

**T.C.**  
**HALIÇ ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**TÜRK KALSİYUM OKSALAT BÖBREK TAŞI**  
**HASTALARINDA**  
**VİTAMİN D RESEPTÖRÜ GENİ**  
**POLİMORFİZMLERİNİN**  
**MOLEKÜLER ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan**  
**ÖMER ONUR ÇAKIR**

**Danışman**  
**Yrd. Doç. Dr. NAGEHAN ERSOY**

**İstanbul – 2008**

## ÖNSÖZ

Bu çalışma 2006-2008 yılları arasında T.C. Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün bilimsel araştırmalarıma ve uygulama çalışmalarına verdiği destek ile hazırlanmıştır. Yüksek lisans eğitimim ve çalışmamın hazırlanması süresince büyük bir gayret, emek ve hoşgörüsüyle, bilgi ve tecrübelerinden yararlanmama izin veren, en ümitsiz hissettiğim anlarda bana olan desteği ve sağladığı motivasyon ile yoluma devam etmemi sağlayan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy'a, gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı teşekkür ederim. Meslek hayatımda ve bilimsel araştırmalarımda her zaman kendisini örnek alacağım.

Yüksek Lisans çalışmalarına başladığım dönem ile Üroloji uzmanlık sınavına hazırlık sürecimin ve hemen arkasından Erzurum'da zorunlu hizmet ile görevlendirilmemin eş zamanlı olmasının çalışmalarımı aksatmasına izin vermeyen değerli dostlarım Sayın Arş. Gör. Kutluhan İncekara'ya ve Sayın Arş. Gör. Mustafa Ömür Köse'ye teşekkürü borç bilirim. Bu çalışmanın gerçekleşebilmesi için kendi çalışmalarına ayırabilecekleri çok değerli ve kısıtlı zamanlarını benim için feda eden sevgili Ömür ve Kutluhan'ı her zaman yüksek lisans eğitimimin bana kazandırdığı en önemli değerler olarak hatırlayacağım. Tezimin yazım aşamasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Zelal Erkişi'ye ve Mehmet Ali Tüfekçi'ye de en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmaya verdiği her türlü destek için sevgili meslektaşım Haliç Üniversitesi Genel Sekreteri Sayın Yrd. Doç. Dr. Kürşat Özdilli'ye teşekkür ederim. Çalışmam için gerekli verileri toplamama imkân sağlayan başta sorumlu hemşiremiz Canan Göz olmak üzere tüm Erzurum Numune Hastanesi Üroloji Kliniği hemşireleri Tülay Hattısar, Selçuk Ulupınar, Umut Yıldız, Ömer Ceylan, Pınar Vatandaş ve sekreterimiz Bindal Aktümer'e teşekkür ederim.

Başarılı olmam için ihtiyacım olan sevgi, huzur ve desteği hayatım boyunca bana cömertçe sunan, sahip olduğum tüm değerleri borçlu olduğum sevgili babam Prof. Dr. Ahmet Çakır, annem Gülten Çakır ve ablam Destan Nil Kulaçoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak da yüksek lisans eğitimine başvurabilmek için LES'e çalışmaya başladığım ilk günden, tezimin son cümlesini yazdığım güne kadar beni hiç yalnız bırakmayan Pınar Akiskalıoğlu'na çok teşekkür ederim.

İSTANBUL, 2008

Ömer Onur ÇAKIR

## İÇİNDEKİLER

<b>KISALTMALAR</b> .....	V
<b>ŞEKİLLER</b> .....	VII
<b>TABLolar</b> .....	IX
<b>ÖZET</b> .....	XI
<b>SUMMARY</b> .....	XIII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Taş Oluşumunun Fizyolojisi.....	1
1.1.1. Termodinamik Çözünürlük.....	1
1.1.2. Nükleasyon ve Agregasyon. ....	2
1.1.3. Serbest Partikül Nükleasyonu ve Kristal Retansiyonu.....	3
1.1.4. Kristal Oluşumunun Modifikatörleri.....	4
1.2. Kalsiyum Oksalat Taşı Patofizyolojisi.....	6
1.2.1. Hiperkalsiüri.....	6
1.2.2. Hiperoksalüri.....	7
1.3. Kalsiyum, Vitamin D ve Kalsiyum Oksalat Taşı İlişkisi.....	8
1.4. Böbrek Taşı Hastalığının Genetik Temeli.....	10
1.4.1. Hiperkalsiüri, Kalsiyum Oksalat Taşı ve Vitamin D Reseptörü İlişkisi.....	10
1.4.2. Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü Fonksiyonları.....	12
1.4.3. Vitamin D Reseptörü Geninin Yapısı.....	13
1.4.4. Vitamin D Reseptörü Polimorfizmleri.....	14
1.4.5. VDR Reseptörü Polimorfizmlerinin Fonksiyonelliği.....	16
1.4.5.1. Fok I Polimorfizmi.....	17

1.4.5.2. Bsm-Apa-Taq ve 3'UTR Polimorfizmleri.....	19
1.4.6. Vitamin D Reseptörü Polimorfizmlerinde Görülen Etnik Varyasyonlar.....	20
<b>2. AMAÇ</b> .....	23
<b>3. GEREÇLER</b> .....	24
3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler.....	24
3.2. Kimyasallar.....	24
3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler.....	25
3.3.1. DNA İzolasyonu.....	25
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri.....	25
3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları.....	25
3.3.4. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri.....	26
3.3.5. Oligonükleotid Primerler.....	28
3.3.6. DNA Büyüklük Markörleri.....	28
3.3.7. Cihazlar.....	28
<b>4. YÖNTEMLER</b> .....	31
<b>5. SONUÇLAR</b> .....	38
5.1. Örneklerin Tanımı.....	38
5.2. DNA İzolasyonu.....	39
5.3. VDR Polimorfik Bölgelerinin PCR-RFLP Yöntemi ile Moleküler Analizi.....	39
5.3.1. Bsm I Polimorfik Bölgesinin Analizi.....	40
5.3.2. Apa I Polimorfik Bölgesinin Analizi.....	41
5.3.3. Taq I Polimorfik Bölgesinin Analizi.....	43

5.3.4. Tru9I Polimorfik Bölgesinin Analizi.....	45
5.3.5. Fok I Polimorfik Bölgesinin Analizi.....	47
5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	50
5.4.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Genotip ve Alel Frekansları.....	51
5.4.2. Polimorfizmlerin Hastalıklarla İlişkilendirilmesi.....	51
5.4.3. Haplotip Analizi.....	54
5.4.4. Yaş-Hastalık İlişkisinin Araştırılması.....	56
5.4.5. Aile Öyküsü-Hastalık İlişkisinin Araştırılması.....	57
5.4.6. Tekrar Taş Oluşturma-Hastalık İlişkisinin Araştırılması.....	60
5.4.7. Sigara Kullanımı-Hastalık İlişkisinin Araştırılması.....	60
<b>6. TARTIŞMA</b> .....	62
<b>7. KAYNAKLAR</b> .....	68
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	83

**KISALTMALAR**

<b><math>\mu</math>l</b>	mikrolitre
<b><math>\mu</math>m</b>	mikrometre
<b><math>\mu</math>M</b>	mikromolar
<b>aa</b>	amino asit
<b>AGT</b>	alanin glioksalat aminotransferaz
<b>bç</b>	baz çifti
<b>Ca</b>	kalsiyum
<b>CaOx</b>	kalsiyum oksalat
<b>CaP</b>	kalsiyum fosfat
<b>COL2A1</b>	kolojen tip II alfa 1
<b>EDTA</b>	etilen diamintetraasetik asit
<b>FISH</b>	floresan in situ hibridizasyon
<b>HDAC7</b>	histon deasetilaz 7
<b>HRT</b>	hormon replasman terapisi
<b>Kf</b>	oluşum sabiti
<b>Ksp</b>	çözünürlük ürününün denge sabiti
<b>LD</b>	bağlantı eşitsizliği
<b>Na</b>	sodyum
<b>PBMC</b>	periferel kan mononükleer hücreleri
<b>PCR</b>	polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PFKM</b>	fosfofruktokinaz
<b>PTH</b>	parathormon
<b>RFLP</b>	restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
<b>RXR</b>	retinoid x reseptörü
<b>SCP</b>	start kodon polimorfizmi
<b>SENP1</b>	sentrin/SUMO-spesifik proteaz
<b>UTR</b>	translasyona uğramayan bölge
<b>UV</b>	ultraviyole

<b>VDR</b>	vitamin D reseptörü
<b>VDRE</b>	vitamin D reseptörü cevaplayıcı elemanı
<b>XRD</b>	X ışını toz difraksiyonu

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b>	Kromozom 12q13.1 üzerinde VDR lokusunun genomik yapısı ve diğer komşu genler .....	15
<b>Şekil 1.2.</b>	VDR geninin ekzon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin pozisyonları.....	39
<b>Şekil 5.1.</b>	DNA izolasyonu sonrasında örneklerin EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	33
<b>Şekil 5.2.</b>	BsmI PCR ürünlerinin % 1 'lik agaroz jelde görüntülenmesi.	40
<b>Şekil 5.3.</b>	BsmI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	40
<b>Şekil 5.4.</b>	Aile öyküsüne göre BsmI genotipleri .....	41
<b>Şekil 5.5.</b>	ApaI PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi ..	42
<b>Şekil 5.6.</b>	ApaI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	42
<b>Şekil 5.7.</b>	Aile öyküsüne göre ApaI genotipleri .....	43
<b>Şekil 5.8.</b>	TaqI PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi .	44
<b>Şekil 5.9.</b>	TaqI restriksiyon kesimi ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	44
<b>Şekil 5.10.</b>	Aile öyküsüne göre TaqI genotipleri .....	45
<b>Şekil 5.11.</b>	Tru9I PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .	46
<b>Şekil 5.12.</b>	Tru9I restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	46
<b>Şekil 5.13.</b>	Aile öyküsüne göre Tru9I genotipleri .....	47
<b>Şekil 5.14.</b>	FokI PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	48
<b>Şekil 5.15.</b>	FokI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi .....	48
<b>Şekil 5.16.</b>	Ff alelini taşıyan DNA örneğinin dizi analizi .....	48
<b>Şekil 5.17.</b>	FF alelini taşıyan DNA örneğinin dizi analizi .....	49



<b>Şekil 5.18.</b>	ff alelini taşıyan DNA örneğinin dizi analizi .....	49
<b>Şekil 5.19.</b>	Aile öyküsüne göre FokI genotipleri .....	50

## TABLOLAR

<b>Tablo 1.1.</b>	VDR alel frekanslarının etnik gruplar arasında karşılaştırılması .....	21
<b>Tablo 3.1.</b>	Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri .....	28
<b>Tablo 4.1.</b>	PCR reaksiyonları .....	33
<b>Tablo 4.2.</b>	PCR döngü şartları .....	33
<b>Tablo 4.3.</b>	Restriksiyon enzimleri ve kesim şartları .....	34
<b>Tablo 4.4.</b>	VDR geni polimorfik bölgelerinin PCR ürünleri ve restriksiyon fragment uzunlukları .....	37
<b>Tablo 5.1.</b>	BsmI genotip frekansları .....	41
<b>Tablo 5.2.</b>	ApaI genotip frekansları .....	43
<b>Tablo 5.3.</b>	TaqI genotip frekansları .....	45
<b>Tablo 5.4.</b>	Tru9I genotip frekansları .....	47
<b>Tablo 5.5.</b>	FokI genotip frekansları .....	50
<b>Tablo 5.6.</b>	BsmI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması .....	52
<b>Tablo 5.7.</b>	TaqI polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması .....	52
<b>Tablo 5.8.</b>	FokI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması .....	53
<b>Tablo 5.9.</b>	Tru9I polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması .....	53
<b>Tablo 5.10.</b>	ApaI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması .....	54
<b>Tablo 5.11.</b>	Polimorfizm-hastalık ilişkilendirme sonuçları .....	55
<b>Tablo 5.12.</b>	BsmI polimorfizmine ait odds ratio.....	55
<b>Tablo 5.13.</b>	BsmI, ApaI, TaqI haplotip analizi.....	55
<b>Tablo 5.14.</b>	Haplotip-hastalık ilişkisi.....	55

<b>Tablo 5.15.</b>	Örneklerin 60 yaş üstü ve altı olarak gruplandırılması .....	56
<b>Tablo 5.16.</b>	60 yaş üstü ve altı gruplarda ki-kare testi .....	56
<b>Tablo 5.17.</b>	Örneklerin <20, 20-40, 40-60 ve >60 yaş gruplarına dağılımı	56
<b>Tablo 5.18.</b>	<20, 20-40, 40-60 ve >60 yaş gruplarında ki-kare testi .....	56
<b>Tablo 5.19.</b>	Hasta bireylerin aile öyküsüne göre gruplandırılması .....	57
<b>Tablo 5.20.</b>	FokI – Aile Öyküsü ilişkilendirmesi .....	57
<b>Tablo 5.21.</b>	BsmI - Aile Öyküsü ilişkilendirmesi .....	58
<b>Tablo 5.22.</b>	Tru9I - Aile Öyküsü ilişkilendirmesi .....	58
<b>Tablo 5.23.</b>	ApaI – Aile Öyküsü ilişkilendirmesi .....	59
<b>Tablo 5.24.</b>	TaqI – Aile Öyküsü ilişkilendirmesi .....	59
<b>Tablo 5.25.</b>	Tekrar taş oluşturma ve hastalık ilişkisi için ANOVA testi ....	60
<b>Tablo 5.26.</b>	Hasta ve kontrol popülasyonlarının sigara kullanımına göre gruplandırılması .....	60
<b>Tablo 5.27.</b>	Sigara kullanımı- hastalık ilişkisinin gösterilmesi .....	61

## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Ömer Onur ÇAKIR  
 Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
 Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
 Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY  
 Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Mayıs 2008

## ÖZET

Böbrek taşı hastalığı genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöriyel bir patolojiye sahiptir. İdyopatik taş hastalarının akrabalarında artmış taş oluşumu riskinin % 60'a varan oranlarda genetik faktörlerle açıklanabileceği söylenebilir. Kalsiyum oksalat (CaOx) taşı olan tüm hastaların % 30 ile % 60'ında hiperkalsüri görülür. Aktif kalsiyum emilimi için en önemli faktör 1,25-dihidroksi vitamin D3 ya da diğer adıyla kalsitrioldür. Kalsitriol, barsaktan kalsiyum emiliminin yanı sıra, kemik ve böbrek üzerinde indirekt etkilere sahiptir. Dolayısıyla, Vitamin D endokrin sistemi, kemik ve kalsiyum homeostazı kontrolünün merkezinde yer alır. Hücre proliferasyonunu, kalsiyum absorpsiyonunu ve hücre farklılaşmasını düzenler. Kalsitriol tüm genomik aktivitelerini vitamin D reseptörü (VDR) vasıtasıyla yürütür. VDR geni üzerinde birçok polimorfizm saptanmıştır, bunlardan en çok çalışılanları ApaI, EcoRV, BsmI, TaqI, FokI ve Tru9I'dır. VDR polimorfizmleri etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. Etnik alel varyasyonlarının sonuçlarını, etnik gruplar arasında diyet ve egzersiz gibi farklı çevresel faktörler yüzünden tam olarak anlamak zordur. Buna ek olarak, etnik gruplar arasında VDR polimorfizmlerinin birbirleri ile ve diğer genlerin varyantlarıyla ilişkide buldukları çok farklı genetik altyapı bulunmaktadır. Bu nedenle farklı etnik gruplardaki VDR polimorfizmlerinin haplotip yapısını açıklamak büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada kalsiyum oksalat böbrek taşı hastalarında taş oluşumu ile BsmI, ApaI, TaqI, Tru9I ve FokI polimorfizmlerinin ilişkisi araştırılmıştır. 98 hasta ve 70 sağlıklı birey ile yapılan çalışmada BsmI lokusunun hastalıkla ilişkilendirilebileceği ve b alelinin hastalık için 1.5 kat risk faktörü teşkil ettiği bulunmuştur. Ayrıca bt haplotipi hastalık ile

ilişkilendirilmiştir. Yaş, aile öyküsü ve sigara kullanımının taş oluşumuna etkisi saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Vitamin D reseptörü, BsmI, ApaI, TaqI, FokI

**GENERAL INFORMATION**

Name and Surname : Ömer Onur ÇAKIR  
Field : Molecular Biology and Genetics  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist.Prof.Dr.Nagehan ERSOY  
Degree Awarded and Date : Master of Science – May 2008

**SUMMARY**

Kidney stone disease has a multifactorial pathology involving the interaction of genetic and environmental factors. There is increased risk of stone formation in the relatives of idiopathic stone patients, which can be explained up to 60% by genetic factors. 30-60% of the patients with calcium oxalate (CaOx) stones are proved to have hypercalciuria. The most important factor in the active calcium absorption is 1,25-dihydroxy vitamin D, which is also known as calcitriol. Calcitriol has indirect effects on bone and kidney in addition to its role in intestinal calcium absorption. Therefore vitamin D has a central role in the control of endocrine system, bone and calcium homeostasis. Calcitriol mediates its genomic activities via vitamin D receptor (VDR). There are lots of polymorphisms identified in the VDR locus, the most widely studied ones are ApaI, EcoRV, BsmI, TaqI, FokI and Tru9I. There are ethnic variations in the distribution of VDR polymorphisms. The outcomes of the ethnic variations are not easy to understand due to differences in dietary habits and environmental factors among ethnic groups. In addition to that, there are different genetic backgrounds on which VDR polymorphisms interact with each other and with variants of other genes. Therefore it is important to explain the haplotype structures of VDR polymorphisms in different ethnic groups. In this study the relevance of ApaI, BsmI, TaqI, FokI and Tru9I polymorphisms with the CaOx kidney stone formation is studied. In this case-control study, including 98 patients and 70 healthy controls, b allele of BsmI polymorphism is found to be associated with 1.5 times increased risk for the disease. In addition to that, bt haplotype is found

to be related to the disease state. Age, family history and smoking status are found not to have an effect in stone formation.

**Key words:** Vitamin D receptor, BsmI, ApaI, TaqI, FokI

## 1. GİRİŞ

Böbrek taşı hastalığı (nefrolitiaz) genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöriyel bir patolojiye sahiptir. Amerika'da kadınların %5'i, erkeklerin ise %12'si hayatlarının bir döneminde böbrek taşı problemi yaşamaktadırlar ve bu rakamlar her iki cinsiyet için de giderek artmaktadır. Böbrek taşlarının % 80'inin yapısında kalsiyum oksalat (CaOx) ve kalsiyum fosfat (CaP) bulunmaktadır; % 10'u strüvitten, % 9'u ise ürik asitten oluşmaktadır. Taşların %1'i ise sistin veya amonyum asit ürattan oluşur, ya da ilaç kullanımına bağlı olarak oluşan taşlardır. Böbrek taşı oluşumu fizyolojik olarak, bahsedilen maddelerin istenmeyen bir şekilde sıvı fazdan katı duruma geçmeleri sonucu oluşur (Coe vd., 2005). Günümüzde taş hastalığının genetik temeli henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Taş oluşumu tetikleyici ve önleyici faktörler arasındaki dengesizlikler sonucu ortaya çıktığından dolayı, genetik ve çevresel faktörler arasındaki kompleks ilişkilerin zaman içinde ortaya koyulmasıyla böbrek taşı hastalığının sebeplerinin aydınlatılması mümkün olabilecektir.

### 1.1. Taş Oluşumunun Fizyolojisi

#### 1.1.1. Termodinamik çözünürlük, satürasyon ve süpersatürasyon

Taş oluşumunun temelini süpersatürasyon oluşturur. Belli pH ve ısıda kristalize olabilme yeteneğine sahip bir madde suya artan miktarlarda katılırsa, kristallerin oluşabileceği bir satürasyon noktasına ulaşılır. Bir sıvıda çözünen maddelerin çözünmüş halde tutulabileceği kritik bir sınır vardır. Bu sınır aşıldığında kristalizasyon başlar. Kristaller oluştuğunda, çözeltinin o maddeye doymuş olduğu ifade edilir. Sistin, ürik asit gibi tek bir maddenin satürasyonu için maddenin miktarını belli bir pH ve ısıda giderek arttırmak yeterli iken, eğer kristal iki ya da daha fazla bileşenden oluşuyorsa (örneğin CaOx) satürasyon düzeyini bu maddelerin



konsantrasyonları çarpımı kontrol eder. Kristalizasyonun başlaması için gerekli doygunluk seviyesinde, termodinamik çözünürlükten bahsedilir ve bu değer ( $K_{sp}$ ) sabittir (Meyer, 1981). İdrardaki kalsiyum ve oksalat konsantrasyonları sudaki termodinamik çözünürlüklerini aştığı takdirde kalsiyum oksalat kristalleri çökebilir. Bununla birlikte, idrarın içindeki inhibitörler ve diğer moleküller sayesinde kalsiyum oksalat solüsyon içindekinden daha yüksek konsantrasyonda bulunabilir ve bu durumdaki idrara metastabil denir. Kalsiyum oksalat konsantrasyonu daha fazla artarsa, solüsyon olarak kalamayacak bir seviyeye ulaşılmış olur. Bu konsantrasyonda ( $K_f$ ) idrarda kalsiyum oksalat oluşur. İdrardaki birçok taş komponentinin konsantrasyonu  $K_{sp}$  ve  $K_f$  arasındaki metastabil aralıktadır. Herhangi bir kristalizasyon işlemi için sıcaklık ve pH her zaman belirlidir (Pak, 1990). Üriner sistem taşları idrarda kristal olmadıkça oluşmaz. Kristal oluşması için idrarın tuzla süpersatüre olması gerekir. Kristalleri oluşturan kimyasalların idrar ekskresyonunun artmasıyla, kristalizasyon riski artar. Sudaki doygunluk ve çözünürlük ürünlerini hesaplamak kolaydır, fakat idrar kompleks bir solüsyondur. İdrardaki maddelerin konsantrasyonları sudaki doygunluk noktasına ulaşırsa beklenen kristalizasyon oluşmaz, çünkü idrar saf sudan daha fazla oranda solüsyonda çözünen madde tutabilir (Welshman ve McGeown, 1975).

### **1.1.2. Nükleasyon ve agregasyon**

Normalde idrardaki kalsiyum oksalat konsantrasyonu su içerisindeki çözünürlüğünden dört kat daha fazladır (Coe ve Parks, 1998). İdrar miktarı azaldığında kalsiyum, oksalat, fosfat ya da ürat atılım oranının artması kalsiyum oksalat süpersatürasyonunu artırır. Öncelikle kalsiyum oksalat konsantrasyonu kendi  $K_{sp}$  değerini geçer ve kristalizasyon başlar. Bununla beraber inhibitör ve diğer moleküller sebebiyle süpersatürasyon, kalsiyum oksalat çözünürlüğünün 7-11 katı olduğu zaman idrarda çökeltme meydana gelir. Saf solüsyonlarda meydana gelen çekirdek oluşumuna homojen çekirdek (homojen nükleasyon) oluşumu denir. İdrarda ise bu kristal çekirdek yapılar var olan yüzeyler üzerinde oluşur (heterojen

nükleasyon). Epitel hücreleri, hücre döküntüleri, diğer kristaller ve kırmızı kan hücreleri heterojen çekirdek gibi davranabilir (Brown ve Purich, 1992). Epitel hücre yaralanması kristal oluşumu için gerekli konsantrasyonu düşürür. Biyolojik işlemler de çekirdek oluşumu için zemin hazırlayabilirler.

