 9,402 pozisyonunda görülen polimorfizmin üriner kalsiyum taşları ile ilişkili olduğu bildirilmiş ve bu polimorfizm kalsiyum taşlarında genetik riski gösteren belirteç olarak gösterilmiştir (11).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmaya Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Nefroloji Bilim Dalında nefrolitiazis tanısıyla takip edilen, 4-210 ay yaş aralığında, 37'si erkek, 27'si kız 65 hasta dahil edildi. Bu hastaların cinsiyet, tanı yaşı (ay), takip süresi (ay), ebeveynler arasında akrabalık durumu, ailede nefrolitiazis öyküsü gibi demografik özellikleri incelendi. Hastalara ait radyolojik bulgular; üriner sistem ultrasonu ile gösterilmiş taş lokalizasyonu, bilateral ve multipl taş varlığı tespit edildi. Üriner metabolik risk faktörlerini belirlemek amacıyla hastalardan 24 saatlik veya spot idrar örnekleri alınarak kalsiyum, okzalat, sitrat, ürik asid, sistin, magnezyum ve kreatinin atılımları tespit edildi. Taşı, cerrahi tedavi veya taş düşürme yoluyla elde edilen hastaların taş örnekleri Türkiye Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğüne gönderilerek analiz sonuçları elde edildi. Hastaların demografik, radyolojik ve metabolik sonuçları, taş analizi ve takip süresi içindeki rekürrens durumları önceden hazırlanmış olan hasta takip formlarına kaydedildi. Hastaların idrar sonuçları Tablo-1 'de verilen çocuklarda 24 saatlik ve spot idrarda normal ekskresyon oranları ile karşılaştırılarak üriner metabolik risk faktörleri belirlendi. Hastalardan poliklinik kontrolleri sırasında osteopontin gen polimorfizminin araştırılması amacıyla EDTA'lı tüpe (hemogram tüpü) 2cc periferik kan örneği alındı.

Kontrol grubu için üriner sistem ultrasonunda taş veya taşa zemin hazırlayabilecek üriner sistem anomalisi saptanmayan, ailesinde ürolitiazis öyküsü olmayan, hasta grubu ile benzer yaş ve cinsiyette 50 çocuk seçildi. Bu çocuklardan da osteopontin gen polimorfizminin araştırılması amacıyla EDTA'lı tüpe (hemogram tüpü) 2cc periferik kan örneği alındı.

Genetik analizlerin yapılabilmesi için çalışma amaç ve yöntemi ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiş ve çalışmaya katılmayı kabul etmiş hasta ve kontrol grubu üyelerinin ebeveynlerine hasta onay formu imzalatılarak onay alındı.

Araştırmanın yapılabilmesi için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Etik Kurul Başkanlığı'ndan etik kurul onayı alındı.

3.1.OPN-SPP1 Gen DNA Dizi Analizi Yöntemi

OPN-SPP1 geninde (4q22.1) mutasyon taramasının yapılması için sağlıklı bireylerden ve hastalardan EDTA'lı tüpe (Hemogram tüpü) 2 cc olarak alınan periferik

kandan her defasında 200 µl alınarak genomik DNA elde edildi. Bu amaçla tuzsuz DNA ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için QIAGEN (QIAGEN, Ontario Kanada) Mini Blood DNA izolasyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemleri kit prospektüsüne göre yapıldı.

Elde edilen genomik DNA, 280 nm dalga boyunda NanoDrop spektrofotometrede ölçülerek kantitasyonu yapıldı ve DNA 50 ng/ µl olarak 200 µl volümde çözüldü. Daha sonra bu DNA molekülünün kalitasyonu yapıldı. Bu amaçla 2 µl (100ng) DNA molekülü % 1 lik Agaroz (Sigma) jelde elektroforeze tabii tutuldu. Moleküler Biyolojide kullanılan Agarozdan 1 gr tartılarak 100 µl 1XTBE (10XTBE; Sigma, Blue View Nucleic Acid Stain) tamponunda magnetik karıştırıcıda boncuklar kullanılarak karıştırıldı. Bu karışım Mikrodalga fırınında eritildi. Magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırılıp 60°C kadar soğutularak üzerine 10 µg/ml konsantrasyonlu Etidyum Bromür (Sigma) solüsyonundan 7 µl ilave edildi ve karıştırıldı. Bu agaroz solüsyonu önceden hazırlanmış elektroforez tankının (Owl, Heidelberg, Germany) taraklar yerleştirilmiş kamerasına döküldü ve sertleşinceye kadar bekletildi. Üzerine 1XTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı ve 2 µl DNA-1 µl 1X6 yükleme solüsyonu ve 3 µl su ile karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez EC (EC Apparatus Corporation, <500mA) güç kaynağı 100 mV, 80mA koşullarında kullanılarak 30-40 dakika arasında uygulandı.

Jeldeki DNA dijital DNA görüntüleme sisteminde (SynGene) ultraviyole (UV) transluminatöründe görüntülendi ve baz çift sayısı bilinen standart olarak kullanılan DNA markerı (Hae III, Fermentas) ile karşılaştırıldı.

Kontrol edilen bu DNA'dan OPN geninin tüm protein kodlayan ekzonlarının amplifikasyonu için PCR reaksiyonları yapıldı.

3.2.PCR İşlemleri

SPP1 genin protein kodlayan 5 ekzonu için ExonPrimer programı kullanılarak intron-exon bağlanma bölge primerleri seçildi ve Invitrogen (Carlsbad, UK) firmasında sentezlendi. 5 ekzon için sentezlenen primerler 100 µM olarak çözüldü ve çalışma solüsyonları 5 pMol olarak hazırlandı.

Bu sentetik oligonukleotid primerleri ve AmpliTaq Gold PCR kiti (Applied Biosystems) kullanılarak Gradientli Thermal Cycler (Bioneer) makineleri kullanılarak

her beş sekans bölgesi için PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilerek ve pozitif PCR örneklerinden saflaştırma yapıldı.

PCR saflaştırma işlemleri Millipore Genomics Sentricon PCR purifikasyon kolonları (Millipore) kullanılarak yapıldı. Her sekans bölgesinin ürünleri için ayrı kolan kullanıldı. Purifikasyon işlemleri 14000rpm'li soğuk santrüfuj (Eppendorff) kullanılarak yapıldı. Elde edilen saflaştırılmış PCR ürünü tekrar %2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. Saf PCR ürünlerinden aynı primerleri ayrılıkta (önce ileri, sonra geri primerleri) kullanarak Cycle-Sequencing PCR yapıldı.

Cycle Sequencing PCR BigDye Terminator v.3.1 kiti kullanılarak ve her sekans bölgesine uygun ya reverse ya da forward primer kullanılarak kit prospektüsünde yazılan protokole göre yapıldı (Tablo-2). Cycle Sequencing PCR GeneAmp 9700 Termal Cycler cihazında yapıldı. Elde edilen Cycle Sequencing PCR ürünleri BigDye XT kiti kullanarak 15 dakika shaker'da sallanarak inkübasyon sonrası fazla boya ürünlerinden saflaştırıldı. Bu saf ürünler DNA dizi analizleri için ABI 3130XL Otomatik Jel Kapiller Analizatör sistemine yüklendi. Elde edilen 903 adet cDNA olmakla toplam 1870 baz çift dizileri aynı sistemin kendi SeqScape2.0 programı kullanılarak FASTA elektronik kütüphaneden elde edilen normal SPP1 gen dizisi (*NM_000582*) ile karşılaştırıldı ve var olan nukleotid yerdeğişimleri ve uygun 301 adet aminoasitten oluşan referans dizisi (*NP_000573*) kullanılarak polimorfizimler veya mutasyonlar kayıt edildi. Nukleotid yer değişimleri veya uygun aminoasit mutasyonları (sinonim ve missense mutasyonlar) HGVS sınıflamasına göre yapıldı ve nukleotid sayıları cDNA sayısına göre yapıldı.

Tablo-2: OPN geni primer listesi

SIF259-1F-5'- AATTCTGGGAGGGCTTGGTTGTCA
SIF259-1R-5'- AGACACCTTTGTTCCAGGAGACCT
SIF259-2F-5'- TTTGTGATCATTTTGTAAATGTGG
SIF259-2R-5'- TACGTTTCTTGACACCTCTCG
SIF259-3F-5'- TTTTCCATTCATCCCTACATTTTC
SIF259-3R-5'- ATGGCCTGAGTGTGGCTATC
SIF259-4F-5'- CTAATGTGCTATAAAGGCTAAGGG
SIF259-4R-5'- TGCAAACCTGTGGTTTCCTAGAC
SIF259-5F-5'- CCATATTCCCATCCCTAGCC
SIF259-5R-5'- CAGACTCAAATAGATACACATTCAACC
SIF259-6F-5'- TGTGGCTTCATGGAAACTCCCTGT
SIF259-6R-5'- AATTGCTGGACAACCGTGGGAAA

3.3.Üriner Metabolik Risk Faktörlerinin Çalışılma Yöntemi

Hastalardan yaşı itibariyle idrar kontinansına sahip olanlardan 24 saat boyunca toplanmış idrar, olmayanlardan ise sabah ikinci idrar örneği alınarak idrar kalsiyum, okzalit, sitrat, ürik asit, sistin, magnezyum ve kreatinin düzeyleri aşağıda belirtilen yöntem, cihaz ve kitler kullanılarak analiz edildi.

Kalsiyum: O-kresolfitaleinli Schwarzenbach yöntemiyle, Cobas integra 800 Analyzer cihazında analiz edildi. (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim kit)

Oksalat: Spektrofotometrik, enzimatik yöntemle, Cobas Mira Plus cihazında analiz edildi.(Trinity Biotech plc,Wicklow, Ireland kit)

Sitrat: Spektrofotometrik, enzimatik yöntemle Cobas Mira Plus cihazında analiz edildi. (R-Biopharm AG Landwehrstr 54, D-64293 Darmstadt kit)

Ürik Asit: Cobas Integra 800 Analyser cihazında analiz edildi.(Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim kit)

Sistin: HPLC yöntemiyle Agilent 1100 cihazında çalışıldı.

Magnezyum: Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi yöntemiyle Perkin Emler cihazında analiz edildi.

Kreatinin: Deproteinizasyon yapılmadan, Jaffe reaksiyonu ile ölçüm yapan Cobas Integra 800 Analyser cihazında analiz edildi.(Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim kit)

3.4.İstatistiksel Analiz

Genotip ve allel sıklıkları ile nefrolitiazis arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde olasılık oranları (OR), %95 güven aralığı (CI) ile birlikte hesaplanmıştır. Ki kare ve Fisher'ın gerçeklik testleri demografik verilerin kontrol ve çalışma grupları arasında karşılaştırılmasında kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak tanımlanmıştır. Saptanan her iki polimorfizm için Hardy-Weinberg eşitlik testi uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS Windows 11.0 programı kullanılarak elde edilmiştir.

4.BULGULAR

Araştırmaya dahil edilen 65 hastanın 37'si (%56.9) erkek, 27'si (%43.1) kız, erkek/kız oranı 1.37, yaş ortalamaları 84.8 ay (4-210 ay) idi. Hastaların tanı yaşı ortalaması 67.2 ay (3-210 ay) iken 21 (%32.3) hasta 1 yaş altında tanı almıştı. Hastaların ortalama takip süresi 13 ay (1-45 ay) idi. 17 (%26.2) hastada ebeveynler arasında akrabalık saptandı. 46 (%70.8) hastada ailede taş öyküsü mevcuttu. Ailede taş öyküsü olanların cinsiyet dağılımına bakıldığında, erkeklerde daha sık olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.3$). 1 yaşın altında tanı almış 21 hastanın 17'sinde (%80.9) ailede taş öyküsü saptandı. Ailede taş öyküsü olanların olmayanlara göre daha sık olarak 1 yaşın altında tanı aldığı gözlemlendi ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.2$). Bu grupta da cinsiyetler arasında anlamlı farklılık saptanmadı. 1 yaş altında tanı alan 21 hastanın 5'inde (%23.8) ebeveynler arasında akrabalık tespit edildi ($p=0.6$).

