



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BÖBREK TAŞI OLUŞUMUNDA *OSTEOPONTIN* rs1126616 GEN
ÇOKYAPILILIĞININ ROLÜ**

DALSHAD SALIH MOHAMMED ABDULLAH

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

Gaziantep

2014

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BÖBREK TAŞI OLUŞUMUNDA *OSTEOPONTIN* rs1126616 GEN ÇOKYAPILILIĞININ
ROLÜ

DALSHAD SALIH MOHAMMED ABDULLAH

Tez Savunma Tarihi: 23.05.2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

23.05.2014

Dalshad Salih Mohammed Abdullah

TEŞEKKÜR

Tez danıőmanım Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ'ye en derin Őukranlarımı sunmak istiyorum. Tez yazımının ve araştırılmasının her safhasında tavsiye, motivasyon, eleőtiri ve yönlendirmelerini eksik etmeyen danıőmanıma teşekkür ederim. Ayrıca, tezime alakalı yardım ve önerileri için bölüm başkanımız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a teőekkürü bir borç bilirim. Laboratuvar sorumlusu Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya İĞCİ'ye yardımlarından ve anlayıőından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, Emine BAYRAKTAR, Esra GEYİK, Recep BAYRAKTAR ve İbrahim BOZGEYİK'e yardımları için teşekkür ederim.

İdeallerimi gerçekteőtirmem konusunda benden yardımlarını ve desteklerini esirgemedikleri için başta eőtım ve aileme teşekkür ederim.

Son olarak, başta Rozhgar KHAILANY olmak üzere tüm emeği geçen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGE ve KISALTMALAR	VII
ŞEKİL LİSTESİ	IX
TABLO LİSTESİ	X
RESİM LİSTESİ	XI
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Böbrekler	5
2.2 Böbrek Fizyolojisi	6
2.3. Böbrek taşı.....	6
2.4.Böbrek Taşları Çeşitleri.....	7
2.4.1.Kalsiyum taşları.....	7
2.4.2.Ürik asit taşları	8
2.4.3.Struvit taşlar.....	8
2.5.Böbrek Taşının Epidemiyolojisi.....	8
2.6.Böbrek Taşı Risk Faktörleri	9
2.6.1.Coğrafya	9
2.6.2.Yaş	9
2.6.3.Cinsiyet.....	10
2.6.4.Beslenme	10
2.6.5.Su Alımı.....	11
2.7.Böbrek Taşının Patofizyolojisi	12
2.8.Böbrek Taşının Moleküler Yönleri.....	12
2.9.Böbrek Taşı Hastalığında <i>Osteopontin</i> Gen Polimorfizmi.....	13

2.10.Osteopontin.....	13
2.10.1. <i>Osteopontin</i> gen yapısı ve işlevi.....	13
2.10.2.Osteopontin proteini	14
2.10.3.Osteopontinin yapısal bölgeleri.....	15
2.10.4.Osteopontin yolağı.....	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
3.1. Örneklerin Toplanması	18
3.2. DNA Eldesi	18
3.2.1. DNA elde etme işlemi	18
3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu	19
3.3.1. Primer tasarımı	19
3.3.2. PCR koşullarının iyileştirilmesi	20
3.4.Elektroforez	21
3.4.1 Agaroz jel elektroforezi.....	21
3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP).....	22
3.5.1. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizi protokolü	22
3.6. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. RFLP Sonuçları	24
5. TARTIŞMA	26
6. KAYNAKLAR.....	29
ÖZGEÇMİŞ.....	33

SİMGE ve KISALTMALAR

AB	Applied Biosystem
cDNA	Komplementer DNA
CaOx	Kalsiyum Okzalat
CAPS	Kesilip çoğaltılmış polimorfik dizi
DNA	Deoksinükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
ETA1	Erken T lenfosit Aktivasyonu 1
EtBr	Etidyum Bromür
IH	İdiopatik hiperkalsiüri
IL-1 β	İnterlökin-1 β
kDa	Kilodalton
MJ	Master of Journalism
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NaCl	Sodyum Klorür
OPN	Osteopontin
Osx	Osteriks
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi
PTH	Paratiroid Hormon
RE	Tanıma Bölgesi
RFLP	restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
RGD	Arjinin-glisin-aspartat
SDS	Sodyum dodesil sülfat

SPP1	Salgılanan fosfoprotein 1
TGF β	Transforme olan büyüme faktörü β
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü α
UTIs	İdrar yolu enfeksiyonları
UV	Mor ötesi
VDRE	Vitamin D yanıt elementi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Böbrek ve böbrek taşı hastalığı.	7
Şekil 2.2. Böbrek taş oluşum süreci (22).	12
Şekil 2.3. Osteopontin geninin 4. kromozom üzerindeki yerinin gösterilmesi (28).	14
Şekil 2.4. İnsanda bulunan osteopontin geninin yapısı. Ekzonlar kutu içerisinde gösterilmektedir, içi dolu kutular kodlanan bölgeyi, içi boş kutular ise kodlanmayan bölgeyi göstermektedir (25).....	14
Şekil 2.5. Osteopontin proteinin yapısı (28).....	15
Şekil 2.6. İnsan Osteopontin proteinin yapısal bölgelerinin gösterilmesi (25).	16
Şekil 2.7. Bcr-Abl tarafından osteopontin geninin ifadesinin yer aldığı mekanizma. Bcr-Abl ifadesi ile OPN ifadesinin uyarıldığı gösterimiştir. Bcr-Abl protein, Ras'ı etkinleştirir. Ras'ın etkinleşmesi ile PI-3K, aPKC, Raf-1 ve MEK yolağı için gerekli uyarım sağlanır. Böylelikle, OPN geninin transkripsiyonu etkinleşir ve OPN proteini sentezlenir (29).....	17
Şekil 4.1. Böbrek taşı hastalarında tespit edilen rs1126616 numaralı osteopontin gen polimorfizmin istatistiksel analizi.	25

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Osteopontin geninin hedef bölgesindeki PCR ürün büyüklüğü, primer dizileri ve uygun bağlanma sıcaklıklarının gösterilmesi.	19
Tablo 3.2. Toplam 25 µL hacimdeki PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.	20
Tablo 3.3. Gradient PCR reaksiyonu koşulları.	20

RESİM LİSTESİ

- Resim 3.1.** Etidyum bromür boyama ile %2'lik agaroz jel elektroforezinde gradient PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: Marker (100 bç). Uygun primer bağlanma sıcaklığı olarak 4. örnek seçilmiştir.21
- Resim 4.1.** Restriksiyon enzim analizi sonrasında DNA parçaları. Markerlar: 100 bç (soldaki), 50 bç (sağdaki). 50-52, 57, 59, 61, 64, 66-70, 73 ve 74 örneklerinde T / “C yada G” genotipi görülürken, 53-56, 58, 60, 62, 65 ve 72. Örnekte “C yada G” / “C yada G” genotipi görülmektedir.24

ÖZET

BÖBREK TAŞI OLUŞUMUNDA OSTEOPONTIN rs1126616 GEN ÇOKYAPILILIĞININ ROLÜ

DALSHAD SALIH MOHAMMED ABDULLAH

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Mehri İĞCİ

Mayıs 2014, 44 Sayfa

Böbrek taşı, çevresel ve kalıtsal etkenlerden kaynaklanan ve çok aşamalı bir süreçte oluşan, yaklaşık %75'i kalsiyum okzalat (CaOx) kristalleri olan karmaşık bir hastalıktır. Osteopontin geni, 1986 yılında ilk olarak kültüre edilen fare osteosarkom hücrelerinden elde edilen cDNA'da tespit edilmiştir. Osteopontin geni, insanda 4. kromozom (4q22.1) üzerinde yer almaktadır. Osteopontin geni, bir çok kollajen olmayan kemik ve dentin proteinlerini kodlamaktadır. Bu çalışmada, 92 böbrek taşı hastasının ve 93 kontrol bireyin örneği kullanılmıştır. Böbrek taşı hastalığı tiplerine, cinsiyet ve yaş gibi klinik özelliklerine göre sınıflandırılarak Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniği kullanılarak çalışılmıştır. Bu çalışma sonucunda, 58 böbrek taşı hastasında ve 43 kontrol grubunda CveyaG / CveyaG genotipi görülürken, 48 hasta ve 34 kontrol grubu örneğinde T / CveyaG genotipi görülmüştür. G ve C nükleotidlerinin varlığının tanımlanması kesim enzimi ile mümkün olmadığından dolayı, CG nükleotidlerinin ayırt edilmesi mümkün olamamıştır. Ayrıca bu çalışmada, T/T genotipine rastlanmamıştır. Sonuçlar ki kare (chi square) testi ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak, osteopontin genindeki polimorfizm analizi böbrek taşı oluşumu ile ilişkili olabilir ve osteopontin genindeki genetik polimorfizmlerin böbrek taşı oluşumuna duyarlılığı etkilediğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: Böbrek taşı, haplotip, Osteopontin, polimorfizm, RFLP

ABSTRACT

THE ROLE OF rs1126616 GENE POLYMORPHISM OF *OSTEOPONTIN* IN KIDNEY STONE FORMATION

DALSHAD SALIH MOHHAMED

Master's thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehri IGCI

May 2014, 44 Pages

Kidney stone is a complex disease resulting from environmental as well as hereditary factors and principally composes of approximately 75% calcium oxalate (CaOx) crystals, which are formed through a multi-step process. Osteopontin gene was identified by isolating cDNA from cultured rat osteosarcoma cells in 1986. *Osteopontin* gene located on human chromosome 4 (4q22.1). This gene encodes several non-collagenous bone and dentin proteins. In this study, 93 normal control samples and 92 kidney stonedisease samples that were grouped according to the types of kidney stone disease and clinical characteristics of patients, including gender and average age were observed with restriction fragment length polymorphism (RLFP) technique. 58 patients and 43 controls displayed the “C or G” / “C or G” genotype, 48 patients and 34 controls displayed T / “G or C” genotype. Since there is no appropriate restriction enzyme to recognize the G or C nucleotide in that position, it could not be possible to discriminate the C-G nucleotides. Additionally no T/T genotype was observed. The results were found statistically significant by chi-square test ($p < 0.05$). In conclusion, the analysis of the polymorphism showed that OPN gene might be associated with kidney stone formation, and suggesting that genetic polymorphisms in OPN gene modify individual susceptibility to nephrolithiasis.