Üriner taşların oluşumunu anlamada gerekli bir diğer kavram da birikmedir. Kristal çekirdekler böbrek tübüllerine 5-7 dakika içerisinde yapışabilecek ve lümeni tıkayabilecek kadar büyüyemeyecekleri için tübüllerden geçerek böbrek pelvisine ulaşırlar. Fakat çok kısa bir sürede birikerek büyük kümeler de oluşturabilirler (Kok vd., 1990). Büyüme ve birikmenin birlikte olması taş hastalığı mekanizmasını açıklar.

### **1.1.3. Serbest Partikül Nükleasyonu ve Kristal Retansiyonu**

Kristalizasyonun standart fiziksel kuralları, statik bir solüsyonda kristal oluşumunu açıklayabilir. *In vivo* şartlarda oluşan idrar statik bir solüsyon değildir; sürekli akar, çözünen eklenebilir ve çıkabilir. İdrar glomerüllerden nefronlar yoluyla toplayıcı sisteme 2-5 dakikada geçer. İdrarın en yüksek konsantrasyon noktası genellikle böbrek papillalarındadır (Jordan vd., 1978). Yapılan çalışmalarda serbest partikül taş oluşumunun matematiksel olarak imkansız olduğu hesaplanmıştır (Finlayson ve Dubois, 1978). Bu, taş hastalığında kristallerin böbrek epitelyumuna yapışmasına ve partiküllerin birleşmesine ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Eğer kristal kitle böbrek papillasına ya da tübülüne yerleşirse, bunu sistemden atabilmek çok uzun sürmez. Eğer kristal böbrekte kalırsa, uzun zaman sürecinde idrarda aşırı doyunluk ya da yeni kristallerin toplanmasıyla büyüme gerçekleşir. Birçok böbrek taşında, doyunluk dönemindeki aralıklı büyümeyi gösteren tabakalı yapı vardır. Medüller sünger böbrek ya da ureteropelvik darlık gibi anatomik anormallikler, kristal toplanmasında predispozan faktörlerdendir. Tübüler epitelyumun yapışkanlığının artması da kristal toplanmasına sebep olur. Sonuç olarak böbrekteki hücresel kalsiyum ya da oksalat transportundaki anormallikler intraselüler ya da interstisyel kristal depolanmasına ve taş oluşumuna sebep olabilir (Menon ve Kou,

1992). Taş hastalarında papiller plakların prevalansının kontrol grubuna göre iki kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Kalsiyum fosfat ve ürik asit taşı olanlarda %100 papiller plaklar varken, strüvit taşı olanlarda yalnızca %20 oranında plak olduğu görülmüştür (Kumar, 1991).

#### **1.1.4. Kristal Oluşumunun Modifikatörleri**

İdrar, kristal oluşumunu etkileyen maddelerden oluşur (Garside, 1982). Bunlar inhibitörler, kompleks yapıcılar ve indükleyicilerdir. Çoğu araştırmacı idrarı süpersatüre olan hastaların idrarlarında kristalizasyon inhibitörleri taşınması sebebiyle kristalizasyonun izlenmediğini belirtmişlerdir. Taş oluşma ihtimali olan hastaları normal hastalardan ayıran ve yüksek doğruluk oranına sahip olan saturasyon inhibisyon indeksi adı verilen bir indeks geliştirilmiştir (Garside, 1982). İdrar inhibitörleri kristallerin gelişim noktalarına yapışarak kristalin daha fazla büyümesini ve agresyonu önler. Bu inhibitörler organik ya da inorganik olabilir. İdrarda kalsiyum oksalat ve kalsiyum fosfat kristal sistemleri için inhibitörler tanımlanırken, urat için tanımlanmamıştır. Magnezyum, sitrat, pirofosfat ve nefrokalsin kalsiyum fosfat, kristal sisteminin inhibitörleridir (Ito ve Coe, 1977). İdrarda kalsiyum oksalat kristallerinin inhibitörleri sitrat, profosfat, glukozaminoglikanlar, RNA parçaları ve nefrokalsindir. En çok inhibisyonu gerçekleştiren, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Khan vd., 1988). İki idrar glikoproteini olan nefrokalsin ve Tamm-Horsfall proteini kalsiyum oksalat monohidrat sisteminin ana inhibitörleridir. İkinci olarak litostatin böbrekte nefrokalsinle benzer yerde lokalize olur, ancak immunolojik yapısı farklıdır (Grover vd., 1994). Diğer bir idrar kalsiyum oksalat sistemi inhibitörü üropotindir (Shiraga vd, 1992). Üropotinin, büyümenin yanı sıra kalsiyum oksalat monohidrat sisteminin agregasyonu ve nükleasyonunu da engellediği gösterilmiştir (Asplin vd., 1998). Böbrek taşlarındaki diğer bir protein de alfa-1 antitripsindir. Bu protein kalsiyuma bağlanmaz, ancak inflamasyonda önemli rolü vardır. Böbrek taşlarında bu proteinin varlığı, kristallerin oluşum ve gelişim

aşamasında kan hücreleriyle kontak halinde olduğunu göstermektedir. Kristal ve kan hücreleri arasındaki reaksiyon, kristal yapışmasına neden olur (Umekawa vd.,1993).

Spesifik kristalleri çevreleyen iyonlar ile çözünebilir kompleks oluşturan kalsiyum oksalat gibi bileşikler, iyonun serbest iyon aktivitesini inhibe ederek, o iyon sisteminin saturasyonunu etkili olarak azaltır. Sitrat, kalsiyum için en güçlü kompleksör olup, maksimum etkisini pH 6,5 iken gerçekleştirir. Kalsiyum oksalat sisteminde magnezyum oksalat ile çözünebilir kompleksler oluşturur. Hem sitrat hem de magnezyum sadece inhibitör olarak değil, kompleksör olarak da etki eder (Malek ve Boyce, 1977).

#### **1.1.5. Matriks**

Üriner sistem taşlarının yapısında kristalin ya da mineral fazın yanı sıra kristal olmayan ya da organik bir faz da mevcuttur. Böbrek taşları basit kristaller değildir. Tiplerine göre % 10 ile % 65 arasında kristal olmayan materyal ya da matriks içerir. Kalsiyumlu tüm taşların % 2,5'i, ürik asit taşlarının % 2'si, strüvit ve apatit taşlarının ise % 1,1'ini oluşturur. Çalışmalar sonucunda matriksin idrar ve serumdaki birçok mukoprotein türevi olduğu gösterilmiştir (Rahman vd., 1986). Matriks içeriği taştan taşa değişmekle birlikte, çoğu sert taş yaklaşık olarak % 3 ağırlığında matrikse sahiptir (Boyce ve King, 1959). Alternatif olarak matriks taşı ağırlık olarak % 65 oranında matrikse sahip olabilir ve genellikle üriner enfeksiyonla ilişkisi vardır (Mall, 1975). Matriksin % 64'ü protein, % 9'u non-amino şeker, % 5'i glikozamin, % 10'u bağlı su ve % 12'si de organik kül yapısındadır. Matriks taşının kimyasal analizi % 65 oranında heksoamin ve % 10 oranında bağlı su içerdiğini göstermiştir. Matriksin polimerizasyonu sonucu matriks taşı oluşur. Matriksin renal tübülden, muhtemelen de proksimal tübülden orijin aldığı düşünülmektedir (Malek ve Boyce, 1973).

## 1.2. Kalsiyum Oksalat Taşı Patofizyolojisi

### 1.2.1. Hiperkalsiüri

Kalsiyum oksalat taşı olan tüm hastaların % 30 ile % 60'ında serum kalsiyum (Ca) düzeyi artmadan, idrar kalsiyum ekskresyonunda artış vardır. Bu durum hiperkalsiüri olarak adlandırılır. İdrar Ca atılımı, büyük bir oranda diyetle alınan kalsiyuma bağlıdır ve bu da batı ülkelerinde günlük 400 ile 2000 mg arasında değişmektedir. Hiperkalsiüri en somut olarak en az bir hafta boyunca, günde 100 mEq Na ve 400 mg Ca diyetine uyulması sonucunda, günde 200 mg'dan fazla kalsiyumun atılımı olarak tanımlanmaktadır (Pak vd., 1974). Hiperkalsiürinin absorbtif, renal ve resorptif hiperkalsiüri olmak üzere üç tipi bulunmaktadır.

Absorbtif hiperkalsiüride primer problem artmış intestinal kalsiyum emilimidir. Absorbtif hiperkalsiürinin iyi tanımlanmış üç alt grubu vardır. Tip 1, Tip 2 ve Tip 3. Absorbtif Hiperkalsiüri Tip 1' de hastanın kalsiyum-kısıtlı diyetle olsun ya da olmasın intestinal hiperabsorbsiyonu vardır. Absorbtif hiperkalsiürisi olan hastalarda barsaktan magnezyum absorbsiyonu normalken, oksalat absorbsiyonu artmıştır (Menon vd., 1992). Tip 2'de normal diyetle 300 mg/gün'ün üzerinde olan idrar kalsiyum atılımı kısıtlı kalsiyum diyeti sonucunda 200 mg/gün' ün altına iner. Tip 3'te ise, serum fosfat düzeyi düşüktür ve bunun sonucu olarak, artmış vitamin D üretimi ve artmış kalsiyum absorbsiyonu vardır.

Renal hiperkalsiüride, böbrekten primer kalsiyum kaçağı söz konusudur. Bunun yarattığı hafif hipokalsemi, parathormon salınımını stimüle eder. Artan kalsitriol ile barsaktan kalsiyum emilimi artar. Burada iki mekanizma vurgulanmalıdır. Birincisi, hem absorbtif hem renal hiperkalsiüride barsaktan kalsiyum emilimi artar. İkincisi ise, absorbtif hiperkalsiüride parathormon (PTH) baskılanırken, renal hiperkalsiüride PTH artar. Absorbtif hiperkalsiüride açlık idrar kalsiyum düzeyleri normaldir ve bu durum aşırı emilen kalsiyumu böbrekten atacak kadar aç kaldıkları anlamını taşır. Renal hiperkalsiüride ise kalsiyum yüksekliği

devam etmektedir. Açlıkta yükselmiş idrar kalsiyum düzeyi ve uyarılmış PTH fonksiyonları renal hiperkalsiürinin, absorbtif hiperkalsiüriden ayırımını sağlar.

Rezorptif hiperkalsiüride idrardaki artmış kalsiyumun kaynağı kemiktir. Bu sendrom hiperparatiroidizm ile eş anlamlıdır. Parathormonun direkt etkisiyle ya da PTH bağımlı kalsitriol sentezi sonucunda, fazla PTH salınımına bağlı kemik resorpsiyonunda, artmış intestinal kalsiyum emilimi kadar hiperkalsiüri görülür. PTH, tübüler kalsiyum resorpsiyonunu arttırmasına rağmen, kalsiyumun süzölmüş miktarı bu resorpsiyonu aşar ve hiperkalsiüri ortaya çıkar.

İdyopatik hiperkalsiüri, sağlıklı insanların % 5-10'unda ve kalsiyum nefrolitiazisi olan hastaların da yaklaşık % 50'sinde görülür (Coe ve Bushinsky, 1984). Bu çalışmalar kalsiyum atılımının poligenik kontrol altında olmasına rağmen, idyopatik hiperkalsiüride kalıtsal olarak otozomal dominant geçiş görülebileceğine işaret etmiştir (Holmes ve Goodman, 1995).

### **1.2.2. Hiperoksalüri**

Hiperoksalürinin üç farklı nedeni vardır: artmış oksalat üretimi, enterik hiperoksalüri, ve hafif metabolik hiperoksalüri. Artmış oksalat üretimi, primer hiperoksalüri ya da artmış hepatik dönüşüm sebebiyle olur. Primer hiperoksalürinin iki tipi vardır. Primer Hiperoksalüri Tip 1; nefrokalsinozis, dokularda oksalat birikimi ile karakterize ve tedavi edilmediği takdirde 20 yaşından önce böbrek yetmezliği nedeniyle ölüme sebep olan, otozomal resesif bir metabolizma bozukluğudur (Williams ve Smith, 1983). Primer Oksalüri Tip 1' in karaciğerdeki alanin glioksalat aminotransferaz (AGT) enzimindeki bir bozukluk sebebiyle oluştuğu gösterilmiştir (Danpure ve Jennings, 1988). AGT, normal insan karaciğerinde glioksalatın glisine transaminasyonunu ya da detoksifikasyonunu katalizler. Primer hiperoksalüride bu enzim eksik olduğu için glioksalat oksalata okside olur. Primer Hiperoksalüri Tip 2 ya da L-gliserik asidüri bu hastalığın nadir görülen bir tipidir (Williams ve Smith, 1983). Karaciğer enzimlerinden D-gliserat dehidrogenaz ya da glioksalat redüktaz eksikliğinde, idrardaki oksalat ve gliserat

atılımı artar. Primer hiperoksalürinin her iki tipi de yüksek seviyede oksalat üretimine ve idrarla günlük 1,5-3 mmol oksalat atılımına neden olur (Itami vd, 1990). Primer hiperoksalüri bazı hastalarda oksalat üretimini azaltan piridoksin (200-400 mg/gün) ile tedavi edilmektedir. Primer hiperoksalürisi olan bazı hastalarda piridoksin, glioksalatın glisine dönüşümünde kofaktör olarak rol oynar ve idrardan oksalat atılımını azaltır.

Enterik hiperoksalüride oksalat mideden ve kolondan emilir (Menon ve Mahle, 1982). İnce barsak rezeksiyonu (Smith, 1992), intrensek hastalıklar ya da ileojejunal baypas (Vainder and Kelly, 1976) gibi malabsorpsiyona yol açabilecek herhangi bir sebep, kolonik epitelin artmış safra tuzuna maruz kalması nedeniyle, oksalatın kolonik permeabilitesini artırır.

Birçok çalışma, idyopatik kalsiyum oksalat taşlarının patogeneğinde, hafif metabolik hiperoksalürinin en az hiperkalsiüri kadar önemli bir faktör olduğunu ortaya koymuştur. Kalsiyum taşı olan hastaların % 30-50'inde üriner oksalat atılımı artmıştır (Menon ve Mahle, 1982). Hiperoksalüri, normalden % 90 daha fazla oksalat atılımı olarak tarif edilmiş ve üriner sistem taş hastalığı olanların % 37'inde bu durum izlenmiştir (Wallace vd., 1981).

### **1.3. Kalsiyum, Vitamin D ve Kalsiyum Oksalat Taşı İlişkisi**

Batı diyetindeki kalsiyum miktarı ortalama 600-1200 mg olmakla birlikte, kg başına 15 mg civarındadır (Pak vd., 1974) ve bunun % 30-% 45'i absorbe edilir. Kalsiyumun barsaktan emilimi diyetle alımıyla ters orantılıdır. Yani kalsiyum emilimi, düşük kalsiyum ağırlıklı diyetlerde daha fazladır. Emilen kalsiyumun 100-200 mg'ı barsağa salınır. Barsaktan kalsiyum emilimi, hücrel ve hücre çevresindeki yollar vasıtasıyla sağlanır. Yüksek luminal konsantrasyonlarda, emilim temel olarak hücre çevresindeki yollar arasında difüzyonla sağlanır. Düşük konsantrasyonlarda ise hücrel yollar önem kazanır. Kalsiyum iyon formunda emilir. Bu sebeple fosfat, sitrat, sülfat, oksalat, yağ asitleri gibi kalsiyuma bağlanan maddeler kalsiyumun emilimini azaltırlar (Menon ve Mahle, 1982). pH 6,1'in altına

indiğinde kalsiyum ile oksalatın birleşimi azaldığı için kalsiyum, jejunum ve ileumun proksimal bölümünde maksimum emilir. Zaten buralardaki pH değeri genellikle 6'nın altındadır. Bir miktar kalsiyum ise tüm gastrointestinal sistem boyunca emilir.

Aktif ya da transselüler kalsiyum Emilimi için en önemli faktör 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) ya da diğer adıyla kalsitrioldür. Kalsitriol, barsak mukozasındaki fırçamsı kenardan kalsiyum Emilimini artırır. Bu da membran lipid konsantrasyonunu değiştirerek, zarın kalsiyuma geçirgenliğinde hızlı bir artış meydana getirir. Diyetteki kalsiyumun miktarı azalınca, kalsitriol üretimi artar, serum düzeyi yükselir ve kalsiyum duodenum, jejunum, ileum ve kolondan emilir.

Vitamin D'nin 40 metaboliti tanımlanmış olmakla birlikte, kalsitriolün vitamin D'nin barsaktan Emilimi artıran en güçlü uyarıcı olduğu kabul edilir (De Luca vd., 1980; Henry vd., 1992). Güneş ışığı, 7-dihidroksilesterolün cildin malpigi tabakasında previtamin D<sub>3</sub>'e dönüşmesine sebep olur. Previtamin D<sub>3</sub> daha sonra karaciğere taşınır ve 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>'e hidroksile edilir, bu ürün ise proksimal renal tübülde 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>'e hidroksile edilir. Bu dönüşüm paratiroid hormon ve hipofosfatemi ile uyarılır. PTH proksimal renal tübül mitokondrisindeki 1-alfa hidroksilaz enzimini uyarır, kalsitriol kana salınır, barsağa ulaşır ve epitel hücrelerdeki fırçamsı kenarlardaki zarın reseptörüne bağlanır. Böbrek, kalsitriolün en önemli üreticisi olmasına rağmen, aktive olmuş makrofajlar ve diğer hücreler de kalsitriolün üretimine katkıda bulunur.

Barsaktan kalsiyum Emiliminin yanı sıra 1,25 dihidroksivitamin D<sub>3</sub>, kemik ve böbrek üzerinde indirekt etkilere sahiptir. Kemikte kalsitriol osteoklastik aktiviteyi artırarak, PTH'nun yardımıyla kemik resorpsiyonuna sebep olur (Raisz vd., 1972), böylece böbreğe ulaşan kalsiyum ve fosfat miktarı artar. Fakat PTH renal kalsiyum re-absorpsiyonunu ve fosfat ekspresyonunu artırır. Sonuç olarak serum kalsiyum seviyesi artar, PTH salınımı baskılanır ve kalsitriol üretimi de azalmış olur.



#### **1.4. Böbrek Taşı Hastalığının Genetik Temeli**

Genetik faktörler, böbrek taşı oluşumunun önemli belirleyicileri olarak düşünülmektedir. Örnek olarak bir çalışmada taş hastalarının % 16-37'sinin pozitif aile öyküsü olduğu saptanmış ve pozitif aile öykülü erkek taş hastalarında hastalığa 2.57 kat daha fazla rastlandığı tespit edilmiştir (Curhan vd., 1997). Bu artmış göreceli risk, sonuçların hastalığı etkileyen çevresel faktörlere göre düzeltilmesi sonucu da aynı kalmıştır. Dolayısıyla, idyopatik taş hastalarının akrabalarında artmış taş oluşumu riskinin % 60'a varan oranlarda genetik faktörlerle açıklanabileceği söylenebilir. Sonuç olarak, diyete bağlı bilinen faktörler kontrol altına alındığında pozitif aile öyküsü tek başına en önemli risk faktörü olmaktadır (Curhan vd., 1997).

##### **1.4.1. Hiperkalsiüri, Kalsiyum Oksalat Taşı ve Vitamin D Reseptörü İlişkisi**

Renal taş oluşumunun metabolik nedenleri arasında en sık görüleni idyopatik hiperkalsiüridir. İdrara aşırı miktarda kalsiyum ekskresyonu sonucu oluşan idyopatik hiperkalsiüri, taş hastalarının yaklaşık % 50'sinde mevcutken genel popülasyonun % 10'undan azında saptanmıştır.

İdyopatik hiperkalsiüri böbrek taşı oluşumunda sıklıkla hiperürikozüri, hiperoksalüri ve hipositratüri gibi diğer metabolik risk faktörleriyle de ilişkilidir. Tekrar taş oluşturan hastaların en az üçte birinde hiperkalsiüri ve hipositratürinin her ikisi de mevcuttur (Hamm vd., 2002; Rudman vd., 1982). Daha önce yapılan çalışmalar, taş oluşturan hastalardaki idyopatik hipositratürinin normal olarak filtre edilmiş sitratın aşırı tübüler reabsorbsiyonundan kaynaklandığını göstermektedir. Rudman vd. (1982) idyopatik hipositratüri taş hastalarında sitrat, kalsiyum ve fosfatın renal işlenmesini direk veya dolaylı olarak etkileyen ortak bir bozukluğun olduğunu öne sürmektedirler. Kalsitriolün genomik ve genomik olmayan etkilerinin kontrolünde rol alan vitamin D reseptörü (VDR), aynı zamanda kalsiyum ve fosfatın tübüler işlemeyle ilgili moleküllerin hücresel ekspresyonunu, bu molekülleri

kodlayan genlerin promotor bölgelerinde yer alan vitamin D cevaplayıcı elemanlar yoluyla düzenler (Erben vd., 2002; Hoenderop vd., 2001).

Kalsiyum oksalat böbrek taşlarının oluşumu, kalsiyum ve oksalatın idrardaki konsantrasyonlarıyla doğru orantılı, magnezyum ve sitrat konsantrasyonları ile ise ters orantılıdır (Lindberg ve Sprague, 2001; Pak, 1998; Scott vd., 1999; Nunziata vd., 1991). Sitrat direkt olarak kalsiyum oksalatın spontan nükleasyonunu inhibe eder. Aynı zamanda kalsiyum oksalat ve kalsiyum fosfat kristallerinin büyümesini, aglomerasyonunu ve agregasyonunu engelleyen potansiyel bir inhibitördür. Bu durum da, hipositratürinin kalsiyum taşları oluşumuna yol açan bir sebep olabileceğini gösterir (Pak, 1998). Üriner sitrat ekskresyonunun en önemli belirleyicisi asit-baz dengesidir. Sitratüri alkalozis ile atar, asidozis ile azalır. Ancak, sitratın böbrekte işlenmesi tam olarak anlaşılabilmiş değildir, bunu etkileyen birçok faktör olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, Vitamin D'nin metabolik aktivitelerinin sitrat ekskresyonunu etkilediği kanıtlanmıştır.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , böbrekteki mitokondriyal sitrat metabolizmasını düzenleyerek üriner sitrat ekskresyonunu arttırmaktadır (Simpson, 1983).  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün etkisini gösterebilmesi için intraselüler reseptörüne -vitamin D reseptörü- bağlanması ve bu kompleksin çekirdek ve mitokondriyel genomdaki vitamin D cevap elementleriyle etkileşimde bulunması gerekmektedir (Haussler vd., 1998). Buna ek olarak, nükleer VDR,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün hızlı ve genomik olmayan etkilerinde de rol oynamaktadır (Bouillon vd., 2001; Erben vd., 2002).

