

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SAĞLIKER SENDROMLU HASTALARIN SİTOGENETİK  
ANALİZLERİ ve KALSİYUMA DUYARLI RESEPTÖR GENİ 2. ve 3.  
EKZON DİZİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**BİLİM UZMANI ERDAL TUNÇ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
PROF. DR. OSMAN DEMİRHAN**

**ADANA-2011**

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**SAĞLIKER SENDROMLU HASTALARIN SİTOGENETİK  
ANALİZLERİ ve KALSİYUMA DUYARLI RESEPTÖR GENİ 2. ve 3.  
EKZON DİZİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**BİLİM UZMANI ERDAL TUNÇ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI  
PROF. DR. OSMAN DEMİRHAN**

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından  
TF2009D2 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

**Tez No:.....**

**ADANA-2011**

## TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında her aŐamada yol gstericiliğini, desteğini ve emeğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. sayın Osman DEMİRHAN'a tüm iğtenliğimle teşekkür ederim. Ayrıca, tezimin izleme komitesinde bulunan hocalarım sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a ve sayın Prof. Dr. Yahya SAĞLIKER'e yol gstericilikleri ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu çalıŐmanın yürütölmesi boyunca her türlü desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Ali İrfan GÜZEL'e teşekkür ederim. İlave olarak katkılarından dolayı Öğr. Gör. Bertan YILMAZ'a, Dokt. Öğr. Sabriye KOCATÜRK-SEL'e ve Yük. Lis. Öğr. Mehmet Ali ERKOÇ'a teşekkür ederim. Son olarak, manevi katkılarından dolayı tüm Anabilim Dalı çalıŐanlarına teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| TEŞEKKÜR   | iii  |
| İÇİNDEKİLER  | iv   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ  | vi   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ  | viii |
| ÖZET   | ix   |
| ABSTRACT   | xii  |
| 1.GİRİŞ  | 1    |
| 2.GENEL BİLGİ  | 3    |
| 2.1 Kronik Böbrek Hastalığının Kliniği   | 3    |
| 2.2 Kronik Böbrek Yetmezliği ve Genetik  | 4    |
| 2.3 Ca <sup>+2</sup> Metabolizması ve Kronik Böbrek Hastalığının Ca <sup>+2</sup><br>Metabolizması Üzerine Olan Etkisi | 8    |
| 2.4 Fosfor Metabolizması ve Kronik Böbrek Yetmezliğinin Fosfor<br>Metabolizması Üzerine Etkileri                       | 13   |
| 2.5 Vitamin D Metabolizması ve KBH   | 18   |
| 2.6 Kemik Metabolizması ile İlişkili Moleküler Süreçler ve Kronik Böbrek<br>Yetmezliği                                 | 20   |
| 2.7 Sağlıker Sendromu  | 25   |
| 2.8 Kalsiyum Reseptörü (CaSR) ve Kodlayıcı Geni  | 31   |
| 2.9 DNA Dizisi Belirleme Yöntemleri  | 34   |
| 3. MATERYAL ve METOT   | 42   |
| 3.1 Sitogenetik Çalışmalar   | 42   |
| 3.1.1 Kan Örneklerinden Kromozom Analizi   | 42   |
| 3.2 Moleküler Çalışmalar   | 43   |
| 3.2.1 DNA Eldesi   | 43   |
| 3.2.2 PCR Amplifikasyonu   | 45   |
| 3.2.3 EgsoSap İle Saflaştırma  | 46   |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.4 Dizi Analizi Reaksiyonu (BigDye)  | 47 |
| 3.2.5 Sephadex ile Saflaştırma  | 47 |
| 3.2.6 ABI 3130 Cihazına Yükleme   | 48 |
| 3.2.7 Sonuçların Değerlendirilmesi  | 48 |
| 3.3 Kullanılan Kimyasal Malzemeler  | 48 |
| 3.3.1 Sitogenetik Çalışma İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler                               | 48 |
| 3.3.2 Moleküler Çalışmalar (Dizi Analizi ve DNA Eldesi) İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler | 49 |
| 3.4 Kullanılan Aygıtlar   | 49 |
| 3.5 İstatistiksel Analiz  | 50 |
| 3.6 Sonuçları Değerlendirme İçin Kullanılan Programlar                                      | 50 |
| 4. BULGULAR   | 51 |
| 4.1 Sitogenetik Bulgular  | 51 |
| 4.2 Moleküler Bulgular  | 63 |
| 5.TARTIŞMA  | 69 |
| 6.SONUÇ ve ÖNERİLER   | 75 |
| KAYNAKLAR   | 77 |
| EKLER   | 81 |
| Ek 1 Sephadex Hazırlama   | 81 |
| Ek 2 DNA İzolasyonunda Kullanılan Başlıca Çözeltiler  | 82 |
| ÖZGEÇMİŞ  | 84 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Şekil 1</b> $Ca^{+2}$ iyonları ile uyarılan kalsiyum reseptörlerinin hücre içinde etkiledikleri yolakların diyagramatik gösterimleri.        | 9  |
| <b>Şekil 2</b> PTH'ın $Ca^{+2}$ metabolizması üzerine olan etkisinin diyagramatik ifadesi   | 11 |
| <b>Şekil 3</b> Epitel hücrelerinden $Ca^{+2}$ transportunun diyagramatik ifadesi  | 12 |
| <b>Şekil 4</b> Doğal olarak meydana gelen bazı mutasyonları da gösteren kalsiyum reseptörünün (CaSR) topolojik görünümü                         | 13 |
| <b>Şekil 5</b> Böbrek epitel hücrelerinde bulunan NaPi taşıyıcı proteinlerinin çalışma mekanizmaları  | 15 |
| <b>Şekil 6</b> Böbrek proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde PTH'ın NaPi-IIa taşıyıcı proteinlerinin yoğunluğunu belirleme mekanizmaları      | 16 |
| <b>Şekil 7</b> Kemik yıkımının kontrolü   | 20 |
| <b>Şekil 8</b> Osteoklast hücrelerinde RANKL/RANK yolağının diyagramatik görüntüsü  | 22 |
| <b>Şekil 9</b> Osteoblast hücrelerinde PTH'ın uyarımıyla harekete geçen hücre içi sinyal yolları  | 23 |
| <b>Şekil 10</b> Sağlıker sendromlu hastaların üst satırda son halleri görülürken alt satırda daha önce çekilmiş olan fotoğrafları görülmektedir | 26 |
| <b>Şekil 11</b> Normal insan ve Sağlıker sendromlu hastanın sefalometrik X-Ray görüntüleri  | 27 |
| <b>Şekil 12</b> Ciddi klas II maloklüzyonu olan dört Sağlıker sendromlu hastanın anteroposterior ve lateral yüz renkli fotoğrafları             | 28 |
| <b>Şekil 13</b> Sağlıker sendromlu hastaların yüz görünümleri   | 29 |
| <b>Şekil 14</b> Sağlıker sendromlu hastaların yüz görünümleri   | 30 |
| <b>Şekil 15</b> Sekiz ekzon içeren CaSR geninin genomik organizasyonu   | 33 |
| <b>Şekil 16</b> CaSR geni kodlayıcı dizisinde bazı baz değişimlerini gösteren diagram.  | 34 |
| <b>Şekil 17</b> Polimeraz zincir reaksiyonu   | 36 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Şekil 18</b> Sanger -Coulson metodu ile DNA sekans analizi  | 38 |
| <b>Şekil 19</b> DNA bantlarının jel üzerinde görüntülenmesi  | 39 |
| <b>Şekil 20</b> Maxam ve Gilbert yöntemi ile DNA sekans analizi  | 41 |
| <b>Şekil 21</b> Sağlıker sendromlu hastalarda gözlenen bazı yapısal kromozom düzensizliklerinin kısmi karyotip görüntüleri | 57 |
| <b>Şekil 22</b> Sağlıker sendromlu hastalarda gözlenen bazı sayısal kromozom düzensizliklerinin karyotip görüntüleri       | 59 |
| <b>Şekil 23</b> Sağlıker sendromlu hastalarda gözlenen bazı sayısal kromozom düzensizliklerinin karyotip görüntüleri       | 59 |
| <b>Şekil 24</b> CaSR 2. ekzon bölgesinin PCR ile çoğaltıldığını gösteren jel görüntüsü                                     | 64 |
| <b>Şekil 25</b> CaSR geni 2. ve 3. ekzonları oluşturan DNA dizileri  | 67 |
| <b>Şekil 26.</b> İkinci ekzon 14 ve 19. örneklere ait kısmi elektroferogram görüntüleri                                    | 68 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|   |    |
|---|----|
| <b>Çizelge 1</b> Kronik böbrek hastalığı nedenleri  | 4  |
| <b>Çizelge 2</b> Sağliker sendromunun evreleri  | 27 |
| <b>Çizelge 3</b> RPMI1640 medyumunun hazırlanışı  | 42 |
| <b>Çizelge 4</b> İkinci ekzon için PCR karışımının hazırlanışı                                    | 45 |
| <b>Çizelge 5</b> Üçüncü ekzon için PCR karışımının hazırlanışı                                    | 45 |
| <b>Çizelge 6</b> Dizi analizi reaksiyonunun hazırlanışı   | 47 |
| <b>Çizelge 7</b> Dizi analizi için PCR şartları   | 47 |
| <b>Çizelge 8</b> Sitogenetik bulgular   | 54 |
| <b>Çizelge 9</b> Sitogenetik bulgular   | 60 |
| <b>Çizelge 10</b> Saptanan bazı önemli yapısal düzensizliklerin idiyogram üzerindeki gösterimleri | 62 |
| <b>Çizelge 11</b> İkinci ekzon için dizi analizi sonuçları  | 65 |
| <b>Çizelge 12.</b> Üçüncü ekzon için dizi analizi sonuçları                                       | 66 |

## ÖZET

### Sağlıker Sendromlu Hastaların Sitogenetik Analizleri ve Kalsiyum Duyarlı Reseptör (CaSR) Geni 2. ve 3. Ekzon Dizilerinin Belirlenmesi

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), nefron sayısında azalma ve fonksiyonlarında bozulma şeklinde seyreden ve sıklıkla son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanan patofizyolojik bir süreçtir. Kronik böbrek hastalarının (KBH) bir kısmında Sağlıker sendromu olarak adlandırılan farklı bir klinik tablo gelişmektedir. Bu sendroma yakalanan hastalarda klinik olarak kronik böbrek hastalığının yanı sıra sekonder hiperparatiroidizm, oldukça ağır yüz-çene değişiklikleri, oldukça ağır psikolojik problemler ve depresyon meydana gelmektedir. Bu hastalarda, laboratuvar bulguları olarak hiperfosfatemi ve hipokalsemi gözlenir.

Sağlıker sendromuna dönüşen kronik böbrek hastalığı tablosu için bazı genetik yatkınlık faktörlerinin sorumlu olabilecekleri düşünülmektedir. Bu çalışmada, genetik yatkınlık faktörlerinden biri olabileceği düşüncesiyle,  $Ca^{+2}$  iyonunun düzeyini düzenleyen kritik öneme sahip kalsiyum reseptör proteini ve onu kodlayan kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR) geninin sekans analizi yapılmıştır. CaSR geni, 3. kromozomun q13.3-21 bölgesine lokalize ve 103 kb büyüklüğünde bir gendir. Bu gen sekiz ekzon içermektedir. CaSR, G proteinine eşlenik olarak çalışan bir reseptördür. Aynı zamanda, hücre zarını yedi kez kateden protein süper ailesinin (C ailesi) bir üyesidir. Binyetmişsekiz aminoasit büyüklüğünde bir proteindir. CaSR, ağırlıklı olarak paratiroid bezi hücrelerinde, tiroid bezinin C hücrelerinde ve böbreklerde ifade edilir.

Bu çalışmada; toplam olarak 23 hastanın CaSR geninin 2 ve 3. ekzonlarının sekans analizleri gerçekleştirildi. İkinci ekzon için 3 hastada, 70239 pozisyonundaki A bazının delesyona uğramış olduğu saptandı. İki hastada 70471'de A>G heterozigot nükleotid değişimi ve 1 hastada 70622'de T>C heterozigot nükleotid değişimi bulundu. Ekzon 3 için 11

hastada, 73724 pozisyonunda G>A homozigot nükleotid değişimi tespit edildi. Bir hastada, 73724'de G>A heterozigot nükleotid değişimi saptandı. Ekzon 2'de 70622 pozisyonu, kodlama yapan bölgenin içerisindedir. Bu noktada, TTT kodonunun sonundaki T nükleotidinin C'ye dönüştüğü gözlemlendi. Yeni kodon TTC şeklinde dir. Bu baz değişimi literatürde tanımlıdır ve her iki kodon da fenilalanin aminoasidini kodlamaktadırlar. Diğer baz değişimleri kodlama yapan bölgelerin dışındadırlar. Bulgularımız, CaSR geninin 2 ve 3. ekzonlarındaki saptadığımız nükleotid değişimlerinin Sağlıker sendromu hastalığının ortaya çıkışında ve gelişiminde etkili olmadıklarını ortaya koymuştur.

Çalışmamız kapsamında 23 Sağlıker sendromlu hasta ile 23 kontrol bireyin karyotipleri de çalışıldı. Karyotip analizleri yapılan hastalardan 5'nin (%21.8) tüm metafaz plaklarının normal kromozom kuruluşuna (46,XX/46,XY) sahip olduğu bulundu. Bu hastalardan 4'ünün erkek ve 1'inin kız cinsiyetine sahip olduğu rapor edildi. Geriye kalan 18 (%78.2) hastanın incelenen metafaz plaklarında bir ya da daha fazla sayıda sayısal ve/veya yapısal kromozom düzensizliklerine rastlandı. Saptanan başlıca yapısal kromozom düzensizlikleri; 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, X ve Y kromozomları üzerindeki hasarlardır. Bunların içerisinde 9qh+ oluşumu, 2q23 bölgesindeki gap oluşumu, chtb(2)(q23), chtb(2)(p31) ve fra(2)(p23) şeklindeki oluşumlar, 13ps+ ve Yq+ oluşumları, 4q22-qter ve 4q31 bölgelerinde kromozom kaybı ve kromatid kırığı, gap(6)(q21) oluşumu, del(10)(p13-pter), del(10)(p15) ve gap(10)(q22)x2 şeklindeki hasarlar, Xp22.1-pter ve q13.2-qter bölgelerinde kayıplar özellikle önemlidirler. Bunlarla birlikte, bulunan sayısal kromozom düzensizlikleri içerisinde kromozom 10, 13, 19, 22 ve Y monozomileri öne çıkmaktadırlar.

Tüm hastalarda incelenen toplam 639 hücrede 241 (%37.7) kromozom düzensizliği tespit edildi. Bu kromozom düzensizliklerinin %88'inin yapısal ve %12'sinin sayısal düzensizlikler olduğu saptandı. Kontrol grubu olarak 23 erkek birey çalışıldı. Kontrol grubundan incelenen 1150 hücrede 182 (%15.8) yapısal düzensizlik bulundu. Hasta grubu ile kontrol grubu

arasında yapılan karşılaştırmada hastalarda kromozom düzensizlik oranının anlamlı bir şekilde artmış olduğu ( $p<0.05$ ) tespit edildi .

**Anahtar kelimeler:** Sağlıker, sendrom, kalsiyum, DNA, dizi, sitogenetik, analiz

## **ABSTRACT**

### **Cytogenetic Analyses and Sequencing of Exon 2 and 3 of Calcium Sensing Receptor (CaSR) Gene in Sagliker Syndrome Patients**

Chronic kidney disease, as a patho-physiological process, is characterized by declining number of functioning nephrons in the course of time and frequently develops to end stage kidney failure. Some patients suffering from chronic kidney disease develop sagliker syndrome. Sagliker syndrome patients, in addition suffering from kidney disease, develop seconder hyperparathyroidism and serious facial deformities and also they suffer from psychological problems and depression. In these patients, as laboratory findings, hypocalcemia and hyperphosphatemia also develop.

In chronic kidney disease patients, having bad prognosis (turning into Sagliker syndrome), it is plausible to think that they are genetically predisposed. In this study, keeping in mind that it could be a genetic predisposition factor and also because of CaSR protein is critically important for calcium homeostasis in the body, exons 2 and 3 of CaSR coding gene sequenced. CaSR, consisted of 1078 amino acid, is a receptor which functions via G protein and a member of seven times membrane spanning protein super family (C family). CaSR is expressed predominantly by parathyroid gland cells, thyroid C cells and kidney. CaSR gene is localized on chromosome 3q13.3-21 region, consisted of 103 kb and 8 exons.

In this study, exon 2 and 3 of CaSR gene of 23 patients were sequenced. For exon 2, 3 patients had adenin base deletion at the position of 70239. Two patients had A>G heterozygote alteration at the position of 70471 and also 1 patients had T>C heterozygote alteration at the position of 70622. For exon 3, G>A homozygote alteration at the position of 73724 was detected in 11 patients and also G>A heterozygote alteration at the position of 73724 was detected in 1 patient. For exon 2, at the position of

70622 T altered to C and finally codon TTT altered to codon TTC, both of which coding phenylalanine amino acid, resulting in no protein sequence alteration. According our findings, there is no any relation between etiology and progression of sağliker syndrome and nucleotide alterations we found in exon 2 and 3 of CaSR gene.

In the scope of our study, we also did karyotype analysis of 23 sagliker syndrome patients and 23 control cases. 5 out of 23 patients (21.8%), four male and one female, had normal karyotype in all metaphase plaques. Remainder 18 patients (%78.2) had structural or numerical chromosomal abnormalities at least in one metaphase plaque or more. Important structural chromosome abnormalities, we found are related to chromosomes 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, X and Y. These abnormalities go as follow, 9qh+, gap(2)(q23), chtb(2)(q23), chtb(2)(p31), fra(2)(p23), 13ps+, Yq+, del(4)(q22-qter), chtb(4)(q31), gap(6)(q21), del(10)(p13-pter), del(10)(p15), gap(10)(q22)x2 Xp22.1-pter and q13.2-qter. Important numerical chromosome abnormalities we found are monosomies of chromosome 10, 13, 19, 22 ve Y.

In another classification, we evaluated 639 metaphase plaques in 23 patients and we found 241 chromosome abnormalities of which 88% were structural and 12% were numerical abnormalities. In control group we studied 23 male individuals. For this group, we totally examined 1150 metaphase plaques and we found 182 (15.8%) chromosome abnormalities. We found stastically significant increase in the ratio of chromosomal abnormalities in patients compared to controls ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** Sagliker, syndrome, calcium, DNA, Sequence, cytogenetic, analyze

## 1. GİRİŞ

Kronik böbrek hastalığı (KBH), çeşitli nedenlerden dolayı ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak nefron kaybının meydana gelmesi ile karakterize bir sendromdur<sup>1</sup>. Klinik açıdan KBH, semptom göstermeyen böbrek fonksiyon azalmasından üremiye kadar değişen bir spektrum gösterir. Başka bir tanıma göre kronik böbrek yetmezliği, nefron sayısında azalma ve fonksiyonlarında bozulma şeklinde seyreden, sıklıkla son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanan patofizyolojik bir süreçtir. Son dönem böbrek yetmezliği durumunda, geri dönüşümsüz olarak böbrek fonksiyonunda bozulma meydana gelmektedir. Bu hastaların yaşamlarını sürdürebilmeleri diyalize veya böbrek transplantasyonuna bağlı hale gelmekte ve sonuçta üremi gelişmektedir. Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda; KBH'lı olguların %30'unda etiolojinin belirsiz olduğu, önde gelen belirli nedenler arasında sırasıyla kronik glomerulonefrit, kronik pyelonefrit/interstisyel nefrit, hipertansiyon ve diyabetik nefropatinin bulunduğu dikkati çekmiştir.

Kronik böbrek hastalarının bir kısmında Sağlıker ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan Sağlıker sendromu hastalık tablosu gelişmektedir. Bu sendroma yakalanan hastalarda, klinik olarak KBH'nın yanı sıra sekonder hiperparatiroidizm oldukça ağır yüz ve çene değişiklikleri ve yine oldukça ağır psikolojik problemler ve depresyon meydana gelmektedir. Anlaşılacağı üzere bazı kronik böbrek hastalarında Sağlıker sendromu gelişmektedir.

Genetik yönünden ele alındığında, Sağlıker sendromuna dönüşen KBH tablosu için bazı genetik yatkınlık faktörlerinin sorumlu olabileceği akla gelmektedir. Bu noktada Sağlıker sendromu olgularında laboratuvar bulguları olarak saptanan hiperfosfatemi, hipokalsemi ve buna bağlı olarak gelişen sekonder hiperparatiroidizm bulguları ön plana çıkmaktadırlar. Bilindiği gibi vücutta bu iyonların düzeyleri karmaşık mekanizmalarla düzenlenmektedir. Bu karmaşık mekanizmaların elemanları olan proteinlerde meydana gelebilecek olan kalıtsal bir değişiklik KBH'nın seyrini etkileyebilir. Buradan anlaşılacağı

üzere, çok sayıda protein faktör bu iyonların düzenlenmesinden sorumludurlar. Bu çalışmada,  $Ca^{+2}$  iyon düzeyinin düzenlenmesi açısından kritik önemde olan kalsiyum reseptör proteini ve onu kodlayan kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR) geninin sekans analizi yapıldı. Toplam olarak 23 hastanın CaSR genlerinin 2. ve 3. ekzonlarının dizi analizleri yapıldı. Mali kaynak yetersizliği nedeni ile diğer ekzonların sekans analizleri gerçekleştirilemedi. Ayrıca bu hastaların yapısal ve sayısal kromozom düzensizlik düzeyleri de incelendi.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1 Kronik Böbrek Hastalığının Kliniği

Kronik böbrek hastalığı (KBH), çeşitli nedenlerden dolayı ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak nefron kaybının meydana gelmesi ile karakterize bir sendromdur<sup>1</sup>. Klinik açıdan KBH, semptom göstermeyen böbrek fonksiyon azalmasından üremiye kadar değişen bir spektrum gösterir. Aslında böbrek yetmezliği, birbiri içine girmiş evreleri ihtiva eden klinik bir tablo gösterir.

KBH'nın erken evresinde sadece böbreğin fonksiyonel rezervinde azalma vardır. Bu safhada böbreğin regülatör, biyosentez ve ekspresyon fonksiyonları genellikle iyi olduğu için klinik belirti ve bulgu yoktur. Orta evrede azotemi oluşur ve anemi gibi bazı klinik belirtiler ortaya çıkabilirse de çoğunlukla hastalar yine semptom göstermezler. Ancak, infeksiyon, hipovolemi, obstrüksiyon ve nefrotoksik ilaç kullanımı gibi araya giren akut stresler hastayı hızla üremik tabloya sokar. Geri dönüşümlü faktörlerin düzeltilmesiyle hasta sıklıkla eski durumuna döner. İleri evre böbrek yetmezliğinde glomerular filtrasyon oranı (GFO) %30'un altındadır. Böbreğin regülatör, biyosentez ve ekspresyon fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması, halsizlik, niktüri ve kemik ağrıları gibi klinik belirti ve bulguların ortaya çıkmasına neden olur. Son dönem böbrek hastalığında, böbrek fonksiyonlarının ileri derecede kaybı sonucunda giderek artan azotemi ve hemen hemen her organ sistemi ile ilgili belirti ve bulgular ortaya çıkar. Terminal dönemde ortaya çıkan bu klinik sendrom üremi olarak tanımlanır<sup>1</sup>.

KBH'nın çok çeşitli nedenleri vardır. Toplumlar arasında büyük değişkenlikler görülür. Genel olarak en sık görülen nedenler arasında kronik glomerulonefritler, diyabetik nefropati, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, obstrüktif üropati ve interstisyel nefritler yer alır<sup>1</sup>. Hastaların önemli bir kısmı hekime üremik tablo ile başvurduğu için temelde yatan hastalığın bulunması böbrek biyopsisi yapılması halinde bile mümkün olmayabilir. Ülkemizde de bu grubun oranı halen yüksek seyretmektedir. KBH'nın ABD' de en sık rastlanılan

nedenleri diyabetik nefropati ve hipertansiyon iken diğer ülkelerin çoğunda glomerulonefritler ve pyelonefrit/interstisyel nefritler gelmektedir<sup>1</sup>. Avusturyada ise analjezik nefropatisi önemli bir hastalık olarak görünmektedir. Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda, KBH'lı olguların %30' unda etiolojinin belirsiz olduğu, önde gelen belirli nedenler arasında sırasıyla kronik glomerulonefrit, kronik pyelonefrit/interstisyel nefrit, hipertansiyon ve diyabetik nefropatinin bulunduğu dikkati çekmiştir. KBH' nın çeşitli ülkelerdeki nedenleri çizelge 1' de gösterilmiştir.

**Çizelge 1. Kronik Böbrek Hastalığı Nedenleri<sup>1</sup>**

| Hastalık                        | Avrupa % | ABD % | Türkiye% |
|---------------------------------|----------|-------|----------|
| Glomerulonefrit                 | 25       | 17    | 20.7     |
| Diyabetes Mellitus              | 12       | 33    | 9.4      |
| Hipertansiyon                   | 10       | 29    | 13.2     |
| Polikistik Böbrek Hastalığı     | 8        | 4     | 3.3      |
| Analjezik nefropatisi           | 2        | 1     | 0.7      |
| Pyelonefrit/interstisyel nefrit | 17       | ?     | 19.7     |
| Nedeni belirsiz                 | 15       | 15    | 29.9     |

## **2.2 Kronik böbrek yetmezliği ve Genetik**

Kronik böbrek yetmezliği, nefron sayısında azalma ve fonksiyonlarında bozulma şeklinde seyreden ve sıklıkla son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanan patofizyolojik bir süreçtir. Son dönem böbrek yetmezliği durumunda, geri dönüşümsüz olarak renal fonksiyonda bozulma meydana gelmektedir. Bu hastaların yaşamlarını sürdürebilmeleri diyalize veya böbrek transplantasyonuna bağlı hale gelmekte ve sonuçta üremi gelişmektedir. KBH'ya yol açan pek çok etmenden söz edilebilir. Fakat sıklıkla, hastalık sürecinde önce böbrekler kitle olarak küçülürler. Renal kitledeki azalmaya paralel olarak geriye kalan nefronların fonksiyonlarında artma ve hipertrofi meydana gelir. Hipertrofi, gelişen hiperfiltrasyona bağlı olarak meydana gelir. Sonuçta, kalan nefron kitlesi skleroz sürecine girer ve fonksiyonlarını kaybetmeye başlar. Kronik böbrek yetmezliğinin (KBY) gelişimi sürecinde gözlenen bireysel farklılıklar, sistemle ilişkili genlerin çeşitlilik göstermelerinden kaynaklanıyor olabilir.

Kronik böbrek yetmezliği hastalığının erken döneminde bulgular ancak laboratuvar düzeyinde olurlar. Bunun için en sık kullanılan laboratuvar ölçümleri serum üre ve kreatinin konsantrasyonlarıdır. Serum üre ve kreatinin değerlerinin hafif yükselmiş olması dahi kronik nefron hasarına işaret eder. Glomerular filtrasyonun düştüğünün göstergesi olarak serum üre ve kreatinin konsantrasyonları yükselse bile glomerular filtrasyon normalin %30'una kadar düşmedikçe hastalar semptom göstermeyebilirler. Bununla birlikte, çok dikkatli bir şekilde yapılan muayenede genellikle renal yetmezliğin erken klinik ve laboratuvar bulguları ortaya çıkarılabilir. Bu bulgular niktüri, hafif anemi, hafif güç kaybı, iştah azalması ve erken beslenme bozuklukları şeklindedirler. Laboratuvar bulguları olarak kalsiyum ve fosfor düzeylerinde anormallikler görülür. Glomerular filtrasyon %30'un altına düştüğü zaman üremik belirtiler artar, klinik tablo ağırlaşır ve biyokimyasal parametrelerde sapmalar görülür. Böylece, ağır böbrek yetmezliği tablosu gelişmiş olur. Glomerulonefrit, diyabetik nefrit ve hipertansif nefrit sıklıkla kronik böbrek yetmezliğine sürükleyen etmenlerdir. İlave olarak, yaşlılarda renovasküler hastalıklar sebebiyle kronik böbrek yetmezliği gelişebilir. Tek genli geçiş gösteren hastalıklar, kronik böbrek yetmezliğine sürükleyen etmenler arasında az ama önemli bir grubu oluştururlar. Bu hastalıklar, otozomal dominant kalıtım gösteren polikistik böbrek hastalığı ve Alport'un herediter nefriti şeklindedirler<sup>2</sup>.

**Otozomal dominant kalıtım gösteren polikistik böbrek hastalığı:** Genetik olarak heterojenite gösteren bu hastalığın en az üç farklı gende meydana gelen mutasyonlarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu genler polycystic kidney disease 1 (PKD1), polycystic kidney disease 2 (PKD2) ve henüz bilinmeyen üçüncü bir gen şeklindedirler. PKD1 geni mutasyonları, otozomal dominant kalıtım gösteren polikistik böbrek hastalığı vakalarının %85'inden sorumludurlar. Bu gen 16 kromozomun p13.3 bölgesine lokalize olmuştur. Olguların geriye kalanlarından, 4q21-23 bölgesine lokalize olmuş PKD2 geninde meydana gelen mutasyonlar sorumludurlar. Bu her iki gene ait mutasyonların saptanmadığı olgularda üçüncü bir gendeki mutasyonların hastalığın gelişmesine yol açtığı düşünülmektedir<sup>2,3</sup>.

