

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HİPERPROLAKTİNEMİ VE AKROMEGALİ HASTALARINDA
RANKL/OPG ORANI VE KEMİK REZORPSİYONU İLE İLİŞKİSİ

Dr. Firuzan FIRAT

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

ANKARA

2011

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HİPERPROLAKTİNEMİ VE AKROMEGALİ HASTALARINDA
RANKL/OPG ORANI VE KEMİK REZORPSİYONU İLE İLİŞKİSİ

Dr. Firuzan FIRAT

İÇ HASTALIKLARI UZMANLIK TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tomris ERBAŞ

ANKARA

2011

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanım ortaya çıkmasında katkısı olanlara;

Endokrinoloji Ünitesi Başkanı Prof. Dr. Aydan Usman, her aşamada bana destek olan tez danışmanım Prof.Dr.Tomris Erbaş başta olmak üzere, tüm Endokrinoloji Bilim Dalı uzmanlarına, laboratuvar analizlerdeki yardımlarından ötürü Metin Ödevci'ye teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Firuzan F. Hiperprolaktinemi ve Akromegali Hastalarında RANKL/OPG Oranı ve Kemik Rezorpsiyonu ile İlişkisi. Hacettepe Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2011. Osteoprotegerin (OPG) ve RANKL'in osteoporoz patogenezinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Hiperprolaktinemi ve yüksek IGF-I düzeyi kemik rezorpsiyonunu artırır. Ancak bugüne kadar akromegali ve prolaktinoma hastalarında yapılan çalışmaların hiçbirinde OPG ve RANKL düzeyine bakılmamıştır. Bu çalışmada IGF-I düzeyi yüksek akromegali hastaları ve hiperprolaktinemisi olan prolaktinoma hastalarında kemik döngüsü ve yıkımının, serum RANKL/OPG oranı ile ilişkisi incelendi. Çalışmaya alınan olgular, akromegali grubu (n: 31, 17K/14E), prolaktinoma grubu (n: 28, 21K/7E) ve kontrol grubu (n: 33, 24K/9E) olarak üçe ayrıldı. Olgularda antropometrik ölçümler yapıldı ve DEXA ile KMD değerleri tespit edildi. Osteoprotegerin ve RANKL düzeyi ELİSA ile ölçüldü. Kemik döngü belirteçlerinden, kemiğe spesifik ALP, osteokalsin ve idrar deoksipiridinolün değerleri incelendi. Osteoprotegerin, RANKL düzeyleri ve RANKL/OPG oranı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Prolaktinoma ve kontrol gruplarında OPG ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandı (sırasıyla $r=0.524$, $p=0.004$ ve $r=0.380$, $p=0.029$). RANKL ve OPG düzeyleri ile prolaktin düzeyi arasında anlamlı bir ilişki bulunmamasına rağmen prolaktinoma grubunda yaş dışlandıktan sonra IGF-I ile OPG arasında negatif ilişki gözlemlendi ($r=-0.412$, $p=0.046$). Akromegali grubunda osteokalsin ve kemiğe spesifik ALP ile RANKL düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki saptandı (sırasıyla $r=-0.384$, $p=0.036$ ve $r=-0.528$, $p=0.003$). Çalışmaya alınan tüm gruplarda KMD değerleri ile RANKL, OPG seviyeleri ve RANKL/OPG oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Çalışmamızın sonuçları, RANKL düzeyinin KMD değerlerinden ve hormon düzeylerinden bağımsız olarak kemik döngüsündeki artışı yansıttığını göstermektedir. OPG ile yaş arasındaki pozitif ilişki OPG'nin ileri yaşta kemik rezorpsiyonuna karşı kompanseuar olarak arttığını düşündürmektedir. Ancak elde ettiğimiz sonuçlar hala prolaktin ve IGF-I izole etkilerinden bağımsız olarak intakt organizma yanıtını yansıtır olabilir. Akromegali ve prolaktinoma hastalarında kemik rezorpsiyonu ve mekanizmasını incelemek amacıyla daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: osteoprotegerin, RANKL, akromegali, prolaktinoma, KMD

ABSTRACT

Firuzan F. sRANKL/OPG Ratio and Relation with Bone Resorption in Patients with Acromegaly and Hyperprolactinemia. Hacettepe University School of Medicine Thesis in Department of Internal Medicine, Ankara 2011. It is known that osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) play an important role in osteoporosis. Hyperprolactinemia and IGF-I enhances bone resorption. However, no studies have investigated the level of sRANKL and OPG in acromegaly and prolactinoma so far. Aim of this study is to evaluate effect of hyperprolactinemia and increased levels of IGF-I on bone resorption and their relation with RANKL/OPG ratio in patients with prolactinoma and acromegaly.

Subjects are grouped as acromegaly (n=31, 17F/14M), prolactinoma (n=28, 21F/7M) and control group (n=33, 24F/9M). Anthropometric measurements were taken from the subjects, OPG and sRANKL were measured by ELISA and bone mineral density (BMD) was measured by DEXA. Change of bone turnover markers, bone alkaline phosphatase (BALP), osteocalcin (OC) and urine deoxypyridinoline (DPD) levels were evaluated. Groups were not statistically different from each other with regard to OPG and RANKL levels. A positive correlation between OPG and age in prolactinoma and control groups was detected ($r=0.524$, $p=0.004$ and $r=0.380$, $p=0.029$, respectively). Although there was not any significant correlation between sRANKL, OPG levels and prolactin values; a significant negative association is observed between OPG and IGF-I values after excluding age in prolactinoma group ($r=-0.412$, $p=0.046$). Bone turnover markers (OC and BALP) were negatively associated with sRANKL level in acromegaly group ($r=-0.384$ $p=0.036$ and $r=-0.528$, $p=0.003$, respectively). Neither levels of OPG nor sRANKL or sRANKL/OPG ratio correlated with BMDs.

Our results indicated that RANKL level is negatively associated with bone turnover markers rather than BMD values and hormone levels. The age dependent increase of OPG may reflect a compensation for bone loss in older age. However our results may reflect conditions in the intact organism rather than isolated effects of prolactin and IGF-I. To evaluate bone resorption and its mechanism, further confirmatory studies are needed in acromegaly and prolactinoma patients.

Key Words: osteoprotegerin, RANKL, acromegaly, prolactinoma, BMD

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| TEŞEKKÜR | iv |
| ÖZET | v |
| ABSTRACT | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | ix |
| TABLolar | xi |
| ŞEKİLLER | xii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. KEMİK DOKUSU | 3 |
| 2.1.1. Remodeling Biyolojisi | 4 |
| 2.1.2. Osteoklast Biyolojisi | 5 |
| 2.1.3. Osteoblast Biyolojisi | 5 |
| 2.2. OSTEOPOROZ | 6 |
| 2.2.1. Osteoporoz Tanısında Biyobelirteçler | 6 |
| 2.3. KMD | 7 |
| 2.4. KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ | 7 |
| 2.4.1. Kemik yapım belirteçleri | 8 |
| 2.4.1.1. Osteokalsin | 8 |
| 2.4.1.2. Kemiğe spesifik ALP | 8 |
| 2.4.2. Kemik yıkım belirteçleri | 9 |
| 2.4.2.1. C telopeptid | 9 |
| 2.4.2.2. Deoksiprinodilin | 9 |
| 2.5. RANK/RANKL/OPG | 9 |
| 2.5.1. RANKL | 10 |
| 2.5.2. RANK | 11 |
| 2.5.3. OPG | 12 |
| 2.6. AKROMEGALİ | 13 |
| 2.7. AKROMEGALİ VE İSKELET SİSTEMİ | 14 |
| 2.7.1. Büyüme Hormonu | 15 |

| | |
|--|-----------|
| 2.7.2. IGF-I ve IGF-II | 15 |
| 2.7.3. GH, IGF-1 ve KEMİK METABOLİZMASI | 16 |
| 2.7.4. IGF1, GH, OPG ve RANKL ilişkisi | 18 |
| 2.8. PROLAKTİN | 18 |
| 2.8.1. Hiperprolaktinemi | 19 |
| 2.8.2. Prolaktinoma | 20 |
| 2.8.3. Prolaktin ve İskelet Sistemi | 21 |
| 2.8.4. Prolaktin OPG ve RANKL İlişkisi | 22 |
| 2.8.5. Hayvan modelleri ve in vitro deneyler | 23 |
| 3. BİREYLER VE YÖNTEM | 25 |
| 3.1. ÇALIŞMA EVRENİ | 25 |
| 3.2. ÇALIŞMA PLANI | 25 |
| 3.3. ÇALIŞMA PROTOKOLÜ | 26 |
| 3.4. ÖLÇÜMLER | 27 |
| 3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ | 27 |
| 3.6. ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ | 28 |
| 4. BULGULAR | 29 |
| 4. 1. OLGULARIN ÖZELLİKLERİ | 29 |
| 4.2. KMD DEĞERLERİ VE OLGULAR | 30 |
| 4.3. RANKL, OPG DÜZEYLERİ, RANKL/OPG ORANI VE DİĞER PARAMETRELERLE İLİŞKİLERİ | 32 |
| 4.4. KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ, GRUPLAR VE DİĞER PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ | 33 |
| 4.5. AKROMEGALİ GRUBU VE KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ | 34 |
| 4.6. PROLAKTİNOMA GRUBU VE KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ | 34 |
| 4.7. KONTROL GRUBU VE KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ | 34 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR | 37 |
| 6. KAYNAKLAR | 43 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|-------|---|
| ALP | Alkale fosfataz |
| cAMP | Siklik adenozin monofosfat |
| DEXA | Dual energy x-ray absorptiometry |
| DPD | Deoksipirinodilin |
| GH | Büyüme hormonu |
| GHP | Büyüme hormon bağlayıcı protein |
| GHD | Büyüme hormon eksikliği |
| GHR | Büyüme hormon reseptörü |
| GHRH | Büyüme hormon salgılatıcı hormon |
| GnRH | Gonadotropin salıcı hormon |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 |
| IGFBP | IGF bağlayıcı protein |
| KDB | Kemik döngü belirteçleridir |
| KMD | Kemik mineral dansitesi |
| OPG | Osteoprotegerin |
| PIF | Prolaktin inhibitör faktör |
| PRF | Prolaktin salgılatıcı faktör |
| PRLR | Prolaktin reseptör |
| PTH | Parathormon |
| RANK | Receptor activator of nuclear factor κ B |

| | |
|-------|---|
| RANKL | Receptor activator of nuclear factor κ B ligandı |
| SRIF | Somatotropin - release inhibiting faktör |
| TNF | Tümör nekroz faktörü |
| VKI | Vücut kitle indeksi |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |

TABLULAR

| | |
|---|-----------|
| Tablo 4.1. Olguların demografik verileri, antropometrik ölçümleri ve KMD değerleri | 30 |
| Tablo 4.2. Olguların metabolik özellikleri | 31 |
| Tablo 4.3. Menapozal durum ve OPG, RANKL değerleri | 33 |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 4.1. Prolaktinoma grubunda yaş ile OPG düzey ilişkisi | 35 |
| Şekil 4.2. Kontrol grubunda yaş ve OPG düzey ilişkisi | 35 |
| Şekil 4.3. Prolaktinoma grubunda OPG düzeyi ile IGF-I düzeyi ilişkisi | 36 |

1. GİRİŞ

RANK/RANKL/OPG ligand reseptör sisteminin, 1990 yılının ortalarında keşfedilmesiyle beraber kemik yapınmasıyla ilgili önemli bilgiler sağlanmıştır (1). O zamana kadar osteoblastların osteoklast oluşumunu kontrol ettiği biliniyordu. Ancak tümör nekroz faktörü (TNF) aile üyelerinin bu mekanizma üzerindeki etkileri tahmin edilmiyordu. RANK/RANKL/OPG sistemi direkt olarak osteoklast farklılaşmasını ve osteolizi kontrol etmektedir. RANK, RANKL ve OPG sırasıyla TNF süperail üyesi 11, 11a ve 11b olarak da adlandırılmaktadır (1,2).

RANKL, T lenfositlerde ve osteoblastlarda bulunan 316 amino asitten (aa) oluşan bir transmembran proteindir. Osteoblastlar tarafından üretilen RANKL preosteoklast yüzeyindeki RANK'a bağlanarak osteoklastik farklılaşma ve olgunlaşmayı başlatır. OPG ise RANKL'a bağlanarak RANK/RANKL etkileşimini bloke eder. Böylece osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu engeller. Bu nedenle RANKL/OPG oranı kemik kitlesi ve iskelet bütünlüğünde önemli bir belirteçtir (1, 2, 3).

Prolaktin, 199 aa'den oluşan, ön hipofiz bezindeki laktotrof hücreler tarafından üretilen, polipeptid bir hormondur. Birincil fonksiyonu gebelikte meme gelişimini ve süt üretimini sağlamaktır (4). Hiperprolaktinemi, prolaktinoma gibi patolojik veya laktasyon gibi fizyolojik durumlar da dahil olmak üzere ilerleyici osteopeniye neden olmaktadır (5). Bu durumu oluşturan mekanizma henüz kesin olarak gösterilememiştir. Bugüne kadar hiperprolaktinemiye bağlı olarak gelişen sekonder hipogonadizmin, ilerleyici osteopeniye neden olduğu düşünülse de, osteoblastlar üzerinde belirlenen prolaktin reseptörleri (PRLR) bu konuya yeni bir bakış açısı getirmiştir (6). Kemik hücreleri prolaktin reseptörü içerdiğinden, prolaktinin kemik rezorpsiyon etkisini direkt olarak osteoblast fonksiyonu üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (7).

Yapılan çalışmalarda prolaktine maruz kalan erişkin osteoblastlarda RANKL artmakta ve OPG ise azalmaktadır. Sonuç olarak RANKL/OPG oranında artış gözlenmektedir. Bu şekilde osteoklast kemik rezorpsiyonu, osteoblast sinyali ile artmakta ve bu durum da prolaktin ile oluşan kemik kaybını daha net bir şekilde açıklamaktadır (8).

Akromegali, artmış büyüme hormon (GH) yapımı ile seyreden bir hastalıktır. Dolaşıma katıldıktan sonra GH, insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1)'in üretilmesini uyarır. GH'nun dokularda büyümei sağlayan ana mediyatörü IGF-1'dir (9).

Akromegalik hastalarda kronik GH ve IGF-1 fazlalığı hem osteoklast hem de osteoblast aktivasyonu ve artmış kemik döngüsü ile karakterizedir (10). Akromegali hastalarında kemik yapım ve yıkım biyokimyasal belirteçlerinin her ikisi de yüksek olarak bulunmaktadır (11). Bu durum IGF-1'in hem osteoblast hem de osteoklast üzerine etkisi olduğunu desteklemektedir (12). Homojen kemik hücre popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalarda bu etkileşimi sağlayan hücresel mekanizmalar ve moleküler sinyal yolları incelenmiştir (13). Rubin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, fare stromal hücrelerinde IGF-1'in RANKL düzeyini arttırdığı ve OPG'ni azalttığı gösterilmiştir (14).

Hiperprolaktinemi ve yüksek GH/IGF-I seviyelerinin artmış kemik döngüsü ve yıkımı ile ilişkili olduğu bilinmesine rağmen bu süreci kontrol eden moleküler mekanizmalar halen çok net değildir. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalar sınırlıdır ve sonuçlar çelişkilidir (8,13) Bu çalışmada IGF-I düzeyi yüksek akromegali hastaları ve hiperprolaktinemisi olan prolaktinoma hastalarında, kemik döngüsü ve rezorpsiyonunun serum RANKL /OPG oranı ile ilişkisinin incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKUSU

Kemik, kimyasal, hormonal, biyomekanik dış uyarıların birleşmesini sağlayan ve kendi rejenerasyonu ile sürekli yenilenme gösteren dinamik bir dokudur (15). Yenilenme süreci osteoklastlar tarafından kortikal ve trabeküler kemik yüzeyinin rezorbe edilmesi ile başlar ve osteoblastlar tarafından yeni kemik dokusunun yapılması ile devam eder (16, 17).

Osteoblast ve osteoklast arasındaki etkileşim; hücre içi iletişim ve koordinasyon, büyüme, yeni kemik oluşumu, hedef kemik kitlesine ulaşma, kırık onarımı ve hayat boyu kemik kitlesinin korunması için kritik önem taşır (18). Herhangi bir zamanda erişkin iskeletinde eş zamanlı yaklaşık bir milyon mikroskopik yenilenme odağına rastlanır. Buradaki amaç hasarlı kemik dokusunu ortadan kaldırarak normal yapılandırmayı sağlamaktır (19).

Metabolik kemik hastalıklarının çoğu osteoklast sayısı ve/veya aktivasyonundaki hasar sonucu oluşmaktadır. Bu nedenle osteoklast biyolojisinin hücresel ve moleküler mekanizmasının anlaşılması hem temel bilim hem de klinik bakış açısı için önemlidir. Ancak bu süreci kontrol eden moleküler mekanizmanın başlaması, ilerlemesi ve sonlandırılması henüz net olarak anlaşılamamıştır (20, 21).

Dekadlar boyu çeşitli sitokin sistemleri, osteoklast fonksiyonunun kontrolörü olarak kabul edilmiştir. Ancak tahmin edilen ‘osteoklast aktive eden faktör’ ne tanımlanmıştır ne de moleküler düzeyde belirlenmiştir (22). İlk olarak 1980’lerde Rodan ve Martin, osteoblastların osteoklast oluşumunu, parathormon (PTH) gibi kemik rezorpsiyonunu uyaran ajanların etkisiyle salgıladıkları bazı faktörler sayesinde sağladıklarını vurgulamışlardır (1, 16).

