



T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
FİZİK TEDAVİ VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI  
PROF. DR. BERRİN DURMAZ

**ERKEN POSTMENOPAZAL DÖNEMDEKİ  
KADINLARDA RANK GENİ C421T VE C575T  
POLİMORFİZMLERİ VE KEMİK MİNERAL  
YOĞUNLUĞU (KMY) İLE İLİŞKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Banu İŞLETEN

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Berrin Durmaz

Etik Kurul Onay Tarihi & No: 26/11/2008 & 08-11/5

İZMİR-2010

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen değerli hocalarım, başta merhum anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ramazan Akşit olmak üzere anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Berrin Durmaz, değerli hocalarım Prof. Dr. Günay Celeboğlu, Prof. Dr. Simin Hepgüler, Prof. Dr. Yeşim Kirazlı, Prof. Dr. Yeşim Akkoç, Prof.Dr. Arzu On, Doç. Dr.Kazım Çapacı, Doç. Dr. Cihat Öztürk, Doç. Dr. Sibel Eyigör, Doç. Dr. Funda Atamaz' a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında bilgi, tecrübe, destek ve katkılarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Berrin Durmaz' a şükranlarımı sunarım.

Tezimin genetik çalışmalarının yürütülmesindeki katkılarından dolayı Tıbbi Genetik Anabilim Dalı değerli hocaları Prof. Dr. Ferda Özkınay, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Onay' a teşekkür ederim. Yine tezimin genetik araştırmalarında her türlü destek ve katkıları için Uzm. Dr. Burak Durmaz ve Uzm. Dr. Asude Durmaz' a çok teşekkür ederim.

Güleryüzü ve değerli bilgileri ile tezime katkılarından ötürü Diyetisyen Dilay Çopuroğlu'na çok teşekkür ederim.

Sevgili asistan arkadaşlarıma, değerli hemşiremiz Fatma Öztürk'e ve tüm anabilim dalı çalışanlarımıza katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince her konudaki destek ve katkılarından ötürü Uzm. Dr. Hale Karapolat' a ve Uzm. Dr. Selcen Özdedeli' ye teşekkür ederim.

Tüm eğitim sürem boyunca her zaman olduğu gibi koşulsuz sevgi ve destekleri ile yanımda olan annem, babam, canım ablam Müge Hoşoğlu ve sevgili eniştem Selçuk Hoşoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

**Dr. Banu İşleten**

**İZMİR-2010**

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı 45-65 yaş arası erken postmenopozal dönemdeki kadınlarda osteoklastogenezde önemli rolü olduğu bilinen RANK geninin, ekzon 4'deki C421T ve ekzon 6'daki C575T tek nükleotid polimorfizmleri ve bunların femoral ve lomber bölge KMY değerleri ile olan ilişkisini araştırmaktır.

Bu amaçla Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre T skorları normal olan 78 kişi ve osteopenik/osteoporotik olarak ayrılan 100 kişi incelendi. Dışlama kriterleri son 4 ayda HRT almış olmak, daha önce osteoporoz açısından herhangi bir tedavi almak, kemik metabolizmasını etkileyecek metabolik, endokrinolojik, nörolojik, romatolojik, malignite vb. gibi ikincil hastalığı olmak, malabsorbsiyon öyküsü, 40 yaşından önce menopoza girmek, >3 ay immobilizasyon öyküsü, karaciğer/böbrek hastalığı, antikoagülan kullanım öyküsü, cerrahi menopoz, kronik alkolizm, glukokortikoid kullanım öyküsü olarak belirlendi. Çalışmaya katılanların yaş, boy, kilo, beden-kitle indeksi, menarş yaşı, menopoz yaşı ve süresi, emzirme süresi, günlük kalsiyum alımı, fiziksel aktivite skoru, alkol ve sigara kullanımını bilgileri kaydedildi. Hologic QDR Delphi ile çekilmiş olan femur total, femur boyun ve lomber total KMY değerleri ile T skorları kaydedildi. RANK C421T polimorfizmi tayini için sekans analizi, C575T polimorfizmi için Ssil enzimi kullanılarak enzim kesimi işlemi uygulandı.

Kontrol ve hasta grubu arasında C421T ve C575T polimorfizmi için genotip dağılımı ve C ve T allel sıklıkları ile birleşik genotip ve birleşik haplotip analizlerinde kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

C421T polimorfizmi ve C575T polimorfizmi için ayrı ayrı genotiplere göre hasta ve kontrol grubunun düzeltilmiş KMY değerleri hesaplandığında, her iki polimorfizm için de, kontrol ve hasta grubunda femoral ya da lomber bölgede KMY değerlerinde anlamlı fark yaratacak genotipe rastlanmadı..

Kontrol ve hasta grubunda ayrı ayrı olarak bakılan CC/CC birleşik genotipi grubu ile diğer birleşik genotiplerin birlikte değerlendirildiği grup arasında femur boyun, femur total ve L1-L4 KMY değerlerinde anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Erken postmenopozal dönemdeki Türk kadınlarında RANK geni C421T ve C575T polimorfizmleri femoral ve lomber bölge KMY değerleri ile anlamlı bir ilişkili saptanmadı.

## SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effects of two genetic polymorphisms, C421T and C575T, of RANK gene, which regulate osteoclastogenesis, on bone mineral density (BMD) at the femoral and lumbar region in early postmenopausal women aged between 45-65 years old.

In this cross sectional study consisting of 78 normal and 100 osteopenic/osteoporotic women according to their T scores defined by WHO criteria were included. Exclusion criteria were menopause before 40 years of age, surgical menopause, past or current history of any neurologic, endocrinologic, metabolic, rheumatologic, malignant diseases or malabsorption, hormone replacement treatment within the previous 4 months, any prior osteoporosis treatment, kidney/liver diseases, glucocorticoid or oral anticoagulant medication history, chronic alcoholism or immobilisation history for >3 months. Following information were recorded to a standardized questionnaire; age, weight, height, body-mass index, densitometric BMD and T score values at the lumbar spine(L1-L4), femoral neck and lumbar total regions measured with Hologic QDR Delphi, fracture history, family history for fracture, cigarette and alcohol consumption, daily calcium intake from 3 days dietary self-records, physical activity, reproductive history (menarche and menopause age, number of pregnancies and their durations, total month of lactations). Enzymatic digestion with SsiI enzyme were used for determination of RANK C575T polymorphism and sequencing method for determination of C421T polymorphism.

There were no significant difference between the two groups for genotype distributions, allelic frequencies, combined genotypes and haplotype frequencies. There were no significant associations between the adjusted BMD and genotypes at the lumbar spine and at the femoral regions for each polymorphism both in the normal and the patient groups.

By assessing both of the control and patient groups separately, no significant difference was found between CC/CC combined genotype and other combined genotypes for adjusted BMD values either at the femoral or at the lumbar regions.

Conclusion: The RANK gene C421T and C575T polymorphisms were not found to affect BMD at the femoral and lumbar region in postmenopausal Turkish women.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET .....	iii
SUMMARY .....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vii
RESİMLER VE ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1 Kemikğin Yeniden Yapılanma Süreci (Remodeling) .....	4
2.2 Osteoporoz Patogenezi.....	7
2.2.1 Östrojenin rolü .....	8
2.2.2 Kalsiyum, D vitamini, Paratiroid hormon (PTH) .....	11
2.2.3 Osteoblast farklılaşması ve işlevlerini belirleyen genler.....	<a href="#">13</a>
2.2.4 Lokal ve sistemik büyüme faktörleri .....	15
2.2.5 Sitokinler, PG, nitrik oksit (NO), lökotrienler .....	16
2.2.6 Kollajen anormallikleri .....	17
2.2.7 Yağ dokusu, nöral Yollar ve osteoporoz.....	18
2.3 RANK/RANKL/Osteoprotegerin (OPG) sistemi ve osteoporoz .....	19
2.4 Osteoporoz Tanısı İçin KMY Ölçümü.....	23
2.5 Genetik ve Hastalıkların İlişkilendirilmesi .....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1 Çalışma Evreni.....	32
3.2 Çalışmaya Alınma Kriterleri.....	32
3.3 Dışlama Kriterleri .....	33
3.4 Araştırmanın Etik Yönü.....	33
3.5 Ölçümler .....	34
3.6 Genetik Analiz .....	35
3.6.1 DNA izolasyonu.....	35
3.6.2 RANK geni C421T polimorfizmi saptanması .....	35
3.6.3 RANK geni C575T polimorfizmi saptanması .....	36
3.7 İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1 Olgulara Ait Özellikler .....	39
4.2 Kontrol ve Hasta Gruplarının KMY Ölçümleri ve T Skorları.....	40
4.3 Kontrol ve Hasta Gruplarında Kırık Öyküsü Değerlendirmesi .....	41
4.4 Kontrol ve Hasta Grupları Arasında Genotip Dağılımlarının ve Allel Sıklıklarının Karşılaştırılması .....	41

4.5 Kontrol ve Hasta Grupları Arasında Birleşik Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması .....	44
4.6 Kontrol ve Hasta Gruplarında Birleşik Haplotip Analizi .....	45
4.7 Kontrol ve Hasta Gruplarının Genotiplere Göre Düzeltilmiş KMY Değerleri....	46
4.8 Kontrol ve Hasta Gruplarının Birleşik Genotiplere Göre Düzeltilmiş KMY Değerleri .....	49
5. TARTIŞMA .....	52
5.1 Kontrol Ve Hasta Grupları Arasında Genotip Dağılımı, Allel Sıklığı, Birleşik Genotip Dağılımı Ve Birleşik Haplotip Analizlerinin Karşılaştırılması.....	57
5.2 Kontrol ve Hasta Gruplarının Kendi İçlerinde Farklı Genotipler ve Farklı Birleşik Genotiplerde Femoral ve Lomber Bölgelerde Düzeltilmiş KMY Değerlerinin Karşılaştırılması .....	59
5.2.1 Kontrol ve hasta gruplarının kendi içlerinde genotiplere göre femoral ve lomber bölgelerde düzeltilmiş KMY değerlerinin karşılaştırılması .....	59
5.2.2 Kontrol ve hasta gruplarının kendi içlerinde birleşik genotiplere göre femoral ve lomber bölgelerde düzeltilmiş KMY değerlerinin karşılaştırılması	61
5.3 Çalışmanın Kısıtlılıkları.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR .....	66
ÖZGEÇMİŞ .....	97

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 4.1</b> : Kontrol ve hasta grubun demografik verileri ve bazı karakteristik özellikleri.....	39
<b>Tablo 4.2</b> : Kontrol ve hasta grubunun KMY ham değerleri ve T skoru değerleri	40
<b>Tablo 4.3</b> : T skoru değerlerine göre hasta grubun WHO sınıflaması göre dağılımı	40
<b>Tablo 4.4</b> : Olguların öyküsünde kırık sayısı ve bölgeleri.....	41
<b>Tablo 4.5</b> : Kontrol grubunun C421T ve C575T polimorfizmleri Hardy-Weinberg eşitliği.....	42
<b>Tablo 4.6</b> : Kontrol ve hasta grupları arasında C421T polimorfizmi genotip dağılımı ve allel sıklıklarının karşılaştırılması.....	43
<b>Tablo 4.7</b> : Kontrol ve hasta grupları arasında C575T polimorfizmi genotip dağılımı ve allel sıklıklarının karşılaştırılması.....	44
<b>Tablo 4.8</b> : Kontrol ve hasta grupları arasında C421T ve C575T polimorfizmlerinin birleşik genotip dağılımının karşılaştırılması.....	45
<b>Tablo 4.9</b> : C421T ve C575T polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarında birleşik haplotip analizi.....	46
<b>Tablo 4.10</b> : Kontrol ve hasta grubunun C421T polimorfizmi için genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içinde karşılaştırılması.....	47
<b>Tablo 4.11</b> : Kontrol ve hasta grubunun C421T polimorfizmi için homozigot mutant ve heterozigot grupların birleştirilmesi sonrası genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içinde karşılaştırılması.....	48
<b>Tablo 4.12</b> : Kontrol ve hasta grubunun C575T polimorfizmi için genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içlerinde karşılaştırılması.....	49
<b>Tablo 4.13</b> : Kontrol ve hasta grubunun birleşik genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içlerinde karşılaştırılması.....	50
<b>Tablo 4.14</b> : Kontrol ve hasta grubunun CC/CC birleşik genotipi ile diğer birleşik genotipler grubunun düzeltilmiş KMY değerleri kendi içlerinde karşılaştırılması...	51

## RESİMLER VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 2.1 : Kemik rezorpsiyonunu aktive eden faktörler.....	6
Şekil 2.1 : Tip 1 (postmenopozal) osteoporozda kalsiyum homeostazı ve kemik turnover değişiklikleri.....	11
Resim 2.2 : Kemik rezorpsiyonunu inhibe eden faktörler.....	7
Resim 2.3 : Osteoklast farklılaşmasının şematik sinyal kaskadı.....	22
Resim 3.1 : C421T polimorfizmi için sekans analizi.....	36
Resim 3.2: C575T polimorfizmi için enzim kesimi.....	37



## SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADAM 10: Disintegrin ve metalloproteinaz 10
- AdipoR1: Adiponektin reseptörü
- Ala: Alanin
- ANKRD6: Ankirin tekrar alanı 6
- ANOVA: Varyans analizi
- APC: Adenomatöz polipozis koli
- AR: Androjen reseptörü
- BKİ=BMI: Beden-Kitle indeksi
- BMPs: Kemik morfogenetik proteinleri
- BMUs: (bone multicellular units) Kemiğin çok hücreli üniteleri
- CaMKIV: Kalsiyum/kalmodulin kinaz IV
- CI: (Confidence interval) Güven aralığı
- CREB protein: cAMP cevap elemanı bağlayan proteini
- COL1A1: Kollajen tip-I alfa 1
- COX2: Siklooksijenaz 2
- ddNTP: Dideoksinükleotid trifosfat Dkk-1: Dickkopf-1
- DNA: Deoksiribonükleik asit E<sub>1</sub>: Östron
- dNTP: Deoksinükleotid trifosfat
- DXA/DEXA: Dual enerji X-ışını absorpsiyometri
- E<sub>2</sub>: Östradiol
- ESR- $\alpha$ : Östrojen reseptör alfa
- FGF-23: Fibroblast büyüme faktörü 23
- FN: Femur boyun
- FRAX: Kırık değerlendirme aracı
- FT: Femur total
- GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
- GSK-3: Glikojen sentaz kinaz-3
- HapMap: Haplotip haritası
- HGP: İnsan Genom Projesi

HRT: Hormon replasman tedavisi  
hTrCP: Transdusin tekrar içeren protein  
HWE: Hardy-Weinberg eşitliği  
Hys: Histidin  
IFN-  $\gamma$ : İnterferon gama  
IGF-2: İnsulin benzeri büyüme faktörü 2  
IL: interlökin  
ITGA1: İntegrin alpha 1  
JNK: Jun-N-terminal kinaz  
KMY: Kemik mineral yoğunluğu  
LDL: (low-density lipoprotein) Düşük yoğunluklu lipoprotein  
LHRH: Luteinizan hormon-salan hormon  
LIF:lösemi inhibitör faktör  
LRP5/LRP6: LDL reseptör ilişkili protein 5/6  
MAPK: Mitojen aktive olmuş protein kinaz  
M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör  
MMP: Matriks metalloproteinaz  
NFATc1: Aktive T hücrelerin nükleer faktörü 1  
NLK: Nemo benzeri kinaz  
OPG: Osteoprotegerin  
OPN (= SPP1): Osteopontin  
OR: Odds oranı  
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu  
PDGF: Platelet kaynaklı büyüme faktörü  
PGE<sub>2</sub>: prostoglandin E<sub>2</sub>  
PPAR- $\gamma$ : Peroksizom proliferatör aktive olmuş reseptör-gama  
PTH: Paratiroid hormon  
PTHrP: paratiroid hormonla ilişkili protein  
QTL: (Quantitative trait loci) Karakteristik özellikler lokusu  
QUS: Kantitatif ultrason  
RANK: Nükleer Faktör- $\kappa\beta$  reseptör aktivatörü  
RANKL: Nükleer faktör kapa  $\beta$  ligandın reseptör aktivatörü

RFLP: Restriction fragment length patterns  
Runx2: Runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2  
SD: Standart sapma  
SFRP: Kıvrımlı ilişkili salınan protein  
SHBG: Seks hormonu bağlayan globulin  
SNP: (Single nucleotide polymorphism) Tek nükleotid polimorfizmi  
SOAİİ: Steroid olmayan anti-inflamatuar ilaç  
SOST: Sklerostin  
TCF/LEF: T hücre faktörü/Lenfosit çoğaltıcı faktör  
TACE: TNF-alfa dönüştürücü (converting) enzim  
TGF- $\beta$ : Tümör büyüme faktörü beta (TGF-beta)  
TNF: Tümör nekroz faktör  
TNFSF11: TNF reseptör süper ailesi 11 (RANKL)  
TNFRSF11A: TNF reseptör süper ailesi 11A (RANK)  
TNFRSF11B: TNF reseptör süper ailesi 11B (OPG)  
TRANCE: (RANKL): Nükleer faktör kappa  $\beta$  ligandın reseptör aktivatörü (TNF ile ilişkili aktivasyonla indüklenen sitokin)  
Tyr: Tirozin  
UTR(untranslated region) Çevrilmeyen bölge  
Val: Valin  
VDR: Vitamin D reseptör  
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

## 1.GİRİŞ

Osteoporoz en sık görülen ve kemik gücündeki azalmaya bağlı olarak kemik fragilitesi ve kırık riskinde artışla giden kronik, progresif ve multifaktöriyel bir kemik metabolizması hastalığıdır.<sup>1</sup>

Genetik faktörler kemik mineral yoğunluğundaki (KMY) değişkenliğin %60-80'inden sorumlu tutulmaktadır.<sup>9</sup>

Osteoporoz patogenezinde genetik ile ilişkili etkileri aydınlatmaya yönelik bağlantı çalışmaları,<sup>253</sup> aday gen saptanması (tek nükleotid polimorfizm (SNP) çalışmaları gibi) ve gen ekspresyonu çalışmaları<sup>254</sup> olmak üzere farklı metodlar kullanılmaktadır.

İnsan genetik varyasyonu üzerine yapılan çoğu araştırma SNP'ler üzerine yoğunlaşmıştır. SNP'ler genomun hem kodlama yapan hem de yapmayan bölgelerinde açığa çıkabilir. Birçok SNP'nin hücre fonksiyonu üzerine hiçbir etkisi yoktur ancak bilim adamları diğerlerinin insanları hastalıklara yatkın hale getirdiğine ya da bir ilaca verecekleri cevabı etkilediğine inanmaktadır.

Çalışmamızda 45-65 yaş arası erken postmeopozal dönemdeki kadınlarda osteoklastogenezde önemli rolü olduğu bilinen RANK geninin,<sup>174</sup> ekzon 4'deki C421T ve ekzon 6'daki C575T tek nükleotid polimorfizmleri ve bunların femoral ve lomber bölge KMY değerleri ile olan ilişkisini araştırmayı planladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

Osteoporoz en sık görülen ve kemik gücündeki azalmaya bağlı olarak kemik frajilitesi ve kırık riskinde artışla giden kronik, progresif ve multifaktöriyel bir kemik metabolizması hastalığıdır.<sup>1,2</sup>

Osteoporozun tarihi çok eskiye dayanmaktadır. Medeniyetin başlamasından itibaren yaklaşık dört bin yıl öncesinde Mısırlılar döneminden itibaren özellikle bayanları etkilemektedir. Arkeolog ve araştırmacılar Mısırlı mumyalarda osteoporoz emarelerinden olan kamburluğu ortaya çıkarmışlardır. 18. yüzyılda bir İngiliz cerrah olan John Hunter yeni kemiğin oluşmaya başladığı yerde eski kemiğin absorbe edildiğini ortaya atmıştır. Bu olay kemik remodellingine karşılık gelmektedir ve osteoporozun nedeni olarak bilinmeye başlanmasının üzerinden yüzyılı aşkın zaman geçmiştir. 1830'larda Fransız patolog Jean George Chretien Frederic Martin Lobstein hastalarda bazı kemiklerin normalden daha fazla oyuk içerdiğini belirtmiş ve bunu osteoporoz yani poröz kemik olarak tanımlamıştır. Yaklaşık bir asır sonra Amerikan klinisyen ve endokrinolog Full Albright post-menopozal kadınların bu duruma daha yatkın olup ve daha zayıf ve kırılğan kemiklere sahip olduklarını öne sürmüştür. Daha sonra da post-menopozal osteoporozu tanımlama çalışmalarına devam edip bu bayanları östrojenle tedavi etmeye başlamıştır. Fakat hastalığın saptanmaya başlanması 1940'lı yılları bulmuştur. 1948 yılında Albright ve Reifenstein primer osteoporozun iki ayrı başlık altında toplandığını birinin östrojen kaybı ile diğer tipin ise yaşlanmayla ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir.<sup>3</sup> Bu tanım daha sonra Riggs ve arkadaşları tarafından detaylandırılıp menopoz sonrası trabeküler kemik kaybını tanımlayan Tip 1 osteoporoz ve yaşla ilişkili değişikliklerin sonucu olarak trabeküler ve kortikal kemik kaybını tanımlayan Tip 2 osteoporoz olarak isimlendirilmiştir.<sup>4</sup> 1960'lı yıllarda araştırmacılar kemik kaybını saptayacak araçlar geliştirmeye başlamışlardır. Bu da hastalığı erken saptama şansını sağlamıştır. 1960'larda Herbert Fleisch kemik rezorbsiyonunu engelleyen bifosfonat bileşiklerini bulmuştur. 1984 yılında osteoporoz Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından sağlığı tehdit eden ciddi bir hastalık olarak ilan edilmiş, kemik kaybının önlenmesi açısından östrojen tedavisi ile birlikte sağlıklı beslenme, kalsiyum ve egzersizin önemi vurgulanmıştır.<sup>5</sup> Günümüzde kabul edilen görüş ise osteoporoz multipl genetik, fiziksel, hormonal ve beslenme ile ilişkili patogenetik faktörlerin tek başına veya bir arada etki ederek

kemik kitlesi kaybı ve kemik mikromimarisinde bozulmaya yol açtığıdır.<sup>6, 7</sup> Bu faktörlere eşlik eden artmış düşme riski osteoporotik hastalardaki kırıkların gelişimine katkıda bulunur.<sup>8</sup>

Genetik faktörler erişkin kemik kitlesindeki değişkenliğin %60-80'inden sorumlu tutulmaktadır.<sup>9,10</sup>

Ailede kırık öyküsü varlığının ise KMY'den bağımsız olarak kırıklar için risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir.<sup>11, 12</sup> Sonuç olarak; kırıkların da kalıtsal özellik taşıması muhtemeldir.<sup>13</sup>

Herhangi bir zamandaki yetişkin KMY'si iskelet gelişimi sırasında kazanılmış doruk kemik kitlesi ile sonrasında kaybedilen miktar ile ilişkilidir. Kemik kitlesinin kazanılması büyük oranda 12 ile 20 yaşlar arasında gerçekleşir. Bu dönemde çevresel ve hormonal çok önemli etkileşimler söz konusudur. Kemik oluşumunu bozan ya da rezorpsiyonu kolaylaştıran herhangi bir hastalık ya da hormonal dengeleri değiştirebilen durumlar, doruk kemik kitlesinin daha az olmasına ve yaşamın ileri dönemlerinde artmış kemik kırık riskine neden olacaktır.<sup>14</sup> Artmış kemik fragilitesine bağlı osteoporotik kırıklar çeşitli faktörlerle ilişkilendirilmiştir, bunlardan başlıcaları düşük KMY ve kemik mikro-mimarisindeki bozulmadır.<sup>15</sup>

Osteoporoz, kemik hücre işlevini düzenleyen birçok lokal ve sistemik faktörlerin etkileşimi sonucu oluşmaktadır. Osteoporozdaki heterojenite sistemik ve lokal faktör düzenleyicileri yanında reseptör değişiklikleri, sinyal transdüksiyon mekanizmaları, nükleer transkripsiyon faktörleri, lokal düzenleyicileri üreten ya da inaktive eden enzimleri de kapsar.<sup>8</sup> Son yıllarda, genetik çalışmalar sonucu osteoporoz ile ilişkili birçok düzenleyici mekanizma tanımlanmıştır. Vitamin D reseptör (VDR) geni, östrojen reseptör alfa (ESR- $\alpha$ ), kollajen tip-I alfa (COL1A1) polimorfizmleri ile kemik kitlesi ve kırılabilirliği arasında ilişki geniş şekilde incelenmiştir. KMY ile ilişkisi kanıtlanmış olanların dışında, çok sayıda aday gen ve KMY ile ilişkili olduğu varsayılan ya da çelişkili sonuçları olup daha ileri çalışmalarla araştırılması önerilen genler de bulunmaktadır.<sup>16</sup> Yapılan bir meta-analiz VDR geninin kemik mineral yoğunluğu üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığını diğer iki genin (ESR- $\alpha$ , COL1A1) ise KMY üzerine ılımlı-muhtemelen %3'den az miktarda-genetik katkısı olduğunu öne sürmüştür.<sup>17</sup> Bununla beraber, bu meta-analizde incelenen çalışmalardaki hasta sayılarının az olması, kontrol ve hasta

gruplarındaki bireylerin genetik arka planında farklılıklar olması nedeniyle bu sonuçların tartışmalı olduğu daha geniş çaplı ve çok uluslu popülasyonları içeren meta-analizlere, DNA havuz çalışmalarına ve gen ekspresyon çalışmalarına ihtiyaç olduğu bildirilmektedir.<sup>18</sup>

Osteoporozun kompleks ve birden fazla geni ilgilendiren (poligenik) bir hastalık olmasından dolayı spesifik gen polimorfizmlerinin katkısı nispeten daha azdır fakat klinik olarak önemli olabilir. Osteoporoz patogenezinde spesifik genlerin rolünün tanımlanması için standardize edilmiş genotipleme metodu ile genetik olarak benzer normal ve hasta bireyleri karşılaştıran çalışmaların yapılması gereklidir. Yakın zamanda östrojen reseptör polimorfizmi ile bu gösterilmiştir.<sup>19</sup>

## **2.1 Kemiğin Yeniden Yapılanma Süreci (Remodeling)**

Aşırı kemik rezorbsiyonunun ve yetersiz kemik yapımının nasıl kemik kırılabilirliğini artırdığını anlamak için kemiğin yeniden yapılanma sürecini (remodeling) anlamak gerekir. Kemik dokusu erişkin yaşamı boyunca yeniden yapılanmaktadır. Remodeling eski kemiğin osteoklastlarca rezorbsiyonu ve rezorbsiyonu takiben osteoblastlarca yeni kemik oluşumu süreçlerini kapsar.<sup>20</sup> Bu iki birbiriyle ilişkili olay hem kemik dokusunun yenilenmesinden hem de kemiğin anatomik ve yapısal bütünlüğünün korunmasından sorumludur. Normal şartlar altında kemik yeniden yapılanması döngüler şeklinde ilerler. Her döngüde osteoklastlar kemiğe yapıştıktan sonra asidifikasyon ve proteolitik sindirimle kemik dokusunu ortadan kaldırırlar.<sup>21</sup> Kısa süre sonra osteoklastlar rezorbsiyon alanını terk eder, yerlerine o bölgeye osteoblastlar göç eder ve osteoid salınımı ile yeni kemik dokusu oluşum süreci başlar. Osteoid doku kollajen ve diğer proteinlerin oluşturduğu bir matrikstir. Bu matriks belirli süreçlerden geçerek mineralize olur. Kemik oluşumu tamamlandıktan sonra, kemik yüzeyi – sonunda osteoblastlara farklılaşacak hücre tipi olan- dölşeyici hücrelerce çevrilir.<sup>22</sup>

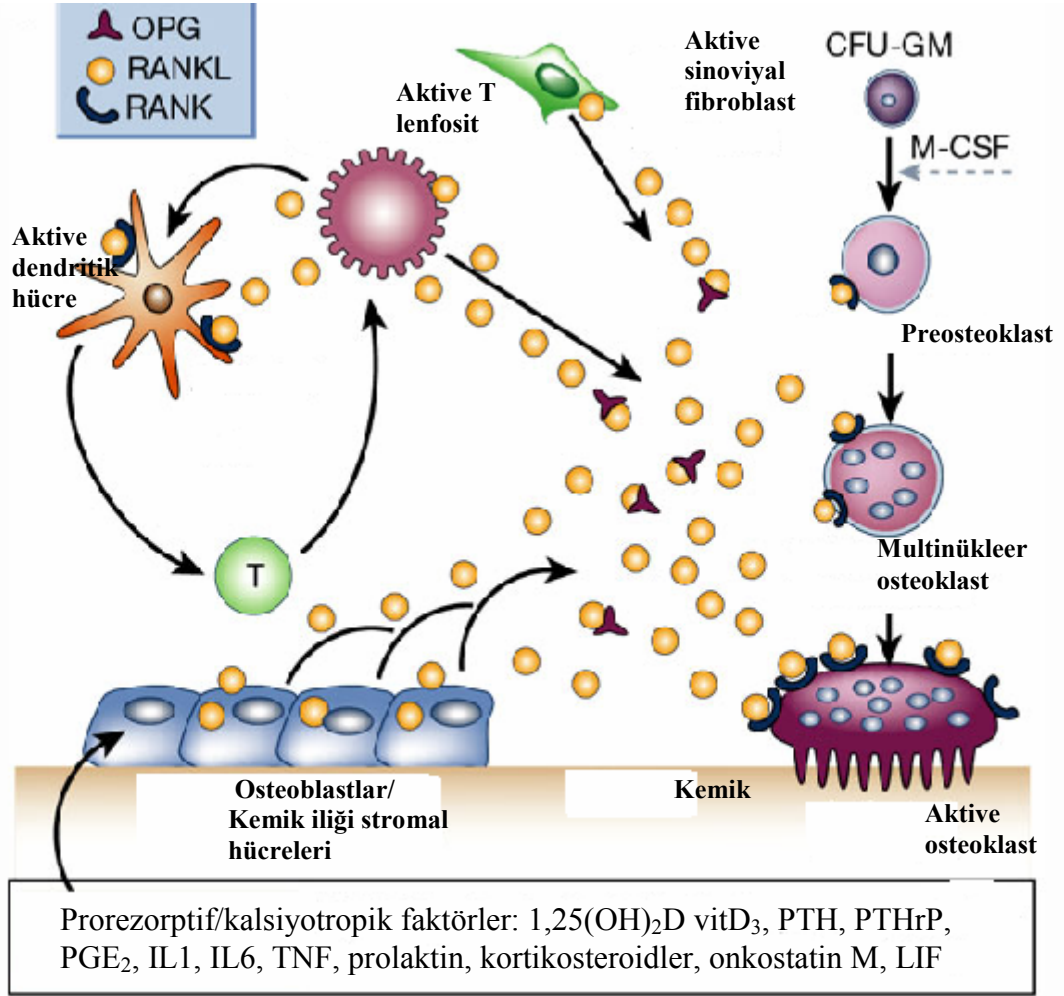
Erişkinde, trabeküler kemiğin yılda yaklaşık %25'i yeniden şekillenirken bu oran kortikal kemikte yalnızca %3'tür. Buradan şu sonuç çıkarılabilir: yeniden yapılanma esas olarak yerel etmenlerce kontrol edilir.<sup>22</sup> Kortikal kemiklere kıyasla trabeküler kemikte yüzey-hacim oranı daha yüksektir ve kemiğin %70-85'i kemik iliği ile temas halindedir.<sup>23</sup>

