

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

**SJÖGREN SENDROMLU VE ROMATOİD ARTRİTLİ
HASTALARDA ANTI-CCP2 DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI
VE KOLLAJEN TİP 1 α 1 S/s, VİTAMİN D RESEPTÖR B/b
ALLEL TAYİNİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Nesrin ÖZLEN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Cevval ULMAN

MANİSA, 2008

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak, iyi niyet ve desteklerini esirgemeyen değerli Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Zeki Arı, tez danışmanım Doç. Dr. Cevval Ulman, hocalarım Doç. Dr. Fatma Taneli, Doç. Dr. Ahmet Var, Doç. Dr. Ece Onur'a,

Araştırma çalışmalarım süresince özverili destekleri, sevgi ve dostlukları için değerli arkadaşlarım; Dr. Serdar Seven, Dr. Mustafa Altaş, Dr. Özlem Günay, Dr. Metin Demir, Dr. Derya Güleç, Dr. Gürol Şahin Ulutaş, Dr. Esat Kılıç, Dr. Ferda Doğan Bozyiğit, Dr. Nurser Arifoğlu, Dr. Mehmet Çalkan, Dr. Ferhunde Pulular, Dr. Soner Erdin'e ve tüm biyokimya laboratuvarı teknisyenlerine,

İlgisi ve desteği için değerli Yrd. Doç. Dr. Yeşim Güvenç'e

Araştırmamın örnek toplama aşamasında beni destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Romatoloji Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Timur Pırıldar'a, hastalarımın öncelik tanıyıp, kemik dansitometresi ölçümlerini gerçekleştiren Nükleer Tıp Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. F. Gül Gümüşer'e ve nükleer tıp teknisyenlerine, istatistik aşamasında bizlere yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Gönül Dinç'e,

Sevgi ve yardımları ile her zaman yanımda olan biricik eşim sevgili Ahmet Özlen'e, yaşama sevincimiz olan sevgili kızımız Zeynep Sude Özlen'e, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman bizden esirgemeyen çok sevgili anneciğim ve babacığım,

Projemin desteklenmesi için yardımlarından dolayı rektörümüz sayın Prof. Dr. Semra Öncü'ye, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu üyelerine ve tüm rektörlük çalışanlarına en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Nesrin ÖZLEN, Manisa 2008

KISALTMALAR

OP : Osteoporoz

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

DEXA : Dual-energy x-ray absorptiometri

BMD : Kemik mineral yoğunluğu

COLIA1: Kollajen tip Iα1 geni

VDR : Vitamin D reseptörü geni

DPD : Deoksipiridinolin

GGT : Gamma-glutamil transferaz

CRP : C reaktif protein

Anti - CCP2 : Anti-siklik sitruline peptid

RANKL: Reseptör aktivator of nuclear faktor kappa ligand

OPG : Osteoprotegerin

PICP : Prokollajen karboksi terminal propeptid

PINP : Prokollajen aminoterminal propeptid

TRACP: Tartarata dirençli asit fosfataz

OHP : Hidroksiprolin

GHYL : Galaktozil-hidroksilizin

GGHYL: Glukozil-galaktozil-hidroksilizin

PD : Piridinolin

NTx-I : Tip I kollajenin aminoterminal telopeptidi

CTx-I : Tip I kollajenin karboksiterminal telopeptidi

OR : Odds Ratio

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

SPSS : Statistical package for social science (Sosyal bilimler için istatistik paketi)

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

KISALTMALAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
II.1. Osteoporoz	3
II.1.1. Osteoporozun Tanımı	3
II.1.2. Osteoporozun Sınıflandırılması	4
II.1.3. Osteoporozda Risk Faktörleri	7
II.1.4. Kemik Metabolizması	8
II.1.5. Osteoporoz Patogenezi	12
II.1.6. Osteoporoz Kliniği	15
II.1.7. Osteoporoz Tanısında Kullanılan Yöntemler	16
II.1.7.1. Görüntüleme Yöntemleri	16
II.1.7.2. Biyokimyasal Markırlar	19
II.1.7.2.1. Kemik Yapım Markırları	20
II.1.7.2.2. Kemik Yıkım Markırları	23
II.1.8. Osteoporoz Tedavisi	27
II.2. Romatolojik Hastalıklar ve Anti-CCP2	33
III. GEREÇ VE YÖNTEM	37
III.1. Araç ve Gereçler	37
III.2. Yöntem	37
III.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	37
III.2.2. Çalışma Düzeni	38
III.2.3. Kan ve İdrar Örneklerinin Alınması	38
III.2.4. Biyokimyasal Analizler	39
III.2.4.1. CRP Tayini	40
III.2.4.2. DPD Tayini	40

III.2.4.3. Spot İdrarda Kreatinin Tayini	41
III.2.4.4. Spot İdrarda GGT Tayini	41
III.2.4.5. Anti-CCP2 Tayini	42
III.2.4.6. COLIA1 ve VDR Gen Polimorfizmi Tayini	43
III.2.5. Kemik Dansitometresi Ölçümü	50
III.3. İstatistiksel Analiz	50
IV. BULGULAR	52
V. TARTIŞMA	62
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	78
VII. ÖZET	80
VIII.İNGİLİZCE ÖZET	82
IX. KAYNAKLAR	84

I. GİRİŞ

Osteoporoz (OP); düşük kemik dansitesi ve frajil mikroyapı nedeniyle kırılğan bir kemik dokusu oluşumu ile karakterize sistemik bir kemik hastalığıdır (1). 1994'de WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından organize edilen uzmanlardan oluşan bir panelde, genç normal kişilere göre kemik dansitesinin 2.5 standart sapmasından daha düşük kemik mineral yoğunluğu (BMD) olanların osteoporoz olarak tanımlanması önerilmiştir (2). Kuzey Amerika'daki epidemiyolojik verilerde 50 yaşında beyaz ırktaki bayanlarda yaşam boyu %17 kalça, %15.6 vertebra, %16 distal önkol fraktürü oluşma riski bildirilirken, aynı riskler erkekler için sırasıyla %6, %5, %2.5 olarak bildirilmiştir (3).

Osteoporozda klinik anlamda belirgin kemik kaybı olmadan tanı konulursa osteoporoz önlenabilir ve etkin şekilde tedavi edilebilir. Son yıllarda osteoporozda tanı ve izlem yöntemlerinden olan kemik mineral yoğunluğunun radyolojik olarak incelenmesi referans tanı kriteri olarak değerlendirilmektedir. Bu metoda ek olarak biyokimyasal kemik turnover markırlarının kullanımı ise birçok araştırmacı tarafından klinik ve deneysel amaçlarla incelenmekte, tanı ve tedavinin takibinde kullanılmaktadır (4). Ancak osteoporoz, kompleks bir etiyolojiye sahiptir. Bilinen faktörler dışında, genetik polimorfizmin araştırılması tanının erken dönemde konulabilmesi yönünde oldukça yarar sağlayacaktır.

VDR yani D vitamini alıcı gendeki tanımlanan polimorfizm, introndaki 8 ve 9 ekson arasında kısıtlanmış BsmI enziminin kendiliğinden oluşmuş kısıtlı alanında yerleşmiştir. Eğer bu kısıtlı alan varsa allel b vardır, eğer eksikse allel B bulunur. b allel yüksek kemik yoğunluğu ile ilgilidir (5). Kollajen tip 1, kemik matrisindeki ana proteini üretir ve kollajen tip I, $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ (COLIA1 ve COLIA2) genleri ile şifrelenir. COLIA1 geni ilk intronunda bulunan, azalan kemik yoğunluğuna ilişkin çok yaygın bir polimorfizm türünü tanımlamıştır. Nükleotid +2046'da, G (guanin-allel S)'den T (thyimidin-allel s)'e doğru bir

taban değişimi olur. Allel s daha düşük kemik yoğunluğu ve yüksek kırılma riskine sahiptir (6).

VDR-B/b ve COLIA1-S/s risk allellerinin incelenmesinin, osteoporozda kalıtsal oluşumların erken safhada belirlenmesine yardımcı olacağı düşünölmektedir. Kemik dansitometresi ölçümleri ise osteoporozun altın standardı olarak kabul edildiğinden, osteoporoz derecesinin belirlenmesinde kullanılması planlanmıştır. Bu çalışmadaki amacımız; bir grup romatolojik hasta ve sağlıklı kontrol grubumuz arasında osteoporoz risk allellerinin farklılığının ve bu farklılığın kemik yıkım belirteçleri ile ilişkisinin incelenmesidir. Ayrıca, çalışmanın farklı bir yönü olarak da romatoid artrit (RA) için bir tanı markırı olabileceğı belirtilen anti-siklik sitröline peptid (anti-CCP2)'in Sjögren sendromu için de tanı markırı olarak kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Bu ayırımın yapılabilmesi için romatolojik hasta grubu oluşturulurken romatoid artritli, romatoid artrit+Sjögren sendromlu ve Sjögren sendromlu hastalar seçilmiştir.

Anti-CCP2, siklik sitröline peptidlere karşı oluşmuş bir otoantikör olup, romatoid artritin erken tanısında ve eklem destrüksiyonunun prognozunun belirlenmesinde önemlidir (7). Romatoid artrit için bir tanı belirteci olarak belirtilmesine rağmen Sjögren sendromu veya diğer romatolojik hastalıklarla ilişkili pek fazla çalışma yoktur. Bu nedenle romatoid artrite ilave olarak Sjögren sendromunda da anti-CCP2'nin kullanımı ve yararını araştırdık. Sjögren sendromu, egzokrin bezlerin otoimmün karakterli, kronik inflamatuvar ve lenfoproliferatif bir hastalığı olup, ilerleyici mononökleer hücre infiltrasyonu ile seyrederek ve özellikle lakrimal bezlerin etkilenmesiyle sonuçlanır (8). Sjögren sendromu tanısının hastalığın kliniğı ortaya çıkmadan önce konulabilmesi, tedaviye erken başlanmasını ve hastanın yaşam kalitesinin yükseltilmesini sağlayacaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. Osteoporoz

II.1.1. Osteoporozun Tanımı

Osteoporoz (OP), kelime olarak poröz (delikli) kemik anlamına gelir. Birim hacim başına düşen kemik kütlesindeki azalma olarak tanımlanabilmektedir (9). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) osteoporozu; 'düşük kemik kütlesi ve kemik mikro mimari yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinde ve kırık olasılığında artma ile karakterize sistemik bir kas-iskelet hastalığıdır' şeklinde tanımlar (10).

Osteoporoz ve osteoporozla ilgili kırıklar, normal yaşam süresinin uzaması ile gittikçe artan bir sağlık problemi haline gelmiştir. Özellikle osteoporozla ilgili gelişen kırıklar, önemli maddi ve manevi kayıplara yol açmaktadır. Tanı ve tedaviye doğru yaklaşımı sağlamak için; normal kemik gelişimi ve fizyolojisi ile bunlara etki eden hormonal değişimler dahil olmak üzere her basamağı ayrıntılı bilmek gereklidir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın tanımladığı osteoporoz tanı kriterleri dual enerji x-ray absorptiometresi (DEXA) yöntemini temel almaktadır (11).

