

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

**HİPEROKZALÜRİK RAT MODELLERİNDE TOLL-LIKE  
RESEPTÖR (TLR) EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. MAHMUT TAHA ÖLÇÜCÜ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. ÖMER LEVENT TUNCAY**

**DENİZLİ-2015**

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

**HİPEROKZALÜRİK RAT MODELLERİNDE TOLL-LIKE  
RESEPTÖR (TLR) EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. MAHMUT TAHA ÖLÇÜCÜ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. ÖMER LEVENT TUNCAY**

Bu tez Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafınca 2015TPF001 proje numarası ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ-2015**

Prof.Dr. Ömer Levent TUNCAY danışmanlığında Dr. Mahmut Taha ÖLÇÜCÜ tarafından yapılan "Hiperokzalürik Rat Modellerinde Toll-Like Reseptör Ekspresyonlarının Araştırılması" başlıklı tez çalışması, jürimiz tarafından Üroloji Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

Prof.Dr. Ömer Levent TUNCAY

ÜYE

Prof.Dr. Tahir TURAN

ÜYE

Prof.Dr. Haluk TOL

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

17.02.2016

(gün/ay/yıl)

Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı V.

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince ve tezimin hazırlanması aşamasında her türlü destek ve yardımlarından dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ömer Levent Tuncay'a, yetişmemde büyük katkıları olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Zafer Aybek'e, Sayın Prof. Dr. Tahir Turan'a, Sayın Prof. Dr., Zafer Sınık'a, Sayın Doç. Dr. Ali Ersin Zümrütbaş'a ,Sayın Doç. Dr. Cenk Acar'a ve Sayın Uzm.Dr.Cihan TOKTAŞ'a

Tezimin deneysel kısımlarını gerçekleştirdiğim PAÜ Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleeri Araştırma Laboratuvarı'nda görevli Öğr.Gör. Dr. Barbaroş ŞAHİN ve diğer çalışanlarına,

Tezimin laboratuvar aşamasında birlikte çalıştığımız PAÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. ve tüm biyokimya laboratuvarı ekibine,

Tezimin dokuların histopatolojik değerlendirmesi aşamasında katkıları olan PAÜ Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D öğretim üyesi Doç.Dr.Nilay Şen TÜRK ve ekibine,

Tezimin dokuların genetik olarak incelemesi aşamasında katkıları olan PAÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik A.B.D öğretim üyesi Doç.Dr.Vildan CANER ve ekibine,

Tezimin hazırlanması aşamasında bana yardımcı olan tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili annem Melike ÖLÇÜCÜ'ye ve sevgili babam Ali ÖLÇÜCÜ'ye ,her zaman desteğiyle yanımda olan canım kardeşim Yusuf Ziya ÖLÇÜCÜ'ye TEŞEKKÜR EDERİM.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI .....	III
TEŞEKKÜR .....	IV
İÇİNDEKİLER .....	V
TABLolar DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ .....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
ÖZET .....	XI
İNGİLİZCE ÖZET .....	XII
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	2
BÖBREKLER .....	2
Anatomi .....	2
Komşulukları.....	2
Toplayıcı sistem Anatomisi.....	4
ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI.....	4
Epidemiyoloji.....	4
Patogenez.....	5
Üriner Sistem Taş Hastalığında Risk Faktörleri.....	7
Üriner sistem Taşları.....	7
Kristal Uyarımlı Renal Enflamasyonun Mekanizmaları.....	10
Kristal Nefropatisinde Tübüler Hasar.....	11
TOLL-BENZERİ (TOLL-LIKE) RESEPTÖRLER.....	13
Genel Özellikler.....	13
TLR Ailesi.....	14
TLR'lerin Lokalizasyonları ve Ligandları.....	18
TLR Sinyal İletimi.....	19
TLR ve Enfeksiyon.....	21
TLR ve Böbrek Hastalıkları.....	22

	Sayfa No
<b>GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>23</b>
<b>Histopatolojik Değerlendirme.....</b>	<b>23</b>
<b>Genetik İnceleme.....</b>	<b>23</b>
<b>İstatiksel Analiz.....</b>	<b>27</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>28</b>
<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>34</b>
<b>SONUÇ .....</b>	<b>41</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>42</b>

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1</b> : TLR'ler ve ligandları .....	19
<b>Tablo-2</b> : TLR1-11 ve ACTB,GAPDH mRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan özgün primer dizilimleri (5' → 3') ve UPL numaraları.....	25
<b>Tablo-3</b> : TLR1-11 ve ACTB ,GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı.....	26
<b>Tablo-4</b> : TLR1-10 ve ACTB ,GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü.....	27
<b>Tablo-5</b> : Okzalal düzeyleri ortalamaları.....	28
<b>Tablo-6</b> : 24 saatlik idrarlardaki okzalal düzeyleri arasındaki farkı gösteren tablo.....	29
<b>Tablo-7</b> : Okzalal düzeyi ortalamaları ve p değeri.....	29
<b>Tablo-8</b> : Genleri deney ve kontrol grubunun normalize ekspresyon değerleri.....	32
<b>Tablo-9</b> : Fold change yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar.....	32
<b>Tablo-10</b> : TLR ekspresyon profillerini gösteren tablo.....	33

## ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1:</b> Böbreğin yerleşimi.....	<b>3</b>
<b>Şekil 2:</b> Böbrekler ve komşulukları.....	<b>3</b>
<b>Şekil 3:</b> Böbreğin yerleşimi ve karın arka duvarı.....	<b>4</b>
<b>Şekil 4:</b> Kristal uyarımlı renal hasar mekanizmaları.....	<b>13</b>
<b>Şekil 5:</b> TLR 'lerde sinyal iletim yolları.....	<b>21</b>
<b>Resim 1.</b> Nefrektomi spesmenlerinin makroskopik görünümü ve böbrek taşları.....	<b>30</b>
<b>Resim 2:</b> Kontrol grubu böbrek dokusunda kalsiyum okzalat kristali ve enflamasyon.....	<b>31</b>
<b>Resim 3:</b> Deney grubu sağ böbrek dokusunda ve sol böbrek dokusunda kalsiyum okzalat kristali ve enflamasyon .....	<b>31</b>



## SİMGELELER VE KISALTMALAR

- PCR:** Polimeraz Chain Reaction
- NLRP:** NOD-like receptor family,pyrin domain
- NOD:** Nucleotide-binding oligomerization domain
- DAMPs:** Damage-associated molecular pattern molecules
- ABH:** Akut böbrek hasarı
- HMGB1:** High-mobility group protein B1
- NFKB:** Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
- MDCK:** Madin-Darby Canine Kidney)
- CaOx:** Kalsiyum okzalat
- ROS:** Reactive Oxygen species
- PRR:** Pattern recognition receptor
- NK:** Natural Killer
- TIR:** Toll/IL-1 receptor
- TNF:** Tumor necrosis factor
- PAMP:** Pathogen associated molecular pattern
- LPS:** Lipopolisakkarit
- CD:** Cluster of differentiation
- MyD :** Myeloid differentiation
- dsRNA:** Double stranded RNA
- Asp299Gly:** Aspartat 299 Glycine
- Thr399Ile:** Threonine 399 Isoleucine
- HSP:** Heat-Shock Protein
- MALP:** Monocyte activating lipopeptide
- BLP:** Bacterial lipopeptide
- TRIF:** TIR domain containing adapter inducing interferon- $\beta$
- TRAM:** TIR domain containing adapter inducing interferon- $\beta$  associated molecule
- TIRAP:** TIR domain containing adapter inducing interferon- $\beta$  associated protein
- TRAF:** TNF receptor associated factors
- IRAK:** Interleukin-1 receptor associated kinase
- TAK:** TGF beta active kinase

**TGF:** Tumor Growth Factor  
**TAB:** TGF beta active kinase binding protein  
**MAPK:** Mitogen-activated protein kinases  
**STAT:** Signal transducer and activator of transcription  
**IRF:** Interferon Regulatory factor  
**iNOS:** Inducible NOS  
**ACTB:** Beta aktin  
**GAPDH :** Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase  
**SPSS:** Statistical Package for Social Sciences  
**mIL20R1a :** Mouse interleukin-20 receptor 1a  
**NLRP:** NACHT, LRR and PYD domains containing protein 2  
**ASC:** Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD  
**IL1RN:** Interleukin-1 receptor antagonist  
**AR:** Androgen receptor  
**SLE:** Sistemik Lupus Eritromatozus  
**HCMV:** Human Cytomegalovirus.  
**HCC:** Hepatocelluler Carcinoma  
**CTC:** Circulating Tumor Cells  
**BCPALL:** B cell precursor acute lymphoblastic leukemia

## ÖZET

Üriner sistem taş hastalığı , üriner enfeksiyonlar ve prostat hastalıklarından sonra üriner sistemi en sık etkileyen 3.patoloji olup üroloji pratiğinin önemli kısmını teşkil etmektedir Üriner taşların en sık karşılaşılan bileşeni kalsiyumdur. Taş oluşumu böbreklerde kristal nefropatisi adı altında bir takım enflamatuvar değişikliklere yol açar.Bu enflamatuvar değişikliklerin meydana gelmesi için bir takım immun sistem mekanizmaların devreye girmesi gerekmektedir. Toll-Like Reseptörler (TLR) doğal immünitenin parçaları olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleri olup sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşmaktadır.TLR'nin kristal nefropatisinde meydana gelen inflamatuvar değişikliklerde de önemli rol aldığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada deneysel olarak hiperokzalüri oluşturan ratların böbrek dokularında meydana gelen enflamasyon sonrasında TLR ekspresyonu araştırıldı. Normal beslenen 10 adet kontrol grubu ve %1lik etilen glikolle beslenerek hiperokzalüri oluşturulan 10 adet deney grubu ratların 24 saatlik idrarları 16. haftanın sonunda metabolik kafes yardımıyla toplandı.İdrar örneklerinin mikroskopileri ve 24 saatlik okzalat atılımları karşılaştırıldı.Deney grubunda okzalat atılımının istatistiksel olarak anlamlı çıkmasıyla ratların böbrekleri çıkartıldı.Böbrek dokusu mikroskopilerinde ise kristal ve enflamasyonun varlığı gösterildi. Daha sonra böbrek dokularında ise total RNA izolasyonunu takiben gerçek zamanlı PCR ile TLR 1-11 ekspresyonu araştırıldı. sadece TLR2 de artış gözlemlendi.Ancak yapılan değerlendirmeler sonucu TLR2 de gözlemlenen artış istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Diğer TLR alt tiplerinin ise hepsinde azalma meydana gelmiş olup TLR 1- 3 - 6 da istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmedi.Geriye kalan TLR 4-5-7-8-9-10-11 de istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi.En belirgin azalma ise TLR11 de daha sonra da TLR7 de görüldü.

Sonuç olarak etilen glikol yardımıyla hiperokzalüri oluşturulan rat böbrek dokularında TLR alt tiplerinde büyük oranda azalma olduğu görüldü.Sadece TLR2 de istatistiksel olarak anlamlı olmayan artış görülmüştür. Önceki çalışmalara bakıldığında bizim çalışmamız ,erken dönemde TLR ekspresyon artışı olup geç dönemde TLR ekspresyon azalışıyla sonuçlanan çalışmalara örnek olabilir.Bunun için erken dönemde yani hiperokzalüri oluştuktan hemen sonra TLR ekspresyon profillerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmanın renal parankim hücrelerinin steril enflamasyonu sonrası TLR2 ekspresyonunda artma ile sonuçlanan çalışmalara yardımcı olarak değerlendirilebileceği görüşüne de varılabilir.

## ABSTRACT

Urinary stone disease, after urinary tract infections and prostate diseases, is the 3<sup>rd</sup> pathology that effects urinary system most commonly, and represents an important part of urologic practice. Calcium is the most common component in urinary stones. Stone formation causes some inflammatory changes which are called crystal nephropathies. This requires the introduction of a number of immune system mechanisms for the occurrence of inflammatory changes. Toll - Like Receptors (TLR) are type 1 transmembrane proteins that consist of cytoplasmic and extracellular regions and are expressed by macrophages and dendritic cells which are part of innate immunity. TLRs are thought to have important role in inflammatory changes that occurs in crystal nephropathy.

In this study, expression of TLR was evaluated in kidney tissues of experimental hiperoxaluria rats, occuring after inflamation. 24-hours urine samples of rats from both control group which included ten rats fed normally and experimental group which included ten rats fed with 1% ethylene glycole and formed hiperoxaluria, were collected with the help of metabolic cage. Microscopy and 24 hours oxalates excretion of urine samples were compared. Once oxalate excretion rate in the experimental group found statistically significant, kidneys of rats were removed. Microscopy of kidney tissue demonstrated the existence of inflammation and crystals. Following total RNA isolation of the kidney tissues, TLR 1-11 expression is examined with real time PCR. An increase is only observed in TLR2. However, as a result of evaluations, the increase observed in TLR2 was not statistically significant. Despite all other subtypes of TLR are found decreased, there were no statistically significant decreases in TLR 1 – 3 – 6. Rest TLR 4- 5- 7- 8- 9- 10 – 11 were found significantly decreased. The most significant decrease was seen on TLR11, then TLR7.

Consequently, substantial decrease in subtypes of TLR were observed in the kidney tissues of rats formed hiperoxaluria with help of etylene glicole. Statistically non-significant increase is observerd only in TLR-2. Considering the previous studies, our work may be an example of studies that resulted increase in TLR expression in early period, decrease in late period. In order to see this result, TLR expression profiles must be investigated in early period namely right after hiperoxaluria formed. This study may also support other studies that report increase in TLR 2 expression in sterile inflammation of the renal parenchyma cells.

## GİRİŞ

Ülkemizde endemik olan üriner sistem taş hastalığı, üriner enfeksiyonlar ve prostat hastalıklarından sonra üriner sistemi en sık etkileyen 3.patoloji olup üroloji pratiğinin önemli kısmını teşkil etmektedir (1). Üriner sistem taş hastalığı M.Ö. 4800 yıllarından beri bilinip Mısır mumyalarında böbrek ve mesane taşları görülmüştür (2). Yunan, Çin, Hint, Mısır,Eski Roma ve Mezopotamyada taş hastalığının nedenleri için birçok fikir ortaya atılmıştır. Özellikle 1940 lardan sonra üriner sistem taş hastalığı oluşumu ile ilgili kalsiyum ve ürik asit birikiminin ilişkili olduğu belirlenmiştir. Teknolojik gelişmelere rağmen taşların oluşumunu açıklayan birçok teori olsada hiçbiri bunu kesin olarak ifade edememektedir. Bu nedenle taş hastalığının multifaktöriyel olup birçok faktörün birleşimi ve birbirleriyle etkileşimi sonucu olduğu düşünülmektedir.

Böbrek taşı sonucu renal parankim dokularında enflamasyon oluştuğu ,bu enflamasyonun kronikleşmesi durumunda fibrozisle sonuçlanan skatrisyel parankim kaybı meydana gelir.Bu parankimal kayıplar sonucunda ileri dönemde kronik böbrek yetmezliği gelişeceği bilinmektedir.Enflamasyon sürecinde çeşitli immün yanıtlarda aktivasyon oluşmaktadır

Toll-like reseptörleri (TLR), birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteindirler. İlk olarak 1991 yılında *Drosophila melanogaster*'de keşfedilen ve immun sistem cevabında önemli fonksiyonu olduğuna inanılan reseptöre "Toll geni"ne olan benzerliğinden dolayı "Toll" adı verilmiştir. Günümüzde insanlarda interlökin-1 reseptör (IL-1R)'ün homoloğu olan bu moleküllere "Toll-like reseptörler" denilmektedir. Bu reseptörler, başta makrofajlar olmak üzere mast hücreleri, dendritik hücreler, eozinofiller, nötrofiller, doğal öldürücü hücreler, doğal öldürücü T hücrelerinde bulunurlar ve mikroorganizmaların tanınmasında ve yangının tetiklenmesinde rol alırlar. Bu güne kadar insanda ve sığırdada 10, farede 13 TLR saptanmış olup, bunların her biri, bir veya birden fazla sayıda spesifik mikrobiyal moleküle bağlanabilir (3).

Böbrek taşı enflamasyonu ve oluşan immün yanıtla ilgili literatürde çalışmalar mevcuttur.Bizim çalışmamızda ise böbrek taşı sonucu oluşan enflamasyona bağlı toll like reseptör ekspresyonu araştırıldı.Bunun için %1 lik etilen glikolle beslenen ve hiperokzalüri oluşturulan ratların böbrek doku örnekleri ile normal ratların böbrek doku örnekleri karşılaştırıldı.Örnekler üzerinde gerçek-zamanlı PCR yöntemi kullanılarak TLR1-11 olmak üzere 11 farklı TLR'lerinin mRNA düzeyindeki ekspresyon profilleri belirlendi.

## GENEL BİLGİLER

### BÖBREKLER

#### Anatomi

Böbrekler her iki tarafta retroperitoneal olarak T12-L2 vertebraların hizasında yer alan, uzun eksende 9-13cm ölçülen ve aşağı dışa doğru,yatay eksenleri yana arkaya doğru olup karın arka duvarında yerleşen organlardır. Sol böbreğin sağ böbreğe göre 1-2 cm daha yukarıda yerleşimli olması fizyolojiktir.Bunun nedeni sağda bulunan karaciğerin bası yapmasıdır.Böbrekler hareketli organlar olup pozisyon değişikliği ve solunum nedeniyle ortalama 4 cm yer değiştirebilir (4). Böbreği içten dışa doğru saran tabakalar capsula fibrosa, capsula adiposa ve fascia renalis (Gerota fasiyası) tir. Böbreğin arka tarafında bulunan capsula adipoza nın büyük kısmı yağ tabakası ile sarılıdır. Yağ dokusu böbreği darbelere karşı korur. Böbreğin peritonla örtülü kısımlarında yağ tabakası bulunmaz. Böbrekleri yerinde tutan en önemli oluşumlar böbreklerin damarları ve fascia renalistir. Ayrıca, capsula adiposa ve pararenal yağ dokusu da yardımcı olur (5).