Trabeküler kemik yüzeyinde Howship lakünaları ya da kortikal kemiğin haversian kanallarında gerçekleşen kemik yeniden yapılanma süreci osteoklast aktivasyonu, osteoblast sıra hücrelerinin hematopoietik hücre öncülleri (preosteoklastlar) ile etkileşmesi ile başlar. İnflamatuar hücreler özellikle T lenfositler de bu süreci başlatabilir. Osteoklastlar olgunlaşır ve rezorbsiyon süreci başlar. Bu faz kısa sürer (3 hafta kadar) ve yine kısa süren yıkım süreci bu fazı izler. Yıkım süreci sırasında kemik yüzeyini mononükleer hücreler kuşatır fakat kemik oluşumu henüz başlamamıştır. Bundan sonra formasyon süreci başlar. Muhtemelen osteoklastlardan ya da yıkım sürecinde rol alan hücrelerden salınan maddeler ya da kemik matriksinden açığa çıkan büyüme faktörleri (tümör büyüme faktörü beta (TGF-beta) (TGF- $\beta$ ), kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), insulin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF-2) gibi) bu sürecin başlamasında rol oynar. Formasyon süreci belirgin olarak diğer 3 süreçten uzun sürer (3 ay kadar) ve osteoblastların ilerleyici dalgalanmaları sonucu matriks oluşumunu kapsar. Bunlar daha sonra ya düz döşeyici hücreler haline gelirler, kemikte gömülü halde yerleşiktir ve osteosit adını alırlar ya da programlı hücre ölümüne giderler.<sup>24</sup>

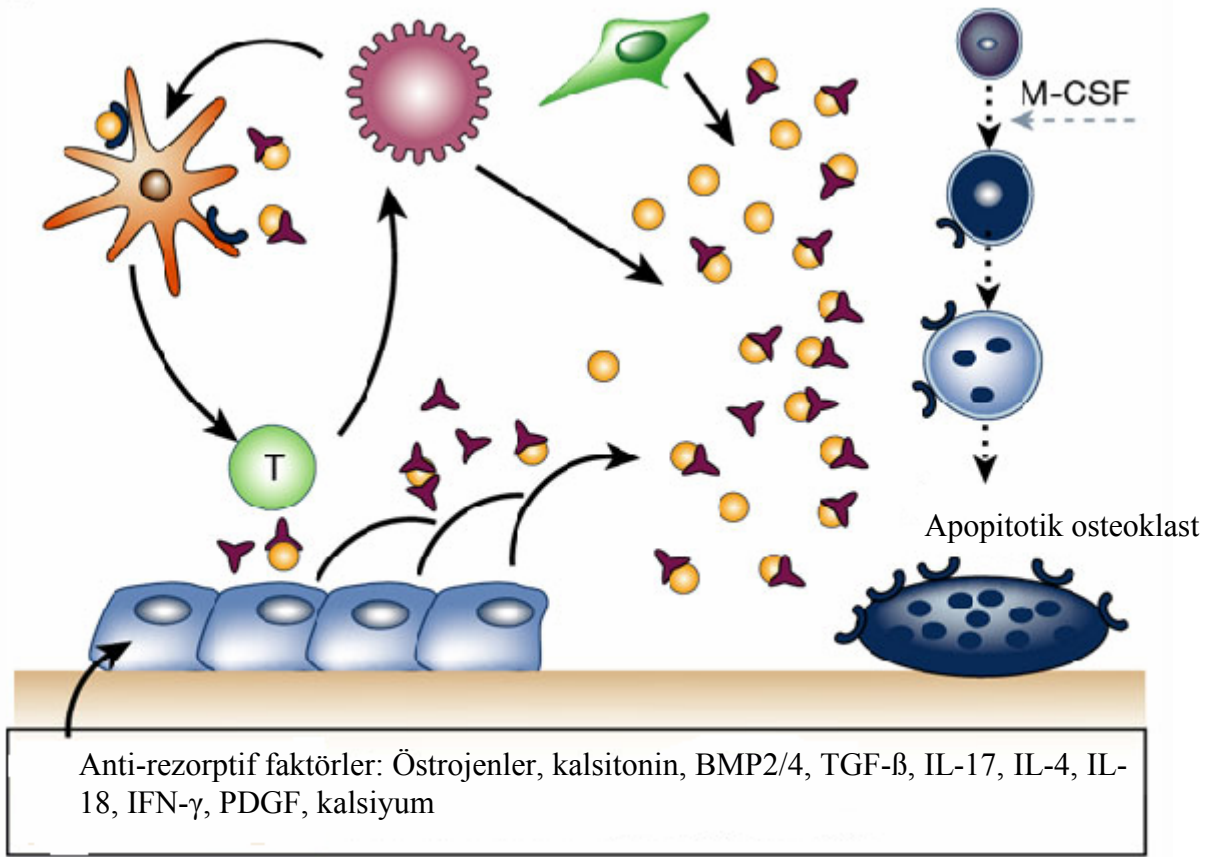
Rezorbsiyon süreci kısa (yaklaşık 3 hafta kadar), yerine koyma süreci uzun olduğundan (yaklaşık 3 ay) kemik döngüsündeki herhangi artış kemik kitlesinde kayıp ile sonuçlanacaktır.<sup>25</sup> Ayrıca dolmamış Howship lakünaları ya da haversian kanalları arttıkça kemik daha da zayıflayacaktır. Aşırı rezorbsiyon trabeküler yapıların tamamen kaybına da neden olabilir. Böylece kemik oluşumu için kalıp kalmaz. Bu nedenle osteoklastik rezorbsiyondaki artışın kemik kırılabilirliği ile sonuçlandığı birçok yol vardır. Kemik yeniden yapılanma süreci erişkin kemiğinin ana görevini oluşturur. Kemik yeniden yapılanması ya da kemiğin çok hücreli üniteleri (bone multicellular units=BMUs) yıllar önce tanımlanmıştır.<sup>23, 26</sup>

Osteoporoz gelişimi için yeniden yapılanma sırasında yeterli olmayan kemik oluşum cevabı da gerekli bileşendir.<sup>8</sup> Kemik rezorbsiyonu ve kemik oluşumunun düzenlenmesinde hem sistemik hem lokal faktörler önemli rol oynamaktadırlar (Resim 2.1, 2.2).





**Resim 2.1** : Kemik rezorpsiyonunu aktive eden faktörler (PTH: paratiroid hormon , PTHrP: paratiroid hormonla ilişkili protein, PGE<sub>2</sub>: prostoglandin E<sub>2</sub>, IL: interlökin , TNF: tümör nekroz faktör; LIF:lösemi inhibitör faktör).<sup>27</sup>



**Resim 2.2 :** Kemik rezorpsiyonunu inhibe eden faktörler (BMP:kemik morfogenetik proteini; TGF: tümör büyüme faktörü; IFN- γ: interferon gama; IL: interlökin; PDGF: platelet kaynaklı büyüme faktörü).<sup>27</sup>

Kemik yeniden yapılanmasında santral ve periferik sinir sistemi de rol almaktadır. Nöroendokrin mekanizma ile leptin hipotalamik reseptörler aracılığı ile kemik yapımını inhibe eder,<sup>28</sup> ayrıca periferik etkiyle de fare deneylerinde β-adrenerjik agonistler yoluyla KMY'de azalmaya yol açtığı görülmüştür.<sup>29</sup>

Nöropeptid Y sempatik kontrolden bağımsız olarak kemik yapımını düzenler.<sup>30</sup> Nöromedin U da sempatik sinir sistemi aracılığıyla kemik kitlesinin belirlenmesinde anahtar rol oynar.<sup>31</sup>

## 2.2 Osteoporoz Patogenezi

Osteoporoz gelişiminde etkili temel patogenetik mekanizmalar:<sup>8</sup>

- 1\* Büyüme ve gelişme sırasında iskeletin optimal gücüne ulaşamaması
- 2\* Kemik kitlesinde kayıp ve kemik mikromimarisinde bozulmayla sonuçlanan aşırı kemik rezorpsiyonu

3\* Kemik yeniden yapılanması sırasında artmış kemik rezorpsiyonuna karşılık yetersiz kemik yapımı

### 2.2.1 Östrojenin rolü

Östrojenin dolaşımdaki iki major formu östron ( $E_1$ ) ve östradiol ( $E_2$ )' dir.  $E_2$ ,  $E_1$ 'den 3.5 kat daha potenttir. Premenopozal kadınlarda serumdaki  $E_2$ 'nin %95'i ve  $E_1$ 'in büyük kısmı over kökenlidir, kalan kısımları ise steroid öncüllerinden aromataz enzimi ile - çoğu zayıf adrenal androjenlerden - periferik konversiyon yoluyla oluşur. Postmenopozal kadınlardaki östrojenin ise neredeyse tamamı periferik dönüşüm yoluyla sağlanır. Aromataz aktivitesi beyin, karaciğer, prostat, deri, adipoz doku, kemik gibi pek çok dokuda bulunsa da,<sup>32</sup> esasen ekstragonadal östrojen üretiminden adipoz doku sorumludur.  $E_2$  testosteronun,  $E_1$  ise androstenedionun periferik konversiyonu ile oluşur. Dolaşımdaki seks steroidlerinin ekstragonadal sentezine ek olarak, osteoblastlar gibi bazı hedef hücrelerde intraselüler olarak da seks steroidleri sentezlenip kullanılabilir. Labrie bu olayı 'intrakrinoloji' olarak adlandırmıştır.<sup>33</sup> Dolaşan östrojenin yıkımı için iki temel mekanizma; 2-hidroksilasyon ve 16-hidroksilasyondur. 2-hidroksilasyona uğrayan östrojen inaktiftir hatta bazı deneysel sistemlerde antagonistik etkisi bulunmuştur, 16-hidroksilasyona uğrayan östrojenin ise östrojenik aktivitesi devam etmektedir.<sup>34</sup> Dolaşan androjen ve östrojen üç kısımda incelenebilir: serbest biyoaktif komponent (%1-3), gevşekçe albumine bağlı komponent - biyolojik aktivitesi vardır - (%35-55), seks hormonu bağlayan globuline (SHBG) sıkıca bağlı komponent - kısıtlı biyolojik aktivitesi vardır - (%40-65). SHBG seks steroidleri tarafından regüle edilebilir; östrojen SHBG miktarını artırır, androjenler ise azaltırlar.

Hücresele düzeyde östrojen kemik çok hücreli ünitelerinin (BMUs) aktivasyonunu baskılayarak rezorpsiyon ve formasyon fazı arasında denge sağlar. Östrojen yokluğu durumunda yeni BMUs aktivitesi artar ve bu birimlerin hepsinde rezorptif faz formasyon fazına göre daha baskındır. Bunun nedeni apoptozun inhibisyonuna bağlı olarak osteoklast yaşam süresinin artmasının yanında osteoklast aktivitesinin de artmasıdır.<sup>35</sup> Osteoklastlar üzerindeki etkisi kadar iyi pekiştirilmemekle beraber östrojenlerin osteoblast oluşumu, farklılaşması, proliferasyonu ve fonksiyonunu arttırması da muhtemeldir.<sup>36,37</sup>

Diğer steroid hormonlar gibi seks steroidleri de spesifik nükleer reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Östrojen için iki reseptör (östrojen reseptör alfa ve beta (ER $\alpha$  ve ER $\beta$ ); androjen için ise tek bir reseptör (AR) bulunmaktadır. ER $\alpha$  esasen kortikal kemikte, ER $\beta$  ise daha çok trabeküler kemikte bulunur.<sup>38</sup> ER $\alpha$  osteoklastlar ve osteositlerde de bulunmaktadır. AR üreme organları kemik ve kas olmak üzere pek çok dokuda bulunur.

ER $\alpha$ , ER $\beta$  veya her ikisinin delesyonu ile yapılan fare deneyleri ile bu reseptörlerin kortikal ve trabeküler kemik üzerindeki etkileri aydınlatılabildiği görülmüştür.<sup>39, 40,</sup> <sup>41</sup> ER $\alpha$  kemik dokusu üzerinde kemik oluşumu için daima stimülatördür. ER $\alpha$  eksikliğinde kemiğin biyomekanik yüklenmelere karşı yetersiz osteojenik cevabı fare deneylerinde gösterilmiştir.<sup>42</sup> ER $\beta$  ise stimülatör, nötral ya da inhibitör etkili olabilir. Androjenlerin AR üzerine bağlanması da trabeküler ve kortikal kemik kitlesinde artış sağlar. Çoğu çalışmada AR yokluğu erkek ve bayanlarda düşük KMY ile birlikte görülür.<sup>43</sup> Yapılan bir çalışmada aromataz geni yokluğu dişi farelerde artmış, erkeklerde ise azalmış kemik turnover ile sonuçlanmış iken, bir başka çalışmada hem erkek hem dişilerde kemik rezorpsiyonu artmış bulunmuştur.<sup>44, 45</sup> Bu farklılığın açıklaması henüz net değildir.

Bazı sitokinler preosteoklast sayısında artışa yol açarken bazıları da kısım osteoklast oluşumu, fonksiyonu ve yaşam süresini olumsuz etkiler. İnterlökin 1-beta (IL1 $\beta$ ), IL-6, IL-7, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) osteoklast aktivitesini arttırıcı etki gösterir. Osteoblastik sıra hücreleri tarafından üretilen TGF- $\beta$  osteoklast apoptozunu arttırır ve osteoklastların yaşam süresini kısaltır.<sup>46</sup> Östrojen bu sitokin ağının tonik olarak inhibe ederken östrojen yokluğu stimüle eder ve kemik rezorpsiyonu artırır.<sup>47</sup> Östrojenin sitokin üretimi üzerindeki etkileri T-hücre aracılığıyla olabilir.<sup>48</sup> Ovariyektomize sıçanlarda aktive T hücrelerinin fazla miktarda salgıladığı TNF- $\alpha$  ve IL-1 kemik kaybında önemli rol oynamaktadır.<sup>49, 50</sup> Aktive T hücreleri aynı zamanda nükleer faktör kappanın ligandının reseptör aktivatörü (RANKL)-aracılığıyla kemik rezorpsiyonunu inhibe eden IFN- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  da üretirler.<sup>51</sup> Böylece pro- ya da anti-osteoklastojenik T hücre sitokin salınımındaki net miktara göre kemik üzerine etki ortaya çıkar. İnflamasyon, östrojen eksikliği gibi durumlarda pro-osteoklastojenik sitokinler baskındır.<sup>52</sup> Östrojen eksikliğinde artmış rezorpsiyona yetersiz kemik

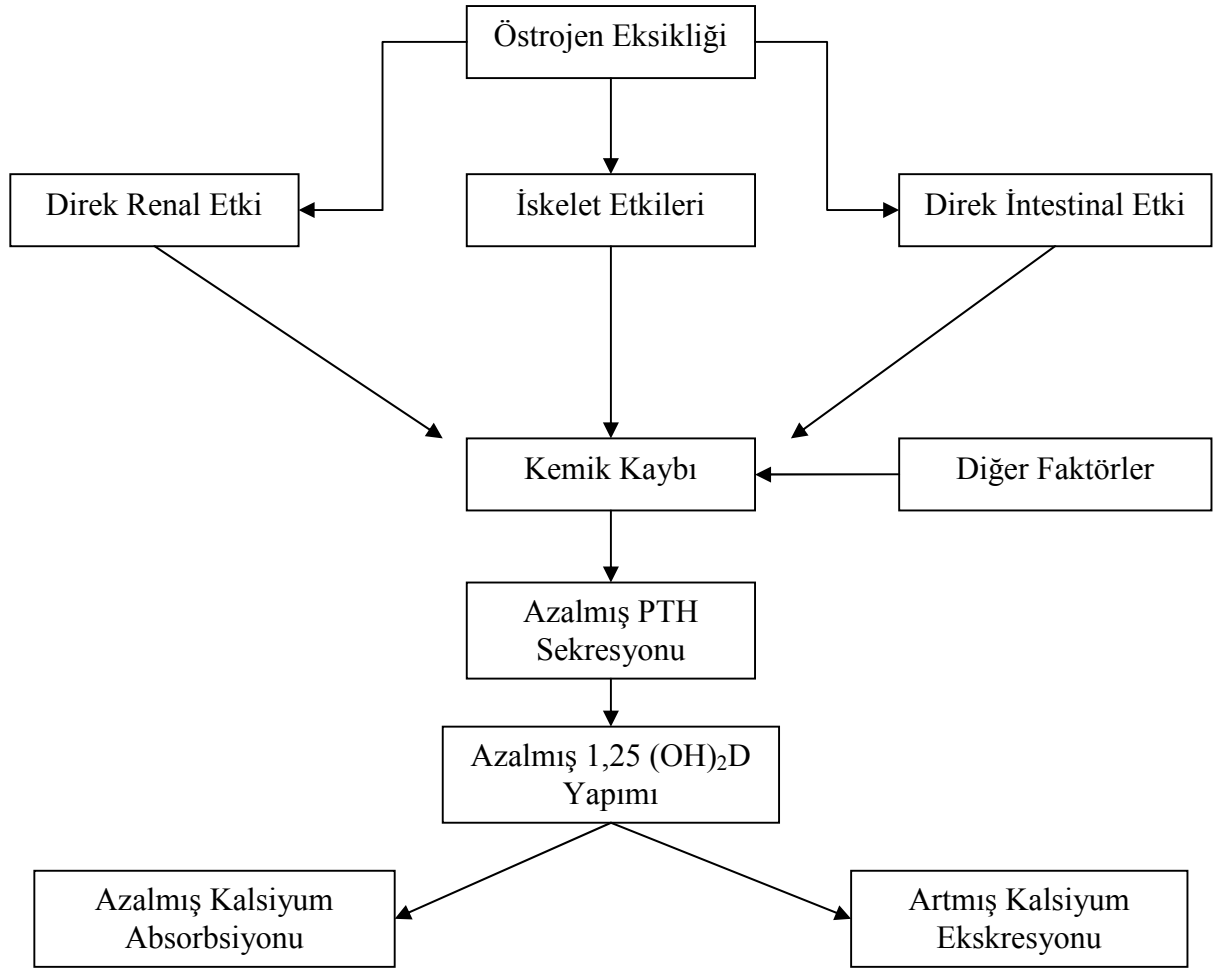
yapımı kemik kaybına neden olur. Östrojen eksikliğinde üretimleri artan IL-7 ve TNF- $\alpha$  osteoblastik aktiviteyi inhibe etmektedir.<sup>49, 53</sup> Deney hayvanları ve insanlarda östrojen replasman tedavisi hızlanmış programlı osteoklast ölümünü (apoptoz) azaltıp osteoklastogenezi engeller; uzun dönem yüksek doz östrojen replasman tedavisi ise bunlara ek olarak kemik yapımını da stimüle etmektedir.<sup>54</sup>

Östrojen TGF- $\beta$  üretimini direk olarak stimüle eder.<sup>55</sup> TGF- $\beta$  T hücre aktivasyonunun en güçlü baskılayıcısıdır. TGF- $\beta$ 'nın sistemik dolaşımdaki artışı ovariectomi ile indüklenen kemik kaybını ve kemik yeniden yapılanmasını önlemektedir.<sup>48</sup> IL-7 ve TGF- $\beta$  birbirlerinin üretimini zıt yönde etkiler.<sup>56</sup>

Östrojen pek çok hücrede antioksidanların yapımını artırır. Östrojen eksikliğinde tiyol antioksidan savunması azalarak serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile osteoklast yapımı uyarılır.<sup>57, 58</sup>

Östrojen eksikliği hem primer olarak hem de kemik turnoverı üzerindeki etkilerine sekonder olarak periferik kalsiyum metabolizmasını da değiştirerek intestinal kalsiyum emiliminin azalması ve idrar kalsiyum atılımının artmasına yol açar (Şekil 2.1).<sup>59, 60, 61</sup>

Östrojen serumda serbest 1,25 dihidroksikolekalsiferol (kalsitriol) (1,25(OH)<sub>2</sub>D) düzeyini de arttırmaktadır.<sup>62</sup>



**Şekil 2.1 :** Tip 1 (postmenopozal) osteoporozda kalsiyum homeostazı ve kemik turnover değişiklikleri

### 2.2.2 Kalsiyum, D vitamini, Paratiroid hormon (PTH)

1,25(OH)<sub>2</sub> D vitamin düzeyi plazma PTH düzeyi, serum kalsiyum ve fosfor düzeylerine göre düzenlenmektedir.<sup>63</sup>

Kemikten salınan fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23) böbrek ve barsak hücrelerindeki sodyum-fosfat kotransporterının fonksiyonunu artırırken 1,25(OH)<sub>2</sub>D vitamini sentezini baskılar.<sup>64</sup> D vitamini olmadan diyetle alınan kalsiyumun %10-15'i ve fosforun %60 kadarı absorbe edilir.<sup>65</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin vitamin D reseptörü ile etkileşimi intestinal kalsiyum absorpsiyonunu yaklaşık %30-40'a, fosfor absorpsiyonunu %80 düzeylerine çıkarır.<sup>66</sup>

Yaş ilerledikçe 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) düzeyi kadın ve erkeklerde %50'ye varan oranlarda azalmaktadır.<sup>67</sup> Yaşlanmayla beraber kalsiyum ve D vitamini alımı, barsaktan kalsiyum ve D vitamini Emilimi, renal 1-alfa hidroksilaz aktivitesi, güneşe maruziyet ve cilt kalınlığında azalmaya bağlı olarak deriden D vitamini sentezi azalmaktadır.<sup>68, 69, 70</sup> Büyüme hormonu yapımı ve IGF-1 düzeylerinin ilerleyen yaşla azalması da 1,25(OH)<sub>2</sub> D vitamin düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır.<sup>71</sup> Tüm bu faktörler sekonder hiperparatiroidiye neden olmaktadır. Aktif form olan kalsitriol kalsiyum ve fosforun barsaktan optimal Emilimi için gereklidir. Aynı zamanda paratiroid hormon sentezi üzerinde tonik inhibitör etkisi vardır.

İskelet kasları da vitamin D reseptörlerine sahiptir ve maksimum fonksiyon için D vitaminine ihtiyaç duyarlar.<sup>72</sup> Bunun dışında vitamin D reseptörü beyin, prostat, meme, yağ dokusu hücresi, kolon hücreleri ve immün sistem hücrelerinde de bulunmaktadır.<sup>65</sup>

Vitamin D eksikliği ve sekonder hiperparatiroidi hızlı kemik kaybı ve artmış kemik kırılabilirliğinin yanı sıra düşme riskini artıran nöromusküler bozukluklara da yol açabilir.<sup>73, 74, 75</sup>

50 yaş ve üstü bayanların %40-50'si ve erkeklerin %13-20'si yaşamlarının geri kalanında osteoporotik kırıklarla karşılaşmaktadır.<sup>76</sup>

Serum 25(OH) D vitamin düzeyi 30-32 ng/ml altında düşük olarak kabul edilebilir.<sup>77</sup> Serum 25(OH) D vitamin düzeyi 20-30 ng/ml altına düştüğünde ise serum intakt PTH düzeyinin artmaya başlayacağı bildirilmektedir.<sup>78, 79</sup>

Kalsiyum ve D vitamini eksikliği riski artmış olan yaşlı bireylerle yapılan klinik çalışmalarda kalsiyum ve D vitamini desteği yapılmasının sekonder hiperparatiroidiyi geri çevirdiği, kemik rezorpsiyonunu azalttığı, kemik kitlesini artırdığı, kırık oranını azalttığı ve düşme sıklığını azalttığı bildirilmiştir.<sup>80, 81</sup> Bunun yanında toplum tabanlı bazı çalışmalarda kırık riskini önleme açısından oral kalsiyum ve D vitamini desteği ile daha az başarı elde edilmiştir.<sup>82</sup> Büyük bir çift kör çalışma kalsiyum ve D vitamini desteğinin kırık insidansına anlamlı etkide bulunmadığını rapor etmiştir.<sup>83</sup> Bu durumun çalışma popülasyonunun göreceli olarak yüksek bazal 25-OH D vitamin düzeyine, düşük dozda vitamin D desteği verilmiş olmasına (400 IU/gün) ve tedaviye uyumun değişkenliğine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.

VDR gen polimorfizmleri yaygın olarak çalışılmıştır fakat sonuçlar değişkenlik göstermektedir. Bunun nedeni kısmen bu reseptördeki belirli bir polimorfizmin etkisinin çevreyle etkileşimine özellikle kalsiyuma bağlı olmasıdır.<sup>84</sup> VDR gen polimorfizmleri aynı zamanda kalsitriol tedavisine yanıtındaki farklılık ile de ilişkili olabilmektedir.<sup>85</sup>

Bunun dışında KMY ve kemik döngüsünden bağımsız olarak kırık riski üzerine de etkilidir ve bu düşme sıklığındaki farklılığa bağlı olabilir.<sup>86</sup>

### **2.2.3 Osteoblast farklılaşması ve işlevlerini belirleyen genler**

Osteoblast farklılaşması ve işlevlerinde çok önemli görevleri olan sinyal transdüksiyon yolları ve transkripsiyon faktörlerinin yakın zamanda keşfi osteoporoz patogenezi anlamada yeni ufuklara yol açmıştır. Gen delesyon çalışmaları göstermiştir ki runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2'nin (Runx2) ya da bir aşağı akım faktörü olan osterix'in yokluğu osteoblast farklılaşmasında çok önemlidir.<sup>87, 88</sup> Bu transkripsiyon faktörlerinin gen polimorfizmleri KMY'deki değişikliklerle ilişkili olabilir.<sup>89, 90</sup>

Wnt sinyal yolağının osteoblast işlevini düzenlemedeki kritik rolünün ortaya konması özel önem taşımaktadır. Çünkü bu yolağın kemik kütle ve gücünü belirlemede önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Bu yolak embriyonik dönemde ve doğumdan sonra kanonik ve non-kanonik yollarla kemik gelişimi, formasyon ve büyümesinde rol oynar.<sup>91, 92</sup> Kanonik Wnt sinyal yolağı osteoblastların kondrositlere dönüşümünü engeller ve osteoblast farklılaşması için runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2'yi (Runx2) hedefler.<sup>93</sup> İlginç olarak Runx2'nin aşırı ekspresyonu kemik kitlesinde azalmaya yol açar. Bu da Runx2'nin osteoblast farklılaşması ve fonksiyonu yanında osteoklast farklılaşmasını da etkileyerek kemik yeniden yapılanma sürecinde kompleks bir rol oynadığı yönünde yorumlanabilir.<sup>94</sup> Farklılaşmış osteoblastlarda  $\beta$ -kathenin sinyali osteoblastlardan osteoprotegerin sentezini indükleyerek osteoklast formasyonu ve kemik rezorpsiyonunu inhibitör yönde etkiler.<sup>95</sup> Wnt sinyali yokluğunda  $\beta$ -kathenin aksin ve glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) ile protein kompleksi şeklinde degradasyona uğrar. LDL reseptör ilişkili protein 5 ya da 6 (LRP5/LRP6) Wnt ligandlarınca transdüksiyon sinyali için kıvrımlı reseptör ile etkileşir. Böylece  $\beta$ -kathenin nükleusa taşınarak T hücre faktörü/lenfosit çoğaltıcı faktör (TCF/LEF) ile etkileşerek hedef genlerin transkripsiyonunu (örneğin



osteoprotegerin (OPG) geni gibi) aktive eder.<sup>96</sup>  $\beta$ -kathenin kemik morfogenetik protein 2 (BMP2) ile etkiletiğine dair kanıtlar vardır.<sup>97</sup> Yapısal aktivasyona neden olan LRP5 mutasyonu kemik yoğunluğunda artış ile sonuçlanabilir.<sup>98</sup> Her ne kadar hiçbirinde kırık olmasa da, LRP5 aktive edici mutasyonlu ailelerin fenotipi oldukça değişkenlik gösterir. Bazıları normal kemik mimarisi gösterirken diğerleri kemik aşırı büyümesine bağlı anormallikler gösterir.<sup>99</sup> LRP5 inhibe edici mutasyonu şiddetli osteoporotik sendrom ve anormal göz gelişimi ile ilişkilidir.<sup>100</sup> LRP5 gen polimorfizmleri kemik kitlesinde farklılıklar ve kırıklar ile de ilişkili olabilir.<sup>101</sup>

Non-kanonik Wnt yolağında ise sinyal kıvrımlı reseptörler aracılığı ile yapı proteini olan Disheveled (Dsh) ve Jun-N-terminal kinaz (JNK) kaskadı ile ya da kalsiyum bağımlı sinyal kaskadı ile iletilir.<sup>96</sup> PTH' nin kemik formasyonu üzerine anabolik etkisi kısmen non-kanonik Wnt4 sinyalini stimüle ederek p38 mitojen aktive olmuş protein kinaz (MAPK) yoluyla osteoprogenitör hücre farklılaşmasını ve osteoblast gelişimini arttırmasına bağlanır.<sup>102</sup> Non-kanonik Wnt5a sinyali ise Runx-2'yi indükler ayrıca in vitro olarak da peroksizom proliferatör aktive olmuş reseptör-gamayı (PPAR- $\gamma$ ) suprese ederek adipoprogenitörlerin osteoblastlara farklılaşmasını sağlar.<sup>103</sup> Wnt yolağı ayrıca osteoblastlarda osteoblast spesifik transkripsiyon faktörü olan osterix tarafından da kontrol edilir. Mekanik yüklenme ya da yüklenmeme osteositler tarafından algılanarak sklerostini içeren biyokimyasal sinyallerin inhibisyonu ya da serbestlenmesi tetiklenir. Mekanik yüklenme gibi fizyolojik durumlar ya da patolojik durumların varlığında kemik matiksinde oluşabilen mikrokırıklar tarafından osteoblastik silsile hücreleri uyarılarak RANKL üretimi de artar.<sup>104</sup>

Wnt sinyal yolağındaki bozukluklarla ilişkili durumlar: osteoporoz psödoglioma, multipl myelom, glukokortikoid ile ilişkili osteoporoz, yüksek KMY ile giden hastalıklar, sklerostozis, van Bucham hastalığı olarak sıralanabilir.<sup>105</sup>

Wnt sinyal yolağının ekstraselüler inhibitörleri kıvrımlı ilişkili salınan protein (SFRP), Dickkopf-1 (Dkk-1), Wnt inhibitör faktör (WIF), Cerberus (Cer), yüzey ektodermin Wnt modülatörü (Wise) ve kemik spesifik sklerostindir. Wnt antagonisti Dkk-1' in bağlanması ile Dkk-1-LRP5/6-Kremen kompleksi oluşarak LRP5/6 endositozu ve degradasyonu meydana gelir ki bu da Wnt ve kıvrımlı reseptör etkileşimini önler. Yine bir Wnt inhibitörü olan Wise de Wnt koreseptörü LRP'ye

bağlanır. Yaygın olarak eksprese edilen Dkk1' in aksine sklerostinin ekspresyonu osteositlerle sınırlıdır. SOST geni ürünü olan sklerostin LRP5' e bağlandığında Wnt-LRP-kıvrımlı reseptör kompleksi oluşumunu engeller. Bu geni inaktive eden mutasyonlar yüksek kemik kitlesine neden olur (Van Bucham hastalığı ve sklerostozis).<sup>105</sup> Dkk insan genomunda 4 tipte tanımlanan sekrete edilen Wnt sinyal regülatörleridir.<sup>106</sup> Dkk-1 Wnt sinyalini LRP5/6' ya bağlanarak direk olarak inhibe ederken,<sup>107</sup> Dkk-2 ve 3 Wnt sinyalini antagonize etmezler. Dkk-2 osteoblastların terminal diferansiyasyonunda ve mineralize matriks formasyonunda rol alır.<sup>108</sup> Dkk-2 olmayan farelerde yapılan çalışmalarda trabeküler ve endokortikal kemik yüzeylerinde osteoidlerin artmış olduğu saptanmış fakat aynı zamanda bozulmuş kemik mineralizasyonu ve buna bağlı osteopenik fenotip de saptanmıştır.<sup>108</sup>

Wnt sinyal yolağının intraselüler inhibitörleri de mevcuttur. Bunlar adenomatöz polipozis koli (APC), aksin, glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3), CKIa ( $\beta$ -kathenini degradasyon yolağı için fosforile eder), transdusin tekrar içeren protein (hTrCP), ankirin tekrar alanı 6 (ANKRD6), nemo benzeri kinaz (NLK) olarak sıralanabilir.