Tablo-3: Hastaların demografik özellikleri

	n (%)
Hasta	65
Erkek	37 (56.9)
Kız	28 (43.1)
Erkek:Kız	1.32
Ortalama yaş (yaş aralığı) (ay)	84.8 ay (4-210 ay)
Ortalama tanı yaşı (tanı yaşı aralığı) (ay)	67.2 ay (3-210 ay)
Ortalama takip süresi (takip süresi aralığı) (ay)	13 ay (1-45 ay)
1 yaş altında tanı alan hasta	21 (32.3)
Ailede taş öyküsü	46 (70.8)
Ebeveynler arasında akrabalık	17 (26.2)
Bilateral taş	15 (23)
Multipl taş	29 (44)
Rekürrens	4 (6.1)

Araştırmamızda 15 (%23) hastada bilateral taş saptanırken, 29 (%44) hastada multipl taş saptandı. Hastalarda saptanan üriner metabolik risk faktörlerine bakıldığında; 15 (%23.1) hastada hiperkalsiüri, 14 (%21.5) hastada hiperokzalüri, 23 (%35.4) hastada hipositratüri, 16 (%24.6) hastada hiperürükozüri, 9 (%13.8) hastada sistinüri, 10 (%15.4) hastada hipomagnezüri saptanırken, 8 (%12.3) hastada hiçbir üriner risk faktörü saptanmadı. Bu takip süresi içinde 4 (%6) hastada taş rekürrensi gözlemlendi. 8 hastaya taş analizi yapıldı. Taş analizi yapılan tüm hastalarda kalsiyum taşı saptandı. Hastaların demografik, klinik ve radyolojik özellikleri Tablo-3'de verilmiştir.

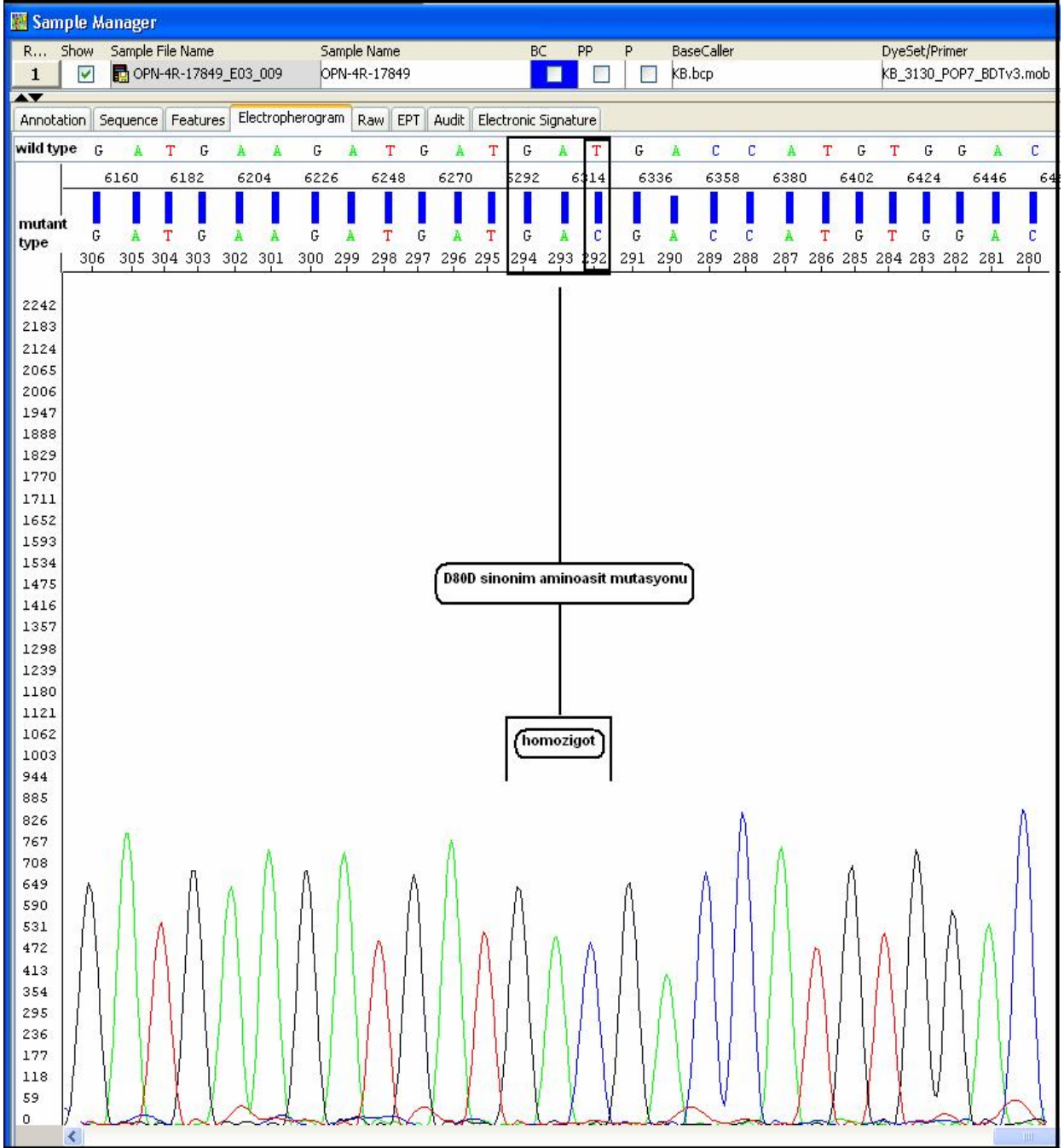
SSP1 geninde 65 hasta ve 50 sağlıklı çocuktan oluşan kontrol grubunda 240 T>C (cD80D) polimorfizm analizi yapıldı. 240 T>C polimorfizminin sinonim aspartik asid aminoasid değişimine neden olduğu saptandı. Analiz sonucuna göre genotip dağılımı hasta grubunda; %15.4 (10) CC, %41.5 (27) TC, %43.1 (28) TT olarak saptandı. Gözlenen bu dağılım Hardy Weinberg eşitliği ile uyum göstermekteydi. Kontrol grubunda ise genotip dağılımı; CC %8 (4), TC %26 (13), TT ise %66 (33) şeklinde saptandı. Hasta grubunda allel dağılımı %63.8 T, %36.2 C şeklinde bulundu. C allel sıklığının hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (p=0.013). C alleleline sahip olmanın taş gelişimi açısından 2.13 kat risk taşıdığı tespit edildi. Genotip dağılımları hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldığında TT genotipleri arasında anlamlı farklılık saptanırken (p=0.049), CC genotipinin taş gelişimi açısından 2.94 kat (p=0.094), TC genotipinin ise 2.44 kat (p=0.035) risk oluşturduğu tespit edildi (Tablo-4). 240. pozisyonda saptanan heterozigot ve homozigot mutasyonlara ait elektroferogramlar Resim-1 ve Resim-2'de verilmiştir.

Tablo-4: Hasta ve kontrol gruplarında 240 T>C polimorfizmi genotip ve allel dağılımı

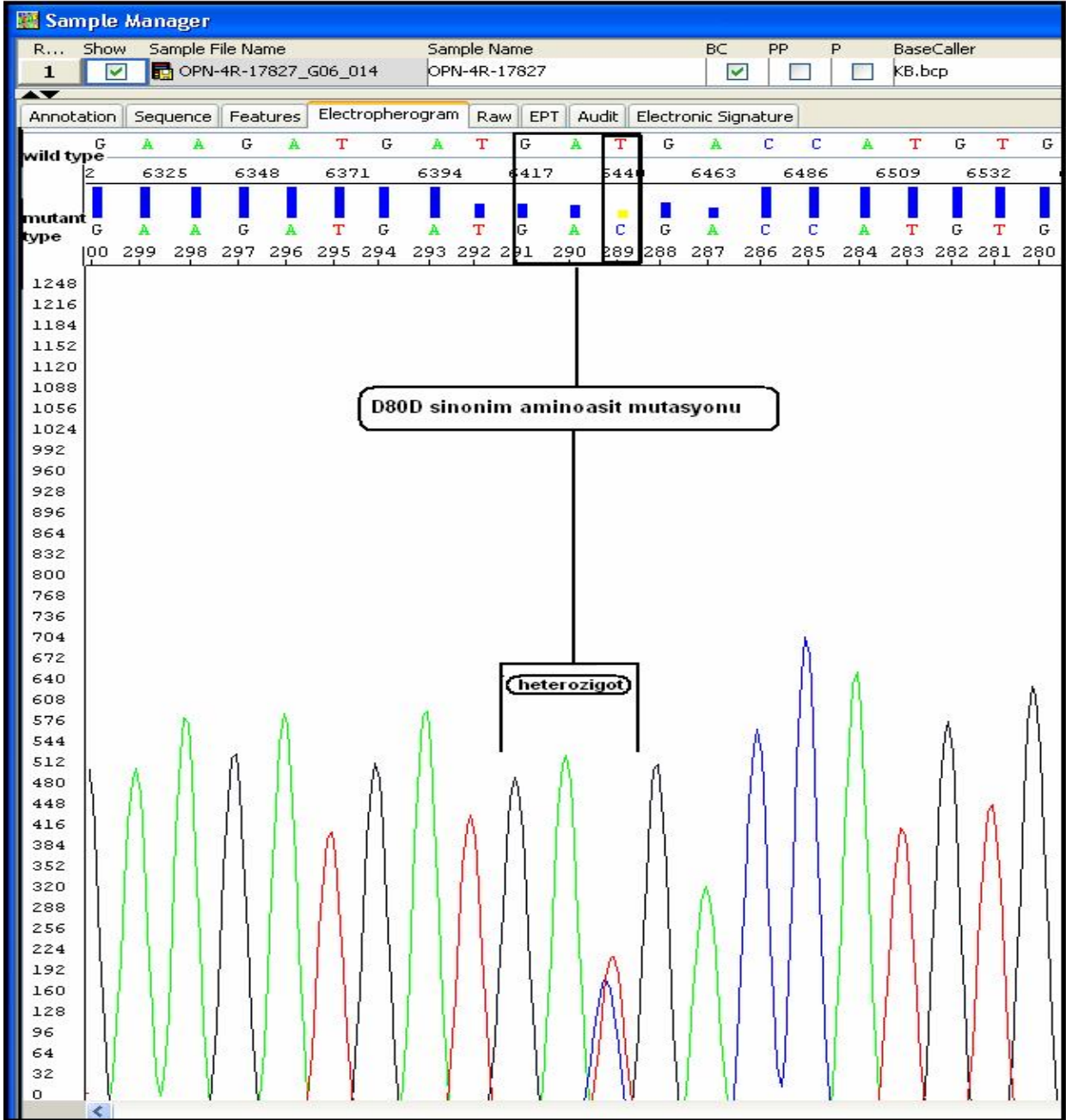
	Hasta	Kontrol			
Genotip	n (%)	n (%)	OR	95%CI	P
CC	10 (15.4)	4 (8)	2.946	0.832-10.431	0.094
TC	27 (41.5)	13 (26)	2.448	1.066-5.622	0.035*
TT	28 (43.1)	33 (66)			
Allel					
T	83 (63.8)	79 (79.0)			
C	47 (36.2)	21 (21.0)	2.130	1.170-3.880	0.013*

*p<0.05

Resim-1: 5. ekzon 240. pozisyonda homozigot D80D sinonim aminoasit mutasyonu elektroferogram görünümü



Resim-2: 5. ekzon 240. pozisyonda heterozigot D80D sinonim aminoasit mutasyonu elektroferogram görünümü



SSP1 geninde 64 hasta ve 50 sağlıklı çocuktan oluşan kontrol grubunda 708 C>T (cA236A) polimorfizm analizi yapıldı. 1 hastada 6. ekzon analizi DNA'da meydana gelen bozukluk nedeniyle yapılamadı. 708 C>T polimorfizminin sinonim alanin aminoasid değişimine neden olduğu saptandı. Analiz sonucuna göre genotip dağılımı hasta grubunda; %15.6 (10) TT, %42.2 (27) CT, %42.2 (27) CC olarak saptandı. Gözlenen bu dağılım Hardy Weinberg eşitliği ile uyum göstermekteydi. Kontrol grubunda ise genotip dağılımı TT %8 (4), CT %26 (13), CC ise %66 (33) şeklinde saptandı. Hasta grubunda allel dağılımı %63.3 C, %36.7 T şeklinde bulundu. T allel sıklığının hasta grubunda anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (p=0.011). T alleleline sahip olmanın taş gelişimi açısından 2.18 kat risk taşıdığı tespit edildi. Genotip dağılımları hasta ve kontrol gruplarında karşılaştırıldığında CC genotipleri arasında anlamlı farklılık saptanırken (p=0.040), böbrek taşı geliştirmek için TT genotipininin 3.05 kat (p=0.084), CT genotipinin 2.53 kat (p=0.029) risk taşıdığı saptandı (Tablo-5). 708. pozisyonda saptanan heterozigot ve homozigot mutasyonlara ait elektroferogramlar Resim-3 ve Resim-4'de verilmiştir.

