

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KALSİYUM OKZALAT BÖBREK TAŞI OLAN HASTALARDA
KLAUDİN (CLDN) GEN AİLESİ ÜYELERİNİN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ÜMİT UYSAL**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÖMER LEVENT TUNCAY**

DENİZLİ – 2021

**T.C
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**KALSİYUM OKZALAT BÖBREK TAŞI OLAN HASTALARDA
KLAUDİN (CLDN) GEN AİLESİ ÜYELERİNİN EKSPRESYON
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. ÜMİT UYSAL**

**DANIŞMAN
PROF. DR. ÖMER LEVENT TUNCAY**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 21.04.2020 tarih ve 2020TPF009 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2021

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince; bilgi, birikim ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, hem tez hazırlama hem de Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda geçen beş yıllık eğitim hayatım boyunca bana yol gösteren ve yetişmemde büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ömer Levent TUNCAY'a, tez hazırlama ve yazım süresince ilgisi ve yardımlarından dolayı desteğiyle bana rehberlik eden, deneyimlerini hoşgörü ve anlayış çerçevesi içerisinde daima bana aktaran Prof. Dr. Vildan CANER'e, eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini hoşgörülle bana aktaran , sabır ve sevgiyle yaklaşımlarını hiç eksik etmeyen Üroloji Anabilim Dalı başkanı hocam Prof. Dr. Tahir TURAN'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Zafer AYBEK'e, Prof. Dr. Ali Ersin ZÜMRÜTBAŞ'a, Dr. Öğr. Üyesi Yusuf ÖZLÜLERDEN'e, Dr. Öğr. Üyesi Sinan ÇELEN'e ayrıca araştırmamın uygulama ve yazım aşamasında fikirleri ve yardımlarıyla bana destek olan Arş. Gör. Dr. İkbal Cansu BARIŞ'a ve birlikte zevkle çalıştığım asistan arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim. Son olarak, hayatım boyunca her türlü fedakarlıktan kaçınmayan, varlıklarıyla hayatıma anlam katan, sevgi ve destekleri ile bugünlere gelmemde en büyük katkıları olan değerli aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY	xiii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	5
BÖBREK ANATOMİSİ, FİZYOLOJİSİ VE FONKSİYONU	5
Böbrek Anatomisi.....	5
Böbreğin Fizyolojisi ve Fonksiyonu.....	10
BÖBREK TAŞI.....	12
Kalsiyum okzalat taşları	13
Kalsiyum fosfat taşları	14
Ürik asit taşları.....	14
Struvit taşları.....	14
Sistin taşları	14
TAŞ OLUŞUM MEKANİZMASI	17
Supersatürasyon Teorisi.....	17
Kristal Çekirdeklenme	17
Kristal Büyümesi	18
Kristal Agregasyonu	18
KALSİYUM OKZALAT TAŞ OLUŞUMUNUN İNHİBİTÖRLERİ.....	19
Glikozaminoglikanlar (GAGS).....	19
Kristal Matriks Protein Extratı (CME)	19
Albumin	20
Uriner Protrombin Fragman 1 (UPTF1).....	20
Bikunin	20

Nefrokalsin	20
Osteopontin.....	21
SIKI BAĞLANTILAR.....	21
Zonula Okludensler	22
<i>Okludinler</i>	23
<i>Kludinler (CLDN)</i>	23
MATERYAL VE YÖNTEM	28
BÖBREK DOKUSU ÖRNEKLERİNDEN TOTAL RNA İZOLASYONU	29
BÖBREK DOKUSUNA AİT TOTAL RNA ÖRNEKLERİNİN SAFLIK DERECELERİNİN VE KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ	30
cDNA SENTEZİ	31
GERÇEK-ZAMANLI KANTİTATİF PCR YÖNTEMİ İLE GEN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ.....	31
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
BULGULAR	35
TARTIŞMA	42
SONUÇLAR	52
KAYNAKLAR	54

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BKİ	: Beden Kitle İndeksi
Ca	: Kalsiyum
CA	: Kanser
CaOx	: Kalsiyum Okzalat
CaP	: Kalsiyum Fosfat
<i>CasR</i>	: Kalsiyum Algılayıcı Reseptör
cDNA	: Komplementer DNA
<i>CLDN</i>	: <i>Klaudin</i>
CME	: Kristal Matriks Protein Extratı
COD	: Kalsiyum Dihidrat
COM	: Kalsiyum Monohidrat
COT	: Kalsiyum Trihidrat
dl	: Desilitre
DM	: Diabetes Mellitus
FHHNC	: Ailesel Hipomagnezemik Hiperkalsiürik Nefrokalsinoz
GAGS	: Glikozaminoglikanlar
GFH	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
GPX3	: Glutasyon Peroksidaz 3
GUK	: Guanilat Kinaz
GWAS	: Genom Çaplı İlişkilendirme Çalışması
H	: Hidrojen
HT	: Hipertansiyon
IL11	: Interleukin 11
JAM	: Junctional Adesyon Molekül/ Bağlantı Adezyon Molekülü
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
kDa	: Kilodalton
KOAH	: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LCN-2	: Lipocalin 2
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram

Na	: Sodyum
NALCN	: Sodium Leak Channel Nonselective Protein
NC	: Nefrokalsin
PCR	: Polymerase Chain Reaction- Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDZ	: Postsynaptic Density Protein/ Disc Large/Zonula-occludens
PEC	: Parietal Epitel Hücreleri
PN	: Piyelonefrit
PT	: Proksimal Renal Tübül
PTGS1	: Prostaglandin Endoperoxide Synthase 1
RCC	: Renal Cell Carcinom- Renal hücreli karsinom
RNA	: Ribonükleik Asid
ROMK	: Renal Outer Medullary Potassium Channel
RP	: Randall Plakları
RS	: Süper Doyma Oranı
TALH	: Henle Kıvrımının Kalın Yükselen Kolu
TCC	: Transizyonel Hücreli Karsinom
THP	: Tamm Horsfall Proteini
TJ	: Tight Junction
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü- α
UPTF1	: Uriner Protrombin Fragmanı 1
VCI	: Vena Cava İnferior
ZO	: Zonula Okludensler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Böbreklerin Genel Görünümü (16)	6
Şekil 2.	Böbrek ve Gerota Fasyası (16).....	7
Şekil 3.	Böbreğin Vasküler Anatomisi (Ekstrarenal).....	9
Şekil 4.	Böbreğin Vasküler Anatomisi (İntrarenal).....	9
Şekil 5.	Sıkı Bağlantı ve Skaffold Proteinleri (9).....	22
Şekil 6.	ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 İntegral Skaffold Sıkı Bağlantı Proteinleri ve Diğer Proteinler ile Etkileşimleri (71).....	23
Şekil 7.	<i>Klaudin (CLDN)</i> Protein Modeli (14).....	24
Şekil 8.	Böbrek Tübülündeki <i>Klaudin (CLDN)</i> Lokalizasyonu (79)	27
Şekil 9.	Hasta ve Kontrol Grubunun Ek Hastalık Bilgileri	36
Şekil 10.	Hasta ve Kontrol Gruplarının <i>CLDN</i> Ortalama Gen Ekspresyon Profillerinin Karşılaştırılması.....	38
Şekil 11.	Hasta Grubunda Yer Alan 3 Bireye Ait β - <i>aktin</i> ve <i>CLDN 1</i> Amplifikasyon Eğrileri (K: Kontrol, H: Hasta, NTC: Negatif Template Control)	38
Şekil 12.	Kontrol Grubunda Yer Alan 3 Bireye Ait β - <i>aktin</i> ve <i>CLDN 1</i> Amplifikasyon Eğrileri. (K: Kontrol, H: Hasta, NTC: Negatif Template Control)	39

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Taşların Oluşum Nedenlerine Göre Gruplandırılması (35).....	15
Tablo 2.	Üriner Sistem Taşlarının Bileşenleri (35)	15
Tablo 3.	cDNA Sentezinde Tek Bir Örnek İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı. 31	
Tablo 4.	cDNA Sentezinde Thermal Cycler Cihazında Uygulanan Protokol	31
Tablo 5.	Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primer ve Prob Dizileri	32
Tablo 6.	Ekspresyon Analizi İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı.....	33
Tablo 7.	Ekspresyon Analizinde Kullanılan Gerçek-Zamanlı PCR Protokolü	33
Tablo 8.	Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Verileri.....	35
Tablo 9.	Hasta ve Kontrol Grubunun Ek Hastalık Bilgileri	36
Tablo 10.	Hasta ve Kontrol Grubunun <i>CLDN</i> Gen Ekspresyon Profilleri	37
Tablo 11.	Hasta Grubunun Korelasyon Analizi Sonuçları	39
Tablo 12.	Kontrol Grubunun Korelasyon Analizi Sonuçları.....	41

ÖZET

Kalsiyum Okzalat Böbrek Taşı Olan Hastalarda *Klaudin (CLDN)* Gen Ailesi Üyelerinin Ekspresyon Profillerinin Belirlenmesi

Dr. Ümit UYSAL

CLDN gen ailesi üyelerinde gözlenen genetik varyasyonların böbrek taşı oluşumundan sorumlu olabileceğine dair çalışmalar güncelliğini korumaktadır. Ancak, bu sorumlu gen ailesi üyelerinin birlikte ekspresyon profillerinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Kalsiyum okzalat taşı bulunan böbrek hastalarında ve sağlıklı kontrollerde taş oluşum mekanizmasından sorumlu tutulan *CLDN* gen ailesi üyelerinin ekspresyon durumlarını birlikte değerlendirmek ve karşılaştırma yapmayı araştırmayı amaçladık.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Kliniğine başvuran ve “Kalsiyum Okzalat Böbrek Taşı” tanısı almış, 19 hasta birey ile kalsiyum okzalat böbrek taşı tanısı almamış 21 kontrol birey çalışmaya dahil edildi. Böbrek taşı tanısı almış ve bu nedenle perkütan nefrolitotomi operasyonu yapılan çalışma grubundaki olgularda ve aynı şekilde böbrek taşı tanısı olmayan diğer nedenlerle ameliyat edilen kontrol grubundaki hastalarda ameliyat sırasında herhangi bir komplikasyona neden olmayacak şekilde böbrek dokusundan 10 mm³ biyopsi örnekleri alındı. Biyopsi örneklerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve hedef genlerin (*Klaudin 1,2,3,4,7,8,10,14,16,18,19*) ekspresyon profilleri gerçek-zamanlı PCR yöntemi ile belirlendi.

Kronik hastalıklarda hasta grubunda taş öyküsünün yanında DM ve HT sağlıklı kontrol grubundan daha fazlaydı. Hasta ve kontrol grubu arasında *CLDN 2, CLDN 3, CLDN 4, CLDN 7, CLDN 8, CLDN 10, CLDN 14, CLDN 16* ve *CLDN 19* gen ekspresyon profilleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p<0,050$). Ancak, kalsiyum okzalat böbrek taşına sahip olan hastalarda *CLDN 1* gen ekspresyonunun, kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat yüksek olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,050$). Aynı zamanda *CLDN 1* ekspresyonunun; *CLDN 4* ($r=0,642$), *CLDN 7* ($r=0,753$) ve *CLDN 14* ($r=0,651$) ile yüksek düzeyde pozitif

korelasyon gösterirken, *CLDN 2* ($r=0,470$) ve *CLDN 8* ($r=0,556$) ile de orta düzeyde pozitif yönde korelasyon gösterdiği saptandı.

Sonuç olarak, *CLDN 1* gen ekspresyon artışının kalsiyum okzalit taş oluşum patogenezinde rol oynayabileceğini, aynı zamanda *CLDN 2*, *CLDN 4*, *CLDN 7*, *CLDN 8* ve *CLDN 14* ile birlikte bu süreçten sorumlu olabileceklerini düşünüyoruz. Kalsiyum okzalit böbrek taşı patogenezinden sorumlu bu *CLDN* gen ailesi üyeleri ile ilgili daha geniş hasta grupları ile yapılacak çalışmalara ve fonksiyon çalışmalarına gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Klaudin, Böbrek Taşı, Gen Ekspresyonu, Kalsiyum Okzalit

SUMMARY

Determination of Expression Profiles of *Klaudin (CLDN)* Gene Family Members in Patients with Calcium Oxalate Kidney Stones

Dr. Ümit UYSAL

Studies suggesting that the genetic variations observed in the *CLDN* family members are responsible for the formation of kidney stones remain up-to-date. However, there is no study evaluating the co-expression profiles of the members. We aimed to evaluate and compare the expression levels of *CLDN* gene family members responsible for the stone formation mechanism in patients with calcium oxalate stones and control group.

Fourty patients (19 patients who were diagnosed with "Calcium Oxalate Kidney Stone" and 21 individuals who were not diagnosed with calcium oxalate kidney stones) who applied to Pamukkale University Medical Faculty Hospital Urology Clinic and underwent kidney surgery were included in the study. During the surgery, 10 mm³ biopsy samples were taken from the kidney tissue, without causing any complications, from the patients who were diagnosed with kidney stones and therefore underwent percutaneous nephrolithotomy and from the patients in the control group who were not diagnosed with kidney stones and were operated for other reasons. Total RNA isolation was performed from biopsy samples and expression levels of target genes (*Claudin 1,2,3,4,7,8,10,14,16,18,19*) were determined by real-time PCR.

Among the chronic diseases, DM and HT were more common in the patients with kidney stone disease than in the control group. There was no statistically significant difference in the expression levels of *CLDN 2, CLDN 3, CLDN 4, CLDN 7, CLDN 8, CLDN 10, CLDN 14, CLDN 16* and *CLDN 19* between the patient and control groups ($p < 0.050$). However, it was determined that *CLDN 1* gene expression levels was approximately 4 times higher in patients with calcium oxalate kidney stones compared to the control group and the difference was statistically significant ($p < 0.05$). The expression of *CLDN 1* was also found to be extremely significantly

positively correlated with the expression of *CLDN 4* ($r=0,642$) , *CLDN 7* ($r=0,753$) and *CLDN 14* ($r= 0,651$), while moderately positively correlated with the expression of *CLDN 2* ($r=0,470$) and *CLDN 8* ($r=0,556$).

In conclusion, we suggest that renal overexpression of *CLDN 1* might play a role in the pathogenesis of calcium oxalate stone formation and be working together with other claudin family members, *CLDN 2*, *CLDN 4*, *CLDN 7*, *CLDN 8* and *CLDN 14*, to promote the disease initiation and/or progression in human kidney. Further studies with larger sample sizes and functional studies are needed to confirm the findings of the present study.

Keywords: Claudin, Kidney Stones ,Gene Expression, Calcium Oxalate,

GİRİŞ

Böbrek taşı hastalığının görülme sıklığı Kuzey Amerika'da %7-13, Avrupa'da %5-9, Asya'da %1-5 ve ülkemizde ise yapılan çok merkezli bir çalışmada %14,8 oranı ile değişkenlik göstermekle birlikte, tüm dünyadaki ortak özelliklerinden birisi de yüksek düzeyde tekrarlama oranıdır (1). Böbrek taşı oluşum mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ailede böbrek taşı öyküsü bulunan erkek bireylerde riskin 2.57 kat arttığı gösterilmiştir. Endüstriyel toplumlarda görülen böbrek taşlarının en yaygın görülen tipi kalsiyum okzalat veya bunun hidroksiapatit kombinasyonu olup yaklaşık olarak böbrek taşlarının %75'ini oluşturur. Böbrek taşlarının geri kalan %25'ini ise enfeksiyon taşları, ürik asit ya da sistin taşları oluşturur (2). İnflamatuar barsak hastalığı, primer hiperparatroidizm ve renal tübüler asidoz gibi sistemik hastalıkların kalsiyum taşı oluşumuna yatkınlıkla ilişkili olabileceği düşünülmeyle birlikte, çoğu hastada bu problemler görülmemektedir. Konu ile ilgili bulgular, çoğunlukla intestinal apatit dositlerinden oluşan ve Randall plakları(RP) olarak bilinen renal papilla ile bağlantılı bölgelerde kalsiyum okzalat taşlarının oluştuğunu göstermektedir (3, 4). Bir başka ifade ile Randall plakları idiyomatik kalsiyum okzalat böbrek taşı oluşumuna katılmaktadır. Ancak, RP oluşumu ile ilişkili genler henüz bilinmemektedir.

Kalsiyum okzalat böbrek taşı oluşumunun patofizyolojisi ile ilgili çalışmalar devam etmekte birlikte, henüz konsensüs sağlanmış bir mekanizma tanımlanmamıştır. Genom-çaplı ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), çoğunlukla taş matriksi, kalsiyum ve fosfat düzenlenmesi, inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili genlerin böbrek taşı oluşum riskine katılımlarına odaklanmıştır. Bu çalışmalarda idiyomatik kalsiyum taşı olan hastalarda, her ne kadar monogenik nedenler tanımlanmışsa da, etyolojide farklı genler ve çevrenin birlikte rol oynadığı kompleks bir etkileşimin yer aldığı değerlendirilebilir. Bu çalışmalarda sorumlu genler, bu genlere ait varyantlar ve hastalığın fenotipleri listelenmiştir (5-7).

Genom-çaplı ilişkilendirme çalışmalarının yanısıra, genom-çaplı ekspresyon çalışmaları da idiyopatik böbrek taşı oluşum mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olmaktadır. Bu amaçla yakın zamanda tamamlanan çalışmada, kalsiyum okzalat böbrek taşına sahip hastalar ve karşılıkları olan sağlıklı bireylerden alınan renal papiller doku örneklerinde mikroarray analizi ile gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. RP doku örneklerinde *Lipocalin 2 (LCN2)*, *Interleukin 11 (IL11)*, *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1 (PTGS1)* ve *Glutathione peroxidase 3 (GPX3)*, genlerinin anlamlı derecede up-regüle oldukları, *SLC12A1* ve *NALCN* genlerinin anlamlı derecede down-regüle oldukları gözlenmiştir (6). Bu yıl içinde tamamlanan bir başka çalışmada, kalsiyum okzalat böbrek hastalarının idrar örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen mikroarray analizleri sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 467 genin up-regüle olduğu ve 416 genin down-regüle olduğu rapor edilmiştir. Up-regüle olan ilk 10 gen arasında *NT5E*, *CHD4*, *NBPF15*, *IGLJ4*, *TAF1*, *ANGPTL3*, *METTL2B*, *ASCC2*, *RPS26* ve *NUP62CL* yer alırken, down-regüle olan ilk 10 gen arasında *RNU6*, *BCL2L14*, *UBAC1*, *GULP1*, *CLEC14A*, *CCNL1*, *CASP4*, *SLC41A3*, *CAMK2G* ve *PDK4* genleri yer almaktadır (8). Bu çalışmalar örnek tipine bağlı olarak gen ekspresyonlarında farklılıklar görülebileceğini göstermektedir ve konu ile ilgili literatürde henüz tam bir konsensus sağlanmış değildir.

Yukarıda da belirttiğimiz üzere renal kalsiyum hastalıkları ve böbrek taşı hastalıklarında linkage çalışmaları ile genom-çaplı ilişkilendirme çalışmaları devam etmektedir ve bu çalışmalardan elde edilen veriler, renal tuz salınımında *NKCC2*, *ROMK* ve *ClCkb/Barttin* genlerinin; renal kalsiyum salınımında *CLDN 14*, *CLDN 16* ve *CLDN 19* genlerinin; böbrekte su, tuz ve kalsiyum (Ca) homeostazının düzenlenmesinde *CasR* (Ca algılayıcı reseptör) geninin rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu genlerin ürünlerinin uyumlu çalışması, büyük olasılıkla böbrekte transepitelyal Ca transportunun selüler mekanizmasını açıklayabilecektir.

Tight junctionlar (Tj) (Sıkı bağlantılar); böbrek doku hücrelerinde paraselüler geçirgenlik ve iyonların seçiciliğini düzenlerler ve bu sayede sıvı ve iyonların hücre içine ve dışına taşınmasında bariyer oluştururlar (9). Tight junctionlar(Tj), lateral

membrandaki epitelyal hücrelerin apikal kısmına lokalizedir (10). Tight junctionlar(Sıkı bağlantılar), epitel hücreleri arasından her iki yöne doğru (apikalden – bazale, bazalden – apikale) oldukça sıkı bir tutunma meydana getirir. Bu sayede sağlam bir barikat oluşturarak madde geçişini engeller. Tight junctionlar (Tj) oldukça fazla sayıda transmembran proteine sahiptirler. Bu proteinler bağlantıların sitoplazmik yüzeyinde bulunurlar. Bağlantıların en tepesinde Zonula okludens (ZO) bulunur.

