



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA PERİFERİK
KAN OSTEOKLAST ÖNCÜ HÜCRELERİNDE NF- κ B VE
RANKL DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Dr. Gülcan GÜNEŞ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. M. Y. Burak ÇİMEN**

MERSİN-2011



**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ HASTALARINDA PERİFERİK
KAN OSTEOKLAST ÖNCÜ HÜCRELERİNDE NF- κ B VE
RANKL DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Dr. Gülcan GÜNEŞ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. M. Y. Burak ÇİMEN**

**Bu tez, BAP-TF TTB (GG) 2009-8 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.**

MERSİN-2011

T E Ő E K K Ü R

Uzmanlık eğitimim süresince her zaman destek ve yardımlarını yanımda hissettiğim bilgisini, sabrını ve hoşgörüsünü esirgemeyen tezimin hazırlanmasında büyük emeği geçen değerli Hocam Doç. Dr. Burak Çimen'e,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, destek ve ilgilerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan onur duyduğum Hocalarım; Prof. Dr. Uğur Atik, Prof. Dr. Gürbüz Polat, Prof. Dr. Lülüfer Tamer Gümüő, Doç. Dr. Gülçin Eskandari'ye ve hocalığının yanı sıra bir ağabey yakınlığı gösteren Doç. Dr. Necati Muşlu'ya,

Tezime ait hasta grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecindeki katkılarından dolayı Nefroloji Bilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ahmet Kıyıkım'a ve Dr. Sinan Aygün'e,

Tezime ait kontrol grubu örneklerinin toplanması ve tezimin klinik sürecindeki katkılarından dolayı Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Özlem Bölgen Çimen'e ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Tezimin istatistik analizinde yardımlarını esirgemeyen Biyoistatistik Anabilim Dalından Ar. Gör. Dr. Gülhan Örekici'ye,

Tezimin örneklerinin çalışılma aşamasındaki emek ve katkılarından dolayı başta Cemil Gülüm olmak üzere tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma,

Asistanlığım süresince güzel, kalıcı dostluklar kurduğum ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma,

Sabır, özveri ve sevgi ile hep yanımda olan, sevgili eşim Ömer'e ve 2010 yılında hayatımıza katılan ve mutluluk getiren çok sevdiğim oğlum Deniz'e,

Bugünlere gelmemde en büyük yere sahip olan; destek, ilgi ve sevgilerini benden esirgemeyen ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım aileme,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Dr. Gülcan GÜNEŞ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	10
KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ	10
Tanım	10
Epidemiyoloji ve Prevelans	10
Etyoloji	11
Patofizyoloji	12
Tanı	12
Evreleme	16
Sistemik Etkiler	16
Renal Osteodistrofi	17
KEMİK DOKU	21
Kemiğin Yapısı	21
Kemik Hücreleri	21
Kemikte Yeniden Yapılanma	23
Osteoklast Farklılaşması	24
RANKL	27
RANK	31
OPG	32
RANKL/OPG/RANK Metabolizması	35
RANKL/OPG/RANK Salınımlarının Düzenlenmesi	35
RANKL/RANK Sisteminde Rol Alan Sinyal Yolakları	37
NF-κB	38
Osteoklastogenezde NF-κB Rolü	44
GEREÇ VE YÖNTEMLER	47
Çalışma Grubu	47
Kullanılan Araç ve Gereçler	47

Kullanılan Kitler	48
NF-κB ölçümü için kullanılan reaktifler	48
Örneklerin Toplanması	49
Kreatinin Ölçümü	49
GFR Hesaplanması	50
Kalsiyum Ölçümü	50
PTH Ölçümü	50
Vit D₃ Ölçümü	50
sRANKL Ölçümü	51
NF-κB Düzeylerinin Belirlenmesi	53
Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	53
Flow sitometrik Değerlendirme	55
Kemik Mineral Yoğunluğu Ölçümü	60
BULGULAR	62
TARTIŞMA	67
SONUÇ VE ÖNERİLER	76
KAYNAKLAR	77
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	89
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	92
TABLolar DİZİNİ	94

ÖZET

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), çeşitli nedenlere bağlı olarak fonksiyonel nefron kitlesinin ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybı ile seyreden bir hastalıktır. KBY'nin kaçınılmaz bir komplikasyonu metabolik kemik hastalığıdır ve bu patoloji renal osteodistrofi (ROD) olarak adlandırılır. Erken evre KBY sürecinde gözlenen ROD patogenezi, RANKL ve NF-κB aracılı intraselüler sinyal yollarına ait rolleri birlikte değerlendiren çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada evre 3 KBY hastalarında serum RANKL ve periferik kan osteoklast öncü hücrelerinde intraselüler NF-κB düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmaya Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi, Dahiliye Nefroloji Bilim Dalına başvuran, yaşları 35 ile 60 arası değişen, kreatinin değerleri temel alınarak hesaplanan GFR değerlerine göre evre 3 olduğu belirlenen, 41 erkek KBY hastası ile yaşları 40 ile 60 arası değişen 27 sağlıklı erkek birey kontrol grubu olarak alındı. Kontrol ve hasta gruplarında biyokimyasal parametreler fotometrik, parathormon elektrokemilüminesans, Vit D₃ HPLC, kemik mineral yoğunluğu DEXA, sRANKL ELISA ve NF-κB düzeyleri flow sitometrik yöntemler kullanılarak belirlendi.

Çalışmamızda evre 3 KBY hasta grubu ile kontrol grubu arasında yapmış olduğumuz karşılaştırmalarda iPTH düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek, Vit D₃ düzeylerinin ise düşük olduğunu bulduk. Bunun yanında hasta grubunda diğer biyokimyasal parametreler, kemik mineral yoğunluğu sRANKL ve NF-κB düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlenmedi.

Sonuç olarak, böbrek yetmezliğinin erken dönemlerinde ROD'un değerlendirilmesi açısından Vit D₃ ve iPTH düzeylerinin değerli olabileceği görülmektedir. sRANKL ve NF-κB düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmaması, bu parametrelerin böbrek yetmezliğinin erken evrelerinde kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde yeterli olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, NF-κB, Renal osteodistrofi, sRANKL

ABSTRACT

Chronic renal failure (CRF) is a disease characterized by progressive and irreversible loss of functional nephron mass depending on the variety of causes. An inevitable complication of CRF is metabolic bone disease and this pathology is called as renal osteodystrophy (ROD). In the pathogenesis of ROD observed during the early stage CRF, there is a lack of study evaluating along with the roles of RANKL and NF- κ B -mediated intracellular signaling pathways. In this study we aimed to determine the levels of serum sRANKL and intracellular NF- κ B levels in peripheral blood osteoclast precursor cells in patients with stage 3 CRF.

In this study, 41 male patients aged 35-60 with CRF identified as stage 3 according to GFR calculated on the basis of creatinine values and 27 healthy male subjects ages ranging from 40 to 60 as control group were included who applied to Mersin University Medical Research and Practice Center Hospital Internal Medicine, Department of Nephrology. Levels of biochemical parameters, vitamin D₃, parathyroid hormon, bone mineral density, sRANKL and NF- κ B were determined by using photometric, electrochemilüminesans, HPLC, DEXA, ELISA and flow cytometric methods in control and patient groups, respectively.

When stage 3 CRF patients were compared with controls, patients with stage 3 CRF had statistically significantly higher iPTH levels, but they had statistically significantly lower Vit D₃ levels. However the other biochemical parameters, bone mineral density, sRANKL and NF- κ B levels did not reveal any significance.

In conclusion, Vit D₃ and iPTH levels seem to be important parameters for evaluating the early stages of ROD. The lack of statistically significant differences in the levels of sRANKL and NF- κ B suggests that these parameters are not sufficient in the evaluation of bone metabolism in the early stages of renal failure.

Keywords: Chronic renal failure, NF- κ B, Renal osteodystrophy, sRANKL

GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), nefron sayısında ve fonksiyonlarında ilerleyici, geri dönüşümsüz azalma ile sonuçlanan, hastayı sıklıkla son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) götüren pek çok etiyolojik sebebi olan patofizyolojik bir süreçtir¹.

KBY, tüm dünyada, izlemi ve tedavisi hem hasta, hem de hekimler açısından zor ve yüksek tedavi maliyeti olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda KBY hasta sayısının arttığı ortaya konmuştur. Dünyada her yıl 1 milyon kişiden, yaklaşık 150-200 kişide KBY ortaya çıkmaktadır². Ülkemizde yapılan değerlendirmelerde diyaliz tedavisi uygulanan hasta sayısının 50-51 bin kişi arasında olduğu tahmin edilmektedir³.

KBY'nin ilk dönemlerinden itibaren fonksiyon gören nefron sayısının patolojik süreçteki ilerleme ile birlikte azaldığı bilinmektedir. KBY hastalarında glomerüllerin, tübüllerin veya her ikisinin de fizyolojik fonksiyonları bozulmuştur. Böbrek kendine düşen metabolik ürünlerin uzaklaştırılması yanında total vücut suyunu dengeleyememekte, plazma osmolalitesini, asit baz dengesini ve diğer fonksiyonlarını gerçekleştirmekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenlerle ortaya çıkan patolojik süreç, organizmada biyokimyasal ve metabolik bozukluklara neden olmaktadır. Bu bozuklukların sık rastlanılanlarından biri de kemik dokuda meydana gelen renal osteodistrofidir (ROD)¹.

ROD, KBY hastalarının yaşam kalitesini düşüren, morbidite ve mortaliteyi artıran önemli komplikasyonlardandır. KBY hastalarında ileri evrelerde ortaya çıkmaya başlayan ve SDBY olan hastaların büyük kısmında bulunan kemiğe ait lezyonlar kompleksi olarak tanımlanır. Kemikteki patolojik değişiklikler kalsiyum (Ca^{+2}), fosfor (P), D vitamini (Vit D₃) ve paratiroid hormonla (PTH) ilişkilidir. KBY hastalarında oluşan hipokalsemi, hiperfosfatemi ve yüksek PTH seviyeleri sekonder hiperparatiroidizme (sHPT) neden olmaktadır. Gelişen sHPT'e bağlı olarak hastalarda yüksek döngülü kemik lezyonları gelişir. Yüksek döngülü kemik lezyonları artmış osteoblastik aktivite, artmış osteoklast sayısı ve aktivitesi ile karakterizedir⁴.

Osteoklastlar, monosit/makrofaj serideki hemotopoetik öncü hücrelerden gelişen kemik yıkımında rol alan multinükleer hücrelerdir. Fizyolojik ve patolojik kemik yıkımında kritik rol oynamaktadırlar⁵. Yapılan çalışmalarda hematopoietik

kök hücrelerden gelişen osteoklast öncü hücrelerinin kemik iliği ve dalak dışında periferik dolaşımında da bulunduğu gösterilmiştir⁶. Osteoklastogenezini değerlendirmeye yönelik olarak gerçekleştirilen ileri çalışmalarda periferik dolaşımında bulunan bu hücrelerin CD14+/CD16- yüzey belirteçlerini taşıyan monositlerden geliştiği belirlenmiştir⁷.

Osteoklastogenezde rol alan faktörlerin bilinmesi kemik yıkımı ile karakterize hastalıkların patogenezinin değerlendirilmesi, erken tanı ve tedavisinde önemlidir. Osteoklastogenezin moleküler mekanizması son yıllarda Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü (RANK)/ Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) sinyal sisteminin keşfi ile daha anlaşılır hale gelmiştir. RANKL, osteoklast öncü hücrelerinin üzerindeki reseptörü RANK'a bağlanarak, onların osteoklastlara dönüşmesini uyarır. Böylece kemik rezorpsiyon süreci ilerler. OPG ise RANKL için yalancı reseptör görevi görür ve RANK aracılığıyla sağlanan mekanizmada gelişen kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. RANKL'in RANK'a bağlanması ile hücre içi birçok sinyal yolağı aktivasyonunun gerçekleştiği bilinmektedir. Bu yollardan Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B) aralı sinyal yolağı, osteoklast farklılaşması açısından en önemli metabolik yollardandır. Kemik metabolizmasında düzenleyici bir role sahip olan RANKL'in kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanan birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı ortaya konmuştur⁸.

KBY hastalarında sekonder hiperparatiroidizm ve buna bağlı olarak gelişen kemik rezorpsiyonunun glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 30 ml/dk'nın altında olduğu değerlerde belirgin hale geldiği bilinmektedir⁹. Bu nedenle ROD'un değerlendirilmesine yönelik yapılan çalışmalar genellikle SDBY hastalarında gerçekleştirilmiştir. ROD'da kemikteki patolojik değişiklikleri değerlendirmede altın standart yöntem kemik biyopsisidir ve yapılan çalışmalarda kemik histopatolojik değişikliklerinin erken evrelerden itibaren geliştiği gösterilmiştir¹⁰. Fakat klinikte hastaları ROD açısından değerlendirmede invaziv ve ağrılı bir işlem olması nedeniyle kemik biyopsisi uygulamasından uzak kalınmaktadır. Bu nedenle ROD'un biyokimyasal ve radyolojik yöntemlerle tanısının gerçekleştirilmesine yönelik çabalar sürmektedir. Klinikte sıklıkla kullanılan biyokimyasal belirteçlerin ROD'un belirlenmesinde bir ölçüde güvenilir olabildikleri fakat sınırlı tanı değerleri olduğu belirtilmektedir. ROD tanısında sık başvurulan radyolojik tetkiklerden elde edilen bilgilerin de sınırlı olduğu ve

mevcut kemik hastalığını ortaya koymada yeterli olmadığı ifade edilmektedir. Bu nedenle araştırmalarda, erken dönemde ROD'un değerlendirilmesine yönelik olarak yüksek tanı değerleri olabilecek yeni biyokimyasal parametreler ve radyolojik yöntemler belirlenmeye alıřılmaktadır¹¹.

Kemik patolojik yıkımında önemli olduğu birçok çalışma ile gösterilen RANKL'in, ROD patogenezinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Literatürde, KBY hastalarındaki kemik patolojik değişimlerinde RANKL'in rolünün değerlendirildiği sınırlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar elişkilidir^{12,13,14,15}. Ayrıca bu hastalarda osteoklastogeneizde rol alan önemli metabolik yollardan biri olan NF-κB sinyal yolağının değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Serum RANKL ve osteoklast öncü hücrelerinde intrasellüler NF-κB düzeylerinin birlikte değerlendirilmesinin, ROD patogenezinde sinyal yolağının etkinliğinin belirlenmesinde önemli olabileceğini düşünmekteyiz. NF-κB düzeylerinin ölçümünde, flow sitometrik olarak periferik kandan yapılan analiz, noninvaziv bir yöntem olması açısından klinik kullanımda kolaylık sağlayabilir.

Bu çalışmada, klinik olarak orta derecede yetmezliği (evre 3) olan KBY hastalarında, daha önce çalışılmamış bir parametre olan periferik kan osteoklast öncü hücrelerinde intrasellüler NF-κB ve serum sRANKL düzeylerinin saptanması ve elde edilen sonuçların ROD açısından önemi kanıtlanmış klinik parametrelerden Ca²⁺, P, PTH ve Vit D₃ düzeyleri ile ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

GENEL BİLGİLER

Kronik Böbrek Yetmezliği

Tanım

KBY, çeşitli nedenlere bağlı olarak fonksiyonel nefron kitlesinin ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybı ile seyreden bir hastalıktır¹⁶. KBY'de glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalmanın sonucu olarak böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ile metabolik ve endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma söz konusudur¹⁷. National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF/DOQI) tarafından yapılan tanımlamaya göre KBY¹⁸;

1. GFR azalsın ya da azalmasın, 3 ay ve daha uzun süre devam eden böbreğin yapısal veya işlevsel bozukluğuna bağlı olarak, kan ve idrar kompozisyonu, görüntüleme testleri, böbrek biyopsisi gibi tanı testlerinden bir veya daha fazlasının anormal olması
2. GFR'nin 3 ay ve daha uzun süre ile 60 ml/dk/1,73 m²'den az olmasıdır.

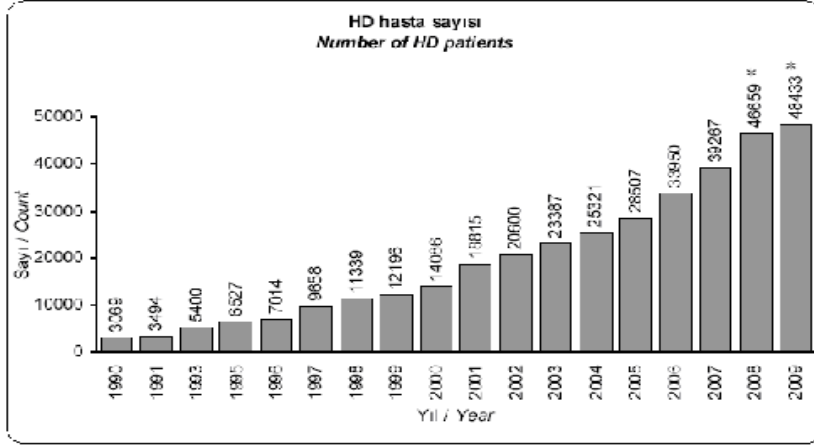
Böbrek fonksiyonlarının ilerleyici olarak kaybıyla, KBY hastalarının %90'ından fazlasında SDBY gelişir. SDBY, böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize ve hayatı tehdit eden, üremiden korunmak için hastaya devamlı olarak diyaliz veya transplantasyon gibi renal replasman tedavilerinin (RRT) uygulandığı klinik bir tablo oluşturur. Üremi, renal yetmezliğin ileri evrelerinde, idrarda normalde atılan metabolizma son ürünlerinin kanda birikmesiyle ortaya çıkan, kompleks multiorgan bozukluğundan kaynaklanan klinik belirtidir¹.

Epidemiyoloji ve Prevelans

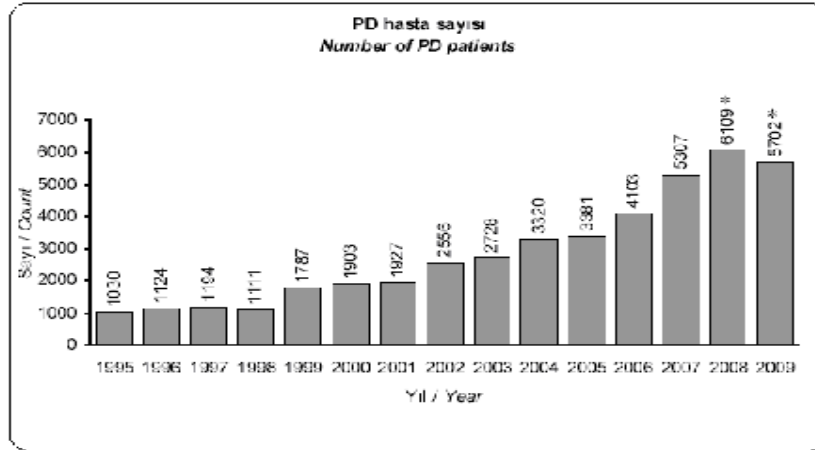
Tüm dünyada KBY insidansı ve prevalansı hızla artmaktadır. KBY ve RRT uygulanan SDBY hastalarının sayısı hakkında dünyanın bazı bölgelerinde veri toplayan çeşitli kayıt kuruluşları vardır. Bu veriler Amerika Birleşik Devletleri'nde United States Renal Data System (USRDS) tarafından toplanmaktadır. USRDS kayıtlarına göre Amerika'da her yıl 1 milyon kişiden, yaklaşık 350-400 kişide KBY ortaya çıkmaktadır¹⁹. Türkiye'de bu veriler Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından toplanmaktadır ve TND verileri KBY görülme sıklığı konusunda ülkemizde en sağlıklı veriler olarak kabul edilmektedir. 2007 TND verilerine göre KBY'nin prevalansı milyon nüfus başına 709 olarak

belirlenmiştir. 2009 yılsonu itibariyle hemodiyalize (HD) giren hasta sayısı 46650, periton diyalizi (PD) hasta sayısı 5418 olup, transplantasyon yapılan hasta sayısı 7375'dir. TND kayıtlarına göre RRT uygulanan hasta sayısı her geçen yıl artış göstermektedir (Şekil 1)³.

A.



B.



Şekil 1. A. Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre HD hasta sayılarının yıllara göre dağılımı **B.** Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre PD hasta sayılarının yıllara göre dağılımı

Etiyoloji

Böbrek yetmezliğinin nedenleri ülkeden ülkeye, ırk ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. İleri yaş (>60), siyah ırk, sigara kullanımı, ağır metallerle maruziyet ve düşük sosyoekonomik durum KBY gelişiminde rol oynayan sosyodemografik faktörlerdir¹⁶. KBY gelişiminde en sık rastlanan etiyolojik neden geçmişte glomerulonefrit iken, günümüzde altta yatan etiyolojiler diyabetik ve hipertansif nefropatilerdir. Bu etiyolojik değişimde

glomerulonefritlerin daha efektif tedavisi, korunması ile diyabetik ve hipertansif hastaların yaşam sürelerinin uzaması etkili olmuştur. Bununla birlikte ilerlemiş KBY hastalarının önemli bir kısmında etiyolojik neden bulunamaz¹. ABD (USRDS) ve Türkiye (TND) kayıtlarına göre SDBY etiyolojik dağılım sırası tablo 3'te gösterilmiştir^{19,3}.

Tablo 1. SDBY Nedenleri

Hastalık	ABD	Türkiye
Diabetes mellitus	46,8	23,7
Hipertansiyon	28,6	22,9
Glomerulonefrit	8,1	8,7
Kistik böbrek hastalığı	2,5	5,8
Ürolojik nedenler	2,1	6,2
Diğer nedenler	12,2	14,9
Etiyolojisi bilinmeyen	4,6	17,8

Patofizyoloji

KBY'de temeldeki böbrek hastalığı ne olursa olsun patolojik incelemelerde periglomerüler ve interstisyel fibroz, glomerüloskleroz, interstisyel kronik inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve tübüler atrofi gibi benzer histolojik bulgular saptanır. Hastalarda başlangıçtaki temel hastalığa bağlı olarak fonksiyonel nefron kitlesinin azalması, sağlam nefronlarda fonksiyon artışına ve hipertrofiye neden olur. Bu değişikliklerin fibrozis oluşumuna ve daha ileri nefron kaybına neden olduğu ve bu kısır döngünün de SDBY ile sonuçlandığı düşünülmektedir¹. Glomerüloskleroz gelişimi hastalığın ilerlemesinde kritik öneme sahiptir. Glomerüloskleroz gelişiminde önce endotel hasarı ve inflamasyon oluşur, bunu mezengial proliferasyon takip eder ve sonrasında glomerüler skleroz ve fibrozis meydana gelir. Glomerüloskleroz gelişiminde glomeruler hiperfiltrasyon ve hipertansiyon, lipid nefrotoksitesi, hızlanmış lokal

ateroskleroz, glomerüler hipertrofi ve çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonların rol oynadığı düşünülmektedir²⁰.

Tanı

Kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeylerinde yükselme veya GFR'de azalmanın saptanması ile böbrek yetmezliği tanısı kolaylıkla konulabilmektedir. Böbrek yetmezliği bulguları olan hastaların değerlendirilmesinde en önemli başlangıç basamağı KBY'yi akut böbrek yetmezliğinden (ABY) ayırt etmektir. Laboratuvar inceleme ve görüntüleme yöntemleri ile bu ayırım kolaylıkla yapılabilmektedir. Progresif KBY'yi ABY'den ayırt eden laboratuvar ve görüntüleme yöntemlerinin en klasik bulguları; bilateral küçük böbrekler (<8,5 cm), anemi, yükselmiş PTH değerleri ile birlikte hiperfosfatemi, hipokalsemi, proteinüri ve geniş silendirleri gösteren veya inaktif olan idrar sedimentidir. Bununla birlikte, laboratuvar ve görüntüleme bulgularının kısmi birlikteliği altta yatan etiyolojik hastalığı tahmin etmeyi çok kuvvetli destekler^{1,16}.

GFR: Böbrek fonksiyonel kapasitesinin en duyarlı ve özgül ölçüsü, GFR'dir. GFR, fonksiyonel nefron sayısının göstergesidir ve maddelerin böbrek glomerülleri aracılığıyla dolaşımdan temizlendiği dakika başına mililitre cinsinden hızıdır. Endojen veya ekzojen maddelerle klirens testi yapılarak ölçülür. Böbreklerin birim zamanda bir maddeden tamamen temizlendiği plazma volumü o maddenin renal klirensi olarak tarif edilir ve sadece glomerüller tarafından filtre edilen maddenin klirensi GFR ölçümünde kullanılabilir²¹.

GFR ölçümü için ideal olarak kabul edilen madde, renal tübüler reabsorbsiyon veya sekresyonu olmaması ve tamamen glomerüler filtrasyon ile atılması nedeniyle inülinidir²². İnülinin enjekte edilebilir formunun elde edilmesinin ve kullanımının zor olması, zaman alıcı olması, kan ve idrar örneklerinde miktarlarının saptanmasındaki güçlükler gibi nedenler klinik uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle GFR ölçülmesinde en sık kullanılan yöntem kreatinin klirensidir²³.

Kreatinin, iskelet kasında kreatinden nonenzimatik dehidrasyon ile sentezlenir. Her gün oluşan kreatinin, kas kitlesine bağlı olup günden güne fazla bir değişiklik göstermez. Normal kişilerde serum kreatinin düzeyleri ve idrar ile kreatinin atılımı kas kütlesinin bir göstergesidir ve diyet değişikliklerinden çok az

etkilenir. Serbest kreatinin, tüm vücut sıvılarında, sekresyonlarda bulunur ve serbest olarak glomerüler filtrasyona uğrar. Glomerüllerden serbestçe filtre olan kreatinin tübüler reabsorbsiyona uğramamaktadır. Çok küçük miktarlarda kreatinin sekresyonu tübüllerde gerçekleşmektedir. Kreatinin endojen olduğundan ve vücut sıvılarında sabit bir hızla salındığından, plazma düzeyleri dar sınırlar içinde korunur ve renal klirensi GFR'nin bir göstergesi olarak ölçülmektedir. Kreatinin klirensini ölçmek için kan ve idrar örneği kullanılır. 24 saatlik idrar toplanarak ve kan serum değerleri kullanılarak hesaplanan kreatinin klirensi, renal fonksiyonun saptanması için yaygın kullanılan yöntemdir. Kreatinin klirensi şu formülle hesaplanabilir²¹.

$$\text{Kreatinin klirensi} = \frac{\text{idrar kreatinin} \times \text{idrar volümü}}{\text{plazma kreatinin} \times 1440}$$

24 saatlik idrar toplamadaki güçlükler dikkate alınarak, serum kreatinininden kreatinin klirensini tahmin edebilmek için birçok formül geliştirilmiştir²⁴. En sık kullanılan formüllerden biri Cockcroft ve Gault tarafından geliştirilen formüldür. Cockcroft-Gault formülü²⁴;

$$\text{GFR} = \frac{(140 - \text{Yaş}) \times \text{vücut ağırlığı}}{\text{Serum kreatinin} \times 72} \quad (\text{Kadınlarda} \times 0.85)$$

Ancak bu formülde, aynı yaşta veya cinsiyette olan kişiler arasında ve hatta aynı kişide ortaya çıkan kreatinin üretimindeki farklar dikkate alınmaz. Obez veya ödemli kişilerde, bu formülün kullanılması ile hesaplanan GFR gerçekte olduğundan daha yüksektir. Bütün bunların yanında, nispeten basit parametrelerle hesaplanabilir olması nedeniyle Cockcroft-Gault formülü yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan bazı klinik çalışmalarda, 24 saatlik idrar toplama ve eş zamanlı kreatinin klirensi sonuçlarının Cockcroft-Gault formülünden daha doğru olmadığı gösterilmiştir²⁴. Araştırmacılar GFR hesaplaması için, The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) çalışmasında izotopik olarak ölçülen GFR tayinlerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, kolay ölçülebilen klinik parametreleri kullanan yeni bir formül geliştirmişlerdir. Bazılarının MDRD denklemi olarak tanımladığı bu formül,

serum üre, kreatinin değerleri ve yaş, cinsiyet ve ırk gibi hasta özellikleri kullanılarak hesaplanır ve orta ve ileri derecede böbrek yetmezliği olan kişilerde Cockcroft-Gault formülünden daha doğru sonuçlar verir²⁵. NKF-K/DOQI kılavuzlarında, MDRD denkleminin erişkinlerde GFR ölçümü için güvenilir bir yöntem olduğu belirtilmektedir¹⁸. MDRD denklemi şu şekildedir²¹;

$$\text{GFR} = 170 \times \text{PCr}^{-0.999} \times \text{Yaş}^{-0.176} \times \text{BUN}^{-0.170} \times \text{Alb}^{-0.318}$$

Klinikte sıklıkla GFR hesaplanmasında Cockcroft-Gault veya MDRD formülleri kullanılmaktadır. Böbrek yetmezliğinin derecesi ile orantılı olarak GFR azaldığından, KBY tanısı almış tüm hastalarda yılda bir kez GFR değerlendirilmelidir²⁶. Genç erişkinlerin ortalama GFR değerleri²⁷;

Erkeklerde $130 \pm 18 \text{ mL/dk/1.73 m}^2$

Kadınlarda $120 \pm 14 \text{ mL/dk/1.73 m}^2$ 'dir.