Wnt sinyal yolağındaki LRP5/6, Dkk2, sklerostin ve sFRP gibi pek çok üyenin kemik mineral yoğunluğu ile anlamlı ilişkide olduğu gösterilmiştir.<sup>109, 110</sup>

#### **2.2.4 Lokal ve sistemik büyüme faktörleri**

Lokal ve sistemik büyüme faktörlerinin üretiminde ve aktivitesindeki spesifik bozukluklar kemik oluşum bozukluğuna katkıda bulunmaktadır. kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) ve TNF ailesinin diğer üyeleri suçlanmıştır. İzlanda ve Danimarkalıların katıldığı büyük bir çalışmada BMP2 gen polimorfizmlerinin düşük KMY ve kırık riski ile ilişkili olduğu görülmüştür.<sup>111, 112</sup> BMP2'yi osteoporozla yatkınlık geni olarak kabul etmek için daha fazla çalışma gerekebilir. Kemik gelişiminde IGF, TGF- $\beta$  ve ilişkili BMP'lerin rolü geniş şekilde araştırılmıştır.<sup>113, 114</sup> Hem sistemik hem lokal düzenleyici etkileri olan IGF ve TGF- $\beta$  kemik oluşumu üzerine etkilidir. Lokal IGF-1 üretiminin inhibisyonu glukokortikoid nedenli osteoporozda önemli bir bileşendir.<sup>115</sup> IGF-1 yoksun farelerde intermittan paratiroid hormonuna periostal kemik oluşumu cevabının olmadığı görülmüştür.<sup>116</sup> Karaciğerden büyüme hormonu bağımlı salgılanan sistemik IGF-1 kortikal kemik

bütünlüğü için daha önemliken osteoblastlardan lokal olarak sentezlenen lokal IGF-1 trabeküler kemik bütünlüğü için önemlidir.<sup>117,118</sup> TGF- $\beta$  kemik rezorpsiyonunu hem stimüle hem de inhibe eden kemiğin multifonksiyonel bir düzenleyicisidir. Ancak daha büyük ölçüde kemik yapımının uyarıcısıdır.<sup>119</sup> KMY ve osteoporotik kırıkların insidansı ile IGF ve TGF- $\beta$ 'yi kodlayan genlerin polimorfizmleri arasında bazı ilişkiler bulunmuştur.<sup>120, 121, 122</sup>

Bunlar haricinde heparin bağlayıcı büyüme faktörleri ve FGF'ler in vivo olarak kemik yapımını artırırken in vitro olarak kollajen sentezini inhibe ederler.<sup>123, 124</sup> FGF olmayan farelerde PTH'nın anabolik cevabı azalmıştır.<sup>125</sup> FGF prostaglandin bağımlı ya da bağımsız mekanizmalarla kemik rezorpsiyonunu arttırabilir.<sup>126</sup> PDGF kemiğin güçlü bir mitojeni ve kemik rezorpsiyonunun uyarıcısıdır.<sup>127</sup>

Bu büyüme faktörlerinin etkileri yanında yaşla birlikte büyüme hormonu ve sistemik IGF-1 salınımının azalması da postmenopozal ve senil osteoporoz patogeneğinde rol oynuyor olabilir.<sup>128</sup> Büyüme hormonu uygulaması postmenopozal bayanlarda PTH'ya hedef organ duyarlılığını, kemik mineral metabolizmasını ve PTH salınım paternini kemik formasyonu yönünde iyileştirebilir.<sup>129</sup>

### **2.2.5 Sitokinler, PG, nitrik oksit (NO), lökotrienler**

İskelete mekanik yüklenme ya da yük vermemeye nitrik oksid, prostoglandinler, IGF-1, glutamat, Wnt sinyal yolağı ligandları gibi çeşitli lokal faktörler aracılığı ile hücrel cevap verilir.<sup>130, 131</sup> Kemik iliğinde osteoblast ve osteoklast öncülleri dışında diğer kas, tendon, kıkırdak, sinovyum gibi komşu dokular da kemik hücrelerine etki eden lokal faktörler salgılayabilirler.<sup>132, 133</sup>

Mitojen ya da antijen aktive lökositler kemik rezorpsiyon aktivitesini IL1, IL6 ve TNF başta olmak üzere çeşitli sitokinler aracılığı ile yaparlar. IL11 kemik rezorpsiyonunu artırırken, IL7 kemik rezorpsiyonuna stimülatör ya da inhibitör etki gösterir.<sup>134, 135, 136</sup> IL-4, IL-13, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) kemik rezorpsiyonunu inhibe ederler.<sup>137</sup>

Sitokinlerin osteoporoz patogeneğinde rol alabileceğini gösteren esas çalışmalar temel olarak ovariektomi sonrası kemik kaybı olan hayvan deneylerine dayanmaktadır. İnsanlarda da IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ 'nın polimorfizmleri ve bunların reseptörlerinin kemik kitlesini etkileyebileceği gösterilmiştir.<sup>138, 139</sup>

Prostaglandinler, özellikle PGE2, kemik hücrelerinde büyük oranda indüklenebilir siklooksijenaz 2 (COX2) aracılığıyla yapılırlar. COX2 kemik rezorbsiyonunu uyaran faktörlerin çoğunca indüklenir. Böylece bu ajanlara yanıtı kolaylaştırabilir. COX inhibitörleri ile tedavi, yük etkisine yanıtı küntleştirir. Bu da prostaglandinlerin mekanik kuvvet yanıtında önemli rol aldıklarına işaret eder. Östrojen, bu etkiyi de kolaylaştırabilir.<sup>140,141</sup> Epidemiyolojik çalışmalarda, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaç (SOAİİ) kullananlarda KMY’de küçük artışlar ve kırık riskinde azalmalar rapor edilmiştir.<sup>142, 143</sup>

Nitrik oksit (NO) kemik hücrelerince üretilir ve mekanik yüke karşı anabolik yanıtta bir kofaktör görevi görür.<sup>141</sup> Bununla birlikte prostaglandinlerden farklı olarak NO kemik rezorbsiyonunu inhibe edebilir, bunu OPG sentezini artırarak başarıyor olabilir.<sup>144</sup> Bu etki izosorbid mononitrat ve diğer NO yolak aktivatörü alan hastalarda gösterilen KMY’deki artıştan sorumlu olabilir.<sup>145</sup>

Lökotrienler lipooksijenaz ürünüdürler, kemikte rezorbsiyonu uyarır ve formasyonu baskırlar.<sup>146</sup> Yakın zamanda araşidonat 15-lipooksijenazın (Alox15 geni tarafından kodlanır) farede kemik dansitesinde negatif düzenleyici olduğu gösterilmiştir.<sup>147</sup> Ayrıca, insanda Alox15 gen polimorfizminin postmenopozal kadınlarda doruk KMY’deki farklarla ilişkili olduğu bulunmuştur.<sup>148</sup>

## 2.2.6 Kollajen anormallikleri

COL1A1 geni kemik matriks proteinlerinden en bol bulunan tip 1kollajenin  $\alpha 1$  zincirini kodlar. 2 tane  $\alpha 1$  zinciri bir  $\alpha 2$  zinciri ile birleşerek kollajen fibrillerin karakteristik üçlü heliks yapısını oluşturur. Bu protein kemik gücü için son derece önemlidir.<sup>149</sup> Bu genin birinci intronunun Sp1 polimorfizmi düşük KMY ve insidental vertebra kırıkları ile ilişkilendirilmiştir.<sup>150</sup> Bunun yanında COL1A1 geni promoter bölgesinin polimorfizminin farklı etnik gruplarda KMY ile anlamlı ilişkili olduğu gösterilmiştir.<sup>151, 152</sup> Sonuç olarak COL1A1 geninin promoteri veya birinci intronunun polimorfizmleri transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkileyerek gen transkripsiyonunu ve kollajen alt tiplerinin yapısını etkilemektedir.<sup>153</sup>

Homosistein proteinden zengin gıdalarda bulunan esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin demetilasyonu ile oluşur. Metiyoninin homosisteine demetilasyonu B12 vitamininin kofaktör olduğu enzimatik reaksiyonla gerçekleşir.<sup>154</sup>

Hiperhomosisteinemi kemik üzerine zararlı etkisini kollajen molekülüne bağlanarak yapar. Bu bağlanma ile tip 1 kollajen çapraz bağlarının oluşumunu engeller.<sup>155</sup> Kollajen çapraz bağlarının kalitatif özelliği bozular. Bu da homosistein düzeylerinin KMY'den bağımsız olarak kırık riski üzerinde etkisini açıklayabilir.<sup>156</sup> B12 vitamin düzeylerindeki azalma metil malonik asit ve homosistein düzeylerindeki artışa bağlı olarak osteoklast yapımında artış ve kemik kalitesinde azalma ile de ilişkili görünmektedir.<sup>154, 157, 158</sup>

### **2.2.7 Yağ dokusu, nöral yollar ve osteoporoz**

Leptin adipositler tarafından üretilen bir hormondur ve ventro-mediyal hipotalamik çekirdekdeki reseptörlerine (serotonerjik nöronlara) bağlanarak fonksiyon gösterir.<sup>159</sup> Bunun sonucu olarak sempatik sinir sistemi aracılığı ile katekolamin salınımı olur. Katekolaminler osteoblastlar üstündeki beta adrenerjik reseptörlere bağlanır. Farelerde yapılan çalışmalar leptin eksikliği ya da direncinin gonadal fonksiyonlar azaltıldığında bile yüksek KMY ile ilişkili olduğunu göstermiştir.<sup>28</sup> Bu olay adrenerjik sinyal yolu üzerine olan santral etkiye bağlanmıştır. Artmış beta adrenerjik aktivite kemik kitlesini azaltabilir fakat diğer yollar da etkilenmiş olabilir.<sup>160</sup> Hepsi olmasa da bazı epidemiyolojik çalışmalar beta-adrenerjik bloker kullanımı ile kırık riskinde azalma ve KMY'de artma bildirmişlerdir.<sup>161</sup>

Adiponektin adipositlerden salınır. Normal kemik iliği dokusunda da bulunur. Adiponektin düzeyleri obezitede, diyabette, insülin rezistansı durumunda, kardiyovasküler hastalık durumunda düşer. Hastalık şiddeti arttıkça düzeyi daha çok düşer. Kilo kaybı adiponektin ekspresyonunda ve insülin duyarlılığında artışla sonuçlanır. Adiponektinin RANKL sinyal yolağı olan TNF $\alpha$  ile indüklenen nükleer transkripsiyon factor- $\kappa$ B aktivasyonunu düzenleyebileceği belirtilmiştir.<sup>162</sup> Adiponektinin non-diyabetik erken postmenopozal dönemdeki kadınlarda lomber vertebra ve femur KMY'leri ile zıt yönde ilişkili olduğu gösterilmiştir, leptinle böyle bir ilişki saptanmamıştır.<sup>163</sup> Adiponektinin siklooksijenaz 2 ekspresyonunu uyarması ile BMP2 ve çeşitli osteojenik belirleyicilere ait genlerin ekspresyonunun arttığı; buna ek olarak adiponektin reseptörü (AdipoR1) aracılığıyla p38 mitojen aktive kinazın uyarıldığı gösterilmiştir. Ayrıca adiponektin varlığında osteojenik

transkripsiyon faktörü Runx2'nin osteogenezin hızlanmasına katkıda bulunduğu da gösterilmiştir.<sup>164</sup>

Endo-kannabinoid reseptörlerinin ve çeşitli santral nöral yolların kemik yeniden yapılanması ile yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir.<sup>165,166</sup>

Nöromedin U ince barsakta submukozal ve miyenterik pleksustaki sinir hücreleri yanında dorsomediyal hipotalamik çekirdek gibi beyin yapılarından da salınan nöropeptiddir.<sup>167</sup> Nöromedin U'nun da santral sinir sistemi ve leptin bağımlı yollar üzerinden kemik yeniden yapılanmasını etkileyebileceği öne sürülmüştür.<sup>166</sup>

### **2.3 RANK/RANKL/Osteoprotegerin (OPG) sistemi ve osteoporoz**

İskelet sistemi fonksiyon ve bütünlüğünü osteoblastlar ve osteoklastlar gibi farklı kökenlerden orijin alan hücrelerin etkileşimi ile sağlar.<sup>168</sup> Osteoklastlar hematopoetik kök hücrelerinden, osteoblastik hücre serileri ise (stromal hücreler, kemik sıra hücreleri, osteoprogenitörler, preosteoblastlar, osteoblastlar, osteositler) mezenkimal hücre öncüllerinden köken alırlar. Bu mezenkimal hücre öncülleri ayrıca fibroblastlar, kondrositler, miyoblastlar ve adipositlere de farklılaşabilir. Osteoblast-osteoklast etkileşimi farklılaşmanın değişik evrelerinde olabilir. 90' lı yıllarda kemik iliği stromal hücreleri ve osteoblastlar tarafından TNF-alfa ailesine ait transmembran glikoprotein olan osteoklastojenik ligand RANKL (nükleer faktör kappa  $\beta$  ligandın reseptör aktivatörü) (TNF ile ilişkili aktivasyonla indüklenen sitokin = TRANCE) tanımlanmıştır. Bu molekül hematopoietik hücreler üzerinde Nükleer Faktör- $\kappa\beta$  reseptör aktivatörü (RANK) için bir liganddır. RANK, TNF reseptör büyük ailesinin bir diğer üyesidir. 616 aminoasitten oluşan homotrimerik bir transmembran proteindir. Bu proteine ait genin kromozom 18q22 üzerinde olduğu bildirilmiştir.<sup>169</sup> RANK proteininin osteoklast öncülleri, olgun osteoklastlar, dendritik hücreler ve meme bezleri ile bazı kanser hücrelerinde (meme ve prostat gibi) ekprese edilebildiği bildirilmiştir.<sup>170</sup>

Kemik yeniden yapılanmasının önemli bir hücresel komponenti olan osteositler osteoblastlardan köken alan ve kemik matriksi içinde gömülü hücrelerdir. Mikrokırıklar ya da mekanik yüklenmenin kaybı gibi çeşitli uyarıcı faktörler ilk olarak osteositler tarafından algılanarak bu osteositlerin dendritik uzantıları aracılığı

ile kemik yüzeyindeki osteoblastlara ve kemik sıra hücrelerine iletilir.<sup>171, 172</sup> Böylece yeniden yapılanmanın ilk aşaması olan osteoklastogenez tetiklenir.<sup>173</sup>

Membran bağlı ya da salınabilir formda bulunabilen M-CSF, reseptörü olan c-fms (proto-onkogen) ile etkileşerek hematopoietik öncüllerin farklılaşması ve çoğalmasını uyarır. Bunu daha sonra preosteoklastlarda RANK ekspresyonu izler. RANK eksprese eden osteoklast öncülleri ile RANKL eksprese eden osteoblastların etkileşimi osteoklastogenez için esastır (Resim 3) . Bu sayede NF-kB, c-Fos, aktive T hücrelerin nükleer faktörü 1 (NFATc1) gibi transkripsiyonel faktörlerin rol aldığı osteoklastojenik kaskad başlar.<sup>174</sup> PTH, paratiroid hormonla ilişkili peptid (PTHrP), TNF-  $\alpha$ , IL-1, IL-11, tiroid hormonu, 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> ve PGE<sub>2</sub> gibi faktörler RANKL aktivasyonu yoluyla osteoklastogenezini uyarırlar.<sup>24</sup>

Osteoblastlar aynı zamanda RANKL'a bağlanarak RANK/RANKL etkileşimini bloke edebilen TNF reseptör büyük ailesinden bir tuzak reseptör olan osteoprotegerin (OPG) üretir ve salgırlar. Wnt-beta katenin sinyalleşmesi osteoblastik hücrelerden osteoprotegerin ekspresyonunu direk olarak düzenler.<sup>175</sup> Kemik rezorpsiyonunu uyaran faktörler osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu artırırken, bunların bazıları OPG ekspresyonunu da azaltırlar.<sup>176</sup> RANKL'ın osteoprotegerine oranı (RANKL/OPG) osteoklastogenez düzeyini belirler.<sup>177</sup>

OPG tüm canlı modellerinde osteoklast oluşumunu ve kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir çünkü canlılarda osteoklast farklılaşması mutlak olarak RANKL ekspresyonuna bağımlıdır.<sup>174</sup> Transgenik farelerle yapılan çalışmalar göstermiştir ki, OPG'nin aşırı ekspresyonu osteopetrozise yol açmakta, OPG'den yoksun bırakılmış fareler ise şiddetli osteoporoz fenotipi göstermekte ve artmış kırık riski taşımaktadırlar.<sup>178</sup> RANKL'a karşı geliştirilen bir monoklonal antikorun postmenopozal kadınlarda kemik rezorpsiyonunu uzun süre inhibe ettiği gösterilmiştir .<sup>179</sup>

RANKL'a karşı geliştirilen insan monoklonal antikoru (denosumab) osteoporozlu bayanlarda vertebral, non-vertebral ve kalça kırık riskinde azalma ile ilişkilidir.<sup>180</sup> Yapılan iki faz 3 çalışmada Denosumab ile kemik döngüsü belirleyicilerindeki azalmanın ve KMY'de meydana gelen artışın Alendronata göre belirgin olarak fazla olduğu bildirilmiştir.<sup>181, 182</sup> Kemik hücreleri RANKL'ın membran bağlı formunu eksprese ediyor görünmektedir, böylece RANK'ın aktive

olması için osteoblastların fiziksel olarak osteoklast öncülleri ile etkileşmesi gerektiği söylenebilir. Solüble(çözünebilir) RANKL membran bağlı formun TNF-alfa dönüştürücü (converting) enzim (TACE), disintegrin ve metalloproteinaz 10 (ADAM 10), matriks metalloproteinaz (MMP) gibi proteinazlar tarafından proteolitik olarak ayrılması ile oluşturulabileceği in vitro çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>183</sup> Solüble RANKL T lenfositlerce de üretilebilir ve RANK'ı bağlamada membran-bağlı RANKL kadar aktiftir.<sup>184</sup> Malign hücreler membran bağlı M-CSF, RANK, PTHrP, sitokinler ve prostaglandinler üreterek osteoklastogenezi artırabilirler. Kemik iliği stromal/osteoblastik hücrelerinin yanı sıra aktive B ve T lenfositler, memeli epitelyum hücreleri, keratinositler, vasküler endotelyal hücreler, sinoviyal fibroblastlar, periodontal doku içindeki hücreler, hipertrofik kondrositler de RANKL üretebilmektedir.<sup>185</sup> Fizyolojik kemik yeniden yapılanmasında stromal/osteoblastik sıra hücrelerinin RANKL için asıl kaynak olduğu varsayılır. Bunun yanında yapılan insan deneyleriyle gösterilmiştir ki postmenopozal bayanlarda T ve B lenfositlerden izole edilen RANKL protein seviyesi pre-menopozal bayanlara veya post-menopozal östrojen replasman tedavisi alan bayanlara göre artmaktadır.<sup>186</sup> Dolayısıyla seks steroidlerinin kaybıyla ilişkili olarak artmış kemik rezorpsiyonunda lenfositlerin RANKL üretiminde artış da önemli rol oynuyor olabilir.

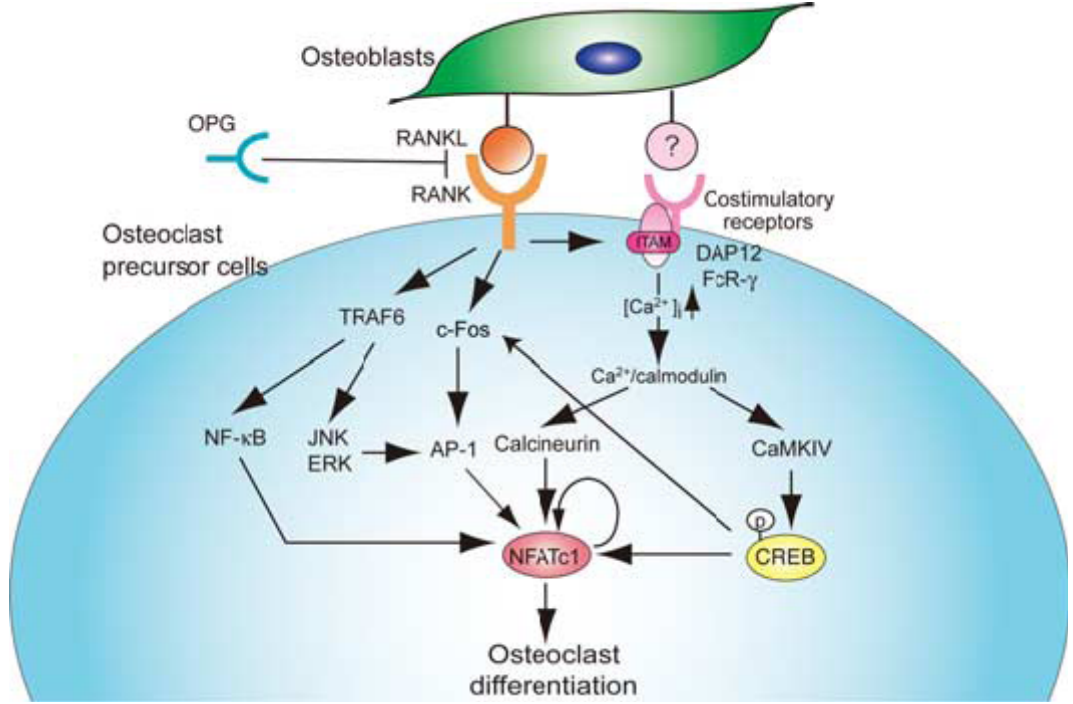
Osteoblast ve osteoklastlar arasındaki bir diğer etkileşim Notch sinyalleşmesidir. Notch ligandı osteoklastlar üzerinde ekprese edilirken, osteoblastların Notch 1'den yoksun olması azalmış OPG üretimi ve osteoklast sayısında artışla sonuçlanmıştır.<sup>187</sup> Dolayısıyla osteoblast-osteoklast etkileşimi Notch sinyalleşmesini aktive ederek artmış OPG üretimine, RANK sinyalleşmesi ve osteoklastogenezin inhibisyonuna katkı sağlayabilir.

OPG gen polimorfizmleri KMY'de farklılıklar ve osteoporotik kırıklarla ilişkili bulunmuştur.<sup>188,189</sup> Buna ek olarak RANK/RANKL/OPG sistemi damarsal kalsifikasyonla ilişkili de olabilir.<sup>178, 190</sup> İnsanlarda yüksek OPG serum düzeyleri kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kronik böbrek yetmezliği ile ilişkili görünmektedir.<sup>191</sup>

İnsanlarda RANK geni 1. ekzonunun aktive edici mutasyonu ile RANK-aracılı NF-kB sinyalleşmesinde, osteoklast formasyon ve aktivitesinde artış olduğu görülmüştür.<sup>192</sup> RANK geni polimorfizmlerinin KMY ile ilişkisi çeşitli çalışmalarda



incelenmiş olup cinsiyet, etnik köken ve kemik bölgelerindeki farklılıklara bağlı olarak değişik sonuçlar elde edilmiştir.<sup>193</sup> İnsanlarda henüz RANK geni inhibe edici mutasyon ya da delesyonu saptanmamıştır.



Resim 2.3 : Osteoklast farklılaşmasının şematik sinyal kaskadı. Osteoklastogenez RANKL, M-CSF ve bazı tanımlanamayan ligandlar üreten osteoblastlar veya kemik iliği stromal hücreleri tarafından desteklenir. RANK-RANKL etkileşimi TRAF6'yı aktive eder, bu da NF-κB ve MAPK'yı aktive eder. Osteoklastogenez için anahtar bir transkripsiyon faktörü olan NFATc1'in uyarılması transkripsiyon faktörleri NF-κB ve AP-1 bağımlıdır. RANK için diğer bir kostimülatör sinyal, immün-reseptörler (OSCAR, TREM-2) ile ilişkili ITAM içeren uyarlayıcılar (FcR $\gamma$ , DAP-12), kalsiyum sinyalleşmesini uyarırlar. NFATc1 kalsiyum sinyalleşmesi sonucu kalsinörin ile defosforile edilerek çekirdeğe taşınır. Kalsiyum/kalmodulin kinaz IV (CaMKIV) cAMP cevap elemanı bağlayan proteini (CREB) aktive eden önemli bir kinazdır. CREB osteoklast farklılaşması için önemlidir. c-Fos uyarılması da CREB aracılığı ile de gerçekleşebilir. Hücre çekirdeğinde NFATc1 AP-1, PU 1, MITF ve CREB gibi transkripsiyon faktörleri ile birlikte osteoklast spesifik genleri uyararak için çalışır.<sup>194</sup>

## 2.4 Osteoporoz Tanısı İçin KMY Ölçümü

Kemiğin gücü kemik yoğunluğu ve kalitesinden etkilenmektedir.<sup>1</sup> KMY'deki her bir standart deviasyon azalma ile kırık riski arasında açık bir korelasyon vardır ve etkilenen bölgeye göre kırık riskini 1.5 ila 3 kat arasında arttırır.<sup>195</sup> Osteoporotik frajilite kırıklarının önlenmesi hospitalizasyon, dizabilitiye yol açması ve komorbid durumlar açısından önemlidir. Özellikle de kalça kırıklarının, yol açtığı medikal harcamalar yanında %20 kadarının ilk yıl içinde ölümlerle sonuçlanması nedeniyle de önemi büyüktür.<sup>196</sup> Yaşlanan nüfustaki artmaya bağlı olarak günümüzde ve ileride osteoporozla bağlı kırıklar gittikçe daha çok artacaktır. 2025 yılında yıllık kırık sayısının 3 milyondan fazla olacağı beklenmektedir.<sup>197</sup> Frajilite kırıklarının ilişkili olduğu morbidite ve mortaliteden uzun yıllardır haberdar olunmasına rağmen, bu konuda ilerleme osteoporoz tanısına kırık gelişmeden tanı konabilmesi ve etkili tedavilerin geliştirilmesi ile sağlanmıştır.<sup>198</sup>

Önceden oluşmuş bir kırık varlığı gelecekteki kırık riskinin güçlü bir belirleyicisidir. Var olan vertebra kırığı hastalarda göreceli vertebra kırığı riskini 4-7 kat kadar arttırır, aynı zamanda diğer iskelet bölgelerinde kırık oluşma riskini de arttırır.

Osteoporoz ve kırık riskinde artışa neden olabilecek pek çok faktör sıralanabilir. Kemik kaybı ve osteoporotik kırık için yaş, KMY kadar önemli bir risk faktörüdür ve KMY'den bağımsız olarak kırık riskine katkıda bulunmaktadır.<sup>199</sup> Bunun yanında vücut kitle indeksi daha düşük olanlarda KMY'nin de düşük olabileceği bildirilmektedir.<sup>200</sup> Bu konuyla ilgili büyük bir çalışmada ağırlıktaki her 1 kg artışın lomber omurga KMY'sinde  $0.004 \text{ g/cm}^2$ , femur boynu KMY'sinde ise  $0.005 \text{ g/cm}^2$  artış ile korele olduğu bildirilmiştir.<sup>201</sup> Yağsız kemik kitlesi fiziksel aktivite düzeylerini yansıtması açısından önemlidir, yağ kitlesi ise östrojen kaynağını yansıtmaktadır. Fakat yüksek yağ kitlesinin kas kitlesi de yüksek olduğunda koruyucu olduğu gösterilmiştir.<sup>202</sup> Yağ kitlesinin KMY üzerine etkisi daha çok ileri yaşlarda olur. 60 yaşından genç bayanlarda yağsız vücut kitlesi esas KMY belirleyicisi iken, 60 yaş üstü bayanlarda vücut yağ oranı KMY için esas belirleyicidir.<sup>203</sup>

Etnik farklılıkların KMY'ye etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>204</sup> Geniş bir kohortta Afrika-Amerikalıların en yüksek KMY değerine, Asyalıların en düşük KMY'ye, beyaz ve İspanyol kadınlarınsa en yüksek kırık riskine sahip olduğu bildirilmiştir.<sup>205</sup>

KMY ırklar arasında farklılıklar gösterebilmektedir. Beyaz ırk düşük KMY için bir risk faktörüdür.<sup>200</sup>

40-60 yaş arası bayanlarda düşük kemik kitlesi açısından çeşitli risk faktörü olabilecek etkenler sistematik bir derlemede incelenmiştir.<sup>206</sup> Yüksek kalsiyum alımı ile KMY arasında bazı çalışmalarda belli iskelet bölgelerinde ilişki saptanmıştır,<sup>207</sup> bazı çalışmalarda ise böyle bir ilişki saptanamamıştır.<sup>208</sup> Bir çalışmada geçmişte düşük kalsiyum alımı ile düşük spinal KMY arasında ilişki bulunmuştur.<sup>209</sup> Oral kalsiyum suplementasyonunu takiben yaklaşık 4 saat içinde paratiroid hormon sekresyonunun azalması ile kemik rezorbsiyon parametreleri düşer. İlerleyen yaşlarda kalsiyum ve D vitamini desteğinin kalça kırık riskini azalttığı bildirilmiştir.<sup>210</sup>

Fiziksel aktivite kemik mineral yoğunluğu artışına ve barsaklardan kalsiyum emiliminin artışına katkıda bulunur.<sup>210</sup> Egzersiz daha belirgin olarak kortikal kemik geometrisini ve kortikal KMY'yi etkiliyor gibi görünmektedir.<sup>211</sup>

Sigara yeni kemik yapımını azaltabilir,<sup>212</sup> kalsiyumun emilimini bozabilir,<sup>213</sup> erken menopoza yol açabilir, karaciğer enzimleri aktivitelerindeki artış ile D vitamini düzeylerinde azalmaya neden olabilir.<sup>214</sup> Büyük bir çalışmada sigara içmekte olanlar ile hiç içmeyenler arasında anlamlı KMY farkı olduğu, buna ek olarak günde içilen sigara ile D vitamini düzeyi ve osteokalsin düzeyleri arasında negatif ilişki olduğu saptanmıştır.<sup>214</sup> Meta-analizlerde de içilen sigara sayısı ile KMY'deki düşüş arasında doza bağımlı ilişki bildirilmiştir. Yaş ve vücut ağırlığına göre düzeltilmiş istatistik analizlerden sonra bile sigara içmiş ya da içmekte olan kişilerde kemik kaybı daha fazla olarak saptanmıştır.<sup>215</sup> Mevcut sigara içiciliği sigara içmeyenlere göre anlamlı derecede kırık riski artışı ile birlikte. En fazla risk artışı kalça kırığında olup, eskiden sigara içme öyküsü olanlarda da kırık riski hiç içmeyenlere göre anlamlı olarak yüksektir fakat risk oranları mevcut sigara içicilerinden düşüktür.<sup>216</sup> Kırık iyileşmesi de sigara içenlerde gecikebilir, yetersiz ya da bozuk olabilir.<sup>217</sup>

Az miktarda alkol tüketimi (günde iki birim veya daha az) KMY'yi arttırdığı bildirilmiştir.<sup>218</sup> Fazla miktarda alkol tüketiminin ise malnütrisyon, hormon panelinde değişiklikler, kemik kitlesinde azalma, düşme sıklığında artışla beraber artmış kırık riski ve kırık iyileşmesinde gecikmeye neden olduğu bildirilmiştir.<sup>210</sup>

Günlük 300 mg'a kadar kafein alımının kemik yoğunluğuna etkisi olmadığı bildirilmiştir.<sup>219</sup> 300 mg/gün'ün daha üstünde kafein alımı varlığında özellikle düşük kalsiyum alımı da (<750 mg/gün) mevcut ise olumsuz etkilerin olabileceği bildirilmektedir.<sup>210</sup>

Glukokortikoid tedavisi kemik kaybını hızlandırdığı çok iyi bilinen bir faktördür. 6 ay veya daha uzun süreli olarak günde 5 mg veya daha yüksek dozda prednisolon veya eşdeğeri glukokortikoid tedavisinin düşük KMY ile ilişkisi tanımlanmıştır.<sup>220</sup>

Tiroid hormon fazlalığı da KMY düşüklüğüne neden olan bir diğer durumdur. Hipo ve hipertiroidizm artmış kırık riski ile ilişkilidir.<sup>221</sup> Luteinizan hormon-salan hormon (LHRH) agonistleri, aromataz inhibitörlerinin de kemik kitlesini azalttığı rapor edilmektedir. Buna neden olarak hipogonadizm yapmaları öne sürülmektedir.<sup>222, 223</sup>

Aynı şekilde anoreksiya nervosa da hipogonadizm nedeni olabilir.<sup>224</sup>

Kas-iskelet, gastrointestinal sistemleri ya da akciğeri tutan kronik inflamatuvar durumlar, kronik böbrek hastalığı ya da organ nakli de azalmış KMY ve artmış kırık riski ile birliktedir.<sup>225</sup>

Geç menarş yaşı ve düşük KMY arasındaki ilişkinin incelendiği dört çalışmadan ikisinde anlamlı bir ilişki saptanamamışken,<sup>226, 227</sup> bazı çalışmalar geç menarş yaşı olan bayanlarda KMY'nin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.<sup>207</sup> Geç menarş yaşı düşük KMY için minör bir risk faktörü olarak değerlendirilebilir.