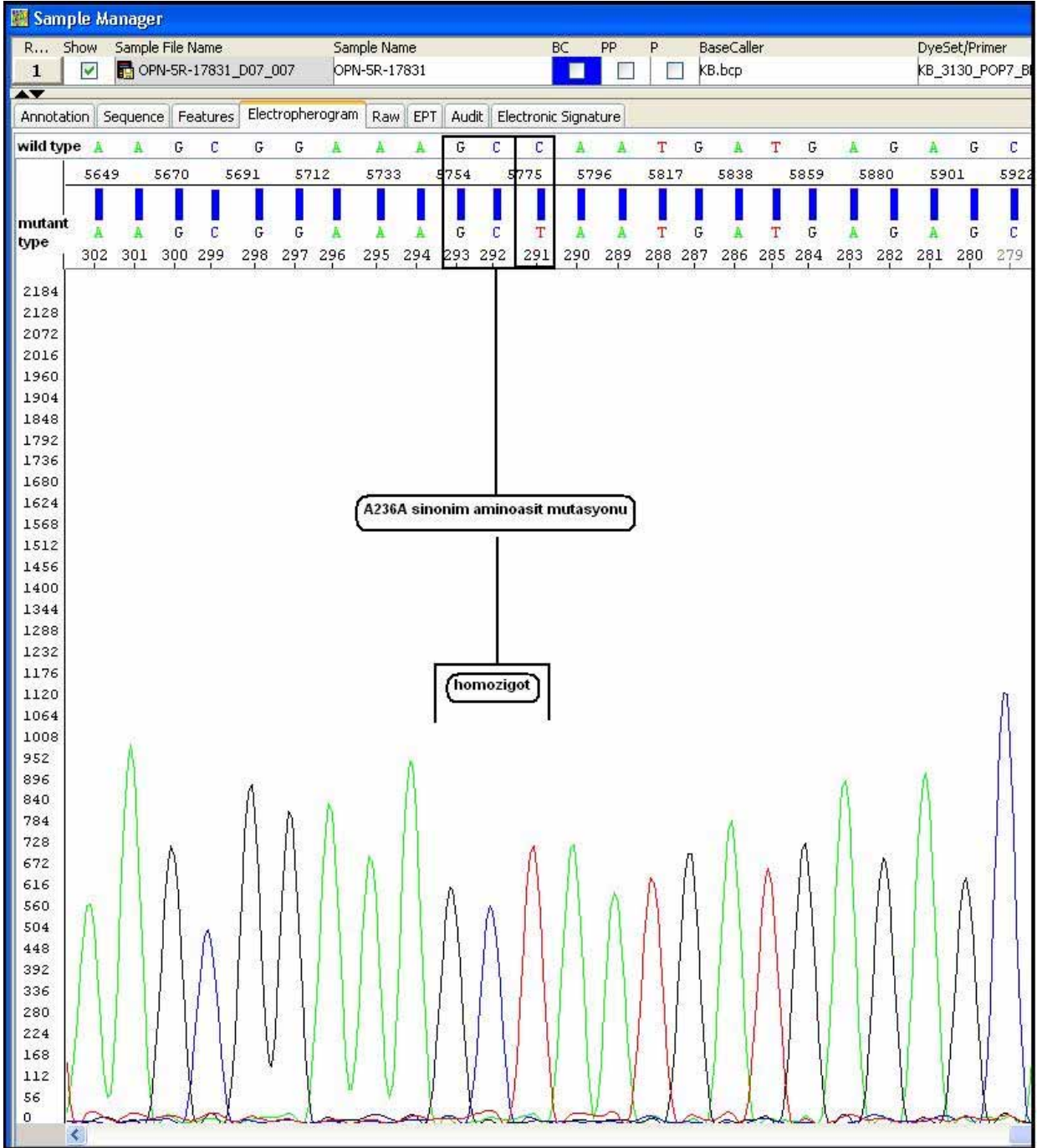
Tablo-5: Hasta ve kontrol gruplarında 708 C>T polimorfizmi genotip ve allel dağılımı

	Hasta	Kontrol			
Genotip	n (%)	n (%)	OR	95%CI	P
TT	10 (15.6)	4 (8)	3.056	0.861-10.839	0.084
TC	27 (42.2)	13 (26)	2.538	1.102-5.848	0.029*
CC	27 (42.2)	33 (66)			
Allel					
C	81 (63.3)	79 (79.0)			
T	47 (36.7)	21 (21.0)	2.183	1.197-3.980	0.011*

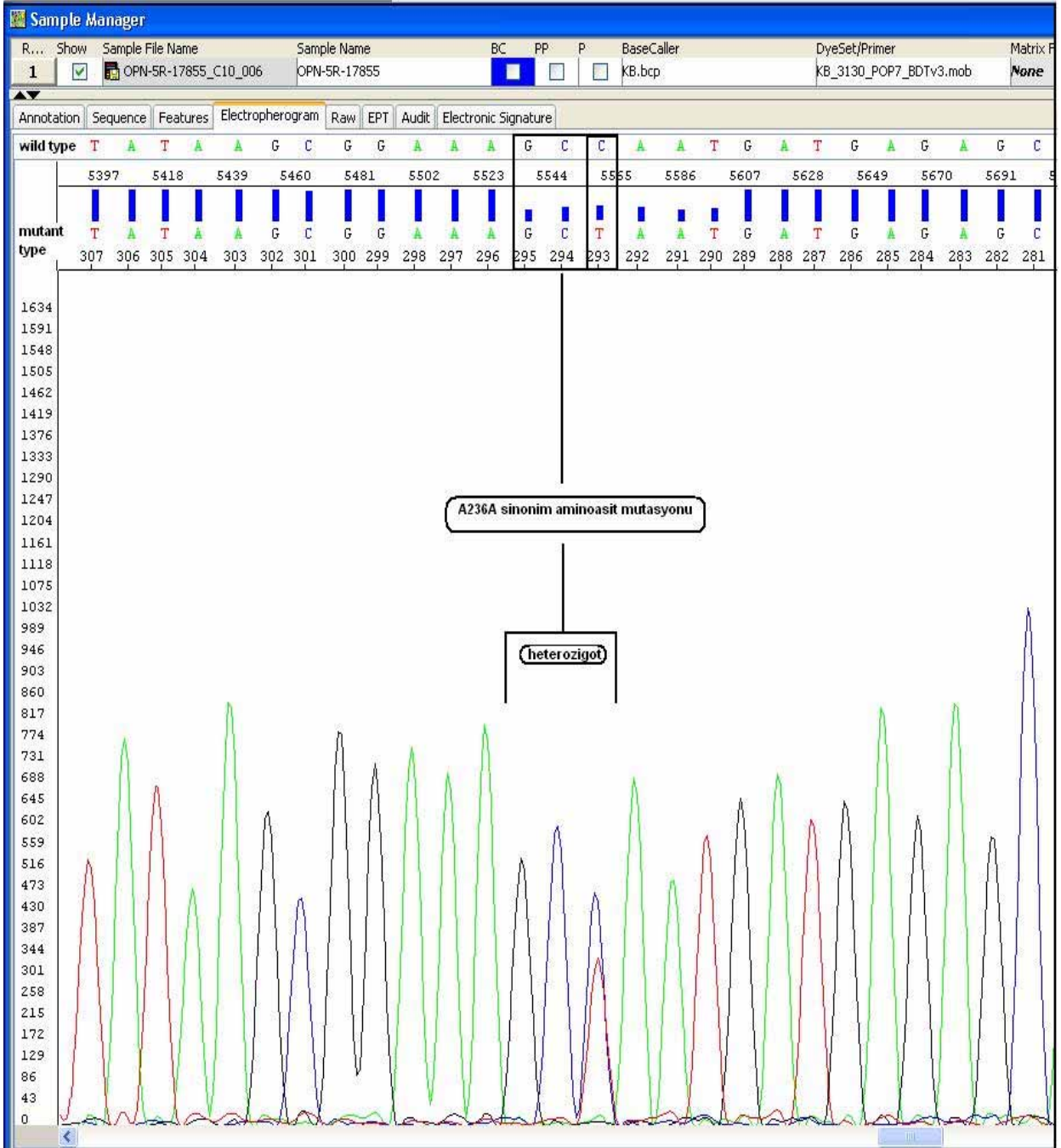
*P<0.05

Hasta ve kontrol grubunda analiz edilen OPN geninde incelenen her iki polimorfik bölgede intragenik bir bağlantıyı (linkaj) gösteren benzer genotip dağılımı gözlemlenmiştir (Bir bölgede heterozigotsa diğer bölgede de heterozigot, bir bölgede homozigotsa diğer bölgede de homozigot).

Resim-3: 6. ekzon 708. pozisyonda homozigot A236A sinonim aminoasit mutasyonu elektroferogram görünümü



Resim-4: 6. ekzon 708. pozisyonda heterozigot A236A sinonim aminoasit mutasyonu elektroferogram görünümü



240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinde allel ve genotip dağılımları ile cinsiyet arasındaki ilişkinin anlamlı olmadığı saptandı. Allel dağılımlarına bakıldığında 240 T>C polimorfizminde erkeklerde T %67.6, C %32.4; kızlarda T %58.9, C %41.1 sıklıkta saptanırken (p=0.3), 708 T>C polimorfizminde erkeklerde C %66.7, T %33.3; kızlarda C %58.9, T %41.1 sıklıkta saptandı (p=0.3). Genotip dağılımlarına bakıldığında ise 240 T>C polimorfizminde erkeklerde TT %48.6, TC %37.8, CC %13.5; kızlarda TT %35.7, TC %46.4, CC %15.4 sıklıkta saptanırken (p=0.5), 708 T>C polimorfizminde erkeklerde CC %47.2, CT %38.9, TT %13.9; kızlarda CC %35.7, CT %46.4, TT %17.9 sıklıkta saptandı (p=0.6).

Bir yaş altında tanı alan 21 hastanın 14'ünde (%66.7) 240. pozisyonda TT genotipi saptanırken (p=0.023), aynı grupta 13 (%65) hastada 708. pozisyonda CC genotipi saptandı (p=0.035). Hastalar tanı yaşları 1 yaş altı, 1-5 yaş, 5-10 yaş ve 10 yaş üstü olacak şekilde sınıflandığında tanı yaşının artmasıyla 240. pozisyonda TT, 708. pozisyonda ise CC genotip sıklığının azaldığı gözlemlendi (p=0.2).