#### Komşulukları

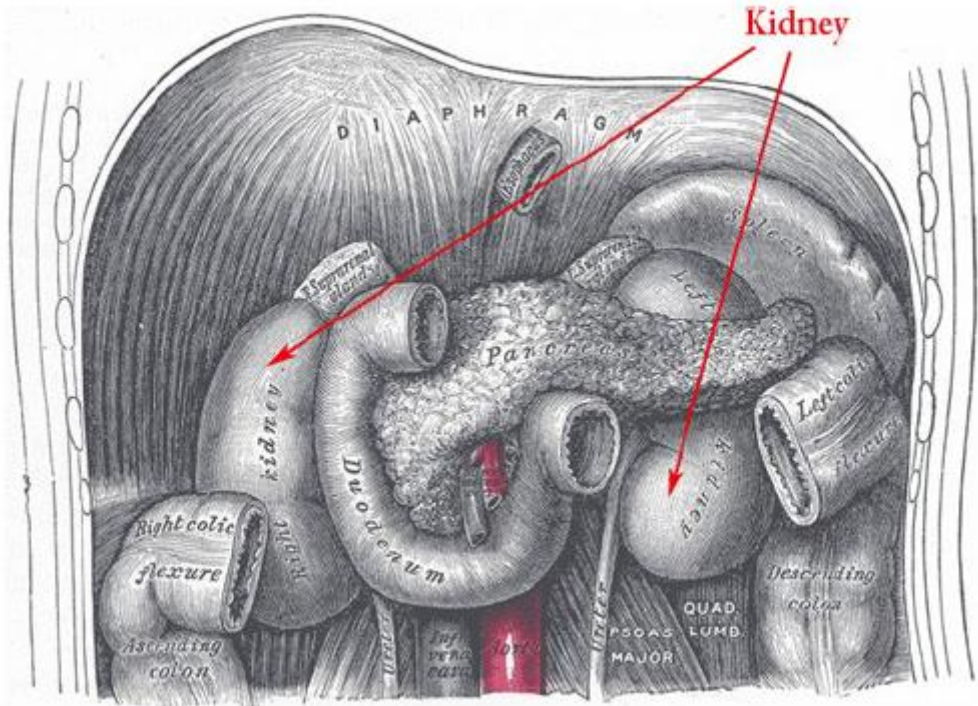
Sol böbreğin ön yüz komşuluğu; sol sürrenal bez, mide, dalak, hilum renaleye yakın kısmı pankreas, alt ucun lateral kısmı flexura coli sinistra ile medial kısmı ise ince bağırsak kıvrımlarıyla komşuluk yapar (Şekil 2).

Sağ böbreğin ön yüz komşuluğu ise sağ sürrenal bez , karaciğerin sağ lobu, flexura coli dextra, medial kenarı boyunca duodenumun ikinci parçası ile alt ucun medial kısmı ince bağırsak kıvrımlarıyla komşuluk yapar

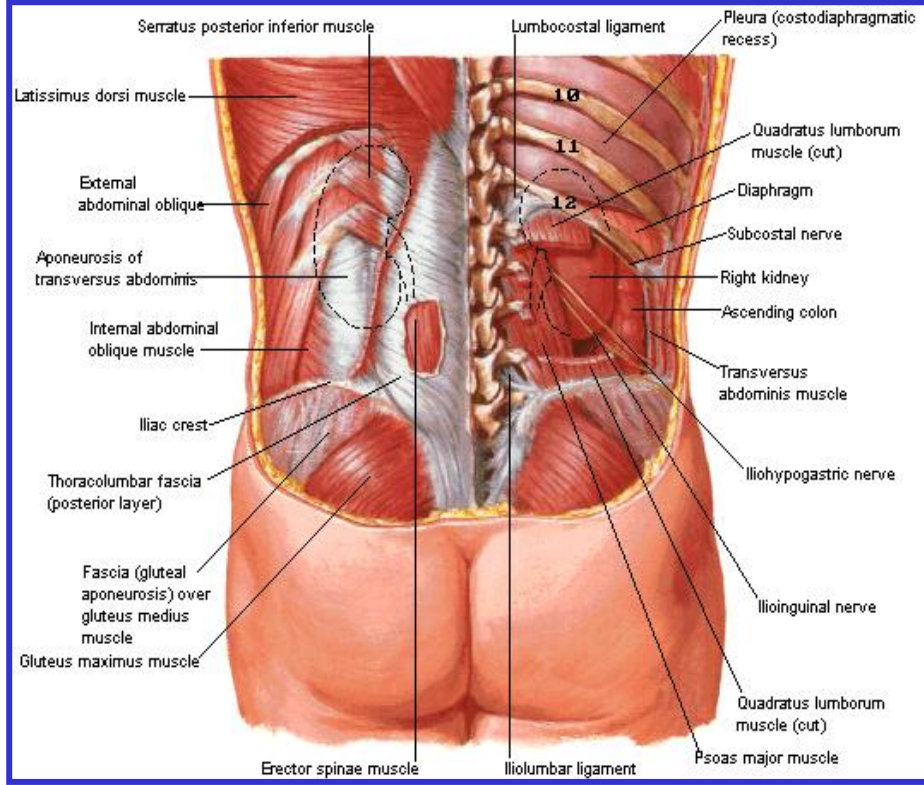
Her iki böbreğin arka yüz komşuluğunda ise posteromedialinde psoas kasları ,posteriorunda quadratus lumborum kasları ve diafram bulunur (6) (Şekil 3).



**Şekil 1 : Böbreğin yerleşimi**



**Şekil 2 : Böbrekler ve komşulukları (Sobotta anatomi atlasından alınmıştır.)**



**Şekil 3 : Böbreğin yerleşimi ve karın arka duvarı**

### **Toplayıcı Sistem Anatomisi**

Böbreklerin pelvikalisiyel sistemi incelendiğinde, kalisiyel yapıların çok çeşitli morfolojik varyasyonlarının olduğu gözlemlenmektedir. 1996'da Sanpai, 140 kadavranın incelendiği bir çalışma ile kalisiyel sistemleri iki ana grup halinde sınıflandırdı (7).

*Grup A:* Pelvikalisiyel sistem iki ana kaliks grubundan oluşur (Superior-Inferior).  
*Grup B:* Bu grup pelvikalisiyel sistemde, superior ve inferior kalisiyel gruplardan bağımsız olarak, orta zon bir kalisiyel gruba drene olur (%37,8)

### **ÜRİNER SİSTEM TAŞ HASTALIĞI**

#### **Epidemiyoloji**

Böbrek taş hastalığının hayat boyu görülme sıklığı muhtemelen yaş, cinsiyet ırk ve coğrafi lokasyona bağlı değişiklik göstermektedir ve %1 ile %15 arasında tahmin edilmektedir (8).Epidemiyolojik çalışmalar, üriner sistem taş hastalığının bölgesel ve etnik farklılıklar gösterebildiğini ve prevelansın %2–15 arasında değiştiğini bildirmektedir (9). A.B.D'de yapılan bir çalışmada prevelansın %2-3 olduğu ve beyaz bir erkekte 70 yaşına ulaşana dek bu hastalığa yakalanma



şansının 1/8 olduğu ortaya konmaktadır (2) . Avrupa ülkelerinde üriner sistem taş hastalığı prevalansının %3-11 arasında değiştiği görülmektedir (10) .

Türkiye 'de en sık Akdeniz,Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde görülen üriner sistem taş hastalığının ülkemizdeki yaygınlığının değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada hastalığın prevalansının genel olarak %14.8 olduğu bildirilmektedir. Tüm bu bulgular, üriner sistem taş hastalığının Türkiye'de endemik olduğunu vurgulamaktadır (11). Yine bu çalışmada üriner sistem taş hastalığının erkeklerde 1,5 kat fazla olduğu, en sık 30-40 lı yaşlarda görüldüğü,düşük eğitim ve sosyoekonomik düzeyde sık görüldüğü bildirilmiştir. Taş hastalığının bazı coğrafi bölgelerde daha sık görüldüğü tespit edilmiş ve dünya taş haritası çıkartılmıştır (2). Su alımı da çok önemlidir. Günlük idrar miktarını 800 ml'den 1200 ml'ye çıkarmak bile taş oluşumunu % 86 azaltır (12).

### **Patogenez**

Üriner sistemde taş oluşumunu açıklamak için çeşitli teoriler ortaya konmuştur.

### ***Süpersatürasyon-kristalizasyon teorisi***

Taş oluşumunun fiziki süreci glomerüler filtratın nefronu geçmesiyle başlayan kompleks bir olaylar dizisidir. Taş oluşturan tuzların etkisiyle idrar süpersature olur, öyle ki eriyen iyon veya moleküller solüsyonda kristalleri oluştururlar. Bir defa oluştuklarında kristaller idrarla atılır veya böbrekte takıldıkları yerde büyüme ve toplanma eğilimi göstererek sonunda taş oluşur. Bir eriyebilir tuza ait iyon ve molekülleri içeren solüsyon konsantrasyon ürünü olarak ifade edilir, ki bu tuzların saf kimyasal parçalarının (iyon veya molekül) konsantrasyon ürününün (Concentration product = CP ) matematiksel ifadesidir. Örneğin, sodyum klorid için konsantrasyon ürünü ifadesi  $CP=[Na^+][Cl^-]$  dir. Bundan sonra ilave olacak tuz kristallerinin ilave edilmesi erimeyecek bir noktaya ulaştığında saf bir tuzlu sulu çözelti sature olarak kabul edilir (8). Üriner sistem taşları idrarda kristal olmadıkça oluşmaz. Kristal oluşması için idrarın tuzla süpersatüre olması gerekir. Kristaloid oluşturan kimyasalların idrar atılımının artmasıyla, kristalizasyon riski artar. İdrardaki kalsiyum ve okzalat konsantrasyonları sudaki termodinamik çözünürlüklerini aşarsa, kalsiyum okzalat kristalleri çökebilir. Bununla birlikte idrarın içerisindeki inhibitörler ve diğer moleküller sayesinde kalsiyum okzalat solüsyon içerisindekinden daha yüksek konsantrasyonda bulunabilir. Kalsiyum okzalat konsantrasyon miktarı daha da artırılırsa solüsyon olarak kalamayacak bir seviyeye ulaşılmış olur.

Sitrat ve fosfat gibi maddeler, kalsiyum ile; magnezyum ve sodyum gibi

elementlerse okzalata kompleks oluşturarak, herbirinin serbest iyon konsantrasyonu azaltırlar (13).

### ***Matrix-Nükleasyon Ve Kristal Büyümesi Teorisi***

Homojen nükleasyon çekirdeğin saf solüsyon içinde geliştiği bir süreçtir. Çekirdekler (nuclei) erimeyen ilk kristal yapılardır. Küçük nükleuslar değişken olabilirler; kritik bir büyüklüğün, hacmin altmdakilerde başlangıçta kristalin erirliği kristal büyümesinden baskın olabilir. Eğer süpersaturasyon seviyesi, nükleusun stabilitesi ve nükleasyon için geçen süre nefrondan gelen idrarın geçiş süresi ile kıyaslandığında yeterli derecede kısa ise nükleus yerinde kalacaktır (8). Sitrat gibi inhibitörler nükleusu destabilize ederken teşvik edici unsurlar stabilize etmektedirler. Bu stabilizasyonu nükleusun üzerinde nükleusun kristal yapısının bağlanabileceği bir yüzey oluşmasını sağlayarak yaparlar. İdrarda, kristal nükleosyonları genellikle heterojen nükleasyon vasıtasıyla epitelyal hücrelerin (14) ,hücre debrislerinin (15) veya diğer kristallerin (16) oluşan yüzeylerine tutunarak meydana gelirler. Tahmini 5-7 dakika süren idrarın nefrondan geçiş süresi çerçevesinde kristaller tubüler lümeni tıkayacak büyüklüğe ulaşamazlar. Ancak yeterli nukleus oluşur ve büyürlerse kristallerin agregasyonuna bağlı olarak dakikalar içinde tubüler lümeni tıkayacak büyüklükte partiküller oluşabilir (17). Magnezyum ve sitrat kristal agregasyonunu inhibe ederler. Böbrekte yapılan nefrokalsin ve asidik glikoprotein kalsiyum oksalat nükleasyon, büyüme ve agregasyonunu inhibe ederler (18),(19). İdrarda en çok bulunan Tamm-Horsfall mukoproteini agregasyonu inhibe ederken (20) üropontin kristal büyümesini inhibe etmektedir (21).

### ***İdrar İnhibitörleri Yokluğu Teorisi***

Kalsiyum, okzalata ve fosfat gibi çoğu taş oluşturan tuz bileşenlerinin idrarda belirli konsantrasyonlarda bulunması idrarı supersature hale getirerek, kristal formasyonunu destekler. Buna rağmen kristal büyüme oranını veya agregasyonu azaltıcı moleküllerin varlığında taş oluşumunun gelişmesi önlenir.

Değişik metodlar kullanılarak sitrat, magnezyum ve pirofosfatın birlikte tüm idrarın inhibitor etkisinin %20'si kadarını oluşturduğu ve bu üçü içerisinde sitratin en önemli faktör olduğu kaydedilmiştir. Glikozaminoglikan, asit mukopolisakkarit ve RNA gibi polianyonların kristal ve nükleasyon büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (22).

İki Üriner glikoprotein olan nefrokalsin ve Tamm Horsfall glikoproteinleri kalsiyum okzalat monohidrat kristal agregasyonunun kuvvetli inhibitörleridir Basit solüsyonda nefrokalsin kalsiyum oksalat monohidrat kristallerinin büyümesini kuvvetli bir şekilde inhibe etmektedir (18).

Taş oluşumunda Tamm-Horsfall'un rolü tartışmalıdır ve molekülün kendisinin durumuna bağlıdır, çünkü belirli şartlarda kendiliğinden agregate olabilir. . Osteopontinin kristallerin renal epitelyal hücrelere in vitro olarak bağlanmalarını azaltırken kalsiyum okzalat kristallerinin nükleasyon, büyüme ve agregasyonunu da inhibe ettikleri gösterilmiştir (23) .

### **Üriner Sistem Taş Hastalığında Risk Faktörleri**

Araştırmalar, üriner sistem taş hastalığı olanların %25'inde aile hikayesi olduğunu, ailesinde taş hastalığı olanlarda, çevresel ve diyetle ilgili faktörler engellense de taş hastalığı gelişme riskinin daha fazla olduğu bildirilmektedir (10). Taş hastalığı en çok 30 ile 60 yaşları arasında görülür .E/K oranı: 3/1 dir.Çocuklarda ise testosteron nedeniyle karaciğerde yapılan endojen okzalat miktarı az olduğundan her iki cinstede yakın oranda görülmektedir (24).

Üriner sistem taş hastalığında coğrafi faktörler de özellikler gösterebilmektedir. Bu açıdan hastalığın daha sık olduğu kabul edilebilecek ülkeler İskandinav ülkeleri, Akdeniz ülkeleri, Kuzey Hindistan, Pakistan, Arap ülkeleri, Orta Avrupa ve Çin olarak sıralanırken, taş hastalığının nadir olduğu bölgeler ise Orta ve Güney Amerika ve Afrika olarak gruplandırılabilir (2). Böbrek taşı gelişimi için risk oluşturan çevresel faktörler incelendiğinde ise aşırı sıcaklığın önemli bir neden olduğu ortaya çıkmaktadır. Yüksek sıcaklık sonucu aşırı terlemeyle yeterli sıvı alımı da olmadığından azalan idrar hacmine bağlı olarak artan idrar yoğunluğu, idrarın yoğunlaşmasına ve bunun sonucunda da idrardaki solüt yükün artmasına ve kristalizasyon oluşumuna neden olur (25).

Diyet faktörü taş oluşumunda önemlidir.Pürin, okzalat, kalsiyum, fosfat ve diğer maddelerin diyetle aşırı alınması idrarla bu maddelerin aşırı atılmasına ve taş oluşumunun kolaylaşmasına yol açabilir (26). Alkol alımı ile de kanda ürik asit, idrarda kalsiyum, fosfat düzeylerinde artış olduğu ileri sürülmektedir. Böylece alkol alışkanlığı olanlarda üriner sistem taş hastalığı riski normalden daha fazla olduğu düşünülmektedir.

### **Üriner Sistem Taşları**

Üriner taşların en sık karşılaşılan bileşeni kalsiyumdur. Taşların %75'inin major içeriğini oluşturmaktadır. Kalsiyum okzalat tüm taşların %60'nı oluştururken

miks kalsiyum oksalat ve hidroksiapatit %20'sini ve bruşit taşları %2'sini oluşturmaktadır. Ürik asit ve struvite (magnezyum amonyum fosfat) taşların her ikisi de %10'unu oluştururken sistin taşları nadirdir (%1).

Nefrolityazis için olan çoğu sınıflandırma sistemleri altta yatan metabolik veya çevresel anormollikler temel alınarak taşları ayırmaktadır. Bir seri fizyopatolojik bozukluklar kalsiyum taşı oluşumuna tek başına veya kombine bir şekilde yol açarlar. Bunlar hiperkalsiuri , hipositratüri , hiperürikozüri, hiperokzalüridir (27). Ürik asit, sistin ve struvite taşları oldukça özgün bir şekilde oluşurlar.Ürik asit taşları sadece asidik idrarda oluşurken sistin taşları ,sistin renel reabsorbsiyonunun bozulması sonucunda oluşur. Enfeksiyon taşları üreaz oluşturan bakterilerin oluşturduğu alkali ortamda meydana gelirler. Sistin gibi bazı taşlarda taşın kimyasal bileşiminin bilinmesi uygun tedavinin başlaması için yeterli bilgiyi sağlayabilir (8).

### ***Kalsiyum Taşları***

#### ***Hiperkalsiüri***

Kalsiyum taşı oluşanlarda görülen en sık karşılaşılan anomali hiperkalsiüridir. (>250-300 mg/gün/24 saatlik idrar) (28),(29),(30).Taş oluşumunda hiperkalsiürinin patogenetik rolünü destekleyen bir sıra bulgu mevcuttur. İlk önce, taş oluşanlarda hiperkalsiüri siktir, hastaların %35-65 inde vardır (31) , (32) . Gerçekten de üriner kalsiyum seviyelerini azaltmaya yönelik tedavi stratejileri taş nüksünde azalmaya neden olmaktadır (33) ve ısrarlı hiperkalsiürisi olanlarda ise medikal tedavi sıklıkla başarısız olmaktadır (34).

Hiperkalsiüri, absorbtif, resorbtif ve renal yolla oluşmasına rağmen en sık hiperkalsiüri nedeni idiopatiktir.Absorptif hiperkalsiüri'de primer sorun intestinal Ca emiliminin artışıdır. Renal hiperkalsiüride esas sorun böbrekten fazla Ca atılmasıdır. Özellikle böbrek tubuluslarında Na, Ca, P ve Mg transportunda fonksiyonel bozukluk, yapısal olarak tubuler ektazi ve geçirilmiş üriner infeksiyonlar idrarda Ca seviyesini yükseltebilmektedir. Resorbtif hiperkalsiüri ise hiperparatiroidi olgularında gözlenmektedir (35), (36) .

#### ***Hiperokzalüri***

Hiperokzalüri üriner okzalatın 40mg/günden fazla olması şeklinde ifade edilir. Hiperokzalürinin nedenleri şunlardır; biyosentetik yollardaki bozukluklar (primer hiperokzalüri), intestinal rezeksiyon, çölyak enteropatisi veya inflamatuvar barsak hastalığı gibi intestinal malabsorbsiyon durumları (enterik hiperokzalüri) ve diyetle

aşırı alınması veya maddenin yüksek seviyede olması (vitamin C) (diet hiperokzalürisi) şeklinde olabilir.