Tight junctionlar (Tj), *occludin*, *kludin* (*CLDN*) proteinleri ve adezyon moleküllerinden oluşur (11). *Kludin* ve *okludinler*; İki membranı birbirine bağlayan transmembran bağlantı proteinleridir. Tight junctionlar'ın esas integral membran proteinleri *kludinlerdir*. Böbrek epitel hücrelerinin fizyolojisinde ve patofizyolojisinde *kludinlerin* önemli rolleri vardır.

Kludinler, epitel hücrelerinin parasetüler yolağında hem por hem de bariyer fonksiyonu gören tight-junction membran proteinleridir. *Kludinler* 20-27 kilodalton (kDa) ağırlığında olan transmembran proteinleridir (12).

Kludinler Tight junctionların komşu hücreyle temas ettiği bağlantılarda bulunurlar ve primer yapılardır. *Kludinlerin* en az 24 üyesi bulunmaktadır (13). Böbrekte, *kludinler* renal tübül boyunca farklı nefron segmentlerinin permabilitelerini ve özgünlüklerini belirlerler. Proksimal tübülde tuz ve suyun reabsorbsiyonunda, kalın asendens kolda kalsiyum ve magnezyumun(Mg) geri emiliminde, distal nefronda katyon bariyerinin oluşturulmasında görevlidirler. *CLDN 16* ve *CLDN 19*'daki mutasyonların ailesel hipomagnezemik hiperkalsiürik nefrokalsinozdan (FHHNC) sorumlu oldukları bilinmektedir. Oysa *CLDN 14*'deki polimorfizmlerin böbrek taşı riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (14, 15). Dolayısıyla, böbrek taşı oluşumunda *kludin* gen ailesi üyelerinin rolleri henüz bilinmemektedir ve bu konuda yapılacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, kalsiyum okzalata taşı bulunan böbrek hastalarında ve böbrek taşı harici şikayetlerle kliniğimize başvuran kontrollerde taş oluşum

mekanizmasından sorumlu tutulan *CLDN* gen ailesi üyelerinin ekspresyon durumlarını birlikte değerlendirmek ve karşılaştırma yapmaktır.

GENEL BİLGİLER

BÖBREK ANATOMİSİ, FİZYOLOJİSİ VE FONKSİYONU

Böbrek Anatomisi

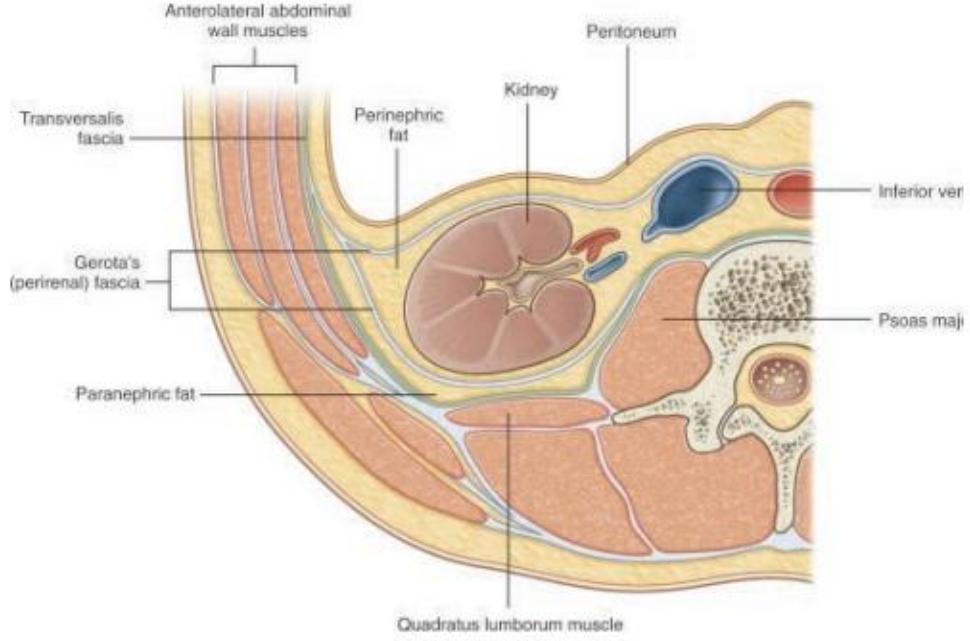
Böbrekler, abdominal boşluğun arka bölümünde, columna vertebralis'in iki yanında yer alan, retroperitoneal yerleşimli bir çift organdır. Normal bir böbrek 10-12 cm uzunluğunda, 5-7 cm eninde ve yaklaşık 3 cm kalınlığında olup, yaklaşık ağırlıkları 150 gramdır. Sağ böbrek karaciğer ile olan komşuluğundan dolayı daha aşağıdadır. Sağ böbrek; L1-3 vertebralar arasında, sol böbrek ise T12- L3 vertebralar arasında uzanır. Böbrekler transvers olarak 30° anteriora rotasyonedir. Hilumları anteromedial yöndedir ve orta hattın 4-5 cm uzaktadırlar. Üst kutupları orta hatta daha yakındır. Alt kutupları daha anterior yerleşimlidir (16).

Böbrekleri yerinde tutan en önemli oluşumlar vasküler yapılar ve fascia renalistir. Böbrekler içten dışa doğru; fibröz kapsül, perirenal yağ dokusu (capsula adiposa), Gerota fasyası (fascia renalis), pararenal yağ dokusu (corpus adiposum pararenale) ile sarılmıştır. Gerota fasyası; perirenal yağ dokusunun dışında yer alır ve adrenal bezi içine alır. Bu yapı böbrek etrafında önemli bir anatomik bariyer oluşturarak böbrek kaynaklı patolojik oluşumları sınırlar. Gerota fasyasının ön ve arka yaprakları böbreğin ön ve arka yüzüne doğru uzanarak böbreğin lateral, medial ve süperiorunda kaynaşırlar. İnfериorda ise, gerota fasyası açık bir alan olarak kalarak üreter ve gonadal damarları içerir (16-18).



Şekil 1. Böbreklerin Genel Görünümü (16)

Böbrekler fonksiyon bakımından iki farklı bölümden oluşur. Dış kısmına renal korteks, iç kısmına ise renal medulla denilir. Orta kısımda bulunan böbrek şeklindeki boşluğa da renal sinüs denilir. Renal medulla birbiri ile devamlılığı bulunmayan ve renal piramid olarak adlandırılan 8-10 adet koni şeklinde segmentlerden meydana gelir. Piramidlerin tabanı kortekse bakar. Tepeleri papilla adını alır ve her biri minör kaliksler ile çevrelenerek renal sinüse açılır. Renal korteks piramitleri periferde sararak interpiramidal alanda 4 renal sinüse ulaşırlar. Renal korteksin bu interpiramidal kısmına Bertini kolonları denir ve renal vasküler yapıların renal parankime giriş ve çıkışları bu alanda gerçekleşir (16).

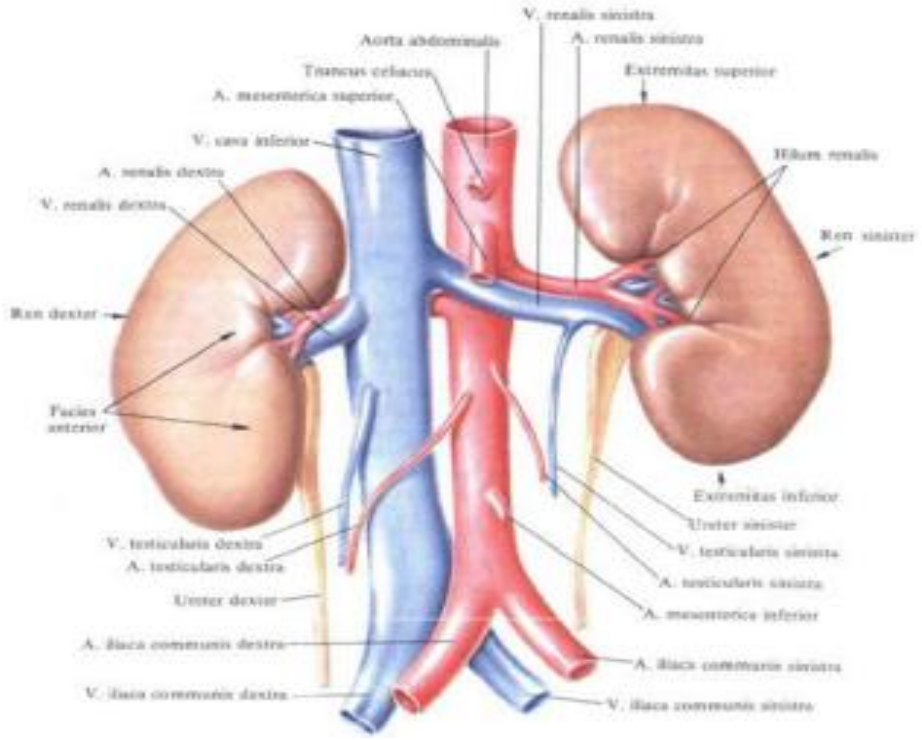


Şekil 2. Böbrek ve Gerota Fasyası (16)

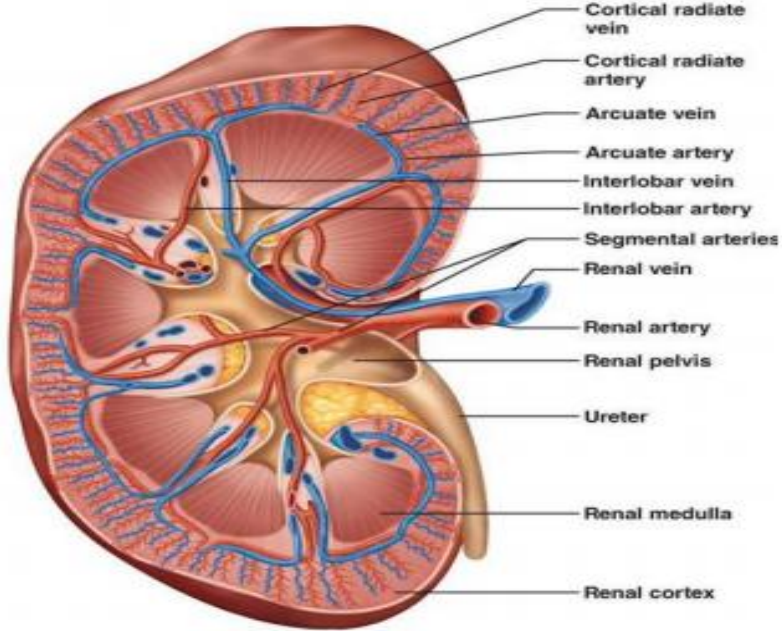
Böbreğin Vasküler Anatomisi; Böbreklerin vasküler yapıları; Süperior mezenterik arterin distalinde, L2 vertebra korpusu düzeyinde, aort ve vena kava inferior (VCI)'dan kaynaklanır. Sağ böbreğin arteri, sol böbreğe göre daha yukarıda, aortadan çıkar ve VCI'nin arkasından geçer. Sağ renal arter, sol renal artere göre daha uzundur. Renal arterler yukarı doğru sürrenal beze, aşağı doğru renal pelvis ve üreterin üst kesimine küçük dallar verirler. Renal arterler, end arter yapısındadır. Dolayısı ile, renal arter tıkanıklıklarında böbreğin beslenmesi bozulur. Renal arterler %70 oranında sağ ve sol renal arter olmak üzere aortadan tek renal arter şeklinde çıkarlar. Aksesuar sağ renal arter görülme sıklığı %30 düzeyindedir. Aksesuar arterler, ana renal arterin kranial ya da kaudalinden çıkabilir ve ona paralel seyrederek renal hilusa girerler (16, 19).

Böbreğin arterleri, 5 segmenter artere ayrılır. Bunlar; superior, anterior (anterior superior, anterior inferior), inferior ve posterior segmentlerdir. Segmenter arterler arasında anastomoz yoktur. Bu nedenle bu arterlerin tıkanması, o arterin beslediği böbrek alanında infarktüse sebep olur. Renal arterin ilk dalı ve aynı zamanda en geniş dalı posterior segmenter arterdir. Posterior segmenter dal arka yüzün orta kesimini beslerken; anterior dal hem üst, hem alt ve hem de böbreğin ön

yüzünün tamamını besler. Böbrekteki bu segmenter dağılım, böbreğin posterolateralinde avasküler bir hat meydana getirir ve bu kısma Brödel hattı denir. Brödel hattı, dış yüzde pelvis renalisin alt noktasına döner. Klinik olarak önemli olan diğer bir bölge, arter ve venlerin çaprazlaştığı üst kutup olan infundibulumudur. Segmenter arterler, her bir piramit için lobar artere ayrılır ve takiben lobar arterler de 2-3 interlobar artere ayrılıp, piramitler arasında seyrederek kortekse doğru ilerlerler. İnterlobar arterler, kortikomedüller bölgede, piramitlerin tabanına paralel seyretmek üzere dönerler ve arkuat arter adını alırlar. Arkuat arterler çok sayıda interlobuler artere ayrılır. Komşu piramitlerin arkuat arterleri ve interlobuler arteri arasında anastomoz yoktur. Afferent glomerüler arteriolü, interlobuler arterlerin ana dalları oluşturur ve afferent arteriol glomerüler kapiller yumağı oluşturduktan sonra çıkınca, efferent arteriol adını alarak, peritubuler kapiller ağı oluşturur. Bu peritubuler kapiller ağ, proksimal ve distal tubuli kontortiyi sarar. Ardından bu kapiller ağ, venöz kapillerlerle birleşerek interlobuler venlere drene olur. Böbreğin venleri, arterlerle birlikte seyrederler ve aynı ismi taşırlar. Sağ renal ven, sol renal vene göre daha kısadır ve çoğunlukla tektir. Sol renal ven, sağ renal venden daha uzundur. Sol renal ven; inferior frenik , adrenal, gonadal ve 3.lomber veni drene eder. İnterlobüler venler, arkuat venlere; arkuat venler de interlobar venlere dökülür. Arkuat arterlerin aksine arkuat venler, komşu primidlerin arkuat venleriyle anastomoz yaparlar. Fibroz kapsülün hemen altında satellit pleksus adı verilen bir kapiller venöz pleksus oluşur. Satellit venler; interlobuler venlerden gelir ve sürrenal, inferior frenik ,gonadal ve üreteral venlerle anastomoz yaparlar. Sağ renal ven, doğrudan VCI'ye açılır. Sağ renal ven, bazen iki ve çok nadir olarak da 3 tane olabilir. Sol renal vene ise sirkumaortik pleksus denir; sol renal ven, ilk olarak tek başına ilerlerken, aortaya yaklaştığında lomber venler, hemiazigos sistemi ve küçük paravertebral venler de sol renal vene dökülür (16, 19).



Şekil 3. Böbreğin Vasküler Anatomisi (Ekstrarenal)



(a) Frontal section illustrating major blood vessels
© 2013 Pearson Education, Inc.

Şekil 4. Böbreğin Vasküler Anatomisi (İntrarenal)

Böbreğin Fizyolojisi ve Fonksiyonu

Böbrekler, abdominal boşluğun arka bölümünde, göğüs kafesinin hemen altında, kolumna vertebralis'in iki yanında yer alan, retroperitoneal yerleşimli sağ ve solda yerleşimli olmak üzere retroperitoneal alanda bulunan bir çift organdır. (20). Böbreğin en önemli görevlerinin başında sıvı ve elektrolit dengesini sağlayarak homeostazın sürdürülmesi gelmektedir. Böbrekler, kan hacmi ve basıncının, ozmolarite ve pH'ın düzenlenmesini, üre ve ürik asit gibi azotlu atık ürünlerin ve diğer toksik maddelerin idrarla atılmasını sağlamaktadır. Böbreklerin en temel ve fonksiyonel birimi nefronlardır. Nefronlar; plazmanın filtre edildiği glomerüler kısım ve süzülen sıvıdan atılacak olan idrarın oluşturulduğu tübüler kısımdan meydana gelmektedir (21). Günlük ortalama 1600 L kan, böbrek glomerüllerinden filtre edilerek (glomerüler filtrasyon) 180 L kadar ultrafiltrat adı verilen sıvı oluşturulur. Vücut için gerekli bileşenlerin geri emilimi (tübüler reabsorpsiyon) ve toksik maddelerin sekresyonu (tübüler sekresyon) sonucunda ultrafiltrattan günlük ortalama 1,5 L idrar oluşturulur (22). Tüm emilim ve atılım süreçleri alderosteron, antidiüretik hormon ve paratiroid hormonları tarafından düzenlenmektedir (21). Her iki böbrekte toplam 2 milyona yakın nefron bulunmaktadır. Böbrek hasarı nefron sayısını azaltmakta, hasar gören nefronlar ise yenilenememektedir. Böbrek fonksiyonunun değerlendirilmesinde kullanılan glomerüler filtrasyon hızı (GFH); fonksiyonel olan her bir nefronda bulunan glomerüllerden birim zamanda süzülen toplam plazma miktarını ifade etmektedir (23). İdrarla atılan atık maddelerin büyük bölümü protein metabolizmasının son ürünlerinden oluşmaktadır. Atılması gereken günlük solüt yükünün çoğunluğunu üre oluştururken, idrarda daha az miktarlarda ürik asit, kreatinin ve amonyak da bulunmaktadır. Bu nitrojenli atık ürünlerin idrar yoluyla eliminasyonu böbrek fonksiyonunun diğer bir göstergesidir (22). Böbrek fonksiyonunda azalma ya da böbrek yetmezliği gibi durumlarda yüksek düzeyde azot içeren son ürünler idrarla uzaklaştırılmadığında kanda birikerek "azotemi"ye yol açmaktadır (24).

Üriner sistem; iki böbrek iki üreter, mesane ve üretradan oluşmaktadır. Üriner sistem homeostatik dengeye, süzülme, emilim ve salgılama ile idrarı üreterek katkıda bulunmaktadır. Böbreklerde üretilen idrar; üreter, mesane ve üretrayı geçerek vücut

dışına atılır. Her iki böbrekte dakikada 125 ml filtrat üretirken, bu filtratın 124 ml'si çeşitli mekanizmalar ile geri emilir ve kalan 1 ml idrar olarak salgılanır. 24 saat içerisinde yaklaşık 1500 ml (24x60) idrar oluşumu beklenir (25-27).

Böbreklerde aynı zamanda renin hormonu da üretilir. Renin doğrudan sıvı-elektrolit dengesini sağlarken, dolaylı olarak da kan basıncının düzenlenmesine katkıda bulunur. Böbreklerin diğer bir görevi ise, eritropoietin üretimidir. Eritropoietin; hem eritrosit üretimini uyarır hem de D3 vitaminini aktive eder (28).

Glomerüllerde ki hidrostatik basınç 45 mm Hg ve bu basınç diğer kan kapillerindeki basınçtan yüksektir. Glomerüldeki bu yüksek basınç; kolloidler tarafından oluşturulan 20 mm Hg'lık onkotik basınç ve kapsül içi 10 mm Hg'lık hidrostatik basınç ile dengelenir. Aradaki 15 mm Hg'lık basınç farkı süzülme sağlar. Sağlıklı kişilerde glomerüler süzüntüden 70 kilodalton (kDa) üzeri bir proteinin geçmesine izin verilmez iken diyabetes mellitus gibi hastalıklarda glomerüler filtre yapısal özelliklerini kaybeder. Böylece bu gibi hastalıklarda idrarda yüksek miktarda protein (proteinüri) görülür (29).

Süzme işlemi, corpusculum renale'de kılcal duvarlara uygulanan hidrostatik basınç ile gerçekleşir. Süzme işleminde hücreler ve büyük proteinler tutulur iken, daha küçük ağırlıklı maddelerin kandan süzülerek idrar haline getirildiği bir ultrafiltrat işlemidir. Böbrek günde 180 lt filtrat üretmektedir (21).

Geri emilim ultrafiltrat içerisine alınmış maddelerin peritübüler kılcallara geri alınma işlemidir. Lümen çevresindeki hücrelerin zarlarında bulunan seçici reseptörler bu işlemi gerçekleştirir. Proksimal tübüldeki glukozun tamamı, suyun yarısından biraz fazlası emilime tabi tutulur. Fakat kan glukozu çok yukarılara çıkar (145-180 mg/dl çocuklarda, 125-215 miligram (mg)/desilitre (dl) yetişkinlerde ise glukoz idrar ile dışarı atılır. Amino asitler proksimal tübülde bulunan sodyuma bağımlı taşıyıcılar tarafından geri emilmektedir (30, 31).

Sekresyon, moleküllerin peritübüler kılcallardan hücreler arası sıvıya, sonra renal tübüler hücrelerden ultrafiltrat içerisine taşınmasıdır. Geri emilimin tersidir (32).