Bu kriterlere göre;

Normal; Genç erişkin ortalama değeri ile karşılaştırıldığında 1 standart sapma (-1SD)'dan daha düşük olmayan kemik mineral yoğunluğu,

Osteopeni; Genç erişkin ortalama değeri ile karşılaştırıldığında -1SD ve -2,5 SD arasında bulunan kemik mineral yoğunluğu,

Osteoporoz; Genç erişkin ortalama değeri ile karşılaştırıldığında -2,5 SD'den daha düşük kemik mineral yoğunluğu,

Yerleşmiş veya Ciddi Osteoporoz; Genç erişkin ortalama değeri ile karşılaştırıldığında -2,5 SD'den daha düşük kemik mineral yoğunluğu ve ek olarak bir veya daha fazla kırık saptanması.

II.1.2. Osteoporozun Sınıflandırılması

Osteoporoz için etiyolojik, patogenetik ve klinik yönlerden değişik sınıflandırmalar geliştirilmiştir. Bu farklı sınıflandırma yöntemleri Tablo 1'de özetlenmiştir (12).

Tablo 1: Değişik açılardan yapılan osteoporoz sınıflandırması

Yaşa göre OP	Juvenil Adult Senil
Lokalizasyona göre OP	Genel Bölgesel
Tutulan kemik dokuya göre OP	Trabeküler Kortikal
Etiyolojiye göre OP	Primer Sekonder
Histolojik görünüme göre OP	Hızlı turnoverli Yavaş turnoverli

Osteoporoz öncelikle primer ve sekonder olarak ayrılır. Primer osteoporoz postmenapozal (Tip I) veya senil (yaşa bağlı) (Tip II) olurken, sekonder osteoporozda altta yatan etiyolojik bir mekanizma tanımlanmaktadır. Tip I ve Tip II osteoporozun farkları Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2: Postmenapozal (Tip I) ve senil (Tip II) osteoporoz farkları

	TİP I	TİP II
Kadın / Erkek	6/1	2/1
Yaş	52-65	>70
Kemik tutulumu	Trabeküler	Kortikal-trabeküler
Kırık bölgesi	Vertebra-radius	Femur
Kemik kaybı	Hızlı	Yavaş
PTH	N veya azalmış	Artmış
Serum kalsiyumu	N	N
İdrar kalsiyumu	Artmış	N
Kalsiyum emilimi	Artmış	Azalmış
D vitamini metabolizması	İkincil azalmış	Birincil azalmış

Sekonder osteoporoz ise çeşitli hastalıklar, cerrahi işlemler ve ilaç kullanımına ikincil olarak gelişen kemik kaybı için kullanılan bir terimdir. Bu koşullar olguların bir kısmında kemik kaybından birinci derecede sorumlu iken diğer bir kısmında yetersiz doruk kemik kitlesi, hipogonadizm ve yaşa bağlı kemik kaybına ek bir risk faktörü gibi hareket eder (12).

Osteoporoz Gelişimindeki Sekonder Nedenler

1. Endokrin nedenler: Hipogonadizm, over agenezisi, hipertiroidi, hiperparatiroidi, cushing sendromu, diabetes mellitus
2. Malign nedenler: Multipl myelom, lösemi, lenfoma, sistemik mastositozis, yaygın karsinom
3. İlaçlar: Glukokortikoidler, heparin, etanol, antikonvülzanlar, kematerapötik ajanlar
4. Kollajen sentez bozuklukları: Romatoid artrit, homosistinüri, ehler-danlos sendromu, osteogenezis imperfekta, marfan sendromu
5. Hepatik ve gastrointestinal nedenler: Primer biliyer siroz, subtotal gastrektomi, hemakromatozis

6. Beslenme: Kalsiyumdan fakir, proteinden zengin diyet

7. İmmobilizasyon

Pekçok faktörün etkili olması nedeniyle pekçok hastada primer-sekonder ayrımını yapmak güçtür. Örneğin; yaşlı ve kortikosteroid kullanan bir kadın aynı zamanda postmenapozal dönemde de olacağından her üç sınıflama içinde de yer alacaktır (12).

Osteoporoz sistemik bir iskelet hastalığı olarak tanımlanmasına rağmen bazı durumlarda lokalize osteoporoz tiplerine de rastlanabilmektedir. Lokalize osteoporoz nedenleri aşağıda özetlenmiştir.

Lokalize Osteoporoz Nedenleri

Kırıklar

İmmobilizasyon

Romatoid artrit

Osteomyelit

Tümörler

Kompleks bölgesel ağrı sendromları

Musküler paralizi

II.1.3. Osteoporozda Risk Faktörleri

Risk faktörleri Tablo 3’de özetlenmiştir (13).

Tablo 3: Osteoporoz için risk faktörleri

Genetik	Aile anamnezinde osteoporotik fraktür Beyaz ırk > zenciler Generalize osteoartrit bulunması
Antropometrik	Minyon yapılı olmak Sarışın, ince, solgun derili olmak Zayıf vücut yapısına sahip olmak
Hormonal	Kadınlar > erkekler Erken menapoz Geç menarş Doğum yapmamış olmak Aşırı egzersize bağlı olarak amenore
Diyete ait	Düşük kalsiyum alınması Fazla protein alınması
Yaşam biçimi	Sedanter yaşam Sigara, alkol kullanımı
Hastalık ve ilaçlar	Gastrektomi, hiperparatiroidizm Romatoid artrit Hipertiroidizm Cushing sendromu, kortikosteroid kullanımı

Osteoporoz ve Genetik Temeli

Osteoporoz, multifaktoryal ve multijenik hastalıklardan birisidir. Hastalıktan birden fazla gen sorumlu tutulmaktadır. Bu genlerin birbirleri ile etkileşimi yanında, çevresel faktörler de bu genlerle etkileşmektedir. Osteoporozdaki genetik çalışmaların çoğunda, kemik mineral yoğunluğu esas alınmıştır. Son yıllarda kırık ve kırılma riskinin genetik etkileşimi üzerinde duran çalışmalar da yapılmıştır. Osteoporozda genetik

çalışmalarda incelenen ilk gen VDR (vitamin D reseptör) genidir. D vitamini alıcı gendeki tanımlanan polimorfizm, introndaki 8 ve 9 ekson arasında kısıtlanmış BsmI enziminin kendiliğinden oluşmuş kısıtlı alanında yerleşmiştir. Eğer bu kısıtlı alan varsa, allel b vardır; eğer eksikse, allel B bulunur. b alleli yüksek kemik yoğunluğu ile ilgilidir (5). Değişik türdeki VDR allellerinin nasıl bir moleküler mekanizma ile kemik yoğunluğuna etki ettikleri henüz bilinmemektedir.

Osteoporoz riskini belirlemede kullanılan genlerden bir diğeri de COLIA1 (Kollajen tip I α 1) genidir. Kollajen tip I, kemik matrisindeki ana proteini üretir ve kollajen tip I α 1 ve α 2 (COLIA1 VE COLIA2) genleri ile şifrelenir . COLIA1 geni ilk intronunda bulunan, azalan kemik yoğunluğuna ilişkin çok yaygın bir polimorfizm türünü tanımlamıştır. Nükleotid + 2046 da, G (guanin-alel S)'den T (thyimidin- alel s)'e doğru bir taban değişimi olur. Allel s daha düşük kemik yoğunluğu ve yüksek kırılma riskine sahiptir (6,14).

VDR-B ve COLIA1-s risk alellerinin incelenmesi, osteoporozda kalıtsal oluşumların erken safhada belirlenmesine yardımcı olur. Bu genotipleme, ileriki yaşlarında osteoporotik kırılma riskinin artması konusunda endişe duyanların önlem alabilmesine olanak sağlar. Aynı zamanda, genotipleme, osteodansitometri (kemik yoğunluğu ölçümü) üzerine yararlı bilgiler sunmaktadır.

II.1.4. Kemik Metabolizması

Kemik, kıkırdakla birlikte iskeleti oluşturan özel bir bağ dokusudur. Üç temel fonksiyonu vardır. Bunlar; vücuda mekanik destek sağlamak, iç organlar ve kemik iliği için koruyuculuk, kalsiyum, fosfat gibi çeşitli iyonlar için depo görevi oluşturmak.

Kemik organik ve inorganik olmak üzere başlıca iki kısımda incelenir. Protein matriks ve kemik hücreleri organik bölümü (total kemik volümünün % 30'u) oluştururken, mineral kitlesi (total kemik volümünün % 70'i) ise inorganik bölümü meydana getirir. Kemik matriksi kollajen lifler ve kollajen

dışı çeşitli proteinler oluşturur. Kemik matriksin % 95'i Tip I kollajendir. Kollajen dışı proteinler ise % 5'lik bölümü oluştururlar. Bunlardan osteokalsin kemiğin non-kollajenöz proteinleri arasında en çok bulunanıdır. Matür kemiğin primer minerali hidroksiapatit' tir. Hidroksiapatit kristalleri saf değildir, değişik miktarlarda sodyum, potasyum, magnezyum ve karbonat içerirler.

Kemiğin hücreleri ise organik kemik volümünün sadece %2'sini oluşturmaktadır. Kemik metabolizması çeşitli çevresel uyarılara (kimyasal, mekanik, elektriksel, magnetik) çok duyarlı olan kemik hücrelerince ayarlanır. Organik kemik hücreleri başlıca üç tiptir; osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar (15).

Kemiğin Hücresel Elemanları

Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik iliğindeki pluripotent kök hücreden gelişir. Osteoblastlardan geliştiğine inanılan iki tip hücre vardır; yüzey hücreleri ve osteositler. Osteoblastik seri hücreleri mekanik yüklenme, hormonlar ve diğer faktörlerin uyarısını algılayarak kemik döngüsünü kontrol eden hücrelerdir, başta kollajen olmak üzere kemik matriksinin hemen tüm elemanlarını üretirler (Tablo 4). Temel işlevleri kemik matriksin sentezi ve aynı zamanda onun mineralizasyonudur.

Tablo 4: Osteoblastlarca sentezlenen başlıca matriks elemanları

- Kollajen (Tip I)
- Alkalen fosfataz (ALP)
- Osteokalsin (Kemik glia proteini)
- Kemik sialoproteini
- Osteopontin
- Dekorin, biglikan (Proteoglikanlar)
- Sitokinler, büyüme faktörleri

Bu ürünlerin kan veya idrarda intakt molekül formlarının veya yıkım ürünlerinin ölçümü, kemik yapım, yıkım veya kemik döngüsü hakkında fikir verdiği için klinik açıdan büyük önem taşımaktadır (16,17).

Osteoklastlar

Kemik mineralini çözündürüp, matriksi yıkarak kemik yıkımını gerçekleştiren osteoklast hematopoetik mononükleer / fagositik seri hücrelerinden gelişir. Öncü hücreler osteoklast gelişim evresinde olasılıkla ekstramedüller hematopoetik bölgelerden göç ederek kemiğe ulaşırlar (17). Osteoklast gelişimi için, osteoblastik seri hücreleri ile hücre / hücre ve RANKL (osteoklast differansiyon faktörü) / RANK (NF-kappa B'nin aktive edici reseptörü) aracılığı ile etkileşim gerekliliği vardır. Osteoklast gelişimi için mutlak gerekli olan M-CSF (makrofaj koloni stimüle edici faktör)'nin kaynağı da osteoblastlardır. Bunun yanında, osteoblastların osteoklast gelişimi üzerine inhibitör görev üstlenmelerinde etkili faktörler arasında osteoblast kaynaklı osteoprotegerin (OPG=osteoklast inhibe edici faktör) ve IL-18 önemlidir (18,19).