GFR değerlerinde 4. Dekattan itibaren her 10 yılda bir yaklaşık 6,5 mL/dk/1.73 m² azalma olduğu belirtilmektedir²⁸.

Proteinüri: Proteinüri varlığı ve derecesi KBY için tanısal, prognostik ve tedavi göstergesi olan bir parametredir. Sağlıklı kişilerin idrarlarında standart kalitatif laboratuvar yöntemleri ile yapılan incelemede protein bulunmazken, duyarlı kantitatif yöntemler kullanıldığında günde 150 mg'ı geçmeyen proteinüri söz konusudur. Semikantitatif yöntemler içinde en yaygın kullanılan standart dipstick yöntemidir ve klasik dipstickler ağırlıklı olarak albumini tanırlar^{22,24}. Böbrek hastalığı yönünden incelenecek kişilerde tarama için spot idrarda (sabah ilk idrar) standard dipstick test ile protein aranmalıdır. Kalitatif değerlendirmede protein $\geq 1+$ ise 3 ay içinde kantitatif değerlendirme yapılmalıdır. Kantitatif değerlendirme 24 saatlik idrarda protein tayini veya spot idrarda Protein/Kreatinin veya Albümin/Kreatinin oranının belirlenmesi ile yapılabilir. İki hafta ara ile yapılan iki ya da daha fazla kantitatif değerlendirmede pozitiflik saptanan hastalar KBY yönünden incelenmelidir²⁹.

İdrar sedimenti: Deneyimli bir kişi tarafından yapıldığında böbrek hastalıklarının türleri konusunda önemli bilgiler veren basit bir yöntemdir. İçindeki şekilli elemanların ve hücrelerin iyi görülebilmesi bakımından taze elde edilmiş sabah idrarından yapılması tercih edilmelidir. İdrar sediment incelemesinde eritrosit, lökosit, böbrek hücresi, tübül epitel hücresi ve

silendirlerin görülmesi kronik böbrek yetmezliği tanısını destekler. Özellikle idrarda granüler ve mumsu silendirlerin görülmesi glomerüler ve tübüler hasarın önemli bir göstergesidir²⁴.

Evreleme

KBY'de GFR'deki azalma ile birlikte böbrek yetmezliği şiddetlenmekte ve komplikasyon riski artmaktadır. NKF-K/DOQI, hastalığın ağırlığının ve beklenen komplikasyonların gösterilmesi amacıyla, KBY'nin 5 evrede incelenmesini önermektedir¹⁸. GFR değerlerine göre belirlenen KBY evreleri Tablo 2'de gösterilmiştir¹.

Tablo 2. KBY Evreleri

Evre	Tanım	GFR (mL/dk/1.73 m2)
1	Böbrek hasarı (Normal veya artmış GFR ile birlikte)	≥90
2	Hafif derecede KBY	60-89
3	Orta derecede KBY	30-59
4	Ağır derecede KBY	15-29
5	Son dönem böbrek yetmezliği	<15 (veya diyaliz)

Sistemik Etkiler

KBY'de GFR'de azalma ile paralel olarak semptomlar ortaya çıkmaya başlar. Hastalar genellikle böbrek fonksiyonlarının büyük kısmı yitildiğinde başvururlar ya da erken dönemlerde rutin biyokimyasal analizler sırasında bakılan BUN veya kreatinin yüksekliği ile saptanırlar¹⁶. GFR 35-50 ml/dk'nın altına inmedikçe hastalar semptomsuz olabilir. Böbrek yetmezliğinin derecesi ile ilişkili olarak meydana gelen üremi tüm organ ve sistemlerin fonksiyonlarında bozukluğa yol açar. KBY'nin sistemik etkileri Tablo 3'te gösterilmiştir¹. KBY hastalarında morbidite ve mortalitenin önemli bir kısmından mineral metabolizması ve kemikteki anormallikler sorumludur ve ilerlemiş böbrek yetmezliği olan hastalarda meydana gelen metabolik kemik hastalıkları renal osteodistrofi (ROD) olarak adlandırılır²⁰.

Tablo 3. KBY'nin Sistemik Etkileri

SİSTEM	BELİRTİ ve BULGULAR
Sıvı-elektrolit bozuklukları	Hipovolemi, hipervolemi, hipernatremi, hiponatremi, hipokalsemi, hiperpotasemi, hipopotasemi, hiperfosfatemi, metabolik asidoz, hipermagnezemi
Sinir Sistemi	Stupor, koma, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları, konvülsiyon, polinöropati, baş ağrısı, irritabilite, konsantrasyon bozuklukları, huzursuz bacak (restless leg) sendromu
Gastrointestinal Sistem	Hıçkırık, parotit, gastrit, stomatit, pankreatit, ülser, bulantı, kusma, gastrointestinal kanama
Kardiyovasküler Sistem	Konjestif kalp yetmezliği, pulmoner ödem, hipertansiyon, sol ventrikül hipertrofisi, aterosklerotik koroner, periferik vasküler hastalık ve perikardit
Hematoloji İmmünoloji	Normokrom normositer anemi, eritrosit fragilitesinde artma, kanama, lenfopeni, infeksiyonlara yatkınlık, kanser,
Pulmoner Sistem	Plevral sıvı, üremik akciğer, pulmoner ödem
Cilt	Kaşınıtı, gecikmiş yara iyileşmesi, solukluk, tırnak atrofisi, hiperpigmentasyon, üremik döküntü, ülserasyon, nekroz
Metabolik-Endokrin Sistem	Glukoz intoleransı, hiperlipidemi, hiperparatiroidi, büyüme geriliği, hipogonadizm, impotans, libido azalması, hiperürisemi, malnütrisyon, hiperprolaktinemi
Kemik	Üremik kemik hastalığı, artrit

Renal Osteodistrofi:

ROD, KBY'nin sık görülen komplikasyonlarından biri olup, böbrek fonksiyon bozukluğu arttıkça şiddetlenir. ROD'un oluşumuna katkıda bulunan faktörler arasında hipokalsemi, P retansiyonu, vitamin D metabolizmasındaki anormallikler, PTH fonksiyonundaki bozukluklar, PTH'ya karşı gelişen iskelet direnci ve asidoz sayılabilir³⁰.

ROD, yüksek döngülü üremik kemik hastalığı (sHPT), düşük döngülü üremik kemik hastalığı ve her iki gruptan özellikler gösteren mikst tip olmak

üzere üç ana grupta incelenebilir. En sık sekonder hiperparatiroidizm görülmektedir³¹.

Yüksek Döngülü Kemik Hastalığı (sHPT): Bu durum yükselmiş PTH düzeyleri ile ilişkilidir. Paratiroid bezlerin hiperplastik büyümesi ve her bir paratiroid hücresinden hormon salınımı artması, hiperparatiroidinin temel özellikleridir. KBY'li hastalarda bozulmuş PTH sentezinden sorumlu ana faktör, fosfor, Vit D3 ve kalsiyum metabolizmasındaki değişikliklerdir¹.

Fosfat: KBY'nin erken dönemlerinden itibaren fonksiyonel nefron sayısındaki azalma ile birlikte fosfat retansiyonuna yatkınlık gelişir ve böbrek yetmezliğinin ilerleyen dönemlerinde GFR değerinin 25-30 ml/dk düzeylerine düşmesiyle renal tübüllerden P atılımı azalarak serum P konsantrasyonu artar. Fakat çalışmalarda GFR'de küçük azalmalar olduğunda bile fosfat birikimi olabileceği gösterilmiştir. KBY'li hastalarda sekonder hiperparatiroidinin gelişiminde asıl neden fosfat birikimidir. Fosfat, böbrekten Vit D₃ üretimini ve plazma iyonize Ca²⁺ seviyesini azaltarak paratiroid bez düzeyinde indirekt etki ile PTH sekresyonu artırır. Yeni çalışmalarda, Vit D₃ düzeyi ve serum Ca²⁺unda değişiklik olmadan, paratiroid bez düzeyinde P'un direkt etkisinin olduğu gösterilmiştir^{1,16}.

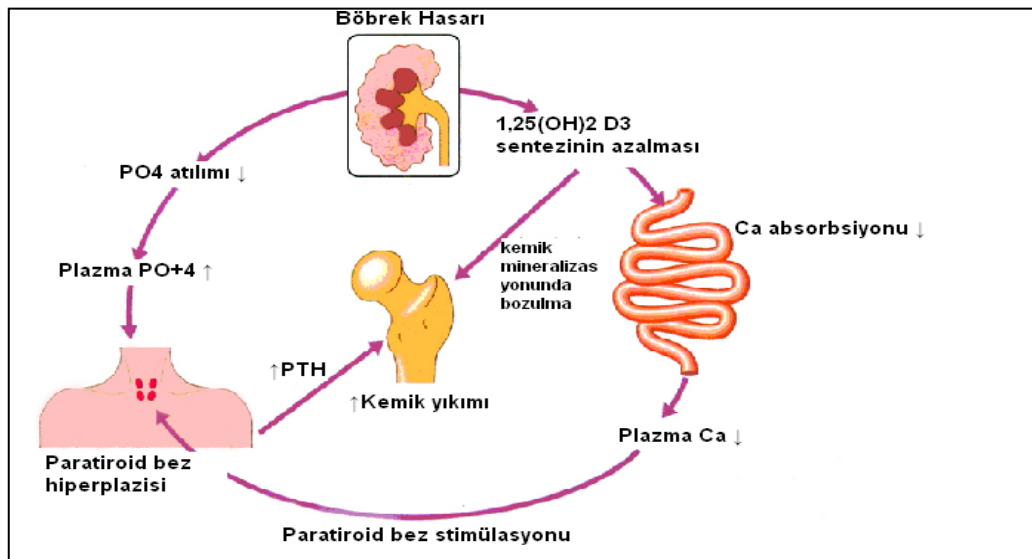
Vit D₃: Fosfat miktarının artması ile böbrek tübülü hücresinde 1- α hidroksilaz enzimi inhibe olarak 25(OH)D₃'den biyolojik olarak aktif metaboliti olan 1,25(OH)₂D₃'e dönüşümü gerçekleşmez ve Vit D₃ düzeylerinde düşme meydana gelir. Böbrek hasarıyla ilişkili olarak da Vit D₃ sentezinde azalma oluşmaktadır. Normal koşullar altında Vit D₃'ün paratiroid bez üzerine hem direkt (Pre-pro PTH mRNA transkripsiyonunda azalma) hem de indirekt yolla negatif feedback kontrolü vardır. İndirekt etki ile Ca²⁺'un barsaklardan emilimini ve kemiklerden mobilizasyonunu uyarır, böylece plazma Ca²⁺ artar ve PTH sekresyonu azalır. Bu nedenle KBY sırasında azalmış Vit D₃ sentezi hiperparatiroidizm patogenezinde hem direkt etkinin azalması ile hem de hipokalsemi yolu ile anahtar rol oynar¹.

Ca²⁺: KBY'li hastalarda toplam plazma Ca²⁺ konsantrasyonu sağlıklı kişilerden sıklıkla anlamlı olarak düşüktür. KBY'de hipokalsemi Vit D₃ eksikliğine bağlı intestinal Ca²⁺ absorpsiyonun azalmasından dolayı oluşur. Ayrıca, serum fosfat seviyesinin artması ile yumuşak dokularda Ca²⁺ –fosfat çökmelerine bağlı olarak total ve iyonize Ca²⁺ düzeyleri azalır. Hipokalseminin

güçlü bir PTH sekresyonunu artırıcı etkisi vardır ve KBY hastalarında meydana gelen hipokalsemi paratiroid bezin hiperplazisine neden olur^{1,32}.

KBY sürecinde artmış PTH sekresyonu mineral metabolizmasını, Ca^{+2} 'nin renal tübüler reabsorpsiyonunu arttırarak, P'nin renal tübüllerden geri Emilimini azaltarak ve böbreklerde Vit D₃ sentezini uyararak düzeltmeye çalışır. Bu durum, GFR normalin %30'una düşünceye kadar devam eder. Ancak bu düzeyden sonra geride kalan sağlam nefronlar günlük atılması gereken P miktarını atmaya yeterli olmadığı için serum P miktarı artmaya başlar. Bu evrede hipokalsemi, hiperfosfatemi ve PTH düzeyinde çok belirgin artış gözlenir. PTH'nın aşırı yapımı, Vit D₃ sentezinin azalması ve kronik metabolik asidozun varlığı hastalarda kemik sorunlarının oluşmasına neden olur (Şekil 2)⁴.

KBY hastalarında görülen sHPT, PTH'nın kalıcı yüksekliğine bağlı olarak osteoklastların sayıca artması sonucu kemik rezorpsiyonunda artma ve kemik iliği fibrozisi ile karakterize bir hastalıktır ve osteitis fibrosa olarak adlandırılır. Yükselmiş PTH değerleri, artmış osteoblastik ve osteoklastik aktiviteye (yüksek dönüşümlü kemik hastalığı) neden olarak kemik metabolizmasını kötü yönde etkiler. PTH, kemik dokuda bulunan Ca^{+2} ve P'nin çözünerek serum Ca^{+2} düzeylerini normal değerlere yakın tutmaya çalışır. Plazma Ca^{+2} düzeylerini normal seviyede tutabilmek uğruna kemik bütünlüğü feda edilerek kemikte bulunan Ca^{+2} deposu kullanıma sunulur. sHPT'de yüksek PTH düzeyi, artmış kemik döngüsü nedeniyle kemik dokusunda mineralizasyona ve sonuçta kırık riskinde artmaya neden olur³³.



Şekil 2: KBY'de sekonder hiperparatiroidizm oluşum mekanizması

Düşük Döngülü Kemik Hastalığı: Kemik yenilenme döngüsünün yavaşlamış olduğu, kemik yenilenme hızını gösteren laboratuvar ve diğer parametrelerin düşük kemik yenilenme hızı ile uyumlu olarak değişime uğradığı klinik bir tablodur. Osteomalazi ve aplastik renal osteodisrofi (adinamik kemik hastalığı) olarak 2 grupta incelenebilir⁴.

Osteomalazi: İskelet mineralizasyon hızındaki azalmaya bağlı olarak mineralize olmamış aşırı osteoidin birikimi sonucu oluşur. KBY hastalarında osteoidde önemli bir artış gösterilirse bu hastalar osteomalazik kabul edilirler. Bu hastalarda osteoid volüm ve genişliğinin artışının yanı sıra osteoblastik ve osteoklastik aktivitenin azaldığı veya olmadığı görülür. Başlangıçta sadece D vitamini eksikliğinden ya da etkilerine direnç olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Günümüzde osteomalazinin alüminyum toksisitesi ile çok yakın ilişkili olduğu bilinmektedir. Alüminyum ilk defa diyaliz hastalarında diyaliz demansının bir sebebi olarak tanımlanmıştır ve kısa bir süre sonra kemikte alüminyum birikiminin osteomalazi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu hastalarda serum Ca^{+2} düzeyleri sıklıkla artmıştır. Serum P düzeyleri fosfat bağlayıcı ajanların kullanımına bağlı olarak değişir fakat yüksek bulunabilir. PTH düzeyleri çok düşüktür ya da tespit edilemeyecek seviyededir. İyileşmeyen kırıklar karakteristiktir^{1,20}.

Adinamik kemik hastalığı: Osteoid kalınlığında bir artış olmadan hücresel aktivite ve kemik yapımında azalma ile karakterize renal osteodistrofi şeklidir. Yaşlılarda, diyabetiklerde, kronik periton diyalizi hastalarında daha sık görülmektedir. Serum Ca^{+2} ve P düzeyleri genellikle artmıştır. Bu hastalar relatif olarak düşük PTH düzeylerine sahiptir. PTH'ı baskılayan faktörler arasında en önde gelenleri aşırı ekzojen Ca^{+2} kullanımı ve Vit D preparatlarıdır. Artmış eritropoetin kullanımı, yüksek serum magnezyum düzeyleri, hiperglisemi, PTH'ın özellikle periton diyalizi sırasında diyalize olarak aşırı kaybı muhtemel nedenler arasındadır. Düşük PTH seviyeleri ve aktif kemik doku hücrelerinin azalması sonucu kemikte oluşan mikro kırıklar iyileşmemekte ve bu durum kırık riskini artırmaktadır¹.

Mikst kemik hastalığı: Bu tabloda hem yüksek döngülü, hem de düşük döngülü kemik hastalığının özellikleri bulunur. Hangi hastalık baskınsa onun özellikleri belirgindir Mikst kemik hastalığı ROD'lu hastaların yaklaşık %7'sini oluşturur ve ROD'un diğer tiplerine göre nadir görülür³⁴.

Kemik Doku

Kemiğin Yapısı

Kemikler iskelet sisteminin en önemli yapıtaşlarıdır. Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, lifler ve temel maddelerden oluşmuş, yaşam boyu sürekli değişen dinamik bir dokudur³⁵.

Kemik doku, organik (%30) ve inorganik (%70) matriks olmak üzere iki bölümden oluşur. Organik kısmın %98'i matrikstir ve matriksin %90-95'i tip I kollajenden oluşmaktadır. Geri kalan %2'lik kısmı ise osteoblast, osteoklast ve osteositler olmak üzere kemik hücreleri oluşturur. Gelişmiş bir kemik dokuda kollajen lifler aralarında porlar bırakacak şekilde paralel olarak yerleşmiştir. Bu porlarda hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir. Organik matriks kemiğin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin belirleyicisidir. Kemiğin inorganik matriksi ise Ca^{+2} , fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddelerden oluşur. Ca^{+2} ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır³⁵.

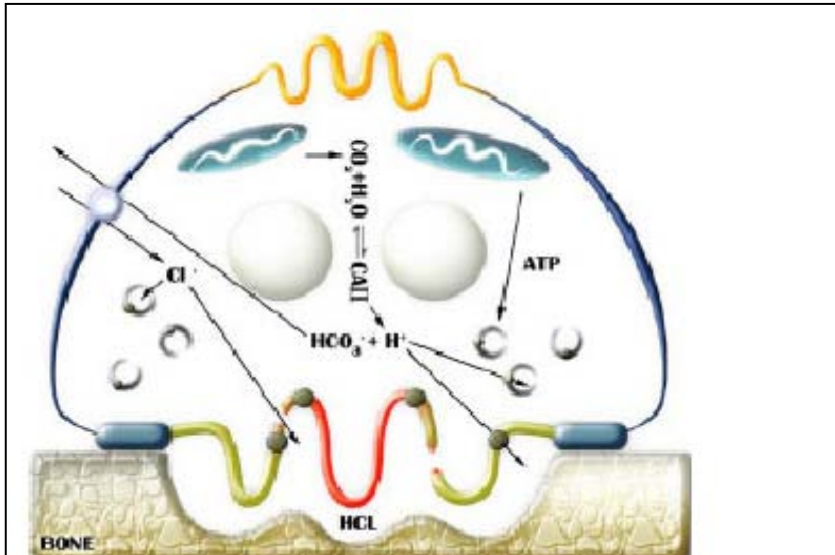
Kemik Hücreleri

Kemik metabolizması, çeşitli çevresel uyarılara (kimyasal, mekanik, elektriksel gibi) çok duyarlı olan kemik hücrelerince ayarlanır. Başlıca kemik hücreleri; osteoblast, osteoklast ve osteoblastlardan gelişen osteositlerdir³⁶.

Osteoblast: Kemik yüzeyinde bulunan kemik yapım hücreleridir. Osteoblastlar pluripotent mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanır ve bu hücreler kemik iliği stromal hücre öncü hücrelerine dönüşür. Kemik iliği stromal hücre öncü hücreleri daha sonra fibroblastlara, kondrositlere, adipositlere, kas hücrelerine veya osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar, başta kollajen olmak üzere tüm kemik matriksi elemanlarının sentezi, organizasyonu ve mineralizasyonu, kemiğin yeniden yapılanmasını kontrol eden lokal ve sistemik faktörlere ait reseptörleri aracılığı ile kendilerine gelen uyarıyı algılayıp, uyarının diğer hücrelere iletiminin sağlanması ve kemik metabolizmasında rol alan bir kısım faktörlerin sentezlenmesinde rol oynar. Olgun osteoblastların bir kısmı (%35), organik matriksi sentezledikten ve salgıladıktan sonra yüzey hücresi veya osteosite dönüşürken, kalanlar da (%65) programlanmış hücre ölümüne (apoptozis) uğrar³⁷.

Osteositler: Kemiğin esas hücreleri olup, olgun kemik hücresi adını da alır. Kemik bütünlüğünü korumak için devamlı olarak küçük miktarlarda matriks sentezinde rol oynar. Kanaliküller içindeki hücresel uzantıları aracılığı ile diğer osteositler, osteoblastlar ve yüzey hücreleri ile yoğun ilişkileri olan, mineralize matriks içine gömülü hücrelerdir³⁷.

Osteoklastlar: Hematopoetik sistemin monosit/makrofaj kaynaklı öncül hücrelerden köken alan çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoklast öncü hücreleri, kemik iliği, dalak ve dolaşımda bulunur. Kemik dokuda, mineralize kemiğin yüzeyine yakın bir yerde bulunurlar ve temel görevleri; kemik mineralini çözerek ve kemik matriksini yıkarak kemik resorpsiyonunu gerçekleştirmektir. Osteoklastlar tartarat rezistan asit fosfataz, kollajenaz ve katepsinleri içeren lizozomal enzimlerden zengindir ve bu enzimler aracılığıyla kemik matriksini rezorbe ederler. Fırçamsı kenar ve organelsiz bir sitoplazmik bölge olmak üzere iki yapısal alan içerir. Fırçamsı kenar, kemik yüzeyindeki kemik yıkım bölgesi ile osteoklastların etkileşimini sağlayan, pek çok sitoplazmik uzantı içeren kıvrımlı membran yapısıdır. Organelsiz sitoplazmik bölge, fırçamsı kenarı çevreleyen ve kontraktil proteinlerden zengin hücresel bir alandır. Kemik yıkımı, fırçamsı kenar ile kemik yüzeyi arasında gerçekleşir (Şekil 3). Osteoklastların yaşam süresi 3-4 haftadır ve bir yıkım siklusunun sonunda apoptozise uğrarlar³⁸.



Şekil 3: Osteoklastların fonksiyonel yapısı

Kemikte Yeniden Yapılanma

Kemik dokusu, yaşam boyunca yapılanma (modeling) ve yeniden yapılanma (remodeling) adı verilen iki işlem sonucu sürekli bir döngü durumundadır. Kemiğin yapılanması, çocukluk döneminde meydana gelen, kemiğin büyümesine ve iskelet gelişimine izin veren kemik dokusunun değişimine denir³⁹. Kemiğin yeniden yapılanması, iskelet maturasyonu tamamlandıktan sonra kemiğin görünümünde önemli bir değişiklik olmadan eski kemiğin yerini yeni kemiğin alması ile sonuçlanan dinamik bir süreçtir. Yeniden yapılanma; mekanik streslere göre adaptasyonun sağlanması, kemiğin mikrofraktürlerden korunması ve tamirinin gerçekleştirilmesi, kemik matriksten dolaşıma büyüme faktörleri ve mineral salınımının (Ca^{+2} , P) yapılabilmesini sağlayan kemik dokusu değişimidir. Yeniden yapılanmada temel olarak iyi differansiye olmuş osteoklastlar ve osteoblastlar rol oynar. Osteoblastlar yeni kemik matriksini salgılayarak, osteoklastlar ise yıkımı gerçekleştirir. Kemik dokusunun osteoklastlar tarafından rezorpsiyonu ve osteoblastlar tarafından yerine konulması, normalde birlikte ve uyum içinde gerçekleştirilir ve erişkinde kemiğin yıkılıp, tümüyle yeniden yapılması yaklaşık 3-6 aylık bir zaman gerektirir^{36,37}.

Kemikte yeniden yapılanma süreci; aktivasyon, rezorpsiyon, sürecin tersine dönüşü ve formasyon evrelerinden oluşur. Aktivasyon süreci istirahat halindeki kemik yüzeyinde bulunan osteoblastların çeşitli uyarılara cevap olarak kontrakte olması ve mineralize matriksin açığa çıkması ile başlar. Osteoklast öncü hücreleri olgun osteoklastlara dönüşür ve açığa çıkan matrikse yapışarak aktif hale gelirler. Rezorpsiyon evresinde aktifleşen osteoklastlardan sentezlenen nötral proteazlar, mineralize olmamış osteoidi rezorbe ederler ve yüzeyde erozyon kavitesi oluştururlar. Kemik rezorpsiyonunun sona ermesi ve formasyonun başlaması arasında geçen süre sürecin tersine dönüş evresidir ve bu evrede daha ileri kemik rezorpsiyonu önlenir. Preosteoblastlar ortaya çıkar. Formasyon evresinde osteoblastlar farklılaşıp, osteoid salgılayarak yeni "temel yapısal ünite" veya "osteon" oluşumunu başlatır. Yeni oluşan osteoid dokunun mineralizasyonu ile yeniden yapılanma tamamlanmış olur³⁷.

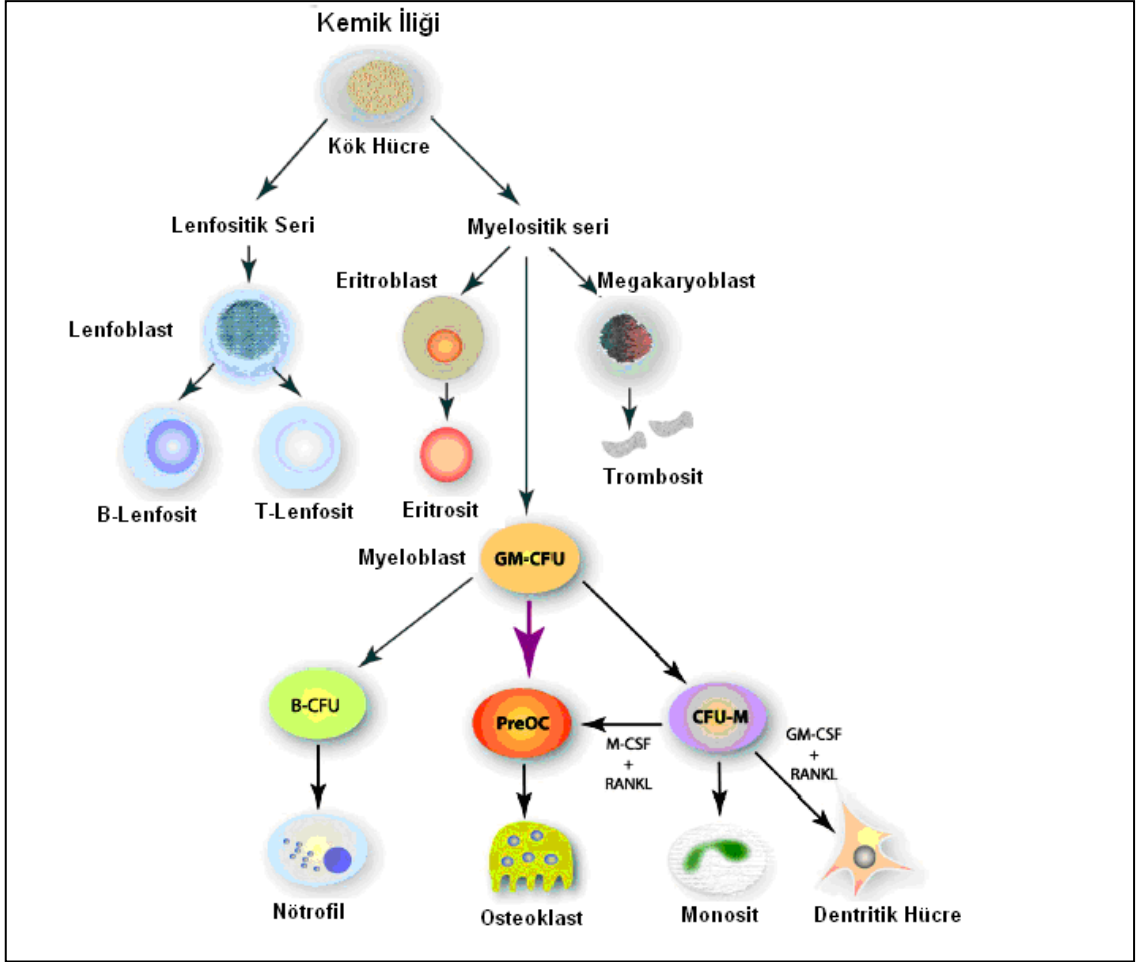
Kemikte remodeling, kemik yapı ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde başlıca metabolik yoldur. Kemik kitlesinin korunması yıkılan eski kemik ile

yapılan yeni kemiğin birbirleriyle dengede olmasıyla mümkündür. Normal bir yeniden yapılanma döngüsünde, yapılan kemik miktarı yıkılana eşittir. Kemik dengesi; osteoklast aktivitesi yüksek veya rezorpsiyon alan sayısı artmış, osteoblast fonksiyonu yetersiz ise negatif yönde bozulur ve kemik kitlesinde kayıp ile sonuçlanır. Yeniden yapılanmada önemli kontrol mekanizmalarından biri osteoklast farklılaşması, aktivasyonu ve yaşam süresinin düzenlenmesidir. Osteoklast farklılaşması ve fonksiyonları yaşam boyu kemik gelişiminde kritik rol oynar⁴⁰.