Ultrafiltratın son adımı boşaltmadır. Ultrafiltratın nefron'dan toplama kanallarına, buradan da üreterlere geçmesidir (33).

BÖBREK TAŞI

Ürolitiasis, insanlığın en eski ve hala evrensel olarak devam eden insan yaşantısını ve sosyal yaşamını olumsuz etkileyen önemli sağlık sorunlarından birisidir. Küresel kültürün batılılaşmasıyla üriner sistem taş oluşumu alt üriner sistemden üst üriner sisteme doğru yer değiştirmiştir. Her iki cinsi etkileyen ve üroloji pratiğinde üriner sistem enfeksiyonları ve prostat hastalıklarından sonra en sık görülen 3.hastalıktır.

Böbrek taşı şiddetli ağrılı sendromlara yol açan üriner sistemde ki katı yumak şeklindeki yapılardır. Ağrının yanı sıra böbrek hasarına yol açmaktadır. Birçok vakada taşlar çok küçük olup hiçbir belirti vermeden üriner sistemden dışarı atılır. Eğer taşlar üriner sistemden geçemeyecek kadar büyük ise üriner sistemde obstrüksiyona neden olur ve ağrılı semptomlara yol açar (34-38). Kalsiyum ve okzalat bazlı çeşitli yapılar böbrek yüzeyinde birleşerek kalsiyum okzalat (CaOx) taşlarını oluşturur. Genellikle kalsiyum, ürik asit, struvit ve sistin taşları olmak üzere dört tip taş oluşumu görülür. Böbrek taşlarının endüstriyel toplumlarda en sık görülen tipi, öncelikle kalsiyum okzalat(CaOx) ya da bunun hidroksiapatit kombinasyonudur. Kalsiyum taşları olan hastaların %70'inde idrarda hiperkalsiüri görülür (39).

Kalsiyum okzalat(CaOx) taşları, böbrek taşlarının yaklaşık %75'ini oluşturur. Taşların %25'i ise ürik asit, struvit ya da sistin taşlarıdır. Nefrolitiazis yüksek nüks oranına sahip olan kalsiyum taşlarının oluşum patogenezi tam aydınlatılmamış ayrıca taş oluşumunda multipl faktörlerin birlikte rol oynadığı toplumsal bir hastalıktır. Endüstriyel toplumlarda coğrafi bölge özelliklerine göre değişiklik göstermekle beraber ortalama insidansi %12 oranında rapor edilen bir hastalıktır. İlk kez taş tespit edilmiş hastaların nüks oranı ortalama %50 oranında rapor edilmiştir. Ülkemizde üriner sistem taş hastalığı prevalansı %14,8 olarak rapor edilmiştir (40).

Gelişmiş ülkelerde üst üriner sistem taşları daha sık görülürken, gelişmekte olan ülkelerde mesane taşlarının daha sık olduğu kaydedilmiştir. Mesane taşları endemik üriner sistem taşlarıdır. Genellikle erkeklerde görülür. Taş kuşağında (Hindistan, Türkiye, Doğu Avrupa, Orta Doğu, Güneydoğu Asya, Güney Amerika ve İngiltere'nin güneydoğusu) halen en sık görülen ürolitiazis tipidir. Ülkemizde son yıllarda yapılan araştırmalarda, üst üriner sistem taşları daha yüksek sıklıkta saptanmaktadır (41). Bu coğrafi dağılımda iklim, beslenme ve ailesel faktörlerin rolü üzerinde durulmaktadır (42).

İklim ile taş teşekkülü arasında direk ilişki bulmak güç ise de, sıcaklığın yüksek olduğu yerlerde ve yaz mevsimlerinde daha fazla görülmektedir. Sıcak iklimde terle su kaybı, idrar konsantrasyonunun yükselmesine ve idrar volümünün azalmasına sebep olur. Bu durumda idrar asiditesi arttığı gibi moleküllerin konsantrasyonu da artarak taş yapmaya eğilimli insanlarda bu moleküllerin kristalizasyonuna sebep olur. Bir taraftan kalsiyum oksalat(CaOx) ve kalsiyum fosfat(CaP) konsantrasyonu artıp büyük kristaller ve taş teşekkül ederken, diğer taraftan da idrar pH' sının düşmesi ile ürik asit ve sistinin erimesi zorlaşır (40).

Su alımı da çok önemlidir. Fazla miktarda su alımı idrar miktarını arttırarak taş yapımına olan eğilimi azaltır. Günlük idrar miktarının 800 ml'den 1200 ml'ye çıkarılması dahi taş oluşumunu %86 oranında azaltır. Bununla birlikte diürezin idrardaki iyon aktivitesini arttırarak, kristal oluşumunu hızlandırdığı gösterilmiştir. Fakat diürez, idrardaki serbest kristal partiküllerinin böbrekten atılmasını hızlandırarak yine de yararlı olur (40). Suyun içerisindeki bazı eser elementlerin varlığı veya yokluğu taş oluşumunda rol oynar. Örneğin çinko kalsiyum kristalizasyonunu önler. İdrarda çinko seviyesi düşüklüğü taş oluşumuna eğilimi arttırabilir. Pürin, oksalat, kalsiyum, fosfat ve diğer maddelerin diyetle aşırı alınması idrarda bu maddelerin aşırı atılmasına ve taş oluşumunun kolaylaşmasına yol açabilir. Taş yapan hastalarda bu durum daha önemlidir (43).

Kalsiyum oksalat taşları

Kalsiyuma bağlı taşlar %75 oranında kalsiyum okzalat taşları (CaOx) taşları'dır. Oksalat kalsiyuma çözümez bir şekilde bağlanır. CaOx taşları, kalsiyum monohidrat (COM), kalsiyum dihidrat (COD) ve nadiren de kalsiyum trihidrat (COT) formlarında var olur. Böbrekte ki CaOx taşları en sık COM formundadır. Bu formda taş olan hastaların idrarlarında hiperkalsiüri belirlenir. CaOx taşları genellikle idiyomatik olarak ortaya çıkmaktadır (44, 45).

Kalsiyum fosfat taşları

Kimyasal gösterimi CaP'tır. Kalsiyum bazlı taşların yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Bu tip taşlar yaygın olmamakla birlikte metabolik veya paratiroidizm gibi hormonal hastalıklara bağlı olarak oluşabilir. İdrarda pH'ın yükselmesi, sitrat seviyesinin düşmesi ile karakterizedir. CaP taşlarının iki formu vardır: kalsiyum hidroksit fosfat (Ca₅PO₄)₃(OH) ve bruşit olarak da bilinen kalsiyum hidrojen fosfat (CaHPO₄·2H₂O). Hidroksil bazlı taşlar daha fazla görülürken bruşit taşları dirençli yapılardır ve oluşturduğu şok dalgalarını kırmak çok zordur. Her iki CaP taşları da asidik ortamda çözülebilir (46).

Ürik asit taşları

Böbrek taşlarının %10'unu oluşturan ürik asit taşları pürinin parçalanması ile oluşur. Karaciğerde üretilen ürik asit kan dolaşımına girer ve büyük bir kısmı böbreklerden geçer ve idrar ile atılır. Bu tip taşlarda idrarda yüksek düzeyde ürik asit görülürken hidrojen(H) gücü ve (pH) seviyesi düşer (47, 48).

Struvit taşları

Magnezyum amonyum fosfat bazlı bu taşlara idrar yolundaki bakteri enfeksiyonları (proteus, pseudomonas gibi) yol açar. Bakterilerin salgıladığı enzimler üreyi amonyum ve karbonata indirger. Yükselen amonyum oranı üreyi daha alkali hale getirir. Bu bazik ortam struvit taşlarını oluşturur (35).

Sistin taşları

Sistinüri, erken yaşlarda ortaya çıkann çocukluk çağı taş hastalığının %6-10'luk kısmını oluşturur. Erişkinlerde %1 oranında görülür. Otozomal resesif

kalıtılan bir hastalıktır. Kromozom 2 ve 19'da bulunan iki gende defekt vardır. Hem böbrek tübüllerinden hem de gastrointestinal sistemden sistin, lizin, arginin ve ornitin gibi dibazik aminoasitlerin emilim bozukluğu mevcuttur. Bunlardan sadece sistin normal idrar pH'sında çözünür değildir ve bu nedenle taş oluşumuna neden olur (16). Genetik bozuklukların hatalı amino asit transferine yol açması sonucunda bazı sistin gibi önemli amino asitler böbreklerde ve sindirim sisteminde taşınır. Bu hatalı taşıma üriner sistemde sistin taşlarının oluşmasına neden olur (1, 35, 49).

Tablo 1. Taşların Oluşum Nedenlerine Göre Gruplandırılması (35)

Enfeksiyon taşları	Karbonat apatit, Amonyum ürat, Magnezyum amonyum fosfat
Non-Enfeksiyöz taşlar	Kalsiyum okzalat, Kalsiyum fosfat, Ürik asit
İlaç kullanımına bağlı oluşan taşlar	İndinavir, Efedrin, Triamteren
Genetik kökenli taşlar	Sistin, 2,8-dihidroksiadenin, Ksantin

Tablo 2. Üriner Sistem Taşlarının Bileşenleri (35)

Kalsiyum okzalat monohidrat	Whewellite	$CaC_2O_4 \cdot H_2O$
Kalsiyum okzalat dihidrat	Wheddelite	$CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$
Kalsiyum fosfat	Apatit	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$
Kalsiyum hidrojen fosfat	Brushite	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
Ürik asit	Uricite	$C_5H_4N_4O_3$
Magnezyum amonyum fosfat	Strüvite	$MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$
Kalsiyum karbonat	Aragonite	$Ca_{10}(PO_4,CO_3,OH)_6(OH)_2$

TAŞ OLUŞUM MEKANİZMASI

Taş oluşumu kompleks bir antitedir ve halen taş oluşum sürecinin neden başladığı kesin olarak bilinmemektedir (12). Taş oluşumunda rol oynayan birçok temel fizyokimyasal mekanizma vardır. Bunlar; supersatürasyon, çekirdeklenme, kristal büyümesi ve kristal toplanmasını içerir (50).

Supersatürasyon Teorisi

Süper doymuluk, kristalleşme en sonunda taş oluşumuna yol açan ilk ve en temel adımdır. Sıvıdan katıya bir faz değişimi olduğunda ortaya çıkan termodinamik itici kuvveti ve iki faz arasındaki aşırı serbest enerjiyi temsil eder (35, 51). Bu itici güç veya serbest enerji (ΔG) denklemiyle verilir: $\Delta G = RT \ln (A/A_{eq})$ (35). Burada R, gaz sabitidir, T sıcaklıktır, A, süper doymuş çözelti içindeki tuzun aktivitesidir ve A_{eq} , çözültideki dengenin aktivitesidir. Süper doyma oranı (A / A_{eq}), nispi süper doyma (RS) olarak adlandırılır. $RS < 1$ olduğunda, çözültinin doymamış olduğu söylenir ve mevcut herhangi bir taş oluşturan tuz serbestçe çözülebilir. $RS = 1$ olduğunda, çözelti doyurulur. Böyle bir durumda, zaten mevcut olan tuzlar çözülmeyecek, yeni tuzlar oluşmayacak. $RS > 1$ 'de, çözelti aşırı doyurulur. Bu durumda, mevcut kristaller büyüebilir (39, 51). İdrar içerisinde bulunan sitrat benzeri bazı organik maddeler kalsiyum iyonları (Ca) ile birleşip erimesi kolay olan kalsiyum sitrat kristallerinin oluşumuna neden olmaktadır. Sitrat eksikliğinde ise mevcut Ca'nın oksalat ile birleşmesi sonucu CaOx tuzlarının oluşumuna zemin hazırlamaktadır (52).

Kristal Çekirdeklenme

Çekirdeklenme, aşırı doymuş bir çözelti içerisinde sıvıdan katı bir faza dönüşümüne izin veren ilk kinetik adımdır. Bu işlemdeki ilk adım, çözelti içindeki taş oluşturan tuzların, yeni kümelerin eklenmesi nedeniyle boyut olarak artabilecek olan gevşek kümeler halinde birleşmesidir. Yavaş yavaş, bu kümeler zaten gelişmekte olan tüm çekirdeği ile kristal embriyolar haline gelir (34, 53). CaOx'un sulu çözültileri, RS değerleri 0.80 ile 1 arasında olduğunda bile kristalsiz kalabilir. Bu çözültilerin metastabilite bölgesinde olduğu ifade edilir. Çözelti, metastabilitenin

üst sınırını aştığında, çözelti hızla kararsız hale gelir ve yeni kristaller kendiliğinden oluşur. Bu yeni kristallerin kendiliğinden oluşum sürecine homojen çekirdeklenme denir. Pek çok idrar makromolekülü, kristal çökeltilmesinin düşük RS değerlerinde gerçekleştiği, taş oluşumunun heterojen çekirdeklerini oluşturur (35, 49, 53, 54).

Kristal Büyümesi

Kristal bileşenlerin hali hazırda oluşturulmuş bir CaOx kristal çekirdeğine dahil edilmesi, kristal büyümesi olarak adlandırılır. Bir kristal çekirdeği kritik boyutuna ulaştığında bu gerçekleşir ve RS her zaman 1'in üzerinde kalır (çözelti aşırı doymuş olur). Kristal büyümesinin gerçekleşmesi için, idrarda yeni oluşan kristal çözülden geçerek mevcut kristallerin yüzeyine tutturulmalıdır (35, 55, 56). CaOx kristallerinin çökeltilmesi, oluşan kristaller idrar yolundan serbestçe geçebildiği sürece bir sorun teşkil etmeyebilir. Böbrekten geçen normal geçiş, kristallerin renal tübüllerin içine girebilecek boyut aralığına büyümesi için yeterince uzun değildir. Bununla birlikte, bu kristaller tutulduktan ve böbrek tübüllerinden serbestçe geçemeyecek kadar büyük hale geldiklerinde idrar akışını bozarlar. Bu nedenle kristal oluşumu taş oluşumunda önemli olarak kabul edilir, çünkü kristaller çok yeterli bir boyuta gelmedikçe taş oluşturmazlar. Kristal büyümesinin meydana gelme hızı da süper doymuluğa bağlıdır (53, 57).

Kristal Agregasyonu

Kristal agregasyonu, çözelti içindeki birçok partikülün daha büyük partiküller oluşturmak için birbirine yapışmasıdır. Daha büyük parçacıkların toplanması enerjik olarak tercih edilir ve bu nedenle tüm doyma durumlarında oluşabilir. Karşılıklı etkileri olan birkaç temel kuvvetle elde edilir. Bu temel kuvvetlerden bir tanesi Van der Waals kuvvetidir (54, 58).

Van der Waals kuvveti, partikül toplanmasını destekler ve parçacıklar arası mesafeler çok küçük olduğunda kuvvetli bir şekilde artar. Zeta potansiyeli, taneler arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Zeta potansiyeli, kristal parçacıkların ayrıştırılmasını destekleyen itici elektrostatik kuvvettir. Sudaki kristallerin +20 mV'luk bir zeta potansiyeline sahip olduğunu; idrarda zeta potansiyeli sitrat ve

makromoleküller gibi negatif yüklü idrar moleküllerinin absorpsiyonu nedeniyle negatiftir (44). Birkaç araştırmacı kristal toplanmasının böbrek taşı oluşumu için en önemli faktör olduğuna inanmaktadır. Bunun nedeni, tek başına CaOx kristal büyümesinin, idrarın renal tübüllerden geçtiği süre içinde klinik olarak önemli parçacıklar üretmek için çok yavaş olabileceği gerçeğidir, oysa toplanma saniyeler içinde gerçekleşir. Buna ek olarak, böbrek taşlarının mikroskopik ve ultrastrüktürel analizleri, taşların oldukça toplanmış yapılar olduğunu ortaya koymuştur. İlginçtir ki taş oluşturunuculardan gelen idrar daha fazla toplanmış kristal içerir. Oysa sağlıklı deneklerden daha az toplanmış parçacıklara sahiptir (53, 59).

KALSİYUM OKZALAT TAŞ OLUŞUMUNUN İNHİBİTÖRLERİ

Vücutta kalsiyum okzalat (CaOx) taş oluşumunu engellemek için bazı proteinler görev almaktadır. CaOx kristalizasyonu inhibitörleri makromoleküller ve mikromoleküller olmak üzere iki kategoride sınıflandırılır. Glikozaminoglikanlar (GAGS), nefrokalsin (NC), tamm horsfall proteini (THP), albümin, üriner protrombin fragmanı 1(UPTF1) gibi proteinler, bikunin, kristal matriks protein ekstratı (CME) ve osteopontin gibi proteinler makromoleküllerdir. Sitrat, magnezyum ve pirofosfatlar ise mikroproteinler grubunda yer almaktadır (35).

Glikozaminoglikanlar (GAGS)

GAGS, tekrarlayan bir disakkarit ünitesinden oluşan uzun dallı polisakaritlerdir. Disakkarit ünitesi, bir N asetil-heksosarninden (amino şeker) ve bir veya her ikisi de sülfatlanabilen bir heksoz veya heksuronik asitten oluşur. Her iki bileşen de bir glikozid bağı ile birbirine bağlanır. Sülfat grubu ve üronik asit kalıntılarının karboksilat grupları kombinasyonu, onlara çok yüksek bir negatif yük yoğunluğu verir. GAGS genellikle CaOx kristal büyümesini, toplanmasını ve çekirdeklenmesini inhibe eder (44, 60).

Kristal Matriks Protein Extratı (CME)

Kristal matriks olarak adlandırılan böbrek taşlarının organik bir bileşeninin keşfi, Von Hyde'ın taşların, genellikle yüksek glutamik ve aspartik asit içeriği ve y karboksiglütamik asit ile karakterize edilen seçici olarak birleştirilen proteinlerden

oluşan organik bir çerçeveye sahip olduğunu keşfettiği zaman 1684 yılına kadar uzanır. Genel olarak, üriner taşlar yaklaşık % 5 oranında organik matriks içerir, bu matriksin % 67'sinin protein olduğunu göstermiştir (61). CME'nin idrarda test edilen en güçlü makromoleküler idrar inhibitörü olduğu sonucuna varıldı. Yeni oluşan kristallerin birikmesini önleyerek, CME'nin bileşenleri in vivo olarak partikül tutma olasılığını ve dolayısıyla ürolitiazis oluşumunu önemli ölçüde azaltabildiği görülmüştür (62).

Albumin

Albumin, idrarda ikinci en bol bulunan proteindir. Tüm insan idrarından ve ayrıca idrar taşlarından elde edilen kristal matriksinde tespit edilmiştir. Albümin'in sağlıklı insanlar tarafından günlük atılımı 1,6 - 34,2 mg / gün arasında değişmektedir. Albüminin CaOx taşları oluşana kadar ürik asit kristallerine de bağlandığı ve CaOx kristal toplanmasını ve büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (63).

Uriner Protrombin Fragman 1 (UPTF1)

Doyle ve ark. (1991) (62) UPTF1'in insan idrarında indüklenen CaOx kristallerinin organik matriksinin ana proteini olduğunu göstermiştir. UPTF1 ürolitiaziste düzenleyici bir proteinden beklenen bazı özelliklere sahip olmasına rağmen, kesin rolü bilinmemektedir. Seyreltilmemiş insan idrarında in vitro olarak yapılan bir çalışma ile CaOx kristal büyümesini ve toplanmasını inhibe ettiği iyi belgelenen idrar proteininin renal ekspresyonunda önemli bir azalmanın olduğunu rapor etmiştir (64).

Bikunin

Birçok araştırmacı bikuninin CaOx kristalleşmesinin bir inhibitörü olduğunu göstermiştir. Bikunin'in ayrıca minimum 10 ng/ml konsantrasyonlarda renal epitel hücrelerine CaOx kristal yapışmasını önlediği ve 200 ng/ml'de tamamen bloke ettiği gösterilmiştir (50, 65).

Nefrokalsin

NC, taş literatüründe bildirilen en yaygın araştırılmış protein olmuştur. 1978'de Nakagawa ve meslektaşları bunu tanımlanamayan bir asidik polipeptit olarak ve ardından birkaç yıl boyunca CaOx kristal büyümesinin glikoprotein inhibitörü olarak tanımladılar. 1987'de idrardan izolasyonunun ilk raporundan sonra, proteine NC adı verildi. NC, idrarda CaOx kristalleşmesinin başlıca inhibitörü olduğu iddia edilen ürolitiazis araştırmalarında belirgin bir konuma sahiptir, aktivitesinin, idrarın CaOx kristalizasyonu üzerindeki toplam inhibitör etkisinin yaklaşık %90'ını oluşturduğu bildirilmektedir (61).