Bunlar gibi daha birçok veri, VDR lokusundaki alelik varyasyonların hiperkalsiüri ile ve dolayısıyla kalsiyum taşlarının oluşumuyla ilişkili olabileceği yönündedir. Bunlardan biri, hiperkalsiüri hastalarının artmış lenfositlerinde VDR sayısını arttırdığının gösterilmesidir (Zerwekh vd., 1993). Bununla birlikte, hiperkalsiürik kalsiyum taşı hastaları azalmış vertebral mineral dansitesine sahiptir (Alhava vd., 1976; Sutton ve Walker, 1986; Bataille vd., 1991) ve VDR lokusundaki genetik varyasyon hepsinde olmasa bile (Hustmyer vd., 1994; Peacock, 1995; Garnero vd., 1995; Garnero vd., 1996; Zmuda vd., 1997) bazılarında kemik mineral dansitesi ile ilişkilendirilmiştir (Morrison vd., 1994; Spector vd., 1995; Salamone

vd., 1996; Harris vd., 1997). Ayrıca, kadınlarda barsak kalsiyum emilimi VDR genotipleri ile ilişkili bulunmuştur (Dawson vd., 1995; Wishart vd., 1997).

#### 1.4.2. Vitamin D ve Vitamin D Reseptörü Fonksiyonları

Vitamin D endokrin sistemi, kemik ve kalsiyum homeostazı kontrolünün merkezinde yer alır. Hücre proliferasyonunu, kalsiyum absorpsiyonunu ve hücre farklılaşmasını düzenler. Vitamin D'nin aktif formu, dolaşımdaki seviyesi çok sıkı bir şekilde düzenlenen 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>'tür (kalsitriol) ve kalsiyum homeostazı ile ilgili tüm genomik aktivitelerini VDR vasıtasıyla yürütür. Bunun dışında vitamin D, immün-cevab ya da kanser gibi diğer metabolik yollarda da görev alır (Haussler vd., 1998). Diyetle birlikte alınmış ya da 7-dehidrokolesterolün biyo-aktivasyonu ile oluşmuş vitamin D inerttir; biyolojik etkisini gösterebilmesi için aktive edilmeye ihtiyaç duyar. Vitamin D<sub>3</sub>, deride 7-dehidrokolesterolün ultraviyole ışığı ile previtamin-D<sub>3</sub>'e fotokonversiyonu (Holick vd., 1977; Okano vd., 1977) ve bunu takiben vitamin D<sub>3</sub>'e termal izomerizasyonu (Hanewald vd., 1961; Fraser ve Kodicek, 1970) ile üretilir. Vitamin D'nin metabolik aktivasyonunda ilk aşama 25. karbonun hidroksilasyonudur; bu reaksiyon 25-hidroksilasyon olarak adlandırılır. Bu reaksiyonun her ne kadar deri, barsak, böbrek gibi dokularda da gerçekleştiği rapor edildiği de önemli ölçüde karaciğerde meydana geldiği bilinmektedir. Vitamin D biyo-aktivasyonunun ikinci ve daha önemli basamağı, fizyolojik şartlar altında temel olarak böbrekte gerçekleşen 25(OH)D<sub>3</sub>'ten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> oluşumudur (Fraser ve Kodicek, 1970). Bu reaksiyonun gerçekleşmesini sağlayan enzim, 25(OH)D-1α-hidroksilaz, iç mitokodriyal membranda bulunur ve moleküler oksijen ile indirgenmiş ferrodoksinine ihtiyaç duyan bir sitokrom P-450 monooksigenazdır (Ghazarian vd., 1974). Son yıllarda birçok çalışma 25(OH)D<sub>3</sub>'ün 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'e çevrilmesinin sadece böbrekte olmadığını göstermiştir. Birçok hücre ve doku 1α-hidroksilaz ekspres eder, ancak insanlarda 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün bu ekstra-renal kaynakları sadece hamilelikte, kronik renal yetmezlikte ve romatoid artrit,

tüberküloz, sarkaidoz gibi patolojik durumlarda önemli ölçüde sirküle eden 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seviyelerine katkıda bulunur.

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün çoğu biyolojik aktiviteleri, ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörü olarak görev yapan, yüksek afiniteli VDR reseptörü vasıtasıyla yürütülür. VDR, steroid reseptör ailesine dahildir ve birçok farklı genin transkripsiyonuna etki etmek suretiyle aktif metabolit 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>'ün etkilerini düzenler (Whitfield vd., 1995). VDR tarafından kontrol edilen gen ekspresyonu prosesi sırasında reseptöre ligandın bağlanması, retinoid X reseptörü ile (RXR) dimerizasyonu, bu heterodimerin vitamin D reseptörü cevaplayıcı elementine (VDRE) bağlanması ve diğer nükleer proteinlerin transkripsiyon preiniasyon kompleksine dahil olmaları ile gerçekleşir. Dolayısıyla, VDR genindeki genetik değişimler gen aktivasyonunda önemli defektlere yol açabilir; bu da kalsiyum metabolizmasını, hücre proliferasyonunu, immün fonksiyonu etkileyebilir. (Ghazarian vd., 1974). VDR genindeki herhangi bir değişim kalsiyum metabolizmasını değiştirerek kalsiyum taşları oluşumu riskini arttırabilir. Bu nedenle VDR gen bölgesi, idyopatik kalsiyum taşı hastalığı için aday gen lokusu olarak düşünülmüştür. Alelik varyasyonlar reseptörün aktivitesini ve dolayısıyla kalsiyum absorpsiyonu ve ekskresyonu gibi Vitamin D'nin rol aldığı yolları etkileyeceklerdir. VDR genindeki polimorfizmler yakın zamanlarda kalsiyum böbrek taşı hastalığında farklı populasyonlar için incelenmeye başlanmıştır (Vezzoli 2002; Mossetti 2004).

### **1.4.3. Vitamin D Reseptörü Geninin Yapısı**

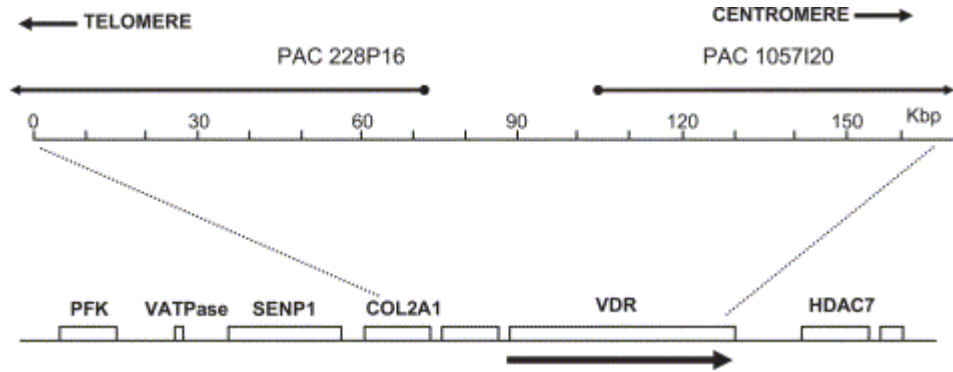
VDR cDNA'sının 1988 yılında klonlanmasından sonra (Baker vd., 1988) insan VDR geninin genomik yapısının keşfedilmesi yaklaşık on yıl sürmüş ve genin önemli bölümleri 1997 yılında ortaya koyulmuştur (Miyamoto vd., 1997). VDR geninin kromozom 12'deki yeri önce kabaca bağlantı analizi ile bulunmuş (Labuda vd., 1992), daha sonra floresan in situ hibridizasyon (FISH) ve radyasyon hibrid haritalama gibi ileri tekniklerle iyileştirilmiştir (Taymans vd., 1999). Sonraki

aşamalarda kromozom 12q13 bölgesinin yüksek rezolüsyonlu fiziksel haritası çıkarılarak gen lokusu kesinleştirilmiştir. Kromozom 12q13.1'e haritalanan VDR geninin 100 kb'dan uzun oldukça büyük bir gen olduğu (Şekil 1.1) ve kolojen tip II alfa 1 (COL2A1) geninin hemen yanında lokalize olduğu bulunmuştur (Huang vd., 1991; Takahashi et al., 1990). Ancak, COL2A1 ile VDR genleri arasında halen tanımlanamamış bir bölge bulunmaktadır. Şekil 1.1'de VDR geni ve etrafındaki genomik bölgelerin tamamlanmış fiziksel haritası görülmektedir. Bu haritadan da anlaşılacağı gibi, VDR geni fosfofruktokinaz (PFKM), sentrin/SUMO-spesifik proteaz (SEN1) ve histon deasetilaz (HDAC7) gen bölgeleri arasında yer almakta, aynı bölgede henüz bilinmeyen genler de bulunmaktadır.

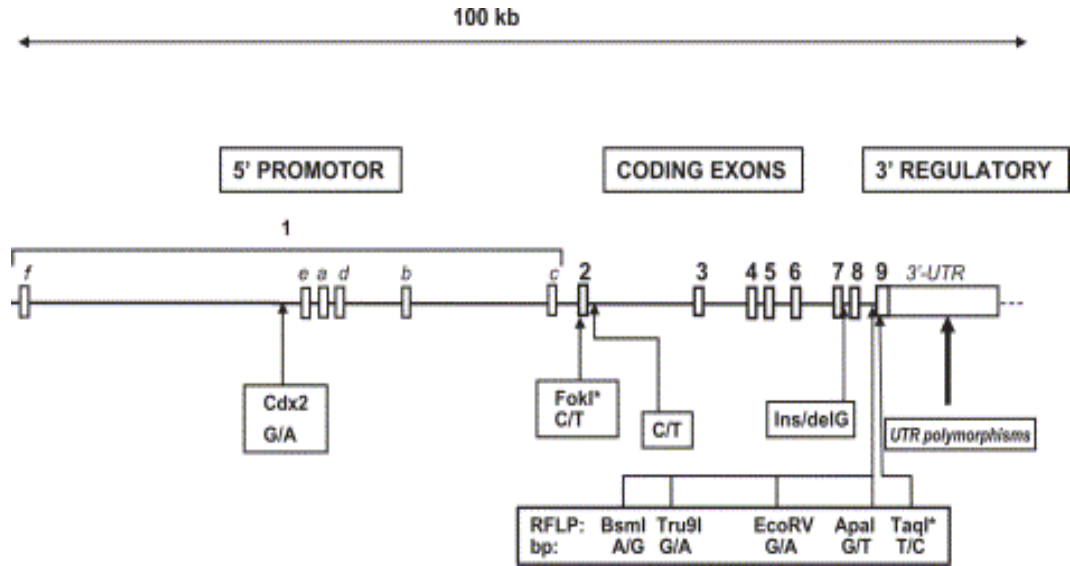
VDR geni, birçok dokuya özgün transkriptler oluşturabilme kapasitesinde olan geniş bir promotor bölgesine sahiptir ve dokuz ekzon içermektedir (Crofts vd., 1998) Birbiriyle bağlantı eşitsizliği (LD) gösteren intron 8 ve ekzon 9' da ve ayrıca ekzon 2'de çeşitli polimorfizmler saptanmıştır (Tokita vd., 1996; Ferrari vd.,1996; Torres vd., 1996; Gross vd., 1996).

#### **1.4.4. Vitamin D Reseptörü Polimorfizmleri**

VDR polimorfizmlerinin keşfi, 1990'ların başında, gen lokusunun değişik restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve polimorfik bant paternlerinin Southern Blot hibridizasyonu ile gösterilmesi yoluyla başlamıştır. Bu yöntemle, VDR geninin 3' ucunda ApaI, EcoRV, BsmI, TaqI (Morrison vd., 1994) ve Tru9I (Ye vd., 2000) restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmleri (RFLP) keşfedilmiştir. Şekil 1.2'de VDR geni üzerinde günümüzde bilinen VDR polimorfizmleri gösterilmiştir.



**Şekil 1.1.** Kromozom 12q13.1 üzerinde VDR lokusunun genomik yapısı ve diğer komşu genler. VDR genine ait ok işareti VDR genindeki transkripsiyonun yönünü göstermektedir. (PFK: fosfofruktokinaz, VATPase: vakuol ATPase, SENP1: sentrin/SUMO-spesifik proteaz, HDAC7: histon deasetilaz 7) (Uitterlinden vd., 2004b).



**Şekil 1.2.** VDR geninin ekzon-intron yapısı ve bilinen polimorfizmlerin pozisyonları. (Kodlayan dizilerdeki polimorfizmler (\*) işareti ile gösterilmiştir) (Uitterlinden vd., 2004b).

FokI RFLP'si ise daha farklı bir yöntemle bulunmuştur. VDR cDNA'sının Baker dizisi adı verilen orijinal dizisine (Baker vd., 1998) bakıldığında iki potansiyel translasyon başlangıç noktası (ATG) saptanmış ve dizi karşılaştırmaları sonucunda ilk potansiyel başlama bölgesinde T/C polimorfizminin (ATG/ACG) olduğu gösterilmiştir (Gross vd. 1996; Saijo vd., 1991; Sturzenbecker vd., 1994). Başlangıç

kodonu polimorfizmi olarak da tanınan bu polimorfizm daha sonraları bir RFLP testinde FokI restriksiyon enzimi kullanılarak tanımlanmıştır (Arai vd., 1997). Olası iki başlangıç bölgesi kullanılarak iki protein varyantı sentezlenebilir: VDR proteininin uzun versiyonu ("f" aleli) ve üç amino asit kısa olan protein versiyonu ("F" aleli). FokI polimorfizmi, VDR geninde saptanan tek protein polimorfizmidir.

Diğer bir VDR polimorfizmi olan Cdx2 polimorfizmi, VDR geninin aynı bölgelerinin farklı bireylerde dizilenmesiyle ortaya çıkarılmıştır. Japon kadınları üzerinde yapılan bir çalışmada VDR 1a promotor bölgesinde G/A sekans varyasyonu rapor edilmiştir (Arai vd., 2001). G/A polimorfizmi Cdx2 adı verilen barsak-spesifik transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinin içindedir (Yamamoto vd., 1999). Yapılan diğer bir çalışmada Cdx2 polimorfizminin VDR 1e promotoru içinde olduğu da gösterilmiştir. Yakın zamanlarda bu polimorfizm farklı etnik gruplar arasında da tanımlanmıştır (Fang vd., 2003).

Yapılan daha kapsamlı bir çalışmada VDR geninin dizi analizi yapılmış olan 22 kb'lık bölümünde, ekzon 1f-1c ve ekzon 2-9'un içinde ve yakınlarındaki promotor bölgelerinde ve ayrıca 3'UTR'da 63 polimorfizm saptanmıştır (Uitterlinden vd., 2004b). Polimorfizmlerin büyük kısmının kodlayıcı bölgelerden çok, düzenleyici bölgelerde olduğu gözlemlenmiştir. Protein dizilerindeki varyasyon ligandın afinitesinde veya DNA'ya bağlanmasında değişiklikler gibi büyük fonksiyonel etkilere sebep olabileceği için, polimorfik varyasyonların ve dolayısıyla populasyon varyasyonlarının 5' promotor veya 3'UTR bölgesi gibi ekspresyon seviyesini düzenleyen bölgelerde bulunması daha olasıdır.

#### **1.4.5. VDR Reseptörü Polimorfizmlerinin Fonksiyonelliği**

Kullanılan polimorfizmlerin çoğunun anonim olması nedeniyle, VDR polimorfizmleri kullanılarak yapılan asosiyasyon çalışmalarının yorumlanması güçleşmektedir. Birçok araştırmacı son yıllarda içinde BsmI RFLP'si, Bsm-Apa-Taq haplotipleri ve 3'UTR'daki polyA VNTR'ını da barındıran anonim polimorfizmleri kullanarak çoklu biyo-cevap parametrelerini analiz etmiştir. Bu çalışmalar *in vitro*

hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji çalışmaları ve aynı zamanda biyokimyasal markörler ve vitamin D, kalsiyum ve hormon replasman terapisi veya bifosfanat muamelelerine oluşturulan cevaplarının *in vivo* ölçümlerini içermektedir. Polimorfizmlerin fonksiyonelliği farklı seviyelerde (örn. mRNA, protein, hücre ve organizma seviyelerinde) test edilmelidir. Optimal koşullarda bir polimorfizmin tüm bu seviyelerde benzer alelik etkiler göstermesi beklenir, bu da moleküler düzeydeki mekanizmalar ile populasyon seviyesindeki epidemiyolojik veriler arasında bağlantı kurulabilmesini sağlayacaktır. Bu durum Cdx2 ve FokI polimorfizmleri için büyük oranda tanımlanmıştır; fakat BsmI-ApaI-TaqI RFLP'leri ve polyA VNTR polimorfizmleri için kesinlik kazanmamıştır ve sonuçlar oldukça tartışmalıdır. Anonim polimorfizmlerle fonksiyonel bir çalışma yapmak gereksiz gibi gözükse de, bu tür çalışmalarda alınacak sonuçlar, markör polimorfizmlerle gerçekten fonksiyonel polimorfizmler arasındaki kuvvetli LD sebebiyle, yine de informatif olabilir.

#### **1.4.5.1. FokI polimorfizmi**

Genetik bakış açısıyla FokI RFLP'sinin VDR geni için bağımsız bir markör olduğu düşünülebilir; çünkü diğer VDR polimorfizmleri ile arasında hiçbir LD yoktur ve bu polimorfizmi çevreleyen LD alanı çok küçüktür (Uitterlinden vd., 2004b). FokI polimorfizminin fonksiyonelliği üzerine yapılan bir çalışmada VDRE barındıran sıçan 24-hidroksilaz geni promotor bölgesinin kısa bir parçasının (-291 - +9) kontrolü altında bir raportör kullanılarak, transfekte edilmiş HeLa hücrelerinde transkripsiyonel aktivasyon deneyleri yapılmıştır (Arai vd.,1997). Sonuçlar 424 aminoasitlik kısa VDR protein varyantının, 427 aminoasitlik uzun varyantından 1.7 kat daha aktif olduğunu göstermiştir. Ancak bu çalışma daha sonra tekrarlanamamıştır (Gross vd., 1998a). Bu çalışmada da FokI alelik farklarının VDR proteininin transkripsiyon aktivasyonuna etkisini incelenmiş, fakat deney COS7 hücrelerinde ve sıçan 24-hidroksilaz promotorunun biraz daha büyük bir bölümü (-1399 - +76) kullanılarak yapılmıştır. Ek olarak insan osteokalsin geni ve sıçan



osteopontin genindeki VDRE'ler analiz edilmiş fakat bu sistemler arasında FokI alelik farklılıklarının etkisini gösterilememiştir.

Ancak, bu test sistemlerinde polimorfizmin nispeten küçük etkilerinin gözlemlenmesinin zor olabileceği de dikkate alınmalıdır. Buna ek olarak, hücre tipinde, promotor bölgesi ve VDRE'nin gen özgüllüğündeki küçük farklar, alelik farklılığın analiz edilmesinde önemli kriterler olabilir.

Yapılan diğer bir çalışmada COS7, HeLa, ve ROS2/3 hücrelerinde 1100 bp'lik sıçan osteokalsin promotörü içeren raportör yapılar kullanarak 424 aminoasitlik VDR varyantının transkripsiyon faktörü TFIIB ile daha verimli bir şekilde etkileştiği gösterilmiş ve 424 aminoasitlik kısa VDR varyantının transkripsiyonel olarak daha güçlü bir VDR proteinini temsil ettiği saptanmıştır (Jurutka vd., 2000). Bu görüş, aynı grup tarafından sıçan osteokalsin geninin dört kopyasını içeren bir raportör yapı kullanılarak değişik endojen FokI VDR genotipine sahip 20 fibroblast hücre hattının analizi ile de doğrulanmıştır (Jurutka vd., 2000). Fonksiyonelliğe farklı bir yaklaşımla da 424 aa kısa VDR varyantının yüksek aktivitesi onaylanmıştır. Bu çalışmada post-menopoz dönemindeki 72 kadından elde edilen ve FokI RFLP'si için değişik genotipler taşıyan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) vitamin D'nin büyüme inhibisyon kapasitesi test edilmiş ve F alelini taşıyan (kısa protein varyantı) PBMC'lerin hücre büyümesini inhibe etmede daha aktif VDR varyantına sahip oldukları gözlemlenmiştir (Colin vd., 2000).

Sonuç olarak FokI polimorfizminin fonksiyonel olduğu söylenebilir ve 424 aa VDR varyantı 427 aa varyantından transaktivasyon kapasitesi açısından daha aktiftir. Bu durum gene özel bir etkiden kaynaklanabilir, yani vitamin D hedef genlerinin bazı promotor bölgeleri, VDR genotipe bağımlı aktivite farkına daha hassas olabilir. Ko-transkripsiyonel faktörlerle hücre tipine özel etkileşim ile birlikte, bu durum genotipe bağımlı farklılıkların hücre tipine özgü ve organa özgü ekspresyonu ile sonuçlanabilir.

#### 1.4.5.2.Bsm-Apa-Taq ve 3'UTR polimorfizmleri

VDR geninin 3' UTR'si pek çok polimorfizm içermektedir ve kuvvetli LD vasıtasıyla, Bsm-Apa ve/veya Taq RFLP'leri ile gözlenen asosiyasyonlar açıklanabilir. Genlerin 3'UTR'ları ekspresyonun düzenlenmesinde, özellikle de mRNA stabilitesinin düzenlenmesi yoluyla, rol alırlar.

En sık görülen iki haplotipe (baT ve BA<sub>T</sub>) bağlı iki 3'UTR varyantı için değişen lusiferaz aktivitesi olduğuna dair kanıt elde edilmiştir (Morrison vd., 2004). Destabilize eden elemanlar olarak adlandırılan bazı UTR parçalarının VDR mRNA'sının stabilitesini belirleme ile alakalı olduğunu gösterilmiştir (Durrin vd.,1999). Özellikle, 3'UTR'lerin mRNA stabilitesi için hücreye özgü etkilerinin olduğu düşünülürse, bu durum UTR bölgesindeki sekans varyasyonlarının fonksiyonelliğini göstermede önem taşıyabilir. 3' polimorfizmlerine göre ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları analiz eden başka çalışmalar da yapılmıştır. BA<sub>T</sub> haplotipinin baT haplotipinden genelde daha yüksek düzeyde mRNA ekspresyon eğilimi olmasına rağmen sonuçlar tutarlı değildir.

Whitfield vd. (2001) translasyon başlangıç kodon polimorfizmi olan FokI ve 3'UTR poli(A) dizisinin fonksiyonel önemini göstermiştir. Farklı VDR genotiplerine sahip 20 fibroblast hücre hattında, FokI RFLP'si (F ve f alelleri) ile uzun (L) ve kısa (S) poli(A) uzantıları için farklı genotipteki endojen VDR proteininin rölatif transkripsiyon verimi ölçülmüştür. Endojen VDR proteini, hücreye transfekte edilen 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub> cevaplayıcı raportör geni (sıçan osteokalsin geni içeren VDRE) için transkripsiyon faktörü gibi davranmıştır. Bu çalışma yüksek ("FL" genotipi) ve düşük ("fS" genotipi) VDR aktivitesi kanıtlarını desteklemektedir. Aynı zamanda bu çalışma VDR genindeki çoklu polimorfizmlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin analiz edilmesine dikkat çekmektedir.

