

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI
OLAN KİŞİLERDE HEPATOCYTE GROWTH FACTOR GEN
POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hülya AKSOY**

**Uzmanlık Tezi
ERZURUM-2010**

TC
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI
OLAN KİŞİLERDE HEPATOCYTE GROWTH FACTOR GEN
POLİMORFİZMİNİN ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Hülya AKSOY**

**Uzmanlık Tezi
ERZURUM-2010**

**Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenen 107S273(SBAG-3766) nolu proje
kapsamında yapılmıştır.**

İÇİNDEKİLER	Sayfa
İçindekiler	I
Onay	III
Teşekkür	IV
Kısaltmalar	V
Özet	VI
Abstract	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Üriner Sistem Taş Hastalığı	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Taş Oluşum Teorileri	5
2.1.2.1 Süpersaturasyon-Kristalizasyon	5
2.1.2.2. İnhibitör Eksikliği	6
2.1.2.3. Matriks-Nükleasyon	8
2.1.2.4. Epitaksi	8
2.1.2.5. Kombine Teoriler	8
2.1.3. Yapılarına Göre Üriner Sistem Taşları	8
2.1.3.1. Kalsiyum Taşları	10
2.1.3.2. Strüvit Taşları	13
2.1.3.3. Ürik Asit Taşları	14
2.1.3.4. Sistin Taşları	14
2.1.4. Semptomlar	15
2.1.5. Tanı	15
2.1.6. Tedavi	15
2.1.7. Üriner Sistem Taş Hastalığının Moleküler Yönü	15
2.2. Hepatosit Büyüme Faktörü	18
2.2.1. HGF Sentezi, Aktivasyonu ve Hücre İçi Cevabı	19
2.2.2. HGF'nin Biyolojik Etkileri	21
2.2.3. HGF ve Kristal İnhibisyonu	22
2.2.4. HGF Gen Polimorfizmi	23
2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23

2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23
2.3.2. PCR Uygulama Alanları	25
2.3.3. Real Time-PCR	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Hasta Grubu ve Örnek Alınması	28
3.1.2. Kan ve İdrar Numunelerinin Alınması	28
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler	29
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar	30
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Deneylerin Yapılışı	31
3.2.1.1. DNA İzolasyonu	31
3.2.1.2. DNA Saflık Tayini ve Konsantrasyonunun Hesaplanması	31
3.2.1.3. HGF Gen Polimorfizm Analizi	32
3.2.1.4. HGF Serum Düzeyinin Ölçülmesi	36
3.2.1.5. İdrar Analitlerinin Ölçülmesi	36
3.3. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
7. KAYNAKLAR	49

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Kurulu' nun 27.04.2009/- tarih ve bila sayılı toplantısında; “Doğu Anadolu Bölgesinde Üriner Sistem Taş Hastalığı Olan Kişilerde Hepatocyte Growth Factor Gen Polimorfizminin Öneminin Araştırılması” başlıklı konunun Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK’e uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetiminin Prof. Dr. Hülya AKSOY tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu’nun 17.04.2009/3 tarih ve sayılı kararı ile ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Temel Tıp Bilimleri Bölümünün 29.04.2009/2.3 tarih ve sayılı kararı ile tez konusu olarak kabul edilmesine karar verildi.

TEŞEKKÜR

İhtisas tezi olarak sunduğum bu çalışmada ve ihtisas hayatım süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve karşılaştığım her türlü sorunda yardımını esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Hülya AKSOY'a, ihtisas eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Ebubekir BAKAN'a, Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Prof. Dr. Zuhale UMUDUM'a, Prof. Dr. M. Sait Keleş ve Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a,

Tez çalışmamda büyük yardımları olan Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yılmaz AKSOY'a, Arş. Gör. Dr. Hasan Rıza AYDIN'a ve hemşire Emel Şenol 'a,

Bölüm teknisyenlerimiz Ercan DEMİR ve Saadettin YILDIRIM ile tüm Aziziye Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına,

İhtisas eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen ve arkadaşlıkları için Arş. Gör. Dr. Vefa YANMAZ'a, Arş. Gör. Dr. Canan YİĞİT'e, Arş. Gör. Nezahat KURT'a, Arş. Gör. Dr. Muhammed ÇELİK'e, Uzm. Dr. Hamdullah TURHAN'a, Arş. Gör. H. Hamit ALP'e, Arş. Gör. Akar KARAKOÇ'a, , Arş. Gör. Dr. İbrahim KAPLAN'a, Arş. Gör. Dr. Çağlar BULUT'a, Arş. Gör. Dr. Fatih KARA'ya, Arş. Gör. Dr. Zafer BAYRAKTUTAN'a, Arş. Gör. Dr. H. İbrahim YILMAZ'a, Arş. Gör. Betül KOÇAK'a, Arş. Gör. Dr. Esra LALOĞLU'na ve diğer asistan, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma,

Bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarımıza,

İhtisas eğitimim ve tüm hayatım boyunca her türlü anlayışı ve desteği gösteren aileme ve eşim Gürkan ÖZTÜRK'e,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Çocuklarım Göktuğ ve Betül'e...

KISALTMALAR

HGF	: Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
COM	: Calcium Oxalate Monohydrate (Kalsiyum Oksalat Monohidrat)
Ksp	: Çözünürlük Çarpımı Sabiti
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
MGP	: Matriks Gla Protein
PH 1	: Primer Hiperoksalüri tip 1
PH 2	: Primer Hiperoksalüri tip 2
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RT-PCR	: Real Time-PCR

ÖZET

Üriner sistem taş hastalığı multifaktöriyel ve kompleks bir hastalıktır. Hastalığın gelişmesinde çevresel ve genetik faktörler rol oynamaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, ‘hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor, HGF)’nin antiapoptotik etkilerinin olduğu bu yüzden de kalsiyum oksalat monohidrat kristallerinin renal epiteliyal hücrelere adezyonunu azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, üriner sistem taş hastalığı olan kişilerde HGF gen polimorfizminin üriner sistem taş hastalığı ile muhtemel ilişkisini belirlemektir.

Aynı demografik özellikleri taşıyan toplam 104 üriner sistem taşı olgusu ve 68 sağlıklı gönüllülerde HGF intron 13 C>A ve 99 böbrek taşı olgusu ve 56 sağlıklı kişide intron 14 T>C polimorfizmleri real time-polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak ‘TaqMan allelik diskriminasyon yöntemi’ ile belirlendi. Ayrıca, her iki grupta serum HGF düzeylerinin ölçümü yapıldı. HGF intron 13 C>A ve intron 14 T>C bölgelerine ait genotiplerin dağılımı açısından iki grup arasında önemli bir farklılık gözlenmedi (sırasıyla $X^2=1.72$ df=2; $p=0.42$ ve $X^2=0.68$ df=2; $p=0.71$). Ayrıca taş hastalığı olan kişilerde serum ortalama HGF düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulundu (sırasıyla 1.05 ± 0.63 ng/mL ve 1.35 ± 0.58 ng/mL, $p<0.0001$). Taş hastaları ve sağlıklı kişiler allel dağılım sıklığı açısından karşılaştırıldığında HGF intron 13 ve intron 14 bölgesinde iki grup arasında istatistik olarak önemli bir farklılık bulunmadı (sırasıyla $p=0.43$ ve $p=0.44$).

Bu sonuçlara göre, HGF azalmasının gen polimorfizminden bağımsız olarak böbreklerde taş oluşumunda rolü olabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Üriner sistem taş hastalığı, Hepatosit Büyüme Faktörü, Polimorfizm.

ABSTRACT

Urolithiasis is a complex, multifactorial disorder. The environmental and genetic factors are important in development of the disease. In a recent study, it was demonstrated that hepatocyte growth factor (HGF) has an anti-apoptotic effect and thus can reduce the adhesion of calcium oxalate monohydrate crystals to renal epithelial cells. The aim of this study was to evaluate the possible association of HGF polymorphism with nephrolithiasis.

One-hundred and five patients with urolithiasis and 70 healthy volunteers with similar demographic features were included in the study. HGF intron 13 C>A (in 104 stone patients and 68 healthy subjects) and intron 14 T>C (in 99 stone patients and 56 healthy subjects) polymorphisms were determined using real time-polymerase chain reaction with TaqMan allelic discrimination method. Additionally, serum HGF levels were measured in two groups. There were no statistically significant differences in terms of HGF intron 13 C>A and intron 14 T>C polymorphisms between the control and patient groups ($X^2=1.71$ df=2; $p=0.42$, and $X^2=0.68$ df=2; $p=0.71$, respectively). Mean serum HGF concentration were significantly lower in the stone disease patients than in control subjects (1.05 ± 0.63 pg/mL and 1.35 ± 0.58 ng/mL respectively, $p<0.0001$). When the allele distribution frequency between stone patients and healthy subjects was compared, there were no significant differences in intron 13 and intron 14 allele distributions between two groups ($p=0.43$ and $p=0.44$, respectively).

It may be concluded from the findings that decrease in HGF levels has a role in renal stone formation independently from gene polymorphisms.

Key words: Urolithiasis, Hepatocyte Growth Factor, Polymorphism.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Üriner sistem taş hastalığı, üriner enfeksiyonlar ve prostat patolojilerinden sonra üriner sistemin üçüncü sıklıkta görülen hastalığıdır ve M.Ö. 4800 yıllarından beri bilinmektedir. 1940'lı yıllardan beri taş oluşumu ile ilgili çok sayıda araştırmalar yapılmıştır. Taş hastalığı günümüzde de sık görülür ve sık nüks eder. Taşın kimyasal ve strüktürel yapısı, bileşimi hakkında bilgiler sağlanmış, taşların kristaloid ve kolloid yapıları belirlenmiştir. Fakat etiyojisi bugün bile tam olarak aydınlatılamamıştır. Taş hastalığı tek bir nedenle değil, multipl, kompleks ve birbiri ile ilişkili birçok faktörün birlikte meydana getirdiği olaylar dizisidir (1).

Tüm taş tipleri için temel neden taşı oluşturan bileşenlerin idrardaki süpersaturasyonudur ve çözünürlük idrar volümü, pH'sı ve solüt atılımından etkilenmektedir. Kalsiyum taşları, en sık görülen taş tipi olup, en sık idiyopatik hiperkalsiüri olmak üzere çeşitli metabolik bozukluklar ile ilgilidirler.

Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor, HGF) ilk olarak matür karaciğer hücreleri için potent mitojen özellikli bir molekül olduğu belirlenmiş daha sonraları ise multifonksiyonlu bir polipeptit olarak tanımlanmıştır (2,3,4). HGF'nin birçok farklı hücre üzerine mitojenik, motojenik (hücre hareketinin artırılması), morfojenik, yayılma, dallanma, proliferasyon, anjiogenezis ve antiapoptozis gibi değişik biyolojik etkileri vardır. Fizyolojik olarak HGF'nin karaciğer, akciğer, mide, pankreas, kalp, nöronlar ve böbrek gibi çeşitli organlarda zedelenmeye karşı koruyucu fonksiyonu vardır. Bu nedenle akut zedelenme ve hastalık sonrası kan ve doku düzeylerinde artış görülür (5). HGF'nin biyolojik etkilerine reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi ve protoonkogen ürünü olan c-Met reseptörü aracılık eder (5,6). HGF ve reseptörü c-Met, böbreklerin gelişiminde ve adult böbreğinin ise yapı ve fonksiyonunun sürdürülmesinde önemli fonksiyonlar üstlenmiştir (5). Literatürde üriner sistem taş hastalığı ile ilgili olarak bir çalışmada deneysel olarak taş oluşturulan rat böbrek modelinde HGF' nin kristal-hücre etkileşiminde ve kristal oluşumunda rolünün olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışma sonunda HGF'nin oksalat ve kalsiyum oksalat monohidrat (COM) kristalleri ile meydana gelen hücre hasarını ve apoptozu inhibe ettiğini ve böylece COM kristallerinin böbrek tubulus hücrelerine adezyonunu engellediğini göstermişlerdir (7).

Üriner sistem taş hastalığı ve özellikle de kalsiyum taşı Türkiye’de endemik olarak bulunmaktadır (8). İdiyopatik kalsiyum taş hastalığında aile hikâyesinin önemli olduğu açık olarak gösterilmiştir, fakat bunun genetiği hakkında bilgiler sınırlıdır. Osteopontin, Fetuin-A ve Matriks Gla protein (MGP) gibi bazı kalsifikasyon inhibitörü olan proteinlerin gen polimorfizminin üriner sistem taş hastalığında önemli olabileceği gösterilmiştir (9,10). Ancak literatürde HGF gen polimorfizminin taş hastalarında herhangi bir rolünün olup olmadığına ilişkin bir yayın bulunamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada üriner sistem taş hastalığı olan kişilerde, HGF gen polimorfizminin herhangi bir öneminin olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Üriner Sistem Taş Hastalığı

2.1. 1. Epidemiyoloji

Üriner sistem taş hastalığı; genetik yatkınlık, metabolik değişiklikler, anatomik, enfeksiyöz, besinsel ve çevresel faktörler gibi farklı nedenlerle ortaya çıkabilmektedir ve son yüzyılda prevalansı artmaktadır (11). Global sosyoekonomik durumlar ve bunu takip eden beslenme alışkanlıklardaki değişiklikler taş hastalığının sadece insidansını değil aynı zamanda lokalizasyonunu ve kimyasal yapısını da etkilemektedir (12). Renoüreteral taşlar daha çok erişkin yaşlarda ve ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde görülür ve genelde kalsiyum oksalat ve fosfattan oluşur. Prevalansı %4-20 arasında değişir. Mesane taşları ise daha çok Asya ülkelerinde yaygındır ve amonyum ürat ve kalsiyum oksalattan oluşur. Yirminci yüzyılın başlarında Avrupa’da nispeten sık görülen mesane taşlarının insidansında geçen yüzyılla birlikte bir azalma olmuş ve bu taşlar yerini renoüreteral taşlara bırakmıştır. Bu durum “taş dalgası” olarak isimlendirilir ve sosyal durumlar ve yeme alışkanlıklarındaki değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (13).

Güneydoğu Asya, Türkiye, Hindistan, Güney Amerika, Ortadoğu ve Doğu Avrupa’da mesane taşları hala endemik olup, bu bölgeler dünyanın taş zonu olarak isimlendirilir (14). Son zamanlardaki çalışmalarda, Türkiye’de yaşam standartlarındaki artma ile orantılı olarak mesane taşı insidansında düşüş ile beraber mesane taşlarının yerini üst üriner sistem taşlarına bıraktığı bildirilmiştir (8).

Üriner sistem taş hastalığı 30-60 yaşları arasında sık görülür. Semptomatik taş oluşum prevalansı erkeklerde %10, bayanlarda %5’tir (15). Hastalık erkeklerde kadınlardan 2-3 kat daha fazla görülmektedir (16). Kadın ve erkek arasındaki oransal farklar değişik çalışmalarda farklı olarak bildirilmiş olup son yıllarda taş prevalansının, her iki cinstede arttığı bildirilmiştir (17). İleri yaşlarda kadınlardaki prevalansın artışından obezite ve özellikle de bel çevresi artışı sorumlu tutulmuştur (15). Taş hastalığı özellikle kadınlarda artmış hipertansiyon riski ile beraberdir ancak bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir (18).

Kalsiyum taşları renal taşların yaklaşık %75’ini oluştururken %25’ini ise ürik asit, struvit ya da sistin taşları oluşturur (19). Radyolüsen ve enfeksiyon taşları çevresel

faktörlerden daha az etkilenirken kalsiyum taşları çevresel faktörler ve özellikle diyet ve yaşam tarzından büyük oranda etkilenmektedir. Kalsiyum oksalat taşlarının patogeneğinde, diyetle alınan yüksek oranda protein, rafine karbonhidrat ve sodyumun rolü bilinirken besinlerle alınan kalsiyum ve oksalatın rolü açık değildir (13).

Kalsiyum taş oluşumu için genetik yatkınlık ta kritik rol oynamaktadır. Genetik aktarımın rolü özellikle Dent hastalığı, sistünüri ve primer hiperoksalüri gibi monogenik hastalıklarda açık olarak gösterilmiştir (19,20). İdiyopatik kalsiyum taş hastalığı için ise aile hikâyesinin önemi açıkca ispat edilmiş olmasada alta yatan metabolik değişiklikler ve diğer genetik geçiş mekanizmaları hakkında sınırlı miktarda bilgi mevcuttur (11).

Taş oluşan hastaların %67'sinde 1-8 yıl içerisinde tek veya mükerrer nüklere rastlanır. Nüks eden vakalar idiyopatik kalsiyum taşları ve ürik asit taşlarıdır. Medikal tedavi görmemiş kalsiyum oksalat taşının nüks oranı bir yılda %10, beş yılda %35 ve on yılda ise %50 olarak bildirilmiştir (21).

Çocuklarda taş hastalığı görülme sıklığı erişkinler kadar iyi tanımlanmamıştır. Türkiyede endemik olarak görülen taş hastalarının %17'si 14 yaşın altındadır (22). Çocuklarda taş hastalığının insidansının daha düşük olmasının nedeni olarak, idrar magnezyum, sitrat ve fosfor miktarının ve kalsiyum oksalat kristal inhibitörlerinin çocuklarda erişkinlerden daha fazla olması gösterilmiştir (23). Yine Miyake ve ark. (24) pediatrik yaş grubunda idrar makromoleküllerinin, kalsiyum oksalat kristal agregasyonunu ve renal tübüler epitel hücrelerine adezyonunu daha güçlü inhibe ettiğini göstermişlerdir. Primer ve rekürren pediatrik taş oluşumlarının önemli bir yüzdesinde metabolik anormallikler tespit edilmektedir. (25).

Taş hastalığı ile hava sıcaklığı arasındaki ilişki eskiden beri bilinmektedir ve yaz aylarında taş hastalığı görülme sıklığındaki bir artış olduğu ve bu artışın muhtemel sebebi olarak da yetersiz sıvı alımı ve düşük idrar çıkışı olabileceği bildirilmiştir (26).

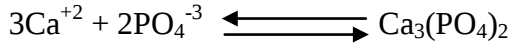
Teorik olarak fazla miktarda sıvı alımı, taş oluşturan bileşenlerin idrar konsantrasyonlarını düşürerek taş oluşumunu inhibe edebilmektedir. Bu nedenle üriner sistem taş hastalarında enfeksiyon ve obstrüksiyonun ortadan kaldırılmasında daha fazla oranda sıvı tüketimi tavsiye edilmektedir. Diğer yandan taş inhibitörlerinin de idrar konsantrasyonlarının dilüe olmasına sebep olabilmektedir. Bununla beraber yapılan bir çalışmada in vivo olarak idrarın dilüsyonu, taş oluşturan bileşenlerin (kalsiyum, oksalat,

fosfor ve ürik asit) ve inhibitörlerin (magnezyum, sitrat) idrarla atılımını veya idrar pH'sını önemli derecede değiştirmedeği belirlenmiştir (27).

