

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**OSTEOPONTİN GENİNDE 9250. POZİSYONUNDAKİ
POLİMORFİZMİN ÜROLİTİYAZİS İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Tuğba TARHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2010

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**OSTEOPONTİN GENİNDE 9250. POZİSYONUNDAKİ
POLİMORFİZMİN ÜROLİTİYAZİS İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Tuğba TARHAN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2010

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa No |
|---|----------|
| 1. ÖZET..... | 1 |
| 2. SUMMARY | 2 |
| 3. GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 4. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 4.1. ETİYOLOJİ..... | 4 |
| 4.2. EPİDEMİYOLOJİ..... | 6 |
| 4.3. TAŞLARIN YAPISI | 8 |
| 4.3.1. Kristal Bileşeni | 8 |
| 4.3.2. Matriks Bileşeni..... | 8 |
| 4.4. TAŞ TİPLERİ..... | 9 |
| 4.4.1. Kalsiyum Taşları | 9 |
| 4.4.2. Kalsiyum Dışı Taşlar | 9 |
| 4.5. BÖBREK ANATOMİSİ | 10 |
| 4.5.1. Embriyolojik Gelişim | 10 |
| 4.5.2. Makroskopik Anatomi..... | 10 |
| 4.5.2.1. Nefron..... | 11 |
| 4.5.2.2. Glomerül..... | 12 |
| 4.5.2.3. Podositler..... | 12 |
| 4.5.2.4. Tubülüsler..... | 13 |
| 4.6. ÜRİNER SİSTEMDE TAŞLARIN YERLEŞİM YERLERİ..... | 14 |
| 4.7. ÜROLİTİYAZİS İLE İLGİLİ GENETİK ÇALIŞMALAR | 15 |
| 4.8. OSTEOPONTİN (OPN)..... | 16 |
| 4.8.1. Osteopontin'in Yapısı..... | 17 |
| 4.8.2. Osteopontin'in Regülasyonu | 20 |
| 4.8.3. Osteopontin'in Fonksiyonları | 22 |
| 4.8.4. Osteopontin'in Böbrek Taşı Oluşumundaki Rolü | 23 |
| 4.8.5. OPN ve Ürolitiyaizis ile İlişkili Genetik Çalışmalar | 24 |
| 5. MATERYAL VE METOD | 26 |
| 5.1. MATERYAL VE LABORATUVAR EKİPMANLARI..... | 26 |

| | |
|---|----|
| 5.1.1. Aletler | 26 |
| 5.1.2. Kimyasallar, Enzimler ve Markerlar | 26 |
| 5.1.3. Kullanılan Kitler | 28 |
| 5.1.4. Çözeltilerin Bileşenleri ve Hazırlanışı | 28 |
| 5.2. ÇALIŞMA GRUBU | 29 |
| 5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ | 29 |
| 5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları | 29 |
| 5.3.2. Uygulanan Laboratuvar Analizleri | 29 |
| 5.4. OSTEOPONTİN GENİNİN ÇOĞALTILMASI VE 9250. POZİSYONDAKİ rs1126616 (NCBI-ID) POLİMORFİZMİN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER..... | 30 |
| 5.4.1. Lökosit İzolasyonu | 30 |
| 5.4.2. Genomik DNA İzolasyonu | 30 |
| 5.4.3. DNA Miktarının Ölçülmesi | 31 |
| 5.4.4. Primerlerin Hazırlanması..... | 31 |
| 5.4.5.OPN Geninde 9250. Pozisyonundaki rs1126616 Polimorfizminin Bulunduğu Bölgenin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması | 32 |
| 5.4.6. PZR Koşulları | 34 |
| 5.4.7. PZR Ürünlerinin Yatay Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi..... | 35 |
| 5.4.8. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi | 36 |
| 5.4.9. Böbrek Taşlarının Analizi | 36 |
| 5.4.10. İstatistiksel Analiz | 36 |
| 6. BULGULAR | 37 |
| 6.1. PZR-RFLP SONUÇLARI | 38 |
| 7. TARTIŞMA..... | 43 |
| 8. SONUÇ..... | 49 |
| 9. TEŞEKKÜR | 51 |
| 10. KAYNAKLAR..... | 52 |

SİMGE VE KISALTMALAR

| | |
|-------------------|---|
| Ala | : Alanin |
| APLS | : Autoimmune lymphoproliferative syndrome |
| A° | : Angstrom |
| bç | : Baz çifti |
| BMPs | : Bone morphogenetic proteins |
| BSP-1 | : Bone sialoprotein-1 |
| C | : Sitozin |
| Ca | : Kalsiyum |
| CaOx | : Kalsiyum oksalat |
| CI | : Konfidans aralığı |
| cm | : Santimetre |
| COM | : Kalsiyum oksalat monohidrat |
| COD | : Kalsiyum oksalat dihidrat |
| C-terminal | : Karboksil ucu |
| C° | : Santigrat |
| dak | : Dakika |
| del | : Delesyon |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| DNaz | : Deoksiribonükleaz |
| dNTP | : Deoksiribonükleozid trifosfat |
| EDTA | : Etilen diamin tetra asetik asit |
| EGF | : Epidermal growth factor |
| Eta-1 | : Early T lymphocyte activation-1 |
| EtBr | : Etidiyum bromid |
| FAK | : Fokal adhezyon kinaz |
| G | : Guanin |
| GWAS | : Genom-wide association study |
| htSNP | : Haplotip-tagging SNP |
| iNOS | : İndüklenebilir nitrikoksit sentaz |
| IL-1β | : İnterlökin-1β |

| | |
|-------------------------|---|
| IL-18 | : İnterlökin-18 |
| kb | : Kilobaz |
| kDa | : KiloDalton |
| Kf | : Konsantrasyon |
| Ksp | : Termodinamik çözünürlük |
| LD | : Linkage disequilibrium |
| MAP | : Magnezyum, amonyum, fosfat |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : Milimolar |
| MMP | : Matriksmetalloproteinaz |
| mRNA | : Mesajcı ribonükleik asit |
| MS | : Multipl skleroz |
| MgCl₂ | : Magnezyum klorür |
| Na | : Sodyum |
| nm | : Nanometre |
| ng | : Nanogram |
| NK | : Natural killer |
| N- terminal | : Amino ucu |
| OD | : Optik dansite |
| OPN | : Osteopontin |
| OR | : Odds ratio |
| Ox | : Oksalat |
| PBS | : Phosphate-buffered saline |
| PDGF | : Platelet-derived growth factor |
| pmol | : Pikomol |
| PTM | : Post translasyonel modifikasyon |
| PZR | : Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RA | : Romatoid artrit |
| RFLP | : Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi |
| RGD | : Arjinin-glisin-aspartik asit dizisi |
| RNaz | : Ribonükleaz |

| | |
|----------------------------|---|
| rpm | : Revolutions per minute |
| SD | : Standart sapma |
| SIBLING | : Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein |
| SLE | : Sistemik lupus eritematozus |
| sn | : Saniye |
| SNP | : Single nucleotide polymorphism |
| SPP-1 | : Secreted phosphoprotein-1 |
| src | : Sarkoma |
| SSCP | : Tek zincir konformasyonel polimorfizm |
| SVVYGLR | : Serin-valin-valin-tirozin-glutamat-lösin-arjinin dizisi |
| T | : Timin |
| TAE | : Trisasetik asit |
| UV | : Ultraviyole |
| V | : Volt |
| VEGF | : Vascular endothelial growth factor |
| VKİ | : Vücut kitle indeksi |
| XRD | : X ışını difraksiyon |
| α | : Alfa |
| β | : Beta |
| μl | : Mikrolitre |
| μM | : Mikromolar |

Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulu tarafından 04.12.2008 tarih ve 2008/78 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi No: TBG/0342008

1. ÖZET

Osteopontin (OPN) (*bone sialoprotein 1* (BSP1), *early T-lymphocyte activation 1* (Eta-1), *secreted phosphoprotein 1* (SPP1)) kemik, böbrek gibi çeşitli dokularda ve aynı zamanda T lenfositler, makrofajlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, epitel hücreleri gibi farklı birçok hücre tipinde eksprese olur. OPN, multipl skleroz (MS), sistemik lupus eritematosus (SLE), romatoid artrit (RA) gibi otoimmün hastalıklar ve Crohn hastalığı, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, böbrek hasarı gibi kronik inflamasyon ile karakterize olan hastalıklar ve çeşitli kanser tiplerinde önemli rol oynamaktadır. OPN rs1126616 polimorfizminin ürolitiazis, primer biliyer siroz (PBC) ve SLE ile ilişkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca OPN genindeki diğer tek nükleotit polimorfizmlerinin (SNP) taş hastalığı üzerindeki etkileri ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, 64 ürolitiazis hastası ve aile öyküsünde taş hastalığı olmayan 50 sağlıklı kontrolde OPN geni rs1126616 polimorfizminin taş oluşumu üzerindeki etkisini araştırmaktır. X ışını difraksiyon (XRD) yöntemi ile taş analizleri yapılan 62 kalsiyum oksalat ve 2 adet strüvit taş hastası toplamda 64 adet ürolitiazis tanısı konmuş hasta ile aile öyküsünde taş hastalığı bulunmayan 50 adet sağlıklı kontrolde OPN rs1126616 polimorfizminin sıklığı araştırıldı. Genotipleme, polimorfik bölgenin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmasının ardından restriksiyon uzunluk parça polimorfizmi (RFLP) yöntemi kullanılarak yapıldı.

Ürolitiazis hastalarında OPN genine ait CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla; %37.5, %43.7 ve %18.7; kontrol grubunda ise %80, %4 ve %16; hasta grubunda en az bir mutant T alleli taşıma sıklığı % 62.5 iken kontrol grubunda %20 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grubu vücut kitle indekslerine (VKİ) göre 25 kg/m²'den küçük (VKİ<25 kg/m²) ve 25 kg/m²'den büyük (VKİ>25 kg/m²) olmak üzere sınıflandırıldığında, VKİ>25 kg/m² olan ürolitiazis hastalarında en az bir mutant T alleli taşıma sıklığı %66.7 iken VKİ>25 kg/m² olan sağlıklı kontrollerin tamamı yabanıl tip (CC) olarak bulundu.

Sonuç olarak Türk popülasyonundaki taş hastalarının OPN rs1126616 polimorfizmini taşıma sıklığının yüksek olması ürolitiaziste OPN'nin önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca fazla tartılı ürolitiazis hastalarında bu polimorfizmin görülme sıklığının yüksek olması, ürolitiazis ile obezite arasında bir ilişki olabileceğini akla getirmektedir.

2. SUMMARY

Osteopontin (OPN) (bone sialoprotein 1 (BSP1), early T lymphocyte activation 1 (Eta-1), secreted phosphoprotein 1 (SPP1)) is found to be expressed various tissues including bone, kidney and in also T lymphocytes, macrophages, endothelial cells, smooth muscle cells and epithelial cells. OPN has an important role in various disorders as such; autoimmune disorders such as multiple sclerosis (MS), sistemic lupus erythematosus (SLE), rheumatoid arthrit (RA); characterized chronic inflammation related diseases e.g; Crohn disease, obesity, cardiovascular disease and renal injury and in various cancer types. Recent studies shows that OPN rs1126616 polymorphism is associated with urolithiasis, primary biliary sclerosis (PBC) and SLE. In the literature, other defined SNP's in OPN gene have also been investigated in order to define their role in urolithiasis.

The aim of our study was to investigate OPN rs1126616 polymorphism in 64 urolithiasis patients together with 50 healthy controls having no history of kidney stone in their families. Stones were analyzed for chemical composition by the use of X-Ray diffraction method. The analysis revealed that 62 of our patients were having calcium oxalate (CaOx) stone and only 2 struvite stone. The study groups were genotyped by using PCR-RFLP method.

In urolithiasis patients the genotype frequencies for OPN rs1126616 revealed the following results; CC, 37.5%; CT, 43.7%; TT, 18.7% and in control group the results were as follows; CC, 80%; CT, 4%; TT, 16%. In patient group the frequency of carrying at least one mutant T allele was found to be 62.5% and in control group 20%. The patient and control groups were also analyzed according to their body mass index (BMI). The groups were classified regarding to their BMI being bigger than or smaller than 25 kg/m². The results showed that 66.7% of patients with BMI>25 kg/m² were carrying at least one mutant T allele wheras the healthy controls with BMI>25 kg/m² were all having CC (wildtype).

Our results showed that OPN rs1126616 polymorphism is found to be significantly higher in Turkish urolithiasis patients. These results might be indicating the important role of OPN in urolithiasis. Our urolithiasis patients having BMI>25 kg/m² clearly showed that they are carrying at least one polymorphic allele. Interestingly, the link between urolithiasis and obesity need to be further studied in our population.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ürolitiazis çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları, metabolik anormallikler ve genetik faktörler gibi çeşitli etmenlerin rol oynadığı kompleks bir hastalıktır. Patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olup çeşitli teoriler öne sürülmektedir. Taş oluşumunda esas olay, çözeltide solüt yükü fazla olduğunda aşırı doygunluğa ulaşması ve bu durumun da taş oluşumuna neden olan kristallerin çekirdekleşmeye ve birikmeye başlamasıdır. Ayrıca kristalizasyon süreci çeşitli inhibitörler (sitrat, pirofosfat, glikozaminoglikanlar, nefrokalsin, Tamm-Horsfall, nefrokalsin) tarafından da etkilenebilir.

Osteopontin (OPN), kalsiyum taşı matriksinin bir bileşeni olup önemli ölçüde renal tubüllerde eksprese olur. Kristallerin çekirdekleşme, büyüme ve birikmesinde inhibitör mü, yoksa kristallerinin çökmesini ve renal tubüler hücre membranlarına bağlanmasını teşvik ederek taş oluşum sürecinde aktivatör rol mü oynadığı hala tartışmalı bir konudur.

Bu çalışmanın amacı, ürolitiazis tanısı konmuş 64 hasta ve 50 sağlıklı kontrolde OPN geni rs1126616 polimorfizm sıklığının, demografik özellikler ve hastalık oluşumu üzerindeki etkilerini araştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

Taş hastalığı (Ürolitiazis), üriner enfeksiyonlar ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemi etkileyen üçüncü patolojik durumdur. Üriner sistem taş hastalığı dünyada geniş bir topluluğu etkilemektedir. Prevelansı %5-12 arasında değişmektedir ve özellikle endüstrileşmiş toplumları daha fazla etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (1). Üriner sistem taş hastalığının neden olduğu morbidite ve mortalite bu hastalığın ne kadar ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermektedir (2).

Üriner sistem taş hastalığı yüksek oranda nüks eden bir hastalıktır. İlk ataktan sonra 3 yıl içinde yaklaşık %50 rekürrens oranına sahiptir. Üriner sistem taş hastalığının medikal tedavisinde amaç bu hastalığın rekürrensini önlenmesi ve var olan taş yükünün azaltılmasıdır. Üriner taş hastalığı oluşumuna neden olan birçok hastalık genetikdir. Hastalığa neden olan çeşitli genetik bozukluklar tanımlanmış ancak en önemli taş grubunu oluşturan kalsiyum içerikli taşların genetik patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (3).

4.1. ETİYOLOJİ

İdrar yollarında taşın oluşması kompleks, tam anlaşılmamış ve çok etmenli bir olaydır. Çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları ve metabolik anormallikler birlikte rol oynamaktadır. Ürolitiazis nüks eden bir hastalık olup patogenezi tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir, fakat çeşitli teoriler öne sürülmüştür (4, 5).

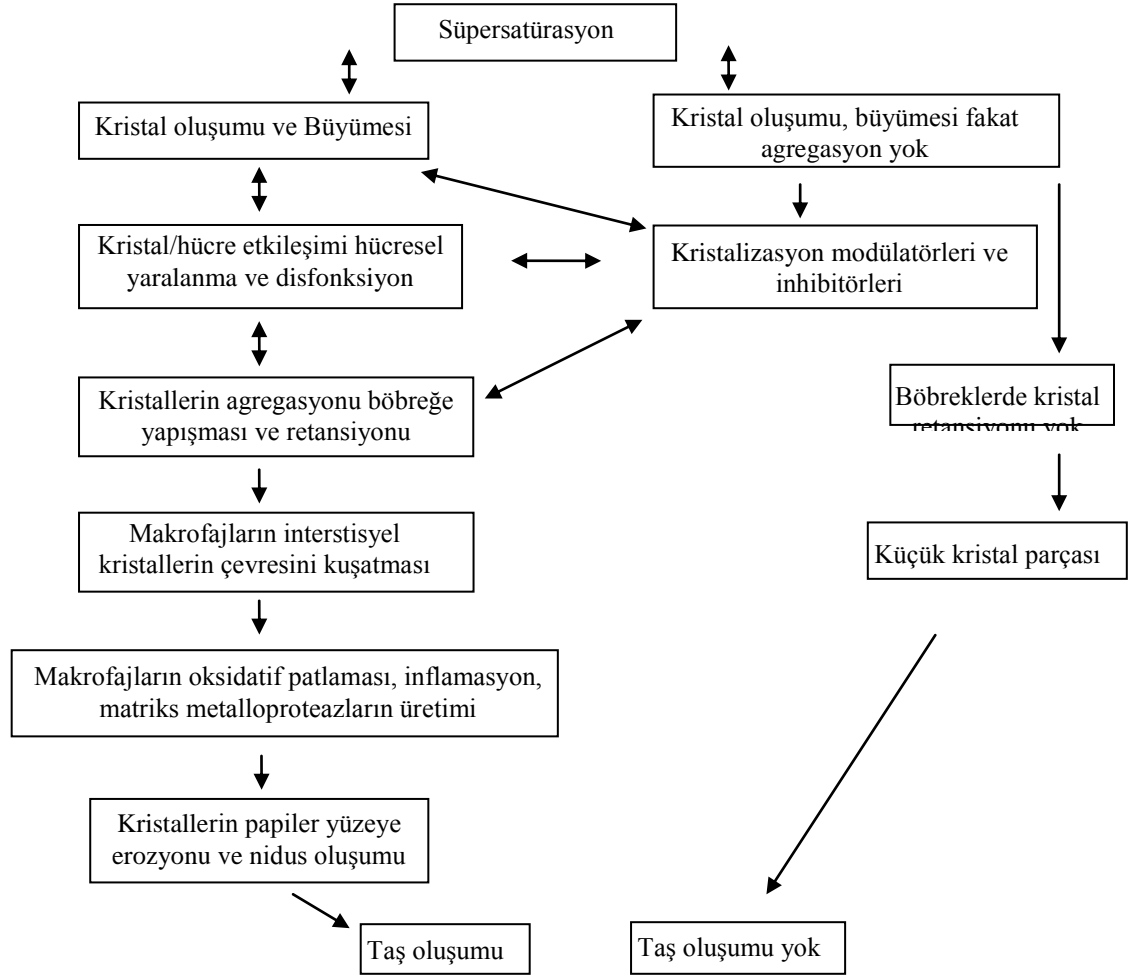
1. Süpersatürasyon-kristalizasyon teorisi
2. İnhibitör eksikliği teorisi
3. Matriks-nükleasyon teorisi
4. Epitaksi teorisi
5. Kombine teoriler