Osteoblastlardan gelişen kemik yüzey hücrelerinin kontrakte olarak üzerini kapladıkları kemik mineral yüzeyini açtıkları ve osteoklastların açtıktaki kemik yüzeyine yapışarak kemik yıkımını başlattıkları kabul edilmektedir. Kemik yıkımında ilk basamak, osteoklastın kemik yüzeyine yapışması ve fırçamsı kenarın oluşmasıdır. Osteoklastın kemik yüzeyine yapışması, integrinler olarak isimlendirilen transmembran adhezyon reseptörleri aracılığıyla olur. Osteoklastların kemik yıkım yeteneği kalsitonin, PTH, 1-25 (OH)₂ Vit D3 başta olmak üzere çeşitli sistemik hormonlar ve lokal faktörlerin yoğun denetimi altındadır (18,20)

Son yıllarda kemik yapım ve yıkımı üzerine yapılan çalışmalarda osteoblast ile osteoklast ve onların ana hücreleri üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu hücrelerin doğrudan kendileri veya işlevleri üzerine etkili olabilecek

maddeler araştırılmaktadır. Kemik üzerine etkili lokal büyüme faktörleri ve sitokinler (Tablo 5) ile sistemik faktörler (Tablo 6) aşağıda gösterilmiştir (21).

Tablo 5: Kemik üzerine etkili lokal büyüme faktörleri ve sitokinler

1. Kemik yapımını uyarıcılar

- İnsülin benzeri büyüme faktörü
- Transforme edici büyüme faktörü β
- Fibroblast büyüme faktörleri
- Platelet kaynaklı büyüme faktörü
- Endotelial büyüme faktörü
- Kemik morfogenetik proteinler

2. Kemik yıkımını engelleyenler

- İnterferon γ
- İnterlökin-4

3. Kemik yıkımını uyarıcılar

- İnterlökin 1, 6, 8, 11
- Tümör nekroz faktörü
- Epidermal büyüme faktörü
- Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
- Fibroblast büyüme faktörü
- Lösemi inhibitör faktörü
- Makrofaj / Granülosit koloni stimüle edici faktör

Tablo 6: Kemik hücre işlevlerine etkili sistemik faktörler

- Paratiroid hormon
- Kalsitriol
- Kalsitonin
- Büyüme hormonu (GH), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve II)
- Glukokortikoidler
- Tiroid hormonları
- Seks hormonları (östrojen ve androjenler)

Yapılanma / Yeniden Yapılanma (Modeling / Remodeling)

Kemik dokusu, genel kanının aksine metabolik olarak aktif bir organdır. Yaşamın değişik dönemlerinde farklı ihtiyaçları karşılayabilecek adaptasyon için sürekli yeniden yapılanma içindedir. İskelet, büyüme ve gelişme süresince henüz epifizlerin açık olduğu yaşamın ilk 20 yılında şeklini ve büyüklüğünü kazandığı bir yapılanma (modeling) süreci geçirir. Erişkin olgun iskelette de, ağır egzersiz gibi biyomekanik strese cevaben yapılanma olabilir de ilerleyen yaşla birlikte bu kapasite azalır. Yapılanma kırık iyileşme işleminin bir parçası olarak ta ortaya çıkabilir. İlerleyen yaşlarda iskelet sisteminde eski kemiğin yeni kemik ile değiştiği yeniden yapılanma (remodeling) süreci ortaya çıkar. İlk önce osteoklastlar aktive olur ve rezorpsiyon gerçekleşir. Bu süre 10 gün kadardır. Bunu osteoblastların aktive olması izler ve yeni kemik yapımıyla hasar giderilir. Bu süreç ortalama 3 ay sürer. Bu fonksiyon ile erişkin iskeleti 10 yılda yeni yapılan kemik ile değiştirilir. Bunun yanında yeniden yapılanma aşırı yük binen, deforme olan ve yaşlılığa bağlı tahribata uğrayan kemiklerin tamiri için de gereklidir (18,19,22).

II.1.5. Osteoporoz Patogenezi

Osteoporoz genetik, fiziksel, hormonal ve nutrisyonel faktörlerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Osteoporozda kemik yıkımının yapımdan daha fazla olması ile kemik mineral dansitesinde ve trabeküler kemik hacminde azalma olur. Kemik normal yapısında azalma olması ile kemik mekanik özelliklerinde bozulma ve kemik kırık riskinde artış ortaya çıkar. Kemik mikroyapısının bozulmasının mekanizması tam açıklanamamıştır. Osteoporoz bir çeşit kemik atrofisi olarak düşünülebilir. Kemik yapısında azalma olduğu halde mineral/kollajen oranı değişmez. Bu durum, özellikle mineral yapının kollajene göre azaldığı osteomalazi ile olan en önemli farkıdır (19,23).

Doruk Kemik Kütlesi: Bir bireyin normal büyüme sonrası elde ettiği maksimum kemik kitlesidir (24). Doruk kemik kitlesine, kadın ve erkekler 18-35 yaş arasında ulaşır. Kemik kütlesi bir süre korunur, daha sonra ise yavaş yavaş kemik kaybı başlar. Kadınlarda erken postmenapozal dönemde kemik kaybı hızlanır (25). Bireyin doruk kemik kitlesi daha çok genetik olarak baştan belirlenmiştir ancak beslenme, mekanik yüklenme ve çevresel faktörler de önemlidir (26). İkizlerde yapılan çalışmalarda genetik faktörlerin kemik mineral dansitesi üzerinde yaklaşık %80 oranında etkili olduğu ileri sürülmüştür (27). Düşük kemik mineral dansitesine osteokalsin, tip I kollagen metabolizmasında yer alan genler ile vitamin D ve östrojen reseptör genlerindeki polimorfizm neden olabilir (28,29). Doruk kemik kütlesinin düşüklüğü, bireyin kırık riskini artırır ve kaçınılmaz olan yaşa bağlı kemik kaybına karşı kemiğin yedek gücünde azalma yapar. Osteoporozdan korunmada birincil koşul, genetik şifrenin olanak tanıdığı ölçüde doruk kemik kütlesinin yüksek bir değere çıkarılabilmesidir.

Nutrisyonel faktörlerden yeterli kalsiyum alımı en önemlisidir. Normal iskelet gelişimi ve idamesi için yeterli kalsiyum alınmalıdır. Çocuklarda ve adölesanlarda genel ortalama kalsiyumdan daha fazla diyetle kalsiyum alınımı doruk kemik kitlesinde artışa yol açmıştır. ABD’de 11-18 yaşları arasındaki bayanlara diyetle 1200 mg/gün kalsiyum tüketmeleri önerilmektedir. Bazı çalışmalarda bu doz iskelette kalsiyum birikimi için yeterli bulunmadığından son yıllardaki bir konsensus raporuna göre 1400-1500 mg/gün kalsiyum tüketilmesi önerilmektedir. Diyetle kalsiyum yanında yeterli D, B6, B12 ve K vitaminlerinin alınması da doruk kemik kitlesi için önemlidir (30).

Adölesanlarda yeterli fiziksel egzersiz yapanlarda kemik dansitesinin artmış olduğu saptanmıştır (31). Sporcularda dominant kol ve ayaklarda diğer ekstremitelere göre kemik dansitesi yüksek bulunmuştur (32). Diğer yandan kilo verdiren veya bayanlarda over fonksiyonlarında bozukluğa yol açan aşırı egzersizin kemik dansitesinde azalmaya yol açtığı bildirilmiştir. İskeletin normal gelişimi için hipofiz, adrenal bez, tiroid ve gonad gibi

endokrin dokuların normal çalışması gereklidir. Son zamanlarda gelişmiş batı toplumlarında genç bayanlarda yeme bozuklukları ve bunun sonucu gelişen gonadal disfonksiyon önemli bir problemdir. Alkolizm, sigara ve kötü beslenme de doruk kemik kitlesinin düşük olmasına yol açmaktadır. Hipertiroidi, hiperparatiroidi ve hiperkortizolizm (endojen veya egzogen) gibi sistemik hastalıklar da yetersiz kemik kitlesi oluşumuna yol açar (33,34).

Kemik Kaybı: Yetişkin iskeleti sürekli yeniden yapılanma içindedir. Kemik homeostazı hormonal ve mekanik faktörlerin kontrolünde olan kemik yapımı ve yıkımı arasındaki denge ile idame ettirilir. Kemiklerin yeniden yapılanması kalsiyum dengesini ve mikroskobik fraktürlerin tamiri ile kemiklerin yük taşıma kapasitesinin idamesini sağlar (34). Bayanlarda ve erkeklerde yaşlanmanın doğal bir sonucu olarak doruk kemik kitlesi oluştuktan sonra kemik kitlesinde zamanla azalma olur. Erkek ve premenapozal bayanlarda kemik kaybı yavaş olur. Bunun nedeni, yaşın ilerlemesi ile osteoblastlarda yeni kemik matriks sentezinin azalması, trabeküler plaklarda ve kortikal kemikte incelmeye gözlendiği (35,36). Yaşlanmayla oluşan osteoporoz tip II osteoporoz olarak tanımlanır. Bu tip osteoporozda yetersiz kemik oluşumunun yanında yaşlanmayla kalsiyum emiliminin azalması ile gelişen sekonder hiperparatiroidi de kemik turnoverını artırır. Hücresel düzeyde kemik yapımında defekt olması nedeniyle turnoverın artması ile kemik kaybı artar (37). İlerleyen yaşa bağlı olarak barsaklarda $1,25 (OH)_2$ vitamin D3 reseptörlerinin konsantrasyonlarının azalması ile D vitaminine direnç gelişir ve kalsiyum emilimi azalır (38). Bunların yanında yaşla birlikte büyüme hormonunda ve IGF-1'de azalma sonucu kalsiyum metabolizması ve kemik turnoverında değişiklikler olur (39). Yaşlanmada bu değişikliklerin yanında nutrisyonel yetersizlikler ve fiziksel inaktivite de kemik metabolizmasını etkiler.