Primer hiperokzalüri, otozomal resesif hastalık olup çocuklarda sık nükseden CaOx taşı ve nefrokalsinozise neden olur. Tip I de 'Gliokzalat karboligaz' enzimi yetersizliğinden gliokzalik asit daha çok gliokzalat ve okzalata dönüşür, glisine dönüşmez. Tip II Hiperoksalüride 'D-gliserat dehidrogenaz' enzimi yetersizliğine bağlı günde 100mg'dan fazla okzalat idrarla atılır. Diğer hiperokzalüri nedenleri, otomobillerde antifiriz olarak kullanılan etilen glikol çok süratli oksalata dönüştüğünden yanlışlıkla alımı masif okzalüriye neden olur. Günde 5 mgdan fazla C vitamini alımı hiperokzalüriyle taş oluşumuna neden olabilir (8).

### ***Hiperürikozüri***

Hiperürikozüri üriner ürik asidin günde 600mg'ı aşması olarak tarif edilir. yalnız ürik asit taşlarında değil, kalsiyum taşlarında da saptanabilir (37). Diyetle aşırı pürin alımı hiperürikozürinin en sık sebebidir. Hiperürikozüride tedavi allopürinoldür Allopürinol, ksantin oksidazı inhibe ederek ürik asit sentezini azaltır.

### ***Hipositratüri***

Hipositratüri kalsiyum taşı oluşturanların %10 kadarında bir izole anomali olarak ortaya çıkan nefrolityazisle ilişkili önemli ve düzeltilebilir bir anomalidir ayrıca diğer anomalilerle de %20-60 arasında ilişkilidir (38),(39),(40),(41). Sitrat üriner sistem taşlarına inhibitör etki yapan önemli bir maddedir. İlk önce kalsiyumla birleşerek kalsiyum tuzlarının idrardaki saturasyonunu azaltır (28). İkinci olarak sitrat kalsiyum oksalatın spontan nükleasyonunu direkt olarak önlemektedir (42). Üçüncü olarak da sitrat kalsiyum okzalat kristallerinin aglomerasyon ve sedimentasyonunu inhibe etmektedir (43).

### ***Hipomagnezüri***

Hipomagnezüri nadiren nefrolityazise neden olur, izole bir anomali olarak taş oluşumunun %1 inden azına neden olmaktadır, ancak diğer anomalilerle birlikte olduğunda bu rakam olguların %6'sına kadar ulaşmaktadır (41). Deneysel modellerde Mg verilmesinin hastalığın tekrarını azalttığı gösterilmiştir. Kalsiyum taş hastalarının %4.3'ünde hipomagnezüriye (<50 mg/kg/24 saatlik idrar) rastlanıldığı bildirilmektedir (44). Hipomagnezüri, enflamatuvar barsak hastalıklarına bağlı malabsorbsiyonlarda da görülebilmektedir.

### ***Sistin Taşları***

Sistinüri dibazik aminoasitlerin intestinal ve renal tübüler transport defektiyle karakterize bir kalıtsal otomozal resesif bozukluktur ve sonunda sistinin aşırı üriner atımı meydana gelmektedir. Bu defekte bağlı olarak lizin, ornitin ve argininin yüksek üriner konsantrasyonları oluşsa da sistinin zayıf erirliği dolayısıyla sistin taşı formasyonu gelişir. Çocuklarda sistinüri tüm taşların %10 kadarının sebebidir (45).

### ***Enfeksiyon Taşları***

Enfeksiyon taşları tüm taşların %5-15'ini kapsar (41). Taşın oluşumu için üre parçalayan bakterilerin yol açtığı bir enfeksiyon ve magnezyum, amonyum, fosfat ve karbonatlardan idrarın doymuş olması gerekir. Enfeksiyon olsa bile idrar pH sı 5,85 in üzerine çıkmadıkça struvit taşları oluşmaz. Bu tür taşlar böbreğin tüm anatomik yapılarını dolduracak kadar gelişir (Koraliform veya staghorn taş). Böbrekte görülen koraliform taşların % 60-90 ı üreaz (+) bakteri enfeksiyonu sonucu oluşur (46). En sıklıkla üreaz üreten bakteriler Proteus, Klebsiella, Psödomonas ve Stafilokok türleridir (47) ve bunların içinde enfeksiyon taşlarına en sık eşlik eden organizma *Proteus Mirabilis* tir.

### ***Ürik Asit Taşları***

Ürik asit pürin metabolizmasının son ürünüdür. Ürik asit 37° C ve 5.35 pH'da yarısı ürat tuzu iken yarısı da serbest ürik asit halindedir. Sodyum ürat serbest asit'den 20 misli daha fazla eriyebilir olduğundan serbest ürik asit kısmı taş formasyonu riskini kuvvetli bir şekilde belirler. Ürik asit çözünürlüğünü belirlemede kritik faktör idrar pH'sıdır (48). Düşük idrar pH'sı eriyebilir ayrılmamış ürik asit konsantrasyonunu artırarak ürik asidin doğrudan presipitasyonuna neden olmaktadır (49),(50).

### ***Kristal Uyarımlı Renal Enflamasyonun Mekanizmaları (51)***

Intralüminal kristal (hafif zincir birikintileri, kalsiyum okzalat, monosodyum ürat, kalsiyum fosfat, miyogloblin, ilaçlar, sistin ve adenin...vb) birikimi tübüler obstrüksiyona ve nefronda fonksiyon kaybına yol açabilir. Tübüllerin %50'den fazlasıyla tamamıyla obstrükte olmadığında tübüler obstrüksiyon kendi başına ABH(akut böbrek hasarı) 'ye sebep olmaz. Kristal artışı ve tübüler hücre hasarı,

endositoz olabilen 1 µm büyüklüğündeki kristaller(hafif zincir birikintileri, kalsiyum oksalat,monosodyum urat, kalsiyum fosfat, miyoglobin, ilaçlar ve kontrast maddeler, sistin,adenin,serbest hafif zincirler) ile tetiklenebilir. Fagozomal destabilizasyon pasif nekroza ve potansiyel olarak programlı nekroz formlarına sebep olur. Nekrotik tübüler hücreler ATP, histonlar veya HMGB1( high-mobility group protein 1 )gibi diğer tübüler hücrelerde pattern tanıma reseptörlerini aktive etme potansiyel olan DAMPs salgılar. In vitro kültürdeki tübüler hücrelerin kristal uyarımlı sitokin ve kemokin salınımında bu indirekt etki sorumlu tutulmaktadır. Direkt NLRP3(NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) aracılı tübüler hücreler tarafından IL-1/IL-8 salınımının aktivasyonu şüpheli kalmaktadır. Kristallerin interstisyel kompartmanda birikimi veya bu kompartmana translokasyonu esas olarak kalsiyum oksalat, kalsiyum fosfat, adenin, monosodyum urat ve sistin için bildirilmiştir. Burada kristaller endotelial hücreler, fibroblastlar ve dendritik hücreler (DCs) tarafından alınmaktadır.Bu mononükleer fagositler tarafından kristal endositozu IL-1β/IL-18 sekresyonu ve potansiyel hücre ölümüne yol açan NLRP3 inflamazonunu aktive eder. Ölen tübüler hücrelerden ATP ve histon salınımı yanı sıra distal tübülün kalın çıkan parçasından interstisyuma Tamm-Horsfall protein sızıntısı dendritik hücrelerde ve makrofajlarda NLRP3 enflamasyonunu aktive eder. Tüm bu hücre tipleri tarafından sitokin ve kemokin salınımı, daha fazla sitokin ve kemokin üreterek inflamatuvar doku ortamını şiddetlendiren nötrofil ve pro-inflamatuvar makrofajların seri üretimini tetikler. Bu durum büyük oranda kristal uyarımlı ABH'ye katkıda bulunur. Persistan kristal birikimi, rejenerasyon yollarının katılımı ve persistan inflamasyon aracılı epitelyal atrofiye ek olarak interstisyel fibrozis gelişimine neden olan mezenşimal onarım süreçlerini ortaya çıkması gibi ilave etkilere sebep olur.

#### ***Kristal Nefropatisinde Tübüler Hasar (Şekil 4)***

Kristal nefropatisinin pek çok formu belirgin tübüler hasar gösterir, fakat kristaller tübüler hücrelere nasıl zarar verir? Şu anda, kristallerin inflamasyonu içeren indirekt veya kristal uyarımlı tübüler hücre ölümünü kapsayan direkt mekanizmalarıyla tübüler hücrelere zarar verdiği düşünülmektedir

#### ***İndirekt mekanizmalar***

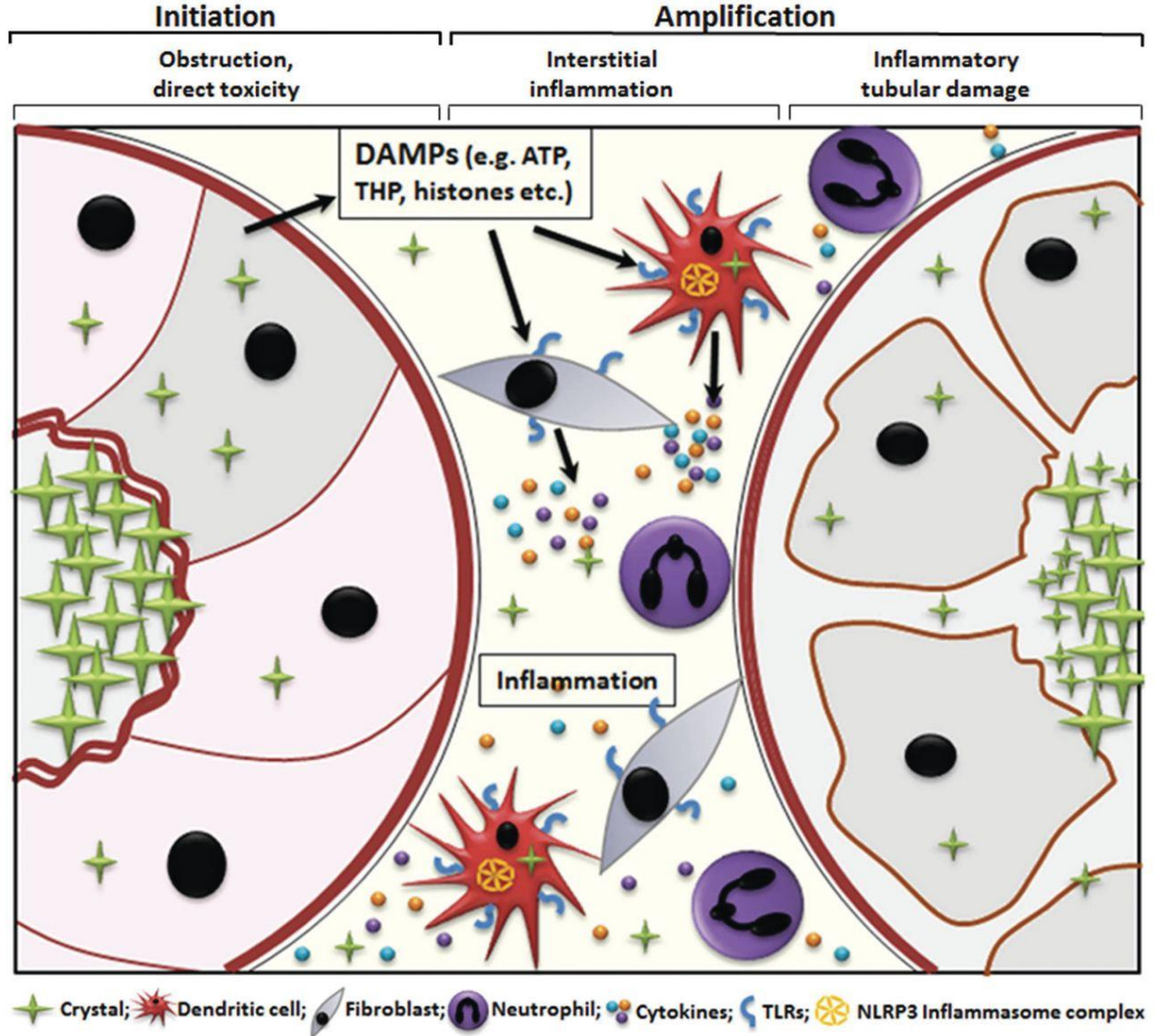
Renal mononükleer fagositlerde inflamazom aktivasyonu ve takip eden TLR/IL1R sinyali sonucu ortaya çıkan inflamasyon, tübüler hasara katkıda bulunur. Hem immün sistem hem de immün sistemden olmayan hücrelerde aktive NFκB( nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunda artışa neden olur. Bunun sonucunda

inflamatuvar hücrelerin (örn. nötrofil, lenfosit, makrofaj NK hücreler and Treg hücreleri vb ) böbrek intertisyumuna infiltrasyonu gözlenir. Ayrıca renal kristal depozitlerden kaynaklanan tübül obstrüksiyon gibi sekonder komplikasyonlar kristal nefropatisi sırasında ortaya çıkan tübül hasara katkıda bulunur.

### ***Direkt Mekanizmalar***

Kristaller tübül epitel ile direkt temas ettiklerinde sitotoksik olduğu bilinmektedir. Örnek olarak, Chen ve ark. CaOx monohidrat kristallerinin MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücrelerine sıkıca yapışarak, bu hücrelerde ölümcül etkilere sebep olduğunu göstermişlerdir (52). CaOx monohidrat kristallerinin MDCK hücreleri tarafından internalizasyonu, mitokondrial disfonksiyon ve ROS(reactive oxygen species) salınımında artışla sonuçlanan, enerji üretimindeki birçok proteinde alterasyona neden olur (53). Bu yüzden bu ROS artışı, renal inflamasyonu şiddetlendiren NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olabilir. Ayrıca ölen hücrelerin PRR'ları aktive eden bir çok DAMPs salgıladığı bilinmektedir. Bunlar arasında ATP ve histonlar gibi DAMP'lar da (Tehlike ile İlişkili Moleküler Pattern ) NLRP3 inflamazonunu aktive edebilir. Ayrıca maruziyette CaOx kristalleri direkt olarak tübül epitelyal hücreleri öldürdüğü ve bu hücrelerden salınan ATP'nin NLRP3 inflamazonunu aktive ettiği, bu durumun tübül hasara katkıda bulunduğu tarafımızca gösterilmiştir. Bunun dışında akut okzalit nefropatisi sırasında ATP inhibisyonu böbreği tübül hasardan korumaktadır (54).





**Şekil 4:** Kristal uyarımlı renal hasar mekanizmaları (Shrikant R. Mulay ve ark Nephrol. Dial. Transplant. 2013)

## TOLL-BENZERİ (TOLL-LIKE) RESEPTÖRLER

### Genel özellikler

İmmün sistem, doğal ve kazanılmış olmak üzere iki ana bölümde incelenir. Doğal immünite patojenlerin tanınması için toll benzeri reseptörler (toll like receptors, TLR) ailesini kullanır. Toll geni ilk defa 1985'te Nobel ödüllü Christiane Nusslein-Volhard, Eric Weischaus ve arkadaşları tarafından bir meyve sineği olan *Drosophi* de tanımlanmıştır. Takip eden yıllarda bu genin sadece böceklerde değil memelilerde de var olduğu ve doğal immünite için gerekli olduğu anlaşılmıştır (55). TLR'ler doğal immünitenin parçaları olan makrofaj ve dendritik hücreler tarafından eksprese edilen tip 1 transmembran proteinleri olup sitoplazmik ve extrasellüler bölgeden oluşmaktadır. Sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile yüksek derecede

benzerlik gösterir ve bu nedenle Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgesi olarak adlandırılır. Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde her biri 24-29 amino asit içeren, lösinden zengin tekrar (LRR) motifleri bulunur. Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülür (56).

İnsanlarda TLR ailesinin tanımlanmış 10 üyesi (TLR1-10) mevcuttur. TLR ilişkili sinyal yollarının uyarılması sonucunda interlökin (IL)-1, IL-6, tümör nekroz faktörü (TNF)  $\alpha$  ve diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile birlikte edinilmiş immün sistemin aktive olmasında rol oynayan “eş zamanlı uyarı (costimulatory) moleküllerinin” ekspresyonu da gerçekleşmiş olur. Böylece hem doğal hem de edinilmiş bağışıklık sistemleri aktive edilmiş olur (56). TLR’ler immün savunma sisteminin ilk basamağında rol oynarlar. Patojenlerde konakta bulunmayan ve “patojen ilişkili moleküler kalıplar” (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) olarak adlandırılan bileşenler bulunmaktadır (57).

Doğal bağışıklık sistemi, patojen tehditlerini tanıyan ve onlara karşı yanıtı harekete geçiren germ-line şifreli Pattern Tanıma Reseptör (PRR)’leri içermektedir. PRR’ler, mikrobiyal patogeneze, sağ kalım ve replikasyonda kritik role sahip olan, Patojenle İlişkili Moleküler Patern (PAMP)’ler olarak adlandırılan mikrobiyal komponentleri tanımada görev almaktadırlar (58).

Enfeksiyon sırasında makrofajlar PAMPs’ı TLR’ler aracılığı ile tanırlar. TLR sinyal mekanizması ile proinflamatuvar sitokin ve nitrik oksit gibi antimikrobiyal küçük moleküllerin üretimi indüklenir ve makrofaj aktivasyonu ortaya çıkar. Böylece enfeksiyonun erken aşamasında makrofajlar mikroorganizmaların eliminasyonu için aktive olurlar. Ancak doğal immün sistem aktivasyonunun patojenlerin yok edilmesinde sınırlı rolü vardır. Edinilmiş immün sistem aktivasyonu ile daha efektif bir konak yanıtı oluşur. TLR’lerin uyarılması sonucunda, perifer dokular ile lenfoid dokular arasındaki iletişimi sağlayan dendritik hücre aktivasyonu başlar ve bu olayların sonucunda edinilmiş immün sistemin en önemli bileşeni olan T-hücre aktivasyonu gerçekleşir (59).

### **TLR Ailesi**

Günümüze kadar memelilerde 13 TLR analogu tanımlanmakla birlikte, TLR11, 12 ve 13 insanlarda eksprese olmayıp sadece farelerde fonksiyoneldirler. Farede ise 12 tane TLR (TLR1-9, TLR11, TLR12, farede TLR10 ekspresyonu yoktur) ailesi üyesi tanımlanmıştır. İlk tanımlanan TLR1 olmasına rağmen, bu reseptörlerden fonksiyonu ilk belirlenen TLR4 olmuştur. Ancak her bir TLR’nin ligand spesifitesi farklıdır. TLR’ler hem lenfoid hem de nonlenfoid dokuda eksprese olmaktadır (60).

Northern blot analizi ve mRNA ekspresyonuna bakılarak, TLR1'in ağırlıklı olarak monosit, nötrofil, B-hücreleri ve natural killer (NK) hücrelerinde, TLR2'nin monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR3'ün dendritik hücrelerde, TLR4'ün endotelial hücreler, monosit, nötrofil ve dendritik hücrelerde, TLR5'in ise monosit ve dendritik hücrelerde eksprese olduğu gösterilmiştir (61).

Ancak tüm bu veriler mRNA ekspresyonu esasına dayandığı için, fonksiyonel proteininin kesin olarak varlığını gösterdiğini söylemek mümkün değildir. Ayrıca, mRNA ekspresyonu, hücre içinde mi yoksa hücre yüzeyinde mi bulunduğu ayırımını yapamamaktadır. Kısıtlı sayıda TLR antikoru bulunduğu için yüzey ekspresyonları hakkındaki bilgiler yeterli değildir (62).