Osteoklast Farklılaşması

Osteoklastlar monosit/makrofaj seriden gelişen ve kendi öncü hücrelerinden hücre sel füzyonla oluşan multinükleer hücrelerdir. 1980'li yıllarda yapılan in vitro çalışmalarda osteoklastların makrofaj öncü hücrelerinden geliştiği gösterilmiş ve osteoklastların makrofajlar ve antijen sunan dentritik hücrelerle ortak hematopoetik kökeni olduğu sonucuna varılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, multipotent hematopoietik öncü hücre olan koloni oluşturan birimden (CFU), in vitro koşullarda uygun sitokin ortamı ile birlikte kültüre edildiğinde osteoklast oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Pluripotent hematopoietik kök hücrelerden gelişen myeloid kök hücreler, daha sonra megakaryositler, granulositler, monositler makrofajlar ve osteoklastlara farklılaşmaktadır (Şekil 4). Osteoklast formasyonunda tanımlanan ilk hematopoietik öncü hücre granulosit-makrofaj koloni oluşturan birimdir (CFU-GM). Daha ileri çalışmalarda makrofaj-koloni oluşturan biriminde (CFU-M) CFU-GM'ye göre daha az oranda olmak üzere osteoklast formasyonunda rol aldığı gösterilmiştir³⁸.

Osteoklast öncü hücreleri proliferatif hücrelerdir ve interlökin 3 (IL-3), granulosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) gibi hematopoietik büyüme faktörleri bu hücrelerin proliferasyonunu arttırıcı etki gösterir. M-CSF ayrıca bu öncü hücrelerin apoptozisini önleyici etki gösterir⁴¹. M-CSF'nin osteoklast farklılaşmasındaki kritik rolü deney hayvanlarında M-CSF gen mutasyonlarının sonucunda ağır osteopetrozis geliştiğinin gösterilmesi ile anlaşılmıştır⁴².



Şekil 4: Pluripotent kök hücreden monosit, granulosit ve osteoklast farklılaşması

Osteoblast/Stromal Hücrelerin Osteoklastogenezdeki Rolü: Son 20 yılda, kemik biyolojisi üzerine yapılan araştırmalarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. 1981 yılında Rodan ve Martin kemikte osteoklastların aktivasyonu ve düzenlenmesinin osteoblast veya stromal hücreler tarafından üretilen lokal etkili faktörler aracılığıyla düzenlendiğini öne sürmüşlerdir⁴³. Bundan 10 yıl sonra osteoklast uyarılmasının osteoblast hücre yüzeyi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁴⁴. Daha sonra yapılan çalışmalarda osteoklastogenezin indüklenmesi için osteoklastlarla, osteoblast ve kemik iliği hücreleri arasında hücre teması olması gerektiği savunulmuştur⁴⁵.

Hücre-hücre temasının moleküler mekanizması ve osteoklastogenezde rol alan osteoblast/stromal hücreler veya diğer hücreler tarafından eksprese edilen faktörler, RANK/RANKL/OPG sinyal sisteminin keşfi ile anlaşılmaya başlanmış ve bu sisteminin tanımlanması bu süreçlerde osteoblastlar tarafından

oynanan rolün açıklığa kavuşturulmasında önemli bir adım atılmasına yol açmıştır⁴⁶. Osteoblast/stromal hücreler veya diğer hücreler tarafından eksprese edilen faktörler, farklı yaklaşımlar kullanan dört farklı grup tarafından birbirlerinden bağımsız bir şekilde keşfedilmiştir⁴⁷.

Amgen firmasından bir grup araştırmacı olası terapötik kullanımlar için transjenik farelerde tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ilişkili molekülleri tanımlamak amacıyla yaptıkları genetik çalışmalarda beklenmedik bir şekilde OPG'yi keşfetmişlerdir. Özel bir cDNA'yı (komplementer deoksiribonükleik asit (DNA)) aşırı şekilde eksprese eden farelerin, kemiklerinde osteoklastları olmadığından belirgin osteoporozis geliştirdikleri gözlenmiş ve bu gen tarafından kodlanan protein osteoklastik kemik yıkımını sınırlayıcı etkisi nedeniyle OPG (kemik koruyucu) olarak adlandırılmıştır⁴⁸. Bağımsız bir şekilde Snow Brand Milk Products firmasından bir grup araştırmacı standart yaklaşımlarla Rodan ve Martin'in hipotezini test etmeye çalışırken, insan embriyonik fibroblastlarından osteoklastogenezi inhibe eden faktörü saflaştırarak, OPG cDNA'sını klonlamışlar ve özdeş bir molekül keşfettiklerini bildirmişlerdir⁴⁹. Her iki grup da hızla OPG'nin ligandını tanımlamışlar ve sırasıyla OPG ligand ve osteoklast differansiyasyon faktör olarak adlandırmışlardır^{50,51}. Daha sonra bu ligandın, daha önceki yıllarda RANKL ve TNF ile ilişkili aktivasyonu indüklenmiş sitokin (TRANCE) olarak adlandırılan TNF ligand ailesi üyesiyle özdeş olduğu anlaşılmıştır^{52,53}. Kısa bir süre sonra da OPG ligandı olarak belirlenen bu molekülün hücrel reseptörünün, insan kemik iliği kökenli miyeloid dendritik hücre cDNA kütüphanesinin oluşturulması sırasında keşfedilen RANK molekülü ile özdeş olduğu anlaşılmıştır⁵².

Periferik Kan Osteoklast Öncü Hücrelerinde Yüzey Fenotipi

Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte, farklı tipteki lökosit alt grupları birbirlerinden ayırt edilebilmektedir. Yöntemlerin temelinde selektif olarak farklı alt grupları tanıyan antikorların üretimi amaçlanmıştır. Farklı tipteki lökosit popülasyonları ile hem selektif hem de spesifik olarak reaksiyona giren birçok türe spesifik monoklonal antikorların üretimi yapılabilmektedir⁵⁴.

Monoklonal antikorlar tarafından tanınan hücre yüzey molekülleri antijen olarak tanımlanmakta ve bu hücreler tarafından farklı tipteki hücre popülasyonlarının ayırımı yapılabilmektedir. Bu hücre yüzey molekülleri farklı

kategorilerde sınıflandırılabilir. Hücre yüzeyindeki bu antijenik yapılar günümüzde CD (Cluster of Differentiation) farklılaşma kümeleri olarak adlandırılmaktadır. Böylece her CD molekülü, lökosit yüzeyinde bulunan farklı bir antijenik yapıyı temsil etmektedir. Yapılan çalışmalarda mononükleer hücrelerin ortak olarak CD14 yüzey antijenini taşıdığı belirlenmiştir⁵⁴.

Daha önceki çalışmalarda hematopoietik kök hücrelerden gelişen osteoklast öncü hücrelerinin periferik kanda dolaşımında bulunduğu gösterilmiş fakat osteoklast öncü hücrelerini diğer periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) ayıran yüzey özellikleri belirlenememiştir⁶. RANKL'ın keşfi ile birlikte osteoklastogenezi değerlendirmeye yönelik in vitro çalışmalar kolaylaşmış ve PBMC ile RANKL ve M-CSF'nin birlikte kültüre edildiği çalışmalar sonucunda osteoklastların CD14+ monositlerden geliştiği gösterilmiştir^{55,56}.

İnsanlarda periferik kan monosit hücreleri temel olarak CD16+ ve CD16- olmak üzere iki altgruptan oluşmaktadır⁵⁷. Hücre kültürü ile desteklenerek yapılan daha ileri bir çalışmada CD16+ ve CD16- monositler, kültür ortamında RANKL ve M-CSF ile stimüle edilmiş ve osteoklast öncü hücrelerinin CD16- monositlerden geliştiği gösterilmiştir⁷.

RANKL

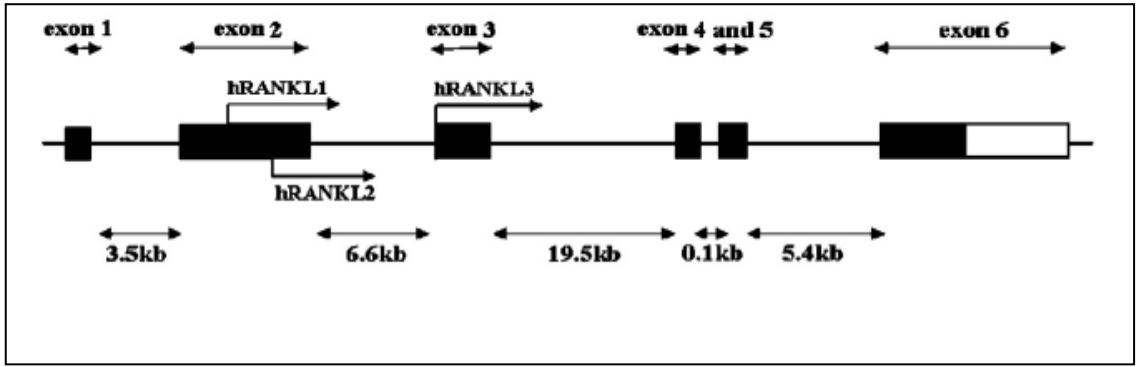
RANKL normal ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunun anahtar mediyatörüdür ve RANK'a bağlanmasıyla indüklenen erken moleküler olaylardan birini teşkil eden NF- κ B'yi aktive etme yeteneği açısından bu ismi almıştır⁵⁸.

RANKL Geni ve Proteinin Yapısı

İnsanlarda RANKL geni 13. kromozomun uzun kolu üzerinde (13q14) yerleşmiştir. Kodlayıcı bölge yaklaşık 36 kb'lık bir alan kaplamakta ve 6 ekzondan oluşmaktadır. Tek gen tarafından kodlanmasına rağmen alternatif splicing sonucu hRANKL1,2,3 olmak üzere 3 farklı izoform ekspresyonu gerçekleşir (Şekil 5). Tüm izoformların C-terminal ekstraselüler alanları özdeşdir⁵⁹.

RANKL, bir sitokin ailesi olan TNF-ligand süperailisinin bir üyesidir ve oldukça korunmuş bir proteindir. İnsan RANKL proteini, fare proteini ile %87 homolojiye sahiptir⁴⁴. İnsan RANKL sekansı, TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL) ve Fas ligand ile sırasıyla, yaklaşık %34 ve %28 sekans

homolojisi paylaşmaktadır. İnsanlarda hRANKL1,2 tip 2 transmembran bağılı glikoproteinlerdir. hRANKL1 317 aa'den oluşur ve 20 aa'lık hidrofobik transmembran alanına sahiptir. C-terminal ekstraselüler bölgesi; iki N-hatlı glikozilasyon bölgesi, iki potansiyel işlemci alanını içeren bir bölge ve aktif reseptör bağlayıcı bölge içeren TNF-ailesi ile homolog bir bölge içerir (Şekil 7)⁵⁹. hRANKL2 270 aa'den oluşur ve hRANKL1'den sadece daha kısa bir intraselüler bölge içermesiyle ayrılır. Her iki izoform da hücre membranında bulunmaktadır. Membran bağılı formlardan metalloproteinaz-disintegrin tümör nekroze edici faktör N dönüştürücü (TACE) aracılığı ile proteolitik ayrılma sonucu çözünür RANKL formları oluşabilmektedir. hRANKL3 243 aa'den oluşan formdur. Transmembran ve sitoplazmik alan içermez ve çözünür ligand olarak (sRANKL) rol oynar. Çözünür formlar aynı zamanda biyolojik aktivite sergilerler⁶⁰



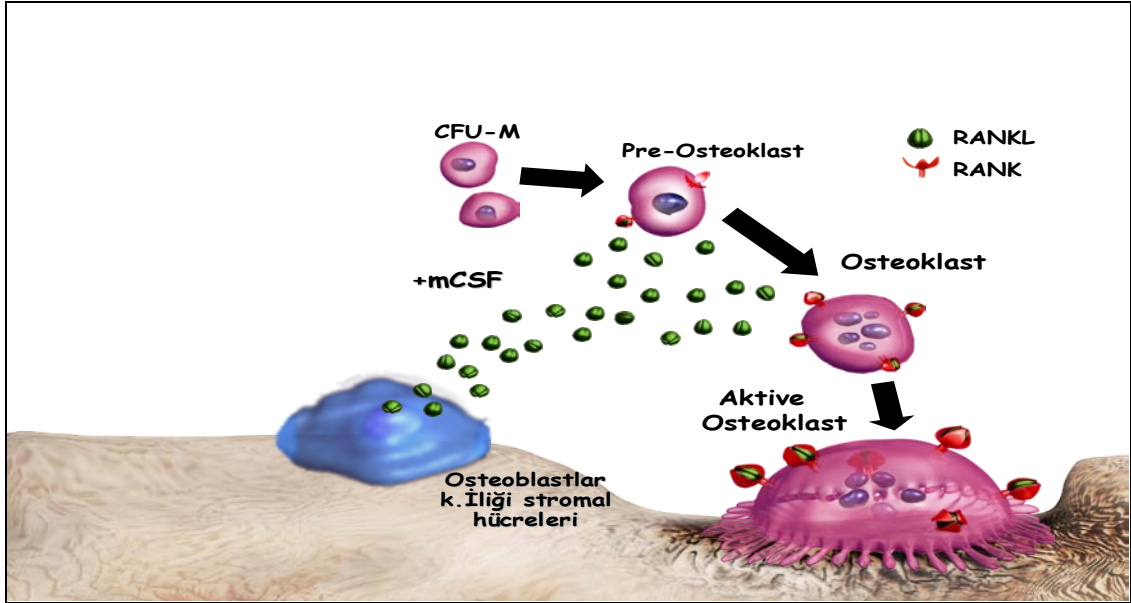
Şekil 5: İnsan RANKL geni izoformları

RANKL Ekspresyonu

İnsan RANKL ekspresyonu ilk olarak periferik lenf nodları, fetal karaciğer ve bazı osteosarkoma hücre hatlarında tespit edilmiştir⁵¹. Daha sonra yapılan çalışmalarda, kemik iliği büyüme plaklarında, periosteum, dalak, timus, kalp, böbrek, akciğer, iskelet kası ve deri gibi pek çok dokuda RANKL ekspresyonunun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Hücresel seviyede, RANKL'ın kemik iliği stromal hücreleri ve osteoblastlar tarafından yüksek oranda ekspresyon edildiği gösterilmiştir. RANKL ekspresyonu bu hücreler dışında ayrıca aktif T hücreleri, B hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler ve meme epitelyum hücreleri tarafından da gerçekleşmektedir⁶¹.

RANKL'ın Biyolojik Etkileri

RANKL osteoklastların farklılaşmasında en temel düzenleyici faktörlerden biridir. RANKL'ın kemikteki ana görevi, osteoklast öncü hücrelerinin füzyonunu, olgun osteoklastlara farklılaşmayı ve aktivasyonlarını stimüle, apoptozunu ise inhibe etmektir (Şekil 6). RANKL sentezinin arttığı durumlarda kemik kaybı ve rezorpsiyonunun arttığı görülmüştür⁶¹



Şekil 6: Osteoklastogenezde RANKL Rolü

İn vitro çalışmalar membran RANKL'ının osteoklastogenezin stimülasyonunda çözünür RANKL'a oranla daha etkin olduğunu göstermiştir⁶². Bununla birlikte dolaşımda ölçülebilir olan sRANKL'dır ve fare çalışmalarında sRANKL'ın ciddi iskelet katabolizmasına yol açabileceği, RANKL knockout deney hayvanlarında matür osteoklastların total kaybı ve sRANKL uygulanan farelerde de doza bağlı şiddetli hiperkalsemi ve kemik kaybı gözlenmiştir. Ayrıca birçok çalışmada serum sRANKL düzeylerinin kemik yıkımının stimülasyonu ile arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar sRANKL'ın fizyolojik ve patolojik kemik yıkımında önemli bir aracı olduğunu göstermiştir⁶¹.

Pek çok çalışmada RANKL'ın kemik doku dışında laktasyonda, immün sistemde ve tümör hücresi proliferasyonunda görev aldığı gösterilmiştir⁶¹. RANKL, meme epitel hücrelerinde reseptörü RANK'a bağlanarak meme epitel hücrelerinin laktasyonel hiperplazisinde ve süt üretiminde rol oynar⁶³. RANKL'ın,

RANK'a bağlanması dendritik hücrelerin canlılığını, immün sistemi uyarma kapasitesini ve apoptozun inhibisyonunu artırır⁶⁴. Ayrıca, T hücrelerinin c-jun N-terminal aktivasyonunu sağlar ve uyarılmış T hücrelerinin fonksiyonunu düzenler. İmmün sistemde uyarılmış T hücrelerinden salgılanan RANKL ise lenfosit farklılaşması ve lenf nodu organogenezi için gereklidir⁵³.

RANKL'in Hastalıklarla İlişkisi

Normal kemik gelişimi ve remodeling için son derece önemli olan RANKL'in periodontal hastalıklar, postmenapozal osteoporoz, romatoid artrit (RA) ve renal osteodistrofi gibi patolojik kemik yıkımı ile karakterize hastalıklarda rol oynadığı gösterilmiştir⁶⁵. RANKL, osteoklastogenezi artırarak ve yeni remodeling döngülerini başlatarak osteoporoz patogenezinde kritik rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada, postmenapozal kadınlarda kemik iliği stromal hücrelerinde RANKL ekspresyonunun premenapozal kadınlara ve östrojen tedavisi alan postmenapozal kadınlara oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir⁶⁶.

İltihaplı eklemlerde sinoviyal hücrelerden ve aktif T hücrelerinden artmış miktarda RANKL salgılanması artrit ve diğer inflamatuvar hastalıklara bağlı kemik kaybında da RANKL'in rol oynayabileceğini düşündürmektedir⁶⁷. İnflamatuvar artritli farelerde, inflame eklemlerde RANKL ekspresyonun yüksek olduğu ve serum sRANKL protein düzeylerinin arttığı gösterilmiştir Benzer şekilde RA'li hastalarda yapılan klinik çalışmalarda RANKL ekspresyonlarının ve sRANKL protein düzeylerinin arttığı görülmüştür⁸.

RANKL'in ROD patogenezinde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Fakat etkileri henüz tam olarak anlaşılammıştır. SDBY hastalarında serum sRANKL protein düzeylerinin değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş ve ROD patogenezindeki etkilerinin anlaşılmasında daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir¹¹.

RANKL sinyalinin tümör hücresi proliferasyonunun indüklenmesinde, tümör hücresi migrasyonu ve kemik metastazında da rolü olduğu gösterilmiştir. Multiple myelom hastalarında kemik hasarınının moleküler mekanizmasının belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, kemik iliği biyopsilerinin immünohistokimyasal analizleri sonucunda RANKL ekspresyonunun arttığı

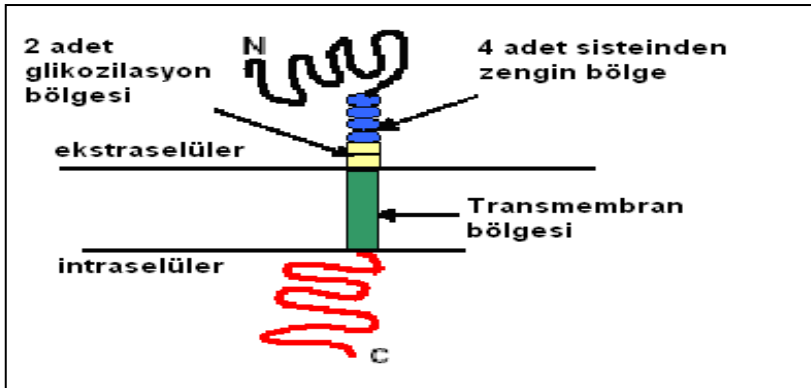
belirtilmiştir. Meme, prostat kanseri ve diğer metastatik kemik tümörlerinde de RANKL ekspresyonunda artış tespit edilmiştir⁶⁸.

RANKL birkaç farklı mekanizmayla kemik metastazlarının patogeneğinde rol oynamaktadır. RANKL seviyelerindeki artmaya bağlı gelişen artmış kemik yıkımı tümör hücrelerinin bölünme ve yaşam sürelerini hızlandıran büyüme faktörlerinin salgılanmasına sebep olmaktadır. Ayrıca, RANKL'ın kemiğe metastaz yapan belirli kanser hücreleri için kemoatraktan olduğu ve kemik metastazlarında vaskülarizasyonu uyardığı düşünülmektedir⁸.

RANK

RANK Geni ve Protein Yapısı

RANK geni, insan genomunda 18. kromozomun uzun kolunda (18q22.1) yer alır. İnsan RANK proteini TNFR süperailisinin bir üyesidir ve C-terminal de 383 aa'lık intraselüler bölge, N-terminal de 184 aa'lık ekstraselüler bölge, hücre dışında 28 aa'lık sinyal peptid bölgesi ve 21 aa'lık kısa transmembran bölgesiyle 616 aa'den oluşan bir transmembran proteindir. Ekstraselüler alan, 4 adet sisteinden zengin bölge ve 2 adet N-terminal glikozilasyon bölgelerinden oluşur (Şekil 7). Sinyal peptidi, protein için etki bölgesini belirleyen sinyal tanıyan bölgeye bağlanır. Bağlanmayla sinyal peptidi ayrılır ve RANK hücre yüzeyinde 588 aa'lık homotrimer protein olarak sentezlenir⁶⁸.



Şekil 7: RANK'ın şematik gösterimi

RANK'ın Biyolojik Etkileri ve Hastalıklarla İlişkisi

RANK'ın, hücresel düzeyde makrofaj/monositik hücreler, T ve B lenfositleri, fibroblastlar, kondrositler, endotelial hücreler, dendritik hücreler ile öncül ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca RANK mRNA ekspresyonunun kemik, kemik iliği, dalak, iskelet kası, beyin, kalp,

karaciğer, akciğer, meme dokusu ve deri gibi dokularda da olduğu gösterilmiştir^{69,70}.

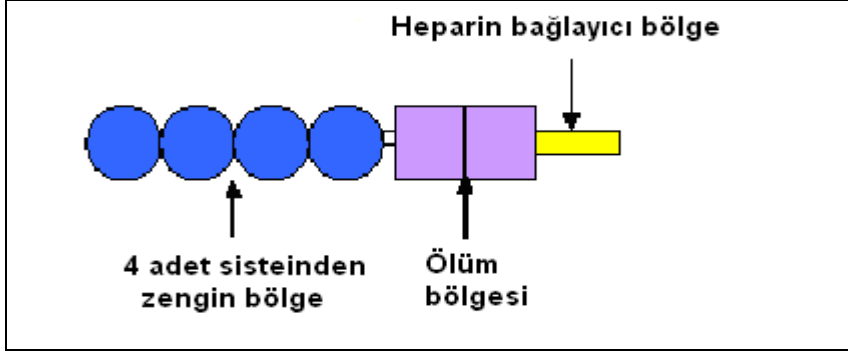
RANK, preosteoklastlara RANKL'in bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. Osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunda rol oynar. RANKL'in RANK'a bağlanması ile hücre içinde birçok sinyal yolağı aktif hale gelir ve osteoklastogenez gerçekleşir⁷¹.

RANKL knockout farelerde olduğu gibi RANK knockout farelerde de çok çekerdeklili osteoklastların olmamasına bağlı olarak ağır osteopetrozis geliştiği belirtilmiştir. RANK protein sentezinin meme epitelyal hücrelerinde, meme ve prostat kanserlerini de kapsayan bazı kanser hücrelerinde ve dentritik hücrelerde tespit edilmesi bu reseptörün laktasyonda, tümör hücre proliferasyon ve metastazında ve edinsel immünte de rol oynadığını göstermiştir⁶¹. Ayrıca yapılan genetik çalışmalarda RANK geninde meydana gelen aktifleştirici mutasyonların ailesel ekspansil osteolizise ve ailesel Paget hastalığına neden olduğu gösterilmiştir. Ailesel Paget hastalığı olan bireylerde RANK geninde ekzon 1'de meydana gelen aktifleştirici mutasyon saptanmış ve RANK aktivasyonu bu hastalarda oluşan osteoliz ile ilişkilendirilmiştir⁷².

OPG

OPG Geni ve Protein Yapısı

İnsanlarda OPG geni 8. kromozom (8q23-24) üzerinde yer alır. İnsan, rat ve fare OPG'leri geniş bir homolojiyi paylaşırlar (%85-95). OPG, RANKL ve RANK'a benzer şekilde TNFR süperailesinin bir üyesidir. Başlangıçta 401 amino asit olarak sentezlenen bir polipeptiddir. Daha sonra 21 amino asitlik propeptid kısmın ayrılması ile 380 amino asitlik olgun protein oluşur. Hücre dışına 60 kDa'luk monomerik ve 120 kDa'luk disülfid bağı içeren homodimerik, çözünür bir glikoprotein olarak salgılanır. OPG N-terminalde 4 adet sisteinden zengin bölge, 2 adet ölüm bölgesi ve C-terminalde heparin bağlayıcı bölge olmak üzere 7 yapısal bölgeden oluşur (Şekil 8). N-terminal'deki sisteinden zengin bölge molekülün yapısal uzunluğunu oluşturur ve RANKL'a bağlanarak RANKL/RANK etkileşimini önler ve osteoklastogenezini inhibe eder⁷³.