Bayanlarda menapoz sonrası kemik kaybında bir hızlanma olmaktadır. Östrojen yetersizliği sonucu kemik döngüsü artmakta ve kemik yıkımının yapımından daha fazla olması nedeniyle kemik kitlesinde azalma olmaktadır. Overlerin fonksiyonlarını kaybetmesi ile kemik iliğinde osteoklast

ve osteoblast öncü hücreleri farklılaşmaya başlar ve kemik dokusundaki temel multisellüler ünite sayısında artış olur. Bu ünitelerde kemik yıkımı yapımından fazla olur. Trabeküler kemik dokusu yüzey alanının geniş, yapısının ince olması nedeniyle kemik turnover artışından kortikal kemiğe göre daha fazla etkilenir. Trabeküler kemikte bu deformasyon kemiğin biyomekanik özelliklerinde değişikliğe ve kemik gücünde kemik dansitesinden daha fazla azalmaya yol açar (40,41). Östrojen, kemik iliğinden ve kemik hücrelerinden sitokin ve büyüme faktörleri salgılatarak yeniden yapılanmayı etkiler. Östrojen yetersizliği IL-1 ve TNF' lerde artışa yol açarak kemik kaybını arttırır (42). Postmenapozal osteoporoz tip I osteoporoz olarak isimlendirilir. Tip I osteoporozda parathormon salınımında, $1,25(OH)_2D_3$ sentezinde ve kalsiyum emiliminde azalma karakteristiktir (37). Postmenapozal osteoporozda menapozdaki östrojen eksikliği dışında başka faktörler de muhtemelen rol oynamaktadır. Bu faktörler arasında osteoblastlarda rezorpsiyondan daha fazla kemik yapımının olmaması, bazı sitokinlerin salınımında genetik eksiklikler sayılabilir (43,44,45).

II.1.6. Osteoporoz Kliniği

Osteoporoz başlangıçta herhangi bir şikayete neden olmayabilir. Osteoporozu olan hastalar kemik ağrılarında yakınabilirler. Kemik ağrı mekanizması halen tam açıklığa kavuşmamıştır. Kemik ağrılarının oluşumunda periost ile eklemler çevresindeki nosiseptörlerin mekanik ya da kimyasal uyarımının sorumlu olduğu düşünülmektedir. Osteoporoz, kırık oluşmadığı sürece genellikle belirtisizdir (46).

Osteoporotik kırık insidansı, yaşla birlikte artış göstermekte olup; beyaz ırkta zencilerden, kadınlarda erkeklerden yüksektir. Kadın-erkek oranı kolles kırığında yaklaşık 1,5:1, vertebra kırıklarında 7:1, femur üst uç kırıklarında 2:1 kadardır. Tip I osteoporozda en sık vertebral ve distal radius, Tip II osteoporozda ise femur üst ucunda kırıklar oluşmaktadır. Distal radius ve

femur üst uç kırıkları, çoğunlukla düşme sonucu oluşurken vertebra kırıkları spontan veya eğilme, doğrulma, ağırlık kaldırma gibi günlük yaşam aktiviteleri sırasında gelişebilir (47).

Çoğu vertebra dışı kırık, klinik olarak belirgin olup morbiditeye yol açarken, vertebral kırıklarda kırığın varlığının veya yokluğunun tanımlanmasında güçlük olabilir. Semptom verdiklerinde ise genellikle akut sırt ağrısına neden olurlar. Vertebra kırıklarının çoğu orta ve alt torakal ile üst lomber vertebralarda (T8-L3) oluşur ve ağrısı dermatomal yayılım gösterir. Vertebra kırıkları santral, kama şeklinde veya kompresyon kırığı olabilir. Her kompresyon kırığı, boyda yaklaşık 1 cm kısaltmaya neden olur. Multipl kırıkları olan olgularda boyda 10-20 cm'lik kısaltmalar oluşabilir ve tipik Dowager' s (yaşlı kadın) kamburu gelişir (46).

Femur üst uç kırıkları ise en ciddi osteoporotik kırıklardır. Femur boyun kırığı ve trokanterik kırık olmak üzere iki tip kalça kırığı gözlenir. Femur üst uç kırıkları, tipik olarak ayaktaki pozisyondan düşme sonucu oluşur. Ancak spontan olarak da oluşabilir, genellikle ağrılıdır. Femur üst uç kırıkları daima yataklı tedavi gerektirir, bu kırıklara bağlı bir yıl içindeki ölüm riski %12-40 arasındadır (46).

II.1.7. Osteoporoz Tanısında Kullanılan Yöntemler

Osteoporoz tanısında anamnez ve fizik muayene bulgularının yanısıra görüntüleme ve laboratuvar yöntemlerinin ve histomorfometrik değerlendirmenin de önemli yeri vardır. Görüntüleme yöntemleri, osteoporozun derecesini ve kırık riskini belirleme, kemik kayıp hızını ve uygulanan tedavinin etkinliğini değerlendirme gibi genel amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır.

II.2.1.7.1 Görüntüleme Yöntemleri

- Konvansiyonel radyografi

- Dual enerji X-ray absorbsiyometresi (DEXA)
- Tek enerji X-ışın absorbsiyometresi
- Radyografik absorbsiyometresi
- Tek foton absorbsiyometresi
- Çift foton absorbsiyometresi
- Tek enerji kantitatif komputerize tomografi
- Çift enerji kantitatif komputerize tomografi
- Periferik kantitatif komputerize tomografi
- Kantitatif ultrason
- Manyetik rezonans görüntüleme
- Nötron aktivasyon analizi
- Çift X-ışını+laser (DXL)

Günümüzde kullanılan bu çok çeşitli görüntüleme yöntemlerinin her birinin birbirine karşı kolay uygulanabilirlik, doğruluk, maruz kalınan radyasyon dozu ve maliyet yönünden farklılıkları bulunmaktadır (4). Günümüzde en çok kullanılan iki yöntem olan konvansiyonel radyografi ve DEXA'dan kısaca bahsedilecektir.

Konvansiyonel Radyografi

İskelet sisteminde kolaylıkla uygulanabilir, metabolik kemik hastalıklarının özellikleri ve morfolojik değişiklikleri hakkında fikir verir ve fraktürlerin yerini belirler. Yumuşak doku görüntüsü, ışın sertliği ve film özellikleri gibi nedenlerle kemik yoğunluğunun değerlendirilmesinde hassasiyeti çok azdır. Kemik kaybı % 25-30'a vardıktan sonra ancak radyolojik olarak belirlenebilir. Osteoporozda rutin olarak, torakal ve lumbosakral vertebraların anteroposterior ve lateral grafileri, pelvisin anteroposterior grafisi çekilmelidir (4).

Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometresi (DEXA)

DEXA yöntemi günümüzde osteoporozun tanı ve izleminde altın standart olarak kabul edilen bir yöntemdir. DEXA yöntemiyle tüm vücut kemik mineral yoğunluğu ölçümleri yapılabildiği gibi, tek tek vertebralar, femur proksimali ve önkol değerlendirilebilir. Omurgada standart olarak L1-L4 arası vertebralar seçilir. Özellikle vertebra kırıklarının varlığında lateral çekimler de yapılabilir. Femurda ise femur boynu, büyük trokanter, intertrokanterik alan ve Wards üçgeninin ayrı ayrı değerlendirilmesi mümkündür. Çekimler standart cihazlarla hasta lateral dekübit pozisyonunda yatırılarak veya hastanın yattığı masanın etrafında 90° dönebilen C-kollu tarayıcılar ile gerçekleştirilebilir.

DEXA ölçümlerinde vücut, yumuşak doku ve kemik olmak üzere iki kısım olarak kabul edilir. Yumuşak dokudan kaynaklanan bazı değişkenler kemik yoğunluğu ölçümlerini etkiler. Tüm yumuşak dokular içinde en fazla yağ dokusunun miktarı ve dağılımı ölçümler üzerinde etkili olmaktadır. DEXA'da yalancı negatif sonuçlar da elde edilebilir. Bu duruma sıklıkla osteofitler, hiperostoz, aort kalsifikasyonları, yumuşak doku kalsifikasyonları, skolyoz, metal implantlar ile vertebranın kırıkları yol açar.

Hidroksiapatite karşılık gelen kemik yoğunluğunu yansıtan ve g/cm^2 cinsinden verilen kemik mineral yoğunluğunun normal değerleri, yaş grupları ve cinse göre ayrı ayrı belirlenmiştir. Ancak bu değerlerin boy ve kiloya göre ayarlanması gerekir. DEXA ile yapılan ölçümlerde iki karşılaştırma parametresi kullanılır. Bunlardan Z skorlaması ölçüm bölgesinin kemik yoğunluk değerleri ile aynı yaş ve cinsteki normal popülasyonun ortalama değerlerinin standart sapma cinsinden hesaplanan miktarları arasındaki farkı gösterir. Diğer karşılaştırma parametresi ise T skorlamasıdır. Bu skorlama, ölçüm bölgesinin kemik yoğunluk değerleri ile 20-35 yaş arası, aynı cins ve ırktaki normal popülasyonun ortalama değerlerinin standart sapma cinsinden hesaplanan miktarları arasındaki farkı gösterir. Bu değerlere göre -2 SD'lik bir değer fraktür eşiği olarak önerilmektedir (48,49,50).

Kemik mineral yoğunluğu ölçüm endikasyonları:

a. Osteoporoz için güçlü risk faktörlerinin bulunması

- Erken menapoz (45 yaşından önce)
- Primer hipogonadizm
- Primer hiperparatiroidizm
- Uzun süreli steroid tedavisi
- Kronik böbrek yetmezliği
- Uzun süreli immobilizasyon

b. Geçirilmiş olan kalça, omurga ve el bileği kırığı öyküsü

c. Radyolojik osteopeni ve vertebral anomali bulunması

d. Kemik kaybı ve tedavinin etkinliğini izlem (50).

II.1.7.2. Biyokimyasal Markırlar

Kemik döngüsü, osteoblastlar ve osteoklastların enzimatik aktivitelerinin ve yapım-yıkım sırasında dolaşıma geçen kemik matriksi elemanlarının ölçülmesiyle değerlendirilir. Kemik döngüsünün biyokimyasal belirleyicileri, osteoporoz patogenezinin değerlendirilmesinde, hızlı kemik kaybı olan ve osteoporotik kırık riski taşıyan hastaların saptanmasında, bireysel olarak erken hastalık tanısı konulması, tedaviye yanıtların değerlendirilmesi ve ilaçların etkinliğinin izlenmesinde kullanılır (51).

İnvaziv olmamaları, kemik yapım ve yıkım dinamikleri hakkında yeterli bilgi vermeleri, kemik metabolizmasındaki akut değişiklikleri hemen saptayabilmeleri ve kolaylıkla tekrarlanabilir olmaları avantajlı yönlerini oluşturur. Sadece yapım ve yıkımdaki net değişiklikleri yansıtmaları, trabeküler ve kortikal kemik gibi özel iskelet bölgelerindeki döngü değişikliklerini ayırt edememeleri ve teknik kısıtlanmalar ise en önemli dezavantajlarıdır (52).

II.1.7.2. 1. Kemik Yapım Markırları

Alkalen Fosfataz (ALP)

ALP yaygın formu hücre membranı ile ilişkili bir enzim olup, 4 izoenzimi vardır: bunlar plasental, intestinal, germ hücre kökenli ve dokuya spesifik olmayan formlar. Dokuya spesifik olmayan form karaciğer, böbrek ve kemiği de içeren birçok dokudan salgılanır. Normal erişkinlerdeki serum seviyelerine, en fazla kemik ve karaciğer izoenzimleri katkıda bulunur. Barsak izoenzimleri tokluk kan örneklerinde gözlenir. Plasental ALP izoenzimi ise hamilelik döneminde dolaşımda bulunmaktadır. Total ALP, pirofosfatı hidrolize ederek yeni sentezlenen osteoid dokuya hidroksiapatit kristallerinin yerleşmesini sağlar. ALP, yıllarca kemik yapımının tek uygun belirleyicisi olarak kullanılmıştır, ancak total ALP'nin sensitivite ve spesifitesi sınırlıdır çünkü kemik izoformu total ALP aktivitesinin sadece %40'ına katkıda bulunur. (51,53).