İnsan TLR genlerinin, kromozom 4p14 (TLR1), 4q32 (TLR2), 4q35 (TLR3), 9q32-33 (TLR4), 1q33.3 (TLR5), 4p16.1 (TLR6), Xp22.3 (TLR7), Xp22 (TLR8) ve 3p21.3 (TLR9) üzerinde olduğu gösterilmiştir (63).

### **TLR1**

TLR ailesinin ilk üyesi olan TLR1, *Drosophila* Toll'u ve insan interlekin-1 reseptörlerinde ortak olarak bulunan homolog alanın varlığıyla tanımlanmıştır (64). TLR1, dalak ve periferik kan hücrelerinden yüksek düzeyde eksprese edilmiştir. TLR1'in triaçil lipopeptitlere karşı oluşan yanıtta TLR2 ile beraber rol oynadığı gösterilmiştir (65).

### **TLR2**

Hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakteriler üzerinde bulunan lipoproteinlerin TLR2'nin tanınması sonucunda hücreleri aktive ettiği gösterilmiş ve TLR2'nin ağırlıklı olarak lipoproteinleri tanıyan reseptör olduğu düşünülmüştür. (66)

TLR2 peptidoglikan, lipoteikoik asit, gram-pozitif LPS ve bir grup gram-pozitif makromolekül ile bağlanıp cevap verebilmektedir. Tek bir TLR nin birden fazla molekülü tanınmasının nedeni diğer TLR'ler ile dimerize olabilme yeteneğinden gelmektedir. Peptidoglikan, TLR2 ve TLR6'nın dimer oluşturduğu reseptör aracılığı ile sinyal iletirken , lipoproteinler TLR6'ya ihtiyaç duymadan TLR2'yi aktive edebilmektedir (67).

Sadece TLR2, TLR1 ve TLR6 ile heterodimerize olarak farklı molekülleri tanıma kapasitesini artırırken, aktive olmak için heterodimerizasyon gerekmeyen TLR4 için bu görevi muhtemelen MD2 ve CD14 gibi diğer yardımcı moleküller yürütmektedir (68).

### **TLR3**

Enfekte hücrelerde viral replikasyon, immun hücreleri stimüle edebilen çift sarmallı RNA (double-stranded RNA, dsRNA)'nın oluşması ve Tip 1 interferon'un indüklenmesiyle sonuçlanır. TLR3'ten yoksun farelerde yapılan çalışmalarda viral RNA kopyasına karşı oluşan cevapların azalması, TLR3'ün dsRNA'nın tanınmasında rol oynadığını göstermiştir (65).

### **TLR4**

İnsanda en çok araştırılan ve fonksiyonu aydınlatılan TLR olan TLR4 lipopolisakkaridler (LPS)'in tanınmasında rol almaktadır. TLR4'ün bir LPS reseptörü olduğu ortaya çıkarılmıştır. TLR4 fonksiyonel olarak hücre yüzeyinde CD14, MD2 ve LPS-bağlayıcı proteini içeren bir molekül kompleksini oluşturmakta ve bu moleküllerden herhangi birisi eksik olan farelerde LPS cevabının da eksik olduğu gözlenmektedir. İzleyen değerlendirmelerde, gram-negatif bakterilerin oluşturduğu ağır infeksiyonlarla TLR4 mutasyonlarının (Asp299Gly ve Thr399Ile) birlikteliği dikkat çekmiştir (69).

Agnese ve arkadaşları tarafından yoğun bakım ünitesinde sistemik enflamatuvar sendromu olan vakalarda yapılan çalışmada belirlenmiştir. TLR4 mutasyonu olan vakalarda gram-negatif infeksiyon insidansı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (70).

CD14, TLR4'ü ve ekstraselüler aksesuar bir protein olan MD2'yi içeren bir kompleksle birleşmektedir. Hem TLR4 hem de MD2'nin LPS yapılarının ayrımında önemli olduğu bilinmektedir. TLR4'ün LPS dışında, konağa ait olan veya olmayan birçok molekülü tanıyabildiği bilinmektedir (71).

TLR4 tarafından tanınan diğer bir yabancı molekül respiratuar sinsityal virüsün füzyon proteini (F protein)'dir. Hem endojen hem de mikrobiyal kaynaklı "Heat-Shock Protein 60 (HSP60)"ın da TLR4'ün tanınması sonucunda enflamatuvar sinyal oluşturduğu gösterilmiştir (72).

### **TLR5**

TLR5 bakteriyel flagellanın temel yapısal bir komponenti olan bakteriyel flagellini tanımaktadır. Flagellin, karbonhidrat veya lipid içermeyen saf bir protein yapıya sahiptir. TLR5'in ligandı olan flagellin ile bağlanması sonucu tümör nekroz faktörü (TNF)  $\alpha$  gibi enflamatuvar sinyal oluşur (73).

### **TLR6**

TLR6, TLR2 ile heterodimerdir (farklı iki molekülün birleşmesiyle oluşan yapı). TLR6'dan yoksun makrofajlar mikoplazmal lipopeptit (MALP-2) karşı cevap oluşturamazken, sentetik bakteri lipopeptidine (BLP) karşı normal sitokin üretilmesini gösterirler (37). TLR2'den yoksun fareler ise MALP2'ye de BLP'ye de cevap

veremezler. TLR2 ve TLR6, MALP2'yi tanımada beraber rol oynarken; TLR6, MALP2 ve BLP arasındaki küçük yapısal farklılığın tanınmasından da sorumludur (74).

### **TLR7**

TLR7, imidazoquinolin ailesinin birkaç tipini tanır. Bunlar, imiquimod ve R-848 (resiquimod, s-28463) gibi kuvvetli antiviral ve antitümör özelliklerine sahip imidazoquinolin ailesinin düşük moleküler kütleli bileşikleridir. Imiquimod'un aktivitesi, IFN (interferon ) ve IL-12 (interlökin 12) gibi sitokinleri uyarma yeteneğine dayanır. Tropikal imiquimod terapisi halen papilloma virüslerin neden olduğu eksternal genital ve perianal siğillerin tedavisinde uygulanmaktadır. R-848, imiquimod'un kuvvetli analogudur ve hepatit C virüs enfeksiyonunda olduğu gibi herpes virüsler için detarapide denenmektedir (75). TLR7 , loksoribin ve broprimin gibi diğer sentetik kimyasalları da tanır.

### **TLR8**

TLR8'in TLR7 ve TLR9 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. TLR8, endozomal kompartmanda tek zincirli RNA'yı tanır ve sitokin salınımına sebep olur (76),(65).

### **TLR9**

Mikrobiyal DNA'da memeli DNA'sına kıyasla çok yüksek oranda metile olmamış CpG molekülleri bulunmaktadır.Yapılan çalışmalarda bu moleküllerin reseptörünün TLR9 olduğu gösterilmiştir (77).

### **TLR10**

TLR10, akciğer ve B lenfositlerden eksprese edilmiştir. TLR10, yapısındaki aminoasit benzerliği ile TLR1 ve TLR6 ile yakından ilişkilidir (65).

### **TLR11**

TLR11 (profilin), idrar kesesi epitel hücrelerinden eksprese edilmiştir. TLR11, üropatojenik bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlara yanıt vermede görevlidir (65). TLR11'den yoksun fareler üropatojenik bakteri enfeksiyonlarına son derece hassastırlar. TLR11, TLR12 ve TLR13 farelerde karakterize edilmiştir. TLR11, insanlarda fonksiyonel değildir.

### **TLR12**

TLR12, yüksek oranda karaciğer, mesane ve böbrekten; zayıf olarak da dalaktan eksprese edilmiştir. TLR12 de üropatojenik bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlara yanıt vermede görevlidir (78).

### **TLR13**

TLR13, faredeki TIR (Toll/Interlökin-1 reseptör) domaine homolog olarak identifiye edilmiştir. TLR13'ün TLR3 ile yakın ilişkide olduğu görülmüştür (78).

### **TLR'lerin Lokalizasyonları ve Ligandları (Tablo 1)**

TLR'ler, Tip I transmembran proteinlerdir ve hücre içerisinde farklı lokalizasyonlarda bulunmaktadır. TLR1, TLR2, TLR4 ve TLR6 hücre yüzeyinde eksprese edilirken, TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9 ise endozom gibi hücre içi komponentlerde eksprese olmaktadır.

Her bir TLR'ye özgün ligandlar ve bu ligandların köken aldıkları orijinler mevcuttur. TLR1 ya da TLR6 ile heterodimer oluşturan TLR2, gram pozitif bakterilerin ve mikoplazmanın peptidoglikan, lipopeptit ve lipoproteinlerini içeren çeşitli bakteriyel komponentleri tanımaktadır. TLR3'ün ligandı replike olan virüslerin ürettiği çift-zincir RNA (dsRNA) molekülüdür. Gram negatif bakterilerde bulunan LPS'nin TLR4'ün ligandı ve bakteriyel flagellin ise TLR5 ligandı olduğu belirlenmiştir. Mikrobiyal ligandlara ek olarak, birçok endojen ligandların da TLR'leri uyardıkları belirlenmiştir. Bu endojen ligandlara ısı-şok proteinleri (HSP) (HSP60 ve HSP70), hiyaluronan oligosakkaritleri, sürfaktan protein A ve heparan sülfat, fibronektin, endoplazmin gibi farklı ekstraselüler matriks ürünleri ve bu matriks ürünlerinin fragmanları verilebilir (79).

Reseptör	Ligand	Ligand Orijini
TLR1	Triaçil lipopeptidler Soluble faktörler	Bakteri ve mikobakteri <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoprotein/lipopeptidler Peptidoglikan Lipoteikoik asit Lipoarabinomannan Fenol-soluble modulin Glikoinositolfosfolipidler Glikolipidler Porinler Atipikal lipopolisakkarit Atipikal lipopolisakkarit Zimosan Isı şok protein 70	Çeşitli Patojenler Gram pozitif bakteri Gram pozitif bakteri Mikobakteri <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungi Konak
TLR3	Çift zincirli RNA	Virus
TLR4	Lipopolisakkarit Taksol Füzyon Protein Zarf Protein Isı şok protein 60 Isı şok protein 70 Fibronektin Tip 3 Tekrarlı Ekstra Domain A Hyaluronik asit oligosakkaritleri Heparan sülfat polisakkarit fragmentleri Fibronojen	Gram negatif bakteri Bitkiler Respiratory Syntcytial virus Fare tümör virusu <i>Chlamydia pneumoniae</i> Konak Konak Konak Konak Konak
TLR5	Flagellin	Bakteri
TLR6	Diaçil lipopeptidler	Mikoplazma
TLR7	Lipoteikoik asit Zimosan Imidazokuinolin Laksoribin Bropirimin Tek iplikli RNA	Gram pozitif bakteri Fungi Sentetik bileşikler Sentetik bileşikler Sentetik bileşikler Viruslar
TLR8	Imidazokuinolin Tek iplikli RNA	Sentetik bileşikler Viruslar
TLR9	CpG -içeren DNA	Bakteri ve Viruslar
TLR10	Tanımlanmamış	Tanımlanmamış
TLR11	Tanımlanmamış	Üropatojenik bakteri

**Tablo 1:** TLR'ler ve ligandları (AKIRA 2004)

### TLR Sinyal İletimi (Şekil 5)

TLR sinyalizasyonunda, myeloid differensiyasyon faktör 88'e (MyD88) bağımlı ve bağımsız sinyal yolu olmak üzere 2 yol tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarında başlıca dört adaptör molekül rol oynar: MyD88, TIR bölgesi IFN-beta

indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP) (80).

### ***MyD88 Aracılıklı Sinyal Yolağı***

MyD88, TLR3 dışındaki tüm TLR tiplerinde, TLR aracılığı ile oluşan doğal immün yanıtın aktivasyonu için başlıca elemandır. Bu yolun basamakları şu şekildedir:

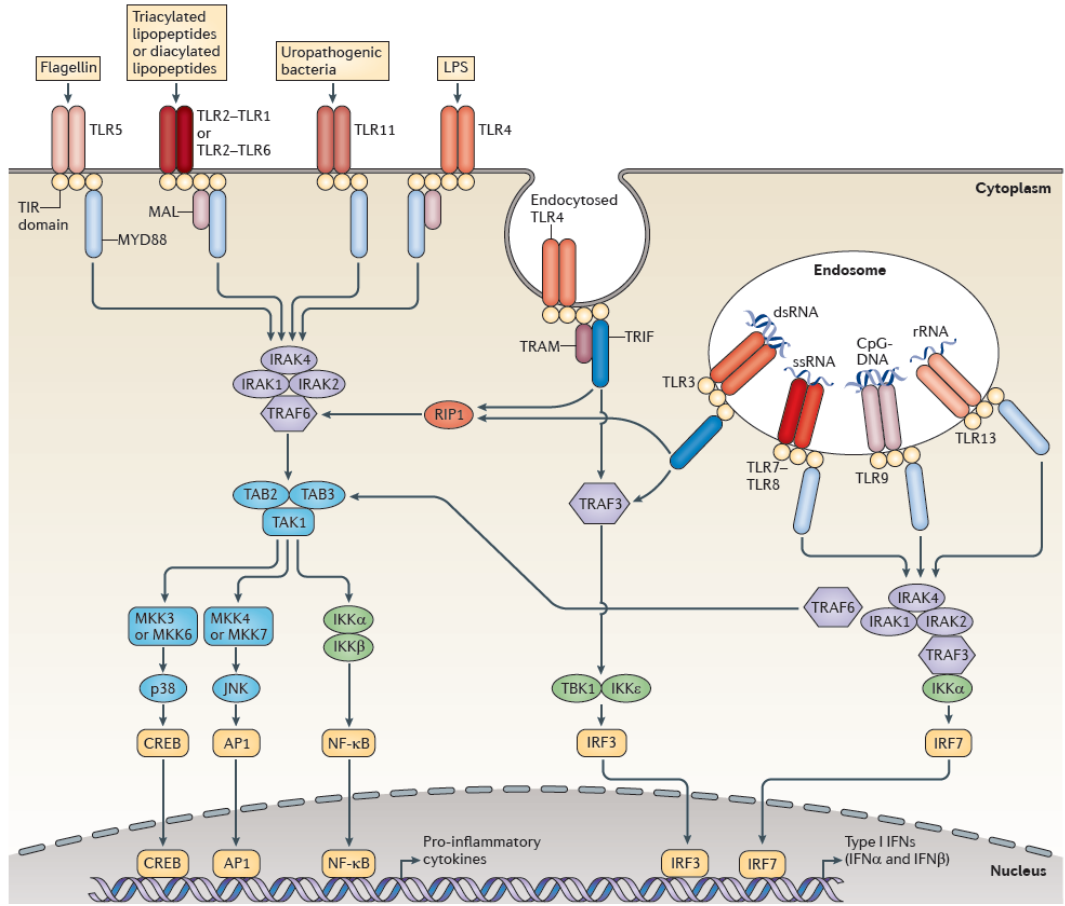
1. CD14, bakteriyel LPS'yi tanır, TLR4 ve MD2 ile bir kompleks oluşturarak sinyalizasyonu başlatır. CD14, bakteriyel LPS'nin ve diğer PAMP'ların tespit ve tanınmasında, TLR4 ve MD2 ile birlikte yardımcı reseptör olarak görev alır. MD2, ekstraselüler bir protein olup, TLR4'ün hücre yüzeyine lokalizasyonu ve LPS ile indüklenen uygun TLR4 cevabı için gereklidir.
2. MyD88 TIRAP varlığında TLR4'e bağlanır ve komplekse IRAK'ı katar. Daha sonra MyD88 terminal bölgedeki karboksil (COOH) kısmından IL-1 reseptör bağlantılı kinaz kompleksi (IRAK) ile birleşir.
3. IRAK otofosforile olup kompleksten ayrılır, TRAF-6 bağlanarak aktifleşir. TRAF6'da TAK1'i (TGF-beta active kinase 1) aktifler. TAK1, TAB1 (TAK1 bağlanma proteini 1) ve TAB2 (TAK1 bağlanma proteini 2) ile bir sinyal kompleksi oluşturarak NF- $\kappa$ B inhibitör protein [IkB] kinaz (IKK) kompleksini aktive eder.
4. Bu kompleksle düzenleyici genler aktive olur. NF- $\kappa$ B nükleusa geçer ve  $\kappa$ B bölgesine bağlanır. Sonuç olarak, NF- $\kappa$ B aktivasyonu, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, iNOS ve MCP-1 gibi inflamatuvar düzenleyici genlerin ekspresyonuna neden olur (81).

### ***TRIF-Bağımlı Yolak***

Bir sitoplazmik protein olan MyD88, tüm IL-1R ve TLR ailesi ile etkileşime geçebilir ve TLR ailesinin sinyal mekanizması için MyD88'in gerekli olduğu gösterilmiştir (82). Ancak MyD88 olmayan farelerde, LPS ile ortaya çıkan NF- $\kappa$ B ve MAPK kaskadı aktivasyonunun geç başlaması, TLR4'un bu kaskadları aktive etmede MyD88'den bağımsız bir şekilde de hareket edebildiğini göstermektedir.

MyD88 bağımsız sinyal yolu başlıca TLR 3 ve 4 tarafından kullanılmaktadır. TLR4 ile uyarılmış IRF-3 aktivasyonu sonucunda IFN- $\beta$  üretimi gerçekleşir. Ardından IFN- $\beta$  STAT1 (signal transducer and activator of transcription) 'i aktive ederek IFN ile uyarılan çeşitli genlerin ekspresyonlarında artışa neden olmaktadır. TLR3 uyarımı ile de IRF-3 aktivasyonu gerçekleşmekte ve TRIF-bağımlı yoldan IFN- $\beta$ 'nin uyarımı sağlanmaktadır (80).





Şekil 5: TLR 'lerde sinyal iletim yolları (O'NEILL 2013)

### TLR ve Enfeksiyon

TLR'lerin ekspresyonu ilk olarak immun sistem hücrelerinde gösterilmiştir. TLR1 ve TLR6 insan lökositlerinde eksprese olmaktadır. TLR2/4/5 ekspresyonu myelomonosit hücreleriyle sınırlı kalırken, TLR3 ekspresyonu myeloid dentritik hücrelerde ve B hücrelerinin bazı alt gruplarında gerçekleşmektedir. B hücreleri ve plasmastoid dentritik hücreler spesifik olarak TLR7/9/10'u eksprese etmektedirler. TLR'ler primer olarak immun sistem hücrelerinde eksprese olmakla birlikte aynı zamanda insan keratinositlerinde, intestinal hücrelerin epitellerinde, ürogenital ve solunum sistemi bez hücrelerinde, endotelial hücrelerde, mezenkimal kök hücrelerde ve çeşitli sinir sistemi hücrelerde de eksprese olabilmektedirler (83).

## TLR ve Böbrek Hastalıkları

TLR'ler birçok mekanizmayla böbrek hastalıklarına katkıda bulunabilirler. Bu reseptörlerin aşırı aktivasyonunun iskemik böbrek hastalıkları, akut böbrek hasarı, son dönem böbrek yetmezliği, akut tübülointerstisyel nefrit ve renal transplant rejeksiyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir (84).