Keywords: Kidney stone, Osteopontin, polymorphism, haplotypes, RLFP

1. GİRİŞ

Böbrek taşı, kalıtsal etkenler gibi çevresel etkenlerinde sebep olduğu ve çok aşamalı bir süreç boyunca oluşturulan yaklaşık olarak %75 kalsiyum okzalat kristallerinin birikimi sonucu oluşan karmaşık bir hastalıktır (1). Böbrek taşı; kalsiyum taşları, ürik asit taşları, struvit taşları ve sistin taşları olmak üzere 4 ana grupta sınıflandırılmaktadır (2). Kalsiyum okzalat oluşumu, sırasıyla CaOx kristallerinin çekirdeklenmesi, kristallerin toplanması ve saklanması aşamalarını içermektedir (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde son 30 yılda böbrek taşı hastalığının iki kat arttığı bildirilmiştir (3). Böbrek taşı hastalığının epidemiyolojisini anlamak için taş oluşumunun tekrarlama olasılığı ve risk faktörlerinin belirlenmesi, toplum düzeyinde böbrek taşı hastalığının belirlenmesi için önemlidir (4). Böbrek taşı herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir ve taş oluşumunun başlangıcı genç ve orta yaşlarda daha yaygın görülmektedir (3). Böbrek taşı hastalığının etiyojisi çevresel ve kalıtsal faktörlerin etkileşiminden kaynaklanan kompleks çok etkenli bir hastalıktır (5). Yetersiz sıvı alımı ve su kaybı, azalmış idrar hacmi ya da idrarda bazı kimyasal seviyelerinin (okzalat, kalsiyum, ürik asit) çok yüksek ya da çok az (magnezyum ve sitrat) miktarda bulunmalarını da içeren durumlar böbrek taşı hastalığı riskini arttırmaktadır (6). Ayrıca, reflü, medüller sünger böbrek, renal tübüler asidoz, idrar yolu enfeksiyonları ve genetik anomaliler de böbrek taşı oluşum riskini arttırmaktadır (6). Böbrek taşı hastalarının idrar analizinde, birçok protein içerdiği bulunmuştur ve bu proteinlerin böbrek taşı oluşumunu engellediği, birçok çalışmada rapor edilmiştir (1). Tamm-Horsfall proteini, glikozaminoglikanlar, bikunin, calgranulin ve osteopontini içeren birçok makromolekül, organik ve inorganik bileşiklerin böbrek taşı oluşumunu engellediği bilinmektedir (1).

Osteopontin (OPN) aynı zamanda üriner taş protein, salgılanan fosfoprotein-1 (SPP-1), kemik siyalo protein ve erken T-lenfosit aktivasyon-1 (ETA-1) olarak da isimlendirilmektedir (7). Osteopontin, kemik gelişimi boyunca osteoblastlar tarafından mineralleştirici matrikse salgılanan fosforillenmiş bir glikoproteindir (7).

Osteopontinin taş matriksleri gibi taş oluşumunda yer aldığı düşünülmektedir (7). Osteopontin proteini, 16 amino asitlik hidrofobik uyarı dizisi ve hücreden salgılanmadan önce translasyon sonrası değişiklikler içeren 33,352-Da büyüklüğünde protein olmak üzere toplam 317 amino asitlik (34,982 Da) bir proteindir (7). Osteopontin geni insanda 4. kromozom üzerinde yer almaktadır (4q22.1) (7).

Bu çalışmanın amacı, daha önceden belirlenen rs1126616 numaralı osteopontin gen polimorfizmi ile böbrek taşı hastalığı arasındaki ilişkiyi polimeraz zincir tepkimesi (PCR) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (RFLP) gibi moleküler yöntemler kullanarak araştırılmasıdır. Böbrek taşı oluşumu çok etkenli bir hastalık olduğu için, rs1126616 numaralı osteopontin gen polimorfizminin böbrek taşı hastalığındaki rolünün belirlenmesi, böbrek taşı hastalarına tedaviye yönelik uygun yaklaşımlar sağlamak için yardımcı olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrekler

Böbrekler kırmızımsı kahverengi olup yaklaşık uzunluğu 10 cm, genişliği 5 cm ve kalınlığı ise 2.5 cm'dir (8). Böbreklerin arka yönleri, onları plevral boşluklardan ayıran diyafram ve 12 çift kaburga ile ilişkilidir (8). Böbrekler arka yüzleri ile karın arka duvarını oluşturan kaslardan m. psoas major, m. quadratus lumborum ve m. transversus abdominis'in üst bölümlerine yaslanmış şekilde durmaktadır (8). Böbreğin arka yüzüne komşu olan sinirler subcostal, iliohipogastrik ve ilioinguinal'dır (8). Sağ böbreğin önünde karaciğer, duodenum ve böbrek kolonları yer almaktadır (8). Bu böbrek karaciğerden hepatorenal girinti ile ayrılmaktadır (8). Sol böbrek ise mide, dalak, pankreas ve jejunum ile ilişkilidir (8).

Böbrekler karın bölgesinin arka bölümünde (posterior), karın zarı arkası (retroperitoneal) bölgesinde, 12. göğüs omuru ile 3. bel omurlarının (T12-L3) düzeyleri arasında yer almaktadır (8). Böbreklerin iç yüzlerinde böbrek hilusu denilen oyuk bir kısım bulunmaktadır (8). Renal hilum böbreklerdeki oyukta bulunan giriş kısmıdır (renal sinüs) (9). Renal sinüs (hilus), böbreğin arteri, veni, sinirleri ve renal pelvisin böbrek içerisine girdiği ya da çıktığı alandır (9). Sol böbrekte bulunan hilum, yaklaşık 5 cm medyan düzlemden uzak olan transpilorik düzlemin yanında bulunmaktadır (9). Transpilorik düzlem, muhtemelen karaciğerin yerleşiminden dolayı sol böbrek kutbundan yaklaşık 2,5 cm uzak olan sağ böbreğin üst kutbuna uzanmaktadır (9). Böbreklerin arka üst kısımları 11. ve 12. kaburgalar boyunca uzanmaktadır (9). Böbrek düzeyleri solunum ve duruş şekli ile değişmektedir (9). Her bir böbrek derin nefes alma sonucu diyaframın hareketi ile dikey olarak 2-3 cm hareket etmektedir (9). Genellikle genel böbrek ameliyatları karın duvarının arka bölgesinden yapılmakta olup, sağ böbreğin alt kutbu yaklaşık olarak iliak kemiğine bir parmak üst mesafededir (9).

Hilusta, renal damar renal pelvisin önünde yer alan renal arterin önünde yer almaktadır (8). Renal sinüste; renal pelvis, kaliksler, damarlar, sinirler ve değişken miktarda yağ ile bulunmaktadır (8). Her böbreğin öne ve arka yüzeyleri, mediyal (orta) ve lateral (yanal) kenarları ve alt ve üst kutupları bulunmaktadır (8).

2.2 Böbrek Fizyolojisi

Böbreklerin temel görevi katabolizma ya da doğrudan besinlerin yenmesi sonucu kaynaklanan artık ürünlerin kandan süzülmesini sağlamaktır (11). Bu ürünlerin uzaklaştırılması onların zehirli seviyelerde birikmelerini önlemek içindir (11). Böbreklerin ikinci önemli görevi ise kan basıncı, kan hacmi ve hücre dışı sıvıyı normal seviyede tutmaya çalışarak düzenleme yapmaktır (11). Bu düzenleme işlemi sıvı ve elektrolit dengesini düzenleyerek ve vazoaktif bileşiklerin üretilmesiyle rennin anjiyotensin sistemi tarafından enzimlerin üretilmesi ve salınması ile sağlanır (11). Kandaki filtreleme işlemi Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{+2} , HCO_3^- , HPO_4^{-2} gibi iyonların ihtiyaç durumlarına göre tutulması ya da salgılanması yoluyla dolaşımdaki iyon derişimini düzenler (11).

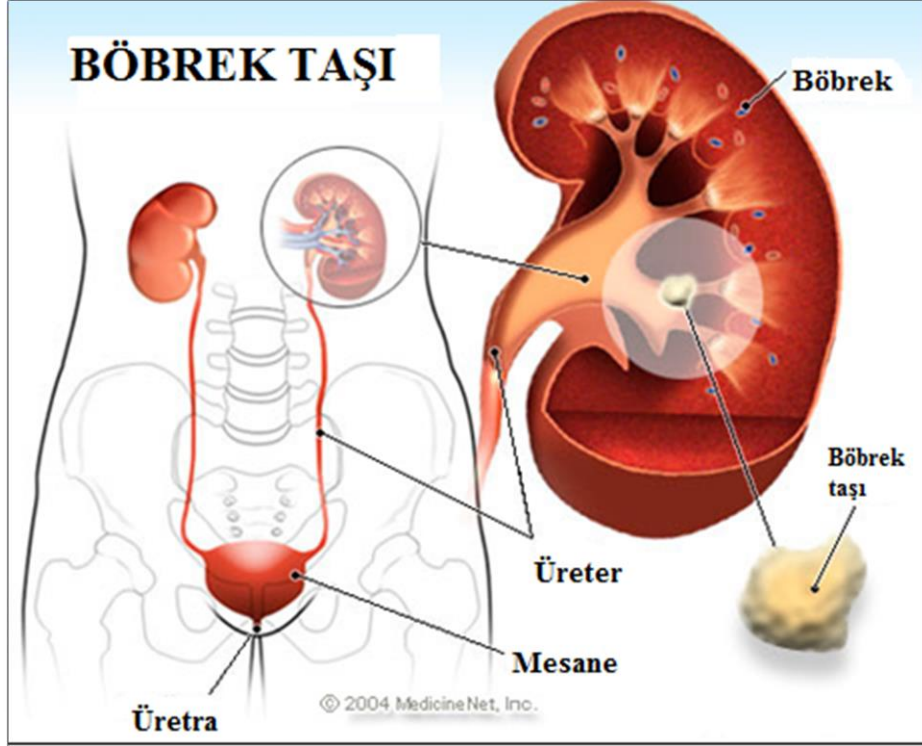
2.3. Böbrek taşı

Böbrek taşı (nefrolitiazis) böbrekte bulunan küçük taş formundadır (12). Taşlar vücutta bazı kimyasalların biraraya gelmesi sonucu oluşmaktadır (12). Bir taş üriner sistem içerisinde taşınabilir ya da böbrek içerisinde kalabilir (12). Üriner sistem taş hastalığı insanlarda oldukça yaygın bir hastalıktır ve üriner alanda oluşan taşların büyük bir kısmı kalsiyum tuzlarının mineralize olmasıyla oluşmaktadır (13). Böbrek taşı hastalığı genetik, biyokimyasal ve epidemiyolojik risk faktörlerinin birleşimi sonucu oluşan çok etkenli bir hastalıktır (14). Dört tip böbrek taşı bulunmaktadır (14). Böbrek taşlarının en yaygın olarak görülen tipi kalsiyum taşlarıdır (15). Böbrek taşı kadınlarda ve erkeklerde görülmesine karşın genellikle erkekler risk grubundadır ve böbrek taşı oluşumu genç kadınlarda da yaygınlaşmaktadır (14).