Tablo-6: Hastaların tanı yaş gruplarına göre 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımları

Tanı yaşı	<1 yaş	1-5 yaş	5-10 yaş	>10 yaş
240 T>C				
TT	14 (%66.7)	5 (%38.5)	5 (%29.4)	4 (%28.6)
TC	6 (%28.6)	6 (%46.2)	8 (%47.1)	7 (%50.0)
CC	1 (%4.8)	2 (%15.4)	4 (%23.5)	3 (%21.4)
p=0.2				
T	34 (%81.0)	16 (%61.5)	18 (%52.9)	15 (%53.6)
C	8 (%19.0)	10 (%38.5)	16 (%47.1)	13 (%46.4)
p=0.038*				
708C>T				
CC	13 (%65)	5 (%38.5)	5 (%29.4)	4 (%28.6)
CT	6 (%30.0)	6 (%46.2)	8 (%47.1)	7 (%50.0)
TT	1 (%5.0)	2 (%15.4)	4 (%23.5)	3 (%21.4)
p=0.2				
C	32 (%80.0)	16 (%61.5)	18 (%52.9)	15 (%53.6)
T	8 (%20.0)	10 (%38.5)	16 (%47.1)	13 (%46.4)
p=0.056				

*P<0.05

Bir yaş altında tanı alan hastaların allel dağılımına bakıldığında 1 yaş altında tanı alan hastalarda 240 T>C polimorfizminde %81 T alleli saptanırken (p=0.005), 708 C>T polimorfizminde C alleli %80 sıklıkta (p=0.008) bulundu. Hastalar tanı yaşları 1 yaş altı, 1-5 yaş, 5-10 yaş ve 10 yaş üstü olacak şekilde sınıflandığında tanı

yaşının artmasıyla 240. pozisyonda T (p=0.038), 708. pozisyonda C allelinin (p=0.056) azaldığı gözlemlendi (tablo-6).

Ebeveynler arasında 1. derece akrabalık öyküsü olan grupta 240 T>C polimorfizmi genotip dağılımı incelendiğinde TT genotipinin %72.7 sıklıkla bulunduğu tespit edilirken (p=0.03), 708 C>T polimorfizmi genotip dağılımı incelendiğinde CC genotipinin %72.7 sıklıkla bulunduğu saptandı (p=0.03). Allel dağılımına bakıldığında 240 T>C polimorfizminde T allelinin %86.4 sıklıkta olduğu tespit edilirken (p=0.008), 708 C>T polimorfizminde C allelinin %86.4 sıklıkta olduğu saptandı (p=0.008) (Tablo-7). 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinde genotip dağılımı, ailede taş öyküsü bulunup ebeveynler arasında da akrabalık olan grupla karşılaştırıldığında 240. pozisyonda TT, 708. pozisyonda CC genotipleri %77.8 sıklıkta görüldü (p=0.065, p=0.056). Aynı grupta allel dağılımları karşılaştırıldığında ise 240. pozisyonda T, 708. pozisyonda C alleli %88.9 sıklıkta saptandı (p=0.017, p=0.015).

Tablo-7: Ailede ürolitiazis öyküsü ve ebeveynler arasında akrabalık varlığının 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımı ile ilişkisi

	Ailede taş öyküsü			Ebeveynler arasında akrabalık		
	Yok	1.derece	2-3.derece	Yok	1.derece	2-3.derece
240 T>C						
Genotip TT	11 (%57.9)	7 (%41.2)	10 (%34.5)	19 (%39.6)	8 (%72.7)	1 (%16.7)
Genotip TC	6 (%31.6)	5 (%29.4)	16 (%55.2)	22 (%45.8)	3 (%27.3)	2 (%33.3)
Genotip CC	2 (%10.5)	5 (%29.4)	3 (%10.3)	7 (%14.6)	0 (%0)	3 (%50.0)
p=0.1			p=0.03*			
Allel T	60 (%62.5)	19 (%86.4)	4 (%33.3)	28 (%73.7)	19 (%55.9)	36 (%62.1)
Allel C	36 (%37.5)	3 (%13.6)	8 (%66.7)	10 (%26.3)	15 (%44.1)	22 (%37.9)
p=0.008*			p=0.2			
708 C>T						
Genotip CC	11 (%57.9)	7 (%41.2)	9 (%32.1)	18 (%38.3)	8 (%72.7)	1 (%16.7)
Genotip TC	6 (%31.6)	5 (%29.4)	16 (%57.1)	22 (%46.8)	3 (%27.3)	2 (%33.3)
Genotip TT	2 (%10.5)	5 (%29.4)	3 (%10.7)	7 (%14.9)	0 (%0)	3 (%50.0)
p=0.1			p=0.03*			
Allel C	58 (%61.7)	19 (%86.4)	4 (%33.3)	28 (%73.7)	19 (%55.9)	34 (%60.7)
Allel T	36 (%38.3)	3 (%13.6)	8 (%66.7)	10 (%26.3)	15 (%44.1)	22 (%39.3)
p=0.008*			p=0.2			

*p<0.05

Ailede taş öyküsü olan hastalarda 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinde genotip ve allel dağılımları karşılaştırıldığında gruplar arasında farklılığın anlamlı olmadığı saptandı (Tablo-7).

240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinde genotip ve allel dağılımları hastalarda saptanan üriner metabolik risk faktörleriyle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olmadığı gözlemlendi (Tablo-8).

Tablo-8: Üriner metabolik risk faktörleri ile 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımları ilişkisi

	Hiperkalsüri	Hiperokzalüri	Hipositratüri	Hiperürükozüri	Sistinüri	Hipomagnezüri
n(%)	15 (%23.1)	14 (%21.5)	23 (%35.4)	16 (%24.6)	9 (%13.8)	10 (%15.4)
240T>C						
TT	6 (%40.0)	5 (%35.7)	9 (%39.1)	6 (%37.5)	5 (%55.6)	5 (%50.0)
TC	6 (%40.0)	2 (%14.3)	8 (%34.8)	6 (%37.5)	3 (%33.3)	4 (%40.0)
CC	3 (%20.0)	7 (%50.0)	6 (%26.1)	4 (%25.0)	1 (%11.1)	1 (%10.0)
P	0.8	0.7	0.2	0.4	0.7	0.8
T	18 (%60.0)	17 (%60.7)	26 (%56.5)	18 (%56.3)	13 (%72.2)	14 (%70.0)
C	12 (%40.0)	11 (%39.3)	20 (%43.5)	14 (%43.8)	5 (%27.8)	6 (%30.0)
P	0.6	0.6	0.1	0.3	0.4	0.5
708C>T						
CC	6 (%40)	5 (%35.7)	9 (%39.1)	6 (%37.5)	4 (%50.0)	5 (%50)
CT	6 (%40)	2 (%14.3)	8 (%34.8)	6 (%37.5)	3 (%37.5)	4 (%40)
TT	3 (%20)	7 (%50.0)	6 (%26.1)	4 (%25)	1 (%12.5)	1 (%10)
P	0.8	0.7	0.2	0.4	0.7	0.8
C	18 (%60.0)	17 (%60.7)	26 (%56.5)	18 (%56.3)	13 (%72.2)	14 (%70.0)
T	12 (%40.0)	11 (%39.3)	20 (%43.5)	14 (%43.8)	5 (%27.8)	6 (%30.0)
P	0.6	0.7	0.2	0.3	0.6	0.4

*p<0.05

Taş analizi sonucu kalsiyum taşı tespit edilen hastaların 240 T>C polimorfizmi genotip ve allel dağılımına bakıldığında 4 (%50) hastada TT, 3 (%37.5) hastada TC ve 1(%12.5) hastada CC genotipi saptanırken T alleli %68.8, C alleli ise %31.3 sıklıkta saptandı. 708 C>T polimorfizmi genotip ve allel dağılımına bakıldığında ise 4 (%50) hastada CC, 3 (%37.5) hastada CT ve 1(%12.5) hastada TT genotipi saptanırken C alleli %68.8, T alleli ise %31.3 sıklıkta saptandı. Kalsiyum taşı saptanan hastalarda 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımlarında anlamlı farklılıkların olmadığı saptandı.

Multipl veya bilateral taşa sahip hastalarda 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımları incelendiğinde anlamlı farklılığın olmadığı saptandı (Tablo-9).

Tablo-9: Bilateral ve multipl taşa sahip olmanın 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımı ile ilişkisi

Taş Dağılımı	Bilateral	Unilateral	Multipl	Tek
240 T>C				
Genotip TT	7 (%43.8)	21 (%42.9)	16 (%55.2)	12 (%33.3)
Genotip TC	7 (%43.8)	20 (%40.8)	10 (%34.5)	17 (%47.2)
Genotip CC	2 (%12.5)	8 (%16.3)	3 (%10.3)	7 (%19.4)
			p=0.9	p=0.1
Allel T	21 (%65.6)	62 (%63.3)	42 (%72.4)	41 (%56.9)
Allel C	11 (%34.4)	36 (%36.7)	16 (%27.6)	31 (%43.1)
			p=0.8	p=0.068
708 C>T				
Genotip CC	6 (%40)	21 (%42.9)	15 (%53.6)	12 (%33.3)
Genotip CT	7 (%46.7)	20 (%40.8)	10 (%35.7)	17 (%47.2)
Genotip TT	2 (%13.3)	8 (%16.3)	3 (%10.7)	7 (%19.4)
			p=0.9	p=0.2
Allel C	19 (%63.3)	62 (%63.3)	40 (%71.4)	41 (%56.9)
Allel T	11 (%36.7)	36 (%36.7)	16 (%28.6)	31 (%43.1)
			p=0.9	p=0.09

*p<0.05

Taş rekürrensi gözlenen 4 hastanın 240 T>C polimorfizmi genotip ve allel dağılımlarına bakıldığında 1 (%25) hastada TT, 2 (%50) hastada TC ve 1 (%25) hastada CC genotipi saptanırken T ve C allelleri eşit sıklıkta saptandı. 708 C>T polimorfizmi genotip ve allel dağılımına bakıldığında ise 1 (%25) hastada CC, 2 (%50) hastada CT ve 1 (%25) hastada TT genotipi saptanırken C ve T allelleri eşit sıklıkta saptandı. Rekürrens gözlenen hastalarda 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri genotip ve allel dağılımlarında anlamlı farklılıkların olmadığı saptandı.

5.TARTIŞMA

Nefrolitiazis, böbreklerde kristal formasyonunun bir sonucunda meydana gelmektedir (3,4). İdrarda kristal formasyonu birçok faktör tarafından inhibe edilmekte ya da uyarılmaktadır. Belirli risk faktörlerinin idrarla atılımı, üriner süpersatürasyon, tübüler akım hızı, üriner pH ve üriner yolun gelişimsel anomalileri bu olaya neden olan faktörler arasında sayılmaktadır (5). Hiperkalsiüri, hiperokzalüri, hiperürikozüri gibi belli risk faktörlerinden başka idrarda organik ve inorganik inhibitörler de bulunmaktadır. Bunlar arasında magnezyum, sitrat, pirofosfat, glikozaminoglikanlar, Tamm-Horsfall proteini, β 2 mikroglobulin, osteopontin (OPN) ve nefrokalsin sayılmaktadır (5). İdrardan ve taş matriksinden izole edilebilen çok sayıda makromoleküler protein böbrekler tarafından oluşturulmaktadır. Bu proteinler sağlıklı bireylerde olduğu gibi nefrolitiazisli hastalarda da mevcut olup kristallerin nükleasyon, büyüme, agregasyon ve adezyonunu düzenleyerek taş oluşum riskini etkilemekte, kristal-kristal ve kristal-hücre etkileşimini inhibe ederek nefrolitiazis patogeneğinde anahtar rol oynamaktadır (6,7,8). Kalsiyum okzalat kristalizasyonunun inhibisyonunda en büyük destek idrar protein içeriği tarafından sağlanmaktadır (6,49,62). Tamm-Horsfall proteini, nefrokalsin ve osteopontin başta gelen proteinler olup, bu proteinler taş oluşumunda farklı basamaklarda etki göstermektedir. Tamm-Horsfall proteini sadece agregasyonu inhibe ederken, nefrokalsin ve osteopontin agregasyon, büyüme ve nükleasyon fazlarını inhibe etmektedir (10). Üriner makromoleküllerin kalitatif ve kantitatif eksiklikleri nefrolitiazisde önemli bir neden olarak gösterilmektedir (9). OPN hem kalsiyum taşlarının yapısında yer alması, hem de taş oluşum mekanizmalarındaki her üç aşamada da olan etkileri ve diğer proteinlere göre daha potent olarak gösterilmesi nedeniyle en önemli rolü oynayan protein olarak göze çarpmaktadır (10).