Başka bir aşamada, VDR genotipinin oluşturduğu cevaplar serum markörlerinin farklılıkları açısından analiz edilmiştir. VDR'nün, belli protein ya da protein fragmanlarının dolaşıma salınmasına sebep olan vitamin D cevaplayıcı genleri üzerinde rol oynadığı düşünülmüştür. Bu konuda yapılan 17 çalışma

osteokalsin ve PTH gibi vitamin D'ye özgü olduğu düşünülen birçok değişik serum markörü içermektedir. Özellikle osteokalsin analiz edilmiştir, çünkü yüksek oranda vitamin D' cevap veren bir gendir ve kemik metabolizmasını (kemik oluşumu aktivitesini) gözlemlmek için klinik olarak sıkça ölçülür. On yedi çalışmadan yedisinde osteokalsinin serum seviyesinde (veya diğer kemik markörlerinde) genotipe bağımlı farklılıklar saptanmamasına rağmen sekiz çalışma BA<sub>T</sub> haplotipli kişilerde ba<sub>T</sub> haplotiplilere göre daha yüksek osteokalsin seviyeleri rapor edilmiştir. Fakat üç çalışmada da tam tersi sonuçlar rapor edilmiştir (Uitterlinden vd., 2004b).

VDR genotipinin belli uygulamalara verdiği *in vivo* cevabı belirleyen çalışmalar analiz edildiğinde benzer sonuçlar görülebilir. Bu çalışmalarda kalsitriol, kalsiyum, kortikosteroidler, HRT ve etidronat ile yapılan muamelelere verilen cevabın analizi yapılmış ve cevaplar çoğunlukla kemik mineral dansitesindeki değişimlerin ölçülmesi şeklinde olmuştur. Dokuz çalışmadan dördü BA<sub>T</sub>'ın ba<sub>T</sub>'tan daha iyi cevap verdiğini rapor etmiştir. Fakat dokuzundan üçü tam ters etki gösterirken üçü de hiçbir etki göstermemiştir (Uitterlinden vd., 2004b).

Sonuç olarak durum hala netleşmemesine rağmen BA<sub>T</sub> haplotipi (3'UTR'deki kısa poliA VNTR alelleri ile alakalı) bir şekilde ba<sub>T</sub> haplotipinden (uzun poliA VNTR alelleri ile alakalı) daha iyi cevap veriyor gibi görünmektedir. *In vitro* çalışmalar ile birlikte, haplotip 2'nin (BA<sub>T</sub>) genel olarak haplotip 1'den (ba<sub>T</sub>) daha iyi cevap oluşturduğu söylenmektedir. Bunun belki de mRNA stabilitesinin ve yarı-ömrünün daha iyi olması nedeni ile olabileceği de düşünülebilir. Bu da teorik olarak hedef hücrede daha fazla sayıda VDR olması ve sonuçta vitamin D'ye daha iyi cevap verilmesi anlamına gelir.

#### **1.4.6. Vitamin D Reseptörü Polimorfizmlerinde Görülen Etnik Varyasyonlar**

VDR polimorfizmleri diğer etnik gruplara göre en fazla beyaz ırkta analiz edilmiş ve saptanmıştır. En çok çalışılan VDR polimorfizmlerine bakıldığında ırklar ve/veya etnik gruplar arasında bazı farklılıklar (Tablo 1.1) görülmektedir (Zmuda vd., 2000).

**Tablo 1.1.** VDR alel frekanslarının etnik gruplar arasında karşılaştırılması (Uitterlinden vd., 2004)

VDR polimorfizmi	Minör allel	Etnik grup (%)		
		Beyaz ırk	Asyalı	Afrikalı
<b>Polimorfizmler</b>				
Cdx2	A	19	43	74
Fok I	f~T	34	51	24
Bsm I	B	42	7	36
Apa I	A	44	74	31
Taq I	T	43	8	31
poly A	kısa n=13-17	41	12	29
<b>Bsm-Apa-Taq haplotipleri</b>				
	baT: haplotip 1	43	75	26
	BAT: haplotip 2	39	7	16
	bAT: haplotip 3	11	17	59

FokI RFLP'sinin uzun protein varyantına (427 aa) karşılık gelen f aleli beyaz ırk ve Asyalılarla karşılaştırıldığında Afrika toplumunda daha seyrek görülmektedir. BsmI RFLP'sinin B aleli beyaz ırk ve Afrikalılarla karşılaştırıldığında ise Asyalılarda daha seyrek görülmektedir. Bunun gibi, 3'UTR-polyA VNTR'ı da etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir (Ingles vd.,1997). Ayrıca, Cdx2 A alelinin frekansı da etnik gruplar arasında oldukça büyük farklar ortaya koymaktadır; A aleli beyaz ırkta en düşük (% 19) ve Afrikalılarda en yüksek (% 74) bulunmuştur (Fang vd., 2003)

Etnik alel varyasyonlarının sonuçlarını, etnik gruplar arasında diyet ve egzersiz gibi farklı çevresel faktörler yüzünden tam olarak anlamak zordur. Buna ek olarak, etnik gruplar arasında, VDR polimorfizmlerinin birbirleri ile ve diğer genlerin diğer genetik varyantlarıyla ilişkide buldukları çok farklı genetik altyapı bulunmaktadır. Bu nedenle farklı etnik gruplardaki VDR polimorfizmlerinin haplotip yapısını açıklamak büyük önem taşımaktadır. Bu, hangi VDR alellerinin belli haplotiplerde

birlikte bulunacağını ve farklı etnik gruplar için frekanslarının ne olacağını gösterecektir. Bu bilgiler ışığında ve etnik gruplar arasındaki çevresel faktörlerdeki farklılıklar da göz önünde bulundurularak ilgili gen-çevre etkileşimi açıklığa kavuşturulabilir.

## 2. AMAÇ

Böbrek taşı problemi yaşayan bireylerin sayısı giderek artmaktadır, ancak taş oluşumuna yol açan faktörler kesin olarak aydınlatılamamıştır. Böbrek taşı hastalığının genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir. Böbrek taşlarının %80'inin yapısında kalsiyum oksalat bulunmaktadır. Buna ek olarak kalsiyum oksalat taşı olan hastaların çoğunda hiperkalsiüri vardır. Kalsiyum metabolizmasında en önemli faktör, emilimde görev alan 1,25-dihidroksivitamin D<sub>3</sub>, yani kalsitrioldür. Kalsitriolün vitamin D'nin barsaktan emilimi artıran en güçlü uyarıcı olduğu kabul edilir. Kalsitriolün etkilerinin ortaya koyulmasında vitamin D reseptörü (VDR) görev alır. Birçok veri, VDR lokusundaki varyasyonların kalsiyum taşlarının oluşumuyla ilişkili olabileceği yönündedir. VDR polimorfizmleri ırklar ve/veya etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle farklı popülasyonlardaki VDR polimorfizmlerinin yapısını açıklamak ve frekanslarını hesaplamak önem taşımaktadır. Bu bilgiler ışığında ve etnik gruplar arasındaki çevresel faktörlerdeki farklılıklar da göz önünde bulundurularak gen-çevre etkileşimi açıklığa kavuşturulabilir. Bu çerçevede, bu çalışmanın temel amacı VDR lokusunda sıklıkla görülen polimorfizmlerden olan BsmI, ApaI, TaqI, Tru9I ve FokI polimorfizmlerini Türk kalsiyum böbrek taşı hastalarında ve sağlıklı bireylerde incelemektir. Hasta ve sağlıklı bireylerin taşıdıkları polimorfizmlerin belirlenmesi, alel frekanslarının hesaplanması ve karşılaştırılması yoluyla incelenen polimorfizmlerin hastalık için bir risk faktörü teşkil edip etmedikleri belirlenecektir. Buna ek olarak yaş, sigara kullanımı ve aile öyküsünün böbrek taşı oluşumuna katkısı incelenecektir. Bu sayede Türk popülasyonunda taş oluşumunu etkileyebilecek genetik ve çevresel faktörler aydınlatılabilecektir.

### **3. GEREÇLER**

#### **3.1. Çalışmada Kullanılan Örnekler**

Bu araştırma bir vaka-kontrol çalışmasıdır. Hasta grubu, Mart 2006 - Mart 2008 tarihleri arasında İstanbul Şişli Etfal Hastanesi ve Erzurum Numune Hastanesi Üroloji Polikliniklerine başvurarak üriner sistem kalsiyum oksalat taş hastalığı tanısı konulan hastalar arasından seçilmiştir. Hastaların özgeçmişleri ve soygeçmişleri incelenmiş, rutin kan ve idrar biyokimyasal testleri yapılmıştır. Taş tipi, röntgen filmi ve/veya ultrasonografi sonrasında belirlenmiştir. Çalışmaya dahil olma kriterleri taş analizinde kalsiyum oksalat tipi taş belirlenmesi, herhangi bir organ ya da hematolojik malignite taşınmaması, üriner sistem enfeksiyonu olmaması, böbrek yetmezliği olmaması, son üç ay içinde vücut dışı taş kırma operasyonu geçirmiş olunmaması ve hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği ve diyabet gibi kronik hastalıkların bulunmamasıdır. Çalışma dahilinde, belirtilen kriterlere uymayan 34 hastanın çalışma dışı bırakılması ile toplam 98 hastadan elde edilen örnekler değerlendirilmiştir. Üriner taş hastalığı öyküsü olmayan, fizik muayene, tam idrar tahlili ve direkt üriner sistem grafisinde her hangi bir patoloji saptanmayan 70 sağlıklı birey kontrol grubuna alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubundaki bireylerden EDTA içeren tüplere 10 ml periferik kan alınmış ve daha sonra DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2. Kimyasallar**

Bu çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı kimyasallar moleküler biyoloji kalitesindedir, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Sigma (ABD) ya da Merck (ALMANYA) tercih edilmiştir.

### 3.3. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

#### 3.3.1. DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ALMANYA) kullanılmıştır.

#### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

10X MgCl <sub>2</sub> 'süz Tampon	: 500 mM KCl 100 mM Tris-HCl, (pH 9.0) % 0.8 Nonidet P40, (Roche, ALMANYA)
MgCl <sub>2</sub>	: dH <sub>2</sub> O'da 25 mM (Roche, ALMANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	: 100 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP (Roche, ALMANYA)
Taq DNA Polimeraz	: Fast Start DNA polimeraz (Roche, ALMANYA) Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)

#### 3.3.3. Restriksiyon Enzimleri ve Reaksiyon Tamponları

<i>BsmI</i>	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA) Tanıma Dizisi: GAATGCN <sup>N</sup> CTTAC <sup>GNN</sup>
<i>BsmI</i> Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer H (Roche, ALMANYA)



<i>TaqI</i>	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA) Tanıma Dizisi: T <sup>^</sup> CGA AGC <sup>^</sup> T
<i>TaqI</i> Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer B (Roche, ALMANYA)
<i>FokI</i>	: 5 U/μl (Roche, ALMANYA) Tanıma Dizisi: GGATG(N) <sub>9</sub> <sup>^</sup> CCTAC(N) <sub>13</sub> <sup>^</sup>
<i>FokI</i> Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer M (Roche, ALMANYA)
<i>Tru9I</i>	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA) Tanıma Dizisi: T <sup>^</sup> TAA AAT <sup>^</sup> T
<i>Tru9I</i> Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer M (Roche, ALMANYA)
<i>ApaI</i>	: 10 U/μl (Roche, ALMANYA) Tanıma Dizisi: GGGCC <sup>^</sup> C CCCGG <sup>^</sup> G
<i>ApaI</i> Reaksiyon Tamponu	: SuRE/Cut Buffer A (Roche, ALMANYA)

### 3.3.4. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA): 890 mM Tris-Base,  
890 mM Borik Asit,  
20 mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, (pH 8.3)

10X Bromofenol Mavisi (BPB) : 2.5 mg/ml BPB

Etidyum Bromid (EtBr) : 10 mg/ml

% 1 veya 2'lik Agaroz Jel : 0.5 X TBE Tamponunda % 1 veya % 2  
(w/v) agaroz

### 3.3.5. Oligonükleotid Primerler

**Tablo 3.1.** Bu çalışmada incelenen polimorfik bölgeleri çoğaltmak için kullanılan primer dizileri (F : ileri primer, R : Geri primer)

Polimorfizm	Primer Dizisi (5'→ 3')
BsmI	BsmTaqF: CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA BsmR: AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG
TaqI	BsmTaqF: CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA TaqR: CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC
FokI	FokIF: AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT FokIR: ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC
Tru9I	Tru9IF: TGTATTGGTCCAGCTTGCTCT Tru9IR: CAGGGTTTCTCCATGTTGGT
ApaI	ApaIF: CAGAGCATGGACAGGGAGCAA ApaIR: GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC

### 3.3.6. DNA Büyüklük Markörleri

GeneRuler 50 bp DNA markörü : 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

GeneRuler 100 bp DNA markörü: 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 baz çiftlik fragmentler içeren DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

### 3.3.7. Cihazlar

Otoklav : Dik Tip Otoklav (BES, TÜRKİYE)

Tartılar : Hassas Terazi, XB 220 A (Presica, İSVİÇRE)

	Terazi, KB 400-2 (KERN, ALMANYA)
Santrifüjler	: Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Derin Dondurucular	: -20°C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE) -20°C, GSD26410NE (Bosch, ALMANYA)
Dokümantasyon Sistemleri	: Bio-RAD Universal Hood II (BIO-RAD, İTALYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri	: Flowgen (İNGİLTERE) Sub-Cell GT (BIO-RAD, İTALYA)
Güç Kaynakları	: EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, İSVEÇ) PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA) PowerPac Universal (BIO-RAD, İTALYA)
Isı Bloğu	: DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Manyetik Karıştırıcılar	: MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Buzdolapları	: Beko 8742 , Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Spektrofotometreler	: Shimadzu UV 1601 (JAPONYA)
Thermo-Cycler	: Techne TC-512 (İNGİLTERE)
Vorteks	: Heidolph REAX (ALMANYA)

Su Banyoları : Nüve BM 402 (TÜRKİYE)

Su Arıtma Sistemi : Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ALMANYA) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu kitin kullanılmasındaki temel prensip, nükleik asitlerin tuz varlığında cam fiber sünger içeren kolona adsorbe olmalarıdır. Diğer kontaminantlar kolonun yıkanmasıyla uzaklaştırıldıktan sonra nükleik asitler cam fiber süngerden düşük konsantrasyonlu tuz solüsyonu ile elde edilirler. Bu tezde kullanılan DNA izolasyon kitinin kullanımını aşağıdaki gibidir:

- 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne 200 µl kan, 200 µl bağlanma tamponu ve 40 µl proteinaz K solüsyonu eklenir, karıştırılır ve 72°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılır.

- İnkübasyondan sonra 100 µl izopropanol eklenir ve örnekler cam fiber süngerli tüplere mikropipet yardımı ile aktarılır.

- Tüpler 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir. Santrifüjden sonra filtreli tüpün altındaki toplama tüpleri değiştirilir.

- İnhibitörlerden kurtulmak için filtreli tüpe 500 µl inhibitör uzaklaştırma tamponu eklenir, 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılır ve toplama tüpleri tekrar değiştirilir.

- Örneği yıkamak için 500 µl yıkama tamponu eklenir, 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir ve toplama tüpleri değiştirilir.

- Yukarıdaki yıkama aşaması tekrarlanır.

- Tüpte kalan tampondan tamamen kurtulmak için tüpler en yüksek hızda (yaklaşık 13.000 rpm) santrifüj edilir.

- Filtreli tüpler 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerinin içine konur.

- Nükleik asitleri elde etmek için filtreli tüpe önceden 70°C’ye ısıtılmış 200 µl elüsyon tamponu eklenir ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.

- Altta kalan 1.5 ml mikrosantrifüj tüpünün içinde genomik DNA elde edilmiş olur.

#### 4.2. İzole Edilen DNA'nın Nicel ve Nitel Analizi

Genomik DNA, izolasyon prosedürü sırasında oluşabilecek fragmentasyon olasılığına karşı test edilir. Bu amaçla Bölüm 4.4.'te açıklanan metod ile yüzde birlik agaroz jel hazırlanır. UV ışığının altında tek bir bant gözlemlenmesi DNA örneğinde fragmentasyon olmaması olarak yorumlanabilir. Çözünmüş DNA'nın tam konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik analiz ile saptanır. DNA örneği damıtılmış su ile seyreltilir ve optik yoğunluğu 260 nm ( $A_{260}$ ) ve 280 nm'de ( $A_{280}$ ) okunur. 50 µg çift zincirli DNA'nın 260 nm'deki absorpsiyonu 1.0 olduğu için örnek DNA'nın konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml}) = \text{seyreltme faktörü} \times A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

DNA'nın saflığı  $A_{260}/A_{280}$  oranı hesaplanarak tahmin edilebilir. 1.8 ( $\pm 0.1$ ) oranına sahip örnekler saf olarak kabul edilir; 1.8'den düşük değerler protein kontaminasyonuna işaret eder.

#### 4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin temeli, iki oligonükleotid primerinin DNA'nın homolog zincirlerinin karşı uçlarına bağlanarak Taq polimeraz enzimi yardımıyla istenilen bölgenin çoğaltılmasını sağlamaktır. Tipik bir PCR reaksiyonu çoğaltılacak DNA'yı, istenilen bölgeyi hedefleyen ileri ve geri primerleri, reaksiyon tamponu,  $MgCl_2$ , dNTP'ler ve Taq polimeraz enzimini içerir. Kalıp denatürasyonu, primer bağlanması ve bağlanan primerlerin Taq polimeraz tarafından uzatılmasını içeren bir ısı döngüsünün seri halinde tekrarı belirlenen özel DNA fragmanının üssel artışı ile sonuçlanır. Sonuç olarak 30 döngümlük bir PCR, hedef DNA dizisini milyonlarca kez çoğaltabilir. Bu tezde yapılan PCR reaksiyonlarının içerikleri ve reaksiyon koşulları Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1.** PCR reaksiyonları

<u>İçerik</u>	<u>Çoğaltılan polimorfik bölgeler</u>				
	<u>BsmI</u>	<u>ApaI</u>	<u>TaqI</u>	<u>Tru9I</u>	<u>FokI</u>
DNA (ng)	50	100	100	100	100
MgCl <sub>2</sub> (mM)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
dNTP (mM)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Primer (pmol)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Tampon (1X)	NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Enzim (1U)	Taq pol (Fermentas)	Taq pol (Fermentas)	Fast start Taq pol (Roche)	Taq pol (Fermentas)	Taq pol (Fermentas)
Hacim	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

**Tablo 4.2.** PCR döngü şartları

<u>Lokus</u>	<u>Başlangıç denatürasyonu</u>	<u>Döngü sayısı</u>	<u>Denatü- rasyon</u>	<u>Bağlanma</u>	<u>Uzama</u>	<u>Son Uzama</u>
<b>BsmI</b>	94° C, 4 min	35	94° C, 30 sec	63° C, 1 dak		68° C, 5 min
<b>ApaI</b>	94° C, 4 min	30	94° C, 1 min.	60° C, 1 min	72° C, 1 min	72° C, 5 min
<b>TaqI</b>	95° C, 4 min	35	95° C, 30 sec	63° C, 1 dak		68° C, 5 min
<b>Tru9I</b>	94° C, 4 min	35	94° C, 30 sec	63° C, 1 dak		68° C, 5 min
<b>FokI</b>	94° C, 4 min	35	94° C, 30 sec	63° C, 1 dak		68° C, 5 min



#### 4.5. Restriksiyon Enzimi Analizi

Restriksiyon enzimleri çift zincirli DNA'yı şeker fosfat bağıını kopararak keser. Her restriksiyon enzimi DNA üzerinde 4-6 baz çiftlik belirli diziyi tanır ve ancak bu tanıma bölgesi bulunduğu zaman DNA'yı bu bölgeden veya bu bölgeye belirli bir uzaklıktan ve de her tanıma bölgesi için bir kesim yapacak şekilde ayırır. Farklı tanıma bölgelerine sahip pek çok enzimin var oluşu bu enzimlerin ilgili gen üzerinde oluşan bir mutasyonu veya polimorfizmi taramak için sıkça kullanılmasına olanak sağlamıştır. Tipik bir restriksiyon reaksiyonu DNA, enzim tamponu, restriksiyon enzimi ve su içerir. Reaksiyon sıcaklığı kullanılan restriksiyon enziminin optimum çalışma sıcaklığı olmalıdır. Bu tezde kullanılan restriksiyon enzimi kesim şartları Tablo 4.3.'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.3.** Restriksiyon enzimleri ve kesim şartları

<u>Restriksiyon enzimi</u>	<u>Kullanılan miktar</u>	<u>Sıcaklık</u>	<u>Kesim süresi</u>
<b>BsmI</b>	2U	65 °C	2 saat
<b>ApaI</b>	2U	30 °C	1 saat
<b>TaqI</b>	2U	65 °C	2 saat
<b>Tru9I</b>	2U	65 °C	1 saat
<b>FokI</b>	2U	37 °C	16 saat

#### 4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi DNA fragmanlarını tespit etmek ve ayırmak için standart bir metottür. DNA fragmanları uygun bir tamponun içine bir jele yüklenmiş olarak negatif elektrottan (katot) pozitif elektrota (anot) yürütülerek ayrılır. DNA iskeletindeki negatif yüklü fosfat gruplarının varlığı nedeniyle DNA molekülleri anoda doğru yürür. DNA bantları etidyum bromid veya gümüş boyaması ile görünür

hale getirilir. Bu tez dahilinde PCR ve restriksiyon enzimi kesim ürünleri agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromid boyaması ile incelenmiştir.

Agaroz jel elektroforezi DNA fragmanlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırır. Farklı agaroz konsantrasyonları farklı ayırım kapasitesine sahiptir. Yüksek konsantrasyonlar kısa fragmanları ayırmada daha spesifiktir. Agaroz jel, agarozun 0.5X TBE tamponu içinde çözünmesi ve kaynatılması ile hazırlanır. EtBr, son konsantrasyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde ve jel soğutulduktan sonra koyulur. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için beklenir. Polimerizasyondan sonra jel içinde 0.5X TBE tamponu bulunan yatay jel elektroforez aparatına konur, taraklar jelden çıkarılır ve böylece örnekleri yüklemek için kuyucuklar oluşturulmuş olur. Örnekler yükleme tamponu ile son konsantrasyonu 1X olacak şekilde karıştırılır ve jele yüklenir. Elektrik akımı verilmesi ile birlikte DNA anoda doğru hareket etmeye başlar. Agaroz jeller genellikle 100-150 voltta (V) 10-45 dakika yürütülür. Elektroforez tamamlandığında DNA bantları UV ışığı altında gözlenebilir.