Böbrek taşı oluşumu; kristal çekirdeğin meydana gelmesi, büyümesi, kümelenmesi ve kristallerin renal tübül içinde tutulumu gibi aşamaları içeren kompleks bir işlemdir (16). Böbrek taşı oluşum süreci, üriner proteinleri de içeren çeşitli faktörler tarafından etkilenebilir (16). Bu faktörler uriner taş oluşumunu pozitif yada negatif yönde etkileyebilirler (16).

Bununla beraber karın boşluğunun içerisinde omurga çıkıntısından dolayı böbrekler birbirlerine belirli bir açıyla eğik olarak yerleşmişlerdir (9) Bu nedenle böbreklerin enine çapı radyografteki görüntüleri küçük görülmektedir (9). Her böbreğin yan boşluğu dışbükey, renal sinus ve renal pelvislerin bulunduğu orta kenar ise içbükey şeklindedir (8). Böbreğin iç bükey şeklindeki orta kenarı fasulye şekline benzemektedir (8). Renal pelvis basık şekilde üretere kadar uzamaktadır. (9). Renal pelvisin devamı ureterdir (9). Renal

pelvisten çıkan 2 ya da 3 adet ana kaliks daha sonra küçük kalikslere ayrılır (9). Her küçük kaliks renal papilla tarafından girintilendirilir (9). İnsanlarda renal pelvis kaliksleri genellikle daralmaktadır (9). Renal piramitler ve onlarla ilişkili korteks böbreklerin loblarını oluşturmaktadır (9). Fetus böbreklerinin dış yüzeyinde loblar görülebilir ve doğumdan bir süre sonra da sürebilmektedir (9).



Şekil 2.1. Böbrek ve böbrek taşı hastalığı.

2.4. Böbrek Taşları Çeşitleri

2.4.1. Kalsiyum taşları

Kalsiyum taşları tüm üriner taşların %75-80'ini oluşturan böbrek taşlarının en yaygın türüdür (17). Bu taşların oluşumu için, idrarda kalsiyum bulunması, idrar hacminin azalması ve sitrat, pirofosfat ve magnezyum gibi inhibitörlerin seviyelerinin azalması önemli risk faktörleridir (17). Kalsiyum taşlarının kalsiyum fosfat ve kalsiyum okzalat olmak üzere 2 önemli formu vardır (2). Kalsiyum okzalat taşları pürüzlü yüzeyinin rengi açık kahverengiden siyaha doğru değişen, sert yapıda ve daha yaygın olarak bulunmaktadır (17,2). Kalsiyum okzalat taşlarının oluşumuna, yüksek seviyede kalsiyum ve okzalat

atılması neden olmaktadır (17). Kalsiyum fosfat taşları ise düz, ince, yuvarlak ya da yamuk, ince taneli, yumuşak ve yoğun yapıdadır (17). Kalsiyum fosfat taşları, idrardaki yüksek pH, yüksek alkalın ve kalsiyumun birleşiminden dolayı oluşmaktadır (2).

2.4.2. Ürik asit taşları

Saf ürik asit taşları yüksek asitli idrar içerisinde oluşmuştur ve normal sert yapıda bulunmaktadır (17). Ürik asit taşları yuvarlak yada oval şekilli, parlak ve bazen de pürüzlü yapıda bulunabilirler (17). Hayvansal proteinlerde bulunan purin bakımından zengin bir beslenme (et, balık, kabuklu deniz hayvanları gibi) idrarda ürik asit artışına sebep olmaktadır (2). İdrarda ürik asit yoğunluğu artarsa kalsiyumla birlikte ya da tek başına taş oluşturabilmektedir (2).

2.4.3. Struvit taşlar

Böbrek enfeksiyonları sonucunda oluşan enfeksiyon taşları krem beyazı renginde ve hücresel ya da sütun şeklinde olabilirler (17). Bu taşlar idrarda yüksek seviyede alkalın bulunmasından dolayı oluşmakta ve hızlı bir şekilde büyüebilmektedirler (17). Üriner sistem enfeksiyonların önlenmesi ile bu taşların oluşumları engellenebilmektedir (2).

2.4.4. Sistin taşları

Sistin taşları böbrek taşı hastalarının%1'inde görülen nadir taşlardır ve böbrekte aminoasit geçişinde kalıtsal bozukluklara neden olurlar (17). Sistin taşlarını oluşturmak için biraraya gelmiş sistin kristalleri bu hastaların idrarında bol miktarda bulunmaktadır (17). Bu taşlardan etkilenen hastalar genellikle erken yaştaki bireylerdir ve yaşam boyu tekrarlayan böbrek taşı oluşumuna maruz kalmaktadırlar (17). Uzun süreli tedavi de, hastanın yakın takibi, eğitim, beslenme değişikliği, sıvı alımı ve tekrarlayan taş oluşumunda bazı ilaçların kullanılması gerekmektedir (17).

2.5. Böbrek Taşının Epidemiyolojisi

Amerika Birleşik Devletleri'nde böbrek taşı görülme sıklığı son otuz yılda iki kat artmıştır (3). Böbrek taşı hastalığının epidemiyolojisini anlamak için taş oluşumunun, tekrarlama olasılığı ve risk faktörlerinin belirlenmesi, toplum düzeyinde böbrek taşı hastalığının

belirlenmesi için önemlidir (4). Böbrek taşı oluşumu her yaşta görülebilmekle beraber genç ve orta yaşlarda hastalığın başlaması daha yaygındır (3). Böbrek taşı görülme sıklığı dünyanın çeşitli yerlerinde farklılıklar göstermektedir (14).

2.6. Böbrek Taşı Risk Faktörleri

Üriner sistem hastalıklarından en yaygın olanlardan birisi böbrek taşı hastalığıdır (18). Böbrek taşı hastalığı uzun bir zamandan beri var olan bir sağlık problemidir (18). Yetersiz sıvı alımı ve su kaybı, azalmış idrar hacmi yada idrarda bazı kimyasal seviyelerinin (okzalat, kalsiyum, ürik asit) çok yüksek ya da çok az (magnezyum ve sitrat) miktarda bulunmalarını da içeren durumlar böbrek taşı hastalığı riskini arttırmaktadır (6). Ayrıca, reflü, medüller sünger böbrek, renal tübüler asidoz, idrar yolu enfeksiyonları ve genetik anomaliler de böbrek taşı oluşum riskini arttırmaktadır (6).

2.6.1. Coğrafya

Böbrek taşı görülme sıklığı dünyanın farklı bölgelerinde çeşitlilik gösterir. Böbrek taşı görülme sıklığı, Afrika'nın bazı bölgeleri, Orta ve Güney Amerika gibi alanlarda düşük olmasına rağmen, İskandinav ülkeleri, Akdeniz ülkeleri, Britanya Adaları, kuzey Avustralya, Orta Avrupa, Malaya Yarımadası, Çin, Pakistan ve Kuzey Hindistan alanlarında böbrek taşı görülme sıklığı yüksektir.

Asya kıtasında ise taş oluşumu Suudi Arabistan, Birleşik Arap Emirlikleri, İran İslam Cumhuriyeti, Pakistan, Hindistan, Myanmar, Tayland, Endonezya ve Filipinler gibi ülkelerde görülmektedir (14). Böbrek taş oluşumunda coğrafyanın etkisi doğrudan olabilir, sıcaklık üzerinden olabilir (19). Yüksek sıcaklık terlemeyi artırdığından dolayı idrar derişiminde artış meydana gelir ve bu da idrarda kristalleşmenin yükselmesine neden olmaktadır (19).

2.6.2. Yaş

Böbrek taşı hastalığı, 1 yaş altı ve 70 yaş üzeri tüm yaş gruplarını etkilemektedir (14). İlk böbrek taşı daha çok otuzlu yaşlar ve yetmişli yaşlarda görülmektedir (19). Baker ve arkadaşları (1993) kalsiyum okzalat kristallerinin en çok oluştuğu dönem 50-60 yaş aralığında olduğunu bildirmişlerdir (14). İleriki yaşlarda yüksek oranda böbrek taşı oluşumunun nedeninin beslenme ve yaşa bağlı olduğu bilinmektedir (20). Geç erişkinlerde beslenme ve böbrek taş oluşumu arasındaki ilişki değişmektedir (14, 19, 20). Birçok

besinin bağırsak emilimi taş oluşumunu etkilemektedir, örneğin; kalsiyum erişkinlerde azalmaktadır (14).

Böbrek taşı oluşumu, 60 yaşını geçen erkeklerde belirgin bir şekilde azalmaktadır, burdan yola çıkarak böbrek taşı oluşumunun patofizyolojisi erişkinlerde değişmektedir (14, 19). Böbrek taşı oluşan yaşlılarda üriner kalsiyum gençlere göre daha az salgılanmaktadır ve kristilizasyon üriner önleyicilerde kusurlar meydana gelebilmektedir (20).

2.6.3. Cinsiyet

Böbrek taşı hastalığı erkeklerde kadınlardan iki kat daha fazla görülmektedir (19). Böbrek taşı hastalığının erkeklerde daha fazla görülmesinin nedeni, protein alımının fazla olması sebebiyle fosfat ve mgnezyumun idrar ile atılımının artması ve idrardaki sitrat derişiminin azalmasıdır (19, 20).

Böbrek taşı oluşumunun kadınlarda düşük riskli olması ilk öncelerde taş oluşturan tuzların idrardaki düşük doygunluğunun idrardaki sitrat derişiminin arttırması nedeniyle olduğu düşünülmekteydi, ancak daha sonraki yapılan çalışmalarda östrojen ve menapoz sonrası östrojen tedavisi gören kadınlarda, üriner kalsiyum ve kalsiyum okzalat derişiminin seviyesinin düşerek böbrek taşı oluşma riskini de azalttığı bildirilmiştir (14).

Ayrıca, östrojen idrarda alkalın ortam sağlayarak ve sitrat seviyesinin yükselmesi ile kalsiyum taşı oluşmasını engellemektedir (19). Hayvanlarda yapılan deneylerde, testesteronun böbreklerdeki *osteopontin* gen ifadesini baskılayarak ve idrardaki okzalat boşaltım seviyesini yükselterek kristal oluşumunu arttırdığı, östrojenin ise böbreklerdeki *osteopontin* gen ifadesini arttırarak ve idrardaki okzalat boşaltım seviyesini azaltarak taş oluşumunu engellediği bildirilmiştir (20).