**Alport'un herediter nefriti:** Alport sendromu, ilerleyici renal yetmezlik ile karakterize kalıtsal nefrit özelliğinde bir hastalıktır. X kromozomuna bağlı kalıtım gösterir. Glomerular membranda eksprese edilen tip IV kollajeni oluşturan alt ünitelerden birini kodlayan gen olan COL4A5'te (collagen, type IV, alpha 5) meydana gelen mutasyonlar bu klinik tablodan sorumludurlar. COL4A5 geni, Xq22 bölgesine lokalize olmuştur. Bunun dışında tip IV kollajenin yapısını katılan iki farklı kollajen proteini daha bulunmaktadır. Bu proteinler, otozomal kromozomlar üzerine lokalize olmuş COL4A3 (2q36-37) ve COL4A4 (2q35-q37) genleri tarafından kodlanırlar. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar da Alport sendromuna yol açarlar. Ancak, bu genlerdeki mutasyonların yol açtıkları Alport sendromu vakalarına oldukça ender rastlanmaktadır<sup>4,5</sup>.

Kronik böbrek yetmezliğine sürükleyen Tip I, II diabetes mellitus ve esansiyel hipertansiyon hastalıkları ise poligenik kalıtım modeline uyarlar. Bu hastalıkların gelişim süreçlerine katılan genlerin belirlenmesi çalışmaları devam etmektedir. Son zamanlarda reflü nöropatisinin de genetik yolla aktarılan bir hastalık olabileceği yönünde kanıtlara ulaşılmıştır. Ancak her durumda, hastalık genetik geçiş gösterebilir veya göstermez, genel etiyolojik faktörlerden bağımsız olarak hasta bireylerde hastalığın gelişim seyri çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitliliğin temelinde genetik farklılıkların yattığı düşünülmektedir. Bu genetik farklılıkların anlaşılması hastalara uygulanacak tedavi protokolleri bakımından yönlendirici olacaktır. Kronik böbrek yetmezliğinin gelişimine doğrudan etkisi olduğu ispat edilmiş olan bir gen bildirilmiştir<sup>2</sup>. Bu gen, anjiyotensinin çevrilmesini sağlayan enzimi (Angiotensin converting enzyme, ACE) kodlayan gendir.

Kromozom 17'nin p23 bölgesine lokalize olmuş olan ACE geni diabetik nefropati, glomerulonefrit, polikistik böbrek hastalığı, ürolojik anomaliler ve kronik böbrek hastalığının dahil olduğu bir grup hastalığın gelişimi sürecinde, dolayısıyla renal fonksiyonun progresif olarak bozulması sürecinde rol almaktadır. Bu genin allelerinde gözlenen polimorfizmler, kodlanan enzimin aktivitesinde değişimlere yol açarlar. ACE geninin her iki allelini de etkileyen homozigot delesyonların kronik böbrek yetmezliğinin gelişimi için büyük risk oluşturdukları saptanmıştır<sup>2,6</sup>.

Kronik böbrek yetmezliğinin ileri evrelerinde hastalarda üremi gelişir. Üremi, normal olarak idrarla atılan metabolizma son ürünlerinin kanda birikmesinden kaynaklanan ve kompleks multiorgan bozukluğu ile karakterize klinik bir tablodur. Dolayısıyla, üremi tablosunun ortaya çıkmasında etkili olan çeşitli etmenler vardır. Bu etmenlerden birincisi, protein ve aminoasitlerin metabolize olmaları sonucu oluşan son ürünlerin kanda birikmeleri ve bunların oluşturduğu toksik durumdur. Buna karşın, yağ ve karbohidratlar üremi tablosunun oluşumu bakımından ikinci derecede önemlidirler. Çünkü, yağ ve karbohidratlar, su ve CO<sub>2</sub> 'ye metabolize olurlar, dolayısıyla son ürünleri su ve CO<sub>2</sub>'dir. Su ve CO<sub>2</sub> ise deri yoluyla atılabilirler. Ancak üremi tablosunun ortaya çıkması sadece metabolitlerin kanda birikmesi ile ilişkili değildir. Bu tablonun ortaya çıkmasında ikinci derecede etkili olan etmen, kronik böbrek yetmezliğine bağlı olarak böbreklerin metabolik ve endokrin fonksiyonlarının bozulmasıdır. Böbrekler normalde bazı proteinleri ve polipeptitleri katabolize ederler<sup>2</sup>. Bunların başında PTH ve metabolitleri gelir<sup>7</sup>. Ayrıca, bu proteinler arasında leptin ve sitokinler de önemlidirler. Üremi durumunda her ikisinin de serum düzeyleri yükselir. Bunun yanında kronik üremi hastalarında C reaktif protein düzeyi de yükselir. Buna karşın bu hastalarda albümin düzeyi düşer<sup>8</sup>.

Ayrıca böbrekler, eritropoetin, 1,25-dihidrooksisivitamin D gibi bileşikler sentez ederler ve salgırlarlar<sup>2,7</sup>. Kronik böbrek yetmezliğine bağlı olarak bu işlev de bozulur. Bütün bu değişimlerin meydana getirdikleri dengesizliğin sonucu olarak PTH, insülin ve prolaktin gibi polipeptid hormonların plazma düzeyleri de yükselir. Bu hormonların seviyelerindeki yükselme, renal atılımın azalmış olmasının yanında, sekresyonun artmış olmasına da bağlıdır. Sonuçta, kronik böbrek yetmezliğine bağlı olarak anemi, malnütrisyon, karbohidrat metabolizma bozukluğu, yağ ve protein metabolizma bozuklukları, enerji kullanımında yetersizlik ve kemik metabolizma bozuklukları gibi durumlar gelişir<sup>2</sup>.

Üremi tablosunun ortaya çıkmasını sağlayan üçüncü etmen sıvı, elektrolit ve asit-baz dengelerinde meydana gelen bozulmadır. Glomerular filtrasyon normal düzeyde olduğunda günde 24.000 milimol'un üzerinde Na<sup>+</sup> filtre edilir. Düzenli olarak filtre edilen bu sodyum yükünün büyük bir bölümü tübüllerden tekrar geri emilir. Genellikle, %1'in altındaki bir kısmı idrarla atılır. Bundan dolayı

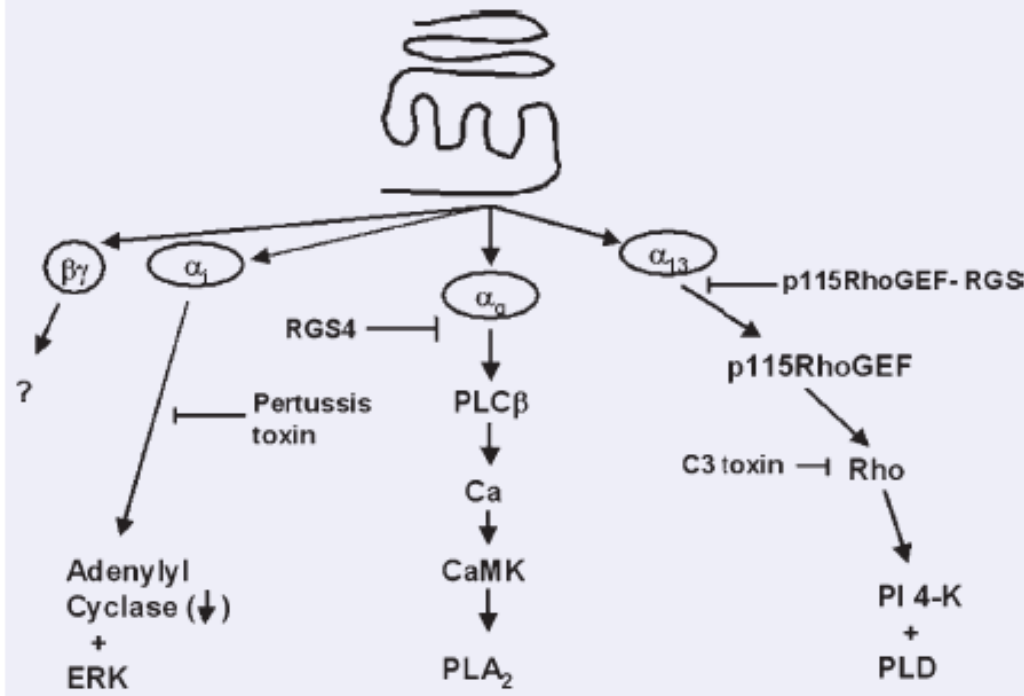
glomerular filtrasyon %10'un altına düşse bile vücut  $\text{Na}^+$  hemostazını koruyabilmektedir. İlerleyici nefron kaybı ile karakterize hastalıklarda; kısmen altta yatan etiyolojik hastalığa (glomerular veya tübulointerstisyel hastalık), verilen diüretik tedaviye ve  $\text{Na}^+$  dengesini etkileyen kalp yetmezliği ve siroz gibi hastalıklara bağlı olarak  $\text{Na}^+$  düzeyi yükselebilir, düşebilir veya normal bir seyir izleyebilir.

Kronik böbrek yetmezliği olgularında genellikle  $\text{K}^+$  düzeyi çok büyük oranda etkilenmez. Hiperkalemi ve hipokaleminin geliştiği olgulara rastlanabilir. Kronik böbrek yetmezliği hastalığının son evrelerinde genellikle metabolik asidoz gelişir. Bunun nedeni, özellikle protein metabolizması sonucu oluşan  $\text{H}^+$  iyonlarının böbrekler yoluyla atılamamasıdır<sup>2</sup>. Kronik böbrek hastalığı açısından ekstra önemli olmaları nedeniyle kalsiyum iyonu, fosfor içeren bileşikler ve vitamin D bileşiğinin normal metabolizmalarının KBH'dan nasıl etkilendiklerinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılması önemlidir.

### **2.3 $\text{Ca}^{+2}$ Metabolizması ve Kronik Böbrek Hastalığının $\text{Ca}^{+2}$ Metabolizması Üzerine Olan Etkisi**

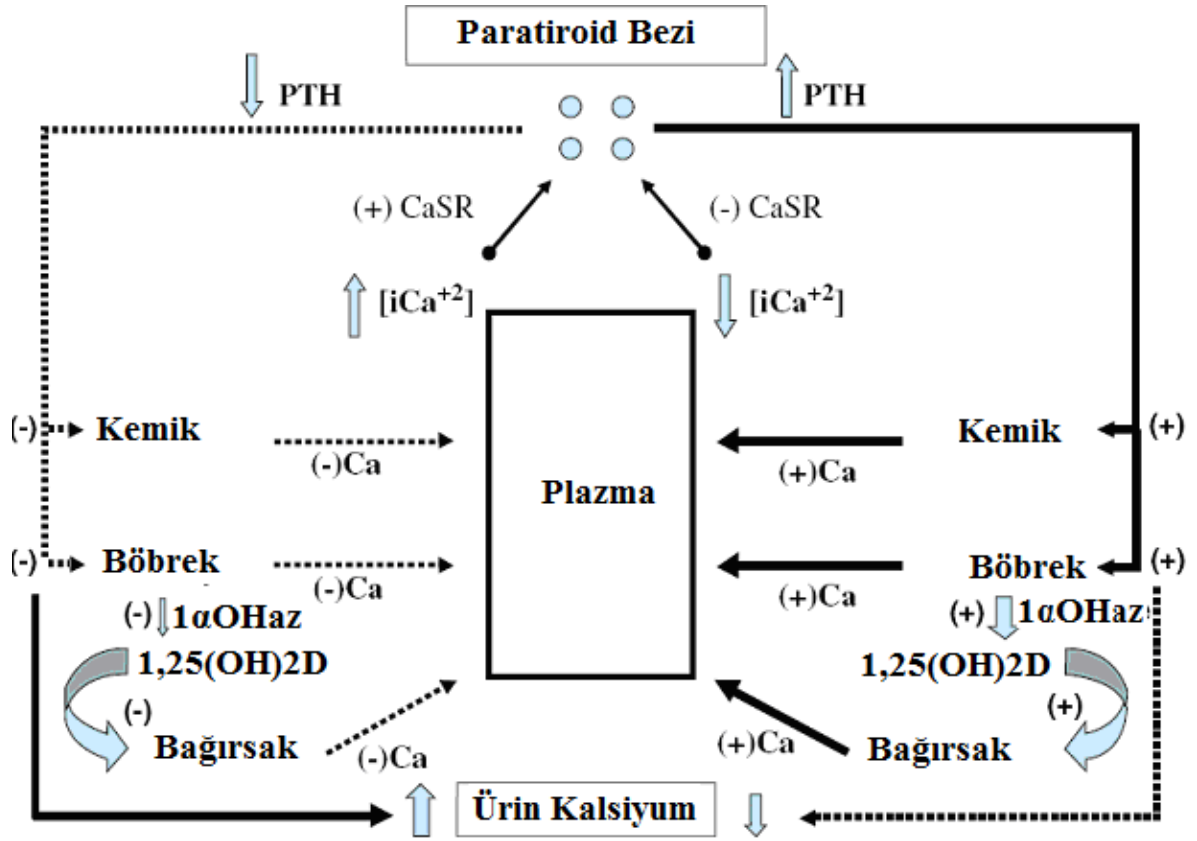
$\text{Ca}^{+2}$  iyonu, önemli bir takım biyolojik süreçlerde rol alan çok kritik bir iyondur.  $\text{Ca}^{+2}$  iyonunun görevleri arasında bulunan hücre zarının çalışmasına katkıda bulunma ve hücre içi sinyal iletimi sürecine katılma konumuz açısından önemlidirler. Kalsiyum tuzları, kemik dokusunun önemli bir kısmını oluştururlar. Bu şekilde kalsiyum tuzları kemik dokusunun dayanıklı olmasında ve doku bütünlüğünün sağlanmasında rol alırlar. Kalsiyum ekstraselüler sıvı içerisinde proteinlere bağlı olarak (özellikle albümine), çözünebilir bileşikler halinde (sitrat gibi anyonlarla bileşik oluşturarak) ve iyonize şekilde olmak üzere üç formda bulunur. Bunlar içerisinde en önemli form, kalsiyumun iyonize formudur. Serbest kalsiyum iyonları kalsiyum kanalları ve kalsiyuma duyarlı reseptörler aracılığı ile hücre zarı ile etkileşirler. Vücut, serum kalsiyum düzeyini dar bir aralıkta tutabilmek için bir takım mekanizmalardan oluşan bir sistem geliştirmiştir. Bu sistemin parçaları olarak intestinal yolda kalsiyum emilimi ve sekresyonu, böbrek yolu ile kalsiyum atılımı ve kemik dokusunda depolanma/dokudan salınma olayları önemlidirler<sup>9,10</sup>.

Kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesi bakımından önemli bir yapı da paratiroid bezidir. Bu bez salgıladığı PTH hormonu aracılığıyla ekstraselüler sıvıda bulunan  $Ca^{+2}$  iyonu düzeyini çok kısa zaman aralığında düzenler. PTH bu düzenlemeyi, renal tubular  $Ca^{+2}$  transportu ve kemik dokusu ile ekstraselüler sıvı arasındaki  $Ca^{+2}$  iyon değişimi üzerine etki ederek yapar. Uzun sürede PTH, intestinal  $Ca^{+2}$  emilimi üzerine de etki eder ve bu üç yolla kandaki iyonize kalsiyum düzeyini sabit bir aralıkta tutar. Paratiroid doku hücrelerinin zarlarında bol miktarda kalsiyuma duyarlı reseptörler (CaSR) bulunmaktadır. Bu reseptörler sayesinde paratiroid bezi kandaki iyonize kalsiyum düzeyinde meydana gelen en ufak değişiklikleri hissetmektedir. PTH hormonunun salgılanması buna göre düzenlenmektedir. Sonuçta PTH hormonu da kan  $Ca^{+2}$  düzeyini ayarlamaktadır. Kandaki iyonize kalsiyum konsantrasyonu düştüğü zaman (kronik böbrek yetmezliğinde olduğu gibi) paratiroid bezi hücrelerinde bulunan kalsiyum reseptörleri inaktive olmaktadır (Şekil 1). Bunun sonucunda paratiroid bezinden PTH salınımı meydana gelmektedir.



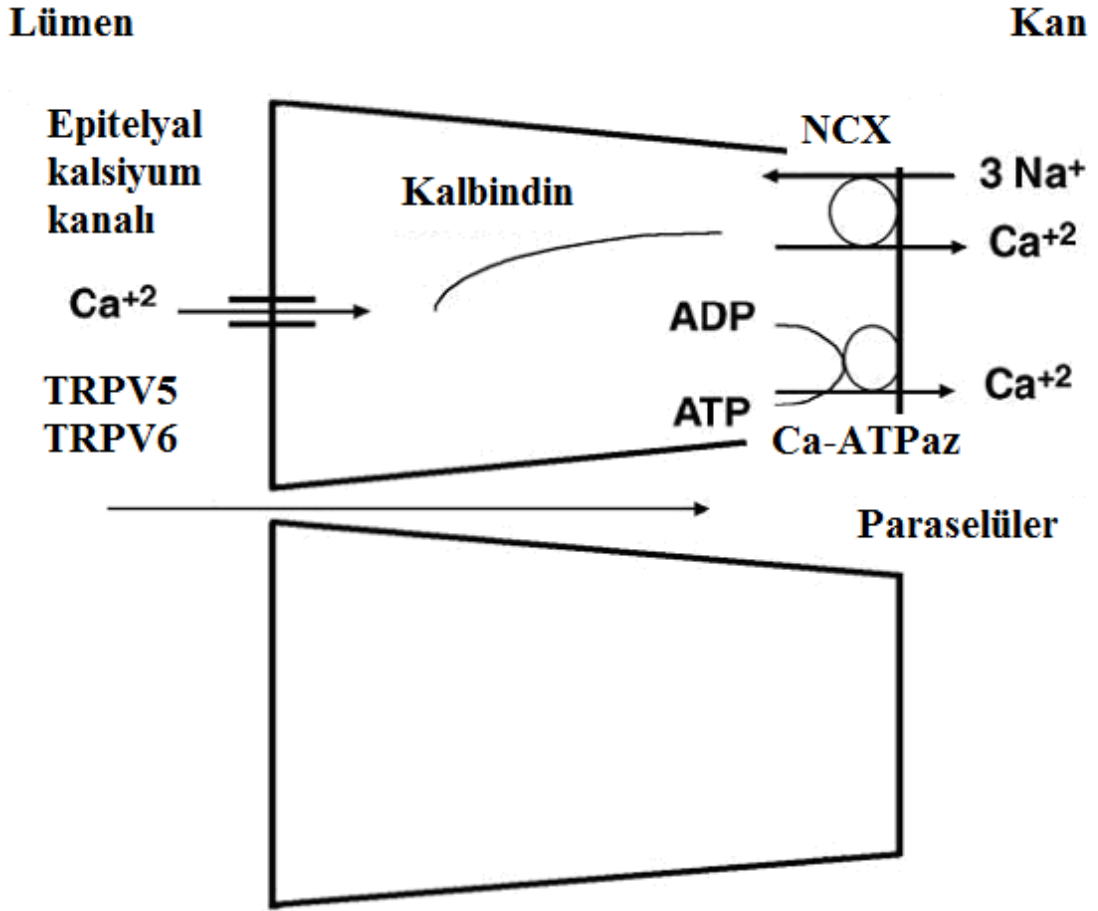
**Şekil 1.**  $Ca^{+2}$  iyonları ile uyarılan kalsiyum reseptörlerinin hücre içinde etkiledikleri yolların diyagramatik gösterimleri. Kalsiyum reseptörleri bir zaman diliminde ve bir hücre içerisinde bu yolların tamamını uyardırmayabilirler. Ancak, farklı hücre tiplerinde kalsiyum reseptörlerinin bu yolları uyardıkları anlaşılmıştır. Paratiroid bezi hücrelerinde bulunan kalsiyum reseptörleri, aktifleştiklerinde bir hücre içi mekanizmayı harekete geçirirler. Sonuçta, PTH hormonunun sentezi ve salınımı inhibe olur<sup>11</sup>.

Kanda PTH düzeyinin yükselmesine bağlı olarak renal tubular  $Ca^{+2}$  geri emilimi artmakta ve idrarla atılan  $Ca^{+2}$  düzeyi düşmektedir. Buna ilave olarak PTH iskelet sisteminin bir parçası olan kalsiyum havuzundan  $Ca^{+2}$  salınımını teşvik eder. Bu da yine kandaki  $Ca^{+2}$  seviyesinin düzenlenmesine katkıda bulunur. Bu iki yönlü cevap PTH hormonuna verilen erken cevabı (dakikalar veya saatlar içerisinde meydana gelen yanıt) oluşturur. Eğer plazma PTH düzeyi uzun süre yüksek kalırsa böbrekte 1,25 dihidrooksivitamin D sentezi ve salınımı artar. Bunun sonucunda, PTH'ya karşı oluşan geç yanıt olarak intestinal  $Ca^{+2}$  emilimi artar. Bu da plazma  $Ca^{+2}$  düzeyini ayarlayan üçüncü mekanizmayı oluşturur. Buna karşın kandaki  $Ca^{+2}$  iyonu konsantrasyonunda meydana gelen artış paratiroid kalsiyum reseptörlerini aktive eder. Bu aktivasyonun sonucunda PTH sentezi ve salınımı inhibisyona uğrar (Şekil 1). PTH düzeyinde meydana gelen düşmeye bağlı olarak idrarda  $Ca^{+2}$  atılımı artar, kalsiyum havuzundan daha az kalsiyum salınımı olur. Böylece, kandaki iyonize kalsiyum konsantrasyonu düşürülür. Eğer, plazma PTH düzeyi uzun süre düşük kalırsa renal 1,25 dihidrooksivitamin D üretimi azalır, buna bağlı olarak intestinal  $Ca^{+2}$  emilimi de azalır. Bu da kan  $Ca^{+2}$  düzeyini uygun aralığa getiren üçüncü mekanizmayı oluşturur (Şekil 2).



Şekil 2. PTH'nin  $Ca^{+2}$  metabolizması üzerine olan etkisinin diagramatik ifadesi<sup>10</sup>.

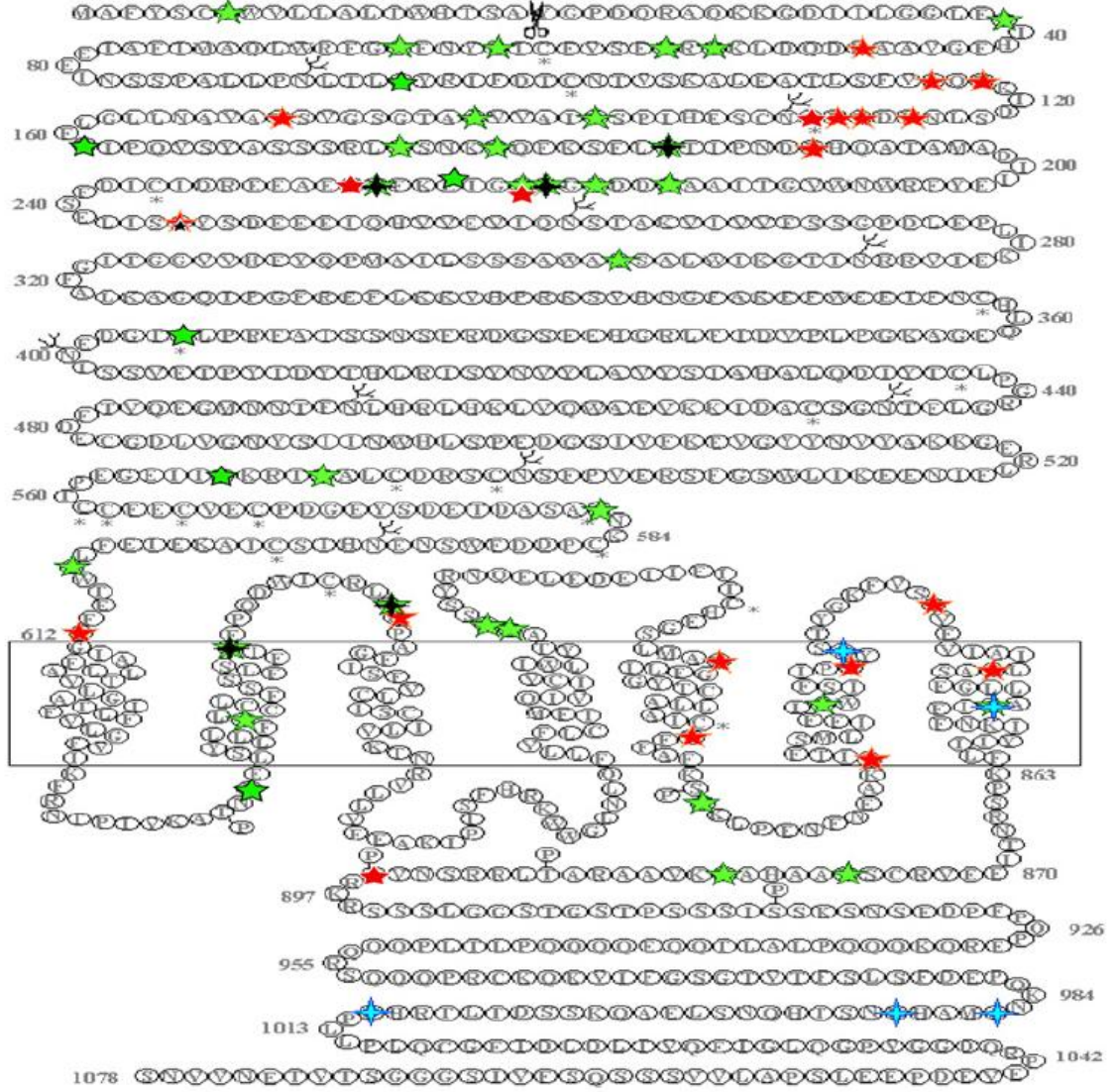
Böbrekten  $Ca^{+2}$  geri-emilimi ile bağırsaklardan  $Ca^{+2}$  emiliminin moleküler mekanizmaları da aydınlatılmıştır (Şekil 3). Her iki durumda da epitel hücreleri (renal tubular epitel ve intestinal epitel) aracılığıyla  $Ca^{+2}$  transportu meydana gelmektedir. Dolayısıyla, mekanizma birbirine benzerdir. Buna göre,  $Ca^{+2}$  iyonları epitel hücrelerinin apikal zarlarında bulunan kalsiyum kanalları (TRPV5 ve TRPV6) aracılığıyla epitel hücrelerine giriş yaparlar. Epitel hücrelerine geçen  $Ca^{+2}$  iyonları hücre içi serbest kalsiyum dengesini bozmamak için kalbindin D (calbindin D) adı verilen bir proteine bağlanırlar. Buna göre  $Ca^{+2}$  iyonları kalbindin D proteinine bağlı olarak epitel hücrelerinin apikal membranlarından bazolateral membranlarına taşınırlar. Bazolateral membranda bulunan Na- $Ca^{+2}$  değişiminden sorumlu proteinler (sodium-calcium exchanger, NCX) ve Ca-ATPaz enzimi yardımıyla  $Ca^{+2}$  iyonları epitel hücrelerinden dolaşıma aktarılırlar. Kalbindin D proteini vitamin D'ye bağımlı bir proteindir. Vitamin D, TRPV5 ve TRPV6 proteinlerinin sentezlerini de etkilemektedir<sup>10</sup>.



**Şekil 3.** Epitel hücrelerinden  $\text{Ca}^{+2}$  transportunun diagramatik ifadesi<sup>10</sup>.

Kronik renal yetmezlik durumunda, serum  $\text{Ca}^{+2}$  konsantrasyonu normal değerlerin altına düşer<sup>8</sup>. Bunun önemli nedenlerinden birisi kronik böbrek hastalıklarında azalan renal fonksiyona bağlı olarak 1,25 dihidrooksivitamin D düzeyinin düşmesidir. Bununla birlikte, diyetle alınan D vitamini miktarı da, D vitamini metabolitlerinin düzeylerini etkiler. Bu noktada, kronik böbrek hastalığına bağlı olarak meydana gelen D vitamini düzeyindeki düşmenin intestinal  $\text{Ca}^{+2}$  emilimini olumsuz etkileyeceği ifade edilmelidir. İlave olarak, hafif renal yetmezliklerde hipokalsiüri görülür. Bu durum intestinal kalsiyum alımının azalması ve PTH hormonunun etkisiyle böbreklerden kalsiyum atılımının azalmasına bağlanabilir<sup>10</sup>. Dolayısıyla kronik böbrek yetmezliği hastalığında vitamin D noksanlığına ve fosfor düzeyinin yükselmesine bağlı olarak, kan kalsiyum konsantrasyonunu belli bir aralıkta tutmak için, paratiroid bezinden normalden daha fazla miktarda PTH salgısı olur. Sonuçta sekonder

hiperparatiroidizm gelişir, Bu da kan kalsiyum düzeyinin belli bir aralıkta tutulabilmesi açısından önemlidir. Şekil 4'de  $Ca^{2+}$  reseptörünün topolojik görüntüsü şematize edilmiştir.