Reproduktif dönem içinde amenoreik dönem varlığı ile düşük KMY arasındaki ilişki tartışmalıdır. Bu konuda literatürde çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. 3 ay veya daha uzun süreli amenoreik dönem ile KMY ilişkisini inceleyen bir çalışmada herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır.<sup>228</sup> Bu durum uzamış amenore durumunda meydana gelebilecek kemik kitlesindeki kaybın menstruasyonun tekrar başlaması ile yeniden kazanılabileceği, bu yüzden geç dönemde amenoreik dönemin etkisinin fark edilemeyeceği şeklinde açıklanabilmiştir.

Hamilelik ve laktasyon östrojen ve prolaktin düzeylerinde değişmelere neden olur. Gebeliğin üçüncü trimesterinde plasental östriol yapımı artışına bağlı olarak östrojen düzeyleri artarken, laktasyon sırasında prolaktin artışına bağlı hipoöstrojenemi olur. Doruk kemik kitlesine erişmiş bir kadında gebelik aşırı kemik rezorpsiyonuna neden olmazken, erken yaşta ya da ergenlikte gebelik doruk kemik kitlesine ulaşmayı zorlaştırabilir.<sup>229</sup> Parite ve laktasyon öyküsü ile KMY arasında yapılan çalışmalarda anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.<sup>227, 207</sup> Laktasyon sırasında kalça ve omurga KMY'lerinde meydana gelen yaklaşık %5-7 kayıp süttten kesilme ve menstruasyonların başlamasını takiben 6-12 ay içinde geri kazanılabilir.<sup>230</sup>

Menopoz varlığı ve menopozdan beri geçen yıl sayısı KMY ile aşikar olarak negatif korelasyon göstermektedir.<sup>207</sup>

Ailede birinci derece yakınarda fragilite kırığı varlığı düşük KMY ve kırık riski ile ilişkili olabilir.<sup>231</sup>

Dual enerji X-ışını absorpsiyometri (DXA/DEXA) klinik pratikte rutin kullanıma 1987 yılında girmiştir.<sup>232</sup> Bunu takiben de Dünya Sağlık Örgütü (WHO) postmenopozal beyaz ırktan bayanlarda omurga, kalça ve ön kol DEXA ölçümü ile T skorlarına göre osteoporoz açısından bir sınıflama yapmıştır.<sup>233</sup>

Postmenopozal beyaz kadınlarda omurga, kalça ve önkolda kemik mineral yoğunluğuna göre WHO sınıflaması:<sup>234</sup>

Normal: T skoru  $\geq -1.0$

Osteopeni:  $-2.5 < T \text{ skoru} < -1$

Osteoporoz: T skoru  $\leq -2.5$

Yerleşmiş osteoproz: T skoru  $\leq -2.5$  ve bir ya da daha fazla fragilite kırığı varlığı

Son yıllardaki en önemli gelişme hastaların sahip oldukları klinik risk faktörleri ve kalça DEXA incelemesi kombinasyonu ile 10 yıllık kırık olasılığının hesaplandığı kırık riski değerlendirme aracının (FRAX) sunulmasıdır.<sup>235</sup>

Günümüzde DEXA ile KMY ölçümleri osteoporoz tanısı, kırık riskinin değerlendirilmesi ve tedavinin izlenmesinde önemli bir role sahiptir.<sup>236</sup> Genellikle tercih edilen metod santral (central) DEXA yöntemi ile proksimal kalça ve lomber omurga KMY ölçümüdür.<sup>237</sup> Bunun nedeni kalça KMY ölçümünün kalça kırık riskini değerlendirmek için en kullanışlı yöntemken, lomber omurga KMY

ölçümünün tedavi monitorizasyonu için en kullanışlı yöntem olarak bildirilmesidir.<sup>238, 239</sup> Pratikte periferik DEXA (pDEXA) (ön kol, topuk, el parmakları) ve kantitatif ultrason (QUS) (topuk, tibia, patella vs.) yöntemleri kullanılarak yapılan ölçümler santral DEXA ölçümü ile zayıf olarak koreledir.<sup>240</sup> Değerlendirme esnasında tanı için en düşük değerlerin alınması önerilir.<sup>241</sup> Postmenopozal beyaz kadınlarda ve 50 yaş üstü erkeklerde kalça ve omurga DEXA ölçümlerinin WHO'nun tanımladığı T skoruna göre osteoporoz sınıflamasına göre yorumlanması konusunda görüş birliği mevcuttur.<sup>241</sup>

DEXA yönteminin avantajları hızlı değerlendirme, bireyleri pozisyonlama açısından kolaylığı, düşük radyasyon dozu (radyasyona maruz kalma değeri omurga için 2 µSv, proksimal femur için 5.4 µSv iken göğüs radyografisi için 25-60 µSv'dir), duyarlı ve hassas bir ölçüm sağlaması olarak sıralanabilir.

DEXA ölçümünde belirlenen T ve Z skoru hesaplanması:

Z skoru: (ölçülen KMY-yaşa uygun ortalama KMY)/ yaşa uygun popülasyonun standart deviasyonu

T skoru: (ölçülen KMY-geçerli erişkin ortalama KMY)/geçerli erişkin popülasyonun standart deviasyonu

DEXA sonuçlarının rapor edilmesi öncesi ölçüm görüntüleri dikkatle gözden geçirilerek kemik ya da yumuşak doku üzerinde sonucu etkileyebilecek artefakt olmadığından ve görüntülemenin doğru şekilde yapıp analiz edildiğinden emin olunmalıdır. Yaşlı bireylerde-özellikle 65 yaş ve üstü-omurga DEXA ölçümü dejeneratif değişiklikler ve osteofitlere bağlı olarak yalancı yüksek kemik mineral yoğunluğu ile sonuçlanabilir. Gözden geçirme sırasında bu tip vertebralar analiz dışı bırakılmalıdır. Omurga değerlendirmesinde uygun en az iki vertebra olmalıdır.<sup>241</sup>

Uzun dönem takip çalışmaları sonucunda düşük KMY ile tüm kırık tiplerinin insidansında artış olduğu, kalça KMY'sinin omurga veya diğer periferik bölge KMY ölçümlerine göre daha kuvvetli ilişkide olduğu saptanmıştır.<sup>242, 238</sup>

Ward's üçgeni ölçümü tanı için kullanışlı değildir, önerilmemektedir.<sup>241</sup>

Ön kol KMY ölçümü rutinde önerilmemektedir. Bununla beraber paratiroid hormonun kortikal kemik üzerine katabolik etkisi bilinmektedir, radius distal %33'ü uygun kortikal yapı sağlaması nedeniyle primer hiperparatiroidi değerlendirmesinde ön kol KMY'si kullanılır.<sup>243</sup>

Premenopozal bayanlar ve 50 yaş altı erkeklerde ve çocuklarda ise T skoru değil, Z skoru değerlendirilmesi kullanılması önerilmektedir. -2.0 ya da daha düşük Z skoru yaşa göre beklenen aralığın altında olarak yorumlanır ve kemik kaybı etyolojisi açısından inceleme gerekir.<sup>241</sup>

## 2.5 Genetik ve Hastalıkların İlişkilendirilmesi

Mendel kanunları Avusturyalı bir papaz olan Gregor Mendel 'in genetik ilmiyle ilgili olarak bulduğu biyoloji kanunları. Manastırın bahçesinde bezelyeleri birbirleriyle çaprazlayarak (eşleştirerek) kalıtım için ilgi çekici sonuçlar buldu. Bugün bu sonuçlar Mendel kanunları adıyla anılmaktadır. Çalışmalarını yaptığı dönemde kromozom ve genlerin varlığı bilinmemesine rağmen, özelliklerin "faktör" adını verdiği birimlerle nesilden nesile aktarıldığını söyledi. Bugün bu birimlere, gen denmektedir. Mendel 1857 yılında bezelyelerle yaptığı çalışmalar sonucunda kalıtım yasalarını bulmuştur. Bunlar:

1- Eşitlik (İzotipi) kanunu; çeşitli kalıtsal karakterlerin, faktörleri (genler) tarafından kontrol edildiğini ve bu faktörlerin çiftler halinde bulunduğunu ifade etmektedir.

2- Baskınlık(dominantlık) kanunu; çiftler halinde bulunan faktörlerden (genlerden) biri diğerini maskeleyebilir veya varlığını göstermesine mani olabilir.

3- Ayrılma kanunu: Kalıtsal belirleyiciler gamet hücreleri aracılığı ile dölden dölle nakledilir. Eşey hücreleri oluşumu sırasında, ayrılan allellerin taksimi tamamen bağımsız ve eşit şekilde gerçekleşir. Örneğin Ss allel çifti taşıyan bir annenin allelleri S ve s 'dir. Oluşacak eşey hücresine, bu karakter belirleyicisinin S alleli iletilir, diğer hücreye de s alleli iletilir. Her eşey hücresi her bir karaktere ait sadece bir allel taşıyabilir.<sup>244</sup>

Genom terimi, 1920 yılında Alman botanikçi Hans Winkler tarafından tüm haploid kromozom seti içindeki gen topluluğu olarak tanımlandı. Günümüzde bu terim, sadece genleri değil haploid kromozom setindeki tüm DNA'yı da içine alacak şekilde genişletildi. İnsan genomunda yaklaşık 3 milyon nükleotid bulunduğu belirtilmektedir (A, C, T ve G). Gen terimi ise bir polipeptidin yapısı, m-RNA veya t-RNA yapısını tayin eden nükleotid dizisidir. Gen, kalıtımın temel fiziksel ve işlevsel birimidir.

İnsan genomunun sadece %2-3'ü genler tarafından temsil edilmektedir. İnsan genomunda yaklaşık 30,000-35,000 arasında gen bulunduğu düşünülmektedir. Hepsi birbirinden farklı olmakla beraber, bir gende ortalama 3000 nükleotid vardır. İnsan genomu Homo sapiens'in genomudur. 23 kromozom çifti üzerinde bulunur, bunlardan 22 çifti otozomal kromozomdur, kalan çift ise cinsiyeti belirler. Haploid insan genomu toplam 3 milyar DNA baz çiftinden biraz fazla uzunluktadır. İnsan genleri kromozomlar üzerindeki dağılımı homojen değildir.

İnsan Genom Projesi ile elde edilen ökromatik insan genom referans dizisi biyomedikal bilimlerde kullanılmaktadır.<sup>245</sup>

Haploid insan genomu tahminen 20,000-25,000 protein-kodlayıcı gen içermektedir. Ökaryot genlerinde DNA'nın kodlanan dizisine *ekzon* adı verilir. Önce RNA'ya daha sonra da polipeptide tercüme edilecek olan ve birbirinden kodlama yapmayan intron parçaları ile ayrılan dizilerdir. DNA protein kodlayıcı diziler (yani ekzonlar) insan genomunun %1,5'inden azını oluşturur, geri kalanı RNA genleri, düzenleyici diziler, intronlar ve "çöp" DNA'dan oluşur.<sup>245</sup>

Genom haritası genom dizisinden çok daha az ayrıntılıdır ve esas amacı genomda belli bir bölgeyi bulmaktır. Varyasyon haritasına örnek Uluslararası HapMap Projesi tarafından oluşturulmakta olan HapMap'dır. HapMap, İngilizce Haplotype Map'in (haplotip haritası) kısaltmasıdır, "DNA dizi varyasyonlarında görülen ortak örüntüleri betimleyecek" bir insan genom haritasıdır.<sup>246</sup> Genomdaki küçük ölçekli (yani tek bazlık) varyasyonların örüntülerini kataloglamaktadır. İngiltere, ABD, Kanada, Japonya, Nijer ve Çin'den 200 bilim adamının çalıştığı, bir özel kamu ortaklığı olan Uluslararası HapMap Konsorsiyumu, Asya, Afrika ve ABD'den 269 kişinin kanlarından alınan DNA örneklerini kullanarak HapMap haritasını geliştirdi. İnsan genetik kodlarını oluşturan 3 milyar harfin dizilimlerini bir haritada birleştiren İnsan Genom Projesi (HGP) için kullanılan DNA, adı bilinmeyen 12 gönüllüden alınmıştır. Akraba olmayan herhangi iki insanın genom sekansı sadece %99.9 oranında benzerdir, tam bir sekans yoktur. DNA'nın 3 milyon baz çiftindeki %0.1'lik fark çok ilginç bir şekilde bizi birbirimizden ayırmaktadır. Kalıtsal hastalıklara yol açan gen mutasyonları bütün olarak popülasyonda oldukça nadirdir ve bundan dolayı bu varyasyonların sadece çok az bir kısmından sorumlu olmaktadır. Çok büyük kısmı, çeşitli ve farklı varyantların (allellerin) oldukça yaygın olduğu



sekans polimorfizmlerinden oluşmaktadır. Birçok ulustan bilim adamlarının biraraya gelmesiyle yapılan çalışma sonucunda, şimdi de bu yüzde 0.1'lik farkı açıklamak için Hapmap haritası çıkarılmıştır.

Tek baz çifti değişiklikleri tek nükleotid polimorfizmi (İngilizcesi *single nucleotide polymorphism* in kısaltması *SNP* olarak bilinir) adını alır. SNP'ler genomda tek bir nükleotid değiştiğinde açığa çıkan DNA dizi varyasyonlarıdır. Örneğin bir SNP, DNA dizisini AAGGGCTAA'dan → ATGGGCTAA'ya değiştirebilir. SNP'ler transisyon- bir pürin bazın (A,G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazın (C,T) diğer pirimidin bazına değişmesi- ya da transversiyon-bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi- şeklinde gerçekleşebilir. Tek nükleotid pozisyonundaki varyasyon terminolojisi *allel frekansı* ile açıklanmaktadır.

Bir insanı diğerinden farklı kılan SNP'lerin farklı dizilimleridir. HapMap projesi SNP'lerin bölge bölge gruplandığını (haplotipler) ve enformasyon blokları olarak insandan insana kalıtım yoluyla geçtiğini göstermektedir. İnsanlarda yaklaşık 10 milyon SNP bulunmakta ve biraraya gelmiş bir SNP setine ise "*haplotip*" denilmektedir. SNP'lerin DNA'mızda bulunup bulunmaması bizi bu haplogrupların içine dahil eder. Zamanla genom içinde yeni SNP'ler dolayısı ile yeni haplogruplar oluşabilmektedir.

Araştırmacılar, DNA dizisinde büyük ölçekli yapısal varyasyonların ilk haritasını Mayıs 2008'te yayımladılar. Büyük ölçekli yapısal varyasyonlar, kişilerin genom dizileri arasında uzun DNA dizilerinin toptan eklenmesi, kaybı veya yer değiştirmesinden oluşan farklılıklardır.

Genetik bilgiyi taşıyan belli bir kromozom bölgesindeki (lokus) gen dizileri bireylerde alternatif şekillerde bulunabilir, bunlar o genetik dizinin allelik formları olarak adlandırılır. Birçok gen için tüm bireylerde o gen dizisi tek bir şekilde bulunur ve '*wild-type*' (doğal tip) olarak adlandırılır. Bir toplumda farklı diziler belli bir sıklıkta bulunuyorsa bu durum o lokusun polimorfizmi olarak tanımlanır. SNPler kromozomal bölge işaretleyicisi olarak kullanılabilir. Çünkü hibridizasyon veya PCR yöntemleri allelleri tanımlamak ve tespit etmek için kullanılmaktadır.

Her ebeveynin kromozom çiftleri farklı SNP'lere sahip olacağından, her çocuğa aktarılan farklı SNP saptanabilir. Mutasyon ise DNA sekansındaki hastalığa neden olan değişiklik olarak tanımlanır. Genomik, kromozomal ve gen mutasyonları

olabilir. Gen mutasyonları nokta mutasyonları, delesyonlar, insersiyonlar, çerçeve kayması mutasyonları, duplikasyonlar ve trinükleotid tekrar uzamaları şeklindedir. Klasik olarak fenotipe olumsuz etkisi olan her tür DNA varyantı mutasyon kabul edilirken etkisiz ya da benign etkili varyantlar polimorfizm olarak kabul edilmiştir. Ancak multifaktöriyel hastalıkların genetiği ile ilgili son çalışmalar polimorfizmlerin de bir araya gelerek ya da çevresel faktörlerle etkileşerek fenotipe etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Bir diğer tanımlama ise toplumda az rastlanan allelin sıklığı %1 den sıkısa polimorfizm, eğer daha nadirse mutasyon olarak yorumlamanın doğru olduğu şeklindedir.<sup>247</sup>

İnsan genetik varyasyonu üzerine yapılan çoğu araştırma, SNP'ler üzerine yoğunlaşmıştır. SNP'ler genomun hem kodlama yapan hem de yapmayan bölgelerinde açığa çıkabilir. Birçok SNP'nin hücre fonksiyonu üzerine hiçbir etkisi yoktur, ancak bilim adamları diğerlerinin insanları hastalıklara yatkın hale getirdiğine ya da bir ilaca verecekleri cevabı etkilediğine inanmaktadır.

Tıbbi genetik açısından genetik hastalıkların ana tipleri şu şekilde gruplandırılabilir:

1. Tek gen hastalıkları: (Mendelyen veya monogenik): Bir tek gen veya gen çiftinin etkisiyle oluşan, basit kalıtım paternine sahip hastalıklardır.
2. Kromozom anomalileri: Down veya Turner sendromlarındaki gibi sayısal ve yapısal kromozom bozukluklarıdır.
3. Multifaktöriyel hastalıklar: Genetik ve genetik dışı etkilerin bileşimi sonucu oluşan hastalıklardır (demans, epilepsi, migren, kanserler gibi).

Toplumdaki hastalıkların çoğu bir veya daha fazla gen ile çevresel faktörlerin etkileşimini içeren karmaşık (kompleks) etyolojiye bağlı olarak gelişir. Bu hastalıklar da bazen tek bir gen hastalığı oluşturabilir, bazen de diğer genler veya çevresel faktörler genetik yatkınlığa eklendiği zaman aynı hastalık gelişir. Toplumda sık görülen diğer hastalıklar gibi nörolojik hastalıkların bazıları Mendel tipi ya da Mendelyen kalıtım özelliği, çoğu ise kompleks kalıtım özelliği gösterir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Çalışma Evreni

Çalışma evrenini 2008-2010 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniği ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na bağlı Menopoz-Osteoporoz polikliniği'ne osteoporoz araştırılmak üzere başvurup takip ve tetkik edilen, yaşları 45-65 arasında olan postmenopozal kadınlar oluşturdu. Çalışmayı kabul eden tüm gönüllüler için olgu rapor formu dolduruldu. Olgu rapor formuna boy ve kilo değerleri, öğrenim ve medeni durumları, menarş ve menopoz yaşı, reproduktif süre içinde amenoreik dönem varlığı ve süresi, hamilelik öyküsü (canlı doğum, düşük ve kürtaj sayısı ve gebe olarak geçirilen süre), emzirme süresi, alkol ve sigara kullanımı, günlük kalsiyum alımı, fiziksel aktivite düzeyleri, kırık öyküsü, aile öyküsünde kırık varlığı ile ilgili bilgiler kayıt edildi. Olguların beden-kitle indeksleri  $\text{kg/m}^2$  cinsinden hesaplandı. Olguların ölçülmüş olan femoral ve lomber bölge KMY değerleri ve T skoru değerleri kaydedildi.

#### 3.2 Çalışmaya Alınma Kriterleri

Çalışmayı kabul eden olgular normal (kontrol) ve düşük KMY değerine sahip (hasta) olmalarına göre iki grupta incelendi.

Düşük KMY'li (Hasta) grup için:

- 1) 45-65 yaş arası olmak
- 2) Herhangi bir bölge T skorunun  $< -1$  olması
- 3) Postmenopozal dönemde olmak = En az 1 yıldır spontan adet görmüyor olup, spontan menopoza girmiş olmak.

Normal KMY'li (Kontrol) grup için:

- 1) 45-65 yaş arası olmak
- 2) Tüm bölge T skorlarının  $\geq -1$  olması
- 3) Postmenopozal dönemde olmak: En az 1 yıldır spontan adet görmüyor olup, spontan menopoza girmiş olmak.

### 3.3 Dışlama Kriterleri

1. Geçmişte ya da şu anda herhangi bir kemik hastalığı, metabolik hastalık, kemik metabolizmasını etkileyecek otoimmün ya da endokrin hastalık ve bu hastalıklarla ilişkili tedavi öyküsü (hipertiroidizm-hipotiroidizm, hiperparatiroidi-hipoparatiroidi, Cushing Hastalığı, Addison Hastalığı, akromegali, Paget hastalığı, osteomalazi, tip 1 veya tip 2 diabetes mellitus, vs.)

2. İnflamatuvar romatolojik patoloji öyküsü (sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit, ankilozan spondilit, sistemik sklerozis, kollajen doku hastalığı, vs.)

3. Düşük KMY' ye neden olabilecek nörolojik hastalık varlığı (inme, motor nöron hastalığı, MS, MG, vs.) ya da 3 aydan uzun süreli immobilizasyon öyküsü

4. Bisfosfonat/SERM/kalsitonin/stronsiyum ranelate/kalsiyum ve D vitamini preparatı vb. gibi KMY' yi etkileyecek herhangi bir tedavi alıyor olmak ya da almış olmak

5. Oral/inhale/intravenöz glukokortikoid tedavisi alıyor ya da geçmişte almış olmak

6. Malabsorbsiyon öyküsü

7. Kalp yetmezliği

8. Karaciğer yetmezliği

9. Kronik böbrek hastalığı

10. Antikoagülan tedavi alıyor ya da almış olmak

11. Malign hastalık öyküsü

12. Antikonvülzan ilaç kullanımı ya da öyküsü

13. Son 4 ayda hormon replasman tedavisi almış olmak

14. Kronik alkolizm varlığı ya da öyküsü

15. Cerrahi menopoza öyküsü

16. 40 yaşından önce menopoza girmiş olmak

### 3.4 Araştırmanın Etik Yönü

Kesitsel ve gözlemsel bir çalışma planlandı. Olgulara tetkik kapsamında müdahale yapıldı. Genetik inceleme çalışması olması nedeniyle, tüm olgulardan genetik çalışmalar için bilgilendirilmiş yazılı onam formu alındı (*Etik kurul onay tarihi & Karar No: 26/11/2008 & 08-11/5*).

### 3.5 Ölçümler

Çalışmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan tüm olgularda şu ölçümler kayıt edildi: *Beden-Kitle indeksi*( $BKİ=BMI$ )( $kg/m^2$ ) :  $Boy/(vücut\ ağırlığı)^2$  formülü ile hesaplandı.

*KMY değerleri*: Hologic QDR 4500 dual enerji X-ray absorbsiyometri ile ölçülmüş olan L1-L4 vertebra ve proksimal femur bölgeleri KMY değerleri ve T skorları kaydedildi.

*Günlük kalsiyum alımı* : Çalışmaya katılan olgulardan yazılış şekli diyetisyen yardımıyla standart format şeklinde hazırlanıp tarif edilen 3 günlük diyet kaydı istendi. Bu yöntemle elde edilen beslenme verileri değerlendirilerek günlük ortalama kalsiyum alım değerleri bir yazılım programı Beslenme Bilgi Sistemi (BeBiS versiyon 6.0, 2006) yardımıyla hesaplandı.

*Fiziksel aktivite skoru* : Çalışmaya katılan olguların fiziksel aktivite düzeyleri Türkiye’de geçerlilik ve güvenilirlik çalışması yapılmış olan Uluslararası Fiziksel Aktivite Anketi (UFAA - International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)) ile belirlendi.<sup>248</sup>

## 3.6 Genetik Analiz

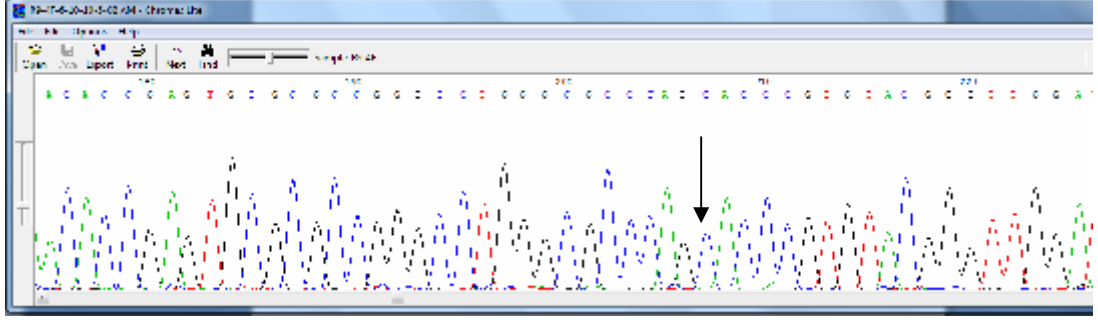
### 3.6.1 DNA izolasyonu

Hasta grubu olarak 100 ve kontrol grubu olarak 78 olmak üzere toplam 178 olgudan 2 ml EDTA'lı kan alındı. Olguların DNA izolasyonları MagnaPure LC (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) kiti ile belirtilen protokole uygun şekilde gerçekleştirildi. İzolasyon başarısı %2'lik agaroz jelde konfirme edildi.

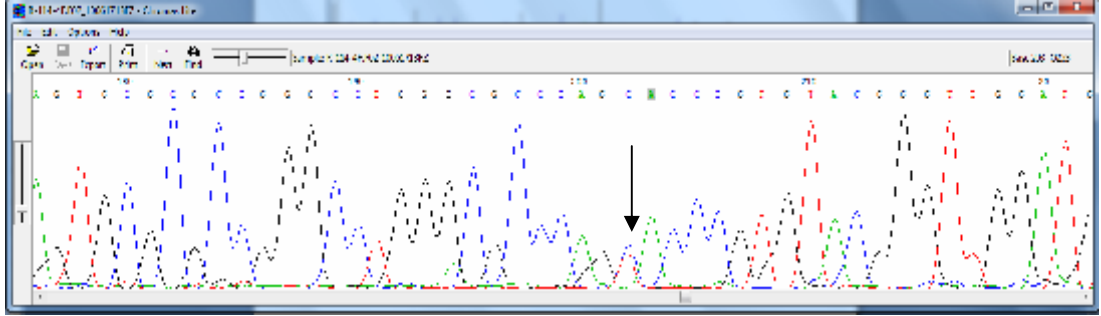
### 3.6.2 RANK geni C421T polimorfizmi saptanması

RANK geni ekzon 4'te bulunan C421T polimorfizminin saptanması amacıyla; F: tctgggctggatgttgatagc, R: tagcacctggagctttcttgc primerleri kullanılarak PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) işlemi gerçekleştirildi. Her bir örnek için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 25 µl 'dir; 12.2 µl distile su, 2.5 µl 10X PCR buffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µl dNTP (deoksiniükleotid trifosfat) (4x25 µ mol), 1'er µl primerler ve 0.3 µl Taq polimerazdan (Fermentas) oluşan karışım 0,2 ml'lik reaksiyon tüplerine dağıtıldı ve en son 5'er µl DNA örnekleri eklendi. PCR koşulları; 95°C-3 dk, 95°C-40 sn / 56°C-40 sn/72°C-45 sn: 33 siklus, 72°C-10 dk olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri, program tamamlandıktan sonra +4°C'de saklandı. İşlem sonrasında PCR ürünün içerisindeki fazla PCR bileşenlerinden ayrılmasını sağlamak amacıyla 1. Purifikasyon işlemi yapıldı (Fermentas Genejet PCR Purification Kit). Purifikasyonu takiben zincir sonlandırma yöntemi, Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems) kullanılarak cycle sequencing (sekans işlemi) protokole uygun olarak standart tekniklerle gerçekleştirildi. Sekans işlemi sonrasında ortaya çıkan PCR ürününün içerisindeki florasan işaretli ddNTP'leri (dideoksiniükleotid trifosfat) ve diğer PCR bileşenlerini ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla 2. Purifikasyon işlemi gerçekleştirildi (Zymo Research DNA Sequencing Clean Up Kit). Purifikasyon sonrası ABI 310 (Applied Biosystems) cihazında sekans protokolü izlenerek örnekler yürütüldü. Gene-Mapper yazılım programı kullanılarak her örnek için analiz yapıldı. Chromas Programı kullanılarak, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov><sup>249</sup> adresine girilip RANK geni ekzon 4 bölgesindeki 421. pozisyonda genotiplendirme yapıldı (Resim 3.1).