Ürolitiazis poligenik bir durumdur ve neden olabilecek genetik varyasyonlar araştırılmaktadır (2). Ürolitiazis oluşumundan sorumlu olabilecek hiperkalsiüri, hiperokzalüri ve hipositratüri ile ilişkili olarak gösterilen çeşitli genler ve bu genlerdeki mutasyonlar literatürde bildirilmiştir (2,4,48).

OPN negatif yüklü, asidik hidrofilik, 44 kDa büyüklüğünde, adezyondan sorumlu arjinin-glisin-aspartik asid bölgesi içeren bir glikoproteindir. Posttranslasyonel modifikasyona uğramakta, fosforile ve glikozile olmaktadır. Vücutta osteoklast, osteoblast, çeşitli epitel hücreleri, makrofaj, T lenfosit, düz kas hücresi ve

bazı tümör hücreleri tarafından salgılanmakta ve çeşitli vücut sıvılarına salınmaktadır (49,55,56,57,80).

OPN çok fonksiyonlu bir protein olup, inflamasyon ve hücre aracılı immun reaksiyonların etkilenmesi, makrofaj ve renal tübüler epitel hücrelerde iNOS'un düzenlenmesi, renal epitelyal hücrelerin apoptozisten korunması, makrofaj adezyon, migrasyon ve sitokin salınımının düzenlenmesi, doku onarımı ve fibrozis gibi fonksiyonları vardır (8). Bunun yanında OPN böbrekte sentezlenip henle, distal tübül ve papiller epitel gibi epitelyal hücreler tarafından idrara salınmaktadır. OPN kalsiyum okzalat kristallerinin nukleasyon, büyüme ve agregasyonunu in vitro olarak ve kristallerinin böbrek epitel hücrelerine bağlanmasını direkt olarak inhibe etmektedir. Kalsiyum okzalat kristalizasyonunu renal tübüler epitelyal hücrelere bağlanma gücü daha fazla olan kalsiyum okzalat monohidrat fazı yerine kalsiyum okzalat dihidrat fazına yönlendirmektedir (7).

Literatürde OPN ve nefrolitiazis ilişkisini gösteren çok sayıda çalışma yer almaktadır. Asplin ve ark. OPN, Tamm-Horsfall protein ve nefrokalsinin taş oluşum aşamalarındaki etkilerini karşılaştırmış ve OPN'i her üç aşamada etkili ve potent bir inhibitör olarak göstermişlerdir (10). Yasui ve ark. tarafından bir çalışmada idrar OPN düzeylerinin, böbrek taşı olan hastalarda azalmış olmasının proteinin taş yapısına katılmasından kaynaklandığı bildirilirken, başka bir çalışmada ise etilen glikol ve vitamin D₃ verilerek böbreklerinde kalsiyum okzalat taşı oluşturulan farelerde OPN salınımının arttığı ve sitrat tedavisinin hem taş oluşumu hem de OPN salınımında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (6,88). Jiang ve ark. tarafından OPN ve mRNA düzeylerinin böbrek distal ve kollektör tüplerinde üriner sistem taşı oluşturulan farelerde arttığı ve bunun OPN'in kalsiyum okzalat kristalizasyonundaki inhibitör aktivitesini yansıttığı bildirilmiştir (87). Wesson ve ark. tarafından hiperokzalürik, OPN -/- farelerde taş oluşumu gözlenirken, okzalüriye cevap olarak artmış OPN düzeyinin diğer farelerde taşa karşı koruyucu olduğu düşünülmüştür (62).

Yapılan bazı çalışmalarda OPN geninde saptanan polimorfizmlerin nefrolitiazis ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Yamate ve ark. tarafından Ala-250 nükleotid değişimi saptanan ürolitiazisli hastalar ve sağlıklı bireylerde OPN yapısının değişmediği ancak transkripsiyon hızındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülen OPN düzeyinde farklılıklar bulunabileceği bildirilmiş, Ala-250 polimorfizminin ürolitiazisli hastalarda ve ailesel ürolitiazisde kalıtsal faktörleri gösteren tanısal bir göstere olabileceği vurgulanmıştır (7). Gao ve ark. yaptıkları bir çalışmada nefrolitiazisli hastalarda

osteopontin geni üzerinde 6'sı yeni, 61 polimorfizm tespit etmiş, başka bir çalışmada ise OPN geninde 9402. pozisyonda görülen polimorfizmin üriner sistem kalsiyum taşları ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Bu polimorfizmler sonucu oluşan OPN varyantları ile böbrek taşı riski arasında ilişki olduğu gösterilmiş, OPN'in üriner sistem kalsiyum taş hastalığında riski gösteren genetik bir gösterge olduğu bildirilmiştir (8,11).

OPN'nin başka hastalıklarla ilişkisini gösteren çok sayıda klinik çalışma bildirilmiştir. Iwasaki ve ark. tarafından OPN geninde 13 tek nükleotid polimorfizmi saptanmış ve OPN'nin kemik metabolizması ve osteoporoz patogenezinde rol aldığı bildirilmiştir (89). Frootan ve ark. tarafından OPN düzeylerinin prostat kanserinde yüksek olduğu belirtilmiş, malign karakterin artışıyla ve prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (90). Reinholz ve Dai yaptıkları çalışmalarda OPN'nin meme kanserinde kanserin invaziv ve metastatik özelliği ile ilişkili olduğunu belirtirken, Dai ve ark. meme kanserinin antikor bazlı tedavisinde OPN'i hedef olarak göstermiş ve anti-OPN antikorlarının (hu1A12) tedavide umut verici ajan olduğunu bildirmiştir (71,91). Song ve ark. tarafından OPN'nin servikal kanserde tanısal faktör olarak kullanılabileceği ve salınımının kanser invazyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (70). Kim ve Imano çalışmalarında OPN'nin mide kanserleri ile ilişkisini göstermiştir (72,73). Ichikawa ve ark tarafından safra kesesi kolesterol taşlarında OPN taş yapısında gösterilmiş, deneysel safra kesesi taşı oluşturulan farelerde ise OPN mRNA ve protein salınımının arttığı bildirilmiştir (92). Forton tarafından yapılan çalışmada SLE'li hastalarda 707 C>T polimorfizminde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında allel sıklıkları arasında 1.63 kat fark saptanmış, genotipik dağılımları arasında anlamlı farklılık tespit edilmiş ve OPN geni, SLE patogenezinde etkili bir gen olarak gösterilmiştir (58). Niino ve ark tarafından MS'li hastalarda yapılan çalışmada OPN geni 6. eksonda 8090. pozisyonda C allelinin ise MS gelişimi açısından 2.57 kat risk taşıdığı ve CC genotipinin MS gelişimi ile anlamlı olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada saptanan 2 polimorfizmin ise MS ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (65).

Araştırmamızda SSP1 geninde yapılan 240 T>C polimorfizm analizi sonucuna göre C alleleline sahip olmanın taş gelişimi için istatistiksel açıdan anlamlı olarak 2.13 kat, CC genotipinin 2.94 kat, TC genotipinin ise istatistiksel açıdan anlamlı olarak 2.44 kat risk oluşturduğu saptanmıştır. 708 C>T polimorfizm analizi sonucuna göre ise T alleleline sahip olmanın taş gelişimi için istatistiksel açıdan anlamlı olarak 2.18 kat, TT genotipininin 3.05 kat, CT genotipinin ise istatistiksel açıdan anlamlı olarak

2.53 kat risk taşıdığı saptanmıştır. Araştırmamızda analiz edilen her iki pozisyonda saptanan polimorfizmde de kodlanan aminoasidlerin sinonim değişimi tespit edilmiştir. Bu değişikliklerin sinonim olması nedeniyle proteinin yapısında değişime neden olmadığı ancak klinik belirtilerden sorumlu olarak proteinin düzeyinde değişiklikler meydana gelmiş olabileceği düşünülmüştür. Gao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada OPN gen polimorfizmleri ile nefrolitiazis riski arasındaki ilişki araştırılmıştır. 45 hasta ve 54 sağlıklı birey arasında -144 ve -145. pozisyonlarda saptanan yeni polimorfizmler anlamlı olarak allel farkı göstermiş, taş gelişimi açısından 3.79 kat risk taşıdığı tespit edilmiştir. 2. blokta incelenen TGTG ve GTTG haplotiplerinin sıklıkları da hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı olarak farklı bulunmuş ve taş gelişimi açısından 0.05 ve 3.79 kat riskli bulunmuştur. 126 hasta ve 214 sağlıklı birey arasında taş gelişimi -145. pozisyonda G alleli taşıyanlarda 1.64 kat, -144. pozisyonda T alleli taşıyanlarda 1.76 kat riskli bulunmuştur. 2. blokta GTTG haplotipi taş gelişimi için 1.67 kat riskli bulunurken TGTG haplotipi düşük risk göstermiştir. Bu sonuç OPN'in taş gelişimi için yüksek risk ve düşük risk olarak iki yönlü ilişkisini göstermiştir (8). Yamate ve ark tarafından 36 sağlıklı birey, 40 nefrolitiazisili hasta ve 25 ailesel nefrolitiazisli hastadan oluşan çalışma grubunda OPN geni incelenmiş ve 7. eksonda Ala-250 GCC>GCT polimorfizmi saptanmıştır. Bu polimorfizmin sinonim Ala-Ala aminoasid değişiminden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Nefrolitiazisli gruplarda GCT kodon ve GCT/GCT genotip sıklığı anlamlı olarak fazla saptanmıştır. GCC ve GCT kodon sıklığındaki farklılıklara rağmen sinonim değişim nedeniyle proteinde yapısal değişikliğin olmaması gruplar arasında OPN düzeyinde farklılıkların olabileceğini düşündürmüştür. OPN mRNA ve protein miktarındaki farklılığın nedeni olarak transkripsiyon hızı ve bunu etkileyen transkripsiyon faktör bağlanma bölgesinde veya transkripsiyon faktörlerinin sentezinde GCC ve GCT kodonlarına ait farklılıklar gösterilmiştir (7). Araştırmamızda Gao ve Yamate'nin çalışmalarında elde ettikleri sonuçlarla da uyumlu olarak OPN geninde saptanan polimorfizmlerin OPN sentezini etkilemek suretiyle proteinin kalitesinde bozulma ve/veya miktarında azalma yaratarak nefrolitiazis gelişiminde kolaylaştırıcı genetik faktör olduğu düşünülmüştür.

Araştırmamızda nefrolitiazisli hastalarda cinsiyet dağılımına bakıldığında erkek üstünlüğü göze çarpmaktadır. Erkek/kız oranı 1.37 olarak bulunmuştur. Çeşitli yayınlarda epidemiyolojik çalışmaların çocukluk çağında ürolitiaziste erkek cinsiyeti baskın olarak gösterdiği belirtilirken (20,21), erkek/kız oranı 1.1-4 aralığında

değişmektedir (29,30). Türkiye’de yapılan çalışmalarda Tabel ve Bak tarafından erkek üstünlüğü gösterilirken (25,29), Dursun ve Ece tarafından ürolitiazis kızlarda daha fazla tanı almıştır (1,20). Araştırmamızda 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinde allel ve genotip dağılımları ile cinsiyet arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Benzer olarak Gao ve ark. da nefrolitiazisli hastalarda OPN polimorfizmleri allel ve haplotip dağılımı ile cinsiyet arasında ilişki saptanmamıştır (8).

Birçok ailesel hastalıkta, meydana gelen nükleotid değişimi nedeniyle hastalığın oluşumundan sorumlu genler tanımlanmıştır (7). Bunun sonucu olarak gen sekanslarının incelenmesi, Adenin-fosforibozil-transferaz (APRT) eksikliği ve sistinüri gibi taş oluşumuna neden olabilen ve sorumlu olan genin tanımlanmış olduğu hastalıklarda tanısal metod haline gelmiştir (7).