Son 10 yıldaki çalışmalar osteoklast oluşmasını ve aktifleşmesini düzenleyen faktörler açısından bilgilerimizi arttırmıştır. Nükleer faktör κ B ligand RANKL/RANK/Osteoprotegerin sinyal sisteminin 1990’larda tanımlanmasıyla osteoblastların bu süreçte oynadığı rol daha çok aydınlanmıştır. İn vivo ve in vitro çalışmalar, açıkça bu üç komponentin osteoklast yaşam döngüsünün tüm fazları için

gerekli olduğunu ve iskelet hastalıklarında mediyatör görevi üstelendiklerini göstermiştir (23, 24).

2.1.1. Remodeling Biyolojisi

Kemik, sert ama esnek, güçlü ama kırılğan, sürekli karşılaştığı yüklere göre anatomik şekli belirlenebilen bir dokudur. Çünkü yıkım ve yapım sürecinin birbirini takip ettiği, yeniden yapılandırma gösteren dinamik bir dokudur (25). Bu yenilenme süreci ayrı ayrı mikroskopik kemik paket ünitelerinde gerçekleşir. Bu yenilenme odakları temel çok hücreli üniteler olarak da adlandırılır. Genç erişkin iskeletinde her üniteye yıkılan kemik yerine daha fazlasının konulmasıyla yıkım ve yapım bir denge içerisindedir (26). Menapoz sürecinde ise her üniteye yıkımın yapımın önüne geçtiği negatif bir denge vardır (27).

Ünitelerin ana hücreleri osteoblast ve osteoklastlardır. Yıkım ve yapım döngüsü öncelikle osteoblastik sinyaller ile başlayan ve sırayla eşleşen süreçlerdir. Çeşitli sistemik ve lokal faktörler (hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler...) döngünün başlaması için osteoblast üzerinde etkilidir. Osteoblastlar daha sonra osteoklast öncüllerinin farklılaşması ve olgun osteoklastların oluşması için uyarı sinyalleri oluştururlar. Bu şekilde üniteye küçük bir paket alanda yıkım gerçekleşir. Kısa bir süre sonra (2-3 hafta) kemik yıkımını gerçekleştiren osteoklastlar apoptoza uğrarlar ve ardından osteoblastlar yıkım oluşan kaviteye göç ederler. Sement çizgisini oluşturur ve yeni matriks sentezlerler. Tek bir üniteye mineralizasyonun da dahil olduğu bir yenilenme döngüsü birkaç ay devam eder (25, 28, 29).

Yeni kemik dokusu sentezlendiğinde bazı osteoblastlar osteosite dönüşerek o bölgede gömülü kalırlar. Osteositler de birbirleriyle birleşerek kanallarla dolu ağı oluştururlar (30, 31).

Bu kemik yapılandırma sürecini etkileyen hormonlar östrojen, androjen, vitamin D, PTH ayrıca IGF-I, transforming growth faktör, paratiroid hormon related peptid, interlökin, prostaglandin, tümör nekrozis faktör ve osteoprotegerin ligand gibi lokal faktörlerdir (32).

2.1.2. Osteoklast Biyolojisi

Osteoklastlar, hematopoetik kök hücrelerin myeloid serisinde yer alan, mononükleer öncül hücrelerin sitoplazmik füzyonu ile oluşan kemik yıkım hücreleridir. Öncül hücrenin olgun osteoklasta dönüşümü, RANKL ile aktiveleşen bir transkripsiyon faktörü olan cFos'un öncül hücrede ekspresyonuna bağlıdır.

Osteoklastların etkin kemik rezorpsiyonu yapabilmeleri için aktinden zengin yapıda olan podozomları ile kemik yüzeyine sıkıca tutunmaları gerekir. Aynı zamanda sitoplazmalarının kemik matriksine sirküler uzanımı da etkileşim yüzeyini arttırmaktadır. Bu şekilde osteoklast etkileştiği kemik yüzey alanına hidroklorik asit ve katepsin K gönderir. Böylece minerallerin çözünmesi ve kemik matriks yıkımı gerçekleşir. Osteoklast aktivasyon süreci RANKL ve kemik matriksin kendisinden gelen integrin aracılı uyarılar ile gerçekleşir. Osteoklastların bu çalışma sistemi makrofaj-koloni stimulan faktör ve RANKL ekspresyonunu gerçekleştiren osteoblastlar tarafından kontrol edilir (23-25,33).

2.1.3. Osteoblast Biyolojisi

Osteoblastın üç gelişimsel fazı tanımlanmıştır. Sırasıyla tip I kollajen (COL1) ve osteopontin mRNA ekspresyonunun belirgin olduğu ilk çoğalma fazı, onu takip eden matriks üretim fazı ve kollajen olmayan proteinlerden osteopontin, alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin üretiminin arttığı olgunlaşma fazlarıdır. Osteoklastın farklılaşmasını ve aktiveleşmesini uyaran RANKL ve osteoklastogenez inhibitörü olan OPG osteoblast gelişimi sırasında farklı şekilde eksprese olurlar. RANKL ekspresyonu geçici olarak matriks oluşum fazı ve mineralizasyonun ilk aşamasında artış gösterir, daha sonra mineralizasyon fazının ilerlemesiyle azalır. OPG mRNA ekspresyonu ise matriks üretimi ve osteoblast olgunlaşma fazları süresince artar (34-36).

2.2. OSTEOPOROZ

Dünya sağlık örgütü (WHO), 1994 yılında osteoporozu düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro yapısında bozulma sonucu kemik kırılabilirliğine yatkınlık ve kırık riskinde artış ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Osteo (kemik) ve poroz (gözenekli) kelimelerinden oluşmuştur. Çoklu etkeni olan kronik bir durumdur ve kırık oluşana kadar sessiz seyrederek. Dünyada 200 milyondan fazla insanı etkilediği bilinmektedir. Elli yaşından sonra her üç kadından birinde ve her beş erkekte birinde osteoporotik kırık gelişir. Genetik olarak tip I (postmenapozal) ve tip II (senil) olmak üzere ikiye ayrılır. Postmenapozal osteoporoz esas olarak östrojen eksikliğine bağlıdır. Senil osteoporoz ise iskelette yaşlanmaya ve kalsiyum eksikliğine bağlı gelişir (37-39).

Kemik kitlesinin seviyesi 'dual energy x-ray absorptiometry' (DEXA) yöntemiyle kemik mineral dansitesinin (KMD) ölçülmesiyle belirlenebilir. Ancak bu ölçüm yöntemi kırık gelişmesi açısından tüm risk faktörlerini içermemektedir. Kemik fragilitesi aynı zamanda kolay olarak ölçülemeyen kemik morfolojisi, mikromimarisi ve kemik matrisi yapı özellikleri ile de ilişkilidir (40, 41). Bu durum WHO kırık risk algoritmasının (FRAX) oluşmasına neden olmuştur. Bu algoritma ile klinik risk faktörleri ve femur boynu KMD değeri kullanılarak 10 yıllık tahmini kırık riski hesaplanır (42). Kişisel hikâyede diğer iskelet sistemi hastalıklarından bağımsız olarak fragilite kırığı olması KMD olmadan klinik olarak osteoporoz tanısını koydurur. Kemik gücü, KMD değerinden bağımsız olarak kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin idrar ve serumda tayiniyle de belirlenebilir (43).

2.2.1. Osteoporoz Tanısında Biyobelirteçler

Biyobelirteçler objektif olarak ölçülebilen, normal biyolojik süreçte, patolojik süreçte ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde bir belirteç olarak yorumlanabilen karakteristiktir. Potansiyel klinik uygulamaları tedavinin klinik yanıtının değerlendirilmesidir. Biyobelirteçler genellikle klinik çalışmalarda ölçülmesi zor klinik sonuçları için yol göstericidirler (44). Osteoporoz için en fazla kullanılan ve en değerli olan DEXA ile ölçülen KMD ve kemik döngü belirteçleridir (KDB).

Osteoporoz çalışmalarında kırık primer sonlanım olurken KMD ve KDB sekonder sonlanımlardır. Ayrıca çalışmalarda primer sonlanım noktası olarak kırık yerine KMD ve KDB kullanılmasının da tedavi etkinliğini gösterdiği belirtilmiştir (45).

2.3. KMD

Frajilite kırığı olmadığında osteoporoz tanısında kullanılan tek yöntem KMD'dir. Osteoporoz, KMD değerinde 2.5 standart sapma azalma ile tanı alır. T skoru olarak -2.5 ve altı belirtilir. DEXA-KMD değerleri ileride görülebilecek kırık riski ile paraleldir. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde de birçok kılavuzda yer almaktadır (43)

2.4. KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ

Kemik döngü hızı osteoblast ve osteoklastların enzim aktiviteleri veya idrarda atılan ve dolaşıma salınan kemik matriks bileşenlerinin ölçülmesiyle belirlenebilir. Yıkım ve yapım belirteçleri olarak ikiye ayrılırsalar da hastalık durumunda eşleşirler ve aynı yönde değişim gösterirler. Kemik döngü belirteçleri trabeküler veya kortikal gibi özel bir kemik bölgesinde gerçekleşen döngüyü yansıtmazlar. Toplam değişikliği yansıtırlar. Kemik döngüsü için son yıllarda kemiğe özgül belirteçler tanımlanmıştır (46-48). Kemik yıkım belirteçlerinin çoğu kemik matriks ana içeriği olan tip I kollajenin fragmantasyonu ile oluşurlar. Bu belirteçler osteoklastik kemik rezorpsiyonu esnasında salınırlar. Serum veya idrarda ölçülebilirler. Klinik uygulamada tip I kollajenin N-telopeptidi, tip I kollajenin c-telopeptidi, deoksiprinodilin ve prinodilin ölçümleri kullanılır (49). Kemik yapım belirteçleri ise osteoblastlar tarafından salgılanan proteinler veya osteoblastlar tarafından tip I kollajen yapımı esnasında oluşan yan ürünlerdir. Bunlar serumda ölçülür ve kemik spesifik ALP, osteokalsin ve prokollajen tip I N terminal propeptidi (PINP) içerirler. Eskiden KDB'leri sadece çalışma amaçlı kullanılırken günümüzde kırık riskini belirlemede klinik uygulamaya girmiştir (50, 51).

KDB'lerin klinik uygulaması kısıtlılıklarını ve etkinliklerini bilmeyi ve yorumlamayı gerektirir. KDB'leri preanalitik (biyolojik) ve analitik değişkenlerden etkilenirler.

Değiştirilemeyen preanalitik değişkenler; yaşı, cinsiyet, menopozal durum, gebelik, laktasyon, kırıklar, ek hastalıklar (diyabet, böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğu), ilaçlar (glukokortikoid, antikonvülsanlar, gonadotropin salıcı hormon (GnRH) analogları) ve immobilitedir. Kontrol edilebilir preanalitik değişkenler ise alınan örneğin saati (sirkadian ritim), açlık durumu ve egzersizdir. Analitik değişkenler ise çalışma sürecini içerir (toplama, saklama koşulları...). KDB'leri için referans aralıkları belirlenmemiştir. Çünkü toplum ve laboratuvar kaynaklı olarak değişkenlik gösterir (52, 53).

2.4.1. Kemik yapım belirteçleri

2.4.1.1. Osteokalsin

Osteokalsin kemikte en fazla bulunan kollajen olmayan proteindir. Kırdokuz aa'den oluşan, kalsiyum bağlayıcı özelliği olan üç adet gama karboksiglutamik asit rezidüsü içeren bir peptiddir. Osteoid sentezi esnasında osteoblastlar tarafından salgılanır. Esas fonksiyonu bilinmemekle birlikte osteoid mineralizasyonunu sağladığı ve kemik yenilenme sürecinde negatif geribildirimde rol aldığı düşünülmektedir. Yeni sentezlenen osteokalsin büyük oranda kemik matrisine dahil olur. Ancak küçük bir kısmı dolaşıma katılarak kemik yapım belirteci görevini üstlenir. Tip I kollajen ve kemiğe spesifik ALP'ye göre kemik yapımını gösteren daha geç bir belirteçtir. Kemik histomorfometri ve kalsiyum kinetik çalışmalarında kemik yapımı ile serum osteokalsin seviyesinin paralellik seyrettiği gösterilmiştir. Böbrekler tarafından atılır ve renal fonksiyon bozukluğundan etkilenir (54, 55).

2.4.1.2. Kemiğe spesifik ALP

ALP, monofosfat ester gruplarının hidrolizini katalize eden ubikuitöz bir ekto enzimdir. İntestinal, plasental, germ hücre ve doku nonspesifik (kemik/osteoblast, karaciğer ve böbrek izoformları) izoenzimlerini kodlayan dört gen bulunmaktadır. İzoformlar posttranslasyonel modifikasyon sonucu oluşurlar. ALP'nin kemik izoformu kemikte lokal inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırarak, kalsiyum

bağlayıcı protein olarak etki eder ve iskelet kalsifikasyonunda görev alır. Dolaşımdaki ALP'nin %95'i kemik ve karaciğer kaynaklıdır. Her iki dokuya ait ALP miktarı kabaca yarı yarıyadır (56).

2.4.2. Kemik yıkım belirteçleri

2.4.2.1. C telopeptid

Telopeptidler kollajen molekülünün helikal olmayan ucunda yer alan amino asit zincirleridir. Tip I kollajenin maturasyonunu gösterirler. Kemik rezorpsiyonu esnasında kollajenin yıkılmasıyla dolaşıma salınırlar. Bifosfonat ve hormon tedavisi ile serum değerlerinde hızlı ve belirgin düşme gözlenir (57, 58).

2.4.2.2. Deoksiprinodilin

Osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonu ve kollajen yıkımı esnasında dolaşıma karışır. Düşük moleküler ağırlıklı olmasından dolayı idrar ile atılır. Normal bireylerde serum seviyeleri genellikle ölçülemeyecek kadar düşüktür (59).

2.5. RANK/RANKL/OPG

Osteoklast biyolojisinden sorumlu sitokinler TNF ligand ve süperailisi üyelerinden belirlenmiştir. TNF alfa ve interlökin 11, sitokin sistemi gibi bu yeni sitokin sistemi de hücreye bağlı veya çözünür halde bulunan bir ligand (RANKL), hücreye bağlı bir reseptör (RANK) ve salgılanan bir reseptörden (OPG) oluşmaktadır. RANK/RANKL ve OPG'e sırasıyla TNF süperailisi üyesi 11, 11a ve 11b de denilmektedir (60).

RANK/RANKL/OPG sistemi son yıllarda kemik biyolojisindeki en önemli buluşlardandır. Bu sistem iskelet sağlığı için çok önemlidir. Bu sistemin bozulması çeşitli kemik hastalıklarına neden olur. Son zamanlardaki çalışmalar bu sistemin diğer dokularda da önemli rol oynadığını göstermiştir (61).

Osteoblastların RANKL ve OPG eksprese ettikleri bilinmektedir. RANKL'ın osteoklast öncül hücrelerde bulunan reseptörüne bağlanması kemik rezorpsiyonuna neden olurken, tuzak reseptörü OPG'ne bağlanması kemik rezorpsiyonunu inhibe etmektedir. Osteoblastlar tarafından RANKL/OPG ekspresyon oranı, osteoklastogenez, osteoklast aktivasyonu ve bu şekilde kemik döngüsünün önemli bir belirleyicisidir (62).

RANKL ve OPG'nin osteoklast biyolojisi üzerine etkileri ile ilgili geniş çalışmalara dayanarak bu iki molekülün kemik metabolizmasında distal efektör oldukları düşünülmektedir (61,62).

Yapılan çalışmalarda insan ve kemiricilerin osteoblast seri hücrelerinde RANKL ve OPG gen ekspresyonunun kontrolü, OPG salınımı ayrıntılı olarak incelenmiştir. Birçok osteotrofik sitokin ve hormonun RANKL ve OPG ekspresyonunu etkilediği bulunmuştur. RANKL ve OPG'ni kontrol eden hormonlar; steroid hormonlar (glukokortikoid, vitamin D3 ve peptid hormonları (PTH, VIP) içermektedir. Diğer modülatörler, peptid büyüme faktörleri (TGF beta, kemik morfojenik protein 2, temel fibroblast büyüme faktörü), aktivin A ve proinflammatuar sitokinlerdir (IL-1, IL-6, IL-11, TNF alfa, TNF beta, prostaglandin E2) (63-67).

2.5.1. RANKL

RANKL proteolitik yıkımla membrandan oluşan, hem membrana bağlı hem de çözünür formu bulunan, tip II homotrimerik transmembran bir proteindir. En sık görülen hücreye bağlı formu, birçok hücre çeşidi tarafından eksprese edilir (24). Lenf nodu, timüs ve akciğerde yüksek düzeyde, buna karşı dalak ve kemik iliğinde daha düşük düzeyde eksprese olur (23,68). Primer sekrete edilen formu 'aktifleşmiş T hücreleri' ve bir 'yassı hücreli karsinom' hücre serisi ile sınırlıdır (69). Osteoblast ve stromal hücrelerden RANKL ekspresyonu, osteoklast oluşmasını ve aktivasyonunu uyaran faktörler tarafından gerçekleşir (23).

RANKL geni nakavt (knockout) farelerde, lenf nodu agenezisi ve timus bezi hipoplazisi gösterilmiştir (70). Yine farelerde yapılan prelinik çalışmalar RANKL'ın ayrıca meme epitel hücrelerinde gebelik esnasında arttığını göstermiştir. Bu şekilde meme epitel hücre hiperplazisini ve süt üretimini sağlamaktadır (71).