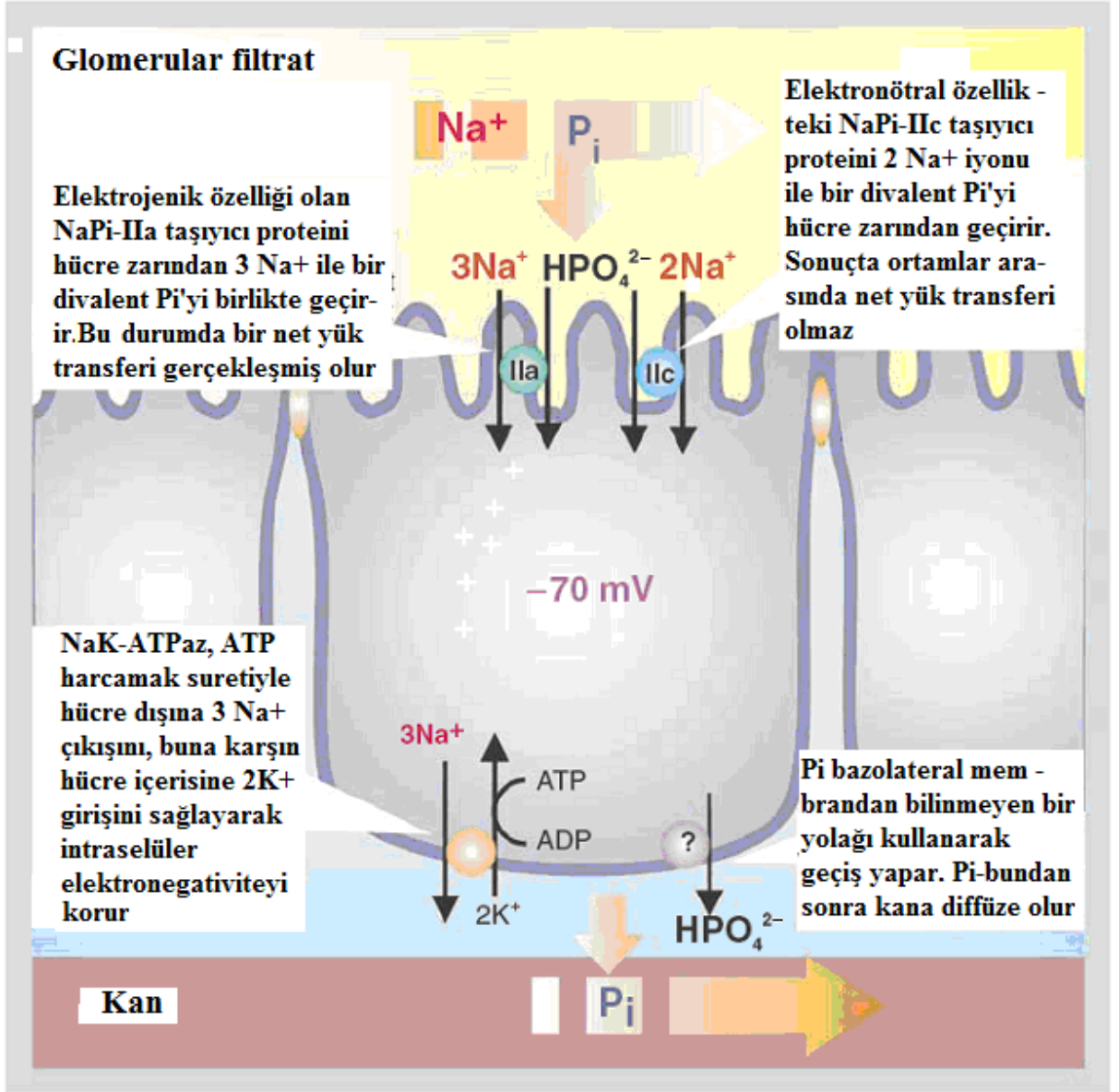
**Şekil 4.** Doğal olarak meydana gelen bazı mutasyonları da gösteren kalsiyum reseptörünün (CaSR) topolojik görünümü<sup>12</sup>.

## 2.4 Fosfor Metabolizması ve Kronik Böbrek Yetmezliğinin Fosfor Metabolizması Üzerine Etkileri

Fosfor, kalsiyuma benzer şekilde ağırlıklı olarak mineralize iskelet dokularında hidroksiapatit formunda bulunur. Fosfor içerikli bileşikler hücre içi muhtevanın önemli bir kısmını oluştururlar. Vücutta bulunan fosforun % 15'lik kısmı kas dokusu gibi yumuşak dokularda, %1'lik kısmı da ekstraselüler sıvıda

bulunur. Diyetle fosfor alımı özellikle proteinler aracılığı ile olur. Böbrekleri normal olarak işlev gören sağlıklı kişilerde vücudun total fosfor dengesi nötral bir seyir izler. İdrar yolu ile atılan fosfor miktarını, kemik dokusu ve intestinal sistemden ekstraselüler sıvıya geçen fosfor miktarı belirler. Bazal şartlar altında yetişkinlerde diyetle alınan kadar fosfor idrar ile atılır. Ancak, sağlıklı kişilerde idrar ile fosfor atılım kapasitesi oldukça büyüktür. Renal fonksiyon, kapasitesinin % 20 ile 25'inin altına düştüğünde diyetle alınan kadar fosforun atılması güçleşir. Bunun sonucunda, fosfor tutulumu gelişir ve serum fosfor düzeyi yükselir. Bu kişilerde, fosfor içerikli diyetlere kısıtlama getirilerek durum telafi edilmeye çalışılır. İskelet sisteminin dönüşümüne bağlı olarak her gün 125-150 mg fosfor ekstraselüler sıvıya katılır ve ekstraselüler sıvıdan ayrılır. Buradan anlaşılacağı üzere, eğer metabolik bir kemik hastalığı yok ise, iskelet sistemine katılan ve sistemden ayrılan fosfor miktarı birbirine eşittir. Bu dengenin bozulduğu durumlarda, sağlıklı renal fonksiyon gösteren bireylerde, idrar ile atılım serum fosfor düzeyinin normal seyretmesini sağlar. Kronik böbrek hastalıklarına bağlı olarak (böbreklerin rezidüel fonksiyon gösterdikleri veya fonksiyonlarını tamamen kaybettikleri olgularda) sekonder hiperparatiroidizm gelişen hastalarda kemik dokusunda fosfor salınımı artar ve hiperfosfatemi gelişir<sup>10</sup>.

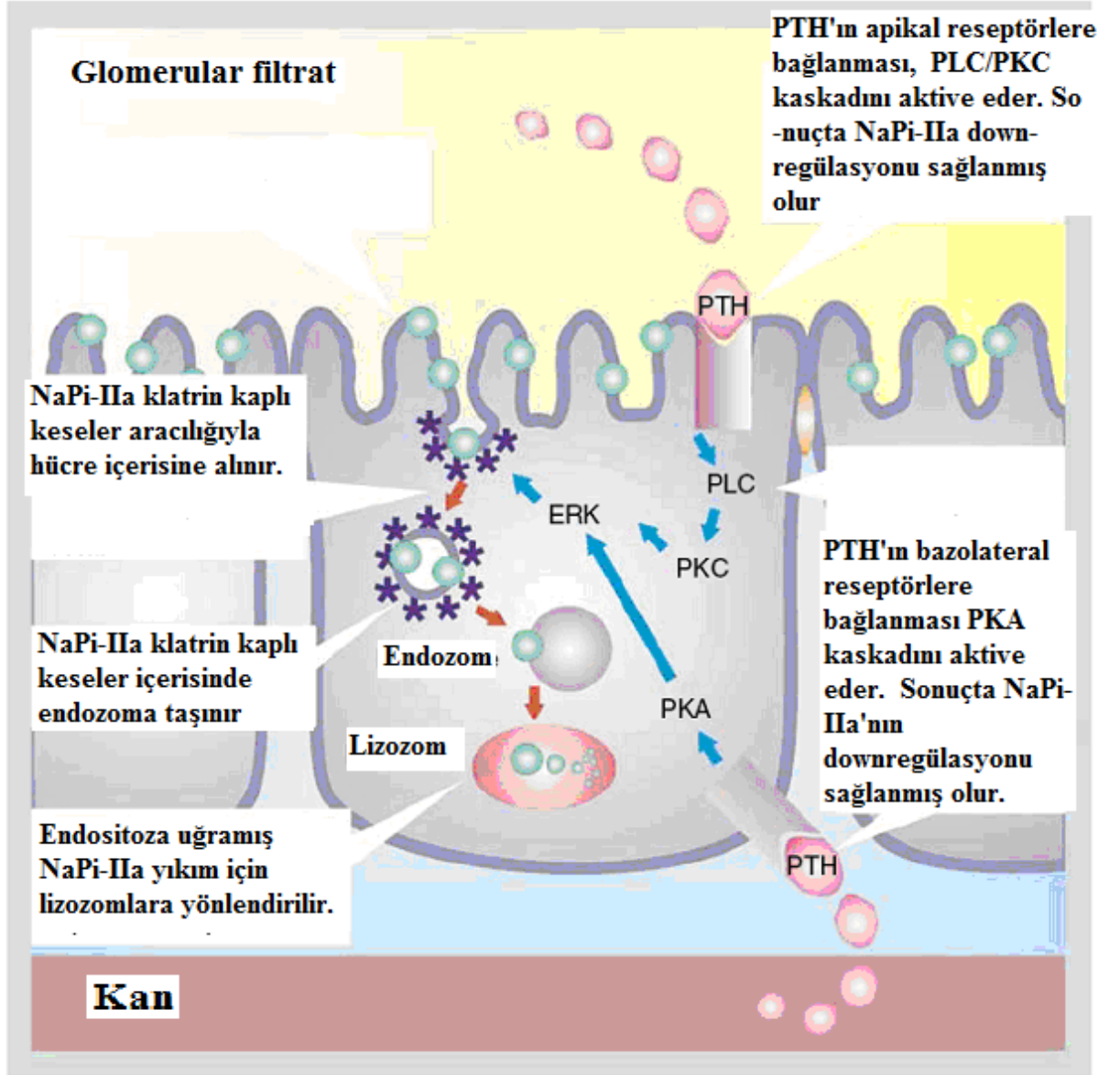
Yukarıda ifade edildiği gibi fosfor hemostazının sağlanması için bağırsak ve böbrek epitel hücreleri tarafından koordineli bir şekilde fosfor transportu gerçekleştirilmelidir. Epitel hücrelerinin apikal membranları boyunca fosfor taşınması üç çeşit taşıyıcı protein aracılığıyla gerçekleşir. Bu proteinler, SLC34 protein ailesinin üyeleridirler. Bu proteinlerden NaPi-IIa (SLC34A1) ve NaPi-IIc (SLC34A3) böbrek proksimal tübüllerinin epitel hücrelerinde sentez edilirler ve bu epitel hücrelerinin fırça kenar membranlarına lokalize olurlar. Görevleri böbrek proksimal tübüllerinde fosfor geri emilimini sağlamaktır. Buna karşın NaPi-IIb taşıyıcı proteini (SLC34A2) bağırsak epitel hücrelerinde sentezlenir ve bu epitel hücrelerinin fırça kenar membranlarına lokalize olurlar. Bu taşıyıcı protein de diyetle bağırsak lümenine geçen fosforun emiliminde rol alır<sup>13</sup> (Şekil 5).



**Şekil 5.** Böbrek epitel hücrelerinde bulunan NaPi taşıyıcı proteinlerinin çalışma mekanizmaları<sup>13</sup>.

Fosfor metabolizmasının düzenlenmesi açısından paratiroid hormon ile fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) olarak isimlendirilen iki hormon ana elemanlar olarak işlev görmektedirler. Bunların yanında kemik dokusunun ana hücreleri olan osteoblastlar aracılığıyla kemik dokusuna fosfor alınımında dolayısıyla iskelet sisteminin mineralizasyonunda rol oynayan başka bazı faktörler de tanımlanmışlardır. Bunların başlıcaları; X kromozomu üzerinde bulunan endopeptidazlara homoloji gösteren fosfat düzenleyici gen (PHEX), matriks ekstraselüler fosfoglikoprotein (MEPE) ve dentin matriks protein 1

(DMP1) faktörleridir. Bu şekilde fosfor metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan proteinlere/faktörlere **fosfatoninler** denir<sup>10</sup>.



**Şekil 6.** Böbrek proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde PTH'ın NaPi-IIa taşıyıcı proteinlerinin yoğunluğunu belirleme mekanizmaları<sup>13</sup>.

Paratiroid hormonu, proksimal tübüllerde epitel hücrelerinin apikal ve bazolateral membranlarında bulunan reseptörlere bağlanır. İlişkili reseptörlerin PTH ile uyarılması sonucunda epitel hücrelerinin fırça kenar (apikal) membranlarında bulunan NaPi-IIa taşıyıcılarının miktarında azalma meydana gelir. Bunun sonucunda, üriner fosfor atılımı artar. PTH hormonu, proksimal

tübül epitel hücrelerinin apikal membranlarındaki reseptörlerle etkileştiğinde hücre içerisinde fosfolipaz C/ protein kinaz C (PKC) yolağının aktifleştirir. Buna karşın, bazolateral membranda bulunan reseptörlerle etkileşen PTH, hücre içerisinde cAMP/protein kinaz A yolağını faaliyete geçirir. PTH'ın uyardığı yollar nihai olarak NaPi-IIa taşıyıcılarının endositoz ile içeri alınmalarına ve lizozomlar aracılığı ile yıkılmalarına yol açarlar (Şekil 6). Diyetle yüksek miktarda Pi alınması da apikal membrandaki NaPi-IIa taşıyıcı yoğunluğunu düşürür. Bu olayın mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak sonuçta, yine NaPi-IIa taşıyıcılarının endositozla içeri alındıkları ve lizozomlarla yıkıldıkları saptanmıştır. Fosfat metabolizması ile ilişkili bazı hastalıklarda bu proteini kodlayan gende mutasyonlar saptanmıştır<sup>13</sup>.

Fosfor metabolizmasının düzenlenmesi açısından önemli olan ikinci hormon FGF23'tür. FGF23 fosfatürik hormonu, baskın olarak osteositler tarafından sentezlenen 32 kDa büyüklüğünde bir proteindir. Temel etkinliği, böbreklerde sodyum-bağımlı fosfat geri emilimini inhibe etmektir. Bunu NaPi-II taşıyıcı proteinlerinin ekspresyon düzeylerini düşürerek sağladığı gösterilmiştir. Bunun yanında, FGF23'ün proksimal tubullerde meydana gelen 1 $\alpha$ -hidroksilaz aktivitesini üzerine de inhibe edici bir etkisi vardır. FGF23 hormonunun bu etkinliği sonucunda fosfatüri ve dolaşımdaki 1.25(OH)<sub>2</sub> D seviyesinde düşme meydana gelir. 1.25(OH)<sub>2</sub> D bileşiğinin dolaşımdaki seviyesinin düşmesi intestinal olarak fosfat emilimini düşürür. Bu mekanizmalar aracılığıyla FGF23 hormonu dolaşımdaki fosfat düzeyinin düzenlenmesine katkıda bulunur. FGF 23 hormonunun sentezi ve işlevi üzerinde etkin olmaları nedeniyle PHEX, MEPE ve DMP1 faktörleri de fosfor metabolizması açısından önemlidirler. Ancak bu faktörlerin FGF23 hormonunun sentezi ve işlevi üzerine olan etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Dolaşımdaki fosfat ve 1.25(OH)<sub>2</sub> D bileşiklerinin seviyelerinde meydana gelen yükselmelerin FGF23 hormonunun sentezini arttırdığı saptanmıştır. Dolayısıyla dolaşımdaki fosfat ve 1.25(OH)<sub>2</sub> D bileşikleri ile FGF23 hormonu arasında karşılıklı olarak birbirini düzenleme şeklinde döngüsel bir ilişki vardır<sup>10,14</sup>.

Fosfor hemostazı bakımından vitamin D sterolleri de son derece önemlidirler. D vitamini sterolleri, bağırsak epitel hücrelerinin apikal

membranlarında sodyum-fosfor birlikte geçişini arttırmak suretiyle bağırsaklardan fosfor emilimini teşvik ederler. Bunun yanında, diyetle alınan dolayısıyla dolaşıma katılan fosfor düzeyi, böbreklerde üretilen 1 $\alpha$ -hidroksilaz ve kalsitriyol bileşiklerinin üretim düzeylerini etkilemektedir. Dolayısıyla fosfor düzeyi ile vitamin D sterollerini arasında da karşılıklı olarak birbirlerinin konsantrasyonlarını düzenleme ilişkisi bulunmaktadır. Böbreklerin, fosfor metabolizmasında anılan önemli rollerinden dolayı; ilerlemiş kronik böbrek hastalığında fosfor tutulumu veya hiperfosfatemi önemli bir gösterge olarak karşımıza çıkar. Özellikle, böbreklerin fonksiyon düzeyi %20'nin altına düştüğünde belirgin olarak hiperfosfatemi gelişir. Yeterli beslenen diyaliz hastalarında hemen daima hiperfosfatemi gelişir. Ayrıca yine fosfor tutulumu veya hiperfosfatemi, paratiroid hiperplazisine yol açmak suretiyle gelişen sekonder hiperparatiroidizm tablosunu daha da ağırlaştırabilir<sup>10</sup>.

## **2.5 Vitamin D Metabolizması ve KBH**

Vitamin D'nin iki formu bulunmaktadır. Bunlar; vitamin D3 (kolekalsiferol) ve vitamin D2 (ergokalsiferol) şeklindedirler. İnsan sağlığı açısından özellikle, vitamin D3 formu önemlidir. Buna göre, vitamin D3 güneş ışığına veya ultraviyole ışığa maruz kalan deride oluşmaktadır. Ayrıca, besin maddeleri ile de alınabilmektedir. Vitamin D3, vücuda alındıktan sonra öncelikle karaciğerde hidroksilasyona uğrar ve 25-hidroksivitamin D3 bileşiğine dönüşür. Bundan sonra, ikinci olarak böbrekte hidroksile olur ve 1,25 dihidroksivitamin D3 (1,25(OH)2D) bileşiğini oluşturur. Böbrekte meydana gelen bu hidroksilasyon olayını 1 $\alpha$ -hidroksilaz enzimi katalize etmektedir. 1,25(OH)2D bileşiği vitamin D'nin aktif metabolitidir ve bağırsaklardan kalsiyum emilimini uyarmaktadır. Bu şekilde oluşan 1,25(OH)2D bileşiğinin paratiroid hücreleri, osteoblastlar ve intestinal enterositler bağlamında hücre içi etki mekanizması da aydınlatılmıştır. Buna göre; dihidroksile vitamin D bileşiklerinin sitozolik reseptörleri (vitamin D reseptörü, VDR) bulunmaktadır. Dihidroksile vitamin D bileşikleri öncelikle bu sitozolik reseptörlere bağlanırlar. Bu şekilde oluşan ligand reseptör kompleksi daha sonra çekirdeğe geçer. Bu kompleks çekirdek içerisinde önce retinoid X reseptörüne bağlanır, oluşan yeni kompleks bundan sonra ilgili genlerin

promoter bölgelerinde bulunan vitamin D cevap elemanlarına (vitamin D response element) bağlanır. Bu bağlanma, DNA'da konformasyonel değişime yol açar. Bunun sonunda, DNA'ya bağlı kompleks çekirdek içerisinde bulunan başka proteinlerle etkileşir. Bu bağlanma ve etkileşmelerin sonucunda ilişkili genlerin transkripsiyonları artar veya azalır. Örneğin, kemik dokusunda vitamin D reseptör (VDR) aktivasyonu sonucunda osteokalsin proteinin sentezi artarken, tip I kollajen ve kemik sialoproteininin sentezleri azalmaktadır. Bunun yanında, böbreklerde VDR aktivasyonuna bağlı olarak 50 genin (CaSR geni de dahil olmak üzere) transkripsiyonunun arttığı, buna karşın 40 genin (renin geni de dahil olmak üzere) transkripsiyonunun azaldığı saptanmıştır. Bağırsak hücrelerinde ise VDR aktivasyonuna bağlı olarak kalbindin proteinin sentezi artar. Bu artışa bağlı olarak emilim ile alınan  $Ca^{+2}$  iyonlarının hücre içerisinde, hücreye zarar vermeden taşınmaları sağlanır. Bu şekilde,  $Ca^{+2}$  emilimi artırılır. Bunun dışında, hücre yüzeyinde bulunan vitamin D reseptörlerine de rastlanmıştır. Bu reseptörler, aktive olduklarında ikincil haberci mekanizması ile hücre içi sinyal şebekeleri ile etkileşirler. Sonuçta kalsiyum akımında, adiposit metabolizmasında ve antiapoptotik yollarda değişimler meydana gelir<sup>15,16</sup>.

Normal koşullar altında kalsitriyolün, paratiroid bezi üzerine direk ve dolaylı etkileri vardır. Kalsitriyolün, paratiroid bezinde pre-pro-PTH transkripsiyonunun azaltıcı etki yapması, direk etkiyi ifade eden bir durumdur. Ayrıca, kalsitriyol intestinal  $Ca^{+2}$  emilimini ve kemik dokudan  $Ca^{+2}$  salınımını arttırıcı etkide bulunur. Sonuçta, yükselen  $Ca^{+2}$  iyon konsantrasyonu paratiroid bezinden PTH salınımını azaltır. Bu da kalsitriyolün dolaylı etkisini ifade etmektedir. Kalsitriyolün paratiroid bezi üzerine olan bu etkilerinden dolayı, kronik böbrek yetmezliğine bağlı olarak gelişen hiperparatiroidizimin bir nedeni de azalmış renal kalsitriyol sentezidir. Vitamin D'nin aktif metaboliti (kalsitriyol) normal şartlarda proksimal tübülde üretilir. Kronik böbrek yetmezliğinde gelişen hiperfosfatemiye bağlı olarak renal  $1\alpha$ -hidroksilaz enzimi baskı altına girer. Dolayısıyla KBH tablosunda, hastalığın bizzat kendisinden kaynaklı ve gelişen hiperfosfatemi kaynaklı olarak vitamin D metabolizması bozulur. Ayrıca, bazı araştırmacılar üremik hastalarda paratiroid dokusunda kalsitriyol reseptörlerinin sayısında azalma olduğunu da ileri sürmüşlerdir. Normalde, vitamin D'nin



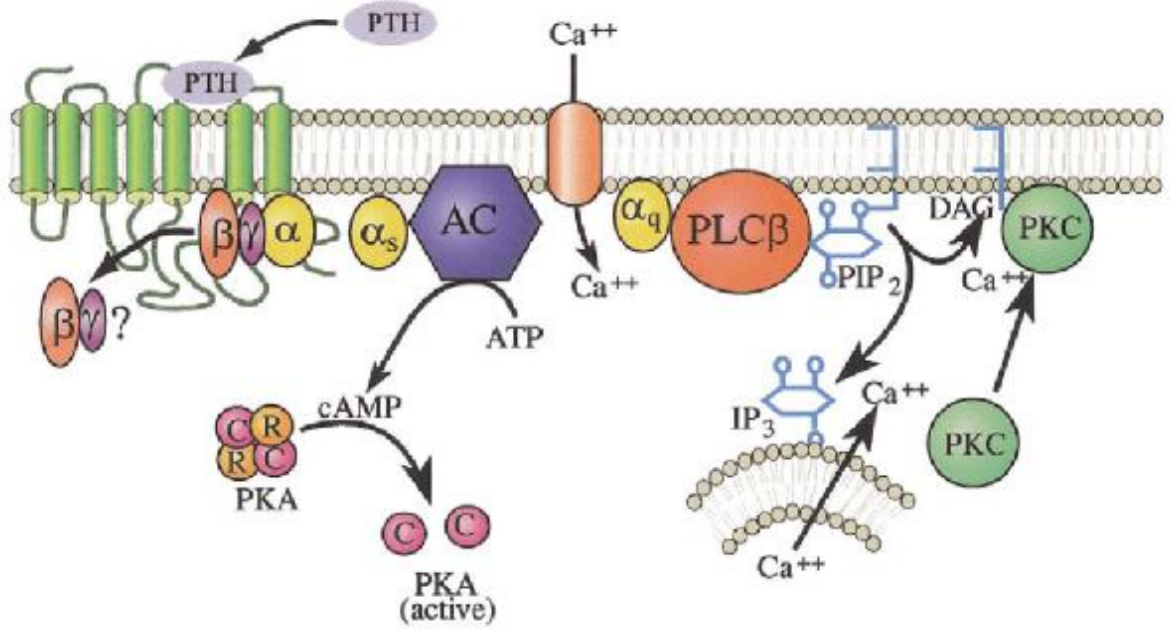
KBH bağı olarak kemik dokusunda bir takım yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu bağlamda kemik metabolizması ile ilişkili moleküler yolların detaylı bir şekilde anlaşılması önemlidir.

Kemik dokusunun dinamik dengesi bakımından osteoblast ve osteoklast olarak adlandırılan iki hücre grubu oldukça önemlidirler. Osteoblastlar, kemik dokusu üzerinde anabolik bir etkide bulunarak kemik kitlesinin artışına yol açarlar. Buna karşın osteoklastlar kemik dokusu üzerinde katabolik etkide bulunurlar. Dolayısıyla, kemik dokusunun yıkımında rol alırlar ve kemik kitlesinin azalmasına yol açarlar. Bu iki hücre grubu arasında bir denge vardır. Bu dengeye göre kemik dokusunun dinamik dengesi, yapım veya yıkım yönünde değişim gösterebilir.

Kemik dokusunun ana elemanı olan osteoblast hücreleri kemik iliğinin stromal hücrelerinden farklılaşırlar. Osteoklast hücreleri ise kemik dokusu üzerinde monosit /makrofaj öncüllerinden farklılaşırlar. Osteoklast oluşumu, özellikle kemik dokusunun yapım ve yıkım dengesi açısından oldukça önemlidir. Son yıllarda osteoklast oluşumunda etkili faktörler ve moleküler yollar aydınlatılmıştır. Osteoklast oluşumunu uyaran faktörler, osteoblastlar ile kemik iliğinin stromal (mezenkimal) hücreler tarafından sentezlenirler (Şekil 7). Bunlar, makrofaj-koloni uyarıcı faktör (M-CSF), NFκB ligand reseptör aktivatörü, (receptor activator of NFκB ligand, RANKL) ve osteoprotegrin (OPG) şeklindedirler. RANK ligandı için osteoklast öncül hücreleri üzerinde RANK reseptörü bulunur. RANKL'nin RANK reseptörü ile etkileşmesi osteoklast öncül hücrelerinde ve osteoklast hücrelerin de karmaşık bir hücre içi yolağı harekete geçirir. RANKL/RANK yolağının harekete geçmesi öncül hücrelerde, olgun osteoklast hücrelerine dönüşüm yönünde; olgun osteoklastlarda ise katabolik aktiviteyi arttırıcı yönde etki yapar (Şekil 8). OPG ise RANKL'ye bağlanarak, RANKL'nin esas reseptörü olan RANK reseptörüne bağlanmasını inhibe eder. Dolayısıyla, OPG osteoklast gelişimi ve aktivitesi açısından negatif regülatör olarak işlev görür. M-CSF faktörü de mezenkimal hücreler tarafından sentezlenir ve osteoklast farklılaşmasında rol alır. Bu faktörler, kooperatif olarak osteoklastogenez sürecini kontrol ederler (Şekil 7). Başta PTH olmak üzere bazı hormonlar (TNF-a, IL-1b, 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> ve PTHrP) kemik dokusunu



edilmiştir. Kemik dokuda PTH reseptörü (PTH1R) osteoblast hücreleri üzerinde tespit edilmiştir. Bunun dışında, osteoklast hücrelerinde PTH reseptörüne rastlanmamıştır. Osteoblastlar üzerinde bulunan PTH1 reseptörünün kesim varyantlarının olabileceği ve bu şekilde PTH hormonunun farklı hücre içi yolları harekete geçirebileceği düşünülmektedir. PTH'ın etkisiyle osteoblast hücrelerinde harekete geçen hücre içi yollar Şekil 9'de gösterilmiştir.



**Şekil 9.** Osteoblast hücrelerinde PTH'ın uyarımıyla harekete geçen hücre içi sinyal yolları<sup>19</sup>.

PTH'ın uyardığı bu yolların neticesinde çeşitli transkripsiyon faktörleri aktifleşmekte ve gen ekspresyonlarında değişimler meydana gelmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri, CREB olarak adlandırılan cAMP cevap elemanına bağlanan protein (cAMP response element binding protein), c-fos, c-jun (AP-1'in alt üniteleri) ve RUNX2 proteinleridir. Bu transkripsiyon faktörlerinden özellikle RUNX2 osteoblastik oluşum açısından oldukça önemlidir. Buna göre RUNX2, osteoblastlara fenotipik özelliklerini kazandıran genlerin (osteokalsin, osteopontin, kollajen  $\alpha$ 1, kollajen  $\alpha$ 2 ve kollajen-3 genleri) ekspresyonlarını uyarılmaktadır. RUNX2, PKA enzimi tarafından fosforile edilerek aktifleştirilir.