Taş oluşumunda esas olay süpersatürasyondur. Çözeltide solüt yükü fazla olduğunda aşırı doygunluk mevcuttur. Bu durum sadece böbrekteki madde miktarına bağlı olmayıp aynı zamanda idrar pH'sı, ısı, iyonik potense, çözünen maddenin yoğunluğuna ve

kompleks oluşturma yeteneğine bağlıdır. Aşırı doygunluk durumunda taş oluşumuna neden olan katı kristallerin nükleasyonu ve agregasyonu oluşur (6). Kristalizasyonun başlaması için gerekli doygunluk seviyesinde, termodinamik çözünlükten (thermodynamic solubility product – K_{sp}) bahsedilir. Bu değer sabittir ve katı-sıvı evrelerin dengede olduğu ortamda saf kimyasal elemanların konsantrasyonuna eşittir. Termodinamik çözünlük seviyesini açan konsantrasyonlar yayılmayı, kristallerin büyümesini ve heterojen nükleasyonu (çekirdek oluşumu) tetikleyebilme kapasitesindedir. Eğer idrardaki kalsiyum (Ca) ve oksalat (Ox) konsantrasyonları sudaki termodinamik çözünlüklerini aşarsa, kalsiyum oksalat kristalleri çökebilir. Bununla birlikte idrarın içerisindeki inhibitörler ve diğer moleküller sayesinde kalsiyum oksalat solüsyon ierisindekinden daha yüksek konsantrasyonda bulunabilir ve bu durumdaki idrara “metastabl” denir. Kalsiyum oksalat konsantrasyonu daha da arttırılırsa solüsyon olarak kalamayacak bir seviyeye ulaşmış olur. Bu konsantrasyonda (K_f) idrarda kalsiyum oksalat oluşumu meydana gelir. İdrardaki birçok taş komponentin konsantrasyonu K_{sp} ve K_f arasındaki metastabl aralıktadır. Kalsiyum oksalatın idrardaki konsantrasyonundan ziyade iyonların kimyasal aktiviteleri de kristalizasyonda etkilidir. Sitrata ve fosfata gibi maddeler kalsiyum ile; magnezyum ve sodyum gibi elementler ise oksalatla kompleks oluşturarak her birinin serbest iyon konsantrasyonunu azaltırlar (7).

İdrar süpersatürasyonu tek başına taş oluşumu için yeterli değildir. Normal kişiler idrarlarında kristal oluşum, gelişim ve agregasyon inhibitörleri taşırlar. Taş oluşumundaki bir teori taş oluşturana kişilerin, oluşturmayanlardan farkının üriner inhibitörlerin yokluğu veya düşük yoğunluklarda bulunmasıdır. Bu inhibitörler, sitrata ve pirofosfata gibi düşük molekül ağırlıklı maddeler olabildiği gibi glikozaminoglikanlar, nefrokalsin, Tamm-Horsfall proteini gibi daha büyük moleküller de olabilir. İdrar glikoproteinleri; nefrokalsin ve Tamm-Horsfall proteini basit solüsyonlarda kristal agregasyonunun potent inhibitörleridir. Sitrata ve magnezyum ise kristal gelişiminin inhibitörleridir (7).

Üriner matriks, genelde üriner taş oluşumunda rol alan, kristal yapısında olmayan bir mukoproteindir. Taş oluşmayan kişilerde üriner matriks inhibitör gibi davranır. Ayrıca, matriks bazı taşların oluşmasında tetikleyici rol oynar ve kristal birikiminin oluşmasında şablon görevi yapar (şekil 1) (6).



Şekil 1: Böbrek Taşının Oluşum Aşamaları (8) (Modifiye edilmiştir).

4.2. EPİDEMİYOLOJİ

Üriner sistem taş hastalığı endüstriyel toplumun %1-5'ine etki eden bir hastalıktır. Böbrek taşlarının endüstriyel toplumlarda en sık görülen tipi öncelikle kalsiyum oksalat ya da bunun hidroksiapatit kombinasyonudur (1).

Yetişkin beyaz erkeklerde ömür boyu taş oluşturma riski %20'dir. Bu oran bayanlarda %5-10 arasındadır. Ürolitiyazisli hastalarda rekkürens oranı ilk taş oluşumundan itibaren 5 yıllık bir süreç içinde %50'den yüksek olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte yetişkin siyah erkeklerde taş hastalığı beyaz erkeklere göre 1/3 ya da 1/4 oranında daha azdır (9).

Hastalığın oluşumunda irksal nedenler de önemli bir özellik olarak göze çarpmaktadır. Taş hastalığı prevalansı ABD’de %2-8 (10), Avrupa ülkelerinde %3-11 arasında değişmektedir (11, 12). Bu oran Güney Kore’de %3.5 (9), Japonya’da %7 olarak verilirken erkeklerde %9.6, kadınlarda ise %4.5 olduğu bildirilmektedir (13).

Ülkemizde Akdeniz, Karadeniz ve Güneydoğu bölgelerinde taş hastalığının prevalansı yüksektir. Türkiye’de yapılan çok merkezli bir çalışmada, hastalık prevalansının %14,8; hastalık insidansının da %2.2 olduğu rapor edilmektedir. Hastalığın en sık 30 ve 40’lı yaşlarda görüldüğü, erkeklerde 1.5 kat daha fazla olduğu, düşük sosyoekonomik seviyeli kişilerde ve düşük eğitim seviyeli bireylerde daha sık görüldüğü, buna karşılık şehirde ve kırsal alanda yaşayanlar arasında prevalans açısından farklılık saptanmadığı bildirilmektedir. Çalışmada altı çizilen bir başka nokta da hastalığın tekrarı ve girişim gerekliliğinin sıklığıdır. Taş nedeniyle tedavi görmüş olanların %16’sının iki veya daha fazla girişim geçirdiği rapor edilmiştir. Tüm bu bulgular, üriner sistem taş hastalığının Türkiye’de endemik olduğunu vurgulamaktadır (14).

Stamatelou ve ark’nın yaptığı bir derleme de ise, taş hastalığı prevalansının tüm yaş dekadlarında arttığını göstermektedir (15). Taş hastalarının %67’sinde 1.5 ile 8 yıl arasında tek ya da birden fazla nüks’e rastlanır (16). Nüks eden vakalar idiopatik kalsiyum taşları ve ürik asit taşlarıdır. Çocuklarda ise taş hastalığı, testosteron nedeni ile karaciğerde yapılan endojen oksalat miktarı az olduğundan her iki cinste de yakın oranda görülmektedir (17).

Su alımı taş oluşumunda oldukça önemlidir (18, 19). Günlük idrar miktarını 800 ml’den 1200 ml’ye çıkarmak bile taş oluşumunu %86 azaltır (20). Araştırmaların bir kısmı, kalsiyum fosfat gibi maddeleri içeren aşırı sert suların taş oluşumunu kolaylaştırdığını bildirmesine karşın, diğer bir kısım araştırmacı sodyum karbonat gibi maddeleri içeren yumuşak suların da bu olayı arttırdığını bildirmişlerdir (19, 21).

Diyet faktörü de taş oluşumunda önemli bir faktördür (22). Pürin, oksalat, kalsiyum, fosfat ve diğer maddelerin diyetle aşırı alınması idrarla bu maddelerin aşırı atılmasına ve taş oluşumunun kolaylaştırılmasına yol açabilir (23, 24). Diyetle alınan fazla şeker böbrek taşına neden olabilir. Şekerin idrar kalsiyumunu arttırdığı ileri sürülmektedir. Aşırı tuz alımı nedeniyle böbrek tubülüslerinden sodyumun reabsorbsiyonu sonucu kalsiyumun tübüler sekresyonu, hiperkalsiüriye neden olarak taş oluşum riskini artırır (1).

Yapılan çalışmalar; rahat yaşam tarzı süren büro personelinde, aktif çalışan işçilere oranla üriner sistem taş hastalığının daha fazla olduğunu göstermektedir (1). *Vahlensieck*

ve *ark.* ise taş hastalığından en çok emeklilerin, daha sonra ise ev kadınları ve memurların etkilendiğini bildirmektedir (11).

4.3. TAŞLARIN YAPISI

Böbrek taşları golf topu kadar büyük olabileceği gibi kum tanesi kadar küçük; yüzeyleri düz, asimetrik, sivri vb. şekillerde; çoğu sarı-kahverengi renkte olup kimyasal bileşimine göre bronz rengi, altuni veya siyah renkte olabilir. Böbrek taşlarının kimyasal içerikleri farklılık göstermekle beraber temel olarak kristal ve matriks bileşeni olmak üzere iki bileşenden oluşur (25).

4.3.1. Kristal Bileşeni

Taşlar esas olarak bir kristalize bileşenden ibarettir. Büyüklük ve saydamlığı polarizasyon mikroskobu ile kolayca tanımlanabilir. Taşların geometri ve yapılanmasını değerlendirmek için X-ışını difraksiyon mikroskobu tercih edilir.

Kristal oluşumunda çekirdekleşme (nükleasyon), büyüme ve kümeleşme (agregasyon) gibi birden fazla aşama vardır. Çekirdekleşme taş oluşumu sürecini başlatır. Proteinli matriks, kristaller, yabancı cisimler ve diğer partiküllü dokuları içeren çeşitli maddeler bu sürecin tetiklenmesine neden olabilir. Daha az enerji gerektiren ve daha az yoğun idrarda oluşabilen heterojen çekirdekleşme (epitaksi) taş oluşumunun ortak paydasıdır. Bu nedenle bir kristal tipi benzer bir kristalize çatıyı içeren başka bir tipin çekirdekleşmesi için bir odak oluşturur. Bu model, kalsiyum oksalat oluşumunu başlatan ürik asit kristallerinde sık görülür. Odakların büyüyüp, topaklaşarak idrar yollarından kolayca geçemeyecek büyüklükte bir taş haline gelmesi zaman alır (25).

4.3.2. Matriks Bileşeni

Üriner taşların kristalleşmemiş matriks bileşenin miktarı, idrar taşının tipine göre değişiklik göstermekle birlikte taş ağırlığının %2 ile %10'unu oluşturur. Esas olarak proteinden az miktarlarda heksoz ve heksozaminden ibarettir. Kristal kümeleşmesi için bir çekirdek veya küçük kristal bileşenleri yapıştıran ve böylece taşların idrar yollarından

herhangi bir olaya neden olmaksızın düşmelerini engelleyen doğal bir yapıştırıcı görevi görebilirler. Diğer taraftan matriks, taş oluşumunda engelleyici bir rol oynayabilir veya herhangi bir aktif katkısı olmayabilir (25).

4.4. TAŞ TIPLERİ

4.4.1. Kalsiyum Taşları

Günümüzde en çok görülen taş, kalsiyum oksalat (CaOx) ve kalsiyum oksalat-kalsiyum fosfat karışımı olan mixt taşlardır (26). Böbrek taşlarının %80'i kalsiyum içerir (27). Ca taşları çoğunlukla mixt tipte bulunur. CaOx taşları monohidrat (COM-Whewellite) veya dihidrat (COD-Weddellite) olarak ya da ikisinin kombinasyonu şeklinde bulunur (26). Hiperkalsiüri, idrar miktarının azalması ve inhibitör aktivitesindeki düşüklük, kalsiyum çökmesi ve agregasyonu için risk faktörüdür. Kalsiyum tuzlarının oluşum süreci oksalat ve fosfatın idrar pH'sındaki kullanılabilirliğine bağlıdır. Düşük pH CaOx taşlarının oluşumunu kolaylaştırırken kalsiyum fosfat çökmesi için düşük pH önemli bir belirteçtir (28).

4.4.2. Kalsiyum Dışı Taşlar

Enfeksiyon taşları olarak bilinen strüvit taşları tüm taşların %10-15'ni oluşturur. En çok kadınlarda bulunur ve hızla nüksedebilirler. Strüvit taşları *Proteus*, *Pseudomonas*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* ve *Mycoplasma* benzeri üreyi parçalayan bakterilerin yol açtığı bir enfeksiyon sonucu oluşur ve magnezyum, amonyum ve fosfattan (MAP) idrarın doymuş olması gerekir. Enfeksiyon olsa bile idrar pH'ı 5.85'in üzerine çıkmadıkça struvit taşları oluşmaz. MAP taşı olan bir hastanın idrar pH'sı 6.8-8.3 arasında olup nadiren 7'nin altına düşer ve bu yüksek idrar pH'ında MAP kristalleri çöker (25, 28).

Ürik asit taşları tüm idrar yolları taşlarının %5'inden azını oluşturur ve sıklıkla erkeklerde rastlanır. Yüksek ürik asit düzeyleri sıklıkla dehidratasyon ve aşırı pürin alımına bağlıdır. Sürekli düşük idrar pH'ı önemli bir risk faktörüdür. Anormal intestinal mukozal emilime ve sistin, ornitin, lizin ve arginin dahil dibazik aminoasitlerin renal tübüler emilimine neden olan bir kalıtsal metabolik bozukluk sistin taşlarına neden olur (25).

Klasik sistinüri otozomal resesif kalıtımla taşınır ve bu defektin tek belirtisi sistin taşlarıdır. Tüm üriner taşların %1-2'sini temsil eder. Sistin taşları sıklıkla kalsiyum taşlarıyla ve bunlarla bağlantılı metabolik anormalliklerle ilişkilidir (25).

Ksantin oksidaz aktivitesinin yokluğu ya da azlığı sonucu ksantin taşları oluşur. Bu enzim normal olarak hipoksantin ve ksantine ve ksantin ürik aside oksidasyonunu kataliz eder. Ksantin oksidaz eksikliği olan hastaların %25'inde üriner taşlar gelişir (25) .

4.5. BÖBREK ANATOMİSİ

4.5.1. Embriyolojik Gelişim

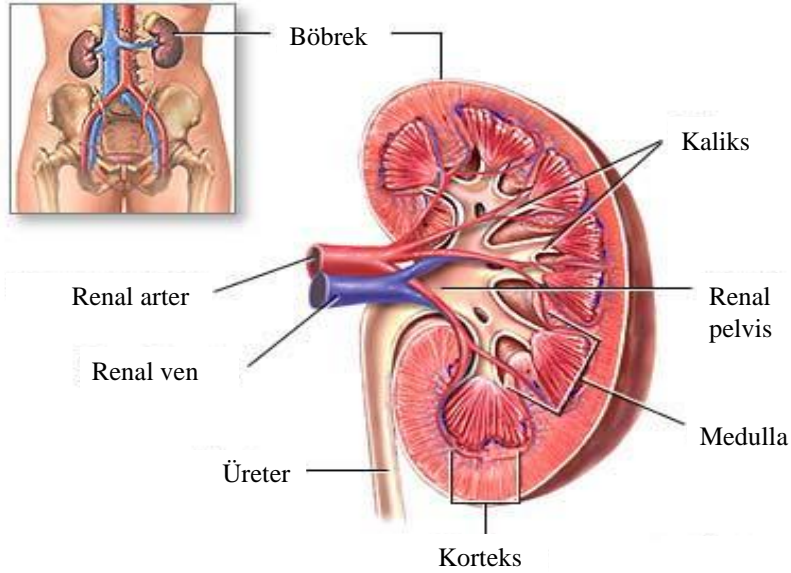
Böbreğin gelişimi üreterik tomurcuktan (*ureteric bud*) olur ve erişkin böbrekte metanefrojenik mezankimle beraber tubülogenez başlar. 26 farklı hücre tipi ortaya çıkar. Üreterik tomurcuk kollektör tüplerin epitelyal hücrelerine, mezankimal yapı ise geri kalan tubülüslerin ve endotelin yapımında rol oynar. Metanefrotik mezengial hücrelerden kollektör kanallar hariç bütün epitelyal hücreler üretilebilir. Bu bulgular böbreğin kök hücrelere (*stem cell*) sahip olduğunun bir belirtisidir. Embriyolojik gelişimde bazı büyüme faktörlerinin rolü vardır. Bunlardan vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) humoral, inflamatuvar ve hormonal vaskülogenezde önemli rol oynamaktadır.

Renal mezankimal apoptoz, böbreğin embriyolojik gelişmesini düzenleyici rol oynamaktadır. Apoptozu ayarlayıcı sistemde meydana gelebilecek dengesizlik, mesela apoptozdaki artış doğuştan nefron azlığına ve bununla ilgili bazı hastalıklara yol açabilmektedir (29).

4.5.2. Makroskopik Anatomi

Her biri ortalama 150 gram ağırlığında olan böbrekler radyolojik görüntülerde yaklaşık üç buçuk vertebra büyüklüğünde, uzunluğuna 12-13 cm, enine 7-8 cm, derinliğine 3 cm civarında bir yer tutarlar. Sağ böbrek karaciğer basısı dolayısıyla daha aşağıdadır. Böbrekler kalp atım hacminin yaklaşık dörtte birini alırlar (dakikada 1.2 litre kan). Bu kanın 120 ml'si bir dakikada glomerülerden filtre olur (glomerüler filtrasyon değeri).

Böbreğin sagittal kesitinde üç bölüm vardır. Bunlar korteks, dış medulla (iç ve dış bölümleri var) ve iç medulladır. Kısa nefronlar iç medullada yoktur. Glomerüller, kortekste bulunur. Proksimal ve distal tubülusun bükümlü kısımları da burada yer almaktadır (Şekil 2) (29).