Böbreklerde doğal immün sistemin aktivasyonu lokal veya sistemik yolla olur. Böbreğe lokal retrograd yolla gelen enfeksiyöz TLR ligandları, böbreklerde güçlü bir inflamatuvar cevap oluşturur (85). Yapılan çalışmalarda, üriner sistem enfeksiyonlarında en sık görülen etken olan *E.Coli* ile oluşan enfeksiyonlarda TLR4 ve TLR5 aktivasyonu ile immün cevabın oluştuğu gösterilmiştir (86). Steril renal hasarla gelişen inflamasyona bağlı renal yetmezlikte ise, TLR2 ile TLR4'ün iskemi/reperfüzyon hasarının gelişimine olan katkısı gösterilmiştir. 2007 de Wu ve arkadaşları tarafından yayınlanan bu çalışmada 8 adet kontrol ve 8 adet deneysel renal iskemi yaratılan farelerin böbrek dokuları incelendiğinde TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının anlamlı derecede arttığını görülmüştür (87). Sirkülasyonda serbest formda olabildiği gibi immün kompleksler şeklinde de olabilen viral TLR agonistlerinin, böbreklerde özellikle glomerüllerde depo edilerek glomerülo nefritlerin oluşumuna katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Lokal aktivasyonun yanı sıra TLR'lerin sistemik aktivasyon yoluyla uyarılması böbreklerde inflamasyonu şiddetlendirebilir. Sistemik aktivasyon ile B lenfositlerinden lupus antikoagulan, romatoid faktör gibi otoantikörlerin yapılması, immün komplekslerle ilişkili glomerülo nefritlerin oluşumunda rol oynayabilir (85).

TLR 7 ve 9'un B lenfositlerini aktive ederek lupus nefritinin patogenezine katıldığı düşünülmektedir. TLR7 knockout farelerde lupus nefritinden koruyucu anti-Smith veya antiribonükleoprotein antikörleri yapılmadığı, TLR9 knockout farelerde ise anti-DNA antikörlerinin yapılmadığı, ama hastalığın arttığı görülmüştür (88).

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 24.07.2014 tarihli 60758568-20 sayılı yazısı ile onay alındıktan sonra Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'ne sunuldu. Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi'nden 2015TPF001 proje no'lu , 24.03.2015 tarihli ve 01 sayılı onay alınarak çalışmaya başlandı.

Erişkin ratlar(Wistar Albino Rat - Erkek) 2 gruba ayrıldı ve her grup 10 rattan oluşturuldu. 1.grup kontrol grubu olarak adlandırıldı , standart olarak yem ve su ile 16 hafta boyunca beslendi (Sham Grubu). 2.grup standart yem ve %1'lik etilen glükol ile 16 hafta boyunca beslendi.(Hiperokzalüri Grubu).Hiperokzalüri grubuna deneyin sağlığı ve kontrolü açısından aynı türden yedek 3 adet erişkin rat eklendi.Yedek ratlarda hiperokzalüri grubundaki gibi beslendi.16.haftanın sonunda tüm ratlar metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplandı. İdrarlar dijital mikroskopla ile incelenerek idrarlarda kalsiyum okzalat kristalleri arandı.Daha sonra idrarlarda 24 saat boyunca atılan okzalat miktarı biyokimyasal olarak ölçüldü.Ardından ratlara anestezi altında laparotomi yapılarak böbrekler çıkartıldı ve kansızlaştırma ile ötenazi yapıldı. Böbrek doku örnekleri histopatolojik incelemeye gönderildi.

### **Histopatolojik Değerlendirme**

Çıkartılan böbrek dokularının, formaldehit fiksasyonu ve doku takibi sonrasında parafin bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Bu kesitler ışık mikroskopunda bir patolog (Dr. NŞT) tarafından kristal depolanması ve enflamasyon varlığı açısından var/yok şeklinde körlemesine değerlendirildi.

### **Genetik İnceleme**

Böbrek dokularından sadece sağ böbrek dokularına ait örneklerinden total RNA izolasyonu ,cDNA sentezi ve gerçek zamanlı PCR ile TLR 1-11 ekspresyonları belirlendi. Sol böbrek dokuları gerektiğinde kullanılmak üzere -80 derecede saklandı.Tüm bu ölçümler sonrası 2 grubun verileri karşılaştırıldı.

### **Böbrek Dokusu Örneklerinden Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi**

#### **Total RNA izolasyonu**

Çalışmaya dahil edilen deney ve kontrol grubuna ait ratların sağ böbrek doku örneklerine total RNA izolasyonu ticari kit (RNAeasy Mini Kit ,Qiagen) yardımı

ile yapıldı. RNAlater solüsyonu eklendi ve total RNA izolasyonuna kadar -80° C'de saklandı.

Total RNA izolasyonu için uygulanan protokolde temel basamaklar aşağıda verildi:

1- Doku örnekleri (her biri en fazla 30 mg) kitle birlikte sağlanan 1000 µl "Lizis tamponunda (β-merkaptotanol eklenmiş)" homojenizatör (Heidolph RZR 2021, Almanya) yardımı ile maksimum hızda 90-120 sn lize edildi ve steril RNaz-içermeyen 1.5 mL'lik tüplere aktarıldı.

2- Tüplerdeki bu homojenat 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant mikropipet yardımı ile alınarak yeni steril tüplere aktarıldı.

3- Bu tüplere toplam hacimleri kadar %70'lik etanol (Merck) ilave edildi ve mikropipet yardımı ile homojenize edildi.

4- Bu karışımlardan 700 µl alındı ve kitle birlikte sağlanan 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş olan spin kolonlara aktarıldı ve 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpleri uzaklaştırıldı.

5- Spin kolonlara kitle birlikte sağlanan Yıkama Tamponu 1'den 700 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.

6- Spin kolonlara kitle birlikte sağlanan Yıkama Tamponu 2'den 500 µl ilave edildi ve 14.000 rpm'de 15 sn santrifüj edildikten sonra toplama tüpü yeniden değiştirildi.

7- Her bir spin kolon tekrar 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Her bir spin kolon steril, RNaz-içermeyen 1.5 ml'lik tüplere yerleştirildi ve üzerlerine kitle birlikte sağlanan RNaz-içermeyen sudan 35 µl eklendi. 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.

8- Elde edilen total RNA örnekleri, aynı gün cDNA sentezinde kullanıldı

#### **Total RNA örneklerinden cDNA sentezi**

TLR1-TLR11 (hedef genler) ve ACTB (β-aktin) ve GAPDH (referans genler) için relatif kantitasyon analizi, gerçek-zamanlı PCR sistemi (LightCycler 480 II Gerçek-zamanlı PCR Sistemi, Roche Diagnostics) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin ve referans genin mRNA düzeyinde ekspresyon analizi için kullanılan primer ve prob setleri "Universal Probe Library (UPL)"den (Roche) seçildi. Gerçek-zamanlı PCR analizinde kullanılan bu setlere ait diziler ve UPL numaraları Tablo 2 'de verildi.

**Tablo 2.** TLR 1-11 ve ACTB,GAPDH mRNA ekspresyon analizlerinde kullanılan özgün primer dizilimleri (5' → 3') ve UPL numaraları

**TLR1;**  
F: GGCAAATCTAAGAGCATCCATTA  
R: TGAGGTGGGTATTCTTATTGCTG  
Probe no: #29 (04687612001)

**TLR2;**  
F: AGAGGACTCAGGAGCAGCG  
R: TCAAGATCCAGAAGAGCCAAA  
Probe no: #80 (04689038001)

**TLR3;**  
F:CTTGTCATCAAATCCACTTAAAGA  
GT  
R: GAGGACGAATAACTTGCCAATC  
Probe no: #80 (04689038001)

**TLR4;**  
F: AATGCCAGGATGATGCCTCT  
R: TGATCCATGCATTGGTAGGTAA  
Probe no: #95 (04692128001)

**TLR5;**  
F: GACCCAGTATGCTCGCTTG  
R: CTGAGGTTGGGCAGGTTTC  
Probe no: #162 (04694490001)

**TLR6;**  
F: GCTTTTTTCAGAGTATTTTCGGAGA  
R: CGATGGGTTCTCTGTCTTGG  
Probe no: #110 (04692306001)

**TLR7;**  
F: TCCTGGTCTATCTCAAGCTCTGT  
R:AAAACTTTGTCTCTTCAATGTCCA  
Probe no: #22 (04686969001)

**TLR8;**  
F:CAAGCTATTGAAAGAGAACCTTC  
CA  
R: AGTTCCCTTTGAGGAAGACTGC  
Probe no: #82 (04689054001)

**TLR9;**  
F: GGAACATCATTCTCTGCTGCC  
R: GCCAGCATTGCAGCCTGTA  
Probe no: #110 (04692306001)

**TLR10;**  
F:CCTGCGATAACAATTCTACTGACT  
G  
R: GAGATACCAGGGCAGATCAAAG  
Probe no: #71 (04688945001)

**TLR11;**  
F:GGCTATGGGTGATGAAAGAGAA  
C  
R:AGGAGAACAGAGTGGAACAGAT  
GT  
Probe no: #77 (04689003001)

**ACTB;**  
F: CCCAGATCATGTTTGAGACCT  
R: AGGCATACAGGGACAACACA  
Probe no: #158 (04694457001)

**GAPDH**  
F: ATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC  
R: GGTCATGAAGGGGTCGTT  
Probe no: #145 (04694317001)

TLR 1-11 genlerinin mRNA düzeyinde relatif ekspresyonlarını analiz etmek için, her bir hedef ve referans genler için optimize edilen gerçek zamanlı PCR karışımı ve protokolü uygulandı (Tablo 3 ve Tablo 4).

**Toplam hacim =10 µL**

<b>Tek reaksiyon (hacim)</b>	<b>Bileşenler</b>
<b>1,5 µl</b>	Su, PCR-grade ( Roche FastStart ile birlikte sağlanmaktadır)
<b>0,5 µl</b>	Probe(UPL)
<b>1 µl</b>	<b>Forward Primer(F)(ara stok 10 µM)</b>
<b>1 µl</b>	<b>Reverse Primer(R)(ara stok 10 µM)</b>
<b>5 µl</b>	Enzim Karışımı (2x) (Roche FastStart Essential Probes Master)
<b>1 µl</b>	Örnek cDNA

**Tablo 3.** TLR1-11 ve ACTB ,GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan reaksiyon karışımı

Optimize edilen protokollerle örneklerin gerçek-zamanlı PCR aşamaları tamamlandı ve “relatif kantitatif” olarak örneklerin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu amaçla, her bir örneğin hedef gene ait mRNA ekspresyon düzeyi, aynı örneğin referans gen olan ACTB ve GAPDH ekspresyon düzeyi gerçek-zamanlı PCR sisteminde varolan yazılım programı (LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılım Programı) ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak hesaplandı.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu tanım olarak fold change ya da kat değişim metodu olarak da bilinir. Bu istatistiksel yöntemde de hata payı olarak aynı şekilde diğer bilimsel çalışmalarda kabul gören %5 değeri verildi.

$$\text{Kat Değişim Hesaplaması} = \text{Olgu Normalize Değeri} / \text{Kontrol Normalize}$$

	(1) Denaturasyon	(2) Amplifikasyon			(3) Soğutma
Parametre					
Analiz Modu	Yok	Kantitasyon modu			Yok
Döngü	1	45			1
Hedef [°C]	95	95	60	72	40
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	0:00:10	00:00:30	00:00:05	00:00:30
Kazanım Modu	Yok	yok	yok	Tek	yok

**Tablo 4.** TLR1-10 ve ACTB ,GAPDH genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını belirlemek amacı ile uygulanan gerçek-zamanlı PCR protokolü .\*: *Gerçek-zamanlı PCR Protokolü; (1)Pre-inkübasyon: Enzim aktivasyonu ve kalıp cDNA'nın denatürasyonu, (2)Amplifikasyon: Hedef bölgenin primerler yardımı ile çoğaltılması ve özgün prob lar yardımı ile ürünün belirlenmesi,(3) Soğutma: Sistemde yer alan rotorun soğutulması basamaklarını içermektedir.*

#### **İstatiksel Analiz**

24 saatlik idradaki okzal atılımı , böbrek dokularındaki enflamasyonun varlığı ve böbrek dokularındaki kalsiyum okzal at kristallerinin varlığı için istatiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanıldı. Bütün değerler ortalama  $\pm$  standart hata şeklinde verildi. İkili grupların karşılaştırılması için Ki-Kare testi kullanıldı. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  değeri istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.TLR ekspresyonunun istatiksel varlığı ise yukarıda belirtildiği gibi gerçek-zamanlı PCR sisteminde varolan yazılım programı (LightCycler Relatif Kantitasyon Yazılım Programı) ile  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu kullanılarak hesaplandı.

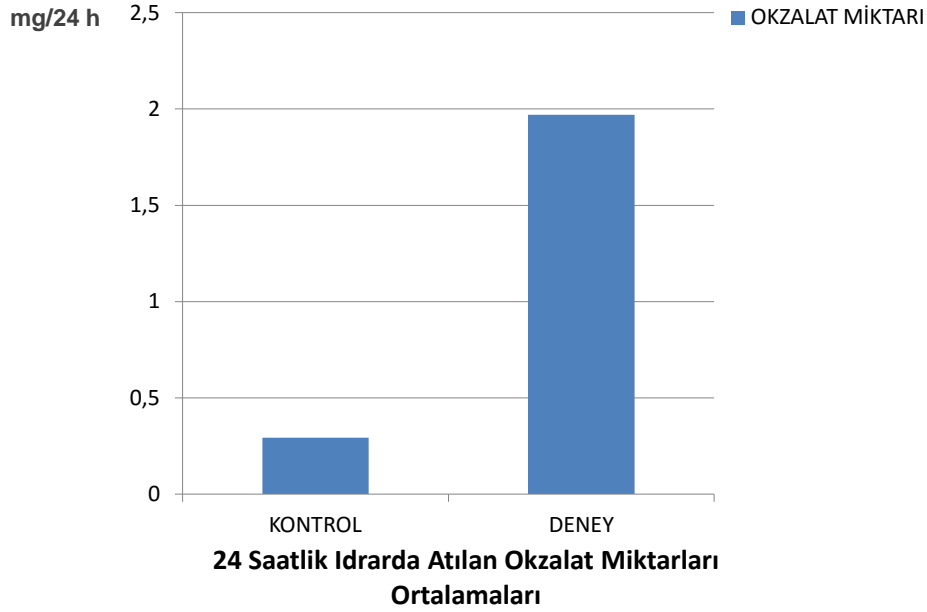
## BULGULAR

Deney ve kontrol olarak 2 gruba ayrılan erişkin ratlardaki yedek olarak hiperokzalüri grubunda bulunan 3 adet erişkin rat bize deneyin daha kontrollü ve sağlıklı olmasında fayda sağladı. Deneyde ratlar 16 hafta süreyle takip edilirken 6. ve 12. ve 16. haftalarda yedek ratlar üzerinden hiperokzalürinin şiddeti ve ratların böbreklerinde taş oluşup oluşmadığı kontrol edildi. 6. hafta sonunda yapılan ölçümlerde (tam idrar tetkiki,dijital idrar mikroskopisi,24 saatlik idrarda okzal atımı) hiperokzalüri grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.Yedek olarak kullanılan hiperokzalüri grubundan ratlardan birine bilateral nefrektomi yapıldı.Böbrek dokusu histopatolojik olarak incelendi.Ancak böbrek dokularında kalsiyum okzal at kristallerine ve enflamasyona rastlanılmadı. 12. haftada aynı şekilde ölçümler yapıldı. 12. hafta sonunda yapılan ölçümlerde deney grubunda kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak hem idrar mikroskopisinde hemde 24 saatlik idrardaki okzal atılımı arasından anlamlı fark saptandı. Yedek ratlardan birine bilateral nefrektomi yapılarak böbrek dokusu histopatolojik olarak incelendi.Böbrek dokusunda kalsiyum okzal at kristallerinin oluştuğu ancak enflamasyonun yeterli olmadığı saptandı.Ratlar 4 hafta daha deney ve kontrol grubuna uygun şekilde beslendi.16. hafta sonunda deney ve kontrol grubu ratlarda yapılan ölçümlerde gerek idrar mikroskopileri gerek 24 saatlik idrardaki okzal at miktarları karşılaştırıldı.Tablolarda da gösterildiği gibi deney grubu 24 saatlik okzal atılımı ortalama 1,91 mg/24 h iken kontrol grubunun ortalama değeri 0,12 mg/24 h olarak görüldü (Tablo 5 ve Tablo 6) ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.( $p=0,003<0,05$ ) (Tablo 7)Yedek olarak kullanılan ratların üçüncüsüne de bilateral nefrektomi yapıldı.Nefrektomi spesmenleri histopatolojik olarak incelendi. Mikroskopik olarak kalsiyum okzal at kristalleri ve yeterli enflamasyon oluştuğu görüldü.