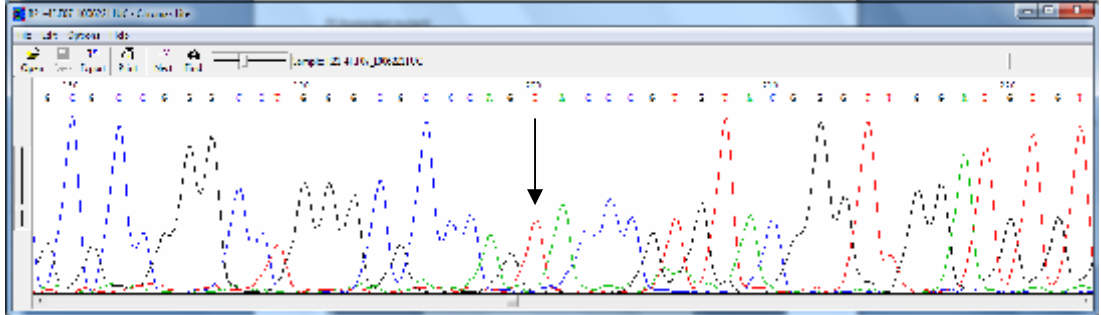
## CC genotipi



## CT genotipi



## TT genotipi



Resim 3.1 : C421T polimorfizmi için sekans analizi

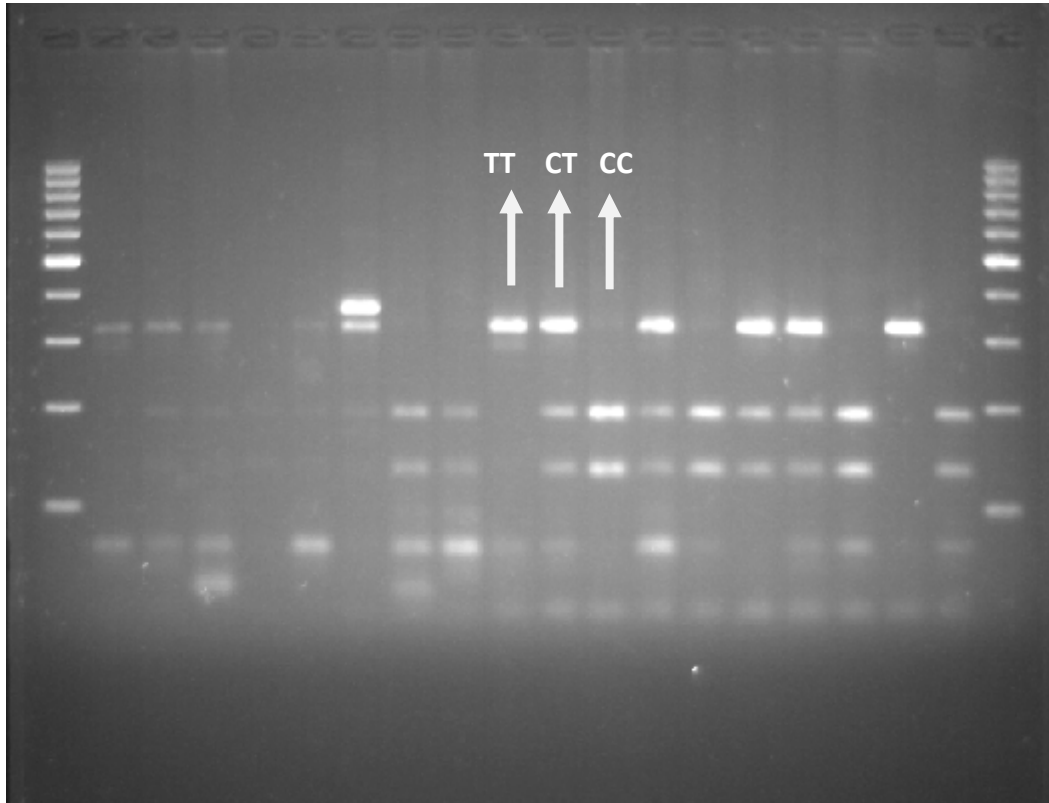
### 3.6.3 RANK geni C575T polimorfizmi saptanması

RANK geni ekzon 6'da bulunan C575T polimorfizminin saptanması amacıyla F: ggggattcaaatgtccaagaagg, R: catgcacgggatgaataaagg primerleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi. Her bir örnek için hazırlanan PCR reaksiyon karışımı 25 µl'dir; 12.2 µl distile su, 2.5 µl 10X PCR buffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 µl dNTP (4x25 µmol), 1'er µl primerler ve 0.3 µl Taq polimerazdan (Fermentas) oluşan karışım 0,2 ml'lik reaksiyon tüplerine dağıtıldı ve en son 5'er µl DNA örnekleri

eklendi. PCR koşulları; 95°C-3 dk, 95°C-40 sn/56°C-40 sn/72°C 45 sn: 33 siklus, 72°C-10 dk olacak şekilde ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri, program tamamlandıktan sonra +4°C'de saklandı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinden amplifikasyonun oluşum kontrolü yapıldıktan sonra enzimatik kesim işlemi yapıldı. PCR-RFLP yönteminde SsiI enzimi kullanıldı. Enzim kesimi koşulları;

PCR ürünü: 10 µl, Buffer: 2 µl, SsiI enzimi: 1 µl - 37°C'de 2 saat inkübasyon.

Restriksiyona uğramış PCR ürünlerinde amplifikasyonun olup olmadığının kontrolü %3.5' lik agaroz jelde yapıldı. Örnekler jele yüklenirken kesim ürünleri üzerine 5µl orange G (yükleme tamponu) eklendikten sonra 13 µl si jeldeki kuyucuklara yüklendi. Yürüyüş panallerine göre değerlendirildikten sonra görüntülendi. Kesilmemiş PCR ürünü 353 bç olarak belirlendi. Genotip CC olması durumunda 188-130-36 bç'lik bantlar elde edilmesi planlandı. CT genotipinde 316-188-130-36 bç ve TT genotipinde 316-37 bç bantları oluşması beklendi (Resim 3.2).



**Resim 3.2:** C575T polimorfizmi için enzim kesimi.



### 3.7 İstatistiksel Analiz

Normal dağılıma uyan sürekli değişkenler (örneğin yaş, boy, KMY değerleri,) ortalama ve standart sapma ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ), normal dağılıma uymayan sürekli değişkenler (örneğin emzirme süresi, fiziksel aktivite skoru) ortanca ve çeyreklikler arası fark ( $\text{median} \pm \text{IR}$ ) olarak verildi. Nümerik değişkenlerde normal dağılıma uygunluk *Shapiro-Wilk* istatistiksel analizi ile test edildi. Gruplar arası farkın önem kontrolünde normal dağılıma uygunluk gösteren değişkenler için (karşılaştırılan grup sayısına göre) *student t-test* ya da *tek yönlü ANOVA*, normal dağılıma uygunluk göstermeyen değişkenler için *Mann-Whitney U testi* seçildi. ANOVA testin önemli bulunması durumunda çoklu karşılaştırma analizi Bonferroni düzeltmesi ile yapıldı.

Sınıflamalı (örneğin genotip sıklıkları, allel sıklıkları) değişkenler için hasta-kontrol gruplarında çapraz tablolar oluşturuldu ve *ki-kare* istatistiksel analizi yapıldı.

Hasta-kontrol grubunda birleşik genotiplerin risk oranlarının belirlenmesi için *lojistik regresyon analizleri* yapıldı ve Odds oranları (OR) hesaplandı.

RANK geni ekzon 4 C421T ve ekzon 6 C575T polimorfizmleri için hasta ve kontrol gruplarında incelenen bölgelerdeki KMY aritmetik ortalamalarının karşılaştırılmasında KMY değeri değişikliklerinde etkisi olabileceği düşünülen yaş, kilo, boy ve menopoz süresi değişkenlerinin etkisi arındırıldıktan sonra polimorfizmler arası farkın önem kontrolü için *genelleştirilmiş doğrusal model (GLM)* yöntemi kullanıldı.

İstatistik önemlilik (anlamlılık) eşik düzeyi olarak 0,05 alındı ( $p < 0,05$ ). Tüm analizler için SPSS 18.0 paket programı kullanıldı.

Kontrol grubunun Hardy-Weinberg eşitliği, birleşik haplotip frekansları ve anlamlılığı analizi için HelixTree Versiyon 5.0.0 genetik analiz yazılım programı kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1 Olgulara Ait Özellikler

Çalışmaya onay veren, çalışmaya dahil edilme kriterlerini tamamen karşılayan n<sub>hasta</sub>: 100, n<sub>kontrol</sub>: 78 olacak şekilde 178 kadın incelendi (Tablo 4.1).

Hasta ve kontrol grubu arasında yaş açısından anlamlı fark yoktu. Vücut ağırlığı, BKİ ve alkol tüketim sıklığı kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek saptandı. Menarş yaşı, menopoz yaşı, canlı doğum sayısı, düşük ve kürtaj sayısı, emzirme süresi, üreme çağında toplam kalınan süre, üreme çağında toplam gebe kalınan süre, fiziksel aktivite skoru, günlük kalsiyum alımı ve sigara alışkanlığı açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı fark gözlenmedi. Menopozda olma süresi açısından iki grup ortalamaları arasındaki fark anlamlı değildi (p:0,062).

**Tablo 4.1** : Kontrol ve hasta grubun demografik verileri ve bazı karakteristik özellikleri

DEĞİŞKEN		KONTROL n:78	HASTA n:100	Toplam N:178	p <sup>a</sup> değeri
Yaş (yıl)		54,5±4,9	54,8±4,7	54,7±4,8	0,630
Vücut ağırlığı (kg)		75,2±10,2	69,4±9,4	71,9±10,2	<0,001**
Boy (cm)		158±6	158±6	158±6	0,346
VKI (kg/m <sup>2</sup> )		29,9±4,1	27,9±3,7	28,7±4	0,001**
Menarş yaşı (yıl)		13,3±1,5	13,3±1,4	13,3±1,5	0,752
Menopoz yaşı (yıl)		48,7±3,3	48±3,9	48,3±3,6	0,238
Menopozda olma süresi (yıl)*		5,8±7	6,8±7	6,4±6,3	0,062
Emzirme süresi (toplam, ay)*		21,7±24	26,2±28	24,2±29,1	0,519
Üreme çağında toplam kalınan süre (yıl)		35,4±3,6	34,8±4,3	35±4	0,342
Üreme çağında gebe kaldığı süre (toplam, ay)*		99,6±46	102,2±40	101,1±42	0,432
Fiziksel aktivite skoru (MET)*		1187,3±995	955,2±1089	1056,9±1040	0,241
Günlük kalsiyum alımı (mg/gün)		700,84±205,8	730,8±248,4	720,6±230	0,380
Alkol tüketim sıklığı	Hiç tüketmeyen (n, %)	67 (85,9)	94 (94,0)	161 (90,4)	0,035**
	Haftada 1 günden az (n, %)	10 (12,8)	3 (3,0)	13 (7,3)	
	Haftada 1-2 gün (n, %)	1 (1,3)	3 (3,0)	4 (2,2)	
Sigara Öyküsü	Hiç içmemiş (n, %)	49 (62,8)	0,642	116 (65,2)	0,642
	Eski içici (n, %)	8 (10,3)	12 (12,0)	20 (11,2)	
	Aktif içici (n, %)	21 (26,9)	21 (21,0)	42 (23,6)	

\*Normal dağılıma uymayan değişkenler median±IR olarak belirtilmiştir. \*\* p<0,05

## 4.2 Kontrol ve Hasta Gruplarının KMY Ölçümleri ve T Skorları

Kontrol ve hasta grubu arasında KMY değerleri ve T skorları açısından fark anlamlı idi ( $p < 0,001$ ) (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2 :** Kontrol ve hasta grubunun KMY ham değerleri ve T skoru değerleri

Bölge	KMY değeri (g/cm <sup>2</sup> )			T skoru		
	KONTROL	HASTA	p	KONTROL	HASTA	p
<b>Femur boyun</b>	0,832±0,082	0,716±0,074	<0,001	-0,1±0,7	-1,2±0,7	<0,001
<b>Femur total</b>	0,965±0,092	0,843±0,091	<0,001	0,1±0,7	-0,8±0,7	<0,001
<b>L1-L4 Total</b>	1,056±0,109	0,850±0,090	<0,001	0,1±0,9	-1,8±0,8	<0,001

Hasta grubunda femur boyun bölgesi T skorları incelendiğinde osteoporozlu hasta saptanmazken, 35 hastada osteopeni mevcuttu. Femur total T skorlarına bakıldığında bir hastada osteoporoz, 39 hastada osteopeni saptandı. Hasta grubunda lomber bölgede 70 kişide osteopeni, 23 kişide osteoporoz saptandı; kalan 7 kişide lomber bölge T skoru normaldi.

Femoral ve lomber bölgede hasta grup WHO tarafından T skoruna göre yapılan sınıflandırma açısından incelendiğinde çoğunluğu femoral ve lomber bölgede osteopeni olan hastaların oluşturduğu görüldü (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3 :** T skoru değerlerine göre hasta grubun WHO sınıflamasına göre dağılımı

	Femur normal+	Femur normal+	Femur o.peni+	Femur o.peni+	Femur o.peni+	Femur o.poroz+	Femur o.poroz+	Femur o.poroz+
	Lomber o.peni	Lomber o.poroz	Lomber normal	Lomber o.peni	Lomber o.poroz	Lomber normal	Lomber o.peni	Lomber o.poroz
	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)
N <sub>HASTA</sub> :100	26	3	7	44	19	0	0	1

### 4.3 Kontrol ve Hasta Gruplarında Kırık Öyküsü Değerlendirmesi

Öyküsünde hafif travmaya bağlı kırığı olan 2 kişi saptandı. Her iki olgunun da hasta gruba ait olduğu saptandı (Tablo 4.4).

Birinci derece yakınlarında kırık öyküsü olan olgu sayısı hasta grubunda 20, kontrol grubunda 10 kişi idi. Annede kalça kırığı öyküsü hasta grubunda 4 kişide mevcuttu. Kontrol grubunda 1 kişide annede kalça kırığı öyküsü, 1 kişide annede kalça ve önkol kırığı öyküsü mevcuttu. Babada kalça kırığı öyküsü sadece hasta grupta 1 kişide mevcuttu. Kontrol grubunda babada kırık öyküsüne rastlanmadı.

**Tablo 4.4 :** Olguların öyküsünde kırık sayısı ve bölgeleri

		KONTROL	HASTA
		(n)	(n)
<b>Travmatik kırık öyküsü</b>	Vertebra	0	0
	Kalça	0	0
	Önkol	2	1
	Diğer	3	3
	Yok	73	96
	Toplam	78	100
	<b>Hafif travma ile oluşan kırık öyküsü</b>	Vertebra	0
Kalça		0	0
Önkol		0	2
Diğer		0	0
Yok		78	98
Toplam		78	100

### 4.4 Kontrol ve Hasta Grupları Arasında Genotip Dağılımlarının ve Allel Sıklıklarının Karşılaştırılması

Kontrol grubunda her iki polimorfizmin genotip dağılımı ki-kare testi ile hesaplanan Hardy-Weinberg eşitliği ile uyumlu bulundu ( $p>0,05$ ) (Tablo 4.5).

Kontrol ve hasta grubu birlikte ele alındığında iki polimorfizmin birlikte kalıtıldığı tespit edildi ( $D^2:0,358$ ;  $p:0,023$ ).

**Tablo 4.5** : Kontrol grubunun C421T ve C575T polimorfizmleri Hardy-Weinberg eşitliği

RANK geni	HWE*	
	$\chi^2$	p değeri
Ekzon 4 (C421T) Kontrol grubu	0,017	0,893
Ekzon 6(C575T) Kontrol grubu	3,700	0,054

\*HWE:Hardy-Weinberg eşitliği

Kontrol grubunda C421T polimorfizmi için analiz edilen 78 olgunun 56'sında CC genotipi (%71,8), 20'sinde CT genotipi (%25,6) ve 2'sinde TT genotipi (%2,6) saptandı. Hasta grubunda ise analiz edilen 100 olgunun 67'sinde CC genotipi (%67,0), 30'unda CT genotipi (%30,0) ve 3'ünde TT genotipi (%3,0) saptandı (Tablo 4.6).

Kontrol ve hasta grubu arasında C421T polimorfizmi için genotipler karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $\chi^2:0,472$ ;  $p:0,790$ ) (Tablo 4.6).

Kontrol ve hasta grubunda C421T polimorfizmi için C ve T allel sıklığı hesaplandığında iki grup arasında fark saptanmadı ( $\chi^2:0,428$ ;  $p:0,512$ ) (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6** : Kontrol ve hasta grupları arasında C421T polimorfizmi genotip dağılımı ve allel sıklıklarının karşılaştırılması

		KONTROL- HASTA		TOPLAM N(%)	OR	% 95 C.I.		p değeri
		KONTROL n(%)	HASTA n(%)			Alt sınır	Üst sınır	
<b>RANK<sup>C421T</sup></b>	CC	56(71,8)	67 (67,0)	123(69,1)	1,00	-	-	-
	CT	20(25,6)	30(30,0)	50(28,1)	1,254	0,643	2,445	0,507
	TT	2(2,6)	3(3,0)	5(2,8)	1,254	0,202	7,769	0,808
Total		78(100,0)	100(100,0)	178(100,0)				
		KONTROL 2n(%)	HASTA 2n(%)	2N				
Alel	C	132(84,6)	164(82,0)	296	1,2073	0,686	2,124	0,512
	T	24(15,4)	36(18,0)	60				
<b>TOPLAM</b>		156(100,0)	200(100,0)	356				

Kontrol grubunda C575T polimorfizmi için analiz edilen 78 olgunun 29'unda CC genotipi (%37,2), 30'unda CT genotipi (%37,5), 19'unda TT genotipi (%24,4) saptandı. Hasta grubunda 100 hastanın 32'sinde CC genotipi (%32,0), 35'inde CT genotipi (%35,0) ve 33'ünde TT genotipi (%33,0) saptandı (Tablo 4.7).

Kontrol ve hasta grubu arasında C575T polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılmasında iki grup arasında fark saptanmadı ( $\chi^2$ :1,607; p:0,448) (Tablo 4.7).

Kontrol ve hasta grubunda C575T polimorfizmi için C ve T allel sıklıkları açısından fark saptanmadı ( $\chi^2$ :1,678; p:0,195) (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7** : Kontrol ve hasta grupları arasında C575T polimorfizmi genotip dağılımı ve allel sıklıklarının karşılaştırılması

		KONTROL- HASTA		TOPLAM N(%)	OR	%95 C.I.		p değeri
		KONTROL n(%)	HASTA n(%)			Alt sınır	Üst sınır	
RANK <sup>C575T</sup>	CC	29(37,2)	32(32,0)	61(34,3)				
	CT	30(38,5)	35(35,0)	65(36,5)	1,057	0,525	2,130	0,876
	TT	19(24,3)	33(33,0)	52(29,2)	1,574	0,739	3,351	0,239
TOPLAM		78(100,0)	100(100,0)	178(100,0)				
		KONTROL 2n(%)	HASTA 2n(%)	2N				
ALLEL	C	88(56,4)	99(49,5)	187	1.3203	0.8669	2.0109	0.195
	T	68(43,6)	101(50,5)	169				
TOPLAM		156 (100,0)	200(100,0)	356				

#### 4.5 Kontrol ve Hasta Grupları Arasında Birleşik Genotip Dağılımlarının Karşılaştırılması

C421T ve C575T polimorfizmlerinin birleşik genotip dağılımında kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ( $\chi^2$ :4,235; p:0,752).

Birleşik genotipler ayrı ayrı hesaplandığında da kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

$CC^{RANK4}/CC^{RANK6}$  birleşik genotipine göre hasta grupta  $CT^{RANK4}/TT^{RANK6}$  birleşik genotipinin görülme riskinin 2,3 kat arttığı saptandı, fakat bu risk anlamlı bulunmadı (p:0,195) (Tablo 4.8).

Kontrol ve hasta grubu için C421T ve C575T polimorfizmlerinin birleşik genotip analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı birleşik genotip paterni ortaya konmamıştır (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8 :** Kontrol ve hasta grupları arasında C421T ve C575T polimorfizmlerinin birleşik genotip dağılımının karşılaştırılması

Birleşik genotip RANK <sup>C421T</sup> /RANK <sup>C575T</sup>	KONTROL n(%)	HASTA n(%)	TOPLAM N(%)	OR	CI(%95)		p değeri
					Alt sınır	Üst sınır	
CC/CC	22(28,2)	26(26,0)	48(27,0)				
CC/CT	21(26,9)	21(21,0)	42(23,6)	0,846	0,369	1,940	0,693
CC/TT	13(16,7)	20(20,0)	33(18,5)	1,302	0,529	3,202	0,566
CT/CC	7(9,0)	6(6,0)	13(7,3)	0,725	0,212	2,480	0,609
CT/CT	9(11,5)	13(13,0)	22(12,4)	1,222	0,440	3,397	0,700
CT/TT	4(5,1)	11(11,0)	15(8,4)	2,327	0,649	8,348	0,195
TT/CC	0	0					
TT/CT	0(0,0)	1(1,0)	1(0,6)				1,000
TT/TT	2(2,6)	2(2,0)	4(2,2)	0,846	0,110	6,511	0,873
TOPLAM		78 (100,0)	100 (100,0)	178 (100,0)			

#### 4.6 Kontrol ve Hasta Gruplarında Birleşik Haplotip Analizi

Kontrol ve hasta grubunda karşılaştırılmak üzere C421T ve C575T polimorfizmlerinin birleşik haplotip analizi uygulandı (Tablo 4.9).

Tüm kontrol ve hasta grubu arasında birleşik haplotip analizinde anlamlı bir fark saptanmadı ( $\chi^2$ :1,324; p:0,723).

$C^{RANK4}/C^{RANK6}$  birleşik haplotipine göre hasta grubunda  $T^{RANK4}/T^{RANK6}$  birleşik haplotipinin görülme riskinin 1,6 kat artmış olduğu saptandı fakat bu artış anlamlı bulunmadı (p:0,322) (Tablo 4.9).



C421T ve C575T polimorfizmlerinin birleşik haplotip analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir haplotip paterni ortaya konmamıştır (Tablo 4.9).

**Tablo 4.9** : C421T ve C575T polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarında birleşik haplotip analizi

Haplotip RANK <sup>C421T</sup> / RANK <sup>C575T</sup>	KONTROL (%)	HASTA (%)	OR	%95CI		p değeri
				Alt sınır	Üst sınır	
C/C	50	44				
C/T	35	38	1,228	0,665	2,268	0,512
T/C	6	5	0,910	0,266	3,109	0,880
T/T	9	13	1,611	0,627	4,136	0,322
Total	100	100				

#### 4.7 Kontrol ve Hasta Gruplarının Genotiplere Göre Düzeltilmiş KMY Değerleri

Kontrol ve hasta grubunda C421T ve C575T polimorfizmlerinin herbiri için genotiplere göre KMY değerleri aritmetik ortalamaları yaş, boy, kilo ve menopoz süresine göre düzeltilerek hesaplandı.

C421T polimorfizmi için her üç genotipe ait femoral ve lomber bölge düzeltilmiş KMY değerleri incelendiğinde kontrol grubunda femur boyun ve femur total ortalama KMY değerleri TT genotipinde yüksek iken, TT genotipi lomber bölge düzeltilmiş ortalama KMY değeri CC ve CT genotiplerinin KMY değerlerinden düşük idi fakat genotipler arasında KMY değerleri arası fark anlamlı değildi ( $p_{FN\ KMY}$ : 0,779,  $p_{FT\ KMY}$ : 0,318,  $p_{L1-L4\ KMY}$ : 0,959) (Tablo 4.10).

Hasta grubunda C421T polimorfizmi için genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerleri incelendiğinde lomber bölgede TT genotipi KMY değeri CC ve CT genotiplerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p_{L1-L4\ KMY}$ : 0,015) (Tablo 4.10). Fakat TT genotipine ait olgu sayısı sadece 3 kişi idi.

**Tablo 4.10 :** Kontrol ve hasta grubunun C421T polimorfizmi için genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içinde karşılaştırılması

RANK <sup>C421T</sup>					RANK <sup>C421T</sup>			
	KMY <sub>Kontrol</sub> * (g/cm <sup>2</sup> )				KMY <sub>Hasta</sub> * (g/cm <sup>2</sup> )			
BÖLGE	CC (n:56)	CT (n:20)	TT (n:2)	p değeri	CC (n:67)	CT (n:30)	TT (n:3)	p değeri
FN KMY	0,833 (0,011)	0,826 (0,018)	0,869 (0,059)	0,779	0,720 (0,009)	0,708 (0,013)	0,729 (0,041)	0,715
FT KMY	0,969 (0,012)	0,946 (0,020)	1,040 (0,065)	0,318	0,850 (0,011)	0,820 (0,016)	0,923 (0,051)	0,099
L1-L4 KMY	1,054 (0,015)	1,062 (0,025)	1,049 (0,079)	0,959	0,855 (0,011)	0,827 (0,016)	0,979 (0,051)	<b>0,015**</b>

\*KMY değerleri yaş, boy, kilo ve menopoz süresine (yıl) göre düzeltilerek, aritmetik ortalama (standart hata) olarak belirtilmiştir.

\*\*p<0,05

C421T polimorfizmi için her iki kontrol ve hasta grubunda TT genotipine sahip olgu sayısı az olması nedeniyle homozigot mutant ve heterozigot grupların birleştirilmesi sonrası C421T polimorfizmi için genotiplere göre hasta ve kontrol grubunun düzeltilmiş KMY değerleri hesaplandığında, kontrol ve hasta grubu içinde her üç bölgede de KMY değerlerinde anlamlı fark yaratacak polimorfizme rastlanmadı (Tablo 4.11).

**Tablo 4.11** : Kontrol ve hasta grubunun C421T polimorfizmi için homozigot mutant ve heterozigot grupların birleştirilmesi sonrası genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içinde karşılaştırılması

	RANK <sup>C421T</sup>			RANK <sup>C421T</sup>		
	KMY <sub>Kontrol</sub> * (g/cm <sup>2</sup> )		p değeri	KMY <sub>Hasta</sub> * (g/cm <sup>2</sup> )		p değeri
BölGE	CC (n:56)	CT/TT (n:22)		CC (n:67)	CT/TT (n:33)	
FN KMY	0,833(0,11)	0,830(0,18)	0,901	0,720(0,09)	0,710(0,12)	0,511
FT KMY	0,970(0,012)	0,954(0,020)	0,517	0,849(0,011)	0,830(0,016)	0,308
L1-L4 KMY	1,054(0,015)	1,061(0,023)	0,808	0,855(0,011)	0,841(0,016)	0,478

\*KMY değerleri yaş, boy, kilo ve menopoz süresine (yıl) göre düzeltilerek, aritmetik ortalama (standart hata) olarak belirtilmiştir.

C575T polimorfizmi için kontrol ve hasta grupları için genotiplere göre femoral ve lomber bölge KMY değerleri hesaplandı. Kontrol grubunda femur boyun, femur total ve L1-L4 KMY değerlerinde C575T polimorfizmi için genotipler arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4.12). Benzer şekilde hasta grubunda her üç bölge KMY değerlerinde C575T polimorfizmi için CC, CT, TT genotipleri arasında anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 4.12).

**Tablo 4.12 :** Kontrol ve hasta grubunun C575T polimorfizmi için genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içlerinde karşılaştırılması

RANK <sup>C575T</sup>					RANK <sup>C575T</sup>			
	KMY <sub>Kontrol</sub> * (g/cm <sup>2</sup> )				KMY <sub>Hasta</sub> * (g/cm <sup>2</sup> )			
BÖLGE	CC (n:29)	CT (n:30)	TT (n:19)	P değeri	CC (n:32)	CT (n:35)	TT (n:33)	P değeri
FN KMY	0,820 (0,015)	0,835 (0,015)	0,844 (0,019)	0,580	0,710 (0,013)	0,720 (0,012)	0,718 (0,012)	0,829
FT KMY	0,954 (0,017)	0,959 (0,017)	0,993 (0,021)	0,317	0,830 (0,016)	0,846 (0,015)	0,852 (0,016)	0,614
L1-L4 KMY	1,055 (0,021)	1,064 (0,020)	1,045 (0,025)	0,849	0,835 (0,016)	0,852 (0,015)	0,862 (0,016)	0,487

\*KMY değerleri yaş, boy, kilo ve menopoz süresine (yıl) göre düzeltilerek, aritmetik ortalama (standart hata) olarak belirtilmiştir.

#### 4.8 Kontrol ve Hasta Gruplarının Birleşik Genotiplere Göre Düzeltilmiş KMY Değerleri

Kontrol grubunda C421T ve C575T polimorfizmleri birleşik genotiplerinin femur boyun KMY değerleri arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p_{FN\ KMY}$ : 0,899). Benzer şekilde femur total KMY değerleri ve L1-L4 KMY değerlerinde birleşik genotipler arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p_{FT\ KMY}$ : 0,622,  $p_{L1-4\ KMY}$ : 0,968) (Tablo 4.13).

Hasta grubunda birleşik genotipler arasında femur boyun ve femur total KMY değerlerinde anlamlı fark saptanmadı ( $p_{FN\ KMY}$ : 0,807,  $p_{FT\ KMY}$ : 0,337) . L1-L4 KMY değeri hasta grubunda homozigot mutant TT/TT birleşik genotipinde anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p_{L1-4\ KMY}$ : 0,017) (Tablo 4.13).

**Tablo 4.13 :** Kontrol ve hasta grubunun birleşik genotiplere göre düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içlerinde karşılaştırılması

	<b>Birleşik genotip</b> <b>RANK<sup>C421T</sup>/</b> <b>RANK<sup>C575T</sup></b>	<b>n<sub>KONTROL</sub>*</b>	<b>KMY<sub>KONTROL</sub></b> <b>(g/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>P</b> <b>değeri</b>	<b>n<sub>HASTA</sub></b>	<b>KMY<sub>HASTA</sub>*</b> <b>(g/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>p</b> <b>değeri</b>
<b>Femur boyun</b>	CC/CC	22	0,822(0,018)	0,899	26	0,705(0,014)	0,807
	CC/CT	21	0,843 (0,019)		21	0,736(0,016)	
	CC/TT	13	0,833(0,024)		20	0,722(0,016)	
	CT/CC	7	0,812(0,032)		6	0,730(0,030)	
	CT/CT	9	0,820(0,028)		13	0,696(0,020)	
	CT/TT	4	0,867(0,044)		11	0,709(0,022)	
	TT/CT	-	-		1	0,708(0,072)	
	TT/TT	2	0,870(0,060)		2	0,740(0,052)	
<b>Femur total</b>	CC/CC	22	0,960(0,020)	0,622	26	0,827(0,017)	0,337
	CC /CT	21	0,971(0,021)		21	0,867(0,019)	
	CC/TT	13	0,983(0,026)		20	0,860(0,020)	
	CT /CC	7	0,933(0,035)		6	0,842(0,037)	
	CT/CT	9	0,932(0,031)		13	0,810(0,025)	
	CT/TT	4	1,001(0,048)		11	0,821(0,027)	
	TT/CT	-	-		1	0,892(0,089)	
	TT/TT	2	1,040(0,066)		2	0,939(0,064)	
<b>L1-L4 Total</b>	CC/CC	22	1,050(0,024)	0,968	26	0,837(0,017)	<b>0,017</b>
	CC/CT	21	1,072(0,025)		21	0,868(0,019)	
	CC/TT	13	1,032(0,032)		20	0,865(0,019)	
	CT/CC	7	1,069(0,043)		6	0,826(0,036)	
	CT/CT	9	1,047(0,038)		13	0,832(0,024)	
	CT/TT	4	1,085(0,059)		11	0,818(0,026)	
	TT/CT	-	-		1	0,793(0,086)	
	TT/TT	2	1,051(0,080)		2	1,078(0,062)	

\*KMY değerleri yaş, boy, kilo ve menopoz süresine (yıl) göre düzeltilerek, aritmetik ortalama (standart hata) olarak belirtilmiştir.