PTH'ın uygulanma şekline bağlı olarak katabolik ve anabolik etkilerinin olabileceği daha önceden ifade edilmişti. PTH, devamlı uygulandığında,

osteoklast oluşumunu dolaylı olarak teşvik eder. Buna göre PTH, RANKL ve M-CSF faktörlerinin ekspresyonlarının uyarırken OPG sentezini inhibe eder. Bu şekilde PTH, osteoklastogenez sürecini teşvik eder. Artan osteoklastojenik aktivite kemik dokusunu yıkım yönünde etkiler. Buna karşın PTH, aralıklı olarak uygulandığında, kemik dokusu üzerinde anabolik etkide bulunur. Dolayısıyla kemik kitlesini artırır. PTH'ın meydana getirdiği anabolik etkinin, osteoblast hücrelerinde bazı büyüme faktörlerinin ekspresyonlarını uyarması sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. PTH'ın IGF-I, IGF-II, IGF bağlanma proteini ve TGF- $\beta$  faktörlerinin ekspresyonlarını uyardığı saptanmıştır. Ayrıca PTH, osteoblast hücrelerinin çoğalmalarını da teşvik eder. Artan osteoblast sayısına bağlı olarak da anabolik etki meydana gelir. PTH'ın PKC/ERK yolağını harekete geçirerek ve bu yolak üzerinden hücre döngüsü elemanlarını etkileyerek osteoblastlar üzerinde proliferatif etki meydana getirdiği sanılmaktadır<sup>19</sup>.

KBH'ya bağlı olarak üremi gelişen hastalarda kemik dokusunun paratiroid hormona verdiği yanıt değişmektedir. Bu tip hastalarda, iskelet sistemi PTH'ya karşı direnç geliştirmektedir. Buna göre, sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında, kronik böbrek yetmezliği hastalarında PTH'nın kalsemik etkisi (kemik dokuyu yıkma etkisi) azalmaktadır. PTH'nın azalan kalsemik etkisine bağlı olarak hastalarda sekonder hiperparatiroidizm gelişmekte ve sürekli olarak PTH düzeyi yüksek olmaktadır. Bu tip hastalarda, iskelet sisteminin PTH'ya karşı direnç geliştirmesinin nedenleri araştırılmaktadır. RANKL/RANK sisteminde meydana gelen bozulmalar, kemik dokusunun PTH'ya karşı geliştirmiş olduğu bu direncin nedeni olabilir. PTH'nın RANKL ekspresyonunu uyardığı daha önceden ifade edilmişti. Kronik böbrek yetmezliği hastalarında bu etki azalmış olabilir. Ayrıca bu hastalarda, fonksiyonel PTH konsantrasyonu yükseldiği gibi fonksiyonel olmayan PTH fragmanlarının konsantrasyonları da yükselmektedir. Buna göre, fonksiyonel olmayan fragmanların fonksiyonel PTH ile yarışarak PTH'nın etkinliğini azaltabilecekleri de düşünülmektedir. İlave olarak PTH, osteoblastlarda PTH reseptörünü uyararak bir hücre içi yolağı harekete geçirmektedir. Bunun sonucunda, RANKL ekspresyonu artmaktadır. Üremi bu yolağın düzgün çalışmasına engel oluyor olabilir. Konu tartışmalı olmakla birlikte, üremik hastaların osteoblastlarında PTH reseptör ekspresyonunda

normale göre azalma olduğu da ileri sürülmüştür. Ayrıca, böbrek fonksiyonunda meydana gelen azalmaya bağlı olarak hastaların serumlarında OPG birikiminin meydana geldiği saptanmıştır. Buna göre, artan OPG konsantrasyonu RANKL/RANK yolağının çalışmasına engel oluyor, dolayısıyla osteoklastogenez olayının aksamasına yol açıyor olabilir<sup>20</sup>.

## 2.7 Sağlıker Sendromu

Kronik böbrek hastalarının bir kısmında Sağlıker ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan ve Sağlıker sendromu olarak adlandırılan bir hastalık tablosu gelişmektedir (şekil 10). Bu sendroma yakalanan hastalarda klinik olarak

- Kronik böbrek yetmezliği
- Sekonder hiperparatiroidizm
- Boy kısıalığı
- Oldukça ağır kafa değişikliği
- Oldukça ağır alt ve üst çene değişiklikleri
- Ağızda patolojik olarak normal ancak görünüm olarak tümörleri andıran dokular
- Ağır diş anormallikleri
- Parmak ucu değişiklikleri
- Oldukça ağır psikolojik problemler ve depresyon
- İşitme kaybı belirtileri ortaya çıkar.

Laboratuvar bulguları olarak, hastaların serum  $Ca^{+2}$  değerleri ortalama 6-7 mg/dL, P değerleri 7-8 mg/dL düzeyindedir. Bu hastalarda; serum alkalin fosfataz düzeyi yükselir (120-240 U/L). Paratiroid hormon düzeyi en az 3,5 kat artış gösterir<sup>21,22,23,24</sup>.



**Şekil 10.** Sağlıker sendromlu hastaların üst satırda son halleri görülürken alt satırda daha önce çekilmiş olan fotoğrafları görülmektedir<sup>17</sup>.

Anlaşılabacağı üzere Sağlıker sendromu kötü prognoz gösteren kronik böbrek yetmezliği olgusunun bir devamı olarak gelişmektedir. Sendrom özellikle gelişmekte olan ve geri kalmış ülkelerde görülmekte, gelişmiş ülkelerde ise hemen hemen görülmemektedir. Bunun nedeni olarak ekonomik olarak sıkıntılı ülkelerde KBH hastalarının gerekli medikal tedaviyi alamamaları ve renal replasman tedavilerinin daha geç başlaması olduğu düşünülmektedir. Sendromun görülme sıklığı %0,5 olarak hesaplanmaktadır. Bu sendromun etyopatogenezi ve klinik belirtileri konusunda halen araştırmalar devam etmektedir. Ayrıca, sendromun hastalardaki klinik bulguların şiddetine göre sınıflandırılması da yapılmaktadır. Buna göre, major kriterlerden olan yüz değişikliğinin olması ağır tipi gösterirken diğer major kriter olan boy kısalığının varlığı orta tipi göstermektedir. Bu iki bulgunun olmadığı hastalar ise hafif grubu oluşturmaktadırlar. Bu bulguların tablo şeklinde ifadesi ve daha önce yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir (Çizelge 2).

## Çizelge 2. Sağliker sendromunun evreleri

| EVRE       | KLİNİK BULGU  |
|------------|---|
| Ağır Evre  | Yüz değişikliğinin varlığı ve/veya hafif ve orta evre bulguları |
| Orta Evre  | Boy kısalığının varlığı ve/veya hafif evre bulguları            |
| Hafif Evre | Major kriterlerin haricindeki bulguların görüldüğü hastalar     |

Çukurova Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada Sağliker sendromlu hastalarda Klas II maloklüzyon, maksiller genişleme ve ileri doğru protrüzyon ve mandibuler geriye doğru çekilme defektleri saptanmıştır<sup>21</sup>. Bu bulguların hastalardaki maksiller kemiğin vertikal gelişimine ve mandibulanın posterior rotasyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülmüştür. Çalışmada, 9 hasta değerlendirilmiş ve sadece 2 hastada normal alt ve üst çene gelişimi görülmüştür. Kalan hastalarda ise hafifden şiddetliye değişen maloklüzyonlar saptanmıştır. Çalışma sırasında hastaların çekilen sefalometrik X-Ray fotoğraflarında bu hastalar ile normal kişiler arasındaki ciddi farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 11,12,13,14)<sup>21</sup>.



Şekil 11. Normal insan sefalometrik X-Ray<sup>21</sup> Sağliker sendromlu hasta sefalometrik X-Ray<sup>22</sup>.



**Şekil 12.** Ciddi klas II maloklüzyonu olan dört Sağlıker sendromlu hastanın anteroposterior ve lateral yüz renkli fotoğrafları<sup>21</sup>.

Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Adana Hastanesi Nöroloji kliniğinin Sağlıker sendromlu hastalarda yaptığı çalışma sonucunda 12 hasta değerlendirilmiş ve tüm hastalarda nöropsikiyatrik bulgu ve semptomlar gözlenmiştir<sup>22</sup>. Böbrek yetmezliğinin başlangıcından sinir sisteminin tutulumuna kadar geçen süre ortalama 2,8 yıl olarak bulunmuştur. Hastaların %50' sinde kronik baş ağrısı, %33,3' ünde polinöropati, %25' inde mononöropati, %25' inde epilepsi, %33,3' ünde kranyal nöropati, %16,6' sında hafif serebellar ataksi, %41,6'sında halsizlik, %16,6 sında uyku bozuklukları ve %25 inde parestezi saptanmıştır. Psikiyatrik manifestasyonlar hastaların %50' sinde bulunmuştur. Bunların %25'i depresyon, %16,6'sı anksiyete bozukluğu, %8,3'ü hafif kognitif bozukluklardır.



**Şekil 13.** Sağlıker sendromlu hastaların yüz görünümüleri<sup>17</sup>.



**Şekil 14.** Sağlıker sendromlu hastaların yüz görünümüleri<sup>17</sup>.

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz kliniği tarafından yapılan ve Sağlıker sendromlu 12 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, timpanogramla yapılan ölçümlerde hiçbir hastada patoloji saptanmazken odyolojik muayene ve odyometrik ölçümlerde 3 hastada orta derecede, 2 hastada ileri derecede işitme kaybı olduğu ve bu kaybında sensörinöral tipte olduğu ortaya konmuştur. Timpanogramla yapılan muayenenin normal olması

bu sendromlu hastalarda iddia edilen kemik yolu ile iletim kusuru olduğu hipotezini de zayıflatmıştır.

Bütün bu klinik değerlendirmelere karşın, tüm kronik böbrek hastalarının Sağlıker Sendromu olarak değerlendirilen tabloya evrilmedikleri açıktır. Özellikle geri kalmış veya gelişmekte olan ülkelerde yaşayan kronik böbrek hastalarının Sağlıker sendromuna yakalanmaları, bu sendromun kronik böbrek hastalarının uygun tedavi ve bakım sürecinden geçememelerinden kaynaklı olarak geliştiği şeklinde yorumlanabilir. Ancak aynı şartlarda yaşayan KBH hastalarından sadece bir kısımlarının Sağlıker sendromuna evrilmeleri, Sağlıker sendromunun bir takım genetik yatkınlık faktörlerine bağlı olarak geliştiği düşüncesini uyandırmaktadır. Bu noktada, Sağlıker sendromu ile muhtemel ilişkili genler veya aday genler düşüncesi ön plana çıkmaktadır. Daha önceden de ifade edildiği üzere Sağlıker sendromunun önemli belirtileri arasında hipokalsemi ve sekonder hiperparatiroidizm vardır. Bu noktada,  $Ca^{+2}$  iyonunun düzeyinin düzenlenmesi açısından kritik önemde olan kalsiyum reseptör proteini ve onu kodlayan CaSR geni ön plana çıkmaktadır.

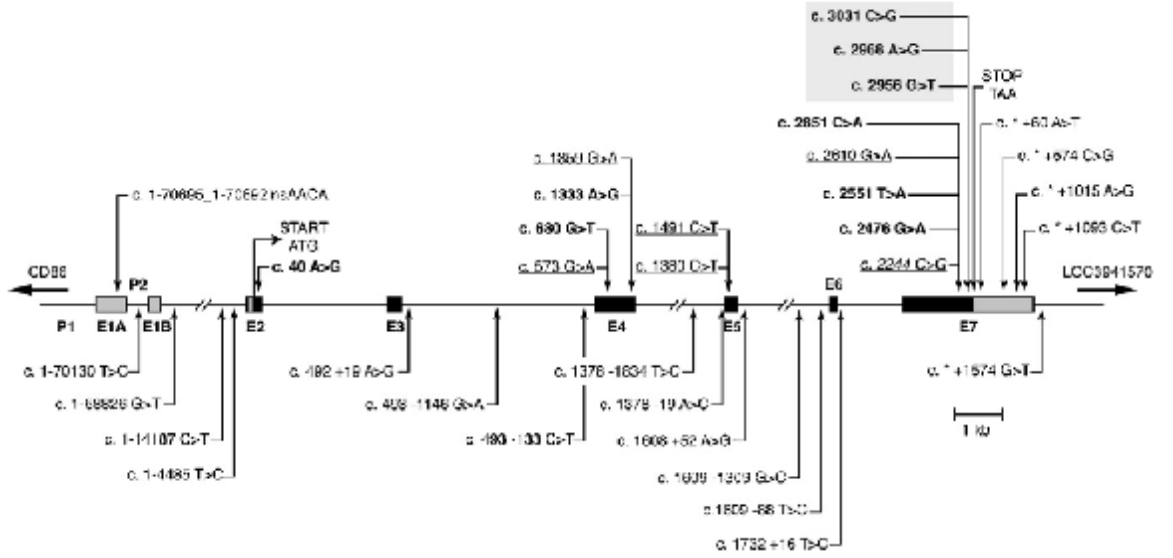
## **2.8 Kalsiyum Reseptörü (CaSR) ve Kodlayıcı Geni**

***CaSR ve Kronik Böbrek Hastalığı Dolayısıyla Sağlıker Sendromu Açısından Önemi:*** CaSR, G proteinine eşlenik olarak çalışan bir reseptördür. Aynı zamanda, hücre zarını yedi kez kateden protein süper ailesinin (C ailesi) bir üyesidir. Binyetmişsekiz aminoasit büyüklüğünde bir protein olup üç domainden oluşur. Ekstraselüler domaini 612 aminoasit büyüklüğündedir. Zarı yedi kez kateden heliksten oluşan transmembran domaini 250 aminoasit büyüklüğündedir. İntraselüler C terminal domaini ise 216 aminoasit büyüklüğündedir. CaSR'nin fonksiyonel formu dimer şeklindedir. Üniteler arasındaki bağlantıları disülfid köprüleri oluşturur. CaSR ağırlıklı olarak paratiroid bezi hücrelerinde, tiroid bezinin C hücrelerinde ve böbreklerde eksprese edilir. Ayrıca, CaSR'ye bağırsak ve kemik dokularında da rastlanmıştır. CaSR, ekstraselüler iyonize kalsiyum düzeyinin dar bir aralıkta (1.1-1.3 mM) tutulmasında anahtar rol oynar. CaSR reseptörü, paratiroid ana hücrelerinin fonksiyonlarını modüle ederek bu görevi yerine getirir. Buna ilave

olarak, CaSR bulunduğu organ ve dokulara özgü olarak bir takım fonksiyonları yerine getirir. Paratiroid bezinde CaSR, paratiroid hormonun (PTH) sentezini ve salınımını düzenler. Ayrıca, paratiroid hücrelerin proliferasyonlarını düzenler.  $Ca^{+2}$  düzeyi düştüğü zaman anılan olaylar gerçekleşir. Buna karşın,  $Ca^{+2}$  düzeyi yüksek olduğu zaman bu olaylar engellenir. Böbreklerde CaSR'nin yine üç fonksiyonu vardır. Buna göre CaSR, PTH'ın böbrek fosfat geri emilimi üzerine olan baskılayıcı etkisini azaltır. İlave olarak, CaSR böbreklerde NaCl,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  iyonlarının geri emilimlerini ve vazopressin aracılığı ile su geri emilimini engelleyici işlev görür. CaSR, kemik dokusunda ağırlıklı olarak osteoblast hücrelerinde eksprese edilir.  $Ca^{+2}$  iyonunun osteoblast oluşumunu teşvik edici etkisi (osteoklast oluşumunu engelleyici etkisi) göz önüne alındığında CaSR'nin kemik dokusu açısından da son dereceli etkili bir reseptör olduğu anlaşılacaktır. Osteoklastlar tarafından sentezlenen CaSR'nin, osteoklastların aktivitelerini engellediği ve onları apoptoza sürüklediği saptanmıştır. Çok düşük ve çok yüksek  $Ca^{+2}$  düzeyleri çok ciddi klinik sekellere yol açabilirler. Bazen, bu durum yaşamı tehdit eden bir hal alır. Dolayısıyla kalsiyum homeostazı yaşamın devamı açısından önemlidir. Buradan anlaşılacağı üzere CaSR, paratiroid bezini ve diğer dokuları iyonize  $Ca^{+2}$  düzeyi bakımından uyaran **kalsiyostat** gibi işlev görür ve bu şekilde kalsiyum homeostazına katkıda bulunur.

**CaSR Geni** : CaSR geni, 3. kromozomun q13.3-21 bölgesine lokalize olmuştur ve 103 kb büyüklüğünde bir gendir. Bu gen, sekiz ekzon içermektedir. Bu ekzonlardan altısı (2-7) 1078 aminoasit büyüklüğündeki CaSR proteinini kodlamaktadır. Yedinci ekzonda iki farklı poliadenilasyon sinyal dizisi (AATAAA) bulunmaktadır. Bu sinyal dizilerine göre 3' translasyona uğramayan bölge (UTR), kısa (177 nükleotid) veya uzun (1304 nükleotid) olmaktadır. İkinci ekzon 242 nükleotidlik 5' UTR bölgesini kodlamaktadır. Bu 242 nükleotidden sonra translasyona uğrayan ilk kodon gelmektedir (Şekil 15, 16). 1A ve 1B ekzonları alternatif 5' UTR bölgelerini kodlarlar. Bunların her biri 2. ekzonda bulunan 5' UTR bölgesi (alternatifsiz, ortak bölge) ile birlikte kesime uğrarlar. Bu genin P1 ve P2 olarak adlandırılan iki çeşit promoter bölgesi tanımlanmıştır (Şekil 15). Bu promoter bölgelerinin transkripsiyona başlama bölgeleri (+1) haritalanmıştır. P1 promoteri (transkripsiyona başlama bölgesine göre) -26. nükleotidde bir TATA

kutusu, -110. nükleotidde CCAAT kutusu içermektedir. P2 promoteri transkripsiyona başlama bölgesinde, Sp1 bölgeleri içermektedir. Ayrıca, her iki promoter bölgesinde de fonksiyonel vitamin D cevap elemanları (VDRE) ve NF- $\kappa$ B elemanları bulunmaktadır<sup>25</sup>.



**Şekil 15.** Sekiz ekzon içeren CaSR geninin genomik organizasyonu. 1A, 1B ekzonları, 2. ekzonun bir parçası ve 7. ekzonun bir parçası translasyona uğramayan bölgeleri oluşturmaktadırlar ve şekilde gri olarak gösterilmişlerdir. Protein kodlayan ekzonlar (3, 4, 5, 6. ekzonlar) ve ekzon parçaları (2 ve 7. ekzon parçaları) ise siyah olarak gösterilmişlerdir. Ekzonik tek nükleotid polimorfizmleri (SNPler) ve 1A ekzonundaki tetranükleotid insersiyon/delesyon polimorfizmi şeklin üst kısmında gösterilmişlerdir. İntronik SNPler ise şeklin alt kısmında gösterilmişlerdir. Ekzonik missense SNPler bold olarak gösterilmiş, buna karşın sessiz SNP'lerin altı çizilmiştir<sup>25</sup>.

421 TGGAGAGACGGCAGAACCATGGC TTTTATAGCTGCTGCTGGGTCCTCTTGGCAC CACC  
.....ATGGCATTTTATAGCTGCTGCTGGGTCCTCTTGGCACTCACC  
.....-M--A--F--Y--S--C--C--W--V--L--L--A--L--T--

481 TGGCACACCTCTGCC TACGGGCCAGACCAGCGAGC CAAAAGAAGGGGGACATTATCCTT  
43 TGGCACACCTCTGCC TACGGGCCAGACCAGCGAGCCAAAAGAAGGGGGACATTATCCTT  
15 -W--H--T--S--A--Y--G--P--D--Q--R--A--Q--K--K--G--D--I--I--L--

541 GGGGGGCTCTT CCTATT CAT TTTGGAGTAGCAGCTAA AGATCAAGATCTCAAATCAAGG  
103 GGGGGGCTCTT CCTATT CAT TTTGGAGTAGCAGCTAAAGATCAAGATCTCAAATCAAGG  
35 -G--G--L--F--P--I--H--F--G--V--A--A--K--D--Q--D--L--K--S--R--

601 CCGGAGTCTGTGGAATGTATCAGGTATAATTTCCGTGGGTTTCGCTGGTTACAGGCTATG  
163 CCGGAGTCTGTGGAATGTATCAGGTATAATTTCCGTGGGTTTCGCTGGTTACAGGCTATG  
55 -P--E--S--V--E--C--I--R--Y--N--F--R--G--F--R--W--L--Q--A--M--

661 ATATTTGCCATAGAGGAGATAAACAGCAGCCAGCCCTTCTTCCCAACTTGACGCTG CGA  
223 ATATTTGCCATAGAGGAGATAAACAGCAGCCAGCCCTTCTTCCCAACTTGACGCTGGGA  
75 -I--F--A--I--E--E--I--N--S--S--P--A--L--L--P--N--L--T--L--G--

721 TACAGGATATTTGACACTTGC AACACCGTTTCTAAGGCC TTGGAAGCCACCCTGAGTTTT  
283 TACAGGATATTTGACACTTGC AACACCGTTTCTAAGGCC TTGGAAGCCACCCTGAGTTTT  
95 -Y--R--I--F--D--T--C--N--T--V--S--K--A--L--E--A--T--L--S--F--

**Şekil 16.** CaSR geni kodlayıcı dizisinde bazı baz değişimlerini gösteren diagram. Şekilde genetik kod, kodladığı amino asit sırası ile birlikte verilmiştir<sup>26</sup>.

## 2.9 DNA Dizisi Belirleme Yöntemleri

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):** İlk olarak R. Saiki, K. Mullis ve arkadaşları tarafından 1985 yılında geliştirilen PCR tekniği, DNA'nın in vitro şartlarda çoğaltılmasını sağlar. PCR tekniği ilk olarak orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya konulmuştur. Daha sonra yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile yaklaşık olarak 20,000 baza kadar olabilen genlerin milyonlarca kopyaları çoğaltılabilir. Yine, PCR tek bir hücre veya çok az dokudan elde edilen DNA'nın çoğaltılmasını sağlar. İnsan genom projesinin yürütülmesinde de bu teknikten faydalanılmıştır. PCR yöntemi özetle 3 aşamadan oluşmaktadır.

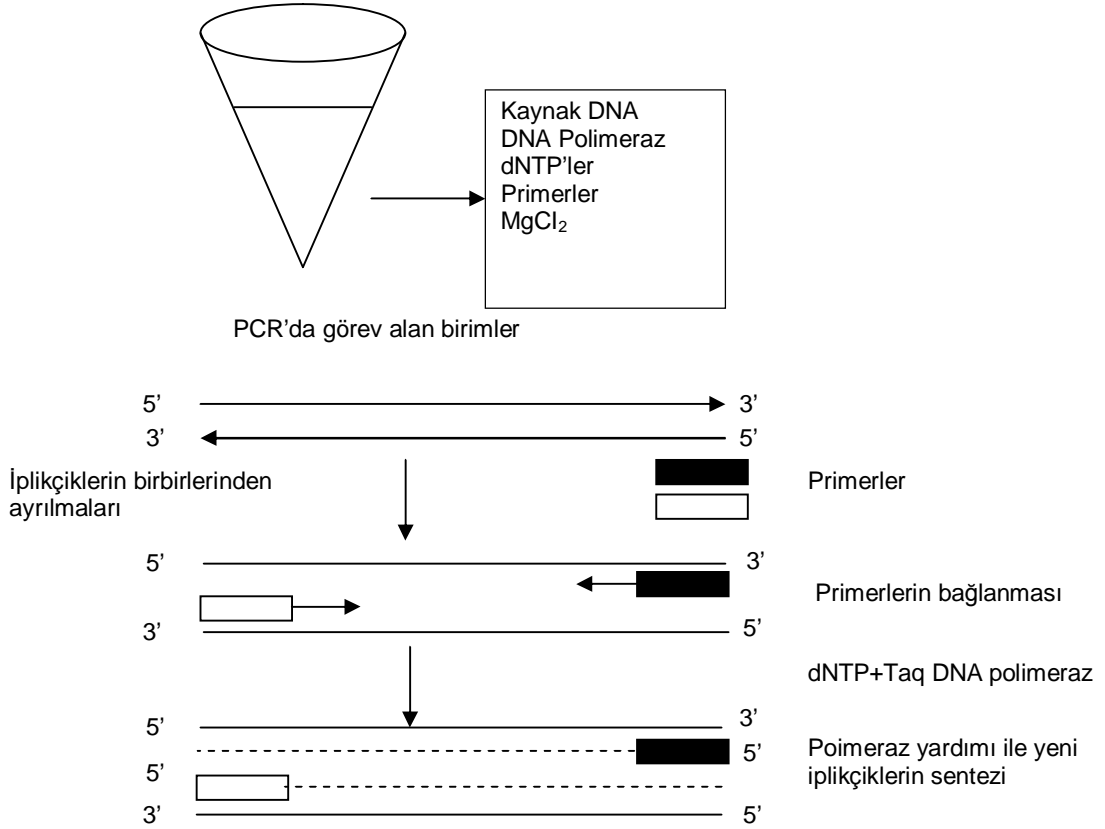
**Denatürasyon:** Çift iplikçikli kaynak DNA'nın yüksek sıcaklık derecesinde (90-95 °C'de 3-4 dakika bekletilerek) tek iplikçiklere ayrılması

**Hibridizasyon (Annealing):** Primerlerin uygun sıcaklıkta (45-55 °C) kaynak DNA'ya bağlanması

Amplifikasyon (Extension): DNA polimeraz (Taq, Pfu, Vent, Tth) ile primerlerden zincirin uzaması (70-75 °C)

Bu teknik, denaturasyon sonucu birbirlerinden ayrılmış olan DNA örnekleri (rekombinant DNA veya bir gen parçası) , 15-30 baz uzunluğunda iki oligonükleotid primeri (sentetik primerler), yüksek sıcaklığa dayanıklı Taq DNA polimeraz I enzimi ve dört çeşit dNTP'nin görev alması sonucu gerçekleşir. Reaksiyonda kullanılan ve 95 °C'ye kadar dayanıklı olan Taq DNA polimeraz enzimi bir bakteri türü olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiştir. Taq DNA polimeraz, 832 aminoaside sahip bir proteindir. PCR ile uygun şartlarda saniyede 75 nükleotid sentezlenebilmektedir. Taq DNA polimeraz enziminin aktivitesi için ortamda serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç vardır. PCR'da kullanılacak primerlerin birbirleri ile çift oluşturmayacak şekilde olmaları amplifikasyonun verimini artırır.

PCR reaksiyonu: Çift sarmallı DNA 95-100 °C'de ısıtılarak iplikçiklerin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Reaksiyon, eppendorf bir tüp içerisinde Taq DNA polimeraz, kaynak DNA, sentetik primerler, dNTP, Tris-HCl, KCl ve MgCl<sub>2</sub> varlığında gerçekleştirilir. Döngü sayısı istenen çoklukta ayarlanır (Şekil 17)<sup>27</sup>.