#### **4.5. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi, DNA örneklerindeki nükleotid dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan bir yöntemdir. DNA dizi analizi kimyasal degradasyon ya da enzimatik sentez yöntemlerle, manuel ya da otomatik olarak yapılabilir. Günümüzde tercih edilen yöntem, dizi analizinin enzimatik sentez ile otomatik olarak yapılmasıdır. Son yıllarda otomatik DNA dizi analizi, enzimatik sentez yöntemi ile gelişmiş bir kapiller sisteme uyarlanmıştır. Boya terminasyon işaretleme adı verilen bir metod kullanılarak farklı bazlarda (A, G, T, C) sonlanan DNA sentez ürünleri floresan işaretli boylarla etiketlenir. İşaretli örnekler bir kapillerden geçirilerek elektroforez uygulanır. Floresan işaretli boyları uyarlamak için bir lazer sistemi, boyların yaydığı ışığı toplamak için ise bir kamera kullanılır. Böylece, lazer uyarımının ardından dört farklı boya tarafından yayılan farklı dalga boylarındaki ışık, tek kulvarda ayırdedilebilir. Floresan miktarlarının ölçülmesi ve yorumlanmasının

ardından DNA örneğindeki bazların dizilişii saptanır. Bu tez çerçevesinde restriksiyon analizine tabii tutulan örneklerdeki kesim bölgeleri, Iontek A.Ş.'den alınan DNA dizi analizi hizmeti ile doğrulanmıştır. Her polimorfik lokusta restriksiyon analizine göre homozigot ve heterozigot olarak belirlenen örnekler dizilenmiş, CLUSTAL W (1.83) çoklu dizi eşleştirme programı ile karşılaştırılmış ve restriksiyon analizi sonuçları ile kıyaslanmıştır.

#### 4.6. Böbrek Taşı Hastalığının Moleküler Analizi

Bu tez çalışmasında böbrek taşı hastalığının VDR geni üzerindeki BsmI, TaqI, FokI, Tru9I ve FokI polimorfizmleri ile ilişkisini araştırmak üzere PCR-RFLP metodu kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, DNA kandan ekstre edildikten sonra VDR geninin polimorfik bölgeleri PCR metodu ile çoğaltılmış ve çoğaltılan gen parçaları ilgili restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. PCR ürünlerinin ve kesim sonrası beklenen fragmentlerin boyları Tablo 4.4.'te gösterilmiştir. Oluşan fragmanlar agaroz jel elektroforezine tabii tutularak ayrıştırılmış ve UV ışığı altında gözlemlenmiştir. Tüm restriksiyon enzimi kesim sonuçları incelenerek hasta ve kontrol gruplarındaki polimorfizmler saptanmış, daha sonra DNA dizi analizi ile sonuçlar doğrulanmıştır. Tüm veriler SPSS 16.0, HapStat, Plink programları kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve polimorfizmlerin kalsiyum oksalat böbrek taşı oluşumu ile ilişkisi irdelenmiştir.

**Tablo 4.4.** VDR geni polimorfik bölgelerinin PCR ürünleri ve restriksiyon fragment uzunlukları.

<u>Polimorfik bölge</u>	<u>PCR uzunluğu (bç)</u>	<u>Restriksiyon fragmentleri (bç)</u>
<b>BsmI</b>	825	650 + 175
<b>ApaI</b>	700	490 + 210
<b>TaqI</b>	2000	1800 + 200
<b>Tru9I</b>	252	193 + 59
<b>FokI</b>	265	196 + 69

## 5. SONUÇLAR

### 5.1. Örneklerin Tanımı

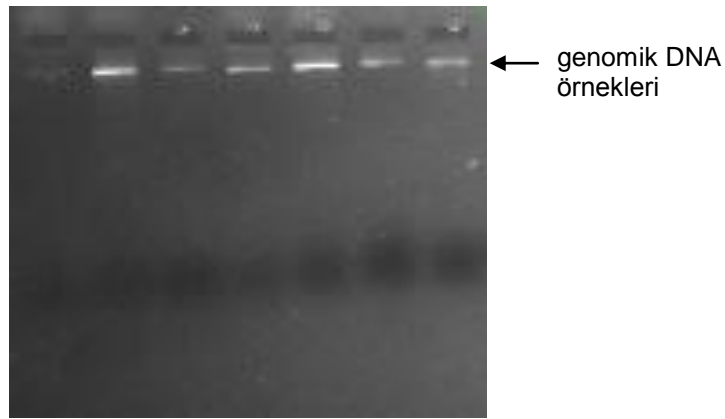
Bu araştırma bir vaka-kontrol çalışması olarak düzenlenmiş olup, yaş ve cinsiyet açısından örtüşme gösteren toplam 98 CaOx böbrek taşı hastası ve 70 sağlıklı birey incelemeye dahil edilmiştir. Tüm bireylerin cinsiyet, yaş, boy, kilo, sigara ve alkol kullanım sıklığı ve meslekleri sorgulanmıştır.

Hasta grubu 66 erkek (% 67.3) ve 33 kadın (% 32.7) bireyden oluşmaktadır. Yaş aralığı 9-85 yaşları arasında olup ortalama yaş 47 olarak belirlenmiştir. Hastaların soygeçmişleri değerlendirildiğinde, 52 vakada ailesel taş oluşumu saptanmıştır, bu da hasta grubunun % 53'ünü oluşturmaktadır. Ailesel taş oluşumu gözlemlenen erkek bireyler ise 33 kişidir (% 33.6). Kontrol grubunu ise 9-71 yaşları arasında olan ve üriner taş hastalığı öyküsü olmayan, fizik muayene, tam idrar tahlili ve direkt üriner sistem grafisinde her hangi bir patoloji saptanmayan 70 sağlıklı birey oluşturmaktadır.

Değerlendirmeye alınan 98 hasta, klinik olarak daha önce üriner sistem taş hastalığı geçirip geçirmediği, fizik muayene, tam idrar tahlili, idrar kültürü ve antibiogram, direkt üriner sistem grafisi ve üriner sistem ultrasonografisi ile değerlendirilmiştir. Gerek görülen hastalara intravenöz piyelografi ve kontrastsız abdominopelvik spiral bilgisayarlı tomografi yapılmıştır. Üreteroskopik üreter taşı tedavisi, açık cerrahi, ve perkütan nefrolitotomi ile alınan taşlar X ışını toz difraksiyonu cihazı ile (XRD) X ışını difraksiyon yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yöntemle saptanan taşlar %70 ve daha fazla CaOx ve %5'ten daha az kalsiyum apetit içerdiğinde CaOx taşı kabul edilmektedir.

## 5.2. DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol grubuna ait kan örnekleri EDTA içeren tüplere alınmış ve High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, ALMANYA) ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu takiben, DNA örneklerinden 3.0 µl alınarak %1'lik agaroz jelde incelenmiş ve DNA'nın kırılmadan elde edildiği doğrulanmıştır (Şekil 5.1.) DNA örneklerinin konsantrasyon ve saflık analizleri de spektrofotometrik ölçümlerle belirlenmiştir. High Pure PCR Template Preparation Kit ile yapılan izolasyonlarda protein kontaminasyonu minimal düzeyde bulunmuştur.



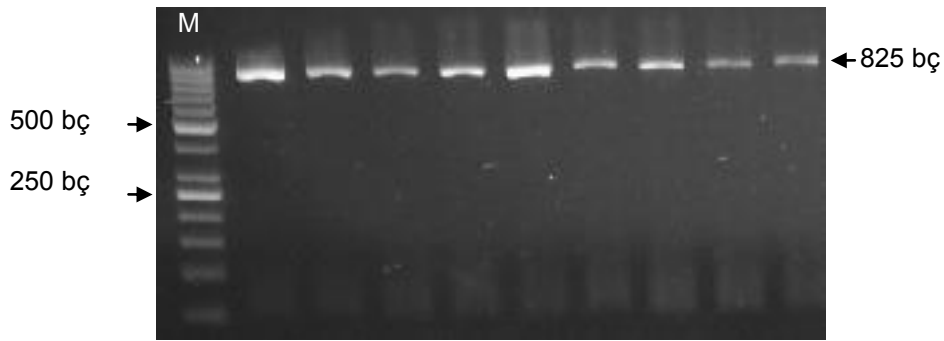
**Şekil 5.1.** DNA izolasyonu sonrasında örneklerin EtBr ile boyanmış %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

## 5.3. VDR polimorfik bölgelerinin PCR-RFLP yöntemi ile moleküler analizi

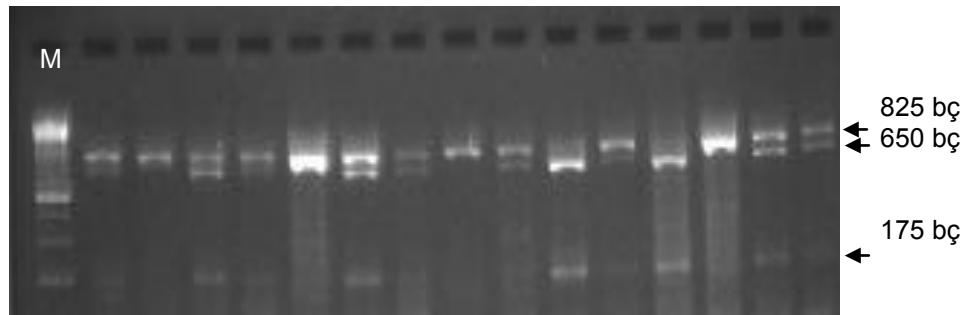
Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri Bölüm 4.3.'te belirtilen şartlar kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Çoğalan gen bölgeleri agaroz jel elektroforezi ve bunu takiben EtBr boyaması ile UV ışığı altında görüntülenmiştir. Başarılı amplifikasyonlar Bölüm 4.5'te belirtilen şartlar kullanılarak restriksiyon enzimi analizine tabii tutulmuş ve reaksiyon örnekleri yine agaroz jel elektroforezi yöntemi ile incelenmiştir. Restriksiyon analizi ile belirlenen aleller DNA dizi analizi ile doğrulanmış ve örnek olarak FokI polimorfizmine ait dizi analizi sonuçları gösterilmiştir.

### 5.3.1. BsmI Polimorfik Bölgesinin Analizi

BsmI polimorfik bölgesi BsmTaqF ve BsmR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve 825 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.2.). PCR ürünleri BsmI restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde incelenmiştir (Şekil 5.3.). BsmI kesimi, PCR ürününü 650 ve 175 bç'lik iki fragmente ayırmaktadır.



**Şekil 5.2.** BsmI PCR ürünlerinin % 1 'lik agaroz jelde görüntülenmesi  
(M: 50bç DNA markörü)

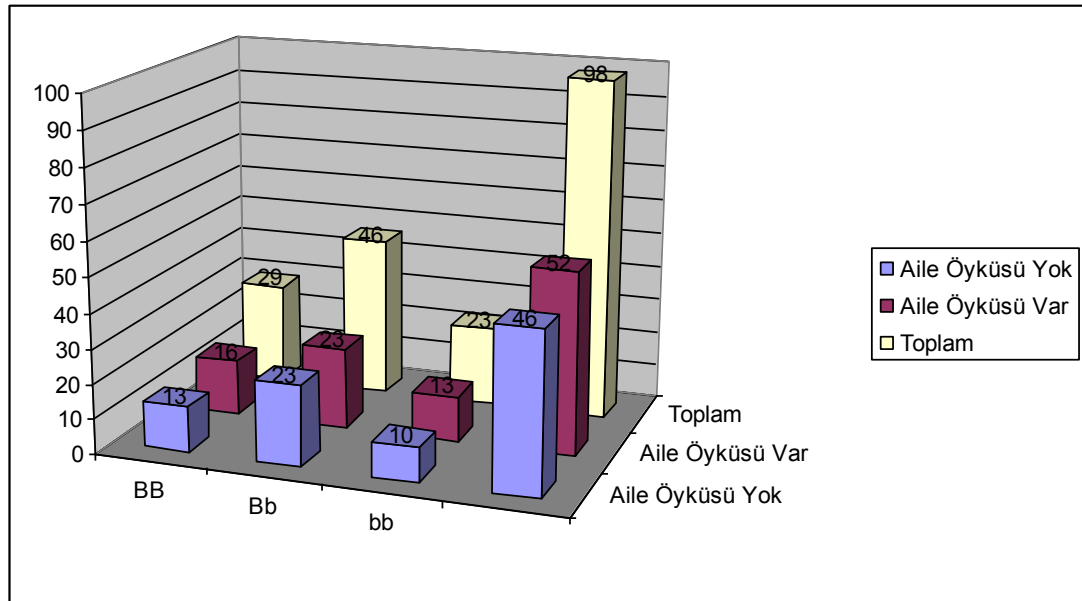


**Şekil 5.3.** BsmI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50bç DNA markörü)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları aleller ve genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.1.). Buna ek olarak hasta bireylerin sahip oldukları genotipler aile öyküsü varlığına göre grafik üzerinde belirtilmiştir (Şekil 5.4.).

**Tablo 5.1.** BsmI genotip frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	BB	29	29,6
	Bb	46	46,9
	bb	23	23,5
	Toplam	98	100,0
Kontrol	BB	13	18,6
	Bb	33	47,1
	bb	24	34,3
	Toplam	70	100,0

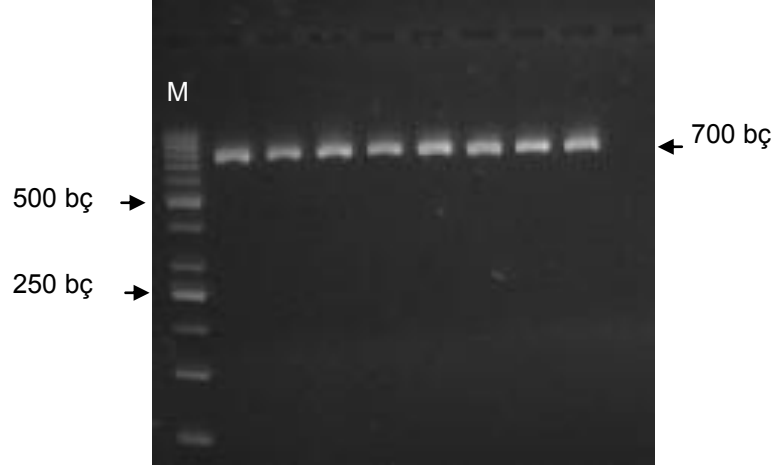
**Şekil 5.4.** Aile öyküsüne göre BsmI genotipleri

### 5.3.2. ApaI Polimorfik Bölgesinin Analizi

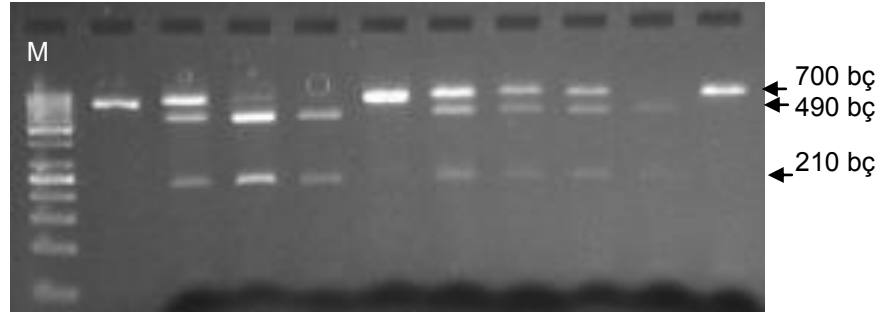
ApaI polimorfik bölgesi ApaIF ve ApaIR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve 700 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.5.). PCR ürünleri ApaI restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2'lik agaroz jel



üzerinde incelenmiştir (Şekil 5.6.). ApaI kesimi PCR ürününü 490 ve 210 bç'lik iki fragmente ayırmaktadır.



**Şekil 5.5.** ApaI PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50bç DNA markörü)

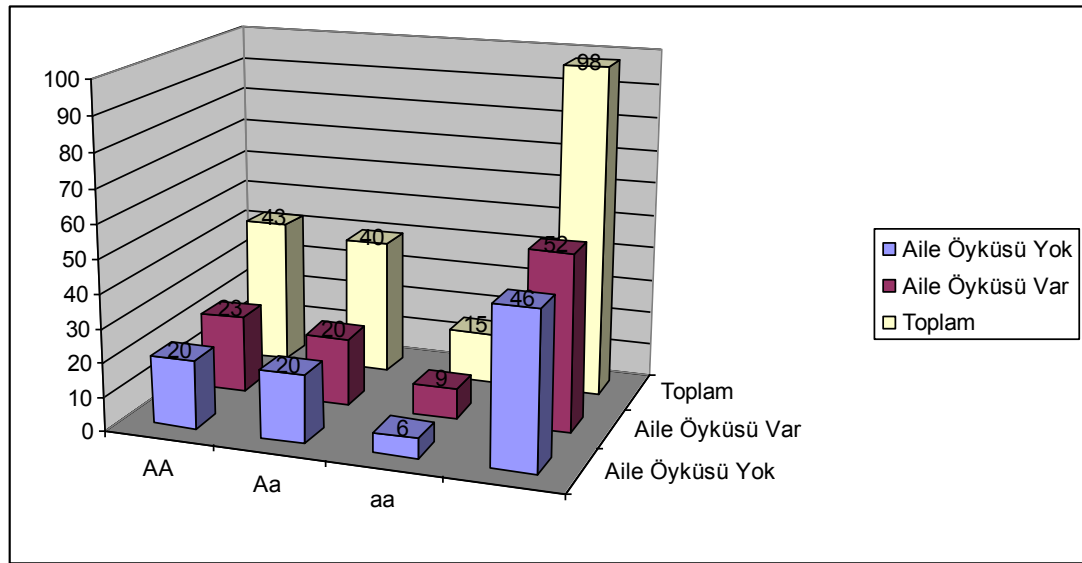


**Şekil 5.6.** ApaI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50bç DNA markörü)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları aleller ve genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.2.). Buna ek olarak hasta bireylerin sahip oldukları genotipler aile öyküsü varlığına göre grafik üzerinde belirtilmiştir (Şekil 5.7.).

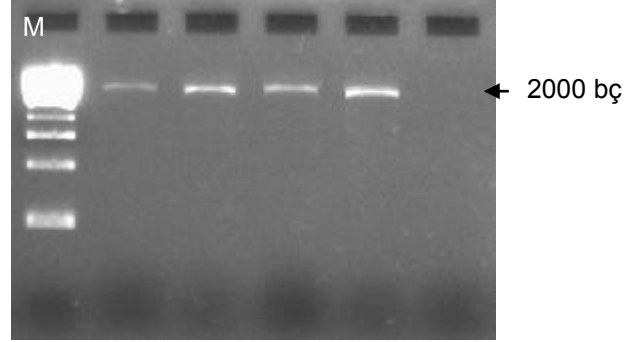
**Tablo 5.2.** ApaI genotip frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	AA	43	43,9
	Aa	40	40,8
	aa	15	15,3
	Toplam	98	100,0
Kontrol	AA	26	37,1
	Aa	34	48,6
	aa	10	14,3
	Toplam	70	100,0

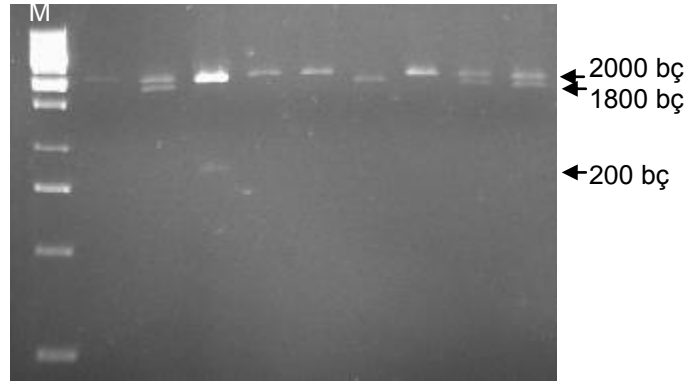
**Şekil 5.7.** Aile öyküsüne göre ApaI genotipleri

### 5.3.3. TaqI Polimorfik Bölgesinin Analizi

TaqI polimorfik bölgesi BsmTaqF ve TaqR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve 2000 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.8.). PCR ürünleri TaqI restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %1'lik agaroz jel üzerinde incelenmiştir (Şekil 5.9.). TaqI kesimi PCR ürününü 1800 ve 200 bç'lik iki fragmente ayırmaktadır.



**Şekil 5.8.** TaqI PCR ürünlerinin % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi  
(M: 1kb DNA markörü)

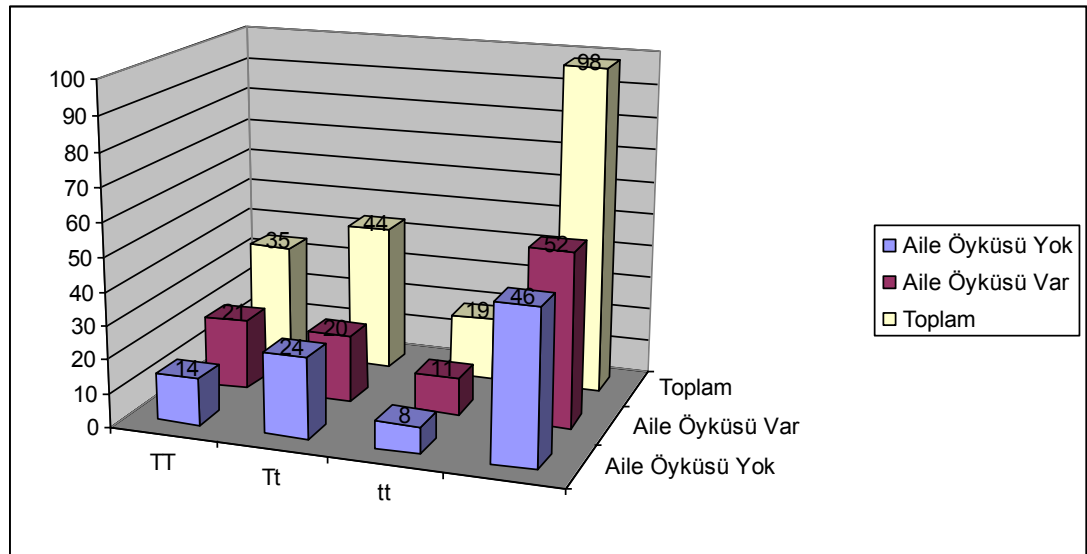


**Şekil 5.9.** TaqI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 1kb DNA markörü)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları aleller ve genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.3.). Buna ek olarak hasta bireylerin sahip oldukları genotipler aile öyküsü varlığına göre grafik üzerinde belirtilmiştir (Şekil 5.10).