Kontrol ve hasta gruplarında C421T ve C575T polimorfizmleri birleşik genotiplerinin KMY değerlerinin analizinde homozigot mutant TT/TT birleşik genotipi KMY değerleri her üç bölgede yüksek saptanmış olmakla birlikte her iki grupta da TT/TT birleşik genotipine sahip sadece 2'şer olgu mevcuttu. Homozigot normal genotiplerden oluşan (CC/CC) birleşik genotipi dışındaki diğer tüm birleşik genotiplerden bir grup oluşturularak kontrol ve hasta grubu için yeni bir analiz yapıldı (Tablo 4.14).

Kontrol grubunda CC/CC birleşik genotipi grubu ile diğer grup arasında herhangi bir KMY değerinde anlamlı fark saptanmadı ( $p_{FN\ KMY}$ : 0,526,  $p_{FT\ KMY}$ : 0,757,  $p_{L1-4\ KMY}$ : 0,778).

Hasta grupta da aynı şekilde CC/CC birleşik genotipi grubu ile diğer grup arasında femur boyun, femur total ve L1-L4 KMY değerlerinde fark saptanmadı ( $p_{FN\ KMY}$ : 0,363,  $p_{FT\ KMY}$ : 0,307,  $p_{L1-4\ KMY}$ : 0,399) (Tablo 4.14).

**Tablo 4.14** : Kontrol ve hasta grubunun CC/CC birleşik genotipi ile diğer birleşik genotipler grubunun düzeltilmiş KMY değerlerinin kendi içlerinde karşılaştırılması

	<b>Birleşik genotip</b> <b>RANK<sup>C421T</sup>/ RANK<sup>C575T</sup></b>	<b>KMY<sub>KONTROL</sub></b> <b>(g/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>p değeri</b>	<b>KMY<sub>HASTA</sub></b> <b>(g/cm<sup>2</sup>)</b>	<b>p değeri</b>
<b>Femur boyun</b>	CC/CC	0,822(0,018)	0,526	0,705(0,014)	0,363
	Diğerleri	0,836(0,011)		0,720(0,008)	
<b>Femur Total</b>	CC/CC	0,960(0,020)	0,757	0,827(0,017)	0,307
	Diğerleri	0,967(0,012)		0,848(0,010)	
<b>L1-L4 Total</b>	CC/CC	1,050(0,024)	0,778	0,837(0,018)	0,399
	Diğerleri	1,058(0,015)		0,855(0,011)	

\*KMY değerleri yaş, boy, kilo ve menopoz süresine (yıl) göre düzeltilerek, aritmetik ortalama (standart hata) olarak belirtilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

RANK geni ekzon 4' deki C421T polimorfizmi ile aynı gen üzerinde ekzon 6' da bulunan C575T polimorfizmi ve bunların femur boyun, femur total ve lomber vertebra KMY değerleri ile olası ilişkisini araştırmayı hedefleyen kesitsel, gözlemsel bu klinik çalışmada; yaşları 45-65 arasında değişen, daha önce osteoporoz açısından herhangi bir tedavi almamış ve kemik metabolizmasını etkileyecek metabolik, endokrinolojik, nörolojik, romatolojik vb. gibi ikincil hastalığı olmayan erken dönem postmenopozal kadın olgularda, KMY'leri normal ve düşük olarak ayrılan iki grup arasında bu iki polimorfizme bağlı genotipler, birleşik genotipler, birleşik haplotipler ve allel frekansları açısından fark saptanmadı. İkinci olarak; C421T ve C575T polimorfizmlerinin normal ve düşük KMY'li grupta ayrı ayrı olarak femur ve lomber bölge KMY değerleri ile ilişkisinin incelenmesinde, bu iki polimorfizm ile KMY değerleri arasında bir ilişki saptanmadı.

Osteoporoz için ileri yaş, menopoz, sigara, hafif travma ile kırık varlığı gibi pek çok risk faktörü tanımlanmaktadır.<sup>250</sup> Genetik etki ve kalıtım bu risk faktörleri içinde çok önemli yere sahip olmasına rağmen en az aydınlatılmış olandır.<sup>251</sup> Aile çalışmaları KMY'deki değişikliklerin çok büyük oranlarda genetik faktörlerden etkilendiğini göstermektedir.<sup>252</sup> KMY'nin bu kadar yüksek oranda olan kalıtsallığı araştırmacıları kemik yapım-yıkım belirleyicileri, kemik kitlesi, KMY gibi fenotipik özellikler; KMY'deki düşüklüğün ilerlemesine bağlı olarak gelişen osteopeni ya da osteoporoz ve klinik son nokta olan kırıklar ile genetik faktörlerin ilişkisini araştırmaya teşvik etmiştir.<sup>18</sup>

Osteoporozda genetik ile ilişkili etkileri aydınlatmaya yönelik bağlantı çalışmaları,<sup>253</sup> aday gen saptanması (tek nükleotid polimorfizm çalışmaları gibi) ve gen ekspresyonu çalışmaları<sup>254</sup> olmak üzere farklı metodlar kullanılmaktadır.

Rekombinant DNA devriminin sonucundan köken alıp, günümüze kadar gelen moleküler tıp ve genomun haritalanması, sekanslanması ve karakterizasyonunun beklenen bilimsel ve tıbbi yararları oldukça önemlidir. Şuanda içinde bulunduğumuz durum oldukça umut vericidir. Günümüzde, insan genomunun tüm dizisi ve tek bir gen için potansiyel yaklaşımlar mevcuttur. Bu da sağlık ve hastalık alanında insan biyolojisi çalışmak için eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Yeni genetik varyasyonları, özellikle de multifaktöryel hastalıklar ve çeşitli bireye özgü

özellikleri etkileyebilen SNP'leri aydınlatmayı amaçlayan genetik ilişkilendirme çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır.<sup>255</sup> Tıbbi araştırmaların odağı günümüzde genlerin sistematik fonksiyonel evrimine ve mekanizmaların aydınlatılmasına doğru dönmüştür. İnsanı daha sağlıklı kılmak için, biyolojik aktivitenin koordinasyonunda genlerin nasıl fonksiyon gösterip, etkileşime girdiğinin tamamen anlaşılması yeni terapilerin gelişmesi için çok büyük bir fırsat sağlamaktadır. Bu durum SNP'leri biyomedikal araştırmalar, farmasötik ürün geliştirmesi ve tıbbi tanı gibi konular açısından oldukça değerli yapar. SNP'ler ayrıca evrimsel açıdan stabildirler. Nesilden nesile çok fazla değişmezler. Bu da onların popülasyon çalışmalarında takip edilmelerini kolaylaştırır. Popülasyonda insan DNA dizilerinin büyük oranda aynı olmasına karşın, DNA dizilerindeki değişiklikler insanların hastalıklara, bakteri veya virüs toksini ya da kimyasallar gibi çevresel etkenlere, ilaçlara ve diğer terapilere nasıl cevap verdiği üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. SNP'ler ve hastalık yatkınlığı arasındaki ilişkinin tanımlanabilmesi, bireylerin genotipine dayalı olarak ilaçların bireylere uygun hale getirildiği, yeni medikal alan farmako-genetiğin temelini oluşturan ilaç yanıtı ve SNP'ler arasındaki ilişkiyi ve hastalık genlerinin keşfedilme hızını büyük oranda artıracaktır.

Günümüze kadar KMY ve kırık riski ile güçlü ilişkili az sayıda gen tanımlanabilmiştir. Richard ve arkadaşlarının KMY ve kırık riski ile ilişkili olabilecek 150 aday gen için 14277'si bayan olmak üzere 19195 erişkin Avrupalıyı 5 epidemiyolojik kohort çalışmasıyla inceledikleri bir meta-analizde pek çok gendeki SNP'nin KMY ve kırık riski ile anlamlı bir ilişki göstermediği bildirilmiştir. Aynı meta-analizde 9 gende görülen (LRP4, LRP5, TNFSF11(RANKL), TNFRSF11A(RANK), TNFRSF11B (OPG = osteoprotegerin), SPP1 (OPN = osteopontin), ITGA1 (integrin alfa 1), SOST geni (gen ürünü sklerostin) ve ESR1) 241 SNP'nin femur boyunda ve/veya lomber bölgede KMY ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu 9 gende KMY'deki azalmanın etki büyüklüğü 0,04 ile 0,18 standart deviasyon (SD) arasında bulunmuş. Ayrıca LRP5, SOST, TNFRSF11A(RANK) ve SPP1 olmak üzere 4 gende genetik polimorfizmlerin kırık riski ile anlamlı ilişkili olduğu saptanmıştır.<sup>256</sup> Bu meta-analizde RANK, RANKL ve OPG kodlayan genlerdeki SNP'ler ile KMY'deki düşme arasındaki ilişki ağırlıklı ilgi görenlerdendir. Bunun nedeni de 'tüm genom bağlantı' (genome-wide association)



çalışmalarının bu yolağı genomda KMY'nin en önemli belirleyicilerinden biri olarak tanımlamaları olmuştur.<sup>257, 258, 259</sup>

Terapötik ajanlara cevabın genetik belirleyicilerinin keşfedilmesine gitgide ilgi artmaktadır. Çünkü bu sayede genetik profillerin temelinde ilaç tedavilerine bireysel cevapların öngörülmesi mümkün olabilecektir.<sup>260</sup> Buna örnek olarak 124 Taylandlı postmenopozal kadında ESR1 polimorfizmleri ile 1 yıllık hormon replasman tedavisine cevabın ilişkisini inceleyen bir çalışmada ESR1 PvuII bölgesinde pp genotipindeki bireylerde KMY'deki artışın (KMY'de %2.3 artış) diğer genotip gruplarına göre (KMY'de %6-7 artış) daha az olduğu saptanmıştır.<sup>261</sup> Benzer şekilde RANK-RANKL-OPG ve Wnt sinyal yollarının inhibisyonunun terapötik potansiyelinin araştırıldığı klinik çalışmalar ve bireysel genetik profillerin özellikle osteoporoz riski yüksek olan bireylerde spesifik tedavilerin hedeflenmesi ve uygulanmasına olanak sağlayabileceğine inanılmaktadır. Bunun en önemli örneği olarak da bu yolağın kullanılmasının sonucu TNFRSF11B (OPG) 'nin rolünü taklit ederek osteoporotik kırıklarda azalmaya yol açan yeni bir ajan olan denosumab (AMG 161 olarak da bilinir) gösterilmiştir.<sup>262, 180, 182</sup>

Kemiğin yeniden yapılanmasında güçlü biyolojik role sahip olan RANK-RANKL-OPG yolağı erken postmenopozal dönemde olan ivmelenmiş kemik kaybında büyük önem kazanmaktadır. Östrojen eksikliğine bağlı olarak RANKL düzeylerinde hızla artış olur,<sup>186</sup> bu da osteoklast diferansiyasyonu, proliferasyonu ve aktivasyonunda artış ile osteoklast apoptozunda azalmaya yol açar. Postmenopozal dönemde; kemik rezorpsiyon ve formasyon belirleyicileri ile doğrulandığı gibi kemiğin rezorpsiyonu %90 oranında artarken, kemik formasyonu sadece %45 artış göstermektedir ki bu da menopoza sonrası yaklaşık 8-10 yıllık dönemdeki hızlı kemik kaybının en önemli etkenidir.<sup>263</sup>

Literatürdeki bu bilgiler ışığında yön vererek oluşturduğumuz çalışma evreni ile erken postmenopozal dönemdeki Türk kadınlarında RANK geninde C421T ve C575T polimorfizmlerinin sıklıkları ve bunların kemik mineral yoğunluğu ile olası ilişkisi hakkında fikir sahibi olmayı planlandık. Ülkemizde bilimiz dahilinde bu konuyla ilgili yapılmış bir çalışma olmamakla beraber literatürde bu konuyla ilgili yapılmış az sayıda çalışmada farklı sonuçlar mevcuttur.<sup>264, 265</sup>

Çalışma evrenimizi oluşturan hasta ve kontrol grubunun yaş ortalaması kontrol grubunda  $54,5\pm 4,9$ , hasta grubunda  $54,8\pm 4,7$  olarak bulundu. Boy ortalamaları açısından anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen (kontrol ve hasta grubu  $158\pm 6$  cm), kontrol grubunun ortalama vücut ağırlığı ve beden-kitle indeksleri hasta gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu (kontrol grubu  $75\pm 10,2$  kg, BKİ:  $29,9\pm 4,1$  kg/m<sup>2</sup>; hasta grubu  $69,4\pm 9,4$  kg, BKİ:  $27,9\pm 3,7$  kg/m<sup>2</sup>). Perimenopozal dönemde vücutta bazı değişiklikler olmaktadır. Bunlar üreme işlevi, stres hormonları düzeyinde düşme, strese katekolaminerjik cevapta azalma, kemik mineral içeriğinde değişiklikler, yağ dokusunda artış<sup>266</sup> ve vücut yağ dağılımında değişiklikler<sup>267</sup> olarak sayılabilir. Çalışmalar perimenopozal dönemdeki kadınlarda dolaşımdaki insülin düzeyinin ve insülin rezistansının artmış olduğuna<sup>268</sup> ve bu nedenle kadınların yağ dokusu birikimine yatkın olduğunu bildirmektedir.<sup>269</sup> Çalışmamızda kontrol ve hasta grubunun ortalama BKİ değerlerinin kilolu sınıfa giriyor olması da literatürdeki bu bilgilerle uyumlu bir bulgu olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda kontrol grubunun anlamlı olarak daha kilolu olarak bulunması şöyle yorumlanabilir: Kontrol grubumuz KMY değeri yüksek kadınlardan oluşmaktaydı. Vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksi ile KMY arasındaki ilişki birçok faktörden etkilenmektedir. BKİ'deki artış ile ilişkili mekanik yüklenme sonucu kemiğe binen yük, vücut ağırlığı ile KMY arasındaki pozitif ilişkiye katkıda bulunuyor olabilir.<sup>270</sup> Bununla beraber, bu koruyucu etki aynı zamanda yük taşımayan kemik bölgelerinde de gözlenmiştir.<sup>271</sup> Bu da kilo ve yağ dokusundaki artışın yük binmesi ile ilişkili mekanik faktörler yanında adrenal androjenlerin periferde adipoz dokuda aromatisasyonu gibi hormonal bazı etkiler aracılığıyla da KMY'yi etkileyebildiği görüşünü desteklemektedir.<sup>272</sup> Perimenopozal dönemde arttığı belirtilen serum insülin düzeyleri de kemik yapımını uyarıyor olabilir.<sup>273, 268, 274</sup>

Çalışmamızda alkol kullanan kişi sayısı kontrol grubunda hasta grubuna göre yüksek saptandı. Fakat olgularımızın hiçbirinde düşük kemik mineral yoğunluğu için risk oluşturacak düzeyde günde 2-3 ünite üzerinde alkol kullanım öyküsü yoktu.<sup>275</sup> Bu da alkol açısından iki grup arasında risk oluşturacak fark olduğu görüşünü göz ardı etmemizi sağlayabilir. Hatta ılımlı miktarlarda alkol kullanımının özellikle ilerleyen yaşlarda koruyucu özelliği olduğu düşünülecek olursa,<sup>276</sup> çalışmamızda

kontrol grubunda alkolün koruyucu etkisinin de KMY değerinde rol oynamış olabileceği olasılığı aklımıza gelmektedir.

Türkiye’de menopoz yaşı ortalama ve ortanca olarak sırasıyla 47,8±4 yaş (40-57 yaş arasında değişen yaşlarda) ve 51 olarak bildirilmiştir.<sup>277</sup> Olgularımızın menopoz yaşı ortalaması da bu bilgilerle uyumlu olarak kontrol grubunda 48,7±3,3; hasta grubunda 48,3±3,9 olarak saptandı.

Menopoz süresi ortalaması kontrol grubunda 5,8±7 yıl iken, hasta grubunda bu süre 6,8±7 yıl idi. Fark iki grup arasında anlamlı bulunmadı.

Osteoporotik kırık riskinin saptanması ve tedavi kararının verilebilmesi için klinik risk faktörleri ve KMY değerlerinin birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir. Klinik risk faktörleri olarak yaş, düşük vücut kitle indeksi, önceki kırık öyküsü her iki cinsiyet için de önemli risk faktörleridir. Düşük fiziksel aktivite,<sup>278</sup> menopoz süresi,<sup>278</sup> aşırı alkol tüketimi,<sup>278</sup> ailede osteoporoz öyküsü,<sup>1</sup> ailede kırık öyküsü,<sup>1</sup> geç menarş,<sup>1</sup> erken menopoz<sup>1</sup> düşük KMY için belirtilen diğer risk faktörleridir. Dünya Sağlık Örgütüne bağlı Metabolik Kemik Hastalıkları Ortak Çalışma Merkezi tarafından 12 epidemiyolojik kohort çalışmasının incelenmesi ile klinik risk faktörleri ve kırık ilişkisini değerlendirildiği bir meta-analiz sonucu 10 yıllık kırık riskinin hesaplandığı kırık değerlendirme aracı (FRAX) geliştirilmiş ve bu değerlendirme aracı 11 kohort çalışması tarafından da onaylanmıştır.<sup>279, 280</sup>

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarını FRAX ile bildirilen risk faktörleri ve düşük KMY’ye etkisi olabileceği bildirilen ancak FRAX içinde yer almayan diğer bazı risk faktörleri açısından karşılaştırdık. İki grup arasında vücut ağırlığı, BKİ ve alkol kullanımı dışında diğer risk oluşturabilecek faktörler açısından anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuçlar çalışmamızdaki hasta ve kontrol grubu arasında risk faktörlerinin homojenitesi açısından önemli bir özellik olarak değerlendirilebilir.

Çalışmamıza dahil edilen olgularımızın hiçbirinde ikincil osteoporoz nedeni altta yatan hastalık mevcut değildi. Hormon replasman tedavisinin (HRT) KMY üzerindeki bilinen etkisi<sup>281</sup> nedeniyle çalışmamıza son 4 ayda HRT almış kadınları dahil etmedik. Bunun dışında antikoagülan<sup>282, 283</sup> ya da antikonvülzan ilaç kullanımı öyküsü, tiroid ya da paratiroid hastalığı öyküsü, kronik böbrek, kronik karaciğer ya da kalp yetmezliği gibi KMY’yi etkilediği iyi bilinen faktörlerin çalışma dışı bırakılması çalışmanın tutarlılığını arttırmak için önemli idi.

## 5.1 Kontrol Ve Hasta Grupları Arasında Genotip Dağılımı, Allel Sıklığı, Birleşik Genotip Dağılımı Ve Birleşik Haplotip Analizlerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda erken postmenopozal kadınlarda RANK geni ekzon 4'de C421T ve ekzon 6'da C575T polimorfizmlerini inceledik. RANK geni polimorfizmleri ve osteoporoz arasındaki ilişki literatürde bugüne kadar 6 çalışmada araştırılmış olup bunların 3'ünde Koreli postmenopozal kadınlarda RANK geni C575T polimorfizmi de araştırılmıştır.<sup>264, 284, 285</sup> İki Kore çalışmasında RANK geni C421T polimorfizmi de araştırılmıştır.<sup>264, 285</sup> Diğer bir çalışma da Çinliler tarafından yapılmış olup, C575T polimorfizmi toplam 1120 bayan ve erkekte araştırılmıştır.<sup>265</sup> Kalan iki çalışmada RANK geninin farklı 18 SNP'ye bağlı polimorfizmleri çalışılmıştır.<sup>286, 287</sup> Son iki çalışmada incelenen 18 SNP'nin 15'i protein kodlanmayan intronik bölgede olup, 3 tanesi 3'-UTR(çevrilmeyen bölge-ingilizcesi untranslated region=stop kodonu ile poli-A arasındaki bölge) bölgesinde yer alan SNP'lerdir. Çalışmamızda incelediğimiz her iki polimorfizm de proteinin kodlandığı ekzon bölgesindedir. RANK geni ekzon 4'deki C421T polimorfizmine bağlı RANK proteininde 141. pozisyona histidin yerine tirozin aminoasidi (Hys141Tyr) geçerken, ekzon 6'daki C575T polimorfizmine bağlı 192. pozisyona valin yerine alanin (Val192Ala) geçmektedir. Bu nedenle polimorfizm varlığında meydana gelecek amino asit değişikliklerine bağlı sentezlenecek proteinde fonksiyonel değişikliklere yol açma ihtimali ile de ilgi çekebilir.<sup>284</sup>

Çalışmamızda RANK geni C421T polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda genotip dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p:0,790). Kontrol grubunda sırasıyla 100 olgunun 67'sinde CC genotipi (%67,0), 30'unda CT genotipi (%30,0) ve 3'ünde TT genotipi (%3,0) saptandı. Hasta grubunda 78 olgunun 56'sında CC genotipi (%71,8), 20'sinde CT genotipi (%25,6) ve 2'sinde TT genotipi (%2,6) saptandı. C421T polimorfizmi için yapılan iki çalışmada bu polimorfizm Kore ırkında saptanamadığından ileri analiz yapılamamıştır.<sup>264, 285</sup>

Allel frekansları etnik gruplara göre değişiklik göstermektedir.<sup>288</sup> C421T polimorfizmi için kontrol grubumuzda C alleli sıklığı %84,6 iken hasta grubumuzda %82,0 idi. Kontrol grubumuzda T alleli sıklığı %15,4 iken hasta grubumuzda %18,0 bulundu. T alleli görülme riskinde hasta grupta 1,2 kat artış saptandıysa da bu artış

anlamli bulunmadı (p: 0,512). Wuyts ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sağlıklı beyaz ırkta RANK 421C allel frekansı %40 olarak bulunmuştur.<sup>289</sup> Kontrol grubumuzun RANK 421C allel sıklığı çalışmamızda 2 kat yüksek saptandı. Choi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise C421T transisyonu allel sıklığı açısından Kore ırkında polimorfik saptanmamıştır.<sup>264</sup>

C575T polimorfizmi için kontrol grubumuzun genotip dağılımına bakacak olursak 78 olgunun 29'unda CC genotipi (%37,2), 30'unda CT genotipi (%37,5), 19'unda TT genotipi (%24,4) saptandı. Hasta grubunda 100 hastanın 32'sinde CC genotipi (%32,0), 35'inde CT genotipi (%35,0) ve 33'ünde TT genotipi (%33,0) saptandı. Choi ve arkadaşlarının çalışmasında sonuç elde edilen 559 olgunun 65'inde (%11,6) CC genotipi, 234'ünde (%41,9) CT genotipi ve 260'ında (%46,5) TT genotipi saptanmıştır.<sup>264</sup> Kore popülasyonunda bizim çalışmamızdan daha yüksek oranda TT genotipi saptanırken daha düşük oranda CC genotipi saptanmıştır. Kim ve arkadaşlarının 385 Koreli postmenopozal kadında yaptıkları çalışmada C575T polimorfizmine rastlanmamıştır.<sup>285</sup> Çinliler tarafından yapılan bir çalışmada 290 sağlıklı erkek olguda C575T polimorfizmi için genotip dağılımı CC, CT, TT genotipleri için sırasıyla %8,8, %46,1 ve %45,1 şeklinde olup; bu popülasyonda da TT polimorfizmi bizi çalışmamızdaki kontrol grubumuza göre yüksek oranda, CC polimorfizmi ise daha düşük oranda saptanmıştır.<sup>265</sup>

Allel sıklığı açısından bakıldığında RANK 575C alleli sıklığı çalışmamızda kontrol grubunda %56,4 iken hasta grubunda %49,5 olarak saptandı. T allelinin hasta grupta görülme riskinin 1,3 kat artış gösterdiği saptandı fakat bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p:0,195). Bu bulgu beyaz ırkta %51 olarak verilen RANK 575C allel sıklığı ile benzerlik göstermektedir.<sup>289</sup> Çinlilerin yaptığı çalışmada sağlıklı erkek kontrollerde RANK 575C allel sıklığı ise %33 olarak saptanmıştır.<sup>265</sup> Kore popülasyonunda da RANK 575C allel sıklığı %33 olarak saptanmıştır.<sup>264</sup>

C421T ve C575T polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubunda birleşik genotip dağılımları değerlendirildiğinde koruyucu veya risk faktörü olabileceğini düşüneceğimiz anlamlı bir birleşik genotip paterni saptanmadı (p:0,752) . Benzer şekilde hasta ve kontrol grubu arasında birleşik haplotip dağılımını incelediğimizde anlamlı bir haplotip paterni saptanmadı (p:0,723).

## 5.2 Kontrol ve Hasta Gruplarının Kendi İçlerinde Farklı Genotipler ve Farklı Birleşik Genotiplerde Femoral ve Lomber Bölgelerde Düzeltilmiş KMY Değerlerinin Karşılaştırılması

### 5.2.1 Kontrol ve hasta gruplarının kendi içlerinde genotiplere göre femoral ve lomber bölgelerde düzeltilmiş KMY değerlerinin karşılaştırılması

Normal ve düşük KMY'ye göre sınıflandırdığımız hasta ve kontrol gruplarında C421T polimorfizmi genotiplerine göre femur boyun, femur total ve L1-L4'de yaş, boy, kilo ve menopoz süresine göre düzeltilmiş KMY değerlerini incelediğimizde kontrol grubunda bu üç bölgede de KMY'yi anlamlı derecede etkileyecek genotip saptanmadı ( $p_{FN\ KMY}:0,779$ ;  $p_{FT\ KMY}:0,318$ ;  $p_{L1-L4\ KMY}:0,959$ ). Hasta grubunda C421T polimorfizmi için femur boyun ve femur totalde CC, CT, TT genotipleri arasında düzeltilmiş KMY değerleri arasında anlamlı fark yoktu ( $p_{FN\ KMY}:0,715$ ;  $p_{FT\ KMY}:0,099$ ). Bununla beraber kontrol grubunda femur boyun ve femur total KMY değerleri ortalamalarının TT genotipinde bir miktar yüksek olduğu gözlemlendi. Fakat TT genotipinde olgu sayısının az olması nedeniyle (n:2) bu genotip için femur bölgesi KMY değeri üzerine koruyucu bir etkiden söz etmek çok uygun olmayacaktır. Buna ek olarak, TT genotipindeki 2 olguyu demografik özellikleri, risk faktörleri ve KMY değerleri açısından inceledik. Olgularımızın birinde her üç bölge KMY değerleri tüm kontrol grubunun ortalama KMY değerinin de altında idi. Menarş yaşı, menopoz yaşı, menopoz süresi açısından kontrol grubu ortalamaları ile benzer değerlere sahip idi. Beden kitle indeksi 24,4 olup, kontrol grubunun ortalamasından ( $BK\dot{I}_{ort}:29,9\pm4,1\text{ kg/m}^2$ ) hafif düşük idi. Diğer TT genotipli olgumuzu incelediğimizde düzeltilmiş KMY değerlerinin ( $FN_{KMY}:0,971\text{ g/cm}^2$ ;  $FT_{KMY}:1,183\text{ g/cm}^2$ ;  $L1-L4_{KMY}:1,224\text{ g/cm}^2$ ) her üç bölgede de kontrol grubu ortalama değerlerinden ( $FN_{KMYort}:0,832\pm0,082\text{ g/cm}^2$ ;  $FT_{KMYort}:0,965\pm0,092\text{ g/cm}^2$ ;  $L1-L4_{KMYort}:1,056\pm0,109\text{ g/cm}^2$ ) belirgin yüksek olduğu saptandı. Olgumuzun yaş, reproduktif öykü, günlük kalsiyum alımı ve fiziksel aktivite düzeyi açısından değerlendirilmesinde kontrol grubu ortalamalarından farklı olmadığı görülürken, beden kitle indeksi 34,6 değeri ile kontrol grubu ortalama değerinin üzerinde olduğu

saptandı. Bu da olgumuzun femoral bölge KMY değerleri yüksekliğinde vücut ağırlığına bağlı mekanik etki ile yağ dokusunun hormonal mekanizmalara bağlı etkilerinin katkı sağlamış olabileceğini de aklımıza getirmektedir.<sup>270, 272, 290</sup>

Hasta grubunda C421T polimorfizminin genotip dağılımına göre düzeltilmiş KMY değerlerini incelediğimizde lomber bölge düzeltilmiş KMY değeri TT genotipinde anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p_{L1-L4 \text{ KMY}}:0,015$ ). Hasta grubunda TT genotipine ait 3 olgu mevcuttu. Olgu sayısı azlığı nedeniyle TT genotipi ile KMY değeri arasında doğru bir ilişki kurmak mümkün olamamaktadır. Bu üç olgunun tüm özellikleri incelendiğinde iki olgumuzun lomber bölge KMY değerleri hasta grubunun ortalama KMY değeri aralığı içinde ( $0,760 \text{ g/cm}^2 - 0,940 \text{ g/cm}^2$ ) iken (bir olguda  $0,822 \text{ g/cm}^2$  ve diğer olguda  $0,894 \text{ g/cm}^2$ ), üçüncü olgumuzun KMY değeri  $1,194 \text{ g/cm}^2$  ile ortalamanın üzerinde idi. Diğer özellikler ve risk faktörleri açısından incelediğimizde yüksek lomber bölge KMY değerine sahip olgumuzun  $32,8 \text{ kg/m}^2$  değeri ile beden kitle indeksi yüksekliği dışında farklı bir özelliğe rastlanmadı.

C421T polimorfizmi ve KMY ilişkisi değerlendirilmesinde olgu sayısı azlığının yol açabileceği yanılığını en aza indirmek amacıyla C421T polimorfizmi için C ve T allel dozu etkilerini incelemek amacıyla homozigot mutant (TT) ve heterozigot grupları birlikte değerlendirerek CC ve CT+TT genotipleri düzeltilmiş KMY değerlerini değerlendirdik. Analiz sonucunda hem hasta hem de kontrol grubunun kendi içinde değerlendirilmesinde homozigot dominant genotipteki (CC) olguların düzeltilmiş KMY değerleri ile heterozigot ve homozigot mutant genotipe (CT+TT) sahip olguların KMY değerleri arasında üç bölgede anlamlı bir fark gözlenmedi.

RANK geni ekzon 6'da C575T polimorfizmi için kontrol grubunda CC, CT, TT genotiplerinin üç bölgede düzeltilmiş KMY değerlerinin analizinde anlamlı fark yaratacak genotip saptanmadı. İkili gruplar oluşturularak yapılan karşılaştırmalarda da anlamlı bir fark saptanmadı.