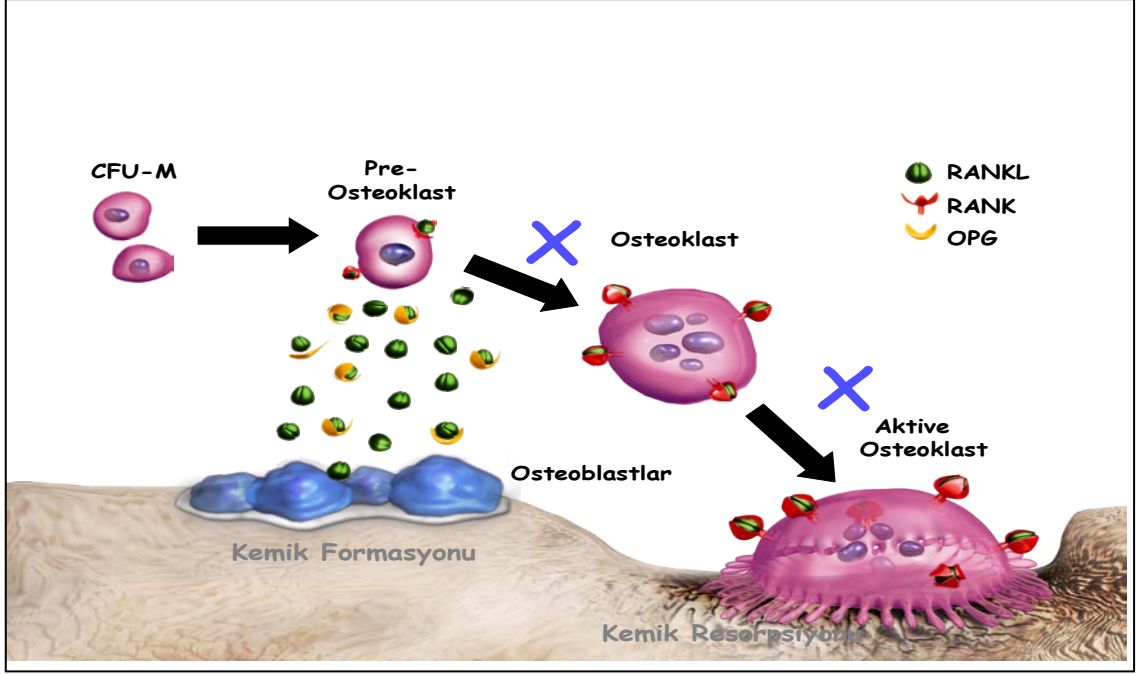
Şekil 8: OPG'nin şematik gösterimi

OPG'nin Ekspresyonu ve Biyolojik Etkileri

OPG, RANKL'dan daha geniş bir alanda ve daha yüksek oranda eksprese olur. OPG mRNA'sı kemik, kıkırdak, aorta, deri, akciğer, böbrek, karaciğer, beyin ve pek çok diğer dokuda tespit edilmiştir. Hücresel seviyede, osteoblast, stromal hücreler, endotel hücreler, aortik düz kas hücreleri, fibroblastlar, dendritik hücreler ve lenfoid hücre hatlarında eksprese olmaktadır^{46,47}.

OPG'nin kemik dokudaki biyolojik etkileri RANK/RANKL'ın etkisi ile terstir. OPG, hem membrana bağlı hem de çözünebilir RANKL'a olan yüksek afinitesi ve RANK'ın aktivasyonunu önlemesi nedeniyle bir tuzak reseptör olarak davranır ve RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engeller. Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur ve RANKL kemik rezorpsiyonu oluşturamaz (Şekil 9)⁷⁴.

OPG kemik dışında birçok dokuda sentezlenmesine rağmen bu dokulardaki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Büyük arterlerin mediasında ve koroner arter düz kası ve endotel hücreleri gibi farklı damar hücre tiplerinde OPG sentezinin gösterilmiş olması vasküler sistemde fonksiyonu olduğunu göstermektedir. Endotel hücrelerinde OPG'nin otokrin canlılık faktörü gibi rol oynadığı belirtilmiştir. OPG knockout farelerde, sadece artmış osteoklast aktivasyonuna bağlı olarak osteoporoz oluşmakla kalmayıp aynı zamanda büyük arterlerinde kalsifikasyon, intima ve medialarında proliferasyon ve aort diseksiyonu görülmüştür. Bu durum OPG'nin büyük arterleri medial kalsifikasyona karşı koruduğunu düşündürmektedir⁶¹.



Şekil 9: OPG'nin osteoklastogenezdeki rolü

OPG'nin Hastalıklarla ilişkisi

Senil osteoporoz ve immobilizasyona bağlı kemik kaybı durumunda OPG'nin önemli bir mediatör olduğu düşünülmektedir. Kemik iliği hücrelerinin sentezlediği OPG'nin yaşla azaldığı görülmüştür⁷⁵. Kemik yüzeyine uygulanan gerilme kuvvetinin ise OPG mRNA sentezini artırdığı belirtilmiştir⁷⁶.

ROD, RA, primer bilier siroz, Cushing hastaları ve kemik metastazı olan prostat kanserlerinde OPG seviyelerinde artma, multipl miyelom hastalarında ise OPG seviyelerinde azalma tespit edilmiştir⁶⁸.

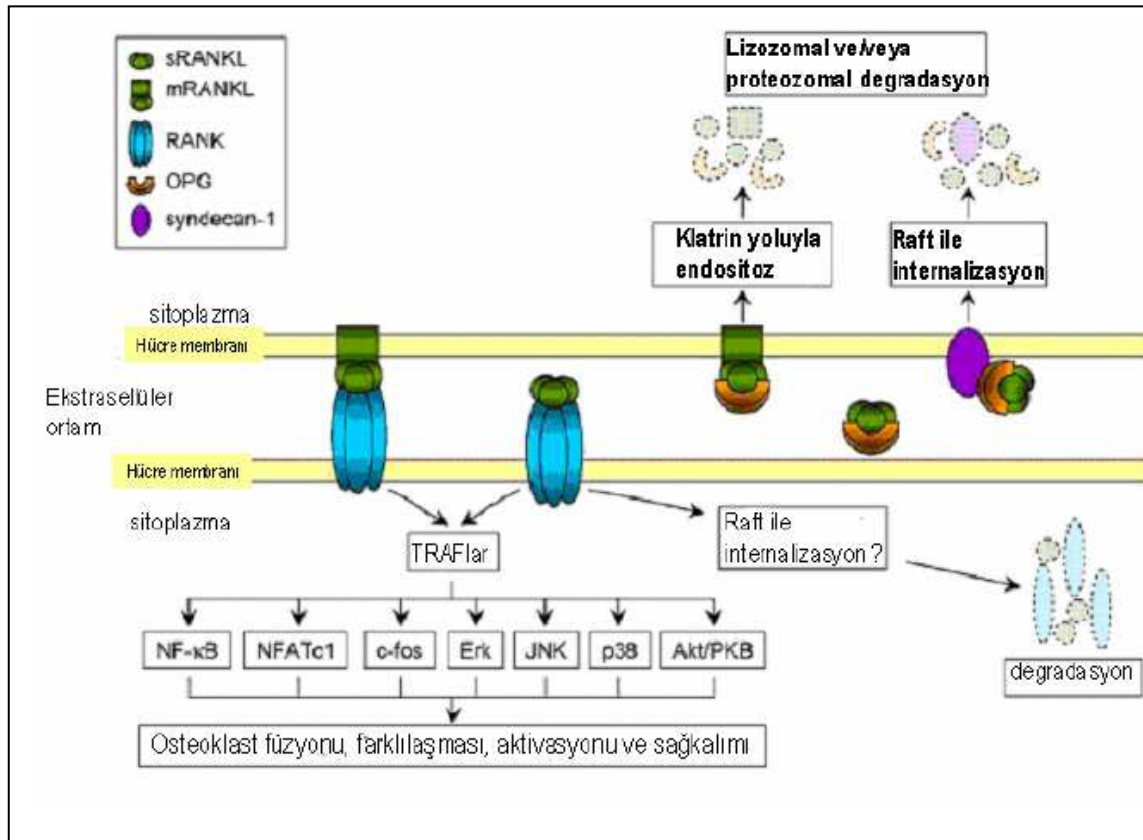
Otozomal resesif geçişli Juvenil Paget hastalarında, OPG'nin 100 kilobazlık kısmında homozigot delesyon görülmüş ve bu hastalarda kemik yıkımının artması, osteopeni ve kırıklar bulunması OPG'nin kemik koruyucu rolünün gerçekleşmemesi ile ilişkilendirilmiştir⁷⁷.

Yine otozomal resesif geçişli bir kemik hastalığı olan idiopatik hipofosfatazyada OPG'nin üçüncü ekzonunda inaktive edici delesyon belirlenmiş ve bu hastalıkta görülen uzun kemiklerde deformiteler, kifoz ve artmış kemik döngüsü de insanlarda OPG'nin kemikte koruyucu rolünü destekleyen diğer bir örnek olmuştur⁷⁸.

RANKL/OPG/RANK Metabolizması

RANKL/OPG/RANK metabolizması tam olarak anlaşılammıştır. RANKL-RANK komplekslerinin muhtemelen raft'lar tarafından internalize edildiği ve daha sonra lizozomlarda parçalandığı düşünülmektedir⁵⁹.

OPG, heparin bağlayıcı bölgeyle etkileşim yoluyla heparin sülfat yan zincirleriyle bir transmembran proteoglikan olan sindekan-1'e bağlanmakta ve daha sonra lizozomlarla kısmen parçalanmaktadır. Yakın zamanda OPG ile kompleks oluşturmuş membran bağlı RANKL'in klatriin kaplı veziküllerle internalize olduğu ve her iki proteinin de lizozom ve proteozomlarla ayrıştırıldığı gösterilmiştir (Şekil 10)⁵⁹.



Şekil 10: RANKL/RANK/OPG metabolizması

RANKL/OPG/RANK Salınımlarının Düzenlenmesi

Yapılan birçok çalışmada osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunda en temel düzenleyici faktörlerin RANKL ve OPG olduğu gösterilmiştir⁵⁹.

Stromal hücreler ve osteoblastlardan RANKL ve OPG sentezi transkripsiyonel, translasyonel ve posttraslasyonel seviyelerde hormonlar (PTH gibi), büyüme faktörleri ve peptidler (tümör growth faktör (TGF)- β 1 ve insülin

like growth faktör (IGF) 1 gibi), sitokinler (interlökin (IL)-1 β , IL-11 ve TNF α gibi) ve glukokortikoidler gibi pek çok faktör tarafından düzenlenir (Tablo 4)⁷⁹.

Kemik yıkımını artıran birçok molekülün RANKL ekspresyonunu artırdığı ve/veya OPG ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Glukokortikoidler, PTH ve Prostaglandin (PG) E₂ RANKL sentezini artırırken, OPG sentezini azaltır⁶¹.

RANKL ve OPG düzeylerindeki karşıt düzenlenme ilk defa PTH çalışmaları ile bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada paratiroidektomili sıçanlarda 6 saat boyunca PTH infüzyonu yapılmış ve RANKL mRNA düzeylerinde doza bağlı artış gözlenirken OPG mRNA düzeylerinde doza bağlı azalma olduğu gösterilmiştir⁸⁰.

OPG kemik rezorpsiyonu üzerine olan inhibitör etkisini sadece, RANKL için bir tuzak reseptörü gibi davranmasıyla değil, aynı zamanda RANKL yarı ömrünü ayarlamasıyla da gösterir. Tersine, RANKL, OPG'nin biyolojik olarak elverişliliğini, hücrenin içine girişini ve yıkımını kontrol etmektedir⁵⁹.

RANK ekspresyonunun düzenlenmesiyle ilgili yapılan çalışmalar RANKL'a oranla çok daha az sayıdadır. Yapılan birkaç çalışmada TGF- β ve Vit D₃'ün RANK mRNA ekspresyonunu artırdığı, IL-4 ve IL-13'ün ise azalttığı belirtilmiştir. Son yıllarda glukokortikoidlerin de RANK mRNA ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir⁴⁶.

Tablo 4: RANKL, OPG ve RANK ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan faktörler

Faktörler	RANKL	OPG	RANK
Vit D ₃	↑	↑ / ↓	↑
Hormonlar			
Estradiol	↓ / —	↑	
Testosteron	—	↑ / ↓	
Glukortikoidler	↑	↓	↑
PTH	↑	↓	
Sitokinler			
TNF α	↑		
IL-1	↑	↑ / ↓	↓
IL-4			
IL-7	↑		
IL-13	↓	↑	↓ / —
IL-17	↑	↓	↓
Büyüme faktörleri			
TGF β	↑ / ↓	↑	↑
BMP-2		↑	
IGF-1	↑	↓	
Diğer			
PG E ₂	↑	↓	↑
Pi		↑	
LPS	↑	↓	
Ca ⁺⁺	↑	↑	

RANKL/RANK Sisteminde Rol Oynayan Sinyal Yolakları

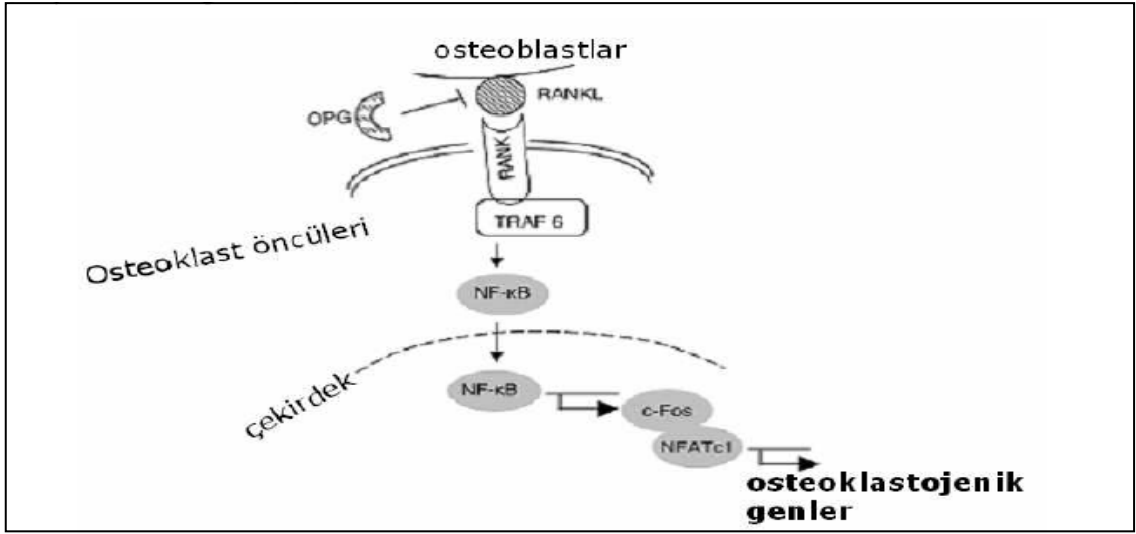
Osteoklast farklılaşması RANKL/RANK etkileşimi ile aktifleşen birçok transkripsiyon faktörü ve sinyal yolakları ile düzenlenir⁸.

RANKL'ın RANK'a bağlanmasıyla oluşan ilk sinyal TNFR ilişkili faktör (TRAF)'lerin RANK'ın sitoplazmik kısmındaki kendine özgü bölüme bağlanmasıdır⁴⁶. TRAF ailesi proteinleri adaptör moleküllerdir ve TNFR süperailisi ve Toll/interlökin-1 reseptör ailesi üyelerini de içeren çeşitli sitokin reseptörlerinin intraselüler sinyalizasyonunda rol oynar⁸¹. Tanımlanan yedi TRAF ailesi üyesi bulunmaktadır ve birçok çalışmada bunlardan TRAF2, TRAF3, TRAF5 ve TRAF6'nın RANK'a bağlandığı görülmüştür⁸². Bunlardan sadece TRAF6 knockout farelerde osteopetrozis gelişimi gösterildiğinden,

TRAF6'nın osteoklastlar için önemli olduğu anlaşılmıştır. TRAF6, osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu düzenleyen spesifik gen ekspresyonuna yol açan önemli bir diğer adaptör gibi davranmaktadır⁸³.

RANKL'in RANK'a bağlanması ile en az yedi hücre içi sinyal yolu uyarılır. Bunlardan dördü (NF- κ B, c-jun aminoterminal kinaz/aktivatör protein-1, c-myc ve kalsinörin/uyarılmış T hücrelerinin nükleer faktörü (NFATc1)) doğrudan osteoklastogeneze aracılık eder. Diğer üçü ise osteoklast aktivasyonuna (src ve MKK6/p38/MITF) ve canlılığını sürdürmesine (src ve hücre dışı sinyal-düzenleyici kinaz) aracılık eder⁴⁷.

RANK ile aktif hale gelen yollardan en dikkat çekici olan NF- κ B sinyal yoludur. Bu transkripsiyon faktörünün aktivasyonu kendi inhibitör proteini olan inhibitör kappa B (I κ B)'nin fosforilasyonu sonucu gerçekleşir. Aktif NF- κ B nükleusa geçerek c-fos ekspresyonunu artırır ve c-fos, NFAT-c1 etkileşimi sonucu osteoklastojenik genlerin transkripsiyonu artar⁶¹.



Şekil 11: OPG, RANKL ve RANK'ın osteoklastogenezdeki rolleri ve hücre içi sinyal iletimi.

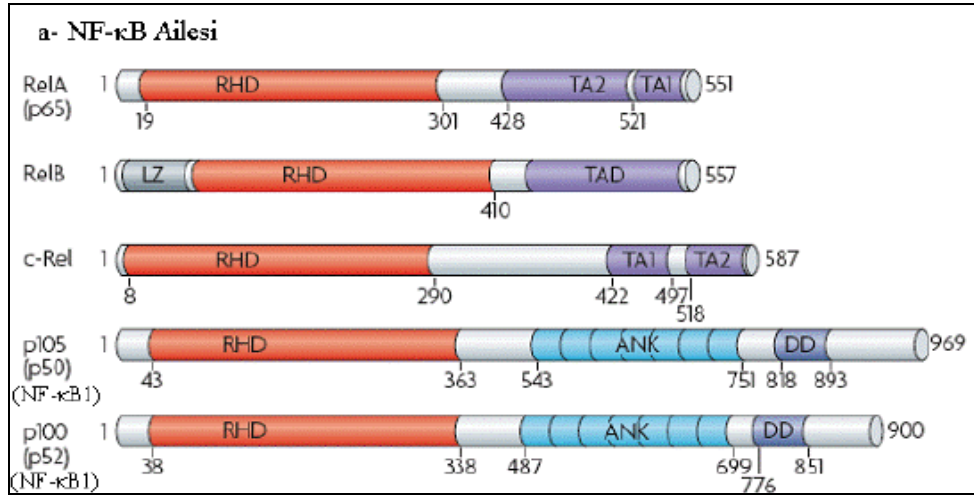
NF- κ B

NF- κ B transkripsiyonel regülatuar bir protein olup, ilk defa 1986 yılında B hücreleri çekirdeğinde immünglobulin kappa hafif zincirlerinin promoter bölgesine bağlanan faktör olarak tanımlanmıştır⁸⁴. Daha sonra yapılan çalışmalarda NF- κ B'nin B ve T lenfositler, fibroblastlar, keratinositler, monosit ve

makrofajlar gibi hücre tiplerinde eksprese edilen, birçok genin uyarılabilir ekspresyonu için önemli bir düzenleyici protein olduğu saptanmıştır⁸⁵.

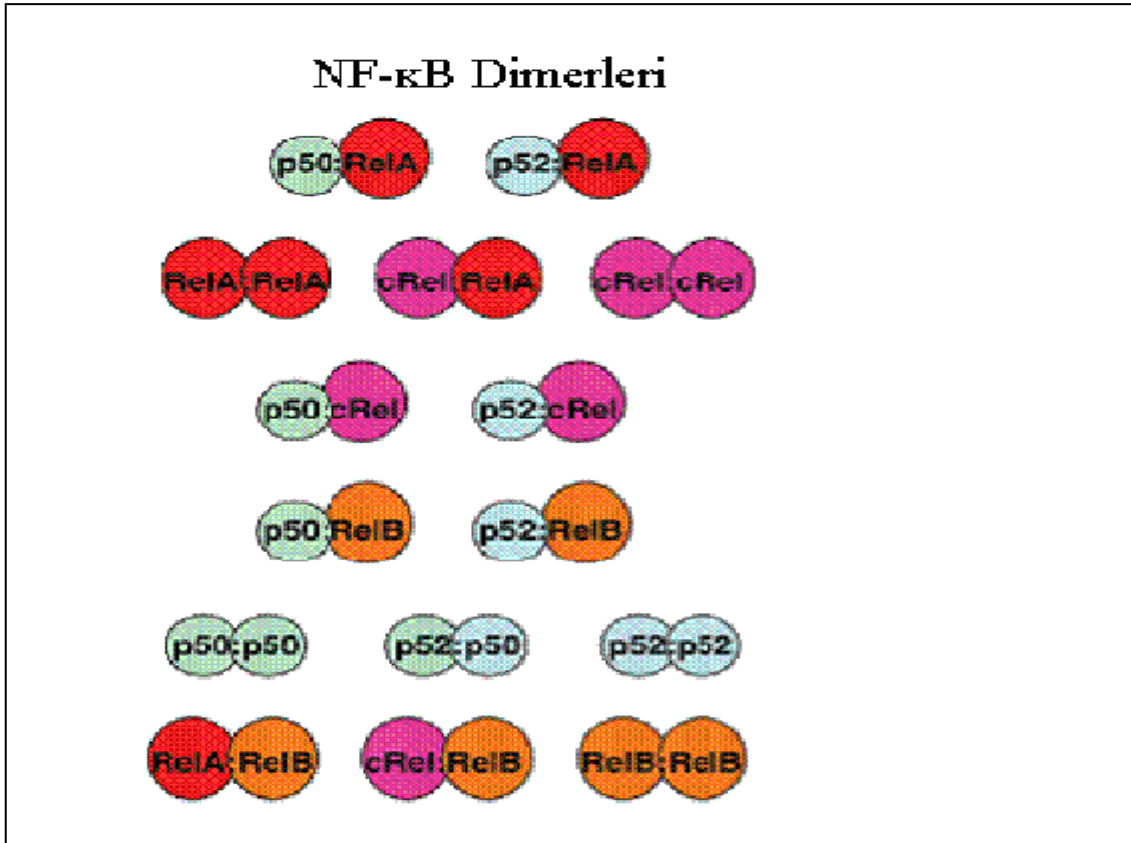
NF-κB'nin Yapısı

NF-κB proteinleri, retroviral onkoprotein v-Rel ile yapısal homoloji gösterdiğinden Rel ailesi proteinleri olarak da bilinmektedirler. NF-κB/Rel protein ailesi, transkripsiyon faktörlerinin farklı bileşimlerinden oluşan heterodimerik bir protein kompleksinden oluşmaktadır. Memeli hücrelerinde RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) ve p52/p100 (NF-κB2) olmak üzere 5 adet NF-κB üyesi bulunmaktadır (Şekil 12)⁸⁶. p50 ve p52 proteinleri daha uzun öncü proteinler olan sırasıyla p105 ve p100 proteinlerinin proteolitik yıkımı sonucunda sentezlenmektedir. Ailenin her üyesi 300 aa'lık rel-homoloji domain (RHD) denen amino-terminal alan içerir. RHD'de DNA'ya bağlanma, inhibitöre bağlanma, dimerizasyon sağlayan bölge ve inhibitör alt ünitelerle etkileşim için çok önemli işlevsel bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) bölgesi bulunur⁸⁷.



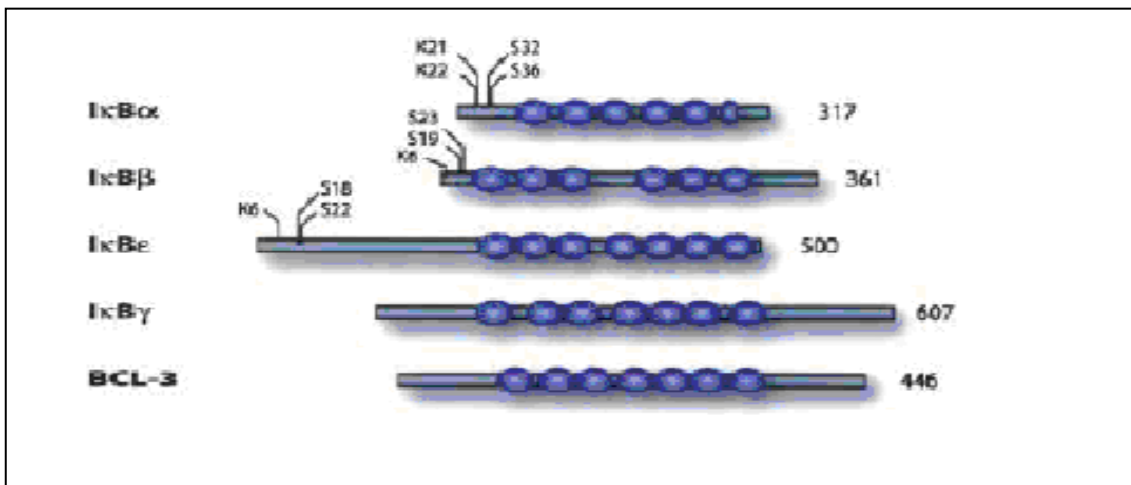
Şekil 12: Memelilere özgü NF-κB protein ailesinin üyeleri.

NF-κB önceleri p50/p65 heterodimeri olarak tanımlanmasına rağmen daha sonra farklı NF-κB komplekslerinin homodimer ya da heterodimer formda olabildiği gösterilmiştir (Şekil 13)⁸⁷.



Şekil 13: NF-κB dimerizasyonu.

NF-κB dimerleri hücrelerde uyarım olmadığı durumlarda, sitoplazmada IκB proteinlerine nonkovalent etkileşim yoluyla bağlanmış halde inaktif formda bulunmaktadır. IκB protein ailesi şimdiye kadar tanımlanan IκBα (NFκBIA), IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl-3 öncü proteinler olan p100 ve p105 olmak üzere yedi adet IκB molekülünden oluşmaktadır (Şekil 14)⁸⁸.



Şekil 14: IκB protein ailesi

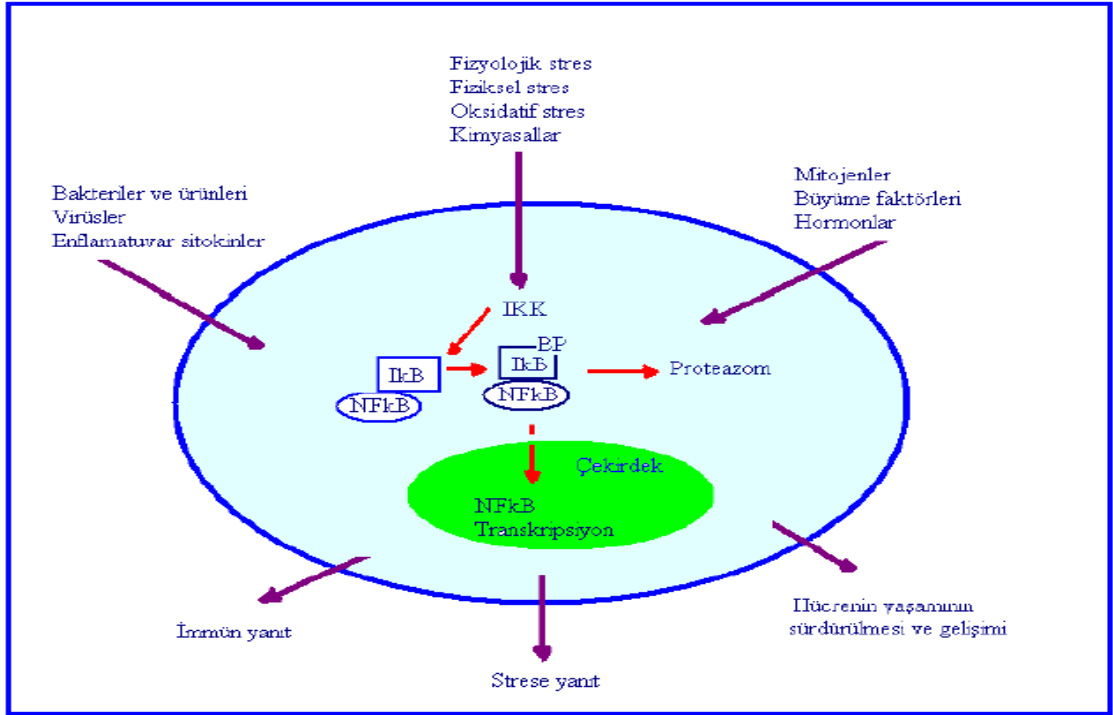
I κ B proteinleri ankirin tekrar bölgeleri içerir. NF- κ B ve I κ B arasındaki bağlantı bu bölgeler ile RHD arasındaki spesifik etkileşim ile gerçekleşmektedir. Hücresel uyarımın olmadığı durumlarda, κ B proteininin NF - κ B molekülündeki NLS dizisini maskeleymesi sonucunda, NF- κ B proteininin nükleer translokasyonu önlenir ve sitoplazmada kalması sağlanır⁸⁹.