Şekil 2: Böbreğin Sagittal Kesiti

4.5.2.1. Nefron

Makroskopik olarak böbreğin en küçük anatomik ve fonksiyonel ünitesi nefrondur. Yaklaşık 50 mm uzunluğundadır ve her iki böbrekte yaklaşık iki milyon kadar bulunur. Nefron sayısı insandan insana değişebilir. Bir nefronun yapısı aşağıda görülmekte olup, glomerül, proksimal tubülüs, Henle kulpu, distal tubülüstten ve birkaç nefronun açıldığı kollektör kanallardan ibarettir. Glomerüller, proksimal ve distal tubülüsler kortekste, kollektör kanallar ve henle kulpunun bir kısmı medullada bulunmaktadır. İki tür nefron vardır. Kısa henle kulpu olan nefron korteks ve dış medullada, uzun henle kulpu olan nefron ise dış ve iç medullada bulunmaktadır (29).

4.5.2.2. Glomerül

Glomerül, dış kaynaklı ilaç ve toksinlerin vücuttan atılmasında, üre, kreatinin, ürik asit gibi sabit metabolik ürünlerin ve ayrıca sodyum başta olmak üzere elektrolitlerin süzülmesinde rol oynamaktadır. Glomerülün süzme (filtrasyon) kabiliyeti sabit olmayıp diğer kapillerler gibi bazı faktörlere de bağlıdır. Bu faktörlerden hidrostatik ve onkotik basınç, filtrasyon yüzeyindeki kan akımı ve permeabilite değişiklikleri ön planda gelir. Glomerülün yapısı üç ana hücre tipi (epitelyum, mezangial ve endotelial hücreler) ve ekstrasellüler olarak da, filtrasyon fonksiyonu olan iki ekstrasellüler bölgeden (glomerüler bazal membran ve mezangial matriks) oluşmaktadır.

Glomerüler bazal membran, ağırlıklı olarak kollajen ve glikoprotein (%10) elemanlarından ibarettir. Glikoproteinler siyalik asit içerir. Orta tabaka (lamina densa) ağırlıklı olarak tip IV kollajen içerir ve elektron mikroskopunda yoğun olarak görünür. Dıştaki subepitelyal tabaka ise laminin ve glikozamin gibi glikoproteinlerden ibarettir. Glomerül bazal membranın 50 Å büyüklüğünde moleküllere geçirgen olduğu halde, 36 Å büyüklüğündeki albumini geçirmemesi bazal membran geçirgenliğinde elektroşimik olayların rolünü göstermektedir. Glomerül endotel hücreleri, siyalik asit tabakası ve bazal membran negatif yükle yüklüdür (29).

4.5.2.3. Podositler

Glomerül visseral epitelyumyal hücrelere bu isim verilir. Mezangial özellikleri de vardır. Kontraktil fonksiyonlara da sahiptirler. Ayaksı cisimlerin (Podosit foot process) bazolateral bölümleri podosit fonksiyonunun merkezidir. Paryetal epitelyumyal hücreler ise Bowman kapsülünü oluştururlar ve proksimal tubülüs epitelyumyale devam ederler. Podositler ayakcıklarla bazal membrana dayanırlar. Hem bunlar hem de bunların aralarındaki slit diyafragmanın negatif yükü, salgıladıkları protein gibi maddelerle (podosin, nefrin, alfa-aktin katherin, FAT, CD2AP vs) sağlanır (29).

4.5.2.4. Tubülüsler

Proksimal tubülüs hücreleri kübik yapıdadır ve villuslara sahiptirler. Bu villuslar tubülüs emilim yüzeyini arttırmaları. Bu hücrelerde büyük miktarda ribozom ve mitokondriler vardır ki bunlar hücrenin metabolik aktivitesi ile yakından ilgilidir. Proksimal tubülüs hücreleri bir yandan tüp lümeni diğer yandan peritübüler kapillerler ile temas halindedirler. Glomerülden süzülen sodyum ve suyun %60-70'i nefronun proksimal tubülüs kısmından geri emilmektedir. Ayrıca potasyum, glikoz, ürat, küçük molekül ağırlıklı proteinler, aminoasit, üre, bikarbonat, fosfat, sülfat, kalsiyum değişik miktarlarda buradan emilmektedir. Proksimal tubülüs suya, küçük ve büyük iyonlara karşı geçirgendir. Bu kadar büyük geçirgenliğe rağmen, tübüler sıvı ile peritübüler ekstrasellüler sıvı arasındaki ozmotik basınç ve sodyum, potasyum, klorür konsantrasyonları dengeli bir şekilde muhafaza edilebilmektedir (29).

Henle kulpu; proksimal ve distal tubülüsler arasında kalan U şeklinde olan bölümdür. Büyük kısmı medulladadır ve medulla hipertoniclerin oluşumunda büyük rol oynar. İnce inen, çıkan ve kalın çıkan kısımları vardır. Kalın çıkan kısmı distal tubülüse dahildir. İnen ince kol, proksimal tubülüs gibi suya karşı çok geçirgendir ve aquaporin I isimli kanalcık proteinlerini içerir. İnce kolun çıkan kısmı ise suya karşı geçirgen değildir. Çıkan kalın kısım ise (dilüsyon segmenti) suya geçirgen olmayıp sodyuma geçirgendir ve sodyumun buradan aktif olarak (Na^+ pompası) peritübüler bölgeye (medulla, intersisyum) aktarılması, meduller hipertoniclerin oluşmasına neden olur. Su buradan vasorektalarla sistemik sirkülasyona geçer ve inen kulpla beraber idrarın dilüsyonunun gerçekleşmesinde önemli rol oynar (29).

Distal tubülüs; henle kulpunun çıkan kalın kısmı, makula densa ve bükümlü bölümlerden oluşur. Düz ve bükümlü distal tubülüslerden sodyum klorür aktif olarak emilir. İdrarın dilüsyonu ve konsantrasyonunu sağlayan zıt yönlü akım çoğaltıcı mekanizma burada önemli rol oynar (29).

Konnektif (bağlayıcı tubülüs) tubülüs; distal tubülüs ve kollektör kanalları bağlayıcı bölümdür. Bu kısım son distal tubülüs olarak da tanımlanmaktadır. Bu bölüm amilorida duyarlıdır. Böylelikle sodyum emilimi ve potasyum atılımı gerçekleşir (29).

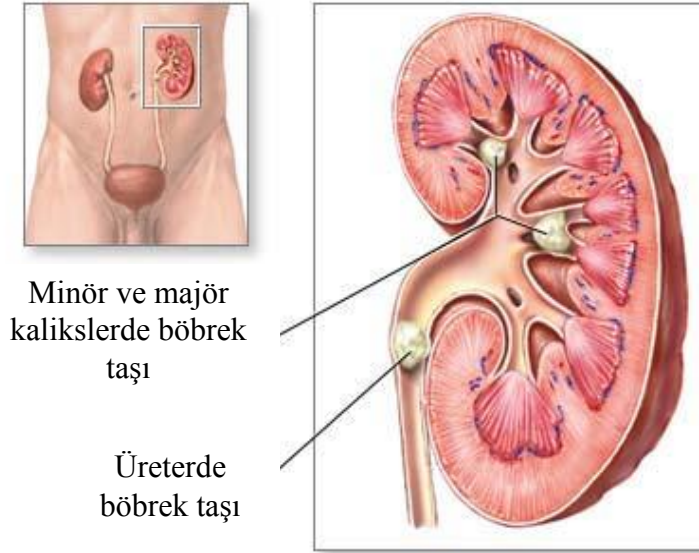
Kollektör kanallar; bağlayıcı bölüm (*connecting tubule*), kortikal ve meduller kollektör kanallardan oluşur. Bir kollektör kanala ortalama 11 nefron açılır. 2500-3000

kollektör kanalda bir böbrek papillasına açılmaktadır. Kollektör tüp kanalları içinde suya geçirgen kanalcık proteinleri vardır. Bu protein içeren kanalcıklar antidiüretik hormonla aktive olurlar ve suyun hipertonic medullaya emilimi ve sonuçta idrarın konsantrasyonunda önemli rol oynarlar (29).

Böbrek önemli bir endokrin organ olarak renin, eritropoetin, 1-25 dihidroksikole kalsiferol, prostaglandin ve kinin salgılar. Birçok hormon için de (steroidler, antidiüretik hormon vs.) hedef organ görevini yapar. Ayrıca son yılların en şaşırtıcı bulgularından olan akuaporinler (su kanalları görevini yapan proteinler) yoluyla da özellikle kollektör tubülüslerde hücresel seviyede su geçirgenliğini sağlar (29).

4.6. ÜRİNER SİSTEMDE TAŞLARIN YERLEŞİM YERLERİ

Taşların şekli geliştiği yerin anatomik yapısından etkilenmektedir. Endüstriyel toplumlarda üriner taşların %97'si renal parankim, papilla, kaliks, renal pelvis veya üreterde bulunurken, %3'ü mesane veya üretrada bulunmaktadır (Şekil 3) (30).



Şekil 3: Böbrekte Taşların Yerleşim Yerleri

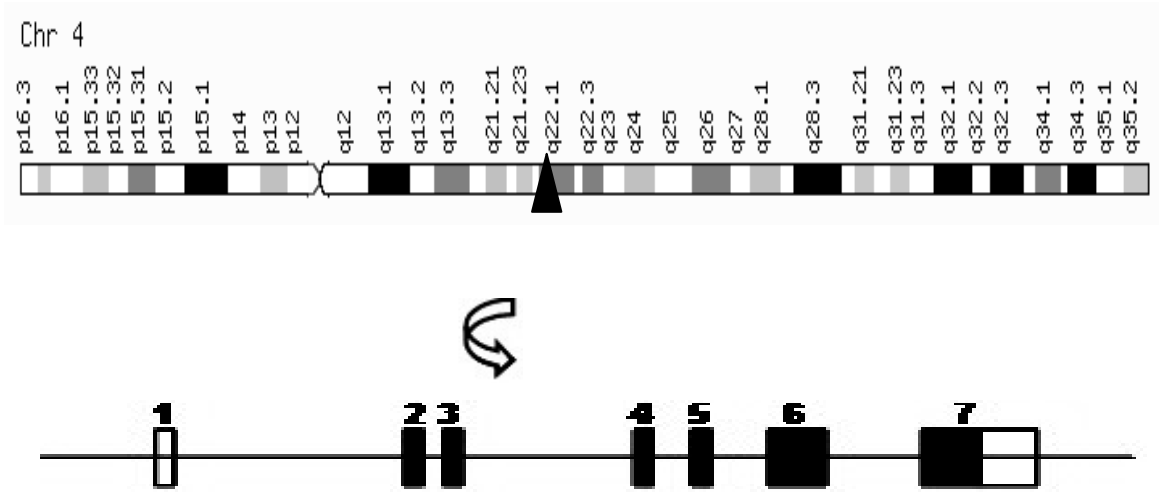
4.7. ÜROLİTİYAZİS İLE İLGİLİ GENETİK ÇALIŞMALAR

Çevresel faktörlerin yanı sıra aile öyküsü gibi genetik faktörler de böbrek taşı patogenezinde önemli rol oynamaktadır (31, 32). Ürolitiyazisin poligenik ve kısmi penetrans bir bozukluk olduğunu gösteren kesin sonuçlar *Coe ve ark.* ve *Goodman ve ark.* tarafından yapılan genetik çalışmalar ile gösterilmiştir (33, 34). Ürolitiyazis hastalığının kısmen de olsa kalıtımla aktarılabilceği Vietnam Era Twin Registry tarafından yapılan ikiz çalışması ile gösterilmiştir (35). Yakın zamanda *Edvardsson ve ark.* tarafından yapılan çalışmada, İzlanda popülasyonundaki ürolitiyazis hastalarında kalıtsal özellikleri inceleyerek genetik faktörlerin bu bireylerde böbrek taşı geliştirme riskini oldukça etkilediği gösterilmiştir (36).

Tek nükleotit polimorfizmleri (*Single nucleotide polymorphism*) (SNP), kompleks hastalıklar ile ilişkili genleri haritalamada kullanılır (37). Vitamin D reseptörü (38-41), androjen ve östrojen reseptörü (42), kalsitonin reseptörü (43), interlökin-1 β (IL-1 β) ve antagonist reseptörü (44, 45), interlökin-18 (IL-18) (46), ürokinaz (47, 48), vasküler endotelial büyüme faktörü (49), e-kadherin (50), heparan sülfat (51), manganez süperoksit dismutaz (52), böbrek taşı hastalığında aday gösterilen genler olup, bu genlerdeki polimorfizmler ürolitiyazis ile ilişkili bulunmuştur. Yakın zamanda klaudin-14 varyantlarının böbrek taşı ile ilişkisi olduğu genom boyu asosiyasyon çalışması (GWAS) ile gösterilmiştir (53). CaOx taş hastalığına spesifik olan genetik markerler risk grubunda olan bireyleri saptamak ve taş oluşumunu önlemek amacıyla yararlı olabilir. Dolayısıyla ürolitiyazis ile ilgili genlerin tanımlanması ve bu genlerdeki SNP'ler ve mutasyonların araştırılması hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır.

4.8. OSTEOPONTİN (OPN)

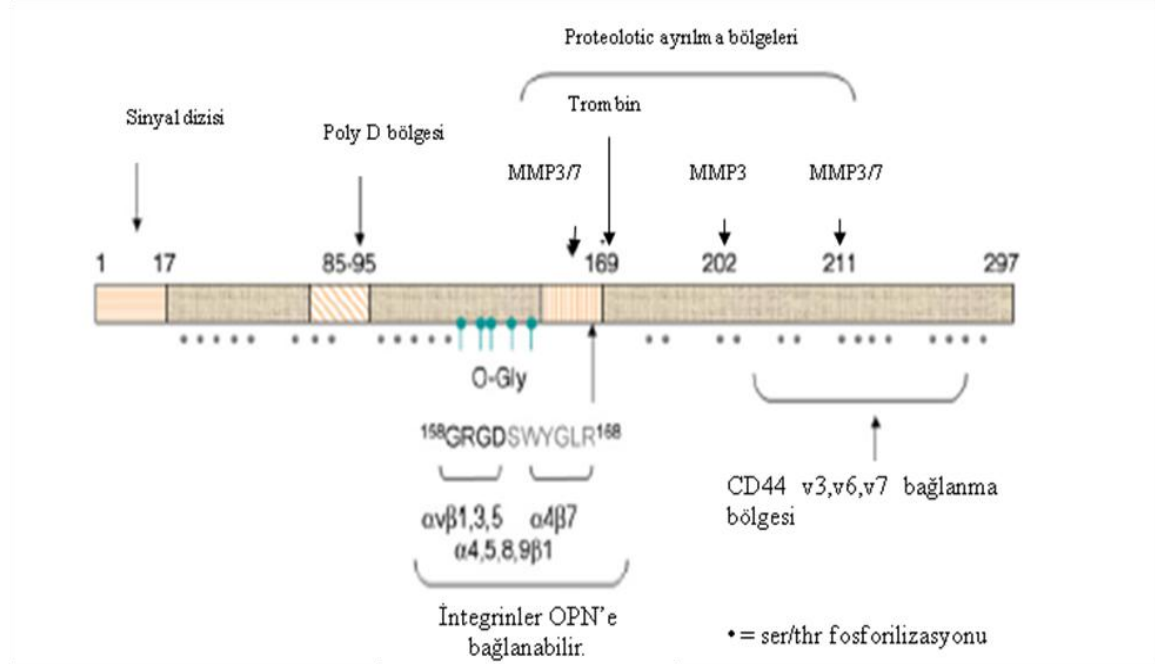
Osteopontin (OPN) (OMIM# 166490) yaklaşık 300 aminoasitten oluşan, 40 kiloDalton (kDa) ağırlığında negatif yüklü, hidrofilik ve fosforilize olmuş asidik bir glikoprotein olup ilk olarak kemikte major sialoprotein olarak tanımlanmıştır. *Bone sialoprotein 1* (BSP-1), *early T-lymphocyte activation 1* (Eta-1), *secreted phosphoprotein 1* (SPP-1) olarak da bilinmektedir (54, 55). OPN kodlayan gen insanda 4.kromozomun uzun kolunun 21 ile 25. bölgeleri (4q21-q25) üzerindedir (Şekil 4). Yaklaşık 11 kilobaz (kb) uzunluğunda olup 7 ekzon içermektedir (56). Böbrek, beyin, T lenfositler, makrofajlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, epitel hücreleri gibi farklı birçok hücre tiplerinde eksprese olur (57, 58). T lenfosit aktivasyonu, inflamasyon, hücre adhezyonu, sitokin ekspresyonu, hücre göçü, doku onarımı gibi birçok biyolojik görevi vardır (59).



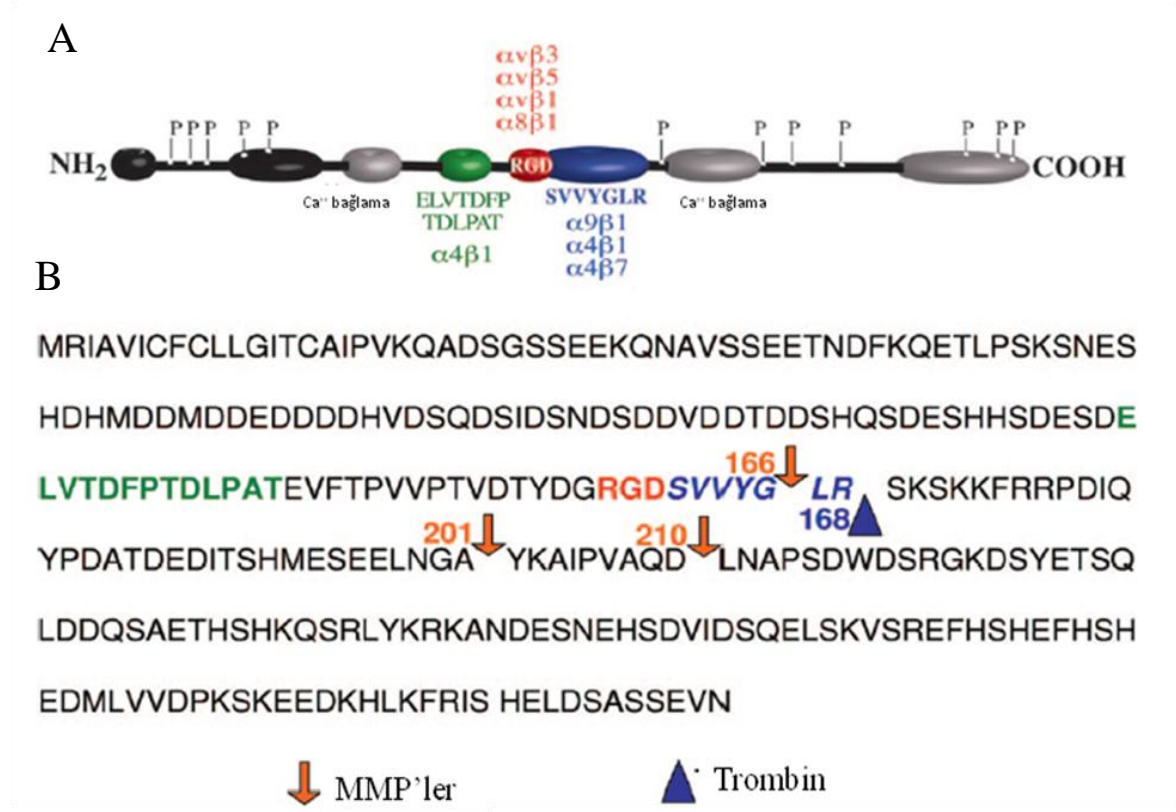
Şekil 4: OPN geninin kromozomal lokalizasyonu (▲ osteopontin geninin 4.kromozom üzerindeki yerinin işareti). Ekzon bölgeleri kutularla gösterilmiştir; siyah renkte olan kutular kodlanan, beyaz renkte olanlar ise kodlanmayan bölgeyi göstermektedir.