## 5.2.2 Kontrol ve hasta gruplarının kendi içlerinde birleşik genotiplere göre femoral ve lomber bölgelerde düzeltilmiş KMY değerlerinin karşılaştırılması

C421T ve C575T polimorfizmleri birleşik genotiplerinde göre yaş, kilo, boy ve menopoz süresine göre düzeltilmiş KMY değerleri hasta ve kontrol gruplarında ayrı ayrı değerlendirildiğinde; kontrol grubunda birleşik genotiplerin KMY değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ( $p_{FN\ KMY}:0,899$ ;  $p_{FT\ KMY}:0,622$ ;  $p_{LI-4\ KMY}:0,968$ ). Hasta grubunda birleşik genotiplerin femur boyun ve femur totalde düzeltilmiş KMY değerlerinin analizinde anlamlı fark saptanmazken ( $p_{FN\ KMY}:0,807$ ;  $p_{FT\ KMY}:0,337$ ); lomber bölgede TT/TT birleşik genotipinin anlamlı oranda yüksek olduğu saptandı ( $p:0,017$ ). Hasta grubunda birleşik genotiplerin Bonferroni düzeltmesi kullanılarak yapılan ikili karşılaştırma testlerinde de sadece TT/TT genotipine bağlı anlamlı fark olduğu saptandı. TT/TT birleşik genotipine sahip olgu sayısı 2 kişi olması nedeniyle TT/TT birleşik genotipi ile KMY değeri arasında bir ilişki kurmak için yetersiz olacağı görüşündeyiz. İstatistiksel analizin güvenilirliğini de arttırmak amacıyla hem hasta hem kontrol grubunda birleşik genotipleri CC/CC birleşik genotipi ile diğer birleşik genotipler olarak iki gruba ayırarak düzeltilmiş KMY değerlerini karşılaştırdık. Kontrol grubunda CC/CC birleşik genotipi KMY değerleri ile diğer birleşik genotipler grubunun KMY değerleri femoral ve lomber bölgelerde karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı. Benzer şekilde hasta grubunda femoral ve lomber bölgelerde KMY değerleri açısından CC/CC birleşik genotipi ve diğer birleşik genotipleri birlikte değerlendirdiğimiz grup arasında fark saptanmadı.

Choi ve arkadaşlarının<sup>264</sup> yaşları 44-79 arasında değişen 650 Koreli postmenopozal kadında OPG (163 A>G, 1181 G>C), RANK (421 C>T, 575 T>C) ve ESR (1335 C>G, 2142 G>A) polimorfizmleri ile yaş ve beden kitle indeksine göre düzeltilmiş distal radius ve kalkaneus KMY'lerinin ilişkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında RANK geni için T575C polimorfik saptanmıştır. Çalışmamızdan farklı olarak Kore popülasyonunda TT genotipinin wild-type olduğu saptanmış olup C allel sıklığı %33 olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda T575C polimorfizmi TT genotipine sahip bireylerde kalkaneus KMY'si CC ve CT genotipine sahip olgulardan yüksek saptanmıştır ( $p:0,017$ ). Gen-gen etkileşimlerini de inceledikleri



çalışmalarında RANK<sup>T575C</sup> ve OPG<sup>G1181C</sup> birleşik genotipleri KMY değerleri arasında anlamlı fark saptanmazken (p:0,104), ikili karşılaştırma testlerinde TT<sup>RANK T575C</sup> / CC<sup>OPG G1181C</sup> birleşik genotipi distal radius ve kalkaneus KMY değerleri TT<sup>RANK T575C</sup> / GG<sup>OPG G1181C</sup> birleşik genotipine sahip olgularınkinden yüksek saptanmıştır (p:0.002).<sup>264</sup> RANK<sup>C575T</sup> polimorfizmi için saptanan bu sonuçlar genlerin farklı etnik grupları ve farklı vücut bölgelerinin KMY değerlerini farklı şekilde etkileyebileceği görüşünü desteklemektedir.<sup>291</sup>

Koh ve arkadaşları 46-83 yaş arası 560 Koreli postmenopozal kadında biri C575T olmak üzere 25 farklı RANK geni polimorfizmlerinin femur boyun ve lomber bölge KMY değerleri ile ilişkisini inceledikleri çalışmalarında, iki intronik SNP'nin lomber bölgede düşük KMY ile ilişkili olduğunu saptamışlardır.<sup>284</sup> C575T polimorfizminin postmenopozal Koreli kadınlarda femur ve lomber bölge KMY değerlerine etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca olguların konvansiyonel grafiplerle vertebral kırıkları ve sorgulama ile öğrenilen non-vertebral kırıkları belirlenerek RANK geni polimorfizmleri ile kırık ilişkisinin değerlendirilmesinde herhangi bir ilişki saptamamışlardır. Bu sonucu kırık riskine kalıtımın %25-35 oranında katkısı olması<sup>292</sup> ve de KMY dışında düşme ile ilişkili pek çok çevresel faktörün önemli rolü<sup>293</sup> olması nedeniyle net bir ilişkinin kurulamayacağı ile açıklamışlardır.

Çinliler tarafından yapılmış bir çalışmada (555 hasta ve 565 kontrol) çalışmamız ile benzer şekilde KMY değerlerine göre ayrılan olgular RANK/RANKL/OPG gen polimorfizmleri ve femur total ve tüm vücut KMY ile ilişkileri açısından incelenmişlerdir.<sup>265</sup> Farklı olarak bu çalışmada erkek cinsiyet ve premenopozal dönemdeki bayanlar da dahil edilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarının demografik özellikler ve risk faktörleri açısından anlamlı bir farklılık göstermediği bu çalışmada sadece erkeklerde RANK<sup>C575T</sup> polimorfizmi ile kalça ve tüm vücut KMY değerleri arasında anlamlı ilişki saptanmış olup CT<sup>RANKC575T</sup> genotipinin daha yüksek KMY değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada yine sadece erkeklerde RANK<sup>C575T</sup> polimorfizminin diğer incelenen RANKL ve OPG polimorfizmleri ile anlamlı gen-gen etkileşiminde bulunduğu saptanmıştır .

### 5.3 Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızın en önemli kısıtlılığı genetik polimorfizme bağlı KMY değerleri arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla toplanan olgu sayısının azlığıdır. Çalışmamızda sadece postmenopozal dönemdeki kadınları incelemiş olmamız nedeniyle erkeklerde bu polimorfizmlerin KMY değerleri ile ilişkisi saptanmadığı için cinsiyetler arası farkın değerlendirilmesi mümkün olmamıştır. Kadın ve erkek cinsiyet arasında karakteristik özellikler lokuslarının (İngilizcesi 'quantitative trait loci' (QTL)) sınırlı düzeyde örtüşmesi nedeniyle farklı cinsiyetler için farklı genlerin KMY üzerinde etki gösterebileceği bilinmektedir.<sup>294</sup> Daha geniş popülasyonlu ve her iki cinsiyeti de içerecek çalışmalar incelenecek genin o toplumdaki polimorfizminin farklı özellikteki olgularda oluşturabileceği etkiyi yansıtabilmesi ve elde edilecek sonuçların genellenebilir olması açısından gereklidir.

Dejeneratif osteoartrite bağlı oluşabilecek osteofitlerin, vertebral kırık ve deformitelerin ya da omurga eğriliklerinin lomber vertebra KMY ölçümleri değerlendirilirken KMY değerini etkileyebileceği bilinmektedir. Olgularımızda omurga deformiteleri açısından klinik fizik muayene yapıldı, DEXA ölçüm görüntülerinin incelenmesi dışında herhangi bir görüntüleme yöntemi kullanılmadı. Fizik muayene ile belirgin deformiteye sahip olgu saptanmadı. Dejeneratif değişikliklerin daha sıklıkla ilerleyen yaşlarda - özellikle 65 yaş ve üstünde-omurga DEXA ölçümünde yalancı yüksek kemik mineral yoğunluğu ile sonuçlandığı bildirilmektedir.<sup>295</sup> Çalışma popülasyonumuz 45-65 yaş arası bireylerle sınırlandırılmış olsa da çalışmamızda sayılan nedenlerden ötürü görüntüleme yöntemi kullanılmamış olması bu açıdan bir kısıtlılıktır.

Günümüzde; üç boyutlu bir yapısı olan kemiğin iki boyutlu bir inceleme yöntemi olan DEXA yöntemi ile mineral yoğunluğu ölçümleri osteoporoz tanısı, kırık riskinin değerlendirilmesi ve tedavinin izlenmesinde önemli bir role sahip olsa da ideal yöntem değildir. Kantitatif bilgisayarlı tomografi ya da kemik biyopsisi gibi ileri tetkiklerle kemik mikromimarisini gösterebilecek değerlendirmeler, osteoporoz gelişiminde etkili olabilecek faktörleri araştırmada kullanılacak daha duyarlı yöntemler olabilir.<sup>296</sup> Ancak, günlük uygulamada bu tetkiklerin pahalı olması, daha uzun analiz zamanı gerektirecek olmaları, tomografi ile daha yüksek dozlarda X

ışınlarına maruz kalınacak olması, kemik biyopsisinin invazif bir işlem olması göz önüne alınırsa bu ileri incelemelerin tercih edilemeyebileceği düşünülebilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Postmenopozal 178 Türk kadınında RANK geni ekzon 4'deki C421T ve ekzon 6'daki C575T polimorfizmleri genotip, birleşik genotip ve allel sıklıkları açısından normal veya düşük kemik mineral yoğunluğuna sahip gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

2. Postmenopozal 178 Türk kadınında normal ve düşük kemik mineral yoğunluğuna sahip gruplarda C421T ve C575T polimorfizmleri ile femur boyun, femur total ve lomber bölge KMY değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Aile ve ikiz çalışmaları ile genetik varyasyonların en büyük oranda etki sahibi olduğu kabul edilen KMY değerlerinin RANK geni polimorfizmleri ile ilişkilerinin aydınlatılması açısından her iki cinsiyeti de içeren ve daha çok sayıda olguya sahip ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- 1) NIH consensus statement. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA 2001;285(6):785–795
- 2) Cole Z, Dennison E, Cooper C. Update on treatment of post-menopausal osteoporosis. Br Med Bull 2008;86:129-143
- 3) F. Albright, and E. C. Reifenstein, Jr. The Parathyroid Glands and Metabolic Bone Disease: Selected Studies. Williams and Wilkins, Baltimore 1948
- 4) Riggs BL, Wahner HW, Seeman E, Offord KP, Dunn WL, Mazess RB, Johnson KA, and Melton, 3rd LJ. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndromes. J Clin Invest 1982; 70(4):716–723
- 5) Osteoporosis. National Institutes of Health. Conn Med. 1984;48(10):651-655
- 6) Kanis JA, Melton LJ, Christiansen 3rd C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res 1994;9(8):1137-1141
- 7) Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med 1991;90(1):107-110
- 8) Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: Concepts, conflicts, and prospects. J Clin Invest 2005;115(12): 3318-3325
- 9) Rosen CJ, Beamer WG, Donahue LR. Defining the genetics of osteoporosis: using the mouse to understand man. Osteoporos Int 2001;12(10):803-810
- 10) Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. Endocrine Reviews 2002;23(3):303-326
- 11) Cummings SR, Nevitt MC, Browner WS, Stone K, Fox KM, Ensrud KE, Cauley J, Black D, Vogt TM. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fracture Research Group. N Engl J Med 1995;332(12):767-773
- 12) Togerson DJ, Campbell MK, Thomas RE, Reid DM. Prediction of perimenopausal fractures by bone mineral density and other risk factors. J Bone Miner Res 1996;11(2):293-297
- 13) Andrew T, Antoniadou L, Scurrah KJ, MacGregor AJ, Spector TD. Risk of wrist fracture in women is heritable and is influenced by genes that are largely independent of those influencing BMD. J Bone Miner Res 2005;20(1):67-74

- 14) Rosen CJ, Bouxsein ML. Mechanisms of disease: Is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(1):35-43
- 15) Seeman E, Duan Y, Fong C, Edmonds J. Fracture site-specific deficits in bone size and volumetric density in men with spine or hip fractures. *J Bone Miner Res.* 2001;16(1):120-127
- 16) Li WF, Hou SX, Yu B, Li MM, Férec C, Chen JM. Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Hum Genet* 2010;127(3):249-85
- 17) Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Reeve J, Reid DM, Amedei A, Bassiti A, Bustamante M, Husted LB, Diez-Perez A, Dobnig H, Dunning AM, Enjuanes A, Fahrleitner-Pammer A, Fang Y, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, Mavilia C, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Pols HA, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Scollen S, Sherlock RE, Ioannidis JP; APOSS Investigators; EPOS Investigators; EPOLOS Investigators; FAMOS Investigators; LASA Investigators; Rotterdam Study Investigators; GENOMOS Study. The association between common vitamin D receptor gene variations and osteoporosis: A participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006;145(4):255-264
- 18) Williams FM, Spector TD. The genetics of osteoporosis. *Acta Reumatol Port* 2007;32(3):231-240
- 19) Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 2004;292(17): 2105-2114
- 20) Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;350(16):1655-1664
- 21) Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* 1989;245(4920):855-857

- 22) Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem* 1994;55(3):273-286
- 23) Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332(5):305-311
- 24) Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):201-209
- 25) Camacho P. Pathogenesis. In: Camacho PM, Miller PD, eds. *Osteoporosis: A guide for clinicians*. USA: Lippincott Williams&Wilkins, 2007:15-24
- 26) Frost HM. Some ABCs of skeletal pathophysiology III: Bone balance and the delta B. *BMU. Calcif Tissue Int* 1989;45(3):131-133
- 27) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003;423(6937):337-342
- 28) Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000;100(2):197-207
- 29) Takada S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002;111(3):305-317
- 30) Baldock PA, Sainsbury A, Couzens M, Enriquez RF, Thomas GP, Gardiner EM, Herzog H. Hypothalamic Y2 receptors regulate bone formation. *J Clin Invest* 2002;109(7):915-921
- 31) Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nature Med* 2007;13(10):1234-1240
- 32) Harada N, Utsumi T, Takagi Y. Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(23):11312-11316

- 33) Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997;82(8):2396-2402
- 34) Westerlind KC, Gibson KJ, Malone P, Evans GL, Turner RT. Differential effects of estrogen metabolites on bone and reproductive tissues of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1998;13(6):1023-1031
- 35) Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res* 2005;20(2):177–184
- 36) Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21(2):115–137
- 37) Falahati-Nini AF, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000;106(12):1553–1560
- 38) Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(5):2309–2314
- 39) Sims NA, Clement-Lacroix P, Minet D, Fraslon-Vanhulle C, Gaillard-Kelly M, Resche-Rigon M, Baron R. A functional androgen receptor is not sufficient to allow estradiol to protect bone after gonadectomy in estradiol receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2003;111(9):1319–1327
- 40) Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Alatalo S, Hallen J, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C. Two different pathways for the maintenance of trabecular bone in adult male mice. *J Bone Miner Res* 2002;17(4):555–562
- 41) Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(3):688–696
- 42) Lee K, Jessop HL, Suswillo G, Zaman G, Lanyon L. Bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature* 2003;424(6947):389
- 43) Vanderschueren D, Vandenput L, Bonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004;25(3):389–425



- 44) Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R, Simpson ER. Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res* 2000;15(3):507–514
- 45) Miyaura C, Toda K, Inada M, Ohshiba T, Matsumoto C, Okada T, Ito M, Shizuta Y, Ito A. Sex- and age-related response to aromatase deficiency in bone. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280(4):1062-1068
- 46) Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996;2(10):1132–1136
- 47) Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 2000;106(10):1203–1204
- 48) Gao Y, Qian WP, Dark K, Toraldo G, Lin AS, Guldberg RE, Flavell RA, Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen prevents bone loss through transforming growth factor beta signaling in T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(47):16618-16623
- 49) Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: An inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006; 116(5):1186–1194
- 50) Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, Kim JH, Kobayashi T, Odgren PR, Nakano H, Yeh WC, Lee SK, Lorenzo JA, Choi Y. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *J Exp Med* 2005;202(5):589–595
- 51) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K, Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408(6812):600–605
- 52) Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402(6759):304–309
- 53) Nanes MS. Tumor necrosis factor-alpha: Molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene* 2003;321:1–15

- 54) Vedi S, Purdie DW, Ballard P, Bord S, Cooper AC, Compston JE. Bone remodeling and structure in postmenopausal women treated with long-term, high-dose estrogen therapy. *Osteoporos Int* 1999;10(1):52–58
- 55) Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S, Glasebrook A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17-beta-estradiol and raloxifene. *Science* 1996;273(5279):1222–1225
- 56) Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M, Gardner B, Batra RK, Strieter RM, Dubinett SM. IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 109(7):931–937
- 57) Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 2004;301(2):119–127
- 58) Chen JR, Plotkin LI, Aguirre JI, Han L, Jilka RL, Kousteni S, Bellido T, Manolagas SC. Transient versus sustained phosphorylation and nuclear accumulation of ERKs underlie anti-versus pro-apoptotic effects of estrogens. *J Biol Chem* 2005;280(6):4632–4638
- 59) Arjmandi BH, Salih MA, Herbert DC, Sims SH, Kalu DN. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. *Bone Miner* 1993;21(1):63–74
- 60) Van Cromphaut SJ, Rummens K, Stockmans I, Van Herck E, Dijcks FA, Ederveen A, Carmeliet P, Verhaeghe J, Bouillon R, Carmeliet G. Intestinal calcium transporter genes are upregulated by estrogens and the reproductive cycle through vitamin D receptor-independent mechanisms. *J Bone Miner Res* 2003;18(10):1725–1736
- 61) McKane WR, Khosla S, Burritt MF, Kao PC, Wilson DM, Ory SJ, Riggs BL. Mechanism of renal calcium conservation with estrogen replacement therapy in women in early postmenopause—A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(12):3458–3464
- 62) Cheema C, Grant BF, Marcus R. Effects of estrogen on circulating “free” and total 1,25-dihydroxyvitamin D and on the parathyroid-vitamin D axis in postmenopausal women. *J Clin Invest* 1989;83(2):537–542

- 63) Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006;116(8):2062-2072
- 64) Hruska KA. Hyperphosphatemia and hypophosphatemia. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006:233-242
- 65) Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: Photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 6th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research, 2006:129-137
- 66) Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003;22(2):142-146
- 67) Landin-Wilhelmsen K, Wilhelmsen L, Wilske J, Lappas G, Rosen T, Lindstedt G, Lundberg PA, Bengtsson BA. Sunlight increases serum 25(OH) vitamin D concentration whereas 1,25(OH)2D3 is unaffected. Results from a general population study in Goteborg, Sweden (The WHO MONICA Project). *Eur J Clin Nutr* 1995;49(6):400-407
- 68) McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med* 1992;93(1):69-77
- 69) Maclaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D3. *J Clin Invest* 1985;76(4):1536-1538
- 70) Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D and solar ultraviolet. *Lancet* 1989;2(8671):1104-1105
- 71) Quesada JM, Coopmans W, Ruiz B, Aljama P, Jans I, Bouillon R. Influence of vitamin D on parathyroid function in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(2):494-501
- 72) Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84(1):18-28
- 73) Venning G. Recent developments in vitamin D deficiency and muscle weakness among elderly people. *BMJ* 2006;330(7490):524-526

- 74) Cauley JA, Lacroix AZ, Wu L, Horwitz M, Danielson ME, Bauer DC, Lee JS, Jackson RD, Robbins JA, Wu C, Stanczyk FZ, LeBoff MS, Wactawski-Wende J, Sarto G, Ockene J, Cummings SR. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and risk for hip fractures. *Ann Intern Med* 2008;149(4):242–250
- 75) Bischoff Ferrari HA, Kiel DP, Dawson-Hughes B, Orav JE, Li R, Spiegelman D, Dietrich T, Willett WC. Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among US adults. *J Bone Min Res* 2009;24(5):935-942
- 76) Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. *Osteoporos Int* 1992;2(6):285-289
- 77) Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status: *Osteoporos Int* 2005;16(7):713-716
- 78) Lips P, Bouillon R, van Schoor NM, Vanderschueren D, Verschueren S, Kuchuk N, Koen Milisen K, Bonen S. Reducing fracture risk with calcium and vitamin D. *Clin Endocrinol(Oxf)* 2009;Sep 10. [Epub ahead of print]
- 79) Kuchuk NO, van Schoor NM, Pluijm SM, Chines A, Lips P. Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective. *J Bone Miner Res* 2009;24(4):693-701
- 80) Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD, Meunier PJ. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med* 1992;327(23):1637-1642
- 81) Chapuy MC, Pamphile R, Paris E, Kempf C, Schlichting M, Arnaud S, Garnero P, Meunier PJ. Combined calcium and vitamin D3 supplementation in elderly women: Confirmation of reversal of secondary hyperparathyroidism and hip fracture risk: the Decalys II study. *Osteoporos Int* 2002;13(3):257-264
- 82) Grant AM, Avenell A, Campbell MK, McDonald AM, MacLennan GS, McPherson GC, Anderson FH, Cooper C, Francis RM, Donaldson C, Gillespie WJ, Robinson CM, Torgerson DJ, Wallace WA; RECORD Trial Group. Oral vitamin D3 and calcium for secondary prevention of low-trauma fractures in elderly people (Randomised Evaluation of Calcium or Vitamin D, RECORD): A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2005;365(9471):1621-1628
- 83) Jackson RD, LaCroix AZ, Gass M, Wallace RB, Robbins J, Lewis CE, Bassford T, Beresford SAA, Black HR, Blanchette P, Bonds DE, Brunner RL, Brzyski

- RG, Caan B, Cauley JA, Chlebowski RT, Cummings SR, Granek I, Hays J, Heiss G, Hendrix SL, Howard BV, Hsia J, Hubbell FA, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller LH, Langer RD, Lasser NL, Limacher MC, Ludlam S, Manson JE, Margolis KL, McGowan J, Ockene JK, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Sarto GE, Stefanick ML, Van HL, Wactawski-Wende J, Whitlock E, Anderson GL, Assaf AR, Barad D, for the Women's Health Initiative Investigators\*. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of fractures. *N Engl J Med* 2006;354(7):669-683
- 84) Ferrari SL, Rizzoli R, Slosman DO, Bonjour JP. Do dietary calcium and age explain the controversy surrounding the relationship between bone mineral density and vitamin D receptor gene polymorphisms? *J Bone Miner Res* 1998;13(3):363-370
- 85) Morrison NA, George PM, Vaughan T, Tilyard MW, Frampton CM, Gilchrist NL. Vitamin D receptor genotypes influence the success of calcitriol therapy for recurrent vertebral fracture in osteoporosis. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(2):127-135
- 86) Garnero P, Munoz, F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(8):4829-4835
- 87) Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89(59):747-754
- 88) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108(1):17-29
- 89) Timpson NJ, Tobias JH, Richards JB, Soranzo N, Duncan EL, Sims AM, Whittaker P, Kumanduri V, Zhai G, Glaser B, Eisman J, Jones G, Nicholson G, Prince R, Seeman E, Spector TD, Brown MA, Peltonen L, Smith GD, Deloukas P, Evans DM. Common variants in the region around Osterix are associated with bone mineral density and growth in childhood. *Hum Mol Genet* 2009;18(8):1510-7

- 90) Lee HJ, Koh JM, Hwang JY, Choi KY, Lee SH, Park EK, Kim TH, Han BG, Kim GS, Kim SY, Lee JY. Association of a RUNX2 promoter polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Calcif Tissue Int* 2009 Jun;84(6):439-45
- 91) Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(9):3324-3329
- 92) Andrade AC, Nilsson O, Barnes KM, Baron J. Wnt gene expression in the post-natal growth plate: regulation with chondrocyte differentiation. *Bone* 2007;40(5):1361-1369
- 93) Dong YF, Soung do Y, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H. Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor. *J Cell Physiol* 2006;208(1):77-86
- 94) Geoffroy V, Kneissel M, Fournier B, Boyde A, Matthias P. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol* 2002;22(17):6222-6233
- 95) Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell* 2005;8(5):751-764
- 96) Shahnazari M, Yao W, Corr M, Lane N. Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation. *Curr Osteoporos Rep* 2008;6(4):142-148
- 97) Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J Cell Biochem* 2005;94(2):403-418
- 98) Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002;346(20):1513-1521
- 99) Van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W. Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5

- (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am J Hum Genet* 2003;72(3):763-771
- 100) Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107(4):513-523
- 101) Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Ueland T, Palmer L, Devine A, Prince RL. LRP5 gene polymorphisms predict bone mass and incident fractures in elderly Australian women. *Bone* 2005;36:599-606
- 102) Bergenstock MK, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulation of noncanonical Wnt signaling in bone. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:354–359
- 103) Takada I, Suzawa M, Matsumoto K, Kato S. PPAR transactivation switches cell fate of bone marrow stem cells from adipocytes into osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:182–195
- 104) Parfitt AM. Targeted and non-targeted bone remodelling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 2002;30(1):5-7
- 105) Canalis E. Growth factor control of bone mass. *J Cell Biochem* 2009;108(4):769-777
- 106) Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391(6665):357–362
- 107) Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, Niehrs C. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* 2001;411(6835):321–325

- 108) Li X, Liu P, Liu W, Maye P, Zhang J, Zhang Y, Hurley M, Guo C, Boskey A, Sun L, Harris SE, Rowe DW, Ke HZ, Wu D. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nat Genet* 2005;37(9):945–952
- 109) Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, Duncan EL, Eisman J, Jones G, Nicholson G, Prince R, Seeman E, Thomas G, Wass JA, Brown MA. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res* 2008;23:499–506
- 110) Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Bone T, Gneg Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Min Res* 2009;24:578-588
- 111) Stykarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K. Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol* 2003;1:1–10
- 112) Ichikawa S, Johnson ML, Koller DL, Lai D, Xuei X, Edenberg HJ, Hui SL, Foroud TM, Peacock M, Econs MJ. Polymorphisms in the bone morphogenetic protein 2 (BMP2) gene do not affect bone mineral density in white men or women. *Osteoporos Int* 2006;17(4):587-9
- 113) Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002;27:2–8
- 114) Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 1994;55(3):350–357
- 115) Mehls O, Himmele R, Homme M, Kiepe D, Klaus G. The interaction of glucocorticoids with the growth hormone-insulin-like growth factor axis and its effects on growth plate chondrocytes and bone cells. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(Suppl 6):1475-1482
- 116) Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S, Halloran BP. Insulin like growth factor is required for the anabolic



- actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Min Res* 2002;17:1570-1578
- 117) Yakar S, Canalis E, Sun H, Mejia W, Kawashima Y, Nasser P, Courtland HW, Williams V, Bouxsein M, Rosen C, Jepsen KJ. Serum IGF-1 determines skeletal strength by regulating sub-periosteal expansion and trait interactions. *J Bone Min Res* 2009;24:1481-1482
- 118) Zhang M, Xuan S, Bouxsein ML, von Stechow D, Akeno N, Faugere MC, Malluche H, Zhao G, Rosen CJ, Efstratiadis A, Clemens TL. Osteoblast specific knockout of the insulin-like growth factor (IGF) receptor gene reveals an essential role of IGF signaling in bone matrix mineralization. *J Biol Chem* 2002;277:44005-44012
- 119) Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev* 2005;26:743-774
- 120) Lau EM, Wong SY, Li M, Ma CH, Lim PL, Woo J. Osteoporosis and transforming growth factor-beta-1 gene polymorphism in Chinese men and women. *J Bone Miner Metab* 2004;22:148-152
- 121) Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the transforming growth factor beta-1-gene and osteoporosis. *Bone* 2003;32:297-310
- 122) Kim JG, Roh KR, Lee JY. The relationship among serum insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I gene polymorphism, and bone mineral density in postmenopausal women in Korea. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:345-350
- 123) Dunstan CR, Boyce R, BoyceBF, Garrett IR, Izbicka E, Burgess WH, Mundy GR. Systemic administration of acidic fibroblast growth factor (FGF-1) prevents bone loss and increases new bone formation in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1999;14:953-959
- 124) Hurley MM, Abreu C, Harrison JR, Lichtler AC, Raisz LG, Kream BE. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 1993;268:5588-5593
- 125) Hurley MM, Okada Y, Xiao L, Tanaka Y, Ito M, Okimoto N, Nakamura T, Rosen CJ, Doetschman T, Coffin JD. Impaired bone anabolic response to

- parathyroid hormone in *Fgf2*<sup>-/-</sup> and *Fgf2*<sup>+/-</sup> mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:989–994
- 126) Hurley MM, Lee SK, Raisz LG, Bernecker P, Lorenzo J. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation in murine bone marrow cultures. *Bone* 1998;22:309–316
- 127) Hock JM, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology* 1994;134:1423–1428
- 128) Dennison EM, Hindmarsh PC, Kellingray S, Fall CHD, Cooper C. Growth hormone predicts bone density in elderly women. *Bone* 2003;32:434-440
- 129) Joseph F, Ahmad AM, Ul-Haq M, Durham BH, Whittingham P, Fraser WD, Vora JP. Effects of growth hormone administration on bone mineral metabolism, PTH sensitivity and PTH secretory rhythm in postmenopausal women with established osteoporosis. *Bone Miner Res* 2008;23(5):721-9
- 130) Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC, Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res* 2005;20:1103–1113
- 131) Lau KH, Kapur S, Kesavan C, Baylink DJ. Upregulation of the WNT, estrogen receptor, insulin-like growth factor-I, and bone morphogenetic protein pathways in C57BL/6J osteoblasts as opposed to C3H/HeJ osteoblasts in part contributes to the differential anabolic response to fluid shear. *J Biol Chem* 2006;281:9576–9583
- 132) Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:154–168
- 133) Guillotin B, Bourget C, Remy-Zolgadri M, Bareille R, Fernandez P, Conrad V, Amedee-Vilamitjana J. Human primary endothelial cells stimulate human osteoprogenitor cell differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:325–332
- 134) Romas E, Udagawa N, Zhou H, Tamura T, Saito M, Taga T, Hilton DJ, Suda T, Ng KW, Martin TJ. The role of gp130 mediated signals in osteoclast development: Regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and

- distribution of its receptor in bone marrow cultures. *J Exp Med* 1996;183:2581–2591
- 135) Lee SK, Kalinowski JF, Jastrzebski SL, Puddington L, Lorenzo JA. Interleukin-7 is a direct inhibitor of in vitro osteoclastogenesis. *Endocrinology* 2003;144:3524–3531
- 136) Toraldo G, Roggia C, Qian WP, Pacifici R, Weitzmann MN. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and tumor necrosis factor alpha from T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:125–130
- 137) Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, Conaway HH, Lerner UH. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem* 2006;281:2414–2429
- 138) Tasker PN, Albagha OM, Masson CB, Reid DM, Ralston SH. Association between TNFRSF1B polymorphisms and bone mineral density, bone loss and fracture. *Osteoporos Int* 2004;15:903-908
- 139) Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL, Kim, JY, Jung JH, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women. *J Hum Genet* 2003;48: 243-248
- 140) Forwood MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res* 1996;11:1688-1693
- 141) Bakker AD, Klein-Nulend J, Tanck E, Albers GH, Lips P, Burger EH. Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos Int* 2005;16:983-989
- 142) Raisz LG. Potential impact of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on bone metabolism in health and disease. *Am J Med* 2001;110(3)(Suppl 1):43-45
- 143) Carbone LD, Tylavsky FA, Cauley JA, Harris TB, Lang TF, Bauer DC, Barrow KD, Kritchevsky SB. Association between bone mineral density and the