2.6.4. Beslenme

Bazı çalışmalar vejeteryan bireylerin taş oluşum riskinin vejeteryan olmayan kişilere göre daha düşük olduğunu göstermiştir (14, 19). Kalsiyum taş oluşumunun etiyolojisinde hayvansal protein ve potasyum alımının rolü tam olarak açık değildir (20). Bazı çalışmalarda ise taş oluşumu ile hayvansal protein alımı arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (20). Hayvansal proteince zengin bir beslenme (et, tavuk ve balık) ve saf şekerlerin tüketilmesi idrarda kalsiyum ve ürik asit yoğunluğunu artırırken, idrardaki sitrat yoğunluğunun azalmasına neden olmaktadır (19). Yoğun şeker tüketiminin idrarda kalsiyum ve okzalat yoğunluğunu arttırarak böbrek taşı oluşturduğu bildirilmiştir (20).

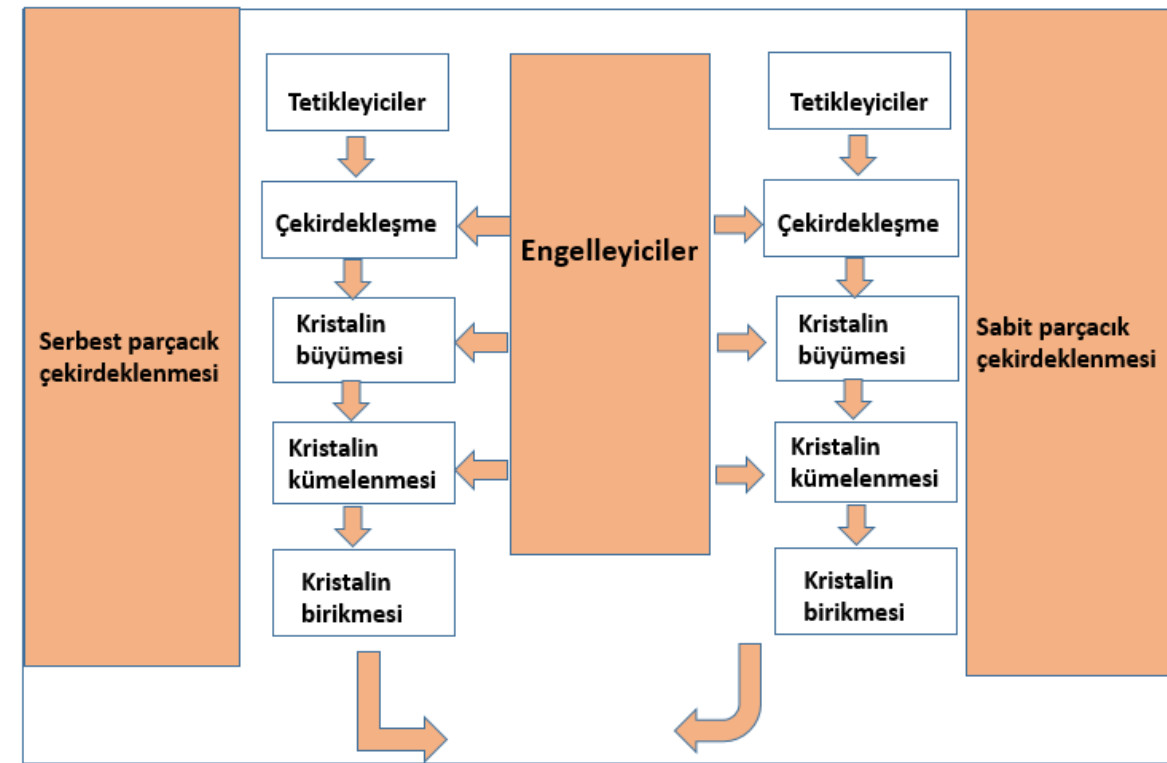
Beslenmede potasyum diyetinin artırılması idrarda kalsiyum atılımını azaltabilir (20). Kalsiyum alımı özellikle de süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi idrarda kalsiyum yoğunluğunun artmasına ve taş oluşumuna neden olabilmektedir (14). Bununla birlikte kalsiyum alımı ile taş oluşumu arasında ters bir ilişkinin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (14). Kadın ve erkeklerin oluşturduğu bir çalışmada yüksek kalsiyum alımının olduğu grupta taş oluşumu düşük kalsiyum alan gruba göre bir buçuk kat azalmıştır (14). Hayvansal proteinlerin farklı mekanizmalar yoluyla taş oluşumunu uyardığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (14). Protein alımı renal asidoz yoluyla metabolic asidoz oluşturur. Kemik emilimi ile idrarda sitrat atılımı azalırken kalsiyum atılımı ise artmaktadır (14). Asidoz distal tübüllerdeki yeniden kalsiyum emiliminin inhibisyonuna da neden olmaktadır. Hayvansal proteinlerin fazla miktarda alınması glomerular filtrasyon oranını artırarak ürat, kalsiyum ve okzalatin idrarla atılımını artırmaktadır (14).

2.6.5. Su Alımı

Taş oluşturan bileşenler ile idrarın yoğunluğu taş oluşumu için bir ön şarttır ve sıvı tüketiminin artması yüksek hacimde idrarın atılması ve böylece taş oluşturan bileşiklerin idrarda daha az yoğun ortamda bulunmasını sağlamaktadır. Böbrek taşı hastalarına taş oluşumunun yeniden tekrarlama riskine karşı eskiden beri su ve sıvı alımı tavsiye edilmektedir (19). Bazı kanıtlar bu öneriyi desteklerken bazıları da desteklemez. Günlük sıvı alımının en az 2-2.5 lt idrar çıkışını sağlayacak kadar alınması konusunda ortak görüşler mevcuttur (14). Sıvı alımının artması üriner inhibitor olan sitrat ve Tamm-Horsfall protein üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (19). Hidrasyon nefronunun bu kısmından hücrelere proksimal tubule sıvı akışını sağlayarak idrarda sitrat atılımını artırmaktadır (14). Bunu takiben hücre içi alkaloz sitrat geri emilimini baskılayarak, sitrat atılmasının artmasına neden olur. Kalsiyum okzalat kristalleri birikmiş olan böbrek taşı hastalarında üriner seyreltmenin Tamm-Horsfall proteininin inhibitor aktivitesinin artırdığı bildirilmiştir (20). Siener ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre fiziksel aktivite ve ortam sıcaklığına bağlı olarak gün içerisinde 2.5- 3 lt sıvı tüketilmesi gerekmektedir. Obez ve kilolu bireylerden erkeklerin %59.2'si kadınların da %43.9'u artan idrar atılımından dolayı taş oluşumu riski taşıdığı ortaya konulmuş ve kilolu erkeklerin kilolu kadınlara göre daha fazla taş oluşum riski taşıdığı ortaya konulmuştur (20). Powell ve arkadaşlarının yapmış olduğu benzer bir çalışmada da erkeklerde, fosfat, sülfat, ürik asit, okzalat ve sodium konsantrasyonlarının idrarda artmasının obezite ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (20).

2.7. Böbrek Taşının Patofizyolojisi

Suyun mükemmel homeostatik koruyuculuğundan dolayı idrar kristal bileşiklerinden dolayı doygun haldedir ve bu durum idrarda kalsiyum tuzlarının kristalizasyonunu engelleyen aktif fizyolojik mekanizmaların olduğunu göstermektedir (21, 22). Kalsiyum okzalat ve kalsiyum fosfatın ya da her ikisinin bir ya da birkaç katı kristal çökmesine neden olması, idrarda kalsiyum taşı oluşabilmesi için gereklidir (22). Kalsiyum okzalat taş oluşumunun 4 farklı aşaması vardır: Kristal çekirdeğin oluşması, kristalin büyümesi, kristalin kümelenmesi ve kristal birikmesi (Şekil 2.2) (22).



Şekil 2.2. Böbrek taş oluşum süreci (22).

2.8. Böbrek Taşının Moleküler Yönleri

Taş oluşumu hastalığı, genetik ve çevresel faktörlerin birleşmesiyle kalsiyum okzalat taşlarının neden olduğu çok etkenli bir hastalıktır. Kapsamlı genetik çalışmalar yapılmasına rağmen, idrarlarında yüksek kalsiyum bulunan ve taş oluşumu gözlenen hastalarla yapılmış kromozomal haritalama çalışması mevcut değildir (23). Genetik çalışmalar yoluyla elde edilen kesin kanıt ürolitiazis hastalığının çok genli ve kısmen geçiş göstermesidir (23). Şimdiye kadar taş oluşum hastalığına neden olan geni

tanımlamak mümkün olmamasına rağmen, aday genlerle yapılan çalışmalar sonucunda ümit verici gelişmelerin olması muhtemeldir (23). Aday genlerle, dokulardaki ifade seviyeleri ve çeşitli gruplardaki klinik göstergeler kullanılarak daha detaylı analiz yapılabilir (23).

2.9. Böbrek Taşı Hastalığında *Osteopontin* Gen Polimorfizmi

Taş oluşumu hem çevresel hem genetik faktörler tarafından etkilenen karmaşık bir süreçtir (24). Taş oluşumu sadece moleküllerin doygunluk durumlarından kaynaklanmaz (24). Bu durum, Gao ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada görülmektedir (24). *Osteopontin*de meydana gelen değişiklik sonucu oluşan genetik bozukluğun, böbrek taşı hastalarının 20 tanesinden sadece birini etkilediği düşünülmektedir (24). Diğer 19 tanesinde idrarda osteopontin ve diğer makromoleküllerin rolü tamamen farklı olabilir (24). Hücre yüzeyi reseptörü CD44 renal tübüler hücrelerinin luminal yüzeyinde hyaluronan ve osteopontini bağlamaktadır (24). Bu reseptör ve bağlandığı ligandının ifadesi tetiklendiği sürece insan böbrek epiteline kristaller bağlanamaz (24). Bu ifade artışı tübüler epitelin yaralanması sonrası geçici olarak meydana gelir (24). Yaralanmada yangı (inflamasyon) ile sonuçlanan mekanik hasar gibi stres sinyalleri oluşabilir (24). Yaralanmadan hemen sonra tübüler astarda hyaluronan ve osteopontin artışı kristal değişimine neden olur ve bu aşama taş oluşumunun önemli erken aşaması olarak kabul edilir (24). Hyaluronan ve osteopontinin ikisi birlikte hücre yüzeyinde kristal bağlayıcı molekül olduğu ileri sürülmektedir (24). Muhtemelen osteopontin genindeki polimorfizmler epiteldeki kristal bağlanmasına olan duyarlılığı etkilemektedir (24). Bu nedenle böbrek taşı hastalarının bir grubunda, osteopontin molekülündeki potansiyel değişim nefronlardaki kristal bağlama kinetiğini ya da idrar hacmini kısıtlayıcı etkiye sahip olabilir (24).