	<b>N</b>	<b>Ortalama ±SS</b>	<b>Median</b>	<b>Min-Max</b>
<b>KONTROL</b>	10	0,29±0,35	0,12	0,01-0,92
<b>DENEY</b>	10	1,91±1,44	1,56	0,06-4,28

**Tablo 5.** Okzal at düzeyleri ortalamaları





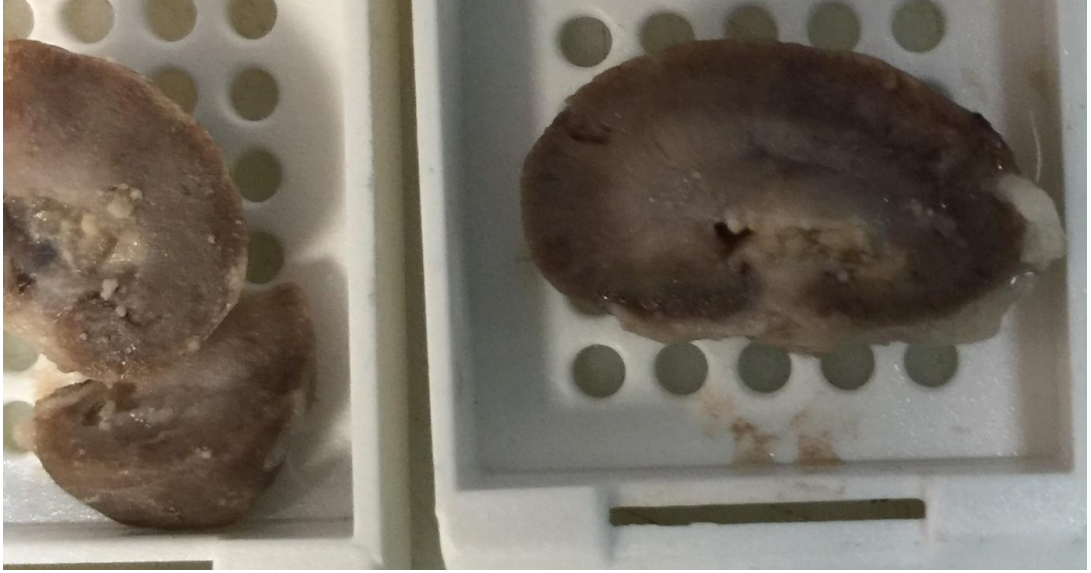
**Tablo 6.** 24 saatlik idrarlardaki okzalat düzeyleri arasındaki farkı gösteren tablo

	KONTROL	DENEY	P
<b>OKZALAT DÜZEYİ ORTALAMALARI</b>	0,29±0,35	1,91±1,44	0,003

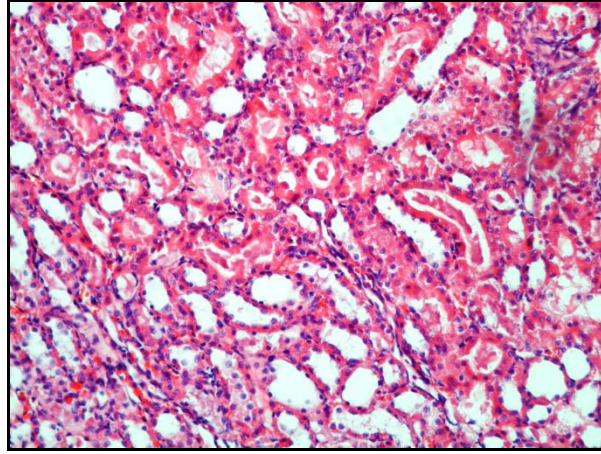
**Tablo 7.** Okzalat düzeyi ortalamaları ve p değeri

Daha sonra kalan tüm kontrol grubu (10 adet) ve tüm deney grubu (10 adet) ratlara bilateral nefrektomi yapılarak histopatolojik olarak incelendi. Kontrol grubu ratların nefrektomi spesmenleri makroskopik ve mikroskopik olarak normal bulunurken ,deney grubundaki ratların böbreklerinde makroskopik olarak önemli bir kısmında böbrek taşları görüldü. Bunlara ek olarak bir kaç adet nefrektomi spesmeninde pelvisi dolduran taşlara rastlanıldı (Resim 1). Histopatolojik

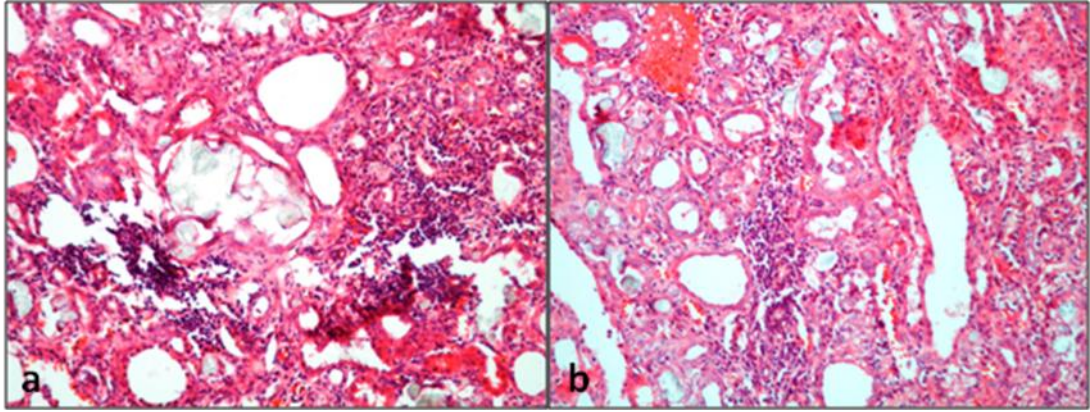
incelemede, kalsiyum okzalit kristali varlığı ve enflamasyon dereceleri var veya yok olarak derecelendirilginde, kontrol grubu böbrek dokularının hiçbirinde kalsiyum okzalit kristali ve enflamasyon izlenmedi (Resim 2). Buna karşın deney grubunda sağ böbrek dokularının (toplam 10 adet) 7'sinde kalsiyum okzalit kristallerine rastlandı ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ( $p=0,003<0,05$ ). Deney grubunda sağ böbrek doku örneklerinde kalsiyum okzalit kristali rastlananların hepsinde (7 adet), enflamasyon varlığı da görüldü. (Resim 3a). Ayrıca kalan sağ böbrek dokusu örneklerinin birisinde de mikroskopik olarak kalsiyum okzalit tespit edilmemesine rağmen, yeterli enflamasyonun oluştuğu görüldü. Toplam 10 adet deney grubu sağ böbrek doku örneklerinin 8'inde enflamasyon tespit edildi ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ( $p=0,001<0,05$ ). Deney grubu sol böbrek doku örneklerinin (toplam 10 adet) 7'sinde kalsiyum okzalit kristali görüldü ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ( $p=0,011<0,05$ ). Deney grubu sol böbrek doku örneklerinde kalsiyum okzalit kristali görülenlerin 7'sinde de enflamasyona rastlanıldı (Resim 3b). Kalan doku örneklerinde (3 adet) enflamasyona rastlanılmadı ve deney grubu sol böbrek doku örneklerinde enflamasyon, kontrol grubuna göre yine istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ( $p=0,003<0,05$ ).



**Resim 1.** Nefrektomi spesmenlerinin makroskopik görünümü ve böbrek taşları.



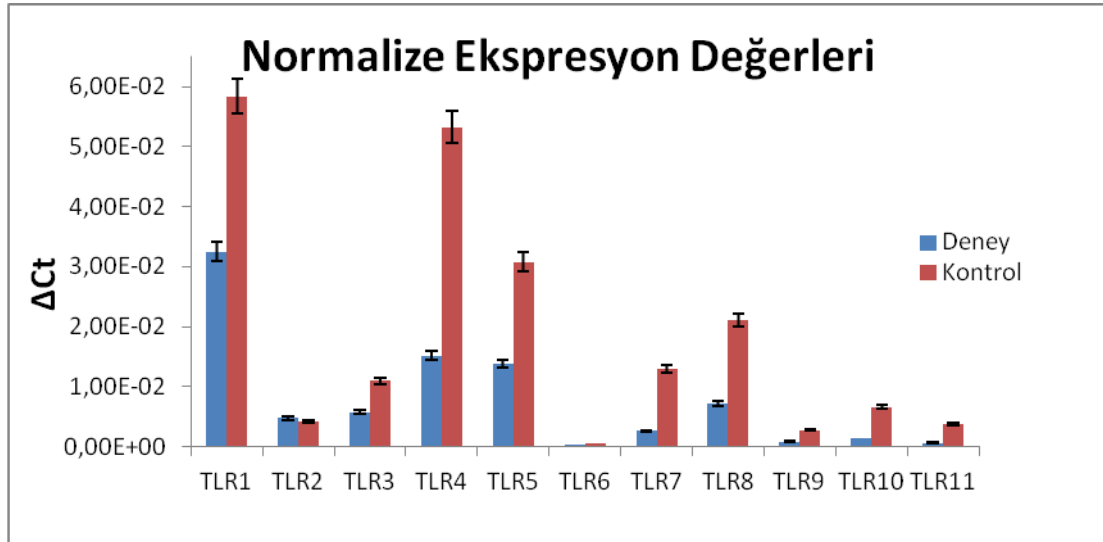
**Resim 2.** Kontrol grubu böbrek dokusunda kalsiyum okzalat kristali ve enflamasyon (H&E, 200).



**Resim 3.** Deney grubu sağ böbrek dokusunda (a) ve sol böbrek dokusunda (b) kalsiyum okzalat kristali ve enflamasyon (H&E, x200).

Kalsiyum okzalat kristalleri oluşumu ve enflamasyon varlığı gösterildikten sonra sağ böbrek doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu sonrası c-DNA sentezi yapıldı. Daha sonra gerçek zamanlı PCR işlemine geçildi. Bu aşamada *TLR* genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri *ACTB* ( $\beta$ -aktin) ve *GAPDH* (referans genler) genleri düzeyine göre relatif olarak belirlendi.

Her bir gen için bir gruptaki her bir örnek tek tek  $\Delta$ Ct değeri hesaplandı sonrasında toplanıp ortalaması alındı. Bu ortalama o grubun normalize ekspresyon değeri olarak kabul edildi (Tablo 8). Yani herbir örneğin target gen ekspresyonu referans gene göre normalize edildi .



**Tablo 8.** Genleri deney ve kontrol grubunun normalize ekspresyon değerleri .(Hata payı % 5 olarak belirlendi)

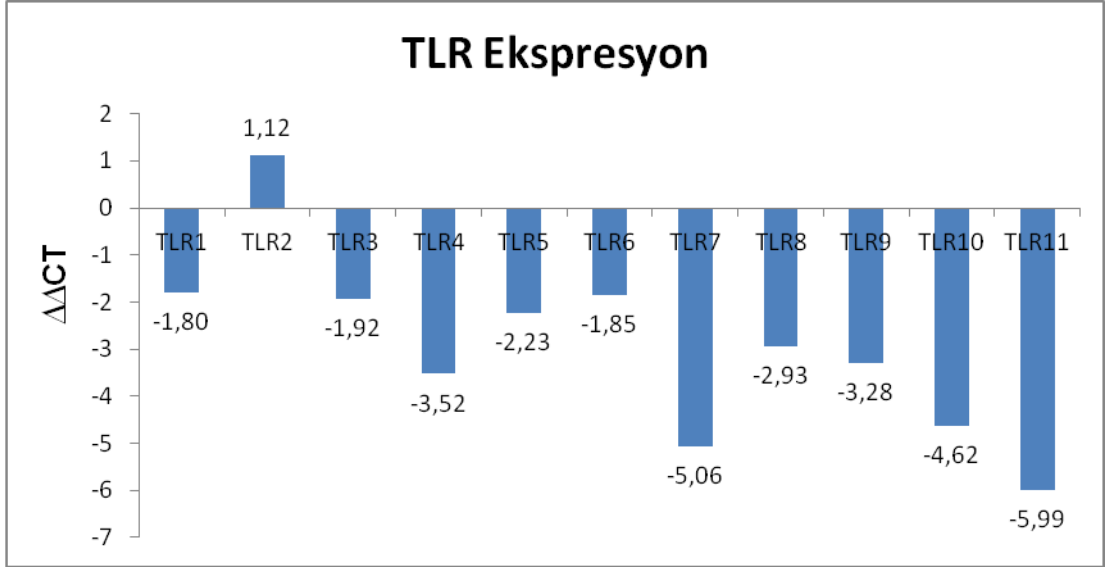
Normalize ekspresyon değerleri belirlendikten sonra 2 grup arasındaki ekspresyon farkı  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (fold change ) yöntemine göre hesaplandı. (Tablo 9)

GEN	Deney(ΔCt Normalize ekspresyon değerleri)	Kontrol(ΔCt normalize ekspresyon değerleri)	Fold Change(ΔΔCt)
			Deney vs Kontrol
TLR1	0,0324825	0,058355556	0,56
TLR2	0,004714	0,004216	1,12
TLR3	0,005716	0,010989075	0,52
TLR4	0,015108571	0,053233333	0,28
TLR5	0,013817778	0,030807571	0,45
TLR6	0,0002886	0,000534333	0,54
TLR7	0,002578667	0,013045	0,20
TLR8	0,00717	0,021038333	0,34
TLR9	0,00083858	0,002753857	0,30
TLR10	0,001427	0,006591571	0,22
TLR11	0,0006316	0,003784167	0,17

**Tablo 9.** Fold change yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar.

Daha önce gereç ve yöntem kısmında belirtilen metodlar izlenerek fold change ile elde edilen sonuçlar değerlendirildi. 1 den büyük değerler artış 0 ile 1 arasındakiler azalma olarak belirlendi. 2 den büyük değerler istatistiksel olarak anlamlı artış olarak kabul edildi. 0 ile 1 değeri arasındakiler ise eksi ile çarpıldı. 1

sayısı çıkan sonuca bölündü. -2 ve altındakiler istatistiksel anlamlı azalma olarak kabul edildi (Tablo 10).



**Tablo 10.** TLR ekspresyon profillerini gösteren tablo

Tablolardan da anlaşılacağı gibi 1,12 sonuç değeriyle sadece TLR2 de artış gözlemlenmiş olup bu değer +2 nin altında olduğundan istatistiksel olarak anlamlı artma kabul edilmedi. Diğer TLR alt tiplerinin ise hepsinde azalma meydana gelmiş olup TLR 1- 3 - 6 da -2 nin altında olmadığından istatistiksel olarak anlamlı azalma kabul edilmedi. Geriye kalan TLR 4-5-7-8-9-10-11 de istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. En belirgin azalma -5,99 ile TLR11 de ,daha sonra ise -5,09 ile TLR7 de görüldü.

## TARTIŞMA

Son yıllarda üriner sistem taş hastalığı ve böbrek dokusundaki gen - reseptör ekspresyonları ile ilgili literatürde yapılmış çalışmalar önem kazanmıştır. Enflamasyonda rol alan gen-reseptör ekspresyonları ile enflamasyon dışı gen-reseptör ekspresyonları hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Üriner sistem taşları ile literatürdeki enflamasyon bazlı çalışmalarda reseptör ekspresyonları ,proinflamatuvar sitokinlerin rolü ,hormonların aktivasyonu gibi çalışmalar mevcuttur. 2005 yılında Huang ve arkadaşları insanlarda renal epitel hücrelerinde okzalat , IL-6 ekspresyonu ve sonrasında böbrek taşı oluşumu ilişkileri açısından bir çalışma yapmıştır. Çalışmada okzalatın renal epitel hücreleride doğrudan IL-6 sekresyonunu ve ekspresyonunu arttığını, renal epitel hücrelerinde artmış olan IL-6 sekresyon ve ekspresyonu hiperokzalurik böbrek taşı oluşması açısından kritik öneme sahip olduğu belirtilmiştir (89).

Shrikan ve arkadaşlarının 2013 te yaptığı çalışmada CaOx kristallerinin dendritik hücrelerde NLRP3/ASC/caspase-1 aracılığıyla IL-1 $\beta$  bağımlı doğal immunitiyi tetiklediğini belirtmiştir.Bu yüzden intrarenal antijen sunucu hücreler renal taş hastalığında IL-1 bağımlı inflamasyon ve böbrek hasarını arttırmaktadır. Ek olarak, CaOx kristalleri, TEC'lere zarar vererek ve NLRP3 agonisti ATP salınımına neden olarak, indirekt yoldan NLRP3'ü aktive etmektedir. Anakina ile IL-1 $\beta$  blokajı, CaOX böbrek hasarını önlemiş olup, kristal nefropatilerde böbrek hasarını sınırlamada yeni tedavi yaklaşımı olabileceğinden bahsetmişlerdir (90). Yine Lai KC ve arkadaşları 2010 yılında IL-18 gen polimorfizmi ve ürolityazis arasındaki ilişkiyi incelemiştir. Çalışmaya göre IL- 18 + 105 A / C polimorfizmlerinin ürolityazis gelişiminde rol oynayabileceği belirtilmiştir (91). 2009 yılında Wei CC ve arkadaşlarının fare böbrek hücrelerinde CaOx ve böbrek taşı oluşumunda renal kalsiyum depolanması ve mL20R1a (mouse interleukin-20 receptor 1a ) ile ilişkisini araştırmışlardır.mL20R1a'nın CaOx maruziyeti bulunan farelerin renal epitelyal hücrelerinde kalsiyum depolanması için agreve edici bir faktör olduğunu belirtmişlerdir (92).

Kramer G. ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada ise insan böbreklerinde CaOx formundaki böbrek taşları ve renal tübüler epitelyal hücrelerideki anti-CD75 in aşırı ekspresyonunu araştırılmıştır. Sonuç olarak İnsan böbreklerinde CD75 ekspresyonunun primer olarak distal tubullerde ve toplayıcı kanallarda olduğunu ve artmış CD75 ekspresyonunun CaOx taşı oluşmasının nedeni ya da sonucu mu olduğunun belirlenmesi için başka çalışmalara ihtiyaç

olduğunu belirtmişlerdir (93). Mittal ve arkadaşları 2007 yılında interlökin -1 reseptör antagonisti geni ve pediyatrik nefrolityazis arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. IL1RN (IL1 reseptör antagonisti geni) ve haplotipinin pediyatrik nefrolityazise yatkınlık için etkili bir belirteç olabileceğini belirtmişlerdir. (94).

2005 yılında Yao JJ ve arkadaşları genetik hiperkalsiürik rat modellerinde kalsiyum reseptörler ve reseptör proteinini araştırmıştır. Genetik olarak hiperkalsiürik sıçan modellerinde yüksek derecedeki CaR ekspresyonu ve CaR protein miktarının börek taşı oluşumundaki katkısının olabileceğini öne sürmüşlerdir (95). Li JY ve arkadaşları ise 2010 yılında böbrek taşı , androjen ve androjen reseptörleri ile ilgili çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucu androjen ve androjen reseptör aksının böbrek taşı oluşumunda önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (96). Androjen reseptörü ve böbrek taşı arasındaki ilişkiyi inceleyen başka bir çalışmayı da Liang Liang ve arkadaşları yapmışlardır. Çalışmada elde edilen bulgulardan ilk olarak AR'nin, CaOx kristal formasyonunu 2 mekanizma üzerinden ortaya çıkmasında kilit öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Teorik olarak bu bulgular, hastalığı baskılamak için yeni ilaçlar geliştirilebilmek için AR'yi potansiyel yeni bir hedef olarak sunduğu kanısına varılmıştır. Sonuç olarak mevcut çalışmanın ilk kez güçlendirilmiş AR sinyalizasyonunun hepatositelerde okzalat biyosentezini artırarak ve oksidatif stresle oluşturulan böbrek tübüler hücre hasarı ile CaOx kristal oluşumunun erken basamaklarında promotör rol oynadığını göstermişlerdir. AR'yi hedef alarak CaOx kristali ilişkili böbrek taşı hastalığı ile mücadele etmek için potansiyel bir tedavi geliştirilebilir olduğunu da belirtmişlerdir (97).

2011 yılında Jules Hoffmann, Bruce Beutler tarafından TLR'lerin keşfi doğal immünitinin mekanizmasını açıkladıkları için Nobel ödülü kazanmışlardır. Son yıllardaki çalışmalar, TLR'lerin immun sistem hücrelerine ek olarak hem normal epitel hücrelerde hem de tümör hücrelerinde eksprese olduklarını göstermektedir (83). Örneğin normal epitel hücrelerinde TLR ekspresyonu incelendiğinde ; TLR1-9'un barsak epitel hücrelerinde, TLR2, TLR4, TLR5 ve TLR9'un mide epitel hücrelerinde ve TLR2 ile TLR5'in over yüzey epitel hücrelerinde ekspresyonları verilebilir (98).