- use of nonsteroidal anti inflammatory drugs and aspirin: Impact of cyclooxygenase selectivity. *J Bone Miner Res* 2003;18:1795-1802
- 144) Wang FS, Wang CJ, Chen YJ, Huang YT, Huang HC, Chang PR, Sun YC, Yang KD. Nitric oxide donor increases osteoprotegerin production and osteoclastogenesis inhibitory activity in bone marrow stromal cells from ovariectomized rats. *Endocrinology* 2004;145:2148-2156
- 145) Jamal SA, Cummings SR, Hawker GA. Isosorbide mononitrate increases bone formation and decreases bone resorption in postmenopausal women: A randomized trial. *J Bone Miner Res* 2004;19:1512-1517
- 146) Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, Mundy GR, Bonewald LF. 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. *Endocrinology* 1998;139:3178-3184
- 147) Klein RF, Allard J, Avnur Z, Nikolcheva T, Rotstein D, Carlos AS, Shea M, Waters RV, Belknap JK, Peltz G, Orwoll ES. Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene *Alox15*. *Science* 2004;303:229-232
- 148) Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxygenase *ALOX15* 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 2005;23:226-230
- 149) Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta. *Lancet* 2004;363(9418):1377-1385
- 150) Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Scollen S, Bustamante M, Husted LB, Carey AH, Diez-Perez A, Dunning AM, Falchetti A, Karczmarewicz E, Kruk M, van Leeuwen JP, van Meurs JB, Mangion J, McGuigan FE, Mellibovsky L, Del Monte F, Pols HA, Reeve J, Reid DM, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Sherlock RE, Ioannidis JP. Large-scale evidence for the effect of the *COL1A1* Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med* 2006;3(4):e90
- 151) Zhang YY, Lei SF, Mo XY, Wang YB, Li MX, Deng HW. The -1997 G/T polymorphism in the *COL1A1* upstream regulatory region is associated with hip

- bone mineral density (BMD) in Chinese nuclear families. *Calcif Tissue Int* 2005;76(2):107–112
- 152) Yazdanpanah N, Rivadeneira F, van Meurs JB, Zillikens MC, Arp P, Hofman A, Van Duijn CM, Pols HA, Uitterlinden AG. The –1997 G/T and Sp1 polymorphisms in the collagen type I alpha1 (COLIA1) gene in relation to changes in femoral neck bone mineral density and the risk of fracture in the elderly: the Rotterdam Study. *Calcif Tissue Int* 2007;81:18–25
- 153) Husted LB, Harsløf T, Gonzalez-Bofill N, Schmitz A, Carstens M, Stenkjaer L, Langdahl BL. Haplotypes of promoter and intron 1 polymorphisms in the COLIA1 gene are associated with increased risk of osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 2009;84(2):85-96
- 154) Tucker KL, Hannan MT, Qiao N, Jacques PF, Selhub J, Cupples LA, Kiel DP. Low plasma vitamin B12 is associated with lower BMD: the Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res* 2005;20:152–158
- 155) Jackson SH. The reaction of homocysteine with aldehyde: an explanation of the collagen defects in homocystinuria. *Clin Chim Acta* 1973;45:215-217
- 156) van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004;350(20):2033-2041
- 157) Vaes BL, Lute C, Blom HJ, Bravenboer N, de Vries TJ, Everts V, Dhonukshe-Rutten RA, Müller M, de Groot LC, Steegenga W T. Vitamin B(12) deficiency stimulates osteoclastogenesis via increased homocysteine and methylmalonic acid. *Calcif Tissue Int* 2009;84(5):413-22
- 158) Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, de Groot LC, Lips P, Smit JH, van Staveren WA. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 2005;20:921–929
- 159) Rosen CF. Serotonin, leptin and the central control of bone remodeling. *Nature Rev Rheumatology* 2009;5(12),657-658
- 160) Takeda S. Central control of bone remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328(3):697-699

- 161) Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, Kotowicz MA, Seeman E, Nicholson GC. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density: Geelong osteoporosis study. *J Bone Miner Res* 2004;19(1):19–24
- 162) Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). *J Biol Chem* 2002;277(33):29359-29362
- 163) Ağbaht K, Gürlek A, Karakaya J, Bayraktar M. Circulating adiponectin represents a biomarker of the association between adiposity and bone mineral density. *Endocrine* 2009;35(3):371-379
- 164) Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi JY, Kim JB. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 2009;27(9):2254-2262
- 165) Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol* 2008;153(2):182-188
- 166) Driessler F, Baldock PA. Hypothalamic regulation of bone. *J Mol Endocrinol* 2010 Jul 26. [Epub ahead of print]
- 167) Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB. Neuromedin U and its receptors: Structure, function, and physiological roles. *Pharmacol Rev* 2004;56(2):231–248
- 168) Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 2005;11(2):76-81
- 169) Johnson-Pais TL, Singer FR, Bone HG, McMurray CT, Hansen MF, Leach RJ. Identification of a novel tandem duplication in exon 1 of the TNFRSF11A gene in two unrelated patients with familial expansile osteolysis. *J Bone Miner Res* 2003;18(2):376-380
- 170) Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 2008;473(2):139-146
- 171) Bonewald LF. Osteocytes as dynamic, multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci* 2007;1116:281-290
- 172) Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *Musculoskeletal Neuronal Interact* 2000;1(2):133-136

- 173) Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res* 2000;15(1):60-67
- 174) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397(6717):315-323
- 175) Boyce BF, Xing L, Chen D. Osteoprotegerin, the bone protector, is a surprising target for beta-catenin signaling. *Cell Metab* 2005;2(6):344-345
- 176) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20(3):345-357
- 177) Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292(4):490-495
- 178) Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12(9):1260-1268
- 179) Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. 2004. *J Bone Miner Res* 2005;20(12):2275-2282
- 180) Cummings SR, Martin JS, McClungMR, Siris ES, Richard Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C, for the FREEDOM Trial. *N Engl J Med* 2009;361:756-765
- 181) Reid I, Miller P, Brown J, Kendler D, Fahrleitner-Pammer A, Valter I, Maasalu K, Bolognese M, Woodson G, Bone H, Ding B, Wagman R, Martin JS, Ominsky M, Dempster D. Effects of denosumab on bone histomorphometry: The

- FREEDOM and STAND studies; on behalf of the Denosumab Phase 3 Bone Histology Study Group. *J Bone Miner Res* 2010 Jun 8. [Epub ahead of print]
- 182) Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, Hadji P, Hofbauer LC, Alvaro-Gracia JM, Wang H, Austin M, Wagman RB, Newmark R, Libanati C, San Martin J, Bone HG. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: A randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res* 2009;24(1):153-161
- 183) Hikita A, Yana I, Wakeyama H, Nakamura M, Kadono Y, Oshima Y, Nakamura K, Seiki M, Tanaka S. Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 2006;281(48):36846-36855
- 184) Kanamaru F, Iwai H, Ikeda T, Nakajima A, Ishikawa I, Azuma M. Expression of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappa-B ligand (RANKL) in human T cells. *Immunol Lett* 2004;94(3):239-246
- 185) O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone* 2010;46(4):911-919
- 186) Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111(8):1221-1230
- 187) Bai S, Kopan R, Zou W, Hilton MJ, Ong CT, Long F, Ross FP, Teitelbaum SL. NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells. *J Biol Chem* 2008;283(10):6509-6518
- 188) Moffett SP, Oakley JJ, Cauley JA, Lui LY, Ensrud KE, Taylor BC, Hillier TA, Hochberg MC, Li J, Cayabyab S, Lee JM, Peltz G, Cummings SR, Zmuda JM. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. Osteoprotegerin Lys3Asn polymorphism and the risk of fracture in older women. *Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):2002-2008
- 189) Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2010;37(1):227-234



- 190) Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006;4(6):801-811
- 191) Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004;95(11):1046-1057
- 192) Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat Genet* 2000;24(1):45-48
- 193) Yang GY, Pan TL, Xu F, Dong XH, Deng SS, Wen H. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2008;3(2):223-267
- 194) Takayanagi H. The Role of NFAT in Osteoclast Formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1116:227-237
- 195) Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Pols HA. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone* 2004;34(1):195-202
- 196) Dolan P, Torgerson DJ. The cost of treating osteoporotic fractures in the United Kingdom female population. *Osteoporos Int* 1998;8(6):611-617
- 197) National Osteoporosis Foundation: Fast facts on osteoporosis. [http://www.nof.org/professionals/Clinicians\\_Guide.htm](http://www.nof.org/professionals/Clinicians_Guide.htm)
- 198) Blake GM, Fogelman IF. An update on Dual-Energy X-Ray absorpsiometry. *Seminars in Nuclear Medicine* 2010;40(1):62-73
- 199) Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B, Oden A, Zethraeus N, Pflieger B, Khaltayev N. Assessment of fracture risk. *Osteoporosis Int* 2005;16(6):581-589
- 200) Holm K, Dan A, Wilbur J, Li S, Walker J. A longitudinal study of bone density in midlife women. *Health Care Women Int* 2002;23(6-7):678-691
- 201) Kröger H, Tuppurainen M, Honkanen R, Alhava E, Saarikoski S. Bone mineral density and risk factors for osteoporosis--a population-based study of 1600 perimenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1994;55(1):1-7

- 202) Sowers MF, Kshirsagar A, Crutchfield MM, Updike S. Joint influence of fat and lean body composition compartments on femoral bone mineral density in premenopausal women. *Am J Epidemiol* 1992;136(3):257-265
- 203) Mizuma N, Mizuma M, Yoshinaga M, Iwamoto I, Matsuo T, Douchi T, Osame M. Difference in the relative contribution of lean and fat mass components to bone mineral density with generation. *J Obstet Gynaecol Res* 2006;32(2):184–189
- 204) Cauley JA, Lui LY, Stone KL, Hillier TA, Zmuda JM, Hochberg M, Beck TJ, Ensrud KE. Longitudinal study of changes in hip bone mineral density in Caucasian and African-American women. *J Am Geriatr Soc* 2005;53(2):183-189
- 205) Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE, Miller PD, Abbott TA, Berger ML, Santora AC, Sherwood LM. Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res* 2005;20(2):185-194
- 206) Waugh EJ, Lam MA, Hawker GA, McGowan J, Papaioannou A, Cheung AM, Hodsman AB, Leslie WD, Siminoski K, Jamal SA; Perimenopause BMD Guidelines Subcommittee of Osteoporosis Canada. Risk factors for low bone mass in healthy 40-60 year old women: a systematic review of the literature. *Osteoporos Int* 2009;20(1):1-21
- 207) Ho SC, Chen YM, Woo JL. Educational level and osteoporosis risk in postmenopausal Chinese women. *Am J Epidemiol* 2005;161(7):680–690
- 208) Alfvén T, Elinder CG, Hellström L, Lagarde F, Järup L. Cadmium exposure and distal forearm fractures. *J Bone Miner Res* 2004;19(6):900-905
- 209) New SA, Bolton-Smith C, Grubb DA, Reid DM. Nutritional influences on bone mineral density: A cross-sectional study in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1997;65(6):1831-1839
- 210) Stransky M, Rysava L. Nutrition as prevention and treatment of osteoporosis. *Physiol Res* 2009;58(Suppl 1):7-11
- 211) Hamilton CJ, Swan VJ, Jamal SA. The effects of exercise and physical activity participation on bone mass and geometry in postmenopausal women: a systematic review of pQCT studies. *Osteoporos Int* 2010;21(1):11-23

- 212) Riebel GD, Boden SD, Whitesides TE, Hutton WC. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995;20(20):2198-2202
- 213) Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium absorption. *J Bone Miner Res* 1999;14(2):215-220
- 214) Hermann AP, Brot C, Gram J, Kolthoff N, Mosekilde L. Premenopausal smoking and bone density in 2015 perimenopausal women. *J Bone Miner Res* 2000;15(4):780-787
- 215) Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2001;68(5):259-270
- 216) Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporos Int* 2005;16(2):155-162
- 217) Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM; LEAP Study Group. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. *J Orthop Trauma* 2005;19(3):151-157
- 218) Williams FM, Cherkas LF, Spector TD, MacGregor AJ. The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: A study of female twins. *Ann Rheum Dis* 2005;64(2):309-310
- 219) Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Ernährung und osteoporoseprevention. *Ernahrungs-Umschau* 2004;51:22-26
- 220) van Staa TP, Geusens P, Pols HA, de Laet C, Leufkens HG, Cooper C. A simple score for estimating the long-term risk of fracture in patients using oral glucocorticoids. *QJM* 2005;98(3):191-198
- 221) Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Influence of hyper- and hypothyroidism, and the effects of treatment with antithyroid drugs and levothyroxine on fracture risk. *Calcif Tissue Int* 2005;77(3):139-144
- 222) Shahinian VB, Kuo YF, Freeman JL, Goodwin JS. Risk of fracture after androgen deprivation for prostate cancer. *N Engl J Med* 2005;352(2):154-164
- 223) Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hochtin-Boes G, Houghton J, Locker GY, Tobias JS. Results of the ATAC (Arimidex,

- Tamoxifen, Alone or in Combination ) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005;365(9453):60-62
- 224) Birch K. Female athlete triad. *BMJ* 2005;330(7485):244-246
- 225) Stein E, Shane E. Secondary osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32(1):115-134
- 226) Ryan PJ, Blake GM, Fogelman I. Postmenopausal screening for osteopenia. *Br J Rheumatol* 1992;31(12):823–828
- 227) Mizuno K, Suzuki A, Ino Y, Asada Y, Kikkawa F, Tomoda Y. Postmenopausal bone loss in Japanese women. *Int J Gynaecol Obstet* 1995;50(1):33-39
- 228) Tuppurainen M, Kroger H, Saarikoski S, Honkanen R, Alhava E. The effect of gynecological risk factors on lumbar and femoral bone mineral density in peri- and postmenopausal women. *Maturitas* 1995;21(2):137–145
- 229) Fox KM, Magaziner J, Sherwin R, Scott JC, Plato CC, Nevitt M, Cummings S. Reproductive correlates of bone mass in elderly women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *J Bone Miner Res* 1993;8(8):901-908
- 230) Sowers MF, Hollis BW, Shapiro B, Randolph J, Janney CA, Zhang D, Schork A, Crutchfield M, Stanczyk F, Russell-Aulet M. Elevated parathyroid hormone-related peptide associated with lactation and bone density loss. *JAMA* 1996;276(7):549–554
- 231) Kelsey JL, Samelson EJ. Variation in risk factors for fractures at different sites. *Cur Osteoporos Rep* 2009;7(4):127-133
- 232) Genant HK, Engelke K, Fuerst T, Gluer CC, Grampp S, Haris ST, Jergas M, Lang T, Lu Y, Majumdar S, Mathur A, Takada M. Noninvasive assessment of bone mineral and structure: state of the art. *J Bone Miner Res* 1996;11(6):707-730
- 233) Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 1994 Nov;4(6):368-381
- 234) WHO: Assessment of fracture risk and its application for postmenopausal osteoporosis: technical report series 843. Geneva, Switzerland, WHO, 1994
- 235) FRAX-WHO Fracture risk assessment tool. <http://www.shef.ac.uk/FRAX>

- 236) National Osteoporosis Foundation: Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. <http://www.nof.org/professionals/index.htm>
- 237) Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, Johnston CC Jr, Lindsay R. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int* 1998;8(5):468-489
- 238) Johnell O, Kanis JA, Oden A, Johansson H, De Laet C, Delmas P, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, Mellstrom D, Meunier PJ, Melton LJ 3rd, O'Neill T, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Predictive value of BMD for hip and other fractures. *J Bone Miner Res* 2005;20(7):1185-1194
- 239) Eastell R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1998;338(11):736-746
- 240) Lu Y, Genant HK, Shepherd J. Classification of osteoporosis based on mineral densities. *J Bone Min Res* 2001;16(5):901-910
- 241) Official positions of the International Society for Clinical Densitometry updated 2007. <http://www.iscd.org/visitors/positions/official.cfm>
- 242) Stone KL, Seeley DG, Lui LY, Cauley JA, Ensrud K, Browner WS, Nevitt MC, Cummings SR. Osteoporotic Fractures Research Group. BMD at multiple sites and risk of fracture of multiple types: long-term results from the Study of Osteoporotic Fractures. *J Bone Miner Res* 2003;18(11):1947-1954
- 243) Bilezikian JP, Silverberg SJ, Shane E, Parisien M, Dempster DW. Characterization and evaluation of asymptomatic primary hyperparathyroidism. *J Bone Min Res* 1991;6(Suppl 2):85-89
- 244) [http://tr.wikipedia.org/wiki/Mendel\\_genetiği](http://tr.wikipedia.org/wiki/Mendel_genetiği)
- 245) [www.genbilim.com](http://www.genbilim.com)
- 246) <http://www.genome.gov/10001688>
- 247) [www.refgen.com](http://www.refgen.com)
- 248) Öztürk M. Üniversitede eğitim-öğretim gören öğrencilerde Uluslararası Fiziksel Aktivite Anketinin geçerliliği ve güvenilirliği ve fiziksel aktivite düzeylerinin belirlenmesi. [Bilim Uzmanlığı Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2005
- 249) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

- 250) Pinheiro MM, dos Reis Neto ET, Machado FS, Omura F, Yang JH, Szejnfeld J, Szejnfeld VL. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Rev Saude Publica* 2010;44(3):479-485
- 251) Zmuda JM. Identification of Osteoporosis Risk Genes: The tip of the Iceberg. *Ann Intern Med* 2009;151(8):581-2
- 252) Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes Dev* 2006;20(18):2492-2506
- 253) Wilson SG, Reed PW, Bansal A, Chiano M, Lindersson M, Langdown M, Prince RL, Thompson D, Thompson E, Bailey M, Kleyn PW, Sambrook P, Shi MM, Spector TD. Comparison of genome screens for two independent cohorts provides replication of suggestive linkage of bone mineral density to 3p21 and 1p36. *Am J Hum Gen* 2003;72(1):144-155
- 254) Mak YT, Hampson G, Beresford JN, Spector TD. Variations in genome-wide gene expression in identical twins-a study of primary osteoblast-like culture from female twins discordant for osteoporosis. *BMC Genet* 2004;5:14
- 255) Penisi E. Breakthrough of the year. Human genetic variation. *Science* 2007;318:1842-3
- 256) Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson BV, Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Mullin BH, Amin N, Aulchenko YS, Cupples LA, Deloukas P, Demissie S, Hofman A, Kong A, Karasik D, van Meurs JB, Oostra BA, Pols HAP, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Soranzo N, Williams FMK, Zhou Y, Ralston SH, Thorleifsson G, van Duijn CM, Kiel DP, Stefansson K, Uitterlinden AG, Ioannidis JPA, Spector TD. GEFOS( Genetic Factors for Osteoporosis) Consortium. Collaborative meta-analysis: Associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med* 2009;151(8):528-537
- 257) Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Snorradottir S, Center JR, Nguyen TV, Alexandersen P, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. New sequence variants associated with bone mineral density. *Nat Genet* 2009;41(1):15-17

- 258) Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: A genome-wide association study. *Lancet* 2008;371(9623):1505-1512
- 259) Stykarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Center JR, Nguyen TV, Bagger Y, Gulcher JR, Eisman JA, Christiansen C, Sigurdsson G, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. *N Engl J Med* 2008;358(22):2355-2365
- 260) Roses AD. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 2000;405(6788):857-865
- 261) Ongphiphadhanakul B, Chanprasertyothin S, Payatikul P, Tung SS, Piaseu N, Chailurkit L, Chansirikarn S, Puavilai G, Rajatanavin R. Oestrogen-receptor-alpha gene polymorphism affects response in bone mineral density to oestrogen in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;52(5):581-585
- 262) Lewiecki EM. Denosumab update. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21(4):369-373
- 263) Young MM, Nordin BE. Calcium metabolism and the menopause. *Proc R Soc Med* 1967;60(11 Part 1):1137-8
- 264) Choi JY, Shin A, Park SK, Chung HW, Cho SI, Shin CS, Kim H, Lee KM, Lee KH, Kang C, Cho DY, Kang D. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2005;77(3):152-159
- 265) Hsu YH, Niu T, Terwedow HA, Xu X, Feng Y, Li Z, Brain JD, Rosen CJ, Laird N, Xu X. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. *Hum Genet* 2006;118(5):568-577
- 266) Ferrara CM, Lynch NA, Nicklas BJ, Ryan AS, Berman DM. Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(9):4166-4170

- 267) Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med* 1998;129(3):229-240
- 268) Eshtiaghi R, Esteghamati A, Nakhjavani M. Menopause is an independent predictor of metabolic syndrome in Iranian women. *Maturitas* 2010;65(3):262-266
- 269) Howard BV, Adams-Campbell L, Allen C, Black H, Passaro M, Rodabough RJ, Rodriguez BL, Safford M, Stevens VJ, Wagenknecht LE. Insulin resistance and weight gain in postmenopausal women of diverse ethnic groups. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28(8):1039-1047
- 270) Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res.* 1993 May;8(5):567-573
- 271) Hla MM, Davis JW, Ross PD, Wasnich RD, Yates AJ, Ravn P, Hosking DJ, McClung MR. A multicenter study of the influence of fat and lean mass on bone mineral content: evidence for differences in their relative influence at major fracture sites. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) Study Group. *Am J Clin Nutr* 1996;64:354-360
- 272) Belanger C, Luu-The V, Dupont P, Tchernof A. Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* 2002;34(11-12):737-745
- 273) Reid IR, Evans MC, Cooper GJ, Ames RW, Stapleton J. Circulating insulin levels are related to bone density in normal postmenopausal women. *Am J Physiol* 1993;265(4 Pt 1):655-659
- 274) Rosen CJ, Motyl KJ. No bones about it: insulin modulates skeletal remodeling. *Cell* 2010;142(2):198-200
- 275) Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2010 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2010;17(1):25-54
- 276) Tucker KL. Osteoporosis prevention and nutrition. *Curr Osteoporos Rep* 2009;7(4):111-117



- 277) Carda SN, Bilge SA. The menopausal age, related factors and climacteric symptoms in Turkish women. *Maturitas* 1998;30(1):37-40
- 278) Lee SH, Khang YH, Lim KH, Kim BJ, Koh JM, Kim GS, Kim H, Cho NH. Clinical risk factors for osteoporotic fracture: a population-based prospective cohort study in Korea. *J Bone Miner Res.* 2010;25(2):369-78
- 279) Kanis JA, Oden A, Johnell O, Johansson H, De Laet C, Brown J, Burckhardt P, Cooper C, Christiansen C, Cummings S, Eisman JA, Fujiwara S, Glüer C, Goltzman D, Hans D, Krieg MA, La Croix A, McCloskey E, Mellstrom D, Melton LJ 3rd, Pols H, Reeve J, Sanders K, Schott AM, Silman A, Torgerson D, van Staa T, Watts NB, Yoshimura N. The use of clinical risk factors enhances the performance of BMD in the prediction of hip and osteoporotic fractures in men and women. *Osteoporos Int* 2007;18(8):1033-1046
- 280) Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Ström O, Borgström F. Development and use of FRAX in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2010;21(Suppl 2):407-413
- 281) Kanis JA, Burlet N, Cooper C, Delmas PD, Reginster JY, Borgstrom F, Rizzoli R; European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2008;19(4):399-428
- 282) Rezaieyazdi Z, Falsoleiman H, Khajehdaluee M, Saghafi M, Mokhtari-Amirmajdi E. Reduced bone density in patients on long-term warfarin. *Int J Rheum Dis* 2009;12(2):130-135
- 283) Le Templier G, Rodger MA. Heparin-induced osteoporosis and pregnancy. *Curr Opin Pulm Med* 2008;14(5):403-407
- 284) Koh JM, Park BL, Kim DJ, Kim GS, Cheong HS, Kim TH, Hong JM, Shin HI, Park EK, Kim SY, Shin HD. Identification of novel RANK polymorphisms and their putative association with low BMD among postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2007;18(3):323-31
- 285) Kim JG, Kim JH, Kim JY, Ku SY, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Choi YM. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and

- circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. *Menopause* 2007;14(5):913-918
- 286) Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y, Wang W, Guo YF, Liu YJ, Recker RR, Deng HW. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. *J Bone Miner Res.* 2006;21(11):1678-1695
- 287) Dong SS, Liu XG, Chen Y, Guo Y, Wang L, Zhao J, Xiong DH, Xu XH, Recker RR, Deng HW. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. *Calcif Tissue Int.* 2009;85(2):104-112
- 288) Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 2005;50(5):264-266
- 289) Wuyts W, Van Wesenbeeck I, Morales-Piña A, Ralston S, Hocking I, Vanhoenacker F, Westhovens R, Verbruggen I, Anderson D, Hughes A, Van Hul W. Evaluation of the Role of RANK and OPG Genes in Paget's Disease of Bone. *Bone* 2001;28(1):104-107
- 290) Sukumar D, Schlüssel Y, Riedt CS, Gordon C, Stahl T, Shapses SA. Obesity alters cortical and trabecular bone density and geometry in women. *Osteoporos Int.* 2010; [Epub ahead of print]
- 291) Deng HW, Li J, Li JL, Johnson M, Gong G, Recker RR. Association of VDR and estrogen receptor genotypes with bone mass in postmenopausal Caucasian women: different conclusions with different analyses and the implications. *Osteoporos Int* 1999;9(6):499-507
- 292) Kannus P, Palvanen M, Kaprio J, Parkkari J, Koskenvuo M. Genetic factors and osteoporotic fractures in elderly people: prospective 25 year follow up of a nationwide cohort of elderly Finnish twins. *BMJ* 1999;319(7221):1334-1337
- 293) Tran BN, Nguyen ND, Center JR, Eisman JA, Nguyen TV. Enhancement of absolute fracture risk prognosis with genetic marker: the collagen I alpha 1 gene. *Calcif Tissue Int* 2009;85(5):379-388

- 294) Ralston SH, Galwey N, MacKay I, Albagha OM, Cardon L, Compston JE, Cooper C, Duncan E, Keen R, Langdahl B, McLellan A, O'Riordan J, Pols HA, Reid DM, Uitterlinden AG, Wass J, Bennett ST. Loci for regulation of bone mineral density in men and women identified by genome wide linkage scan: the FAMOS study. *Hum Mol Genet* 2005;14(7):943-951
- 295) Faulkner KG, Miller PD. Clinical Use of Bone Densitometry. In: Marcus R, Feldman D, Nelson D, Rosen CJ, eds. *Osteoporosis, Two-Volume Set, vol. 2*, 3rd ed. USA: Elsevier Academic Press, 2008:1493-1518
- 296) Lang TF, Keyak JH, Heitz MW, Augat P, Lu Y, Mathur A, Genant HK. Volumetric quantitative computed tomography of the proximal femur: precision and relation to bone strength. *Bone* 1997;21(1):101-108

## **ÖZGEÇMİŞ**

**İş adresi:** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Bornova, İzmir

**İş telefonu:** 0-232-390 24 32

**Mobile Telefon:** 0-533-637 94 81

0-555-604 66 97

**e-mail:** banuisleten@gmail.com

## **KİŞİSEL BİLGİ**

**Doğum Tarihi:** 14.12.1980

**Doğum yeri:** Balıkesir

**Cinsiyet:** Bayan

**Medeni durum:** Bekar

**Yabancı dil:** İngilizce (iyi düzeyde)

## **EĞİTİM**

**Tıp Fakültesi:** 1998-2004

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Diploma No:04311108

**Lise:** 1995-1997 Bornova Anadolu Lisesi, İzmir

1997-1998 Karşıyaka Lisesi

**Ortaöğretim:** 1991-1994 Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi

**İlkokul:** 1986-1991 Altı Eylül Elementary School

## **MEVCUT İŞ DURUMU**

2005 Kasım-2010 Kasım: Araştırma Görevlisi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı

## **KONGRE ve BİLİMSEL TOPLANTI KATILIMLARI**

1- 5 Eylül 2006. Romatoloji 2006 Kongresi , Çeşme, İzmir, Türkiye

2- 4 Kasım 2006. 1. Tıbbi Rehabilitasyon Sempozyumu, Ankara, Türkiye

2 Kasım 2006. 1. Tıbbi Rehabilitasyon Sempozyumu Nörorehabilitasyonda Hasta Değerlendirme Kursu, Ankara, Türkiye

24- 29 Kasım 2007. 21. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi, Antalya, Türkiye

31 Mayıs- 03 aziran 2007. 2. Ege FTR Günleri, Nörojenik Mesane, Çeşme, İzmir, Türkiye

07-09 Şubat 2008. 3. İzmir Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Ortopedi ve Travmatoloji Günleri , İzmir, Türkiye

15-19 Ekim 2008. 3. Ulusal Osteoporoz Kongresi, Antalya, Türkiye

19-22 Mart 2009. 6. Nöropatik Ağrı Sempozyumu, Antalya, Türkiye

13-15 Kasım 2009. Klinik Dansitometri Sertifika Kursu ve Osteoporozda Tedavi Algoritmaları Sempozyumu, İzmir, Türkiye

10 Eylül 2009. İyi Yayın Ugulamaları Kursu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye

## **YAYINLAR**

### **Makale**

**Olgu Sunumu:** İşleten B, Öztürk C, Hepgüler S. Traumatic central cord syndrome:Case report. The Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation. 2009;55:128-31.

**Derleme:** Öztürk C, İşleten B. Servikal Spondilotik Miyelopati. Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Özel Sayısı,2009;2(3):44-52

### **Posterler**

**İşleten B, Öztürk C, Hepgüler S.** 2007. Travmatik Santral Kord Sendromu: Olgu Sunumu. 24- 29 Kasım 2007. 21. Ulusal Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kongresi, Antalya, Türkiye

İşleten B, Hepgüler S, Keser G, Bayraktaroğlu S. Anti-TNF tedavisi alan ankilozan spondilitli hastada bifosfonat ile ilişkili çene kemiğinin osteonekrozu:Olgu Sunumu.

18-21 Mart 2010. 4. Ulusal Osteoporoz Sempozyumu, Antalya, Türkiye

### **Kitap Bölümü Çevirisi**

1-Russel G: Pathogenesis of Osteoporosis. In:Lane NE, Sambrook PN. Osteoporosis and the osteoporosis of rheumatic diseases. A companion to rheumatology, 1st ed, Mosby, Elsevier, 2006. (Türkçeye çeviri)

2- Finnoff JT. Musculoskeletal problems of the upper limbs. In:Braddom RL. Physical Medicine and Rehabilitation, 3 rd ed, Saunders, Elsevier, 2007. (Türkçeye Çeviri)

### **Ödüller**

**Proje Destek Ödülü: Isleten B.**, Durmaz B., Özkınay F., Öztekin K., Özkınay H., Durmaz B. Postmenopozal kadınlarda RANK geni C421T ve C575T polimorfizmlerinin kemik mineral yoğunluğu ile ilişkisinin araştırılması. (15-19 Ekim 2008. 3. Ulusal Osteoporoz Kongresi, Antalya, Türkiye)

### **Diğer Bilimsel Katılımlar ve Eğitim Programları**

05 Nisan-02 Temmuz 2010 tarihleri arasında TC Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon AD Başkanlığı 200 Yataklı Rehabilitasyon Hastanesi'nde Nörolojik Rehabilitasyon Servisinde (Beyin Hasarı ve Rehabilitasyon) Uzmanlık Öğrencisi Eğitim programına aktif olarak katılım.