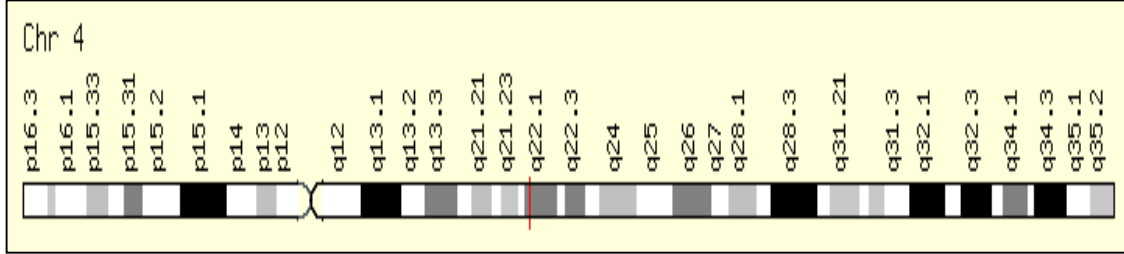
2.10. Osteopontin

2.10.1. *Osteopontin* gen yapısı ve işlevi

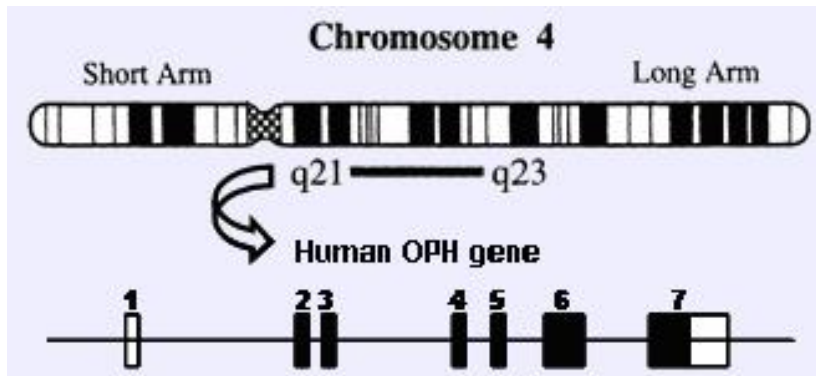
Osteopontin geni birçok kollajen olmayan ve dentin proteinlerinin kodlandığı 600 kb'lık bölge içerisinde yer almaktadır (25). *Osteopontin* geni, ilk olarak 1986 yılında Oldberg ve arkadaşları tarafından sıçan osteosarkom hücrelerinden elde edilen cDNA dizi ile tanımlanmıştır (26). *Osteopontin* geni insanda 4. kromozom üzerinde yer almaktadır (4q22.1) (7). *OPN* geni birçok kollajen olmayan ve dentin proteinlerini kodlamaktadır (27). *OPN* gen dizisi yaklaşık olarak 9 kb uzunluğunda olup toplam 7 ekzon içermektedir (25).

OPN geninin açık okuma çerçevesi 942 nükleotid içermekte olup, başlangıç kodonu 2. ekzonda ve bitiş kodonu 7. ekzonda bulunmaktadır (25).

Osteopontin geninin kromozom üzerindeki yeri Şekil 2.3'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. *Osteopontin* geninin 4. kromozom üzerindeki yerinin gösterilmesi (28).



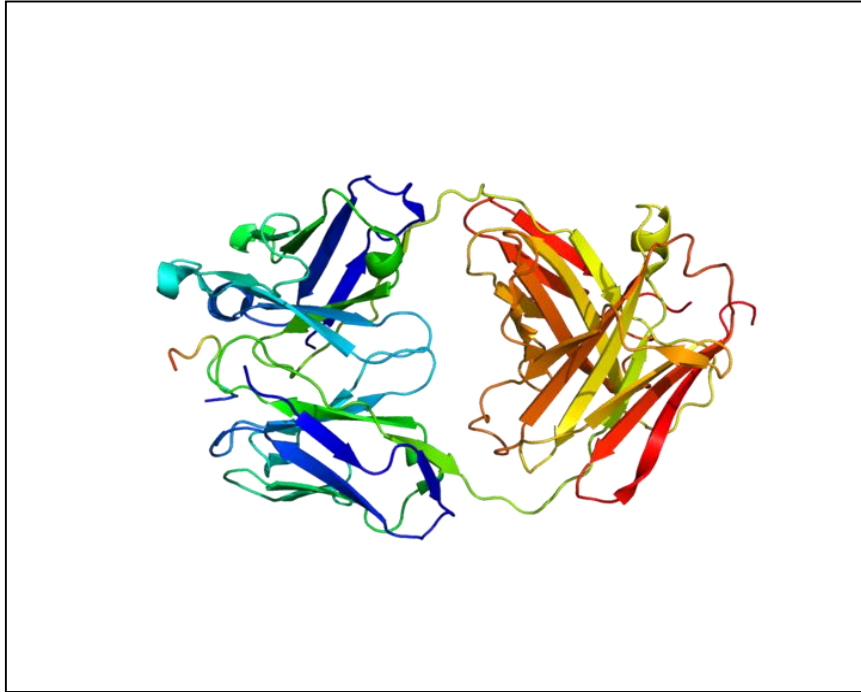
Şekil 2.4. İnsanda bulunan *osteopontin* geninin yapısı. Ekzonlar kutu içerisinde gösterilmektedir, içi dolu kutular kodlanan bölgeyi, içi boş kutular ise kodlanmayan bölgeyi göstermektedir (25).

2.10.2. Osteopontin proteini

Osteopontin trombin ve matriks metalloproteinazlar (MMP2, MMP3, MMP7, MMP9 ve MMP12) için substrat görevi görmektedir ve hücre dışı proteinlerden olan fibronektin ve kollajenlere bağlanabilmektedir (25). Ayrıca, Osteopontin integrin alfa V (beta1, beta2 ya da beta5) ve (alfa4, alfa5, alfa8 ya da alfa 9) beta1 yüzey almaçlarına Arg-Gly-Asp (RGD) dizisinden bağlanmaktadır (25). Osteopontin 314 amino asit uzunluğunda bir proteindir (25).

Yüksek oranda fosforilenmiş glikoprotein olan OPN ilk olarak kemikte tanımlanmıştır (5) ve OPN, adezyon molekülleri olan integrinler ve CD44 ile etkileşime giren arjinin-glisin-

aspartat (RGD) amino asit dizileri içermektedir (5). OPN 32 kDa büyüklüğünde bir protein olarak sentezlenmektedir ancak fosforilasyon, glikolizasyon ve proteolitik süreç gibi translasyon sonrası uzayan değişiklikler sebebiyle 45 ile 75 kDa büyüklüğünde moleküler kütleyle sahip olmaktadır (5). Osteopontin sadece idrar taşı matrisindeki ana organik bileşen olarak tespit edilmemiştir, aynı zamanda taş oluşturan sıçanda distal tübüler hücrelerde de osteopontin protein seviyesinin arttığı bildirilmiştir (5). Böbrek hasarı oluşunca osteopontinin miktarının artmış olduğu gözlenmiştir (5).



Şekil 2.5. Osteopontin proteinin yapısı (28).

2.10.3. Osteopontinin yapısal bölgeleri

Osteopontinin aspartat içeren amino asit dizisi, Asp86-Asp89, hidroksiapatite, RDG dizisi, Arg159-Asp159, alfaVbeta3, alfaVbeta1, alfaVbeta5 ve alfa5bata1 integrinlere, SVVYGRRLR dizisi, Ser162-Arg168, alfa9bata1 ve alfa1bata1 integrinlere bağlanmaktadır (27). Trombin kesim bölgesi (cleavage site), Arg168-Ser169, RGD dizisini içermektedir (27). Kalsiyum bağlanma bölgesi, Asp216-Ser228, ile kalsiyuma bağlanmaktadır (27). Heparin bağlanma bölgesi, Asp290-Ile305, ile CD44'e bağlanmaktadır (27). Osteopontin, translasyon sonrası, N- ve O-glikosillenmiş serin içeren amino asit bölgelerinden oldukça fosforillenmektedir (Şekil 2.6) (27).



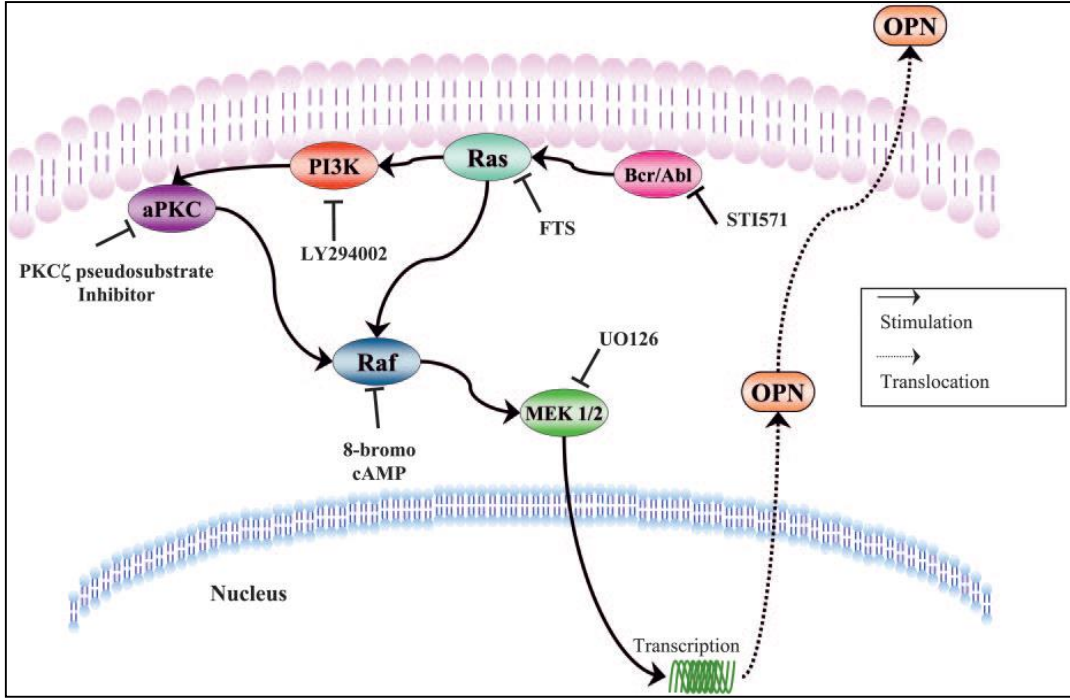
Şekil 2.6. İnsan Osteopontin proteininin yapısal bölgelerinin gösterilmesi (25).