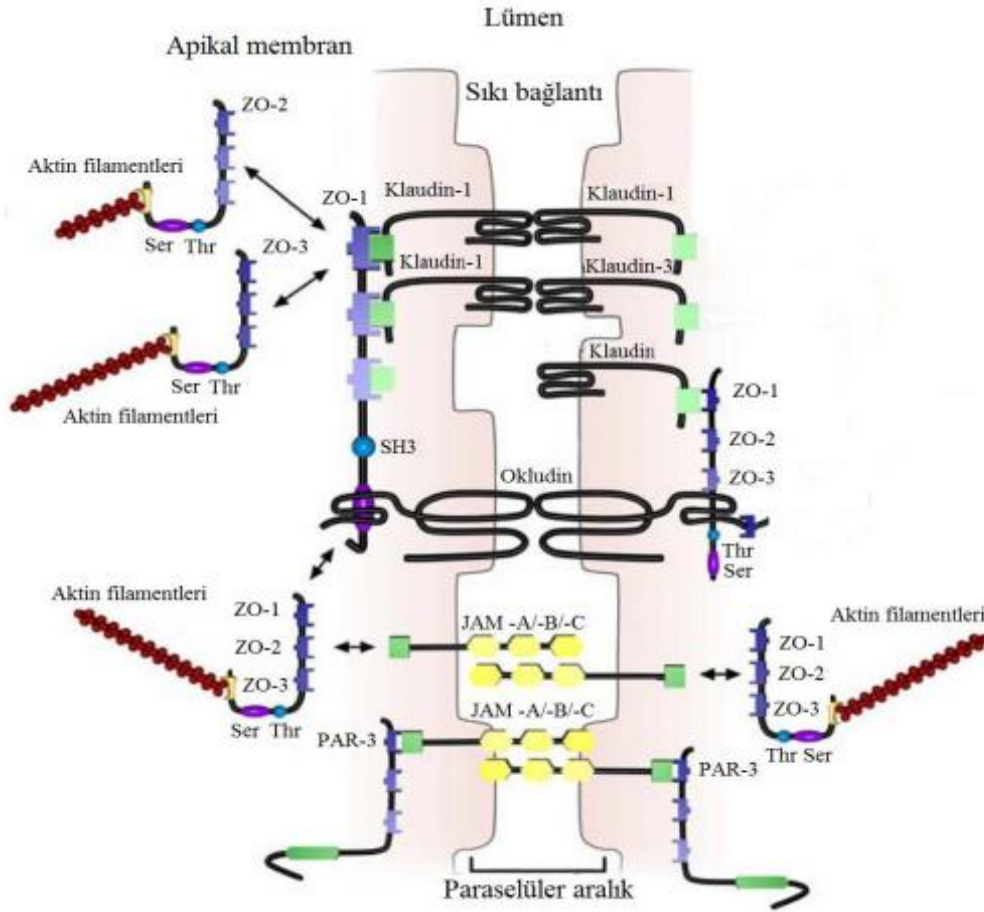
Osteopontin

Osteopontin başlangıçta mineralize kemik matriksinden izole edilmiş çok işlevli bir kollajen olmayan fosfoproteindir. Daha sonraki dönemlerde idrardan izole edildiğinde uropontin olarak da bilinmektedir (66, 67). Genel olarak, mevcut veriler Osteopontinin kristal oluşumuna karşı endojen savunmada bir rol oynadığını göstermektedir. Osteopontin kristal çekirdeklenmesini, büyümesini veya toplanmasını geciktirmek yerine, kristallerin tutulmasını engellemek için in vivo olarak hareket etmekte olduğu bildirilmiştir (30).

SIKI BAĞLANTILAR

Sıkı bağlantı proteinleri(Tight junctionlar), evrimsel olarak adezyon bağlantıları ve dezmozom proteinlerinin füzyonu ile oluşmuştur. Bu integral transmembran proteinler, apikal-lateral bağlantı bölgesinde lokalizedir ve *okludin*, *klaudin* ve bağlantı adezyon molekülü (junctional adhesion molecul-JAM)'nden oluşmaktadır (Şekil 2.7). Tight junctionlar (Tj), epitel hücreleri arasından her iki yöne doğru (apikalden – bazale, bazalden –apikale) oldukça sıkı bir tutunma meydana getirir. Bu sayede sağlam bir barikat oluşturarak madde geçişini engeller. Bu proteinler, homofilik (*CLDN1/CLDN1*) ve heterofilik (*CLDN1/CLDN3*) etkileşimler ile epitelde bariyer fonksiyonu görürler. Böbrek doku hücrelerinde paraselüler geçirgenlik ve iyonların seçiciliğini düzenlerler ve bu sayede sıvı ve iyonların hücre içine ve dışına taşınmasında bariyer oluştururlar (9).

Bu transmembran proteinlerinin hücre içi bölgeleri skaffold (ZO-1, ZO2, ZO-3, hücre polarite proteini-PAR3) ve adaptör proteinlerinin (Post-synaptic density Protein 95/Drosophila disc large/Zona-occludens(PDZ)) domainlerinin etkileşimleri ile hücre iskeletini, polaritesini, sinyalini ve vezikül taşınımını düzenleyebilmektedirler. Sıkı bağlantı proteinleri kinazların, fosfatazların ve diğer sinyal moleküllerinin fosforilasyonu ile düzenlenirler (68-70).

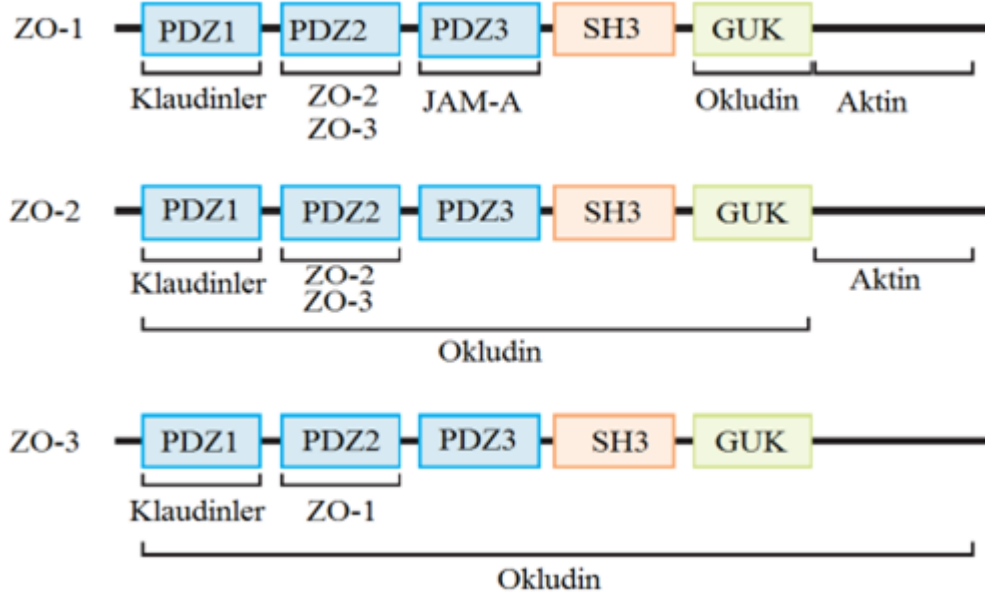


Şekil 5. Sıkı Bağlantı ve Skaffold Proteinleri (9)

Zonula Okludensler

ZO proteinleri; ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 olmak üzere ilk tanımlanan üç spesifik sıkı bağlantı proteinleridir. Bu proteinler, membran ilişkili guanilat kinaz protein ailesindedir ve üç PDZ yapısal bölgesi, bir Src homoloji-3 (SH3) bölgesi ve bir de guanilat kinaz (GUK) homoloji bölgesinden oluşmaktadır. Şekil 2.8’de gösterildiği

gibi bu yapısal bölgeler, hücre içi skaffold yapıların oluşumunu sağlar ve sıkı bağlantı komplekslerinin düzenlenmesi için gereklidir. ZO-1 geni, sıkı bağlantı protein 1 (Tight Junction Protein 1- TJP1) olarak da adlandırılmaktadır. ZO-1 geni, 33 ekzondan oluşmaktadır ve 15. kromozomun q13.1 bölgesinde lokalizedir (71).



Şekil 6. ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 İntegral Skaffold Sıkı Bağlantı Proteinleri ve Diğer Proteinler ile Etkileşimleri (71)

Okludinler

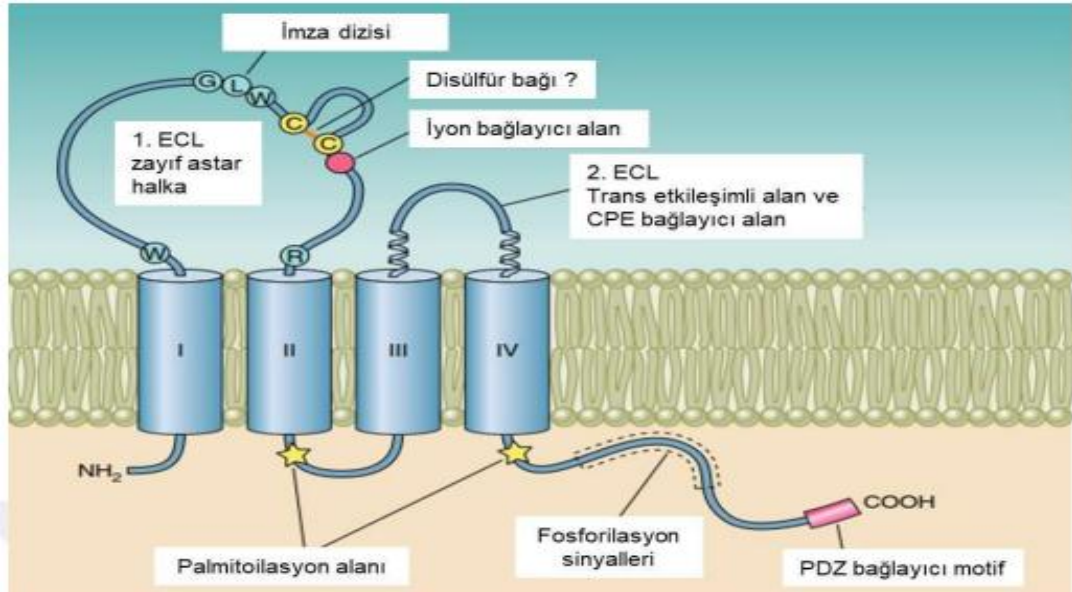
Okludin, integral membran proteini olarak ilk tanımlanan spesifik bir sıkı bağlantı proteindir. Daha çok epitel ve endotel hücrelerinde ifadenmektedir. 60-80 kDa ağırlığında zarı kateden dört transmembran kısmı ve ekstraselüler ve intraselüler bölgelerden oluşmaktadır. Ekstraselüler bölgesi, seçici paraselüler geçirgenlikte rol alırken intraselüler bölgesi ZO-1 proteininin PDZ domaini ile etkileşerek aktin filamentlerine bağlanmaktadır (72, 73).

Klaudinler (CLDN)

Klaudinler (CLDN), iyon ve suyun paraselüler geçişinde rol oynayan transmembran proteinlerdir (14). Sıkı bağlantıların(Tj) esas integral membran proteinleri *klaudinlerdir*. *Klaudinler*, sıkı bağlantıların temel yapısını oluşturdukları

düşünülmektedir. *Klaudinler* epitelial hücrelerin seçici olarak geçirgenliğinde doğrudan doğruya etki etmektedir. İlk olarak 1998 yılında Japon araştırmacılar Furuse ve ark. (74) tarafından bulunmuştur. İnsanda 21-34 kilodalton (kDa) ağırlığında olup, 207 ila 305 amino asit içerir. *Klaudinler*, renal epitel hücrelerinde parasellüler yolda hem gözenek hem de bariyer olarak işlev gören sıkı bağlantılı membran proteinleridir (14). Böbrek epitel hücrelerinin fizyolojisinde ve patofizyolojisinde *Klaudinlerin* önemli rolleri vardır.

CLDN'ler Şekil 7'de gösterildiği gibi 4 transmembran alana, iki hücre dışı halkaya (ECL 1–ECL 2) sitoplazmik bölgede amino ve karboksi terminal alana sahiptir. *CLDN* ailesinin en az 27 üyesi tanımlanmıştır. Bu proteinler genellikle epitelyal ve endotelyal hücreler tarafından eksprese edilir. Ekspresyonları diğer sıkı bağlantı proteinlerinden farklı olarak doku ve hücre tipine göre çeşitlilik gösterir (14, 75, 76).



Şekil 7. *Klaudin (CLDN) Protein Modeli (14)*

Üzerinde çalışılmış *CLDN* tiplerinin çoğunluğu böbrekte eksprese edilir. *CLDN*'lerin özel kombinasyonlarının, her nefron segmentinde önemli parasellüler geçirgenlik özelliklerini belirlediğine inanılmaktadır. *Klaudinler* böbrek dokusunda tübüller boyunca yerleşmiş olup; nefron segmentlerinin seçiciliğini ve geçirgenliğini

düzenler. Böbrekte bulunan *CLDN*'lerin farklı fonksiyonları ve lokalizasyonları vardır (14).

Klaudinler (CLDN); Proksimal tübülde, suyun ve tuzun yeniden emilmesinde görev alır. Henlenin çıkan kalın kolunda (TALH), magnezyum ve kalsiyumun yeniden emilmesinde rol alır ve kalsiyum sensitif reseptörü tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Distal nefronda; elektrojenik sodyum yeniden emiliminde görev alır (14).

CLDN 1;Parietal epitel hücrelerinde (PEC) eksprese edilir. PEC'lerin bir belirteci olarak kabul edilir. Glomerüler podositlerde, hücre bağlantılarında belirleyici rol oynar. Bowman kapsülünde lokalizedir. Katyon bariyer olarak görev alır (14).

CLDN 2; Yüksek iletken katyon gözenekleri oluşturan *CLDN 2*, proksimal tübül ve Henle'nin inen ince kolunda eksprese edilir. *CLDN 2* proksimal tübüldeki paraselüler sodyum(Na) geri emiliminden sorumludur. Aksine, *CLDN 4* ve *CLDN 8* esas olarak katyon bariyerleri olarak işlev görürler ve genel olarak nefronun distal kısımlarında eksprese edilir. *CLDN 2*, epitelyal hücre dizilerinde aşırı eksprese edildiğinde, katyona geçirgen paraselüler gözenek gibi davranır. Böbrekte, farelerde *CLDN 2*'nin bloke edilmesi, proksimal tübül S2 segmentlerinin Na iletkenliğinde bir azalmaya sebep olmuş ve Na ve suyun geri emilmesinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. Bir başka çalışmada *CLDN 2*'nin bloke edilmesi ile hiperkalsiüri gözlenmiştir. Bu sonuçlar *CLDN 2*'nin sodyum(Na) ve kalsiyum(Ca) geri emilimini sağladığını ve suyun emilmesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (76).

CLDN 3: Toplama kanalına giden ince yükselen henle kolunda eksprese edilir.Geçirgenlik özelliği bilinmemektedir.

CLDN 4: Henlenin ince yükselen kolunda ve toplayıcı tübüllerde eksprese edilir.Katyon bariyer ve anyon seçici gözenek olarak görev alır.

CLDN 7: Henlenin distal ince inen kolunda, maküler densa, distal tübül, toplayıcı kanallarda eksprese edilir. Anyon bariyer olarak görev alır.

CLDN 8: Henlenin distal ince inen kolunda, distal tübül, toplayıcı kanallarda eksprese edilir. Katyon bariyer olarak görev alır.

CLDN 10: Proksimal tübülden toplayıcı kanallara kadar olan bölümde eksprese edilir. Anyon gözenekli veya katyon gözenekli değişken olarak görev alır.

CLDN 10'un; *CLDN 10 a* ve *CLDN 10 b* olmak üzere iki çeşidi vardır. Bu iki *CLDN* farklı hücre dışı alanlara ve farklı fonksiyonel özelliklere sahiptir. Anyon seçici olan *CLDN 10 a*, korteksteki nefron tübülleri içinde daha yoğun bulunurken, katyon seçici *CLDN 10 b* medullada daha fazla bulunur.

CLDN 14: Toplayıcı kanallarda eksprese edilir .Katyon bariyer olarak görev alır.*CLDN 14* genindeki polimorfizm böbrek taşı riski ile ilişkilidir. Yakın tarihli bir genom çapında ilişki çalışması, *klaudin-14* 'ü hiperkalsiürik nefrolitiazis için önemli bir risk geni olarak tanımlamıştır (14).

CLDN 16 (paracellin-1): Henlenin ince yükselen kolunda ve kalın yükselen kolunda eksprese edilir. Katyon seçici gözenek olarak görev alır. *Kludin 16* daki genetik mutasyonlar, nefrokalsinoz ile birlikte ailesel hipomagnezemik hiperkalsiüriye neden olduğu (FHHNC) görülmüştür (14, 77).

CLDN 18: Toplayıcı kanallarda eksprese edilir .Sodyum (Na) ve Hidrojen (H) iyon bariyeri olarak görev alır.

CLDN 19: Henlenin ince yükselen kolunda ve kalın yükselen kolunda eksprese edilir. Bu gendeki resesif mutasyonlar, kalıtsal bir kalsiyum ve magnezyum kaybı hastalığına neden olur (78). Böbrek tübülü boyunca *CLDN* lokalizasyonu Şekil 2'de verilmiştir (79).

Bowman kapsülü	Proksimal tübül	İnen ince kol	Çıkan ince kol	Çıkan kalın kol	Makula densa	Distal tübül	Toplayıcı kanal
Glomerüler filtrat bariyeri	Na, Cl, HCO ₃ ⁻ , glikoz ve su emilimi	Medüller interstisyel konsantrasyon gradyanı üretimi		NaCl ile paraseüler Ca ve Mg geri emilimi	TGF ve renin sekresyonu sinyalleri	Elektronötral NaCl ile paraseüler Ca ve Mg geri emilimi	Elektrojenik Na ⁺ , K ⁺ ve H ⁺ sekresyonu, AVP bağımlı su geri emilimi
CLDN1							
	CLDN2						
			CLDN4		CLDN3		CLDN4
		CLDN7				CLDN7	
		CLDN8				CLDN8	
				CLDN10			
				CLDN14			
			CLDN16				
			CLDN18				CLDN18
			CLDN19				

Şekil 8. Böbrek Tübülündeki *Klaudin (CLDN)* Lokalizasyonu (79)

MATERYAL VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üroloji Kliniğine başvuran ve ‘‘Kalsiyum Okzalat Böbrek Taşı’’ tanısı almış,15’i erkek 4’ü kadın olmak üzere 19 hasta birey ile böbrek taşı tanısı almamış ve diğer nedenlerle kliniğe başvuran 15’i erkek 6’si kadın olmak üzere olan toplamda 21 kontrol birey çalışmaya dahil edildi. Üniversitemizin İstatistik Anabilim Dalı tarafından değerlendirilen güç analizi sonucunda çalışmaya en az 38 kişi (her grup için en az 19 kişi) alındığında %95 güven düzeyinde %80 güç elde edilebileceği hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarının belirlenmesinde öncelikli kriterlerimiz şu şekildedir.

Hasta Grubunun Belirlenmesinde Uyulan Kriterler

18 yaş ve üzerinde olması

Böbrek taşı nedeni ile ameliyat endikasyonu olan hastalar.

Taş analizi sonucunda kalsiyum okzalat taşı olan hastalar.

Kontrol Grubunun Belirlenmesinde Uyulan Kriterler

18 yaş ve üzerinde olması

Üriner sistem taş öyküsü olmaması

Böbrek taşı dışındaki nedenlerle (Renal Hücreli Karsinom, Atrofik Böbrek, Transizyonel Hücreli Karsinom) ameliyat olan olgular.

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin cinsiyetleri, yaşları, beden kitle indeksi (BKI), ek hastalıkları, taş öyküsü olup olmaması ve sosyodemografik verileri kaydedildi.