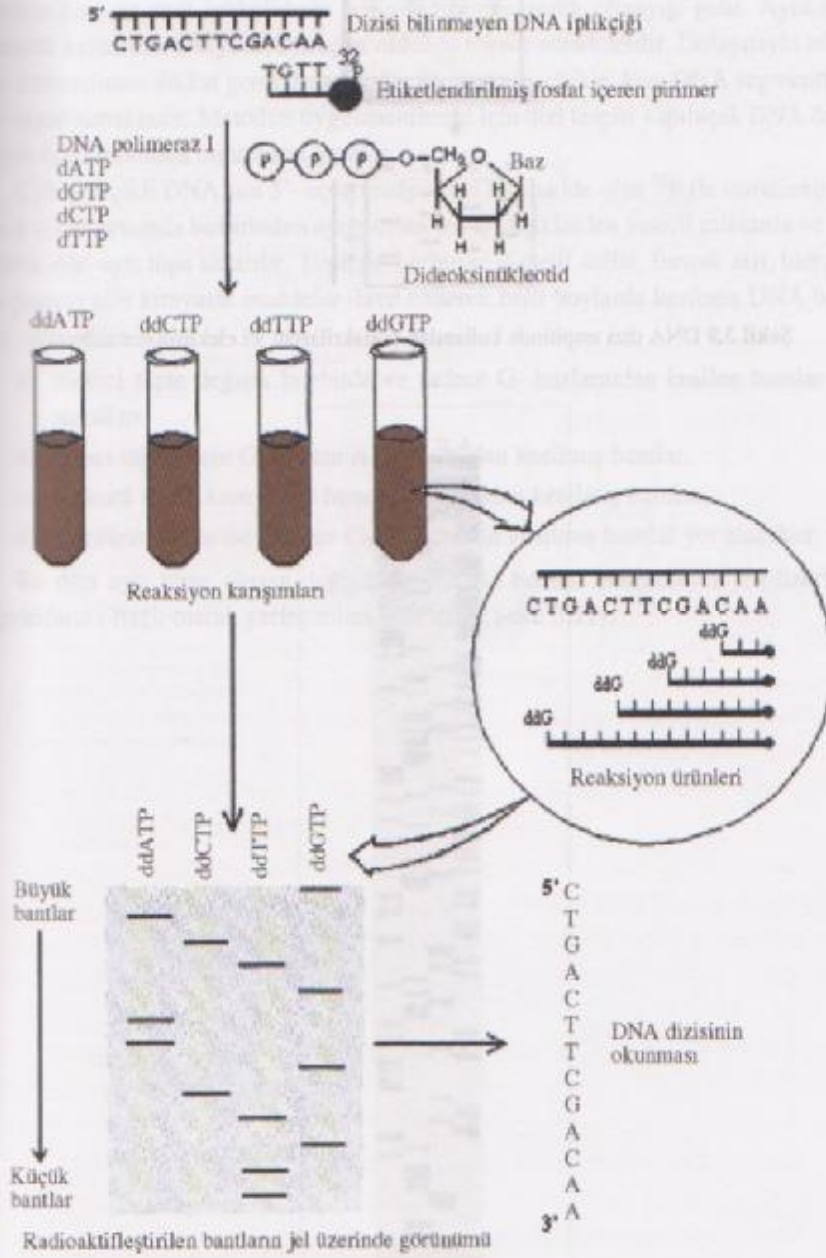
**Şekil 17.** Polimeraz zincir reaksiyonu<sup>27</sup>

PCR ile çoğaltılan DNA segmenti bundan sonra bir restriksiyon enzimi ile kesilir; oluşan DNA parçaları agaroz veya akrilamid jel elektroforezinde ayrılır. Etidyum bromid ile boyanarak direkt olarak ultraviyole ışık altında incelenir. DNA bantları, DNA'nın etidyum bromid ile oluşturduğu floresan özelliğine bağlı olarak siyah zemin üzerinde beyaz bantlar halinde görünür. Bantlar otoradyografi sistemi ile görünür hale getirilir.

**DNA Dizisinin Belirlenmesi:** DNA dizi tespiti moleküler biyoloji kapsamında geliştirilen en önemli tekniklerden biri olarak bilinir. Geni teşkil eden baz dizisinde meydana gelebilecek herhangi bir yanlış kodlama oluşacak ürünün farklı bir şekilde oluşumuna neden olmaktadır. DNA dizi tespitinde temel iki yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerden biri Frederick Sanger ve A. R. Coulson adlı bilim adamları tarafından geliştirilmiştir. Bir diğeri ise Alan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilmiştir.

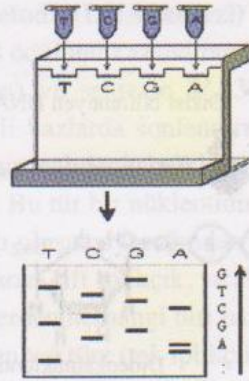
**a) Sanger-Coulson Metodu (DNA sentezi):** Bu yöntem Sangere ikinci kez Nobel ödülü kazandırmıştır. Bu yöntem, DNA zincirinin enzimatik sentezine (polimerizasyon) ve sentezin 2' ve 3' dideoksinükleotidtrifosfatlar (ddNTP'ler) kullanılarak belli bazlarda sonlandırılması prensibine dayanmaktadır. ddNTP'leri dNTP'lerden ayıran özellik bunun 3. karbonunda bir oksijenin eksik olmasıdır. Bu tür bir nükleotidin bağlandığı noktadan fosfodiester bağı oluşamayacağı için sentez burada durmuş olur. Bu metot için gen DNA'sını oluşturan çift iplikçik, sıcaklık veya alkali ortamda birbirinden ayrıştırılır. Ayrılan ipliklerden herhangi biri baz tespitinde kullanılmak üzere tek iplikçik olarak M13 adı verilen vektöre (tek iplikçikli plazmid) klonlanır. Bu yöntem için 4 ayrı deoksinükleotid (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 4 dideoksinükleotid (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) ve <sup>32</sup>p ile radyoaktifleştirilmiş dört bazlı primerler kullanılır. G, A, C ve T olarak işaretlenen dört ayrı tüpün her birine <sup>32</sup>p ile işaretlenmiş primerler, dört tür deoksinükleotid trifosfatlar, polimeraz I enzimi ve eşit oranlarda baz dizisi belirlenecek DNA iplikçığı ilave edilir. Tüplerden her birine farklı tek bir ddNTP konularak reaksiyon başlatılır. Reaksiyonda her bir ddNTP, kendine uyumlu olan nükleotidin deoksiribozundaki hidroksil grubunu bloke ederek iplikçığın uzamasını durdurur. Örneğin ddGTP konulan tüpte oluşacak polimerizasyon sırasında DNA iplikçığında yer alan bir sitozin (C) bazının varlığında, sitozine karşılık gelmesi gereken guanosin trifosfat yerine 2',3' ddGTP'nin gelmesi ile polimerizasyon bu noktada sonlanır ve bu baza kadar olan gen bandı ortaya çıkar. Bu durum her bir baz için dört tüpte ayrı ayrı tekrarlanır. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra oluşan fragmentler ısıtma ile kaynak DNA ipliklerinden ayrılırlar. Ayrılan iplikler 70 °C'lik ortamda üre deterjanını içeren jelde hareket ettirilir. Baz sayısına bağlı olarak oluşan değişik uzunluklardaki tek iplikçikli DNA bantları hareket hızlarına bağlı olarak poliakrilamid jel elektroforezinde ayrıştırılır. Böylece 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi belirlenmiş olur (Şekil 18,19)<sup>27</sup> .

### 3.12 BİR DNA MOLEKÜLÜNDEKİ BAZ SIRASININ TESPİT EDİLMESİ

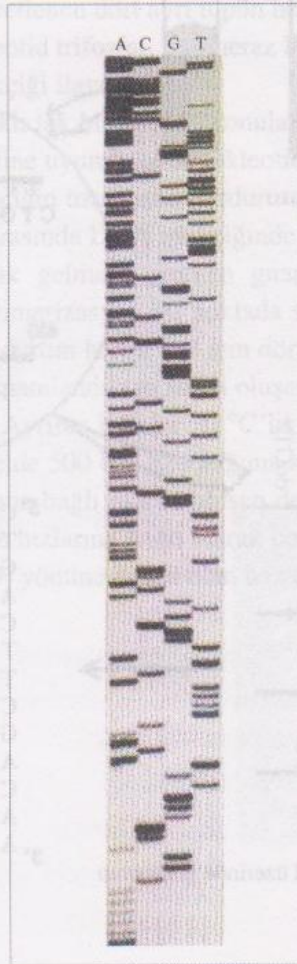


Şekil 3.8 Sanger ve Coulson metodu (Watson et al., 1989).

Şekil 18. Sanger -Coulson metodu ile DNA sekans analizi



Şekil 3.9 DNA dizi tespitinde kullanılan poliakrilamid jel elektroforez sistemi.



Şekil 3.10 DNA bantlarının jel üzerinde görüntülenmesi (Dilsiz, 1995).

Şekil 19. DNA bantlarının jel üzerinde görüntülenmesi

### **b) Maxam-Gilbert Yöntemi (Kimyasal Kırılma):**

Bu metodu diğer metottan ayıran özelliklerin başında, tek iplikçik oluşturma zorunluluğuna ve yeni iplikçiklerin sentezlenmesine gerek olmayışı gelir. Bu metotta kullanılan kimyasal ayıraçlar oldukça toksik maddelerdir. Dolayısıyla tekniğin kullanılması dikkat gerektirmektedir. Bu metot, özellikle kısa DNA segmentlerine uygulanmaktadır. Metodun uygulanabilmesi için dizi tespiti yapılacak DNA örneğinin fazla miktarda bulunması gerekir. Çift iplikçikli DNA'nın 5' uçları radyoaktif bir madde olan  $^{32}\text{P}$  ile işaretlenir. Isı veya alkali ortamda birbirlerinden ayrıştırılan tek iplikçiklerden yeterli miktarda ve eşit olarak dört ayrı tüpe aktarılır. Tüplerin her birine dimetil sülfat, formik asit, hidrazin ve piperin gibi kimyasal maddeler ilave edilerek belli boylarda kesilmiş DNA bantları elde edilir.

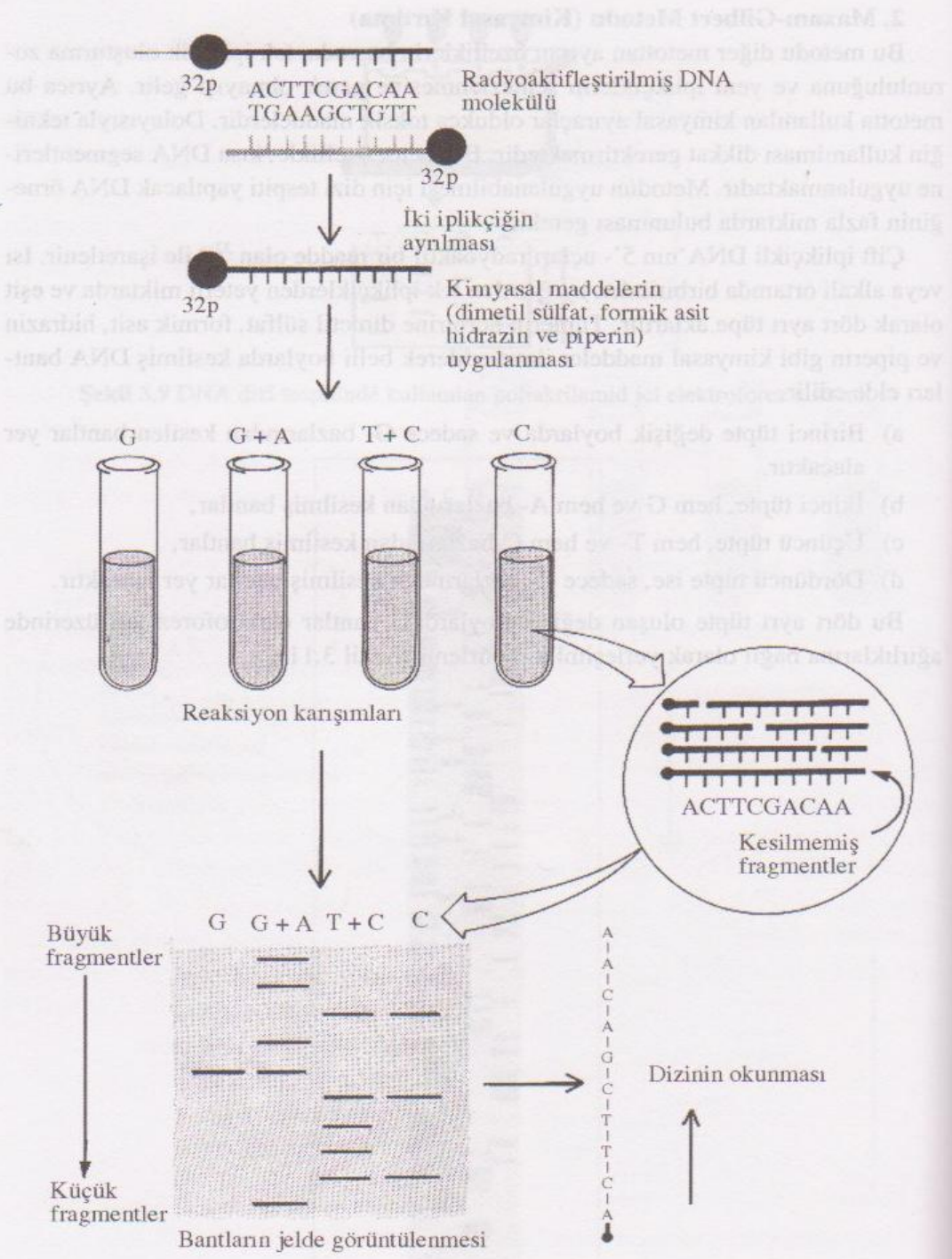
1-) Birinci tüpte değişik boylarda ve sadece G bazlarından kesilen bantlar yer alacaktır.

2-) İkinci tüpte hem G ve hem A bazlarından kesilmiş bantlar

3-) Üçüncü tüpte hem T ve hem C bazlarından kesilmiş bantlar

4-) Dördüncü tüpte ise sadece C bazlarından kesilmiş bantlar yer alacaktır.

Bu dört ayrı tüpte oluşan değişik boylardaki bantlar elektroforez jeli üzerinde ağırlıklarına bağlı olarak yerleşimleri belirlenir (Şekil 20)<sup>27</sup>.



Şekil 3.11 Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilen DNA sekans analiz metodu (Watson et al., 1989).

Şekil 20. Maxam ve Gilbert yöntemi ile DNA sekans analizi

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1 SİTOGENETİK ÇALIŞMALAR

##### 3.1.1-Kan Örneklerinden Kromozom Analizi

Bu çalışmada Sağlıker sendromlu olguların periferik kan kültürü yolu ile karyotip analizleri yapıldı. Bunun için, hastalardan heparinle yıkanmış enjektör ile 2 ml venöz kan alındı. Daha sonra bu kanlardan lenfosit kültürü yapıldı. Bunun için aşağıdaki çalışma yöntemi kullanıldı.

Kültür işlemi için RPMI1640 (Çizelge 7) medyum kullanıldı. Her birey için bir tüp hazırlandı. Önceden hazırlanmış RPMI 1640 medyumundan 3 cc tüpe aktarıldı. Bu tüpe heparinli enjektöre alınmış olan kandan 3 damla, steril şartlarda (bek alevi önünde), ilave edilerek ekim yapıldı. Bu şekilde ekimi yapılan kan örnekleri 37 °C'lik bir etüvde, 72 saat inkübasyona bırakıldı.

**Çizelge 3.** RPMI1640 medyumunun hazırlanışı

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1 | 100 ml RPMI1640 medyum      |
| 2 | 20 ml Fetal calf serum      |
| 3 | 1,5 ml L-glutamin           |
| 4 | 1 ml Penisilin-streptomisin |
| 5 | 1ml Fitohemaglutinin        |

Ekimin 70. saati sonunda (son iki saatinde), son konsantrasyonu 0.045µg/ml olacak şekilde tüplere kolşemid ilave edildi. Bundan 2 saat sonra yani 72. saatte hasat işlemine geçildi. Hasat işlemi, aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı;

1-Tüpler, 1000-1200 rpm'de 10 dk çevrildi ve üstte oluşan süpernatant uzaklaştırıldı.

2-Kalan pelletin üzerine, 4-5 ml hipotonik çözelti ilave edildi ve 15 dk 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı.

3-Süre sonunda, hipotonik solüsyonunun üzerine 8-10 damla fiksatif solüsyonundan ilave edildi ve tekrar santrifüj edildi. Oluşan süpernatant uzaklaştırıldı.

4-Bundan sonra, yıkama işlemlerine geçildi. Bunun için elde edilen pelletin üzerine 4-5 ml fiksatif çözeltisi ilave edildi ve tüpler santrifüj edildi (yukarıda belirtilen süre ve hızda). Oluşan süpernatant uzaklaştırıldı. Fiksatif çözeltisi ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.

5-Tüpler son fiksatif aşamasında en az 2 saat buzdolabında bekletildi. Son olarak fiksatif çözeltisi, dipte 0.5cc kalacak şekilde uzaklaştırıldı ve damlatma işlemine geçildi. Dipte kalan pellet önceden temizlenmiş soğuk lamlara belli bir yükseklikten damlatıldı. Damlaların lamlara homojen bir şekilde yayılmasına özen gösterildi.

Kurutulan lamlar, 60°C'de 1 gece veya 37°C'de 3 gece yaşlandırmaya bırakıldıktan sonra boyamaya alındı (GTG bantlama ve solid boyama yöntemleriyle). Yaşlandırılmış lamlar mikroskop altında incelemeye alınarak, gözlenebilen metafaz kromozomları yapısal ve sayısal anomaliler yönünden incelendi. Her örnek için en az 20, şüpheli durumlarda 50 metafaz plağı incelendi. Analiz ve görüntüleme için Cytovision programı kullanıldı<sup>28</sup>

## **3.2 MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR**

### **CaSR geni 2 ve 3. ekzonları için dizi çıkarma prosedürü**

- 1-DNA eldesi
- 2-PCR, isteğe bağlı jelde yürütme
- 3-EgsoSap ile saflaştırma
- 4-Dizi belirleme reaksiyonu (BigDye)
- 5-Sephadex ile saflaştırma
- 6-ABI 3130 cihazına yükleme
- 7-Sonuçları değerlendirme

#### **3.2.1-DNA Eldesi**

Genomic DNA, tuzla çöktürme metodu kullanılarak izole edildi

### ***Tuzla Çöktürme Metodu İle DNA Eldesi***

a-) Ependorf tüpüne 700 µl kan ve 700 µl eritrosit lizis tamponu ilave edildi ve karışım 4000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

b-) Elde edilen pelletin üzerine 700 µl eritrosit lizis tamponu yeniden ilave edildi. 4000 RPM'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

c-) Pelletin üzerine 1000 µl fizyolojik tampon ilave edildi ve pelletin tampon içerisinde çözülmesi sağlandı. 4000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

d-) Pelletin üzerine 300 µl TE-9, 100 µl SDS ve 20 µl proteinaz K ilave edildi. Vorteks ile karışım sağlandıktan sonra 65°C'de 2 saat süreyle (bu süre bir geceye kadar uzatılabilir) benmaride bekletildi.

e-) 200 µl 6 M tuz çözeltisi karışımın üzerine ilave edilerek 13500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi.

f-) Üstte oluşan süpernatant dikkatlice başka bir tüpe aktarıldı (pellet içeren tüp atıldı).

g-) 13500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant başka bir tüpe alındı, pellet atıldı.

h-) 1ml %100 alkol ilave edilip karıştırılarak 13500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi.

ı) Süpernatant dökülüp, pellet üzerine 1ml %70'lik alkol ilave edildi ve çözdürüldü.

j) 13500 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

k) Tüpler ters çevrilerek oda ısısı şartlarında kurutuldu.

l) Tüplere 50 µl TRİS-EDTA (TE) ilave edildi.

m) Bundan sonra DNA örnekleri ihtiva eden tüpler 70 °C ısı şartlarında benmaride 15 dakika süre ile bekletildiler.

Bu şekilde elde edilen DNA'lar sonraki işlemlerde kullanılmak üzere saklandılar.

### 3.2.2-PCR Amplifikasyonu

İkinci ekzon için örnek sayısına göre çizelge 3'teki veriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

**Çizelge 4.** İkinci ekzon için PCR karışımının hazırlanışı

| Bileşen                            | Miktar µl |
|------------------------------------|-----------|
| AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (2X) | 12.5      |
| Forward Primer                     | 2.0       |
| Reverse Primer                     | 2.0       |
| Distile su                         | 5.5       |
| Genomik DNA (5-20 ng/µl)           | 3         |
| <b>Toplam</b>                      | <b>25</b> |

Üçüncü ekzon için örnek sayısına göre çizelge 4'teki veriler kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

**Çizelge 5.** Üçüncü ekzon için PCR karışımının hazırlanışı

| Bileşen                            | Miktar µl |
|------------------------------------|-----------|
| AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (2X) | 12.5      |
| Forward Primer                     | 2.0       |
| Reverse Primer                     | 2.0       |
| Distile su                         | 7.5       |
| Genomik DNA (5-20 ng/µl)           | 1         |
| <b>Toplam</b>                      | <b>25</b> |

0.2 ml'lik PCR tüplerine dağıtıldı.

Reaksiyon hacmi 25 µl olarak ayarlandı.

Hazırlanan karışımlar aşağıdaki termal saykır programları kullanılarak PCR işlemine tabi tutuldular.

2. ekzon için

95°C -----10 dak.

95 °C-----30 sn.

60 °C-----1,5 dak.

72 °C-----1 dak.

} 40 döngü

72 °C-----7 dak  
+4 °C----- ~

3. ekzon için

95°C -----10 dak.  
95 °C-----30 sn. }  
63 °C-----1 dak. } 40 döngü  
72 °C-----1 dak. }  
72 °C-----7 dak  
+4 °C----- ~

PCR reaksiyonundan sonra, çıkan ürünler %2' lik agaroz jelde yürütülerek sonuçları kontrol edildi. Jele yükleme 4 µl PCR ürünü kullanılarak yapıldı<sup>28</sup>.

Kullanılan Primer Dizileri

2. Ekzon

CASR-2F TAAATggAAATTCTgAgCCACCTTA<sub>g</sub>

CASR-2R TgATTACCAATCAATCACTATTC

3. Ekzon

CASR-3F ACTCTggACCTCAA<sub>g</sub>TgATCCACC

CASR-3R TggTCATgATACA<sub>g</sub>CATATCAACT

### 3.2.3-EgsoSap İle Saflaştırma

PCR tüpü içerisine 5 µl PCR ürünü ve 2 µl EksoSap ilave edildi. Hafif bir vorteksleme işleminden sonra

37 °C-----30 dak

80 °C-----15 dak

4 °C----- (istenen süre kadar)

şartlarında PCR yapıldı. Elde edilen ürün saykıl sekans reaksiyonunda kullanıldı.

### 3.2.4-Dizi Analizi Reaksiyonu (BigDye)

Çizelge 5’de belirtilen miktarlarda karışım hazırlanarak karıştırıldı.

**Çizelge 6.** Dizi analizi reaksiyonunun hazırlanışı

| Bileşen                           | Miktar (µl) |
|-----------------------------------|-------------|
| Big Dye Cycle Sequencing v3.1 Kit | 2.0         |
| 5x Sequencing Buffer              | 2.0         |
| Forward ya da reverse primer      | 2.0         |
| PCR Ürünü                         | 2.0         |
| Su                                | 2.0         |
| Toplam Hacim                      | 10.0        |

Reaksiyon hacmi 10 µl olarak ayarlandı

Şartları çizelge 6’da gösterilmiş olduğu şekilde ayarlanarak PCR yapıldı.

**Çizelge 7.** Dizi analizi için PCR şartları

| Aşama | Tanım                    | Isı (°C) | Süre      |
|-------|--------------------------|----------|-----------|
| 1     | Aktivasyon               | 96       | 1 Dakika  |
| 2     | Amplifikasyon<br>25Cycle | 96       | 10 Saniye |
|       |                          | 50       | 5 Saniye  |
|       |                          | 60       | 4 Dakika  |
| 3     | Bekleme                  | 4        | Sonsuz    |

### 3.2.5-Sephadex ile Saflaştırma

**a-)** 1 gr. sephadex 14 ml. distile suda çözüldü ve 30 dk ara ara çalkalanarak oda ısısında bekletildi.

**b-)** Sephadex kolonları hazırlık aşaması olarak 3 defa su ile yıkandı. Her defasında 600 µl saf su konan kolonlar 5000 rpm’de çevrilerek su boşaltıldı. Son kez olarak kolonlar 5000 rpm’de boş çevrildi. Bundan sonra, kolonlara sephadex aktarılması aşamasına geçildi.

**c-)** Sephadex kolonlarının içerisine 600 µl olarak dağıtıldı.

**d-)** 5000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi.

e-) Santrifüj sonrası sephadexli kolonlar başka bir tüpe aktarıldı.  
f-) 10 µl dizi belirleme reaksiyonu ürünü sephadex üzerine (kolona temas etmeden) bırakıldı.

e-) 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.

Alttaiki tüpe aktarılmış olan ürün dizileme için kullanıldı<sup>29</sup>.

### **3.2.6- ABI 3130 Cihazına Yükleme**

Yüklenen ürün miktarı 10µl'den az ise üzeri distile su ile 15µl'ye tamamlanarak cihaza yüklendi.

### **3.2.7- Sonuçların Değerlendirilmesi**

Sekans değerlendirme işlemi, Sequencing Analysis , SeqScape ve BioEdit programları ile mutasyon tabloları kullanılarak yapıldı.

## **3.3 Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

### **3.3.1-Sitogenetik Çalışma İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

1-RPMI 1640 medyum (Sigma, R 0883)

2-Koşşisin (Seromed Cat No. L6210)

3-Phytohemaglutinin (Biochrom AG Cat. No: M 5030)

4-Fetal bovine serum (Biochrom AG Cat. No: S0113)

5-Penisilin-streptomisin (Seromed Cat. No: A2212)

6-L-Glutamin (Biochrom KG Cat. No: K 0282)

7-Tripsin (Difco Cat. No: L-000403 (1298))

8-Metanol (Merck)

9-Glasiyel asetik asit (Merck)

10-Aseton (Merck)

11-Ksilol (Merck)

12-Giemsas (Merck)

13-Heparin (Liquemine, Roche)

14-İmmersiyon yağı (Merck)

15-Entellan (Merck)

16-Sodyum klorid (NaCl) (Merck)

- 17-Potasyum klorid (KCl) (Sigma)
- 18-di-Sodyum hidrojen fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Merck)
- 19-Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Merck)

### **3.3.2-Moleküler Çalışmalar (Dizi Analizi ve DNA Eldesi) İçin Kullanılan Kimyasal Malzemeler**

- 1-Sükroz (Eritrosit lizis tamponu)(Merck)
- 2-SDS(BIO BASIC INC. Ürün no:DB0485)
- 3-Proteinaz K enzimi (Sigma P2308)
- 4-Tuz çözeltisi (6M)
- 5-Etil alkol (%100 ve %70'lik olarak)(Akkimya)
- 6-EDTA (Sigma E-5134)
- 7-AmpliTaq Gold PCR Master Mix(2X) (Applied Biosystems)
- 8-Primerler
- 9-Distile su
- 10-EgsoSap (Applied Biosystems)
- 11- Big Dye Cycle Sequencing v3.1 Kit (Applied Biosystems)
- 12-5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems )
- 13-Sephadex (Applied Biosystems)
- 14-Agarose (BIO BASIC INC.)
- 15-Tris (Amresco)

### **3.4 Kullanılan Aygıtlar**

- 1-ABI kapiller elektroforez sistemi (ABI3130)
- 2-Termal saykır (Biometra,Eppendorf)
- 3-Vortex (Nüve)
- 4-Jel görüntüleme cihazı (Uvitec)
- 5-Elektroforez tankı (Cleaver)
- 6-Derin dondurucu (-20 derecede soğutabilen)
- 7-Buzdolabı (Arçelik)
- 8-İnkübatör (Dedeoğlu, Memmert)
- 9-Zaman ayarlı santrifüj (Nüve NF 800, Hettich Universal 16 R, Techne)

- 10-Mikroskop (Olympus BX51 ve CH20)
- 11-Lamin air flow (Kojair)
- 12-Elektronik terazi (Sartorius)
- 13-pH metre (Inolab)
- 14-Eppendorf tüpler ve PCR tüpleri
- 15-Steril kültür tüpü (Greiner 164160)
- 16-Steril enjektörler (2 ml'lik, 5 ml'lik, 10 ml'luk, 20 ml'lik)
- 17-Pastör pipeti
- 18-Mezür
- 19-Şale
- 20-Lam (Thermo Scientific-Superfrost)
- 21-Lamel (24X32)

### **3.5 İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 15.0 paket programı kullanıldı. Kesikli değişkenler sayı ve yüzde olarak özetlendi. Bu değişkenlerin karşılaştırılmasında  $\chi^2$  testi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi  $p < 0.05$  alındı.

### **3.6 Sonuçları Değerlendirme İçin Kullanılan Programlar**

- 1-Cytovision (kromozomları görüntülemek için)
- 2-Sequencing analysis (sekans analizi sonuçlarının eldesi için)
- 3-SeqScape (sekans analizi sonucunda elde edilen dizinin referans dizi ile karşılaştırılması için)
- 4-GeneRunner (primer dizaynı için)

## 4. BULGULAR

### 4.1 Sitogenetik Bulgular

Toplam olarak 23 hastanın karyotip analizleri gerçekleştirildi, bu hastalara ait sonuçlar Çizelge 8 ve Çizelge 9'da verildi. Hastaların 17'si (%73.9) erkek ve 6'sı (%26) kadın cinsiyetine sahiptirler.

Karyotip analizleri yapılan hastalardan 5'nin (%21.8) tüm metafaz plaklarının normal kromozom kuruluşuna (46,XX/46,XY) sahip olduğu bulundu. Bu hastalardan 4'ünün erkek ve 1'inin kız cinsiyetine sahip olduğu rapor edildi. Geriye kalan 18 (%78.2) hastanın incelenen metafaz plaklarında bir ya da daha fazla sayıda sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerine rastlandı. Araştırılan 23 hastada incelenen toplam 639 hücrede 241 (%37.7) kromozom düzensizliği tespit edildi. Bu kromozom düzensizliklerinin %88 yapısal ve %12 sayısal düzensizlikler olduğu rapor edildi.