Kronik inflamatuvar hastalıklarda TLR sinyal yoluyla kanser gelişiminde katkısı olduğu bildirilmiştir (99). Yapılan bazı çalışmalarda farklı kanser hücre tiplerinde TLR ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmiştir. Enflamasyonla bağlantılı kanser tiplerinde, TLR veya TLR adaptör molekülleri eksikliğinde tümör sayısının, büyüklüğünün ve displazinin azaldığı gözlenmiştir (100). Enflamatuvar hücrelerden salınan çeşitli endojen TLR ligandları, prekanseröz hücrelerdeki TLR sinyal yolunu aktive ederek sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, anjiogenik faktörlerin ve

ekstrasellüler matriksi parçalayan proteazların ortaya çıkmasını sağlar (101). Böylece kanser gelişimini ve kanserin ilerlemesini destekleyen mikroçevresel şartları meydana getirir. Hem onkogen hem de tümör süpresörlerini posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden mikroRNA'lar ile TLR arasındaki ilişki de kanser oluşumunda önemlidir (102).

Li Shao ve arkadaşları 2015 yılında astımlı çocuklarda TLR2 ekspresyonu ile ilgili çalışma yapmıştır. Bu çalışmada *mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonu olan (grup 1) ve olmayan (grup 2) ayrıca astımı olmayan normal kontrol grubu (grup 3) karşılaştırmıştır. TLR2 ekspresyonunun grup 1 ve 2 de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlemlenmiş olup bu artışın grup 1 de daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir (103).

İnfluenza virüs enfeksiyonlarında TLR10 ekspresyonunu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur. 2014 yılında Lee SM ve arkadaşları farelerde yaptıkları deneylerde İnfluenza virüs enfeksiyonlarında TLR10 un arttığını ve immun sisteminin aktivasyonunda ve enflamasyonda rol oynadığını öne sürmüşlerdir (104). Türkiye'de 2014 yılında farelerin beyin dokularında *Toxoplasma gondii* enfeksiyonu sonrası TLR ekspresyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada Atmaca HT. ve arkadaşları farelerin beyin dokularındaki *T. Gondii* enfeksiyonu sonrasında astrosit, mikrogliya, makrofaj ve nöron hücrelerinde TLR11 in anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir (105).

2015 yılında SLE ve periodontal hastalıklarda ki TLR ilişkisini gösteren başka bir çalışma yapılmıştır. Marques ve arkadaşları, SLE ve periodontal hastalıklarda TLR2 ve TLR4' ün arttığını ortaya koymuşlardır (106).

Düzenli egzersiz ve sedanter yaşayan kişilerin periferik kan örneklerinde proinflamatuvar sitokinlerin ve TLR ekspresyonunu araştıran bir çalışma dikkat çekici sonuçlar ortaya çıkmıştır. 2015 yılında Zhen Q ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada düzenli egzersiz ve sedanter yaşayan insanların periferik kan örneklerinde proinflamatuvar sitokinler açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Buna rağmen TLR2, TLR7 VE MyD88 düzenli egzersiz yapan grupta sedanter yaşayan gruba göre anlamlı derecede artışı gözlemlenmiştir (107).

Feng Y. Ve arkadaşları da 2011 yılında insanlarda iskemik hasara maruz kalan kardiyak hastaların kardiyak miyosit hücrelerinde ekstrasellüler RNA'nın arttığını ve bu artışa bağlı olarak TLR7, MyD88 in arttığını göstermişlerdir (108).

2014 yılında Oostin ve arkadaşları da TLR-10 un antiinflamatuvar olduğunu iddaa etmişlerdir. Farelerin periferik kanlarında monosit stimülasyonu sonrası TLR10 blokajı yaparak enflamasyonun arttığını öne sürmüşlerdir (109).



Over kanserli hastalarda yapılan bir çalışmada ise , TLR ekspresyon düzeyleri açısından kanserli doku ile normal sağlıklı doku karşılaştırılmış ve kanserli dokularda TLR2, TLR3 ve TLR4'un mRNA düzeyinde ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir (110). 2010 yılında Gonzales ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada ise meme kanseri ve TLR ilişkisi arasında ekspresyonlar araştırılmıştır. Meme kanserli dokularda (n=74) TLR3, TLR4 ve TLR9'un mRNA düzeyinde ekspresyonlarının arttığını ve aynı zamanda bu artışın rekürrens gösteren tümörlerde göstermeyen tümörlere oranla daha yüksek olduğunu belirlemiştir (111). Meme kanserlerini ilgilendiren 2014 yılında yayınlanan başka bir çalışmada, hem meme kanser hücre hatlarında hem de klinik meme kanseri doku örneklerinde TLR9 mRNA ve proteininin ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sentetik TLR9 ligantlarının in vitro kanser hücre invazyonunu uyardıkları rapor edilmiştir. Araştırmacılar, bu verilere dayanarak TLR9 ekspresyonunun tümör immunofenotipinde etkili olabileceğini ve kemoterapinin immunojenik etkilerine katkı sağlayabileceğini belirtmişlerdir (112). 2012 de yapılan çalışmada ise Samara ve arkadaşları tarafından küçük hücre dışı akciğer kanseri hastalarının bronkoalveolar lavaj sıvılarında TLR2, TLR7 ve TLR9 mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (113).

B hücre prekürsör akut lenfoblastik lösemi (BCPALL) hücrelerinde TLR1-9 artışı gözlenirken, TLR3-5 ekspresyonları gözlenmemiştir. Primer myeloma hücrelerinde ise TLR1, 7 ve 9 un artışı bildirilmiştir (114).

Prostat kanserli 133 hastada tümörlü doku örneklerinde TLR'lerin mRNA düzeyindeki ekspresyonlarıyla ilgili bir çalışmada , rekürrens tümörlerde TLR3, TLR4 ve TLR9 ekspresyonunun anlamlı derecede arttıkları ve aynı zamanda bu artış düzeylerinin yüksek olasılıkla biyokimyasal rekürrensle de ilişkili olduğu rapor edilmiştir (115). Finlandiya'da 1996-2003 yılları arasında radikal prostatektomi yapılan 186 prostat kanserli olgunun spesmenlerinde TLR9 ekspresyon düzeyleri analiz edilmiş ve TLR9'un rekürrensle anlamlı derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (116).

2015 yılında Proença MA. ve arkadaşları kolorektal kanseri olan ve olmayan sağlıklı hastalarda TLR2 yi araştırmıştır. Kolorektal kanserli dokularda sağlıklı dokulara oranla anlamlı olarak TLR2 artışı gözlemlenmiştir (117).

Tümör hücrelerinin sağ kalımında TLR7 ekspresyonunun önemli bir etkiye sahip olduğu yani yüksek ekspresyon düzeyinin tüm sağ kalıma kötü yönde etki ettiği belirlendiği bir çalışmada 2014 te yapılmıştır. Ek olarak bu çalışmada ilk kez neoadjuvan kemoterapisi alan hastalarda TLR7 ekspresyon artışının tedaviye yanıtı

da etkilediği ve kemoterapiye dirençte bir belirteç(marker) olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (118). 2004 te Shimizu ve arkadaşlarının mesane kanseri hücrelerinde yaptıkları başka bir çalışmada, TLR2 ve TLR4 ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir (119).

Çalışmalara bakıldığında enflamasyon, enfeksiyon ,malignensi ...vb gibi immun sistemi aktive eden durumlarda TLR ekspresyonları genelde artma yönündedir.Öte yandan benzer durumlarda artma kadar fazla olmasada TLR ekspresyonunun azalma şeklinde sonuçlandığı çalışmalarda vardır.Landais ve arkadaşlarının 2015 te yaptıkları çalışmada Human Cytomegalovirus (HCMV) ün insan hücrelerindeki TLR2 nin ekspresyonunu azalttığını öne sürmüşlerdir.Bu çalışmada invitro insan doku kültürlerindeki HCMV enfeksiyonu oluşturulmuş ilk 24-48 saate TLR2 ekspresyonu artmış ancak daha sonra azalmıştır.Net sonuç ise azalma olarak görülmüştür (120).

Oral liken planuslu insanların dokularında TLR ekspresyonunu araştıran başka bir çalışmada Oral liken planuslu ve normal sağlıklı oral dokusu olanlar karşılaştırılmıştır.2015 te Sinon ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada TLR3 ekspresyonunun anlamlı derecede oral liken planuslu hastalarda azalma olduğu gözlemlenmiştir. TLR aracılı yolda rol alan protein genlerinden MyD88 ve TIRAP ın da azaldığı görülmüştür. Ayrıca bir stress proteini olan HMGB1 in ve ısı şok proteini D1 inde benzer şekilde azalma görülmüştür.Buna karşın TLR4 ün anlamlı derecede artışı çalışmada gözlemlenmiştir (121).

Yine TLR azalmasını gösteren bir çalışma da Jakkampudi A ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılmıştır.Bu çalışmada Hepatit -B li hastaları akut karaciğer yetmezliği olanlar,inaktif taşıyıcılar,sirozlu olanlar ve HCC'li olanlar diye 4 gruba ayrılmıştır.Bu grupların karaciğer doku hücreleri örneklerinde TLR ekspresyonu araştırılmıştır.İnaktif taşıyıcı olan HBV enfeksiyonlu hücrelerde anlamlı olarak TLR2 ve TLR4 azalışı görülmüştür (122).

2013 yılında yapılan bir çalışmada ise Thompson ve arkadaşları intrauterin rat embriolarında deneysel hipoksi sonrası miyoblastlarda TLR ekspresyonu araştırmışlardır.Çalışma sonucunda hipoksinin rat miyoblastlarında TLR4 ü azalttığı görülmüştür (123).

Dolaşımda tümör hücre (CTC)'lerine sahip metastatik meme, kolorektal ve prostat kanserli olguların doğal immun sistem fonksiyonlarını karşılaştıran bir çalışmada, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında TLR2 ve TLR4 ekspresyonlarının tüm metastatik olgularda anlamlı derece azaldığı belirlenmiştir. Çalışmanın ilgi çekici başka bir bulgusu da, her bir metastatik grupta CTC sayısı arttıkça her iki reseptörün ekspresyon düzeyinin azalmasıdır (124). Prostat kanserli hastaların

tümörlü dokularında Gleason skoru ve TLR ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki 2009 yılında bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada Gleason skoru yüksek olgularda TLR4 ekspresyonunun anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir (125). Bundan başka metastatik meme kanserli hastaların CTC'lere sahip olan ve olmayan dendritik hücreler ve sitotoksik T lenfosit (Tc)'lerindeki TLR ekspresyonlarını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, CTC'lere sahip meme kanserli hastaların dendritik hücrelerinde TLR3 ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığı, Tc 'lerde ise TLR2 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (126).

Hiperokzalüri sonucu oluşan CaOX kristallerinin oluşturduğu enflamasyon ve TLR ekspresyonları arasındaki ilişkiyle ilgili literatürde yayınlanmış çalışma yoktur. CaP kristalleri ve TLR ekspresyonları ilişkileri ile ilgili ise deneysel araştırmalar mevcuttur (127). Ayrıca böbrek taşlarının böbrek dokuları üzerindeki inflamatuvar değişikliği incelenirken TLR lerin önemli olduğu da belirtilmiştir. TLR'lerin kristal oluşumunda rolü olabileceği, TLR 'lerin renal hücre geçirgenliğini arttırabileceği ve böbrek taşı olan hastalarda renal fibrozisi kolaylaştırabileceği hakkında çalışmalar da bulunmaktadır (127).

Bizim yaptığımız çalışmadaki sonuçlarda sadece TLR2 artışı olmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Diğer bütün TLR alt tiplerinde azalma meydana gelmiş olup TLR 1- 3 - 6 alt tipleri -2 nin altında olmadığından istatistiksel olarak anlamlı azalma kabul edilmedi. Geriye kalan TLR 4-5-7-8-9-10-11 de istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. Literatürdeki çalışmalara bakılacak olursa enfeksiyon, enflamasyon, malignite ...vb immun sistemi aktive eden durumlarda TLR ekspresyonları genelde artış şeklinde kendini göstermektedir. Bu gibi durumlarda TLR azalışı ile sonuçlanan çalışmalar ise artışa oranla göre daha azdır. Daha öncede belirtildiği gibi Wu ve arkadaşlarının 2007 yılında yabancı farelerde yaptığı çalışmada steril renal hasarla gelişen inflamasyona bağlı renal yetmezlikte TLR 2 ile TLR 4'ün iskemi/reperfüzyon hasarının gelişimine olan katkısı gösterilmiştir (87). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara dikkat edilecek olursa steril enflamasyonda TLR2 ve TLR4 artışından bahsetmektedir. Böbrek taşlarının renal parankim hücrelerinde enfeksiyondan bağımsız steril enflamasyon yaptığı bilindiğinden bizim çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasada TLR2 artışıyla sonuçlanmıştır. Bu yönden bizim çalışmamızda TLR2 nin steril enflamasyonda artış olduğunu istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar desteklemektedir.

Akıllara gelecek başka bir soruda 16 hafta boyunca etilen glikolle beslenen ratlarda etilen glikolün immün sistem üzerine negatif ya da baskılayıcı etkileri olup olmadığıdır. Kronik etilen glikol maruziyeti üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında

kronik etilen glikol maruziyetinin immün sistemde herhangi bir değişiklik yapmadığı bildirilmiştir (128), (129 ).

## SONUÇ

Bu çalışma rat böbreklerinde oluşturulan hiperokzalüri ve sonrasında renal parankim hücrelerindeki TLR ekspresyonu üzerine yapılan ilk çalışmadır. Rat böbreklerinde oluşturulan hiperokzalüri sonrasında yeterli enflamasyon olduğu da patolojik olarak gösterildikten sonra gerçek zamanlı PCR yöntemi ile TLR ekspresyonu araştırıldı. Daha önce de belirtildiği gibi literatürdeki çalışmalara bakılacak olursa enfeksiyon, enflamasyon, malignite ...vb immun sistemi aktive eden durumlarda TLR ekspresyonları genelde artış şeklinde kendini göstermektedir. Bu gibi durumlarda TLR azalması ile sonuçlanan çalışmalar ise TLR artışına göre daha azdır. Bizim yaptığımız çalışmadaki sonuçlarda sadece TLR2 de artış olmuş fakat istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Diğer bütün TLR alt tiplerinde azalma meydana gelmiş olup TLR 1- 3 - 6 alt tipleri -2 nin altında olmadığından istatistiksel olarak anlamlı azalma kabul edilmemiştir. Geriye kalan TLR 4-5-7-8-9-10-11 de istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edildi. Literatürde TLR2 artışı steril enflamasyonun yanı sıra bazı enfeksiyon ve malignensi durumlarında da görülmüştür. Çalışmalarda TLR tiplerinin azalması ise artma kadar sık görülmemiştir. Özellikle viral bazı enfeksiyon durumlarında ve metastatik malignensilerde TLR ekspresyonlarının azalma şeklinde olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bazı enfeksiyon durumlarında da TLR ekspresyonunun erken dönemde artış sonrasında ise azalış şeklinde sonuçlandığı bildirilmiştir.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda ki hiperokzalürik rat böbrek dokularında TLR ekspresyonlarında büyük oranda azalma şeklinde meydana gelmiştir. Önceki çalışmalara bakıldığında bizim çalışmamız ,erken dönemde TLR ekspresyon artışı olup geç dönemde TLR ekspresyon azalışıyla sonuçlanan çalışmalara örnek olabilir. Bunun için erken dönemde yani hiperokzalüri oluştuktan hemen sonra (taş oluşumunu beklemeden) TLR ekspresyon profillerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca bu çalışmanın renal parankim hücrelerinin steril enflamasyonu sonrası TLR2 ekspresyonunda artma ile sonuçlanan çalışmalara yardımcı olarak değerlendirilebileceği görüşüne de varılabilir.

## KAYNAKLAR

1. Stoller ML: Urinary stone disease; in Tanagho EA McAninch JW 17th edition Smith's general urology, McGraw Hill Medical, 2008.
2. Menon M, Resnick MI. Urinary Lithiasis: etiology, diagnosis, and medical management Campbell's Urology, Editor-in-chief: Patrick C. Walsh. Saunders, 2002, 8. Baskı, 96. Bölüm.
3. Abdullah INCI, Zuhail BISKIN. Toll-Like Reseptörler ve Protozoon Enfeksiyonlarındaki Roller Erciyes Üniv Vet Fak Derg 4(2) 121-128, 2007.
4. F. Dere Anatomi ders kitabı, I. Baskı Adana: kOullar Kitapevi, 1989; 655–668.
5. Odar İV. Anatomi ders kitabı. 7. Baskı, Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti. 1986; 230–277.
6. Yaman LS, Göğüs O, Müftüoğlu YZ, Küpeli S, Anafarta K, Şafak SMBedük Y, Arıkan N. Üroloji I. Baskı Ankara Güneş kitapevi Ltd. Şti. 1990; 1–21.
7. Sampaio FJB. Anatomic classification of the pelvicaliceal system. Urologic and radiologic Urology, Endourology, and implications. In Sampaio FJB, Uflacker R, eds. Renal Anatomy Applied to Interventional Radiology. New York:Thieme,1993, pp 1-6.
8. Campbell's Urology, Editor-in-chief: Patrick C. Walsh. Saunders, 2012, 10. Baskı, 45. Bölüm.
9. Kim: Prevalence. and HH, Jo MK, Kwak C, Park SK epidemiologic characteristics of urolithiasis in Seoul, Korea. Urology 2002; 59: 517-521.
10. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB: Family history and risk of kidney stones. J Am Soc Nephrol 1997; 8: 1568-1573.
11. Akıncı M, Esen T, Tellaloğlu S: Urinary stone disease in Turkey: an updated epidemiological study. Eur Urol 1991; 20: 200-203.
12. Rodgers AL: Effect of mineral water containing calcium and magnesium on calcium oxalate urolithiasis risk factors. Urol Int 1997; 58: 93-99
13. Randall A: The origin and growth of renal calculi. Ann Surg 1937; 105: 1009
14. Umekawa T, Iguchi M, Kurita T. The effect of ovteopontin immobilized collagen granules in the seed crystal method. Urol Res 2001;29:282-6.
15. Fasano JM, Khan SR. Intratubular crystallization of calcium oxalate In the presence of membrane vesicles: an in vitro study. Kidney hitcalcium nephrolithiasis: from the rare monogenic to the common polygenic forms Am J Kidney Dis 2004;44:963-86.
16. Kok DJ. Intratubular crystallization events. World J. Urol 1997;15:219- 28)
17. Finlayson B: Renal lithiasis in review. Urol Clin North Am 1974; 1: 181-212

- 18 . Nakagawa V, Ahmed M. Hall SL et al. Isolation from human calcium oxalate renal stones of nephrocalcin . a glycoprotein inhibitor of calcium oxalate crystal growth: evidence that nephrocalcin from patterns with calcium oxalate nephrolithiasis is deficient In gamma-carboxyglutamic add. J Clin Invest 1987;79:1782-7.
19. Asplin JR. DeCanello S. Nakagasva YN, Coe FL. Evidence that nephrocalcin and urine Inhibit nucleatkin of calcium oxalate monohydrate crystals. Am J Physiol 1991;261:F824-30
20. Hess B, Xakagawa Y. Parks III, Coe FI Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. Am J Physiol. 1991 Apr;260(4 Pt 2):F569-78.
21. H Shiraga, W Min, W J VanDusen, M D Clayman, D Miner, C H Terrell, J R Sherbotie, J W Foreman, C Przywiecki, E G Neilson .Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin: another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jan 1; 89(1): 426–430
22. Shimokawa N. and M. Yamaguchi (1993b) Expression of hepatic calcium-binding protein regucalcin mRNA is mediated through Ca calmodulin in nit liver. t'EBS Leu. 316: 79 84.
23. Asplin JR. Arsenault D. Parks JH, Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization. Kidney Int 1998,-53: 194-9.
24. Fan J, Chandhoke PS, Grampsas SA: Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. J Am Soc Nephrol 1999; 10: 376-380
- 25 . Taylor EN, Curhan GC: Diet and fluid prescription in stone disease. Kidney Int 2006;70:835-839.
26. Assimios DG, Holmes RP: Role of diet in the therapy of urolithiasis. Urol Clin North Am 2000; 27: 255- 268.
27. Pak CYC, Resnick MI: Medical therapy and new approaches to management of urolithiasis. Urol Clin North Am 2000; 27: 243-252.
28. Pak CY. Nicar M. Northernt C. The definition of the mechanism of hypercalciuria Is necessary for the treatment of recurrent stone formers. Contrlh Nephrol 1982;33:136-51.
29. Coe FL, Parks JH. Asplin JR. The pathogenesis and treatment of kidney stones. N Engl J Med 1992.327:1141-52.
30. Bushinsky DA1, Monk RD. Electrolyte quintet: Calcium. Lancet. 1998 Jul 25;352(9124):306-11.
31. Coe FL, Kavalach AG. Hypercalciuria and hyperuricosuria in patients with calcium nephrolithiasis. N Engl J Med. 1974 Dec 19;291(25):1344-50.