İnflamasyonlu eklemlerde ise sinoviyal hücreler tarafından eksprese edilir ve aktifleşmiş T hücreleri tarafından salınır. RANKL'ın bu kaynağının RA'li hastalarda eklem yıkımından sorumlu olduğu düşünülmektedir (72). Ayrıca RANK eksprese eden bazı malign tümör hücrelerinde eş zamanlı RANKL ekspresyonu gözlemlenmesi, otokrin veya parakrin yolla tümör proliferasyonu ile ilişkili olabileceğini akıllara getirmiştir (73).

Parenteral RANKL verilmesinden sonra farelerde osteoklast oluşumu ve aktivasyonundaki artışa bağlı olarak masif osteoporoz ve hayatı tehdit eden hiperkalsemi gözlenmiştir (74). RANKL gen delesyonu ise osteoklastların yokluğuna bağlı olarak osteopetroz (artmış kemik kitlesi) ve diş gelişiminde bozulma ile sonuçlanmıştır (70).

Spesifik olarak RANKL'a bağlanıp, nötralize ederek kemik rezorpsiyonunu ve takibinde kemik kaybını önleyebilecek bir molekül fikri çarpıcı gibi görünmektedir. RANKL'a karşı insan monoklonal antikoru olan denosumab, antirezorptif bir ajan olarak şu an araştırılmaktadır. Kemik döngü belirteçlerini hızlı bir şekilde düşürerek kemik mineral dansitesinde belirgin artış ve kırık riskinde azalma sağlamaktadır. Ancak RANKL, T hücre büyümesi ve dendritik hücre fonksiyonu için de gerekli olduğundan, inhibisyonu eş zamanlı bağışıklık sistemini de etkileyerek enfeksiyon ve malignensi riskinde artışa neden olabilir (75).

2.5.2. RANK

RANKL ile etkileşen spesifik hücre reseptörü, RANK olarak adlandırılmıştır (76). Tip 1 homotrimerik transmembran proteindir. İlk olarak ekspresyonu sadece osteoklast öncül hücrelerde, olgun osteoklast ve dendritik hücrelerde saptanmasına rağmen RANKL gibi geniş ekspresyon alanı olduğu anlaşılmıştır (23). RANK geni 1. exonda görülen bir nokta mutasyonu aktivasyona neden olarak RANK, RANKL etkileşimini arttırmakta ve osteolize neden olmaktadır. Ailesel Paget hastalarının bazısında bu mutasyon görülmektedir (77). RANK'ın aktifleştirici antikolar ile uyarılmasının ise osteoklastogenezi arttırdığı gösterilmiştir (78, 79). RANK geni delesyonu olan farelerde RANKL yokluğuna benzer şekilde osteopetroz, diş gelişiminde bozulma ve lenf nodu yokluğu gözlenmiştir (80,81). RANK protein

ekspresyonu meme dokusunda, ayrıca meme ve prostat kanser hücrelerinde gösterilmiştir (71, 73, 82). Her iki tümörde de yüksek kemik metastaz potansiyeli vardır (82). RANK'ın tümör hücre proliferasyonu ve metastazındaki önemi araştırılmaktadır (73).

2.5.3. OPG

OPG, 1997 yılında birbirinden bağımsız çalışan iki grup tarafından keşfedilmiştir (83). İsmi kemik üzerindeki koruyucu özelliğinden gelmektedir (Latince, os: kemik ve protegere: korumak). OPG, 401 aa içeren, transmembran parçası olmadan salınan bir TNF'dür. OPG birçok doku ve hücre türü tarafından eksprese edilir (84).

OPG, RANKL için tuzak reseptör gibi etki etmektedir. Bu nedenle in vitro ve in vivo etkileri RANKL'ın karşıtıdır. Osteoklast öncül hücrelerin olgunlaşmasını, farklılaşmasını ve fonksiyonlarını inhibe eder. Osteoklast aktivasyonunu engelleyerek, apoptozunu artırır (85). Yapılan hayvan deneylerinde in vivo OPG gen delesyonunun kemirici hayvanlarda şiddetli osteoporoza neden olduğu gözlenmiştir. RANKL'ın karşılanmamış etkilerinden dolayı eş zamanlı immün hasar görülmemiştir (86,87). Tam tersi OPG overekspresyonu veya normal kemiricilerin OPG ile tedavisi ise osteopetroza neden olmuştur (88).

Osteoprotektif rolü iki juvenil paget hastasında 100 kilo bazlı OPG'de delesyon gösterilmesi ile desteklenmiştir. Bu hastalık otozomal resesif geçişli, artmış kemik döngüsü, osteopeni ve kırık ile karakterizedir (89). Ayrıca idiyopatik hiperfosfatazya tanısı almış üç kardeşte OPG geni 3. exonda inaktif mutasyon gösterilmiştir. İdiyopatik hiperfosfatazya, kemik döngüsünde artış, uzun kemik deformiteleri, kifoza ve asetabulum çıkıkları ile seyreden otozomal resesif bir hastalıktır (90).

OPG ve RANKL sinyal yolunun kardiyovasküler hastalıklarda oynadıkları rol hala tartışmalıdır (91). OPG'nin ateroskleroza karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir. OPG'nin büyük kan damarlarını medial kalsifikasyondan koruduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (92). Ayrıca serum OPG seviyesi, kardiyovasküler hastalık riskinin artmış olduğu kronik böbrek yetmezliği (KBY) hastalarında yüksek düzeyde bulunmuştur. Ancak KBY hastalarındaki bu yüksek OPG seviyesi sekonder hiperparatiroidi ile gelişen renal osteodistrofi ve vasküler kalsifikasyona karşı

koruyucu değildir. Muhtemelen bu hastalarda OPG proteine bağlı ve inaktif durumdadır (91).

2.6. AKROME GALİ

Akromegali, artmış GH üretimi ile gelişen bir hastalıktır. GH hipersekresyonuna genellikle pitüiter somatotrof adenomlar neden olur. Nadiren hipotalamik tümörlerden büyüme hormon salgılatıcı hormon (GHRH) salgılanması veya hipofiz dışı tümörlerin ektopik GH/GHRH üretimi de görülebilir. Dolaşıma katıldıktan sonra GH, somatomedin C olarak da bilinen insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1)'in üretilmesini uyarır. Birçok doku tarafından üretilse de IGF-1'in ana kaynağı karaciğerdir. GH'nun dokularda büyümeyi sağlayan ana mediatörü IGF-1'dir (93).

Akromegali'de yıllık yeni vaka insidansı bir milyonda 3-4'tür. En sık ortalama 40-45 yaşlarında görülür. Hastalık görülme oranı her iki cinsiyette eşittir. Hastaların %95'inde pitüiter somatotrof adenom vardır. Bu hastaların %40'ında guanozin trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinin alfa subünitesinde mutasyon gösterilmiştir. Bu mutasyon varlığında siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeyinin somatotrof hücrelerinde sürekli yüksek düzeyde kalması GH aşırı sekresyonu ile sonuçlanmaktadır (94).

GH ve IGF-1 hipersekresyonunun klinik belirtileri sessiz seyrettiği için akromegalik hastaların tanısı on yıla kadar gecikebilir. Çocuk ve adolesanlarda epifizyel plakların kapanmasından önce GH hipersekresyonu olması gigantizm ile sonuçlanır. Erişkinlerde, akral kemik aşırı büyümesi; frontal çıkıntı, el ve ayaklarda büyüme, prognatizm ile mandibulada büyüme ve diş aralarında açılma ile sonuçlanır. Yumuşak dokularda şişkinlik ise ayak topuğunda kalınlaşma, yüzük ve ayakkabı numarasında büyüme, karakteristik kaba yüz görünümü, büyük etli bir burun görüntüsüne neden olur. Diğer klinik özellikleri aşırı terleme, kifoz, yağlı cilt, artropati, karpal tünel sendromu, proximal kas güçsüzlüğü, akantosis nigricans ve cilt taglerini içermektedir. Kardiyomegali, makroglossi ve tiroid bezi büyümesini de içeren jeneralize visseromegali görülür. Büyüme hormon seviyesi kontrol edilmediği müddetçe yaşam beklentisi aynı yaştaki kontrollere göre 10 yıl azalmıştır (95).

Yaş ve cinsiyet ile uyumlu IGF-1 düzeyleri akromegali hastalarında yüksektir. Klinik şüphe varlığında IGF-1 düzeyi tarama için önemli bir laboratuvar bulgusudur. GH salınımının pulsatil olmasından dolayı tek bir GH düzey ölçümünün tanıda yeri yoktur. Tanı, oral glukoz (75gr) yükleme testi sonrası GH düzeyinin 1 µg/L'nin altına düşmemesi ile koyulur. Akromegali hastalarının %25'inde prolaktin değerleride yüksek olduğundan prolaktin düzeyi de ölçülmelidir. Tümör kitle etkisi ile tiroid disfonksiyonu görülebilir. Gonadotropin ve sex steroidleri azalabilir.

Yüksek GH ve IGF-I değerleri mortalite ile ilişkili olduğundan, akromegalik hastalarda tedavi hedefi, GH ve IGF-I'in normal değerlere indirilmesidir. İlk tedavi seçeneği hipofiz tümörünün cerrahi olarak çıkarılması ve ardından rezidü hastalık için medikal tedavi uygulanmasıdır. Radyoterapi daha çok dirençli vakalarda kullanılmaktadır. Bugün kullanılan medikal tedaviler arasında somatostatin analogları, GH reseptör antagonisti ve dopamin agonistleri yer almaktadır (96,97).

2.7. AKROMEĞALİ VE İSKELET SİSTEMİ

Akromegali, kronik sistemik GH ve IGF-1 fazlalığının erişkinlerde iskelet metabolizması üzerine etkilerinin çalışılabileceği bir hipersomatotrofizm modelini teşkil etmektedir (98). Yapılan çalışmalarda artmış biyokimyasal belirteçler ve histomorfometri ile desteklenen kemik döngüsü aktif akromegalide hem osteoblast hem de osteoklast aktivasyonunu göstermektedir (99). Kemik yapımı ve yıkımı ile ilişkili biyokimyasal belirteçler dolaşımdaki GH ve IGF-1 düzeyi ile paralellik gösterir (98,99). Bu durum hem GH hem de IGF-1'in her iki hücre üzerinde etkisi olduğunu desteklemektedir (100). Tedavi esnasında bu hastalarda GH ve IGF-1'in normalize edilmesi ise kemik döngü belirteç seviyelerinin hızlı düşüşü ile sonuçlanmaktadır (100,101).

Birçok çalışmada akromegalide artmış kortikal kemik kitlesi tanımlansa da trabeküler kemik ile ilgili veriler karışıktır (102). Gerçekte akromegali geleneksel olarak osteoporoz ile ilişkilidir (103). Hayvan deneylerinde GH seviyesi yüksek erişkin transgenik farelerde önce kemik yapımında artış ardından belirgin kemik rezorpsiyonu gözlenmiştir (104). Yapılan bir çalışmada büyüme hormon eksikliği (GHD) olan hastalarının GH ile tedavisinde doza bağlı olarak kemik döngüsünün

arttığı ve bu değişikliklerin serum GH, IGF-1, IGF bağlayıcı protein (IGFBP) seviyeleri ile paralellik gösterdiği izlenmiştir (105).

2.7.1. Büyüme Hormonu

Büyüme hormonu ön hipofizde en yüksek düzeyde bulunan hormondur. Büyüme hormonu salgılayan somatotrof hücreler ön hipofiz hücre popülasyonunun %50'sini oluşturur. GH ön hipofiz bezinde yer alan somatotrof hücrelerden hipotalamik faktörlerin uyarısı ile pulsatil şekilde salınır. Bu faktörler GHRH ve inhibitör hormon olan somatostatindir. GHRH 44 aa'den oluşan GH sentezini ve salınımını uyaran bir hipotalamik peptittir. Somatostatin [(somatotropin-release inhibiting faktör (SRIF)] hipotalamusun medial preoptik alanından üretilir ve GH sekresyonunu inhibe eder. GHRH, GH'nun pulsatil salınımını sağlayacak şekilde aralıklı pikler şeklinde salınırken, SRIF bazal GH düzeyini sabitleştirir (106).

GHRH reseptörü hücre içi siklik AMP ile sinyal ileten G-protein eşleşmiş resptördür. Bu reseptörün aktif hale gelmesi somatotrof hücre proliferasyonunu ve hormon üretimini uyarır. Somatostatin beş ayrı reseptör alt tipine bağlanır (SSTR1- SSTR5). SSTR2 ve SSTR5 alt tipleri GH baskılanması ile ilişkilidir (106).

GH fizyolojik etkileri büyüme hormon reseptörü (GHR) ve büyüme hormon bağlayıcı protein (GHBP) olmak üzere iki protein üzerinden gerçekleşir. GHR'ü GH'na yüksek afinite ve özgülükle bağlanan bir transmembran proteindir. GH reseptörü, sitokin/hematopoietik süperailisi ile aynı yapısal homolojiyi paylaşır. Reseptörün ekstrasellüler parçasının bir fragmanı ayrılarak GH bağlayıcı protein oluşturur ve dolaşımdaki GH ile etkileşir. GH'nun GHR'e bağlanması dimerizasyon ve JAK2 tirozin kinaz aktivasyonunu sağlar. Bu şekilde stat faktörleri, src homolog kollajen proteinleri, insülin reseptör substratları 1 ve 2'yi içeren sinyal molekül yolakları aktifleşir (106-108).

2.7.2. IGF-I ve IGF-II

IGF ailesi yüksek homolog mitojenik peptid olan IGF-1 veIGF-II olmak üzere iki ligand içerir. IGF-1 ve IGF-II, hem endokrin hem de lokal parakrin ve otokrin yolla

büyüme faktörü olarak etki eder. IGF-1 birçok dokuda bulunur ancak dolaşımında bulunan IGF-1, karaciğerde üretilir ve salınımı GH tarafından kontrol edilir. IGF-1'in birçok hücrel etkisi bir transmembran tirozin kinaz reseptörü olan IGFR-1'e bağlanması ile gerçekleşir. IGFR-1'in alt sinyal yolağı insülin reseptör substrat 1 (IRS-1), Shc, Ras, Raf ve mitojen aktivated protein (MAP) kinazı da içeren bir veya daha fazla hücre içi faktörler kaskadı ile iletilir. IGFR1 mRNA ekspresyonu major IGF-1 üretim yeri olan karaciğer hariç tüm dokularda düşük düzeyde gerçekleşir (109-111).

Serum IGF-1 düzeyi ergenlikte artar ve yaş ile beraber %80 den fazla düşüş gösterir. Kadınlarda IGF-1 düzeyi erkeklerden daha yüksektir (109).

IGF'ler serumda altı adet tanımlanan IGF bağlayıcı proteinlere yüksek afinite ile bağlanırlar. Bu taşıyıcı proteinler IGF'leri proteolitik yıkımdan korur ve hedef dokuya ulaşmasını sağlarlar. Ayrıca lokal olarak üretilen IGFBP'ler, IGF etkisinin otokrin ve parakrin kontrolünü sağlarlar. IGFBP3 seviyesi GH bağımlıdır ve dolaşımında IGF-1 için ana taşıyıcı proteindir (112,113).

2.7.3. GH, IGF-1 ve Kemik Metabolizması

GH, çocukluk süresince epifiz kıkırdağındaki öncül hücreleri uyarabilmesinden dolayı uzunlamasına kemik büyümesi için önemli bir sistemik düzenleyicidir. Erişkinlerde kemik kitlesinin idamesinde kritik rol oynamaktadır. GH'nun kemik dokusu üzerine etkisi dolaşımdaki GH, IGF'ler ve IGF bağlayıcı proteinlerin etkileşimleri ile sistemik yolla, lokal üretilen IGF-1 ve bağlayıcı proteinler ile otokrin ve parakrin yolla gerçekleşir. Yıllar içerisinde izole edilen homojen kemik hücre popülasyonları üzerinde çalışılarak bu etkileşimi sağlayan hücrel mekanizmalar ve moleküler sinyal yolları incelenmiştir (114-116). In vitro çalışmalar IGF-1'in kemik hücre proliferasyonunu uyardığını, osteoblast farklılaşmasını ve kemik matriksinin bazı komponentlerinin oluşmasını sağladığını göstermiştir (117). In vivo IGF-1 eksikliği, IGF-1 olmayan farelerde ve IGF-1 geni 5. exonda bir nokta mutasyonu olan bir insan vakasında da belirtildiği gibi belirgin büyüme geriliği ve çok düşük kemik mineral dansitesi ile sonuçlanır (118,119). Yapılan bu in vitro çalışmaların avantajı iskelet dışında sisteme karşı sekonder yanıtlardan kontrollü bir

şekilde kaçınılması; dezavantajı ise doku geometrisi ve ekstrasellüler çevrenin basitleştirilmesi nedeniyle intakt organizma yanıtını net olarak yansıtamamasıdır (13).

Yaşlanma, trabeküler ve kortikal kemik kitlesinde azalma ve her iki kompartmanda iskelet mikromimarisinin bozulması ile ilişkilidir. Postmenapozal kadınlarda kemik kaybının asıl nedeni kemik yapımında bir artış olmadan yıkımında artış olmasıdır. Yaşlanmaya eşlik eden hormonal değişikliklere bakıldığında GH ve IGF seviyeleri de yaşla beraber azalmaktadır. Oluşan bu disfonksiyonel GH/IGF aksının da postmenapozal osteoporozda rol oynayabileceğini akıllara getirmiştir. Bu nedenle GH ve IGF-1 tedavileri bu kişilerde bir seçenek olarak görülmüştür. Ancak yapılan çalışmalarda, GH ve IGF-1 kemik yapımını uyardığı zaman kemik döngüsünü de arttırmıştır (120). Osteoblast ve kemik iliği stromal hücrelerinin uyarılması ile osteoklastogenez ve osteoklast aktivasyonunu sağlayan moleküllerin salındığı gözlenmiştir (121,122). Friedlander ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise postmenapozal kadınlara bir yıl süreyle düşük doz rhIGF-1(30mcg/kg/gün) verilmesi vertebra veya kalça kemik mineral dansitesinde artışa neden olmamıştır. Ayrıca östrojen replasmanı alanlar ile karşılaştırıldığında artmış kemik döngüsü ile ilişkili olduğu görülmüştür (123).