Genetik faktörler, bireyin hidrasyon durumu ve diyetel alışkanlıklar gibi çevresel faktörlerin iyon konsantrasyonları üzerindeki etkisine göre daha az bilinen mekanizmalar üzerinden etkilemektedir (48). Taş oluşumu genetik olarak değişkenlik gösteren, hücrelerin yüzeysel özelliklerinde ve kristal nükleasyon ve/veya agregasyonunu inhibe eden maddelerin idrardaki kompozisyonu ve/veya konsantrasyonundaki değişkenliklerden kaynaklanmaktadır (48). Tek nükleotid polimorfizmleri insan genomunda başta gelen varyasyon türü olup yaklaşık her 1200 baz çiftinden birinde bulunmaktadır (48). İnsan genomunun büyüklüğü göz önünde bulundurulursa bu farklılıklar dikkate değer olmasına rağmen herhangi iki bireyde yaklaşık %99.92 oranında özdeş nükleotid sekansı bulunmaktadır (48).

Ürolitiazisin infantil ya da erken çocuklukta prezente olması, ebeveynler arasında akrabalık, ailede ürolitiazis öyküsü, multipl, bilateral ve/veya rekürren taş oluşumu, tübüler disfonksiyon bulgularının olması, nefrokalsinozis ve böbrek dışı sendromik bulguların olması çocukluk çağında ürolitiazis etiyolojisinde kalıtsal nedenleri düşündürmektedir (33).

Akraba evliliği sistinüri, primer hiperokzalüri ve ksantinüri gibi resesif kalıtılan hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (93). Al-Eisa ve ark. tarafından taş oluşumuna karşı duyarlılık oluşturan metabolik hastalıklara genetik yatkınlığın, ebeveynler arasında akrabalığın sık görüldüğü Kuveytli çocuklarda diyet ve iklim gibi erişkin yaşta taş oluşumu için sorumlu tutulan çevresel faktörler yanında belirleyici olduğu düşünülmüştür (93). Iguchi ve ark. tarafından ürolitiazisli hastaların yaklaşık %30’unun ailesel olarak kalıtıldığı bildirilmiştir (7).

Araştırmamızda 46 (%70.8) hastada ailede taş öyküsü saptanmıştır. Bu oran Arjantin ve İtalya'da yapılan çalışmalar ile benzerlik gösterirken Türkiye'den yapılan başka çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur (15,25,26,30). Ailede bir veya birden fazla hasta birey olması sonraki nesilde hastalık gelişiminin daha erken yaşta olması için güçlü bir risk faktörü olarak bildirilmiştir (94). Araştırmamızda 1 yaşın altında tanı almış 21 hastanın 17'sinde (%80.9) ailede taş öyküsü saptanmıştır (p=0.2). Literatürde infant taş hastalarında ailede taş öyküsünün varlığı %11,8-78,7 arasında bildirilmektedir (26). Araştırmamızda 240 T>C polimorfizminde CC, 708 C>T polimorfizminde ise TT genotipleri ailede taş öyküsü olan grupta daha fazla sıklıkta görülürken, bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 240 T>C polimorfizminde C, 708 C>T polimorfizminde ise T alleli ailede 2-3. derece akrabalarda taş olan grupta daha yüksek sıklıkta saptanmıştır. Bu oran istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. Gao ve ark tarafından nefrolitiazisli hastalarda OPN polimorfizmleri allel ve haplotip dağılımı ile ailede hastalık öyküsü arasında anlamlı ilişki saptanmazken (8), Yamate ve ark. tarafından OPN geni 7. ekzonda saptanan Ala-250 nükleotid değişiminin ailesel olarak kalıtıldığı tespit edilmiştir (7). Araştırmamızda saptanan OPN polimorfizmleri ile ailede taş öyküsü varlığı arasındaki ilişki Yamate ve ark.'nın sonuçlarıyla da uyumlu olarak ailede böbrek taşı varlığının genetik yatkınlığı arttırdığını desteklemektedir.

Araştırmamızda ebeveynler arasında akrabalık 17 (%26.2) hastada saptanmıştır. 1 yaş altında tanı alan 21 hastanın 5'inde (%23.8) ebeveynler arasında akrabalık bulunmuştur. Ailede taş öyküsünün bulunması ve ebeveynler arasında akrabalık olması genetik ve çevresel faktörler arasında etkileşim sonucunda taş patogenezinde genetik faktörlerin önemli ölçüde etkili olduğunu düşündürmektedir (20, 27). Araştırmamızda ebeveynler arasında akrabalık olan grupta genotip ve allel dağılımlarına bakıldığında beklenin tersine 240 T>C polimorfizminde T allel ve TT genotip, 708 C>T polimorfizminde ise C allel ve CC genotip sıklıkları daha yüksek bulunmuştur. Bu sonucun araştırmaya alınan hasta sayısının az olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Koyuncu ve Al-Eisa yaptıkları çalışmalarda ailede ürolitiazis öyküsü olan hastalarda taş gelişiminin, olmayanlara göre daha erken yaşlarda meydana geldiğini ve yüksek rekürrens oranı gösterdiğini bildirmişler ve bu durumun hastalar ve ailelerde bulunan genetik faktörlere bağlı olduğunu düşünmüşlerdir (93,94). Çeşitli ülkelerden yapılan yayınlarda ürolitiazisli çocuklarda tanı yaşı ortalama 4.2-9.4 yaş

olarak bildirilmiştir (20,29). Araştırmamızda ortalama tanı yaşı literatürle de uyumlu olarak 67.2 ay (3-210 ay) bulunmuştur. Bu ortalama Türkiye'den yapılan başka yayınlarla da benzerlik göstermektedir (25,29). Hastaların 21'inin (%32.3) 1 yaş altında tanı aldığı gözlenmiştir. Araştırmamızda 240 T>C polimorfizminde TT genotipi ve T alleli, 708 C>T polimorfizminde CC genotipi 1 yaş altında tanı alan hastalarda anlamlı olarak yüksek sıklıkta bulunmuştur. Tanı yaşları 1 yaş altı, 1-5 yaş, 5-10 yaş ve 10 yaş üstü olacak şekilde sınıflandığında tanı yaşının artmasıyla bu genotip ve allellerin sıklığında azalma saptanmıştır. Shin ve ark yaptıkları çalışmada OPN geninde saptanan -1800 G>T polimorfizminin ve ht-2 haplotipinin hepatosellüler karsinom gelişim yaşı ile ilişkili olduğunu bulmuştur (95). Niino ve ark MS'li hastalarda yaptıkları çalışmada OPN geni 7. Eksonda 9583. pozisyondaki polimorfizmin hastalığın başlangıç yaşı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (65). Gao ve ark tarafından nefrolitiazisli hastalarda OPN polimorfizmleri allel ve haplotip dağılımı ile tanı yaşı arasında ilişki saptanmazken, farklı haplotipleri taşıyan bireylerde farklı OPN düzeylerinin bulunabileceği bildirilmiştir (8). Yasui ve arkadaşları yaptıkları çalışmada nefrolitiazisli hastalarda OPN düzeyinin düşük olduğunu göstermiştir (6). Yamate ve ark tarafından OPN geninde saptanan Ala-250 polimorfizmine bağlı olarak OPN yapısında değişiklik saptamazken ürolitiazis gelişiminden protein düzeyindeki farklılıkların sorumlu olduğu düşünülmüştür (7). Bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde araştırmamızda OPN geninde polimorfizm saptanan çocukların bir yaş altında nefrolitiazis tanısı almamalarının bu polimorfizmin bazı hastalarda protein yapısında bozukluğa neden olarak taş oluşumundan sorumlu olurken, bazılarında ise proteinin miktarındaki değişiklikler nedeniyle sadece taş hastalığına karşı yatkınlık oluşturması sonucu olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte asemptomatik hastaların değerlendirilmesi sırasında görüntüleme yöntemlerinin kullanılmaması ve buna bağlı olarak nefrolitiazis tanısının atlanması da hastaların daha geç tanı almalarına neden olabilmektedir.

Koyuncu ve ark. tarafından ailede ürolitiazis öyküsü olan hastalarda rekürrens ve multipl taş görülme oranı olmayanlara göre daha fazla olarak bildirilmiştir (94). Başka bir çalışmada ise rekürren taş oluşumunun genetik bozuklukları düşündürdüğü bildirilmektedir (28). Araştırmamızda 15 (%23) hastada bilateral taş saptanırken, 29 (%44) hastada multipl taş saptanmıştır. Bilateral veya multipl taşı olan hastaların 240 T>C, 708 C>T polimorfizmleri allel ve genotip dağılımları incelendiğinde anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu sonucun hasta sayısının az olmasına bağlı olabileceği

düşünülmüştür. Araştırmamızda elde edilen sonuçlarla benzer olarak Gao ve ark. tarafından da nefrolitiazisli hastalarda OPN polimorfizmleri allel ve haplotip dağılımı ile taş sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (8).

Rekürrens oranı çeşitli yayınlarda ortalama 3-24 yıllık takip süresi boyunca %6-54 arasında bildirilmektedir (1,29). Araştırmamızda ortalama 13 ay (1-45 ay) süreli izlem boyunca rekürrens oranı %6 bulunmuştur. Rekürrens oranının düşük olmasının ortalama takip süresinin kısa olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri allel ve genotip dağılımları incelendiğinde 240 T>C polimorfizminde TC ve CC genotipleri TT'den, 708 C>T polimorfizminde ise CT ve TT genotipleri CC'den daha yüksek sıklıkta saptanmıştır. Bu oran istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Yasui ve ark tarafından OPN düzeyleri rekürren taş hastalarında ilk kez taş saptanan hastalara göre daha düşük saptanmıştır (6). Araştırmamızda saptanan bu sonuçların izlem süresinin kısa ve taş rekürrensi gözlenen hasta sayısının az olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

OPN sadece kalsiyum taşlarının yapısına katılırken, ürik asid ve sistin taşlarının yapısında gösterilmemiştir (7,56). Araştırmamızda 8 hastaya taş analizi yapılmıştır. Taş analizi yapılan tüm hastalarda kalsiyum taşı saptanmıştır. Kalsiyum taşı saptanan hastalarda 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri allel ve genotip dağılımlarında farklılığın anlamlı olmadığı saptanmıştır. Benzer olarak Gao ve ark tarafından da taş tipi ile OPN polimorfizmleri arasında ilişki saptanmamıştır (8). Araştırmamızda elde edilen bu sonuçların hasta sayısının az olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinde allel ve genotip dağılımları hastalarda saptanan hiperkalsiüri, hiperokzalüri, hipositratüri, hiperürükozüri, sistinüri ve hipomagnezüri gibi üriner metabolik risk faktörleriyle karşılaştırıldığında ilişkinin anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Hiperokzalürik hastalarda 240 T>C polimorfizminde CC, 708 C>T polimorfizminde TT genotipleri yüksek oranda tespit edilmiştir ancak bu oranın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Wesson ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada hiperokzalürik, OPN -/- farelerde kalsiyum okzalat monohidrat kristallerinin oluşumu gözlenirken, OPN +/+ fareler korunmuş ve bu durum OPN'nin kalsiyum okzalat kristal formasyonu için inhibitör olduğu sonucunu düşündürmüştür (62). Yasui ve Min tarafından yapılan çalışmalarda OPN düzeyi ile kalsiyum ve magnezyum atılımı arasında ilişki saptanmamıştır (6,96). Araştırmamızda elde edilen sonuçlarla benzer olarak Gao ve ark. tarafından da nefrolitiazisli hastalarda OPN

polimorfizmleri allel ve haplotip dağılımı ile üriner metabolik risk faktörleri arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (8).