2.10.4. Osteopontin yolağı

Osteopontin geninin düzenlenmesi tam olarak anlaşılamamıştır. Farklı hücre tiplerinde osteopontin geninin düzenlenme mekanizmaları farklılık gösterebilmektedir (29). *Osteopontin* geni, osteoblastlar ve osteositler hem de osteoklastlar tarafından ağırlıklı olarak kemikte ifade edilmektedir (29). *Osteopontin* geninin ifadesi için Runx2 (aka Cbfa1) ve osterix (Osx) transkripsiyon faktörleri gereklidir. Runx2 ve Osx osteoblastlara özgü genler olan *Colla1*, *Bsp*, ve *Opn* genlerinin transkripsiyonunu artırmaktadır (29).

Hipokalsemi ve hipofosfatemi, osteopontin transkripsiyonuna, protein çevrilmesine ve salgılanmasına yol açar (29). Bu durum osteopontin geninin özendirici bölgesindeki (promoter) vitamin D yanıt elemanının (VDRE) varlığından kaynaklanmaktadır (29).

Hücre dışı inorganik fosfat da (ePi) *osteopontin* gen ifadesinin düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (29). *Osteopontin* gen ifadesinin uyarılması aynı zamanda akut inflamasyonda klasik araçlar olan (tümör nekrozis faktör α [TNF α], interlökin-1 β [IL-1 β]), anjiotensin II, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF β) ve paratiroid hormonunda (PTH) oluşmasına neden olmaktadır (29). Fakat bu düzenleyici yolların ayrıntılı mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (29). Ayrıca hiperglisemi ve hipoksininde osteopontin gen ifade seviyesini artırdığı bilinmektedir (29).



Şekil 2.7. Bcr-Abl tarafından osteopontin geninin ifadesinin yer aldığı mekanizma. Bcr-Abl ifadesi ile OPN ifadesinin uyarıldığı göstermiştir. Bcr-Abl protein, Ras'ı etkinleştirir. Ras'ın etkinleşmesi ile PI-3K, aPKC, Raf-1 ve MEK yolağı için gerekli uyarım sağlanır. Böylelikle, OPN geninin transkripsiyonu etkinleşir ve OPN proteini sentezlenir (29).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu tez çalışmasında kullanılan kan örnekleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Bölümüne gelen hastalardan elde edilmiştir. Çalışmada CaOx taş oluşumu tespit edilen 92 hastadan alınan örnekler analiz edilmiştir ve böbrek taşı oluşumu tespit edilmeyen 93 birey kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Toplam 185 örneğin analizi yapılmıştır. Hastalardan ve kontrol grubundan alınan kan örnekleri DNA elde etme işlemi yapılana kadar -20°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Çalışmaya katılan bütün bireylerden bilgilendirme formları alınmış ve bu çalışma yerel etik kurul tarafından onaylanmıştır. Onay numarası: 05.02.2013/53

3.2. DNA Eldesi

Böbrek taşı hastalarından ve kontrol grubu bireylerden alınan kan örneklerinden tuzla çöktürme/kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.1. DNA elde etme işlemi

Birinci gün

Buzdolabında daha önceden EDTA’lı tüpe alınan kan örnekleri oda sıcaklığına getirilerek örneklerin çözünmesi sağlandı. 5 ml kan 14 ml’lik tüplere alınarak üzerine soğuk steril distile su eklendi ve tüpler iyice karıştırıldı. Daha sonra örnekler 4000 devir/dakika’da 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki sıvı kısım atıldı. Bu işlem en az üç defa tekrar edildi. Üçüncü santrifüjün ardından, atılan sıvı kısmın yerine her bir tüpe 3 mL üreli parçalama çözültüsü eklendi ve pelletin iyice çözünmesi sağlandı. İyice altüst edildikten sonra 400 µL %20’lik SDS ve 100 µL 10mg/mL proteinaz K eklenerek 37 °C’de 1 gece için inkübasyona bırakıldı.

İkinci gün

İnkübasyondan çıkarılan örneklere 2 mL 5M NaCl eklendi ve 10-15 dakika altüst edildi. Ardından, üzerlerine 8 mL kloroform eklenerek 4000 devir/dakika’da 15 dakika santrifüj

edildi. Santrifüj sonunda oluşan 3 kısımdan en üstteki kısım temiz bir tüpe alınarak, üzerine 2.5 ml soğuk %70'lik etil alkol eklendi. Alkol ilavesi ile çöken DNA'lar pipet ucu ile 1,5 mL'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerlerine 1000 µL %96'lik etil alkol eklendi. Tüpler 2500 devir/dakika'da 8 dakika santrifüj edilerek DNA'ların tüpün dibine yapışması sağlandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Santrifüj aşamalarından sonra etil alkol dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

Etil alkol tüplerden tamamen uzaklaştıktan sonra üzerlerine deiyonize steril su eklendi. Bir gün +4°C' de bekletilerek çözünmesi sağlanan DNA'lar saklanmak üzere -20°C' lik derin dondurucuya kaldırıldı

3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hedeflenen DNA dizisinin in vitro olarak çoğaltılmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak *Osteopontin* geninin rs1126616 bölgesi bu araştırma için çoğaltıldı. Primer çiftleri SDSC workbench internet veritabanı primer tasarlama programı kullanılarak dizayn edilmiştir. PCR reaksiyonu için kullanılacak bütün malzemeler steril edilmiştir ve PCR karışımları biyogüvenlik kabini içerisinde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonları için MJ Research ve Applied Biosystem cihazları kullanılmıştır.

3.3.1. Primer tasarımı

Primer DNA sentezinin istenilen noktadan başlamasını sağlayan nükleik asit zinciridir. Primerlerin seçimi sekans dizisindeki hedeflenen bölgeye bağlı olarak yapılmaktadır. Bu çalışmada *Osteopontin* geninin DNA dizisine göre bir çift primer primerin (NCBI Erişim Numarası: U20758.1, GI: 1001962) tasarlanmıştır. Primer tasarlama doğrudan <http://workbench.sdsc.edu> veri tabanı primer tasarlama programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve PCR ürün büyüklükleri Tablo 3.1'de gösterilmektedir

Tablo 1.3. Osteopontin geninin hedef bölgesindeki PCR ürün büyüklüğü, primer dizileri ve uygun bağlanma sıcaklıklarının gösterilmesi.

Primer Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	PCR Ürün Büyüklüğü
<i>Osteopontin</i> geni			
C6982T F	ATTCTTCATTTGTGCCGTGA	57	356 bp
C6982T R	TTTGGGGTCTACAACCAGC		

3.3.2. PCR koşullarının iyileştirilmesi

Primer çiftlerinin gradient PCR tepkimesi herhangi bir kalıp DNA kullanılarak yapıldı. PCR tepkimesi AB (Applied Biosystems) thermocycler cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi sonucuna göre uygun bağlanma sıcaklığı tespit edilmiştir.

Gradient PCR tepkimesi için kullanılan bileşenler Tablo 3.2’de gösterilmektedir.

Tablo 3.2. Toplam 25 µL hacimdeki PCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

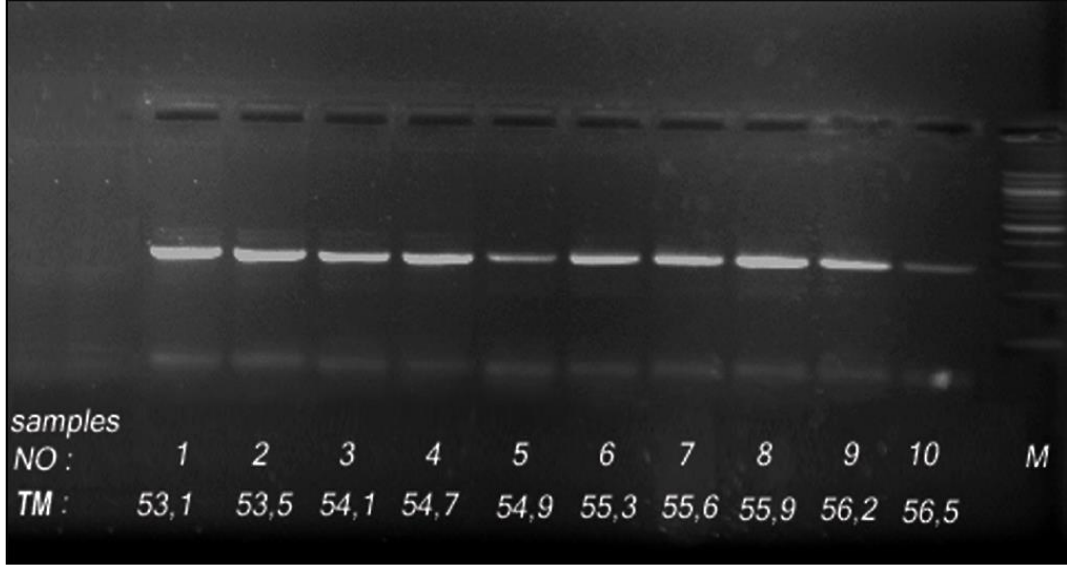
PCR Bileşenleri	Miktar (µL)
dH ₂ O	14,875
10X PCR Tamponu (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5
25 mM MgCl ₂	2
2 mM dNTP	1,5
20 mM İleri primer	1
20 mM Geri primer	1
5 U/ML Taq DNA polimeraz	0,125
DNA kalıbı	2
Toplam	25

PCR reaksiyonu için uygun program ayarlanarak toplam döngü sayısı 35 olarak belirlenmiştir. Tablo 3.3’te PCR reaksiyonu koşulları gösterilmektedir.

Tablo 3.3. Gradient PCR reaksiyonu koşulları.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman
1 . İlk denatürasyon	95	3 dakika
2 . Denatürasyon	95	30 saniye
3 . Primerin bağlanması	55- 60	30 saniye
4 . Uzama	72	30 saniye
	2’den 4’e döngü	35
5 . Son uzama	72	2 dakika
Bekleme	4	∞

PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek etidyum bromür boyama yardımıyla analiz edilmiştir. Güç kaynağı 140 voltta 30 dakika olarak ayarlanmıştır. DNA parçaları UV ışık altında görüntülenmiştir. Gradient PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntüledikten sonra primerlerin uygun bağlanma sıcaklığı 54,7 °C olarak belirlenmiştir (Resim 3.1).