Bu etkileri nedeniyle bu ajanların terapötik potansiyelleri sınırlanmakta ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalar artmaktadır. GH ve IGF-1'in osteoblastik gelişim ve fonksiyonu üzerindeki etkileri iyi bilinmesine rağmen kemik rezorpsiyonu üzerine olan etkileri hala net değildir (124). Kazanılmış GH eksikliği olan erişkinlerde azalmış kemik kitlesi ve biyokimyasal belirteçler ile gösterilen azalmış kemik döngüsü ve kırık riski ile karakterize sekonder osteoporoz gözlenmiştir (125). Büyüme hormon replasman tedavisi ile yapılan çalışmalar ise süre ile ilişkili olarak çelişkili sonuçlar vermiştir (126). Bir yıl ve üzerindeki uzun süreli çalışmalar kemik kitle artışının yanı sıra kemik döngüsünde de belirgin artış olduğunu göstermiştir (127-129).

Hayvan deneylerinde farelere suprafizyolojik dozlarda GH verildiğinde ilk olarak osteoblast üzerindeki etkiyle beraber kemik kitlesinde artış gözlenmiştir. Daha ileri uyarılar ise kemik rezorpsiyonunda artış ve iskelet bütünlüğünde bozulma ile sonuçlanmıştır (130). Farelerde yapılan başka bir deneyde ise IGF-1

overekspresyonunun 6. ve 8. haftalarda artmış osteoklast oluşumu ile sonuçlandığı gözlenmiştir (131,132).

İnsan osteoblast hücre kültürlerinde ve farelerde osteoblast benzeri hücre serilerinde proliferasyon ve farklılaşmayı kontrol eden GHR ve IGFR1 in gösterilmesi, IGF1 ve GH'nun osteoblast üzerinde direkt etkili olduğunu desteklemektedir (133-136). GH'nun bu etkisinin ortama eklenen anti IGF-1 antikorları ile engellenmesi GH'nun etkisinin endojen üretilen IGF'ler üzerinden olduğunu göstermektedir (13).

2.7.4. IGF1, GH, OPG ve RANKL ilişkisi

IGF-1'in kemik rezorpsiyonu üzerinde etkili olduğu bilindiğinden, stromal hücrelerde IGF-1'in RANKL/OPG oranını regüle ettiği düşünülmektedir (14).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda postmenapozal kadınların serumlarında artmış OPG seviyesine rastlanmıştır (137,138). OPG'nin GH/IGF-1 gibi yaş ile ilişkili faktörler tarafından da kontrol ediliyor olmasını akla getirmiştir (13, 137, 138). Rubin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IGF-1'in RANKL düzeyini arttırdığı ve OPG'ni azalttığı fare stromal hücrelerinde gösterilmiştir (14). Ancak serum seviyeleri kemik mikro çevresindeki sitokin seviyesini yansıtmıyor olabilir. Ayrıca GH yerine koyma tedavisi ile kortikal kemikte artmış OPG seviyesi gösterilmiştir. Artmış kortikal OPG seviyesi IGF-1 ile indüklenen kemik rezorpsiyonuna karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür (13).

Rubin ve arkadaşlarının yaptığı deneyde murin stromal hücre serisi kültür ortamına 100mcg/L IGF-I eklenerek 48 saat sonra OPG ve RANKL ekspresyonları, IGF-I eklenmeyen kültür ortamı ile karşılaştırılmıştır. IGF-I etkisi ile OPG ekspresyonunda %42 azalma, RANKL ekspresyonunda ise %74 artış olduğu gözlenmiştir (14).

2.8. PROLAKTİN

Prolaktin, 198 (23-kD) amino asitten oluşan, ön hipofiz laktotrof hücrelerinden salınan bir polipeptiddir. Tamamı hipofiz kaynaklı değildir. Kıl folikülleri, yağ dokusu ve immün sistem hücreleri tarafından da üretilir. Prolaktin endokrin yolla bir hormon olarak, otokrin ve parakrin yollar ile büyüme faktörü, nörotransmitter ve

immünregülatuar olarak etki edebilir. Primer görevi gebelik esnasında meme epitel hücre çoğalmasını uyarmak ve laktasyonu sağlamaktır. Ancak süt üretimi ve salgılanmasının dışında menstruasyon düzeni ve üreme fonksiyonları üzerinde de önemli bir etkisi vardır (139).

Salınımı pulsatildir. Uyku, stres, gebelik, ön göğüs duvarının travması veya uyarılmalarında değeri yüksek bulunabilir. Normal açlık plazma değeri kadınlarda 25mcg/L, erkeklerde 20mcg/L'nin altıdır. Salınımı hipotalamik faktörler tarafından kontrol edilir. Prolaktin salınımını uyarıcılar TRH, VIP, histidin, metionin peptid olup 'prolaktin salgılatıcı faktör' (PRF) olarak adlandırılırlar. 'Prolaktin inhibitör faktör' (PIF) olarak bilinen dopamin prolaktin salınımı üzerinde baskın etkiye sahiptir. Prolaktin salınımı, dopamin tarafından laktotrof hücreleri üzerinde bulunan D2 reseptörü aracılığıyla tonik inhibisyon altındadır (140).

2.8.1. Hiperprolaktinemi

Artmış serum prolaktin değeri hiperprolaktinemi olarak adlandırılır. Fizyolojik, patolojik ve farmakolojik olmak üzere geniş bir ayırıcı tanı yelpazesi vardır. Gebelik ve emzirme dönemlerinde fizyolojik olarak sırasıyla 75-100 ve 200-300ng/ml gibi yüksek prolaktin değerlerine rastlanır. Açlık sonrası uygun alınmayan örnek, aşırı egzersiz, göğüs duvarı travması, böbrek yetmezliği ve siroz durumlarında da prolaktin değeri yüksek bulunabilir (141).

Laktotrof hücrelerde dopamin reseptörünü uyaran ilaçlar (metoklopramid, fenotiazid) veya hipotalamustan dopamin salınımını inhibe eden ilaçlar (monoamin oksidaz inhibitörleri, trisiklik antidepresanlar, serotonin re-uptake inhibitörleri) hiperprolaktinemiye neden olurlar. Genellikle bu durumlarda 100 mcg/L'yi aşmayan hafif düzeyde bir prolaktin yükselmesi gözlenir (142). Hipotiroidizmde artış gösteren tirotropin salıcı hormonun (TRH) hipofiz laktotrof hücreleri uyarmasıyla da prolaktin değeri yüksek bulunabilir. Kraniofarinjiyoma, menenjiom, nonfonksiyone makroadenomların ekstrasellar uzanımlarının pituitar sapı baskıya uğratmasıyla da prolaktin yüksekliği görülür (143).

2.8.2. Prolaktinoma

Hiperprolaktinemi nedenlerinden biridir ve en sık görülen hormon salgılayan hipofiz tümörüdür. Tümör ön hipofiz bezinde neoplastik transformasyon sonrası laktotrof hücrelerden oluşur ve aşırı prolaktin sentezi ve salınımı ile sonuçlanır. Tüm hipofiz adenomlarının %40'ını oluşturmaktadır. Prevelansı 100.000'de 44-62'dir. En sık 25-34 yaş arasındaki kadınlarda görülür. Tümörün boyutuna göre makroprolaktinoma (>10mm) veya mikroprolaktinoma (<10mm) olarak sınıflandırılır (139).

Prolaktinoma patogeneğinde öne sürülen iki hipotez vardır. Dopamin uyarısının azalması (dopaminerjik reseptör veya postreseptör disregülasyon) ve klonal somatik mutasyonlardır. Ancak nöroleptik ilaç kullananlar ve pitüiter stalk basısı olan kişilerde uzun dönemde prolaktinoma geliştiği gözlenmemiştir. Ayrıca prolaktinoma hipofiz bezinin sadece lokal olarak bir bölgesinde gelişir. Yaygın olarak tüm laktotrof hücrelerinin bulunduğu bölgelerde aynı anda çok odaklı oluşmaz. X kromozom inaktivasyon analizi ile oluşan lokal mutasyon hipotezi tüm pitüiter adenomlarının monoklonal olduğunu göstermiştir (139, 140).

Hastalar hiperprolaktinemiye bağlı gonadal ve seksüel disfonksiyon veya tümör ekspansiyonuyla ilişkili semptomlar nedeniyle başvurabilirler. Prolaktin GnRH salınımını baskılayarak folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizing hormon (LH) seviyelerinde azalmaya neden olur. Bu durum hem kadın hem de erkekte hipogonadizm ile sonuçlanır. Bu nedenle premenapozal kadınlarda en sık semptom amenore ve galaktoredir. Erkekteki semptomlar ise impotans, azalmış libido ve azalmış sakal gelişimidir. Kadınlardan farklı olarak galaktore erkeklerde sık görülmez. Genellikle kranyal görüntülemelerde insidental olarak veya baş ağrısı, görmede azalma gibi tümör kitle etkileri nedeniyle tanı alırlar. Tanı alındığında %60'ı makroadenomdur. Kadınlarda ise tanı anında %90 mikroadenom tespit edilir (144).

Hastalarda tedavinin amaçları prolaktin konsantrasyonunu ve neden olduğu gonadal disfonksiyon, infertilite ve osteoporozu düzeltmek, tümör kitle etkisini azaltmak, geri kalan hipofiz fonksiyonlarını korumaktır. Tüm prolaktinomalarda ilk tedavi seçeneği dopamin agonistleri ile medikal tedavidir. Bu ilaçlar hem prolaktin salınımını inhibe eder hem de tümör hacmini azaltırlar. En sık kullanılan dopamin agonistleri ergot türevidir olan bromokriptin, kabergolin ve ergot olmayan quinagolid'dir. Bromokriptin

prolaktinoma tedavisinde klinik pratiğe giren ilk medikal tedavidir. Kısa yarı ömrü vardır. Günde üç kez 2.5-3.5mg olarak kullanılır. Halen en çok tercih edilen ajan dopamin agonisti olan kabergolindir. Dopamin D2 reseptörünün potent bir agonistidir. Haftada iki kez 0.25-0.5 mg dozlarında uygulanır. Mikroprolaktinomalarda ortalama doz 0.5 mg/hafta iken makroprolaktinomalarda ortalama 1 mg/hafta'dır. Tümörde ortalama %72-92 hacim küçülmesine neden olmaktadır. Diğer dopamin agonistlerinden daha az yan etkisi (bulantı, kusma, baş ağrısı, baş dönmesi) vardır. Dopamin agonistleri ile tedaviyi tolere edemeyen veya dirençli olan hastalarda transsfenoidal cerrahi uygulanır. Cerrahi sonrası remisyon oranları mikroprolaktinomalarda %85-90, makroprolaktinomalarda ise %18-80'dir (145-148). Radyoterapi ise medikal ve cerrahi tedaviler başarısız olduğunda üçüncü basamak tedavi olarak sınırlıdır (149).

2.8.3. Prolaktin ve İskelet Sistemi

Prolaktinin major fonksiyonu meme gelişimi ve laktasyon olmasına rağmen klinik önemi üreme sistemi ve kemik üzerindeki etkilerine bağlıdır (150). Yapılan çalışmalar ışığında yüksek serum prolaktin değeri, kalsiyum metabolizması ve kemik hastalıkları arasında bir bağ olduğu düşünülmektedir (8). Gebelik ve laktasyon gibi fizyolojik hiperprolaktinemi de artmış kemik döngüsü ve azalmış kemik mineral dansitesine neden olmaktadır. Gebelik ve laktasyon sırasında yüksek kemik döngüsü fetal gelişim ve süt üretimi için hızlı bir kalsiyum temin etme mekanizmasıdır (151). Her ne kadar laktasyonla ilişkili osteopeni geçici olsa da şiddetli osteoporoz ve artmış kırık riski bildirilmiştir (152). Emziren farelerle yapılan histomorfometrik bir çalışmada, emziren farelere bromokriptin verilerek endojen prolaktinin baskılanması ile maternal kemik döngüsünde azalma gösterilmiştir (153).

Hiperprolaktineminin neden olduğu osteoporoz bugüne kadar hipogonadizime bağlanmıştır. Ancak hiperprolaktinemisi olan kadınlarda östrojen seviyesi normal olsa bile net kemik kaybı olduğu gözlenmiştir (154). Östrojen ve testosteron replasman tedavilerinin hiperprolaktinemili hipogonadal kişilerde kemik mineral dansitesini arttırdığına dair veri yoktur (150). Literatürde yapılan çalışmalar

hiperprolaktinemi hastalarında kemik kaybının kontrol sağlıklı bireylere göre daha fazla olduğunu göstermiştir (150,155).

Prolaktinoması olan kadınlarla yapılan bir çalışmada kortikal kemik dansitesinde ortalama % 17, trabeküler kemik dansitesinde ise %15-30 azalma olduğu gösterilmiştir (156-158). Aynı şekilde prolaktinoması olan erkeklerde de, Greenspan ve arkadaşları ön kol ve vertebrada KMD değerinde belirgin kayıp olduğunu göstermişlerdir (159). Başka bir çalışmada vertebral kemik mineral içeriği %20-30 azalırken ön kol kemik mineral içeriği de %2.5-10 azalmıştır. Kalçada vertebradan daha az kayıp olduğu gözlenmiştir (160). Bu bölgeler arası kemik kayıp farkı trabeküler kemikte kemik döngüsünün daha hızlı olmasından kaynaklanmaktadır (150).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda prolaktinin hem uzun hem de kısa izoformunun erişkin dişi farelerde tibia, femur ve vertebra üzerinde reseptörleri gösterilmiştir (161). Ayrıca insan fetal osteoblast ve osteoblast benzeri hücre serileri üzerinde polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) ve immünohistokimya ile prolaktin reseptörünün gösterilmesi de prolaktinin kemik döngüsü üzerine direkt etkili olduğunu desteklemektedir (154).

2.8.4. Prolaktin OPG ve RANKL İlişkisi

Hiperprolaktinemide kemik kaybı olduğu bilirse de prolaktinin kemik üzerindeki etki mekanizması hala çelişkilidir. Daha önceleri overden östrojen üretimini baskılayarak kemik kaybına neden olduğuna inanılıyordu. Ancak osteoblastlar üzerinde PRLR'nin gösterilmesi güçlü bir şekilde kemiğin prolaktinin direkt hedefi olduğunu desteklemektedir (162). PRLR'nün osteoklast değil de osteoblast üzerinde gösterilmesi osteoblastların prolaktin ile uyarılmış kemik rezorpsiyonunda modülatör olduğunu göstermektedir (161,163). Yani aslında prolaktin osteopeniye direkt olarak osteoblastlar üzerindeki etkisiyle indirekt olarak over kaynaklı östrojeni baskılayarak neden oluyor olabilir (162).

Osteoblastlar farklılaştıklarında osteokalsin, osteopontin, RANK ve OPG gibi anahtar proteinleri salgırlar (164). Osteokalsin ve osteopontin matriks mineralizasyonunu sağlarken RANKL/OPG arasındaki denge ise kemik döngüsünü

belirler. Prolaktin bu faktörlerin salınımını etkileyerek kemik yapımını azaltıyor olabilir. Yüksek kemik döngüsü artmış yıkım ve azalmış yapım ile sonuçlanacağından hiperprolaktinemi olması durumunda da artmış osteoblastik aktivite ve RANKL/OPG oranı beklenmektedir (162,165).

Dolaşımda bazal prolaktin değeri (7-10 ng/ml) normal kemik gelişimi idamesi için gereklidir (166). Diğer yandan patolojik düzeydeki prolaktin seviyeleri östrojen eksikliğindeki gibi aşikâr osteopeniye neden olmaktadır. Çünkü doz bağımlı bir şekilde kemik belirteçlerinden osteokalsin, alkalen fosfataz, RANKL ve OPG ekspresyonlarını kontrol eder (167).

2.8.5. Hayvan modelleri ve in vitro deneyler

Yapılan bir hayvan modelinde, 10 haftalık dişi farelere overektomi (ovx) yapılmıştır. Overektomi yapılan bir grupta renal kapsül altına ön hipofiz transplantasyonu (AP+ovx) uygulanmıştır. Böylece östrojen eksikliği ve hiperprolaktinemi oluşturulmuştur. İnsanlarda ve farelerde gebelikte görülen yüksek fizyolojik prolaktin değerleri sabit bir şekilde sağlanmıştır. Bu çalışmada ön hipofiz transplantasyonu sonrası yedi hafta süresince prolaktin salgılanması devam etmiş ve graft rejeksiyonu gözlenmemiştir. Kemik mineral dansite ve içeriğinin 0., 2., 5. ve 7. haftalarda yapılan ölçümlerde her iki grupta da benzer olduğu görülmüştür. Histomorfometrik analizler ise prolaktinin kemik üzerine direkt etkili olduğunu desteklemiştir. Östrojen verilmesi ovx farelerde bulguları tamamen normale çevirirken AP+ovx grupta normale gelmemiştir. Ovx farelerden farklı olarak ovx+AP olan farelerde daha yüksek kemik döngüsü gözlenmiştir. Bu veriler prolaktinin östrojenden bağımsız olarak kemik döngüsü üzerinde etkili olduğunu desteklemektedir (165).