NF κ B'nin İşlevi ve Aktivasyonu

NF- κ B inflamasyon, lenfosit aktivasyonu, hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre yüzey reseptörleri ve çeşitli sitokinlerin dahil olduğu 150'den fazla genin ekspresyonun düzenlenmesinde rol almakta ve hücrede apoptosiz ve hayatta kalma başarısına katkıda bulunmaktadır⁹⁰.

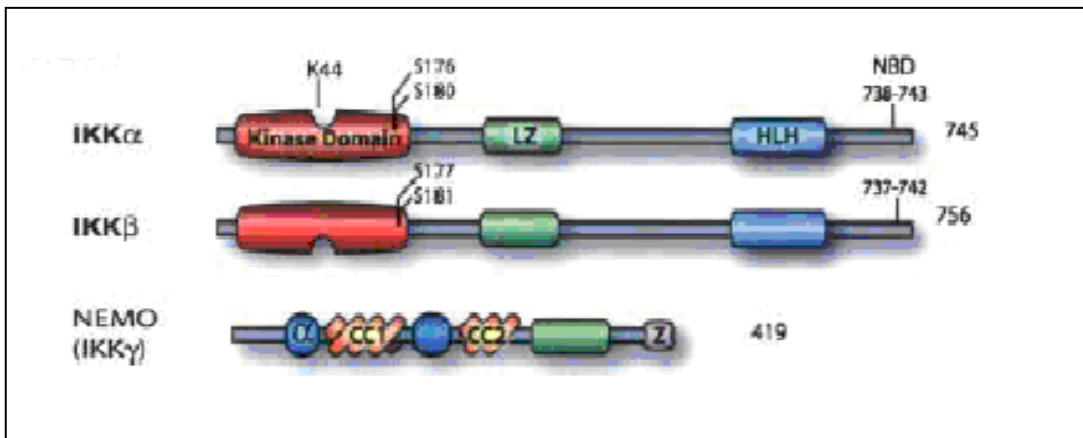
NF- κ B'nin potent uyarıcıları IL-1, TNF- α gibi sitokinler, lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel ve viral ürünler, sfingomyelinaz, çift sarmal RNA, HTLV-1 (human T-cell leukemia virus 1)'in Tax proteini, serbest oksijen radikalleri ve ultraviyole ışın, gamma irradyasyon gibi proapoptotik ve nekrotik durumlardır (Şekil 15)⁹¹.

LPS, NF- κ B sinyalinin en güçlü uyarılarından biridir. LPS, çeşitli aerobik gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki lipoidal glukozamid disakkarittir⁹². Lipid A, O-polisakkarit yan zincir ve R-kor oligosakkaritler olmak üzere üç immünokimyasal bölümden oluşmaktadır. Lipid A birimi, endotoksisite denilen inflamatuvar ve hemodinamik değişikliklerden sorumludur⁹³. Endotoksinin en önemli hedef hücreleri, hücresel immün sistemi oluşturan polimorfonükleer lökositler (PMNL), B-lenfositler, monosit ve doku makrofajları, vasküler endotelyal hücreler ve düz kas hücreleridir⁹². Endotoksin, hepatositlerde üretilen bir akut faz reaktanı olan lipoprotein bağlayıcı proteine bağlanır ve bu yapı, monosit, makrofaj, lenfosit gibi hücrelerin yüzeyinde bulunan CD14 molekülü ile birleşir ve bu birleşme sonucu, hücre içinde NF- κ B sinyal aktivasyonu gerçekleşir⁹⁴.



Şekil 15: NF-κB aktivasyonuna neden olan sinyal uyarıları

NF-κB aktivasyonu büyük molekül ağırlıklı serin-spesifik IκB kinaz (IKK) ile NF-κB/IκB kompleksinin etkileşimi sonucu gerçekleşir. IKK nadir bir kinaz tipidir ve katalitik altüniteler olan IKKα ve IKKβ, ve regülatuar altünite olan IKKγ (NEMO= NF-κB essential modifier) olmak üzere 3 altünite içermektedir (Şekil 18). Ekstrasellüler sinyaller sonucu IKK enzimlerinin uyarılması IκB proteinlerin fosforilasyonu ve yıkımına yol açar. IκB proteininin yıkımı ile aktif hale gelen NF-κB çekirdeğe taşınarak hedef genlerin transkripsiyonunu başlatır (Şekil 16)^{95,96}.



Şekil 16: IκB Kinaz kompleksinin (IKK), 3 ana subünitesi gösterilmiştir: katalitik subüniteler olan IKKα ve IKKβ, ve regülatuar altünite olan IKKγ (NEMO= NF -

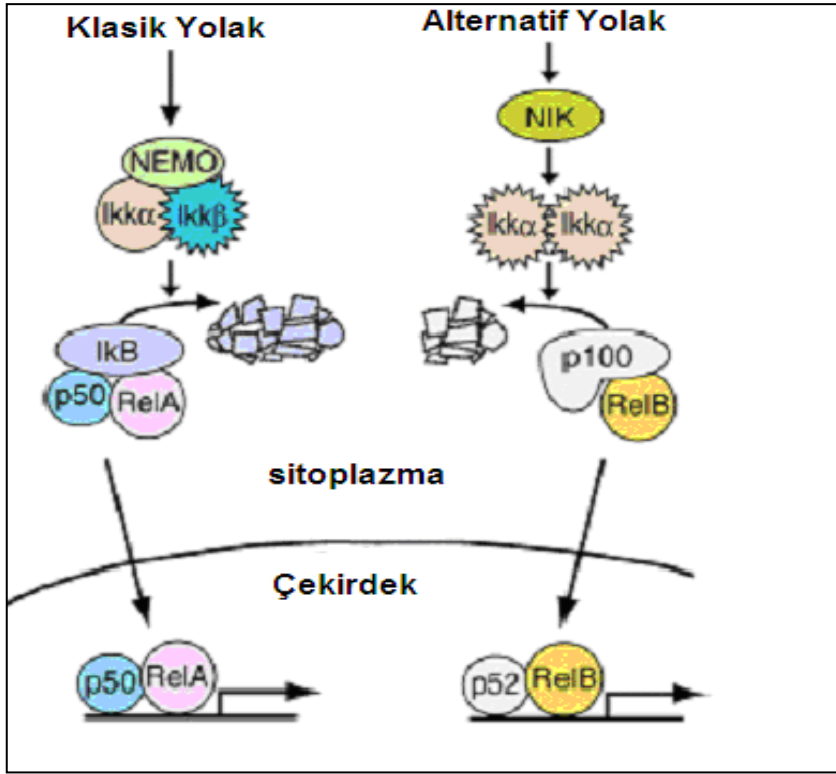
κB essential modifier). HLH, heliks-loop-heliks; LZ, RelB transaktivasyon domainindeki lösün-zipper motif.

NFκB'nin ana aktivasyon yolları; klasik ve alternatif yollar olarak tanımlanmışlardır (Şekil 17). Bir de atipik yolak olarak adlandırılan, ancak henüz tam olarak anlaşılmamış, daha az kullanılan üçüncü bir aktivasyon yolağından söz edilmektedir^{97,98}.

Klasik yolak: Klasik yolak, NF-κB aktivasyonu IκB proteinlerinin fosforilasyon, ubiquitinasyon ve yıkımı sonucu gerçekleşir ve NF-κB aktivasyonunda en sık kullanılan ve en hızlı aktivasyon yolağıdır⁸⁷. Ekstraselüler sinyaller IKK kompleksinin β alt nitesini uyararak aktifleştirir. Aktif IKK kompleksi, NF-κBIA (IκBα) molekülünün N-terminal bölgelerindeki 2 spesifik serin (Ser32 ve Ser34) bölgesini fosforile eder. Daha sonra bu aşamayı poliubikitinasyon ve 26S proteozom aracılıklı yıkım işlemleri izlemektedir. Bu olaylar sonrasında NF-κB, inhibitöründen ayrılır ve NF-κB dimeri (ağırlıklı olarak p50/p65 heterodimeri) açığa çıkar. Açığa çıkan NF-κB dimeri çekirdeğe geçer ve hedef gene bağlanarak transkripsiyonunu aktifleştirir⁹⁷.

Alternatif yolak: Son yıllarda tanımlanmıştır ve klasik yolun aksine IKK kompleksinin α alt nitesinin aktivasyonu gerçekleşir⁹⁹. Alternatif yolağın, klasik yolağın daha yavaş olduğu anlaşılmıştır¹⁰⁰. Ekstraselüler uyarılar sonucunda hücre içinde NF-κB indükleyen kinaz (NIK) aktivasyonu meydana gelir ve NIK IKKα homodimerlerinin aktivasyonunu sağlar. Aktif IKK α ile p100 proteininin C-terminal ucundan fosforilasyonu ve daha sonra poliubikitinasyonu gerçekleşir. Bu sayede C-terminalinden proteozomlarca yıkılan p100'ün amino-terminal yarısından p52 meydana gelir. p52/relB heterodimeri daha sonra çekirdeğe geçer ve hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşir¹⁰¹.

Atipik yolak: IKK'dan bağımsız olması nedeniyle atipik olarak adlandırılmaktadır. Atipik NF-κB aktivasyon yolağının, ultraviyole ışınları ve doksorubisin tarafından aktifleştirilebildiği gösterilmiştir. Bu aktivasyon DNA hasarı ile sonuçlanabilmektedir¹⁰².



Şekil 17: NF-κB Klasik ve Alternatif Aktivasyon Yolağı.

Osteoklastogenezde NF-κB sinyali

NF-κB 'nin kemikteki rolü ilk defa 1990'lı yılların ortalarında iki grup araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. Bu araştırmacılar NF-κB'nin immün hücre fonksiyonlarındaki etkilerini belirlemek amacıyla NF-κB 1/2 double-knockout farelerde yaptıkları çalışmalarda beklenmedik bir şekilde osteoklast yokluğuna bağlı olarak diş çıkarma problemleri ve osteopetrozis geliştiğini gözlemlemişlerdir¹⁰³.

NF-κB knockout farelerde osteoklastogenezde meydana gelen defekt osteoklast öncü hücrelerinin farklılaşmasında RANK ekspresyonunun gerçekleşmemesi ve farklılaşmada rol alan diğer belirteçlerin ekspresyonlarının bozulması yönünden, RANKL knockout farelerdeki bulgular ile benzer şekildedir¹⁰⁴.

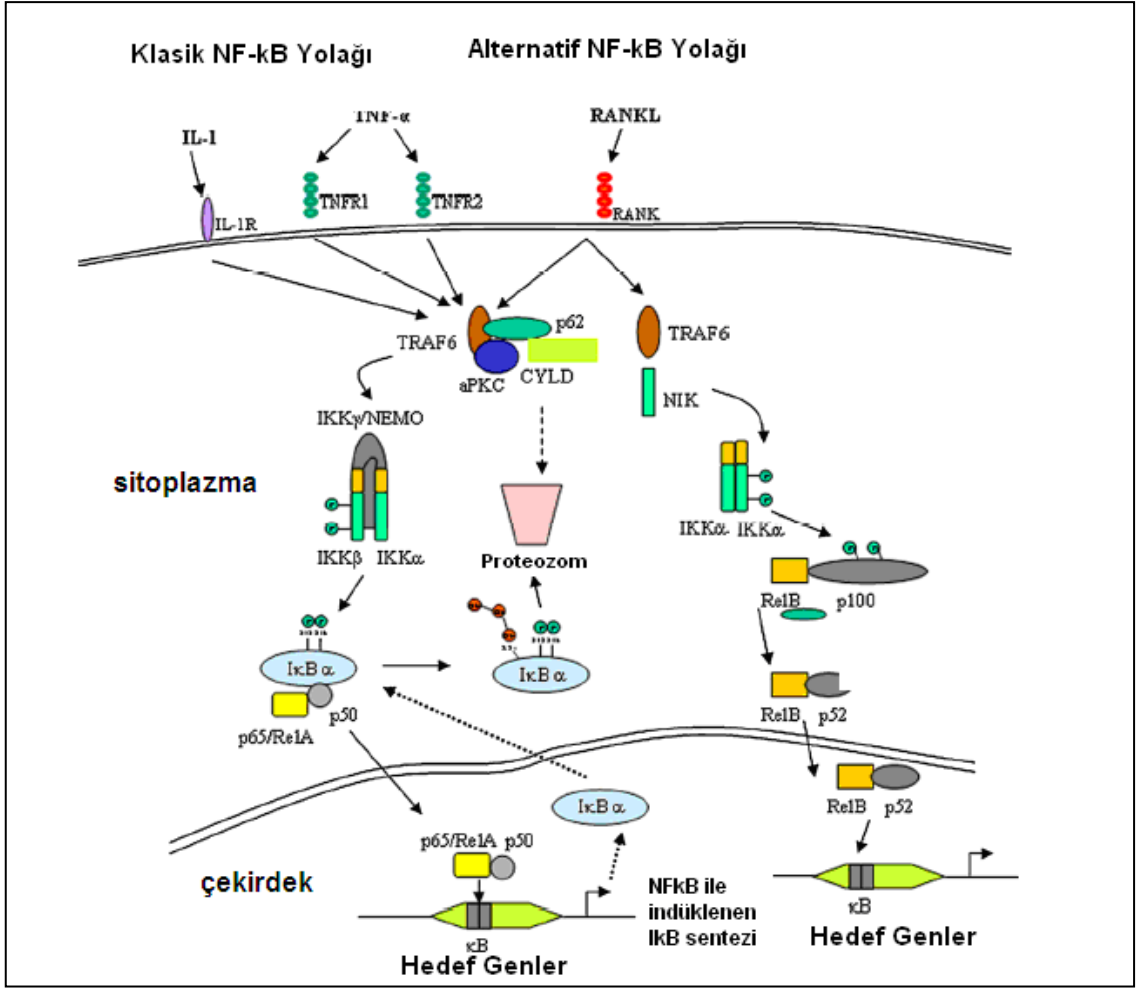
NF-κB'nin osteoklastogenezi inibleyici etkisinin mekanizması büyük oranda açıklanmıştır. RANKL/RANK etkileşiminin ardından hızlı bir şekilde ve kısa süreli (yaklaşık 1 saat) RelA ve p50 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir ve bunu yaklaşık 2 saat sonra c-fos ve p52 ekspresyonlarının artışı izlemektedir¹⁰⁵.

Yine yapılan bir çalışmada RANKL uygulanmasının ardından 48-72 saat sonra NFATc1 ekspresyonlarının arttığı gözlenmiştir¹⁰⁶.

Osteoklast farklılaşmasında NF- κ B, NFATc1 ve cfos gen ekspresyonlarındaki ardışık değişiklikler RANKL/RANK sinyalinden bağımsız olarak TNF- α ile de gerçekleşmektedir. Fakat TNF - α 'nın invitro çalışmalarda RANKL'a oranla osteoklast öncü hücrelerinden çok daha az sayıda osteoklast oluşumunu uyardığı gösterilmiştir⁸. TNF- α ve RANKL'oste oklast farklılaşmasındaki etkileri hücre içinde adaptör bir protein olan TRAF6 aracılığıyla NF- κ B sinyal yolağının aktivasyonu sonucu gerçekleşmektedir (Şekil 18)¹⁰⁷.

RANKL osteoklast öncü hücrelerinde IKK β ve IKK α aktivasyonu ile hem klasik hem de alternatif NF- κ B sinyal yolağını aktifleştirir. İn vivo ve in vitro koşullarda yapılan IKK β gen delesyon çalışmalarında bazal osteoklastogenez için IKK β 'nin gerekli olduğu gösterilmiştir^{108,109}.

IKK β knockout farelerin aksine IKK α knockout fareler in vivo olarak normal bir kemik yapısına ve osteoklast sayısına sahiptir. Fakat in vitro koşullarda IKK α knockout farelerde RANKL'a cevap olarak osteoklast formasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. Bu bulgular ışığında IKK α 'nın basal osteoklastogenezde önemli olmadığı, IKK α 'nın yokluğunda IKK β ile olan klasik NF- κ B yolağının osteoklastogenezini sağladığı sonucuna varılmıştır¹¹⁰.



Şekil 18: Osteoklastogenezde IL-1, TNF-α ve RANKL ile NF-κB aktivasyonu

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Grubu

Bu çalışmaya Temmuz 2010 - Eylül 2011 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi, Dahiliye Nefroloji Bilim Dalına başvuran, yaşları 35 ile 60 arası değişen, kreatinin düzeylerinden yararlanılarak hesaplanan GFR değerlerine göre evre 3 olduğu belirlenen, 41 erkek KBY hastası ile kontrol grubu olarak Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon polikliniğine başvuran yaşları 40 ile 60 arası değişen 27 sağlıklı erkek birey dahil edildi. Kadınlarda yaşa bağlı olarak gelişebilecek osteoporotik değişikliklerin çalışma sonucuna olası etkilerinin engellenmesi amacıyla çalışma, erkek hasta ve kontrol grubuyla gerçekleştirildi.

Hasta grubu için dışlanma kriterleri:

- Evre 3 dışındaki KBY hastaları,
- Çalışmaya başlarken veya çalışma öncesi takiplerinde D vitamini, TNFR antagonisti, sistemik steroid ve fosfor bağlayıcı ilaç kullanım hikayesi,
- Otoimmün hastalık,
- Akut enfeksiyon,
- Malignite

varlığı olarak kabul edildi.

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol gruplarında yer alan bireylere ayrıntılı bilgi verildi ve tüm gruplardan bilgilendirilmiş olur formu alındı. Çalışma, Helsinki deklarasyonu özelliklerine göre yapıldı ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 15/05/2009 tarih ve 5/108 sayı ile onaylandı.

Kullanılan Araç ve Gereçler

Akım sitometri cihazı (BD Facs Calibur, Becton, Dickinson and Company Diagnostics (BD), USA)

Cobas c501 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

Modüler E170 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)

HPLC (HP 1100, Chromosystems Diagnostics, GmbH, Almanya)

DSX™ ELISA (Dynex Technologies, Virginia, USA)

Norland XR36 (Norland Medical Systems Inc., Fort Atkinson, USA)

Santrifüj cihazı (Nüve NF 800)

Santrifüj cihazı (Sigma k-15-1, Almanya)
+ 4⁰C buzdolabı (Electrolux, Almanya)
-20⁰C derin dondurucu (Uğur, Türkiye)
Otomatik ayarlanabilir pipet (Eppendorf, Almanya)
Otomatik ayarlanabilir pipet (Gilson)
Pastör pipeti (Citotest)
Plastik pipet ucu (LP Italiana SPA)
1,5 ml'lik kapaklı ependorf tüp (Isolab, Almanya)
Falkon 12x75mm, 5 ml polistren tüp (BD Biosciences, USA)
Falkon 17x120mm, 15 ml polipropilen konik tüp (BD Biosciences, USA)
3 ml'lik %7.5 EDTA'lı tüp (BD, Vacutainer, İngiltere)
10 ml'lik jel seperatörlü tüp (BD, Vacutainer, İngiltere)

Kullanılan Kitler

- Kreatinin: (Cat. No:3262991, Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Almanya)
- Üre: (Cat. No:4460715 Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Almanya)
- Kalsiyum: (Cat. No:2055716 Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Almanya)
- PTH: (Cat. No:1972103, Roche Diagnostics Mannheim, GmbH, Almanya)
- Vitamin D3: (Cat. No:38038, Chromosystems Diagnostics, GmbH, Almanya)
- sRANKL Human ELISA Kiti: (Cat. No:RD193004200R, Biovendor Research and Diagnostics, Çek Cumhuriyeti)

NF-κB Ölçümü İçin Kullanılan Reaktifler:

- BD Pharmingen™ Phosflow Wash Buffer I (Cat. No:557885, BD Biosciences, Belçika)
- BD Pharmingen™ Phosflow Fix Buffer I I (Cat. No: 557870, BD Biosciences, Belçika)
- BD Pharmingen™ CD14 Per-CP-Cy5.5 I (Cat. No: 550787, BD Biosciences, Belçika)
- BD Pharmingen™ NF-KPA-B (PS529) PE I (Cat. No: 558423, BD Biosciences, Belçika)

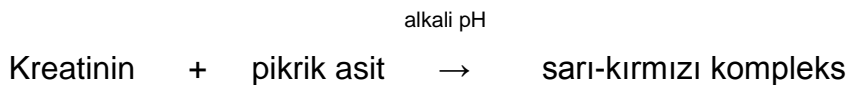
- BD Pharmingen™ FITC labeled anti-human CD16 I (Cat. No: 555406, BD Biosciences, Belçika)
- BD Pharmingen™ PharMingenStain Buffer (with FBS) I (Cat. No: 554656, BD Biosciences, Belçika)
- CellWASH (Cat. No: 342409, BD Biosciences, Belçika)
- Ficoll-Paque Plus (Cat No: 07957, GE Healthcare Bio-Sciences AB, İsveç)
- Lipopolisakkarit (Cat No: L-4130, Sigma-Aldrich)

Örneklerin Toplanması

Çalışmaya alınan hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin 12 saatlik açlık sonrasında sabah alınan periferik venöz kanları, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren tüplere, serumları ise ayrılmak üzere jel seperatörlü tüplere alındı. Jelli tüplere alınmış periferik venöz kan örnekleri, 10 dakika bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve kreatinin, Ca⁺², P ve PTH düzeyleri bekletilmeden otoanalizörde çalışıldı. Ayrılan serumdan 1 ml kadar kapaklı ependorf tüplerine konularak daha sonra sRANKL düzeylerini belirlemek üzere -20°C'de saklandı. Vit D₃ düzeyleri belirlenmek üzere, EDTA içeren tüplere alınan kan örnekleri 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı ve ışıktan konurarak çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı. EDTA'lı tüpe alınan diğer kan örneğinden NF-κB düzeylerinin belirlenmesi aynı gün içerisinde Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında BD Facs Calibur flow sitometri cihazında gerçekleştirildi.

Kreatinin Ölçümü

Kreatinin düzeyleri tamponlanmış deproteinizesiz kinetik Jaffe yöntemi ile Roche Cobas 501 otoanalizöründe çalışıldı. Yöntemin prensibi alkali solüsyonda kreatininin pikrat ile reaksiyona girerek sarı-kırmızı kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan rengin 505 nm'de verdiği absorbans kreatinin düzeyleri ile doğru orantılıdır. Kreatinin ölçümünde yer alan tepkime denklemi aşağıda verilmiştir.

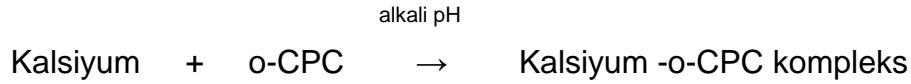


GFR Hesaplanması

Hasta ve kontrol grubunun GFR değerleri MDRD calculator ile kişilerin serum kreatinin değerleri, yaşları, cinsiyetleri ve etnik k3ken bilgileri girilerek paket program ile hesaplandı¹¹¹.

Kalsiyum 3lçümü

Kalsiyum d3zeyleri Schwarzenbach with o-cresolphtalein complexone y3ntemi ile Roche Cobas 501 otoanaliz3ründe çalışıldı. Y3ntemin prensibi, kalsiyum iyonlarının o-cresolphtalein complexone (o-CPC) ile mor renkli bir kompleks oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan rengin yoğunluğu kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 552 nm'de absorbands artışı ile kalsiyum konsantrasyonu belirlenir. Kalsiyum 3lçümünde yer alan tepkime denklemi aşağıda verilmiştir.



PTH 3lçümü

PTH d3zeyleri elektrokemilüminesans y3ntemi ile Roche Moduler E170 otoanaliz3ründe çalışıldı. Y3ntemin prensibi, intakt PTH'ın N-terminal parçası ile biyotinlenmiş monoklonal antik3rler ve C-terminal parçası ile rutenyum işaretili antik3rlerin etkileşime girmesi, streptavidin kaplı mikropartik3llerin biotin işaretili antik3ra bağlanarak imm3n kompleks oluşturması ve oluşan imm3n kompleksin de tripropilamin ile uyarılması esasına dayanmaktadır. Uyarım sonucu 620 nm'de açığa çıkan ışık miktarına g3re madde konsantrasyonu belirlenir. Açığa çıkan ışık miktarı ile madde konsantrasyonu doğru orantılıdır.

Vitamin D₃ 3lçümü:

Vit D₃ d3zeyleri, vitamin D₃ için Y3ksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analiz kiti kullanılarak HPLC cihazında çalışıldı.

Prensip: Y3ntemin prensibi, 3rnekteki proteinler 3kt3r3lerek, interferansa neden olabilecek maddeler uzaklaştırıldıktan sonra konsantre analit elde edilmesine dayanmaktadır. 3lçümü doğrulamak için stabil vitamin D t3revi internal standart olarak kullanılır.

Vitamin D3 için HPLC koşulları:

Enjeksiyon Volümü:25 µL

Akış Hızı:0,7 ml/dk

Oda sıcaklığı:25 °C

UV dedektör: Dalga boyu 265 nm9+

Kromatografik Ayrılma:

	Alıkönma zamanı (dk)
25-OH-vitamin D ₃	4,5
İnternal standart	7,5

Çalışma Prosedürü:

1. Hasta plazma örneklerinden 500 µl ve 50 µl internal standart koyu renkli kapaklı ependorflara pipetlenerek karıştırıldı.
2. Üzerine 500 µl presipitasyon reaktifi eklendi ve vortekslendikten sonra 4°C'de 10 dk bekletildi.
3. 13000 rpm'de 5 dk santrifüjün ardından elde edilen süpernatant ekstraksiyon kolonlarına konularak 1500 rpm'de 1 dk santifüj edildi ve süzölen sıvı uzaklaştırıldı.
4. Ekstraksiyon kolonuna 1 ml yıkama tamponu 1 konuldu ve 1500 rpm'de 1 dk santifüj edilerek süzölen sıvı uzaklaştırıldı.
5. Ekstraksiyon kolonuna 75 µl yıkama tamponu 2 konuldu ve 1500 rpm'de 1 dk santifüj edilerek süzölen sıvı uzaklaştırıldı.
6. Toplama tüpü değiştirilerek 200 µl elüsyon tamponu kolona konuldu ve 1500 rpm'de 1 dk santifüj edilerek elüat toplandı.
7. Elde edilen elüat 20 µl distile su ile dilüe edildi ve dilüe elüattan 50 µl alınarak HPLC sisteminde analizi gerçekleştirildi.

Serum sRANKL Düzeyinin Belirlenmesi

Serum sRANKL düzeyleri kantitatif sandviç enzim bağılı immünoassay (ELİSA) yöntemi ile çalışıldı.

Prensip: Yöntemin prensibinde ELİSA plak kuyucukları insan sRANKL molekülüne karşı geliştirilmiş spesifik bir antikor ile kaplanmıştır. Standartlar ve örneklerin ELİSA kuyucuklarına eklenmesi ile ortamda bulunan sRANKL molekülleri sabit antikorlara bağlanır. Yıkama ile örnekte bağlanmayan komponentler uzaklaştırılır. Yıkama sonrası biyotinlenmiş serbest antikorlar eklenir. İkinci yıkama işlemi ile ortamdan fazla antikorlar uzaklaştırıldıktan sonra

avidinle konjuge Horseradish Peroksidaz (HRP) bağlı konjugat eklenir. İnkübasyondan sonra kuyucuklar tekrar yıkanır ve ortama peroksidazın substratı olan Tetrametilbenzidin (TMB) eklenir. Son basamakta kuyucuklara eklenen stop çözeltisi ile reaksiyon durdurulur. Örneklerdeki sRANKL konsantrasyonu oluşan sarı renkle doğru orantılıdır. Bu renk 450 nm de ölçülürerek absorbans elde edilir. Daha sonra standart eğri kullanılarak örnek konsantrasyonları hesaplanır.