Resim 3.1. Etidyum bromür boyama ile %2'lik agaroz jel elektroforezinde gradient PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: Marker (100 bp). Uygun primer bağlanma sıcaklığı olarak 4. örnek seçilmiştir.

3.4.Elektroforez

Elektroforez makromoleküllerin özellikle de proteinlerin ve nükleik asitlerin (DNA) farklı büyüklük, yük ve konformasyonuna göre saflaştırma ve ayırma işlemleri için kullanılan bir yöntemdir. Bu nedenle moleküler biyoloji ve biyokimyada kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Elektriksel alandaki moleküller yüklerine göre pozitif (anot) veya negative (katot) kutbuna doğru hareket ederler. Nükleik asitler sahip oldukları fosfat omurgasından dolayı negatif yüklü oldukları için dolaylı olarak anoda doğru hareket ederler (30). Bu çalışmada agaroz jel elektroforezi metodu kullanılmıştır.

3.4.1 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, PCR reaksiyonlarının verimliliğini ve RFLP analizlerinin sonuçlarını kontrol etmek için kullanılmaktadır. PCR ürünleri 2%'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında DNA'yı görünür kılan etidyum bromide ile boyanmıştır. Etidyum bromür (EtBr) agaroz jellerde DNA'nın boyanması için kullanılmaktadır. PCR ürünleri 140 voltta 30 dakika elektriksel alanda yürütüldü. PCR ürünlerinin büyüklüğü 365 baz çifti uzunluğundadır.

3.5. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi (RFLP)

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi tabanlı analiz, polimorfik dizinin çoğaltılıp kesilmesi diye de bilinen moleküler genetik analizler için kullanılan yaygın bir tekniktir (31). Bu yöntem hem türler arası hem de aynı tür içindeki farklılıkları tespit etmek için kullanılmaktadır (31).

Polimorfizmler popülasyonda bulunan bireylerdeki kalıtsal farklılıklardır (30). Polimorfizm terimi ile mutasyon terimi aynı anlama gelmemektedir. Mutasyonlar popülasyonda daha nadir görülür ve genellikle tümör hücrelerinde kalıtılarak aktarılmayan değişimlerdir (somatik mutasyon) (30).

Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizinde DNA dizisindeki RE tanıma dizileri, kesim bölgesindeki değişimi göstermektedir (30).

RE bölgesinin tanınmamasından dolayı polimorfizm göstermeyen bireylerin DNA'ları RFLP tespit edilen bireylere göre daha büyük DNA bulundurur (30). Yeni RE bölgelerinin oluşmasıyla restriksiyon kesim sonuçlarına göre etkilenmemiş bireylere göre 2 tane küçük parça görülür (30). Her iki durumda da polimorfizm yeni kesim parçalarının oluşmasıyla tespit edilebilir (30).

RFLP yönteminde PCR ürünleri RE enzimleri ile kesilerek elektroforezde bantların analizine göre değişiklikler tespit edilmektedir (30).

3.5.1. Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizi protokolü

- 1- Hastalardan ve kontrol grubu bireylerden alınan kan örneklerinden tuzla çöktürme/kloroform yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.
- 2- *Osteopontin* geninin hedef bölgesi PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.
- 3- Bu çalışmada *Osteopontin* geninin hedef bölgesini kesen AluI kesim enzimi kullanılmıştır.

- 4- Enzim kesimi sonrasında agaroz jel elektroforezi ile PCR ürününün fragmentleri analiz edilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada istatistik analiz ki-kare testi (chi-square test) kullanılarak yapılmıştır. $p \leq 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

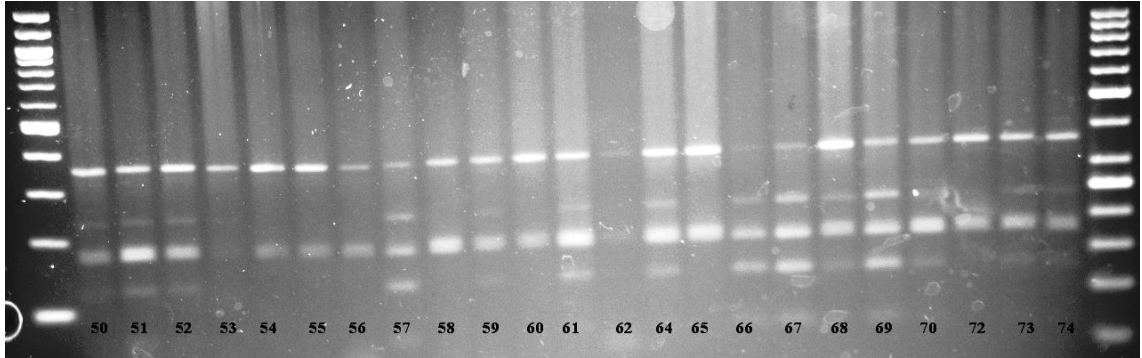
4. BULGULAR

4.1. RFLP Sonuçları

Bu tez çalışmasında, RFLP yöntemini takip eden etidyum bromür içeren agaroz jel elektroforezinde Osteopontin rs1126616 numaralı gen polimorfizmi tespit edilmiştir.

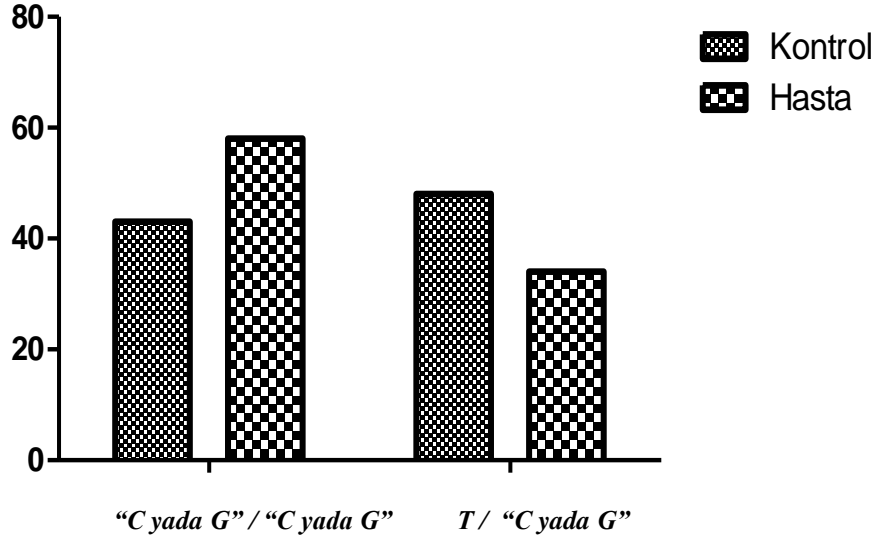
RFLP analizi sonucunda, 58 böbrek taşı ve 43 kontrol grubu örneğinde “CveyaG” / “CveyaG” genotipi gözlenirken, 48 böbrek taşı ve 34 kontrol grubu örneğinde T / “GveyaC” genotipi gözlenmiştir.

Bu pozisyondaki G yada C nükleotid değişimini belirleyebilen uygun bir kesim enzimi bulunmadığından, değişimin C yada G nükleotidi olduğunu ayırt etmek mümkün olamamıştır. Bu çalışmada, T/T genotipi gözlenmemiştir. RFLP yöntemi ile tespit edilen rs1126616 numaralı osteopontin gen polimorfizmi Resim 4.1’de gösterilmiştir.



Resim 4.1. Restriksiyon enzim analizi sonrasında DNA parçaları. Markerlar: 100 bç (soldaki), 50 bç (sağdaki). 50-52, 57, 59, 61, 64, 66-70, 73 ve 74 örneklerinde T / “C yada G” genotipi görülürken, 53-56, 58, 60, 62, 65 ve 72. Örnekte “C yada G” / “C yada G” genotipi görülmektedir.

Toplam 92 böbrek taşı hastası ve 93 sağlıklı bireyden elde edilen DNA’lar kullanılarak RFLP çalışması yapıldı. Bu çalışmada, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p=0,0317$; ki kare testi). Çalışmanın istatistiksel sonucu Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Böbrek taşı hastalarında tespit edilen rs1126616 numaralı *osteopontin* gen polimorfizminin istatistiksel analizi.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasının amacı, restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizi (RFLP) ile Osteopontin genindeki rs1126616 numaralı tek nükleotidlik polimorfizm ve böbrek taşı oluşumu arasındaki ilişkinin moleküler seviyede araştırılmasıdır.

Böbrek taşlarının çoğunluğu kalsiyum okzalat (CaOx) taşlarından oluşmaktadır (5). CaOx kristalleri genellikle renal tübüllerde oluşmaktadır ve renal epitel hücrelerinin CaOx kristallerine maruz kalması, osteopontin (OPN) de dahil birçok üriner proteinin miktarının artması ile sonuçlanmaktadır (5).

Yüksek oranda fosforilenmiş glikoprotein olan OPN ilk olarak kemikte tanımlanmıştır (5) ve OPN, adezyon molekülleri olan integrinler ve CD44 ile etkileşime giren arjinin-glisin-aspartat (RGD) amino asit dizileri içermektedir (5). OPN 32 kDa büyüklüğünde bir protein olarak sentezlenmektedir ancak fosforilasyon, glikolizasyon ve proteolitik süreç gibi translayon sonrası uzayan değişiklikler sebebiyle 45 ile 75 kDa büyüklüğünde moleküler kütleyle sahip olmaktadır (5). Osteopontin sadece idrar taşı matrisindeki ana organik bileşen olarak tespit edilmemiştir, aynı zamanda taş-oluşturan sıçanda distal tübüler hücrelerde de osteopontin protein seviyesinin arttığı bildirilmiştir (5).

Osteopontinin kemik şekillenmesi ile ilgili önemli bir kollajen olmayan protein olarak bilinmektedir (32). OPN, ilk olarak 1979 yılında kötü huylu transforme epitelial hücre hatlarında ve T-hücrelerinde tespit edildi (32). OPN geni insanda 4. kromozom üzerinde yer almaktadır (4q22.1) (7). Dördüncü kromozomda yer alan 600 kb'lık bölge içerisinde bir çok kollajen olmayan kemik ve dentin proteinleri kodlanmaktadır (25).