Yapılan bir in vitro çalışmada, insan osteoblast benzeri hücre (MG-63) kültür ortamına 10, 100 ve 1000 ng/ml dozlarında prolaktin eklenerek osteoblast belirteçleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. RANKL/OPG oranında 100 ve 1000 ng/ml değerlerinde anlamlı yükselme gözlenmiş, 10 ng/ml değerinde ise RANKL/OPG oranı artmıştır. Ancak bu artış anlamlı saptanmamıştır. Bu bulgular da prolaktinin

kemik rezorpsiyonuna RANKL'ı arttırarak, OPG'ni azaltarak, yani RANKL/OPG oranını etkileyerek neden olduğunu desteklemektedir (165).

3. BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA EVRENİ

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Ünitesi polikliniğine başvuran prolaktinoma ve akromegali tanısı alan olgular çalışmaya kabul edildi. Kontrol grubunu ise, hasta gruplarına benzer yaş ve cinsiyette olan sağlıklı bireyler oluşturdu.

3.2. ÇALIŞMA PLANI

Tek merkezli, kesitsel, tedavi müdahalesiz, tetkik müdahaleli, vaka kontrollü kesitsel bir çalışmadır.

Çalışmaya alınma kriterleri:

i) Çalışma grubu

1. Endokrinoloji ve Metabolizma Ünitesine başvuran,
2. Akromegali tanısı almış olan ve IGF-I düzeyi yüksek olan,
3. Prolaktinoma tanısı almış olan ve prolaktin düzeyi yüksek olan,
4. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden 18-65 yaş arası hastalar,

ii) Kontrol grubu

1. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden 18-65 yaş arası sağlıklı gönüllüler

Çalışmaya alınmama kriterleri:

1. Çalışmaya dahil olmayı kabul etmeyen hastalar,
2. 18-65 yaş grubu dışındaki hastalar,
3. Hiperprolaktinemi ayırıcı tanısında yer alan, fizyolojik hiperprolaktinemi gözlenen durumlar;
 - a) gebelik ve laktasyon,
 - b) uyku,
 - c) stres,
 - d) egzersiz yapan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

4. Diğer;

- hipotalamo-hipofizer hastalık, kronik böbrek yetmezliği, ilaçlara bağlı hiperprolaktinemi, diabetes mellitus, hipogonad hastalar, karaciğer yetmezliği, hipertiroidi, hiperparatirodi, kemik döngüsünü etkileyen medikal tedavi alıyor olması (bifosfonat, vitamin D ve kalsiyum gibi), bilinen iskelet sistemi hastalığı olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

3.3. ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Endokrinoloji ve Metabolizma Ünitesi polikliniğine başvuran olgulardan, çalışmaya uygunluk açısından sözü edilen kriterlere göre değerlendirildikten sonra prolaktinoma, akromegali ve kontrol olmak üzere üç grup oluşturuldu.

Hastaların öyküleri alındı ve genel fizik muayeneleri yapıldı. Daha sonra antropometrik ölçümleri, demografik veriler, diğer hastalıkları ile kullanmakta oldukları medikal tedaviler kaydedildi. Hacettepe Tıp Fakültesi, Radyoloji Bölümünde bulunan GE Lunar DPX marka kemik mineral dansitometri cihazı ile (DEXA yöntemiyle) üç yönlü KMD ölçümü yapıldı. Ön lumbar vertebra L1-L4 KMD değeri ve T skoru, yan lumbar vertebra B3-B4 KMD değeri ve T skoru, femur boynu KMD değeri ve T skoru kaydedildi. Sabah 10 saatlik açlığı takiben, sabah 8:30-9:00 arasında venöz kan örneği alındı. Bu kan örneğinden ön hipofiz hormon paneli, vitamin D, PTH, kemik döngü belirteçleri (c-telopeptid, kemiğe spesifik ALP, osteokalsin ve tip I kollajen), Ca, P, albumin çalışıldı. Kemik döngü belirteçlerinden DPD düzeyi için aynı sabah idrar örneği alındı. Osteoprotegerin ve RANKL için alınan kan örnekleri – 80C’de saklandı. GH, PTH, ACTH, kortizol ve idrar DPD düzeyleri kemilüminesans metodu ile immulite 2000 cihazında (Siemens, Diagnostics, AG, USA) çalışıldı. Prolaktin, LH, FSH, östrojen, testesteron, ve kemik döngü belirteçleri kemilüminesans metodu ile Abbott-Architect cihazında (Abbott Diagnostics, IL, USA) çalışıldı. IGF-I düzeyi immünoradyometrik assay yöntemi ile çalışıldı.

3.4. ÖLÇÜMLER

Vücut ağırlığı (kg): Olgular, üzerinde giysiler varken ayakkabı olmaksızın aynı tartı kullanılarak tartıldı. Boy (cm): Olgular dik durumda iken baş-ayak tabanı mesafeleri çalışma boyunca aynı cetvel kullanılarak ölçüldü. Vücut kitle indeksi (VKİ) (kg/m^2): Vücut ağırlığı (kg)/ boy (m^2) formülü ile hesaplandı.

Osteoprotegerin: Derin dondurucuda (-80 C) saklanmış olan örnekler ELİSA yöntemi (enzyme linked immunosorbent assay) ile hazır kitler kullanılarak (Bioscience, Human Osteoprotegerin Instant Elisa, Austria, Europe) Endokrinoloji laboratuvarında çalışıldı. Yöntem içi ve yöntemler arası varyasyon katsayıları sırasıyla %7.0 ve %8.0 idi. En küçük ölçüm değeri 7.5pg/ml olarak bulundu.

RANKL: Derin dondurucuda (-80 C) saklanmış olan örnekler ELİSA yöntemi (enzyme linked immunosorbent assay) ile hazır kitler kullanılarak (Biomedica Medizinprodukte GmbH and Co KG, A-1210 Wien, Divischgasse 4, Switzerland) Endokrinoloji laboratuvarında çalışıldı. Yöntem içi ve yöntemler arası varyasyon katsayıları sırasıyla %8 ve %6 idi. En küçük ölçüm değeri 0,01 pmol/L olarak bulundu.

RANKL/OPG oranı hesaplanırken OPG'nin pg/ml biriminde olan sonuçları pmol/L'ye çevirildi (1pg/ml= 0, 05pmol/L)

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizlerde SPSS for Windows version 15.0 programı kullanıldı. Sayısal değişkenler ortalama, standart sapma, median (ortanca) ile nitelik değişkenler ise sayı ve yüzde ile gösterildi. Gruplar arasında sayısal değişkenler bakımından farklılık olup olmadığına değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermediğine göre tek yönlü varyans analizi veya Kruskal Wallis testi ile, nitelik değişkenler bakımından farklılık olup olmadığına ise ki kare testi ile bakıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman korelasyon katsayısı ile araştırıldı. Anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak belirlendi. Çoklu grup karşılaştırmalarında ise p değeri üzerinde Bonferroni düzeltmesi yapıldı.

3.6. ARAŞTIRMANIN ETİK YÖNÜ

Helsinki deklarasyonuna göre çalışma protokolü düzenlendi. Çalışmaya katılan hasta ve sağlıklı bireylerden yazılı onam formu alındı. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik kurulundan onay alındı. (Etik kurul onay tarihi: 05.07.2010, Karar no: FON 10/02-6)

4. BULGULAR

4. 1. OLGULARIN ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya 31 akromegali (17 kadın, 14 erkek) ve 28 prolaktinomali (21 kadın, 7 erkek) hasta alındı. Kontrol grubu ise 24 kadın ve 9 erkek olmak üzere 33 kişiden oluşturuldu. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı fark yoktu. Yaş ortalaması akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarında sırasıyla 45.7 ± 11.9 , 34.7 ± 11.0 ve 39.8 ± 11.5 yıl olarak bulundu. Akromegali grubunda prolaktinomali hastalara göre yaş ortalaması daha yüksek idi ($p=0.001$).

Akromegali grubunda 29 hastaya daha önce transsfenoidal cerrahi uygulanmıştı. Radyoterapi alan iki hasta vardı. Yeni akromegali tanısı almış olan dört hasta bulunmaktaydı. Yirmidört hasta okreotid LAR tedavisi alıyordu. Üç hasta ise okreotid LAR'a ek olarak pegvisomant kullanıyordu. Prolaktinoma grubunda daha önce transsfenoidal cerrahi uygulanmış 12 hasta bulunmaktaydı. Yeni tanı prolaktinoma olan 13 hasta mevcuttu. Onbir hasta kabergolin kullanıyordu.

Ortalama VKİ akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarında sırasıyla 29 ± 4.5 , 25 ± 4.7 , 26 ± 3.6 kg/m² olup, akromegali grubunda prolaktinoma grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.003$).

Ortalama IGF-I düzeyi, akromegali hastalarında 463 ± 255 ng/ml olup, beklendiği şekilde diğer iki gruptan anlamlı olarak yüksek idi ($p<0.001$). Prolaktinoma grubunda ise ortanca prolaktin düzeyi 81 ng/ml olup diğer gruplardan yüksek olarak saptandı ($p<0.001$).

Postmenapozal kadın sayısı akromegali grubunda daha fazla olup, prolaktinoma grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p=0.007$). Östrojen düzeyleri prolaktinoma grubunda akromegali ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.004$, $p=0.002$). Testesteron serum düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p=0.078$).

Vitamin D ortanca düzeyleri akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarında sırasıyla 18, 17 ve 17 µg/L olup, gruplar arasında vitamin D düzeyi açısından anlamlı bir fark yoktu. PTH ortanca düzeyleri akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarında sırasıyla 64, 43, 44 pg/ml olup akromegali grubunda kontrol ve

prolaktinoma gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0.005$, $p=0.002$). Kalsiyum ve fosfor ortalama değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Olguların demografik özellikleri, antropometrik özellikleri tablo 4.1’de, metabolik özellikleri ise tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Olguların demografik verileri, antropometrik ölçümleri ve KMD değerleri

| Değişkenler | Akromegali n=31 | Prolaktinoma n=28 | Kontrol n=33 | P |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|----------|
| Yaş | 45.7±11.9 | 34.7±11.0 | 39.8±11.5 | 0.002 |
| VKİ (kg/m²) | 29.0±4.5 | 25.0±4.7 | 26.4±.6 | 0.003 |
| IGF-I (ng/ml) | 463±255 | 191±77 | 177±73 | 0.001 |
| Femur boyun BMD | 0.998±0.164 | 0.942±0.128 | 1.000±0.128 | 0.183 |
| Femur boyun T skoru | -0.356±1.224 | -0.757±0.966 | -0.296±1.008 | 0.235 |
| Ön lumbar BMD | 1.139±0.247 | 1.131±0.160 | 1.199±0.153 | 0.238 |
| Ön lumbar T skoru | -0.533±1.953 | -0.614±1.356 | -0.010±1.273 | 0.195 |
| Yan lumbar BMD | 0.610±0.223 | 0.754±0.176 | 0.830±0.188 | 0.001 |
| Yan lumbar T skoru | -1.545±1.848 | 0.085±1.590 | 0.520±1.703 | 0.024 |

Tabloda değerler, ortalama±standart sapma olarak gösterilmiştir

4.2. KMD DEĞERLERİ VE OLGULAR

Femur boynu ve ön lumbar vertebra ortalama KMD ve T skorları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi.

Akromegali grubunda yan lumbar vertebra KMD değeri kontrol grubundan ($p=0.001$), T skoru ise prolaktinoma ve kontrol gruplarından anlamlı olarak düşük saptandı (sırasıyla $p=0.024$, $p=0.001$).

Olgular osteoporoz (T skoru: < -2.5), osteopeni (T skoru: -1 ile -2.5 arası) ve normal (T skoru: > -1) olarak gruplandırıldığında osteoporotik hasta sayısı akromegali grubunda (n: 10), kontrol grubuna (n: 1) göre anlamlı olarak yüksek bulundu (p=0.012). VKİ ile KMD değerleri arasında gruplar arası ve grup içi analizlerde anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Tablo 4.2. Olguların metabolik özellikleri

| Değişkenler | Akromegali n=31 | Prolaktinoma n=28 | Kontrol n=33 | P |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|----------|
| Prolaktin (ng/ml) | 8.40 (0.79-49) | 81 (20-1276) | 11 (5.4-32) | 0.001 |
| Östrojen (pg/ml) | 29.5 (10-269) | 106 (11-283) | 41 (10-179) | 0.002 |
| PTH (pg/ml) | 64 (29-134) | 43 (13-110) | 44 (21-105) | 0.003 |
| Vitamin D (µg/L) | 18 (5-59) | 17 (5-26) | 17 (7-73) | 0.117 |
| RANKL (pmol/L) | 0.2187 (0,01- 1.68) | 0.1954 (0.01- 2.0) | 0.1480 (0.01-1,151) | 0.205 |
| OPG (pg/ml) | 13.71 (9.4-58.1) | 11.57 (7.7-38.46) | 11.8 (9.29- 110.36) | 0.244 |
| RANKL/OPG | 0.336 (0.01-2.08) | 0.376 (0.015-1.754) | 0.199 (0.008- 2.14) | 0.104 |
| Osteokalsin (ng/ml) | 23.99 (9.68- 171.1) | 22.24 (7.50- 88.66) | 22.18 (5.71- 70.42) | 0.189 |
| C telopeptid (ng/ml) | 0.59 (0.10-3.27) | 0.54 (0.10-3.00) | 0.47 (0.12-9.54) | 0.032 |
| Tip I kollajen(ng/ml) | 108.20 (6.8- 225.6) | 84.40 (5.70- 261.60) | 62.00 (5.70-277) | 0.005 |
| Kemik sALP (µg/L) | 18.55 (8.2- 50.9) | 16.50 (8.3- 41.1) | 19.20 (14.0- 44.0) | 0.221 |
| İdrar DPD (NMDPD/mM) | 6.16 (3.12-300) | 7.99 (5.37-30.86) | 7.49 (3.54-11.94) | 0.300 |

Tabloda değerler, ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterilmiştir.

4.3. RANKL, OPG DÜZEYLERİ, RANKL/OPG ORANI VE DİĞER PARAMETRELERLE İLİŞKİLERİ

RANKL ortanca serum düzeyleri akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarında sırasıyla, 0.2187, 0.1954 ve 0.1480 pmol/L; OPG ortanca serum seviyeleri 13.71, 11.57 ve 11.8 pg/ml ve ortanca RANKL/OPG oranları ise 0.336, 0.376 ve 0.199 olarak bulundu. Değerler, gruplar arasında ve grup içinde cinsiyet dağılımı ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak farklı değildi (sırasıyla $p=0.205$, $p=0.244$ ve $p=0.104$).

Akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarının her üçünde RANKL ile OPG düzeyleri arasında bir ilişki saptanmadı.

Grup içi analizlerde prolaktinoma ve kontrol gruplarında, OPG düzeyinde yaş ile ilişkili olarak anlamlı artış gözlemlendi (sırasıyla $r=0.524$, $p=0.004$ ve $r=0.380$, $p=0.029$) (Şekil 4.1. ve 4.2). Akromegali grubunda OPG ile yaş arasında benzer bir ilişki saptanmadı.

IGF-I ve prolaktin serum düzeyleri ile RANKL, OPG düzeyleri ve RANKL/OPG oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak prolaktinoma grubunda IGF-I ile OPG arasında negatif ilişki gözlemlendi ($r=-0.442$, $p=0.027$). Prolaktinoma grubunda yaş dışlandıktan sonra da IGF-I ve OPG düzeyleri arasında anlamlı negatif ilişki devam ediyordu ($r=-0.412$, $p=0.046$) (Şekil 4.3.). Gruplar ortak değerlendirildiğinde postmenapozal kadınlarda OPG düzeyi premenapozal kadınlara göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p=0.018$) (Tablo 4.3.).

PTH ve vitamin D düzeyleri ile RANKL, OPG düzeyleri ve RANKL/OPG oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Grupların hiçbirinde RANKL düzeyi, RANKL/OPG oranı ile KMD değerleri arasında bir ilişki saptanmadı. Akromegali grubunda femur boyun BMD ve T skoru ile OPG düzeyi arasında negatif ilişki gözlemlendi (sırasıyla $r=-0.422$, $p=0.02$ ve $r=-0.396$, $p=0.03$).

Tablo 4.3. Menapozal durum ve OPG, RANKL değerleri

| Değişkenler | Premenapozal n=41 | Postmenapozal n=20 | P |
|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|----------|
| OPG (pg/ml) | 11.33 (7,72-110,36) | 14.30 (10,42-32,32) | 0.018 |
| RANKL (pmol/L) | 0.2187 (0,0100-1.1511) | 0.1245 (0,0100-1,2380) | 0.098 |
| RANKL/OPG | 0.365 (0.016-2.143) | 0.207 (0.008-2.080) | 0.121 |

Tabloda değerler, ortanca (minimum-maksimum) olarak gösterilmiştir.

4.4. KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ, GRUPLAR VE DİĞER PARAMETRELERLE İLİŞKİSİ

Osteokalsin ortanca serum düzeyleri akromegali, prolaktinoma ve kontrol gruplarında sırasıyla 23.99, 22.24 ve 22.18 ng/ml; ortanca idrar DPD düzeyleri ise sırasıyla 6.16, 7.99 ve 7.49 NMDPD/mM olarak saptanmış olup, değerler açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Kemiğe spesifik ALP düzeyi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Grupların hiçbirinde tip I kollajen ve C telopeptid düzeyi ile RANKL, OPG ve RANKL/OPG arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Gruplar ortak değerlendirildiğinde idrar DPD düzeyi ile RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı arasında negatif ilişki (sırasıyla $r=-0.259$, $p=0.49$ ve $r=-0.389$, $p=0.003$) gözlendi. OPG ile idrar DPD arasında pozitif ilişki gözlendi ($r=0.276$, $p=0.036$).