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 19.11.2019 tarih ve 20 nolu kurul toplantısı kararı ile onaylanmıştır. Çalışmaya dahil olan bireylere yapılacak olan işlemlerin detaylı açıklamalarını içeren bilgilendirilmiş gönüllü olur formları okutularak, bireylerin

yazılı izinleri alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden mRNA ekspresyonlarının analizi için, böbrek taşı tanısı almış ve bu nedenle perkütan nefrolitotomi operasyonu yapılan çalışma grubundaki olgularda ameliyat sırasında herhangi bir komplikasyona neden olmayacak şekilde perkütan trakt hattındaki böbrek dokusundan 10 mm³ biyopsi örnekleri alındı. Yine aynı şekilde böbrek taşı tanısı olmayan ve diğer nedenlerle (renal hücreli karsinom nedeni ile parsiyel yada radikal nefrektomi yapılan olgular, transizyonel hücreli karsinom nedeni ile nefroüretrektomi yapılan olgular, atrofik böbrek nedeni ile basit nefrektomi yapılan olgular,) ameliyat edilen kontrol grubundaki olguların ameliyat materyalindeki böbrek dokusundan alınan 10 mm³ biyopsi örnekleri, içinde RNA later solüsyonu bulunan tüplere konuldu ve böbrek doku örnekleri alınır alınmaz RNA stabilize edici ajan varlığında, total RNA izolasyon aşamasına kadar -80°C’de saklandı.

Doku örnekleri çalışma ve kontrol grubu olmak üzere ayrı ayrı işaretlendi. Ayrıca böbrek taşı nedeniyle ameliyat edilen hastaların taş örnekleri hastanemiz biyokimya laboratuvarındaki taş analizi bölümünde analiz edilerek kalsiyum okzalat taşı oldukları belirlendi.

Alınan böbrek dokusu biyopsi örneklerinden sırasıyla total RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve gerçek-zamanlı PCR komponentleri kullanılarak, her bir hedef gene özgün ekspresyon analizleri yapıldı.

BÖBREK DOKUSU ÖRNEKLERİNDEN TOTAL RNA İZOLASYONU

Böbrek dokusu örneklerinden total RNA izolasyonu için ticari RNA izolasyon kiti (Hybrid-R™, Geneall) kullanılmıştır. RNA izolasyonu için uygulanan basamaklar şu şekildedir:

1. RNA later solüsyonunda -80°C’de saklanan böbrek biyopsi doku örnekleri oda sıcaklığında çözülünceye kadar bekletildi.
2. 100 mg böbrek biyopsi örneği 1ml RiboEx™ solüsyonunda doku homojenitörü yardımı ile homojenize edildi.
3. Elde edilen homojenat oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyon sonrası homojenat 4°C'de, 12.000 x g'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant temiz tüpe aktarıldı.
5. Süpernatant üzerine 200 µl kloroform eklendikten sonra homojenat kuvvetlice vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası homojenat 4°C'de, 12.000 x g'de 15 dk santrifüj edildi ve üstteki sulu faz temiz tüpe aktarıldı.
7. Temiz tüpe aktarılan sulu faz üzerine 1 hacim RB1 (RB Transcriptional Corepressor 1) tamponu eklendi ve tüp ters çevrilerek karıştırıldı.
8. Elde edilen karışımdan 700 µl alınarak mini kolona transfer edildi.
9. Oda sıcaklığında 10.000 x g 'de 30 sn santrifüj uygulandı.
10. 8 ve 9. Basamaklar tekrar edildi.
11. Mini kolon üzerine 500 µl SW1 tamponu eklendi.
12. Oda sıcaklığında 10.000 x g 'de 30 sn santrifüj uygulandı.
13. Mini kolon üzerine 500 µl RNW tamponu eklendi.
14. Oda sıcaklığında 10.000 x g 'de 30 sn santrifüj uygulandı.
15. Kalan yıkama tamponunu uzaklaştırmak üzere oda sıcaklığında 10.000 x g 'de 1 dk santrifüj uygulandı ve mini kolon yeni 1.5 ml santrifüj tüpüne aktarıldı.
16. Mini kolon membranına 50 µl nükleazlardan arındırılmış su eklendi ve mini kolon oda sıcaklığında 1 dk inkübasyona bırakıldı.
17. İnkübasyon sonrası 10.000 x g 'de 1 dk santrifüj uygulandı.
18. Elde edilen RNA örneği ileri analizler için -20°C'ye kaldırıldı.

BÖBREK DOKUSUNA AİT TOTAL RNA ÖRNEKLERİNİN SAFLIK DERECELERİNİN VE KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

Çalışma ve kontrol grubuna ait böbrek biyopsi doku örneklerinden izole edilen total RNA örneklerinin saflıkları ve konsantrasyonları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçülmesiyle değerlendirilen spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Ardından saflık ve konsantrasyon seviyeleri belirlenen böbrek dokusuna ait RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi

cDNA SENTEZİ

cDNA sentezi için VitaScript™ FirstStrand cDNA Sentez Kiti kullanılmıştır. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon karışımları hazırlandı. Tek bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışım içeriği Tablo 3'te gösterilmiştir. Örnek sayısına göre gerekli miktarda reaksiyon karışımı hazırlandı ve 0.2 ml'lik ependorf tüplerine dağıtıldı.

Tablo 3. cDNA Sentezinde Tek Bir Örnek İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Tek reaksiyon (hacim)	Bileşenler
4 µl	5× VS Reaction Buffer
1 µl	VitaScript™ Enzyme Mix
1-6 µl	Total RNA
20 µl'ye tamamlanır	Nukleaz-free H2O
20 µl	Toplam hacim

Yukarıdaki tabloda belirtildiği şekilde hazırlanan reaksiyon karışımlarına hasta ve kontrol gruplarına ait böbrek dokusundan elde edilen RNA örnekleri eklendi. Hazırlanan örnekler thermal cycler cihazına (BioRad) yerleştirildi. cDNA sentezinde uygulanan protokol Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. cDNA Sentezinde Thermal Cycler Cihazında Uygulanan Protokol

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak
Sıcaklık(°C)	42	80	4
Zaman	1 saat	10 dakika	∞

Elde edilen cDNA'lar gerçek-zamanlı PCR analizine kadar -20°C'de saklandı.

GERÇEK-ZAMANLI KANTİTATİF PCR YÖNTEMİ İLE GEN EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

Hedef genlerin (*CLDN 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 14, 16, 18 ve 19*) ekspresyonlarının analizi için böbrek doku örneklerinden elde edilen RNA'lardan sentezlenen

cDNA'lar kullanılmıştır. Gerçek-zamanlı PCR sistemi (Rotor Gene, Qiagen) kullanılarak hedef genler ve β -aktin (referans gen) için relatif kantitasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçek-zamanlı PCR'da analiz edilen hedef genlere ait primer ve prob dizileri (Roche Diagnostics) Tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Ekspresyon Analizinde Kullanılan Primer ve Prob Dizileri

<i>CLDN1</i>	TGG TCA GGC TCT CTT CAC TG (Forward) TTG GAT AGG GCC TTG GTG TT (Reverse) TTC TCT CTG CCT TCT GGG AGG TGC C (Prob)
<i>CLDN2</i>	ACC CTC AAC TTG AAA CCC CA (Forward) GGT CAG TCA GTG GGA TGT GA (Reverse) CCA GGA CTC AGA GGA TCC CTT TGC CCT (Prob)
<i>CLDN3</i>	CCA AGG CCA AGA TCA CCA TC (Forward) GGT TGT AGA AGT CCC GGA T (Reverse) AGG CGT GCT GTT CCT TCT CGC C (Prob)
<i>CLDN4</i>	CTG GAT ATT GGG GAG GGA C (Forward) AGG GTT AAG CTA TCC TGG C (Reverse) ACA GGG TGT GGT GGT GGA GTG GGG A (Prob)
<i>CLDN7</i>	AAA GTG AAG AAG GCC CGT ATA GC (Forward) GCT ACC AAG GCG GCA AGA C (Reverse) CCA CGA TGA AAA TTA TGC CTC CAC CCA (Prob)
<i>CLDN8</i>	ATT CCC TGC TGG CTC TTT CT (Forward) AGA AGG ACA TCA CGG AAG CA (Reverse) CTA CAG GCA GCC AGA GGA CTG ATG T (Prob)
<i>CLDN10</i>	GGA GCC GCT CTG TTT ATT GG (Forward) TGG CCC CGT TGT ATG TGT AT (Reverse) AGG AGC CTC ACT GTG CAT AAT TGG T (Prob)
<i>CLDN14</i>	CAC CAG CTG CCT ACA AAG AC (Forward) TAG TCG TTC AGC CTG TAC CC (Reverse) CCT CAG TGA CCT CGG CCA CGC A (Prob)
<i>CLDN16</i>	TGC CTG TAG TCC CAG CTA (Forward) CTC ACT GCA ACC TCC ACC (Reverse) AGG CTG AGG CAG GAG AAT CGT TTG (Prob)
<i>CLDN18</i>	GGA TGG TGC AGA CTG TTC AG (Forward) CCC AAT TAG TGT GAG GCC T (Reverse) ACA CAT TTG GTG CGG CTC TGT TCG T (Prob)
<i>CLDN19</i>	CTC CTT CCT CTG CTG CAC AT (Forward) AGA GGG TCC AGG CCG ATA (Reverse) AGC CAG AGA GAC CCA ACA GCA GC (Prob)
<i>β-aktin</i>	CCC AGA TCA TGT TTG AGA CCT T (Forward) CCA GAG GCG TAC AGG GAT (Reverse) TGT ACG TTG CTA TCC AGG CTG TGC (Prob)

Hedef genlerin (*CLDN 1,2,3,4,7,8,10,14,16,18,19*) ve referans genin (*beta aktin*) hasta ve kontrol gruplarında mRNA düzeyinde relatif ekspresyonunu değerlendirebilmek amaçlı 2x PCR master karışımı (Roche Diagnostics) ile reaksiyon karışımı hazırlandı. Ekspresyon analizi için reaksiyon karışımı aşağıda tablo 6’da belirtilmiştir.

Tablo 6. Ekspresyon Analizi İçin Hazırlanan Reaksiyon Karışımı

Bileşenler	Hacim
Su, PCR-grade	6.5 µl
Primer-Prob karışımı	1 µl
2x master karışımı (<i>Taq</i> Polimeraz içeren)	10 µl
cDNA	2.5 µl
Toplam hacim	20 µl

Yukarıda belirtilen şekilde hazırlanmış olan reaksiyon sonrasında Gerçek-zamanlı PCR cihazına (Rotoe Gene, Qiagen) yerleştirilerek Tablo 7’te belirtilen protokol gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. Ekspresyon Analizinde Kullanılan Gerçek-Zamanlı PCR Protokolü

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Analiz modu	yok	Kantifikasyon modu			Yok
Döngü	1	45			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:12:00	00:00:10	00:00:30	00:00:01	00:00:30
Kazanım modu	Yok	Yok	Yok	Tek okuma	Yok

Çalışmamızda sonuçların relatif kantitasyonunu değerlendirme amaçlı comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle reaksiyon sonucunda hasta ve kontrol gruplarına ait örneklerin eşik döngü (C_T =threshold cycle) değerleri hedef genler (*CLDN 1,2,3,4,7,8,10,14,16,18,19*) ve referans gen olan β -*aktin* için belirlendi. Her bir hedef genin ekspresyonu, referans gen (β -*aktin*) ekspresyonuna göre normalize edilmiştir. Bu değer ΔC_T olarak ifade edilmektedir. Bu hesaplama için $\Delta C_T = C_T (\text{hedef genler}) - C_{T\beta\text{-aktin}}$, denklemi kullanılmıştır.

Sonrasında, relatif ekspresyon katlı değişimleri için ΔC_T değerinin logoritmik değeri alınarak $\Delta\Delta C_T$ değeri hesaplandı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gruplar arasında elde edilebilecek olan etki büyüklüğünün orta derece ($d=0.5$) olabileceği varsayılarak yapılan güç analizi sonucunda çalışmaya en az 19 kişi alındığında (her grup için en az 38 kişi) %95 güvenle %80 güç elde edileceği hesaplanmıştır. Veriler SPSS 25.0 paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Parametrik test varsayımlarını sağlanmadığı için çalışmada bağımsız grup farklılıkların karşılaştırılmasında Mann whitney U testi kullanılmıştır. Ayrıca sürekli değişkenlerin arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analizi ile incelenmiştir. Tüm analizlerde $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya böbrek taşı olan ve buna bağlı şikayetlerle kliniğimize başvuran 19 hasta birey ile taş öyküsü olmayan ve diğer nedenlerle kliniğimize başvuran 21 kontrol birey çalışmaya dahil edildi. Tablo 6’ daki demografik veriler değerlendirildiğinde hasta grubunda en küçük yaş 25, en büyük yaş 73 ve yaş ortalaması 51,58 iken, kontrol grubunda ise en küçük yaş 20, en büyük yaş 76 ve yaş ortalaması 54,10 olarak bulundu. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş farkı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.611$). Boy ortalaması hasta grubunda 170,05 cm iken, kontrol grubunda 167,52 cm olduğu görüldü. Hasta ve kontrol grupları arasında boy ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.295$). Hasta grubunun ortalama kilo değeri 78,11 kg iken, kontrol grubunun ki 75,05 kg idi. Hasta ve kontrol grupları arasında kilo değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.464$). Beden Kitle İndeksi (BKİ) ortalama değerleri hasta grupta 27,01 kontrol grubunda 26,76 olarak hesaplandı. Hasta ve kontrol grupları arasında BKİ ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.854$) Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik veriler aşağıda tablo 8’ da belirtilmiştir.

Tablo 8. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Verileri

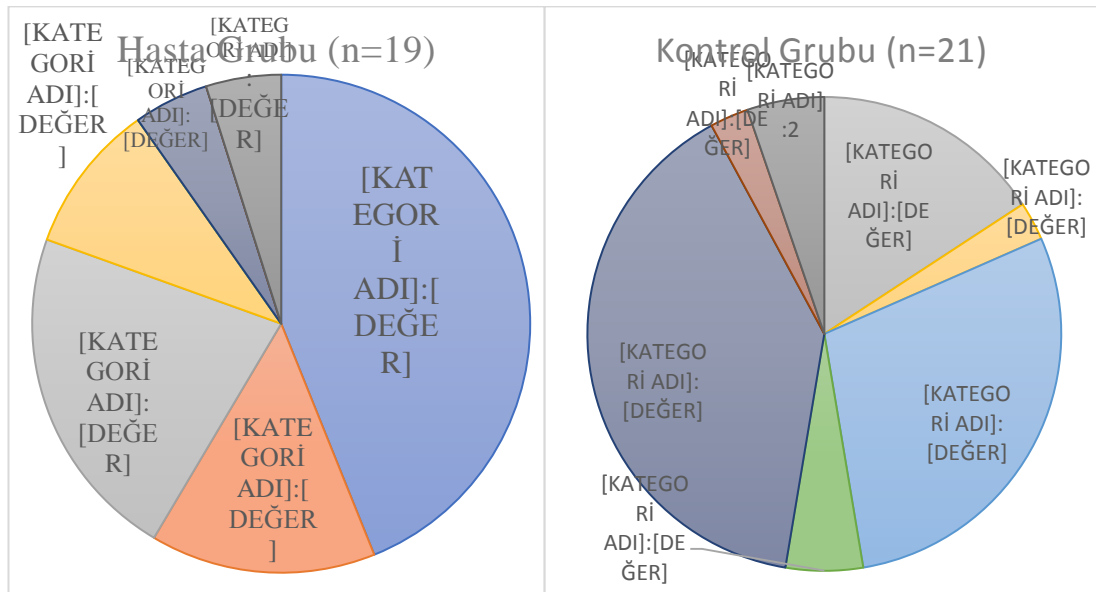
	Hasta Grubu (n=19)		Kontrol Grubu (n=21)		p
	Ort. ± S.S.	Med (min- maks)	Ort. ± S.S.	Med (min- maks)	
Boy	170,05±6,01	170 (162-185)	167,52±8,65	168 (151-185)	0,295
Kilo	78,11±14,43	74 (57-112)	75,05±11,69	73 (59-107)	0,464
BKİ	27,01±4,75	25,61 (20,76-36,36)	26,76±3,72	25,70 (21,22-36,51)	0,854
Yaş	51,58±14,60	54 (25-73)	54,10±16,23	57 (20-76)	0,611
		n (%)		n (%)	
Cinsiyet	Kadın	4 (%21,1)		6 (%28,6)	0,429
	Erkek	15 (%78,9)		15 (%71,4)	

Çalışmaya dahil edilen hastaların ve kontrol grubundaki bireylerin taş öyküsü haricinde bulunan ek hastalıkları tablo 9 ‘da verilmiştir. Hasta grubunda en sık

görülen komorbiditesi HT (n=9) ve DM (n=4) olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda sık görülen komorbidite CA öyküsü (özellikle de RCC) olduğu görülmüştür.

Tablo 9. Hasta ve Kontrol Grubunun Ek Hastalık Bilgileri

Ek hastalık	Hasta Grubu (n=19)	Kontrol Grubu (n=21)
Taş öyküsü	18	0
Yok	6	0
HT	9	6
DM	4	1
RCC	0	11
PN(Piyelonefrit)	0	2
CA	2	15
Varikosel	0	1
KOAH	2	2
KBY	2	0



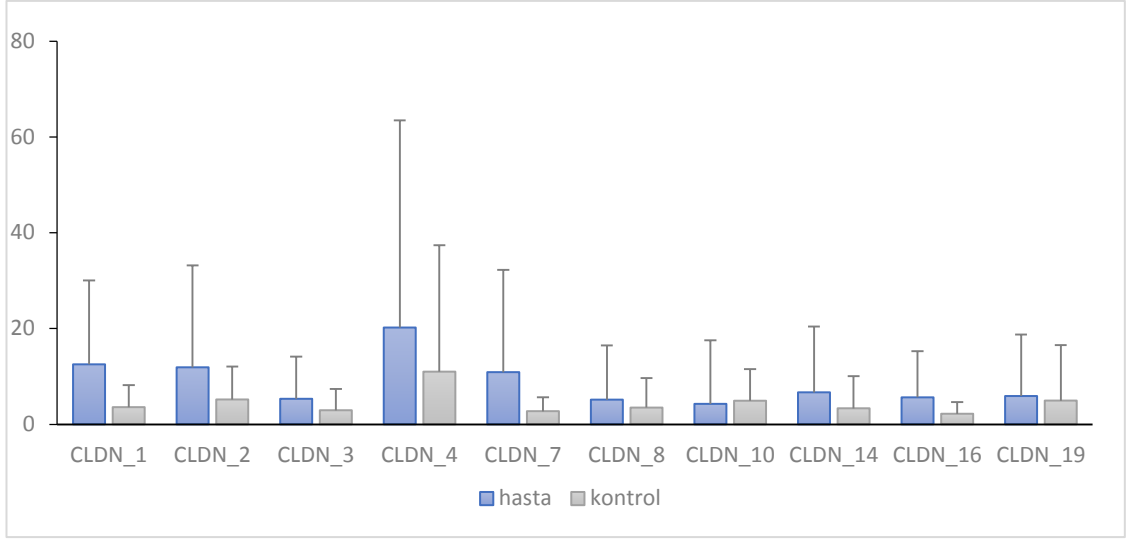
Şekil 9. Hasta ve Kontrol Grubunun Ek Hastalık Bilgileri

Hasta ve kontrol grubunun *CLDN* gen ekspresyon katlı değişim değerlerinin ortalamaları tablo 10’da verilmiştir. Çalışmamızda *CLDN 18* gen ekspresyonu hasta ve kontrol grubundaki bireylerin hiçbirinde gözlenmemiştir. Tablo 10’daki istatistiksel

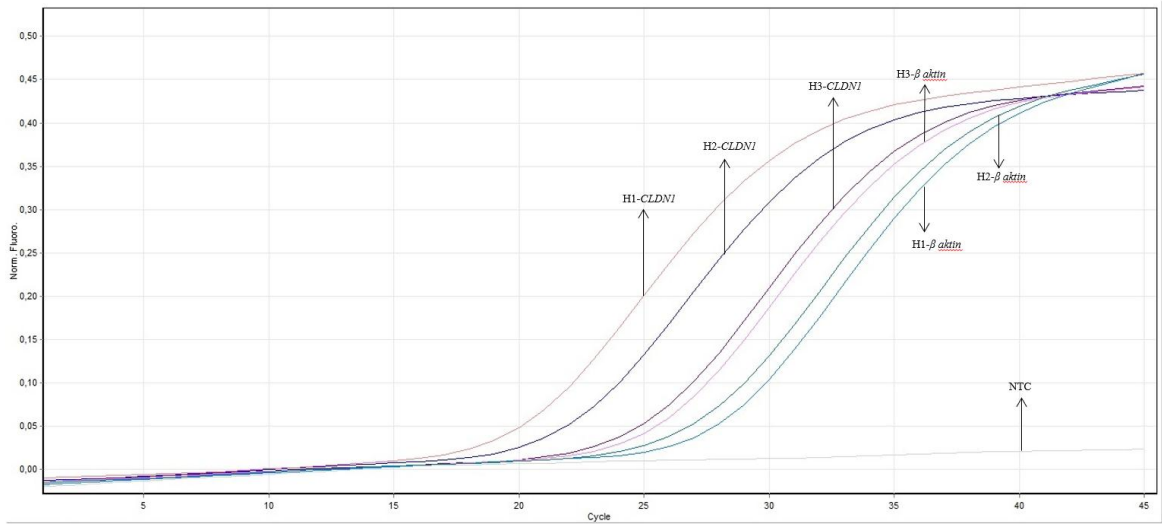
verilere bakıldığında *CLDN 2*, *CLDN 3*, *CLDN 4*, *CLDN 7*, *CLDN 8*, *CLDN 10*, *CLDN 14*, *CLDN 16*, *CLDN 18* ve *CLDN 19* genlerinde ekspresyon artışları açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p < 0,050$). Hasta grubu *CLDN 1* gen ekspresyon katlı artışı 12,82 ortalamaya ve kontrol grubunda 3,57 ortalamaya sahipti ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Tablo 10, Şekil 10) ($p = 0,037$). Örnek olarak, hasta grubumuza ait bazı bireylerin *CLDN 1* için amplifikasyon eğri görselleri Şekil 11 ve Şekil 12’de sunulmuştur.