Kromozom düzensizliği bulunan 1 nolu hastada; incelenen 70 hücrenin tamamında 9. Kromozomun heterokromatik bölgesinde artışa (qh+), buna ilaveten 3 hücrede anöplodik sayısal kromozom düzensizliğine rastlandı. Bu sayısal sapmaların 1 ve 10. kromozomların monozomisi ile 15. kromozomun trizomisi (45,XY,-1; 45,XY,-10 ve 45,XY,+15) şeklinde oldukları kaydedildi. İlave olarak bir hücrede 13. kromozomun q kolunda kromatid kırığı [chtb(13q31.1)] tespit edildi. İkinci hasta için 20 hücre incelendi. Tüm alanların sayısal olarak normal oldukları ancak 4 hücrede yapısal düzensizlikler bulunduğu kaydedildi. Üç hücrede kromatid kırığı [chtb(16)(q22), chtb(2)(q23), chtb(2)(q31)], bir hücrede frajilite [fra(5)(q31)] ve bir hücrede gap [gap(2)(q23)] tipi yapısal düzensizlikler kaydedildi. [chtb(2)(q31)] ve [fra(5)(q31)] düzensizlikleri aynı hücrede bulundu. Dördüncü hastada; 12 hücrenin tamamının sayısal olarak normal oldukları, ancak tüm hücrelerde 13. kromozomda satellit artışı (13ps+) ve Y kromozomunun q kolunda artış (Yq+) tespit edildi. Bir hücrede ise 1 ve 3. kromozomlar arasında translokasyon tespit edildi [t(1;3)(p32;q25)].

Beşinci hastada, 64 hücre incelendi; bunların 62'sinde normal (46,XY) kromozom kuruluşuna, ancak iki alanda 20 ile 22. kromozomların monozomilerine (45,XY,-20 ve 45,XY,-22) rastlandı. Yedinci hastada; 20 hücrenin 18'inde normal kromozom kuruluşuna (46,XY) rastlanırken, diğer iki hücrede frajilite [fra(6)(q22) ve fra(7)(q22)] tespit edildi. Sekizinci hastada; 20 hücre incelendi. Bu hücrelerin 5'inin yapısal düzensizliklere [9qh+ (10/20), chtb(4)(q31) (1/20), del(10)(p15) (1/20), gap(7)(q22) (1/20) ve gap(5)(p31) (1/20)] sahip oldukları tespit edildi. Dokuzuncu hasta için toplam 27 hücre incelendi. Bu hücrelerin 1'inde 19. kromozomun monozomisine (45,XX,-19) ve diğerinde 1. kromozomun p33 bölgesinde kromatid kırığına [(chb(1)(p33)] rastlandı.

Onuncu hastada; 35 hücrenin tamamında 9qh+ kromozom yapısına ve bir alanda Y kromozom monozomisine (45,X,-Y) rastlandı. Onbirinci hastada incelenen 20 hücrenin tamamında 9qh+ kromozom yapısına, ilaveten 5 hücrede 6. kromozomun q21 bölgesinde [gap(6)(q21)] ve 2 hücrede 10. kromozomun q22 bölgesinde gap oluşumlarına [gap(10)(q26)] rastlandı. Onüçüncü hastada; 25 hücreden 21'inde normal (46,XY) kromozom kuruluşuna, iki hücrede monozomiye [-17 ve -19 kromozom], bir hücrede 17. kromozomun q23 bölgesinde kromatid kırığına [chb(17)(q23)], bir hücrede ise 4. kromozomun q22-qter bölgesinde delesyona [del(4)(q22-qter)] rastlandı.

Onbeşinci hastada, 45 hücre incelendi; bu hücrelerden 38'inde normal kromozom kuruluşu (46,XX), diğer alanlarda sayısal ve yapısal düzensizlikler [-3 (1/45),-12 (1/45), +17,-X (1/45), -12, 9qh+ (1/45), del(11)(p13-pter) (1/45), del(X)(q13.2-qter) (1/45) ve t(5;17)(p13.3-p13) (1/45)] gözlemlendi. Onaltıncı hastada, 15 hücre incelendi; bunların 14'ünde normal kromozom kuruluşu (46,XY), bir hücrede 3 ve 7. kromozomlar arasında translokasyon [t(3;7)(p23;p22)] tespit edildi. Onyedinci hastada, 50 hücre incelendi; bunların 47'sinde normal kromozom kuruluşuna (46,XX), birinde 18. kromozomda (q21) kromozom kırığına [chrb(18)(q21)], birinde 10. kromozomun p13-pter bölgesinde [del(10)(p13-pter)] ve X kromozomunun p22.1-pter bölgesinde delesyona [del(X)(p22.1-pter)], bir hücrede ise 13. kromozom nullizomisine (-13X2) ve derivatif 12. kromozom kuruluşuna [der(12)(p?)] rastlandı.

Onsekizinci hastada, 50 hücre incelendi; bu hücrelerin beşinde 8, 13, 19, 22 ve Y kromozom monozomileri bulundu. Ayrıca, bir hücrede 11. kromozomun p11.2 bölgesinde kromatid kırığına [chtb(11)(p11.2) ve bir hücrede ise 13 ve 15. kromozomlar arasında translokasyona [der(13)t(13;15)(q34-q21)] rastlandı. İlave olarak 2. kromozomun p23 bölgesinde frajilite [fra(2)(p23)] tespit edildi. Ondokuzuncu hastada, 20 hücre incelendi; bu hücrelerin 3'ünde 10, 19 ve 20. kromozom monozomileri bulundu. Yirminci hastada, 15 hücre incelendi; bunların 2 tanesinde monozomi 13 ve 16 kromozom kuruluşlarına rastlandı. Yirmibirinci hastada, 10 hücre incelendi; bir hücrede monozomi -Y kromozom kuruluşuna rastlandı. Yirmiikinci hastada, 20 hücre incelendi; bir hücrede 9qh+ oluşumuna, 1'inde 15. kromozom monozomisine ve 1'inde 5. kromozomun q31 [chtb(5)(q31)] bölgesinde kromatid kırığına rastlandı (Çizelge 8).

Kontrol grubu olarak 23 erkek birey çalışıldı. On kişide (%43.5) sayısal ve yapısal kromozom düzensizliğine rastlandı. Bu kontrollerden incelenen 1150 hücrede 182 (%15.8) yapısal düzensizlik bulundu. Rapor edilen bu kromozom düzensizlikleri; 9qh+, del(8)(p11-pter), robt(14;21), inv(9)(p11;q13) ve del(7)(q32) şeklindedir. Hasta ve kontrol grubu arasında rapor edilen toplam kromozom düzensizlikler arasındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ). Mevcut olan kromozom düzensizlikleri Çizelge 8'de gösterildi.

**Çizelge 8.** Sitogenetik Bulgular

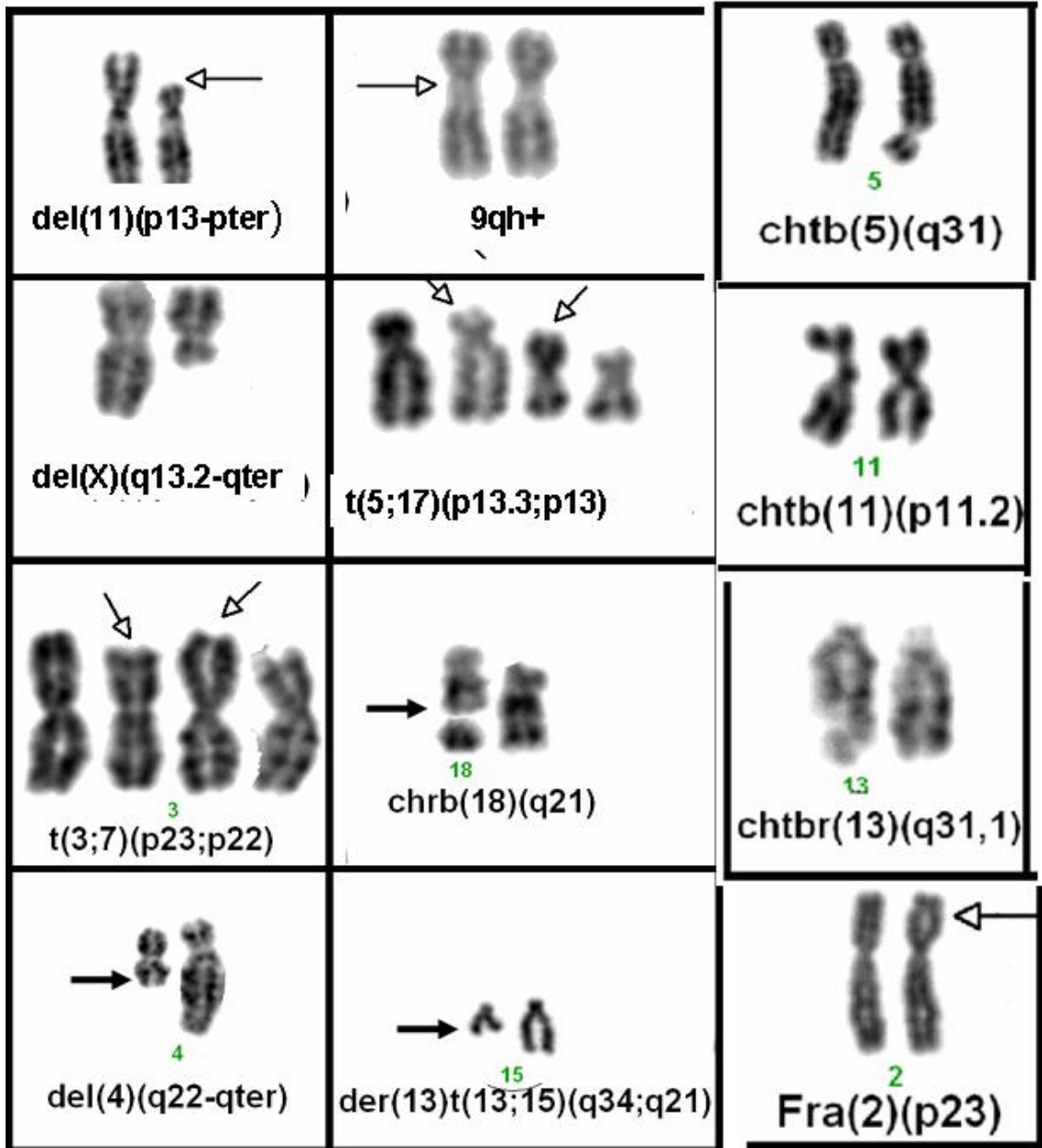
| Hastalar | Karyotip sonuçları (normal-anormal metafaz plağı sayısı/toplam metafaz plağı sayısı)  | Kontroller                                   |
|----------|---|--|
| H1       | 46,XY, 9qh+ (70/70)<br>45,XY,-1 (1/70)<br>45,XY,-10 (2/70)<br>47,XY,+15 (1/70)<br>46,XY,chtb(13q31.1) (1/70)  | K1 46,XY (50/50)                             |
| H2       | 46,XY,chtb(16)(q22) (1/20)<br>46,XY,chtb(2)(q23) (1/20)<br>46,XY,gap(2)(q23) (17/20)<br>46,XY,chtb(2)(q31),fra(5)(q31) (1/20)                         | K2 46,XY,9qh+ (50/50)                        |
| H3       | 46,XX (14/14)   | K3 46,XY (50/50)                             |
| H4       | 46,XY, 13ps+, Yq+ (12/12)<br>46,XY,t(1;3)(p32;q25) (1/12)   | K4 46,XY,del(8)(p11-pter) (1/50)             |
| H5       | 46,XY (62/64)<br>45,XY,-20(1/64)<br>45,XY,-22(1/64)   | K5 46,XY(50/50)                              |
| H6       | 46,XY (10/10)   | K6 45,XY, robt(14;21) (50/50)                |
| H7       | 46,XY (18/20)<br>46,XY,fra(6)(q22) (1/20)<br>46,XY,fra(7)(q22) (1/20)   | K7 46,XY (50/50)                             |
| H8       | 46,XY (20/20)<br>46,XY,9qh+ (10/20)<br>46,XY,chtb(4)(q31) (1/20)<br>46,XY,del(10)(p15) (1/20)<br>46,XY,gap(7)(q22) (1/20)<br>46,XY,gap(5)(p31) (1/20) | K8 46,XY (50/50)                             |
| H9       | 46,XX (26/27)<br>45,XX,-19 (1/27)<br>46,XX, chtb(1)(p33) (1/27)   | K9 46,XY,9h+ (11/50)                         |
| H10      | 46,XY, 9qh+ (35/35)<br>45,X,-Y (1/35)   | K10 46,XY (50/50)                            |
| H11      | 46,XY,9qh+ (20/20)<br>46,XY,9qh+, gap(6)(q21) (5/20)<br>46,XY,9qh+, gap(10)(q22) (2/20)   | K11 46,XY (50/50)                            |
| H12      | 46,XY (20/20)   | K12 46,XY,9qh+ (3/50)                        |
| H13      | 46,XY (21/25)<br>45,XY,-17 (1/25)<br>45,XY,-19 (1/25)<br>46,XY,chtb(17)(q23) (1/25)<br>46,XY,del(4)(q22-qter) (1/25)                                  | K13 46,XY,inv(9)(p11;q13) (50/50)            |
| H14      | 46,XY (30/30)   | K14 46,XY (50/50)                            |
| H15      | 46,XX (38/45)<br>45,XX,-3 (1/45)<br>45,XX,-12 (1/45)<br>46,X46,X,+17,-X (1/45)  | K15 46,XY, 9qh+ (5/50)<br>del(7)(q32) (1/50) |

|     |   |     |                    |
|-----|---|-----|--------------------|
|     | 45,XX,-12, 9qh+ (1/45)<br>46,XX,del(X)(q13.2-qter)(1/45)<br>46,XX,t(5;17)(p13.3-p13)<br>(1/45)X,del(11)(p13-pter) (1/45)  |     |                    |
| H16 | 46,XY(14/15)<br>46,XY,t(3;7)(p23;p22) (1/15)  | K16 | 46,XY, 9qh+ (6/50) |
| H17 | 46,XX (47/50)<br>46,XX, chrb(18)(q21) (1/50)<br>46,XX,del(10)(p13-pter); del(X)(p22.1-<br>pter) (1/50)<br>44,XX,-13x2,der(12)(p?) (1/50)  | K17 | 46,XY, (50/50)     |
| H18 | 46,XY (41/50)<br>45,XY,-8 (1/50)<br>45,XY,-13 (1/50)<br>45,XY,-19 (2/50)<br>45,XY,-22 (2/50)<br>46,XY,chtb(11)(p11.2) (1/50)<br>45,X,-Y (1/50)<br>46,XY,der(13)t(13;15)(q34-q21)<br>(1/50)19<br>46,XY, fra(2)(p23) (1/50) | K18 | 46,XY, 9qh+ (3/50) |
| H19 | 46,XX (17/20)<br>45,XX,-10 (1/20)<br>45,XX,-19 (1/20)<br>45,XX,-20 (1/20)   | K19 | 46,XY, 9qh+ (2/50) |
| H20 | 46,XX (13/15)<br>45,XX,-13 (1/15)<br>45,XX,-16 (1/15)   | K20 | 46,XY (50/50)      |
| H21 | 46,XY (9/10)<br>45,X,-Y (1/10)  | K21 | 46,XY (50/50)      |
| H22 | 46,XY (17/20)<br>46,XY,9qh+ (1/20)<br>45,XY,-15 (1/20)<br>46,XY,chtb(5)(q31) (1/20)   | K22 | 46,XY (50/50)      |
| H23 | 46,XY (27/27)   | K23 | 46,XY (50/50)      |

Yukarıdaki bulgular doğrultusunda araştırılan 23 hastanın incelen 639 hücrenin 429'unda (%67) normal kromozom kuruluşu (46,XY/46,XX) ve 210'ununda (%33) sayısal ve yapısal kromozom düzensizlikleri bulundu. Normal hücrelerin 275'inde 46,XY (%43) ve 154'ünde 46,XX (%24) kromozom kuruluşuna rastlandı. Bir hücrede birden fazla düzensizliğin bulunduğu durumlarda bunların her biri tek olarak ele alındığından dolayı 210 hücrede toplam olarak 241 kromozom düzensizliğine rastlandı. Bu durumda, toplam düzensizlik sayısının tüm hücre sayısı içerisindeki oranı %37.7 olarak tespit edildi. Saptanan yapısal düzensizlik sayısı 212 olup tüm

hücreler içerisindeki oranı %33.1 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %87.9 olarak tespit edildi. Bulunan sayısal düzensizlik sayısı 29 olup tüm hücreler içerisindeki oranı %4.5 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %12 olarak rapor edildi (Çizelge 9).

Mevcut yapısal düzensizlikler arasında; 9qh+ oluşumu, 137 hücrede tespit edildi, tüm hücreler içerisindeki oranı %21.4, tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %56.8 olarak rapor edildi. gap(2)(q23) oluşumu, 17 hücrede tespit edilmiş olup tüm hücreler içerisindeki oranı %2.7, tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %7 olarak saptandı. 13ps+ oluşumu, 12 hücrede tespit edilmiş olup tüm hücreler içerisindeki oranı %1.9 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %5'dir. Yq+ oluşumu, 12 hücrede bulundu; tüm hücreler içerisindeki oranı %1.9 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %5 olarak tespit edildi. gap(6)(q21) oluşumu, 5 hücrede tespit edildi, tüm hücreler içerisindeki oranı %0.8 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %2.1'dir. gap(10)(q22) oluşumu, 2 alanda bulundu, tüm hücreler içerisindeki oranı %0.3 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranı %0.8 olarak bulundu. Bunlarla birlikte, t(1;3)(p32;q25), chtb(1)(p33), chtb(2)(q23), chtb(2)(p31), fra(2)(p23), t(3;7)(p23;p22), del(4)(q22-qter), chtb(4)(q31), t(5;17)(p13.3-p13), chtb(5)(q31), fra(5)(q31), gap(5)(p31), fra(6)(q22), fra(7)(q22), gap(7)(q22), del(10)(p13-pter), del(10)(p15), del(11)(p13-pter), chtb(11)(p11.2), der(12)(p?), der(13)t(13;15)(q34-q21), chtb(13q31.1), chtb(16)(q22), chtb(17)(q23), chrb(18)(q21), del(X)(p22.1-pter), del(X)(q13.2-qter), oluşumlarına birer hücrede rastlanmış olup tüm hücreler içerisindeki oranları %0.15 ve tüm düzensizlikler içerisindeki oranları %0.4'dür (Çizelge 8, 9, 10, Şekil 21).

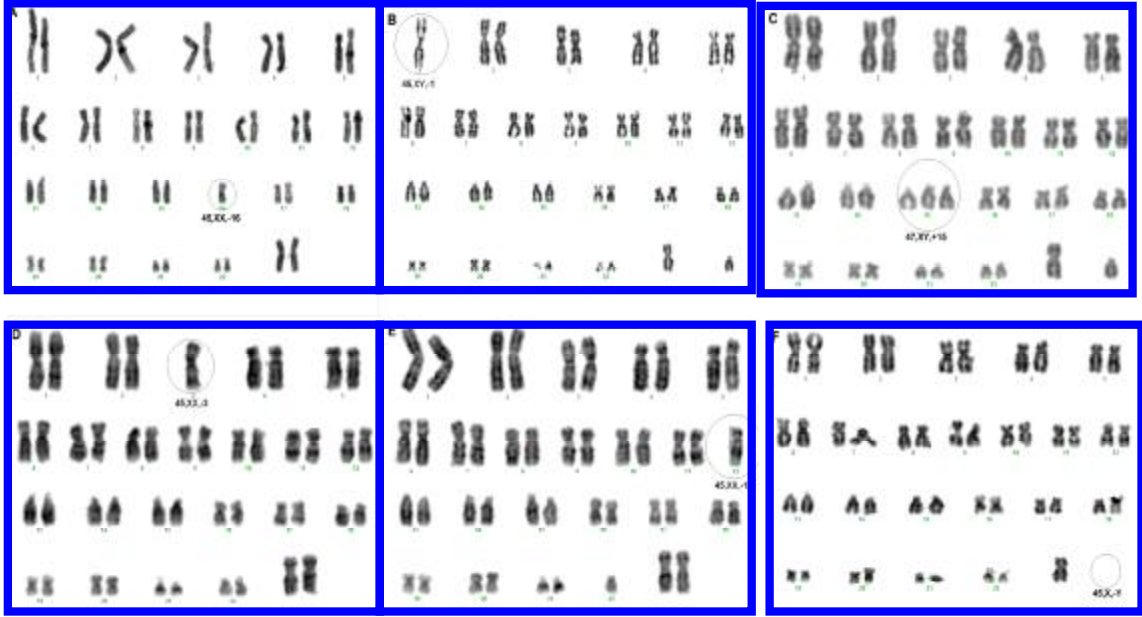


**Şekil 21.** Sağlıker sendromlu hastalarda gözlenen bazı yapısal kromozom düzensizliklerinin kısmi karyotip görüntüleri.

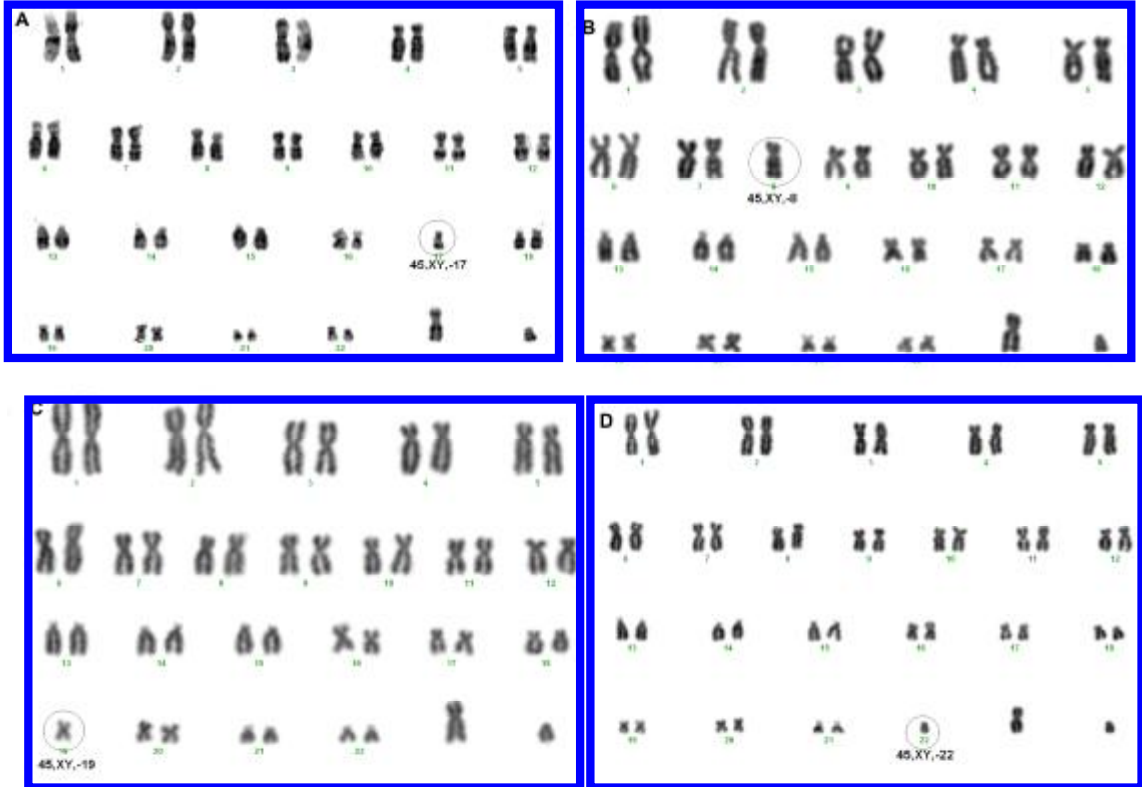
Saptanan sayısal kromozom düzensizlikleri ise 45,XY/XX,-19 kromozom kuruluşuna 5 hücrede rastlanmış olup tüm hücreler içerisindeki oranı %0.8 tüm anomaliler içerisindeki oranı %2.1'dur. 45,XY/XX,-10, 45,XY,-22 ve 45,X,-Y kromozom kuruluşlarına 3'er hücrelerde rastlanmış olup tüm hücreler içerisindeki oranları %0.47 tüm anomaliler içerisindeki oranları %1.24'tür. 45,XY/XX,-20, 45,XX,-12 ve 45,XY/XX,-13 kromozom kuruluşlarına 2'şer hücrelerde rastlanmış olup tüm hücreler içerisindeki oranları %0.31, tüm anomaliler içerisindeki oranları %0.83'tür.

45,XY,-1, 45,XX,-3, 45,XY,-8, 44,XX, -13x2, 47,XY,+15, 45,XY,-15, 45,XX,-16, 46,X,+17,-X, 45,XY,-17 kromozom kuruluşlarına 1'er hücrelerde rastlanmış olup tüm hücreler içerisindeki oranları %0.15 tüm anomaliler içerisindeki oranları %0.41'dir. (Çizelge 9, Şekil 22 ve 23).

İncelenen metafaz plaklarında gözlenen bazı sayısal kromozom düzensizliklerine ait resimler aşağıda verilmiştir (Şekil 22 ve 23).



**Şekil 22.** Sağlıker sendromlu hastalarda gözlenen bazı sayısal kromozom düzensizliklerinin karyotip görüntüleri: A 45,XX,-16; B 45,XY,-1; C 47,XY,+15; D 45,XX,-3; E 45,XX,-12; F 45,X,-Y .



**Şekil 23.** Sağlıker sendromlu hastalarda gözlenen bazı sayısal kromozom düzensizliklerinin karyotip görüntüleri: A 45,XY,-17; B 45,XY,-8; C 45,XY,-19; D 45,XY,-22 .