Her üç grupta idrar DPD düzeyi ile KMD değerleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Grupların hiçbirinde VKİ ile kemik döngü belirteçleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

4.5. AKROMEĞALİ GRUBU VE KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ

C telopeptid ve Tip I kollajen serum düzeyleri akromegali hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı (sırasıyla $p=0.003$ ve $p=0.013$).

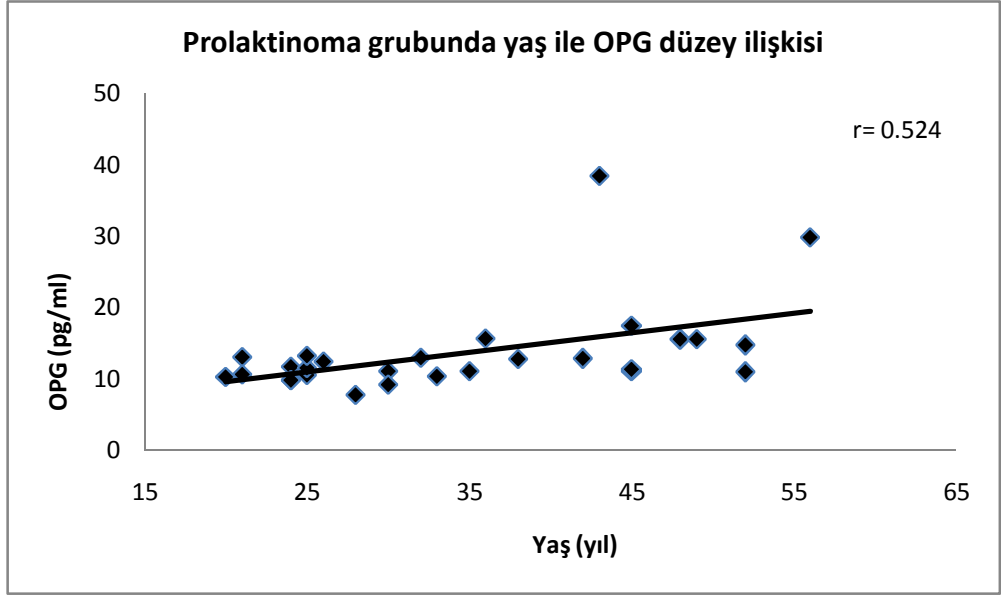
Tip I kollajen ile femur boynu KMD, ön lumbar KMD ve T skoru arasında negatif ilişki gözlemlendi (sırasıyla $r=-0.372$, $p=0.043$ ve $r=-0.385$, $p=0.036$ ve $r=-0.409$, $p=0.025$). Kemiğe spesifik ALP ile RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı arasında negatif ilişki saptandı (sırasıyla $r=-0.528$, $p=0.003$ ve $r=-0.474$, $p=0.008$). Osteokalsin ile RANKL düzeyi arasında negatif ilişki gözlemlendi ($r=-0.384$, $p=0.036$).

4.6. PROLAKTİNOMA GRUBU VE KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ

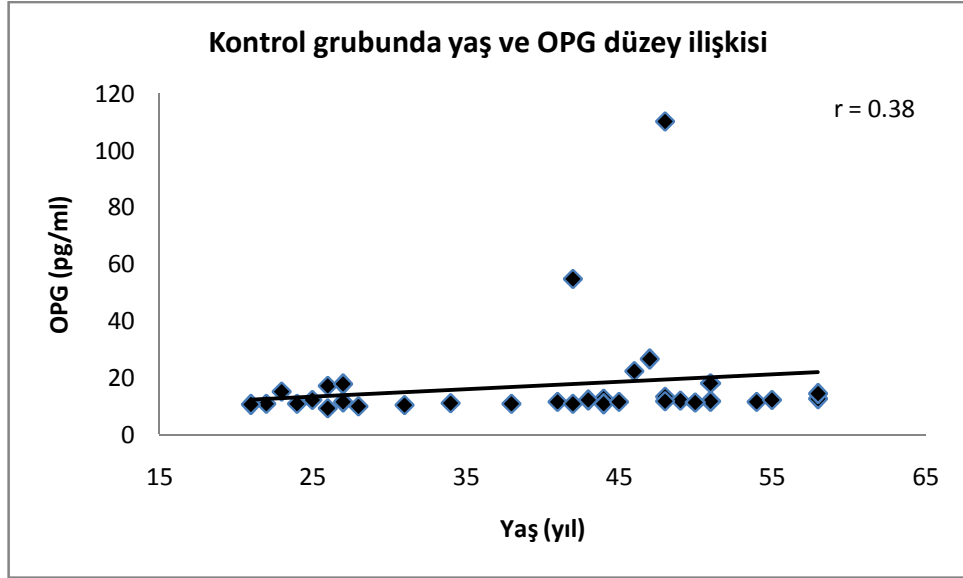
Tip I kollajen düzeyi prolaktinoma grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek tespit edildi ($p=0.018$). Prolaktinoma grubunda kemiğe spesifik ALP ile yan lumbar T skoru arasında negatif ilişki gözlemlendi ($r=-0.532$, $p=0.05$).

4.7. KONTROL GRUBU VE KEMİK DÖNGÜ BELİRTEÇLERİ

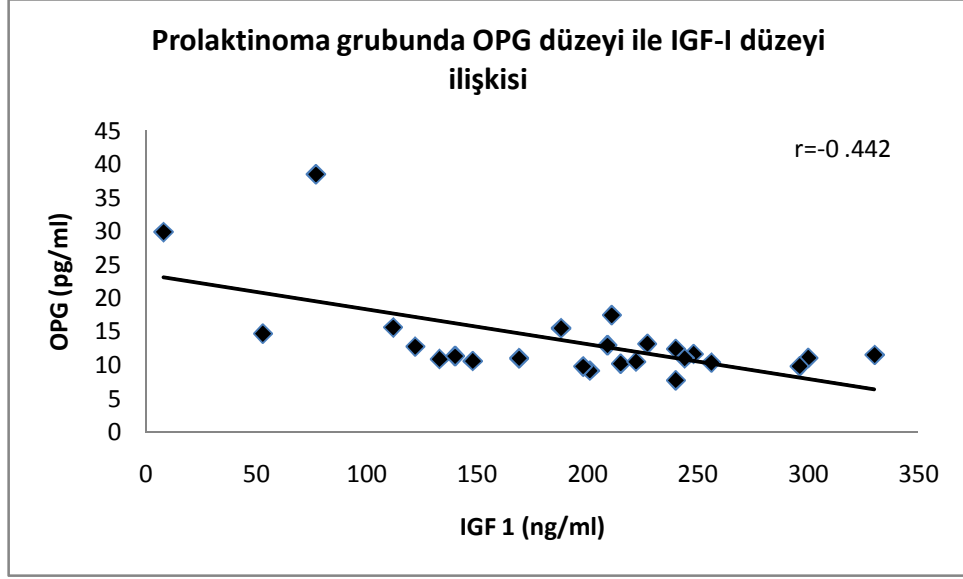
Kontrol grubunda kemiğe spesifik ALP ve femur boyunu KMD arasında negatif ilişki saptandı ($r=-0.407$, $p=0.032$). C telopeptid düzeyi femur boynu BMD ve T skoru (sırasıyla $r=-0.473$, $p=0.015$ ve $r=-0.444$, $p=0.023$) ve ön lumbar vertebra BMD ve T skoru (sırasıyla $r=-0.395$, $p=0.046$ ve $r=-0.416$, $p=0.036$) ile ters ilişkili olup aradaki bağıntı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. İdrar DPD ile RANKL/OPG arasında negatif ilişki gözlemlendi ($r=-0.630$, $p=0.028$).



Şekil 4.1. Prolaktinoma grubunda yaş ile OPG düzey ilişkisi



Şekil 4.2. Kontrol grubunda yaş ve OPG düzey ilişkisi



Şekil 4.3. Prolaktinoma grubunda OPG düzeyi ile IGF-I düzeyi ilişkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

TNF süperaile üyesi olan RANK/RANKL/OPG ligand reseptör sisteminin osteoporozdaki rolü iyi bilinmektedir (2). Hiperprolaktinemi ve yüksek GH/IGF-I seviyelerinin artmış kemik döngüsü ve yıkımı ile ilişkili olduğu bilinmesine rağmen bu süreci kontrol eden moleküler mekanizmalar hala net değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalar prolaktinin hipogonadizm etkisinden bağımsız olarak RANKL/OPG ligand reseptör sistemi üzerinden kemik rezorpsiyonuna neden olduğunu göstermiştir (154). Benzer şekilde akromegali hastalarında sıkça görülen osteoporozda da aynı moleküller suçlanmıştır (10, 13, 14). Ancak literatürde bu konuda yapılan çalışmalar sınırlıdır ve çelişkili sonuçlar vermiştir (8,13). Bu nedenle bu kesitsel çalışmada, IGF-I düzeyi yüksek akromegali hastaları ile hiperprolaktinemi olan prolaktinomalılarda kemik döngüsü ve yıkımının serum RANKL, OPG düzeyleri ve RANKL /OPG oranı ile ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bu çalışma in vivo olarak, akromegali ve prolaktinoma hastalarında, RANKL/OPG oranı ve kemik rezorpsiyonu ile ilişkisinin incelemesi bakımından ilktir. Çalışmamızda gruplar arasında RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranı açısından anlamlı bir fark saptanmadı. RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı en düşük kontrol grubunda gözlenmesine rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Prolaktin ve IGF-I'in RANKL ve OPG düzeyleri ile ilişkisini inceleyen daha çok in vitro çalışmalar ve hayvan deneyleri yapılmıştır. İntakt organizmada kemik rezorpsiyonunu, döngü belirteçlerinin düzeyini ve RANKL/OPG oranını etkileyen diğer durumların dışlanması in vitro deneylere göre daha güçtür. Bu açıdan in vivo çalışmaların prolaktin ve IGF-I yanıtlarını net olarak yansıtamayacağı endişesi mevcuttur. Hiperparatiroidi, hipertiroidi, vitamin D tedavisi, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu, diabetes mellitus, hipogonadizm ve çeşitli iskelet sistemi hastalıkları, RANKL/OPG oranını etkiler (63-67). Hasta seçiminde kemik döngüsünü değiştirecek, IGF-I ve prolaktin etkileri ile örtülecek bu tıbbi durumları özellikle dışladık. Buna rağmen, elde ettiğimiz sonuçlar halen prolaktin ve IGF-I izole etkilerinden bağımsız olarak intakt organizma yanıtını yansıtır olabilir.

Rubin'in yaptığı in vitro deneyde, ortama IGF-I eklendiğinde, OPG 24 saat sonra azalmıştır. Ancak birgün sonra IGF-I eklenmediğinde OPG, 48 saat sonra eski değerine dönmüştür (14). Rubin ve arkadaşlarının yaptığı in vivo çalışmada ise, yaşlı postmenapozal kadınlara düşük doz rhGH (0.005mg/kg/gün) bir yıl süreyle verildiğinde, IGF-I düzeyinde hafif artış (100-200 mcg/L) gözlenmiştir. Dolaşımdaki OPG konsantrasyonu ise değişmemiştir. IGF-I, 30 mcg/kg/gün dozunda bir yıl süreyle verildiğinde ise serum IGF-I düzeyinde 300-450 mcg/L'e kadar yükselme ve OPG düzeyinde %20 azalma gözlenmiştir (14). Bu çalışma sonucunda, serum OPG düzeyini etkileyen eşik bir IGF-I düzeyi ve maruziyet süresi olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda ortalama IGF-I düzeyi akromegali grubunda kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen OPG düzeyleri açısından her iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Ancak prolaktinoma grubunda, OPG ile IGF-I değeri arasında anlamlı ters ilişki saptandı. Yaş dışlandıktan sonra da aynı ilişkinin devam ettiği gözlemlendi.

Çift kör randomize plasebo kontrollü bir çalışmada, kazanılmış GH eksikliği olup rhGH tedavisi uygulanan 25 erişkin hastanın ilyak kemik biyopsisi alınarak kortikal ve trabeküler kemik IGF-I ve OPG seviyeleri incelenmiştir (168). On iki hastaya plasebo enjeksiyon, 13 hastaya rhGH (2 IU/gün) en düşük dozda bir yıl süreyle uygulanmıştır. Altıncı ayda serum örnekleri, 12. ayda ise ilyak krest biyopsi örnekleri incelenmiştir. GH uygulanan grupta plaseboya göre kortikal ve trabeküler IGF-I ve OPG seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir. Literatürde yapılan in vitro deneyler IGF-I yüksekliğinde OPG düzeyinde azalma olduğu yönünde sonuçlanmıştır. Sınırlı sayıda in vivo çalışmada ise akromegali hastalarında OPG düzeyinin normal olduğu saptanmıştır (169). Yukarıdaki paragrafta da belirtildiği şekilde bizim çalışmamızda OPG düzeyi açısından akromegali ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Prolaktinoma ve kontrol gruplarında gözlenen yaş ile beraber serum OPG düzeyindeki artışa akromegali grubunda rastlanmadı. Bu sonuç akromegali hasta grubunun diğer gruplara göre daha ileri yaş ve homojen bir grup olmasından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca akromegali hasta grubu daha ileri yaş grubu olmasına ve daha fazla sayıda postmenapozal hasta içermesine rağmen OPG düzeyleri diğer gruplardan farklı bulunmadı. Bu durum yüksek IGF-I seviyelerinin OPG düzeyini baskılaması ile de ilişkili olabilir.

Mürin osteoblast kültürü ile yapılan in vitro bir deneyde, kısa süreli aktif vitamin D tedavisinin OPG mRNA ekspresyonunu değiştirmediği ancak RANKL/OPG oranını arttırdiği gözlenmiştir (34). İnsan osteoblast hücre seri kültürleriyle yapılan çalışmalar, bifosfonat tedavisinin OPG üzerine minimal etkili olup azalttığını, RANKL ekspresyonunu belirgin arttırdığını, dolasıyla RANKL/OPG oranını da arttırdığını göstermiştir (170). Vitamin D düzeyinin RANKL/OPG oranı ile direkt ilişkisi bilinmemekle birlikte, vitamin D replasman tedavisinin RANKL/OPG oranını arttırdığı yapılan in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (171). Bu nedenle bizim çalışmamıza daha önce osteoporoz tanısı alan ve osteoporoz tedavi sürecinde olan hastalar dahil edilmedi. Çalışmamızda vitamin D düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Ayrıca vitamin D düzeyleri ile RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranı arasında bir ilişki saptanmadı.

Yapılan in vitro çalışmalar PTH'nun OPG düzeyini azalttığını, RANKL'ı arttırdığını dolayısıyla RANKL/OPG oranını arttırdığını göstermiştir (172). Çalışmamızda PTH ortalama serum düzeyi akromegali grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek saptandı. Ancak bu yüksek değer göreceli bir artış olup, hastalarda kemik döngüsünü arttıracak hiperparatiroidi kliniği mevcut değildi. Aynı zamanda çalışmamızda PTH serum düzeyi ile RANKL, OPG düzeyleri ve RANKL/OPG oranı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Dutmanee ve arkadaşlarının yaptığı in vitro çalışmada insan preosteoblast (SV-HFO) kültür modelinin farklılaşması prolaktin etkisiyle incelenmiştir. Yirmibir gün süreyle ortalama 100 ng/ml düzeyinde prolaktinin etkisi incelenmiştir (154). Takip süresinde OPG, RANKL veya RANKL/OPG oranının ekspresyonlarında bir değişiklik gözlenmemiştir.

Narattaphol ve arkadaşlarının yaptığı diğer in vitro çalışmada ise, dişi erişkin farelerin tibialarından alınan primer osteoblastlar ile yapılan kültürde, osteoblastlar 48 saat süreyle 10, 100 ve 1000 ng/ml düzeylerinde prolaktine maruz bırakılmıştır. Prolaktin düzeyi 1000 ng/ml iken OPG ve RANKL mRNA ekspresyonları sırasıyla %72 ve %87 azalmıştır. RANKL/OPG oranı ise değişmemiştir. Osteokalsin düzeyi ve mineralizasyon da etkilenmemiştir (8). Prolaktin yüksekliğinin RANKL/OPG oranına etkisini incelemek amacıyla yapılan in vitro deneyler çelişkili sonuçlar vermiştir. Ayrıca sonuçlar RANKL/OPG oranının yüksek prolaktin değerleri ile

ilişkili olduğunu da düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda prolaktin değeri 1000 civarında olan iki hastamız vardı. Ortanca prolaktin düzeyi 81 ng/ml olup prolaktin düzeyi ile RANKL, OPG düzeyleri ve RANKL/OPG oranı arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Belki daha yüksek prolaktin değerleri ve daha fazla hasta sayısı ile arada anlamlı bir fark gözlenebilirdi.