Kemiğe Spesifik Alkalen Fosfataz

Total ALP içindeki kemik izoenziminin ayrılması için; selektif denatürasyon, kinetik aktivitenin kimyasal inhibisyonu, elektroforetik ayırıştırma, presipitasyon ve immun yöntemler olmak üzere çeşitli metodlar tanımlanmıştır. Bunların içinden immunoradyometrik (IRMA) ölçümlerin en iyi yöntem olduğu ileri sürülmektedir. Kemiğe spesifik ALP; paget hastalığı, osteomalazi, primer hiperparatiroidi, osteodistrofi, osteoporoz ve kemik metastazlı hastalarda değerli bilgiler verir (54).

Osteokalsin (OK)

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kemik glia proteini olarak da adlandırılır. Kemik matriksinin kollajen olmayan en önemli proteindir. Osteokalsin, üç gamma-karboksiglutamik asit kalıntısı taşır. Bunlar, osteokalsinin hidroksiapatite bağlanmasını ve kemik matriksinde kalmasını sağlarlar. Osteokalsin kemik dokusu ve dentin için spesifiktir

ancak kesin fonksiyonu bilinmemektedir. Kemik matriksinde depolanmasına rağmen, serumda da önemli miktarlarda mevcuttur, ancak dolaşımdaki osteokalsinin yarı ömrü kısadır. Glomerüler filtrasyon ile hızla temizlenir ve idrarda büyük miktarlarda osteokalsin fragmanları tesbit edilebilir. Serum konsantrasyonları böbrek fonksiyon bozukluklarında artar (51).

Serum osteokalsin düzeyleri, pubertede, hızlı iskelet gelişimi sırasında, hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, kırıklar, renal osteodistrofi gibi kemik turnoverının arttığı durumlarda genellikle yüksektir. Postmenapozal dönemde ise; düşük kemik turnoverı olan hastalarda düşük veya normal olabilirken, kemik turnoverı yüksek olan hastalarda genellikle artmıştır. Serumda osteokalsin ölçümleri radyoimmün, kemiluminesan veya immunometrik yöntemlerle yapılmaktadır.

Osteokalsin düzeyleri sirkadiyen değişkenlik gösterir. Seviyeleri gece yükselir, gündüz düşer, öğleden sonra ise % 50'ye yakın düşüşler saptanmıştır. Bu sorunların ortadan kaldırılması için 24 saatlik idrarda osteokalsin fragmanlarının ölçülmesi önerilmektedir. Osteokalsin çalışılacak plazma örnekleri buz üzerinde laboratuara ulaştırılmalı ve 1 saat içinde çalışılmalıdır. Eğer hemen çalışılmayacaksa en geç bir saat içinde dondurulmalıdır (55).

Prokollajen Peptidler

Tip I kollajen kemik organik matriksinin %90'ını oluşturur ve prokollajen prekürsör molekülü olarak sentez edilir. Prokollajen molekülü amino- ve karboksi- terminal uzantıları taşır. Prokollajen karboksi terminal propeptid (PICP) ve aminoterminal propeptid (PINP) olarak bilinen bu peptidler yeni kollajen sentezinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedirler.

PICP zincir içi disülfid bağları ile stabilize edilmiştir, ayrıca molekül ağırlığı yaklaşık olarak 100.000 kDa kadardır. Bu yüzden glomerülden filtre edilemez ve renal fonksiyonlardan etkilenmez. Hepatik endotelial hücrelerden mannoz reseptör yoluyla uzaklaştırılmaktadır. PICP

immunassay yöntemler ile güvenle ölçülebilir. PICP ölçümlerinin histomorfometrik incelemelerle korelasyon gösterdiği bildirilmektedir (51).

PINP serumda iki majör komponent halinde (100- ve 30- kDa) bulunur. Küçük molekül bir degradasyon ürünüdür. Yeni immunassay yöntemler sadece sağlam molekülün kemik oluşumundaki değişiklikleri fark etmede yeterli olduğunu göstermiştir. PINP ölçümleri, henüz histomorfometrik incelemeler ve kalsiyum kinetik çalışmaları ile karşılaştırılarak geçerlilik kazanmamıştır (51).

Osteoproteogerin (OPG)

1997 yılında tanımlanmış ve kemik üzerine koruyucu etkisinden dolayı bu şekilde adlandırılmıştır. Solubl tuzak reseptör olarak kabul edilir, çünkü RANK (reseptör aktivator of nuclear faktor kappa)'ın RANKL (Reseptör Aktivator Of Nuclear Faktor Kappa Ligand)'a bağlanmasını engelleyerek osteoklastların proliferasyon ve aktivasyonunu engeller. OPG, transmembran alan içermeyen homodimerizasyon için gerekli 21 aminoasitlik sinyal peptidi, 4 karakteristik sistein yalancı tekrar grubu ile 401 aminoasitten oluşan salgılanmış bir TNRF (tümör nekrotize edici faktör reseptörü)'dir. OPG birçok hücre tarafından eksprese edilebilir. OPG gen promotörü, osteoblastik transkripsiyon faktörü olan faktör cfba-1 için 12 bağlanma bölgesi içerir (56).

OPG, invitro ortamda RANKL'in etkisine zıt etki gösterir. Bu etkiler arasında osteoklastik prekürsör hücrelerin füzyonu, farklılaşmanın inhibisyonu ve osteoklast apoptozisinin ilerlemesi sayılabilir. İn vivo olarak OPG gen delesyonu yapılmış ratlarda RANKL'in etkilerinin karşılanamamasından dolayı immun yetmezlik ve şiddetli osteoporoz meydana gelmiştir. RANKL/OPG sistemindeki dengesizlikler; Paget hastalığı, kemik tümörleri, postmenapozal osteoporoz, romatoid artrit, kemik metastazları ve hiperkalsemiyle ilişkili olabilir (56).

II.1.7.2. 2. Kemik Yıkım Markırları

Tartarata Dirençli Asit Fosfataz

Asit fosfataz primer olarak kemik, prostat, trombosit, eritrosit ve dalakta olmak üzere birçok dokuda bulunan lizozomal bir enzimdir. Kemikte ise hem osteoblast, hem de osteoklastlarda mevcuttur. En az altı izoenzimi vardır. Bu farklı izoenzimler elektroforetik metodlar ile ayırt edilebilmektedir (57).

Asit fosfatazların iki formu osteoklastlarda gösterilmiştir. Büyük izoenzim tartarata duyarlı, 34 kDa'luk küçük izoenzim tartarata dirençlidir. Tartarata dirençli asit fosfataz (TRACP)'ın osteoklastların kıvrımlı kenarlarında yüksek miktarlarda bulunduğu ve kemik rezorpsiyonu sırasında salındığı gösterilmiştir. TRACP'nin osteoklast dışında makrofaj, eritrosit ve lökositlerde de bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, immobilize hastalarda, artmış kemik döngüsüyle birlikte olan Paget hastalığı ve çeşitli metabolik kemik hastalıklarında, yüksek TRACP düzeyleri bildirilmiştir (51,57). TRACP, matriks yıkım ürünleri ya da tip I kollajenin telopeptidleri gibi biyokimyasal belirleyiciler kadar spesifik değildir ve rutin kullanım için fazla önerilmemektedir.

Hidroksiprolin (OHP)

Hidroksiprolin, kollajenin yapısında bulunur ve kollajen aminoasit içeriğinin %13'ünü oluşturur. Peptid zinciri içinde posttranslasyonel hidroksilasyon ile oluşur. Kollajen yıkıldığında OHP tekrar kullanılmaz, kollajenin parçalanması ile OHP dolaşıma geçer. Dolaşıma geçen OHP'in yaklaşık %80'i karaciğerde metabolize olur. İdrar OHP'i ise ya serbest aminoasit olarak, ya da proteine bağlı formda bulunur. Adolesan büyüme sırasında, paget hastalığı, hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, multipl myeloma veya metastatik kemik hastalıkları gibi kemik döngüsünün arttığı durumlarda, idrarda OHP / kreatinin oranı yükselir. Kalsitonin, bifosfonatlar ve östrojen gibi kemik yıkımını azaltan ilaçlar kullanıldığında idrar OHP /

kreatinin oranı düşer. Klinik açıdan, idrarda OHP atılımı, kemik yıkımıyla aynı yönde değişiklik göstermektedir.

OHP, kemikte bulunan Tip I kollajene spesifik değildir. İskelet dışı dokulardaki tüm kollajenlerde de mevcuttur. Ayrıca, barsaktan kollajen içeren gıdalardan da salınır. Son zamanda daha spesifik ve duyarlı yöntemler bunun yerini almaktadır (51).

Hidroksilizin Glikozidler

Hidroksilizin, primer olarak kollajen ve kollajen benzeri peptidlerde bulunan bir aminoasittir. Kollajen yıkımı sonucu, galaktozil-hidroksilizin (GHYL) ve glukozil-galaktozil-hidroksilizin (GGHYL) halinde idrarla atılır. Hidroksilizin glikozidler tüm kollajenlerde bulunmalarına karşın kemik dokusunda GHYL oranı oldukça yüksektir. Kemikte yüksek konsantrasyonda GHYL varsa bunun ekskresyonunun hidroksiprolin göre daha spesifik olduğu ileri sürülmektedir (51). Erken postmenapozal dönemde idrar GHYL atılımı ile kemik mineral yoğunluğu arasında ilişki gösterilmiştir (58). GHYL, kemik yıkımının sensitif bir markırı olmasına karşın, halen kullanımı yaygınlaşmamıştır, sadece araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır.

Piridinolin Çapraz Bağları

Piridinolin (PD) ve deokspiridinolin (DPD), olgun kollajende bulunan ve indirgenemeyen çapraz bağlardır. Kemik yıkımı sonucu olgun kollajenden salınırlar. PD ve DPD %40-50 serbest olarak, %50-60 ise peptide bağlı çapraz bağlar olarak idrarla atılırlar. Biyolojik sıvılardaki PD ve DPD'nin önemli bir kısmı kemikten kaynaklanmaktadır. Ölçümler için HPLC ve immün yöntemler kullanılmaktadır. PD serum ve idrardan, DPD ise yalnızca idrardan bakılabilmektedir. PD ve DPD kreatinin klirensi ile korele olduğundan bu yıkım markırlarının düzeyleri idrar kreatinine göre düzeltilmelidir (51). Osteoporotik hastalarda, HPLC ile ölçülen idrar PD ve DPD düzeyleri, stronsiyum kinetikleri ile ölçülen kemik yıkımı ve kemik histomorfometrisi ile büyük bir korelasyon göstermiştir (59). Postmenapozal

osteoporoz teşhisinde kemik yıkım markırları yapım markırlarından daha değerlidir. DPD ve PYD düzeyleri; postmenapozal osteoporotik grupta, postmenapozal non-osteoporotik grup ve premenapozal non-osteoporotik gruba göre daha yüksek bulunmuştur, kemiğe spesifik ALP ve osteokalsin ise postmenapozal osteoporoz ayrımının yapılmasında yeterince etkin bulunmamıştır. (53).