2.1.2. Taş Oluşum Teorileri

2.1.2.1. Süpersaturasyon-Kristalizasyon

Belirli bir pH ve sıcaklıktaki suya, kristalize olabilen bir element ilave edildiğinde solüsyon halinde kalır ve element konsantrasyonu artırılınca belirli bir seviyeden sonra eriyik halde kalamaz. Doymuş haldeki madde kristalize olmaya başlar. Taşların oluşumu ve büyümesi için kristallerin böbrek içerisinde oluşması ve orada kalması gerekir. Kristallerin oluşabilmesi için idrarın ilgili taş maddesi ile süpersatüre olması gerekir. Çözünürlük çarpımı sabiti (K_{sp}) çözünürlüğü az olan iyonların saturasyon noktasını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. K_{sp} ; az çözünen bir tuzun doymuş çözeltisinde sıcaklık sabit iken, tuzu oluşturan iyonların molar konsantrasyonlarının çarpımına eşittir. Taş tuzlarının süpersaturasyonu ise idrardaki konsantrasyonun, çözünürlüğüne olan oranı olarak tanımlanır ve 1 üzerindeki her oran o maddenin süpersaturasyonunu ifade eder (17,28,29). Kalsiyum fosfat ($Ca_3(PO_4)_2$) suda çözünmez ve denge reaksiyonu ve K_{sp} 'si aşağıdaki gibidir:



$$K_{sp} = [Ca^{+2}]^3 [PO_4^{-3}]^2$$

$[Ca^{+2}]^3 \times [PO_4^{-3}]^2$ çarpımı K_{sp} yi geçerse çökme başlamaktadır.

İdrar birçok yüklü iyonların karışımından oluşmaktadır ve bu iyonlar çekme ve itmelere sebep olduğundan moleküllerin çözünmesini kolaylaştırır. Bu nedenle de idrar daha fazla molekülü solüsyon halinde tutabilme özelliğine sahiptir. Ancak idrarda bulunan kristalize olabilen moleküllerin konsantrasyonu çok artırılırsa çözünür halde kalamaz ve kristal nüveleri oluşmaya başlar (1,28). Eğer benzer iyonlar kristaller oluşturmak üzere birleşirse bu nüvelenmeye 'homojen nüveleşme' denirken, bir kristalin başka bir tür kristalin etrafında oluşması 'heterojen nüveleşme' olarak isimlendirilir. Ölü epitelyal hücreler, hücre membranları ve diğer materyaller etrafında da heterojen nüveleşme meydana gelebilir (1,28).

Dinamik bir süreç olan kristal oluşumu, kristal büyümesi, agregasyonu, disagregasyonu ve kristallerin çözünmesi, idrarın fizikokimyasal durumundaki günlük

değişimlere eşlik eder. Taş oluşumu veya kristalizasyonun oluşması için devamlı ya da aralıklı idrar süpersaturasyonu meydana gelmelidir. Süpersaturasyon sıvı alımı ve idrar akım hızından etkilendiğinden artmış sıvı alımının indüklediği yüksek idrar akım hızı idrar süpersaturasyonunu azaltır (28,29).

Taşın komponentlerinin kimyasal serbest iyon aktivitesi yani saturasyonu, iyonun konsantrasyonundan olduğu kadar, idrar pH'sından (28) ve idrarda bulunan moleküllerin kompleks yapmasından da etkilenmektedir (30). İdrar pH'sı 6'nın üzerine çıktığında kalsiyum fosfat çözünürlüğünde azalma olurken, ürik asit çözünürlüğünde ise artma olmaktadır (17).

Khan ve ark. (31) kalsiyum ve ürik asit taşı olanların idrar örneklerinde sağlıklı kontrollere göre kolesterol, kolesterol esteri ve trigliserit içeriğinin fazla olduğunu, ayrıca kalsiyum oksalat taşı olanlarda asidik fosfolipitlerin daha fazla bulunduğunu bildirmişlerdir. Buna göre hücre membranı yıkım ürünlerinin kalsiyum oksalat nükleasyonu için uygun substrat olmasının yanında lipidlerin, kalsiyum taşlarının kristalizasyonunu hızlandırmasının söz konusu olabileceği vurgulanmıştır.

Taş oluşturan kişilerin idrarında kalsiyum oksalat süpersaturasyonunun daha belirgin olarak yüksek olduğu, ancak süpersaturasyonunun taş oluşumu için gerekli olsa da yeterli olmadığı tesbit edilmiştir (17). Bu da göstermektedir ki taş oluşumu, tek bir faktörden ziyade birçok faktörün bir araya gelmesi ile gerçekleşmektedir.

2.1.2.2. İnhibitör Eksikliği

Aynı miktarda ve yapıda kalsiyum, oksalat, ürik asit veya sistin içeren süpersatüre idrarı olan kişilerin hepsinde taş oluşmaması kristalizasyonu inhibe eden moleküllerin varlığını düşündürmüştür. Tselius ve ark. (32) taş oluşan kişilerin normal kişilere göre kristal agregasyon inhibisyonunun daha az olduğunu göstermişlerdir. Araştırmalar bu inhibitörlerin in vitro olarak; nükleasyon, kristallerin büyüme ve agregasyonunu önleyebildiği ve renal epitel hücrelerine tutunmasını azalttığını göstermiştir (33,34). Düşük molekül ağırlıklı organik (sitrat vb.), inorganik (pirofosfat vb.) moleküller ve çok değerli metalik katyonlar (magnezyum vb.) (21,35), ayrıca osteopontin, protrombin F1 fragman, inter- α -trypsin inhibitör molekül, bikunin, kalgranülin, Tamm-Horsfall glikoprotein gibi proteinler ile RNA ve DNA fragmanları, nefrokalsin ve glikozaminoglikanlar idrar kristalizasyon inhibitörleri olarak tanımlanmışlardır

(28,29,36-38). Bu moleküllerin genelde kalsiyum atomlarına bağlanabilen ve kristal büyümesini önleyen uzun polianyonik zincirleri vardır (29). Yapılan çalışmalarda taş hastalarında bu inhibitör moleküllerde defekt veya varyasyon ve konsantrasyonlarında bir azalma olabileceği bildirilmiştir (29,37,38).

Böbrek tübüllerinde veya toplayıcı kanallarda oluşan birçok kristalin bir araya gelmesi, ürotelyuma tutunması, idrar tarafından temizlenememesi ve toplayıcı kanallarda tıkanıklık olması gibi olaylar sonucunda taş oluşur. Ayrıca idrar akımını engelleyen medüller sünger böbrek, üretero-pelvik bileşkede darlık, tübüler epitelyum kalınlığında artma gibi anatomik anormalliklerin ve üriner sistemi etkileyen idrar yolu enfeksiyonlarının varlığı ve renal hücresel fonksiyon bozukluğu sonucu artmış kalsiyum ve oksalat Emilimi de kristalizasyona sebep olur ve bu durum taş oluşumu ile sonuçlanabilir (21).

Aslında glomerüllerde filtratın oluşmasından idrarın mesaneye ulaşmasına kadar geçen sürede devamlı bir akım söz konusudur. Oluşan kristaller genellikle idrar yolundan atılır. Böyle bir ortamda taş oluşumu ve oluşan taşın büyümesi ile ilgili olarak iki kuram öne sürülmektedir. ‘Serbest Partikül Kuramı’na göre taş oluşumu için kristallerin renal tübülü tıkayıp akımı engellemeye yetecek bir boyutta agregre olmaları gerekmektedir. ‘Sabit Partikül Kuramı’nda ise oluşan kristallerin renal epitelyal hücrelere, papiller uca, kaliks duvarına veya idrar yolunda başka bir bölgeye tutunması söz konusudur (28,39,40). Renal tübüler epiteldeki hasar tutunmayı artırır. Toksinler, enfeksiyon veya kristaller hasar oluşumunu indükleyebilmektedir (41).

Son yıllarda kalsiyum oksalat kristalleri ile renal tübüler hücreler arasındaki etkileşimin taş oluşumunda önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Renal hücre hasar artışının renal epitel hücrelerine kristallerin tutunmasını hızlandığı birçok araştırmacı tarafından öne sürülmektedir (7,42,43). Taş hastalığında renal hücre hasarının mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte bazı çalışmalarda yüksek oksalat düzeylerinin hücre zedelenmesini artırarak COM kristallerinin renal tübüler hücrelere adezyonunu artırdığı gösterilmiştir (7,44). Hücre membranında lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen metabolitlerinin de hücre hasarına yol açtığı ve antioksidant tedavi ile üriner oksalat atılımının azaldığı belirlenmiştir (45,46). Ayrıca Tsujihata ve ark. (47) fibronektinin, hasarlı epitel dokusunu tamir ederek kristallerin tübüler epitel hücrelerine adezyonunu önlediğini bildirmişlerdir.

2.1.2.3. Matriks-Nükleasyon Teorisi

Üromukoidlerdeki sialik asidin ayrılması sonucu oluştuğu söylenen, %65 oranında heksozaminlerin oluşturduğu, proksimal tüp hücrelerinde yapılan matriksin, çekirdek görevi görmesi ve diğer kristallerin bu çekirdek etrafına tabakalar halinde yapışması esasına dayanan bir teoridir. Genellikle kalsiyum içeren taşların %3'ünü, ürik asit taşlarının %2'sini ve enfeksiyonun eşlik ettiği matriks taşlarının ise %65'ini oluşturmaktadır (1,28).

2.1.2.4. Epitaksi

Bir element kristalizasyon sürecinde çok fazla kristalize olursa idrarın kalan kısmında saturasyonunun azalması sonucu çekirdek büyüyemez. Ancak bir başka element kristalin yüzeyine yapışarak heterojen çekirdekleşme oluşur ki bu olaya 'Epitaksi' denir. Örneğin ürik asit kristalleri üzerine kalsiyum oksalat kolaylıkla epitaksi ile tutunabilmektedir (1,48).

2.1.2.5. Kombine Teoriler

Üriner sistemde taş oluşumu için yukarıdaki teorilerin hepsinin birlikte geçerli olduğu teoridir.

Taş oluşumu için bu teoriler ile birlikte bazı predispozan faktörler de vardır. Bunlar yukarıda da saydığımız gibi; idrar pH'sındaki değişiklikler, üriner enfeksiyonlar, konjenital anomaliler, ürostaz ile böbrekteki kalsifikasyonlar, üriner sistemdeki yabancı cisimler, üriner sisteme iştiraki olan fistüller, üriner sistem tümörleri ve nekrotik doku parçalarıdır. Bazı olgular ise, taş oluşum teorileri ya da bu nedenlerle açıklanamaz. Bunlara ise 'İdiopatik Taş Hastalığı'denir. Bu grupta en çok kalsiyum içeren taşlar bulunmaktadır.

2.1.3. Yapılarına Göre Üriner Sistem Taşları

Üriner sistem taşları içerdikleri elementlere, kimyasal yapılarına ve makroskopik görünümlerine göre değişik şekillerde isimlendirilmişlerdir (Tablo 2.1).

Taş oluşumunda yer alan moleküller:

İnorganik: Kalsiyum, oksalat, fosfat, sülfat, sodyum, magnezyum

Organik: Sistin, ürik asit, ksantin

Yetişkin taşlarının %65-70'i saf kalsiyum oksalat taşı (monohidrat veya dihidrat) olup kalsiyum oksalat-kalsiyum fosfat karışımı olan miks taşlarla beraber tüm üriner sistem taşlarının %80'ini kalsiyum taşları oluşturmaktadır. Taşların %10 kadarını magnezyum amonyum fosfat (strüvit), %9'unu ürik asit, %1 kadarını ise sistin veya amonyum ürat ya da ilaçlara bağlı taşlar oluşturmaktadır (29).

Tablo 2.1: Taşların Özel İsimleri ve Kimyasal Formülleri

Madde adı	Mineral adı	Formül
Oksalatlar		
Kalsiyum oksalat monohidrat	Whewellite	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Kalsiyum oksalat dihidrat	Weddelite	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Fosfatlar		
Hidroksiapatit	Hydroxiapatite	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
Karbonat-apatit	-	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3, \text{OH})_6(\text{OH})_2$
Kalsiyum hidrojen fosfat dihidrat	Brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Trikalsiyum fosfat	Whitlockite	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Mg amonyum fosfat	Struvite	$\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Ürik asitler		
Ürik asit	-	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$
Ürik asit dihidrat	-	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Üratlar		
Amonyum ürat	-	$\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{NH}_4$
Sodyum ürat monohidrat	-	$\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_3\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$

2.1.3.1. Kalsiyum Taşları

Günlük idrar kalsiyum atılımının 4 mg/kg veya erkeklerde 7 mmol'den, kadınlarda 6 mmol'den fazla olması veya 200 mg'dan fazla olması 'hiperkalsiüri' olarak tanımlanır (21,30). Kalsiyum taşı olan hastalarda, altta yatan metabolik durumlar sıklık sırasına göre hiperkalsiüri, hipositratüri, hiperürikozüri, hiperoksalüri olup, bu metabolik bozukluklar tablo 2. 2'de verilmiştir. Birçok hastada ise bu değişikliklere düşük idrar hacmi ve idrar pH değişiklikleri de eşlik etmektedir (49).

Hiperkalsiüri üç başlık altında incelenebilir:

1. Absorptif hiperkalsiüri: Barsaklardan kalsiyum absorpsiyonunun artması ile karakterizedir.
2. Rezorptif hiperkalsiüri: Primer hiperparatiroidizmle karakterize olup kemikten kalsiyum kaybı vardır.
3. Renal hiperkalsiüri: Renal tübüler kalsiyum reabsorpsiyon bozukluğu sonucu oluşan hiperkalsiüridir (17,50).

İdiopatik hiperkalsiüri ise normal serum kalsiyumu, normal ya da çok hafif düşmüş serum fosfor düzeylerinin bulunduğu, herhangi bir kemik hastalığını gösteren bulgunun olmadığı, primer hiperparatiroidizm, sarkoidoz, Cushing sendromu, bazı kanserler, aşırı vitamin D alımı, hipertiroidizm, glukokortikoid kullanımı, Paget hastalığı ve renal tübüler asidozis gibi diğer hiperkalsiüri sebeplerinin ekarte edildiği durumlardaki aşırı kalsiyum atılımı durumudur. Kalsiyum taşı olan erişkin ve çocukların %30-60'ında görülen en yaygın metabolik durumdur (51).

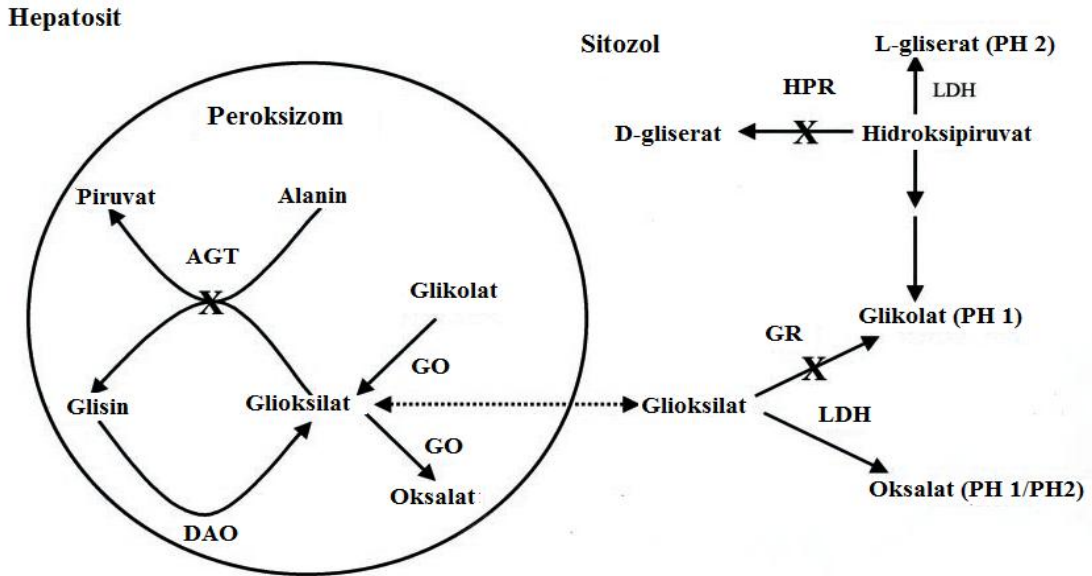
Tablo 2.2. Kalsiyum Taş Oluşumunun Başlıca Sebepleri - (17)'nolu kaynaktan alınmıştır.

Kalsiyum oksalat veya kalsiyum fosfat taşları	
Normokalsemi ile beraber hiperkalsiüri	
-İdiopatik hiperkalsiüri	
-Granulomatöz hastalıklar (Sarkoidoz gibi)	
Hiperkalsemi ile beraber hiperkalsiüri	
-Primer hiperparatiroidizm	
-Granulomatöz hastalıklar (Sarkoidoz gibi)	
-Vitamin D fazlalığı	
-Maligniteler (Nadir)	
-Hipertiroidizm	
Hipositratüri	
-Hipokalemiye sekonder	
-Metabolik asidozise sekonder	
-İdiopatik	
Primer olarak kalsiyum oksalat taşları	
Hiperoksalüri	
-Primer hiperoksalüri (Tip1, Tip2)	
-Enterik hiperoksalüri (İnce barsak rezeksiyonu, bariatrik cerrahi, yağ malabsorbsiyonu)	
-Diyeter hiperoksalüri (Kalsiyum alımının az olması ve aşırı vitamin C alımı)	
Hiperürikozüri	
-Myeloproliferatif hastalıklar,	
-Pürin içeriği zengin diyet	
Devamlı düşük idrar hacmi (Diyare)	
Primer olarak kalsiyum fosfat taşları	
Normokalsemi ve metabolik asidozis ile beraber hiperkalsiüri	
-Distal renal tubüler asidoz	

Hiperoksalüri günlük üriner oksalat atılımının 45 mg'dan fazla olması olarak tanımlanır (52) ve sebepleri tablo 2.2. de verilmiştir. Oksalat; glisin ve glioksilat yıkımının son ürünüdür. Primer hiperoksalüri tip 1 (PH 1) glioksilat metabolizmasındaki defekt sonucu oluşan otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Karaciğere spesifik peroksizomal, pridoksal fosfat bağımlı alanin glioksilat aminotransferaz (AGT) enziminin yokluğu veya düzeyinin düşük olması sonucu kan ve idrar oksalat düzeyi artar (53,54). Böbrek taşı, nefrokalsinozis ve böbrek yetmezliği

linik bulguları olup semptomlar erken yaşlarda görülür (17). Primer hiperoksalüri tip 2 (PH 2) ise daha az sıklıkta görülmesine rağmen, üriner sistemde daha çok taş oluşumu ile karakterize bir metabolik bozukluktur. PH 2, dokuzuncu kromozomda bulunan gliksilat redüktaz (GR)/hidroksipiruvat redüktaz (HPR) genindeki mutasyon sonucunda GR/HPR enzim aktivitesi olan sitozolik bir proteinin düzeylerinde ve aktivitelerinde azalma ve oksalat birikimi ile karakterizedir (şekil 2.1) (53).

Plazma oksalat konsantrasyonu 1-2.4 mg/mL olup, idrarla atılımı günlük 17.5-35.1 mg'dır (55). Hiperoksalüri, kalsiyum oksalat saturasyonunu ve taş oluşum riskini artırmaktadır. Ayrıca eksperimental çalışmalarda, oksalatın lipid peroksidasyonunu ve serbest oksijen radikallerini artırarak, böbrek tubül hücre zedelenmesine ve böylece kristallerin büyümesi ve tubül epiteline tutunmasına aracılık ettiği de gösterilmiştir (44,50).