4.8.1. Osteopontin'in Yapısı

OPN; aspartik asit, glutamik asit ve serin aminoasitlerince zengin yaklaşık 300 aminoasitten oluşan bir glikoprotein olup SIBLING (*Small Integrin Binding Ligand N-linked Glycoprotein*) protein ailesi içerisinde yer almaktadır (60). En önemli karakteristik yapısı arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) dizisinden oluşan hücre bağlanma bölgesine sahip olmasıdır (Şekil 5) (59). Bu bölgeye çeşitli integrinler ve ekstrasellüler matriks proteinleri bağlanır (61). Bu bağlanmalar ile OPN hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimleri, hücre göçü, kemotaksi ve hücre içi sinyalleşme yollarını tetiklemektedir (62). Aynı zamanda bir kalsiyum, iki heparin bağlanma bölgesine de sahiptir (59). Hücre etkileşim bölgelerinin yanı sıra OPN'nin fonksiyonunun düzenlenmesinde önemli olan proteaz ayrılma bölgeleri de bulunmaktadır. RGD bölgesinin yakınında birçok türde bulunan oldukça korunmuş diziye sahip trombin ayrılma motifi (*trombin cleavage motif*) bulunmaktadır (Şekil 5 ve Şekil 6) (63). Trombin ayrılması ile OPN amino (N) ve karboksil (C) terminal bölgesi olmak üzere farklı sinyal fonksiyonları taşıyan 2 reseptör bağlanma bölgesinin oluşmasına neden olur. CD44v6 doğrudan, CD44v3 ise heparin köprüleri aracılığı ile C terminal bölgesine bağlanmaktadır (64). OPN'nin $\alpha_v\beta_3$ integrin reseptörüne verimli bir şekilde bağlanabilmesi için trombin ayrılması ve fosforilizasyon ile RGD bölgesini içeren N terminal bölgenin aktivasyonu ilk koşuldur (65). Yapılan çalışmalarda, bütün hücre dizilerinde trombin ayrılması ile OPN'nin hücrelere bağlanmasını ve ayrılmasını belirgin bir şekilde teşvik ettiği gösterilmiştir (63). Trombinin ayrılmasından sonra gizli bir integrin bağlanma bölgesi serin-valin-valin-tirozin-glutamatlösün-arjinin (SVVYGLR; insanda) açığa çıkar. Bu bölgeye α_4 ve α_9 integrinlerinin bağlanması ile hücre adhezyonu ve hücre göçü uyarılmaktadır (66). Son zamanlarda OPN çeşitli matriksmetalloproteinazlar (MMP'ler) için bir substrat gibi nitelendirilmektedir. MMP'ler, OPN'nin SVVYGLR bölgesini glisin ve lizin rezidülerinden ayırdığı gibi çeşitli bölgelerinde de yer almaktadır (Şekil 6). MMP'ler ile aktive olmuş OPN formları farklı bağlanma bölgeleri ile çeşitli integrinlere bağlanabilmekte ve böylece OPN etkinliğini ve hücre yanıtlarının değişmesini düzenlemektedir (67).



Şekil 5: OPN'nin yapısı. Soldan sağa: N-terminal sinyal dizisi OPN salgılandığında ayrılır ve proteinin salgılanmasını düzenler; aspartat rezidüleri bakımından zengin olan bölge hidroksiapatitin bağlanmasından sorumludur; O-glikozillenmeye uğrayan GRGD dizisi integrinlerin bağlanmasından sorumludur; C-terminalden YGL dizisine kadar olan trombin ayrılma bölgesi; C-terminal bölgesine doğru CD44 varyantlarının bağlandığı bölge. Metalloproteinazlar ile ayrılmaya yatkın bölgeler ve serin/treonin fosforilasyon bölgeleri gri noktalar ile gösterilmiştir (59).

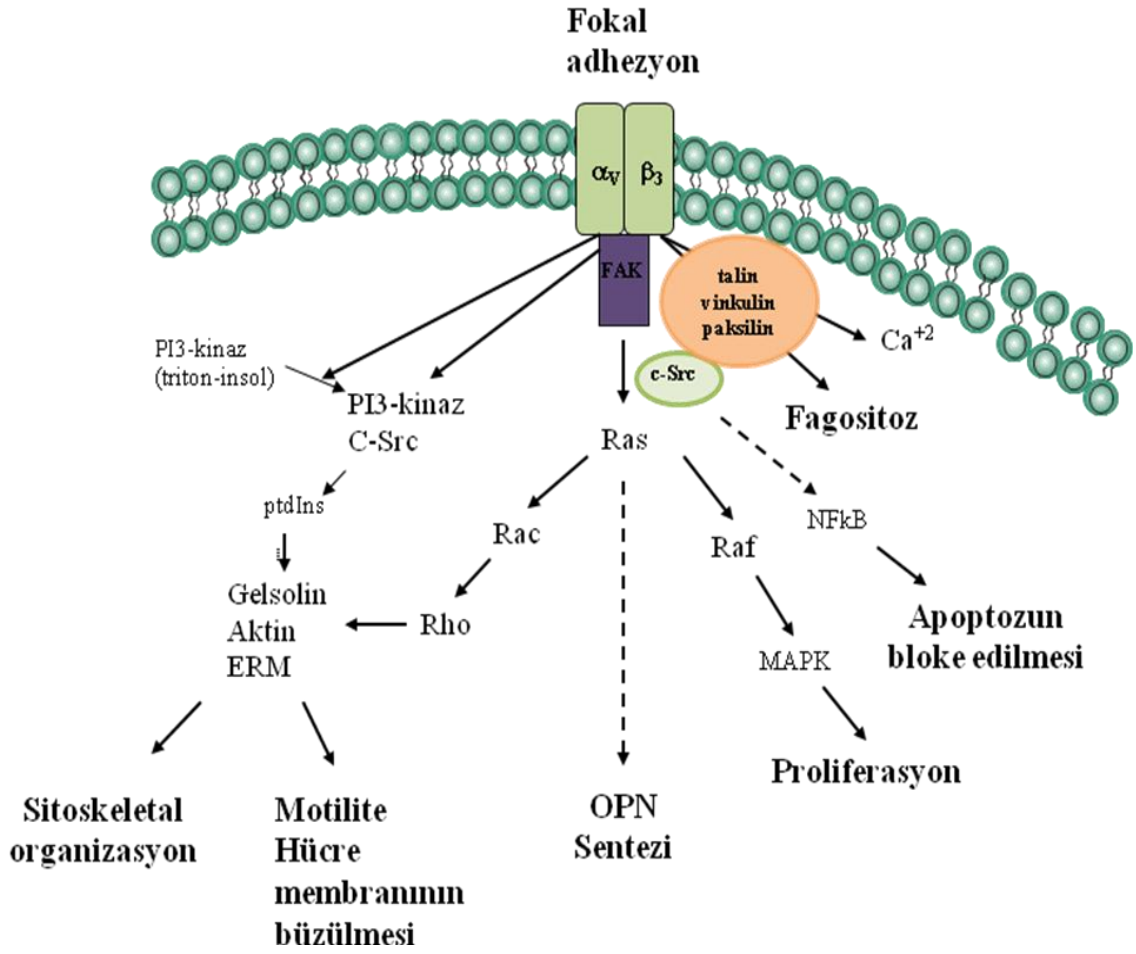


Şekil 6: **A)** OPN'nin yapısal özellikleri. Kalsiyum bağlanma bölgeleri gri renkte, diğer matriks bağlanma bölgeleri siyah renkte gösterilmiştir. Ayrıca fosforilizasyon bölgeleri de “P” ile gösterilmiştir. **B)** OPN'nin aminoasit dizisi. Bağlantı dizileri renkli olarak gösterilmiştir. Oklar ayrılma bölgelerini göstermektedir. Trombin ayrılma bölgesi mavi, MMP ayrılma bölgesi kırmızı ok ile gösterilmiştir (68).

Molekül, post-translasyonel modifikasyon (PTM) olarak O-glikozillenme (69), ser/thr fosforilizasyonu (69) ve sülfatlanmaya (70) uğrar ve bu modifikasyonlar OPN'nin fonksiyonunu etkiler (71). PTM bölgeleri birçok türde oldukça korunmuştur; ancak modifikasyon derecesi doku ve hücre tipine veya farklılaşma evresine bağlıdır (59). OPN'nin fosforilizasyonu molekülün yapısını, özelliklerini ve sinyal etkinliğini değiştirir (59) ve doğrudan mineralizasyonda etkisini göstermektedir; OPN'nin defosforilizasyonu sonrası hidroksiapatit kristellerinin büyümesini inhibe edici etkisi azalmışken (72), OPN fosforilizasyonu ile kalsiyumoksalat monohidrat (COM) kristallerinin inhibisyonunu belirgin şekilde arttırmıştır (73).

4.8.2. Osteopontin'in Regülasyonu

OPN ekspresyonunun düzenlenmesi günümüzde hala anlaşılmamış olup çeşitli hücre tipleri arasında değişiklik göstermektedir. OPN'nin ekspresyonu, transkripsiyon oranı, mRNA sentezi, stabilitesi ve translasyon ve post-translasyonel modifikasyonlar çeşitli hormon, sitokin ve büyüme faktörleri tarafından etkilenir (74). Genel olarak steroidler, retinoik asit ve glukokortikoidler ve sekosteroid hormon 1,25-dihidroksivitamin D3 kemik hücrelerindeki OPN ekspresyonunu artırır (75, 76). OPN ekspresyonu aynı zamanda çeşitli büyüme ve differansiyasyon faktörleri olan *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor- β s* (TGF- β s), *bone morphogenetic* proteinler (BMPs) ve enflamatuvar sitokinler ile upregüle edilir (74). OPN ekspresyonu hormonlar ve sitokinler ile *up-regüle* edilirken kemik (77) ve böbrekte (78) bisfosfonat ile baskılanır (Şekil 7).

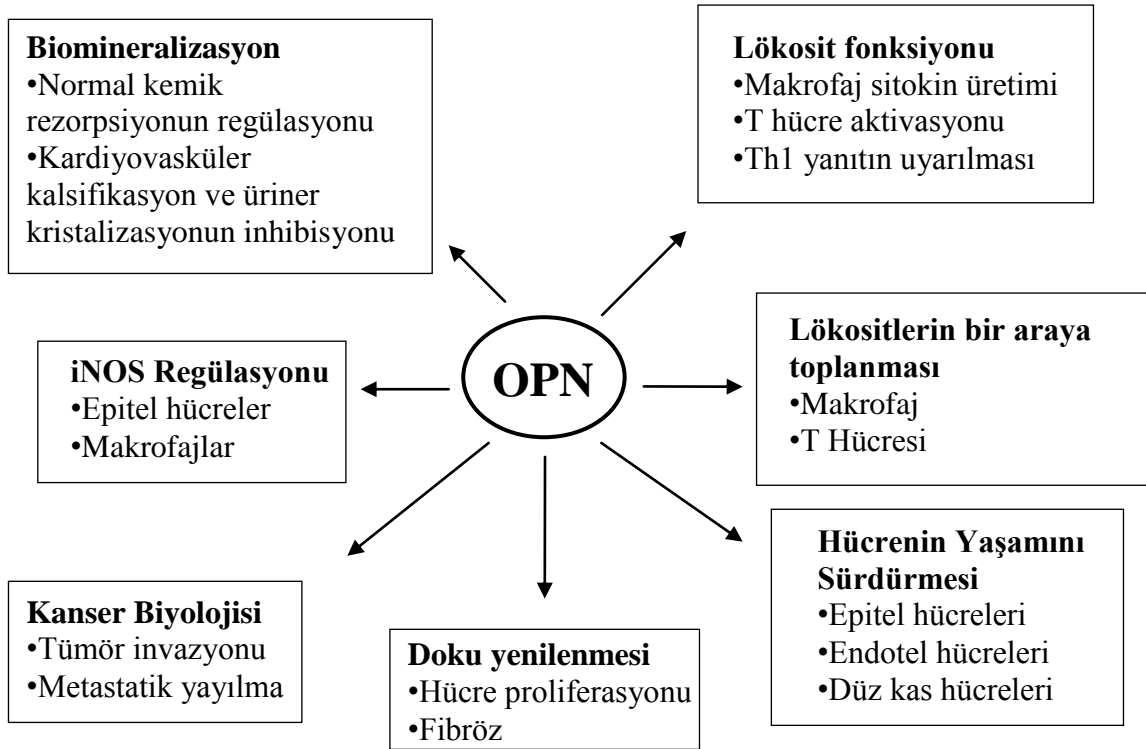


Şekil 7: OPN'in $\alpha_v\beta_3$ integrini aracılığı ile sinyal iletim yolağı. OPN'nin $\alpha_v\beta_3$ gibi integrinler ile bağlanması fokal adhezyon kinaz (FAK), paksilin, tensin ve Src'nin fosforilasyonuna yol açarak proliferasyon, sitoskeletal organizasyon, motilite ve apoptozun bloke edilmesini başlatır (62).

4.8.3. Osteopontin'in Fonksiyonları

OPN, kemiğin yeniden şekillendirilmesi ve rezorpsiyonunu düzenleme (79), düz kas hücrelerinin kalsifikasyonunu inhibe etme (80), biyomineralizasyonu düzenleme (81), tümör oluşumu ve transformasyonu (82), apoptoz (83), indüklenebilir nitrikoksitsentaz (iNOS) ekspresyonunun inhibisyonu (84) gibi birçok görevi bulunmakla beraber; makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, natural killer (NK) hücreleri, T ve B lenfositlerde önemli ölçüde eksprese olur ve hücrel bağışıklıkta rol oynar (Şekil 8) (59). Birçok kanser tipi ve inflamatuvar hastalıklarda biyomarker olarak tanımlanmıştır (64, 85).

Ayrıca, OPN'nin aşırı veya düzensiz ekspresyonu; multipl skleroz (MS) (86), sistemik lupus eritematozus (SLE) (87), romatoid artrit (RA) (88), otoimmün lenfoproliferatif sendrom (APLS) (89) gibi otoimmün hastalıklar; yüksek OPN serum düzeyi, Crohn hastalığı (90), obezite (91), kardiyovasküler hastalıklar (92), böbrek hasarı (93) gibi kronik inflamasyon ile karakterize olan hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 5: OPN'nin Çeşitli Önemli Biyolojik Fonksiyonları (54) (Modifiye edilmiştir).

4.8.4. Osteopontin'in Böbrek Taşı Oluşumundaki Rolü

Böbrek taşı oluşumunun erken evrelerinde OPN, Tamm-Horsfall protein, bikunin, üriner protrombin fragment-1 gibi birtakım uyarıcı faktörler kalsiyum kristallerinin distal renal tubüler hücrelerine adhezyonunu ve çökmesini teşvik eder (94). Bu kristaller ile distal renal tubüler hücreler arasındaki ilişkisinin böbrek taşı oluşum süresince önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (95, 96).

OPN, kalsiyum taşı matriksinin önemli bir bileşeni olup önemli ölçüde renal tubüllerde özellikle distal tubüllerde Henle kulpunun yukarı doğru çıkan ince kolunda eksprese olur (97) ve CaOx kristalizasyonunu inhibe edecek kadar yeterli miktarda idrara salgılanır (98). Bu miktar, taş oluşumu görülen hastalarda, sağlıklı bireylere göre daha düşük saptanmıştır (99). Yapılan *in vitro* çalışmalar, OPN'nin üriner formu olan üropontin'in CaOx kristallerinin nükleasyon, büyüme ve agregasyonunu ve doğrudan CaOx kristallerinin renal epitel hücrelerine bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (100-102). Poliaspartik asit sekansındaki kalsiyum bağlama özelliği ve serin fosforilasyon bağlanma bölgeleri ile doğrudan ilgili olduğu düşünülen bu inhibisyonun, aslında spesifik olarak kristal yüzey-asidik protein (özellikle HA {100} yüzeyi) ve fosforile proteinlerin-{010} yüzey bağlantılarına sebep olduğu düşünülmektedir (103, 104). OPN'nin, CaOx kristalizasyonunu, renal tubüler hücrelere CaOx monohidrattan (COM) daha az bağlanma özelliğine sahip CaOx dihidrat (COD) evresine yönlendirip COD oluşumunu uyardığı ve bu yolla da CaOx taş oluşumunu engellediği bilinmektedir (105).

Diğer taraftan bazı *in vitro* çalışmalarda OPN'nin CaOx kristallerinin çökmesini ve renal tubüler hücre membranlarına bağlanmasını teşvik ederek taş oluşum sürecinin erken evresinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (106, 107). Dolayısıyla OPN'nin taş oluşumu sürecinde inhibitör mü yoksa tetikleyici rol mü oynadığı hala tartışmalı bir konudur.