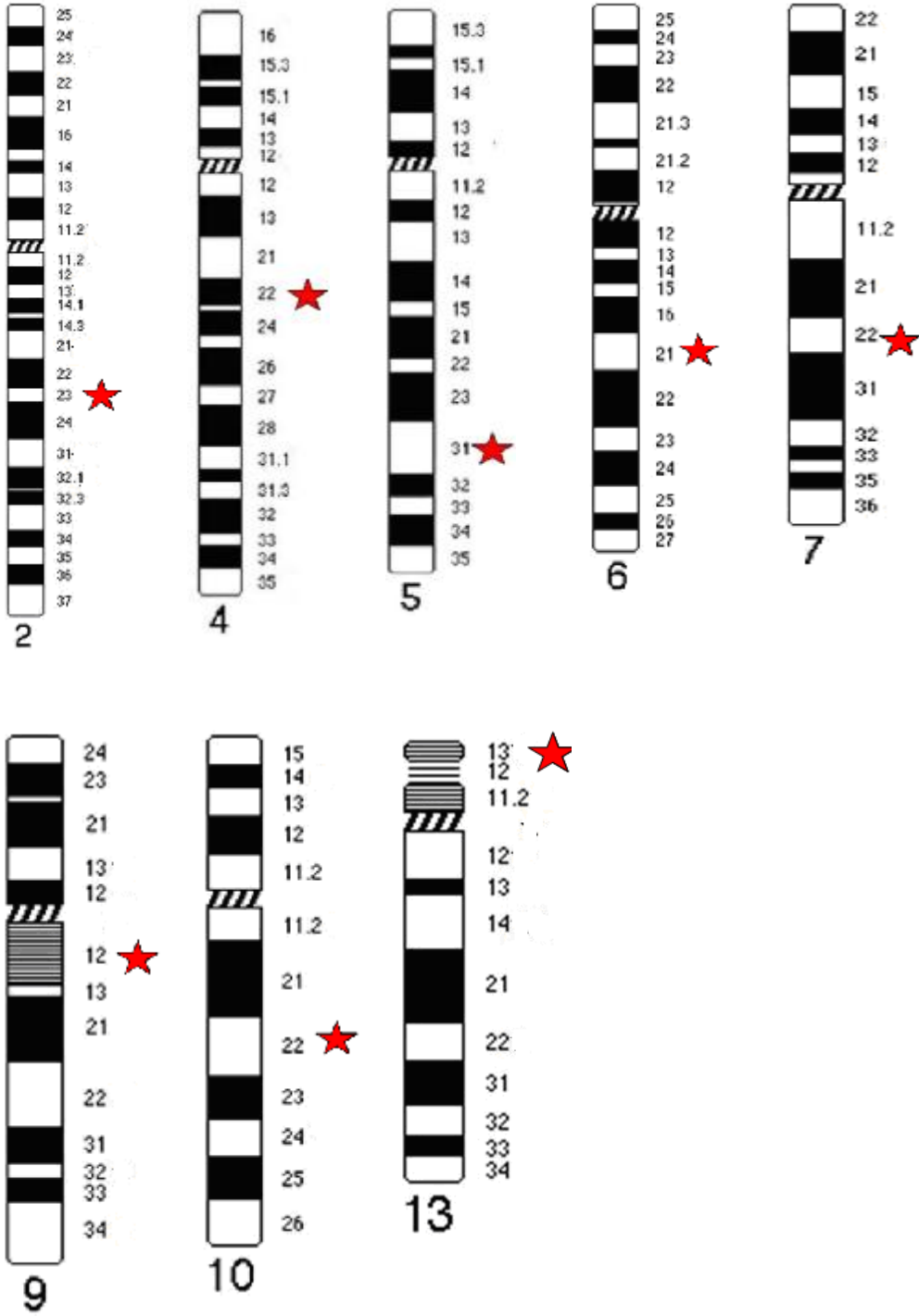
**Çizelge 9.** Sitogenetik Bulgular

| Karyotip                  | İncelenen hücre sayısı | İncelenen tüm hücreler içindeki oranı (%) | Tüm düzensizlikler içerisindeki oranı (%) |
|---------------------------|------------------------|---|---|
| 46,XY                     | 275                    | 43  | -   |
| 46,XX                     | 154                    | 24  | -   |
| <b>Total</b>              | <b>429</b>             | <b>67</b>                                 | <b>-</b>                                  |
| <b>Yapısal anomaliler</b> |                        |   |   |
| t(1;3)(p32;q25)           | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| chtb(1)(p33)              | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| chtb(2)(q23)              | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| chtb(2)(p31)              | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| fra(2)(p23)               | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>gap(2)(q23)</b>        | <b>17</b>              | <b>2.66</b>                               | <b>7.05</b>                               |
| t(3;7)(p23;p22)           | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>del(4)(q22-qter)</b>   | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>chtb(4)(q31)</b>       | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| t(5;17)(p13.3-p13)        | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>chtb(5)(q31)</b>       | <b>1</b>               | <b>0.15</b>                               | <b>0.41</b>                               |
| <b>fra(5)(q31)</b>        | <b>1</b>               | <b>0.15</b>                               | <b>0.41</b>                               |
| <b>gap(5)(q31)</b>        | <b>1</b>               | <b>0.15</b>                               | <b>0.41</b>                               |
| fra(6)(q22)               | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>gap(6)(q21)</b>        | <b>5</b>               | <b>0.78</b>                               | <b>2.07</b>                               |
| <b>fra(7)(q22)</b>        | <b>1</b>               | <b>0.15</b>                               | <b>0.41</b>                               |
| <b>gap(7)(q22)</b>        | <b>1</b>               | <b>0.15</b>                               | <b>0.41</b>                               |
| <b>9qh+</b>               | <b>137</b>             | <b>21.43</b>                              | <b>56.84</b>                              |
| del(10)(p13-pter)         | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| del(10)(p15)              | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>gap(10)(q22)</b>       | <b>2</b>               | <b>0.31</b>                               | <b>0.83</b>                               |
| del(11)(p13-pter)         | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| chtb(11)(p11.2)           | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| der(12)(p?)               | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| der(13)t(13;15)(q34-q21)  | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| <b>13ps+</b>              | <b>12</b>              | <b>1.87</b>                               | <b>4.97</b>                               |
| chtb(13q31.1)             | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| chtb(16)(q22)             | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |
| chtb(17)(q23)             | 1                      | 0.15                                      | 0.41                                      |

|                                  |            |              |              |
|----------------------------------|------------|--------------|--------------|
| chr(18)(q22)                     | 1          | 0.15         | 0.41         |
| del(X)(p22.1-pter)               | 1          | 0.15         | 0.41         |
| del(X)(q13.2-qter)               | 1          | 0.15         | 0.41         |
| <b>Yq+</b>                       | <b>12</b>  | <b>1.87</b>  | <b>4.97</b>  |
| <b>Toplam</b>                    | <b>212</b> | <b>33.17</b> | <b>87.96</b> |
| <b>Sayısal anomaliler</b>        |            |              |              |
| 45,XY,-1                         | 1          | 0.15         | 0.41         |
| 45,XX,-3                         | 1          | 0.15         | 0.41         |
| 45,XY,-8                         | 1          | 0.15         | 0.41         |
| <b>45,XY/XX,-10</b>              | <b>3</b>   | <b>0.47</b>  | <b>1.24</b>  |
| <b>45,XX,-12</b>                 | <b>2</b>   | <b>0.31</b>  | <b>0.83</b>  |
| <b>45,XY/XX,-13, 44,XX,-13X2</b> | <b>3</b>   | <b>0.47</b>  | <b>1.24</b>  |
| 47,XY,+15                        | 1          | 0.15         | 0.41         |
| 45,XY,-15                        | 1          | 0.15         | 0.41         |
| 45,XX,-16                        | 1          | 0.15         | 0.41         |
| 46,X,+17,-X                      | 1          | 0.15         | 0.41         |
| 45,XY,-17                        | 1          | 0.15         | 0.41         |
| <b>45,XY/XX,-19</b>              | <b>5</b>   | <b>0.78</b>  | <b>2.07</b>  |
| <b>45,XY/XX,-20</b>              | <b>2</b>   | <b>0.31</b>  | <b>0.83</b>  |
| <b>45,XY,-22</b>                 | <b>3</b>   | <b>0.47</b>  | <b>1.24</b>  |
| <b>45,X,-Y</b>                   | <b>3</b>   | <b>0.47</b>  | <b>1.24</b>  |
| <b>Toplam</b>                    | <b>29</b>  | <b>4.53</b>  | <b>12.03</b> |
| <b>Genel toplam</b>              | <b>241</b> | <b>37.7</b>  | <b>-</b>     |

Çizelge 10. Saptanan bazı önemli yapısal düzensizliklerin idiyogram üzerindeki gösterimleri

Kromozomların idiyogramı



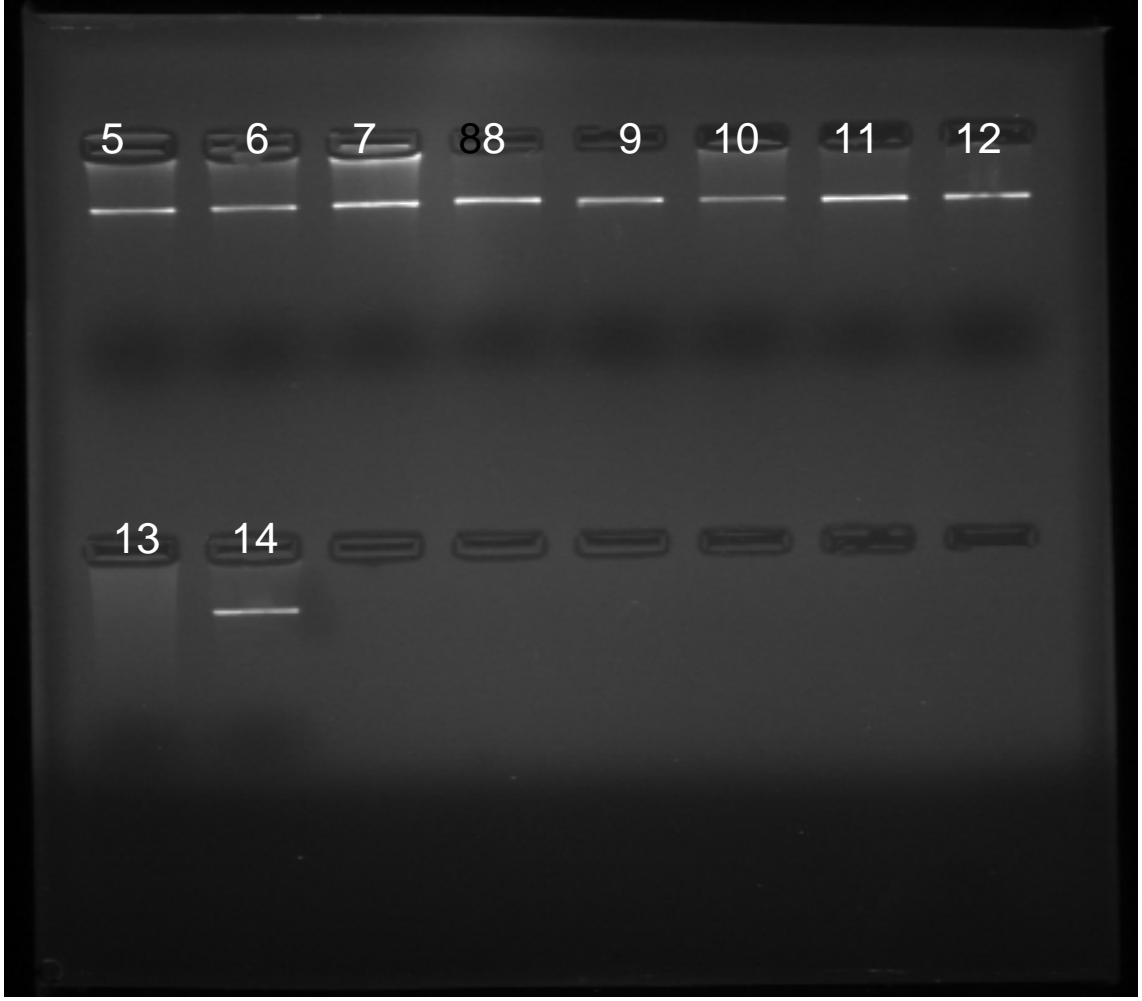
\* Kırmızı yıldızlar, kromozomlardaki hassas bölgelerini göstermektedirler (delesyon heterokromatin artışı, kromozom kırığı, kromatid kırığı, frajil bölgeler ve gaplar).

## 4.2 Moleküler Bulgular

Araştırmada yer alan Sağlıker sendromlu 23 hasta için CASR geninin 2 ve 3. ekzonları çalışıldığı için toplam 46 örnekten dizi analizi yapıldı, bu rnekerin bir kısmının PCR jel görüntüleri Şekil 24'de gösterilmektedir.

İkinci ekzon için çalışılan rnekerden 16'sında herhangi bir mutasyona rastlanmadı. Üç hastada, 70239 pozisyonundaki adenin (A) bazının kayba uğramış olduğu saptandı. Bu bölge kodlayıcı ekzonun dışında bulunduğundan genin ürününe bir etkisi yoktur. İki hastada, 70471'de A>G heterozigot değişimi saptandı. Bu bazın bulunduğu bölge 2. ekzonun içerisindedir, ancak bu değişim ATG başlama kodonundan önce olduğundan gen ürününe bir etkisi yoktur. Bir hastada, 70622'de T>C heterozigot değişimi saptandı. Bu bölge, 2. ekzonun kodlayıcı bölgesi içerisindedir. Bu baz değişimine bağlı olarak TTT kodonu TTC kodonuna dönüşmüştür. Bu iki kodon da fenilalanin aminoasidini kodlamaktadırlar, dolayısıyla nihai gen ürününde bir değişime neden olmamaktadırlar (izelge 11, Şekil 25, 26). Bir hastadan ise sonuç alınamadı.

nc ekzon için 8 hastada, mutasyonel bir değişime rastlanmadı. On bir hastada, 73724 pozisyonunda G>A homozigot değişimi ve bir hastada ise 73724'de G>A heterozigot değişimi saptandı. Bu baz değişimlerinin meydana geldiği bölge, 3. ekzonun dışında olduğundan genin ifadesinde herhangi bir değişime neden olmamaktadır. Üç hastada ise sonuç alınamadı (izelge 12).



**Şekil 24.** CASR 2. ekzon bölgesinin PCR ile çoğaltıldığını gösteren jel görüntüsü. Sayılar örnek numaralarını göstermektedir.

**Çizelge 11.** İkinci ekzon için dizi analizi sonuçları

| Hasta no | H n | Sonuçlar                                     |
|----------|-----|--|
|          | 1   | Normal dizi                                  |
|          | 2   | Normal dizi                                  |
|          | 3   | <b>70622'de T&gt;C heterozigot değişimi</b>  |
|          | 4   | Normal dizi                                  |
|          | 5   | Normal dizi                                  |
|          | 6   | Normal dizi                                  |
|          | 7   | <b>70239 pozisyonundaki Adenin baz kaybı</b> |
|          | 8   | Normal dizi                                  |
|          | 9   | <b>70471'de A&gt;G heterozigot değişimi</b>  |
| 0        | 1   | <b>70239 pozisyonundaki Adenin baz kaybı</b> |
| 1        | 1   | Normal dizi                                  |
| 2        | 1   | Sonuç alınamadı                              |
| 3        | 1   | <b>70239 pozisyonundaki Adenin baz kaybı</b> |
| 4        | 1   | Normal dizi                                  |
| 5        | 1   | <b>70471'de A&gt;G heterozigot değişimi</b>  |
| 6        | 1   | Normal dizi                                  |
| 7        | 1   | Normal dizi                                  |
| 8        | 1   | Normal dizi                                  |
| 9        | 1   | Normal dizi                                  |
| 0        | 2   | Normal dizi                                  |
| 1        | 2   | Normal dizi                                  |
| 22       |     | Normal dizi                                  |
| 3        | 2   | Normal dizi                                  |

**Çizelge 12.** Üçüncü ekzon için dizi analizi sonuçları

| Hasta no | Hasta no | Sonuçlar                                    |
|----------|----------|---|
|          | 1        | Normal dizi                                 |
|          | 2        | Sonuç alınamadı                             |
|          | 3        | Normal dizi                                 |
|          | 4        | Normal dizi                                 |
|          | 5        | Sonuç alınamadı                             |
|          | 6        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
|          | 7        | Normal dizi                                 |
|          | 8        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
|          | 9        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 0        | 1        | Normal dizi                                 |
| 1        | 1        | <b>73724'de G&gt;A heterozigot değişimi</b> |
| 2        | 1        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 3        | 1        | Normal dizi                                 |
| 4        | 1        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 5        | 1        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 6        | 1        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 7        | 1        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 8        | 1        | Normal dizi                                 |
| 9        | 1        | Normal dizi                                 |
| 0        | 2        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 1        | 2        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 2        | 2        | <b>73724'de G&gt;A homozigot değişimi</b>   |
| 3        | 2        | Sonuç alınamadı                             |

## 2.Ekzon (primer dizilerini de içerecek şekilde)

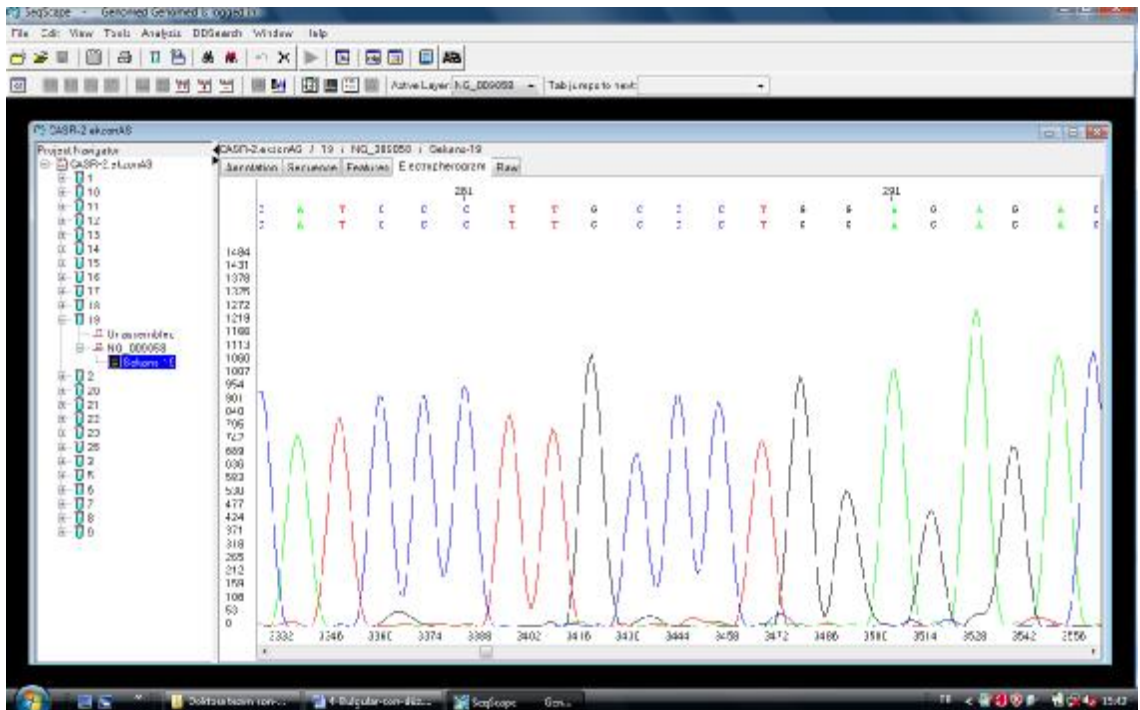
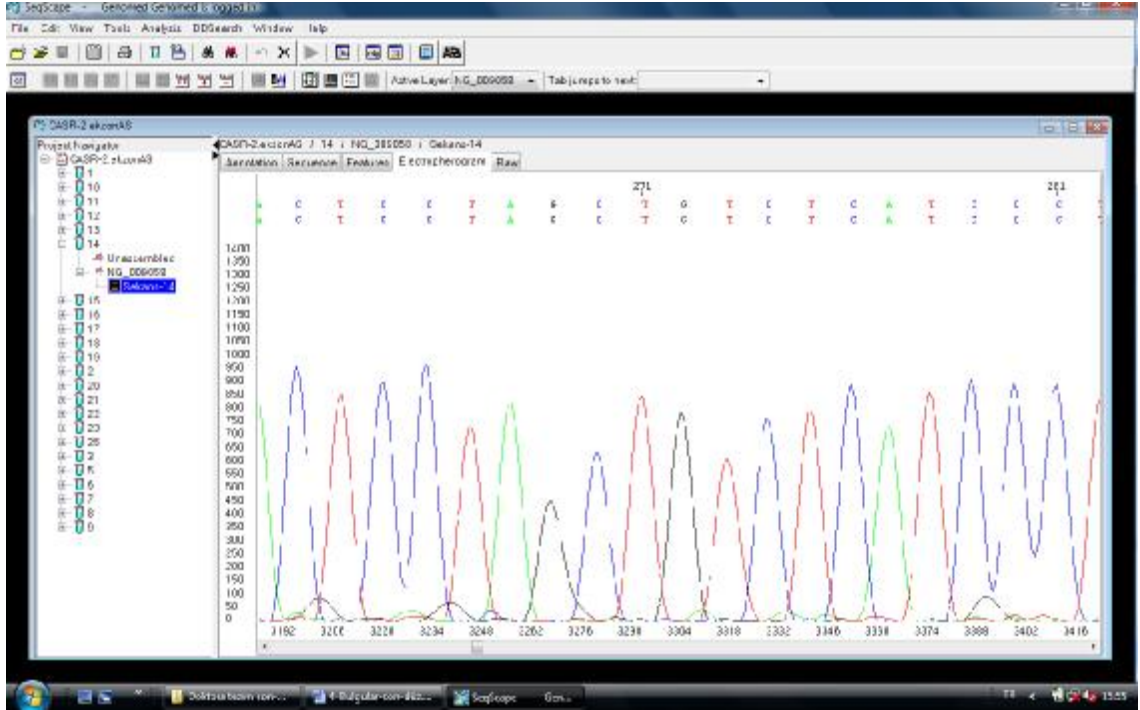
70141 aggccttttc agtctgccac ccctaggccc ctctaaatgg aaattctgag ccaccttagt  
70201 tgcagtggctc atcacaagat gggattgagg ttttagctgAa tccatthttgt ctttcttttc  
70261 ttttagaagg catcacagga ggcctctgca tgatgtggct tccaaagact caaggaccac  
70321 ccacattaca agtctggatt gaggaaggca gaaatggaga ttcaaacacc acgtcttcta  
70381 ttattttatt aatcaatctg tagacatgtg tccccactgc agggagtgaa ctgctccaag  
70441 ggagaaactt ctgggagcct ccaaactcct Ggctgtctca tcccttgccc tggagagacg  
70501 gcagaaccat ggcattttat agctgctgct gggctctctt ggcactcacc tggcacacct  
70561 ctgcctacgg gccagaccag cgagcccaaa agaaggggga cattatcctt ggggggctct  
70621 tCcctattca ttttgagta gcagctaaag atcaagatct caaatcaagg cgggagtctg  
70681 tggaatgtat caggtaagaa gaggggccta atctgccaat ctcttctctt ctgagtggtt  
70741 ggagaaaagc tgcaccaaac gcaaaataat tttttcaaac tttgtcctat cttttcaaga  
70801 atagtgattg attggtaatc atgctgaagc ttattgcccc cacaacctgc cttttttttc  
70861 ctgaagactt ctttttaaat aaaatgtcaa tgatattaag tagaaaatcc atgcatggcc

## 3.Ekzon

73141 ttttgccag gctggttttg aactctggac ctcaagtgat ccaccgcct cggcctcccg  
73201 aagtgctgag attacaggcg tgagccacca cgcccggcca tgtcatcccc attttaacag  
73261 agagggctct gtacagagca tgccatgaag ccagagagta gtaacagttc gatgattcaa  
73321 acccagcttt gccaggctt tactctaaag tegttagacta gaaagcttcc cattttcttc  
73381 cacttcttct ttcttcag g tataatttcc gtgggtttcg ctggttacag gctatgatat  
73441 ttgccataga ggagataaac agcagccag cccttcttcc caacttgacg ctgggataca  
73501 ggatatttga cacttgcaac accgtttcta aggccttggga agccacctg agttttgttg  
73561 ctcaaaacaa aattgattct ttgaacctg atgagttctg caactgctca gagcacattc  
73621 cctctacgat tgctgtggtg ggagcaactg gctcaggcgt ctccacggca gtggcaaatc  
73681 tgctggggct cttctacatt cccaggtac tcaagccttc tcaAgcgggg cactgggagc  
73741 aggatcagaa gaagcaggct tgggggtgcc atgcccaata gccatacggg ttaccatatt  
73801 cccatctctg gcacaaaaga cctatgattt agttgatatg ctgtatcatg accatttggg

**Şekil 25.** CaSR geni 2. ve 3. ekzonları oluşturan DNA dizileri. Esas ekzonları oluşturan diziler ve primer dizileri kırmızı harflerle, baz değişimleri de mavi renklerle gösterilmiştir

30



Şekil 26. İkinci ekzon 14 ve 19. örneklere ait kısmi elektroferogram görüntüleri

## 5. TARTIŞMA

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), nefron sayısında azalma ve fonksiyonlarında bozulma şeklinde seyreden ve sıklıkla son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanan patofizyolojik bir süreçtir. Sağlıker sendromu ise KBY bağlı olarak gelişir ve ağırlıklı olarak kemik bozuklukları ile karakterizedir. Sendromda, hücre dışı  $Ca^{+2}$  düzeyi düşer.  $Ca^{+2}$  iyonu ile kemik dokusu arasında direk bir ilişki olduğu göz önüne alındığında Sağlıker sendromlu hastalarda,  $Ca^{+2}$  metabolizmasını düzenleyen moleküler yolakların, bu yolakları oluşturan elemanların yapılarında meydana gelen değişimlerin ve bu değişimlerin fonksiyonel sonuçlarının anlaşılması, KBY'nin gelişim seyrinin ve bu sendromun etiyolosinin anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünölmektedir. Sağlıker sendromlu hastalarda,  $Ca^{+2}$  metabolizmasını düzenleyen moleküler yolakları oluşturan proteinleri kodlayan genlerin yapısında meydana gelen değişimlerin hastalığın etiyolojisinde rol aldıkları düşünölmektedir. Ancak, Sağlıker sendromlu hastalardaki genetik öykü henüz bilinmemektedir.

Kromozomların sıcak bölgeleri olarak ifade edilen kritik lokuslarda oluşan yapısal düzensizlikler, bazı hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çalışmamızda; karyotip analizleri yapılan Sağlıker sendromlu 23 hastanın %78.2'sinde, bir yada daha fazla sayıda sayısal veya yapısal kromozom düzensizliğine rastlandı. Bu hastalarda, incelenen 639 hücrenin %37.7'inde sayısal ve yapısal kromozom kusuru rapor edildi. Kontrol grubunda ise kusurlu kromozom taşıyan hücre oranı %15.8 olarak tespit edildi. Hastalarımızda, tespit edilen bu kromozom düzensizliklerinin %87.9'unun yapısal ve %12.1'inin sayısal düzensizlikler olduğu gözlemlendi. Bu oranlara göre hastalarda yapısal kromozom hasarlarının önemli oranda arttığı anlaşılmaktadır. Bu kromozom düzensizlikleri bakımından, hasta (%37.7) ve kontrol (%15.8) grubu arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ( $p<0,05$ ). Bu da Sağlıker sendromlu hastalarda, kromozom hasarlarının veya genetik dengesizliklerin önemli oranda arttığını göstermektedir. Nitekim, pek çok çalışmada; KBH

hastalarında değişik kromozomlarda yapısal düzensizlikler ve bazı bölgelerde hastalıkla ilgili genlere rastlandığı bildirilmiştir. Bu kromozom düzensizlikleri; 1p13, 1q21, 2q13, 3p21, 3q21-25, 4q13-23, 6p21.l-pl2, 9q34, 10q23.33, 13q kaybı ve 13q33–34, 16p13, p53 ve 17p23 bölgeleri ile ilişkilidir<sup>31,32,33,34,35,36</sup>. Hastalarımızda; birer hücrede önemli kromozom kayıpları ve parça alışverişleri bulundu. Bunlar; t(1;3)(p32;q25), del(4)(q22-qter), t(5;17)(p13.3-p13), del(10)(p13-pter), del(10)(p15), del(11)(p13-pter), der(12)(p?), der(13)t(13;15)(q34-q21), del(X)(p22.1-pter) ve del(X)(q13.2-qter) şeklindeki önemli yapısal hasarlardır (Çizelge 8 ve 9)(Şekil 21). Hastalarımızda gözlenen bu önemli yapısal düzensizlikler, hastalığın oluşumu/prognozu açısından önemli olabilirler.

Hastalarımızda; bulduğumuz kromozom düzensizliklerinin %88'i yapısal düzensizlikler olup, bunlar 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13 ve X kromozomları üzerindeki hasarlardır (Çizelge 8,9,10) (Şekil 21). Bu yapısal kromozom düzensizlikleri içerisinde 9qh+ oluşumu 137 hücrede tespit edildi. 9qh+ kromozom kuruluşuna, tüm hücrelerin %21.4'ünde ve tüm düzensizliklerin %56.8'inde rastlandı (Çizelge 9). Dokuzuncu kromozomunun uzun kolunda heterokromatik artış ve inv(9)(p11;q12), her ne kadar bazı araştırmacılar tarafından bazı hastalıklarla ve fenotipik düzensizliklerle ilişkilendirilmişler ise de, normal varyant olarak kabul edilmektedirler<sup>37,38,39,40</sup>. Bu yapısal şekil bozuklukları normal populasyonlarda en sık rastlanan düzensizliklerdir.

Hastalarımızda, ikinci sıklıkta rastladığımız kromozom düzensizliği, 2. kromozomun uzun kolunun q23 bölgesindeki gap oluşumudur. 17 hücrede bu düzensizliğe rastlandı. İkinci kromozomdaki bu yapısal düzensizlik, tüm hücrelerin %2.7'sine ve tüm düzensizliklerin %7.1'ine karşılık gelmektedir. Bu gap oluşumu ile birlikte, hastalarımızda; 2. kromozomdaki diğer hasar gören bölgeler; chtb(2)(q23) chtb(2)(p31) ve fra(2)(p23) şeklindedirler (Çizelge 8, 9 ve 10). Yapılan çalışmalarda; ikinci kromozomun q13 bölgesinin otozomal resesif medüller kistik böbrek hastalığı (Nephronophthisis type 1, NPH1) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir<sup>41,42</sup>. Hastalarımızda, 2. kromozomda gözlenen hasarlar, Sağlıker sendromunun prognozu açısından önemli bölgeler olabilirler. Bu kritik

lokuslarda oluşan yapısal düzensizlikler bu bölgelerdeki genleri uyarmak ve/veya baskılamak suretiyle hastalığın oluşumuna neden olmuş olabilirler.

Hastalarımızda, 13ps+ ve Yq+ oluşumlarına 12'şer hücrede rastlandı (Çizelge 8 ve 9). Bu sayı, tüm hücrelerin %1.9'una ve tüm düzensizliklerin %5'ine karşılık gelmektedir. Bu iki normal karyotip dışı sapmalar fenotipe yansımayan varyantlar olarak kabul edilmektedirler. Bu nedenle bu değişimlerin hasta grubumuzla bir ilişkisi olamayacağını söyleyebiliriz.

PKD1 geni mutasyonları, otozomal dominant kalıtım gösteren polikistik böbrek hastalığı vakalarının %85'inden sorumludurlar. Bu gen 16 kromozomun p13.3 bölgesine lokalize olmuştur. Hastaların geriye kalanlarından, 4q21-23 bölgesine lokalize olmuş PKD2 geninde meydana gelen mutasyonlar sorumludurlar. Bu her iki gene ait mutasyonların saptanmadığı olgularda ise üçüncü bir gendeki mutasyonların hastalığın gelişmesine yol açtığı düşünülmektedir<sup>2,3</sup>. Hastalarımızda, 4. kromozomun q22-qter ve q31 bölgelerinde kromozom kaybı ve kromatid kırığı bulundu (Çizelge 8 ve 9, 10) (Şekil 21). Özellikle, del(4)(q22-qter) bölgesi kondrodisplastik hastalarda kemik gelişimini sağlayan geni (BMGR1B) içermesi bakımından dikkat çekicidir<sup>43</sup>. Bu konuda, bir şey söylemek için daha fazla hasta çalışılması gerekmektedir.