Şekil 2.1. Oksalat Biyosentez Yolu

AGT: Alanin Gliksilat Aminotransferaz, PH 1: Primer Hiperoksalüri Tip 1, GR: Gliksilat Redüktaz, HPR: Hidroksipiruvat Redüktaz, PH 2: Primer Hiperoksalüri Tip 2. GO; Gliksilat Oksidaz, DAO; D-Amino Oksidaz, LDH; Laktat dehidrogenaz. – (53)'nolu kaynaktan alınmıştır.

Hiperürikozüri, günlük ürik asit atılımının 600 mg'dan daha fazla olması olarak tanımlanır. Kalsiyum taşı olan hastalarda, idrarla ürik asit atılımının artması genellikle fazla miktarda pürin alımının bir sonucudur. Hiperürikozürik kalsiyum taşı olan

hastaların, gut ve ürik asit taşı olan hastalardan farklı olarak idrar ürik asit düzeylerinin yanı sıra idrar pH'ları da artmıştır (17).

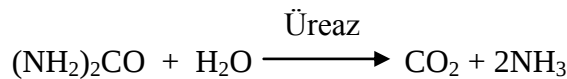
Monosodyum ürat idrarda bulunan taş inhibitörlerine bağlanarak kalsiyum oksalat kristalizasyonunu başlatabilmektedir (50,52).

Sitrat idrarda en fazla bulunan organik anyondur. Genel olarak meyvelerle alınmaktadır ve günde idrarla 116-926 mg (0.6-4.8 mmol) gibi geniş bir ranjda atılmaktadır (55). Hipositratüri, günlük sitrat atılımının 320 mg'dan daha az olması şeklinde tanımlanır. Kalsiyum taşı olan hastaların %20-60'ında hipositratüri risk faktörü olarak tanımlanmıştır. İdrarda bulunan sitrat, kalsiyum ile çözünebilir kompleksler oluşturarak taş oluşumunu inhibe etmektedir. İnhibisyon mekanizmalarından birincisi taş oluşumuna sebep olan kalsiyum tuzlarının saturasyonunu azaltması, ikincisi ise idrar pH'sını artırmak yolu ile kalsiyum fosfat presipitasyonunu azaltmasıdır (35,50).

2.1.3.2. Strüvit taşları

Magnezyum amonyum fosfat'dan oluşan strüvit taşları, üreaz enzimini bulunduran *Proteus*, *Providensiya*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* ve *Enterokoklar* 'la oluşan üriner sistem enfeksiyonlarında görülebilmektedir. Üreaz enzimi reaksiyonu, takip eden magnezyum amonyum fosfat ve karbonat apatit oluşumu aşağıdaki reaksiyonlarda görülmektedir (56):

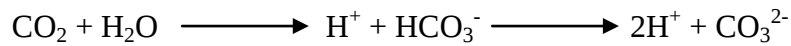
1. Üre $\longrightarrow$ Amonyak



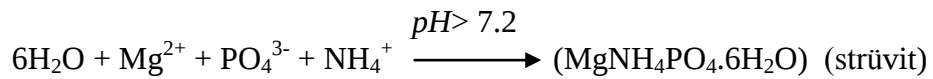
2. Amonyak $\longrightarrow$ Amonyum



3. Karbondioksit $\longrightarrow$ Asit oluşumu



4. Magnezyum amonyum fosfat oluşumu (strüvit)



5. Karbonat apatit oluşumu

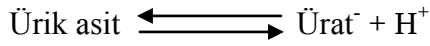


Mikroorganizmaların etrafında ve toplayıcı sistemde, kalikslerde ve pelviste strüvitle beraber kalsiyum karbonat presipitatları oluşur ve genellikle kalikslerin yapısına benzer şekilde böbreğin tüm toplayıcı sistemini dolduracak şekilde geyik boynuzu (staghorn) taşlar oluşur. Üriner sistem enfeksiyonları ile ilişkili olduğu için bu taş türü kadınlarda erkeklerden üç kat daha sık görülür (17,30,52).

2.1.3.3. Ürik Asit Taşları

Ürik asit taşları düşük idrar pH'sı, hiperürikozüri veya her ikisinin bir sonucu olarak oluşur. İdrar pH'sı 5.5'in altına düştüğünde çözünmeyen ürik asit presipitatları oluşur (35).

Ürik asit kristalizasyonunun belirleyicisi idrar pH'sıdır. Ürik asit zayıf asittir ve pKa'sı 5.5'dir (57).



Ürik asitin sulu çözeltilerde 37°C sıcaklıkta (Ksp)'si yaklaşık 90 mg/L (17) iken üratınki 20 kat daha fazladır. Bu nedenle ürat, ürik asitten daha fazla suda çözünür. pH'sı 5 olan idrarda ürat konsantrasyonu çok azdır (15 mg/dL). Oysa pH'sı 7 olan idrarda 150-200 mg/dL ürat bulunur. İdrarın alkalizasyonu daha fazla ürik asidin ürata dönüşümüne neden olur ve dolayısı ile çökeltme riskini azaltır.

Ürik asit taşları primer olarak gut hastalığında veya pürinden zengin diyetle beslenme durumunda görülürken, sekonder olarak da dışkı ile alkali kaybının asit idrara neden olduğu kronik diyare durumlarında ürik asit taşları görülür (30,51,52). Lesch-Nyhan sendromunda da benzer şekilde aşırı ürik asit üretimine bağlı olarak ürik asit taşları görülmektedir. Ürik asit taşları tüm taş hastalarının %5-10'unda görülürken diyabetik taş hastalarında bu oran %30-40'a kadar yükselmektedir (58). Bu olgularda insülin rezistansına sekonder olarak gelişen amonyum sentezindeki azalma, idrar pH'sını düşürerek ürik asit taşı oluşumunu artırmaktadır (17,59).

2.1.3.4. Sistin Taşları

Sistinüri nadir görülen otozomal resesif bir hastalık olup, dibazik amino asitler ve sistenin reabsorbsiyonunu sağlayan transport proteinlerindeki genetik defekt sonucunda idrarla artmış lizin, ornitin, arjinin ve sistenin atılımı sonucunda sistin taşları

oluşmaktadır. Sistinin çözünürlüğü alkali idrarda daha fazladır. Normalde idrarla günde 30 mg kadar sistin atılmaktadır, sistin taşı olan kişilerde ise bu miktar 400 mg veya daha fazladır. İdrar pH'sını yükselten ve sistin çözünürlüğünü artıran ajanlar bu hastalarda tedavi seçeneklerindendir (17).

2.1.4. Semptomlar

Kaliks veya renal pelvise yerleşmiş taşlar, kısmi obstrüksiyon yaparsa künt bir ağrıya, üreter ve toplayıcı sistemde tıkalı nitelikte ise kolik tarzında ağrıya neden olurlar. Hematüri, enfeksiyon, ateş, bulantı ve kusma üriner sistem taş hastalığında görülen diğer bulgulardır (1).

2.1.5. Tanı

Üriner sistem taş hastalığının tanısı fizik muayene, idrar analizleri ve kan biyokimyasını içeren laboratuvar testleri ile direkt üriner sistem grafisi, ultrasonografi, intravenöz pyelografi, nükleer radyoloji ve bilgisayarlı tomografi gibi radyolojik tetkiklerle konur (1).

2.1.6. Tedavi

Tedavinin planlanmasında taşın cinsi, lokalizasyonu, boyutları, tek ya da çok sayıda olması, üriner sistemin anatomik özellikleri, hastanın ek patolojileri, yaşı ve fiziksel aktivitesi gibi faktörler önemlidir. Tedavinin amacı akut dönemde ağrının giderilmesi ve taşların temizlenmesi, sonraki dönemde yeni taş oluşumunun veya var olan taşın büyümesinin önlenmesidir.

Medikal tedavi, endürolojik yöntemler, vücut dışından şok dalgaları ile taş kırma (ESWL, Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy), açık cerrahi ve profilaktik tedavi seçenekleri hasta için uygun zaman ve kombinasyonda kullanılmalıdır.

2.1.7. Üriner Sistem Taş Hastalığının Moleküler Yönü

Üriner sistem taş hastalığında genetik faktörlerin katkısının olduğunu düşündüren bulgular, bu konuda detaylı incelemelerin yapılmasına neden olmuştur. Bu yönde düşünceler üriner sistem taş hastalığının pozitif aile hikâyesi olanlarda daha sık olarak

görülmesiyle güçlenmiştir (60). Taş hastalığında herediter faktörlerin önemi bir çok çalışmada ortaya konulmuş olmasına rağmen spesifik gen henüz tanımlanamamıştır ve poligenik bir hastalık olduğu vurgulanmıştır (11). Bu konuda yapılan bir çalışmada, aynı bölgede yaşayan insanlar arasında taş hastalığı öyküsü olan ailelerde normal popülasyona göre hastalığın 3 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (61). Bu ailelerde taş hastalığının sık olarak görülmesinin nedeninin genetik faktörlere bağlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Genetik yatkınlıkla ilgili olarak yapılan detaylı çalışmalarda taş oluşum mekanizmalarıyla genler arasında bağlantılar kurulmaya çalışılmıştır. Yakın zamanda yapılmış çalışmalarda, oksalat ve kalsiyum oksalat kristallerinin renal tübüler hücrelerde tamir ve yeniden yapılanma gibi genlerin ekspresyonunu etkilediği belirlenmiştir (62,63). Bunun sonucunda kalsiyum oksalat kristallerinin tutunma, büyüme ve agregasyonu etkilenmektedir.

Multifonksiyonel glikozile fosfoprotein olan osteopontin; inflamasyonda ve hücre aracılı immün reaksiyonlarda, hem makrofajlarda hem de renal tubuler epitel hücrelerinde uyarılabilir nitrik oksit sentazın regülasyonunda, renal epitel hücrelerinin apoptozdan korunmasında ve makrofajların adezyon, migrasyon ve sitokin salınımının modülasyonunda rol oynayan bir moleküldür. Osteopontin proteininin taş matriksinde bulunduğu tesbit edildikten sonra taş oluşumunda nasıl bir fonksiyonunun olduğunun araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır (9,62,63). Osteopontin proteini, böbreklerde anormal kalsifikasyon inhibitörü olarak gösterilmiştir. Osteopontin üretiminin, oksalat ve kalsiyum oksalat kristallerine maruz kalan renal epitel hücrelerinden yanıt olarak arttığı tesbit edilmiştir (63). Yine osteopontin geninin bazı tek nükleotid polimorfizmlerinin (single nucleotide polymorphism, SNP) böbrek taşları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (9,62).

İnorganik pirofosfat (PPi) plazma ve idrarda bulunan ve kalsiyum fosfat kristallerinin yüzeyine bağlanarak kristal büyümesini inhibe eden bir moleküldür. Son yıllarda toplayıcı tübüllerde PPi taşıyıcısı olarak keşfedilen ANKH molekülünün geninde oluşan mutasyon sonucu, hipofosfatüri ve kalsiyum fosfat dihidrat çökmesi ile karakterize renal taş oluşumu tanımlanmıştır (64).

Üromodulin olarak da isimlendirilen Tamm-Horsfall proteini Henle kulpunun çıkan kolundaki tübüler hücreler tarafından sentezlenir ve hücre membranına fosfatidil inozitol vasıtası ile bağlanmış şekilde bulunur (64). Proteolitik yıkım ile idrara

çıkılmaktadır ve idrarda en fazla bulunan proteindir (36). Bu molekül oluşan kristallerin üriner epitel hücrelerine adezyonunu inhibe ederek taş oluşumunu engellemektedir. Hatta Tamm-Horsfall protein gen defekti olan farelerde üriner kalsiyum oksalat taşı oluşumunun arttığı gösterilmiştir (64).

MGP, lokal olarak kalsifikasyonu inhibe eden, aktivitesi için K vitaminine bağımlı γ -karboksilasyona uğrayan bir proteindir (36). Yapılan çalışmalarda MGP geninden yoksun ratlarda arter duvarlarında kalsifikasyon geliştiği ve zamanla bu damarların rüptüre olduğu bulunmuştur (65). Ayrıca serum MGP düzeylerindeki azalmanın koroner arter kalsifikasyonunun şiddetini artırdığı da gözlenmiştir (10,64).

Fetuin-A (α 2-Schmid Heremans glycoprotein) karaciğer tarafından sentezlenen bir glikoprotein olup, negatif bir akut faz reaktantıdır. Fetuin-A'nın önemli fonksiyonlarından birisi hidroksiapatit kristal oluşumu ve büyümesini engellemektir. Bu etkisi muhtemelen kalsiyum ve fosfat ile suda çözünür özellikte olan ve geçici kompleksler yapmasına bağlıdır (36). Fetuin-A geninden yoksun ratlarda yapılan çalışmalarda kalp, akciğer, deri ve böbrek gibi kemik dışındaki bazı dokularda kalsifikasyonların oluştuğu belirlenmiştir (66). Yaptığımız bir çalışmada fetuin A c.766C>G gen polimorfizminin dolaşımdaki fetuin A düzeylerini etkilediğini ve CG genotipine sahip olanların, CC genotipi taşıyanlara göre taş hastalığı için önemli derecede artmış riske sahip olduklarını gösterdik (67).

Hiperkalsiüri ile ilişkili diğer genler tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Hiperkalsiüri- Taş ile İlişkili Genler - (68)'nolu kaynaktan alınmıştır.

Gen	Gen ürünü/fonksiyonu	Renal tübüler ekspresyon bölgesi	Renal fenotip
VDR	Vitamin D reseptörü	DKT, TK	Kalsiyum reabsorbsiyonunda azalma, hiperkalsiüri, nefrokalsinozis, taş
CLCN5	Cl/H antiporter	PT, Çıkan kol, intermedier hücreler	Hiperkalsiüriye neden olan inaktif mutasyon, hiperfosfatüri, düşük moleküler ağırlıklı proteinüri, nefrokalsinozis, taş.
CASR	Kalsiyum duyarlı reseptör	PT, MTK, Çıkan kol, DKT	Taş oluşumuna neden olan mutasyon hiperkalsiüri, nefrokalsinozis, taş
CLDN16	Tight junksiyon proteini	Çıkan kol, DKT	Hiperkalsiüri, magnezyum kaybı, nefrokalsinozis,
NPT2a/c	Sodyum fosfat ko-transporter	PT	Hiperkalsiüri, hipofosfatemi, fosfat kaybı, nefrokalsinozis, taş
TRPV5	Kalsiyum selektif transient reseptör potansiyel kanal	DKT	Hiperkalsiüri, hiperfosfatüri
sAC	Çözünebilir adenilat siklaz	DKT, Çıkan kol, TK	Hiperkalsiüri, taş
KLOTHO	Yaşlanmayı baskılayıcı protein	DKT	Hiperkalsiüri

VDR:	Vitamin D reseptörünü kodlayan gen	NPT2a/c:	Sodyum fosfat ko-transporter proteinini kodlayan gen
CLCN5:	Klor/proton antiportör proteinini kodlayan gen	TRPV5:	Tubul hücre apikal kalsiyum kanal proteinini kodlayan gen,
CASR:	Kalsiyum duyarlı reseptör geni	sAC:	Bikarbonat sensörü çözünebilir adenilat siklazı kodlayan gen
CLDN16:	Kalsiyum ve magnezyum taşıyıcısı Claudin-16 membran proteinini kodlayan gen	KLOTHO:	Yaşlanmayı baskılayıcı proteini kodlayan gen
DKT:	Distal kıvrımlı tübül	TK:	Toplayıcı kanal
PT:	Proksimal tübül	MTK:	Medüller toplayıcı kanal

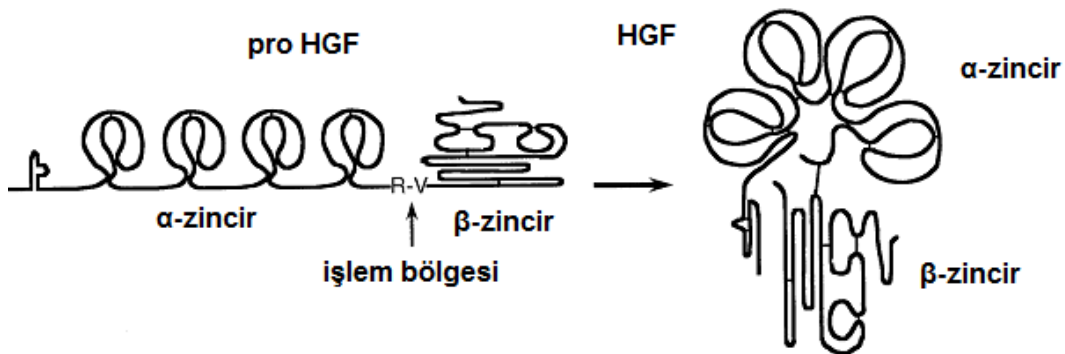
2.2. Hepatosit Büyüme Faktörü

Hepatosit büyüme faktörü, ilk olarak 1984 yılında hepatositlerde hepatosit proliferasyonunu uyaran bir mitojen olarak tanımlanmıştır. Ancak günümüzde çok fonksiyonlu bir sitokin olduğu anlaşılmıştır. Bu proteinin amino asit dizilimi 1989 yılında belirlenmiş ve HGF geninin, 7. kromozomda lokalize olduğu bulunmuştur. Sonraki süreçte 1991 yılında sıkı bir şekilde paketlenmiş memeli epitel hücrelerinin

dağılımına sebep olan ve daha önceden ‘scatter faktör (SF)’ olarak bilinen fibroblast kaynaklı faktörün HGF ile aynı protein olduğu tesbit edilmiştir. Bu yüzden bazı araştırmacılar molekülü HGF/SF olarak da göstermektedirler (2- 4,69).