Tablo 10. Hasta ve Kontrol Grubunun *CLDN* Gen Ekspresyon Profilleri

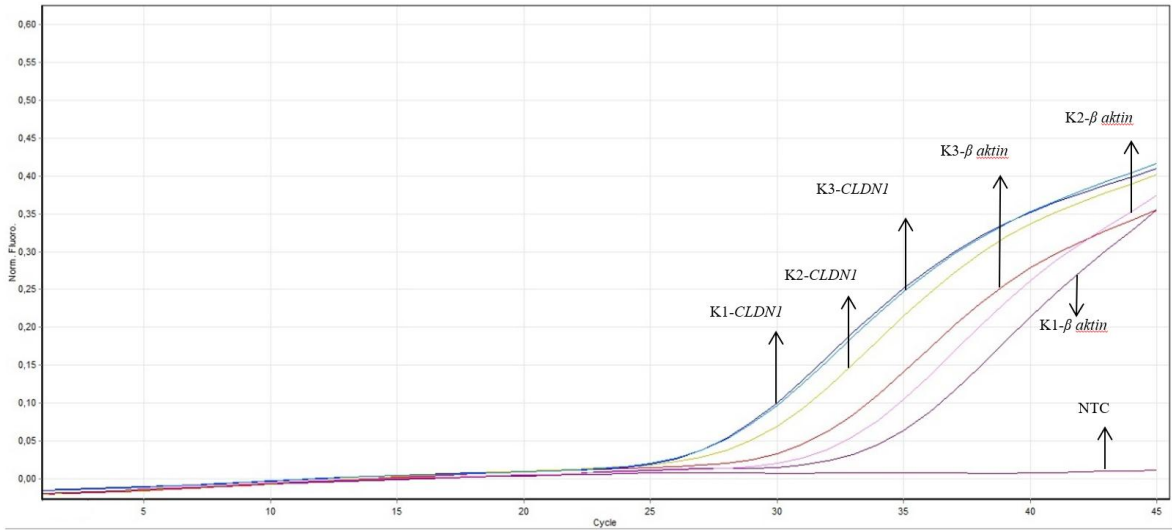
	HASTA		KONTROL		p
	A.O ± S.S	Med (min - maks)	A.O ± S.S	Med (min - maks)	
<i>CLDN 1</i>	12,82±17,51	4.42(0.81 - 54,68)	3,57±4,64	2.25(0 - 20,29)	0.037
<i>CLDN 2</i>	11.88 ± 21.31	2.47 (0.08 - 79.60)	5.17 ± 6.91	3.00 (0 - 21.48)	0.282
<i>CLDN 3</i>	5.31± 8.81	1.17(0.13 - 29.57)	2.92 ± 4.46	0.89 (0.06 - 14.48)	0.405
<i>CLDN 4</i>	20.19 ± 43.25	3.78(0.96 - 165.7)	10.98 ± 26.41	2.43 (0 - 117.21)	0.093
<i>CLDN 7</i>	10.87± 21.37	1.86 (0.22 - 80.63)	2.73 ± 2.92	1.90 (0 - 10.80)	0.410
<i>CLDN 8</i>	5.13 ± 11.32	1.31 (0.04 - 45.98)	3.47 ± 6.17	0.92 (0 - 26.22)	0.460
<i>CLDN 10</i>	4.25 ± 13.29	0.50(0.01- 55.31)	4.90 ± 6.58	2.20(0 .03- 23.25)	0.143
<i>CLDN 14</i>	6.66 ± 13.73	1.44(0.09- 58.44)	3.33 ± 6.71	0.75(0.05 - 29.02)	0.258
<i>CLDN 16</i>	5.61±9.62	2.60 (0.14 - 35.66)	2.19 ± 2.43	1.69 (0.03 - 8.79)	0.196
<i>CLDN 18</i>	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 ± 0	0 (0 - 0)	
<i>CLDN 19</i>	5.89 ± 12.85	1.55 (0.05 - 50.69)	4.94 ± 11.6	0.89(0.03- 51.75)	0.627



Şekil 10. Hasta ve Kontrol Gruplarının *CLDN* Ortalama Gen Ekspresyon Profillerinin Karşılaştırılması



Şekil 11. Hasta Grubunda Yer Alan 3 Bireye Ait β -aktin ve *CLDN 1* Amplifikasyon Eğrileri (K: Kontrol, H: Hasta, NTC: Negatif Template Control)



Şekil 12. Kontrol Grubunda Yer Alan 3 Bireye Ait β -aktin ve *CLDN 1* Amplifikasyon Eğrileri. (K: Kontrol, H: Hasta, NTC: Negatif Template Control)

Tablo 11’de hasta grubundaki bireylerin *klaudin* gen ekspresyonlarının birbirini ile korelasyonu görülmektedir. Buna göre *CLDN 1* gen ekspresyonu; *CLDN 2* ve *CLDN 8* ile orta düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterirken, *CLDN 4*, *CLDN 7* ve *CLDN 14* ile yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon göstermiştir. *CLDN 2* gen ekspresyonu; *CLDN 4* ile negatif yönde korelasyon gösterirken, *CLDN 1* ve *CLDN 8* ile ise orta düzeyde; *CLDN 10* ile de yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon göstermiştir. *CLDN 3* gen ekspresyonu; *CLDN 14* ve *CLDN 19* ile orta düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 4* gen ekspresyonu; *CLDN 1* ve *CLDN 7* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon gösterirken, *CLDN 2* ve *CLDN 19* ile ise negatif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 7* gen ekspresyonu; *CLDN 8* ile orta düzeyde; *CLDN 1* ve *CLDN 4* ile yüksek pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 8* gen ekspresyonu; *CLDN 1,2,7* ve *14* ile orta düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 10* gen ekspresyonu; *CLDN 16* ile orta düzeyde; *CLDN 2* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 14* gen ekspresyonu; *CLDN 3* ve *CLDN 8* ile orta düzeyde ; *CLDN 1*, *CLDN 16* ve *CLDN 19* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 16* gen ekspresyonu; *CLDN 10* ile orta düzeyde ; *CLDN 14* ve *CLDN 19* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 19* gen ekspresyonu; *CLDN 4* ile negatif yönde korelasyon gösterirken, *CLDN*

3 ile orta düzeyde, *CLDN 14* ve *CLDN 16* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir.

Tablo 11. Hasta Grubunun Korelasyon Analizi Sonuçları

Hasta Grubu		<i>CLDN</i> _1	<i>CLDN</i> _2	<i>CLDN</i> _3	<i>CLDN</i> _4	<i>CLDN</i> _7	<i>CLDN</i> _8	<i>CLDN</i> _10	<i>CLDN</i> _14	<i>CLDN</i> _16	<i>CLDN</i> _19
<i>CLDN 1</i>	r	1,000									
	p										
<i>CLDN 2</i>	r	,470*	1,000								
	p	0,049									
<i>CLDN 3</i>	r	0,470	0,202	1,000							
	p	0,057	0,436								
<i>CLDN 4</i>	r	,642**	-0,039	0,304	1,000						
	p	0,004	0,877	0,236							
<i>CLDN 7</i>	r	,753**	0,212	0,125	,820**	1,000					
	p	0,000	0,399	0,633	0,000						
<i>CLDN 8</i>	r	,556*	,520*	0,275	0,309	,550*	1,000				
	p	0,017	0,027	0,286	0,213	0,018					
<i>CLDN 10</i>	r	0,036	,680**	0,003	0,341	0,456	0,408	1,000			
	p	0,891	0,003	0,991	0,181	0,066	0,104				
<i>CLDN 14</i>	r	,651**	0,353	,576*	0,007	0,196	,529*	0,190	1,000		
	p	0,003	0,164	0,016	0,978	0,451	0,029	0,481			
<i>CLDN 16</i>	r	0,359	0,388	0,456	0,166	0,243	0,348	,495*	,756**	1,000	
	p	0,131	0,111	0,066	0,510	0,332	0,157	0,043	0,000		
<i>CLDN 19</i>	r	0,265	0,438	,517*	-0,073	0,059	0,463	0,293	,798**	,614**	1,000
	p	0,272	0,069	0,034	0,773	0,817	0,053	0,254	0,000	0,005	

*istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur

Tablo 12’de kontrol grubundaki bireylerin *Klaudin* gen ekspresyonlarının birbiri ile korelasyonu görülmektedir. Buna göre *CLDN 1* gen ekspresyonu; *CLDN 3* ile orta düzeyde, *CLDN 4* ile yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterirken, *CLDN 8,10,14,19* ile negatif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 2* gen ekspresyonu; *CLDN 4* ve *CLDN 16* ile orta düzeyde, *CLDN 7, CLDN 8* ve *CLDN 19* ile ise yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 3* gen ekspresyonu; *CLDN 1* ile orta düzeyde ; *CLDN 7,8,10,14,16,19* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 4* gen ekspresyonu; *CLDN 2* ve *7* ile orta düzeyde; *CLDN 1* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 7* gen ekspresyonu; *CLDN 4, CLDN 16* ve *CLDN 19* ile orta düzeyde, *CLDN 2,3* ve *8* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 8* gen ekspresyonu; *CLDN 1* ile negatif yönde korelasyon gösterirken; *CLDN*

2,3,7,10,14,16,19 ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 10* gen ekspresyonu; *CLDN 1* ile negatif yönde korelasyon gösterirken; *CLDN 3,8,14,16,19* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 14* gen ekspresyonu; *CLDN 1* ile negatif yönde korelasyon gösterirken; *CLDN 3,8,10,16* ve *CLDN 19* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 16* gen ekspresyonu; *CLDN 2* ve *CLDN 7* ile orta düzeyde pozitif yönde korelasyon gösterirken ; *CLDN 3,8,10,14* ve *19* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir. *CLDN 18* gen ekspresyonu kontrol grubundaki hiçbir bireyde gözlenmemiştir. *CLDN 19* gen ekspresyonu; *CLDN 1* ile negatif yönde korelasyon gösterirken, *CLDN 7* ile orta düzeyde, *CLDN 2,3,8,10,14* ve *16* ile yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir.

Tablo 12. Kontrol Grubunun Korelasyon Analizi Sonuçları

Kontrol Grubu		<i>CLDN 1</i>	<i>CLDN2</i>	<i>CLDN_3</i>	<i>CLDN_4</i>	<i>CLDN_7</i>	<i>CLDN 8</i>	<i>CLDN 10</i>	<i>CLDN 14</i>	<i>CLDN 16</i>	<i>CLDN 19</i>
<i>CLDN 1</i>	r	1,000	0,078	,476*	,841**	0,375	-0,035	-0,303	-0,087	0,348	-0,093
	p		0,737	0,046	0,000	0,094	0,882	0,221	0,724	0,123	0,697
<i>CLDN 2</i>	r		1,000	0,420	,467*	,615**	,584**	0,311	0,386	,442*	,587**
	p			0,082	0,038	0,003	0,005	0,209	0,102	0,045	0,006
<i>CLDN 3</i>	r			1,000	0,300	,762**	,759**	,782**	,828**	,832**	,645**
	p				0,226	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005
<i>CLDN 4</i>	r				1,000	,496*	0,400	0,235	0,152	0,392	0,197
	p					0,026	0,081	0,363	0,548	0,087	0,420
<i>CLDN 7</i>	r					1,000	,568**	0,360	0,378	,508*	,547*
	p						0,007	0,142	0,111	0,019	0,013
<i>CLDN 8</i>	r						1,000	,798**	,884**	,869**	,838**
	p							0,000	0,000	0,000	0,000
<i>CLDN 10</i>	r							1,000	,730**	,711**	,698**
	p								0,001	0,001	0,001
<i>CLDN 14</i>	r								1,000	,856**	,830**
	p									0,000	0,000
<i>CLDN 16</i>	r									1,000	,756**
	p										0,000
<i>CLDN 19</i>	r										1,000
	p										

*istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur

TARTIŞMA

Böbrek taşı hastalığının görülme sıklığı Kuzey Amerika'da %7-13, Avrupa'da %5-9, Asya'da %1-5 ve ülkemizde ise yapılan çok merkezli bir çalışmada %14,8 oranı ile değişkenlik göstermekle birlikte, tüm dünyadaki ortak özelliklerinden birisi de yüksek düzeyde tekrarlama oranıdır (1, 80). Semptomatik taşların oluşumu büyük ölçüde yaşa ve ırka bağlıdır ve nüks oranı yüksektir. Böbrek taşı oluşum mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ailede böbrek taşı öyküsü bulunan erkek bireylerde riskin 2.57 kat arttığı gösterilmiştir (81). Endüstriyel toplumlarda görülen böbrek taşlarının en yaygın görülen tipi kalsiyum okzalat veya bunun hidrokksiapatit kombinasyonu olup yaklaşık olarak böbrek taşlarının %75'ini oluşturur. Böbrek taşlarının geri kalan %25'ini ise enfeksiyon taşları, ürik asit ya da sistin taşları oluşturur (2).

İnflamatuvar barsak hastalığı, primer hiperparatroidizm ve renal tübüler asidoz gibi sistemik hastalıkların kalsiyum taşı oluşumuna yatkınlıkla ilişkili olabileceği düşünülmekle birlikte, çoğu hastada bu problemler görülmemektedir. Konu ile ilgili bulgular, çoğunlukla intestinal apatit dositlerinden oluşan ve Randall plakları (RP) olarak bilinen renal papilla ile bağlantılı bölgelerde kalsiyum okzalat taşlarının oluştuğunu göstermektedir (3, 4). Bir başka ifade ile Randall plakları idiopatik kalsiyum okzalat böbrek taşı oluşumuna katılmaktadır. Ancak, RP oluşumu ile ilişkili genler henüz bilinmemektedir.

Kalsiyum okzalat böbrek taşı oluşumunun patofizyolojisi ile ilgili çalışmalar devam etmekle birlikte, henüz konsensüs sağlanmış bir mekanizma tanımlanmamıştır. Genom-çaplı ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), çoğunlukla taş matriksi, kalsiyum ve fosfat düzenlenmesi, inflamasyon ve oksidatif stresle ilişkili genlerin böbrek taşı oluşum riskine katılımlarına odaklanmıştır. Bu çalışmalarda idiopatik kalsiyum taşı olan hastalarda, her ne kadar monogenik nedenler

tanımlanmışsa da, etyolojide farklı genlerin ve çevrenin birlikte rol oynadığı kompleks bir etkileşimin yer aldığı değerlendirilebilir.

Kalsiyum okzalit taşı hastalığının genetik belirteçleri, risk altındaki hastaları tanımlamak ve ürolitiazisi önlemek için yararlı olabilir (82). Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), karmaşık hastalık genlerini haritalamak için bir araç olarak kullanılmıştır (83). D vitamini reseptörü (84), kalsitonin reseptörü (85) ve gen polimorfizmlerinin tümü, bu ilişki arayışında adaylar olarak önerilmiştir. Son zamanlarda, renal kalsiyum hastalıkları ve böbrek taşı hastalıklarında linkage çalışmaları ile genom-çaplı ilişkilendirme çalışmaları devam etmektedir ve bu çalışmalardan elde edilen veriler, renal tuz salınımında *NKCC2*, *ROMK* ve *ClCkb/Barttin* genlerinin; renal kalsiyum salınımında *Klaudin 14*, *16* ve *19* genlerinin; böbrekte su, tuz ve Ca homeostazının düzenlenmesinde *CasR* (Kalsiyum algılayıcı reseptör) geninin rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu genlerin ürünlerinin uyumlu çalışması, büyük olasılıkla böbrekte transepitelyal Ca transportunun selüler mekanizmasını açıklayabilecektir. Tight junctionlar(Tj,(Sıkı bağlantılar)); böbrek doku hücrelerinde paraselüler geçirgenlik ve iyonların seçiciliğini düzenlerler ve bu sayede sıvı ve iyonların hücre içine ve dışına taşınmasında bariyer oluştururlar (9). Tight junctionlar (Tj) oldukça fazla sayıda transmembran proteine sahiptirler.

Tight junctionların esas integral membran proteinleri *klaudinlerdir*. Böbrek epitel hücrelerinin fizyolojisinde ve patofizyolojisinde *Klaudinlerin* önemli rolleri vardır.

Klaudinler, epitel hücrelerinin paraselüler yolağında hem por hem de bariyer fonksiyonu gören tight-junction membran proteinleridir. Klaudinler 20-27 kilodalton (kDa) ağırlığında olan transmembran proteinlerdir (12).

Klaudinler Tight junctionların komşu hücreyle temas ettiği bağlantılarda bulunurlar ve primer yapılardır. *Klaudinlerin* en az 24 üyesi bulunmaktadır (13). Böbrekte, *klaudinler* renal tübül boyunca farklı nefron segmentlerinin

permabilitelerini ve özgünlüklerini belirlerler. Proksimal tübülde tuz ve suyun reabsorbsiyonunda, kalın asendens kolda kalsiyum(Ca) ve magnezyumun(Mg) geri emiliminde, distal nefronda katyon bariyerinin oluşturulmasında görevlidirler. *Klaudin 16* ve *19*'daki mutasyonların ailesel hipomagnezemik hiperkalsiürik nefrokalsinozdan (FHHNC) sorumlu oldukları bilinmektedir.

Böbrek taşlarının çoğunda majör komponent kalsiyumdur. Kalsiyum en çok proksimal tübülden ve henle kıvrımının kalın yükselen kolundan (TALH) paraselüler (epitel hücreleri arasından) yoldan yeniden emilir. Böbrek taşı oluşumu için en büyük risk faktörü hiperkalsiüridir. Artmış üriner kalsiyum atılımı, kristal büyümesine katkıda bulunur. Tersine, üriner kalsiyum atılımındaki azalma ise böbrek taşı oluşumunu yavaşlatır (86).Hiperkalsiüri, kalsiyumun çeşitli organlarda taşınmasının bozukluğundan kaynaklanabilir. Artmış bağırsak emilimi veya kemikten rezorpsiyon hiperkalsiüriyi teşvik eder çünkü renal kasiyum taşıyıcıları, serum kalsiyumunu 'normal sınırlar içinde tutmak için idrar atılımını ayarlar (87). *Klaudinler*, bir maddenin geçirgenlik özelliklerini veren sıkı bağlantı proteinleridir. *Klaudinlerde* oluşan bir mutasyon ya da defekt durumunda ultrafiltrata kalsiyum geçişi artar ve hiperkalsiüri, nefrokalsinozis ve nefrolitiasis olur. Örneğin *CLDN 14* de' ki mutasyonlarda hiperkalsiüri ve buna bağlı böbrek taşı oluşumu izlenir (88).Yani *Klaudin-14*'deki polimorfizmlerin böbrek taşı riski ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (14, 15). Dolayısıyla, böbrek taşı oluşumunda *Klaudin* gen ailesi üyelerinin rolleri henüz bilinmemektedir ve bu konuda yapılacak çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmaların *CLDN* gen poliformizminin böbrek taşı oluşumunda aktif rol oynadığını bildiren ve alt mutasyonlarına yoğunlaşan çalışmalar sıklaşmıştır (89-91). Yapılan çalışmaların büyük bir bölümünün *CLDN* ailesinin genetik varyasyonlarına (mutasyonlar ve polimorfizimler) odaklandığı görülmekle birlikte, bu aile üyelerinden hangilerinde gözlenen ekspresyon değişikliklerinin taş öyküsünde daha aktif bulunduğu araştırılmamıştır. Kliniğimize başvuran hastaların önemli bir kısmı üriner sistem taşı şikayeti ile başvurmakta ve klinik olarak taş tedavisine yönelik cerrahi tedavi modaliteleri rahatlıkla yapılmasına rağmen kurumun bağlı bulunduğu bölge itibariyle böbrek taşı öyküsü popülasyonda yüksek bir değer taşımaktadır (92). Kalsiyum okzalat böbrek taşı bulunan hastalarda ve

böbrek taşı harici şikayetlerle kliniğe başvuran kontrollerde taş oluşum mekanizmasından sorumlu tutulan *CLDN* gen ailesi üyelerinin ekspresyon durumlarını birlikte değerlendirmek, karşılaştırma yapmayı ve araştırmayı amaçladık.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz üriner sistem taşı olup bu şikayetle kliniğimize başvuran 19 hasta birey ile taş öyküsü olmayan ve diğer nedenlerle kliniğimize başvuran 21 kontrol birey olarak planladık. Çalışmaya dahil ettiğimiz hasta ve kontrol grubundaki bireylerin boy, kilo, BKİ, yaş ve cinsiyet açısından her ne kadar *CLDN* gen ekspresyonunun araştırmasında etken belirteç olarak görmesek de benzer aralıklarda olmasına dikkat ettik. Çalışmamızdaki hasta grubunda taş öyküsü bulunan 18 hasta ve bunun yanında kronik böbrek yetmezliği olan ailede sık görülen böbrek taşı öyküsü bulunan 1 hasta alındı. Hasta grubumuzdaki ek hastalıklarda HT, DM çoğunlukta idi.