OPN gen polimorfizmi ve nefrolitiazis ile ilgili sınırlı sayıda yayınlanmış çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, OPN geninde tespit edilen bir polimorfizm (C/T genotipi, Ala250Ala, ekzon 7) ile böbrek taşına sahip yada ailesel nefrolitiazisli hastalarda önemli derecede ilişkili bulunmuştur (5). İnsanda bulunan OPN genindeki tek nükleotidlik değişim (A9402G, ekzon 7) ile üriner taş oluşumu arasında yüksek oranda ilişki olduğu da rapor edilmiştir (5).

Bu çalışmada, OPN geninin 7. ekzonunda C6982T, rs1126616 sessiz polimorfizm ile böbrek taşı oluşumu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. rs1126616 için T/T

genotipi ya da T allel taşıyıcılarında, rs1126616 için C yada G allel taşıyıcısı olanlara göre böbrek taşı oluşma riski daha fazla olduğu bulunmuştur (5).

Kültür edilmiş fare böbrek korteks hücreleri idrarda bulunan kemik matrisi proteini olan osteopontini salgılamaktadır (33). Osteopontin hücre çoğalması, tümör oluşumu ve aynı zamanda böbrek taşı mineral kristal büyümesini yavaşlatmaktadır (33). Hücre kültürü besiyerinden elde edilen osteopontine karşı antikolar kullanılarak, normal fare böbreklerinde osteopontinin yerleşimi gösterilmiştir (33).

Floresans, konfokal ve elektron mikroskopu ile osteopontinin daha çok Henle kulpunda yer alan hücrelerde (DTL) ve kaliks forniks bölgesinde yer alan papiller yüzey epitel (PSE) hücrelerinde bulunduğu tespit edilmiştir (33).

Immunolojik işaretleme ile lizozom ve endozomlardan alınan veziküllerde lokalizasyon tespit edilmiştir (33). Osteopontinin döngüsünü incelemek amacıyla farelere böbrek fiksasyonundan altı saat öncesinde protein sentez inhibitörü sikloheksamit (14 mg/kg) enjekte edilmiştir (33). Bu böbreklerde DTL içerisinde osteopontin gösterilerek ve papillar yüzeyde immonofloresan yanıtın azaldığı tespit edilmiştir (33). Nitekim osteopontin böbrekte taş mineral bileşiklerinin yoğun olduğu iki alanda salgılanır (33). Bu nedenle osteopontinin fizyolojik düzenlenme yoluyla hızlı bir döngüsünün olduğu düşünülmektedir (33). Osteopontin böbrek taşı oluşumuna karşı normal endojen engelleme için önemli olabilir (33)

OPN gibi bazı makromoleküllerin böbrek taşı gelişiminde önemli rollerinin olduğu üzerine çeşitli çalışmalar mevcuttur (5). CaOx kristalleri maruziyeti sonucu OPN mRNA seviyesinin arttığı gözlenmiştir ve uyarılan böbrek ve renal epitel hücre kültürlerinde OPN üretiminin arttığı bildirilmiştir (5). Kristaller ve oksalat iyonları renal fibroblastlarda OPN seviyesinin artması ile de oluşmaktadır (5). Renal epitel hücrelerin CaOx monohidrat kristallerine maruziyeti sonucu NADPH oksidaz, süperoksit üretimi ve OPN mRNA seviyesi artmaktadır (5).

Böbrek taşı oluşumunda, OPN'nin etki gösterdiği moleküler mekanizma henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (5). *OPN* geni susturulmuş farelerde yapılan bir çalışmada, diğer üriner makromoleküler proteinlerin de böbrek taşı oluşumunda rol aldığı tespit edilmiştir (5). Böbrek taşı oluşumu bir çok etkeni içeren karmaşık bir süreçtir (5).

Osteopontinin böbrek hasarına karşı, akut iskemiye karşı toleransın artırılması, uyarılmış nitrik oksit sentazın yavaşlatılması ve nitrik oksit sentezinin baskılanması, hücre peroksit

seviyesinin azaltılması ve hipoksiye maruz kalan hücrelerin hayatta kalmasını teşvik etmesi, hücre apoptozunun azaltılması ve hücrelerin yenilenmesine katılması gibi bazı koruyucu etkileri bulunmaktadır (5). Böbreklerde CaOx birikiminin uyarılması, monosit ve makrofajların yangı olan bölgeye hareket etmeleri ile ilişkidir (5). Renal epitel hücrelerinin CaOx kristallerine maruziyeti sonucu, yangısal sürece ve hücre dışı matriks oluşumuna katılan osteopontinin sentezi artmaktadır (5).

Sonuç olarak, *OPN* geninde oluşan her polimorfizm böbrek taşı oluşumunda risk faktörü olabilir ve *OPN* geninde oluşan genetik polimorfizmler bireysel nefrolitiazise karşı duyarlılığı değiştirebilir. Bu çalışmanın, daha farklı etnik gruplarda da yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- 1- Tekin G, Ertan P, Horasan G, Berdeli A. SPP1 Gene Polymorphisms Associated With Nephrolithiasis in Turkish Pediatric Patients. *Urology journal*. 2012; 9 (4): 640- 647.
- 2- www.kidney.niddk.nih.gov.
- 3- Sakhaee K, Maalouf N M, and Sinnott B. *Kidney Stones 2012: Pathogenesis, Diagnosis, and Management*. *J ClinEndocrinolMetab*.2012; 97(6):1847–1860.
- 4- Hughes P. Kidney stones epidemiology. *Nephrology* 2007; 12: S26–S30.
- 5- Gogebakan B, Igci Y Z, Arslan A, Igci M and at el. Association Between the T-593A and C6982T Polymorphisms of the Osteopontin Gene and Risk of Developing Nephrolithiasis. *Elsevier*. 2010; 41: 442- 448.
- 6- <http://www.healthcommunities.com/kidney-stones/causes.shtml>.
- 7- Fisher, W. L., Bride M.O.W., Termine, J. D, Young, Human bone sialoprotein: deduced protein sequence and chromosomal localization. *J. Biol. Chem*1990; 265: 2347- 2351.
- 8- Moore K L, PhD, FIAC, FRSM, FAAA , Anne M. R. Agur BSc (OT), MSc, PhD, Arthur F Dalley PhD. *Clinically Oriented Anatomy*. Fifth edition. 2006; 290 - 295.
- 9- Williams L and Wilkins, Snell R S. *clinical anatomy*. 7th ed. 2004.
- 10- <http://cnx.org/content/m46429/latest/?collection=col11496/latest>.
- 11- Guyton and Hall. *Medical Physiology*. Elsevier 12th edition. 2011; 303 - 306.

- 12- <http://www.kidneyfund.org/kidney-health/kidney-problems/kidney-stones.html>
- 13- Shiraga, Min, Vandusen, Clayman and at el. Inhibition of calcium oxalate crystal growth in vitro by uropontin. Another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. Proc. Natl. Acad. Sci.USA1992;89: 426- 430.
- 14- Abbagani S, Gundimeda S D, Varre S, Ponnala D, Mundluru H P. Kidney Stone Disease: Etiology and Evaluation. Jabpt. 2010; 1: 176- 182.
- 15- Edvardsson V, Indridason OS, Haraldsson G, Kjartansson O and Palsson R. Temporal trends in the incidence of kidney stone disease. Kidney International. 2012; 83: 146–152
- 16- Rodgers W, Sturrock. Selective inclusion of proteins into urinary calcium oxalate crystals: comparison between stone-prone and stone-free population groups. Journal of Crystal Growth. 2003; 259: 179–189.
- 17- Bukhari S I. metabolic evaluation of patients with recurrent stone in balochistan. 2004; 7- 9.
- 18- <http://umm.edu/health/medical/reports/articles/kidney-stones#ixzz2nBlje3NN>.
- 19- Carreras E B. Atomic force microscopy study of urolithiasis evolution in space crews during long- term missions. 2009; 10- 14.
- 20- Zhang P, Nie W and Jiang H. effect of vitamin D receptor polymorphisms on urolithiasis risk: a meta- analysis. Medical genetics. 2013; 14: 1- 14.
- 21- Linda M K. Dietary influences on urinary oxalate and risk of kidney stones. Frontiers In Bioscience 2003; 8: 584 - 594.

- 22- Basavaraj D R, Biyani C S, Browning A J, Cartledge J J. The Role of Urinary Kidney Stone Inhibitors and Promoters in the Pathogenesis of Calcium Containing Renal Stones. *European Association Urology*. 2007; 5: 126–136.
- 23- Deniarji D T and Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. 1993; 17: 1475- 1482.
- 24- Mittal R D, Bid H K, Manchanda P K and Kapoor R. Predisposition Of Genetic Polymorphism With The Risk Of Urolithiasis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2008; 23 (2) 106-116.
- 25- Rodrigues L R. SPP1 (secreted phosphoprotein 1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2009; 13(10): 733- 736.
- 26- Konya E, Umekawa T, Iguchi M , Kurita T. The Role of Osteopontin on Calcium Oxalate Crystal Formation. *European Urology* 2003; 43: 564–571.
- 27- <https://www.google.iq/#q=genetic+home+reference>.
- 28- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508357> 01/10/2012 23: 02.
- 29- Hickey F B, England K and Thomas, Cotter T G. Bcr-Abl regulates osteopontin transcription via Ras, PI-3K, aPKC, Raf-1, and MEK. *Journal of Leukocyte Biology*. 2005; 78: 289- 300.
- 30- Barril P and Nates S. *Gel electrophoresis - Principles and Basics: In Tech*. 2012.
- 31- Rasmussen H B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (2012), Dr. Magdeldin S (Ed.), ISBN: 978-953-51-0458-2.

- 32- Chiu Y-W, Tu H-F , Wang I-K, Wu C-H, Chang K-W, Liu T-Y, Kao S-Y. The implication of osteopontin (OPN) expression and genetic polymorphisms of OPN promoter in oral carcinogenesis. *Oral Oncology*. 2010;46:302-306.
- 33- Kleinman JG1, Beshensky A, Worcester EM, Brown D. Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. 1995 Jun; 47(6):1585-96.

ÖZGEÇMİŞ

29/07/1979 yılında Irak'ın Süleymaniye şehrinde dünyaya geldi. 2004-2005 döneminde Irak'ta bulunan Süleymaniye Üniversitesi, Fen Bilimleri, Biyoloji Bölümünden mezun oldu. Yüksek lisans eğitimi için Gaziantep Üniversitesi'nden kabul aldı. 2011 yılında Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Microsoft Word, PowerPoint, Excel gibi çeşitli bilgisayar programları kullanabilmektedir. Ana dili Kürtçe olmakla beraber, İngilizce, Türkçe ve iyi düzeyde Arapça bilmektedir. Evlidir.

DALSHAD SALIH MOHAMMED