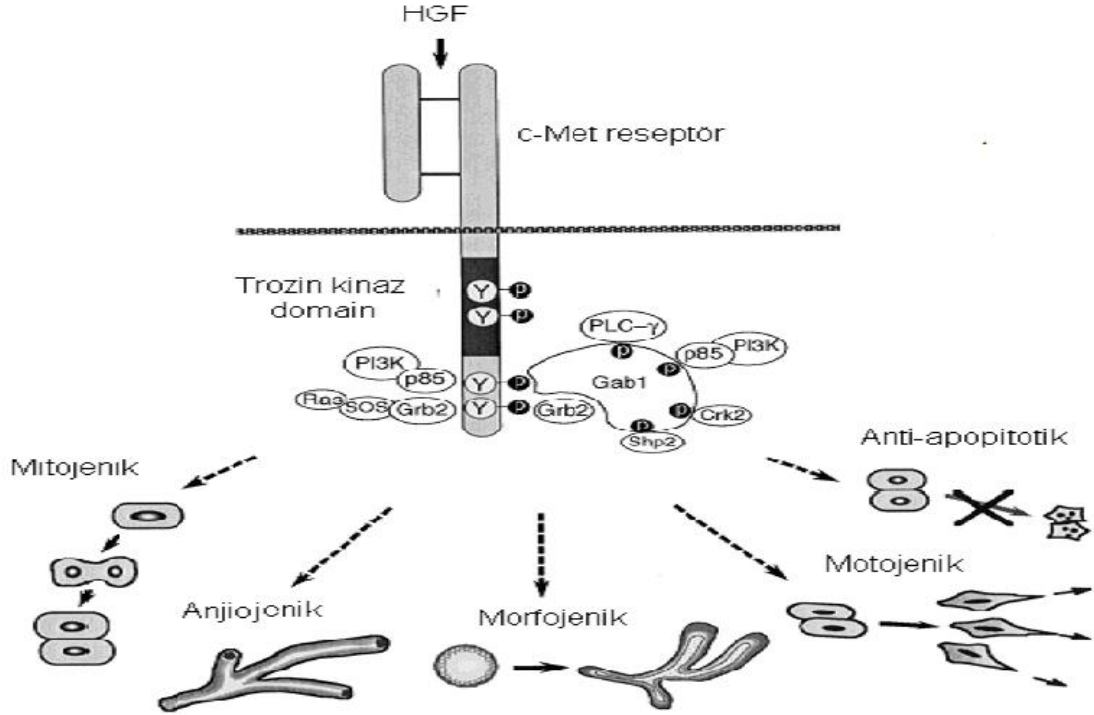
2.2.1. HGF Sentezi, Aktivasyonu ve Hücre İçi Cevabı

Hepatosit büyüme faktörü başta fibroblastlar olmak üzere pek çok mezenşimal kökenli hücre tarafından üretilmektedir. HGF geni, kromozom 7q11.2-q21 üzerinde bulunmaktadır. 18 ekson ve 17 introndan oluşmaktadır. Yaklaşık 70 kb uzunluğundaki bu dizinin translasyonu ile, 728 amino asit içeren yaklaşık 94 kDa ağırlığında, inaktif, büyük ve tek zincirli bir protein meydana gelir. Pro-HGF, spesifik serin proteaz olan HGF aktivatör (HGFA) proteini ile Arg⁴⁹⁴ Val⁴⁹⁵ arasından proteolitik kesim sonucunda iki zincirli heterodimer yapıya dönüşür (5,6,70,71). HGFA da HGF gibi karaciğer hücrelerinden inaktif halde sentezlenip salgılanır ve doku hasarı sonucu aktive olan trombin tarafından belli bölgelerinden proteolitik yıkıma uğramak suretiyle aktive olur (71). Aynı zamanda ürokinaz, plazminojen aktivatörü, doku plazminojen aktivatör gibi birçok faktörün HGF aktivasyonunda rolü olduğu gösterilmiştir (72). Matür HGF birbirine disülfür bağı ile bağlı, amino ucunda hairpin domain ve dört tane kringle domain içeren 69 kDa ağırlığındaki α zinciri ve serin proteaz benzeri domain içeren 34 kDa ağırlığındaki β zincirinden oluşur (Şekil 2.2) (4,5,73-76). HGF amino asit dizilimi plazminojenle %38 oranında homoloji göstermektedir (73). Yapay olarak bu hairpin domain veya birinci ve ikinci kringle domainin kesilmesi proteinin bütün fonksiyonlarının kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle bu domainler, muhtemelen HGF’nin biyolojik etkilerinden ve reseptöre bağlanmasından sorumludurlar (77).



Şekil 2.2. Pro-HGF ve HGF - (5)'nolu kaynaktan alınmıştır.

HGF'nin biyolojik etkilerine reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi ve protoonkogen ürünü olan c-Met reseptörü aracılık eder (5,6,73,78). HGF reseptörünün hepatosit, fibroblast, keratinosit, melanositler, böbrek, akciğer ve dalaktada bulunduğu gösterilmiştir (4).



Şekil 2.3. c-Met/HGF Reseptör Aracılı HGF'nin Biyolojik Aktivasyonu ve Hücre İçi İleti Yolağı - (5)'nolu kaynaktan alınmıştır.

c-Met reseptörü 1436 amino asitten oluşan tek zincir polipeptid olarak sentezlenir ve proteolitik yıkım ile hücre yüzeyinde aktif, heterodimer yapısı meydana gelir. N terminal α zinciri (50 kDa) membranın dış yüzünde lokalizedir. C terminal β zinciri (145 kDa) ise ekstramembran kısım, tek transmembran bölgesi ve sitoplazmik protein kinaz domaininden oluşur. Bu üniteler birbirlerine disülfür bağları ile bağlanmışlardır. HGF reseptörüne bağlandığı zaman ATP ve Mg^{2+} varlığında reseptörün sitoplazmik kısmındaki trozin rezidülerinde otofosforilasyona neden olur ve HGF sinyali hücre içine birçok farklı yolla iletilir (Şekil 2.3) (5,69,79-81) HGF-Met sinyali normal gelişim süresince anahtar rol oynar. Bunlar arasında kas öncül hücrelerinin ve motor nöronların migrasyonunu harekete geçirmesi sayılabilir (6,73,80,81).

2.2.2. HGF'nin Biyolojik Etkileri

Mezenşimal hücrelerden sekrete edilen HGF, epitelyal kaynaklı birçok farklı hücre üzerinde mitojenik, motojenik, morfojenik, yayılma, dallanma, proliferasyon ve antiapoptotik etki gibi birçok biyolojik aktivite gösterir. Bu biyolojik aktiviteler, doku yapılanmasının organizasyonunda, gelişim sürecinde ve rejenerasyonda önemlidir. Epitelyal hücrelerde tubüler yapıların oluşumu, endotelyal hücrelerde güçlü anjiogenik faktör, kemiğin yeniden yapılanması, osteoblast-osteoklast koordinasyonu ve eritroid kolonilerin stimülasyonu gibi fizyolojik olaylarda HGF rol oynamaktadır (5,81). Karaciğer, böbrek, akciğer, plesenta, diş ve meme bezleri gibi organ veya dokuların gelişmesi ve şekillenmesinde HGF'nin önemli rolünün olduğu gösterilmiştir. HGF karaciğer, akciğer ve mide gibi çeşitli organlarda zedelenmeye karşı koruyucu ve rejenerasyonda organotropik fonksiyonlara sahiptir. Bu nedenle akut zedelenme ve hastalık sonrası kan ve doku düzeylerinde artış görülmektedir. Böbrek, ovaryum ve testis dokularının gelişim sürecinde mezenşimden epitelyuma dönüşümde HGF rol oynamaktadır (5).

c-Met reseptörünün aşırı aktivasyonu tümör gelişimine neden olabilmektedir. Ayrıca birçok kanser hücresinde HGF ile motilite artışı, invazyon, metastaz ve tümör anjiogenezi arasında ilişkili olduğu bulunmuştur (4,5,80-83).

Son yıllarda böbrek hastalıklarında HGF'nin renotropik etkilerinin belirlenmesinde ilerlemeler kaydedilmiştir ve bu konuda kapsamlı çok sayıda derleme yayınlanmıştır. HGF'nin akut hasar sonrasında hücre ölümü ve hasarın önlenmesinde sitoprotektif ajan olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Normal böbrekten ekstrakte edilen HGF proteini, karaciğerden elde edilenden dört kat fazladır (6). HGF, renal epitelyal hücrelere ve primer kültürlerde proksimal tubül hücreleri üzerine mitogenik etki göstermektedir (69,81).

Laboratuar çalışmalarında özellikle tek taraflı nefrektomi yapıldıktan sonra kalan böbrekte büyümeye neden olan “renotropin” denilen bir protein varlığı tesbit edilmiştir (82). Ancak bu molekül tam olarak tanımlanamamışsa da HGF'nin renotropine en yakın molekül olduğu düşünülmektedir. HgCl_2 gibi renal toksinlerin verilmesi, renal iskemi, vitamin E eksikliği ve üreteral obstrüksiyon gibi farklı nedenlerle oluşan akut böbrek hasarında kanda ve böbrekte HGF mRNA ve protein düzeyleri yükselmektedir (69,84-86). Benzer şekilde akut böbrek yetmezliği olanlarda ve renal transplantasyon sonrası

akut renal rejeksiyon durumlarında hastaların HGF kan düzeyleri hızla yükselmektedir. Bu kompensatuar cevap tübüler hasarı önlemeye yönelik olup renal rejenerasyonu uyarmaktadır. Yine rekombinant HGF uygulanması yukarıda belirtilen sebeplere bağlı olarak oluşan böbrek hasarında renal rejenerasyonu uyarmaktadır (69). Bu sonuçlar HGF'nin renal büyüme ve rejenerasyonda "renotropin" için potansiyel bir aday olduğunu göstermektedir (82,84). Yine son zamanlarda eksperimental çalışmalarda azalmış HGF ekspresyonunun kronik renal yetmezlik ve fibrozis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve HGF alımı ile bu hastalığın önlenebileceği ileri sürülmüştür (82,87).

2.2.3. HGF ve Kristal İnhibisyonu

Hem hücre kültürlerinde hem de hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, yüksek düzeyde oksalat ve COM kristallerinin varlığında renal epitelyal hücrelerin hasara uğradığı ve bu hasarın apoptotik değişimleri başlattığı bildirilmiştir (42,44,88,89).

HGF, apoptozisi önleyici bir moleküldür. HGF'nin antiapoptotik etkilerine Bcl-2 protein ailesi aracılık eder. HGF fosfoinozitol 3-kinaz bağımlı yolda Akt kinaz enzimini aktive ederek proapoptotik olan Bad proteinini fosforiller. Bu proteinin fosforile hali inaktiftir. Ayrıca tübüler epitel hücrelerinde antiapoptotik özelliği olan Bcl-xl proteininin gen ekspresyonunu da artırmaktadır. Yukarıda bahsedilen iki yolla HGF apoptozisi inhibe etmektedir (5,6). HGF'nin oksalat ve COM kristalleri ile meydana gelen hücre hasarını ve apoptozisi inhibe ettiği ve böylece COM kristallerinin adezyonunu azalttığı düşünülmektedir. Yine çalışmalarda HGF gen transferinin taş oluşturan rat böbreklerinde kristal depozitlerini ve apoptotik hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir (7,44).

Hayvanlarda oluşturulan siroz modelinde parsiyel hepatektomi sonrasında HGF gen transferinin apoptozis üzerine etkileri incelenmiştir. HGF'nin karaciğer hücrelerinde Bcl-xl proteininin ekspresyonunu artırarak apoptozisi önlediği tesbit edilmiştir. Bu hayvanlarda parsiyel hepatektomi sonrası erken ve geç dönemlerde sağ kalımın arttığı gösterilmiş ve bu durum HGF nin etkisine bağlanmıştır. Hatta bu çalışmanın sonucunda siroz hastalarında karaciğer yetmezliğini önlemek için HGF gen tedavisinin etkili olabileceği ileri sürülmüştür (90).

2.2.4. HGF Gen Polimorfizmi

Polimorfizmler tabii olarak mevcut bulunan DNA sekans varyasyonlarıdır ve replikasyon hatalarından doğarlar. Bunlar gen mutasyonlarından, normal popülasyonda bulunmaları ve en az %1 oranında görülmeleri ile ayrılırlar. Yani mutasyonlar polimorfizmlere göre çok daha nadirdir. DNA polimorfizmlerinin %90'ı tek baz değişimlerine bağlı olarak meydana gelmiş SNP'lerdir. Diğerleri ise insersiyon/delesyon polimorfizmleri ve minisatellit, mikrosatellit polimorfizmleridir. Her ne kadar çoğu polimorfizmler sessiz olsa da bazılarının gen regülasyonu, proteinin fonksiyonu veya o proteinin ekspresyon düzeyi üzerine etkileri mevcuttur. Bazı polimorfizmler proteinin kan düzeyini artırırken, bazıları kan düzeyinin düşmesine ve buna bağlı olarak bazı patolojik sayılabilecek değişikliklerin meydana gelmesine sebep olmaktadır. Ayrıca fonksiyonel polimorfizmler, kişiler arasında hastalıklara olan duyarlılığı ve hastalığın şiddetini etkileyebilmektedirler (91).

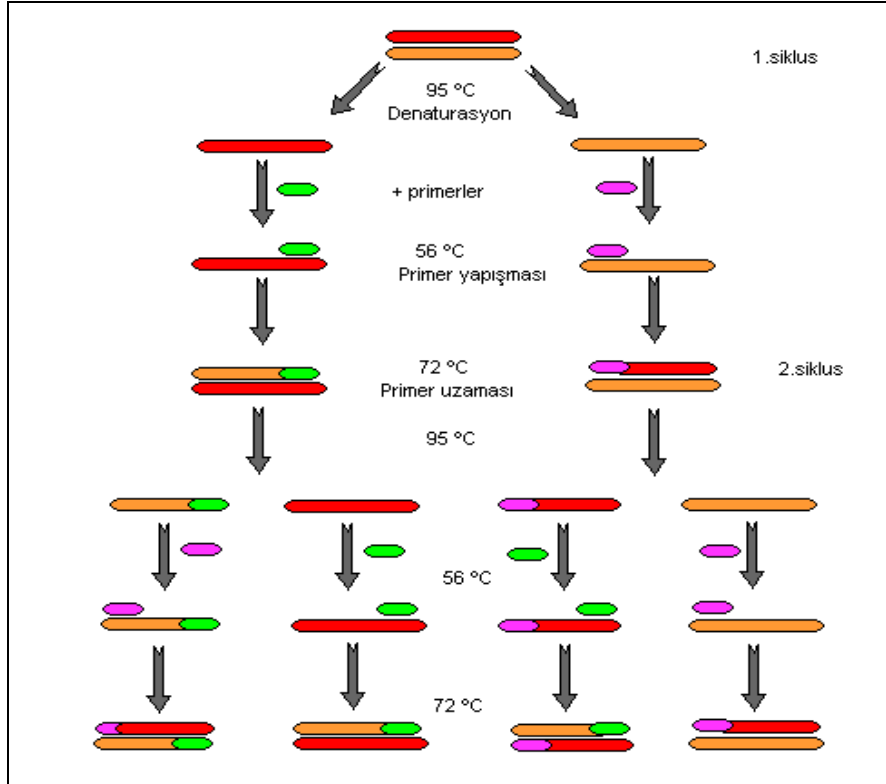
Literatürde HGF gen polimorfizmi analizi çalışmaları sınırlı sayıdadır. Ateroskleroz (92), hipertansiyon (93), myopi (94,95) ve otizm (96) gibi hastalıklarda HGF gen polimorfizmi çalışmaları yapılmış ve proteinin gen polimorfizmi ile bu hastalıkların bazılarının ilişkili olduğu tesbit edilmiştir.

2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

2.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) hücrede doğal olarak meydana gelen replikasyona benzer şekilde, istenilen bir DNA parçasının kopyalarının, in vitro koşullarda sentezlenmesini sağlayan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Bir PCR döngüsü denaturasyon, primerlerin bağlanması ve uzama olmak üzere üç basamaktan oluşur. Bir döngü 25-35 kez tekrar edilerek DNA amplifiye edilir. Denatürasyon, yüksek sıcaklıkta (90-95°C'de yaklaşık 5 dakika süreyle) çift zincir DNA'nın tek zincirli hale getirildiği aşamadır. Bağlanma aşamasında 50-70°C arasında bir sıcaklıkta oligonükleotid primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Uzama aşamasında, yüksek sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz (Taq DNA polimeraz enzimi), uygun tampon, MgCl₂ ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat

(dNTP; dATP, dGTP, dCTP, dTTP) varlığında primerin 3'hidroksil ucundan uzaması ve hedef bölgenin sentezlenmesi gerçekleşir. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Ardarda tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları eksponansiyel olarak artar. Bu artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır (Şekil 2.4). Böylece başlangıçtaki az miktardaki kalıp DNA'dan analiz edilebilecek miktarda DNA elde edilmesi sağlanır. Örneğin 30 döngü boyunca amplifiye edilen tek bir DNA molekülünden, teorik olarak 2^{30} adet (yaklaşık 1 milyar) yeni molekül elde edilebilecektir (97).



Şekil 2. 4. PCR'ın İşleyişi (2 döngü gösterilmiş)

2.3.2. PCR Uygulama Alanları

PCR amplifikasyonu kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısının konmasında, klinik örneklerdeki patojenik organizmaların saptanmasında, adli tıpta, kanser, ilaç direnci ve gen ekspresyonu araştırmalarında, DNA dizi analizlerinde, mutasyon taramalarında, ırkların araştırılmasında ve polimorfizm analizlerinde kullanılmaktadır (97).

2.3.3. Real Time-PCR

Thermus aquaticus bakterisinden saflaştırılan, sıcaklığa dayanıklı polimerazın (taq polimeraz) kullanımı ile birlikte PCR için otomatize termal siklus cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesiyle real time-PCR (RT-PCR)'da gelişmeler sağlanmıştır. RT-PCR tekniğini Higuchi ve ark. (98) 1992 yılında geliştirmişlerdir. Klasik PCR ile kompleks bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisi siklik işlemlerle çok sayıda ve istenilen miktarda kolayca çoğaltılabilmektedir. Ancak tek başına PCR ile ürün miktarı hakkında bilgi sağlanamaz ve sonrasında ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça zordur. Çünkü klasik PCR'da, başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün oluşur. RT-PCR tekniği sayesinde artık gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PCR reaksiyonunu, kullanılan floresan boyalar veya hedefe özgü işaretli probalar ile ekranda izleyerek eşzamanlı olarak reaksiyonun gidişine müdahale etmek ve PCR döngülerinin sayısı ile oynayabilmek de mümkündür (99). Bu yöntemle başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız bir şekilde çok sayıda DNA elde edilmiş olur ve oluşan DNA ile doğru orantılı floresan ışımaya meydana gelir. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma yapması nedeniyle yabancı yayınlarda 'floresan kantitatif RT-PCR' veya 'kantitatif-kinetik PCR' gibi çeşitli isimler verilmektedir. Bu sayede gen ekspresyon analizi, patojen belirlenmesi, SNP analizi gibi birçok farklı alanda gen ifadesini sayısal bir değer olarak ölçmek mümkün olmaktadır (99).

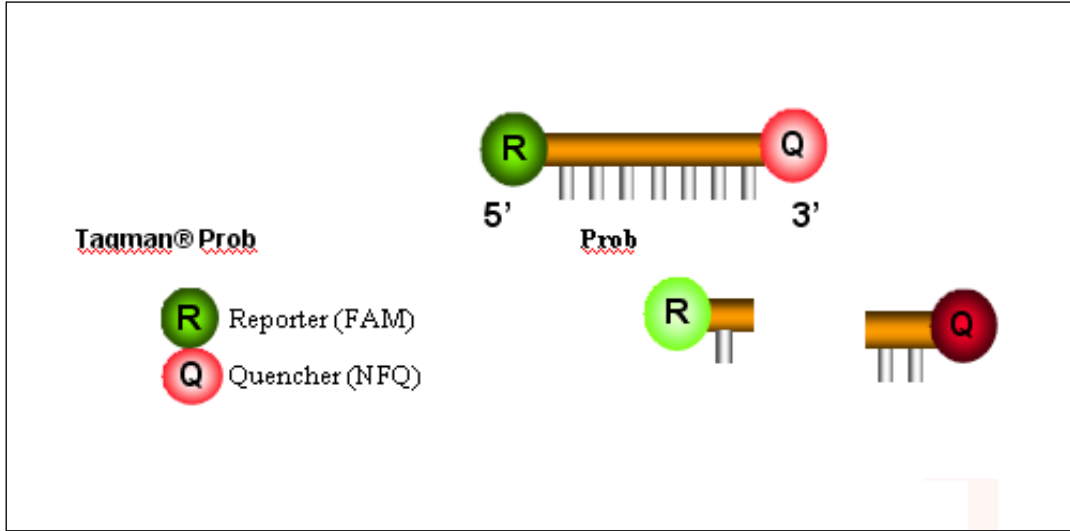
RT-PCR, SNP analizi için, gün geçtikçe kullanım alanı artmaktadır. Bu yöntem, hızlı, sensitif, spesifik, uygulaması kolay ve kesin sonuçlar veren ucuz bir uygulamadır. RT-PCR tekniği kolaylıkla otomatize edilebilmekte ve PCR sonrası işlemleri ortadan kaldırmaktadır. Standart eğrilerin kullanımı ile örnekler ve deneyler arasında

karşılaştırma imkânı sağlayan, internal standartlar yardımı ile başlangıç miktarındaki farklılıktan kaynaklanacak problemlere son veren yüksek verimde sonuçlar elde edilmektedir (100).