32. Menon M. Calcium oxalate renal lithiasis endocrinology and methabolism. In: Rajfer J. editor. Urologie endocrinology. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p. 386-407.
33. Pearle MS, Watamull I.M, Mullican MA. Sensitivity of noncontrast helical computerized tomography and plain film radiography compared to flexible nephroscopy for detecting residual fragments after percutaneous nephrostolithotomy. J Urol 1999;162:23-6.
34. Strauss AL, Coe FL, Deutsch I.. Parks III Factors that predict relapse of calcium nephrolithiasis during treatment: a prospective study. Am J Med 1982;72:17-24.
35. . Pak CYC, Oata M, Lawrence EC: The hypercalciurias. Causes, parathyroid function, and diagnostic criteria. J Clin Invest 1974; 54: 387- 400 .
36. Tefekli A, Esen T, Ziylan O, Erol B, Armagan A, Akıncı M: Metabolic risk factors in pediatric and adult calcium oxalate urinary stone formers: is there any difference? Urol Int 2003; 70: 273-277.
37. Coe FL: Hyperuricosuric calcium oxalate nephrolithiasis. Kidney Int 1978; 13:418-426.
38. Menon M, Mahle CJ. Urinary citrate excretion in patients witli renal calculi. I Urol 1983.129:1158-60.
39. Pak CY. Fuller C. Idiopathic hypocitraturic calcium-oxalate nephrolithiasis successfully treated with potassium citrate. Ann Intern Med 1986; 104:33-7.
40. Pak CY. Citrate and renal calculi: an update. Miner Electrolyte Merab 1994;20:371-7.
41. Levy FL, Adams-Huet B, Pak CY. Ambulatory evaluation of nephrolithiasis: an update of a 1980 protocol.Am J Med. 1995 Jan;98(1):50-9.
42. Sakhaee K, Xigatn S, Snell P. et al. Assessment of the pathogenetic role of physical exercise in renal stone formation. J Clin Endocrinol Metab1987;65:974-9.
- 43.Tiselius HG, Berg C, Fornander AM, Nilsson MA. Effects of citrate on the different phases of calcium oxalate crystallization.Scanning Microsc. 1993 Mar;7(1):381-9; discussion 389-90.
44. Preminger GM, Baker S: Hypomagnesiuric hypocitraturia. An apparent new entityfor calcium nephrolithiasis. J Lit Stone Dis 1989; 1: 22-25.
45. Faerber GJ, Pediatric urolithiasis. Curr Opin Urol. 2001 Jul;11(4):385-9.
46. Ciftcioğlu N, Bjorklund M, Kuorikoski K: Nanobacteria: an infection cause for kidney stone formation. Kidney Int 1999; 56: 1893-1898
47. Griffith DP, Osborne CA. Infection (urease) stones. Miner Electrolyte Metab 1987;13:278-85.
48. Asplln JR. Uric acidstones. Semin Nephrol 1996;16:412-24.



49. Pak CY, Peterson R, Sakhaee K, et al. Correction of hypocitraturia and prevention of stone formation by combined thiazide and potassium citrate therapy in thiazide-unresponsive hypercalciuric nephrolithiasis *Am J Med* 1985;79:284-8.
50. Pak CY, Poindexter JR, Adams-Huet B, Pearle MS. . *Am J Med*. 2003 Jul;115(1):26-32. Predictive value of kidney stone composition in the detection of metabolic abnormalities
51. Mulay SR, Evan A, Anders HJ. Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Mar;29(3):507-14. doi: 10.1093/ndt/gft248. Epub 2013 Oct 25.
52. Thongboonkerd V, Semangoen T, Sinchaikul S, et al. Proteomic analysis of calcium oxalate monohydrate crystal-induced cytotoxicity in distal renal tubular cells. *J Proteome Res* 2008;7:4689-4700.
53. Chaiyavit S, Thongboonkerd V. Changes in mitochondrial proteome of renal tubular cells induced by calcium oxalate monohydrate crystal adhesion and internalization are related to mitochondrial dysfunction. *J Proteome Res* 2012. April 27.
54. Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *J Clin Invest* 2013;123:236-246.
55. Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res* 1994;1:27-35.
56. Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR. Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics* 1996;32:486-8.
57. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-8.
58. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:271-96.
59. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998;161:1083-6.

60. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leucocytes: selective expression of TLR-3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004
61. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, et al. Toll-like receptor 4, but not Toll-like receptor 2 is a signalling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol* 2000; 165:5780-7
62. Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002; 30(Suppl):1-11.
63. Utahaisangsook S, Day NK, Bahna SL, Good R, Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88:253-65.
64. Werling D, Jungi TW, 2003. Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol.* 91: 1-12.
65. Takeda K, Akira S, 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 1:1-14.
66. Sieling PA, Modlin RL. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr Opin Microbiol* 2002, 5:70-5.
67. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13766-71.
68. Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, et al. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in antibacterial responses. *J Immunol* 2000; 165:7125-32.
69. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, et al. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002; 48: 1661-7
70. Agnese DM, Calvano JE, Hahm S, et al. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002; 186:1522-5.
71. Kawasaki K, Akashi S, Shimazu R, Yoshida T, Miyake K, Nishijima M. Mouse Toll-like receptor 4, MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Biol Chem* 2000; 275:2251-4.
72. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-61.
73. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor5. *Nature* 2001; 410:1099-103.
74. Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda S, 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology*, 13: 933-940.

75. Akira S, 2003. Mammalian Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*,15: 5-11.
76. Peng G, Guo Z, Kniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, Wang DY, Li Y, Wang HY, Wang RF,2005. Toll-like receptor 8 mediated reversal of CD4+ T regulatory cell function. *Science*, 309: 1380-1384.
77. . Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.
78. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA and Beutler B, 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.101(10): 3516-3521.
79. Ahmed A, Redmond P, Wang JH. Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. *Oncolimmunology* 2013; 2:2, e22945.
80. O'Neill LAJ. and Bowie A.G. The family of five: TIR domaincontaining adaptors in Toll-like receptor signalling. *NatureReviews Immunology* 2007;7(5):353-364.
81. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 2004; 4: 499-511.
82. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C Ghosh S, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998;2:253-8.
83. Goutagny N, Estornes Y, Hasan U, Lebecque S, Caux C. Targeting pattern recognition receptors in cancer immunotherapy. *Targ Oncol* 2012; (7) :29–54.
84. Gluba A, Banach M, Hannam S, Mikhailidis DP, Sakowicz A, RyszJ. The role of Toll-like receptors in renal diseases. *Nature Reviews Nephrology* 2010;6:224-235.
85. Smith KD. Toll-like receptors in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(3):189-196.
86. Song J, Abraham SN. TLR-mediated immune responses in the urinary tract. *Curr Opin Microbiol* 2008;11:66-73.
87. Wu H, Chen G, Wyburn KR. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007;117:2847–2859.
88. Christensen SR, Shupe J, Nickerson K. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 2006;25:417-428.
89. Huang MY, Chaturvedi LS, Koul S, Koul HK. Oxalate stimulates IL-6 production in HK-2 cells, a line of human renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int*. 2005 Aug;68(2):497-503.

90. Shrikant R. Mulay, Onkar P. Kulkarni<sup>1</sup>, Khader V. Rupanagudi<sup>1</sup>, Adriana Migliorini<sup>1</sup>, Murthy N. Darisipudi<sup>1</sup>, Akosua Vilaysane<sup>2</sup>, Daniel Muruve<sup>2</sup>, Yan Shi<sup>3</sup>, Fay Munro<sup>3</sup>, Helen Liapis<sup>4</sup>, and Hans-Joachim Anders<sup>1</sup> Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  secretion Published in Volume 123, Issue 1 (January 2, 2013) *J Clin Invest.* 2013;123(1):236–246. doi:10.1172/JCI63679.
91. Lai KC, Lin WY, Man KM, Tsai CH, Chen HY, Tsai FJ, Chen FJ, Chen HY, Liu HP, Ho TJ, Huang PH, Liu PL, Lin FY, Shen JL, Liu JT, Chen YH, Chen WC. Association of interleukin-18 gene polymorphisms with calcium oxalate kidney stone disease. *Scand J Urol Nephrol.* 2010 Feb;44(1):20-6.
92. Wei CC, Chang MS. Mouse interleukin-20 receptor 1a targets renal epithelial cells and is associated with renal calcium deposition *Genes Immun.* 2009 Apr;10(3):237-47. doi: 10.1038/gene.2008.93. Epub 2008 Dec 11.
93. Kramer G, Steiner GE, Neumayer C, Prinz-Kashani M, Hohenfellner M, Gomha M, Ghoneim M, Newman M, Marberger M. Over-expression of anti-CD75 reactive proteins on distal and collecting renal tubular epithelial cells in calcium-oxalate stone-forming kidneys in Egypt. *BJU Int.* 2004 Apr;93(6):822-6.
94. Mittal RD<sup>1</sup>, Bid HK, Manchanda PK. Genotype and haplotype determination of IL1B (g. -511C>T and g. +3954C>T) and (IL1RN) in pediatric nephrolithiasis. *Clin Chim Acta.* 2007 Apr;379(1-2):42-7. Epub 2006 Dec 15.
95. Yao JJ, Bai S, Karnauskas AJ, Bushinsky DA, Favus MJ. Regulation of renal calcium receptor gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Am Soc Nephrol.* 2005 May;16(5):1300-8. Epub 2005 Mar 23.
96. Li JY, Zhou T, Gao X, Xu C, Sun Y, Peng Y, Chang Z, Zhang Y, Jiang J, Wang L, Hou J. Testosterone and androgen receptor in human nephrolithiasis. *J Urol.* 2010 Dec;184(6):2360-3. doi: 10.1016/j.juro.2010.08.009. Epub 2010 Oct 16.)
97. Liang Liang,\* Lei Li,\* Jing Tian, Soo Ok Lee, Qiang Dang, Chiung-Kuei Huang, Shuyuan Yeh, Erdal Erturk, David Bushinsky, Luke S. Chang, Dalin He and Chawnshang Chang. Androgen Receptor Enhances Kidney Stone-CaOx Crystal Formation via Modulation of Oxalate Biosynthesis & Oxidative Stress. *Mol Endocrinol.* 2014 Aug; 28(8): 1291–1303.
98. Ridnour L., Cheng R, Christopher H, Heinecke J, Ambs S, Glynn S, Howard A, Trinchieri G, and Wink D. Molecular Pathways: Toll-like Receptors in the Tumor Microenvironment—Poor Prognosis or New Therapeutic Opportunity. *Clin Cancer Res* 2013;19(6).

99. Li Q, Withoff S, Verma IM. Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends in immunology* 2005;26:318-25.
100. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*.2007;133(6):1869-81
101. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118:285-96.
- 102: Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12481-6
103. Li Shao, Zhijie Cong,<sup>2</sup> Xiaoli Li,<sup>3</sup> Hanbing Zou,<sup>4</sup> Lanfang Cao,<sup>3</sup> Yinshi Guo<sup>1</sup>. Changes in levels of IL-9, IL-17, IFN- $\gamma$ , dendritic cell numbers and TLR expression in peripheral blood in asthmatic children with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(5): 5263–5272
104. Lee SM, Kok KH, Jaume M, Cheung TK, Yip TF, Lai JC, Guan Y, Webster RG, Jin DY, Peiris JS. Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Mar 11;111(10):3793-8.
105. Atmaca HT, Kul O, Karakuş E, Terzi OS, Canpolat S, Antepioğlu T. Astrocytes, microglia/macrophages, and neurons expressing Toll-like receptor 11 contribute to innate immunity against encephalitic *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroscience*. 2014 Jun 6;269:184-91.
106. . PerMarques CP, Maor Y, de Andrade MS, Rodrigues VP, Benatti BB. Possible evidence of systemic lupus erythematosus and periodontal disease association mediated by Toll-Like Receptors-2 and 4 (TLR2, TLR4). *Clin Exp Immunol*. 2015 Sep 19.
107. Zheng Q, Cui G, Chen J, Gao H, Wei Y, Uede T, Chen Z, Diao H. Regular Exercise Enhances the Immune Response Against Microbial Antigens Through Up-Regulation of Toll-like Receptor Signaling Pathways. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(2):735-46.
108. Feng Y, Chen H, Cai J, Zou L, Yan D, Xu G, Li D, Chao W. Cardiac RNA induces inflammatory responses in cardiomyocytes and immune cells via Toll-like receptor 7 signaling. *J Biol Chem*. 2015 Sep 11.
109. Oosting M, Cheng SC, Bolscher JM, Vestering-Stenger R, Plantinga TS, Verschueren IC, Arts P, Garritsen A, van Eenennaam H, Sturm P, Kullberg BJ, Hoischen A, Adema GJ, van der Meer JW, Netea MG, Joosten LA. Human

TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 21;111(42).

110. Chen R, Alvero A B, Silasi D-A, K D Steffensen, G Mor. Cancers take their Toll—the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27: 225–233.

111. González-Reyes S, Marín M, González L, González L, Casar J, Lamelas M, González-Quintana J, Vizoso F. Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer* 2010; 10:665.

112. Sandholm J and Selander S. Toll-like receptor 9 in breast cancer. *Frontiers in Immunology* 2014 ;(5): 330.

113. Samara K, Katerina M. Karagiannis K, Margaritopoulos G, Lasithiotaki I, Koutala E, Siafakas N. Expression profiles of Toll-like receptors in non-small cell lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *International Journal Of Oncology* 2012; 40: 1397-1404

114. Harsini S, Beigy M, Akhavan-Sabbagh M, Rezaei N. Toll-like receptors in lymphoid malignancies: Double-edged sword. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2014 ; (89) :262 283.

115. Gonzalez-Reyes S, Fernández M, González L, Aguirre A, Suárez A, M. González J, Escaff S, Vizoso F. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol Immunother* 2011; (60):217–226.

116. Väisänen Mr, Jukkola-Vuorinen A, Katri S, Katri S. Selander K, Vaarala M. Expression Of Toll-Like Receptor-9 Is Associated With Poor Progression-Free Survival In Prostate Cancer. *Oncology Letters* 2013; 5: 1659-1663.

117. Proença MA, de Oliveira JG, Cadamuro AC, Succi M, Netinho JG, Goloni-Bertolo EM, Pavarino EC, Silva AE. TLR2 and TLR4 polymorphisms influence mRNA and protein expression in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Jul 7;21(25):7730-41.

118. Chatterjee S, Crozet L, Damotte D, Iribarren K, Schramm C, Alifano M, Lupo A, Cherfils-Vicini J, Goc J, Katsahian S, Younes M, Dieu-Nosjean M, Fridman W, Sautès-Fridman C, Cremer I. TLR7 promotes tumor progression, chemotherapy resistance and poor clinical outcomes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2014;15;74(18):5008-5018.

119. Shimizu T, Yokota S, Takahashi S, Kunishima Y, Takeyama K, Masumori N, Takahashi A, Matsukawa M, Itoh N, Tsukamoto T, Fujii N. Membrane-Anchored CD14 Is Important for Induction of Interleukin-8 by Lipopolysaccharide and

Peptidoglycan in Uroepithelial Cells Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology 2004: 969–976.

120. Igor Landais, Chantel Pelton, Daniel Streblow, Victor DeFilippis, Shannon McWeeney, and Jay A. Nelson\*): Human Cytomegalovirus miR-UL112-3p Targets TLR2 and Modulates the TLR2/IRAK1/NFκB Signaling Pathway PLoS Pathog. 2015 May; 11(5).

121. Sinon SH, Rich AM, Parachuru VP, Firth FA, Milne T, Seymour GJ. Downregulation of toll-like receptor-mediated signalling pathways in oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2015 Apr 12.

122. Jakkampudi A, Mukherjee RM, Kota R, Shravanti GV, Rao PN, Reddy DN. Downregulation of Human Toll-like Receptor 2 and 4 Genes in Inactive Carriers of Hepatitis B Virus Infection-A Possible Mode of Viral Persistence. Journal of Gastroenterology and Hepatology Research 2014; 3(7):

123. Jennifer Anne Thompson and R. Clinton Webb. Down-regulation of TLR-4 in Hypoxic Myoblast Cells. Physiology, Georgia Regents University, Augusta, GA. The FASEB Journal. 2013;27:1b800.

124. Santos M, Mannama V, Craft B, Punecky L, Sheehan N, Lewis R, Cruse J. Comparative analysis of innate immune system function in metastatic breast, colorectal, and prostate cancer patients with circulating tumor cells. Experimental and Molecular Pathology 2014; (96) :367–374

125. Gatti G, Quintar A, Andreani V, Nicola J, Maldonado A, Masini-Repiso M, Virginia E, Maccioni M. Expression of Toll-Like Receptor 4 in the Prostate Gland and Its Association With the Severity of Prostate Cancer. The Prostate 2009; (69): 1387-1397 .

126. Green L, Santos M, Ejaeidi A. Craft B, Lewis R, Cruse M. Toll-like receptor (TLR) expression of immune system cells from metastatic breast cancer patients with circulating tumor cells. Experimental and Molecular Pathology 2014; (97) :44–48.

127. <http://kidneystones.uchicago.edu/role-of-innate-immunity-in-plaque-formation/>

128. <http://des.nh.gov/organization/commissioner/pip/factsheets/ard/documents/ard-ehp-12.pdf>

129. [http://oehha.ca.gov/air/chronic\\_rels/pdf/107211.pdf](http://oehha.ca.gov/air/chronic_rels/pdf/107211.pdf)