Hastalarımızda, gap(6)(q21) oluşumuna 5 hücrede rastlandı. Bu kromozom hasarı tüm hücrelerin %0.8'ine ve tüm düzensizliklerin %2.1'ine karşılık gelmektedir (Çizelge 8, 9, 10). Nitekim, Zerres ve ark. (1994) ile Guay-Woodford ve ark. (1995) otozomal resesif polikistik böbrek hastalığı ile ilgili bölgeyi 6. kromozomun p21-cen bölgesinde tanımlamışlardır<sup>44,45</sup>. Hastalarımızda 6q21 bölgesinde hasar görülmesi bu bağlamda ilgi çekicidir.

Diabetik ve nondiabetik böbrek hastalığı ile ilişkili bağlantı analizlerinde 10. kromozomun uzun kolu üzerindeki bazı bölgeler tespit edilmişlerdir. Li ve ark. (2011) ile Bowden ve ark. (2004) tip 2 diyabetik nefropatilerde, 10. kromozomun uzun kolunda bazı bölgeler ile hastalık arasında bir ilişkinin bulunduğunu bildirmişlerdir<sup>46,47</sup>. Çalışmamızda ise 4 hücrede 10. kromozomda; del(10)(p13-pter), del(10)(p15) ve gap(10)(q22)x2 şeklinde hasarlar rapor edildi (Çizelge 8 ve 9) (Şekil 21). Tüm bu bilgiler ışığında; 10. kromozomun Sağlıker hastalarında,

hastalığın oluşumunda yada seyrinde etkili genleri ihtiva edebileceğini ileri sürebiliriz .

Alport sendromu, ilerleyici böbrek yetmezliği ile karakterize kalıtsal nefrit özelliğinde bir hastalık olup X kromozomuna bağlı olarak kalıtım gösterir. Glomerular zarlarda eksprese olan tip IV kollajeni oluşturan alt ünitelerden birini kodlayan gen olan COL4A5'te meydana gelen mutasyonlar bu klinik tablodan sorumludurlar. COL4A5 geni, Xq22 bölgesinde yerleşiktir. Bunun dışında, tip IV kollajenin yapısını katılan iki farklı kollajen proteini daha bulunmaktadır<sup>4,5</sup>. Hastalarımızda ise X kromozomun kısa ve uzun kolu üzerinde p22.1-pter ve q13.2-qter bölgelerinde kayıplara rastlandı (Çizelge 8 ve 9) (Şekil 21). Bu bilgiler ışığında X'in, böbrek yetmezliğinde etkili bir kromozom olduğu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızda; yapısal kromozom düzensizlikleri yanında sayısal kromozom düzensizliklerinin sıklığı ve nisbi oranları da yüksek bulundu (%4.5 ve %12) (Çizelge 8 ve 9) (Şekil 21). Özellikle, sırasıyla kromozom 19, 10, 13, 22 ve Y monozomileri öne çıkmaktadır. Dikkat edildiğinde, bu kromozomların çoğu KBH hastalığın gelişiminde etkili genleri taşıyan kromozomlar olduğu görülmektedir. Tüm bu sitogenetik bulgular; Sağlıker sendromlu hastalarda önemli oranda yapısal ve sayısal kromozom düzensizliklerinin oluştuğunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda öne çıkan önemli kromozom bölgeleri, ileriki moleküler genetik çalışmalarda önemli araştırma lokusları olabilirler.

Sağlıker sendromlu hastalarda,  $Ca^{+2}$  metabolizmasını düzenleyen moleküler sürecin önemli bir elemanı olan CaSR'yi kodlayan genin nükleotid dizisinin belirlenmesi ve olası mutasyonlarının saptanması genetik yönü bilinmeyen bu yeni hastalığa ışık tutacaktır. Daha önceleri, ailesel hipokalsiürik hiperkalsemiya, şiddetli neonatal primer hiperparatiroidizm ve otozomal dominant hipoparatiroidizm hastaları üzerinde yapılan çalışmalarda çeşitli mutasyonlar rapor edilmiştir<sup>48,49,50</sup>. CaSR geni, 3. kromozomun q13.3-21 bölgesinde yerleşik olup, kodlama yapan bölgelerinin toplam uzunluğu 3234 bç'dir ve 8 ekzonu bulunmaktadır<sup>51</sup>. Bu ekzonlardan ikisi alternatifli bir şekilde 5'UTR bölgesini kodlamakta ve 1A ve 1B ekzonları olarak isimlendirilmektedirler. İkinci ekzon içerisinde ATG kodonunu bulundurmaktadır ve bu ekzonun ilk kısmı (ATG'ye kadar olan kısmı) ortak 5'UTR bölgesini

kodlamaktadır. İkinci ekzonun esas ikinci kısmı sinyal peptid ile hücre dışı bölgenin başlangıcını kodlamaktadır. Hücre dışı domainin geri kalan kısmı veya ana gövdesi 3, 4, 5 ve 6. ekzonları tarafından kodlanmaktadır. Yedinci ekzon ise hücre dışı domainin sonunu, membran-içi domaini ve hücre-içi domaini kodlamaktadır<sup>52,53,54</sup>.

Çalışmamızda; CaSR geninin 2. ve 3. ekzonlarının dizi analizleri yapıldı. Bu ekzonların, proteinin N-terminal ucunu kodladığı ve kodlanan bu bölgenin proteinin kalsiyum duyarlılığı açısından önemli olduğu bildirilmiştir<sup>12,55</sup>. Aslında, genin kodlama yapan 8 ekzonun tamamının dizi analizlerinin yapılması gerekirdi. Ancak, mali kaynak yetersizliği nedeni ile sadece 2. ve 3. ekzonları çalışabildik.

Çalışmamızda toplam, Sağlıker sendromlu 25 hastaya ait DNA'nın çalışılması planlandı. Ancak, hastalardan ikisi öldüğü için ve elimizde kanları olmadığından dolayı çalışılmadı. 23 hastanın DNA dizi analizleri yapıldı. CaSR geninin 2. ekzonu için çalışılan örneklerden 16'sında herhangi bir mutasyona rastlanmadı (Çizelge 11). Üç hastada, 70239 pozisyonundaki adenin (A) bazının kayba uğramış olduğu saptandı. Ancak, bu adenin bazı, ATG kodonunun önünde olduğu için kodlanan proteini etkilememektedir. İki hastada, 70471'de A>G heterozigot değişimi saptandı (Çizelge 11). Bu nükleotid değişimi, 2. ekzonun içerisindedir. Ancak, ATG başlangıç kodonunun 2. ekzonun içerisinde olması ve meydana gelen A>G değişiminin ATG başlangıç kodonunun öncesinde kalması nedeni ile bu değişim de CaSR proteinini veya proteinin fonksiyonunu etkilemez. Bir hastada, 70622'de T>C heterozigot değişimi saptanmıştır (Çizelge 11). 70622 pozisyonu genin kodlama yapan bölgesinin içerisindedir. Bu noktada, TTT kodonunun sonundaki T nükleotidi, C'ye dönüştüğü görülmektedir (Çizelge 11). Yeni kodondaki bu baz değişimi (TTC) literatürde daha önce tanımlanmıştır ve her iki kodon da fenilalanin aminoasidini (38. aminoasit, F38F) kodlamaktadırlar<sup>26</sup>. Dolayısıyla, bu baz değişimi de proteinin aminoasit sırasını değiştirmemektedir. Bu bulgulardan, Sağlıker sendromlu hastalarda CaSR geninin 2. ekzonundaki nükleotid değişimlerinin ekzonun ifadesini etkilemediği ve hastalığın etiolojinde bir etkisinin olmadığını söyleyebiliriz.

Üçüncü ekzon için 8 hastada mutasyon oluşturacak herhangi bir nükleotid değişikliğine rastlanmadı. Onbir hastada, 73724 pozisyonunda G>A homozigot nükleotid değişimi bir hastada ise 73724'de G>A heterozigot nükleotid değişimi saptandı (Çizelge 12). 73724 pozisyonu, 3. ekzonun dışında son ucuna yakın bir pozisyonudur. Dolayısıyla, gözlediğimiz G>A homozigot ve G>A heterozigot nükleotid değişimleri, genin kodladığı proteini etkilemedikleri anlaşılmaktadır. Bulduğumuz bu nükleotid değişimlerinin literatürde karşılıklarına rastlanmamıştır. Sonuç olarak, Sağlıker sendromlu hastalarda CaSR geninin 3. ekzonundaki nükleotid değişimlerinin de ekzonun ifadesini etkilemedikleri ve hastalığın etiyolojinde bir etkilerinin olmadığı anlaşılmaktadır. Üç hastada ise sonuç alınamamıştır. Tüm bu bilgiler ışığında; CaSR geninin 2. ve 3. ekzonlarında bulduğumuz heterozigot ve homozigot nükleotid değişimlerinin Sağlıker sendromlu hastalarda hastalığın oluşumu ve ilerlemesinde etken olamayacaklarını söyleyebiliriz.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar Anabilim Dalı, Nefroloji Bilim Dalında Sağlıker sendromu tanısı konmuş hastalar ile yapmış olduğumuz sitogenetik ve CaSR geninin 2. ve 3. ekzonlarının moleküler genetik analizlerinde elde edilen bulgular ışığında aşağıdaki sonuçlar ve öneriler ortaya çıkmıştır;

1. Rapor ettiğimiz kromozom düzensizlikleri bakımından hasta (%37.7) ve kontrol (%15.8) grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,05$ ). Sağlıker sendromlu hastalarda önemli oranda yapısal ve sayısal kromozom düzensizliklerinin oluştuğunu ve öne çıkan önemli kromozom bölgelerinin ileriki moleküler gen çalışmalarında önemli araştırma lokusları olabilecekleri ortaya çıkmıştır.
2. Hastalarda, kromozomal düzensizlik gösteren hücrelerin %87.9'unun yapısal ve %12.1'inin sayısal kromozom düzensizlikleri taşıdıkları bulundu. Bu da Sağlıker sendromunun öyküsünde yapısal kromozom düzensizliklerinin önemli olabileceklerini göstermektedir.
3. Yapısal kromozom düzensizliklerin tüm hücreler içerisindeki sıklığı %33.2 oranı gibi yüksek değerde bulunması hasta hücrelerinin önemli kısmının genetik hasara uğradığını ortaya koymaktadır.
4. Yapısal kromozomal düzensizlikleri arasında; 2q23, 4q, 5q3, 6q21, 10q-p ve Xp-q bölgelerinin Sağlıker sendromunda en sık rastlanan sıcak noktalar olduğu ve hastalığın oluşumunda etkili gen veya genleri taşıyabileceğini söyleyebiliriz.
5. Bu nedenle bu bölgeler, hastalığın tanısında ve prognozunda etkili gen veya genlerin belirlenmesinde moleküler genetik çalışmalarda aday kritik noktalar olarak alınabilirler.
6. Altı hastada, CaSR geninin 2. ekzonunda bulunmuş olan heterozigot ve homozigot nükleotid değişimleri ve kayıplarının gen ifadesini etkilemediği, dolayısıyla mutasyona neden olmadığı kaydedildi.

7. Oniki hastada CaSR geninin 3. ekzonunda bulunmuş olan heterozigot ve homozigot nükleotid değişimlerinin de gen ifadesini etkilemediği, dolayısıyla mutasyona neden olmadığı gözlemlendi.
8. Ortaya çıkan bu moleküler bulgular doğrultusunda CaSR geninin 2. ve 3. ekzonlarındaki nükleotid değişimlerinin Sağlıklı sendromuna yol açamayacakları, elde ettiğimiz bu küçük değişimlerin hastalığın öyküsünde, tanısında ve prognozunda kriter olarak alınamayacağını söyleyebiliriz.
9. Ancak, genin diğer ekzonlarının analizlerinin yapılması halinde CaSR geninin gerçekten Sağlıklı sendromlu hastalardaki etkinliği konusunda kesin bir yargıya varabiliriz.

## KAYNAKLAR

1. İliçin G, Ünal S, Biberöglü K, Akalın S, Süleymanlar G. *Temel İç Hastalıkları*, 3. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, **2003**: 769-777.
2. Skorecki K, Green J, Brenner BM. Kronik böbrek yetmezliği. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al. Çeviri editörü. Sağlıkler Y. Harisson iç hastalıkları prensipleri (cilt 2), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. ve McGraw-Hill Comp. Inc; **2004**: 1551-1562.
3. Chung W, Kim H, Hwang YH, Kim SY, Ko AR, Ro H, Lee KB, Lee JS, Oh KH, Ahn C. PKD2 gene mutation analysis in Korean autosomal dominant polycystic kidney disease patients using two-dimensional gene scanning *Clin Genet*, **2006**; 70: 502–508.
4. King K, Flinter FA, Green PM. A Two-Tier Approach to Mutation Detection in the COL4A5 Gene for Alport Syndrome *Hum Mutat*, **2006**; 27(10): 1061 – 1061.
5. Erişim: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Erişim tarihi: 15,01,2011
6. Hong SH, Park HM, Ahn JY, Kim OJ, Hwang TS, Oh D, Kim NK. ACE I/D polymorphism in Korean patients with ischemic stroke and silent brain infarction *Acta Neurol Scand*, **2008**; 117: 244–249.
7. Goodman WG. Renal osteodystrophy for nonnephrologists *J Bone Miner Metab*, **2006**; 24: 161–163.
8. Guarnieri G, Antonione R, Biolo G. Mechanisms of Malnutrition in Uremia *J Ren Nutr*, **2003**; 13(2): 153-157.
9. McCann L. Calcium in Chronic Kidney Disease: Recommended Intake and Serum Targets *Adv Chronic Kidney Dis*, **2007**; 14(1): 75-78.
10. Goodman WG. Calcium and Phosphorus Metabolism in Patients Who Have Chronic Kidney Disease. *Med Clin North Am*, **2005**; 89: 631–647.
11. Huang C, Miller RT. The calcium-sensing receptor and its interacting proteins *J Cell Mol Med*, **2007**; 11 (5): 923-934.
12. Egbuna OI, Brown EM. Hypercalcaemic and hypocalcaemic conditions due to calcium-sensing receptor mutations *Best Pract Res Clin Rheumatol*, **2008**; 22(1): 129–148.
13. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int*, **2006**; 70(9): 1548–1559.
14. Liu S, Gupta A, Quarles LD. Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone–kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **2007**; 16(4): 329–335.
15. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: A systemic role for selective vitamin D receptor activation *Kidney Int*, **2006**; 69(1): 33–43.
16. Lips P. Vitamin D physiology *Prog Biophys Mol Biol*, **2006**; 92(1): 4–8.

17. **Saglikler Y, Balal M, Saglikler Ozkaynak P, Paydas S, Saglikler C, Sabit Saglikler H, Kiralp N, Mumin Adam S, Tuncer I, Gonlusen G, Esenturk M, Gocmez E, Taskapan H, Yeksan M, Kobaner E, Ozkaya O, Yuksekgonul M, Emir I, Cengiz N, Onder Isik I, Bilginer O, Guler T, Yakar H, Sarsmaz N, Dilaver S, Akoglu B, Basgumus M, Chirik E.** Saglikler syndrome: uglifying human face appearance in late and severe secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure *Semin Nephrol*, **2004**; 24(5): 449-55.
18. **Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL.** Osteoclast differentiation and activation *Nature*, **2003**; 423: 337-342.
19. **Swarthouta JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC.** Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells *Gene*, **2002**; 282(1-2): 1-17.
20. **Fukagawa M, Kazama JJ, Kurokawa K.** Renal osteodystrophy and secondary hyperparathyroidism *Nephrol Dial Transplant*, **2002**; 17 [Suppl 10]: 2-5.
21. **Uzel A, Uzel I, Saglikler Y, Yildiz I, Halvaci I, Paylar N, Ocal F, Balal M, Ozkaynak PS, Paydas S, Saglikler C, Saglikler HS, Kiralp N, Adam SM, Esenturk M, Gocmez E, Taskapan H, Yuksekgonul M, Emir I, Guler T, Yakar H, Sekin O, Kayali E, Caliskan S, Eskiocak AF, Ogruk B, Guzelyurt T, Kurt C.** Cephalometric evaluation of patients with Saglikler syndrome: uglifying human face appearance in severe and late secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure patients *J Ren Nutr*, **2006**; 16(3): 229-32.
22. **Giray S, Saglikler Y, Yildiz I, Halvaci I, Paylar N, Ocal F, Balal M, Ozkaynak PS, Paydas S, Saglikler C, Saglikler HS, Kiralp N, Adam SM, Esenturk M, Gocmez E, Taskapan H, Yuksekgonul M, Emir I, Guler T, Yakar H, Sekin O, Kayali E, Caliskan S, Eskiocak AF, Ogruk B, Guzelyurt T, Kurt C.** Neurologic manifestations in Saglikler syndrome: uglifying human face appearance in severe and late secondary hyperparathyroidism in chronic renal failure patients *J Ren Nutr*, **2006**; 16(3):233-6.
23. **Saglikler Y, Acharya V, Ling Z, Golea O, Sabry A, Eyupoglu K, Ookalkar DS, Tapiawala S, Durugkar S, Khetan P, Capusa C, Univar R, Yildiz I, Cengiz K, Bali M, Ozkaynak PS, Saglikler HS, Paylar N, Adam SM, Balal M, Paydas S, Demirhan O, Tasdemir D, Ben Maiz H, Redulescu D, Garneata L, Mircescu G, Hong-Liang R, Lun L, Yildizer K, Emir I, Yuksekgonul M, Yenicerioglu Y, Akar H, Saglikler C, Esenturk M, Kiralp N.** International study on Saglikler syndrome and uglifying human face appearance in severe and late secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease patients *J Ren Nutr*, **2008**; 18(1):114-7.
24. **Saglikler Y, Acharya V, Golea O, Sabry A, Bali M, Eyupoglu K, Ookalkar D, Tapiawala S, Durugkar S, Khetan P, Capusa C, Univar R, Yildiz I, Cengiz K, Akar H, Yenicerioglu Y, Saglikler Ozkaynak P, Sabit Saglikler H, Paylar N.** Is survival enough for quality of life in Saglikler Syndrome-uglifying human face appearances in chronic kidney disease? *J Nephrol*, **2008**; 21 (Suppl. S13): S134 - S138.
25. **Yun FHJ, Wong BYL, Chase M, Shuen AY, Canaff L, Thongthai K, Siminovitch K, Hendy GN, Cole DE.** Genetic variation at the calcium-sensing receptor (CASR) locus: Implications for clinical molecular diagnostics *Clin Biochem*, **2007**; 40: 551-561.  
Erişim: (<http://www.sciencedirect.com>) Erişim tarihi: 19.06.2008
26. Erişim: ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core:g](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core:g))  
Erişim Tarihi:09.02.2011.
27. **Dilsiz N.** *Moleküler Biyoloji*, 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, **2004**:55-64.
28. **Tunç E.** İlk trimester spontan düşüklerde fetal, maternal ve Paternal sitogenetik incelemeler. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2004**.

29. Applied Biosystems.
30. GenBank Erişim tarihi: 15.12.2010.
31. **Savostianov KV, Chistiakov DA, Shestakova MV, Voros M.** Identification of the locus associated with diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus *Mol Biol (Mosk)*, **2002**;36:1015–1020.
32. **Xu J, Li G, Wang P, Velazquez H, Yao X, Li Y, Wu Y, Peixoto A, Crowley S, Desir GV.** Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure *J Clin Invest*, **2005**;115:1275–1280.
33. **Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S.** PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science (Wash. D)*, **1996**; 272:1339–1342.
34. **Thrash-Bingham CA, Salazar H, Freed JJ, Greenberg RE, Tartof KD.** Genomic alterations and instabilities in renal cell carcinomas and their relationship to tumor pathology. *Cancer Res*, **1995**; 55:6189–6195.
35. **Christodoulou K, Tsingis M, Stavrou C, Eleftheriou A, Papapavlou P, Patsalis PC, Ioannou P, Pierides A and Deltas CC.** Chromosome 1 localization of a gene for autosomal dominant medullary cystic kidney disease (ADMCKD) *Hum Mol Genet*, **1998**;7(5): 905–911.
36. **Fearon ER, Vogelstein B.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, **1990**; 61:759–767.
37. **Demirhan O, Taştemir D.** Cytogenetic effects of ethanol on chronic alcohol users *Alcohol Alcohol.*, **2008**;43(2):127-36.
38. **Demirhan O, Pazarbasi A, Karahan DS, Tanrıverdi N, Kilinc Y.** Correlation of clinical phenotype with a pericentric inversion of chromosome 9 and genetic counseling *Saudi Med J*, **2008**;29(7):946-951.
39. **Rao BV, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K.** Pericentric inversion of chromosome 9[inv(9)(p12q13)]: Its association with genetic diseases *Indian J Hum Genet*, **2006**;12(3):129-132.
40. **Mozdarani H, Meybodi AM, Karimi H.** Impact of pericentric inversion of chromosome 9[inv(9)(p11q12)] on infertility *Indian J Hum Genet*, **2006**;13(1):26-29.
41. **Antignac C, Arduy CH, Beckmann JS, Benessy F, Gros F, Medhioub M, Hildebrandt F, Dufier JL, Kleinknecht C, Broyer M, Weissenbach J, Habib R, Cohen D.** A gene for familial juvenile nephronophthisis (recessive medullary cystic kidney disease) maps to chromosome 2p *Nature Genet*, **1993**;3:342–345.
42. **Konrad M, Saunier S, Heidet L, Silbermann F, Benessy F, Calado J, Le Paslier D, Broyer M, Gubler MC, Antignacm C.** Large homozygous deletions of the 2q13 region are a major cause of juvenile nephronophthisis *Hum Mol Genet*, **1996**;5:367–371.
43. **Demirhan O, Türkmen S, Schwabe GC, Soyupak S, Akgül E, Taştemir D, Karahan D, Mundlos S, Lehmann K.** A Homozygous BMPR1B mutation causes a new subtype of acromesomelic chondrodysplasia with genital anomalies *J Med Genet*, **2005**;42:314-317.

44. **Zerres K, Muecher G, Bachner L, Deschennes G, Eggermann T, Kaariainen H, Knapp M, Lennert T, Misselwitz J, von Mühlendahl KE, Neumann HPH, Pirson Y, Rudnik-Schöneborn S, Steinbicker V, Wirth B, Schärer K.** Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nature Genet*, **1994**;7:429-432.
45. **Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD, Avner ED, Germino GG, Guillot AP, Herrin J, Holleman R, Irons DA, Primack W, Thomson PD, Waldo FB, Lunt PW, Zerres K.** The Severe Perinatal Form of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease Maps to Chromosome 6p21. Implications for Genetic Counseling *Am J Hum Genet*, **1995**;56:1101-1107.
46. **Li G, Xu J, Wang P, Velazquez H, Li Y, Wu Y, Desir GV.** Catecholamines Regulate the Activity, Secretion, and Synthesis of Renalase *Circulation*, **2008**;117:1277-1282.
47. **Bowden DW, Colicigno CJ, Langefeld CD, et al.** A genome scan for diabetic nephropathy in African Americans. *Kidney Int*, **2004**;66:1517-1526.
48. **Pollak MR, Brown EM, Chou Y-HW, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG.** Mutations in the human Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*, **1993**; 75: 1297-1303.
49. **Pollak MR, Brown EM, Estep HL, McLaine PN, Kifor O, Park J, Hebert SC, Seidman CE, Seidman JG.** Autosomal dominant hypocalcemia caused by a Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*, **1994**; 8: 303-307.
50. **Chikatsu N, Fukumoto S, Suzawa M, Tanaka Y, Takeuchi Y, Takeda S, Tamura Y, Matsumoto T, Fujita T.** An adult patient with severe hypercalcaemia and hypocalciuria due to a novel homozygous inactivating mutation of calcium-sensing receptor *Clin Endocrinol*, **1999**; 50: 537-543.
51. **Shakhssalim N, Kazemi B, Basiri A, Houshmand M, Pakmanesh H, Golestan B, Eilanjeh AF, Kashi AH, Kilani M, Azadvari M.** Association between calcium-sensing receptor gene polymorphisms and recurrent calcium kidney stone disease: A comprehensive gene analysis. *Scand J Urol Nephrol*, **2010**; 44: 406-412.
52. Erişim: ([www.casrdb.mcgill.ca/](http://www.casrdb.mcgill.ca/)) Erişim Tarihi:17.01.2011.
53. **Cole DE, Yun FH, Wong BY, Shuen AY, Booth RA, Scillitani A, Pidasheva S, Zhou X, Canaff L, Hendy GN.** Calcium-sensing receptor mutations and denaturing high performance liquid chromatography. *J Mol Endocrinol*, **2009**; 42(4): 331-9.
54. **Hendy GN, D'Souza-Li L, Yang B, Canaff L, Cole DE.** Mutations of the Calcium-Sensing Receptor (CASR) in Familial Hypocalciuric Hypercalcemia, Neonatal Severe Hyperparathyroidism, and Autosomal Dominant Hypocalcemia. *Hum Mutat*, **2000**; 16: 281-296.
55. **Heath HR, Odelberg S, Jackson CE, Teh BT, Hayward N, Larsson C, Buist NR, Krapcho KJ, Hung BC, Capuano IV, Garrett JE, Leppert MF.** Clustered inactivating mutations and benign polymorphisms of the calcium receptor gene in familial benign hypocalciuric hypercalcemia suggest receptor functional domains. *J Clin Endocrinol Metab*, **1996**; 81: 1312-1317.

## EKLER

### Ek 1) Sephadex Hazırlama

- A) 1 gr Sephadex 14 ml distile suda çözdürülür.
- B) Filtreli tüplere (spin kolon) 600 µl aktarılır.
- C) 5000 rpm'de (2000g) 2dk. santrifüj edilir.
- D) Toplama tüpleri atılır. Spin kolonlar yeni toplama tüplerine konur
- E) PCR ürünleri jel haline gelen Sephadex'e değmeden, pipetle tamamen spin kolona aktarılır.
- F) Spin kolonlar 5000 rpm'de (2000g) 2 dk. santrifüj edilir.
- H) Toplama tüplerinde purifiye DNA süzölmüştür.

## **Ek 2) DNA İzolasyonunda Kullanılan Başlıca Çözeltiler**

### **1) 1 M Tris-HCl PH 7.5**

12.11 gr Tris base 80 ml bidistile su içerisinde çözüldü. pH HCl ile 7.5'e ayarlandıktan sonra hacim 100 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edildikten sonra oda ısısında saklandı.

### **2) 5X Red Cell Lysis Buffer (Eritrosit Lizis Tamponu)**

54.8 gr süzkroz (1.6 M)

6 ml 1M Tris HCl, pH:7.5 (final konsantrasyonu 60 mM)

2.5 ml 1 M  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  (final konsantrasyonu 25 mM)

5 ml Triton-X-100 (final konsantrasyonu %5 V/V)

Süzkroz 50 ml bidistile su içerisinde çözüldükten sonra Triton-X 100,  $MgCl_2$  ve Tris HCl ilave edildi. Hacim bidistile su ile 100 ml'ye tamamlanarak buzdolabında saklandı.

### **3) 1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$**

10.16 gr  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 40 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve daha sonra yine bidistile su kullanılarak hacim 50 ml'ye tamamlandı. Otoklavda steril edilerek oda ısısında saklandı.

### **4) Fizyolojik Tampon**

0.438 gr NaCl

0.93 gr EDTA

Deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı ve pH 7.5'e ayarlandı.

### **5) TE-9 (pH:9)**

500 mM Tris baz

20 mM EDTA pH:9.0

10 mM NaCl

Hazırlanacak hacme göre Tris baz, EDTA ve NaCl hesaplanarak tartılır ve üzeri saf su ile tamamlanır, otoklavlanır ve kontamine edilmeden kullanılır.

#### **6) SDS Solüsyonu (%10'luk)**

10 ml için 1 gr SDS tartıldı ve bir şişeye aktarıldıktan sonra üzerine 10 ml saf su ilave edildi. İyice vortekslenerek çözülmesi sağlandı. Buzdolabında veya oda ısısında saklanabilir.

#### **7) Proteinaz K (10 mg/ml)**

10 mg proteinaz K, 1000 µl steril saf su ile sulandırıldı ve steril ependorf tüplere paylaştırılarak -20 °C'de saklandı.

#### **8) Lizis Tamponu (pH:8)**

0.209 gr Tris HCl, 0.249 gr EDTA ve 0.67 gr SDS tartıldı ve son hacmi 100 ml olacak şekilde saf su ilave edildi. pH 8.0'a ayarlandı.

## ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 1995 yılından Dokuz Eylül Üniversitesi Hukuk Fakültesini kazandı ve bir dönem okuduktan sonra ayrıldı. 1997 yılında Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümüne girdi. 2001 yılında buradan mezun oldu. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans yapmaya hak kazandı. 2005 yılında yüksek lisansını tamamladı. 2006 Yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora yapmaya hak kazandı.