4.8.5. OPN ve Ürolitiyazis ile İlişkili Genetik Çalışmalar

Ürolitiyazis ile OPN arasındaki ilişkiyi gösteren ilk çalışma *Yamate ve ark.* tarafından Japon popülasyonunda yapılmıştır. Tek zincir konformasyonel polimorfizm (SSCP) ve dizileme yöntemi ile OPN geninde 250. pozisyonunda (Ala250) yer alan aminoasitte sinonim bir değişime yol açan substitüsyon (GCC→GCT; rs1126616) saptanmış; ürolitiyazis hastalarında taşınma sıklığı sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuştur ve bu polimorfizmin (rs1126616) ilk kez taş hastalığında ailesel olarak kalıtıldığı gösterilmiştir (108).

Gao ve ark.'nin yaptığı bir çalışmada; OPN geninde 9402 ve 9171. pozisyonda bulunan sinonim olmayan bir değişikliğe neden olan iki tane SNP ve bunların kalsiyum taşı geliştiren bireylerde taşınma sıklığı araştırılmıştır. 9171. pozisyonda bulunan SNP ile kalsiyum taşı geliştiren hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı bir farklılık saptanmamış iken 9402. pozisyonda bulunan SNP taş hastalarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş ve ürolitiyazis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (109). Aynı grubun yaptığı diğer bir çalışmada 11 kb uzunluğundaki OPN geni, Japon popülasyonunda sekanslanarak 6 tanesi yeni (*novel*) (olmak üzere toplamda 61 SNP saptanmıştır. *Novel* SNP'lerden 2 tanesinin OPN geninin promotör bölgesinde olduğunu ve bu polimorfizmlerin ürolitiyazis hastalarında sağlıklı bireylere göre yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 4 tane *haplotip-tagging* SNP (htSNP)'de yaptığı asosiyasyon analizi sonucunda; bir haplotipi koruyucu, diğer bir haplotipi ise risk haplotipi olarak saptamışlardır. Bu çalışma, OPN'i taş hastalığında hem koruyucu hem de risk faktörü olarak gösteren ilk genetik çalışma olduğu için önemlidir. (110).

Lee ve ark.'nin yaptığı çalışmada ise, Kore popülasyonundaki ürolitiyazis hastalarında OPN geninde 9250. pozisyondaki SNP'nin taşınma sıklığı araştırılmış ve ürolitiyazis hastalarında mutant alleli taşıma frekansı sağlıklı bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (111).

Henüz yayınlanmış olan *Liu ve ark.* tarafından Tayvan'da yapılan çalışmada, transkripsiyonel aktivite ve gen ekspresyonu üzerine fonksiyonel etkisi olan OPN'nin promotör bölgesindeki -66T/G, -156delG/G, -443T/C polimorfizmleri, üriner parametreler ile karşılaştırılarak kalsiyum taşı oluşumundaki etkileri araştırılmıştır. Ürolitiyazis hastaları ve sağlıklı kontroller arasında -66T/G ve -443T/C genotip dağılımları açısından anlamlı bir

farklılık saptanmamış iken -156delG/G genotip dağılımı karşılaştırıldığında, delG/delG genotipini taşıyan hastaların kalsiyum taşı geliştirme riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiş ve bu polimorfizmin genetik marker olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (112).

5. MATERİYAL VE METOD

5.1. MATERİYAL VE LABORATUVAR EKİPMANLARI

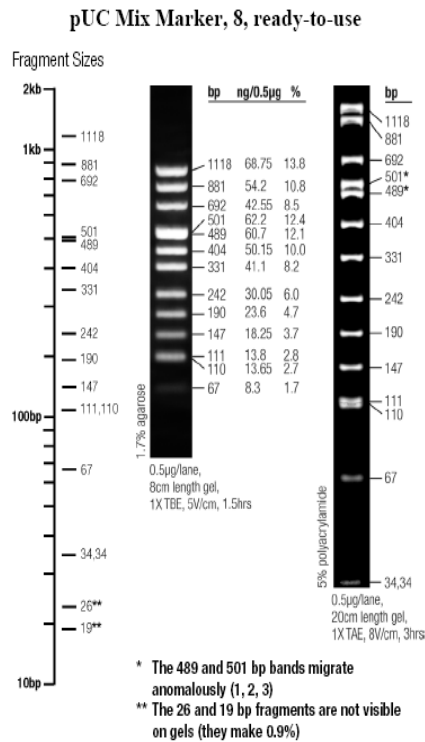
5.1.1. Aletler

| | |
|---|--|
| Santrifüjler | Beckman Coulter |
| PCR | Techne 512 Thermo Cycler Thermo Scientific |
| Spektrofotometre | Picodrop Microlitre Spectrophotometer |
| Elektroforez Ekipmanları | Thermo Scientific |
| Jel Sistemi | Thermo Scientific |
| Görüntüleme Sistemi | FotoDyne Incorporated |
| Jel Fotoğraf Sistemi | Mitsubishi |
| Pipetler | Thermo Scientific |
| Vorteks | Nüve |
| Distile Su Cihazı | Nüve |
| Hassas Terazi | Radwag |
| Su Banyosu | Precitherm |
| Mikrodalga | Arçelik |
| Buzdolapları (-20 C°, -80 C°, +4 C°) | Arçelik, SANYO, Regal |

5.1.2. Kimyasallar, Enzimler ve Markerlar

| | |
|----------------------|---------------------|
| Agaroz | Multicell |
| Bromfenol Mavisi | Fermentas |
| dNTP | Fermentas |
| EDTA | Multicell |
| Etidiyum Bromid | ApliChem |
| Glasiyal Asidik Asit | Carlo Erba Reagenti |

| | |
|---------------------------------|--|
| Etanol | Merck |
| İsopropanol | Sigma |
| MgCl ₂ | Fermentas |
| NH ₄ Cl | Pancreac |
| KHCO ₃ | Sigma |
| PBS Tablet | Zymed |
| Primerler | Integrated DNA Technologies, Inc XX IDT |
| Tris baz | Multicell |
| 10X PZR Tamponu | Fermentas |
| 10X Enzim Tamponu | Fermentas |
| Inhibitor Removal Buffer | Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit) |
| Wash Buffer | Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit) |
| Elution Buffer | Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit) |
| Taq polimeraz | Fermentas,Roche |
| Alu I | Fermentas |
| Proteinaz K | Roche (High Pure PCR Template Preparation Kit) |
| DNA Moleküler Ağırlık Standartı | Fermentas |



5.1.3. Kullanılan Kitler

DNA izolasyonu için ROCHE High Pure PCR Template Kit kullanılmıştır.

5.1.4. Çözeltilerin Bileşenleri ve Hazırlanışı

1) Etidiyum Bromid

Etidiyum bromid konsantrasyonu 10mg/ml olacak şekilde dH₂O ile sulandırıldı.

2) Gey's Solüsyonu

NH₄Cl 8,291 gr

KHCO₃ 1,001 gr

1000 ml dH₂O ile tamamlanır ve otoklavlanır.

3) TAE (Tris-Asetat-EDTA) Çözeltisi (500 ml, 5X)

Tris baz 242 gr

Glasiyal Asetik Asit 57.1 ml

4) EDTA 100 ml (0.5 M, pH 8.0)

1000 ml dH₂O ile tamamlanır ve pH 8.0'e ayarlanır.

5) Proteinaz K

100 gr liyofilize Proteinaz K 20 ng/ml olacak şekilde 4.5 ml dH₂O ile sulandırılır.

6) Inhibitor Removal Buffer

Kullanılmadan önce 20 ml %100 etanol eklendi.

7) Wash Buffer

Kullanılmadan önce 80 ml %100 etanol eklendi.

8) PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu)

1 adet tablete 100 ml dH₂O ilave edildi.

5.2. ÇALIŞMA GRUBU

Çalışmamıza, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği'ne başvuran 64 ürolitiazis hastası ve 50 sağlıklı kontrol alınmıştır. Hasta grubunu oluşturan kişilerin 18'i kadın (K) 46'sı erkek (E) iken sağlıklı kontrollerin 22'si kadın 28'i erkekten oluşmaktadır. Hasta ve sağlıklı kontrollerin; yaşları, özgeçmişleri, aile öyküleri, sigara kullanıp kullanmadıkları kayıt edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm kişilerin boy ve kiloları ölçülüp, vücut kitle indeksi (VKİ) hesaplandı. Ürolitiazis hastalarının taş cinsleri analiz edildi. Hasta ve kontrol gruplarına çalışmanın amacı açıklanarak hasta olur formları dolduruldu.

5.3. KULLANILAN İNCELEME YÖNTEMLERİ

5.3.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanma Koşulları

Hasta ve sağlıklı kontrollerin venöz kan örnekleri 4 ml' lik vakumlu steril K₃-EDTA' lı tüplere alındı. + 4 °C'de saklanan kanlardan daha sonra genomik DNA izole edildi.

5.3.2. Uygulanan Laboratuvar Analizleri

Hastaların taş analizleri, İstanbul Üniversitesi İleri Analizler Laboratuvarında X ışını difraksiyonu (XRD) yöntemi ile yapıldı.

5.4. OSTEOPONTİN GENİNİN ÇOĞALTILMASI VE 9250. POZİSYONDAKİ rs1126616 (NCBI-ID) POLİMORFİZMİN TESPİTİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER

Hasta ve kontrol grubuna ait kişilerden alınan venöz kan örneklerinden, lökosit izolasyonunu takiben genomik DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA örneklerinin kantifikasyonu yapıldı. DNA örnekleri, kalitelerinin kontrolü için *housekeeping* bir gen olan β Globin geni ile amplifiye edildi. Daha sonra, 252 bç'lik OPN gen ürününü çoğaltmak amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulandı. Çoğaltılan ürünlere, 9250. pozisyondaki genotiplerin belirlenmesi amacıyla restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) yöntemi uygulandı.

5.4.1. Lökosit İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubundan alınan 4 ml kan örneklerinden, Gey's solüsyonu ile eritrositler patlatılıp uzaklaştırılarak lökositler elde edildi. Alınan 4 ml kan örneklerinin üzerine 2 katı kadar (8 ml) Gey's solüsyonu eklendi. Tüpler, iyice çalkaladıktan sonra +4°C'de 20 dakika bekletildi. 3200 rpm'de 10 dakika santrifuj edildikten sonra süpernetant kısmı atıldı ve çöken lökositleri homojenize etmek amacı ile tüpe iyice vuruldu. Daha sonra 4 ml Gey's solüsyonu eklendi ve 3200 rpm'de 10 dakika santrifuj edildi. Süpernetant atıldı, üzerine 1000 ml fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklendi ve vorteks yapıldı. PBS içerisinde çözünen lökositler ependorf tüplere aktarıldı ve 10000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildikten sonra süpernetant atıldı. Elde edilen lökositlerden DNA izolasyon aşamasına geçildi.

5.4.2. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE) kullanılarak yapıldı. Elde edilen lökositlerin sayısı 10^6 - 10^7 ise 300 μ l PBS, 10^4 - 10^6 ise 200 μ l PBS ile çözdürüldü ve vorteks yapıldı. Üzerine sırasıyla 200 μ l Binding buffer ve 40 μ l Proteinaz K eklendi ve pipetaj yapıldı. 70°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 100 μ l isopropanol eklendi, örnek toplama tüpünün (collection tube) içine yerleştirilen filtre (filter tube)

tüpüne aktarıldı ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Filtre tüpü yeni bir toplama tüpüne alındıktan sonra 500 µl Removal buffer eklendi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Steril toplama tüpü yerleştirildi ve 500 µl Wash buffer eklendi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi (Yıkama aşaması iki kez tekrarlandı). Toplama tüpü değiştirildi ve herhangi bir solüsyon eklenmeden 14000 rpm'de 10 saniye santrifuj edildi. Ependorf tüpe geçirilen filtre tüpe 200 µl Elution buffer eklendi ve DNA'nın bağlanması için 5 dakika bekletildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildikten sonra filtre tüpü atıldı.

5.4.3. DNA Miktarının Ölçülmesi

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Picodrop Microlitre Spectrophotometer Version 3.0 ile ölçüldü. Her bir ölçümde 1µl DNA örneği, blank solüsyonu olarak da Elution buffer (Roche) kullanıldı. İzole edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu 260 nm optik dansitesinden (OD), saflığı ise 260 nm / 280 nm dalga boyundaki OD oranından tespit edildi. DNA konsantrasyonu formül a'da, saflığı ise formül b' de gösterilen şekilde hesaplanmıştır.

$$(a) \text{ DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{l)} = A_{260} \times \text{Sulandırım oranı} \times 50$$

$$(b) \text{ DNA saflığı} = A_{260} \times \text{Sulandırım oranı} \times 50 / A_{280} \times \text{Sulandırım oranı} \times 50$$

5.4.4. Primerlerin Hazırlanması

İzole edilen DNA örneklerinin kalitesini kontrol etmek amacıyla yapılan β Globin PZR primerleri ve OPN rs1126616 genotiplerinin belirlenmesi için kullanılan ileri ve geri primerler DNaz, RNaz içermeyen çift distile su ile çözündürülerek stok primerler hazırlandı (100 pmol/µl). Daha sonra stok primerler tekrar çözündürülerek (10 pmol/µl) -20°C'de saklandı.

Bu çalışmada β Globin PZR'ında ve OPN rs1126616 genotiplerinin belirlenmesi amacı ile kullanılan oligonükleotit primerlerin dizileri aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

| | İleri primer | Geri primer |
|---|---------------------------------|------------------------------------|
| β Globin primerleri | 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTA - 3' | 5'- CCACTTCATCCACGTTACC - 3' |
| Osteopontin rs1126616 primerleri | 5'- TACCCTGATGCTACAGACGAGG - 3' | 5'- CTGACTATCAATCACATC GGAATG - 3' |

Tablo 1: Oligonükleotit Primerlerin Dizileri

5.4.5. OPN geninde 9250. Pozisyondaki rs1126616 Polimorfizminin Bulunduğu Bölgenin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

Hasta ve sağlıklı kontrollere ait DNA örnekleri öncelikle kalitelerinin kontrolü için *housekeeping* bir gen olan β Globin geni ile daha sonra OPN geninde 9250.konumdaki polimorfik bölge PZR yöntemi ile amplifiye edildi. Standart 25 µl' lik PZR karışımı 0.5 ml' lik ince duvarlı PZR tüplerinde Tablo 2' de belirtildiği gibi hazırlandı.

| Kullanılan temel komponentler | Stok konsantrasyon | Kullanılan miktar | Final konsantrasyon |
|-------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
| 10 X PZR Tamponu | 10X | 2.5 µl | 1X |
| MgCl ₂ | 25 mM | 1.5 µl | 1.5 mM |
| İleri primer | 10 pmol/µl | 1 µl | 0.5µM |
| Geri primer | 10 pmol/µl | 1 µl | 0.5µM |
| Taq polimeraz | 5 U/µl | 0.15 µl | 0.05 U/µl |
| dNTP mix | 2 mM | 2 µl | 40 µM |
| Çift distile su | — | 14.85 µl | — |
| Kalıp DNA | 50 ng/µl | 2 µl | 100 ng |
| TOPLAM | 25 µl | | |

Tablo 2: β Globin PZR ve OPN PZR Reaksiyon Karışımı İçeriği

5.4.6. PZR Koşulları

β Globin PZR'ı ve OPN PZR'nın koşulları sırasıyla Tablo 3 ve 4' de gösterilmiştir.

| Döngü sayısı | Derece | Süre | Evre |
|--------------|--------|----------|-------------------------|
| 1 | 95 °C | 3 dak | Başlangıç denatürasyonu |
| 40 | 95 °C | 45 sn | Denatürasyon |
| | 56 °C | 30 sn | Primerlerin bağlanması |
| | 72 °C | 30 sn | Uzama |
| 1 | 72 °C | 10 dak | Sonlanma |
| 1 | 4 °C | ∞ | Saklanma 1S1S1 |

Tablo 3: β Globin PZR Koşulları

| Döngü sayısı | Derece | Süre | Evre |
|--------------|--------|--------|-------------------------|
| 1 | 95 °C | 4 dak | Başlangıç denatürasyonu |
| 40 | 95 °C | 30 sn | Denatürasyon |
| | 60 °C | 45 sn | Primerlerin bağlanması |
| | 72 °C | 30 sn | Uzama |
| 1 | 72 °C | 10 dak | Sonlanma |
| 1 | 4 °C | ∞ | Saklanma Isısı |

Tablo 4: OPN PZR Koşulları

5.4.7. PZR Ürünlerinin Yatay Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Jel elektrofrezinde kullanılacak agaroz jelin konsantrasyonu, ayrıştırılmak istenen parçanın büyüklüğüne göre değişmektedir. Bu çalışmada, DNA kalitesini kontrol etmek amacı ile yapılan β Globin PZR ürünleri %2'lik agaroz jellerde, çoğaltılan OPN gen ürünleri ise %2.5'lük jellerde, enzim kesimi ürünleri %3'lük jellerde yürütüldü ve jeller ultraviyole (UV) ışık altında incelendi.

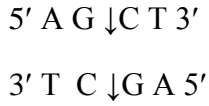
% 2.5'lik agaroz jel; 1.25 gr agaroz ve 50 X ana stoktan sulandırılmış 50 ml 1X TAE içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Elle tutulabilecek sıcaklığa geldiğinde 2 μ l etidiyum bromid (EtBr) eklenerek iyice karıştırıldı. Kuyucukları oluşturacak taraklar kasete yerleştirildi ve jel üzerine döküldü. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı.

5 μ l PZR ürünleri 2 μ l yükleme tamponu ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi ve Thermo Scientific elektrofrez sistemi ile 90 V gerilimde 1X TAE tamponu içerisinde 30

dakika yürütüldü. PZR ürünlerinin büyüklükleri PUC8 DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak belirlendi.

5.4.8. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Analizi

OPN geninde 9250. pozisyonundaki rs1126616 polimorfizminin belirlenmesi amacı ile çoğaltılan 252 bp' lik PZR ürünleri Alu I enzimi kullanılarak kesildi (Şekil 2). 10 µl PZR ürünü 10 µl/U AluI enzimi ile 37 °C'de su banyosunda 6 saat boyunca inkubasyona bırakıldı.



Şekil 2: Alu I Enziminin Kesim Bölgesi

5.4.9. Böbrek Taşlarının Analizi

Taş kompozisyonunun kalitatif ve kantitatif bilgilerinin eksiksiz ve doğru olması etiyojilerinin ve koruyucu önlemlerin alınması açısından oldukça önemlidir. X ışını difraksiyon (XRD) yöntemi kristal yapıya sahip maddeleri analiz etmek için oldukça sık kullanılan ve X ışınlarının kristal kafes üzerinde dağılımlarına dayanan bir yöntemdir (113). Bu yöntemin kristal yapıya sahip olan üriner sistem taşlarının analizine uygulanışı ilk kez 1947 yılında *Prien* ve *Frondele* tarafından gerçekleştirilmiştir (27).