Çalışmamıza aldığımız hasta ve kontrol grubundaki bireylerin hiçbirinde *CLDN 18* ekspresyonunu gözlemedik ve bu nedenle de analiz için aldığımız doku örneklerinde *CLDN 18* ekspresyonunun olmadığını yorumladık. Sahip olduğumuz çalışma grubunu incelerken *CLDN 18* ekspresyonunun böbrek taşı oluşumuna etkisinin olmadığını düşünüyoruz.

CLDN 1; *okludin* ve diğer *klaudin*lerle birlikte sıkı bağlantıların omurgasını oluşturan ve epitelyal bariyer fonksiyonları için gerekli olan bir membran proteindir (93). *Kludin* ailesinin 22 kDa moleküler ağırlığı ile tanımlanan ilk üyesidir ve bağırsak, dalak, beyin, karaciğer (hepatositlerin sıkı bağlantı noktalarında ve ayrıca safra kanalı kolanjiyositlerinin lateral membranı boyunca eksprese edilir) , böbrek (86) ve testis gibi vücudun çoğu yerinde güçlü bir şekilde eksprese edilir (94, 95). *CLDN 1* bariyer özelliklerini taşıyan 211 amino asit proteinini kodlayan dört eksondan oluşur. (96). *CLDN 1*'in aynı zamanda bariyer oluşturan *klaudin*ler olan *CLDN 3* ve *CLDN 5* ile etkileştiği gösterilmiştir (97). Aynı zamanda Deride epidermiste ifade edilir ve 'Bariyer *Kludin*' görevi görür. *CLDN 1* stratum corneum, stratum basale, stratum granulosum ve stratum spinosumda eksprese edilir. (85). *CLDN 1* mutasyonlarının çalışmalarda genelde kolon kanserleri, oral skuamöz

hücreli karsinomlar, meme kanserleri, melanomlar ve tiroid kanserleri gibi çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinde *CLDN 1*'in doğrudan rol oynadığını göstermiştir ve *CLDN 1* ile ilişkilendirilmiştir (98-100). Yapılan çalışmalarda *CLDN 1* gen ekspresyonunun bazı tümör tiplerinde destekleyici (tiroid kanseri, melanom, oral skuamöz hücreli karsinom), bazılarında ise tümör baskılayıcı (prostat kanseri, akciğer kanseri ve meme kanserinin bazı suptiplerinde) etkisi olduğunu göstermişler (99). Bizim çalışmamızda ise kontrol grubundaki hastalarımızın çoğunda (11 Renal Hücreli Karsinom (RCC), 4 Transizyonel Hücreli Karsinom (TCC)) RCC (renal hücreli karsinom) tümör tanısı mevcuttu ve bu kontrol grubundaki hastaların *CLDN 1* gen ekspresyonunun çalışma grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu (hasta grubu: $12,82 \pm 17,51$, kontrol grubu: $3,57 \pm 4,64$ p değeri: 0,037) gözlemledik. Dolayısıyla RCC açısından *CLDN 1* ekspresyonunun düşük olması RCC (renal hücreli karsinom) için tümör destekleyici olarak görünmektedir. Ayrıca Fritzsche ve ark. yaptıkları bir çalışmada *CLDN 1* 'in RCC (renal hücreli karsinom) alt tiplerinden olan papiller RCC ile berrak hücreli RCC arasındaki ekspresyon oranlarını incelemişler. *CLDN 1* 'in Papiller RCC 'de berrak hücreli RCC 'ye göre daha yüksek oranda eksprese olduklarını bulmuşlar.(Papiller RCC; %76-86, Berrak hücreli RCC; %29,9) (101).

Yine bizim çalışmamızdaki kontrol grubundaki RCC (renal hücreli karsinom) tanılı bireylerin çoğunluğu berrak hücreli tip RCC olup (11 RCC tanılı kontrol bireyin 8 tanesi berrak hücreli tip RCC), *CLDN 1* ekspresyonunun hasta grubuyla karşılaştırıldığında kontrol grubunda daha düşük olması (hasta grubu: $12,82 \pm 17,51$, kontrol grubu: $3,57 \pm 4,64$ p değeri: 0,037) bu çalışmayı destekler niteliktedir. Çalışmamız haricinde *CLDN 1* geni ile böbrek taşı öyküsünün incelendiği başka çalışmaya rastlamadık. Çalışmamız sonucunda *CLDN 1* gen ekspresyon artışının böbrek taşı ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu gözlemledik. Renal kalsiyum okzalat kristal gelişiminde TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin rolü iyi bilinmektedir (102). Her ne kadar renal doku özelinde olmasa da intestinal inflamasyonda TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü- α)'nın *klaudin 1* sentezini arttırdığı belirlenmiştir. Benzer mekanizma ile hasta grubunda *CLDN 1* ekspresyon artış mekanizması açıklanabilir.

Klaudinlerdeki ekspresyon değişimleri, renal iskemi gibi olaylara yanıt olarak da değiştirilebilir. Yapılan bir deneysel renal iskemi-reperfüzyon hasarında *CLDN 1 ve 7* genlerinde up-regüasyon izlenmiştir (103). Bizim çalışmamızda da özellikle hasta grubunda *CLDN 1 ve CLDN 7* ‘nin istatistiksel olarak pozitif yönde anlamlı korelasyon göstermesi olası bir iskemi reperfüzyon hasarına bağlı bu genlerdeki ekspresyon artışlarının taş oluşum mekanizmasına katkısı olduğunu düşünebiliriz.

Çoğu *klaudinlerin (CLDN 1,4,5,8,11 ve 14)*, genellikle katyon geçirgenliğini azaltarak konakçı hücre hattının transepitelyal direncini arttırdığı gözlenmiştir (104). Bu *klaudinlerde* oluşan bir ekspresyon artışı durumunda konakçı hücrenin transepitelyal bariyer mekanizmasında defekt meydana gelir ve katyon geçirgenliğinde artış olur. Hiperkalsiüri’ nin kalsiyum okzalat taşı oluşumu için en büyük risk faktörü olduğu göz önüne alındığında bu patofizyolojik mekanizmanın daha önemli hale geldiğini öngörebiliriz. Bizim çalışmamızda da özellikle taş öyküsü olan hasta grubunda *CLDN 1* ekspresyon artışının, *CLDN 8* ile orta düzeyde; *CLDN 4 ve 14* ile de yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon göstermesi, özellikle taş hastalarında böbrek hücrelerinin transepitelyal bariyer direncinin önemli olduğunu göstermektedir. Çalışma grubumuzda yer alan hasta sayısını Covid-19 pandemi koşullarına uygun tutmak durumunda kaldık ve bu pandemi nedeni ile daha fazla hastaya ulaşma çabasını gösteremedik. Özetle, *CLDN 1* ekspresyon artışının rolü ile ilgili daha geniş katılımlı çalışmaların yanısıra fonksiyon çalışmalarının da yapılması gerekliliğini düşünüyoruz.

Nedeni belli olmayan hiperkalsiürlü hastalarda taş oluşumunun patogenezi taşın bileşimine bağlı olarak değişmekle birlikte çoğunluğunun renal papilla veya papiller nefrokalsinozda kalsiyum birikimi ile başladığına inanılmaktadır (105). Bu idiyopatik hiperkalsiürlü hastalarda yapılan bazı çalışmalarda, proksimal renal tübülde (PT) kalsiyum reabsorbsiyonunda spesifik bir kusur olduğunu düşündürmektedir. Proksimal tübül (PT) ‘de yüksek oranda ifade edilen *klaudinlerden* birisi de *CLDN 2* ‘dir. *Klaudin 2*, parasellüler su, sodyum ve kalsiyum geçirgenliğini korumak için gereklidir (74). Kalsiyumun proksimal tübülden

paraselüler yoldan yeniden emiliminde *klaudin 2*' nin önemli rolü bulunmaktadır. *CLDN 2* de herhangi bir defekt durumunda kalsiyumun reabsorpsiyonunda bozulma olur ve buna bağlı kalsiyum okzalit taşı oluşumuna zemin hazırlar (106). *CLDN 2* özellikle böbrekte taş oluşumu ile doğrudan ilişkili olabilecek bir *klaudin* ailesi üyesi olarak bildirilmiştir (107). Curry ve ark.ları tarafından yapılan çalışmada *CLDN 2* geninin mutasyonlarında taş oluşumunun daha yaygın görüldüğünü ve taşın boyutu ile ilişkisinin bulunduğunu bildirmişlerdir. (107). Bizim çalışmamızda *CLDN 2* genomunun taş oluşumuyla doğrudan ilişkili olduğunu belirleyebileceğimiz istatistiksel anlamlılık bulunmamasına rağmen gözlemlediğimiz *CLDN 1* gen ekspresyonu ile *CLDN 2* gen ekspresyonlarının birbirleri ile paralellik gösterecek şekilde korele olduğunu gözlemledik. Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki sonuçlara baktığımızda hasta grubunda *klaudin 2* gen ekspresyon artışı 11,88 ortalama iken, kontrol grubunda 5,17 ortalama kalmıştır. Ortalama değerlerin birbirleriyle anlamlı ilişki bildiriyor görünmesine rağmen çalışma grubunun azlığı ve hastalar arasındaki ekspresyon katlı değişim değerlerinin geniş aralıkta olduğundan dolayı standart sapmaların aralığının genişlediğini ve anlamlı ilişki varlığını engellediğini düşünüyoruz. *CLDN 1* ve *CLDN 2* gen ekspresyon artışının böbrek taşı ile ilişkisinin olduğunu ve daha geniş bir çalışma grubu ile çalışmanın tekrarlanması gerektiğini düşünmekteyiz.

CaSR(Ca-algılayıcıreseptör) tüm vücut Ca homeostazının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Böbrekte, esas olarak TALH (Henle'nin kalın çıkan kolu) 'nin bazolateral membranında eksprese edilir, burada renal tübüler Ca geri emilimini azaltır ve Ca yüküne yanıt olarak kalsiürezi indükler (108). *CLDN 14* geni toplayıcı kanallarda ifade edilir ve katyon bariyer olarak görev alır. *CLDN 14* ekspresyonunun *CaSR*(Ca-algılayıcı reseptör) aktivasyonu ile güçlü bir şekilde yukarı regüle edildiği ve böbrek *CaSR-CLDN14* yolağının düzensizliğinin böbrek taşı gelişimine önemli ölçüde neden olabileceklerini bildirmişlerdir (109). 2009 da Thorleifsson ve ark.ları yaptıkları GWAS (Genom Çaplı İlişkilendirme Çalışması) 'da Tek nükleotid polimorfizmi *rs219778*, *rs219779*, *rs219780* ve *rs219781* içeren *CLDN 14* geninin bir izlanda popülasyonunda böbrek taşı, kalsiyum atılımı ve kemik mineral yoğunluğu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (91). Başka bir çalışmada ise

CLDN 14'teki *rs199565725*'in böbrek taşları ile en güçlü ilişkiyi gösterdiği bildirilmiştir (110). Bu çalışmalarda tanımlanan polimorfizimlerin gen ekspresyonuna etkisi bilinmemekle birlikte, bizim çalışmamızda *CLDN 14* gen ekspresyon artışının hasta grubunda (ortalama 6,66 kat) kontrol grubuna göre (ortalama 3,33 kat) daha yüksek olduğunu gördük. İstatistiksel olarak anlamlılık görmesek de literatürle uyumlu bir şekilde böbrekteki taş oluşumunda aktif rolü olduğunu düşünmekteyiz.

CLDN 16 (paracellin-1) ve *CLDN 19*; böbrekte henle'nin ince yükselen kolunda ve kalın yükselen kolunda (TALH) eksprese edilir. *CLDN 16 (paracellin-1)* ve *CLDN 19*, kalsiyum ve magnezyumun parasellüler hareketini kontrol ederler (111). Yapılan çalışmalarda *CLDN 16* ve *CLDN 19* gen poliformizimlerinin birbirleriyle ilişkili sonuçlar ortaya koyduğu söylenebilir (110, 112). Astrid Godron ve ark. ları tarafından 26 aileden akraba olmayan genetik olarak tanımlanmış 32 tane FHHNC (ailesel hipomagnezemik hiperkalsiürik nefrokalsinoz) hastasının klinik ve biyokimyasal verilerini retrospektif olarak incelemişler. Yapılan moleküler çalışmalarda 8 ailenin probandlarında *CLDN 16* mutasyonları ve 18 ailenin probandlarında ise *CLDN 19* mutasyonları olduklarını bulmuşlar. *CLDN 16* ve *19* daki mutasyonlar FHHNC (Ailesel Hipomagnezemik Hiperkalsiürik Nefrokalsinoz) ilişkili bulunmuş (113). FHHNC, kalsiyum ve magnezyumun idrarla artmış atılımı ile karakterize otozomal resesif geçişli nadir bir hastalıktır (90, 113). Hipomagnezemi, hiperkalsiüri ve nefrokalsinozis (böbrek parankiminde kalsiyum bazlı kristalin parankimal birikimi) ile seyreden ve yetişkin öncesi böbrek yetmezliği nedenlerindedir. Bu hastaların çoğunda tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonları, hematüri, abakteriyel lökositüri, poliüri, polidipsi ve nefrolitiazis mevcuttur. FHHNC hastalarında *CLDN 16* ve *CLDN 19* 'da nokta mutasyonlar görülür. Bu genlerde görülen mutasyonlar TALH (Henlenin kalın yükselen kolu)'da kalsiyum ve magnezyumun parasellüler yeniden emiliminde *CLDN 16* ve *CLDN 19* ' un önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir (90, 113). *CLDN 16* ve *CLDN 19* ' daki mutasyonlarda aynı zamanda hastalarda şaşılık, astigmatizm gibi oküler anormallikler de görülebilir (114). Bizim çalışmamızda ise hasta grubunda *CLDN 16* ekspresyonu 5,61 ortalamada iken, kontrol grubunda bu oran 2.19' du. Yine *CLDN*

19 için hasta grubunda 5,89 ortalamada iken, kontrol grubunda bu oran 4,94' d . Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulmasak da her 2 gendeki ekspresyon oranı hasta grubunda daha yüksek bulundu. Aynı zamanda alışmamızda *CLDN 16* ve *19* birlikte yüksek düzeyde pozitif yönde korelasyon göstermiştir.

Bizim alışmamızda da özellikle taş öyküsü olan hasta grubunda *CLDN 14* ile *CLDN 16* ve *CLDN 19* arasında yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı bir korelasyon sağladığını gözlemledik. Bu verilerimizin özellikle böbrek taşı olan hastalarda *CLDN 14*, *16* ve *19* ile ilişkilendirilmiş çalışmalarla uyumlu olduğunu gördük.

Çalışmamızda *CLDN* gen ailesi üyelerinden 11 tanesinin (*CLDN 1,2,3,4,7,8,10,14,16* ve *19*)  zellikle kalsiyum okzalat böbrek taşı olan hastalarla *ile* ilişkisini araştırdık. Bu *CLDN* genlerinin taş oluşumu ile ilişkisi incelendiğinde *CLDN 1* istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu gözlemledik. Ayrıca *CLDN 1* 'in *CLDN 2* ve *8* ile orta düzeyde; *CLDN 4,7* ve *14* ile de yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı bir korelasyon sağladığını gözlemledik. Fakat bu *klaudin* gen ailesinin daha büyük bir çalışma grubuyla çalışıldığında daha anlamlı sonuçların olabileceğini düşünüyoruz. Özellikle de *CLDN 2*, *CLDN 4*, *CLDN 7*, *CLDN 10*, *CLDN 14* ve *CLDN 16* olarak hasta grubunda ortalama değerlerinde iki kat daha yoğun olmasına rağmen standart sapmanın geniş olmasından dolayı anlamlılık belirleyemedik. Çalışmamızdaki genlerin birbiri ile korelasyonlarını incelediğimizde zaten birden fazla *CLDN* genomunun birbirleriyle ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Daha  nceki çalışmalarda özellikle de *CLDN 1* 'in böbrek taşı ile öyküsünün gösterilememesi ve ilk olarak bizim alışmamızda *CLDN 1* geninin anlamlı görülmesi, ilerde bu gen ile kalsiyum okzalat taşı bulunan böbrek hastalarının patofizyolojisine yönelik çalışmalara yardımcı olacağını düşünüyoruz.

Özellikle son yıllardaki çalışmalara bakıldığında insan b breğindeki *klaudin* gen ailesinin böbrek taşı ile ilişkisi ve vücuttaki iyon dengesi ile ilişkisine yönelik bilgiler zaman geçtikçe giderek artmaktadır. *Kludinlerdeki* mutasyonlara sekonder oluşan bazı sendromlarda ( rneğin FHHNC) ve klinik sonuçlara bakıldığında *kludinlerin* rolünün ne kadar önemli olduğu görülmektedir. Biz alışmamızda

klaudin gen ailesinden olan 11 genin ekspresyon durumlarını inceledik. Son zamanlarda dünya genelinde bir sorun teşkil eden covid -19 pandemisi nedeni ile kısıtlı bir zamanda ve dar bir hasta grubu ile çalışmamızı tamamladık. Çalışmamızda her ne kadar özellikle istatistiksel anlamda sadece *CLDN 1* geninde anlamlılık tespit etsek de özellikle *CLDN 14*, *CLDN 16* ve *CLDN 19* genlerinin hasta grubunda hem kendi aralarında pozitif yönde korelasyon göstermesi, hem de taş hastalarında kontrol grubuna göre yüksek oranda ekspresyonlar göstermesi, daha önce bu genlerle yapılmış olan ekspresyon çalışmalarıyla uyumlu olduğunu gözlemledik. Sonuç olarak *klaudinlerin* patofizyolojisini anlamak, bu genlerdeki ekspresyonlara sekonder oluşacak olan sendromların ve klinik sonuçların doğru anlaşılmasını sağlayacaktır. Bu genlerdeki ekspresyonlara bağlı nadir görülen sendromlara faydalı tedavi alternatifleri sağlamak ne kadar zor gözükse de bu nadir görülen sendromların ciddi klinik sonuçları göz önüne alındığında bu çabaya değer gözükecektir.