Tip I Kollajenin Telopektidleri

Tip I kollajen, kemiğin organik matriksinin %90'ından fazlasını temsil eder. Tip I kollajen heliks şeklinde bir proteindir. Molekül uçlarındaki aminoterminal (NTx) ve karboksiterminalleri (CTx) ile çapraz bağlantı yapar. Kemik yıkımı sırasında çapraz bağların %40'ı serbest piridinyum, geri kalan %60'ı peptide bağlı çapraz bağlar olarak salınır (51).

Bu grupta üç biyokimyasal belirleyici vardır;

1. Tip I kollajenin aminoterminal telopeptidi (NTx-I), serum ve idrarda
2. Tip I kollajenin karboksiterminalleri (CTx-I), serum ve idrarda
3. Tip I kollajenin metalloproteazdan kaynaklanan karboksiterminalleri (ICTP), sadece serumda

Tip I kollajenin telopeptidleri, kemik rezorpsiyon oranını gösterir. Klinikte kemik mineral yoğunluğundan bağımsız olarak kemik kaybını ve kırık riskini belirlemek için kullanılır. Ayrıca, osteoporozda antirezorptiflerle tedavide, erken etkinliği izlemede, tedaviye alınacak hastaların saptanmasında değerli bilgiler verir (51).

Antirezorptiflerle tedavi edilen hastalar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda 3 ay sonunda idrar NTx düzeylerinde, kalsitoninle %20-30, östrojenle %35-50, alendronatla %50'den fazla, alendronat ve östrojen kombinasyonunda ise %50'den çok fazla düşüş saptanmıştır. Serum NTx düzeylerinde ise bu azalma daha azdır. Östrojenle tedavide %24.4, alendronat tedavisinde ise %28.4 olarak bulunmuştur. Bu tedavilerden sonra maksimum etki 3-6 ay içinde elde edilmektedir (60,61,62,63). ICTP (CTx-MMP)'nin doku spesifitesi ve klinik önemi halen tam açıklanamamıştır.

RANKL (Reseptör Aktivator Of Nuclear Faktor Kappa Ligand)

RANKL, OPG için ligand araştırmalarında keşfedilmiştir. TNF-ligand ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır. Üç izoformu vardır;

1. RANKL 1: 316 aminoasitlik hücreye bağlı bir peptid.
2. RANKL 2: 140 veya 145. pozisyonlardan TNF- α konverting emzim benzeri proteazla kısaltılmış ektodomain.
3. RANKL 3: Primer sekrete form.

Bu izoformlardan RANKL1 ve RANKL2 transmembran formlardır. RANKL3 ise transmembran bölüme sahip değildir, solubl RANKL (sRANKL) olarak bilinir, serumda ölçülebilen formdur. RANKL1 ve RANKL2 çok çeşitli hücreler tarafından eksprese edilirken, sRANKL aktive edilmiş T hücreleri ve squamöz hücreli karsinomlardan salgılanır.

RANKL selüler bir reseptördür. Kemik metabolizması üzerine OPG ile ters etki gösterir. Matür osteoklast oluşumu için ana stimölan faktördür. Osteoklastların yaşaması için gereklidir. RANKL seviyesi arttığında kemik rezorpsiyonu artar. RANKL'ın parenteral uygulanmasından sonra farelerde artmış osteoklast oluşumu ve aktivasyonu, masif osteoporoz, hayatı tehdit eden hiperkalsemi gözlenmiştir. Diğer yandan RANKL gen delesyonu yapılmış farelerde, osteoporozla zıt bir fenotip ve olgun osteoklastların yokluğuna bağlı olarak bozulmuş diş oluşumu gözlenmiştir (64).

Üriner GGT (γ -Glutamil Transferaz)

Xenopus oocyte expression klonlama tekniği kullanılarak yeni kemik rezorbe edici sitokinler tesbit etmek için yapılan bir araştırmada; son olarak osteoklastojenik bir faktör olarak γ -glutamiltransferaz (GGT) belirlenmiştir. Genetik fare modelleri ve insan denekleri kullanılarak, üriner GGT'nin kemik rezorpsiyonu için potansiyel bir marker olup olmadığı araştırılmış ve tahmin edilmeyen bir biçimde üriner GGT aktivitesi, serumdakinden farklı olarak kemik rezorpsiyonu ile korele bulunmuştur. Üriner GGT atılımının kreatinin ile düzeltildikten sonra OPG null osteoporotik farelerde ve osteoporozlu hastalarda arttığı gösterilmiştir. Alendronat tedavisi ile DPD, NTx azalırken,

üriner GGT atılımı da azalmıştır. DPD 7.6 nmol/mmol Cr düzeyi üzerindeki hastalardaki osteoporozda üriner GGT atılımı cut off 40IU/g Cr olarak tanımlandığında; sensitivitesi %61, spesifitesi %92 olarak bulunmuştur (65).

II.1.8. Osteoporoz Tedavisi

Osteoporozun kontrolündeki ideal yöntem önlemdir. Bu nedenle adölesan dönemde 'doruk kemik kitlesi'nin en yüksek değere ulaşabilmesi ve daha sonraki yaşam dönemlerindeki 'kemik kaybı'nın en düşük düzeyde tutulması amaçlanmalıdır.

Osteoporozdan Korunmaya Yönelik Genel Önlemler;

1. Diyet (dengeli beslenme ve yeterli kalsiyum tüketimi),
2. Vitaminler (vit D),
3. Düzenli egzersiz,
4. Sigara içilmemesi, aşırı alkol tüketilmemesi,
5. Kırığa neden olabilecek kişisel ve çevresel risk faktörlerinin düzeltilmesi (görme bozukluğu vb.) (66).

Ancak osteoporoz geliştikten sonra uygulanacak tedavi yöntemleri de büyük önem taşımaktadır. Osteoporoz tedavisinde temel amaç; kırıkların önlenmesi, kemik mineral yoğunluğunun stabilize edilmesi veya artırılması, kırık ve iskelet deformitelerine bağlı belirtilerin iyileştirilmesidir. Osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçları; kemik yıkımını azaltanlar, kemik yapımını arttıranlar ve karışık etki gösteren ilaçlar olarak gruplandırmak mümkündür. (Tablo 7)

Tablo 7: Osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçlar

Kemik yıkımını azaltanlar	<ul style="list-style-type: none">- Östrojen (\pm progesteron)- Selektif östrojen reseptör modölatörleri (tamoksifen, raloksifen, levormeloksifen)- Kalsiyum- Kalsitonin- Bifosfonatlar (etidronat, klodronat, alendronat, risedronat, ibandronat)
Kemik yapımını uyarıcılar	<ul style="list-style-type: none">- Flor- Sodyum florür- Monoflorofosfat- Paratiroid hormon ve diğer peptidler
Karışık etki gösterenler	<ul style="list-style-type: none">-Anabolik steroidler (stanozolol, oksandrolon, nandrolon)- Vitamin D ve türevleri- Tiyazid diüretikleri- İpriflavon

Günümüzde osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçların büyük çoğunluğu kemik yıkımını azalttığı için 'antirezorptif' olarak isimlendirilir, ancak yeniden yapılanma ünitesinde yıkım ve yapım arasındaki eşleşme fenomeni nedeniyle yalnızca kemik yıkımı değil her iki işlem birden azalır. Bu nedenle antirezorptif (yıkımı azaltan) terimi yerine 'kemik döngüsünü baskılayan-yavaşlatan' ilaç teriminin kullanılması daha doğrudur. Bu gruptan bir ilaç uygulandığında yıkım birkaç haftada, yapım ise birkaç ay içinde azalır. Bu ilaçlar aktivasyon frekansını da azaltarak yeni oluşan yeniden yapılanma ünite sayısını ve sonuçta yeniden yapılanma boşluğunu azaltarak kemik kaybını azaltır. Yıkımın azalıp yapımın henüz azalmadığı dönemde yeniden yapılanma boşluğunun dolması sonucunda kemik mineral yoğunluğunda %5-10 oranında bir artış oluşur. Bu etki genellikle 2-3 yıl içinde gelişir. Daha

sonraki yıllarda kemik mineral yoğunluğundaki değişim çok azdır. Yapımı arttıran ilaçların uygulanması ile ilk 2-3 yılda kemik mineral yoğunluğundaki artış oranı antirezorptiflere benzer, ancak artış 2. yıldan sonra da bir ölçüde devam eder (67).

Kalsiyum

Vücuttaki toplam kalsiyumun %99'u kemikte bulunur. Serum kalsiyum konsantrasyonu, normal metabolizmanın korunması için belli seviyelerde tutulmak zorundadır. Bu denge, PTH, aktif vitamin D ve kısmen kalsitonin tarafından kontrol edilmektedir. Çocukluk, ergenlik, yetişkin dönemde besin ile yeterli kalsiyum alınımı, doruk kemik kütlesi için gereklidir. 51 yaş üzerinde 1200 mg/gün kalsiyum, 400-600 IU/gün vit D, besinlere ilave kullanılmalıdır (68). Osteoporoz tedavisi alan bireylere ek olarak kalsiyum ve D vitamini verilmesi tedavinin etkinliğini artırır. Postmenapozal kadınlarda kalsiyum desteği (500-2000 mg/gün), yıllık kemik kaybını ortalama %1 / yıl oranında azaltır (yıllık kaybın yarısı) (69).

Vitamin D

D vitaminleri, ergokalsiferol (vit D₂) ve kolekalsiferol (vit D₃)'ü içeren, yağda eriyen bir grup vitamindir. İnsanda vit D₃ ultraviyole etkisi ile deride sentezlenir. Vit D ayrıca diyetteki hayvansal (D₃) ve bitkisel (D₂) kaynaklı besinler aracılığıyla alınır. Karaciğerde 25. pozisyonda (25 OH vit D₃), böbrekte de 1. pozisyonda [1,25 (OH)₂ vit D₃] olmak üzere iki kez hidroksilasyona uğrayarak aktif forma döner. 1,25 (OH)₂ D₃ (kalsitrol), D vitamininin en aktif şeklidir ve böbrekte, barsakta, kemikte özel reseptörlere sahiptir. Kalsiyumun barsaktan emilimini artırır, böbrekten atılımını azaltır ve olasılıkla kemik mineralizasyonunda rol oynar (70).

Vitamin D desteği eve bağımlı, yeterli güneş ışığı görmeyen, dengeli beslenmeyen ve vitamin D direnci gelişmiş yaşlı bireyler için özel bir önem taşır. Yaşlılarda kalça ve diğer tip osteoporotik kırık riski yüksektir. Bu bireylerde yapılan vitamin D ve kalsiyum desteğinin kalça kırık riskini

azalttığı gösterilmiştir (71). Yaşlı bireyler için önerilen günlük vitamin D dozu 400-800 IU'dur. Günlük alıma uyum gösteremeyen olgularda ise sonbaharda bir kez 150000-300000 ünite IM enjeksiyon uygulanır.