RT-PCR metodu için reaksiyon tüpündeki floresanı ölçebilecek bir ‘thermal cycler’, lazer veya halojen lamba ve her bir tüpteki floresan emisyon monitörizasyonunda kullanılan CCD kamera gereklidir (101). RT-PCR sistemleri, PCR ürünü ile floresan ışımaya arasındaki orantı ile sonuç belirleme esasına dayalı olarak çalışırlar. RT-PCR’da dizi spesifik olmayan çift zincirli DNA’nın minör oluşuna bağlanan ‘SYBR Green’ gibi floresan boyalar kullanılarak floresan artışı eş zamanlı olarak izlenebilir. Ancak özgül olmayan reaksiyon ürünleri de boyaya bağlanıp ölçüm artefaktları oluşturabilir. Bu yüzden spesifik bir diziye bağlanabilen özgül floresan işaretli probalar (TaqMan prob gibi) kullanılabilir.

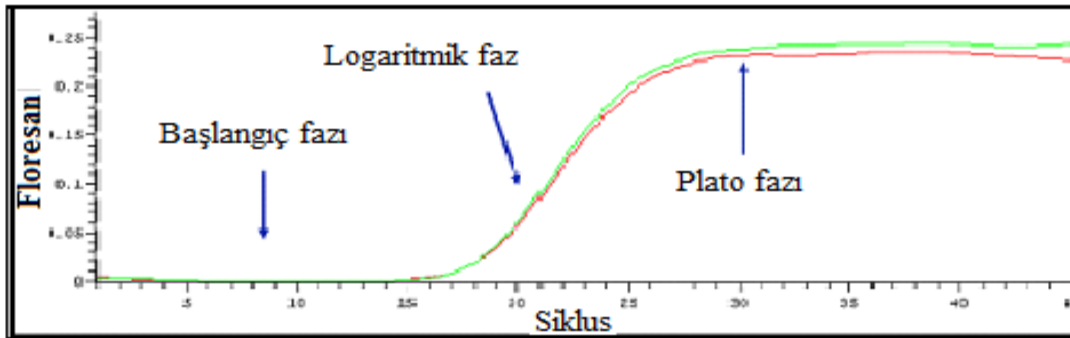
Bizim de çalışmamızda kullandığımız TaqMan Problar, DNA polimeraz enziminin 5’ nükleaz aktivitesini hidroliz için kullanan problardır. Prob floresan özelliğe sahip ‘reporter’ (R) (artırıcı) ve ‘quencher’ (Q) (durdurucu) özellikte iki floroforla işaretlidir (Şekil 2.5). PCR sırasında prob, hedef DNA dizisiyle hibridize olur ve uzama işlemi sırasında polimeraz enzimi ile uzaklaştırılır. ‘Reporter Quencher’dan polimeraz enziminin 5’-3’ nükleaz etkisi ile ayrılır, serbest kalan ‘reporter’ floresan ışık yayar (99-102).

RT-PCR için tampon içeriği, siklus koşulları, $MgCl_2$ konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, prob konsantrasyonu ve kalıp DNA konsantrasyonu kriterleri optimize edilmelidir. Şu an için ticari amaçlı üretilen master mixler mevcut olup bunlar PCR optimizasyonunu kolaylaştırmaktadırlar.



Şekil 2.5. 'TaqMan Prob'un Yapısı

RT-PCR sırasında başlangıç fazında, ürün oluşmakta, ancak floresan ışımaya zemindeğeri (background) seviyesinin altında kalmaktadır (Şekil 2.6). Logaritmik fazda, ürünün eksponansiyel birikimiyle floresan zemindeğeri seviyesinin üzerine çıkmaktadır. Floresan amplifiye olan ürün miktarıyla direkt orantılı olarak artmaktadır. Plato fazında, DNA veya floresan miktarında primer, taq polimeraz gibi reaksiyon bileşenlerinin tükenmesinden dolayı anlamlı artış yoktur (102).



Şekil 2.6. RT-PCR Sırasında Amplifikasyonun Meydana Getirdiği Evreler

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Hasta Grubu ve Örnek Alınması

Bu çalışmaya Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun onayı (17.04.2009 tarih ve 3 sayılı kararı) alındıktan sonra başlandı. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniğinde üriner sistem taş hastalığı tanısı ile takip edilen, yeni tanısı konulup tedavilerine henüz başlanmamış olan veya cerrahi operasyon düşünülen ancak henüz ameliyat yapılmamış olan 105 hasta çalışma kapsamına alındı. Hastaların 68'i erkek 37'si ise kadın idi. Hastalardan daha sonra endoskopik olarak veya spontan düşürme sonrasında taşları elde edildi. Bu taşların cinsi hassas bir yöntem olan 'X-ray diffraction' metodu ile tayin edildi. Bu işlem *Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü*'nde yapıldı. Taş analizi sonuçlarına göre 103 hastada kalsiyum, 4 hastada ürik asit, 1 hastada sistin ve 1 hastada ise strüvit taşı olduğu tespit edildi.

Kontrol grubu ailesinde ve kendisinde taş hikâyesi olmayan yaş ortalamaları ve cinsiyet oranları hasta grubunununkine benzer 70 sağlıklı kişiden oluşturuldu.

Hasta ve kontrol gruplarında solunum hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve endokrinopatisi (diyabet ve tiroid fonksiyon bozuklukları gibi) olan hastalar ve her hangi bir ilaç kullanan hastalar çalışma kapsamına alınmadı.

Bu çalışma ile ilgili biyokimyasal ölçümler ve gen polimorfizmi araştırmaları Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler ve Araştırma Laboratuvarlarında ve Aziziye biyokimya laboratuvarında yapıldı.

3.1.2. Kan ve İdrar Numunelerinin Alınması

Çalışmamız için sağlıklı ve taş hastalığı olan kişilerden herhangi bir müdahale yapılmadan önce hem kan ve hem de 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. 24 saatlik idrar analit ölçümlerinde rutin olarak uyguladığımız idrar asidifikasyonu, ürik asit ölçümünü etkilediği için uygulanmadı. Bunun için Ferraz ve ark. (103) tarafından daha önceden asidifikasyon yapılan ve yapılmayan 24 saatlik idrar numunelerinde çalışılan analitler arasında istatistiksel olarak farklı sonuçlar veya klinik olarak ilişkili farklılıklar bulamadıklarını rapor ettikleri çalışma referans alındı. Her idrar örneği laboratuvarımıza ulaştığında rutin olarak idrar analitleri (oksalat, sitrat, ürik asit ve kalsiyum) çalışıldı.

Kan örneklerinden serum ayırma tüpünde olanlar uygun hızda santrifüjlenerek serumları ayrıldı ve alikotlanarak, EDTA'lı olanlar ise DNA izolasyonu için herhangi bir işleme tabi tutulmadan derin dondurucuda -80°C saklandı.

HGF proteinine ait gende 2 bölgedeki polimorfizm için genetik çalışma yapıldı. Derin dondurucuda saklanan örnekler, DNA izolasyonu yapılacağı zaman önce -20°C 'ye daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye alınarak kademeli çözünmeleri sağlandı. Pure Link Genomic DNA mini kit (Invitrogen, Germany) kullanılarak aşağıda detayı verilen yöntemle DNA izolasyonu yapıldı.

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal maddeler ve kitlelere ait bilgiler Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Temin Edilen Firmalar

Kimyasal Malzeme veya Reaktif Adı	Temin Edildiği Firma ve Katalog No
Pure Link Genomic DNA İzolasyon Kiti	Invitrogen Cat.No:K1820-01
20 x TaqMan SNP Genotyping Assay Mix	Applied Biosystems
2 x FastStart Universal Probe Master	Roche
Human HGF ELISA Kit	Biosource Cat No:KAC2211
Etanol (%96–100)	Merck
Etidyum Bromür(EDTA)	Sigma
10xTaq Buffer, KCl'li	Fermentas
MgCl ₂ Çözeltisi (25 mM)	Fermentas
dNTP Karışımı (25 mM)	Fermentas
Taq DNA Polimeraz (5 U/ μL)	Fermentas
Sitrat Tayin Kiti	Far Diagnostics REF:7046
Oksalat Tayin Kiti	Sigma Diagnostics Cat No:591-D

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışmamızda kullandığımız alet ve cihazlara ait bilgiler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan Alet ve Cihazlar

Alet/Cihaz	Marka
Mikropleyt Okuyucu	Bio-tek PowerWave XS, The USA
7300 Real Time PCR Sistem	Applied Biosystems, California, USA
Derin Dondurucu (-80 °C),	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd,
Derin Dondurucu (-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Spektrofotometreler	Cecil CE 304 UV
	Beckman DU 500
Laminar Flow Kabin	Nüve LN 120, Türkiye
Mikro Santrifüj	Mikro 200 Hettich, Germany
Mikro Otomatik Pipetler	Eppendorf, Finn timer, Medispes plus
Termomikser	Thermomixer Comfort Eppendorf, Germany
Vorteks Yellov Line TTS2	IKA, USA
Farklı Boyutlarda Filtreli Pipet Uçları	Biosphere filter tips, Nümbrecht, Germany
PCR Tüpleri (DNAaz ve RNAaz free)	Axygen, Union City, USA
Pudrasız Tek Kullanımlık Eldivenler	Aldrich, Malasia
RT- PCR Optik 96 Well-	MicroAmp, Singapore
Reaksiyon Pleyti (Barkodlu)	
UV Küvetler	Plastbrand, Germany
Otoklav	Hmc-Hirayama, Japan.
Cobas 6000 Otoanalizör	Roche, Germany

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deneylerin Yapılışı

3.2.1.1. DNA İzolasyonu

Pure Link Genomik DNA izolasyon kiti kullanılarak EDTA'lı tüplere alınan periferik venöz kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı:

1. Termomikser 55°C'ye ayarlandı. Her bir numune için steril mikrosantrifüj tüplerine 200'er µL vortekslenmiş tam kan aktarıldı. 20 µL proteinaz K, 20 µL RNAaz A eklendi, karışım hafifçe vortekslendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
2. Üzerine 200 µL 'genomik lysis binding buffer' eklendi ve homojen olması için vortekslendi.
3. Termomikserde 55°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. Inkübasyon sonrası üzerine 200 µL %96-100'lük etanol eklendi. Homojenizasyonu sağlamak için vortekslendi.
5. Karışım ependorflara yerleştirilen spin kolona aktarıldı. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Kolonlar yeni ependorflara aktarıldı ve 500 µL 'wash buffer 1' eklenerek kolon yıkandı. 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Ependorfun altında kalan kısım kolona bulaştırılmadan atıldı, kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve kolona 500 µL 'wash buffer 2' ilave edilerek 14.000 g'de 3 dakika santrifüj edildi.
8. Yine alta kalan kısım atıldı. Spin kolon steril mikro santrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 100 µL 'elution buffer D' eklendi, oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi ve daha sonra 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
9. Dipte kalan kısım 50 mikrolitrelik 2 adet PCR tüpüne aktarıldı.

3.2.1.2. DNA Saflık Tayini ve Konsantrasyonunun Hesaplanması

DNA konsantrasyonları ve saflık derecelerini belirlemek için izole edilen DNA'ların absorbanları spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm dalga boylarında, quartz küvete, 195 µL saf su + 5 µL DNA konularak ölçüldü. A260/A280 oranından DNA saflığı saptandı ve bu değer 1.7 üzerinde ise DNA saf olarak kabul edildi ve PCR

analizlerinde kullanıldı. DNA konsantrasyonu 260 nm’de okunan absorbans değerlerinden aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{DNA konsantrasyonu (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times 50 \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

Çift iplik DNA’nın 260 nm’de vermiş olduğu 1 absorbans, 50 ng/μL DNA’ya karşılık gelmektedir (97),

Bu izolasyon yöntemiyle elde edilen DNA konsantrasyonu 30-95 ng/μL aralığında değişmekte idi. Allelik diskriminasyon analizi, her reaksiyon için birden fazla primer ve probun kullanıldığı bir multipleks PCR yöntemidir. RT-PCR allelik diskriminasyon analizi için önerilen final DNA konsantrasyonu 5 ng/μL olduğu için, izole edilen DNA örnekleri, Tris-EDTA (pH 8.0) ile son konsantrasyonu 5 ng/μL olacak şekilde seyreltilti

3.2.1.3. HGF Gen Polimorfizm Analizi

HGF geni intron 13’te C>A baz değişimi (rs2074725) ve intron 14’te T>C baz değişimi (rs2074724) analizleri, RT-PCR kullanılarak ‘TaqMan allelik diskriminasyon yöntemi’ ile belirlendi.

HGF SNP analizi, TaqMan PCR metoduyla yapıldı. PCR işlemi sonunda verilerin elde edildiği ‘end-point’ ölçümü ile ilgili DNA dizisindeki tek nükleotid varyantları tespit edildi. HGF SNP analizi için, allele spesifik ‘TaqMan probler’ kullanıldı. HGF geni intron 13 C>A baz değişimi için kullanılan probler:

5’-FAM-GCACAAATTATAGTCCAGAGCTTAC_CGTCTGGCAAGCAGATGTGATCAGCT
-Tamra-3’ ve

5’-VIC- GCACAAATTATAGTCCAGAGCTTAC_AGTCTGGCAAGCAGATGTGATCAGCT
-Tamra-3’

Primer dizileri ise;

Forward 5’-CTACCTCTGGAGGCACAAATTA-3’ ve

Reverse 5’-GGGTACAACCTTCAGGACCA-3’ şeklinde idi.

HGF geni intron 14 T>C baz değişimi için kullanılan probler:

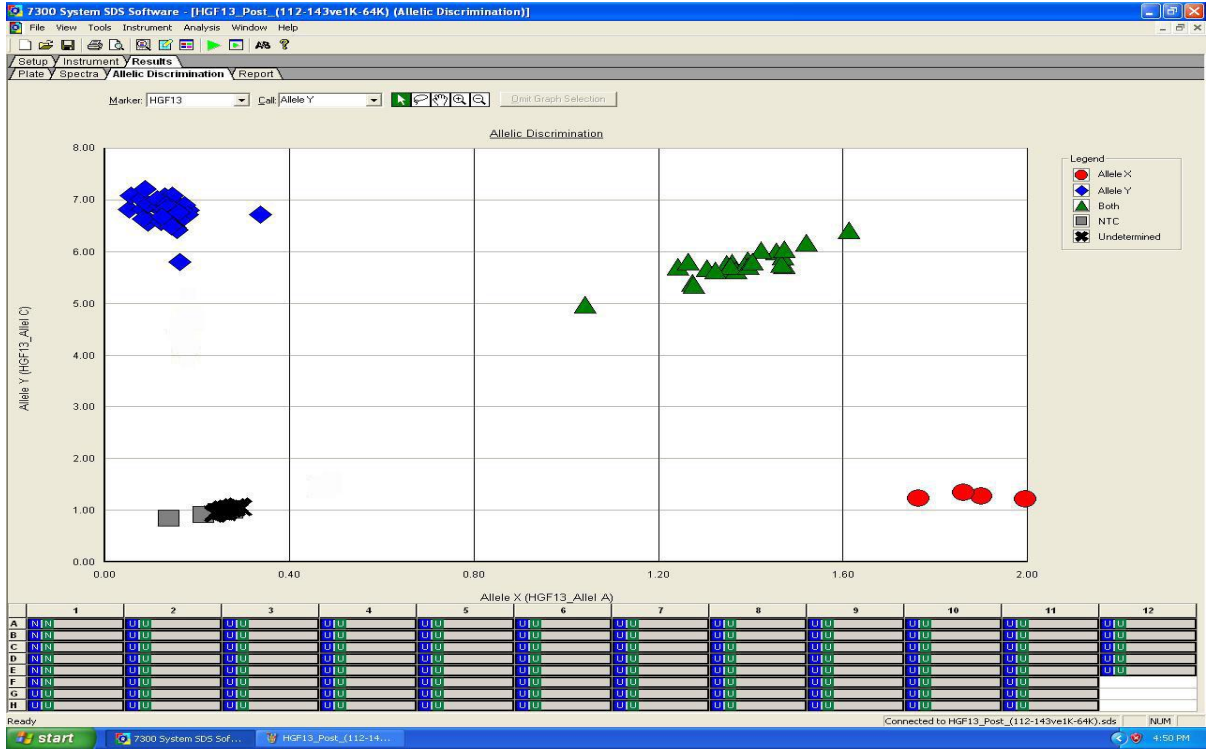
5’-FAM-CTACAGGAGAAAGAAGTAGTGAGGA_TTGAAAAAAGCCTATTGACAATTTAG
-Tamra-3’ ve

5’-VIC-CTACAGGAGAAAGAAGTAGTGAGGA_CTGAAAAAAGCCTATTGACAATTTAG

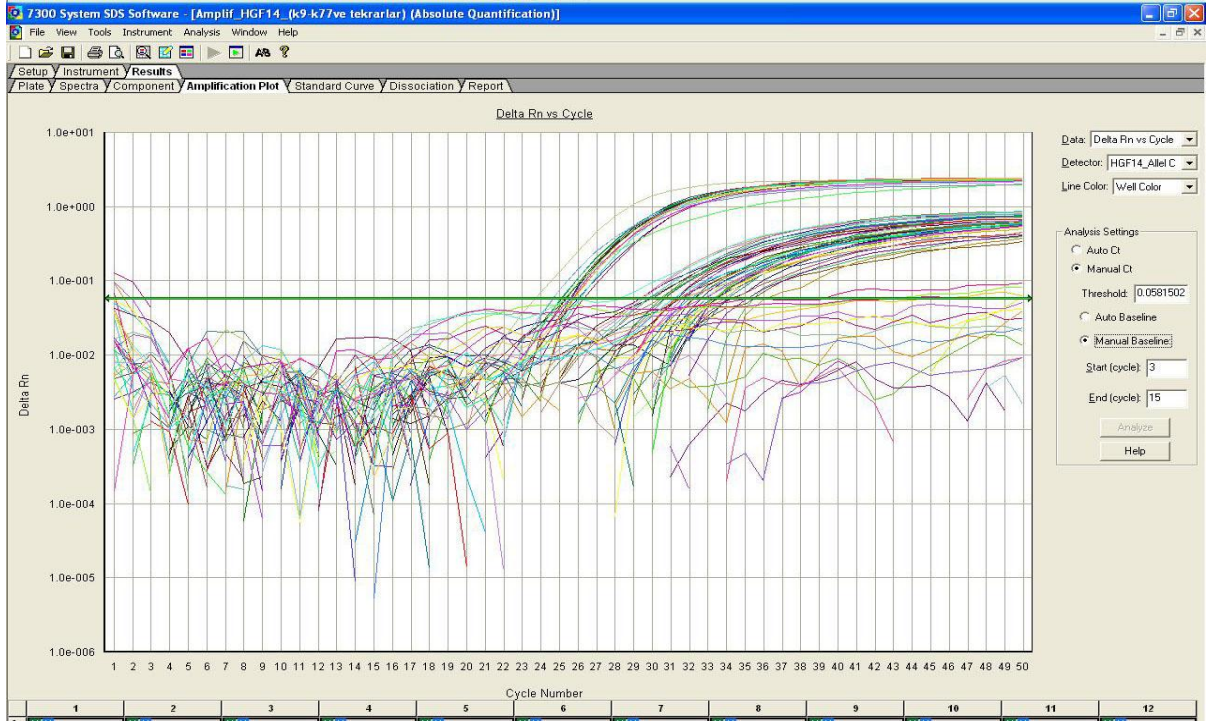
-Tamra-3' şeklinde idi.