SONUÇLAR

Kalsiyum okzalata b6brek taşı bulunan hastalarda ve b6brek taşı harici nedenlerle kliniğe başvuran kontrollerde taş oluşum mekanizmasından sorumlu tutulan *CLDN* gen ailesi 6yelerinin ekspresyon durumlarını birlikte değerlendirdiğimiz 7alışmamızda sonu7 olarak:

1. Hasta ve kontrol grubunun demografik parametreleri benzerdi ve gruplar arası anlamlı farklılık saptanmadı. (yaş, BKİ, cinsiyet)
2. Kronik hastalıklarda hasta grubunda taş 6yk6s6n6n yanında DM ve HT kontrol grubundan daha fazlaydı.
3. Hasta grubu *CLDN 1* gen ekspresyonu 12,82 ortalamaya ve kontrol grubunda 3,57 ortalama ile anlamlı Şekilde farklılık g6sterdi (**p<0,050**)
4. *CLDN 2*, *CLDN 3*, *CLDN 4*, *CLDN 7*, *CLDN 8*, *CLDN 10*, *CLDN 14*, *CLDN 16*, *CLDN 18* ve *CLDN 19*, genlerin ekspresyonlarında gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p<0,050).
5. *CLDN 1* ekspresyonu; *CLDN 2* ve *CLDN 8* ile orta d6zeyde pozitif y6nde anlamlı korelasyon g6sterirken, *CLDN 4*, *CLDN 7* ve *CLDN 14* ile y6ksek d6zeyde pozitif y6nde anlamlı korelasyon g6stermiştir
6. *CLDN 1* ekspresyonu; kontrol grubundaki RCC (renal h6creli karsinom) tanılı bireylerde 7alışma grubuna g6re d6ř6k bulundu ve dolayısıyla RCC a7ısından *CLDN 1* ekspresyonunun d6ř6k olması RCC (renal h6creli karsinom) i7in t6m6r destekleyici olarak g6r6nmektedir.
7. *CLDN 2* ekspresyonu; *CLDN 4* ile negatif y6nde korelasyon g6sterirken; *CLDN 1* ve *CLDN 8* ile orta d6zeyde pozitif y6nde anlamlı korelasyon g6sterirken; *CLDN 10* ile de y6ksek d6zeyde pozitif y6nde korelasyon g6stermiştir.
8. *CLDN 14* gen ekspresyonu; *CLDN 3* ve *CLDN 8* ile orta d6zeyde ; *CLDN 1*, *CLDN 16* ve *CLDN 19* ile y6ksek d6zeyde pozitif y6nde korelasyon g6stermiştir.
9. *CLDN 16* ekspresyonu, *CLDN 10* ile orta d6zeyde ; *CLDN 14* ve *CLDN 19* ile y6ksek d6zeyde pozitif y6nde korelasyon g6stermiştir.

10. *CLDN 19* ekspresyonu, *CLDN 4* ile negatif yönde korelasyon gösterirken; *CLDN 3* ile orta düzeyde pozitif yönde, *CLDN 14* ve *CLDN 16* ile de yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı korelasyon gösterdi.
11. Çalışmamızda *CLDN 18* gen ekspresyonu hasta ve kontrol grubundaki bireylerin hiçbirinde gözlenmemiştir.

KAYNAKLAR

1. Akinci M, Esen T, Tellaloğlu S. Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. *European Urology*, 1991;20:200-3.
2. Özkeçeli R, Satar N, Doran Ş, Arıdoğan İ, Bayazıt Y, Zeren S. Üriner sistem taş hastalığı. *Bölüm*, 1998;15:1559-604.
3. Evan AP, Lingeman JE, Coe FL, Parks JH, Bledsoe SB, Shao Y, et al. Randall's plaque of patients with nephrolithiasis begins in basement membranes of thin loops of Henle. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003;111(5):607-16.
4. Evan A, Lingeman J, Coe F, Worcester E. Randall's plaque: pathogenesis and role in calcium oxalate nephrolithiasis. *Kidney International*, 2006;69(8):1313-8.
5. Sayer JA. Progress in understanding the genetics of calcium-containing nephrolithiasis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017;28(3):748-59.
6. Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, Unno R, Kamisawa H, Naiki T, et al. Genome-wide gene expression profiling of Randall's plaques in calcium oxalate stone formers. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017;28(1):333-47.
7. Tanikawa C, Kamatani Y, Terao C, Usami M, Takahashi A, Momozawa Y, et al. Novel risk loci identified in a genome-wide association study of urolithiasis in a Japanese population. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2019;30(5):855-64.
8. Liang X, Lai Y, Wu W, Chen D, Zhong F, Huang J, et al. LncRNA-miRNA-mRNA expression variation profile in the urine of calcium oxalate stone patients. *BMC Medical Genomics*, 2019;12(1):1-11.
9. Anderson J, M. Van Itallie C. M. Physiology L. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1995;269(4):G467-G75.
10. Balkovetz DF. Claudins at the gate: determinants of renal epithelial tight junction paracellular permeability. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2006;290(3):F572-F9.
11. Choi YD, Kim KS, Ryu S, Park Y, Cho NH, Rha SH, et al. Claudin-7 is highly expressed in chromophobe renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Journal of Korean Medical Science*, 2007;22(2):305.

12. Tsukita S, Furuse MJGtC. Overcoming barriers in the study of tight junction functions: from occludin to claudin. *Genes to Cells*, 1998;3(9):569-73.
13. Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, Yakirevich E, Greaves WO, Sciandra KT, et al. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms. *Modern Pathology*, 2008;21(11):1320-9.
14. Hou J, Rajagopal M, Yu AS. Claudins and the kidney. *Annual Review of Physiology*, 2013;75:479-501.
15. Shah RJ, Lieske JC. Inching toward a greater understanding of genetic hypercalciuria: the role of claudins. *Am Soc Nephrol*; 2018.
16. Ateş M, Yaman, Ö, Taşçi Kadioğlu A.İ. Güncel Üroloji. 2018.
17. Faller A, Schünke M, Schünke G, Taub E. *The human body: an introduction to structure and function*. Thieme Stuttgart; 2004.
18. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W, Palmer E, Platzer W. *Color atlas and textbook of human anatomy*. Vol. 1, Locomotor system: Thieme; 2004.
19. Anafarta K, Baykara M, Baydınç C, Anafarta K, ed. Temel Üroloji. Ankara: Güneş Kitapevi. Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı. 1998:1-28.
20. Anatomi AA, Ankara. Fizyoloji insan biyolojisi (3. Baskı). 2006.
21. Eaton DC, Pooler JP. *Vander's renal physiology*: Mc Graw Hil Medical; 2009.
22. Mahan LK, Raymond JL, Krause's Food & the Nutrition Care Process. *Medical Nutrition Therapy For Hepatobiliary and Pancreatic Disorders*, 2017;13:645-51.
23. Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ. Böbrek Fizyopatolojisi. İstanbul: Reaktif. (1); 2017.
24. Morgan D, Carver ME, Payne RJ. Plasma creatinine and urea: creatinine ratio in patients with raised plasma urea. *Br Med Journal*, 1977;2(6092):929-32.
25. John HA, Guyton JH. *Textbook of Medical Physiology*. Saunders, Mississippi; 2013.
26. Cargill K. *The Role of Hypoxia in Metabolism and Nephron Development: University of Pittsburgh*; 2019.
27. Brizi V. *Engineering Complex Kidney Structures for Disease Modelling, Drug Testing, and Studying Kidney Development: The Open University*; 2018.

28. Hoyer-Kuhn H, Kohbrok S, Volland R, Franklin J, Hero B, Beck BB, et al. Vitamin B6 in primary hyperoxaluria I: first prospective trial after 40 years of practice. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014; 9(3): 468-77.
29. Zhang J. Glomerular Hyperfiltration and Hypertension in Diabetes. 2017.
30. Kleinman JG, Wesson JA, Hughes JJ. Osteopontin and calcium stone formation. *Nephron Physiology*, 2004;98(2):p43-p7.
31. Gast C. A study of the genetics of chronic kidney disease: *University of Southampton*; 2015.
32. Kasırğa Z. *Sağlıklı böbreklerde korteks, medulla, sinus hacimleri ve böbrek boyutları ile vücut kompozisyonu arasındaki ilişkinin tespiti*: Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 2015.
33. Kızılay NÖ. 28-37 haftalar arası prematüre bebeklerde akut böbrek hasarı belirteci olarak ngal ve sistatin-c'nin karşılaştırılması ve akut böbrek hasarının risk faktörlerinin belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Bursa, 2017.
34. Brown C, Purich D, Ackermann D. EQUIL 93: a tool for experimental and clinical urolithiasis. *Urological Research*, 1994;22(2):119-26.
35. Deppa N. Rarity of kidney stones in South Africa's black population: studies of urinary macromolecules, crystal matrix extract containing osteopontin, and bone turnover markers in urine and serum from black and white subjects as a key to understanding this paradox. *University of Cape Town* 2007.
36. Bano H, Jahan N, Makbul SAA, Kumar B, Husain S, Sayed A. Effect of Piper cubeba L. fruit on ethylene glycol and ammonium chloride induced urolithiasis in male Sprague Dawley rats. *Integrative Medicine Research*, 2018;7(4):358-65.
37. Başoğlu N, İşlek İ. Çocuklarda idrar yolu enfeksiyonuna yaklaşımda yenilikler. *Medical Journal of Bakirkoy*, 2019;15(4).
38. Gemici A, Atmış B, Ergün R. Çocuklarda üriner sistem taşı klinik görünümü ve metabolik özellikleri: Tek merkez deneyimi. *Acta Medica Alanya*, 3(1):59-66.
39. Gambaro G, Croppi E, Coe F, Lingeman J, Moe O, Worcester E, et al. Metabolic diagnosis and medical prevention of calcium nephrolithiasis and its systemic manifestations: a consensus statement. *Journal of Nephrology*, 2016;29(6):715-34.
40. Anafarta K, Gögüs O, Bedük Y, Arıkan N. Ürogenital Tümörler. 1998:707-26.

41. Bak M, Ural R, Ağın H. Pediyatrik ürolitiaziste metabolik nedenler. *T Klin Pediyatri*, 2004;13:104-13.
42. Kabalin J. Surgical anatomy of the retroperitoneum, kidneys, and ureters. 2002:3-40.
43. Lingeman JE. Surgical management of urinary lithiasis. *Campbell's Urology*, 2002:3361-451.
44. Iwata H, Nishio S, Wakatsuki A, Ochi K, Takeuchi M. Architecture of calcium oxalate monohydrate urinary calculi. *The Journal of Urology*, 1985;133(2):334-8.
45. Afkari R, Feizabadi MM, Ansari-Moghadam A, Safari T, Bokaeian M. Simultaneous use of oxalate-degrading bacteria and herbal extract to reduce the urinary oxalate in a rat model: A new strategy. *International braz j urol*, 2019;45(6):1249-59.
46. Jiang H, Pokhrel G, Chen Y, Wang T, Yin C, Liu J, et al. High expression of SLC26A6 in the kidney may contribute to renal calcification via an SLC26A6-dependent mechanism. *Peer J*, 2018;6:e5192.
47. Borghi L, Schianchi T, Meschi T, Guerra A, Allegri F, Maggiore U, et al. Comparison of two diets for the prevention of recurrent stones in idiopathic hypercalciuria. *New England Journal of Medicine*, 2002;346(2):77-84.
48. Carvalho M, Mulinari R, Nakagawa Y, Research B. Role of Tamm-Horsfall protein and uromodulin in calcium oxalate crystallization. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2002;35(10):1165-72.
49. Aggarwal KP, Narula S, Kakkar M, Tandon C. Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. BioMed Research International, 2013.
50. Khan SR, Glenton PA. Experimentally induced hyperoxaluria in MCP-1 null mice. *Urological Research*, 2011;39(4):253-8.
51. Khan SR, Canales BK. Unified theory on the pathogenesis of Randall's plaques and plugs. *Urolithiasis*, 2015;43(1):109-23.
52. Ömerli, A. Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan böbrek taşı üzerine gilâburu (*Viburnum opulus*) suyunun etkisi. Doktora tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2016.
53. Kok DJ, Khan SR. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney International*, 1994;46(3):847-54.
54. Hess B. Metabolic syndrome, obesity and kidney stones. *Arab Journal of Urology*, 2012;10(3):258-64.

55. Jiang Z, Asplin JR, Evan AP, Rajendran VM, Velazquez H, Nottoli TP, et al. Calcium oxalate urolithiasis in mice lacking anion transporter Slc26a6. *Nature Genetics*, 2006;38(4):474-8.
56. Meyer AJ. The impact of prenatal glucocorticoid exposure on the ovine kidney: University of Western Australia; 2006.
57. Dardamanis M. Pathomechanisms of nephrolithiasis. *Hippokratia*, 2013; 17(2): 100.
58. Aradhya SV, Frei M, Hybertsen MS, Venkataraman L. Van der Waals interactions at metal/organic interfaces at the single-molecule level. *Nature Materials*, 2012;11(10):872-6.
59. Meyer AS, Finlayson B, DuBois L. Direct Observation Of Urinary Stone Ultrastructure 1. *British Journal of Urology*, 1971;43(2):154-63.
60. Da Silva S, Hennequin C, Droz D, Bader C, Daudon M, Drüeke T, et al. Influence of various calcium intakes on calcium-oxalate crystalluria in rats on sodium-oxalate diet. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1994;9(8):1090-6.
61. Mustafi D, Nakagawa Y. Characterization of Ca²⁺-binding sites in the kidney stone inhibitor glycoprotein nephrocalcin using vanadyl ions: different metal binding properties in strong and weak inhibitor proteins revealed by EPR and ENDOR. *Biochemistry*, 1996;35(47):14703-9.
62. Doyle I, Marshall V, Dawson C, Ryall R. Calcium oxalate crystal matrix extract: the most potent macromolecular inhibitor of crystal growth and aggregation yet tested in undiluted human urine in vitro. *Urological Research*, 1995;23(1):53-62.
63. Baumann J, Affolter B. The paradoxical role of urinary macromolecules in the aggregation of calcium oxalate: a further plea to increase diuresis in stone metapylaxis. *Urolithiasis*, 2016;44(4):311-7.
64. Grover PK, Miyazawa K, Coleman M, Stahl J, Ryall RL, Ireland. Renal prothrombin mRNA is significantly decreased in a hyperoxaluric rat model of nephrolithiasis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 2006;210(3):273-81.
65. Kröning R, Katz D, Lichtenstein A, Nagami G. Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines. *British Journal of Cancer*, 1999;79(2):293-9.
66. Malyankar UM, Almeida M, Johnson RJ, Pichler RH, Giachelli CM. Osteopontin regulation in cultured rat renal epithelial cells. *Kidney International*, 1997;51(6):1766-73.

67. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an $\alpha v\beta 3$ -induced, NF- κ B-dependent survival factor for endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2000;275(28):20959-62.
68. Groschwitz KR, Hogan SP, immunology c. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009;124(1):3-20.
69. Matter K, Balda MS. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *Journal of Cell Science*, 2007;120(9):1505-11.
70. Macia L, Thorburn AN, Binge LC, Marino E, Rogers KE, Maslowski KM, et al. Microbial influences on epithelial integrity and immune function as a basis for inflammatory diseases. *Immunological Reviews*, 2012;245(1):164-76.
71. Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, 2015;13(1):11.
72. Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 1994;127(6):1617-26.
73. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2000;279(2):G250-G4.
74. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 1998;143(2):391-401.
75. Muto S. Physiological roles of claudins in kidney tubule paracellular transport. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2017;312(1):F9-F24.
76. Günzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*, 2013;93(2):525-69.
77. Li J, Ananthapanyasut W, Alan S. Claudins in renal physiology and disease. *Pediatric Nephrology*, 2011;26(12):2133-42.
78. Gong Y, Hou J. Claudins in barrier and transport function—the kidney. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 2017;469(1):105-13.
79. Yu A. Claudins and the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 2014;26(1):11-9.

80. Sorokin I, Mamoulakis C, Miyazawa K, Rodgers A, Talati J, Lotan Y. Epidemiology of stone disease across the world. *World Journal of Urology*, 2017;35(9):1301-20.
81. Curhan G, Willett W, Rimm E, Stampfer M. Family history and risk of kidney stones. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1999;162(2):635-.
82. Tsai F-J, Wu H-C, Chen H-Y, Lu H-F, Hsu C-D, Chen W. Association of E-cadherin gene 3'-UTR C/T polymorphism with calcium oxalate stone disease. *Urologia Internationalis*, 2003;70(4):278-81.
83. Loder N. Genetic variations can point the way to disease genes. Nature Publishing Group; 1999.
84. Chen WC, Chen HY, Lu HF, Hsu CD, Tsai F. Association of the vitamin D receptor gene start codon Fok I polymorphism with calcium oxalate stone disease. *BJU international*, 2001;87(3):168-71.
85. Chen W-C, Wu H-C, Lu H-F, Chen H-Y, Tsai F. Calcitonin receptor gene polymorphism: a possible genetic marker for patients with calcium oxalate stones. *European Urology*, 2001;39(6):716-9.
86. Coe F, Evan A. Worcester. E Kidney stone disease. *J Clin Invest*, 2005; 115: 2598-608.
87. Pak CY, Kaplan R, Bone H, Townsend J, Waters O. A simple test for the diagnosis of absorptive, resorptive and renal hypercalciurias. *New England Journal of Medicine*, 1975;292(10):497-500.
88. Plain A, Alexander RT, hypertension. Claudins and nephrolithiasis. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2018;27(4):268-76.
89. Frische S, Alexander RT, Ferreira P, Tan RSG, Wang W, Svenningsen P, et al. Localization and regulation of claudin-14 in experimental models of hypercalcemia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2021; 320(1):F74-F86.
90. Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, et al. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *The American Journal of Human Genetics*, 2006;79(5):949-57.
91. Thorleifsson G, Holm H, Edvardsson V, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gudbjartsson DF, et al. Sequence variants in the CLDN14 gene associate with kidney stones and bone mineral density. *Nature Genetics*, 2009;41(8):926-30.
92. Özlülerden YÖ, Tuncay ÖL. Prone Percutaneous Nephrolithotomy.12(1):35-44.

93. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier a lesson from claudin-1-deficient mice. *The Journal of Cell Biology*, 2002;156(6):1099-111.
94. Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*, 2006;6(1):1-8.
95. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999;96(2):511-6.
96. Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2008;1778(3):631-45.
97. Piontek J, Fritzsche S, Cording J, Richter S, Hartwig J, Walter M, et al. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011;68(23):3903-18.
98. Visco ZR, Sfakianos G, Grenier C, Boudreau M-H, Simpson S, Rodriguez I, et al. Epigenetic Regulation of Claudin-1 in the Development of Ovarian Cancer Recurrence and Drug Resistance. *Frontiers in Oncology*, 2021;11:68.
99. Bhat AA, Syed N, Therachiyil L, Nisar S, Hashem S, Macha MA, et al. Claudin-1, a double-edged sword in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020;21(2):569.
100. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of Pathology*, 2010;177(3):1053-64.
101. Fritzsche FR, Oelrich B, Johannsen M, Kristiansen I, Moch H, Jung K, et al. Claudin-1 protein expression is a prognostic marker of patient survival in renal cell carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 2008;14(21):7035-42.
102. Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Unno R, Moritoki Y, Ando R, et al. M1/M2-macrophage phenotypes regulate renal calcium oxalate crystal development. *Scientific Reports*, 2016;6(1):1-13.
103. Kieran NE, Doran PP, Connolly SB, Greenan M-C, Higgins DF, Leonard M, et al. Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog. *Kidney International*, 2003;64(2):480-92.
104. Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2008;295(4):F867-F76.
105. Evan AP, Lingeman JE, Worcester EM, Sommer AJ, Phillips CL, Williams JC, et al. Contrasting histopathology and crystal deposits in kidneys of idiopathic

- stone formers who produce hydroxy apatite, brushite, or calcium oxalate stones. *The Anatomical Record*, 2014;297(4):731-48.
106. Sutton RA, Walker VR. Responses to hydrochlorothiazide and acetazolamide in patients with calcium stones: Evidence suggesting a defect in renal tubular function. *New England Journal of Medicine*, 1980;302(13):709-13.
 107. Curry JN, Saurette M, Askari M, Pei L, Filla MB, Beggs MR, et al. Claudin-2 deficiency associates with hypercalciuria in mice and human kidney stone disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 2020;130(4).
 108. Hebert SC, Brown EM, Harris HW. Role of the Ca (2+)-sensing receptor in divalent mineral ion homeostasis. *Journal of Experimental Biology*, 1997; 200(2):295-302.
 109. Guha M, Bankura B, Ghosh S, Pattanayak AK, Ghosh S, Pal DK, et al. Polymorphisms in CaSR and CLDN14 genes associated with increased risk of kidney stone disease in patients from the eastern part of India. *PLoS one*, 2015;10(6):e0130790.
 110. Oddsson A, Sulem P, Helgason H, Edvardsson VO, Thorleifsson G, Sveinbjörnsson G, et al. Common and rare variants associated with kidney stones and biochemical traits. *Nature Communications*, 2015;6(1):1-9.
 111. Wu J, Helftenbein G, Koslowski M, Sahin U, Tureci Ö, Function, Bioinformatics. Identification of new claudin family members by a novel PSI-BLAST based approach with enhanced specificity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006;65(4):808-15.
 112. Arcidiacono T, Simonini M, Lanzani C, Citterio L, Salvi E, Barlassina C, et al. Claudin-14 gene polymorphisms and urine calcium excretion. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2018;13(10):1542-9.
 113. Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, et al. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science*, 1999;285(5424):103-6.
 114. Claverie-Martín F, García-Nieto V, Loris C, Ariceta G, Nadal I, Espinosa L, et al. Claudin-19 mutations and clinical phenotype in Spanish patients with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *PLoS One*, 2013; 8(1):e53151.