5.4.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS 10.0 programında yapılmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrollerin yaş, vücut kitle indeksi (VKİ) ortalamaları *Student's t test*, hasta ve kontroller arasında genotip dağılımları *ki-kare* testi kullanılarak yapılmıştır. Hardy Weinberg dengesine göre allel frekanslarından beklenen genotip dağılımı hesaplandı. Genotip dağılımlarındaki standart sapma *ki-kare* testi kullanılarak saptandı; *P* değeri 0.005'in altında olması ($p < 0.005$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

Bu çalışmada 62 adet kalsiyum oksalat taşı ile 2 adet struvit taşı düşüren toplamda 64 tane ürolitiyazis hastası ile aile öyküsünde taş hastalığı bulunmayan 50 tane sağlıklı kontrol ile çalışıldı (Tablo 5).

| Taş cinsi | Kalsiyum Oksalat | Strüvit |
|-----------|------------------|---------|
| Hasta % | 96.87 | 3.13 |

Tablo 5: Taş Cinslerinin Hasta Grubundaki Dağılımı

Ürolitiyazis hasta grubu yaş ortalamaları 44.15 ± 12.03 olan 46 erkek ve 18 kadın, kontrol grubu ise yaş ortalamaları 37.14 ± 13.02 olan 28 erkek ve 22 kadından oluşmaktadır.

Tedavi sonrasında hastaların %62.5' inde tekrar taş oluşumu görülürken %37.5' inde taş oluşumu tekrarlanmamıştır. Çalışma grubumuzu oluşturan ürolitiyazis hastalarına ve kontrol grubuna ait demografik özellikler Tablo 6'da verilmiştir.

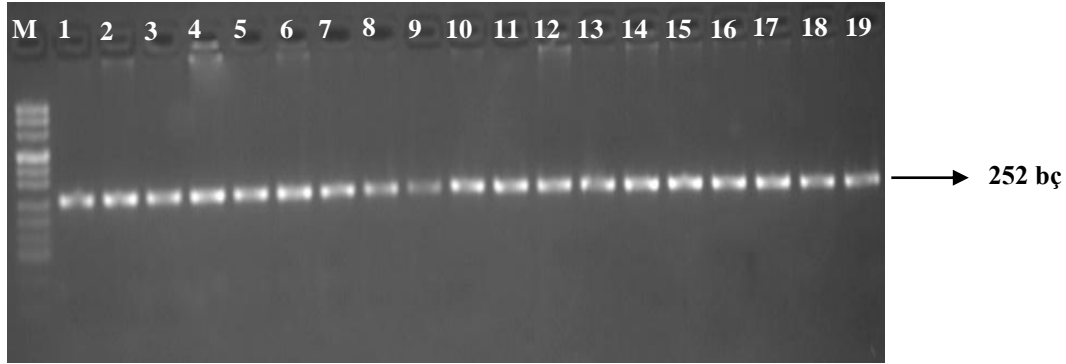
| | Ürolitiyazis | Kontrol grubu |
|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Cins (E/K) | | |
| n | 46/18 | 28/22 |
| Yaş | 44.15 ± 12.03 | 37.14 ± 13.02 |
| VKI (kg/m^2) | 27.14 ± 2.71 | 23.52 ± 2.41 |

Değerler ortalama \pm SE olarak ifade edilmiştir.

Tablo 6: Hasta ve Kontrol Grubuna Ait Bazı Demografik Özellikler

6.1. PZR-RFLP SONUÇLARI

Osteopontin rs1126616 genotiplerini saptamak amacı ile öncelikle polimorfizmin bulunduğu bölge PZR ile çoğaltıldı ve PZR sonucunda 252 bç'lik ürün elde edildi (Şekil 3). PZR ürünleri AluI restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesim sonrası, mutant alleli taşımayan yabanıl tipler (CC); 147 ve 105 bç'lik ürünler, mutant alleli yalnız bir allelinde taşıyan heterozigotlar (CT); 147, 105, 61 ve 44 bç'lik ürünler ve mutant alleli her iki allelinde de taşıyan homozigotlar (TT) ise 147,61 ve 44 bç'lik ürünler oluşturmaktadır (Tablo 7).

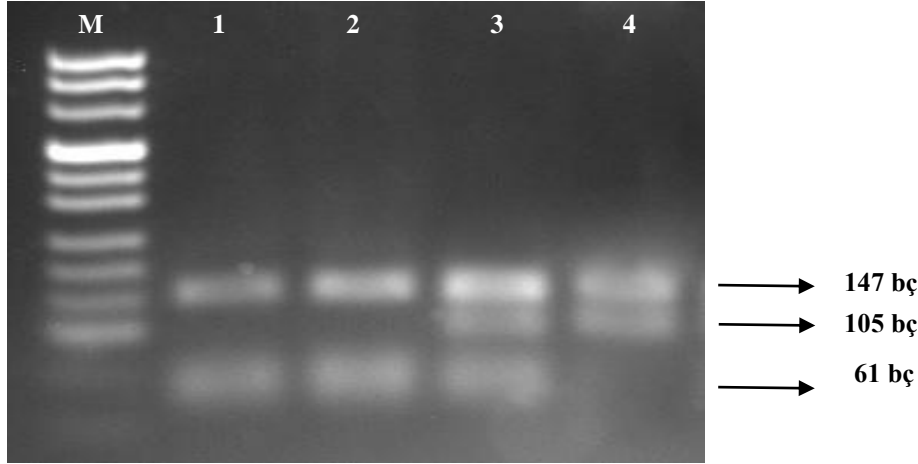


Şekil 3: OPN 9250. konumdaki polimorfik bölgenin PZR ürünlerinin %2.5'luk agaroz jel görüntüsü. M: PUC 8 DNA moleküler ağırlık standartı, kuyu 1-19: 252 bç' lik PZR ürünleri

| | Yabanıl tip CC | Heterozigot Mutant CT | Homozigot Mutant TT |
|--------|-------------------|--------------------------|------------------------|
| 147 bç | ———— | ———— | ———— |
| 105 bç | ———— | ———— | |
| 61 bç | | ———— | ———— |
| 44 bç | | ———— | ———— |

Tablo 7: OPN PZR Sonrasında Alu I Enzim Kesimi Sonucu Ortaya Çıkan Ürünler

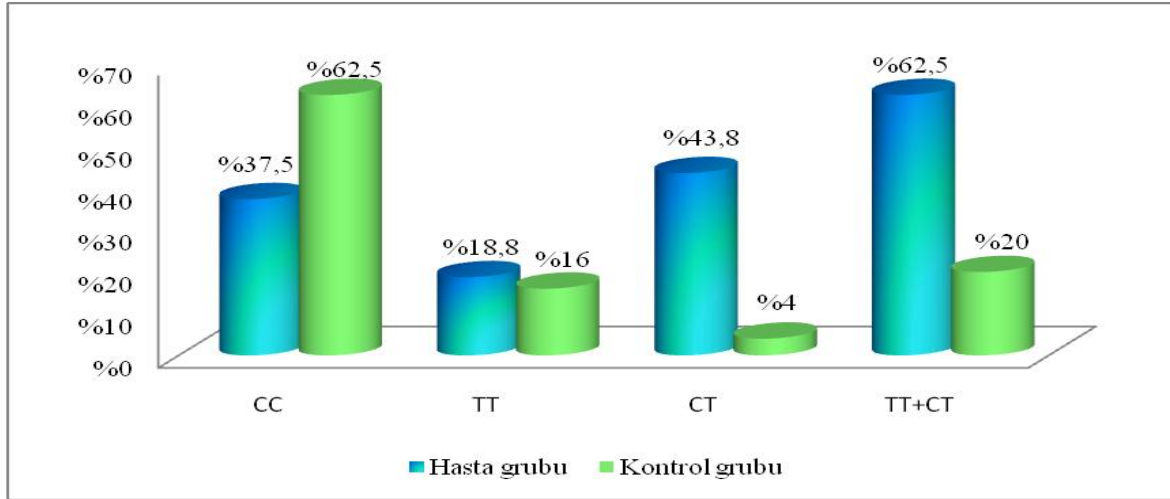
Allellik polimorfizmler, 9250. konumdaki CT polimorfizminin her iki allelde de bulunmaması (yabanıl tip); her iki allelde bulunması (homozigot mutant) ve sadece bir allelde bulunması (heterozigot mutant) şeklinde açıklanabilir (Şekil 4).



Şekil 4: PZR ürünlerinin Alu I ile kesimi sonucu elde edilen ürünlerin %3'lük agaroz jel görüntüsü. M: PUC8 DNA moleküler ağırlık standartı, kuyu 1-2: TT genotipi (homozigot mutant) 44 bç'lik bant görüntülenemedi); kuyu 3: CT genotipi (heterozigot mutant) 44 bç'lik bant görüntülenemedi, kuyu 4: CC genotipi (yabanıl tip).

Ürolitiyazis hastalarında 24 kişi yabanıl tip, 28 kişi heterozigot ve 12 kişi homozigot mutant; kontrol grubunda ise 40 kişi yabanıl tip, 2 kişi heterozigot ve 8 kişi homozigot mutant olarak bulunmuştur. Hasta ve kontrol grubuna ait 9250. konumdaki OPN rs1126616 genotiplerinin dağılım sıklıkları Grafik 1'de gösterildiği gibidir. Hasta ve kontrol gruplarında CC genotip sıklığı, CT ve TT genotiplerine göre anlamlı olarak fazla bulundu. Kontrol grubunda CC genotip sıklığı en fazla, CT genotip sıklığı ise en düşük oranda gözlemlendi ($p < 0.001$) (Tablo 8). Hasta grubunda en az bir mutant alleli taşıma sıklığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 5) (Tablo 8). Hasta ve kontrol grubu arasında genotip ve allel frekansları bakımından Hardy-Weinberg kuralına uyumluluk görülmüştür ($p < 0.005$) (Tablo 9).

Hasta grubundaki kadın ve erkekler arasında hem genotip dağılımı hem de en az bir mutant alleli taşıma sıklığı açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.207$ ve $p=0.239$). Taş hastalığı nükseden ve nüksmeyen hastalar, hem genotip dağılımı hem de en az bir mutant alleli taşıma sıklığı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,133$ ve $p=0.131$).



Şekil 5: Hasta ve Kontrol Grubuna Ait OPN Genotip Dağılımları

| OPN rs1126616 | Hasta Grubu n (%) | Kontrol Grubu n (%) | <i>p</i> |
|----------------|----------------------|------------------------|------------------|
| Genotip | | | |
| CC | 24 (37.5) | 40 (80) | <0.001 |
| CT | 28 (43.75) | 2 (4) | |
| TT | 12 (18.75) | 8 (16) | |
| CT+TT | 40 (62.5) | 10 (20) | |

χ^2 testi ile hesaplandı $p<0.005$

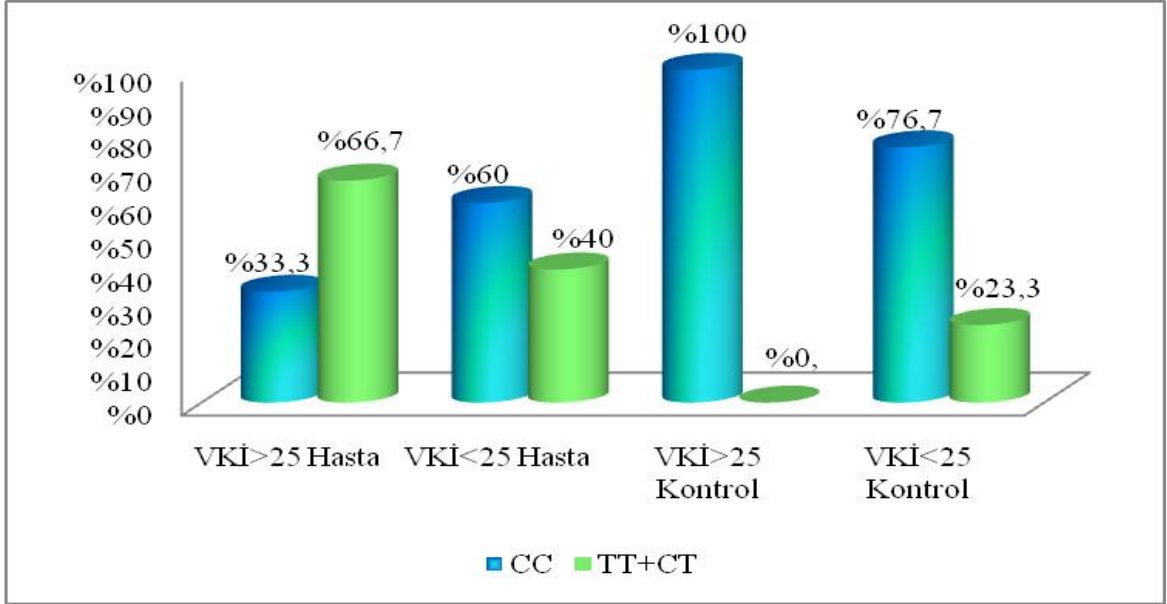
Tablo 8: Hasta ve Kontrol Grubunda OPN Genotip ve Allel Frekanslarının Dağılımı

| Allel frekans farklılığı | Heterozigot | Homozigot | Allel pozitifliği | Armitage's trend testi |
|---|---|--|---|---|
| Risk alleli - T | | | | |
| C/T | CC/CT | CC/TT | CC/CT+TT | Genel odds ratio |
| OR=3.117 C.I.=(1.676-5.796) chi2=13.51 p= 0.00024 | OR=23.333 C.I.=(5.097-106.812) chi2=25.76 p=3.864e-07 | OR=2.500 C.I.=(0.894-6.987) chi2=3.15 p=0.07593 | OR=6.667 C.I.=(2.827-15.724) chi2=20.59 p=5.686e-06 | OR=1.813 chi2=9.78 p=0.00177 |
| Risk alleli - C | | | | |
| T/C | TT/CT | TT/CC | CC+TT/TT | Genel odds ratio |
| OR=0.321 C.I.=(0.173-0.597) chi2=13.51 p=0.00024 | OR=9.333 C.I.=(1.721-50.614) chi2=8.33 p=0.00389 | OR=0.400 C.I.=(0.143-1.118) chi2=3.15 p=0.07593 | OR=0.825 C.I.=(0.309-2.205) chi2=0.15 p=0.70167 | OR=0.526 chi2=9.78 p=0.00177 |

OR: odds ratio; C.I.: konfidans aralığı (confidence interval)

Tablo 9: OPN rs1126616 Genotip ve Allel Frekanslarının Dağılımı

Hasta ve kontrol gruplarının vücut kitle indeksleri (VKİ) hesaplanarak 25 kg/m^2 'den küçük ($\text{VKİ} < 25 \text{ kg/m}^2$) ve 25 kg/m^2 'den büyük ($\text{VKİ} > 25 \text{ kg/m}^2$) olmak üzere sınıflandırıldı. En az bir mutant alleli taşıma sıklığı $\text{VKİ} > 25 \text{ kg/m}^2$ olan ürolitiyazis hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) (Şekil 6).



Şekil 6: Hasta ve Kontrol Grubu $\text{VKİ} > 25 \text{ kg/m}^2$ ve $\text{VKİ} < 25 \text{ kg/m}^2$ Olarak Gruplandırıldığında OPN rs1126616 Polimorfizmini “En Az 1 Allelinde” Taşıma Sıklıkları

7. TARTIŞMA

Ürolitiazisin erken evrelerinde bir takım uyarıcı faktörler, kalsiyum kristallerinin gelişimi, agregasyonu, distal renal tübül hücrelere adhezyonu ve çökmesinde rol oynar. Osteopontin (OPN) 40 kiloDalton (kDa) ağırlığında bir glikoprotein olup normal ve anormal kalsifikasyonun düzenlenmesi gibi birçok biyolojik süreçte rol oynamaktadır (54). Üriner sistemde ise OPN idrarın temel bir bileşeni olup, böbrekte sentezlenir ve renal epitel hücreler aracılığıyla idrara salınır (54, 114). Yapılan *in vitro* çalışmalarda, OPN'nin kalsiyum kristallerinin nükleasyonu, agregasyonu ve renal epitel hücrelerine adhezyonunda inhibitör olarak etki ettiği gösterilmiştir. İdrardaki OPN düzeyi ise ürolitiazis hastalarında sağlıklı bireylere göre düşük saptanmış ve taş oluşumunda protektif rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (100, 115). Bunların tersine bazı *in vitro* çalışmalarda, OPN'nin CaOx kristallerinin çökmesini ve renal tübül hücre membranlarına bağlanmasını teşvik ederek taş oluşum sürecinin erken evresinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (107). Bütün bu çalışmalara göre OPN'nin taş oluşum sürecinde promotör mü yoksa inhibitör olarak mı rol oynadığı tam anlamıyla kesinlik kazanmamıştır.