96 well PCR reaksiyon pleytine, negatif kontrol amaçlı 6 kuyucuk boş bırakılarak (No template control, NTC) diğer kuyucuklara 1 µL DNA (5 ng/µL) örneği pipetlenerek oda sıcaklığında evaporasyona bırakıldı. Örnekler tamamen uçtuktan sonra hazırlanan PCR reaksiyon miksi [20 x TaqMan SNP Genotyping Assay Mix (Applied Biosystems), 2 x FastStart Universal Probe Master (Roche) ve nuclease-free su] kuyucuk başına 5 µL olacak şekilde, pleyte yüklendi. Pleyt üzeri sıkıca kapatıldıktan sonra 'Applied Biosystems 7300 RT-PCR' cihazına yüklenerek 'pre-read run' işlemi yapıldı. 'Pre-read run'da, PCR amplifikasyonu öncesi, problemlerden kaynaklanan zemindeğer floresan ışımlar okutuldu. Daha sonra RT-PCR cihazına PCR protokolü: 95 °C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu, 92 °C'de 15 sn ve 60 °C'de 90 sn şeklinde toplam 50 siklus olarak girildi. PCR amplifikasyonundan sonra 'post-read run' işlemi yapıldı. 'Post-read run'da, pleytteki floresan ışıma düzeyi okundu ve 'pre-read run' sürecinde tespit edilen zemindeğer floresan ışımlar otomatik olarak çıkartıldı. Daha sonra amplifiye olmuş datalar kullanılarak, cihazın yazılım programı yardımıyla floresan ışımanın renk özelliğine göre HGF geni intron 13 C/A ve intron 14 T/C allel varyantları saptandı.

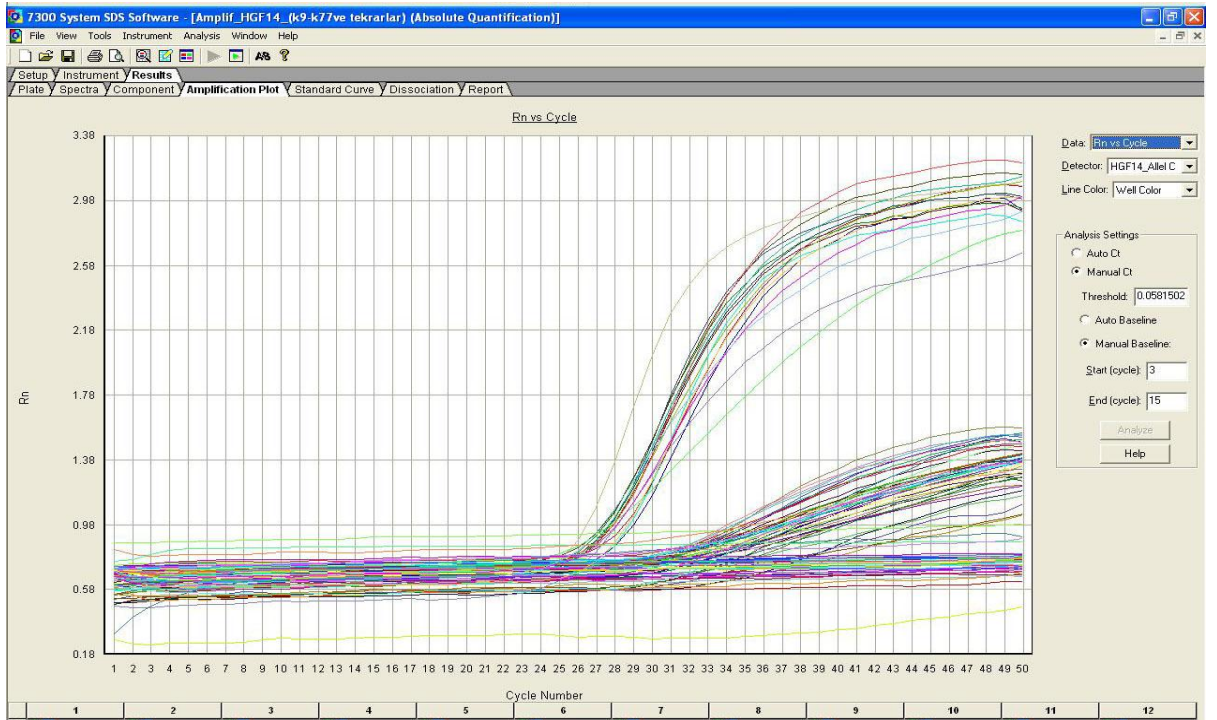
Applied Biosystems 7300 RT-PCR cihazının yazılım programı olan '7300 System SDS Software'de bir dağılım grafiği oluşturuldu. Örneğin sahip olduğu genotipe göre üç farklı dağılım grafiği elde edilmektedir. Sadece allel X ya da allel Y'yi taşıyanlar homozigot, her iki alleli taşıyanlar ise heterozigot şeklinde gruplandırılmaktadır; homozigot (allel X), heterozigot (allel X/allel Y) ve homozigot (allel Y). Bizim çalışmamızda HGF 13 A/C için; allel A, VIC floresan boya; allel C ise FAM ile işaretlendi. HGF 14 C/T için; allel C, VIC ile; allel T ise FAM boyasıyla işaretlendi. Pasif boya olarak ROX kullanıldı. Çalışma sonuçlarıyla ilgili grafikler şekil 3.1, şekil 3.2 ve şekil 3.3'te görülmektedir.



Şekil 3.1. HGF intron 13 C>A polimorfizmine ait scatter plot görüntüleri. Sol üst köşede toplanan Allel Y (mavi), C allelini temsil etmektedir. Sağ alt köşede toplanan Allel X (kırmızı), A allelini göstermektedir. Grafiğin orta kısmında gruplanan üçgen şekille şematize edilen yeşil renkli “Both alleli” heterozigot C/A genotipini temsil etmektedir. Grafikte sol alt köşede gruplanan veriler, negatif kontrolleri (NTC) temsil etmektedir. Yine sol alt köşede toplanan ancak X işareti ile gösterilen veriler, genotipi belirlenemeyen örnekleri temsil etmektedir (muhtemelen çok düşük DNA konsantrasyonu veya PCR inhibisyonundan dolayı). İlk analizde genotipi saptanmayan örnekler tekrar çalışıldı.



Şekil 3.2. HGF intron 14 T>C RT-PCR Reaksiyonlarını Gösteren Logaritmik 'Delta Rn-Cycle' Grafiği.



Şekil 3.3. HGF İntron 14 T>C RT-PCR Reaksiyonlarını Gösteren 'Linear Rn-Cycle' Grafiği

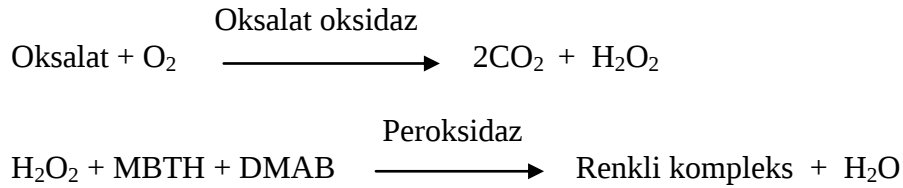
3.2.1.4. HGF Serum Düzeyinin Ölçümü

HGF serum düzeyi, ‘Human HGF ELISA kiti’ (Biosource Cat No:KAC2211) kullanılarak mikropleyt okuyucuda (Bio-tek PowerWave XS) belirlendi. HGF düzeyleri pg/mL cinsinden hesap edildi. Kitin bir çalışma içi varyasyon katsayısı (%CV), 4.8 iken çalışmalar arası %CV’si 5.4 idi. Kitin en düşük tesbit etme sınırı ise 20 pg/mL idi.

3.2.1.5. İdrar Analitlerinin Ölçümü

İdrar oksalat düzeyi ‘Oksalat tayin kiti’ (Sigma Diagnostics Cat No:591-D) kullanılarak enzimatik yöntem ile ölçüldü.

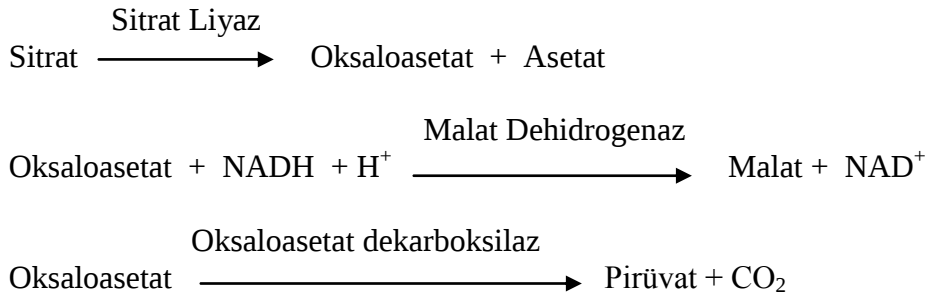
Oksalat, oksalat oksidaz enzimi ile CO_2 ve H_2O_2 ’ye dönüştürüldü. H_2O_2 , 3 metil-2-benzotiazolinon hidrazon (MBTH) ve 3-dimetilamino benzoik asit (DMAB) ile peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona sokularak renkli kompleks oluşturuldu.

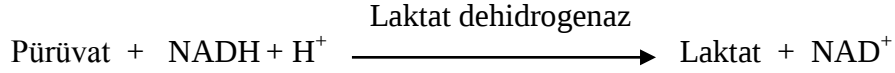


Oluşan bu renkli kompleksin absorbansı 590 nm’de ölçülerek numunedeki oksalat konsantrasyonu standartla karşılaştırılmak suretiyle hesap edildi.

Sitrat düzeyi ‘sitrat tayin kiti’ (Far Diagnostics REF:7046) kullanılarak ölçüldü.

Sitrat, sitrat liyaz enzimi varlığında oksaloasetat ve asetata dönüştü. Oksaloasetat malat dehidrogenaz enzimi ile malata; pürüvat, laktat dehidrogenaz enzimi ile laktata indirgendi ve NADH yükseltgendi.

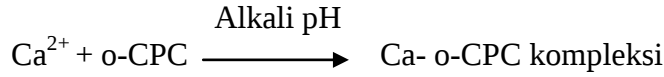




Harcanan NADH'ye bağlı olarak 340 nm'deki absorbans azalışı ölçüldü. Bu absorbanstaki azalma numunede bulunan sitrat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

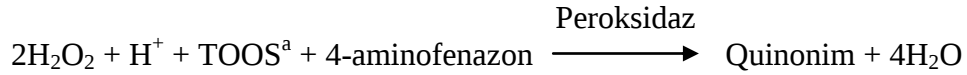
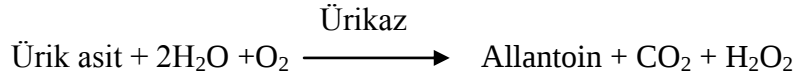
İdrar kalsiyum ve ürik asit düzeyleri standart spektrofotometrik metodlar kullanılarak Cobas 6000 (Roche, Germany) otoanalizöründe ölçüldü.

Kalsiyum iyonları alkali ortamda o-kresolftalein (o-CPC) ile reaksiyona girerek kırmızı renkli kalsiyum-kresolftalein kompleksi oluşturuldu.



Oluşan bu renkli kompleks 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Rengin şiddeti kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Ürik asit ölçümü için, ürik asit aşağıdaki reaksiyonlar sonucunda renkli bir ürün olan quinonim'e dönüştürüldü.



TOOS (N-etil-N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3-metilanilin)

Oluşan renkli kompleksin absorbansı ürik asit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.3. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizleri SPSS 11.5 istatistik programı (SPSS Inc, Chicago, USA) kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normal olup olmadığı Kolmogorov Smirnov testi ile belirlendi. Normal dağılıma uymayan testlerin istatistik değerlendirmesi Mann Whitney U testi ile yapıldı. Sonuçlar ortalama±standart deviasyon (SD) olarak verildi. Hasta ve kontrollerde gen polimorfizm dağılımını karşılaştırmak için χ^2 (Chi square) testi uygulandı. $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Toplam 104 taş hastasında ve 68 sağlıklı kişilerde HGF geni intron 13 C>A baz değişimi (rs2074724) araştırıldı.

Buna göre hastaların 8'inde AA genotipi, 28'inde CA genotipi ve 68 hastada ise CC genotipi olduğu tesbit edildi. Sağlıklı kişilerde ise 2 kişide AA, 20 kişide CA ve 46 kişide CC genotipinde olduğu saptandı (Tablo 4.1). Genotiplerin dağılımı açısından farkın önemlilik testi X^2 ile yapıldı ve 2 grup arasında önemli bir farklılık gözlenmedi ($X^2=1.72$ df=2; p=0.42).

HGF geni intron 14'deki T>C baz değişimi (rs2074724) analizleri ise toplam 99 hasta ve 56 sağlıklı kişide araştırıldı. Buna göre hastaların 3'ünde CC genotipi, 26'sında CT genotipi ve 70 hastada ise TT genotipi olduğu tesbit edildi. Sağlıklı kişilerde ise 3 kişide CC, 16 kişide CT ve 37 kişide TT genotipi olduğu saptandı (Tablo 4.1). Genotiplerin dağılımı açısından farkın önemlilik testi X^2 (Chi square) ile yapıldı ve 2 grup arasında önemli bir farklılık gözlenmedi ($X^2=0.68$ df=2; p=0.71).

Tablo 4.1. HGF İtron 13 ve İtron 14 Gen Polimorfizm Sonuçları

Polimorfizm	Hasta (%)	Kontrol (%)	p
İntron13			
CC	68 (60)	46 (40)	$X^2= 1.72$, df=2 p=0.42
AA	8 (80)	2 (20)	
CA	28 (58)	20 (42)	
İntron 14			
TT	70 (65)	37 (35)	$X^2=0.68$, df=2 p=0.71
CT	26 (62)	16 (38)	
CC	3 (50)	3 (50)	

Allel sıklığı açısından, sağlıklı kontrol ve üriner sistem taş hastalığı olan kişiler arasında farklılığın olup olmadığı araştırıldı. Ne HGF intron 13 ne de intron 14 bölgesinde allel sıklığı açısından iki grup arasında istatistik olarak önemli bir farklılık bulunmadı (sırası ile p=0.43 ve p=0.44). Tablo 4.2 ve 4.3'te detaylı veriler verilmektedir.

Tablo 4.2. HGF İntron 13 için Allel Sıklığı

Allell tipi	Çalışma grubu (%)	Kontrol grubu (%)	p
A	44 (65)	24 (35)	0.43
C	164 (60)	112 (40)	

Tablo 4.3. HGF İntron 14 için Allel Sıklığı

Allell tipi	Çalışma grubu (%)	Kontrol grubu (%)	p
C	32 (60)	22 (40)	0.44
T	166 (65)	90 (35)	

Toplam 105 taş hastasında ve 70 sağlıklı kişilerde serum HGF düzeylerini ölçtük. Taş hastalarında ortalama serum HGF düzeyi 1.05 ± 0.63 ng/mL iken kontrol grubunda 1.35 ± 0.58 ng/mL idi. İki grup arasındaki farkın istatistiksel olarak çok önemli olduğu bulundu ($p < 0.0001$).

Ayrıca HGF intron 13 C>A genotiplerinin serum HGF düzeyleri üzerine etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Sağlıklı kişiler ve üriner sistem taş hastalarında CC genotipini taşıyanlar ile CA veya AA taşıyanlar arasında serum HGF düzeyleri açısından önemli bir farklılık gözlenmedi (Kontrol grubu için $p = 0.10$, hasta grubu için $p = 0.50$). Her iki grupta HGF intron 14 T>C genotiplerinden sağlıklı kişiler ve üriner sistem taş hastalarında TT genotipini taşıyanlar ile CT veya CC taşıyanlar arasında serum HGF düzeyleri açısından önemli bir farklılık gözlenmedi (Her iki grup için $p = 0.20$).

24 saatlik idrar analit sonuçları tablo 4.4'te görülmektedir. Üriner sistem taş hastalığı olan grupta 24 saatlik idrar örneklerinde ortalama kalsiyum ($p = 0.03$) ve oksalat konsantrasyonu ($p = 0.04$) kontrol grubuna göre daha yüksek iken, sitrat ise ($p = 0.04$) daha düşük olarak bulundu. İdrar ürik asit düzeyleri açısından iki grup arasında önemli farklılık gözlenmedi.

Tablo 4. 4. Hasta ve Kontrol Gruplarına ait 24 Saatlik İdrar Örneklerinde Sitrat, Oksalat, Kalsiyum ve Ürik Asit Düzeyleri

Analitler (mg/24 sa)	Hasta (n=105) Ortalama±SD	Kontrol (70) Ortalama±SD	
Sitrat	282.9±120.7	300.6±8.6	0.04
Oksalat	39.01±15.3	33.5±7.1	0.04
Kalsiyum	234.8±114.3	199.3±71.2	0.03
Ürik asit	408.1±172.2	411.4±141.4	0.43

5. TARTIŞMA

Üriner sistem taş hastalığı, sık görülen, önemli morbiditeye sebep olan ve ekonomik olarak yük oluşturan bir sağlık problemidir. Taş oluşumu, genetik, çevresel ve anatomik faktörlerin etkileşimi ile ortaya çıkan multifaktöriyel bir durumdur. Bu hastalıkta aile hikâyesi uzun zamandan beri bilinmekte olup, genomik çalışmalarda ilerlemeler ile altta yatan genetik defektler tanımlanmaya başlanmıştır. Klinik pratikte tüm taşlar içerisinde en sık olarak görülmekte olan taş cinsi kalsiyum taşlarıdır ve bu taşların oluşumu hiperkalsiüri ve diğer metabolik bozukluklarla ilişkilidir. Nadir görülen izole gen defektleri ve tek gen kusurları (sistünüri ve primer hiperoksalüri ile ilişkili kalsiyum oksalat taş hastalığı gibi) taş oluşumuna sebep olurlar. Taş oluşumunun en önemli sebebi idiopatik hiperkalsiüridir. Ancak idiopatik kalsiyum taşları için yapılan moleküler genetik çalışmaların sonuçları, etiyoloji ve patogenezi tam olarak açıklamamaktadır.