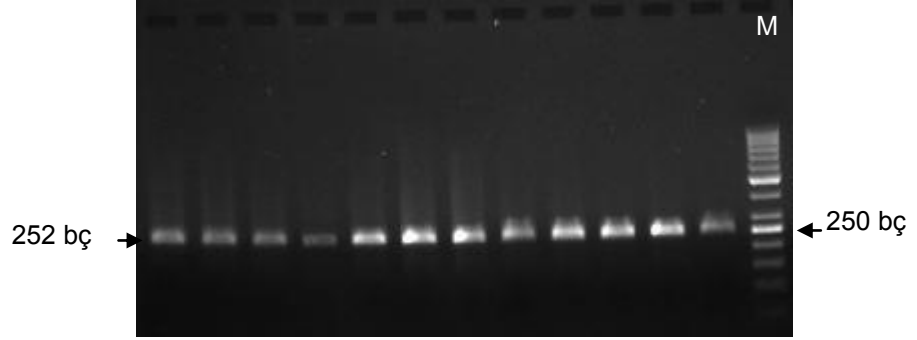
**Tablo 5.3.** TaqI genotip frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	TT	35	35,7
	Tt	44	44,9
	tt	19	19,4
	Toplam	98	100,0
Kontrol	TT	31	44,3
	Tt	29	41,4
	tt	10	14,3
	Toplam	70	100,0

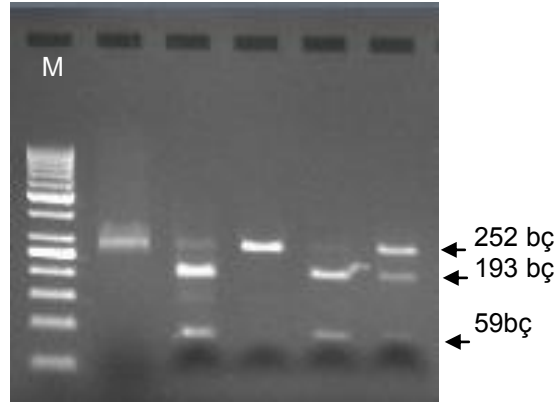
**Şekil 5.10.** Aile öyküsüne göre TaqI genotipleri

#### 5.3.4. Tru9I Polimorfik Bölgesinin Analizi

Tru9I polimorfik bölgesi Tru9IF ve Tru9IR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve 252 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.11.). PCR ürünleri Tru9I restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde incelenmiştir (Şekil 5.12.). Tru9I kesimi PCR ürününü 193 ve 59 bç'lik iki fragmente ayırmaktadır.



**Şekil 5.11.** Tru9I PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi  
(M: 50bç DNA markörü)

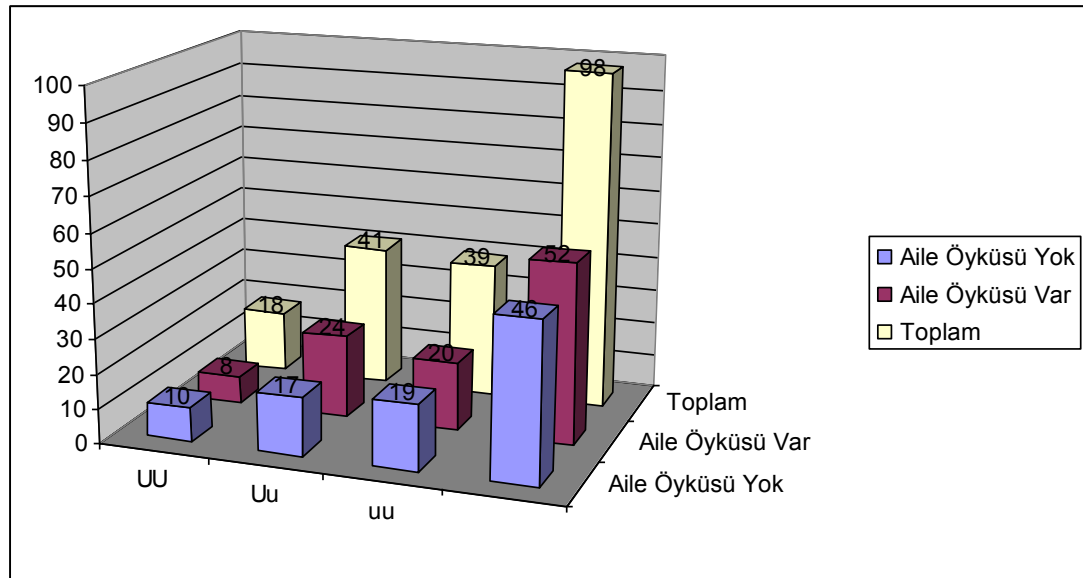


**Şekil 5.12.** Tru9I restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50bç DNA markörü)

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları aleller ve genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.4). Buna ek olarak hasta bireylerin sahip oldukları genotipler aile öyküsü varlığına göre grafik üzerinde belirtilmiştir (Şekil 5.13).

**Tablo 5.4.** Tru9I genotip frekansları

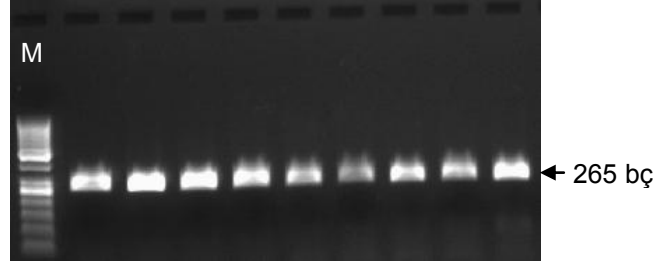
Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	UU	18	18,4
	Uu	41	41,8
	uu	39	39,8
	Toplam	98	100,0
Kontrol	UU	6	8,6
	Uu	37	52,9
	uu	27	38,6
	Toplam	70	100,0

**Şekil 5.13.** Aile öyküsüne göre Tru9I genotipleri

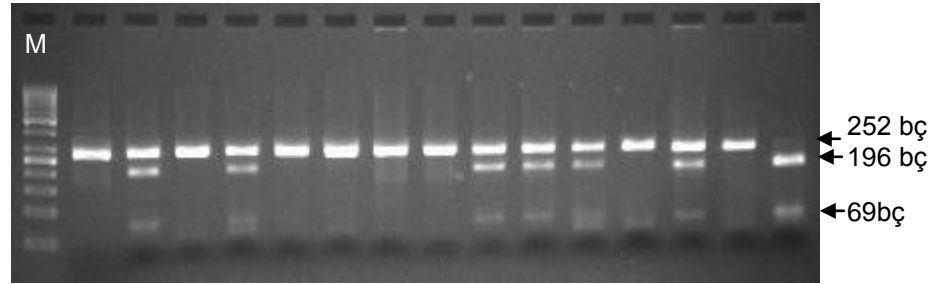
### 5.3.5. FokI Polimorfik Bölgesinin Analizi

FokI polimorfik bölgesi FokIF ve FokIR primerleri ile sınırlandırılarak PCR ile çoğaltılmış ve 265 bç'lik amplifikasyon ürünü elde edilmiştir (Şekil 5.14.). PCR ürünleri FokI restriksiyon enzimi ile kesilerek kesim ürünleri %2'lik agaroz jel üzerinde incelenmiştir (Şekil 5.15.). FokI kesimi PCR ürünü 196 ve 69 bç'lik iki

fragmente ayırmaktadır. Restriksiyon analizi ile belirlenen aleller DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 5.16 – 5.18)

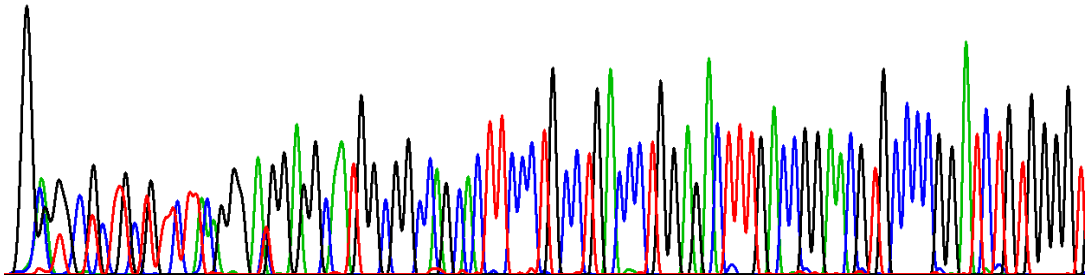


**Şekil 5.14.** FokI PCR ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50bç DNA markörü)

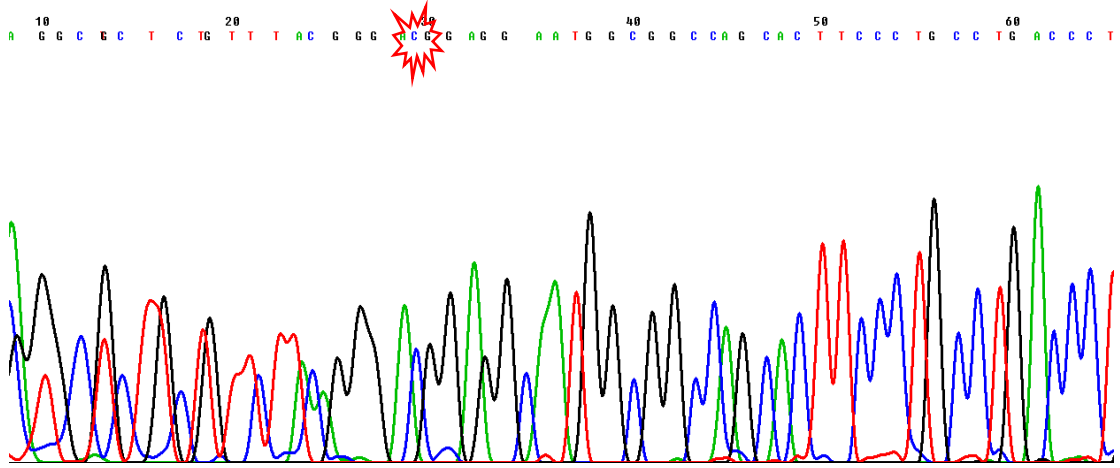


**Şekil 5.15.** FokI restriksiyon kesimi ürünlerinin % 2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (M: 50bç DNA markörü)

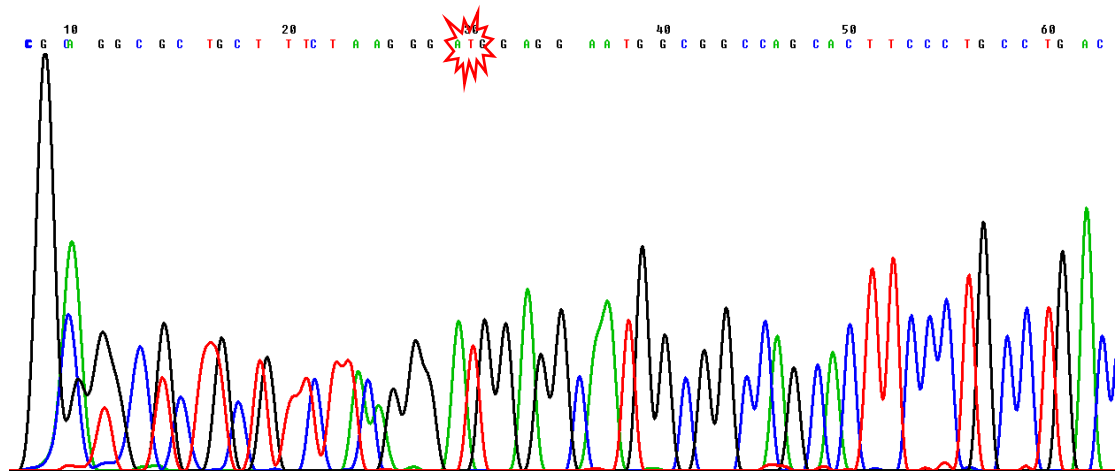
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
 ; C G A G G C C C T C G T C T A C G A G A G A G A A T G G C G G C C A G C A C T T C C C T G C C T G A C C C T G G A G A C T T T G A C C G G A A C G T G C C C C G G A T C T G T G G G G T



**Şekil 5.16.** Ff alelini taşıyan DNA örneğinin dizi analizi



**Şekil 5.17.** FF alelini taşıyan DNA örneğinin dizi analizi



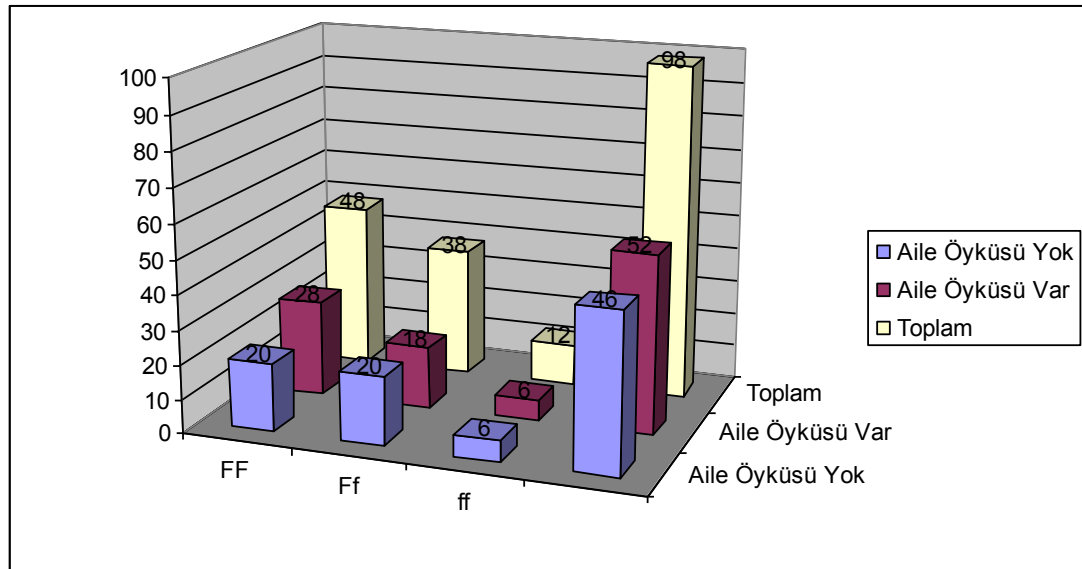
**Şekil 5.18.** ff alelini taşıyan DNA örneğinin dizi analizi

Tüm restriksiyon ürünlerinin kesim paternleri incelenerek hasta ve kontrol grubu örneklerinin taşıdıkları aleller ve genotip frekansları belirlenmiştir (Tablo 5.5.). Buna ek olarak hasta bireylerin sahip oldukları genotipler aile öyküsü varlığına göre grafik üzerinde belirtilmiştir (Şekil 5.19.).



**Tablo 5.5.** FokI genotip frekansları

Grup		Frekans	Yüzde
Hasta	FF	48	49,0
	Ff	38	38,8
	ff	12	12,2
	Toplam	98	100,0
Kontrol	FF	39	55,7
	Ff	25	35,7
	ff	6	8,6
	Toplam	70	100,0

**Şekil 5.19.** Aile öyküsüne göre FokI genotipleri

#### 5.4. Verilerin İstatistiksel Analizi

PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen sonuçlar çerçevesinde VDR geninin beş alelik varyantının dağılımı incelenmiş ve hasta ve kontrol popülasyonda görülen alel ve genotip frekansları karşılaştırılmıştır. Daha sonra bu karşılaştırma detaylandırılarak bireylerin yaş, cinsiyet, sigara içimi, aile öyküsü ve tekrar taş

oluşturma özelliklerinin hastalık için oluşturduğu risk açısından analiz edilmiştir. İstatistik analizler SPSS 16.0 (“Statistical Package for Social Sciences”, version 16.0) ile gerçekleştirilmiştir.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Haplotip frekansları plink ve HapStat programlarıyla belirlenmiştir.

#### **5.4.1. Hardy-Weinberg Analizi ve Genotip ve Alel Frekansları**

VDR polimorfizmlerinin Türk populasyonundaki genotip ve alel frekanslarını göstermek üzere Hardy-Weinberg kanunu uygulanmıştır. Alel frekansı nesilden nesile aynı kalan ve genotip frekansı alel frekansından hesaplanabilen bir populasyon, Hardy-Weinberg dengesi durumunda kabul edilir. Belirli bir örneğin Hardy-Weinberg dengesindeki bir populasyondan rastgele alınan örneklerden biri olup olmadığını test etmek amacıyla ki-kare testi kullanılmış ve çalışılan populasyon dengede bulunmuştur ( $\chi^2 < 3.84$ ).

Her polimorfizme ait gözlemlenen genotip frekanslarından yararlanılarak alel frekansları ve beklenen genotip frekansları hesaplanmış, beklenen ve gözlemlenen frekanslar ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 5.6 – 5.10.’da gösterilmiştir.

#### **5.4.2. Polimorfizmlerin Hastalıkla İlişkilendirilmesi**

Her polimorfizmin böbrek taşı hastalığı ile ilişkisi, plink programı ile analiz edilmiştir. Alınan sonuçlar çerçevesinde, ApaI, TaqI, Tru9I ve FokI polimorfizmleri hastalıkla kesinlikle ilişkilendirilemiştir, fakat BsmI polimorfizminin hastalıkla ilişkili olabileceği (Tablo 5.11.) bulunmuştur ( $df=1$ ,  $p=0.04835$ ,  $\chi^2=3.898$ ).

Bu polimorfizmin yarattığı rölatif riskin hesaplanmasında 95% güvenlik aralığında ihtimaller oranı (“odds ratio”) testi kullanılmıştır (Tablo 5.12.). Test sonuçlarına göre, BsmI “b” alelinin böbrek taşı hastalığı riskini 1.5 kat arttırdığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ , CI: 1.002-2.403).

**Tablo 5.6.** BsmI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması

Gözlemlenen	BB	Bb	bb	Toplam
Hasta	29	46	23	98
Kontrol	13	33	24	70
Toplam	42	79	47	168

**Frekans**

	B	b
Hasta	0,53	0,47
Kontrol	0,42	0,58
Toplam	0,49	0,51

Beklenen	BB	Bb	bb	Toplam
Hasta	27,59184	48,81633	21,59184	98
Kontrol	12,43214	34,13571	23,43214	70
Toplam	39,5372	83,9256	44,5372	168

**ki-kare**

Hasta	0,326183
Kontrol	0,077485
Toplam	0,578679

**Tablo 5.7.** TaqI polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması

Gözlemlenen	TT	Tt	tt	Toplam
Hasta	35	44	19	98
Kontrol	31	29	10	70
Toplam	66	73	29	168

**Frekans**

	T	t
Hasta	0,58	0,42
Kontrol	0,65	0,35
Toplam	0,61	0,39

Beklenen	TT	Tt	tt	Toplam
Hasta	33,15306	47,69388	17,15306	98
Kontrol	29,575	31,85	8,575	70
Toplam	62,5372	79,9256	25,5372	168

**ki-kare**

Hasta	0,587849
Kontrol	0,560491
Toplam	1,261397

**Tablo 5.8.** FokI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması

<b>Gözlemlenen</b>	<b>FF</b>	<b>Ff</b>	<b>ff</b>	<b>Toplam</b>
<b>Hasta</b>	48	38	12	98
<b>Kontrol</b>	39	25	6	70
<b>Toplam</b>	87	63	18	168

**Frekans**

	<b>F</b>	<b>f</b>
<b>Hasta</b>	0,68	0,32
<b>Kontrol</b>	0,74	0,26
<b>Toplam</b>	0,71	0,29

<b>Beklenen</b>	<b>FF</b>	<b>Ff</b>	<b>ff</b>	<b>Toplam</b>
<b>Hasta</b>	45,80612	42,38776	9,806122	98
<b>Kontrol</b>	37,88929	27,22143	4,889286	70
<b>Toplam</b>	83,58482	69,83036	14,58482	168

**ki-kare**

<b>Hasta</b>	1,050098
<b>Kontrol</b>	0,466166
<b>Toplam</b>	1,607339

**Tablo 5.9.** Tru9I polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması

<b>Gözlemlenen</b>	<b>UU</b>	<b>Uu</b>	<b>uu</b>	<b>Toplam</b>
<b>Hasta</b>	18	41	39	98
<b>Kontrol</b>	6	37	27	70
<b>Toplam</b>	24	78	66	168

**Frekans**

	<b>U</b>	<b>u</b>
<b>Hasta</b>	0,39	0,61
<b>Kontrol</b>	0,35	0,65
<b>Toplam</b>	0,38	0,63

<b>Beklenen</b>	<b>UU</b>	<b>Uu</b>	<b>uu</b>	<b>Toplam</b>
<b>Hasta</b>	15,125	46,75	36,125	98
<b>Kontrol</b>	8,575	31,85	29,575	70
<b>Toplam</b>	23,625	78,75	65,625	168

**ki-kare**

<b>Hasta</b>	1,482513
<b>Kontrol</b>	1,830179
<b>Toplam</b>	0,015238

**Tablo 5.10.** ApaI polimorfizminin hasta ve kontrol grubunda gözlemlenen ve beklenen frekanslarının karşılaştırılması

<b>Gözlemlenen</b>	<b>AA</b>	<b>Aa</b>	<b>aa</b>	<b>Toplam</b>
<b>Hasta</b>	43	40	15	98
<b>Kontrol</b>	26	34	10	70
<b>Toplam</b>	69	74	25	168

	<b>Frekans</b>	
	<b>A</b>	<b>a</b>
<b>Hasta</b>	0,64	0,36
<b>Kontrol</b>	0,61	0,39
<b>Toplam</b>	0,63	0,37

<b>Beklenen</b>	<b>AA</b>	<b>Aa</b>	<b>aa</b>	<b>Toplam</b>
<b>Hasta</b>	40,5	45	12,5	98
<b>Kontrol</b>	26,41429	33,17143	10,41429	70
<b>Toplam</b>	66,88095	78,2381	22,88095	168

	<b>ki-kare</b>
<b>Hasta</b>	1,209877
<b>Kontrol</b>	0,043675
<b>Toplam</b>	0,492963

### 5.4.3. Haplotip Analizi

BsmI, ApaI ve TaqI polimorfik bölgelerinin haplotip oluşturabileceği daha önceki çalışmalarda farklı populasyonlar için gösterilmiştir. Bu çalışmadan alınan verilerle de Türk populasyonunda bu bölgelerin haplotip oluşturma olasılığı HAPSTAT Analizi ile belirlenmiştir (Tablo 5.13.).

**Tablo 5.11.** Polimorfizm-hastalık ilişkilendirme sonuçları

	Hasta	Sağlıklı	$\chi^2$	df	P
BsmI (Alelik)	104/92	59/81	3.898	1	0.04835

**Tablo 5.12.** BsmI polimorfizmine ait ihtimaller oranı

	$\chi^2$	P	OR	L95	U95
BsmI	<b>3.898</b>	<b>0.04835</b>	<b>1.552</b>	1.002	2.403

**Tablo 5.13.** BsmI, ApaI, TaqI haplotip analizi

Haplotip	F
BAt	0.3801
BaT	0.02582
baT	0.3432
BAT	0.07925
bAT	0.1618
Bt	0.38
BT	0.1051
bT	0.505

Daha sonra plink programı ile haplotip-temelli ilişkilendirme testleri yapılmış, BsmI-TaqI ve BsmI-ApaI-TaqI polimorfizlerinin birlikte görülmeleriyle hastalık ilişkisi araştırılmıştır (Tablo 5.14.). Veriler ışığında “bT” haplotipinin böbrek taşı hastalığı ile ilişkisi bulunmuştur ( $\chi^2=4.038 > 3.84$ )

**Tablo 5.14.** Haplotip-hastalık ilişkisi

Haplotip	F hasta	F sağlıklı	$\chi^2$	df	P
BAt	0.412	0.3448	1.547	1	0.2136
BaT	0.03575	0.01199	1.815	1	0.1779
baT	0.3253	0.3768	0.9485	1	0.3301
BAT	0.08861	0.06802	0.4662	1	0.4948
bAT	0.1383	0.1984	2.135	1	0.1439
Bt	0.4124	0.3453	1.538	1	0.2149
BT	0.1237	0.07914	1.711	1	0.1909
<b>bT</b>	<b>0.4639</b>	<b>0.5755</b>	<b>4.038</b>	<b>1</b>	<b>0.0445</b>

Bunlara ek olarak yaş, aile öyküsü, sigara kullanımı ve tekrar taş oluşturma kriterleri göz önünde bulundurularak belirtilen kriterlerin hastalıkla ilişkilendirilmesi araştırılmıştır.