Kullanılan Araç, Gereç ve Çözeltiler

sRANKL antikoları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)

Biotin kaplı antikor

Streptavidin-HRP konjugat

Standart (liyofilize)

Yüksek düzey kalite kontrol örneği (liyofilize)

Düşük düzey kalite kontrol örneği (liyofilize)

Standart ve Örnek dilüsyon tamponu

Tetrametilbenzidin substrat (TMB)

Yıkama çözeltisi

Stop solüsyonu

Standart Çözeltilerinin Hazırlanması: 15 dk oda ısısında bekletilmiş 700 µl standart çözücü, liyofilize halde olan stok standart içine eklenerek köpürtmeden nazikçe karıştırıldı ve 32 pmol/L konsantrasyonda stok standart solüsyonu elde edildi. 7 tane ependorf alındı ve ilk altı ependorf içerisine 0.25 ml standart diluent eklenip sonuncusu boş bırakıldı. 40 ng/ml olan stok solüsyonundan 250 µl alınıp ilk ependorfa eklendi ve iyice karıştırıldı. Bundan da 250 µl alınıp bir sonrakine eklendi. Bu işlem sıradaki 6 ependorfla tamamlandı.

Yüksek ve Düşük Düzey Kalite Kontrol Örneklerinin Hazırlanması: Dilüsyon tamponundan 250 µl alınıp liyofilize halde olan yüksek ve düşük düzey kalite kontrol örneklerine eklendi.

Serum Örneklerinin Dilüsyonu: Serum örnekleri dilüsyon tamponu ile 100 kat dilüe edildi. Dilüsyon iki aşamalı olarak gerçekleştirildi.

A/ 5 µl serum örneği üzerine 95 µl dilüsyon tamponu eklendi.

B/ A basamağında ön dilüsyonu yapılan örnekten 50 µl alınarak üzerine 200 50 µl eklendi.

Yıkama Çözeltisi ve Yıkama Prosedürü: 100 ml'lik 10 kat konsantre yıkama çözeltisi alınıp üzerine 900 ml distile su eklenerek 1000 ml'lik yıkama solüsyonu hazırlandı. Her bir yıkama basamağında otomatik ELİSA yıkayıcısı her kuyucuğa 350 ml yıkama çözeltisi pipetleyecek şekilde ayarlandı ve kuyucuklar her yıkama basamağında 5 kez yıkandı.

Çalışma Prosedürü;

1. ELİSA plak kuyucuklarına standart, kör, kalite kontrol çözeltileri ve örneklerden 100 µL eklendi. Üzeri kapatılıp 2-8°C de 20 saat 300 rpm'de mikroplate shaker'da inkübe edildi.
2. Solüsyonlar aspire edildi ve otomatik ELİSA yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı.
3. Her bir kuyucuğa önceden 2 saat oda ısısında bekletilen Biotin Kaplı Antikordan 100 µL pipetlenip oda ısısında 1 sa 300 rpm'de mikroplate shaker'da inkübe edildi.
4. Solüsyonlar aspire edildi ve otomatik ELİSA yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı.
5. Her bir kuyucuğa 100 µL Streptavidin-HRP konjugat pipetlenip oda ısısında 1 s 300 rpm'de mikroplate shakerda inkübe edildi.
6. Solüsyonlar aspire edildi ve otomatik ELİSA yıkayıcısı ile 5 kez yıkandı
7. 100 µL substrat solüsyonu kuyucuklara pipetlenip oda ısısında 25 dakika inkübe edildi.
8. 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
9. 450 nm de absorbanlar ELİSA plak okuyucusunda okundu. Konsantrasyonlar standart eğriden hesaplandı.

NF-κB Düzeylerinin Belirlenmesi

Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Periferik kan mononükleer hücre izolasyonu için örnekler ficol ile muamele edildi. Öncelikle EDTA'lı tüpe alınan kan örneği 1:1 oranında yıkama solüsyonu ile dilüe edilerek vortekslendi. Dilüe edilen kan örneği ile eşit miktarda ficol falkon tüpe konuldu ve kan örneği ficol üzerinde tabaka oluşturacak şekilde birbirine karıştırılmadan yavaşça falkon tüpe eklendi. Daha sonra falkon tüpteki örnek 3000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üstünde kalan plazma tabakası tüpten uzaklaştırılıp ortadaki beyaz renkli mononükleer hücre tabakası pipet yardımıyla alınarak falkon tüpe ayrıldı. Falkon tüpe ayrılan örnek 1680 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Tüpün üst kısmındaki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra çöken

hücreler Flow sitometrik analiz öncesi hücre sayısı 10 milyon/mL olacak şekilde BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) ile dilüe edildi..

Hazırlanan Solusyonlar:

Phosflow Wash Buffer I (x10): 1/10 oranında distile suyla dilue edilerek her bir hasta örneği için 2mL %10'luk Phosflow Wash Buffer I hazırlandı.

LPS: 0,5 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Çalışma Prosedürü

Her bir kan örneğinin çalışılmasında sırasıyla aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. Tamponlar oda ısısına getirildi. Yukarıda anlatıldığı gibi %10'luk Phosflow Wash Buffer I ve LPS solusyonları hazırlandı.
2. Üç ayrı falkon tüpüne (12x75mm) monoklonal antikolar uygun miktarlarda kondu.
1 nolu tüpe 20 µL Simultest γ_1/γ_{2a} (FITC/PE) yüzey boyama negatif kontrolü
2 nolu tüpe 20 µL CD16 (FITC)
5 µL CD14 (PERCP-CY5,5) monoklonal antikor boyaları
3 nolu tüpe NF- κ B aktivasyonunun ~~ş~~aması amacıyla 100 µL L PS pipetlendi.
3. Mononükleer hücre izolasyonu yapılarak hazırlanan örnekten her bir falkon tüpüne 100'er µL ilave edildi. Tüpler vortekslendikten sonra 1 ve 2 nolu tüpler 20 dakika karanlıkta oda ısısında 3 nolu tüp 37⁰C'de 30 dk bekletildi.
4. 1 ve 2 nolu tüplerin içine 2 mL cell wash eklenip vortekslendi. 1200 rpm'de (250 x g) 10 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj edilen her bir tüp tek hamlede hızlıca ters çevrilerek cell wash uzaklaştırıldı. Tüpleri düz çevirmeden tüpün çevresinde kalan fazla sıvı gazlı bezle alındı.
6. Bu işlemlerin ardından 1 ve 2 nolu tüplerde yüzey boyama işlemi tamamlanmış olup 300 µL cell wash ilave edilerek buzdolabında bekletildi. Sitoplazmik boyanın ardından flowsitometri cihazında analiz edildi.
7. Bu aşamadan sonra 3 nolu tüple çalışmaya devam edildi. 37⁰C'de 30 dk bekletilen 3 nolu tüpe 20 µL CD16 (FITC)
5 µL CD14 (PERCP-CY5,5) monoklonal antikor boyaları pipetlendi ve vortekslenerek 20 dk oda ısısında bekletildi.

8. Tüpe hücrelerin fiksasyonunu sağlamak amacıyla 37⁰C'ye getirilen Phosflow Fix Buffer I 'den 1 ml ilave edildi ve 37⁰C'de 10 dk bekletildi.
9. 10 dk 1680 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edilen tüp tek hamlede hızlıca ters çevrilerek Phosflow Fix Buffer I uzaklaştırıldı. Tüp düz çevrilmeden tüpün çevresinde kalan fazla sıvı gazlı bezle alındı.
10. Hücreleri permeabilize edebilmek için 1 mL %10'luk Phosflow Perm/Wash Buffer I eklendi ve 1680 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
11. 10. basamak tekrar edildi.
12. 20 µL NF-KPA-B (PE) ilave edilip vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
13. 500 µL FBS ilave edilip vortekslendi. Bu işlemlerin ardından 3 nolu tüpün intrasitoplazmik boyama işlemi tamamlanmış oldu.

Daha önce yüzey boyaması yapılan 1 ve 2 nolu tüplerle birlikte intrasitoplazmik boyanan 3 nolu tüp yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanıp örnekler flow sitometri cihazı ve BD CellQuest Pro Version The Premier Acquisition and Analysis Software'i kullanılarak değerlendirildi.

Flowsitometrik Değerlendirme

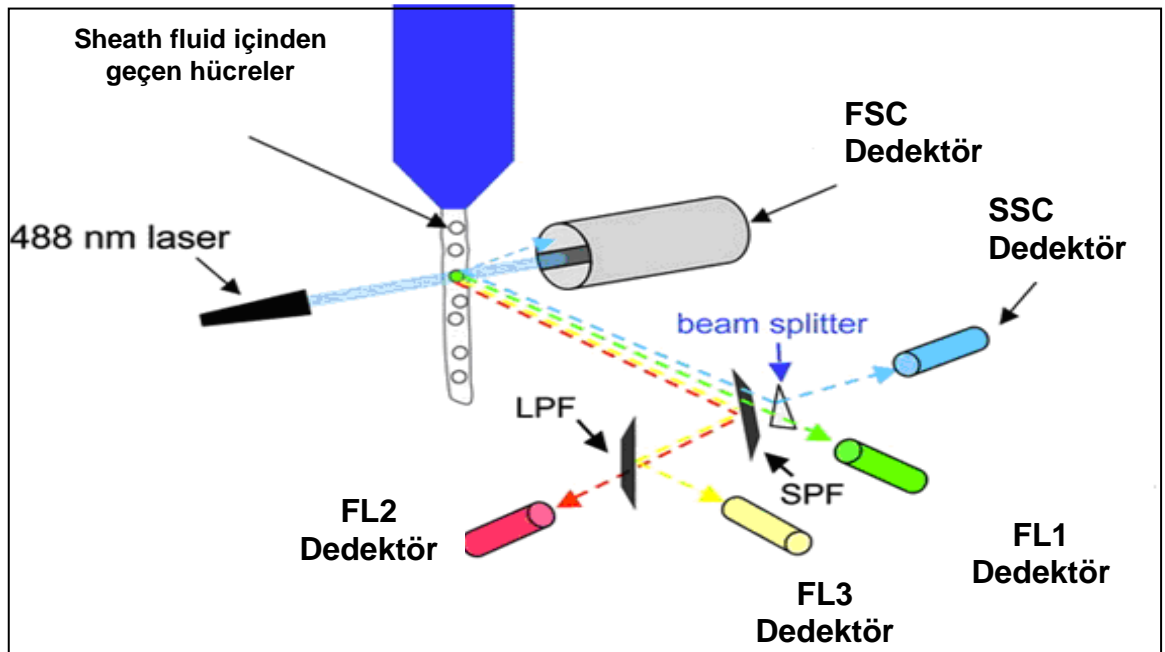
Prensip

Flow sitometri, hücrelerin granülaritesine ve büyüklüğüne bağlı olarak, tek hücre seviyesinde kantitatif analize olanak sağlayan, çok parametrelili ve hızlı bir yöntemdir. Analiz için hücrelerin süspansiyon haline getirilmesi ve monoklonal antikolar ile işaretlenmesi flow sitometrinin temel kuralını oluşturur. İşaretlemede kullanılan problemler hücre yüzey antijenlerine ya da hücre içi elemanlara özgüdür. Flow sitometrinin bileşenleri; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), ışık kaynağı (laser kaynağı), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri (optik ve elektrik sinyal), bilgisayarlar (data toplanması, saklanması, sunumu ve analizi) ve ayırma mekanizmasıdır⁵⁴.

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) gibi florokrom maddelerle konjuge olmuş monoklonal antikolarla işaretlenmiş hücreler süspansiyon halinde hava basıncı ile sheath fluid içinden geçirilir. Sheath fluid içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturur ve bu basınç ile hücreler cam veya kuartzdan yapılmış (flow chamber) akış kabine gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminer akışı, hücrelerin tek sıra

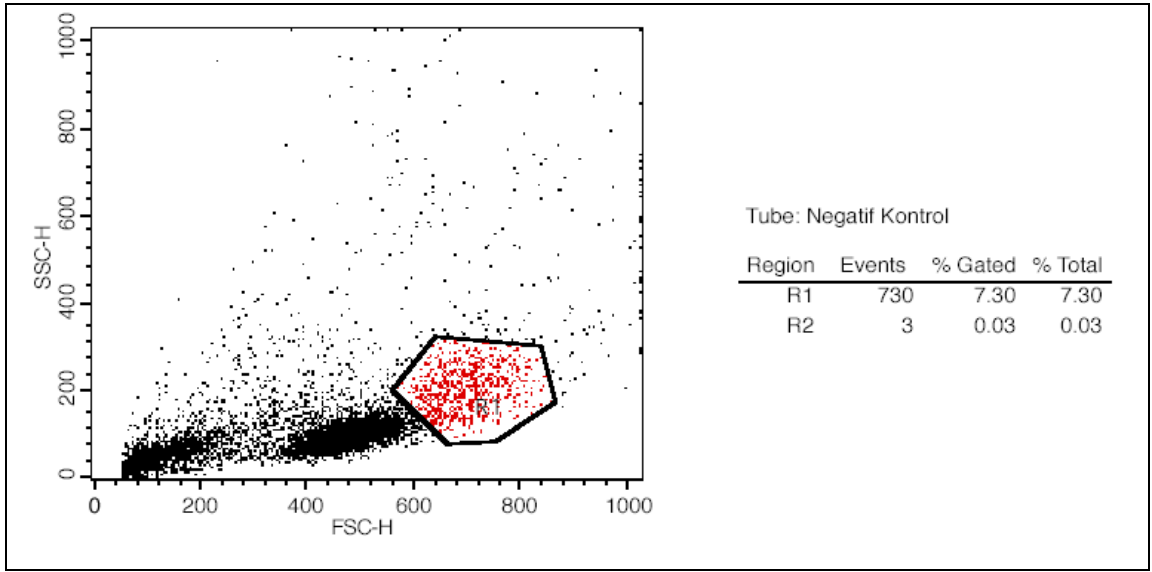
halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak; argon iyonu, kripton, helium-kadmium, helium-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları kullanılır. İşaretlemede kullanılan prob lar lazer kaynağıyla eksite olup, farklı bir dalga boyunda emisyon gösterirler ve bu sayede saptanabilirler. Genellikle lazer kaynağı olarak Argon iyonu kullanılır ve FITC, PE, propidium iodide (PI) gibi florokrom maddelerin 488 nm’de eksitasyonu sağlanır. Hücreye bağlı florokrom lazer ışığı ile belli bir dalga boyunda aktiflenir ve bu enerjiyle farklı bir dalga boyunda ışın yayar. İleri ve yana olan ışık saçılımına göre hücre boyutu, iç yapısı hakkında, prob bağlanma yoğunluğuna göre de antijenik özellikleri hakkında bilgi edinilir. Aktiflenme sonucu açığa çıkan floresan fotodiodlarla toplanır, Photo Multiply Tubes (PMT’s) ile elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara aktarılır⁵⁴.

Flow sitometri cihazında bulunan dedektör ve filtreler: FSC (Forward Scatter Channel; ileri saçılım kanal) dedektörü; hücrenin boyutu hakkında bilgi verir. SSC (Side Scatter Channel; yana saçılım kanal) dedektörü hücre granül içerikleri hakkında bilgi verir. Floresan Filtreler ve dedektörler; değişik dalga boylarındaki floresan ölçümler, florokromla işaretlenmiş hücre yüzey reseptörleri veya sitokin ve DNA gibi intraselüler moleküller hakkında bilgi verir⁵⁴ (Şekil 19).



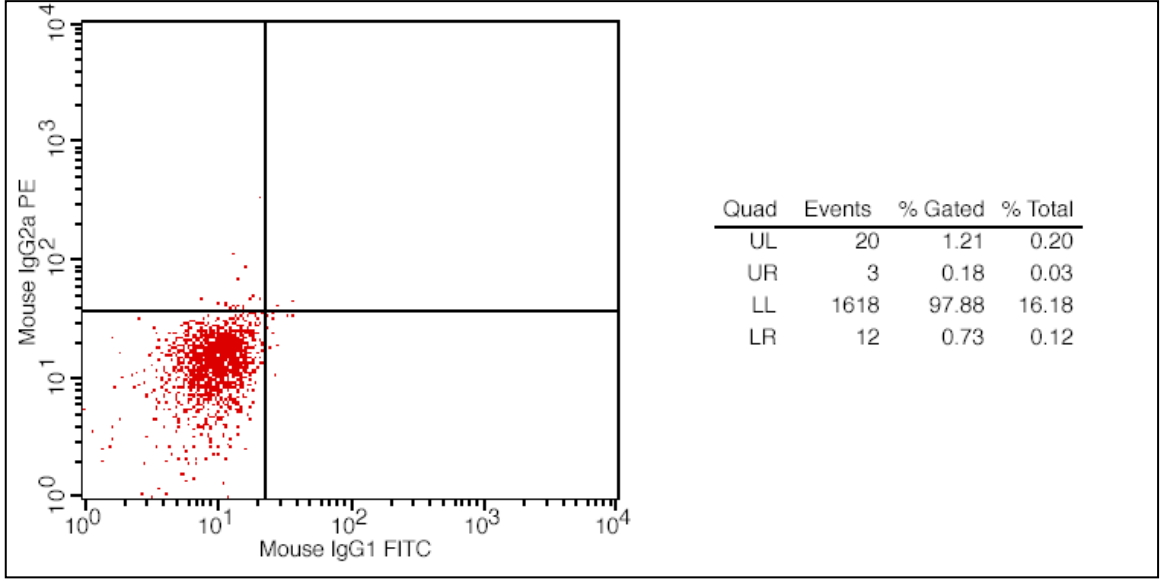
Şekil 19. Flow sitometrinin şematik gösterimi.

NF- κ B düzeylerinin de ğerlendirilmesinde öncelikle FSC/SSC histogramında hücrelerin büyüklük ve granül içeriklerine göre bilgisayar ortamına yansıtılıp monositler, diğ er periferik kan hücrelerinden karakteristik görünüm ve yerleşim yerleri esas alınarak ayrıldı ve monosit kapısı (gating) belirlendi. Alınan kapı içerisinde 10.000 hücre saydırıldı. FSC/SSC histogramında monosit popülasyonu kapılandırıldı ve çalışmalar bu popülasyonda yapıldı (Ş ekil 20). Monosit kapısında CD14 ve CD16 yüzdeleri de ğ erlendirildi, ayrıca CD14 kapısı alınarak (Ş ekil 23) CD14+CD16-NF- κ B+ %'si belirlenerek osteoklast öncü hücrelerinde NF- κ B düzeyleri de ğ erlendirildi.



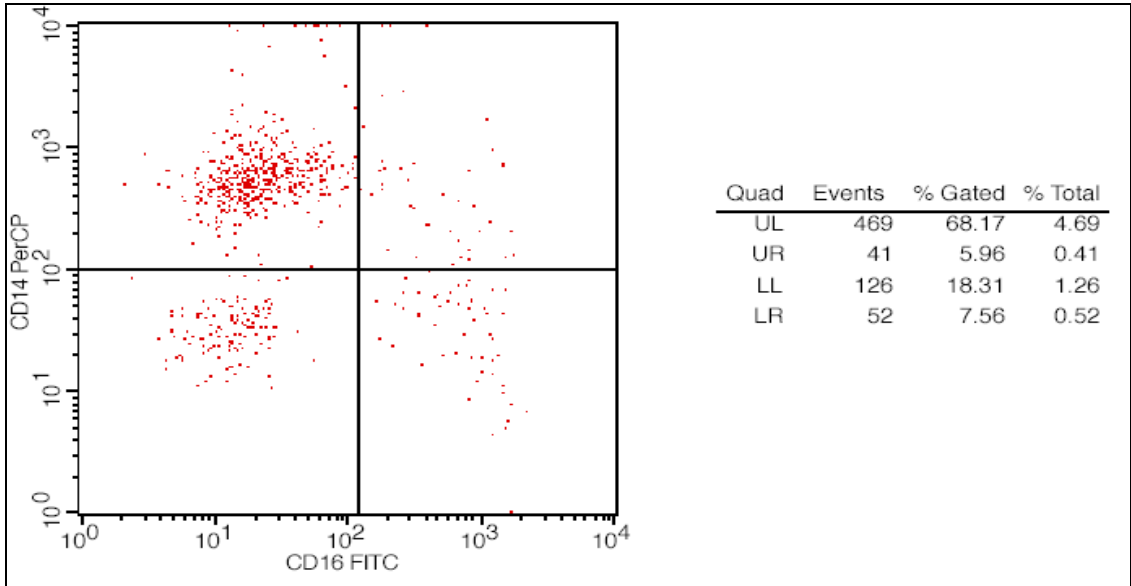
Ş ekil 20. İş aretli alan total PBMC içindeki monositlerin yüzdesini göstermektedir.

Hücrelerde otofloresan ya da özgün olmayan bağ lanmadan kaynaklanan zemin boyanmasının tespit edilip, nonspesifik boyanmayı elimine etmek için yüzey negatif kontrol kullanıldı (Ş ekil 21).



Şekil 21. Negatif kontrol dot plot görüntüsü.

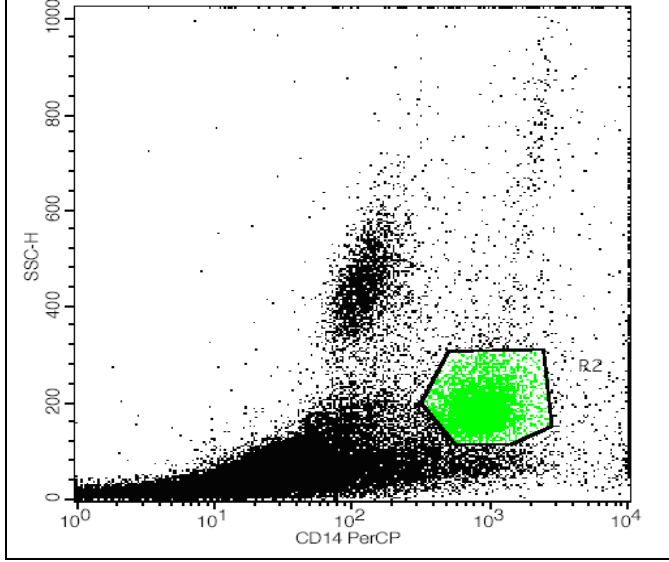
Monosit kapısı üzerinde CD16-FITC'e karşı CD14--PERCP-CY5,5 parametreleri kullanılarak oluşturulan floresans dot plot görüntüsünde CD14 ve CD16 ekspresyon oranları değerlendirildi (Şekil 22).



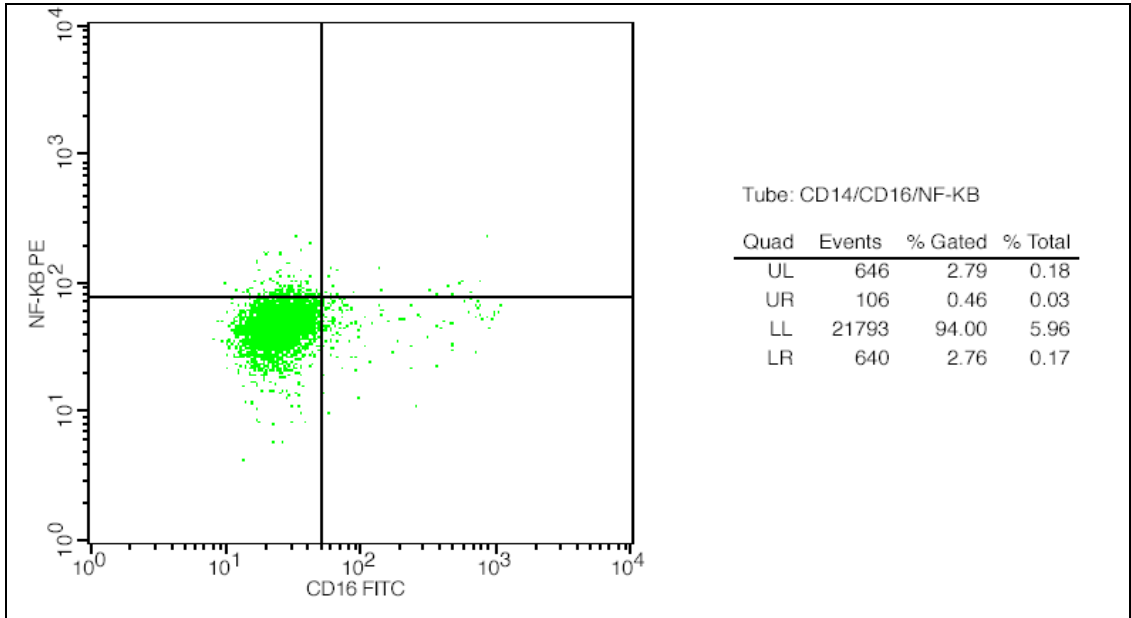
Şekil 22. Sağ üst (UR) ve sol üst (UL); total monositler içindeki CD14+ hücrelerin ve sol üst (UL); total monositler içindeki CD14+ CD16 - hücrelerinin yüzdesini göstermektedir.

CD14--PERCP-CY5,5'in ışımaya verdiği floresansa karşı SSC kullanılarak oluşturulan dot plotta CD14 ekspresyonu değerlendirildi (Şekil 23). CD14 kapısı

kullanılarak CD16- FITC'e karşı NF-κB-PE parametreleri kullanılarak oluşturulan fluoresans dot plot görüntüsünde CD16 ve NF-κB ekspresyonları değerlendirildi. CD14 kapısında 30.000 hücre saydırıldı. CD14 pozitif hücrelerde CD14+CD16-NF-κB + ekspresyonları yüzde değer olarak saptandı (Şekil.24).



Şekil 23. İşaretli alan PBMC içindeki CD14+ monositleri göstermektedir.



Şekil 24. Sol üst (UL); CD14+CD16-NF-κB+ hücrelerin yüzde esini göstermektedir.

Bütün bu değerlendirmelerin ardından kan sayım sonuçlarından yararlanılarak her bir parametre için aşağıdaki formül uygulanarak absolut

sayı/ μ L cinsinden sonuçların hesaplanması aşağıda verilen formülle gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Absolut sayı}/\mu\text{L} = \frac{\text{Lökosit sayısı} \times \% \text{monosit} \times \% \text{antikor pozitifliği}}{10.000}$$

Kemik Mineral Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil olan tüm gruplarda X-ray absorpsiyometre (DEXA) yöntemi ile Norland XR36 cihazında L2-L4 vertebra kemik mineral yoğunluğu (KMY) ölçümleri Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Radyoloji Anabilim Dalı tarafından yapıldı.

DEXA yüksek enerjili (genellikle 140 kVp) ve düşük enerjili (genellikle 100 kVp) X ışınının kemik ve yumuşak dokuda absorpsiyonunun farklı olması prensibi ile çalışmaktadır. X ışınının kemik ve yumuşak doku tarafından farklı soğurulması özellikleri ile kemik mineral içeriğini ve kemik mineral yoğunluğunu hesaplar¹¹². Çalışmamızda, KMY'nin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) sınıflandırmasında kriter olarak önerilen KMY T skorları kullanıldı¹¹³.

Z Skoru: Hasta ile aynı yaşta, cinsiyette ve etnik kökenden sağlıklı kişiler ile hastanın KMY değerleri arasındaki farklılığı gösterir. (-2,5) SD'den fazla olan kemik mineral kaybı osteoporozu gösterir¹¹⁴.

T Skoru: Hasta ile aynı cinsiyette ve etnik kökenden genç erişkinler ile hastanın KMY değerleri arasındaki farklılığı gösterir. (-2,5) SD'den fazla olan kemik mineral kaybı osteoporozu gösterir¹¹⁴.

İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal parametrelerin hasta ve kontrol gruplarında normal dağılıma uygunluk kontrolleri Shapiro Wilk testi ile test edilmiştir. Parametrelerin dağılımları normal dağılıma uygun olduğundan tanımlayıcı istatistikleri olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Kategorik veriler için tanımlayıcı istatistik olarak sayı ve yüzdeler hesaplanmıştır. Parametreler arasındaki ikili doğrusal ilişkilerin testinde korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Hasta ve kontrol grupları arasında parametrelerin ortalama değerleri arasında farklılık olup olmadığının kontrolüne Student t testi ile bakılmıştır. Gruplar arasındaki ortalama farklılığı görsel olarak göstermek için de grafik olarak Error Bar grafiği tercih edilmiştir. İstatistik anlamlılıkta $p < 0.05$ alınmıştır. Verilerin

değerlendirilmesinde SPSS 11.5 (Statistical Package for Social Sciences version) paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Bu çalışma, 2010-2011 yılları arasında Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Dahiliye Nefroloji Bilim Dalına başvuran orta derecede böbrek yetmezliği tanısı almış 41 erkek hasta ve Mersin Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon polikliniğine başvuran 27 sağlıklı erkek birey ile gerçekleştirildi. Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarını oluşturan olguların yaş ortalamasına göre dağılımı Tablo 5'te gösterilmektedir.