Bu nedenle, taş hastalığı konusundaki çalışmaların çoğunda hiperkalsiüri ve idiopatik kalsiyum taşları ile ilgili genler araştırılmıştır. Örneğin kristalizasyon inhibisyonu yapan, oksalat ve sitrat metabolizmasında rol alan ve böbrek, kemik ve barsaklarda kalsiyum metabolizmasında fonksiyonu olan proteinleri kodlayan genler bunlardan bir kaçını oluşturmaktadır (9,68,104). Çalışmalarda, osteopontin, Tam-Horsfall proteini, inorganik pirofosfat taşıyıcı molekülü, MGP, fetuin-A, vitamin D resptörü gibi birçok molekülün genetik çalışmaları üriner sistem taş hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.

Aslında taş oluşum mekanizması oldukça komplekstir ve çok sayıda farklı protein işin içine girebilmektedir. Aynı zamanda kristal-hücre etkileşiminde veya kalsifikasyonun başlamasında rol oynayan moleküllerin genleri de araştırma konularındandır. Hücre bütünlüğünün bozulması kristal tutulumu ile ilişkilidir ve kalsiyum oksalat kristallerinin büyümesi ve taş oluşumu için kristallerin renal tubüllerde birikmesi gerekmektedir. Bu bağlamda Tei ve ark. (7) deneysel olarak taş oluşturulan ratlarda, HGF'nin oksalat ve COM kristalleri ile meydana gelen hücre hasarını ve apoptozu inhibe ettiğini ve böylece COM kristallerinin böbrek tubülüs hücrelerine adezyonunu engellediğini göstermişlerdir. Aynı zamanda taş oluşturulan ratlarda, HGF gen transferinin renal tubüllerde kristal depozitlerini önemli derecede azalttığı da bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıktığımız çalışmamızda; üriner sistem

taş hastalığı olan kişilerde HGF genindeki polimorfizmlerin taş oluşumunda etkili olup olmadığını ve polimorfizme bağımlı ya da bağımsız olarak serum düzeylerindeki değişimin bu hastalıktaki önemini araştırdık.

HGF ilk olarak karaciğer hücreleri için mitojen etkili bir molekül olarak keşfedildikten sonra (2) hepatektomi yapılmış ratlarda da serumda izole edilmiştir (105). Bugün HGF'nin birçok hücre için tanımlanmış çok fonksiyonlu bir molekül olduğu bilinmektedir. HGF, epitelyal kaynaklı birçok farklı hücre üzerinde mitojenik, motojenik, morfojenik, yayılma, dallanma, proliferasyon ve antiapoptotik etkilere sahiptir. Ayrıca epitelyal hücrelerde tübüler yapıların oluşumu, endotelial hücreler üzerine güçlü anjiogenik etki, kemiğin yeniden yapılanması, osteoblast-osteoklast koordinasyonu gibi fizyolojik olaylarda da rol oynamaktadır (5).

Mevcut çalışmada HGF geni intron 13'teki C>A baz değişimi (rs2074725) ve intron 14'deki T>C baz değişimi (rs2074724) araştırıldı. Çalışma sonunda, HGF geni intron 13'teki C>A polimorfizmi ve intron 14'deki T>C polimorfizminin üriner sistem taş hastalığı ile ilişkisinin olmadığı tesbit edildi. Yine çalışmamızda HGF geni intron 13 için, A ve C alleli, intron 14 için C ve T alleli sıklığı açısından, sağlıklı kontrol ve üriner sistem taş hastalığı olan kişiler arasında önemli bir fark göstermedi. Yapılan literatür taramasında HGF gen polimorfizminin taş oluşum riskinde herhangi bir rolünün olup olmadığına ilişkin bir yayın bulunamamıştır.

Farklı hastalık gruplarında HGF gen polimorfizmi ve kan düzeyleri ile ilişkili çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda hipertansiyon sıklığı ve şiddeti ile serum HGF konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişkinin olduğu tesbit edilmiştir (106,107). Motone ve ark. (93) bu sonuçlardan yola çıkarak HGF gen polimorfizmi ve esansiyel hipertansiyon arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bizim de araştırdığımız HGF geni intron 13 C/A değişimini, intron 14 T/C değişimini ayrıca da intron 8'deki T/A değişimini incelemiştir. HGF geninin intron 13 bölgesindeki C/A polimorfizminin genotip dağılımı CC %83, CA %16 ve AA %1 şeklinde bulmuşlardır. Aynı çalışmada hipertansiyon ile allel dağılımı arasında önemli bir ilişki bulunamazken kadınlarda ve zayıf kişilerde intron 13'teki C/A polimorfizminde A allelinin bulunmasının esansiyel hipertansiyon riskini azalttığı belirlenmiştir.

Yine hipertansiyon ve ateroskleroz gibi vasküler endotelial hasarlı kişilerde serum HGF düzeylerinin yükselmesinden yola çıkılan bir çalışmada, kan basıncı veya

karotik ateroskleroz ve HGF genindeki SNP'ler arasındaki ilişki araştırılmıştır. HGF promotöründe 8, ekson 15'te 1 ve intron 7, 8, 9,10, 11, 13, 14 ve 17'de 12 adet olmak üzere toplam 21 SNP tanımlanmışlardır ve bu çalışmanın sonuçları, HGF genotipi ve kan basıncı veya hipertansiyon prevalansı arasında önemli bir ilişkinin olmadığını göstermiştir. Ancak intron 8'de A43839T'nin A alleli kadınların T alleli olanlara göre daha şiddetli karotik ateroskleroza sahip oldukları gösterilmiştir (92).

Otizmin bazı gen polimorfizmleri ile ilişkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada, araştırılan HGF geni intron 1-15 arası birçok gen bölgesindeki polimorfizminin otizm riskini etkilemediğini ortaya koymuştur. Bu gen bölgelerinden birisi de bizim çalışmamızda olduğu gibi intron 14 bölgesi idi (96).

Wei ve ark. (94) Han Çin popülasyonunda yüksek miyopi ile HGF gen polimorfizmini ilişkilendirdikleri çalışmada HGF5-5b, HGF9, HGF10b SNP'lerini araştırmışlar ve HGF5-5b gen bölgesi polimorfizmini, miyopi yatkınlığı ile ilişkili olarak bulmuşlardır. Yine bir başka çalışmada hafif-orta miyopi grubu ile HGF SNP rs3735520, HGF haplotipleri rs2286194-rs3735520-rs17501108 ve rs12536657-rs2286194 arasında güçlü ilişkinin olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada yüksek miyopi ile rs2286194 arasında da ilişki olduğu belirlenmiştir (95) .

Biz çalışmamızda HGF serum düzeyini ELISA yöntemi ile ölçtük. Üriner sistem taş hastalığı olan kişilerin serum HGF düzeylerini kontrol grubuna göre düşük bulduk. Ayrıca HGF intron 13 ve 14 genotiplerinin serum HGF düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını tesbit ettik. Bu sonuçlara göre, HGF düşüklüğünün incelediğimiz gen bölgelerinin polimorfizmlerinden bağımsız olarak böbrek hücrelerinde apoptozis artışına ve buna bağlı kristal çökmesine neden olabileceği söylenebilir. Bu nedenle taş hastalarında serum HGF düzeyleri ile renal hücre apoptozisi arasındaki ilişkinin irdeleneceği çalışmalara ihtiyaç vardır.

HGF, myokardial hücrelerde de apoptozisi önleyerek ve iskemik alandaki kan damarı oluşumunu artırarak myokardın korunmasında fonksiyon görmektedir (108). Chen ve ark. (109) deney hayvanlarında iskemi öncesi HGF gen transferinin myokardial alan infarkt büyüklüğünü azalttığını, angiogenez ve Bcl-2 ekspresyonunu artırarak antiapoptotik, antioksidan ve antifibrotik etkisi ile sol ventrikül fonksiyonlarını koruduğunu göstermişlerdir.

Bell ve ark. (110) obez kişilerde zayıf kişilere göre serum HGF düzeyinin daha yüksek olduğunu, obez kişilerdeki adipoz dokudan kaynaklanan yükselmiş HGF düzeyinin kilo kaybı ile azalabileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Nishimura ve ark. (111) proliferatif retinopatili diabetlilerde, retinopatisi olmayan diabetlilere göre serum HGF düzeyinin daha yüksek olduğunu ve bu yüksekliğinde proliferatif retinopatide neovaskülarizasyon mekanizmasından sorumlu olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada diyabete ilaveten komplikasyon olarak periferik damar hastalığı olanlarda olmayanlara göre HGF düzeyinin daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Serum ya da kanserli dokudaki HGF konsantrasyonu ile kanser ve hastalığın seyri arasındaki ilişki literatürde çokca araştırılmıştır. Meme kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada meme kanserli hastalarda HGF düzeyinin yüksekliği ile TNM evrelemesi arasında paralel bir ilişki olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte preoperatif dönemde hastalığın şiddetinin belirlenmesinde HGF'nin kullanılması içinde daha detaylı çalışmalar yapılması gerektiği ifade edilmiştir (112). Toiyama ve ark. (113) kolorektal kanserlerde yükselmiş serum HGF düzeyi ile tümör oluşumu, lenf nodu, uzak metastaz ve kısalmış sağkalım arasında ilişki olduğunu ve HGF düzeyinin sağkalım için bağımsız risk faktörü olduğunu ifade etmişlerdir.

Mevcut çalışmada 24 saatlik idrarda sitrat, oksalat, kalsiyum ve ürik asit ölçümlerini yaptık. 24 saatlik idrarda kalsiyum konsantrasyonu hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek idi. Yükselmiş idrar kalsiyum atılımı hem çocuk hem erişkin üriner sistem taşı olan kişilerde en sık görülen bozukluktur (17). Curhan ve ark. (114) tarafından yapılan ve 24 saatlik idrar biyokimyası ile taş oluşum riski arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmada taş hastalığı hikâyesi olan kişilerde idrarla kalsiyum atılımının taş hikâyesi olmayanlara göre daha yüksek olduğu tesbit edildi. Bu çalışmada yaş ve cinsiyete göre farklılıklar olsa bile, bu analit ölçümünün genel olarak taş oluşma riskini belirlemede önemli olabileceği sonucuna varıldı.

Yirmi dört saatlik idrar örneklerinde oksalat düzeyini hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olarak bulduk. Diyetle oksalat alımındaki değişimler, analitik metodlardaki farklılıklar ve askorbatın oksalata dönüşümü nedeni ile idrar oksalat düzeylerinde çalışmadan çalışmaya farklılıklar olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada hiperoksalürisi bulunan idiopatik kalsiyum oksalat taşı olan hastalarda üç ay süre ile normal kalsiyum, hayvansal protein ve tuz kısıtlanması ile idrar oksalat atılımının

azaldığını gösterilmiştir (115). Curhan ve ark. (114) hasta ve kontrol grubu arasında hiperoksalüri sıklığı açısından bir fark olmadığını, ancak erkeklerde bayanlara göre üç kat daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. Genel olarak kalsiyum taşı olan kişilerin %20'sinde hiperoksalüri bulunmaktadır.

İdrarla sitrat atılımının az olması, taş hastalarının büyük bir kısmında görülebilen kalsiyum taş oluşumu için bilinen bir risk faktörüdür (116) ve biz de önceki çalışma sonuçlarına uygun şekilde hasta grubunda 24 saatlik idrar sitrat düzeylerini daha düşük tesbit ettik. Sitrat kalsiyumla çözünebilir kompleksler oluşturarak kalsiyumun iyonik konsantrasyonunu düşürmesinin yanı sıra COM kristallerinin oluşmasını, büyümesini ve agregasyonunu da inhibe etmektedir. Yine sitratın Tamm-Horsfall protein gibi kristalizasyon inhibitörü proteinlerin etkilerini de artırdığı gösterilmiştir (117). Bu etkilerinden dolayı idrar sitrat düzeyinin düşük olması, taş oluşum riskinde artışa neden olmaktadır. Bu nedenle oral olarak potasyum sitrat verilmesi taş hastalığının tekrarlanmasının önlenmesinde etkili bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Miyake ve ark. (118) çocuklarda taş hastalığının daha az sıklıkta görülmesinin nedeni olarak erişkinlerden daha yüksek idrar sitrat atılımı olduğunu göstermişlerdir.

Marickar (119) tarafından yapılan bir çalışmada, idrar kalsiyum ve oksalat düzeylerinin kalsiyum oksalat taşı olan kişilerde kontrol grubu ve gut hastalığı olan kişilere göre daha yüksek, sitrat düzeyinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada ürik asit taşı, kalsiyum oksalat taşı veya gut hastalığı olanlarda idrar ürik asit düzeylerinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

İdrarla artmış ürik asit atılımı kalsiyum taşlarının yaklaşık olarak %10'ununda görülebilen bir metabolik anormalliktir (52,59). Ancak çalışmamızda İdrar ürik asit düzeyleri açısından iki grup arasında önemli farklılık bulunamadı. Curhan ve ark. (120) ise idrar ürik asit atılımının artması ile taş oluşum riski artmadığını aksine azaldığını bildirmişlerdir. Bu sonucun sebebi olarak ta hastaların taş nedeni ile pürin içeriği az gıda ile beslenmeleri belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada idrar kalsiyum ve oksalat atılımının artışı ile taş oluşum riskinin arttığını, sitrat atılımı ve idrar volumünün artışı ile de taş oluşum riskinin azaldığını bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (121) obesite insidansındaki artışa bağlı olarak hiperürikozürinin son yıllarda en sık görülen üriner metabolik anormallik olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Belirtilen idrar analitlerinin klinik önemi yüksek veya düşük olmaları ile tanımlanmış olmasına rağmen sadece bunların sonuçlarına göre belli bir risk düzeyi tanımlanması zordur. Çünkü risk faktörleri fazladır ve idrar bileşenleri yaş, cinsiyet, iklim ve diyetle göre geniş bir aralıkta değişmektedir. Ürik asit atılımı da, vücut kitle indeksinden, 24 satlik idrar örneği toplanırken fazla pürin tüketiminden etkilenebilmektedir.

Auge ve ark. (122) metabolik anormalliklerin taş oluşumuna katkıda bulunduğu bilgilerinden hareketle cerrahi tedavi görmüş ve kalisiyel divertikül taşı olan hastalarda etkili selektif tedaviyi belirlemek amacı ile metabolik analizler yapmışlar. Endoskopik tedavi yapılmış kalisiyel divertikül taşı olan ve rastgele seçilmiş taş hastalarının 24 satlik idrar örneklerinden elde edilen hiperkalsiüri, hiperoksalüri, hipositratüri ve hiperürükozüri bulgularının her iki grupta da benzer olduğunu bulmuşlardır. Kalisiyel divertikül taşı olan hastalarda, anatomik bozukluk nedeni ile oluşan üriner stazın, taş oluşumunu açıklamak için yeterli olmadığını birlikte anatomik olarak normal kalsiyum taşı olan kişilere benzer şekilde metabolik bozuklukların da olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle 24 saatlik idrar analiz sonuçları taş rekürrensini azaltmak için kullanılcak olan medikal tedavi içinde bir öngörü sağlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, üriner sistem taş hastalığı olan 105 kişi ve sağlıklı 70 kişiden hem kan hem de 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Kan örneklerinden serum ayırma tüpünde olanlar uygun hızda santrifüjlenerek serumları ayrıldı. İdrar ve serum örnekleri alikotlanarak, EDTA'lı olanlar ise DNA izolasyonu için herhangi bir işleme tabi tutulmadan derin dondurucuda saklandı.

Hastalardan daha sonra endoürolojik yöntemlerle veya spontan pasajla üriner sistem taşları elde edildi. Bu taşların cinsi hassas bir yöntem olan 'X-ray diffraction' metodu ile tayin edildi. Bu işlem *Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü*'nde yapıldı. Taş analizi sonuçlarına göre 103 hastada kalsiyum, 4 hastada ürik asit, 1 hastada sistin ve 1 hastada ise strüvit taşı olduğu tesbit edildi.

HGF proteinine ait 2 bölgedeki polimorfizmler için genetik çalışma yapıldı. Ticari kit kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. HGF geni intron 13 C>A baz değişimi (rs2074725) ve intron 14'deki T>C baz değişimi (rs2074724) analizleri, real-time PCR (RT-PCR) kullanılarak TaqMan allelik diskriminasyon yöntemi ile belirlendi. Çalışma sonunda HGF geni intron 13 ve 14'deki SNP'ler ile üriner sistem taş hastalığı arasında önemli bir ilişki bulunamadı. Yine allel sıklığı açısından HGF geni intron 13 için A ve C alleli, intron 14 için C ve T allelinin hasta ve kontrol grubu arasında farklılık olmadığı görüldü.

Serum HGF düzeyi, Human HGF ELİSA kiti (Biosource Cat No:KAC2211) kullanılarak mikroplyt okuyucuda (Bio-tek PowerWave XS) ölçüldü ve sonuçta taş hastalığı olan kişilerde serum HGF düzeyleri kontrol grubuna göre düşük bulundu. Ayrıca HGF intron 13 ve 14 genotiplerinin serum HGF düzeyleri üzerine etkisinin olmadığını belirledik. Bu sonuçlara göre, HGF düşüklüğünün gen polimorfizminden bağımsız olarak böbrek hücrelerinde apoptozis artışına ve buna bağlı kristal çökmesine neden olabileceğini düşünmekteyiz.

24 saatlik idrarda oksalat düzeyi Sigma marka kit kullanılarak enzimatik yöntem ile sitrat düzeyi ise sitrat liyaz enzimi kullanılarak Far Diagnostics marka kit kullanılarak ölçüldü. İdrar kalsiyum, ürik asit düzeyleri standart spektrofotometrik metodlar kullanılarak Cobas 6000 otoanalizöründe ölçüldü. Hasta grubunda kontrol grubuna göre idrar kalsiyum ve oksalat atılımının daha yüksek, sitrat atılımının ise daha

düşük olduğu bulundu. İdrar ürik asit düzeyleri açısından ise iki grup arasında önemli farklılık gözlenmedi.

Sonuç olarak; genetik, anatomik, metabolik ve çevresel faktörlerin etkileşiminin sonucunda kompleks bir şekilde meydana gelen taş hastalığında genetik çalışmalar artık bir takım veriler sunmaya başlamıştır. Taş hastalığı olan kişilerin idrar bileşimi ve kalsifikasyonda rolü olan veya olabileceği düşünülen diğer aday proteinler proteomik çalışmalar ile, bu proteinlerin genleri de genetik çalışmalarla incelenebilir. Böylece bu çalışmaların ışığında klinik kullanıma girebilecek biyomoleküller belirlenerek günümüzde hala önemli bir sağlık sorunu olan üriner sistem taş hastalığının çözümüne önemli katkılar sağlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Özkeçeli R, Satar N, Doran Ş ve ark. Üriner Sistem Taş Hastalığı. İçinde: Anafarta K, Göğüş A, Bedük Y, Arıkan N, (Ed). Temel Üroloji. Ankara. Güneş Kitabevi. 1998.
2. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984; 122:1450–1459.
3. Nakamura T, Nishizawa M, Hagiya T, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor, *Nature* 1989; 342: 440–443.
4. Boros P, M Miller C. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine. *Lancet* 1995; 345: 293-295.
5. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int.* 2001; 59: 2023-2038.
6. Liu Y. Hepatocyte growth factor and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002; 11: 23-30.
7. Tei N, Tsujihata M, Tsujikawa K, Yoshimura K, Nonomura N, Okuyama A. Hepatocyte growth factor has protective effects on crystal-cell interaction and crystal deposits. *Urology.* 2006; 67: 864-869.
8. Ozokutan BH, Küçükaydın M, Gündüz Z, Kabaklioğlu M, Okur H, Turan C. Urolithiasis in childhood. *Pediatr Surg Int.* 2000; 16: 60-63
9. Gao B, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of the osteopontin gene is related to urinary calcium stones. *J Urol.* 2005; 174: 1472-1476.
10. Gao B, Yasui T, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. A polymorphism of matrix Gla protein gene is associated with kidney stones. *J Urol* 2007; 177: 2361–2365.
11. Gambaro G, Vezzol G, Casari G, Rampoldi L, Angelo AD, Borghi L. Genetics of hypercalciuria and calcium nephrolithiasis: from the rare monogenic to the common polygenic forms. *Am J Kidney Dis.* 2004; 44:963-986.
12. López M, Hoppe B. History, epidemiology and regional diversities of urolithiasis. *Pediatr Nephrol.* 2008; 25: 49-59.