6.SONUÇ

Araştırmamızda OPN-SPP1 geninde 5. ekzonda 240 T>C ve 6. ekzonda 708 C>T polimorfizm analizi yapılmıştır. 240 T>C polimorfizminin cD80D, 708 C>T polimorfizminin ise cA236A sinonim aminoasid değişimlerini kodladığı saptanmıştır. Bu polimorfizmler hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında nefrolitiazis gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte araştırmamızda hastaların cinsiyet, ailede nefrolitiazis öyküsü, ebeveynler arasında akrabalık, erken yaşta tanı, bilateral taş, multipl taş, taş cinsi, taş rekürrensi ve üriner metabolik risk faktörleri gibi özellikleri ile 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri arasında ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak sinonim aminoasid değişimleri proteinlerin yapısında değişikliğe neden olmazken, düzeylerinde değişiklikler yaratarak etki oluşturabilmektedir. Bu araştırmada nefrolitiazis ile ilişkili olarak saptanan ve sinonim aminoasid değişikliğine neden olan polimorfizmlerin daha geniş hasta grupları ile yapılacak çalışmalarda OPN mRNA ve/veya idrar OPN düzeyleri ile birlikte değerlendirilmesinin klinik ilişkinin sağlamaştırılması ve risk faktörleri ile nefrolitiazise genetik yatkınlık ilişkisinin belirlenmesi için gerekli olduğu düşünölmüştür.

7.ÖZET

Ürolitiazis organik bir matriks içinde kristal komponentler içeren, üriner traktusun herhangi bir yerinde oluşabilen anormal bir birikimdir. Metabolik bozukluklar, genetik yatkınlık, çevresel faktörler, nütrisyonel nedenler, üriner sistemin anatomik malformasyonları ve taş oluşumunu kolaylaştırıcı medikal tedavileri içeren multifaktöryel etiyolojiye sahiptir. Çocukluk çağında prevalansı %2-3 arasında değişmektedir. Yüksek morbiditesi ve son dönem böbrek yetmezliği potansiyeli nedeniyle önemli bir sağlık sorunudur. İnsidans, lokalizasyon ve etiyolojisi; iklim, diyet, genetik ve sosyoekonomik faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Nefrolitiazis oluşumu, birçok faktör tarafından inhibe edilen veya uyarılan kristal formasyonunun sonucunda meydana gelmektedir. Üriner makromoleküllerin kalitatif ve kantitatif eksiklikleri taş oluşum riskini etkilemekte ve nefrolitiazis patogenezinde anahtar rol oynamaktadır. OPN hem kalsiyum taşlarının yapısında yer alması, hem de taş oluşum mekanizmalarındaki nükleasyon, büyüme ve agregasyon aşamalarında olan etkileri nedeniyle en önemli rolü oynayan protein olarak göze çarpmaktadır.

Araştırmamızda 65 hasta ve 50 sağlıklı çocuktan oluşan kontrol grubu ile çocuklarda nefrolitiazis gelişiminde OPN gen polimorfizminin rolü incelenmiştir. OPN-SPP1 geninde 5. ekzonda 240 T>C ve 6. ekzonda 708 C>T polimorfizm analizi yapılmıştır. 240 T>C polimorfizminin cD80D, 708 C>T polimorfizminin ise cA236A sinonim aminoasid değişimlerini kodladığı saptanmıştır. Bu polimorfizmler hasta ve kontrol grubunda karşılaştırıldığında nefrolitiazis gelişimi ile ilişkili bulunmuştur. Bununla birlikte araştırmamızda hastaların cinsiyet, ailede nefrolitiazis öyküsü, ebeveynler arasında akrabalık, erken yaşta tanı, bilateral taş, multipl taş, taş cinsi, taş rekürrensi ve üriner metabolik risk faktörleri gibi özellikleri ile 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmleri arasında ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak OPN geninde 240 T>C ve 708 C>T polimorfizmlerinin nefrolitiazis ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Saptanan bu polimorfizmlerin sinonim aminoasid değişimini kodlamaları nedeniyle proteinin yapısında değişiklik yaratmadığı bulunmuş ancak proteinin düzeylerinde değişiklikler yaratarak etki oluşturduğu düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: Osteopontin, Nefrolitiazis, Polimorfizm

8.İNGİLİZCE ÖZET

THE ROLE OF OSTEOPONTIN GENE POLİMORPHİSM IN CHILDREN WITH NEPHROLİTHİASİS

Urolithiasis is an abnormal accumulation, containing crystal components in an organic matrix, that can form anywhere along the urinary tract. Its' etiology is multifactorial including metabolic abnormalities, genetic susceptibility, nutritional factors, anatomic malformations of urinary tract and medical treatments facilitating urinary stone formation. Its' prevalence in childhood is 2-3 %. It is an important health problem with high morbidity and potential to cause end-stage renal failure. Incidence, localization and etiology change depending on climatic, dietary, genetic and socioeconomic factors. Development of nephrolithiasis occurs through crystal formation, stimulated and inhibited by many factors. Qualitative and quantitative deficiencies of urinary macromolecules are associated with formation of urinary stones and play an important role in nephrolithiasis pathogenesis. Because of its' involvement in structure of calcium stones and effects on mechanisms of renal stone formation, like nucleation, growth and aggregation phases, OPN seems to be the protein having the most important role.

Our study group was composed of 65 children with urinary stones and 50 healthy children. We investigated the role of OPN gene polymorphism in development of nephrolithiasis in children. We evaluated the polymorphisms of 240 T>C at 5th exon and 708 C>T at 6th exon on OPN-SPP1 gene. We found that 240 T>C and 708 C>T polymorphisms were coding cD80D and cA236A synonym aminoacid changes, respectively. These polymorphisms were found to be associated with development of nephrolithiasis when patient group and control group were compared. We also detected association between 240 T>C and 708 C>T polymorphisms and characteristics of the patients like sex, family history of nephrolithiasis, consanguinity between parents, diagnosis at an early age, bilateral stones, multiple stones, type of stones, stone recurrence, and urinary metabolic risk factors.

In conclusion, it was found that there is an association between 240 T>C and 708 C>T polymorphisms in OPN gene and nephrolithiasis. Although these polymorphisms code for synonym aminoacid changes and therefore does not cause

any change in protein structure, we believe that they may create their effects through promoting changes in protein levels.

Key words: Osteopontin, Nephrolithiasis, Polymorphism

9.KAYNAKLAR

1. Aydın Ece, Enver Özdemir, Fuat Gürkan, Ali İhsan Dokucu and Osman Akdeniz. Characteristics of pediatric urolithiasis in south-east Anatolia. *International Journal of Urology* (2000) 7, 330-334
2. Jessica A. Mandeville, Caleb P. Nelson. Pediatric urolithiasis. *Curr Opin Urol* 19: 419-423
3. Saeed R. Khan. Renal tubular damage/dysfunction: key to the formation of kidney stones. *Urol Res* (2006) 34: 86-91
4. Saeed R: Khan, Benjamin K. Canales. Genetic basis of renal cellular dysfunction and formation of kidney stones. *Urol Res* (2009) 37: 169-180
5. K. Sarıca. Pediatric urolithiasis: etiology, specific pathogenesis and medical treatment. *Urol Res* (2006) 34: 96-101
6. Takahiro Yasui, Keiji Fujita, Yutaro Hayashi, et al. Quantification of osteopontin in the urine of healthy and stone-forming men. *Urol Res* (1999) 27:225-230.
7. T.Yamate, H.Tsuji, N.Amasaki,et al. Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis. *Urol Res* (2000) 28:159-166.
8. B Gao, T Yasui, Y Itoh, et al. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney International* (2007) 72, 592-598.
9. Lan Mo, Lucy Liaw, Andrew P. Evan, et al. Renal calcinosis and stone formation in mice lacking oteopontin, Tamm-Horsfall protein, or both. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F1935-F1943,2007.
10. John R.Asplin, Denise Arsenault, Joan H.Parks, et al. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney International*, Vol.53 (1998), pp.194-199.
11. Gao B, Yasui T, Okada A, et al. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol*, 2005 Oct; 174:1472-6.
12. Mustafa Bak, Rana Ural, Hasan Ağın. Pediatrik ürolitiaziste metabolik nedenler. *T klin pediatri* 2004, 13

13. Kamel El-Reshaid, Hafeez Mughal, Madan Kapoor. Epidemiological profile, mineral metabolic pattern and crystallographic analysis of urolithiasis in Kuwait. *European Journal of Epidemiology* 13: 229-234 (February 1997)
14. B. H. Özokutan, M. Küçükaydın, Z. Gündüz, M. Kabaklıoğlu, H. Okur, C. Turan. Urolithiasis in childhood. *Pediatr Surg Int* (2000) 16: 60-63
15. Francisco R. Spivacow, Armando L. Negri, Elisa E. del Valle, Irene Calvino, Erich Fradinger, Jose R. Zanchetta. Metabolic risk factors in children with kidney stone disease. *Pediatr. Nephrol.* 2008 Jul; 23(7):1129-33
16. Sofia A. Martins, Clara Gomes, A. Jorge Correia. Paediatric nephrolithiasis and nephrocalcinosis: a 20 year retrospective analysis. *Port Nephrol Hypert* 2007; 21(2): 77-82
17. National Hemodialysis, Transplantation and Nephrology Registry Report of Turkey, 2008. İstanbul 2009, 38.
18. Laura Chang Kit, Guido Filler, John Pike, Michael P. Leonard. Pediatric urolithiasis: experience at a tertiary care pediatric hospital. *CUAJ*. August 2008. Volume 2, Issue 4
19. Saud Al-Rasheed et al. Nephrolithiasis in children and adolescents in the south western region of Saudi Arabia. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 1995; 6(4): 396-399
20. Ismail Dursun, Hakan M. Poyrazoglu, Ruhan Dusunsel, Zubeyde Gunduz, Metin K. Gurgoze, Deniz Demirci, Mustafa Kucukaydın. Pediatric urolithiasis: an 8-year experience of single centre. *Int. Urol Nephrol* 2008;40(1):3-9
21. Shatha Huusain Ali, Usama Nihad Rifat. Etiological and clinical patterns of childhood urolithiasis in Iraq. *Pediatr Nephrol* (2005) 20: 1453-1457
22. Onur Sakallıoğlu, Bülent Hacıhamdioğlu, Süleyman Kalman, Faysal Gök. Ürolitiyazisli çocuk hastaların demografik özellikleri ve tedavi yaklaşımlarının değerlendirilmesi. *Gülhane Tıp Dergisi* 2007; 49: 137-140
23. Gary J. Faerber. Pediatric urolithiasis. *Current Opinion in Urology* 2001, 385-389

24. Paul Goodyer, Irfan Saadi, Patricia Ong, Gay Elkas and Rima Rozen. Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. *Kidney International*. Vol. 54(1998), pp. 56-61
25. Yilmaz Tabel, Ilke Mungan Akin, Serap Tekin. Clinical and demographic characteristics of children with urolithiasis. Single-centre experience from eastern Turkey. *Urol Int* 2009; 83: 217-221
26. Ayfer Gür Güven, Mustafa Koyun, Yunus Emre Baysal, Sema Akman, Emel Alimoglu, Halide Akbas, Adnan Kabaalioglu. Urolithiasis in the first year of life. *Pediatr Nephrol*. 2009 Aug 25.
27. Vidar Edvardsson, Helga Elidottir, Olafur S. Indridason, Runolfur Palsson. High incidence of kidney stones in Icelandic children. *Pediatr Nephrol* (2005) 20: 940-944
28. Uri S. Alon, Hannah Zimmerman, Michal Alon. Evaluation and treatment of pediatric idiopathic urolithiasis-revisited. *Pediatr Nephrol* (2004) 19: 516-520
29. Mustafa Bak, Rana Ural, Hasan Agin, Erkin Serdaroglu, Sebnem Calkavur. The metabolic etiology of urolithiasis in Turkish children. *Int Urol Nephrol*. 2009; 41(3): 453-60.
30. Harika Alpay, Ahmet Özen, Ibrahim Gokce, Nese Biyikli. Clinical and metabolic features of urolithiasis and microlithiasis in children. *Pediatr Nephrol* (2009) 24: 2203-2209
31. Dönmez ve ark. Sağlıklı çocuklarda idrar kalsiyum atılımı. *Türk Ped Arş* 2009; 44: 131-4
32. Sağlıklı Okul Çocuklarında İdiopatik Hiperkalsiüri Sıklığı. Betül Ersoy ve ark. *T Klin Pediatri* 2002, 11
33. Uri S Alon, Tarak Srivastava, Urolithiasis, Kanwal K Kher, H William Schnaper, Sudesh Paul Makker. *Clinical Pediatric Nephrology*, 2nd ed, 539-553.
34. Mary Ann Cameron, Khashayar Sakhaee, Orson W. Moe. Nephrolithiasis in children. *Pediatr Nephrol* (2005) 20: 1587-1592