#### 5.4.4. Yaş – Hastalık İlişkinin Araştırılması

Hasta ve kontrol grupları öncelikle 60 yaş üstü ve altı olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Tablo 5.15.) fakat hastalığın yaş ile ilişkisi bulunamamıştır ( $\chi^2 < 3.84$ ) (Tablo 5.16.). Daha sonra yaş aralıkları daraltılarak <20, 20-40, 40-60 ve >60 yaş grupları oluşturulmuş (Tablo 5.17.), ancak yaş grupları yine hastalıkla ilişkilendirilememiştir ( $\chi^2 < 3.84$ ) (Tablo 5.18.).

**Tablo 5.15.** Örneklerin 60 yaş üstü ve altı olarak gruplandırılması

Yaş		Grup		Toplam
		Kontrol	Hasta	
> 60		9	20	29
<60		61	78	139
Toplam		70	98	168

**Tablo 5.16.** 60 yaş üstü ve altı gruplarda ki-kare testi

	Değer	df	p
<b>Pearson Ki-kare testi</b>	1,630	1	,221

**Tablo 5.17.** Örneklerin <20, 20-40, 40-60 ve >60 yaş gruplarına dağılımı

Yaş		Grup		Toplam
		Kontrol	Hasta	
<20		3	4	7
20-40		31	38	69
40-60		27	36	63
>60		9	20	29
Toplam		70	98	168

**Tablo 5.18.** <20, 20-40, 40-60 ve >60 yaş gruplarında ki-kare testi

	Değer	df	p
<b>Pearson Ki-kare</b>	1,691	3	,638

#### 5.4.5. Aile öyküsü – Hastalık İlişkisinin Araştırılması

Aile öyküsünün hastalıkla olası ilişkisinin araştırılması amacıyla hasta bireylerden aile öyküsü olanlar gruplandırılmıştır (Tablo 5.19). FokI, BsmI, Tru9I, ApaI, TaqI genotiplerinden hiçbiri böbrek taşı hastalığı ile ilişkili bulunmamıştır ( $\chi^2 < 5.99$ ) (Tablo 5.20. -5.24.).

**Tablo 5.19.** Hasta bireylerin aile öyküsüne göre gruplandırılması

		Cinsiyet		
		Kadın	Erkek	Total
Aile Öyküsü	Yok	15	31	46
	Var	17	35	52

**Tablo 5.20.** FokI - Aile Öyküsü ilişkilendirmesi

			Aile Öyküsü		Total
			Yok	Var	
FokI	FF	Deneysel	20	28	48
		Beklenen	22,5	25,5	48,0
	Ff	Deneysel	20	18	38
		Beklenen	17,8	20,2	38,0
	ff	Deneysel	6	6	12
		Beklenen	5,6	6,4	12,0
Toplam	Deneysel		46	52	98
	Beklenen		46,0	52,0	98,0

#### Ki-kare Testi

	Değer	df	p
Pearson ki-kare	1,075	2	,584



**Tablo 5.21.** BsmI - Aile Öyküsü İlişkilendirmesi

			Aile Öyküsü		Total
			Yok	Var	
BsmI	BB	Deneysel	13	16	29
		Beklenen	13,6	15,4	29,0
	Bb	Deneysel	23	23	46
		Beklenen	21,6	24,4	46,0
	bb	Deneysel	10	13	23
		Beklenen	10,8	12,2	23,0
Total	Deneysel		46	52	98
	Beklenen		46,0	52,0	98,0

**Ki-kare Testi**

	Değer	df	p
Pearson Chi-Square	,336 <sup>a</sup>	2	,846

**Tablo 5.22.** Tru9I - Aile Öyküsü ilişkilendirmesi

			Aile Öyküsü		Total
			Yok	Var	
Tru9I	UU	Deneysel	10	8	18
		Beklenen	8,4	9,6	18,0
	Uu	Deneysel	17	24	41
		Beklenen	19,2	21,8	41,0
	uu	Deneysel	19	20	39
		Beklenen	18,3	20,7	39,0
Total	Deneysel		46	52	98
	Beklenen		46,0	52,0	98,0

**Ki-Kare Testi**

	Değer	df	p
Pearson Chi-Square	1,080 <sup>a</sup>	2	,583

**Tablo 5.23.** ApaI – Aile Öyküsü ilişkilendirmesi

			Aile Öyküsü		Total
			Yok	Var	
ApaI	AA	Deneysel	20	23	43
		Beklenen	20,2	22,8	43,0
	Aa	Deneysel	20	20	40
		Beklenen	18,8	21,2	40,0
	aa	Deneysel	6	9	15
		Beklenen	7,0	8,0	15,0
Total	Deneysel		46	52	98
	Beklenen		46,0	52,0	98,0

**Ki-kare Testi**

	Değer	df	p
Pearson Chi-Square	,444 <sup>a</sup>	2	,801

**Tablo 5.24.** TaqI - Aile Öyküsü ilişkilendirmesi

			Aile Öyküsü		Total
			Yok	Var	
TaqI	TT	Deneysel	14	21	35
		Beklenen	16,4	18,6	35,0
	Tt	Deneysel	24	20	44
		Beklenen	20,7	23,3	44,0
	tt	Count	8	11	19
		Beklenen	8,9	10,1	19,0
Total	Deneysel		46	52	98
	Beklenen		46,0	52,0	98,0

**Ki-kare Testi**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1,877	2	,391

#### 5.4.6. Tekrar taş oluşturma –Polimorfizm İlişkisinin Araştırılması

Tekrarlayan taş oluşumu gösteren 11 hastanın taşıdığı polimorfizmlerle hastalık ilişkisi ANOVA testi ile araştırılmış, ancak hiçbir polimorfik lokusla ilişki bulunamamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 5.25.)

**Tablo 5.25.** Tekrar taş oluşturma ve hastalık ilişkisi için ANOVA testi

	F	Sig.
FokI	,194	,661
BsmI	,020	,887
Tru9I	,077	,781
ApaI	1,632	,204
TaqI	,621	,433

#### 5.4.7. Sigara kullanımı – Hastalık İlişkisinin Araştırılması

Sigara kullanımı ile taş oluşumu arasındaki olası bağlantının araştırılması için hasta ve kontrol popülasyonu sigara kullanımlarına göre gruplandırılmış (Tablo 5.26.), ancak sigara kullanımının hastalıkla ilişkisi saptanamamıştır ( $\chi^2<3.84$ ) (Tablo 5.27.)

**Tablo 5.26.** Hasta ve kontrol popülasyonlarının sigara kullanımına göre gruplandırılması

		Sigara Kullanımı		Toplam
		Kullanmıyor	Kullanıyor	
Grup	Kontrol	37	33	70
	Hasta	58	40	98
Toplam		95	73	168

**Tablo 5.27.** Sigara kullanımı- hastalık ilişkisinin gösterilmesi

	Değer	df
Pearson Ki-kare	,665 <sup>a</sup>	1
Continuity Correction <sup>b</sup>	,433	1
Likelihood Ratio	,664	1
Fisher's Exact Test		
Linear-by-Linear Association	,661 <sup>c</sup>	1
N of Valid Cases	168	

## 6. TARTIŞMA

Böbrek taşı hastalığı çevresel olduğu kadar hormonal ve genetik faktörler etkisiyle de ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik faktörler, böbrek taşı oluşumunun önemli belirleyicileri olarak düşünülmektedir. Çevresel faktörler kontrol altına alındığında pozitif aile öyküsü tek başına en önemli risk faktörü olmaktadır (Curhan vd., 1997).

Kalsiyum oksalat, taşların en sık görülen kristal komponentidir. Çoğu böbrek taşı hastasında taş oluşumunun başlangıç aşaması CaOx ile süpersatüre olan idrardaki kalsiyum oksalatın kristalizasyonudur. Kalsiyum oksalat süpersatürasyonu kalsiyum ve oksalatın idrardaki konsantrasyonlarıyla doğru orantılıdır (Hess ve Tiselius; 2002). Hiperkalsiüri, kalsiyum taşları ile en fazla bağlantılı bulunan biyokimyasal bir değişimdir. İdyopatik hiperkalsiüri, idrardaki kalsiyum tuzlarının saturasyonunu arttırarak ve kalsiyum oksalat kristalizasyonunun inhibitörlerini inaktive ederek kalsiyum taşı oluşumunu tetikleyebilir. Sıklıkla idyopatik hiperkalsiüri böbrek taşı oluşumuna yol açan diğer metabolik risk faktörleriyle (hiperürikosüre, hiperoksalüre, hipositatüri) de bağlantılıdır. Tekrarlayan taş oluşumu gözlenen hastaların en az üçte birinde hem hiperkalsiüri, hem de hipositatüri görülmektedir (Hamm vd., 2002; Rudman vd., 1982). Vitamin D hücre proliferasyonunu, kalsiyum absorpsiyonunu ve hücre farklılaşmasını düzenler ve etkilerini VDR vasıtasıyla yürütür. VDR genindeki herhangi bir değişim kalsiyum metabolizmasını değiştirerek kalsiyum taşları oluşumu riskini arttırabilir. Kalsiyum metabolizmasında en önemli faktör olan 1,25-dihidroksi vitamin D3, yani kalsitriol, vitamin D'nin barsaktan emilimini arttıran en güçlü uyarıcıdır. Kalsitriolün etkilerinin ortaya koyulmasında vitamin D reseptörü görev alır. Kalsiyum taş oluşumu sıçanlarda da modellenmiş, hiperkalsiürik sıçanlarda VDR aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Bushinsky vd.; 2001). VDR aktivasyonu, taş matrisleri oluşumunda rol alan osteokalsin ekspresyonunu regüle eder (Celeste vd; 1986). Bununla birlikte, VDR aktivitesi sadece vitamin D tarafından değil, aynı zamanda da protein kinaz A, paratiroid hormon ve büyüme faktörleriyle de artar. VDR aynı zamanda protein

kinaz C ekspresyonunu bastırır (Krishnan vd., 1991). Hormonal sinyalizasyondaki potansiyel etkisi de göz önünde bulundurularak VDR geni kalsiyum taşı hastalığı için aday gen lokusu olarak ortaya koyulmuştur. VDR ile bağlantılı bu fonksiyonlar, VDR geni ile taş oluşumu arasındaki ilişkinin sadece kalsiyum regülasyonu ile sınırlı olmadığını, aynı zamanda diğer sinyal yollarından da etkilendiğini gösterir. Dolayısıyla, tüm bunlar kalsiyum oksalat taşı hastalığının haritalanmasını güçleştirmektedir.

VDR geni 12q13.1 lokusunda olup dokuz eksondan oluşur ve oldukça polimorfiktir. Restriksiyon enzimleri kullanılarak VDR geninde birçok polimorfizm tanımlanmıştır. Bunlara örnekler Tru9I, TaqI, BsmI, EcoRV ve ApaI'dır. Tüm bu RFLP'ler henüz fonksiyonu bilinmeyen intron 8 ve ekzon 9 bölgelerinde yer alır. Bunlardan farklı bir RFLP ise FokI'dır. Bu polimorfizm ekzon 2'de, başlangıç kodonu olan ATG'de T/C değişimi olarak tanımlanmıştır (Uitterlinden vd.; 2004b).

Polimorfizm, populasyonun en az %1'inde görülen genetik varyant anlamını taşır. Bu değişimler genlerin kodlamayan intronik bölgelerinde olursa protein ürününe yansımazlar. Genin düzenleyici bölgelerindeki değişimler genin ekspresyon seviyesini ve dolayısıyla protein düzeylerini etkiler. Örneğin VDR geninin 5' promotor bölgesindeki değişimler mRNA ekspresyon paternini ve seviyesini, 3'UTR bölgesindeki değişimler ise mRNA stabilitesini ve protein translasyon verimini etkileyebilir. Ekzonik bölgelerdeki değişimler ise protein dizisini değiştirir. Ancak ekzonik dizilerdeki değişimlerin protein yapısını değiştirmemesi de olasıdır (sinonim polimorfizmler). Bu değişimler genellikle DNA'yı kesen restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini yok ederler ya da yaratırlar. Enzim kesimi sonrası farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur ve bunlar elektroforez yöntemi ile birbirlerinden ayırt edilebilir. Bu polimorfizmler RFLP polimorfizmleri olarak adlandırılır.

Yakın zamanlarda VDR polimorfizmleri kalsiyum metabolizması hastalıklarında ve kalsiyum taş hastalığında incelenmeye başlanmıştır. Bu polimorfizmlerin kalsiyum taşları oluşumunda rolü olduğu düşünülmüştür, bununla ilgili kanıtlar aşağıdaki gibi özetlenebilir (Scott vd; 1999):

1. Hiperkalsiüre sıklıkla artmış barsak kalsiyum Emilimi ile ilişkilidir. Kalsiyumun barsaktan Emilimini etkileyen tek bilinen stimulan 1,25(OH)<sub>2</sub>VitD reseptörü yoluylaadır.
2. Hiperkalsiüre hastalarının artmış VDR sayısının arttığı gösterilmiştir.
3. Hiperkalsiurik kalsiyum taşı hastaları azalmış vertebral mineral dansitesine sahiptir ve VDR lokusundaki genetik varyasyon hepsinde olmasa bile bazılarında kemik mineral dansitesi ile ilişkilendirilmiştir kadınlarda barsak kalsiyum Emilimi VDR genotipleri ile ilişkili bulunmuştur

Son yıllarda kompleks genetik özelliklerin çalışılmasında genetik markör olarak tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) kullanılmaya başlanmıştır. Taş hastalığının genetik markörlerinin aydınlatılması klinik açıdan büyük önem taşımaktadır. SNP'ler popülasyon temelli çalışmalarda aday genlerin araştırılması için yeni bir yolak olmuşlardır. Taş hastalığının genetik alt yapısı büyük oranda tanımlanmamış ve sadece birkaç polimorfizm araştırılmıştır (Scott vd., 1999) Hastalıklara yatkınlıkla bağlantılı olan genetik varyantların keşfi koruyucu tıp kavramının gelişmesi için kilit noktadır. Genellikle bir polimorfizmin hastalarda sağlıklı kontrollerde görüldüğünden daha sık rastlandığını test etmek üzere ilişkilendirme (asosiasyon) analizleri yapılır. Asosiasyon çalışmalarından hastalıkla ilgili bir bağlantı bulunursa bu bulgu aday genin hastalık prosesine bir şekilde dahil olduğunu kuvvetle destekler. Ancak asosiasyon çalışmalarının yorumlanması, polimorfizmlerin çoğunun fonksiyonel bir etkisinin bilinmemesinden dolayı güçleşmektedir. Dolayısıyla, bir hedef gen bölgesindeki polimorfizmlerin bilinmesinin yanı sıra, bu polimorfizmlerin genetik ve fonksiyonel seviyede birbirleriyle olan ilişkilerinin anlaşılması da çok önemlidir.

Belli polimorfizmlerin fenotiple bağlantılı gözükmesi ilgili durumdan bu polimorfizmin kesinlikle sorumlu olduğunu göstermez. Bir popülasyonda farklı polimorfizmlerin birbirleriyle bağlantılı olması bağlantı eşitsizliği olarak adlandırılır. Bir gen bölgesinde zaman içinde düşük seviyede rekombinasyon olmuşsa, bu durum belli polimorfizmlerin yüksek düzeyde bağlantılı olması sonucunu doğurur. Pratikte

bunun anlamı belli bir alelin varlığının ona komşu ve bağlı olan diğer bir alel vasıtasıyla belirlenebilmesidir. Yüksek seviyede LD , birlikte bulunan alel blokları, yani haplotiplerin oluşmasını sağlar. Bu haplotip blokları bazı genetik hastalıkların sebebinin belirlenmesi için oldukça yararlıdır. Hangi haplotipin risk alelini taşıdığı belirlendikten sonra, bu haplotipteki hangi polimorfizmin gerçekten fenotipten sorumlu olduğu ortaya koyulabilir. VDR genindeki bilinen polimorfizmler arasındaki LD'ni belirlemek üzere birçok çalışma yapılmıştır. Bugüne kadar elde edilen bilgiler çok sınırlı olmasına rağmen, dört farklı haplotipte TaqI, BsmI, EcoRV ve ApaI RFLP'leri arasında kuvvetli bir LD bulunmuştur. Farklı VDR polimorfizmleri arasında yapılacak olan LD çalışmaları belli bazı hastalıkların etiyojilerinin aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

Ruggiero vd.(1999), BsmI polimorfizminin bb aleli ve yüksek üriner kalsiyum ekskresyonu ve dolayısıyla artmış taş oluşumu riski arasında bir bağlantı bulmuşlardır. Aynı şekilde Mossetti vd.(2004) bb genotipli bireylerde azalmış üriner sitrat ekskresyonuna dikkat çekmişlerdir, bu da popülasyonda b aleline sahip bireylerin böbrek taşı oluşturma riskinin fazla olabileceğini göstermiştir. Ancak bu sonuçlar tüm çalışmalarda tekrar edilememiştir.

TaqI polimorfizmi ile de benzer tartışmalı sonuçlar ortaya koyulmuştur. Nishijima vd., (2002) t alelinin yüksek Ca ekskresyonu ve dolayısıyla yüksek taş oluşumu riski ile bağlantılı bulmuşlardır. Ancak diğer bir çalışmada T aleli ile hipositratüri arasında, dolayısıyla taş oluşumuna yol açan şartlar arasında bir bağlantı bulunmuştur. Bunların yanında Taq I polimorfizmi ile taş oluşumu arasında herhangi bir bağlantı bulmayan çalışmalar da mevcuttur (Güneş vd; 2006).

Bazı çalışmalarda FokI ve ApaI polimorfizmleri taş oluşumuyla ilişkili bulunmuştur (Chen vd; 2001). İki çalışma C alelinin taş oluşumuyla ilişkili olabileceğini saptamıştır (Chen vd., 2001; Kumar Bid vd; 2005); bir çalışma ise AA genotipinin taş hastalarında daha fazla görüldüğünü ortaya koymuştur (Özkaya vd, 2003). Ancak diğer bazı çalışmalarda bu veriler doğrulanamamıştır (Mossetti vd, 2004).



Türk popülasyonunda VDR polimorfizmleri ile taş oluşumu ya da hiperkalsiüri arasındaki bağlantı sadece üç çalışma kapsamında ve sadece BsmI, ApaI ve TaqI polimorfizmlerinin incelenmesiyle sınırlı kalmıştır. İlk çalışmada 64 Ca taş hastası çocukta AA genotipinin kontrollere kıyasla hastalarda daha fazla olduğu tespit edilmiş, ancak BsmI ve TaqI genotiplerinin dağılımı sağlıklı ve hasta bireylerde benzer bulunmuştur (Özkaya vd., 2003). Bunu takiben, aynı araştırma grubu tarafından hasta sayısının 80 çocuğa çıkarılması ile yapılan ikinci incelemede ise yine AA genotipinin hiperkalsiüri ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir, BsmI ve TaqI polimorfizmleri ise ilişkili bulunmamıştır (Söylemezoğlu vd; 2004). 110 taş hastasıyla yapılan üçüncü çalışmada ise taş tipi belirtilmemiştir ve çalışılan hiçbir polimorfizm taş oluşumuyla ilişkilendirilememiştir. (Güneş vd; 2006).

Bu çalışma kapsamında 98 CaOx taşı hastası ve 70 sağlıklı kontrolü kapsayan Türk popülasyonunda ilk kez beş farklı VDR polimorfizmi incelenmiş, taş oluşumuna etkisi araştırılmış ve aile öyküsü, tekrar taş oluşturma ve yaş kriterlerinin hastalıkla ilişkisi incelenmiştir. Alınan sonuçlar çerçevesinde, ApaI, TaqI, Tru9I ve FokI polimorfizmleri hastalıkla ilişkilendirilememiştir ( $p > 0.05$ ), fakat BsmI alelinin hastalıkla ilişkili olabileceği bulunmuştur ( $p = 0.04835$ ,  $\chi^2 = 3.898$ ). Bu polimorfizmin getirdiği rölatif riskin hesaplanmasında 95% güvenlik aralığında ihtimaller oranı hesaplanmış ve “b” alelinin böbrek taşı hastalığı riskini 1.5 kat arttırdığı saptanmıştır ( $p < 0.05$ , CI: 1.002-2.403). Ancak bu sonuç dikkatle değerlendirilmelidir, çünkü p değeri istatistiksel önemlilik sınırına (0.05) oldukça yakındır. Çalışılan popülasyon büyüklüğünün artırılmasıyla bu durum biraz daha açıklığa kavuşturulabilir.

Bu tez çalışmasından alınan sonuçlar çerçevesinde Türk popülasyonunda ilk kez BsmI polimorfizmi CaOx taşı oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Buna ek olarak yine ilk kez Türk CaOx taşı hastalarında VDR polimorfik bölgelerinin haplotip oluşturma frekansları incelenmiş ve BA<sub>T</sub>, ba<sub>T</sub>, bAT haplotiplerinin yüksek oranlarda görüldüğü tespit edilmiştir (sırasıyla %38, %34, %16). Diğer haplotiplerin görülme olasılığı oldukça düşüktür (F: 0.03-0.08).

Haplotip-temelli ilişkilendirme testleri yapıldığında, yine Türk populasyonunda ilk kez “bT” haplotipinin böbrek taşı oluşumu ile ilişkisi bulunmuştur ( $\chi^2=4.038 >3.84$ ).

Ayrıca, yaş, aile öyküsü, sigara kullanımı ve tekrar taş oluşturmanın CaOx taş oluşumuyla bağlantısı araştırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları öncelikle 60 yaş üstü ve altı olmak üzere ve daha sonra <20, 20-40, 40-60 ve >60 yaş gruplarına ayrılmış, ancak hastalığın yaş ile ilişkisi bulunamamıştır ( $\chi^2<3.84$ ). Aile öyküsünün hastalıkla olası ilişkisinin araştırılması amacıyla hasta bireylerden aile öyküsü olanlar gruplandırılmış, fakat yine FokI, BsmI, Tru9I, ApaI, TaqI genotiplerinden hiçbiri böbrek taşı hastalığı ile ilişkili bulunmamıştır ( $\chi^2<5.99$ ). Tekrarlayan taş oluşumu gösteren 11 hastanın taşıdığı polimorfizmler ve sigara kullanımı da yine hastalık ile ilişkilendirilememiştir.