Bifosfonatlar

Bifosfonatlar, kemik metabolizması hastalıklarının tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır. Kimyasal olarak (P-O-P) bağlarından oluşan pirofosfatların karbon atomu taşıyan analoglarıdır (P-C-P). Karbon atomunun hidrojenle yer değiştirmesi sonucu çeşitli bifosfonatlar sentez edilmiştir. Önceleri bifosfonatların etki mekanizmasının birincil olarak hidroksiapatit kristallerine bağlanmaları sonucu kemik yıkımına direnç oluşturdukları yönündeydi. Son yıllarda özellikle yeni geliştirilen güçlü bifosfonatların seçici olarak kemikte yoğunlaşarak osteoklast aktivitesini ve apoptozunu etkileyerek kemik yıkımını azalttığı gösterilmiştir (72).

Osteoporoz tedavisinde en sık kullanılan bifosfonatlar; alendronat, risedronat ve etidronattır. Klodronat ve pamidronat ta bazı ülkelerde kullanılmaktadır. Hiçbir bifosfonatın metabolize olduğu gösterilmemiştir. Bifosfonatların barsaktan emilim oranı verilen dozun %1-5'i gibi çok düşük bir düzeydir. Her tür yiyecek, kalsiyum ve diğer iki değerlikli katyon içeren içeceklerle birlikte alındığında ise bifosfonat bağlanacağı için emilim tümüyle engellenebilir. Bu nedenle oral yolla alınan bifosfonatlar aç karna ve yalnızca suyla içilmelidir. Bifosfonat tedavisi sırasında hastanın kalsiyum ve D vitamini gereksinimi de yeterli düzeyde sağlanmalıdır (73).

Kalsitonin

Kalsitonin, tiroid bezinin C hücrelerinden salgılanan 32 aminoasitten oluşan polipeptid bir hormondur. Osteoklastların uyardığı kemik rezorpsiyonunu durdurması esas fonksiyonudur. Etkisini adenilat siklazı aktive ederek gerçekleştirir. Serum iyonize kalsiyum seviyesi sekresyonunu kontrol eder. Parenteral veya nazal sprey şeklinde kullanımı vardır. Nazal kullanımda yan etki insidansı parenteral kullanıma göre oldukça düşüktür.

Kalsitonin muhtemelen spinal serotonerjik reseptör ekspresyonu seviyesinde değişim yaparak analjezik etki göstermektedir. Analjezik özelliği nedeni ile kalsitonin akut vertebral kırıklı semptomatik hastalarda, bifosfonatlara ve östrojene toleransı olmayan hastalarda önerilen bir tedavi şeklidir (74). Kalsitonin, geç postmenapozal osteoporoz, hiperkalsemi, paget hastalığı, immobilizasyon osteoporozu, sudeck atrofisi, glukokortikoide bağlı osteoporoz tedavilerinde onaylanmıştır. Randomize kontrollü çalışmalar, kalsitoninin kemik kayıp hızını erken postmenapozal dönemden çok, geç postmenapozal dönemde azalttığını ortaya koymaktadır (75).

Seçici Östrojen Reseptör Modülatörleri (SERM'ler)

Sentetik, steroid olmayan, östrojen reseptörlerine bağlanma özelliği gösteren bileşiklerdir. SERM'lere ilgi, bir ölçüde hormon replasman tedavisinin sınırlanmasıyla bağlantılıdır, zira hormon replasman tedavisinin uzun kullanımı sonucu yan etkilerinin artması (meme, uterus ca vb.), tedaviye uyumu güçleştirmektedir. Birçok sentetik SERM bulunmaktadır. Bunlardan trifeniletilen (tamoksifen, toremifen, droloksifen ve idoksifen), chroman (levormeloksifen), benzotiofenler (raloksifen ve LY 353381) invitro prelinik araştırmalarda, östrojene agonist ve antagonist etkilere sahip bileşiklerdir. İdeal bir SERM, iskelet ve kardiyovasküler sistemde östrojene agonist, endometrium ve memede antagonist etkiye sahip olmalıdır.

Raloksifen halen osteoporozdan korunma ve tedavide onay almış tek SERM'dir. Raloksifen ile yapılan prelinik ve klinik çalışmalar, meme ve uterus dokusunu stimüle etmeden kemik kaybını durdurma ve serum lipoproteinlerini azaltma gibi özelliklerini ortaya çıkarmıştır (76,77). Raloksifen ile yapılmış çok merkezli randomize bir çalışmada, postmenapozal 600 kadın plasebo ile karşılaştırılmış ve lomber BMD'de ortalama %2,4 artış, kemik döngüsü belirleyicilerinden CTx'de %34, osteokalsin'de %23, kemiğe özel ALP'de %15 azalma tesbit edilmiştir (78).

Hormon Replasman Tedavisi

Östrojen, perimenapozal dönemde osteoporozun önlenmesi için bir tedavi alternatifidir ancak ilk tedavi seçeneği için uygun bir ajan değildir. Günümüzde postmenapozal hastalarda yaygın olarak kullanılan östrojenler (Tablo 8), kontrendikasyonları ve rölatif kontrendikasyonları (Tablo 9) aşağıda belirtilmiştir (79).

Tablo 8: Hormon replasman tedavisinde (HRT) kullanılan başlıca östrojenler

<ul style="list-style-type: none">• Konjuge östrojenler• Mikronize östradiol• Östradiol valerat• Östriol• 17-b-östradiol• Sentetik östrojenler

Tablo 9: HRT 'nin kontrendikasyonları ve rölatif kontrendikasyonları.

<p>HRT 'nin kontrendikasyonları</p> <ul style="list-style-type: none">• Endometrium kanseri• Meme kanseri• Kronik bozulmuş KC fonksiyonları ve aktif KC hastalığı• Yeni geçirilmiş tromboz• Yeni geçirilmiş MI	<p>HRT 'nin rölatif kontrendikasyonları</p> <ul style="list-style-type: none">• Epileptik hastalar• Migren• Kontrol altına alınamayan HT• Ailesel hiperlipidemi• Safra kesesi hastalıkları• Uterin leiomyomlar
--	---

II.2. Romatolojik Hastalıklar ve Anti-CCP2

Romatolojik hastalıklar, özellikle inflamatuvar artritler, sıklıkla lokalize veya jeneralize kemik kaybı ile birlikte dir. Romatolojik hastalıkların yol açtıkları disabilitenin ekonomik yükü ise, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser dahil diğer kronik sorunların yükünden daha büyüktür. Romatoid artrit, polimiyalji romatika, sistemik lupus eritematozus, seronegatif spondilartropatiler gibi devamlı tedavi gerektiren inflamatuvar hastalıklar bu kapsamdadır. Kemiğe mekanik stresin azalması, kemik rezopsiyonunu arttırarak romatolojik hastalıkların önemli bir kısmında kullanılmama osteoporozuna yol açar. Romatolojik hastalıklarda kullanılmama osteoporozunun yanı sıra, hastalığın kendi özelliklerinden kaynaklanan ve tedavilerinde etkin olarak kullanılan kortikosteroidlere bağı gelişen osteoporoz da görülür.

Romatolojik hastalıkların inflamatuvar aktiviteleri, örneğin proinflamatuvar sitokinler, kemik kaybının patofizyolojisinde büyük olasılıkla önemli rol oynamaktadırlar. Ayrıca, 1,25 (OH)₂ vitamin D3 de, hem inflamatuvar olaylarda, hem de kemik döngüsünde düzenleyici bir mediyatör olarak etki yapmaktadır. Vitamin D'nin endojen bir immun-modülatör olduğu ve inflamasyon proçesini hızlandırabileceğı düşünölmektedir. Düşük düzeylerinin aktif T hücrelerini ve hücre proliferasyonunu baskılaması olasıdır. Bu nedenle romatolojik hastalıklara veya tedavilerine bağı olarak gelişen osteoporozun profilaksisinde kalsiyum ve vitamin D, birinci basamak seçeneklerdir.

Romatoid Artrit

Romatoid artrit (RA), bütün dünyada genel nüfusun %0.5 ile %1'ini etkileyen, kadınlarda erkeklere oranla iki kat fazla ortaya çıkan en sık rastlanan inflamatuvar artrit tir. Etiyolojisi bir sır olmakla birlikte çevresel ve genetik faktörlerin bir karışımının bundan sorumlu olduğu düşünölmektedir. Genetik komponent için en ilginç örnek monozigot ikizlerde görölmüş tür.

Bunlarda ikizlerden birisi hastalandığında, diğesinde de hastalık görölme oranı %30- 50 arasındadır. Birinci derece akrabalarda bu oran %2-5 toplumda ise %1'dir. İmmunogenetiğın tam olarak anlaşılmasına ve yalnızca tek neden olmamasına rağmen dominant risk faktörü kişinin klas II MHC haplotipidir. Çevresel faktörlerin bir kısmı RA yatkınlığı ile açık bir şekilde ilgili olabilir, buna rağmen özel bir çevre maruziyeti kesin önemli ajan olarak tanımlanamamıştır (80).

Patogenezinde, arasıdonik asit metabolitleri gibi inflamasyonun küçük molekülü mediyatörlerinin, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, kemokinlerin, adhezyon moleküllerinin ve matriks-metalloproteinazlarının rolü dikkatle tanımlanmıştır. Bu ürünler periferik kandaki hücreleri çekmekte ve aktive etmektedirler, sinoviyositlerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu uyarmaktadırlar. Proteazlar daha sonra lokalize tümöre benzer şekilde bir davranışa yol açarlar. Bu da eklem kartilajını, subkondral kemiği, tendonları ve ligamentleri istila eder ve harap eder. Bu patogenetik mekanizmaların anlaşılması, eklem kartilajının geri dönüşümsüz kaybının RA'nın seyri sırasında nisbeten erken başladığının anlaşılmasını sağlamıştır. Eklem harabiyetinden kaçınılmak isteniyorsa, tanı mümkün olduğunca erken konmalı ve sinoviti baskılamak için tedaviye erken başlanmalıdır.

RA, vakaların %55-65'inde haftalar-aylar boyunca, yavaş, sinsi bir başlangıç gösterir. Başlangıç semptomları sistemik veya artiküler olabilir. Bazı bireylerde yorgunluk, halsizlik, ellerde şişlik veya yaygın muskuloskeletal ağrı ilk nonspesifik şikayetler olabilir. Eklemler daha sonra tutulur. İlk olarak tutulan eklemler metakarpofalangeal (MKF) eklemler, proksimal interfalangeal (PIF) eklemler, metatarsofalangeal eklemler ve el bilekleridir (81). Büyük eklemler genellikle küçük eklemler tutulduktan sonra semptomatik hale gelirler.

RA tanısı dikkatli anamnez, fizik muayene bulguları ve laboratuvar testler temeline dayanan kriterlere ve ayırıcı tanıya göre konulmalıdır. Kesin tanı koyduran tek özellik yoktur. 1988'de Amerikan Romatoloji Birliğı (ARC)'nin RA için tanımladığı tanı kriterleri şu şekildedir;

1. Sabah tutukluğu olması; eklem ve çevresinde en az bir saat süren,
2. Üç veya daha fazla eklemdede artrit bulunması,
3. El eklemlerinde artrit bulunması; el bilekleri, metakarpofalingeal (MKF) veya proksimal interfalingeal (PIF) eklemlerden en az birisinde şişlik.
4. Simetrik artrit bulunması,
5. Romatoid nodüllerin bulunması; ekstansör yüzeyler veya jugstaartiküler bölgelerde,
6. Serum romatoid faktör pozitifliği,
7. RA için tipik radyolojik değişikliklerin bulunması.
8. Bir hastanın RA'lı olduğunu söyleyebilmek için yedi kriterden en az dördü bulunmalıdır. İlk dört kriter en az altı haftadır mevcut olmalıdır (82).