İlk kez 2000 yılında *Yamate ve ark.* tarafından Japon popülasyonunda yapılan tek zincir konformasyonel polimorfizm (SSCP) ve dizileme yöntemi ile OPN geninde 250.aminoasiti (Ala250) kodlayan bölgede sinonim bir değişime neden olan GCC→GCT substitüsyonu (rs1126616; 9250.nükleotid) saptanmış ve bu polimorfizmin ailesel olarak kalıtıldığı gösterilmiştir. Bu polimorfizmin sıklığı, aile öyküsünde ürolitiazis geçmişi olan (FSF) 25, taş oluşumu tekralanan (RSF) 40 hasta ile 36 sağlıklı kontrolde araştırılmıştır. Orjinal kodon olan GCC frekansı, kontrol grubunda 0.528, FSF grubunda 0.3 ve RSF grubunda 0.35 olarak saptanmış ve kontrol grubundaki insidansı diğer iki gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). GCT frekansı ise kontrol grubunda 0.472, FSF grubunda 0.7 ve RSF grubunda 0.65 olarak saptanmış ve ürolitiazis hastalarındaki insidansı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Çalışmalarında ürolitiazis hastalarında Ala250 polimorfizminin ailesel olarak kalıtıldığı gösterilmesi ile hastalığa yatkınlık genlerinin tanımlanarak diagnostik bir yöntem olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir (108). Bu çalışma ile Japon ürolitiazis hastalarında OPN rs1126616 polimorfizmi taşıma sıklığı bizim çalışmamızla uyumlu olarak yüksek bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda ise, 64 ürolitiazis hastasından %62.5'i OPN rs1126616 polimorfizmini en az bir allelinde taşıırken sağlıklı kontrollerde bu oranın %20 olduğu saptanmıştır. Bu polimorfizmi taşımayan ürolitiazis hastaları (%37.5) ise sağlıklı kontrollere (%80) göre yaklaşık 2.2 kat daha düşük bulunmuştur. Kadın ve erkekler arasında ve tekrarlayan taş hastalarında OPN rs1126616 polimorfizmini taşıma sıklığı arasında her hangi bir anlamlılık saptanmamıştır. Sonuç olarak, hem genotip hem de allel frekansları Türk ürolitiazis hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$) ve bizim toplumumuzda OPN geninde 9250. pozisyonda yer alan rs1126616 polimorfizminin taş oluşumunda bir risk faktörü olabileceğini saptadık. *Lee ve ark.* tarafından Kore'de yapılan benzer bir çalışmada ise OPN geninde aynı SNP (rs1126616)'nin ürolitiazis ile ilişkisi araştırılmıştır (111). Hasta grubunda CC, CT ve TT genotip frekansları sırasıyla %10.6, %36.6 ve %52.8 iken kontrol grubunda sırasıyla %6.7, %27.9 ve %65.8 olarak saptanmıştır ($p<0.05$). C ve T allel frekansları hasta grubunda sırasıyla %28.9 ve %72.1 iken kontrol grubunda %20.7 ve %79.3 olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Bu çalışmada OPN gen frekansları ile ürolitiazis arasında bir ilişki bulunamazken, allel frekansları ürolitiazis hastalarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ise hem genotip frekansları hem de allel frekansları ürolitiazis hastalarında sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, Türk ürolitiazis hastalarında riskli genotipin heterozigot olarak taşınması bile hastalık riskini önemli ölçüde arttırabileceğini göstermiştir, yani T allelini taşımak hastalığa olan yatkınlığı arttırabilir (OR=9.333, C.I.=(1.721-50.614) $p=0.00389$). En az bir mutant T allelinin ürolitiazis hastalarında taşınma sıklığı Kore popülasyonunda Türk popülasyonuna göre daha fazladır, sağlıklı kontrollerde ise bu insidans yaklaşık 4 kat daha fazladır. Kore popülasyonundaki sağlıklı bireylerde bu polimorfizmin Türk popülasyonuna göre daha sık görülmesi Korelilerin ürolitiazise daha yatkın olabileceklerini düşündürmektedir. Bu farklılığın sebebi ise beslenme alışkanlıkları ve çevre koşullarının etkisi olabilir.

Gao ve ark. ise OPN geninde farklı SNP'lerin; 9402 (Arg/His) ve 9171 (Asn/Ser) pozisyonlardaki sinonim olmayan değişime neden olan substitüsyonların, kalsiyum taşı oluşumunda risk faktörü olup olmadığını 76 taş hastası ve 124 sağlıklı kontrolde araştırmıştır (109). Çalışmanın sonucunda, hasta grubunda 9171. pozisyonunda yer alan SNP ile hasta ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir farklılık saptanmamış iken; 9402.

pozisyonunda yer alan A/G genotipi sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$), fakat klinik özellikler ile genotip dağılımı arasında bir ilişki saptanamamıştır. Ancak bu polimorfizmin taş oluşturma riski açısından değerlendirilmesinde genetik marker olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Aynı grubun Japon popülasyonunda yaptığı diğer bir çalışmada ise 11 kb uzunluğundaki OPN geni, 45 ürolitiazis hastası ve 54 sağlıklı kontrolde dizilenerek 6 tanesi yeni (*novel*) olmak üzere toplamda 61 SNP saptanmıştır (110). Saptanan *novel* SNP'lerden, *novel 2* (-145T/G) ve *novel 3* (-144G/T) OPN geninin promotör bölgesinde lokalize olup böbrek taşı oluşumunda oldukça anlamlı bulunmuştur (sırasıyla $p=0.026$ ve $p=0.0113$). Minör allel frekansları $\geq 1\%$ olan 23 SNP'de bağlantı analizi yapılarak, 4 Linkage Disequilibrium (LD) bloğu belirlenmiş ve toplamda 11 *haplotip-tagging SNP* (htSNP) saptanmıştır. Daha sonra asosiyasyon analizi yapılarak, bloklardan bir tanesinde TGTG (odds ratio (OR)=0.0526; %95 confidence interval (CI)=0.007-0.402; $P=0.0001$) ve GTTG (OR=3.7947; %95 CI=1.31-10.989; $p=0.0093$) haplotip frekanslarının taş hastaları ve kontrol grubu arasında anlamlı olduğu gösterilmiştir. TGTG haplotip frekansı sağlıklı kontrollerde daha yüksek bulunduğundan koruyucu, GTTG haplotip frekansı ise ürolitiazis hastalarında yüksek olduğundan risk oluşturan haplotip olarak saptanmıştır. Diğer 3 haplotip bloğunda, haplotip frekansları ile ilgili istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmamıştır. Risk ve koruyucu haplotip bloğunda çalışmamızda araştırdığımız SNP rs1126616 olmamasına rağmen farklı bir haplotip bloğunda SNP rs6532039 ve SNP rs4754 ile birlikte asosiyasyon analizi yapılmıştır. Fakat bu bloktaki haplotip frekansları ile hasta ve sağlıklı kontroller arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu çalışma, OPN'nin taş hastalığındaki hem promotör hem de inhibitör etkisinin olabileceğini gösteren ilk genetik bulgu olduğu için oldukça önemli olup, risk ve koruyucu özellikleri olan haplotiplerdeki bireyler arasında bilinmeyen bir patogenezin altta yatabileceği öne sürülmüştür.

OPN geninin transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesi ile ilgili mekanizmaların araştırılması, yatkınlık geni olarak aday gösterilen hastalıkların genetik çalışmasında yardımcı olabilir. Nitekim *Giacopelli ve ark.* tarafından yapılan çalışmada OPN geninin promotör bölgesinde bulunan ve transkripsiyonel aktivitesine etki eden üç polimorfizm saptanmıştır (116). OPN geninde saptanan promotör polimorfizmlerinden -66T/G, SP1/SP3 transkripsiyon faktörünün bağlanma afinitesini değiştirdiğini; -443T/C polimorfizminin henüz bilinmeyen nükleer bir faktörün farklı bir bağlanma bölgesi

olduğunu ve -156delG/G polimorfizminin ise RUNX2 bağlanma bölgesinin içinde bulunduğunu göstermişlerdir. Daha sonraki çalışmada *Hummelshoj ve ark.* tarafından OPN geninin promotör bölgesinde bulunan 3 SNP'nin *luciferase reporter gene assay* yöntemi ile gen ekspresyonu araştırılmıştır. Çalışmalarında -443C/-156G/-66T haplotipinin diğer haplotipler ile karşılaştırıldığında promotör aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (117). Transkripsiyonel aktivite ve gen ekspresyonu üzerine fonksiyonel etkisi olan OPN geninin promotör bölgesindeki SNP'lerin taş hastalarında önem kazandığı *Liu ve ark.* tarafından Tayvan'da yapılan çalışmada gösterilmiştir (112). Çalışmalarında promotör bölgesindeki 3 fonksiyonel polimorfizmin (-66T/G, -156delG/G, -443T/C) ürener parametreler ile karşılaştırılarak kalsiyum taşı oluşumundaki etkisi araştırılmıştır. Hasta grubu (G/G=33, delG/G=110 ve delG/delG=106) ile sağlıklı kontroller (G/G=47, delG/G=126 ve delG/delG=74) arasında 156delG/G genotip dağılımı karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmışken ($p=0.01$), -66T/G ve 443T/C genotip dağılımları açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ayrıca -156delG/G ve -443T/C polimorfizmleri ile haplotip analizi yapılmış fakat anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ($p=0.568$). DelG/delG genotipini taşıyan hastalar, G/G genotipini taşıyanlar ile cinsiyet, vücut kitle endeksi (VKİ), günlük sıvı tüketimi ve idrardaki ürik asit düzeyi gibi parametreler açısından karşılaştırıldığında delG/delG genotipini taşıyan hastaların kalsiyum taşı geliştirme riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (OR=1.95, %95 CI=1.01-3.77, $p=0.046$). İdrardaki kalsiyum düzeyini OPN düzeyine oranladıklarında, bu oranın delG/G ve delG/delG genotipini taşıyan hastalarda taşımayanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0.021$). Sonuç olarak, idrardaki düşük OPN düzeyinin kalsiyum ürolitiazisi gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğunu ve bunun değerlendirilmesinde -156delG/G polimorfizminin genetik marker olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir. Ayrıca delG allelini taşıyan bireylerin yemek alışkanlıklarını ve yaşam tarzlarını değiştirerek kalsiyum taş oluşumunun önüne geçilebileceğini vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda araştırdığımız OPN rs1126616 polimorfizmi dışında farklı SNP'ler de; özellikle promotör bölgedeki polimorfizmler, transkripsiyonel düzeyde etki ederek taş oluşumunda risk faktörü olarak gösterilmiştir.

Taş hastalığında beslenme alışkanlığı önemli bir risk faktörü olduğundan, vücut ölçüsü artışının (kilo, boy ve vücut kitle indeksi (VKİ)), yüksek taş oluşum riski ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (118). Yapılan çoklu lineer regresyon çalışmalarında; VKİ ile

idrardaki ürik asit, sodyum ve amonyum düzeyi, fosfat salınımı, sadece kadınlarda üriner oksalat salınımı ve sadece erkeklerde üriner kalsiyum salınımı arasında pozitif bir ilişki saptanmış iken; hem kadın hem de erkeklerde idrar pH'sı ile VKİ arasında ters bir ilişki saptanmış ve sonuç olarak VKİ artışının taş oluşum riskini arttırabileceği gösterilmiştir (119). Ürolitiazis ile VKİ arasındaki ilişkinin yanısıra, OPN proinflamatuvar özelliğinden dolayı obezite gibi inflamatuvar hastalıklarla da ilişkilidir. OPN, obezitenin erken evrelerinde makrofajlarda yüksek oranda eksprese olurlar ve sahip olduğu reseptörler aracılığı ile makrofajların adipoz dokuya göçünde, infiltrasyonunda ve birikmesinde rol oynarlar (120, 121). Daha sonraki çalışmalarda, *Kiefer ve ark.* obez insan ve fare modelinde, OPN'nin adipoz dokudaki (AT) ekspresyonunu araştırmışlardır (122). Çalışmalarında morbid obezlerde omental ve subkutan AT'da, diyet ile uyarılmış ve genetiği değiştirilmiş obez farelerde periton makrofajlar ve gonadal AT'da; osteopontin (SPP1), adiponektin (AdipoQ) ve tümör nekroz faktör (TNF) gen ekspresyonları ile serum OPN seviyesine bakılmıştır. Diyet ile uyarılmış ve genetiği değiştirilmiş farelerde OPN gen ekspresyonu zayıf farelere göre sırasıyla 42 ($p<0.01$) ve 40 kat ($p<0.05$); morbid obezlerde sağlıklı kontrollere göre subkutan AT'da 7 kat ($p<0.01$), omental AT' da 3.3 kat ($p<0.001$) daha yüksek bulunmuştur. Serum OPN düzeyi ise morbid obezlerde sağlıklı bireylere göre 1.7 kat daha yüksek iken ($p<0.05$); diyet ile uyarılmış ve genetiği değiştirilmiş farelerde anlamlılık bulunamamıştır. Bu çalışma ile OPN'nin obezite gelişiminde patofizyolojik bir rolü olabileceği ve AT inflamasyonu ile ilgili hastalıkların tedavisinde önemli bir hedef haline gelebileceği ileri sürülmüştür. Biz de çalışmamızda, ürolitiazis ile obezite arasındaki ilişkiyi araştırmak için taş hastalarını, Dünya Sağlık Örgütü'nün obezite kriterlerinden biri olan (fazla tartılı $\geq 25\text{kg/m}^2$ ve obezite $\geq 30\text{kg/m}^2$) (123, 124) VKİ'ne göre 25kg/m^2 'den büyük ve küçük olmak üzere 2 gruba ayırarak, OPN rs1126616 polimorfizminin taşıma sıklığını bu gruplarda araştırdık. VKİ'leri 25kg/m^2 'den büyük yani fazla tartılı olan ürolitiazis hastalarının en az bir allelinde OPN rs1126616 polimorfizmini taşıma sıklığı, VKİ'leri 25kg/m^2 'den az olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$). Bu sonuç bize ürolitiazis hastalarının obezite geliştirmeye daha yatkın olabileceğini diğer bir deyimle fazla tartılı böbrek taşı geliştirme olasılığının daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Fakat obez bireylerin mi taş oluşturma riskinin daha fazla olduğu yoksa taş hastalarının mı obezite geliştirmeye daha yatkın oldukları çalışılması gereken bir konudur. Henüz yayınlanmamış diğer bir çalışmamızda

ise obez çocukların OPN rs1126616 polimorfizmini sağlıklı kontrollere göre daha sık taşıdıklarını ve obezite gelişiminde bir risk faktörü olabileceğini saptadık.

Türk popülasyonundaki taş hastalarında OPN'nin transkripsiyonel aktivitesini etkileyen promotör bölgede yer alan polimorfizmler ve OPN geninde 9250. pozisyondaki rs1126616 (Ala250) polimorfizminin ailesel olarak kalıtılabileceğini gösteren çalışmalar yapılmalıdır. Ayrıca OPN'nin 4. kromozomun belirli bir bölgesinde grup halinde bulunan SIBLING ailesinin bir yesi olması, bu ailede bulunan diğer genlerin taş hastalığında OPN ile birlikte etki edebileceğini düşündürmektedir. Farklı haplotiplerdeki bireylerin belirli şartlarda farklı OPN protein konsantrasyonlarını eksprese edip etmedikleri ve SIBLING ailesinde yer alan diğer genler ile birlikte taş hastalığı riski oluşturup oluşturmadıkları Türk rolitiyazis hastalarında çalışılması gereken bir konudur.

Çalışmamızın devamında ise hasta ve sağlıklı kontrollerin sayısını arttırmayı ve her iki grupta da OPN serum düzeylerine bakarak OPN rs1126616 polimorfizmi ile ilişkisini araştırmayı planlamaktayız.

8. SONUÇ

Sonuç olarak, ürolitiyazis hastalarında hem CT ve TT genotip dağılımını hem de T allel frekansını yabanıl tipe (CC) göre yüksek bulmamız OPN rs1126616 polimorfizminin hastalık oluşumu ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca fazla tartılı (VKİ>25kg/m²) ürolitiyazis hastalarının normal tartılı hastalara kıyasla en az bir mutant T alleli taşıma sıklığının yüksek olması taş hastalığının obezite ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Hasta ve kontrol grubumuzun kısıtlı sayıda kişiden oluşmasına rağmen ürolitiyazis hastalarında OPN rs1126616 polimorfizminin Türk popülasyonundaki sıklığı ve klinik önemi hakkında bilgi vermektedir. Çalışmaya hasta ve kontrol grubundaki sayıları arttırarak ve serum OPN düzeyi ile bu polimorfizmin arasındaki ilişkiyi araştırarak devam etmekteyiz.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her türlü bilimsel desteği sağlayıp, yakın ilgi, güleryüz ve anlayışından dolayı danışmanım Sn. Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ'a çok teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında önerileri, bilimsel desteği ve güleryüzüyle katkılarından dolayı Dr. Fatmahan ATALAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hasta ve kontrol örneklerinin toplanması ve hasta verilerinin oluşturulması sırasında yardımcı olan Uzm. Dr. Volkan TUĞCU ve Dr. Alper BİTKİN'e saygılarımla teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarında bilimsel yardımları, emeği ve en başta dostluğu için arkadaşım Gökçe AKAN'a; deneyimi ve yardımları için Melike ERSÖZ ve Türkan SARIOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Her türlü yardımımıza koşan Enstitü Sekreterimiz İlknur KARAOSMANOĞLU'na teşekkür ederim. Dostlukları ve yardımları için Yüksek Lisans arkadaşlarım Seher Şule YILDIRIM ve Hasan ARSLANYÜREĞİ'ne teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca her an yanımda olan desteğini esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Menon M, Resnick MI. Urinary Lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management. Campbell's Urology. Ed: Patrick C. Walsh. Tokyo, Saunders Company, 2002.
2. Clark JY, Thompson IM, Optenberg SA. Economic impact of urolithiasis in the United States. *J Urol.* 1995, 154: 2020.
3. Asplin JR, Favus MJ, Coe FL. Nephrolithiasis. In: Brenner and Rector's the kidney. Ed: Brenner BM. Philadelphia, Saunders Company, 1996.
4. Anafarta K, Arıkan N, Bedük Y. Üriner sistem taş hastalığı genel bilgiler ve etyopatogenez. Temel Üroloji Cep Kitabı. Ed: Özkeçeli R, Satar N. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2008.
5. Kim SC, Coe FL, Tinmouth WW, Kuo RL, Paterson RF, Parks JH, Munch LC, Evan AP, Lingeman JE. Stone formation is proportional to papillary surface coverage by Randall's plaque. *J. Urol.* 2005, 173:117–119.
6. Siroky MB, Robert DO, Babayan RK. Urinary calculi and Endourology. Handbook of Urology. Ed: Ronal AE, Wang DS, Babayan RK. Philadelphia, Lippincott Williams&Wilkins, 2003.
7. Yalçınkaya S. Böbrek taşı tedavisinde perkutan nefrolitotomi sonuçları, komplikasyon ve başarı oranları ile bunları etkileyen faktörler. Uzmanlık tezi, 2007.
8. Khan SR. Renal tubular damage/dysfunction: key to formation of kidney stones. *Urol Res.* 2006; 34: 86-91.
9. Kim HH, Jo MK, Kwak C, Park SK, Yoo KY, Kang D, Lee C. Prevalence and epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. *Urology* 2002; 59: 517-521.
10. Curhan GC, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ. Regional variation in nephrolithiasis incidence among United States men. *J Urol.* 1994,151: 838-841.
11. Vahlensieck EW, Bach D, Hesse A. Incidence, prevalence and mortality of urolithiasis in German Federal Public. *Urol Res.* 1982,10:161-164.
12. Robertson WG, Peacock M, Baker M, Marshall DH, Speed R, Sergeant W, Smith A. Studies on the prevalence and epidemiology of urinary stone disease in men in Leeds. *Br J Urol.* 1983; 55: 595-598.