Sonuç olarak, 2001 yılından itibaren VDR polimorfizmlerinin CaOx taş oluşumu ile ilişkisi araştırılmaktadır, ancak elde edilen sonuçlar tartışmalıdır ve çoğu zaman birbirine zıt düşmektedir, bu nedenle de VDR polimorfizmlerinin taş oluşumundaki rolü henüz aydınlatılamamıştır. Irk, diyet alışkanlıkları ve yaşanan coğrafi bölge bile polimorfizmlerin hastalık oluşturmaya yatkınlığını değiştirebilir. Bu nedenlerden dolayı VDR polimorfizmleri-taş oluşumu ilişkisi, farklı populasyon gruplarında incelenmeli ve aynı populasyonlar için alınan sonuçlar farklı araştırma gruplarınca tekrar edilmelidir. Bu sayede hastalığın oluşumunu aydınlatılabilir ve yüksek riskli bireylerin değerlendirilmesine ışık tutulabilir. Bu çalışma ile VDR lokusunda görülen beş polimorfizm ilk kez birlikte çalışılmıştır ve elde edilen sonuçlar literatüre katkı sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

ALHAVA E, Juuti M, Karjalainen P: Bone mineral density in patients with urolithiasis. *Scand J Urol Nephrol* 1976, 10: 154–156.

ARAI, H., Miyamoto, K., Taketani, Y., Yamamoto, H., Iemori, Y., Morita, K., Tonai, T., Nishisho, T., Mori, S., Takeda, E., 1997. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J. Bone Miner. Res.* 12, 915–921.

ARAI, H., Miyamoto, K.I., Yoshida, M., Yamamoto, H., Taketani, Y., Morita, K., Kubota, M., Yoshida, S., Ikeda, M., Watabe, F., Kanemasa, Y., Takeda, E. The polymorphism in the caudal-related homeodomain protein Cdx-2 binding element in the human vitamin D receptor gene. *J. Bone Miner. Res.* 16, 2001, 1256– 1264.

ASPLIN J, Arsenault D, Parks JH vd: Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. *Kidney Int* 1998; 53(1): 194-199.

BAKER, A.R., McDonnell, D.P., Hughes, M., Crisp, T.M., Mangelsdorf, D.J., Haussler, M.R., Pike, J.W., Shine, J., O'Malley, B.W.. Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 1988, 3294–3298.

BATAILLE P, Achard J, Fournier A, Boudailliez B, Westeel P, El Esper N, Bergot C, Jans I, Lalau J, Petit J, Henon G, Laval Jeantet M, Bouillon R, Sebert J: Diet, vitamin D and vertebral mineral density in hypercalciuric calcium stone formers. *Kidney Int* 1991, 39: 1193–1205.

BOUILLON R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism and action to clinical application. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 2001; 1009–28.

BOYCE WH ve KING JS Jr. Crystal-matrix interrelations in calculi. *J. Urol.* 1959; 81:351.

BROWN CM, Purich DL. Physical chemical processes in kidney stone formation. In Coe FL, Flavus MJ (eds). *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. New York, Raven Press, 1992, pp 613-624.

BUSHINSKY DA, Grynbas MD, Asplin JR. Effect of acidosis on urine supersaturation and stone formation in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *Kidney Int.* 2001; 59: 1415-1425.

CELESTE AJ, Rosen V, Buecker JL, Kriz R, Wang EA, Wozney JM. Isolation of the human gene for gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J*, 1986; 5: 1885-90.

CHEN WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai FJ. Association of the vitamin D receptor gene start codon FokI polymorphism with calcium oxalate stone disease *BJU International* 87: 168-171, 2001.

COE FL, Bushinsky DA. Pathophysiology of hypercalciuria. *Am. J. Physiol.* 1984; 247:1-13.

COE FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115(10):2598-608.

COE FL, Parks JH. Nephrolithiasis: Pathogenesis and Treatment, 2nd ed. Chicago, Year Book Medical Publishers, 1988.

COLIN, E.M., Weel, A.E., Uitterlinden, A.G., Buurman, C.J., Birkenhager J.C., Pols, H.A., van Leeuwen, J.P. Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 52,2000, 211 – 216.

CURHAN GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1568–1573.

DANPURE CJ ve JENNINGS PR. Further studies on the activity and subcellular distribution of alanine: Glyoxylate aminotransferase in the livers of patients with hyperoxaluria type 1. *Clin. Sci.* 1988; 75:315-322.

DAWSON-HUGHES B, Harris SS, Finneran S: Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995, 80: 3657–3661.

DE LUCA LM, Sasak W, Adamo S, Bhat PV, Akalovsky I, Silverman-Jones CS, Maestri N. Retinoid metabolism and mode of action. *Environ Health Perspect.* 1980; 35:147-52.

ERBEN RG, Soegiarto DW, Weber K vd. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Mol. Endocrinol.* 2002; 16:1524–1537.

FANG, Y., van Meurs, J.B., Bergink, A.P., Hofman, A., van Duijn, C.M., van Leeuwen, J.P., Pols, H.A., Uitterlinden, A.G. Cdx-2 polymorphism in the promoter

region of the human vitamin D receptor gene determines susceptibility to fracture in the elderly. *J. Bone Miner. Res.* 18,2003, 1632– 1641.

FERRARI S, Rizzoli R, Chevalley T. Vitamin D receptor gene polymorphism and the rate of change of lumbar spine bone mineral density in elderly men and women. *Lancet* 1995;345:423–4.

FINLAYSON B, Dubois L. Absorption of heparin on sodium acid urate. *Clin. Chim. Acta* 1978; 84:203-206.

FRASER DR ve E. Kodicek, Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin-D metabolite, *Nature* 228 (1970) (5273), p. 764

GARNERO P, Borel O, Sornay-Rendu E, Arlot ME, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are not related to bone turnover, rate of bone loss, and bone mass in postmenopausal women: The OFELY Study. *J Bone Miner Res* 1996,11: 827–834.

GARNERO P, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD: Vitamin D receptor gene polymorphisms do not predict bone turnover and bone mass in healthy premenopausal women. *J Bone Miner Res.* 1995, 10: 1283–1288.

GARSDIE J. Nucleation. In Nancollas GH (ed): *Biological mineralization and demineralization*. New York, Springer-Verlag, 1982, pp 23-25.

GHAZARIAN JG, C.R. Jefcoate, J.C. Knutson, W.H. Orme-Johnson and H.F. DeLuca, Mitochondrial cytochrome P450 — component of chick kidney 25-hydroxycholecalciferol-1 $\alpha$ -hydroxylase, *J Biol Chem* 249 (1974) (10), pp. 3026–3033.

GROSS C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D. The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *J Bone Miner Res* 1996;11:1850–5.

GROVER PK, Marshall VR, Ryall RL: Tamm-Horsfall mucoprotein reduces promotion of calcium oxalate crystal aggregation induced by urate in human urine in vitro. *Clin. Sci.* 1994; 87:137-142.

GÜNEŞ S, Bilen CY, Kara N, Asci R, bağcı H, Yılmaz AF. Vitamin D receptor gene polymorphisms in patients with urolithiasis. *Urol Res.* 34: 47-52; 2006.

HAMM LL, Hering-Smith KS. Pathophysiology of hypocitraturic nephrolithiasis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2002; 31: 885–893.

HANEWALD KH, M.P. Rappoldt and J.R. Roborgh, Analysis of fat-soluble vitamins.5. The antirachitic activity of previtamin-D<sub>3</sub>, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas-Journal of the Royal Netherlands Chemical Society* vol. 80(9–10) (1961), pp. 1003–1014.

HARRIS SS, Eccleshall TR, Gross C, Dawson-Hughes B, Feldman D: The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *J Bone Miner Res.* 1997, 12: 1043–1048.

HAUSSLER MR, G.K. Whitfield ve C.A. Haussler vd. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed, *J Bone Miner Res.* 13 (1998) (3), pp. 325–349.

HAUSSLER MR, Whitfield GK, Haussler CA et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 325–49.

HENRY HL, Dutta C, Cunningham N, Blanchard R, Penny R, Tang C, Marchetto G, Chou SY. The cellular and molecular regulation of 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> production. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992; 41(3-8):401-7.

HESS B, Tiselius HG. Physical-chemical processes in kidney stone formation. In: Coe FL, Favus MJ, eds. *Disorders of Bone and Mineral Metabolism* (second edition). Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, PA: 2002; 619-628.

HOENDEROP JG, Muller D, Van Der Kemp AW vd.. Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001; 12: 1342–1349.

HOLÍCK MF, J.E. Frommer, S.C. Mcneill, N.M. Richtand, J.W. Henley and J.T. Potts, Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to pre-vitamin-D<sub>3</sub> in skin, *Biochem Biophys Res Commun* 76 (1977) (1), pp. 107–114.

HOLMES RP, Goodman HD, Assimos DG. The distribution of urinary calcium excretion in individuals on controlled diets. *J. Urol.* 1995; 153:350.

HUANG, M.C., Seyer, J.M., Thompson, J.P., Spinella, D.G., Cheah, K.S., Kang, A.H. Genomic organization of the human procollagenalpha 1(II) collagen gene. *Eur. J. Biochem.* 195,1991, 593– 600.

HUSTMYER FG, Peacock M, Hui S, Johnston CC, Christian J. Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 1994, 94: 2130–2134.



INGLES, S.A., Haile, R.W., Henderson, B.E., Kolonel, L.N., Nakaichi, G., Shi, C.Y., Yu, M.C., Ross, R.K., Coetzee, G.A. Strength of linkage disequilibrium between two vitamin D receptor markers in five ethnic groups: implications for association studies. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 6,1997, 93– 98.

ITAMI N, Yasoshima K, Akutsu Y, Nonomura K. Spot urine screening for primary hyperoxaluria. *Nephron.* 1990. 56:337-338.

ITO H, Coe FL. Acidic peptide and polyribonucleotide crystal growth inhibitors in human urine. *Am. J. Physiol.* 1977; 233:455-463.

JORDAN WR, Finlayson B, Luxenburg M. Kinetics of early time calcium oxalate nephrolithiasis. *Invest. Urol.* 1978; 15:465-468.

JURUTKA, P.W., Remus, L.S., Whitfield, G.K., Thompson, P.D., Hsieh, J.C., Zitzer, H., Tavakkoli, P., Galligan, M.A., Dang, H.T., Haussler, C.A., Haussler, M.R. The polymorphic N terminus in human vitamin D receptor isoforms influences transcriptional activity by modulating interaction with transcription factor IIB. *Mol. Endocrinol.* 14,2000, 401– 420.

KHAN SR, Shevock PN, Hackett RL. In vitro precipitation of calcium oxalate in the presence of whole matrix or lipid components of the urinary stones. *J. Urol.* 1988; 139:418-422.

KOK DJ, Papapoulos SE, Bijvoet OL. Crystal agglomeration is a major element in calcium oxalate urinary stone formation. *Kidney Int.* 1990; 37:51-56.

KUMAR Bid H, Chaudhary H, Mittal RD. Association of Vitamin D and calcitonin receptor gene polymorphism in paediatric nephrolithiasis. *Pediatr Nephrol.* 20: 773-776, 2005.

KUMAR S, Sigmon D, Miller T, vd. A new model of nephrolithiasis involving tubular dysfunction/injury. *J. Urol.* 1991; 146:1384-1389.

L.A. Crofts, M.S. Hancock, N.A. Morrison, J.A. Eisman, Multiple promoters direct the tissue-specific expression of novel N-terminal variant human Vitamin D receptor gene transcripts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 10529–10534.

Labuda, M., Fujiwara, T.M., Ross, M.V., Morgan, K., Garcia-Heras, J., Ledbetter, D.H., Hughes, M.R., Glorieux, F.H. Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13– 14. *J. Bone Miner. Res.* 7, 1992, 1447– 1453.

LINDBERG JS, Sprague SM. Nephrolithiasis. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. *Endocrinology*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company, 2001; 1169–80.

MALEK RS ve Boyce WH. Intranephronic calculosis: Its significance and relationship to matrix in nephrolithiasis. *J. Urol.* 1973; 109:551-555.

MALEK RS ve Boyce WH. Observations on the ultrastructure and genesis of urinary calculi. *J. Urol.* 1977; 17:336-341.

MALL JC, Collins PA, Lyon ES. Matrix calculi. *Br. J. Radiol.* 1975; 48:807-810.

Menon M ve Mahle CJ. Oxalate metabolism and renal calculi. *J. Urol.* 1982; 127:148-151.

MENON M, Koul H. Clinical review 32: Calcium oxalate nephrolithiasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992; 74:703-707.

MEYER JL. Nucleation kinetics in the calcium oxalate-sodium urate mono-hydrate system. *Invest Urol* 1981; 19:197-201.

MIYAMOTO K.-I. , Kesterson R.A., Yamamoto H., Taketan Y., Nishiwaki E., Tatsumi S., . Inoue Y., Morita K., Takeda E., Pike J.W. Structural organization of the human Vitamin D receptor chromosomal gene and its promotor, *Mol. Endocrinol.* 11 (1997)

MORRISON NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994, 367: 284–287.

MORRISON, N.A., Qi, J.C., Tokita, A., Kelly, P.J., Crofts, L., Nguyen, T.V., Sambrook, P.N., Eisman, J.A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367,1994, 284– 287.

MOSSETTI G, Rendina D, Viceconti R, Manno G, Guadagno V, Strazzullo P, Nunziata V. The relationship of 3' vitamin D receptor haplotypes to urinary supersaturation of calcium oxalate salts and to age at onset and familial prevalence of nephrolithiasis. *Nephrol Dial Transplant* 19: 2259–2265, 2004.

NISHIJIMA S, Sugaya K, Naito A, Morozumi M, Hatano T, Ogawa Y. Association of VDR polymorphism with urolithiasis. *J Urol.* 2002, 167(5): 2188-91

NUNZIATA V, Di Giovanni G, Giannattasio R, Lettera AM, Mancini M. Recurrent kidney stones: causes and diagnostic criteria in patients from Campania (Southern Italy). *Br J Urol.* 1991; 68: 125–31.

OKANO T, M. Yasumura, K. Mizuno and T. Kobayashi, Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin-D3 in rat skins, *J Nutr Sci Vitaminol* 23 (1977) (2), pp. 165–168.

ÖZKAYA O, Söylemezoğlu O, Mısırlıoğlu M, Göenn S, Buyan N, Hasanoğlu E. Polymorphisms in the Vitamin D receptor gene and the risk of Calcium nephrolithiasis in children. *Eur Urol* 44: 150-154, 2003.

PAK CY, Oata M, Lawrence EC, Snyder W. The hypercalciurias. Causes, parathyroid functions, and diagnostic criteria. *J. Clin. Invest.* 1974; 54:387-400.

PAK CY. Hypercalciuric calcium nephrolithiasis. In Resnick MI, Pak CY (eds). *Urolithiasis: A Medical and Surgical Reference*. Philadelphia, WB Saunders, 1990, pp 79-88.

PAK CYC. Kidney stones. pathogenesis, diagnosis and therapy. In: Avioli LV, Krane SM, eds. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. San Diego, CA. Academic Press, 1998; 739–58.

PEACOCK M: Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: A contrasting view. *J Bone Miner Res* 1995, 10: 1294–1297.

RAHMAN MA, Rahman B, Perveen S: Studies on serum mucoproteins in patients with urinary calculi. *Biomed. Pharmacother* 1986, 40:311-313.

RAISZ LG, Trummel CL, Simmons H. Induction of bone resorption in tissue culture: Prolonged response after brief exposure to parathyroid hormone or 25-hydroxycholecalciferol. *Endocrinology*. 1972 Mar;90(3):744-51.

RUDMAN D, Kutner MH, Red SC II, Waters WC IV, Gerron GG, Bleier J. Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 55: 1052–1057.

RUDMAN D, Kutner MH, Red SC II, Waters WC IV, Gerron GG, Bleier J. Hypocitraturia in calcium nephrolithiasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; 55: 1052–1057.

RUGGIERO M, Pacini S, Amato M, Aterini S, Chiarugi V. Association between Vitamin D receptor gene polymorphism and nephrolithiasis. *Miner Electrolyte Metab* 25: 185-190, 1999.

SAIJO, T., Naito, E., Ito, M., Takeda, E., Hashimoto, T., Kuroda, Y. Therapeutic effect of sodium dichloroacetate on visual and auditory hallucinations in a patient with MELAS. *Neuropediatrics* 22, 1991,166–167.

SALAMONE LM, Ferrell R, Black DM, Palermo L, Epstein RS, Petro N, Steadman NKLH, Cauley JA: The association between vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density at the spine, hip and whole-body in premenopausal women. *Osteoporos Int* 1996, 6: 63–68.

SCOTT P, Ouimet D, Valiquette L et al. Suggestive evidence for a susceptibility gene near the vitamin D receptor locus in idiopathic calcium stone formation. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 1007–13.

SHIRAGA H, Min W, VanDusen WJ, vd. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: Another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci .USA* 1992; 89:426-430.

SIMPSON DP. Citrate excretion. A window on renal metabolism. *Am J Physiol* 1983; 244: F223–F234.

SMITH LH: Hyperoxaluric states. In Coe FL, Favus MI (eds): *Disorders of Bone and Mineral Metabolism*. New York, Raven Press, 1992, pp 707-728.

SÖYLEMEZOĞLU O., Özkaya O., Gönen S., Mısırlıoğlu M, Kalman S, Buyan N. Vitamin D receptor gene polymorphism in hypercalciuric children. *Pediatr Nephrol.* 19: 724-727, 2004.

SPECTOR TD, Keen RW, Arden NK, Morrison NA, Major PJ, Nguyen TV, Kelly PJ, Baker JR, Sambrook PN, Lanchbury JS. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mineral density in postmenopausal women: A twin study in Britain. *Br Med J.* 1995, 310: 1357–1360.

STURZENBECKER, L., Scardaville, B., Kratzeisen, C., Katz, M., Abarzua, P., McLane, J. Isolation and analysis of cDNA encoding a naturally occurring truncated form of the human vitamin D receptor. In: Bouillon, R., Norman, A., Thomasset, M. (Eds.), *Vitamin D: A Pluripotent Steroid Hormone: Structural Studies, Molecular Endocrinology and Clinical Applications.* Walter de Gruyter, Berlin, 1994, pp. 253–257.

SUTTON R ve Walker V. Bone resorption and hypercalciuria in calcium stone formers. *Metabolism* 1986, 35: 485–488.

TAKAHASHI, E., Hori, T., Sutherland, G.R. Mapping of the human type II collagen gene (COL2A1) proximal to fra(12) (q13.1) by nonisotopic in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 54, 1990, 84–85.

TAYMANS, S.E., Pack, S., Pak, E., Orban, Z., Barsony, J., Zhuang, Z., Stratakis, C.A. The human vitamin D receptor gene (VDR) is localized to region 12cen– q12 by fluorescent in situ hybridization and radiation hybrid mapping: genetic and physical VDR map. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1999, 1163–1166.

TOKITA A, Matsumoto H, Morrison NA, Tawa T, Miura Y, Fukamauchi K, et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1996;11: 1003–9.

TORRES A, Machado M, Conception MT, Martin Lorenzo V, Hernandez D, Rodriguez AP, et al. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mass changes after renal transplantation. *Kidney Int* 1996;50:1726–33.

UITTERLINDEN André G., Yue Fang, Joyce B.J. van Meurs, Hans van Leeuwen, Huibert A.P. Pols Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2004a, 89–90 187–193.

UITTERLINDEN Andre' G., Yue Fang, Joyce B.J. van Meurs, Huibert A.P. Pols, Johannes P.T.M. van Leeuwen Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene* 338 (2004b) 143–156.

UMEKAWA T, Kohri K, Amasaki N vd. Sequencing of a urinary stone protein, identical to alpha-one antitrypsin, which lacks 22 amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:1049-1053.

VAINDER M ve Kelly J. Renal tubular dysfunction secondary to jejunoileal bypass. *JAMA* 1976; 235:1257-1258.

VEZZOLI G, Soldati L, Provberbio MC, Adamo D, Rubinacci A, Bianchi G, Mora S. Polymorphism of vitamin D receptor gene start codon in patients with calcium kidney stones. *J Nephrol* 15: 158–164, 2002.

WALLACE MR, Mason K, Gray J. Urine oxalate and calcium in idiopathic renal stone formers. *NZ Med. J.* 1981; 94:87-89.

WELSHMAN SG, McGeown MG. The relationship of the urinary cations, calcium, magnesium, sodium and potassium, in patients with renal calculi. *Br J Urol* 1975; 47:237-242.

WHITFIELD GK, Hsieh JC, Jurutka PW, Selznick SH, Haussler CA, MacDonald PN, Haussler MR. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Nutr* 1995, 125: 1690S–1694S.

WHITFIELD, G.K., Remus, L.S., Jurutka, P.W., Zitzer, H., Oza, A.K., Dang, H.T., Haussler, C.A., Galligan, M.A., Thatcher, M.L., Encinas, D.C., Haussler, M.R. Functionally relevant polymorphisms in the human Nuclear vitamin D receptor gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 177, 2001, 145– 159.

WILLIAMS HE, Smith LH Jr. Primary hyperoxaluria. In Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS (eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 5th ed. New York, McGraw-Hill, 1983, pp 204-228.

WISHART JM, Horowitz M, Need AG, Scopacasa F, Morris HA, Clifton PM, Nordin BE: Relations between calcium intake, calcitriol, polymorphisms of the vitamin D receptor gene, and calcium absorption in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1997, 65:798–802.

YAMAMOTO, H., Miyamoto, K., Li, B., Taketani, Y., Kitano, M., Inoue, Y., Morita, K., Pike, J.W., Takeda, E. The caudal-related homeodomain protein Cdx-2 regulates vitamin D receptor gene expression in the small intestine. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1999, 240– 247.

YE, W.Z., Reis, A.F., Velho, G. Identification of a novel Tru9I polymorphism in the human vitamin D receptor gene. *J. Hum. Genet.* 45,2000, 56– 57.



ZERWEKH JE, Yu XP, Breslau NA, Manolagas S, Pak CY: Vitamin D receptor quantitation in human blood mononuclear cells in health and disease. *Mol Cell Endocrinol* 1993, 96: 1–6.

ZMUDA JM, Cauley JA, Danielson ME, Wolf RL, Ferrell RE. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone turnover, and rates of bone loss in older African-American women. *J Bone Miner Res.* 1997, 12: 1446–1452.

ZMUDA, J.M., Cauley, J.A., Ferrell, R.E. Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol. Rev.* 22, 2000, 203– 217.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Erzurum’ da doğan Ömer Onur Çakır orta ve lise öğrenimini Erzurum Anadolu Lisesi’nde tamamladı.

Yüksek Öğrenimini Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde gören Çakır, üniversite eğitimini fakülte onuncusu olarak 2001 yılında tamamladı.

İhtisasını TC Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Üroloji Kliniği’nde gördü. 2007 yılında ihtisasını tamamlayarak, ‘Kalsiyum Oksalat Taş Hastalığı’nın Serum Antioksidan Enzim Seviyeleri ile İlişkisi’ konulu tezi ile Üroloji Uzmanı unvanını aldı.

Ömer Onur Çakır Çakır halen Erzurum Numune Hastanesi’nde üroloji uzmanı olarak zorunlu hizmetini yerine getirmektedir.