35. Preminger GM, Pak CYC. Nephrolithiasis. In: Jacobson HR, Striker GE, Klahr S, eds. The Principles and practice of Nephrology. St. Louis Missouri USA: Mosby Year Book; 1995: 1015-31
36. Pierre Cochat, Aurelia Liutkus, Sonia Fargue, Odile Basmaison, Bruno Ranchin, Marie-Odile Rolland. Primary hyperoxaluria type 1: still challenging! *Pediatr Nephrol* (2006) 21: 1075-1081
37. Fernando C. Delvecchio, Glenn M. Preminger. Medical management of stone disease. *Current Opinion in Urology* 2003, 13: 229-233
38. Tülay Akçay, Dildar Konukoğlu, Çiğdem Çelik. Hypocitraturia in patients with urolithiasis. *Archives of Disease in Childhood* 1996; 74: 350-351
39. Bülent Önal. Çocuklarda Taş Hastalığı ve Tedavisi. *Klinik gelişim* s 44-51
40. L Massey, Magnesium therapy for nephrolithiasis, *Magnesium Research* 2005; 18 (2): 123-6
41. Mitra Naseri, Abdol Reza Varasteh, Seied Ali Alamdaran. Metabolic factors associated with urinary calculi in children. *Iranian journal of kidney disease* vol.4 no1 january 2010.
42. Thomas Knol, Antonia Zöllner, Gunnar Wendt-Nordahl, Maurice Stephan Michel, Peter Alken. Cystinuria in childhood and adolescence: recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Pediatr Nephrol* (2005) 20: 19-24
43. Ita Pfeferman Heilberg, Nestor Schor. Renal stone disease: causes, evaluation and medical treatment. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50/4: 823-831
44. Jack S Elder. Urinary Lithiasis. *Kliegman: Nelson textbook of pediatrics*, 18th ed. Chapter 547.
45. Andrew P. Evan. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol*. 2009 Feb 7.

46. Andrew P. Evan, Fredric L. Coe, James E. Lingeman, Elaine Worcester. Insights on the pathology of kidney stone formation. *Urol Res* (2005) 33: 383-389
47. Bernd Hoppe, Ernst Leumann, and Dawn S. Milliner. Urolithiasis and Nephrocalcinosis in Childhood. *Comprehensive Pediatric Nephrology*, 1st ed. Chapter 33: 499-525
48. R. W. E. Watts. Idiopathic urinary stone disease: possible polygenic aetiological factors. *Q J Med* 2005; 98: 241-246
49. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, et al. Osteopontin- a molecule for all seasons. *J Med* 2002;95:3-13
50. Yuansheng Xie, Minoru Sakatsume, Shinichi Nishi, et al. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney International*, Vol. 60 (2001), pp.1645-1657.
51. Mahipal Singh, Cerrone R. Foster, Suman Dalal, et al. Osteopontin: Role in extracellular matrix deposition and myocardial remodeling post-MI. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2009).
52. Franziska Buback, Andreas C. Renkl, Guido Schulz, et al. Osteopontin and the skin: multiple emerging roles in cutaneous biology and pathology. *Experimental Dermatology* 2009;18:750-759.
53. Klaus Schmidt-Petersen, Eva Brand, Ralph Telgmann, et al. Osteopontin gene variation and cardio/cerebrovascular disease phenotypes. *Atherosclerosis* 206(2009) 209-215.
54. David T. Denhardt and Xiaojia Guo. Osteopontin : a protein with diverse functions. *FASEB J.* 7:11475-1482;1993.
55. John R. Hoyer, John R. Asplin, Laszlo Otvos. Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibiting the growth of calcium oxalate crystals. *Kidney International*. Vol. 60(2001), pp.77-82.
56. Toshiyasu Tawada, Keiji Fujita, Takeshi Sakakura, et al. Distribution of osteopontin and calprotectin as matrix protein in calcium-containing stone. *Urol Res* (1999) 27:238-242.

57. Takahiro Yasui, Keiji Fujita, Shoichi Sasaki, et al. Expression of bone matrix proteins in urolithiasis model rats. *Urol Res* (1999) 27:255-261.
58. A.C. Forton, M.A. Petri, D. Goldman, et al. An osteopontin (SPP1) polymorphism is associated with systemic lupus erythematosus. *Human Mutation* 2002.
59. Alex B. Magil, Raimund H. Pichler, Richard J. Johnson. Osteopontin in chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 8:1383-1390, 1997.
60. Sergio A. Mezzano, M. Alejandra Droguett, M. Eugenia Burgos, et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney International*, Vol. 57 (2000), pp. 147-158.
61. Kelly L. Hudkins, Cecilia M. Giachelli, Frank Eitner, et al. Osteopontin expression in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, Vol. 57 (2000), pp. 105-116.
62. Jeffrey A. Wesson, Richard J. Johnson, Marrilda Mazzali, et al. Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 14:139-147, 2003.
63. Muhammedullah Aryan, Alper Kepez, Enver Atalar, et al. Association of plasma osteopontin levels with coronary calcification evaluated by tomographic coronary calcium scoring. *J Bone Miner Metab* (2009) 27: 591-597.
64. Satoshi Mochida, Michie Hashimoto, Atsushi Matsui, et al. Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (2004) 1079-1085.
65. Masaaki Niino, Seiji Kikuchi, Toshiyuki Fukazawa, et al. Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *Journal of Neuroimmunology* 136 (2003) 125-129.
66. Yi-Ping Yan, Bradley T. Lang, Raghu Vemuganti, et al. Osteopontin is a mediator of the lateral migration of neuroblasts from the subventricular zone after focal cerebral ischemia. *Neurochemistry International* (2009).
67. P. Nambi, M. Gellai, H.L. Wu, et al. Upregulation of osteopontin in ischemia-induced renal failure in rats: a role for ET-1? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241, 212-214 (1997).

68. Jonathan R. Diamond, Deborah Kees-Folts, Sharon D. Ricardo, et al. Early and persistent up-regulated expression of renal cortical osteopontin in experimental hydronephrosis. *Am J Pathol* 1995;146:1455-1466.
69. Raimund Pichler, Cecilia M. Giachelli, Donna Lombardi, et al. Tubulointerstitial Disease in glomerulonephritis. Potential role of osteopontin (Uropontin). *Am J Pathol* 1994, 144:915-926.
70. Jae Yun Song, Jae Kwan Lee, Nak Woo Lee, et al. Osteopontin expression correlates with invasiveness in cervical cancer. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2009; 49:434-438.
71. Jianxin Dai, Bohua Li, Jinping Shi, et al. A humanized anti-osteopontin antibody inhibits breast cancer growth and metastasis in vivo. *Cancer Immunol Immunother*.
72. Jung Yeon Kim, Byung-Noe Bae, Kyoung Soo Kim, et al. Osteopontin, CD44, and NFkB expression in gastric adenocarcinoma. *Cancer Res Treat*. 2009;41 (1):29-35.
73. Motohiro Imano, Takao Satou, Tatsuki Itoh, et al. Immunohistochemical expression of osteopontin in gastric cancer. *J Gastrointest Surg* (2009) 13:1577-1582.
74. Jami Mandelin, Emme C.K. Lin, Dana D. Hu, et al. Extracellular and Intracellular mechanisms that mediate the metastatic activity of exogenous osteopontin. *Cancer* 2009;115:1753-64.
75. Kohri K, Suzuki Y, Yoshida K et al. Molecular cloning and sequencing of cDNA encoding urinary stone protein, which is identical to osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Apr 30; 184(2): 859-64
76. Kenjiro Kohri, Shintaro Nomura, Yukihiro Kitamura et al. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *The journal of biological chemistry*. Vol.268, no:20, Issue of July 15, pp 15180-15184
77. Giachelli CM, Pichler R, Lombardi D et al. Osteopontin expression in angiotensin II-induced tubulointerstitial nephritis. *Kidney int*. 1994 feb; 45(2):515-24.

- 78.Veerle P Persy, Walter A Verstrepen, Dirk K Ysebaert et al. Differences in osteopontin up-regulation between proksimal and distal tubules after ischemia/reperfusion. *Kidney international*, vol.56(1999), pp. 601-611
- 79.Raimund H Pichler, Nor Franceschini, Bessie A.Young, et al. Pathogenesis of Cyclosporine nephropathy:roles of angiotensin II and osteopontin. *J Am Soc Nephrol*. 1995;6:1186-1196.
- 80.Hui Y.Lan, Xue Q.Yu,Niansheng Yang, et al. De novo glomerular osteopontin expression in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, Vol.53 (1998), pp.136-145.
- 81.Xue Q.Yu, Leonard L.Wu, Xiao R.Huang, et al. Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney:role of angiotensin II. *Kidney International*, Vol.58(2000), pp.1469-1480.
- 82.Jens W.Fischer, Carsten Tschöpe, Alexander Reinecke, et al. Upregulation of osteopontin expression in renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats is mediated by bradykinin. *Diabetes* 47:1512-1518, 1998.
- 83.Richard J.Johnson, Katherine L.Gordon, Shiinichi Suga, et al. Renal injury and slit-sensitive hypertension after exposure to catecholamines. *Hypertension* 1999;34:151-159.
- 84.Thomas SE, Lombardi D, Giachelli C, et al. Osteopontin expression , tubulointerstitial disease, and essential hypertension. *Am J Hypertens*. 1998 Aug; 11:954-61.
- 85.Okada H, Moriwaki K, Konishi K, et al. Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis. *Am J Kidney Dis*. 2000 Sep;36(3):498-506.
- 86.Eiji Konya, Tohru Umekawa, Masanori Iguchi, et al. The role of osteopontin on calcium oxalate crystal formation. *European Urology* 43 (2003) 564-571.
- 87.X.J. Jiang, T.Feng, L.S. Chang,et al. Expression of osteopontin mRNA in normal and stone-forming rat kidney. *Urol Res* (1998) 26:389-394.

88. Takahiro Yasui, Motohiko Sato, Keiji Fujita, et al. Effects of citrate on renal stone formation and osteopontin expression in a rat urolithiasis model. *Urol Res* (2001) 29:50-56.
89. Hironori Iwasaki, Yasutomo Shinohara, Yoichi Ezura, et al. Thirteen single-nucleotide polymorphisms in the human osteopontin gene identified by sequencing of the entire gene in Japanese individuals. *J Hum Genet* (2001) 46:544-546.
90. Shiva S. Forootan, Christopher S. Foster, Vijay R. Aachi, et al. Prognostic significance of osteopontin expression in human prostate cancer. *Int. J. Cancer*: 118, 2255-2261 (2006).
91. Monica M. Reinholz, Stephen J. Iturria, James N. Ingle, et al. Differential gene expression of TGF- β family members and osteopontin in breast tumor tissue : analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Research and Treatment* 74:255-269, 2002.
92. Hideaki Ichikawa, Motohiro Imano, Yoshifumi Takeyama, et al. Involvement of osteopontin as a core protein in cholesterol gallstone formation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* (2009) 16:197-203.
93. A. A. Al-Eisa, A. Al-Hunayyan, R. Gupta. Pediatric urolithiasis in Kuwait. *International Urology and nephrology* 33: 3-6, 2002
94. Hakan Hasbey Koyuncu, Faruk Yencilek, Bilal Eryıldırım, ark. Family history in stone disease: how important is it for the onset of the disease and the incidence of recurrence ?. *Urol Res* 2009.
95. Hyoung Doo Shin, Byung Lae Park, Hyun Sub Cheong, et al. SPP1 polymorphisms associated with HBV clearance and HCC occurrence. *International Journal of Epidemiology* 2007;1-8.
96. Wei Min, Hiroshi Shiraga, Charles Chalko, et al. Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney International*, Vol.53 (1998), pp. 189-193.