Tablo 5. Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı.

Grup	Sayı	Yaş Ortalaması	Standart Sapma
Hasta	41	54,43	7,89
Kontrol	27	50,40	5,56

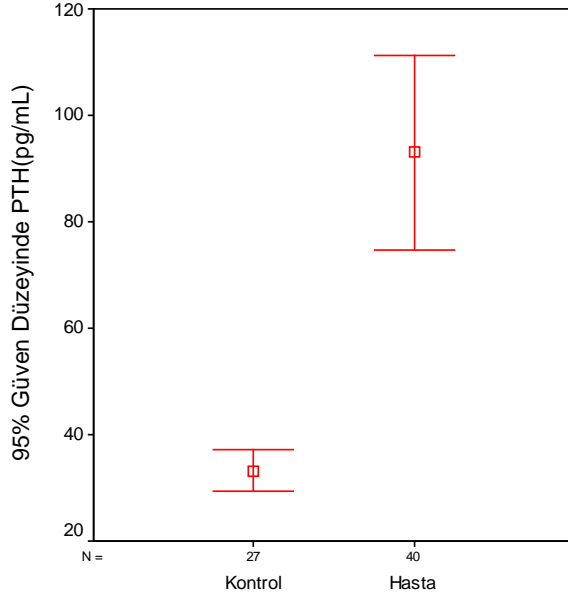
Hasta ve kontrol gruplarının sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Hasta ve kontrol gruplarının sonuçlarının karşılaştırması

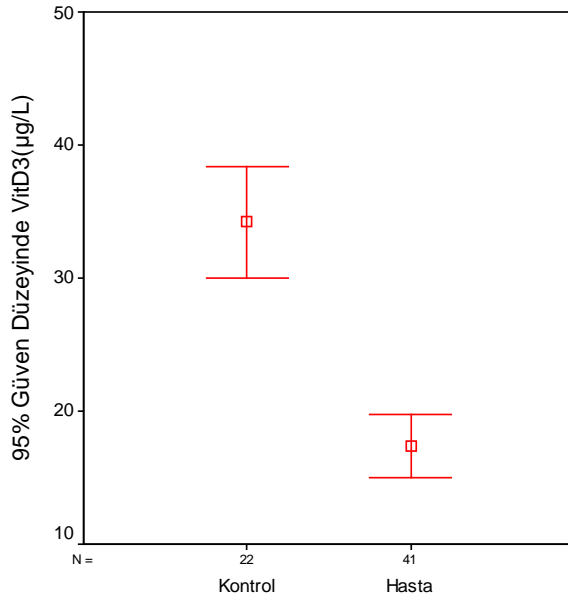
Parametreler	Hasta (n=41)	Kontrol (n=27)	p
iPTH (pg/mL)	92,98±57,14	33,18±9,95	<0.001
Kalsiyum (mg/dL)	9,43±0,41	9,60 ±0,33	0.076
Fosfor (mg/dL)	3,32±0,42	3,42±0,49	0.396
Kreatinin (mg/dL)	1,77±0,35	0,86±0,15	<0.001
GFR (ml/dk/1.73 m ²)	44,58±9,00	110,55±22,43	<0.001
Vit D ₃ (µg/L)	17,41±7,48	34,22±9,446	<0.001
sRANKL (pmol/L)	2,66±2,72	2,45±1,83	0.723
T Skoru	-0,88±0,71	-0,73±0,81	0.434

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

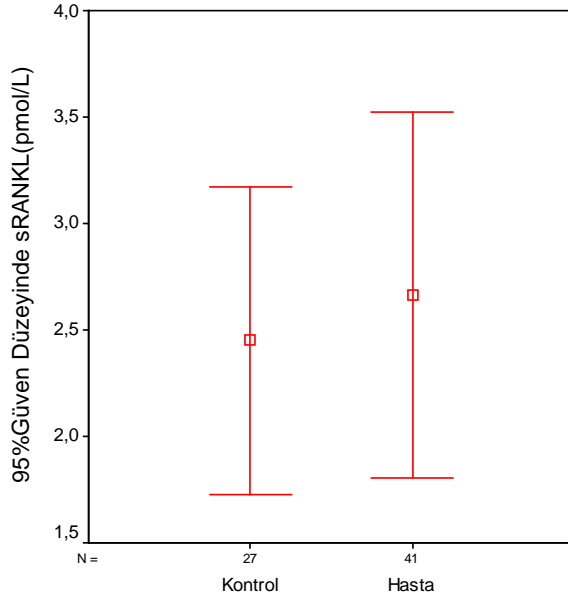
KBY hastalarında PTH ve Vit D₃ düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuşken, Ca⁺², P, sRANKL ve T skor parametreleri açısından yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı farklılığa rastlanmamıştır. Parametreler açısından grup ortalamaları için yapılan değerlendirmelerin sonuçları Şekil 25, 26 ve 27'de gösterilmiştir.



Şekil 25. Hasta ve kontrol grubunda PTH ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 26. Hasta ve kontrol grubunda Vit D₃ ortalamalarının error bar grafiği.



Şekil 27. Hasta ve kontrol grubunda sRANKL ortalamalarının error bar grafiği.

Hasta ve kontrol gruplarının flow sitometrik sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 7’de gösterilmiştir.

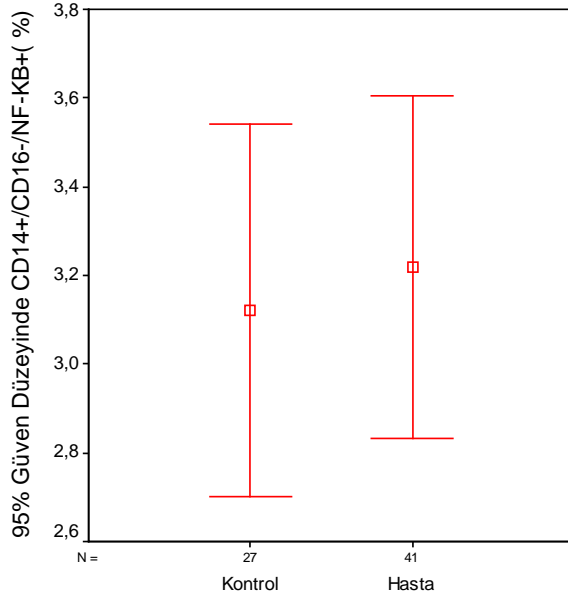
Tablo 7. Hasta ve kontrol gruplarının flow sitometrik analiz sonuçlarının karşılaştırması

Parametreler	Hasta (n=41)	Kontrol (n=27)	p
CD14+ %	74,59±8,66	72,53±10,66	0.383
CD14+ (absolut sayı/µL)	462,59±136,69	421,10±160,60	0.258
CD14+CD16- %	65,82±10,28	67,41±10,51	0.538
CD14+CD16- (absolut sayı/µL)	407,09±123,44	390,90±149,11	0.628
CD14+CD16-NF-KB + %	3,21±1,22	3,12±1,06	0.735
CD14+CD16-NF-KB + (absolut sayı/µL)	19,78±8,91	17,83±7,71	0.354

p: gruplar arası anlamlılık derecesi

Hasta ve kontrol gruplarının flow sitometrik analiz sonuçlarının yüzde değerler ve absolut sayı/µL düzeyleri temel alınarak karşılaştırılmasında araştırılan parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılığa

rastlanmamıştır. CD14+CD16-NF-KB + % açısından grup ortalamaları Şekil 28'de gösterilmiştir.



Şekil 28. Hasta ve kontrol grubunda NF-κB % ortalamalarının error bar grafiği.

Hasta grubunda GFR, iPTH, Vit D₃ ve sRANKL ile diğer parametrelerin karşılaştırılması sonucunda, iPTH ile GFR, Vit D₃ ve Ca²⁺ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda negatif, sRANKL ile CD14+CD16-NF-KB+ yüzde ve absolut sayı/μL değerleri arasında zayıf, pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. Hasta grubunda parametreler arasındaki korelasyon Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8: Hasta grubunda parametreler arasındaki korelasyon

Parametreler	GFR		iPTH (pg/mL)		Vit D ₃ (µg/L)		sRANKL (pmol/L)	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Ca ⁺² (mg/dL)	0,286	0,069	-0,428	0,006	0,169	0,290	0,015	0,927
P (mg/dL)	-0,259	0,103	0,213	0,187	0,179	0,262	-0,271	0,087
iPTH	-0,574	0,000	1		-0,398	0,011	-0,082	0,616
Vit D ₃	-0,002	0,991	-0,398	0,011	1		-0,086	0,591
sRANKL	0,108	0,501	-0,082	0,616	-0,086	0,591	1	
T skoru	0,324	0,050	-0,161	0,348	0,135	0,424	0,090	0,597
CD14+CD16- NF-KB + %	-0,071	0,661	0,075	0,644	0,032	0,842	0,324	0,039
CD14+CD16- NF-KB+ (absolut sayı/µL)	-0,053	0,743	0,228	0,157	-0,170	0,288	0,388	0,012

r: korelasyon katsayısı

p: testler arası anlamlılık derecesi

TARTIŞMA

KBY, mutlak nefron sayısı ve nefron fonksiyonlarında azalma ile sonuçlanan ve sıklıkla SDBY'ne götüren pek çok etiyolojik sebebi olan patofizyolojik bir süreçtir. KBY açısından metabolik kemik patolojileri hastalığının kaçınılmaz bir komplikasyonudur ve ROD olarak adlandırılır. ROD'lu hastalarda gelişen sHPT'e bağlı olarak kemik remodelling süreci yıkım yönünde bozulur ve kemik gücünde azalma ile birlikte kırık riskinde artış meydana gelir. Kemik dokuda meydana gelen bu patolojik değişiklikler hastaların yaşam kalitesini düşürmekte ve tedavi maliyetlerini artırmaktadır. Bu nedenle ROD'da tanının erken konması ve koruyucu tedbirlerin alınması; sağlık masraflarının ve artan mortalitenin azaltılması ve hastaların hayat kalitesinin artırılması açısından son derece önemlidir¹¹⁵.

Son yıllarda, kemiğin yapılanma süreçlerini inceleyen bilimsel araştırmaların artması, kemik patolojilerinin tanı ve tedavisinde yeni bakış açılarının oluşmasına neden olmuştur. Klinikte ROD tanısında kullanılan biyokimyasal parametreler ile radyolojik yöntemlerin, mevcut kemik hastalığını ortaya koymada yeterli olmadığı belirtilmektedir¹¹⁶. Bu nedenle kemik yıkımına ilişkin daha sağlıklı yorumlar yapılabilmesi bulunabilecek yeni parametrelerle mümkün olabilecektir. Bu açıdan erken evre KBY hastalarında patolojik kemik yıkımında rolü olduğu gösterilen RANKL ile osteoklastogenez sürecinde rolü bulunan periferik kan osteoklast öncü hücrelerinde intrasellüler NF-κB düzeylerinin belirlenmesi bu çalışmanın odak noktasını oluşturmaktadır.

Çalışmamızda evre 3 KBY hastalarında klinik önemi kanıtlanmış olan ROD parametreleri ve KMY değerleri ile sRANKL ve periferik kan osteoklast öncü hücrelerinde intrasellüler NF-κB düzeyleri birlikte değerlendirilerek sonuçlar sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı.

sHPT'nin başlangıcının böbrek yetmezliğinin erken dönemlerinden itibaren etkili olduğu ve yetmezlik derecesi ile ilişkili olarak artan oranda hastanın yaşamı boyunca devam ettiği kabul edilmektedir¹. Ayrıca erken evre böbrek yetmezliğinde serum PTH ölçümünün rutin taramanın bir parçası olması gerektiği savunulmaktadır¹¹⁷.

Prediyaliz hastalarında kemik biyopsisi ile ROD tiplerinin değerlendirildiği bir çalışmada, kemik histomorfometrik incelemeleri sonucunda ağırlıklı olarak sHPT'ye bağlı değişikliklerin gözlemlendiği belirtilmiş ve bu hastalarda PTH

yüksekliği ile kemikteki patolojik değişimler arasındaki korelasyonun diğer biyokimyasal parametrelere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir¹¹⁸.

Pitt ve ark. yaptıkları bir çalışmada iPTH değerlerinde GFR>40 olan KBY hastalarında 2 kat, GFR 20-40 olanlarda 4 kat ve GFR<20 olanlarda da 8 kat artış olduğunu tespit etmişlerdir¹¹⁹. Benzer şekilde İspanya'da oldukça yüksek sayıda KBY hasta popülasyonunda yapılan bir çalışmada evre 1'e göre evre 3 KBY hastalarında iPTH artışının 3 kat, evre 4 hastalarda da 4 kat olduğu gösterilmiştir¹²⁰.

Craver ve ark. evre 1-5 1836 prediyaliz hastasında yaptıkları bir çalışmada, PTH artışının erken evrelerden itibaren gerçekleştiğini ve böbrek yetmezliğinin derecesi arttıkça PTH yüksekliğinin belirgin hale geldiğini belirtmişlerdir. Evreler arası yaptıkları karşılaştırmalarda, evre 1'e göre evre 3 KBY hastalarında iPTH artışının 2 kat, evre 4 hastalarda da 4 kat olduğunu göstermişlerdir¹²¹.

Çalışmamızda literatürde yer alan çalışmalarda elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak hastaların ortalama iPTH değerlerinde sağlıklı kontrollere oranla istatistiksel olarak anlamlı artış olduğunu gözlemledik. Bu anlamda elde ettiğimiz sonuçlar PTH yüksekliğinin erken evrelerden itibaren ROD patogenezinde etkili olduğunu destekler niteliktedir.

Erken evrede serum PTH yüksekliğinin gelişiminde böbrek yetmezliği derecesi ile ilişkili olarak mineral metabolizmasında meydana gelen değişikliklerin rol oynadığı bilinmektedir. sHPT gelişiminden, böbrek hasarı ile birlikte fosfat ekskresyon bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan hiperfosfateminin sorumlu olduğu belirtilmektedir. Artan PTH düzeylerinin böbrek yetmezliğinin son evrelerine kadar kompensatuar etkisi ile serum Ca^{+2} ve P düzeylerinin normal sınırlarda tutulduğu düşünülmektedir¹.

Jiang ve ark. evre 1-5 60 KBY hastasında yaptıkları bir çalışmada evre 1-3 hastalarda Ca^{+2} düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulmazken, evre 4-5 hastalarda Ca^{+2} düzeylerinin evre 1'e göre anlamlı düşük bulmuşlardır. Aynı çalışmada evre 1-4 hastaların P düzeylerinde anlamlı fark olmadığı evre 5 hastaların P düzeylerinin evre 1'e göre anlamlı yüksek olduğu gösterilmiştir¹²².

Bir başka çalışmada GFR<30 mL/dak olan hastaların serum Ca^{+2} seviyelerinin GFR >30 mL/ dk olan hastalarinkinden düşük, P düzeylerinin ise farklı olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada hastalar PTH düzeylerine göre iki gruba ayrılmış ve yüksek PTH düzeylerinde Ca^{+2} düzeylerinin anlamlı olarak düşük olduğu belirlenirken, P değerleri yüksek bulunmuştur¹²³. Ramos ve ark. GFR<60 mL/dak olan ve 1 yıl boyunca takip edilen prediyaliz hastalarında Ca^{+2} düzeylerinde anlamlı olarak düşüş ve P düzeylerinde anlamlı artış tespit ederlerken, iPTH ve P değerleri arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmişlerdir¹²⁴.

Çalışmamızda Ca^{+2} ve P değerleri açısından literatüre benzer şekilde hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını, hasta grubunda iPTH ile Ca^{+2} değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon olduğunu gözlemledik. Bu anlamda sonuçlarımız erken evrelerdeki PTH yüksekliğinin mineral metabolizmasında erken dönemde kompensasyon açısından önemli olduğunu desteklemektedir. Ayrıca iPTH ile Ca^{+2} değerleri arasında saptanan negatif korelasyon PTH sekresyonundaki artışın Ca^{+2} düzeylerindeki azalmayla ilişkili olduğunu göstermektedir.

Yumita ve ark. evre 1-5 prediyaliz KBY hastalarında yaptıkları çalışmada Vit D₃ düzeylerinin evre arttıkça düştüğünü göstermişlerdir. Vit D₃ düzeylerinin evre 2'den itibaren belirgin olarak azaldığı, düşük Vit D₃ ile yüksek P düzeylerinin ilişkili olduğunu fakat Vit D₃ ile Ca^{+2} düzeyleri arasında ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada iPTH ve Vit D₃ düzeyleri arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir¹²⁵. Yapılan başka bir çalışmada serum kreatinin değerleri >1,5 mg/dl olan prediyaliz KBY hastalarında GFR'deki azalmayla Vit D₃ düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiş, KBY hastalarında Vit D₃ düzeylerindeki azalmanın sekonder hiperparatiroidizm gelişiminde etken olabileceği belirtilmiştir¹²⁶. Benzer şekilde Ramos ve ark. evre 3-5 KBY hastalarında yaptıkları çalışmada Vit D₃ düzeyleri ile P ve iPTH arasında negatif korelasyon olduğunu göstermişlerdir¹²⁴.

Çalışmamızda literatürdeki çalışmalarla uyumlu olarak Vit D₃ düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğunu saptadık. Ayrıca Vit D₃ ile iPTH düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda negatif korelasyon olduğunu gözlemledik. PTH düzeylerinde gözlenen erken artışın Vit D₃ eksikliğinin bir sonucu olarak

değerlendirilebileceği, Vit D₃ düzeylerindeki azalmanın erken evrelerden itibaren etkili olduğu düşünülmektedir¹. Bu anlamda elde ettiğimiz sonuçların bu hipotez ile uyumlu olduğu görülmektedir.

KBY hastalarında ROD'un değerlendirilmesinde KMY ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. ROD tanısında sadece KMY ölçümünün yeterli olmadığı, hastanın hikayesi, biyokimyasal belirteçler ve eğer yapılırsa kemik histolojisi ile birlikte tanı konulması gerektiği belirtilmektedir¹²⁷. Yapılan bir çalışmada, ROD'lu hemodiyaliz hastalarında kemik histomorfometrik sonuçları ile DEXA sonuçları karşılaştırılmış ve sensitivite düşük bulunmuştur¹²⁸.

Klinikte DEXA ile genellikle lomber vertebra (LS) ve femur boynu (FN) KMY ölçümleri yapılmaktadır. WHO tarafından hazırlanan osteoporoz rehberine göre FN veya LS T skorlarının <2,5 olması kırık için yüksek risk olarak değerlendirilmektedir¹¹³. Renal kemik hastalığının tanısı ve takibinde hangi bölgeden KMY ölçümünün yararlı olduğu halen tartışma konusudur. LS-KMY değerlerine göre ön kol ve FN-KMY değerlerinin daha güvenilir olduğu ve KBY'li hastalarda LS-KMY ölçümlerinde aortik kalsifikasyona bağlı olarak yanlış yüksek sonuçlar ortaya çıkabileceği belirtilmektedir¹²⁹.

Bianchi ve ark. evre 3-5 KBY hastalarının sağlıklı kontrollere göre KMY değerlerinin düşük olduğunu ve KMY'deki düşüşün GFR'deki azalmayla korele olduğunu belirtmişlerdir¹³⁰. Ayrıca bu çalışmada PTH ile KMY değerlerinin negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde 113 prediyaliz hastasında yapılan başka bir çalışmada, hastalarda LS, FN ve ön kol KMY sonuçlarının kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğu gösterilmiş, böbrek yetmezliği şiddetlendikçe KMY T skor değerlerinde anlamlı düşüş olduğu, PTH değerleri ile KMY Z skoru arasında güçlü ilişki olduğu belirtilmiştir¹³¹.

Ha ve ark. prediyaliz hastalarında bölgesel ve total KMY Z skor ölçümlerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca hasta grubunda KMY Z skorları ile GFR arasında pozitif, iPTH değerleri ile negatif korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre KBY hastalarında diyaliz tedavisi öncesi evrelerde de kemik patolojik değişikliklerinin meydana geldiğini, DEXA ile KMY ölçümlerinin bu değişiklikleri belirlemede yararlı bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir¹³².

Çalışmamızda, literatürde yer alan çalışmalardan farklı olarak, DEXA T skor sonuçlarına göre hasta ve kontrol grubu değerlerinde anlamlı fark

olmadığını gözlemledik. Hasta grubunda KMY ile diğer parametreler arasında da anlamlı ilişki saptamadık. KMY değerlerinde diğer çalışmalardan farklı sonuç elde etmemizin nedeni çalışma grubunun sadece evre 3, erkek hastalardan oluşuyor olması olabilir. Yapılan diğer çalışmalarda prediyaliz hastalarında çalışma grubuna evre 1-5 tüm hastalar dahil edilmiş ve genellikle evre 4 ve 5'te KMY değerlerinde belirgin azalma olduğu gösterilmiştir. KBY erişkin popülasyonda genellikle ileri yaşlarda görülmektedir ve yaşa bağlı olarak gelişen osteoporotik değişikliklerin kadınlarda daha sık gözlemlendiği bilinmektedir¹³³. Literatürdeki çalışmalarda çalışma grubuna kadın hastaların dahil edilmiş olması nedeniyle, senil osteoporoza bağlı kemikteki değişikliklerin çalışma sonuçlarını etkilemiş olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bu çalışmalarda, FN ve ön kol KMY sonuçlarında LS-KMY sonuçlarına göre daha anlamlı düşüş olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda sadece LS-KMY değerlerini ölçmemiz farklı sonuçlar elde etmemizde diğer bir etken olabilir.

RANK/RANKL/OPG sinyal sisteminin osteoklastogenezdeki önemli rollerinin gösterilmesinin ardından serum sRANKL düzeylerinin RA ve osteoporoz gibi patolojik kemik yıkımı ile karakterize hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kemik patolojik değişimlerinde RANKL'in rolünün gösterilmesi yeni bir terapötik hedefi açığa çıkarmıştır. RANKL inhibisyonunun kemik yıkımı ile karakterize hastalıklarda yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılabileceği belirtilmektedir⁶⁵.

ROD gelişiminde RANKL aktivitesi ve etkileri tam olarak anlaşılmış değildir. KBY hastalarında RANKL düzeyleri ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Ayrıca böbrek yetmezliğinde sRANKL ekskresyonunda meydana gelebilecek azalmalara bağlı olarak serum düzeylerinin yüksek ölçülebileceği belirtilmektedir. Bu nedenle serum sRANKL değerlerinin KBY'de kemik patolojik değişikliklerini sağlıklı olarak yansıtmayacağı düşünülmektedir¹⁴.

Avbersek-Luznik ve ark. HD hastalarında, sağlıklı kontrollere göre sRANKL düzeylerinin artmış olduğunu göstermişlerdir. PTH düzeylerine göre gruplandıkları hastalarda, yüksek PTH düzeyleri bulunan grupta düşük olan gruba göre sRANKL düzeylerinin de yüksek olduğunu bulmuşlardır. Elde ettikleri sonuçların in vitro çalışmalarda gösterildiği gibi PTH'ın sRANKL sentezini uyarıcı etkisini destekler nitelikte olduğunu belirtmişlerdir. Diürez

açısından aynı olan hastalarda PTH düzeylerine göre farklı sRANKL değerleri elde etmeleri nedeniyle serum sRANKL düzeylerindeki yükseklikte, molekülün ekskresyonundaki bozulmanın sorumlu olamayacağını ifade etmişlerdir¹³.

Doumouchtsis ve ark. iPTH düzeylerine göre iki gruba ayırdıkları 104 HD hastasında, bu çalışmadan farklı olarak, düşük iPTH ile sRANKL düzeyleri arasında pozitif, OPG düzeyleri ile negatif korelasyon bulurken, yüksek iPTH düzeyleri ile OPG arasında pozitif ve sRANKL arasında negatif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Yüksek iPTH düzeylerinin olduğu grupta iPTH ile OPG arasındaki pozitif korelasyonun kompensatuar mekanizmaların etkisinde gerçekleşmiş olabileceğini belirtmişlerdir¹³⁴. Yapılan başka bir çalışmada kronik hemodiyaliz hastaları ile sağlıklı kontrollerin serum OPG ve RANKL düzeyleri karşılaştırılmış, hasta grubunda serum OPG ve RANKL düzeylerinin belirgin olarak arttığı ve hasta grubunda RANKL ile LS-KMY değerleri arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre OPG ve RANKL'in ROD'un değerlendirilmesinde yararlı belirteçler olabileceği savunulmuştur¹².

Albalate ve ark. HD hastalarında yaptıkları bir çalışmada hasta grubu ve sağlıklı kontroller arasında serum sRANKL düzeylerinde fark olmadığını belirtmişler, hasta grubu OPG düzeylerinde ise belirgin artış tespit etmişlerdir¹⁵. HD hastalarında yapılan başka bir çalışmada serum sRANKL düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre hafif düşük olduğu, OPG düzeylerinin ise belirgin olarak arttığı gösterilmiştir¹³⁵.

Her iki çalışmada da OPG düzeylerinde gösterilen belirgin artışla ilişkili olarak bu hastalardaki serum sRANKL düzeylerindeki değişimlerde kemik resorpsiyon sürecinde kompensasyon mekanizmalarının etkili olduğu düşünülmüştür.

Fahrleitner-Pammer ve ark. evre 1-5 ve henüz diyaliz tedavisi almamış olan 132 KBY hastasında RANKL ve OPG düzeylerinin KMY üzerine etkilerini göstermeyi amaçladıkları çalışmalarında, RANKL, OPG ve RANKL/OPG değerleri açısından gruplar arasında fark olmadığını göstermiş, iPTH düzeyleri ile RANKL, OPG düzeyleri arasında ilişki bulunmadığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada KMY ve RANKL, OPG düzeyleri arasında FN Z skorları açısından anlamlı ilişki olduğu, serum sRANKL düzeyleri ile Z skorları arasında daha belirgin olmak üzere negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar,

prediyaliz hastalarında RANK/RANKL/OPG sisteminin kemik mineral yoğunluğu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir¹⁴.

Bizim çalışmamız HD hastalarında yapılan çalışmalardan, daha erken evrelerdeki hastaların değerlendirilmeye alınması ve prediyaliz hastalarında yapılan çalışmadan da sonuçların sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması yönünden farklılık göstermektedir. Bu anlamda, böbrek yetmezliğinin erken evrelerinde, hasta ve kontrol gruplarının sRANKL düzeylerinin karşılaştırıldığı ilk çalışmadır. Literatürdeki çalışmalarda, sRANKL düzeyleri ile kemik patolojik değişikliklerinde rol alan diğer parametreler arasında belirlenen ilişki, bu molekülün KBY hastalarında ROD gelişiminde rolü olabileceğini düşündürmektedir. SDBY hastalarında çelişkili sonuçlar elde edilmesinde, literatürdeki çalışmalarda belirtildiği gibi ilerlemiş böbrek yetmezliğinde sRANKL ekskresyon bozukluğunun veya kompensatuar mekanizmaların etkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sRANKL düzeylerinin böbrek fonksiyonlarının tam olarak bozulmadığı erken evrelerde belirlenmesinin, ROD gelişimindeki rolünün ve erken tanıda kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi açısından daha anlamlı olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu sRANKL düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığını gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlar erken evrede serum sRANKL düzeylerinin ROD patogenezinde önemli bir rolü olmadığını ve erken tanıda yeni bir parametre olarak kullanılamayacağını göstermektedir. Fakat hasta sayımızın az olmasının sonuçların değerlendirilmesi açısından yeterli olmadığını düşünmekteyiz. Bu nedenle, daha geniş hasta gruplarıyla yapılacak çalışmalar daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir.