Bussade ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 18-49 yaş arası 24 prolaktinoma hastasında lumbar vertebranın en fazla etkilendiği ve Z skorunun hastaların %20'sinde iki standart sapma azaldığı saptanmıştır. Mikro veya makroprolaktinoma hastalarının KMD değerleri arasında bir fark gözlenmemiştir. Aynı zamanda KMD değerleri ile serum prolaktin düzeyi arasında da ilişkili bulunmamıştır. KMD değeri, menstrual siklus sıklığından etkilenmektedir (173). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde makroprolaktinoma ve mikroprolaktinoma hastalarının KMD değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Serum prolaktin düzeyi ile KMD değerleri arasında da anlamlı bir ilişki saptanmadı. Prolaktinoma grubunda menstrual siklus düzensizliği ile KMD değerleri ve RANKL/OPG oranı ile anlamlı bir ilişki bulunmadı. Ancak östrojen seviyesi prolaktinoma grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek olmasına rağmen, ortalama KMD değerleri prolaktinoma grubunda kontrol grubundan (istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte) daha düşük saptandı. Östrojen seviyesi yüksek olmasına rağmen prolaktinoma grubunda gözlenen KMD değerindeki düşüklük, prolaktinin hipogonadizm etkisinden bağımsız olarak kemik rezorpsiyonuna neden olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Yapılan bir çalışmada 18-75 yaş arası 80 kadında serum OPG düzeyi, yaş ve VKI ile doğru orantılı olarak bulunmuştur. RANKL düzeyi ise yaş arasında ise negatif ilişki gözlenmiştir. Postmenapozal kadınlarda premenapozal kadınlara göre OPG düzeyi daha yüksek saptanmıştır (174). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kontrol ve prolaktinoma gruplarında OPG düzeyinde yaş ile ilişkili olarak artış gözlendi. Postmenapozal kadınlarda OPG düzeyi premenapozal kadınlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu. OPG ile yaş arasında gözlenen pozitif korelasyon OPG'nin ileri yaşta kemik rezorpsiyonuna karşı kompensatuar olarak arttığını düşündürmektedir. Çalışmamızda RANKL ve RANKL/OPG oranı yaştan etkilenmiyor olarak bulundu. Benzer şekilde VKI'nden RANKL, OPG düzeyleri ve RANKL/OPG oranı etkilenmiyordu.

Nabipour ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 382 sağlıklı postmenapozal kadında serum OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranının yaş ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yaş, VKİ RANKL ve OPG, lumbar KMD değeri için bağımsız belirleyici olarak saptanmıştır. Yaş, VKİ ve RANKL ise femur boynu KMD değeri için bağımsız belirleyici olarak bulunmuştur (175). Çalışmamızda postmenapozal kadın sayısı ve ortalama yaş, akromegali grubunda diğer gruplardan anlamlı olarak yüksekti. Femur boyun ve lumbar vertebra KMD değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak yan lumbar vertebra T skoru akromegali grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük saptandı. Yan lumbar KMD değerinin prolaktinoma grubundan daha düşük bulunması akromegali hastalarının daha uzun süreli hastalık seyri ile ilişkili olabilir. Ayrıca postmenapozal kadın sayısı da akromegali hasta grubunda daha yüksekti. Yüksek risk faktörlerini içermesine rağmen akromegali grubu KMD değerleri bakımından prolaktinoma grubundan çok farklı bulunmadı. Bu sonuç akromegali grubunda VKİ'nin daha yüksek olması ile de ilişkili olabilir. Ancak çalışmamızda VKİ ile KMD değerleri arasında anlamlı bir ilişki gözlenmedi.

Liu ve arkadaşlarının 20-75 yaş arası 504 Çinli kadınla yaptığı çalışmaya göre RANKL yaş ile azalırken, OPG yaş ile artmaktadır. Bu nedenle postmenapozal kadınlarda premenapozal kadınlardan daha yüksek OPG seviyesi ve daha düşük RANKL ve RANKL/OPG oranı tespit edilmiştir. Yaş ve menapozal durum dışlandıktan sonra OPG, RANKL veya OPG/RANKL oranı KMD ile ilişkili bulunmamıştır. Serum RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı artarken osteokalsin düzeyleri azalmaktadır (176). Bu çalışmayı destekler şekilde bizim çalışmamızda da akromegali grubunda osteokalsin düzeyi ile RANKL ters ilişkili olarak bulundu. Benzer şekilde postmenapozal kadınlarda OPG düzeyi anlamlı olarak yüksek tespit edildi. RANKL değerleri yaş ile ilişkili saptanmadı. KMD değerleri ile RANKL, OPG ve RANKL/OPG oranı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Tedavi almamış 48 osteoporotik kadınla yapılan bir çalışmada serum OPG seviyesi ve kemik döngü belirteçleri (tip I kollajen, osteokalsin) arasında pozitif ilişki saptanmıştır (177). Bizim çalışmamızda CTX düzeyi akromegali grubunda kontrol grubundan, tip I kollajen düzeyi ise akromegali ve prolaktinoma gruplarının her

ikisinde kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek tespit edildi. Kontrol grubundan yüksek saptanan bu değerler kemik döngüsündeki artışı yansıtmaktadır.

Bizim çalışmamızda akromegali grubunda osteokalsin ile RANKL arasında ters bağıntı gözlemlendi. Benzer şekilde yine akromegali grubunda kemik spesifik ALP artışı ile RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı azalıyordu. Ayrıca kontrol grubunda idrar DPD düzeyi arttıkça RANKL/OPG oranı azalıyordu. Her üç kemik döngü belirteci KMD değerlerinden bağımsız olarak RANKL ile negatif ilişkili bulundu. Bu bulgular RANKL'ın KMD değerinden bağımsız olarak kemik döngü belirteçleri ile negatif korelasyon gösterdiğini düşündürmektedir. RANKL ve kemik döngü belirteçleri arasındaki ilişki daha çok akromegali grubunda gözlemlendi. Prolaktinoma grubunda benzer bir ilişkinin saptanmaması kemik döngüsünün akromegali grubu kadar yüksek olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Kemik döngü belirteçlerinin akromegali grubunda daha yüksek bulunması, KMD değerinin daha düşük saptanması gibi hastalık seyrinin daha uzun süreli olmasına bağlanabilir.

Bu çalışmada akromegali ve prolaktinoması olan hastalar ile kontrol grubu arasında RANKL, OPG serum düzeyleri ve RANKL/OPG oranı açısından bir fark bulunmadı. Gruplar arasında KMD değerlerinin çok farklı olmaması takip eden OPG, RANKL düzeyleri ve RANKL/OPG oranının sonucunu da etkilemiş olabilir. RANKL düzeyi KMD ve hormon düzeylerinden bağımsız olarak kemik döngü hızını yansıtmaktadır. IGF-I yükseldikçe OPG düzeyleri azalmaktadır. OPG'in postmenapozal kadınlarda daha yüksek bulunması ve yaş ile arasındaki pozitif ilişki OPG'in ileri yaşta kemik rezorpsiyonuna karşı kompansatuar olarak arttığını düşündürmektedir. Bulduğumuz sonuçlar izole IGF-I ve prolaktin etkisini yansıtmıyor olabilir veya RANKL, OPG ile prolaktin ve IGF-I arasında gerçekten anlamlı bir ilişki olmayabilir. Ancak çalışmamız özellikle akromegali grubunda, RANKL düzeyinin kemik döngüsündeki önemini vurgulamaktadır. OPG düzeyinde ise akromegali ve prolaktinoma gruplarında risk artışına rağmen kompansatuar yanıtın görülmeyişi prolaktin ve IGF-I etkisiyle baskılanmasına bağlı olabilir. Daha fazla hasta sayısı ile geniş kesitsel çalışmaların yapılması bu konuda yol gösterici olacaktır. Ayrıca bu hasta gruplarında osteoporoz tedavisi aldıktan sonra tedavi yanıtını değerlendiren prospektif çalışmaların yapılması literatüre ışık tutacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007;9 Suppl 1:S1
2. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001 Jun;79 (5-6):243-53.
3. 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 Jun;20(3):345–357.
4. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008 Mar;3(1):67-99.
5. Nicks KM, Fowler TW, Gaddy D. Reproductive hormones and bone. *Curr Osteoporos Rep* 2010 Jun;8(2):60-7.
6. Clément-Lacroix P, Ormandy C, Lepescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Amling M, Gaillard-Kelly M, Binart N, Baron R, Kelly PA. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology* 1999 Jan;140(1):96–105.
7. Bataille-Simoneau N, Gerland K, Chappard D, Basle MF, Mercier L. Expression of prolactin receptors in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 Dec 4;229(1):323–8.
8. Seriwatanachai D, Charoenphandhu N, Suthiphongchai T, Krishnamra N. Prolactin decreases the expression ratio of receptor activator of nuclear factor

kappaB ligand/osteoprotegerin in human fetal osteoblast cells. *Cell Biol Int* 2008 Sep;32(9):1126-35.

9. Freda PU. Current concepts in the biochemical assessment of the patient with acromegaly. *Growth Horm IGF Res* 2003 Aug;13(4):171-84.
10. Ezzat S, Melmed S, Endres D, Eyre DR & Singer FR. Biochemical assessment of bone formation and resorption in acromegaly. *J of Clin Endocrinol and Metab* 1993 Jun;7(6):1452-7.
11. Marazuela M, Astigarraga B, Tabuenca MJ, Estrada J, Marin F, Lucas T. Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly. *Calcif Tissue Int* 1993 Jun;52 (6):419-21.
12. Terzolo M, Piovesan A, Osella G, Pia A, Reimondo G, Pozzi C, Raucci C, Torta M, Paccotti P, Angeli A. Serum levels of bone Gla protein (osteocalcin, BGP) and carboxyterminal propeptide of type I procollagen (PICP) in acromegaly: effects of long-term octreotide treatment. *Calcif Tissue Int* 1993 Mar;52(3):188-91.
13. Ueland T. Bone metabolism in relation to alterations in systemic growth hormone. *Growth Horm IGF Res* 2004 Dec;14(6):404-17.
14. Rubin J, Ackert-Bicknell CL, Zhu L, Fan X, Murphy TC, Nanes MS, Marcus R, Holloway L, Beamer WG, Rosen CJ. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Sep;87(9):4273-9.
15. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995 Feb 2;332 (5):305-11.

16. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981;3 (4):349-51.
17. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 2005 Feb;11 (2) :76-81.
18. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996 Aug;17(4)17:308–32.
19. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000 Sep 1;289(5484):1504–8.
20. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003 Aug;4 (8):638-49.
21. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell* 2002 Apr;2 (4):389- 406.
22. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res* 1997 Jun;12(6):869–79.
23. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006 Jan;12(1): 17-25.
24. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Mar 31;95(7):3597-602.

25. Brown JP, Albert C, Nassar BA, Adachi JD, Cole D, Davison KS, Dooley KC, Don-Wauchope A, Douville P, Hanley DA, Jamal SA, Josse R, Kaiser S, Krahn J, Krause R, Kremer R, Lepage R, Letendre E, Morin S, Ooi DS, Papaioannou A, Ste-Marie LG. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clin Biochem* 2009 Jul;42(10-11):929-42.
26. Martin TJ, Seeman E. Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008 Oct;22(5):701–22.
27. Brockstedt H, Kassem M, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Age- and sex-related changes in iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 1993 Jul-Aug;14 (4):681–91.
28. Johnell O, Oden A, De Laet C, Garnero P, Delmas PD, Kanis JA. Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporos Int* 2002 Jul;13 (7):523–6.
29. Boivin G, Meunier PJ. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif Tissue Int* 2002 Jun;70 (6):503–11.
30. O'Brien CA, Plotkin LI, Galli C, Goellner JJ, Gortazar AR, Allen MR, Robling AG, Bouxsein M, Schipani E, Turner CH, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PLoS One* 2008 Aug;13(3):e2942.
31. Vatsa A, Breuls RG, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, Klein-Nulend J. Osteocyte morphology in fibula and calvaria — is there a role for mechanosensing?. *Bone* 2008 Sep;43 (3):452–8.

32. Naidoo U, Goff DC, Klibanski A. Hyperprolactinemia and bone mineral density: the potential impact of antipsychotic agents. *Psychoneuroendocrinology* 2003 Apr;28 Suppl 2:97-108.
33. Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, Yokochi T, Oda H, Nakamura K, Ida N, Wagner EF, Taniguchi T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002 Apr 18 416(6882):744-9.
34. Thomas GP, Baker SU, Eisman JA, Gardiner EM. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. *J Endocrinol* 2001 Aug;170(2):451-60.
35. Deyama Y, Takeyama S, Koshikawa M, Shirai Y, Yoshimura Y, Nishikata M, Suzuki K, Matsumoto A. Osteoblast maturation suppressed osteoclastogenesis in coculture with bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Jul 21;274(1):249-54.
36. Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER. Characterization of human bone cells in culture. *Calcif Tissue Int* 1985 May;37(3):228-35.
37. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993 Jun;94(6):646-50.
38. Geusens P, Dumitrescu B, van Geel T, van Helden S, Vanhoof J, Dinant GJ. Impact of systematic implementation of a clinical case finding strategy on diagnosis and therapy of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2008 Jun;23(6):812-8.
39. 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 Fractures Research Group. N Engl J Med 1995 Mar 23;332(12):767-73

40. Garnero P, Delmas PD. Contribution of bone mineral density and bone turnover markers to the estimation of risk of osteoporotic fracture in postmenopausal women. J Musculoskelet Neuronal Interact 2004 Mar;4(1):50-63.
41. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. Osteoporos Int 2000;11(3):192-202.
42. Watts NB. The Fracture Risk Assessment Tool (FRAX®): Applications in Clinical Practice. J Womens Health (Larchmt) 2011 Mar 25.
43. Lewiecki EM. Benefits and limitations of bone mineral density and bone turnover markers to monitor patients treated for osteoporosis. Curr Osteoporos Rep 2010 Mar;8(1):15-22.
44. Biomarkers Definitions Working Group: Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001 Mar; 69(3):89-95.
45. Watts NB, Lewiecki EM, Miller PD, Baim S. National Osteoporosis Foundation 2008 Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis and the World Health Organization Fracture Risk Assessment Tool (FRAX) : what they mean to the bone densitometrist and bone technologist. J Clin Densitom 2008 Oct-Dec;11(4):473-7.
46. Melton LJ, Crowson CS, O'Fallon WM, Wahner HW, Riggs BL. Relative contributions of bone density, bone turnover and clinical risk factors to long-term fracture predictions. J Bone Miner Res 2003 Feb;18(2):312-8.

47. Garnero P, Hausherr E, Chapuy MC, Marcelli C, Grandjean H, Muller C, Cormier C, Bréart G, Meunier PJ, Delmas PD. Markers of bone resorption predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective study. *J Bone Miner Res* 1996 Oct;11(10):1531-8.
48. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B, Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: The OFELY study. *J Bone Miner Res* 2000 Aug;15(8):1526-36.
49. Srivastava AK, Vliet EL, Lewiecki EM, Maricic M, Abdelmalek A, Gluck O, Baylink DJ. Clinical use of serum and urine bone markers in the management of osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 2005 Jul;21(7):1015–26.
50. Garnero P, Somay Rendu E, Duboeuf F, Delmas PD. Markers of bone turnover predict postmenopausal bone loss over 4 years: The OFELY study. *J Bone Miner Res* 1999 Sep;14(9):1614-21
51. Nishizawa Y, Nakamura T, Ohta H, Kushida K, Gorai I, Shiraki M, Fukunaga M, Hosoi T, Miki T, Chaki O, Ichimura S, Nakatsuka K, Miura M. Guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2004). *J Bone Miner Metab* 2005;23 (2):97–104.
52. Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6:S30–44.
53. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* 2005 Nov;26(4):97–122
54. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000 Jul;37(Pt 4):432–46.

55. Delmas PD, Christiansen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res* 1990 Jan;5(1):5–11.
56. Ross PD, Kress BC, Parson RE, Wasnich RD, Armour KA, Mizrahi IA. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteoporos Int* 2000;11(1):76–82.
57. Chapurlat RD, Garnero P, Breart G, Meunier PJ, Delmas PD. Serum type I collagen breakdown product (serum CTX) predicts hip fracture risk in elderly women: the EPIDOS study. *Bone* 2000 Aug;27(2):283–6.
58. Garnero P, Borel O, Delmas PD. Evaluation of a fully automated serum assay for C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen in osteoporosis. *Clin Chem* 2001 Apr;47(4):694–702.
59. Gerrits MI, Thijssen JH, van Rijn HJ. Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin Chem* 1995 Apr;41(4):571–4.
60. American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature. *J Bone Miner Res* 2000 Dec;15(12):2293-6.
61. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Nov;90(11):6323-31.

62. Fuller K, Wong B, Fox S, Choi Y, Chambers TJ. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med* 1998 Sep 7;188(5):997–1001
63. Vidal NOA, Brändström H, Jonsson KB, Ohlsson C Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol* 1998 Oct;159(1):191–5.
64. Murakami T, Yamamoto M, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T. Transforming growth factor- β 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Nov 27;252(3):747–52.
65. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999 Aug;140(8):3552–61.
66. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999 Oct;140(10):4382–9.
67. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology* 1998 Nov;139(11):4743–6.
68. Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL

(receptor activator of NF- κ B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone* 1999 Nov;25(5):525–34.

69. Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Mar 16; 269(2):532–6.
70. Kong Y-Y, Yoshida H, Sarosi I, Tan H-L, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliviera 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 Jan 28;397(6717):315–23
71. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell* 2000 Sep 29;103(1):41-50.
72. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlich K, Smolen JS. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005 Nov;1(1):47-54
73. Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, Yokota Y, Penninger JM, Kong YY. Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol* 2006 Feb;26(3):1002-13.
74. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that

regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998 Apr 17;93(2):165–76.

75. Anastasilakis AD, Toulis KA, Polyzos SA, Terpos E. RANKL inhibition for the management of patients with benign metabolic bone disorders. *Opin Investig Drugs* 2009 Aug;18(8):1085-102.
76. Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997 Nov 13;390(6656):175–9.
77. 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 Jan;24(1):45-8.
78. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan H-L, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia X-Z, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Mar 30;96(7):3540–45.
79. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Dec 18;253(2):395–400.
80. Li J, Sarosi I, Yan X-Q, Morony S, Capparelli C, Tan H-L, McCabe SM, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan S-C, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR,

Lacey DL, Boyle WJ. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Feb 15;97(4):1566–71.

81. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999 Sep 15;13(18):2412–24.
82. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 2006 Jul 15;107(2):289-98.
83. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997 Apr 18;89(2):309–19.
84. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S-I, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 May 8;234(1):137–142.
85. Emery JG, McDonnell P, Brigham Burke M, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem* 1998 Jun 5; 273(23):14363–7.

86. 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 May 1;12(9):1260-8.
87. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Jun 29;247(3):610-5.
88. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki S-I, Yano K, Fujise N, Sato Y, Goto M, Yamaguchi K, Kuriyama M, Kanno T, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998 Mar 139(3):1329-37.
89. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med* 2002 Jul 18;347(3):175-84.
90. Cundy T, Hegde M, Naot D, Chong B, King A, Wallace R, Mulley J, Love DR, Seidel J, Fawcner M, Banovic T, Callon KE, Grey AB, Reid IR, Middleton-Hardie CA, Cornish J. A mutation in the gene TNFRSF11B encoding osteoprotegerin causes an idiopathic hyperphosphatasia phenotype. *Hum Mol Genet* 2002 Sep 1;11(18): 2119-27.
91. Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004 Nov 26;95(11):1046-57.

92. Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Sep;26(9):2117-24.
93. Ezzat S. Acromegaly. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997 Dec;26(4):703-23.
94. Rajasoorya C, Holdaway IM, Wrightson P, Scott DJ, Ibbertson HK. Determinants of clinical outcome and survival in acromegaly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994 Jul ;41(1):95-102
95. Thorner M, Vance ML, Laws E. The anterior pituitary. In: Wilson JD, ed. *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders; 1998:249-340.
96. Giustina A, Chanson P, Bronstein MD, Klibanski A, Lamberts S, Casanueva FF, Trainer P, Ghigo E, Ho K, Melmed S. A consensus on criteria for cure of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 Jul ;95(7):3141-8.
97. Paisley AN, Trainer PJ. Medical treatment in acromegaly. *Curr Opin Pharmacol* 2003 Dec;3(6):672-7.
98. J.W. Bijlsma, J.W. Nortier, S.A. Duursma, R.J. Crougns, R. Bosch, J.H. Changes in bone metabolism during treatment of acromegaly, *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983 Oct;104(2) 153–9.
99. H. Kotzmann, P. Bernecker, P. Hubsch P, Pietschmann P, Woloszczuk W, Svoboda T, Geyer G, Luger A. Bone mineral density and parameters of bone metabolism in patients with acromegaly. *J Bone Miner Res* 1993 Apr;8(4): 459–65.

100. Marazuela M, Astigarraga B, Tabuenca MJ, Estrada J, Marin F, Lucas T. Serum bone Gla protein as a marker of bone turnover in acromegaly. *Calcif Tissue Int* 1993 Jun;52(6):419–21.
101. Legovini P, De Menis E, Breda F, Billeci D, Carteri A, Pavan P, Conte N. Long-term effects of octreotide on markers of bone metabolism in acromegaly: evidence of increased serum parathormone concentrations. *J Endocrinol Invest* 1997 Sep;20(8):434–8.
102. Diamond T, Nery L, Posen S. Spinal and peripheral bone mineral densities in acromegaly: the effects of excess growth hormone and hypogonadism, *Ann. Intern. Med* 1989 Oct 1;111(7):567– 73.
103. Seeman E, Wahner HW, Offord KP, Kumar R, Johnson WJ, Riggs BL. Differential effects of endocrine dysfunction on the axial and the appendicular skeleton. *J Clin Invest* 1982 Jun;69(6):1302–9.
104. Tseng KF, Goldstein SA. Systemic over-secretion of growth hormone in transgenic mice results in a specific pattern of skeletal modeling and adaptation. *J Bone Miner Res* 1998 Apr;13(4):706–15.
105. Thoren M, Hilding A, Brismar T, Magnusson P, Degerblad M, Larsson L, Saaf M, Baylink DJ, Mohan S. Serum levels of insulin- like growth factor binding proteins (IGFBP)-4 and -5 correlate with bone mineral density in growth hormone (GH)-deficient adults and increase with GH replacement therapy. *J Bone Miner Res* 1998 May;13(5):891–9.
106. Bluet-Pajot MT, Tolle V, Zizzari P, Robert C, Hammond C, Mitchell V, Beauvillain JC, Viollet C, Epelbaum J, Kordon C. Growth hormone secretagogues and hypothalamic Networks. *Endocrine* 2001 Feb;14 (1):1–8.

107. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G, Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 1987 Dec 10-16;330(6148):537–43.
108. Talamantes F, Ortiz R. Structure and regulation of expression of the mouse GH receptor. *J Endocrinol* 2002 Oct;175(1): 55–9.
109. A. Ullrich, A. Gray, A.W. Tam, et al., Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *J EMBO* 1986 May;11(5) 2503–12
110. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts J TC. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 1995 Apr;16(2):143–63.
111. Roth RA. Structure of the receptor for insulin-like growth factor II: the puzzle amplified. *Science* 1988 Mar 11;239(4845):1269–71.
112. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr Rev* 2002 Dec;23(6):824–54
113. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995 Feb;16(1) 3–34.
114. Ferry RJ Jr, Katz LE, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Horm Metab Res* 1999 Feb-Mar;31(2-3):192-202.
115. Eriksen EF, Kassem M, Langdahl B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodelling. *Eur J Clin Invest* 1996 Jul;26(7):525–34.

116. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998 Feb;19(1):55–79.
117. Rosen CJ. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: clinical implications. *Clin Chem* 1999 Aug;45(8pt2):1384–90.
118. Bikle D, Majumdar S, Laib A, Powell-Braxton L, Rosen C, Beamer W, Nauman E, Leary C, Halloran B. The skeletal structure of IGF-I deficient mice. *J Bone Miner Res* 2001 Dec;16(12):2320–9.
119. Camacho-Hubner C, Woods KA, Miraki-Moud F, Hindmarsh PC, Clark AJ, Hansson Y, Johnston A, Baxter RC, Savage MO. Effects of recombinant hIGF-I therapy on the GH/IGF system of a patient with a partial IGF-I gene deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 1999 May; 84(5):1611–6.
120. Ravn P, Overgaard K, Spencer EM, Christiansen C. Insulin-like growth factors I and II in healthy women with and without established osteoporosis. *Eur J Endocrinol* 1995 Mar;132(3):313–9.
121. Sugimoto T, Nishiyama K, Kuribayashi F, Chihara K. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF) I, IGF-binding protein (IGFBP)-2, and IGFBP-3 in osteoporotic patients with and without spinal fractures. *J Bone Miner Res* 1997 Aug;12(8):1272–9.
122. Nasu M, Sugimoto T, Chihara M, Hiraumi M, Kurimoto F, Chihara K. Effect of natural menopause on serum levels of IGF-I and IGF-binding proteins: relationship with bone mineral density and lipid metabolism in perimenopausal women. *Eur J Endocrinol* 1997 Jun;136(6):608-16.
123. Friedlander AL, Butterfield GE, Moynihan S, Grillo J, Pollack M, Holloway L, Friedman L, Yesavage J, Matthias D, Lee S, Marcus R, Hoffman AR. One

year of IGF-I treatment does not affect BMD, body composition, or psychological measures in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Apr;86(4):1496–1503

124. Ueland T. GH/IGF-I and bone resorption in vivo and in vitro. *Eur J Endocrinol* 2005 Mar;152(3):327-32.
125. Sartorio A, Conti A, Monzani M, Morabito F, Faglia G. Growth hormone treatment in adults with GH deficiency: effects on new biochemical markers of bone and collagen turnover. *J Endocrinol Invest* 1993 Dec;16(11):893–8.
126. Holmes SJ, Economou G, Whitehouse RW, Adams JE, Shalet SM. Reduced bone mineral density in patients with adult onset growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Mar;78(3):669–74.
127. Hansen TB, Brixen K, Vahl N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Mosekilde L, Hagen C. Effects of 12 months of growth hormone (GH) treatment on calciotropic hormones, calcium homeostasis, and bone metabolism in adults with acquired GH deficiency: a double blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Sep;81(9):3352–9.
128. Kotzmann H, Riedl M, Bernecker P, Clodi M, Kainberger F, Kaider A, Woloszczuk W, Luger A. Effect of long-term growth-hormone substitution therapy on bone mineral density and parameters of bone metabolism in adult patients with growth hormone deficiency. *Calcif Tissue Int* 1998 Jan;62(1):40–6.
129. Valimaki MJ, Salmela PI, Salmi J, Viikari J, Kataja M, Turunen H, Soppi E. Effects of 42 months of GH treatment on bone mineral density and bone turnover in GH-deficient adults. *Eur J Endocrinol* 1999 Jun;140(6):545–54.

130. Tseng KF, Goldstein SA. Systemic over-secretion of growth hormone in transgenic mice results in a specific pattern of skeletal modeling and adaptation. *J Bone Miner Res* 1998 Apr;13(4):706–15.
131. Zhao G, Monier-Faugere MC, Langub MC, Geng Z, Nakayama T, Pike JW, Chernausek SD, Rosen CJ, Donahue LR, Malluche HH, Fagin JA, Clemens TL. Targeted overexpression of insulin-like growth factor I to osteoblasts of transgenic mice: increased trabecular bone volume without increased osteoblast proliferation. *Endocrinology* 2000 Jul;141(7):2674–82.
132. Jian GJ, Gronowicz G, Ledgard F, Clark SH, Lichtler AC, Kream BE. Phenotypic characterization of transgenic mice with bone directed overexpression of IGF-I. *J Bone Miner Res* 2000 15:S157
133. Kassem M, Blum W, Ristelli J, Mosekilde L, Eriksen EF. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif. Tissue Int* 1993 Mar;52(3):222–6.
134. Nilsson A, Swolin D, Enerback S, Ohlsson C. Expression of functional growth hormone receptors in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995 Dec;80(12):3483–8.
135. Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Receptors for insulinlike growth factors-I and -II in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone, *Endocrinology* 1990 Jan;126(1):39–44.
136. Leung K, Rajkovic IA, Peters E, Markus I, Van JJ, Ho KK. Insulin-like growth factor I and insulin down-regulate growth hormone (GH) receptors in rat osteoblasts: evidence for a peripheral feedback loop regulating GH action. *Endocrinology* 1996 Jul; 137(7): 2694–702.

137. Yano K, Tsuda E, Washida N, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. Immunological characterization of circulating osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1999 Apr;14(4): 518–27.
138. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Feb;86(2):631–7.
139. Kars M, Dekkers OM, Pereira AM, Romijn JA. Update in prolactinomas. *Neth J Med* 2010 Mar;68(3):104-12.
140. Krysiak R, Okopień B, Marek B, Szkróbka W. Prolactinoma. *Przegl Lek* 2009 May;66(4):198-205.
141. Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JA. Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 Feb;96(2):273-88
142. Jones TH. The management of hyperprolactinaemia. *Br J Hosp Med* 1995 Apr;53(8):374-8
143. Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ* 2003 Sep;169(6):575-81
144. Schlechte JA. Clinical practice. Prolactinoma. *N Engl J Med* 2003 Nov 20;349(21):2035-41
145. Ben Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001 Dec;22(6):724-63.

146. Colao A, Sarno AD, Cappabianca P, Briganti F, Pivonello R, Somma CD, Faggiano A, Biondi B, Lombardi G. Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *Eur J Endocrinol* 2003 Mar;148(3):325-31.
147. Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev* 2006 Aug;27(5):485-534.
148. Kreutzer J, Buslei R, Wallaschofski H, Hofmann B, Nimsy C, Fahlbusch R, Buchfelder M. Operative treatment of prolactinomas: indications and results in a current consecutive series of 212 patients. *Eur J Endocrinol* 2008 Jan;158(1):11-8.
149. Patil CG, Hayden M, Katznelson L, Chang SD. *J Clin Neurosci* 2009 Aug;16(8):985-93.
150. Shibli-Rahhal A, Schlechte J. The effects of hyperprolactinemia on bone and fat. *Pituitary* 2009;12(2):96-104.
151. Ritchie LD, Fung EB, Halloran BP, Turnlund JR, Van Loan MD, Cann CE, King JC. A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *Am J Clin Nutr* 1998 Apr;67(4):693–701.
152. Naylor KE, Iqbal P, Fledelius C, Fraser RB, Eastell R. The effect of pregnancy on bone density and bone turnover. *J Bone Miner Res* 2000 Jan;15(1):129–37.
153. Lotinun S, Limlomwongse L, Sirikulchayanonta V, Krishnamra N. Bone calcium turnover, formation, and resorption in bromocriptine- and prolactin-treated lactating rats. *Endocrine* 2003 Feb-Mar;20(1-2):163–70.

154. Seriwatanachai D, Krishnamra N, van Leeuwen JP. Evidence for direct effects of prolactin on human osteoblasts: Inhibition of cell growth and mineralization. *J Cell Biochem* 2009 Jul 1;107(4):677-85.
155. Schlechte JA, Sherman B, Martin R. Bone density in amenorrheic women with and without hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1983 Jun;56(6):1120-3.
156. Cann C, Martin M, Genant H, Jaffe R. Decreased spinal mineral content in amenorrheic women. *JAMA*. 1984 Feb;251(3):626-9.
157. Koppelman M, Kurtz D, Morrish K. Vertebral body bone mineral content in hyperprolactinemic women. *J Clin Endocrinol Metab* 1984 Dec;59(6): 1050-3.
158. Schlechte JA, el-Khoury G, Kathol M, Walkner L. Forearm and vertebral bone mineral content in treated and untreated hyperprolactinemic amenorrhea. *J Clin Endocrinol and Metab* 1987 May;64(5):1021-6.
159. Greenspan SL, Neer RM, Ridgway EC, Klibanski A. Osteoporosis in men with hyperprolactinemic hypogonadism. *Ann Intern Med* 1986 Jun;104(6):777-82
160. Schlechte J, Walkner L, Kathol MA. Longitudinal analysis of premenopausal bone loss in healthy women and women with hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992 Sep;75(3):698-703.
161. Charoenphandhu N, Tudpor K, Thongchote K, Saengamart W, Puntheeranurak S, Krishnamra N. High-calcium diet modulates effects of long-term prolactin exposure on the cortical bone calcium content in ovariectomized rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Feb;292(2):E443-52.

162. Charoenphandhu N, Teerapornpuntakit J, Methawasin M, Wongdee K, Thongchote K, Krishnamra N. Prolactin decreases expression of Runx2, osteoprotegerin, and RANKL in primary osteoblasts derived from tibiae of adult female rats. *Can J Physiol Pharmacol* 2008 May;86(5):240-8.
163. Coss D, Yang L, Kuo CB, Xu X, Luben RA, Walker AM. Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000 Dec;279(6):E1216–25.
164. Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, Harrison K, Findlay DM, Zannettino AC. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2003 Jun;18(6):1088-98
165. Seriwatanachai D, Thongchote K, Charoenphandhu N, Pandaranandaka J, Tudpor K, Teerapornpuntakit J, Suthiphongchai T, Krishnamra N. Prolactin directly enhances bone turnover by raising osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio. *Bone* 2008 Mar;42(3):535-46.
166. Clément-Lacroix P, Ormandy C, Lepescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Amling M, Gaillard-Kelly M, Binart N, Baron R, Kelly PA. Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology* 1999 Jan;140(1):96–105.
167. Haddad PM, Wieck A. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs* 2004;64(20):2291–314.

168. Ueland T, Bollerslev J, Flyvbjerg A, Hansen TB, Vahl N, Mosekilde L. Effects of 12 months of GH treatment on cortical and trabecular bone content of IGFs and OPG in adults with acquired GH deficiency: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Jun;87(6):2760-3.
169. Ueland T, Bollerslev J, Godang K, Müller F, Froland SS, Aukrust P. Increased serum osteoprotegerin in disorders characterized by persistent immuneactivation or glucocorticoid excess: possible role in bone homeostasis. *Eur J Endocrinol* 2001 Dec;145(6):685–90.
170. Koch FP, Merkel C, Ziebart T, Smeets R, Walter C, Al-Nawas B. Influence of bisphosphonates on the osteoblast RANKL and OPG gene expression in vitro. *Clin Oral Investig* 2010 Oct 12.
171. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 Sep 29;250(3):776–81.
172. Stilgren LS, Rettmer E, Eriksen EF, Hegedüs L, Beck-Nielsen H, Abrahamsen B. Skeletal changes in osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand mRNA levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Bone* 2004 Jul;35(1):256-65.
173. Bussade I, Naliato EC, Mendonça LM, Violante AH, Farias ML. Decreased bone mineral density in pre-menopause women with prolactinoma. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007 Dec;51(9):1522-7.
174. Tenta R, Panagiotakos DB, Fragopoulou E, Nomikos T, Pitsavos C, Chrysohoou C, Antonopoulou S, Stefanadis C. Osteoprotegerin and nuclear

factor-kappaB ligand are associated with leptin and adiponectin levels, in apparently healthy women. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2010 Jun;10(2):174-9

175. Nabipour I, Larijani B, Vahdat K, Assadi M, Jafari SM, Ahmadi E, Movahed A, Moradhaseli F, Sanjdideh Z, Obeidi N, Amiri Z. Relationships among serum receptor of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, high-sensitivity C-reactive protein, and bone mineral density in postmenopausal women: osteoimmunity versus osteoinflammatory. *Menopause* 2009 Sep-Oct;16(5):950-5.
176. Liu JM, Zhao HY, Ning G, Zhao YJ, Chen Y, Zhang Zh, Sun LH, Xu MY, Chen JL. Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75. *Calcif Tissue Int* 2005 Jan;76(1):1-6.
177. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Piswanger-Soelkner C, Bonelli C, Dimai HP, Leb G, Obermayer-Pietsch B. Osteoprotegerin serum levels in women: correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien Klin Wochenschr* 2003 May 15;115(9):291-7.