13. Iguchi M, Umekawa T, Katoh Y, Kohri K, Kurita T. Prevalence of urolithiasis in Kaizuka City, Japan. *Int J Urol*. 1996, 3: 175- 179.
14. Akıncı M, Esen T, Tellaloğlu S. Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. *Eur Urol*. 1991, 20: 200-203.
15. Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Jr Nyberg LM, Curhan GC. Urinary tract stones. *Kidney Int*. 2003, 63: 1817-1823.
16. Kane CJ, Bolton DM, Stoller ML. Current indications for open stone surgery in an endourology center. *Urology* 1995, 45: 218-221.
17. Fan J, Chandhoke PS, Grampsas SA: Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol*. 1999, 10: 376-380.
18. Borghi L, Meschi T, Schianchi T, Briganti A, Guerra A, Allegri F, Novarini A. Urine volume: stone risk factors and preventive medicine. *Nephron* 1999,81: 31-37.
19. Rodgers AL: Effect of mineral water containing calcium and magnesium on calcium oxalate urolithiasis risk factors. *Urol Int*.1997, 58: 93-99.
20. Matlaga BR, Assimos DG. Changing indications of open stone surgery. *Urology* 2002, 59:490-494.
21. Caudarella R, Rizzoli E, Buffa A, Bottura A, Stefoni S: Comparative study on the influence of 3 types of mineral water in patients with idiopathic calcium lithiasis. *J Urol*. 1998, 159: 658-663.
22. Resnick M, Pridgen DB, Goodman HO: Genetic predisposition to formation of calcium oxalate renal calculi. *N Eng J Med*. 1968, 278: 1313-1318.
23. Parivar F, Low RK, Stoller ML: The influence of diet on urinary stone disease. *J Urol*. 1996; 155: 432-440.
24. Assimos DG, Holmes RP: Role of diet in the therapy of urolithiasis. *Urol Clin North Am* 2000, 27: 255- 268.
25. Tanagho E.A & McAninch JW, Smith General Urology, USA, McGraw-Hill Companies, 2004.
26. Lemann J. Calcium and phosphate metabolism: an overview in health and in calcium stone formers. *Kidney Stones. Medical and surgical management*. Ed: Coe FL, Favus MJ, Pak CYC, Preminger GM. Philadelphia, Lippincott-Raven publishers, 1996.
27. Prien EL, Frondel C. Studies in urolithiasis. Composition of urinary calculi. *J Urol*. 1947, 57: 949-994.

28. Menon M, Mahle CJ. Oxalate metabolism and renal calculi. *J Urol.* 1982, 127: 148-151.
29. Ereğ E, Nefroloji, Ankara, Nobel Tıp Kitapevi, 2005.
30. Arık N, Nefroloji, İstanbul, Deniz Matbaacılık, 2001.
31. Abdel-Halim RE. Urolithiasis in adults. Clinical and biochemical aspects. *Saudi Med J.* 2005, 26:705–13.
32. Amato M, Lusini ML, Nelli F. Epidemiology of nephrolithiasis today. *Urol Int.* 2004, 72(Suppl 1):1–5.
33. Coe FL, Parks JH, Asplin JR: The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med.* 1992, 327:1141–1152.
34. Goodman HO, Brommage R, Assimios DG, Holmes RP: Genes in idiopathic calcium oxalate stone disease. *World J Urol.* 1997, 15:186–194.
35. Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J. A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. *Kidney Int.* 2005, 67:1053–61.
36. Edvardsson VO, Palsson R, Indridason OS, Thorvaldsson S, Stefansson K. Familiality of kidney stone disease in Iceland. *Scand J Urol Nephrol.* 2009, 43:1–5.
37. Loder N. Genetic variations can point the way to disease gene. *Nature* 1999, 401:734.
38. Chen WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai FJ. Association of the vitamin D receptor gene start codon Fok I polymorphism with calcium oxalate stone disease. *BJU Int.* 2001, 87:168–71.
39. Bid HK, Kumar A, Kapoor R, Mittal RD. Association of vitamin D receptor-gene (FokI) polymorphism with calcium oxalate nephrolithiasis. *J Endourol.* 2005,19:111-5.
40. Jackman SV, Kibel AS, Ovuworie CA, Moore RG, Kavoussi LR, Jarrett TW. Familial calcium stone disease: TaqI polymorphism and the vitamin D receptor. *J Endourol.* 1999, 13:313–6.
41. Ozkaya O, Soylemezoglu O, Misirlioglu M, Gonen S, Buyan N, Hasanoglu E. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the risk of calcium nephrolithiasis in children. *Eur Urol.* 2003, 44:150–4.
42. Chen WC, Wu HC, Lin WC, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. The association of androgen- and oestrogen-receptor gene polymorphisms with urolithiasis in men. *BJU Int.* 2001, 88:432–6.

43. Chen WC, Wu HC, Lu HF, Chen HY, Tsai FJ. Calcitonin receptor gene polymorphism: a possible genetic marker for patients with calciumoxalate stones. *Eur Urol.* 2001, 39:716–9.
44. Mittal RD, Bid HK, Manchanda PK. Genotype and haplotype determination of IL1B (g. – 511C > T and g. + 3954C > T) and (IL1RN) in pediatric nephrolithiasis. *J Endourol.* 2007, 21:1565–70.
45. Chen WC, Wu HC, Chen HY, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Interleukin-1beta gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones. *Urol Res.* 2001, 29:321–4.
46. Lai KC, Lin WY, Man KM, Tsai CH, Chen HY, Tsai FJ, Chen FJ, Chen HY, Liu HP, Ho TJ, Huang PH, Liu PL, Lin FY, Shen JL, Liu JT, Chen YH, Chen WC. Association of interleukin-18 gene polymorphisms with calcium oxalate kidney stone disease. *Scand J Urol Nephrol.* 2010, 44(1):20-6.
47. Ozturk M, Kordan Y, Cangul H, Dogan HS, Kilicarslan H, Vuruskan H, Oktay B. Association of urokinase gene 3'-UTR T/C polymorphism with calcium oxalate urolithiasis in children. *Int Urol Nephrol.* 2008, 40:563–8.
48. Mittal RD, Bid HK, Kumar A, Bhandari M. Association of urokinase gene 3'-UTR polymorphism with calcium oxalate nephrolithiasis. *J Endourol.* 2006, 20:157.
49. Chen WC, Chen HY, Wu HC, Wu MC, Hsu CD, Tsai FJ. Vascular endothelial growth factor gene polymorphism is associated with calcium oxalate stone disease. *Urol Res.* 2003, 31:218–22.
50. Tsai FJ, Wu HC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Chen WC. Association of E-cadherin gene 3'-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease. *Urol Int.* 2003, 70:278–81.
51. Onaran M, Yilmaz A, Sen I, Ergun MA, Camtosun A, Kupeli B, Menevse S, Bozkırlı B. Heparan sulfate gene polymorphism in calcium oxalate nephrolithiasis. *Urol Res.* 2009, 37:47–50.
52. Tugcu V, Özbek E, Aras B, Arısan S, Çaşkurlu T, Taşçı Aİ. Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) gene polymorphisms in urolithiasis. *Uro Res.* 2007, 35(5):219-24.

53. Thorleifsson G, Holm H, Edvardsson V, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gudbjartsson DF, Sulem P, Haldorsson BV, de Veegt F, d'Ancona FC, den Heijer M, Franzson L, Christiansen C, Alexandersen P, Rafnar T, Kristjansson K, Sigurdsson G, Kiemenev LA, Bodvarsson M, Indridason OS, Palsson R, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density. *Nat Genet.* 2009, 41:926–30.
54. Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson J.A, Johnson R, Hughes J. Osteopontin-a molecule for all seasons. *QJM* 2002, 95: 3-13.
55. Prince CW, Oosawa T, Butler WT, Tomana M, Bhowan AS, Bhowan M, Schrohenloher RE. Isolation, characterization and biosynthesis of a phosphorylated glycoprotein from rat bone. *J Biol Chem.* 1987, 25, 262(6):2900-7.
56. Young MF, Kerr JM, Termina JD, Wewer M, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics* 1990, 7(4): 491-502.
57. Higashibata, Y. Identification of promoter regions involved in cell- and developmental stage-specific osteopontin expression in bone, kidney, placenta, and mammary gland: an analysis of transgenic mice. *J Bone Miner. Res.* 2004, 19: 78–88.
58. Weber GF. The metastatic gene osteopontin: a candidate target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2001, 1552: 61–85.
59. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine&Growth Factors Rev.* 2008, 19(5-6):333-345.
60. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 280:460–5.
61. Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A. Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 9 \beta 1$ to osteopontin. *Matrix Biol.* 2005, 24:418–27.
62. Sodek J, Ganss B, McKee M.D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000, 11;279.
63. Senger D, Perruzzi CA, Papadopoulos-Sergiou A, Van de Water L. Adhesive properties of osteopontin: regulation by a naturally occurring thrombin-cleavage in close proximity to the GRGDS cell-binding domain. *Mol Biol Cell.* 1994, 5(5): 565–74.

64. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol.* 2006, 16:79–87.
65. Salih E, Ashkar S, Gerstenfeld LC, Glimcher MJ. Identification of the phosphorylated sites of metabolically ³²P-labeled osteopontin from cultured chicken osteoblasts. *J Biol. Chem.* 1997, 272: 13966–13973.
66. Smith LL, Cheung HK, Ling LE, Chen J, Sheppard D, Pytela R, Giachelli CM. Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem.* 1996;271:28485–28491.
67. Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem.* 2001, 276: 28261–28267.
68. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, 27: 2302-2309.
69. Singh K, DeVouge MW, Mukherjee BB. Physiological properties and differential glycosylation of phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin secreted by normal rat kidney cells. *J Biol Chem.* 1990, 265:18696–18701.
70. Kasugai S, Todescan R, Nagata T, Yao KL, Butler WT, Sodek J. Expression of bone matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in vitro: inductive effects of dexamethasone on the osteoblastic phenotype. *J Cell Physiol.* 1991,147: 111–120.
71. Kazanekki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J Cell Biochem.* 2007, 102: 912–24.
72. Hunter GK, Kyle CL, and Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins; structural specificity of the osteopontin mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994, 300: 723–728.
73. Hoyer JR, Asplin JR, Otvos L. Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibiting growth of calcium oxalate crystals. *Kidney Int.* 2001, 60: 77–82.
74. Denhardt T, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. *J Cell Biochem Suppl.* 1998, 30-31: 92-102.

75. Prince CW, Bulter WT. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Cell Relat Res.* 1987, 7(4): 305-13.
76. Kasugai S, Zhang Q, Overall CM, Wrana JL, Butler WT, Sodek J. Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner.* 1991, 13(3): 235-50.
77. Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescal R Jr, Li IW, Kim RH. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1995,760: 223-41.
78. Yasui T, Fujita K, Sasaki S, Iguchi M, Hirota S, Nomura S, Azuma Y, Ohta T, Kohri K. Alendronate inhibits osteopontin expression enhanced by parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) in the rat kidney. *Urol Res.* 1998, 26(5): 355-60.
79. Razzouk S, Brunn JC, Qin C, Tye C, Goldberg HA, Butler WT. Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion. *Bone* 2002, 30: 40-7.
80. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem.* 2000, 275:20197-203.
81. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, Boskey AL. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005, 77: 45–54.
82. Wai PY, Kuo PC. The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surgical Res.* 2004, 121: 228-241.
83. Khan SA, Lopez-Chua CA, Zhang J, Fisher LW, Sørensen ES, Denhardt DT. Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *J Cell Biochem.* 2002, 85: 728-36.
84. Rollo EE, Laskin DL, Denhardt DT. Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukoc Biol.* 1996, 60: 397-404.
85. Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity and cancer. *Toxicol Sci.* 2008, 103: 4–13.

86. Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci.* 2002, 25:491–505.
87. Xu A, Bai J, Lü J, Liang YY, Li JG, Lai DY, Wan X, Huang HH. Osteopontin gene polymorphism in association with systemic lupus erythematosus in Chinese patients. *Chin Med J.* 2007, 120: 2124-8.
88. Xu G, Nie H, Li N, Zheng W, Zhang D, Feng G, Ni L, Xu R, Honh J, Zhang JZ. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis. *J Clin Invest.* 2005, 115:1060–7.
89. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacopelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 2004, 103(4):1376-82.
90. Agnholt J, Kelsen J, Schack L, Hvas CL, Dahlerup JF, Sørensen ES. Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand J Immunol.* 2007, 65: 453– 460.
91. Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, Rotellar F, Mugueta C, Gil MJ, Cienfuegos AJ, Salvador J, Frühbeck G. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92:3719-27.
92. Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2004,11:313–21.
93. Xie Y, Nishi S, Iguchi S, Imai N, Sakatsume M, Saito A, Ikegame M, Iino N, Shimada H, Ueno M, Kawashima H, Arakawa M, Gejyo F. Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. *Kidney Int.* 2001, 59: 959-974.
94. Ebisuno S, Kohjimoto Y, Tamura M, Ohkawa T. Adhesion of calcium oxalate crystals to Madin–Darby canine kidney cells and some effects of glycosaminoglycans or cell injuries. *Eur Urol.* 1995, 28: 68-73.
95. Menon M, Koul H. Clinical review 32: Calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin. Endocrinol Metab.* 1992, 74: 703-7.

96. Khan SR, Hackett RL. Retention of calcium oxalate crystals in renal tubules. *Scanning Microsc.* 1991, 5: 707–12.
97. Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, Gejyo F. Expression, roles, receptors and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int.* 2001, 60:1645-1657.
98. Min W, Shiraga H, Chalko C, Goldfarb S, Krishna GG, Hoyer JR. Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney Int* 1998, 53: 189-193.
99. Nishio S, Hatanaka M, Takeda H, Iseda T, Iwata H, Yokoyama M. Analysis of urinary concentrations of calcium phosphate crystal-associated proteins: alpha-2-HS-glycoprotein, prothrombin F1, and osteopontin. *J Am Soc Nephrol.* 1999, 10:394–396.
100. Shiraga H, Min W, VanDusen WJ, Clayman MD, Miner D, Terrell CH, Sherbotie JR, Foreman JW, Przywiecki C, Nielson EG. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: Another member of aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc. Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 426-430.
101. Asplin JR, Arsenault D, Parks JH, Coe FL, Hoyer JL. Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int.* 1998, 53: 194-199.
102. Lieske JC, Leonard R, Toback FG. Adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells is inhibited by specific anions. *Am J Physiol.* 1995, 268: 604-612.
103. Fujisawa R, Kuboki Y. Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face hydroxiapatite crystals. *Biochim Biophys Acta.* 1991, 1075(1):56-60.
104. Füredi-Milhofer H, Moradian-Oldak J, Weiner S, Veis A, Mintz KP, Addad L. Interactions of matrix proteins from mineralized tissues with octacalcium phosphate. *Connect Tissue Res.* 1994, 30(4): 251-64.
105. Wesson JA, Worcester EM, Wiessner JH, Mandel NS, Kleinman JG. Control of calcium oxalate crystal structure and cell adherence by urinary macromolecules. *Kidney Int.* 1998, 53: 952–957.
106. Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. Osteopontin antisense oligonucleotide inhibits adhesion of calcium oxalate crystals in Madin-Darby canine kidney cell. *J Urol.* 1998, 160:1506-1512.

107. Yamate T, Kohri K, Umekawa T, Amasaki N, Isikawa Y, Iguchi M, Kurita T. The effect of osteopontin on the adhesion of calcium oxalate crystals to Madin-Darby canine kidney cells. *Eur Urol.* 1996, 30: 388-393.
108. Yamate T, Tsuji H, Amasaki N, Iguchi M, Kurita T, Kohri K. Analysis of osteopontin DNA in patients with urolithiasis. *Urol Res.* 2000, 28: 159-166.
109. Gao B, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol.* 2005, 174 (4 Pt 1): 1472-6.
110. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Li Z, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2007, 72(5): 592-8.
111. Lee MK, Kim TH, Lee SY, Myung SC, Moon YT, Kim YS, Kim HR. Eta-1/Osteopontin Genetic Polymorphism is Associated with Urolithiasis in Koreans. *Korean J Urol.* 2008, 49: 55-59.
112. Liu CC, Huang SP, Tsai LY, Wu WJ, Juo SH, Chou YH, Huang CH, Wu MT. The impact of osteopontin promoter polymorphisms on the risk of calcium urolithiasis. *Clinica Chimica Acta.* 2010, 411 (9-10):739-743.
113. Shubert G. Stone analysis. *Urol Res.* 2006, 34:146–150.
114. Watts RW. Idiopathic urinary stone disease: possible polygenic aetiological factors. *QJM* 2005, 98: 241-6.
115. Worcester EM, Beshensky AM. Osteopontin inhibits nucleation of calcium oxalate crystals. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 760:375-7.
116. Giacomelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, Ravazzolo R. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics* 2004, 20:87–96.
117. Hummelshoj T, Ryder LP, Madsen HO, Odum N, Svejgaard A. A functional polymorphism in the Eta-1 promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression. *Mol Immunol* 2006, 43:980–6.
118. Curhan GC, Willet WC, Rimm EB, Speizer FE, Stampfer MJ. Body size and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 1998, 9:1645-52.
119. Siener R, Glatz S, Nicolay C, Hesse A. The role of overweight and obesity in calcium oxalate stone formation *Obes Res.* 2004, 12:106-113.

- 120.** Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am. J. Pathol.* 1998, 152:353–358.
- 121.** Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science.* 2000, 287:860–864.
- 122.** Kiefer FW, Zeyda M, Todoric J, Huber J, Geyeregger R, Weichhart T, Aszmann O, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Stulnig TM. Osteopontin Expression in Human and Murine Obesity: Extensive Local Up-Regulation in Adipose Tissue but Minimal Systemic Alterations. *Endocrinology* 2008, 149(3):1350-7.
- 123.** World Health Organisation. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity, Geneva, 3-5 June 1997 WHO/NUT/NCD/98.1, 1998, Geneva.
- 124.** World Health Organisation. Physical status: The use and interpretation of anthropometry. Technical report Series 854, 1995, Geneva.