Osteoklast öncü hücrelerinde RANKL/RANK etkileşimi ile hücre içi birçok sayıda sinyal yolağı aktivasyonun gerçekleştiği bilinmektedir. Bu metabolik yolaklardan NF-κB arağı sinyal yolağının osteoklastogenez açısından son derece önemli olduğu belirtilmektedir. Osteoklastların aşırı üretim ve aktivasyonu açısından NF-κB'nin kemik hastalıklarıyla ilişkili olduğu ve sinyal yolağıyla düzenlenen osteolitik hastalıkların tedavisinde etkileyici terapötik bir hedef haline gelebileceği düşünülmektedir¹³⁶.

Böbrek yetmezliklerine bağlı gelişebilen kemik döngüsüne ait değişikliklerde rol oynayan hücresel olayların daha ayrıntılı olarak anlaşılması, kemik yapımı ve yıkımında kullanılan bir takım biyokimyasal göstergelerin öne

çıkmasıyla mümkün olacaktır¹¹⁶. Bu anlamda KBY hastalarında meydana gelen patolojik kemik değişikliklerinde daha önce çalışılmış olan sRANKL düzeylerinin, hücresel düzeyde bir molekül olan NF-κB protein düzeyleri ile birlikte değerlendirilmesinin önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Sitokin aracılı sinyal iletimi ile oluşan NF-κB dimerlerinin nükleusdan sitoplazmaya tekrar taşınarak sinyal iletilerine katılmaları nedeniyle NF-κB mRNA düzeylerindeki değişikliklerin, protein düzeylerindeki değişiklikleri tam olarak yansıtmadığı düşünülmektedir. Transkripsiyon faktörlerinin osteoklast formasyon ve aktivitesini nasıl düzenlediğinin daha geçerli bir şekilde tanımlanması için bu proteinlerin nükleus ve sitoplazmik ekstraktlarda düzeyleriyle ilgili ayrıntılı ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir¹³⁷. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, ROD patogeneğinde NF-κB sinyal yollarını değerlendirmek üzere, intraselüler NF-κB protein düzeylerini flow sitometrik yöntemle belirlemeyi amaçladık.

Son yıllarda immünofenotiplemede kaydedilen önemli ilerlemeler sayesinde CD yüzey belirteçleri ile dolaşımdaki lökosit alt gruplarının belirlenmesi ve hastalıklar yönünden bu hücrelerin incelenmesi daha kolay hale gelmiştir⁵⁴. Komano ve ark. tarafından⁷, periferik kan osteoklast öncü hücrelerinin CD14+CD16- monositlerden geliştiği gösterilen çalışma, flow sitometrik yöntemle NF-κB protein düzeylerini belirlememizde yol gösterici olmuştur.

Literatürde periferik kan osteoklast öncü hücrelerinde NF-κB protein düzeylerinin belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca KBY hastalarında kemik metabolik değişikliklerinde NF-κB aktivasyonunun değerlendirildiği bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmamızda NF-κB protein düzeylerini CD14+CD16-NF-κB+ hücrelerin yüzdelerini ve absolut sayı/μL miktarlarını inceleyerek belirledik. Hasta ve kontrol grupları NF-κB protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını, hasta grubunda sRANKL ile NF-κB düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu gözlemledik. Bu sonuçlar erken evre ROD gelişiminde NF-κB sinyal yollarına aktivasyonunun belirlenmesinin, fizyopatolojinin değerlendirilmesi açısından etkili bir parametre olmadığını düşündürmektedir.

Hasta grubunda sRANKL ile NF-κB düzeyleri arasında bulunan pozitif korelasyona göre, osteoklast öncü hücrelerinde intraselüler NF-κB düzeyleri ile

serum sRANKL düzeylerinin ilişkili olduğu söylenebilir. Fakat, bu parametreler arasında belirlenen korelasyonun zayıf ve hasta sayımızın az olmasının sonuçların değerlendirilmesi açısından yeterli olmadığını düşünmekteyiz.

Benzer Şekilde daha geniş hasta grupları ve ileri evrelerde yapılacak değerlendirmeler farklı sonuçlar elde edilmesi, RANKL ve NF-κB yolağının değerlendirilmesi açısından faydalar sağlayabilir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Evre 3 KBY hastalarında iPTH düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunan artış, sHPT'nin erken evrelerden itibaren etkili olduğunu göstermektedir.
2. Hasta ve kontrol grubu arasında Ca^{+2} ve P düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu anlamda sonuçlarımız erken evrelerdeki PTH yüksekliği ile mineral metabolizmasında erken dönemde kompensasyonun sağlandığını göstermektedir.
3. Vit D₃ düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Bu nedenle PTH düzeylerinde gözlenen erken artış Vit D₃ eksikliğinin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.
4. Çalışmamızda, LS-KMY T skor sonuçlarına göre hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark olmadığını gözlemledik. Bu nedenle erken evre KBY hastalarında LS-KMY ölçümlerinin ROD'un değerlendirilmesinde yararlı bir parametre olmadığı söylenebilir. Total veya diğer bölgelerden KMY ölçümlerinin yapılması farklı sonuçların elde edilmesini sağlayabilir.
5. Çalışmaya alınan hasta sayısının yeterli olmaması ve hasta grubunda belirlenen GFR aralığının sınırlı olması, çalışmanın kısıtlı yönünü oluşturmaktadır.
6. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu sRANKL ve NF-κB düzeyleri arasında anlamlı fark olmadığını gözlemledik. Elde ettiğimiz sonuçlar erken evrede ROD gelişiminde serum sRANKL düzeyleri ile NF-κB sinyal yolağının aktivasyonunun belirlenmesinin fizyopatolojinin değerlendirilmesi açısından etkili parametreler olmadığını düşündürmektedir. Daha geniş hasta grupları ve ileri evrelerde yapılacak çalışmalar farklı sonuçlar elde edilmesi, RANKL ve NF-κB yolağının değerlendirilmesi açısından faydalar sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Bargman M, Skorecki K. Chronic Kidney Disease. In: Fauci S, Kasper L, Braunwald E, Hauser K, Longo B, Jameson F (eds). Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York: Mv Graw Hill, 2008:1761-71.
2. Süleymanlar G, Erek E, Serdengeçti K. The Registry Group, Turkish Society of Nephrology, Dialysis and Transplantation in Turkey, Nephrol Dial Transplant 2006; 17:101-107.
3. Türkiye'de Nefroloji - Diyaliz ve Transplantasyon, Türkiye 2009 Yılı Ulusal Hemodiyaliz, Transplantasyon ve Nefroloji Kayıt sistemi Raporu, <http://www.tnd.org.tr>. Erişim tarihi: 05.09.2011
4. Sprague SM. Renal bone disease. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2010;17:535-9.
5. Abu-Amer Y. Advances in osteoclast differentiation and function. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2005; 5:347-55.
6. Faust J, Lacey DL, Hunt P, et. al. Osteoclast markers accumulate on cells developing from human peripheral blood mononuclear precursors. Journal of Cellular Biochemistry 1999; 72:67-80.
7. Komano Y, Nanki T, Hayashida K, et al. Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. Arthritis Res Ther 2006; 8:R152.
8. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys 2008; 473:139–146.
9. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal Osteodystrophy. New England Journal of Medicine 1995; 333:166-174
10. Al Badr W, Martin KJ. Role of bone biopsy in renal osteodystrophy. Saudi J Kidney Dis Transpl 2009; 20:2-9
11. Klejna K, Naumnik B, Gasowska K, et al. OPG/RANK/RANKL signaling system and its significance in nephrology. Folia Histochem Cytobiol 2009; 47:199-206.

12. Shaarawy M, Fathy SA, Mehany NL, et al. Circulating levels of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand in patients with chronic renal failure. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:498-503.
13. Avbersek-Luznik I, Balon BP, Rus I, et al. Increased bone resorption in HD patients: is it caused by elevated RANKL synthesis? *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20:566-70
14. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Dimai HP, et. al. The effect of RANKL and OPG on bone mineral density in pre-dialysis chronic renal failure. *Clin Nephrol* 2009; 71:652-9.
15. Albalate M, Piedra C, Fernandez C, et al. Association between phosphate removal and markers of bone turnover in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:1626-32.
16. Çamsarı T, Sağlam F. Kronik Böbrek Yetmezliği. In: Erol Ç.(ed) İç Hastalıkları. 1.baskı Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 2008:2783-2795.
17. Selçuk Y. Kronik Renal Yetmezlik. In: Dolar E (ed). İç Hastalıkları. 1. baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2005:297-304
18. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(suppl 1):S1–S266.
19. United States Renal Data System. USRDS Annual data report. *Am J Kidney Dis* 2005; 47:1-286.
20. Luke RG, Sandes CE, Curtis JJ. Chronic Renal Failure In: Stein JH (ed). *Internal Medicine.* 5th ed. Missouri: Mosby, 1998:776-787
21. Lamb E, Newman DJ, Price CP. Kidney Function Tests. In: Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood. (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry.* 3rd. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 2005:797-835
22. Ersoy A. Böbrek Hastalıklarında Klinik Değerlendirme ve Yaklaşım. In: Dolar E (ed). İç Hastalıkları.1. baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2005:250-259
23. Kaplan MJ, First MR. Renal Function. In: Kaplan AL, Pesce JA (eds). *Clinical Chemistry: Theory Analysis, Correlation.* 5th.ed. New York: Mosby Elsevier, 2010:567-585.

24. Süleymanlar G. Böbrek Hastalıklarının Tanısında Kullanılan Laboratuvar Testleri. In: Erol Ç.(ed) İç Hastalıkları. 1.baskı Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:2713-2727.
25. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Ann Intern Med 1999; 130:461-470.
26. Hughes J, Jefferson A. Clinical Chemistry Made Easy.1st ed. Elsevier, 2008
27. Cameron JS, Greger R: Renal fuction and testin of function. Oxford Textbook of Clinical Nephrology. Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Kerr DNS, Ritz E, Winearls CG (eds). Oxford Medical Publications, Oxford, 1998:39-69.
28. Tietz, Norbert W. Clinical Guide To Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1995:188
29. Nolan CR, Mckinney TD, Forland M. Urinalysis and Renal Function Tests. In: Stein JH (ed). Internal Medicine. 5th ed. Missouri: Mosby, 1998:742-761
30. Slatopolsky E. Renal osteodystrophy. Wyngaarden JB, Simith LH, Bennett JC (eds). Cecil Textbook of Medicine W:B. Saunders Company. 1992:1423-1426.
31. Moe S, Drueke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int 2006; 69:1945–1953.
32. Ersöz B. Kalsiyum ve Fosfor metabolizmasını düzenleyen hormonlar In: Onat T, Emerk K, Sözman YE (eds). İnsan Biyokimyası.1. baskı Ankara: Palme Yayıncılık, 2002:37-42.
33. Fukagawa M, Kurokawa K. Renal osteodystrophy and secondary hyperparathyroidism. Clin Calcium 2002; 12:707-10.
34. Monier-Faugere MC, Malluche HH. Trends in renal osteodystrophy: A survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients. Nephrol Dial Transplant 1996; 11(Suppl 3):11-120.
35. Özmen B. Kemik Yapısı ve Metabolizması. In: Erol Ç.(ed) İç Hastalıkları. 1.baskı Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:3963-3973

36. Itani O, Tsang CR. Bone Disease. In: Kaplan AL, Pesce JA (eds). *Clinical Chemistry: Theory Analysis, Correlation*. 5th.ed. New York: Mosby Elsevier, 2010:614-650
37. Mundy GR, Reasner CA. Physiology of bone and mineral homeostasis. In: Stein JH (ed). *Internal Medicine*. 5th ed. Missouri: Mosby, 1998:1714-1720
38. Väänänen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473:132-8.
39. Özmen B. Hiperkalsemi sendromları. In: Erol Ç.(ed) *İç Hastalıkları*. 1.baskı Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:3975-3988 .
40. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009; 19:171-80.
41. Lorenzo JA, Sousa SL, Fonseca JM, et al. Colony-stimulating factors regulate the development of multinucleated osteoclasts from recently replicated cells in vitro. *J. Clin. Invest*. 1987; 80: 160–164.
42. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature* 1990; 345:442-44.
43. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981; 33:349-351.
44. Fuller K, Gallagher AC, Chambers TJ. Osteoclast resorption-stimulating activity is associated with the osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 181:67-73
45. Jimi E, Nakamura I, Amano H, et al. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinol* 1996; 137:2187–90.
46. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15:64-81.
47. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Therap* 2007; 9:1-7.

48. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
49. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin(OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis vitro. *Endocrinology* 1998; 139:1329-37.
50. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3597-3602.
51. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-176.
52. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997; 390:175-179
53. Wong BR, Rho J, Arron J, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997; 272:25190-194.
54. Gazioğlu S. Flowsitometrinin tarihçesi, çalışma metodolojisi. Yılmaz MT, Deniz G, Yıllar G. (ed). *Flowsitometri ve Tıpta Kullanımı*. 2. baskı. İstanbul: Bilmedya Grup, 2004:1-11.
55. Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br J Haematol* 1999;106:167–170
56. Nicholson GC, Malakellis M, Collier FM, et al. Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL). *Clin Sci (Lond)* 2000; 99:133–140
57. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; 19:71-82.
58. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068:100–109.

59. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:1077-81.
60. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, et al. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology* 2001;142:1419–26.
61. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008; 29:155-92.
62. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Comm* 2000; 275:768-775.
63. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, et al. Receptor activator of NF- κ B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol* 2006; 26:1002-1013.
64. Josien R, Li HL, Ingulli E, et al. TRANCE, a TNF family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000; 191:495–502.
65. Tanaka S, Nakamura K, Takahashi N, et al. Role of RANKL in physiological and pathological bone resorption and therapeutics targeting the RANKL-RANK signaling system. *Immunol Rev* 2005; 208:30-49.
66. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003; 111:1221–30.
67. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology *J Periodont Res* 2005; 40:287–93.
68. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, et al. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2009; 2:56-64.
69. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142:5050-55.
70. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL/RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006; 12:17-25.

71. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 253:395-400.
72. Hughes AE, Ralston SH, Marken J, et al. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000; 24:45-48.
73. Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *J Biol Chem* 1998; 273:5117–23.
74. Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. *Curr Pharm Des* 2001; 7:613-35.
75. Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, et al. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268:669–7.
76. Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, et al. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor- and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1924-34.
77. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, et al. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002; 347:175-84.
78. Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, et al. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2119-27.
79. Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:457-475.
80. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology* 2001; 142:4047-54.

81. Inoue J, Ishida T, Tsukamoto N, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) family: adapter proteins that mediate cytokine signaling. *Exp Cell Res* 2000; 254:14-24.
82. Wong BR, Josien R, Lee SY, et al. The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor. *J Biol Chem* 1998;273:28355-359.
83. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective Interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev* 1999; 13: 1015-24.
84. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986; 47:921-28.
85. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kB in the immune system. *Annu. Rev. Immunol* 1994; 12:141-79.
86. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kB. *Immunol. Today* 1998; 19:80-88.
87. Hofmann A, Baltimore D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* 2006; 210:171-86.
88. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kB. *Genes Dev* 2004; 18:2195-24.
89. Baldwin AS Jr. The NF-kappaB and I kappa B proteins: new discoveries and insight. *Annual Rev. Immunol* 1996; 14:649-83.
90. Richmond A. NF-kappa B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. Immunol* 2002; 2:664-74.
91. Li X, Stark GR. NFkappa B-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002; 30:285-96.
92. Rietschel ET, Brade H, Holst O. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. In: Rietschel ET, Wagner H(eds). *Pathology of Septic Shock*. Berlin, Springer-Verlag. 1996:40-81.
93. Kabanov DS, Prokhorenko IR. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. *Biochemistry (Mosc)* 2010; 75:383-404.
94. Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein and CD 14 in LPS-dependent macrophage activation. *Immunobiol* 1993; 187:227-32.

95. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109:81-96
96. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, et al. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell* 1997; 91:243-52.
97. Tergaonkar V. NF κ B pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:1647-53.
98. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004; 25:280–288.
99. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, et al. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science* 2001; 293:1495–99.
100. Sun SC, Ley SC. New insights into NF- κ B regulation and function. *Trends Immunol* 2008; 29:469-78
101. Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, et al. Activation of IKK α target genes depends on recognition of specific κ B binding sites by RelB:p52 dimers. *Embo J* 200; 23:4202-10.
102. Perkins ND. Regulation of NF- κ B by atypical activators and tumour suppressors. *Biochem Soc Trans* 2004; 32: 936–39.
103. Franzoso GL, Carlson L, Xing L, et al. Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev* 1997; 11:3482–96.
104. Xing L, Bushnell TP, Carlson L, et al. NF- κ B p50 and p52 expression is not required for RANK expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANK- and cytokine-mediated osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res* 2002; 17:1200–10.
105. Asagiri M, Sato K, Usami T, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J. Exp. Med* 2005; 202:1261-69.
106. Yamashita T, Yao Z, Li F, et al. NF- κ B p50 and p52 regulate receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. *J. Biol. Chem* 2007; 282:18245-253.
107. Darnay BG, Besse A, Poblenz AT, et al. TRAFs in RANK signaling. *Adv. Exp. Med. Biol* 2007; 597:152–59.

108. Otero JE, Dai S, Foglia D, et al. Defective osteoclastogenesis by IKKbeta-null precursors is a result of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL)-induced JNK-dependent apoptosis and impaired differentiation. *J. Biol. Chem* 2008; 283:24546–553.
109. Jimi E, Aoki K, Saito H, et al. Selective inhibition of NF-kappaB blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nat. Med* 2004;10:617–24.
110. Ruocco MG, Maeda S, Park JM, et al. IkbKinase (IKK)beta, but not IKKalpha, is a critical mediator of osteoclast survival and is required for inflammation-induced bone loss. *J. Exp. Med* 2005; 201:1677–87.
111. EPI CKD Calculator. <http://www.MDRD.com/> Erişim Tarihi:18.09.2011
112. Mazess R, Chesnut CH, McClung M. Enhanced precision with dual energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 1992; 51:14–17.
113. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *Tech Rep Ser* 1994; 843:1–129.
114. Miller PD. Fragility fractures in chronic kidney disease: an opinion-based approach. *Cleve Clin J Med* 2009; 76:715-23.
115. Schoolwerth AC, Engelgau MM, Hostetter TH, et al. Chronic kidney disease: a public health problem that needs a public health action plan. *Prev Chronic Dis* 2006; 3:A57.
116. Ferreira MA. Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when bone biopsy is needed. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 (Suppl 5):8-14.
117. Hamdy NA. The need to treat predialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10 (Suppl 4):19-22.
118. Shin SK, Kim DH, Kim HS, et al. Renal osteodystrophy in pre-dialysis patients: ethnic difference? *Perit Dial Int* 1999; 19 (Suppl 2):402-7.
119. Pitt TO, Piraino BH, Mitro R, et al. Hyperparathyroidism and 1,25 dihydroksyvitamin D deficiency In mild. Moderate and severe renal failure. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 67:876-81.
120. Martínez-Castelao A, Górriz JL, Portolés JM, et al. Baseline characteristics of patients with chronic kidney disease stage 3 and stage

- 4 in Spain: the MERENA observational cohort study. *BMC Nephrol* 2011; 5:12:53.
121. Craver L, Marco MP, Martínez I, et al. Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5--achievement of K/DOQI target ranges. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:1171-76.
 122. Jiang JQ, Lin S, Xu PC, et al. Serum osteoprotegerin measurement for early diagnosis of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Nephrology (Carlton)* 2011; 16:588-94.
 123. Gomes CP, Silva MIB, Duarte MEL, Dorigo D (eds). Bone disease in patients with chronic kidney disease under conservative management. *Sao Paulo Med J* 2005; 123:83-87.
 124. Ramos AM, Albalade M, Vázquez S, Caramelo C, Egido J, Ortiz A. Hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in incident chronic kidney disease patients *Kidney Int Suppl* 2008; 111:88-93.
 125. Yumita S, Suzuki M, Akiba T, et al. Levels of serum 1,25 (OH)₂ D in patients with pre-dialysis chronic renal failure. *Exp Med* 1996; 180:45-46.
 126. Kurajoh M, Inaba M, Yamada S, et al. Association of increased active PTH(1-84) fraction with decreased GFR and serum Ca in predialysis CR patients: modulation by serum 25-OH-D. *Osteoporos Int* 2008; 19:709-716.
 127. Ott SM. Review article: Bone density in patients with chronic kidney disease stages 4-5. *Nephrology* 2009; 14:395-403.
 128. DeVita MV, Rasenas LL, Bansal M, Gleim et al. Assessment of renal osteodystrophy in hemodialysis patients. *Medicine* 1992; 71:284-290.
 129. Iimori S, Mori Y, Akita W, et al. Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in predicting fracture in CKD stage 5D patients--a single-center cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 0:1-7.
 130. Bianchi ML, Colantonio G, Montesano A, et al. Bone mass status in different degrees of chronic renal failure. *Bone (NY)* 1992; 13:225-28.
 131. Rix M, Andreassen H, Eskildsen P, et al. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 56:1084-93.

132. Ha SK, Park CH, Seo JK, Park SH, Kang SW, Choi KH, Lee HY, Han DS. Studies on bone markers and bone mineral density in patients with chronic renal failure. *Yonsei Med J* 1996; 37:350-6.
133. Bartl R, Frisch B. Osteoporosis. 1st ed. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2004.
134. Doumouchtsis K, Perrea D, Doumouchtsis S, et al. Regulatory effect of parathyroid hormone on sRANKL-osteoprotegerin in hemodialysis patients with renal bone disease. *Ther Apher Dial* 2009; 13:49-55.
135. Doumouchtsis KK, Kostakis AI, Doumouchtsis SK, et al. sRANKL/osteoprotegerin complex and biochemical markers in a cohort of male and female hemodialysis patients. *J Endocrinol Invest* 2007; 30:762-66.
136. Xu J, Wu HF, Ang ES, et al. NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20:7-17.
137. Boyce BF, Yao Z, Xing L. Functions of nuclear factor kappaB in bone. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192:367-75.

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

1,25(OH)₂D₃	:1,25-dihidroksikolekalsiferol
ABY	:Akut Böbrek Yetmezliği
BD	:Becton, Dickinson and Company Diagnostics
BUN	:Kan Üre Azotu
Ca⁺²	:Kalsiyum
CD	:Cluster of Differentiation (Farklılaşma Kümesi)
cDNA	:Komplementer DNA
CFU	:Koloni Oluşturan Birim
CFU-GM	:Granulosit-Makrofaj Koloni Oluşturan Birim
CFU-M	:Makrofaj – Koloni Oluşturan Birim
DEXA	:Dual Enerjili X-Ray Absorbsiyometre
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
EDTA	:Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	:Enzim Bağlı İmmünoassay
FITC	:Fluorescein İsothiocyanate
FN	:Femur Boynu
FSC	:Forward Scatter Channel (İleri Saçılım Kanal)
GFR	:Glomerüler Filtrasyon Hızı
GİS	:Gastrointestinal Sistem
HD	:Hemodiyaliz
HPLC	:Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HTLV-1	:Human T-Cell Leukemia Virus 1
IGF	:İnsülin Like Growth Faktör
IKK	:İnhibitör Kappa B Kinaz
IL	:İnterlökin
IL-1R	:İnterlökin-1 Reseptör
İkB	:İnhibitör Kappa B
KBY	:Kronik Böbrek Yetmezliği
KMY	:Kemik Mineral Yoğunluğu

LPS	:Lipopolisakkarit
LR	:Lower Right (Sağ Alt)
LS	:Lomber Spine
M-CSF	:Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
MDRD	:The Modification of Diet in Renal Disease
NEMO	:NF-κB Essential Modifier
NFATc1	:Kalsinörin/Uyarılmış T Hücrelerinin Nükleer Faktörü
NF-κB	:Nükleer Faktör Kappa B
NIK	:NF-κB İndükleyen Kinaz
NKF/DOQI	:National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
NLS	:Nükleer Lokalizasyon Sinyal
OPG	:Osteoprotegerin
P	:Fosfor
PBMC	:Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PD	:Periton Diyalizi
PE	:Phycoerythrin
PMNL	:Polimorfonükleer Lökosit
PTH	:Paratiroid Hormon
RA	:Romatoid Artrit
RANK	:Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü
RANKL	:Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı
RHD	:Rel-Homoloji Domain
ROD	:Renal Osteodistrofi
RRT	:Renal Replasman Tedavisi
SDBY	:Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SPSS	:Statistical Package For Social Sciences Version
sRANKL	:Çözünür (Soluble) RANKL
SSC	:Side Scatter Channel (Yana Saçılım Kanalı)
TACE	:Metalloproteinaz-Disintegrin TNF N Dönüştürücü
TGF-β	:Transforming Growth Factor-B
TND	:Türk Nefroloji Derneği
TNF	:Tümör Nekroz Faktör

TNFR	:Tümör Nekroz Faktör Reseptör
TRAF	:TNFR İlişkili Faktör
TRAIL	:TNF-İlişkili Apoptozis İndükleyici Ligand
TRANCE	:TNF ile İlişkili Aktivasyonu İndüklenmiş Sitokin
UL	:Upper Left (Sol Üst)
UR	:Upper Right (Sağ Üst)
WHO	:World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
USRDS	:United States Renal Data System
Vit D₃	:Vitamin D ₃

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

Şekiller		Sayfa No
Şekil 1	(Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına göre HD ve PD hasta sayılarının yıllara göre dağılımı)	11
Şekil 2	(KBY'de sekonder hiperparatiroidizm oluşum mekanizması)	19
Şekil 3	(Osteoklastların fonksiyonel yapısı)	22
Şekil 4	(Pluripotent kök hücreden monosit, granulosit ve osteoklast farklılaşması)	25
Şekil 5	(İnsan RANKL geni izoformları)	28
Şekil 6	(Osteoklastogenezde RANKL rolü)	29
Şekil 7	(RANK'ın şematik gösterimi)	31
Şekil 8	(OPG'nin şematik gösterimi)	33
Şekil 9	(OPG'nin osteoklastogenezdeki rolü)	34
Şekil 10	(RANKL/RANK/OPG metabolizması)	35
Şekil 11	(OPG, RANKL ve RANK'ın osteoklastogenezdeki rolleri ve hücre içi sinyal iletimi)	38
Şekil 12	(Memelilere özgü NF-κB protein ailesinin üyeleri)	39
Şekil 13	(NF-κB dimerizasyonu)	40
Şekil 14	IκB protein ailesi	40
Şekil 15	NF-κB aktivasyonuna neden olan sinyal uyarıcıları	42
Şekil 16	(IκB Kinaz kompleksi)	42
Şekil 17	(NF-κB klasik ve alternatif aktivasyon yolağı)	44
Şekil 18	(Osteoklastogenezde IL-1, TNF-α ve RANKL ile NF-κB aktivasyonu)	46
Şekil 19	(Flow sitometrinin şematik gösterimi)	56
Şekil 20	(PMBC içindeki monositlerin %'si)	57
Şekil 21	(Negatif kontrol dot plot görüntüsü)	58

Şekil 22	(Total monositler içindeki CD14+ ve CD14+ CD16 - hücrelerinin %'si)	58
Şekil 23	PBMC içindeki CD14+ monositler	59
Şekil 24	(CD14+CD16-NF-κB+ hücrelerin %'si)	59
Şekil 25	(Hasta ve kontrol grubunda PTH ortalamaları)	63
Şekil 26	(Hasta ve kontrol grubunda Vit D3 ortalamaları)	63
Şekil 27	(Hasta ve kontrol grubunda sRANKL ortalamaları)	64
Şekil 28	(Hasta ve kontrol grubunda NF-κB % ortalamaları)	65

TABLolar DİZİNİ

Tablolar		Sayfa No
Tablo 1	(Son dönem böbrek yetmezliği nedenleri)	12
Tablo 2	(KBY evreleri)	16
Tablo 3	(KBY'nin sistemik etkileri)	17
Tablo 4	(RANKL, OPG ve RANK ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan faktörler)	37
Tablo 5	(Grupların yaş ortalamasına göre dağılımı)	62
Tablo 6	(Hasta ve kontrol gruplarının sonuçlarının karşılaştırması)	62
Tablo 7	(Hasta ve kontrol gruplarının flow sitometrik analiz sonuçlarının karşılaştırması)	64
Tablo 8	(Hasta grubunda parametreler arası korelasyon)	66