13. Trinchieri A. Epidemiology of urolithiasis. *Arch Ital Urol Androl.* 1996; 68: 203-249.
14. Bak M, Ural R, Agin H, Serdaroglu E, Calkavur S. The metabolic etiology of urolithiasis in Turkish children. *Int Urol Nephrol.* 2009; 4: 453-460
15. Taylor EN, Stampfer MJ, Curhan GC. Obesity, weight gain, and the risk of kidney stones. *JAMA.* 2005; 293: 455-462.
16. Tiselius HG. Stone incidence and prevention. *Braz J Urol* 2000; 26: 452–462.
17. Worcester EM, Coe FL. Nephrolithiasis. *Prim Care.* 2008; 35: 369-390.
18. Gillen DL, Coe FL, Worcester EM. Nephrolithiasis and increased blood pressure among females with high body mass index. *Am J Kidney Dis.* 2005; 46: 263-269.
19. Coe FL, Parks JH, Asplin JH: The pathogenesis and treatment of kidney stones. *N Engl J Med* 1992; 327: 1141-1152.
20. Goldfarb DS, Fischer ME, Keich Y, Goldberg J. A twin study of genetic and dietary influences on nephrolithiasis: a report from the Vietnam Era Twin (VET) Registry. *Kidney Int* 2005; 67: 1053–1061.
21. Menon M, Koul H. Clinical review 32: Calcium oxalate nephrolithiasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 703-710.
22. Tellaloğlu R, Ander H. Stones in children. *Türk J Pediatr* 1984; 26: 51-60.
23. Miyake O, Yoshimura K, Tsujihata M, et al. Possible causes for the low prevalence of pediatric urolithiasis. *Urology.* 1999; 53: 1229-1234.
24. Miyake O, Kakimoto K, Tsujihata M, Yoshimura K, Takahara S, Okuyama A. Strong inhibition of crystal-cell attachment by pediatric urinary macromolecules: a close relationship with high urinary citrate secretion. *Urology.* 2001; 58: 493-497.
25. Tefekli A, Esen T, Ziylan O, et al. Metabolic risk factors in pediatric and adult calcium oxalate urinary stone formers: is there any difference. *Urol Int.* 2003; 70: 273-277.
26. Soucie JM, Coates R, McClellan W, Austin H, Thun M. Relation between geographic variability in kidney stones prevalence and risk factors for stones. *Am J Epidemiol.* 1996; 143: 487–495.
27. Siener R, Hesse A. Fluid intake and epidemiology of urolithiasis. *Eur J Clin Nutr.* 2003; 57: 47-51.

28. Miller NL, Evan AP, Lingeman JE. Pathogenesis of renal calculi. *Urol Clin North Am.* 2007; 34: 295-313.
29. Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J Clin Invest* 2005; 115: 2598–2608.
30. Bushinsky DA. Nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9: 917-924
31. Khan SR, Maslamani SA, Atmani F et al. Membranes and their constituents as promoters of calcium oxalate crystal formation in human urine. *Calcif Tissue Int.* 2000; 66: 90-96.
32. Tiselius HG, Bek-Jensen H, Fornander AM, Nilsson MA. Crystallization properties in urine from calcium oxalate stone formers. *J Urol.* 1995; 154: 940-946.
33. Kumar V, Lieske JC. Protein regulation of intrarenal crystallization. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15: 374-380.
34. Marangella M, Bagnis C, Bruno M, Vitale C, Petrarulo M, Ramello A. Crystallization inhibitors in the pathophysiology and treatment of nephrolithiasis. *Urol Int.* 2004; 72: 6-10.
35. Orson W Moe. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet.* 2006; 367: 333-344.
36. Schlieper G, Westenfeld R, Brandenburg V, Ketteler M. Inhibitors of calcification in blood and urine. *Semin Dial.* 2007; 20: 113-121.
37. Bergsland KJ, Kelly JK, Coe BJ, Coe FL. Urine protein markers distinguish stone-forming from non-stone-forming relatives of calcium stone formers. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291:530-536.
38. Højgaard I, Tiselius HG. Crystallization in the nephron. *Urol Res.* 1999; 27: 397-403.
39. Evan AP. Physiopathology and etiology of stone formation in the kidney and the urinary tract. *Pediatr Nephrol.* 2009; (in press).
40. Hess B, Ryall RL, Kavanagh JP, et al. Methods for measuring crystallization in urolithiasis research: why, how and when? *Eur Urol.* 2001; 40: 220-230.
41. Tiselius HG, Lindbäck B, Fornander AM, Nilsson MA. Studies on the role of calcium phosphate in the process of calcium oxalate crystal formation. *Urol Res.* 2009; 37: 181-192.

42. Khan SR, Byer KJ, Thamilselvan S, et al. Crystal-cell interaction and apoptosis in oxalate-associated injury of renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 14: 457-463.
43. Khaskhali MH, Byer KJ, Khan SR. The effect of calcium on calcium oxalate monohydrate crystal-induced renal epithelial injury. *Urol Res.* 2009; 37: 1-6.
44. Jonassen JA, Kohjimoto Y, Scheid CR, Schmidt M. Oxalate toxicity in renal cells. *Urol Res.* 2005; 33: 329-339.
45. Khand FD, Gordge MP, Robertson WG, Noronha-Dutra AA, Hothersall JS. Mitochondrial superoxide production during oxalate-mediated oxidative stress in renal epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 32: 1339-1350.
46. Thamilselvan S, Selvam R. Effect of vitamin E and mannitol on renal calcium oxalate retention in experimental nephrolithiasis. *Indian J Biochem Biophys.* 1997; 34: 319-323.
47. Tsujihata M, Yoshimura K, Tsujikawa K, Tei N, Okuyama A. Fibronectin inhibits endocytosis of calcium oxalate crystals by renal tubular cells. *Int J Urol.* 2006; 13: 743-746.
48. Srinivasan S, Kalaiselvi P, Varalakshmi P. Epitaxial deposition of calcium oxalate on uric acid rich stone matrix is induced by a 29 kDa protein. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 267–274.
49. Marangella M, Vitale C, Bagnis C, Bruno M, Ramello A. Idiopathic calcium nephrolithiasis. *Nephron.* 1999; 8: 38-44.
50. Park S, Pearle MS. Pathophysiology and management of calcium stones. *Urol Clin North Am.* 2007; 34: 323-334.
51. Worcester EM, Coe FL. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria. *Semin Nephrol.* 2008; 28: 120-132.
52. Colella J, Kochis E, Galli B, Munver R. Urolithiasis/nephrolithiasis: what's it all about? *Urol Nurs.* 2005; 25: 427-448.
53. Leumann E, Hoppe B. The primary hyperoxalurias. *J Am Soc Nephrol.* 2001 ; 12: 1986-1993.
54. Danpure CJ. Primary hyperoxaluria type 1: AGT mistargeting highlights the fundamental differences between the peroxisomal and mitochondrial protein import pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763: 1776-1784.

55. Delaney MP, Price CP, Newman DJ, Lamb E. Kidney Disease. İçinde: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. USA. Elsevier Saunders. 2006: 1671-1745.
56. Healy KA, Ogan K. Pathophysiology and management of infectious staghorn calculi. *Urol Clin North Am.* 2007; 34: 363-374.
57. Cameron MA, Sakhaee K. Uric acid nephrolithiasis. *Urol Clin North Am.* 2007; 34: 335-346.
58. Daudon M, Lacour B, Jungers P. High prevalence of uric acid calculi in diabetic stone formers. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20: 468-469.
59. Abate N, Chandalia M, Cabo-Chan AV Jr, Moe OW, Sakhaee K. The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int* 2004; 65: 386-392.
60. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Stampfer MJ. Family history and risk of kidney stones. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8: 1568-1573.
61. Sritippayawan S, Borvornpadungkitti S, Paemanee A, et al. Evidence suggesting a genetic contribution to kidney stone in northeastern Thai population. *Urol Res.* 2009; 37: 141-146.
62. Gao B, Yasui T, Itoh Y, et al. Association of osteopontin gene haplotypes with nephrolithiasis. *Kidney Int.* 2007; 72: 592-598.
63. Miyazawa K, Aihara K, Ikeda R, Moriyama MT, Suzuki K. cDNA macroarray analysis of genes in renal epithelial cells exposed to calcium oxalate crystals. *Urol Res.* 2009; 37: 27-33.
64. Sayer JA. The genetics of nephrolithiasis. *Nephron Exp Nephrol.* 2008; 110: 37-43.
65. Brancaccio D, Biondi ML, Gallieni M, et al. Matrix GLA protein gene polymorphisms: clinical correlates and cardiovascular mortality in chronic kidney disease patients. *Am J Nephrol* 2005; 25: 548-552.
66. Schafer C, Heiss A, Schwarz A, et al. The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003; 112: 357-366.

67. Aksoy H, Aksoy Y, Öztürk N, Aydın HR, Yıldırım AK, Akçay F. Fetuin-A Gene Polymorphism in Patients With Calcium Oxalate Stone Disease. *Urology*. 2009; (in press).
68. Khan SR, Canales BK. Genetic basis of renal cellular dysfunction and the formation of kidney stones. *Urol Res*. 2009; 37: 169-180.
69. Vargas GA, Hoeflich A, Jehle PM. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney Int*. 2000; 57: 1426-1436.
70. Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H. Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev*. 2003; 22: 223-236.
71. Miyazawa K, Wang Y, Minoshima S, Shimizu N, Kitamura N. Structural organization and chromosomal localization of the human hepatocyte growth factor activator gene--phylogenetic and functional relationship with blood coagulation factor XII, urokinase, and tissue-type plasminogen activator. *Eur J Biochem*. 1998; 258: 355-361.
72. Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem*. 1995; 270: 603-611.
73. Stella MC, Comoglio PM. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999; 31: 1357-1362.
74. Matsumoto K, Nakamura T. Renotropic role and therapeutic potential of HGF in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 9: 59-61.
75. Nakamura T. Structure and function of Hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res*. 1991;3: 67-85.
76. Mizuno K, Inoue H, Hagiya M, et al. Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem*. 1994; 269: 1131-1136.
77. Mizuno K, Nakamura T. Molecular characteristics of HGF and the gene, and its biochemical aspects. *Exs*. 1993; 65: 1-29.
78. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 287: 7-16.

79. Schievenbusch S, Strack I, Scheffler M, et al. Profiling of anti-fibrotic signaling by hepatocyte growth factor in renal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 385: 55-61.
80. Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol*. 1998; 8: 404-410.
81. Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-Met Signaling in the Control of Branching Morphogenesis and Invasion. *J Cell Biochem*. 2003; 88: 408-417.
82. Matsumoto K, Mizuno S, Nakamura T. Hepatocyte growth factor in renal regeneration, renal disease and potential therapeutics. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000; 9: 395-402.
83. Jiang WG, Martin TA, Parr C, Davies G, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor, it's receptor, and potantial value in cancer therapies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005; 53: 35-69.
84. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 639-644.
85. Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol*. 1994; 266: 129-134.
86. Vijayan A, Martin DR, Sadow JL, Kissane J, Miller SB. Hepatocyte growth factor inhibits apoptosis after ischemic renal injury in rats. *Am J Kidney Dis*. 2001; 38: 274-278.
87. Mizuno S, Kurosawa T, Matsumoto K, Mizuno-Horikawa Y, Okamoto M, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents renal fibrosis and dysfunction in a mouse model of chronic renal disease. *J Clin Invest*. 1998; 101: 1827-1834.
88. Sarica K, Yagci F, Bakir K, et al: Renal tubular injury induced by hyperoxaluria: evaluation of apoptotic changes. *Urol Res*. 2001; 29: 34–37.
89. Sarica K, Erbagci A, Yagci F, Bakir K, Erturhan S, Uçak R. Limitation of apoptotic changes in renal tubular cell injury induced by hyperoxaluria. *Urol Res*. 2004; 32: 271–277.

90. Nishino M, Iimuro Y, Ueki T, Hirano T, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes. *Surgery*. 2008; 144: 374-384.
91. Balasubramanian SP, Brown NJ, Reed MW. Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 2002; 87: 1057-1065.
92. Takiuchi S, Mannami T, Miyata T at al. Identification of 21 single nucleotide polymorphisms in human hepatocyte growth factor gene and association with blood pressure and carotid atherosclerosis in the Japanese population. *Atherosclerosis*. 2004; 173: 301-307.
93. Motone M, Katsuya T, Ishikawa K at al. Association between hepatocyte growth factor gene polymorphism and essential hypertension *Hypertens Res*. 2004; 27: 247-251.
94. Han W, Yap MK, Wang J, Yip SP. Family-based association analysis of hepatocyte growth factor (HGF) gene polymorphisms in high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47: 2291-2299.
95. Yanovitch T, Li YJ, Metlapally R, Abbott D, Viet KN, Young TL. Hepatocyte growth factor and myopia: genetic association analyses in a Caucasian population. *Mol Vis*. 2009; 15: 1028-1035.
96. Toyoda T, Nakamura K, Yamada K et al. SNP analyses of growth factor genes EGF, TGFbeta-1, and HGF reveal haplotypic association of EGF with autism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 360: 715-720.
97. Güler Temizkan, Nazlı Arda. Eds. *Moleküler Biyolojide kullanılan yöntemler*. Genişletilmiş 2. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, 2004; 90-120.
98. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 1992; 10: 413-417.
99. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006; 27: 95-125.
100. Provenzano M, Mocellin S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 593: 66-73.

101. Aldape K, Ginzinger DG, Godfrey TE. Real-time quantitative polymerase chain reaction: a potential tool for genetic analysis in neuropathology. *Brain Pathol.* 2002; 12: 54-66.
102. Macabeo-Ong M, Ginzinger DG, Dekker N, et al. Effect of duration of fixation on quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analyses. *Mod Pathol.* 2002; 15: 979-987.
103. Ferraz RR, Baxmann AC, Ferreira LG, et al. Preservation of urine samples for metabolic evaluation of stone-forming patients. *Urol Res.* 2006; 34: 329-337.
104. Bid HK, Kumar A, Kapoor R, Mittal RD. Association of vitamin D receptor-gene (FokI) polymorphism with calcium oxalate nephrolithiasis. *J Endourol.* 2005; 19: 111-115.
105. Balkovetz DF. Hepatocyte growth factor and Madin-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. *Microsc Res Tech.* 1998; 43: 456-463
106. Nakamura S, Moriguchi A, Morishita R et al. A novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), as a potential index of the severity of hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 242: 238-243.
107. Nakamura Y, Morishita R, Nakamura S, Aoki M, Moriguchi A, Matsumoto K, Nakamura T, Higaki J, Ogihara T. A vascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure. *Hypertension.* 1996; 28: 409-413.
108. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1511-1519.
109. Chen XH, Minatoguchi S, Kosai K, et al. In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions. *J Card Fail.* 2007; 13: 874-883.
110. Bell LN, Ward JL, Degawa-Yamauchi M, et al. Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006; 291: 843-848.
111. Nishimura M, Nakano K, Ushiyama M, et al. Increased serum concentrations of human hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83: 195-198.

112. Sheen-Chen SM, Liu YW, Eng HL, Chou FF. Serum levels of hepatocyte growth factor in patients with breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14: 715-717.
113. Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Okugawa Y, Tanaka K, Kusunoki M. Serum hepatocyte growth factor as a prognostic marker for stage II or III colorectal cancer patients. *Int J Cancer.* 2009; 125: 1657-1662.
114. Curhan GC, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Twenty-four-hour urine chemistries and the risk of kidney stones among women and men. *Kidney Int* 2001; 59: 2290–2298.
115. Nouvenne A, Meschi T, Guerra A, et al. Diet to reduce mild hyperoxaluria in patients with idiopathic calcium oxalate stone formation: a pilot study. *Urology.* 2009; 73: 725-730
116. Hamm LL, Hering-Smith KS. Pathophysiology of hypocitraturic nephrolithiasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2002; 31: 885–893.
117. Hess B, Jordi S, Zipperle L, Ettinger E, Giovanoli R. Citrate determines calcium oxalate crystallization kinetics and crystal morphology-studies in the presence of Tamm-Horsfall protein of a healthy subject and a severely recurrent calcium stone former. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: 366-374.
118. Miyake O, Yoshimura K, Yoshioka T, Koide T, Okuyama A. High urinary excretion level of citrate and magnesium in children: potential etiology for the reduced incidence of pediatric urolithiasis. *Urol Res.* 1998; 26: 209–213.
119. Fazil Marickar YM. Calcium oxalate stone and gout. *Urol Res.* 2009; (in press).
120. Curhan GC, Taylor EN. 24-h uric acid excretion and the risk of kidney stones. *Kidney Int.* 2008; 73: 489-496.
121. Kim YJ, Ha YS, Jo SW, et al. Changes in urinary lithogenic features over time in patients with urolithiasis. *Urology.* 2009; 74: 51-55.
122. Auge BK, Maloney ME, Mathias BJ, Pietrow PK, Preminger GM. Metabolic abnormalities associated with calyceal diverticular Stones. *BJU Int.* 2006; 97: 1053-1056.

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ERZURUM

**DOĞU ANADOLU BÖLGESİNDE ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI OLAN
KİŞİLERDE HEPATOCYTE GROWTH FACTOR GEN POLİMORFİZMİNİN
ÖNEMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK

Dekanlık makamının 11.02.2010 Tarih ve B.30.2.ATA.0.01.02/852 sayılı yazıları ile gönderilen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden Nurinnisa ÖZTÜRK'e ait "Doğu Anadolu Bölgesinde Üriner Sistem Taş Hastalığı Olan Kişilerde Hepatocyte Growth Factor Gen Polimorfizminin Öneminin Araştırılması" adlı tez tarafımızdan incelendi.

Amaç, genel bilgiler, materyal ve metot, bulgular ve tartışma ve sonuç bakımından yeterli nitelikte olup, doyurucu ve güncel literatür kullanımı ile bu tezin uzmanlık tezi için yeterli olabileceği kanaatine varıldı.

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi : 29.12.2004

Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi : 03.03.2010

Uzmanlık Sınavı Tarihi : 03.03.2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Hülya AKSOY

Jüri : Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Jüri : Prof. Dr. Fatih AKÇAY

Jüri : Prof. Dr. Erhan VAROĞLU

Jüri : Prof. Dr. Hülya AKSOY

Jüri : Prof. Dr. Yılmaz AKSOY

Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

**MART 2010
ERZURUM**