Erken inflamatuvar eklem hastalıklarında kliniğin oturmasını beklemek yerine, eklem hasarının gösterilmesi önem kazanmıştır. RA'lı hastalar için tanımlanmakta olan pek çok yeni otoantikör arasında anti-siklik sitriline peptidler (anti-CCP) umut vericidir. Anti-CCP sıradışı bir protein olan sitrullini içeren proteinlerin antijenik determinantlarına bağlanır. Sitrullin, arjinin amino asidinin deiminasyonuyla oluşur. Son dört yıl içerisinde yayınların artan bir kesimi ikinci jenerasyon anti-CCP (anti-CCP2) testinin erken RA teşhisi için, yaygın olarak kullanılan fakat daha az spesifik olan romatoid faktör testiyle karşılaştırılabilir derecede yüksek spesifiklikte olduğunu ve bu bakımdan günümüz için seçilen bir erken tanı markırı haline gelebileceğini bildirmiştir. Ayrıca, anti-CCP2 pozitifliği gelecekteki ACR kriterlerini tam karşılayan RA gelişmelerini hem asemptomatik bireylerde hem de farklılaşmamış artritli olan hastalarda tahmin edebilmektedir. Buna ilaveten, sunulan antikör seviyeleri eroziv hastalığa doğru gidişle korelasyon gösterebilmektedir (83,84,85).

Romatoid artrit ve Anti-CCP2 birlikteliği ile ilgili yapılmış pek çok çalışmada olmasına rağmen yine bir romatolojik hastalık olan Sjögren sendromu ve

anti-CCP2 birlikteliğini araştırmaya yönelik pek fazla yayın yoktur. Yaptığımız literatür taramalarında konuyla ilişkili tek bir yayına rastlanmıştır.

Sjögren Sendromu

Sjögren sendromu, egzokrin bezlerin otoimmün karakterli, kronik inflamatuvar ve lenfoproliferatif bir hastalığı olup, ilerleyici mononükleer hücre infiltrasyonu ile seyreder. Otoimmun regülasyon bozukluğunu meydana getiren faktörler arasında seks hormonları, ilaçlar, virüsler veya bakterilerin rolü olduğu düşünülmektedir. Prevelansı yaklaşık olarak %0.5–5, kadın erkek oranı ise 9:1'dir. Vakaların yaklaşık %50'si primer Sjögren sendromudur (86). Yapılan histokompatibilite çalışmaları ile hastalığın primer ve sekonder olmak üzere iki tipinin olduğu anlaşılmıştır. Sekonder tipte sendrom bir bağ dokusu hastalığıyla özellikle de romatoid artrit birliktelik gösterir. Hastalığın kliniğinde; gözyaşı ve tükürük bezlerinin lenfositler ve plazma hücreleri ile infiltrasyonu sonucu hiperplazisi ve bez kanallarının daralması ile gözyaşı ve tükürük sekresyonunda azalma görülür. Hastaların yarısında parotis bezi şişmiştir. Burun mukozası kuruluğu sonucu epistaksis ve koklama duyusu azalması görülebilir. Üst solunum yolu mukozasının hastalığa katılması ile öksürük, bronşit ve pnömoni, östaki borusunun katılması ile kronik otit, sağırılık, özefagusun katılması ile disfaji ortaya çıkar. Pankreas, mide ve deri de hastalığa katılabilir.

Sjögren sendromunun tanısı dikkatli anamnez, fizik muayene bulguları ve laboratuvar testler temeline dayanan kriterlere ve ayırıcı tanıya göre konulmalıdır. Lökositoz, eozinofili, hipergamaglobulinemi, kriyoglobulinemi, hastalığın sekonder tipinde anti-nükleer antikor (ANA) ve romatoid faktör (RF) pozitifliği belli başlı non-spesifik laboratuvar bulgularıdır. Asıl tanı ise invaziv bir yöntem olan biyopsi ile konulur. Sjögren sendromu tanısının bir biyokimyasal markırla hastalığın kliniği ortaya çıkmadan önce konulabilmesi, tedaviye erken başlanması sayesinde hastanın yaşam kalitesinin yükseltilmesini sağlayacaktır (87).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1. Araç ve Gereçler

Santrifüj	Hettich Rotina 35 R / Soğutmalı (Almanya) Hettich mikro 200 / Soğutmalı (Almanya)
Otomatik pipetler	Biohit (Finlandiya) - Isolab (Almanya)
Derin dondurucu	Nuaire Ultralow Freezer (-80 °C)
Vorteks	Yellowline (Amerika Birleşik Devletleri)
Benmari:	Medingen W 22 (0-99 °C) (Almanya)
Elisa okuyucu	BioRead, Spectra II (Avusturya)
Thermal cycler	2720 Applied Bioystems (Singapur)
Otoanalizörler	Profiblot T48 analizörü (Almanya) Beckman Coulter DXC 800 analizörü (İrlanda) Immulate 2000 analizörü (A.B.D.)

III.2. Yöntem

III.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Kontrol Grubu: Yaş ortalamaları 44.56 ± 9.89 olan tamamen sağlıklı kadınlar (n=18),

Grup 1: Sjögren sendromu tanısı almış, yaş ortalamaları 46.94 ± 10.56 olan kadın hastalar (n=17),

Grup 2: Romatoid artrit ile birlikte Sjögren sendromu tanısı almış yaş ortalamaları 53.44 ± 11.63 olan kadın hastalar (n=16),

Grup 3: Romatoid artrit tanısı almış yaş ortalamaları 48.76 ± 10.87 olan kadın hastalar (n=25), çalışma gruplarımızı oluşturdu.

III.2.2. Çalışma Düzeni

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Romatoloji Birimi ile birlikte yürütüldü. Sağlıklı bireylerden oluşan 27-59 yaş arası 18 kişi kontrol grubumuzu, Sjögren sendromu tanısı almış 23-60 yaş arası 17 kişi, romatoid artrit birlikte Sjögren sendromu tanısı almış 35-75 yaş arası 16 kişi, romatoid artrit tanısı almış 27-68 yaş arası 25 kişiden oluşan üç ayrı grup ise hasta gruplarımızı oluşturmak üzere çalışmaya dahil edildi. Hastalar, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Romatoloji Polikliniği'ne ardışık olarak başvuran kişilerden rastgele seçilerek gruplandı. Tüm hasta grupları ve kontrol grubundan çalışmanın başında toplam 1 kez kan örneği (1 adet düz tüp, 1 adet mor kapaklı tüp) ve spot idrar örneği alındı, aynı gün kemik dansitometreleri çektilti. Düz kan örneklerinden CRP (C-reaktif protein) ve anti-CCP2, tam kan örneklerinden COLIA1 ve VDR gen polimorfizmi tayin edildi. Aynı gün alınan spot idrar örneklerinden ise DPD, idrar kreatinin ve idrar GGT tayini yapıldı. CRP, anti-CCP2, DPD, idrar kreatinin ve idrar GGT tayini çalışmaya dahil edilen tüm kişilerden yapıldı, ancak allel tayinleri gruplardan 16'şar kişi alınarak çalışıldığı için osteoporoz ve allel arasındaki ilişkiler 64 kişi üzerinden değerlendirildi. Tüm katılımcılar, çalışma konusunda bilgilendirilerek kendilerine rızalarının alındığına dair bilgilendirilmiş onay formları imzalatıldı.

III.2.3. Kan ve İdrar Örneklerinin Alınması

Tüm hasta grupları ve kontrol grubundan çalışma başlangıcında bir kez olmak üzere 1 tüp düz tüpe, 1 tüp te hemogram tüpüne olmak üzere toplam 2 tüp venöz kan örneği ve spot idrar örneği alındı. Düz kan örnekleri, 30 dakika içerisinde + 4 °C'de 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve bundan CRP çalışıldı. Geriye kalan serum ise anti-CCP2 çalışılmak üzere ependorf tüplerine ayrılarak -80 °C'de saklandı. Spot idrardan DPD, idrar kreatinin ve

İdrar GGT'si çalışıldı. Tam kan örnekleri ise 1 haftadan daha uzun süre bekletilmemek koşuluyla + 2-8°C'de biriktirildikten sonra DNA'ları ayrıldı ve VDR / COLIA1 genleri çalışılmak üzere -80°C'de saklandı.

III.2.4. Biyokimyasal Analizler

Spot idrar örneklerinden DPD, idrar kreatinin ve idrar GGT düzeyleri tayini, serum örneklerinden CRP ve anti-CCP2 düzeyleri tayini, tam kandan ise VDR / COLIA1 DNA gen analizleri yapıldı.

Laboratuvar testlerinden;

- Serum CRP düzeyi ölçümü Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe turbidimetrik yöntemle (Beckman Coulter Galway, İrlanda),
- İdrar DPD düzeylerinin ölçümü Immulite 2000 otoanalizöründe kemilüminesan immunometrik yöntemle (Siemens Los Angeles, CA, Amerika Birleşik Devletleri)
- İdrar kreatinin ve idrar GGT düzeyleri ölçümü Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe spektrofotometrik yöntemle (Beckman Coulter Galway, İrlanda), Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi Biyokimya ve Hormon laboratuvarlarında,
- Serum anti-CCP2 düzeyleri ticari kit kullanılarak enzim immünassay yöntemi ile (Euro-Diagnostica Malmö, İsviçre),
- DNA ekstraksiyonu Invisorb Spin Blood Mini Kit kullanılarak (Invitek GmbH, Berlin, Almanya),
- VDR / COLIA1 gen analizleri PCR ve ters hibridizasyon yöntemleriyle, Profiblot T48 analizöründe strip testler kullanılarak (Genome Identification Diagnostics GmbH, Straßberg, Almanya)

Celal Bayar Üniversitesi dekanlık binasında bulunan Biyokimya çalışma laboratuvarında yapılmıştır.

III.2.4.1. CRP (C-Reaktif Protein) Tayini

C reaktif protein ölçümleri stres, travma, infeksiyon, inflamasyon ve cerrahi sırasında ölçüldüğünde yararlı olabilir. CRP klasik olarak karaciğer kaynaklıdır. Yüksek sensitiviteye sahip ölçüm yöntemi sebebi ile plazma, serum, donmuş çözünmüş plazma gibi örneklerden stabil sonuçlar elde edilir.

CRP düzeyleri Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarı'nda bulunan Beckman Coulter firmasına ait DXC 800 otoanalizöründe turbidimetrik yöntemle ölçüldü. Reaksiyonda, C reaktif protein spesifik antikoru ile karşılaşarak çözünmez kompleksler oluşturur. Cihazda 340 nm'de yapılan okumalar standart eğrisi ile karşılaştırılarak sonuç verilir. Beckman Coulter firmasının CRP kiti için verdiği ölçüm aralığı; serum veya plazmada 0.5-20.0 mg/dl'dir. CRP referans sınırı ise serum veya plazmada <1.0 mg/dl veya <10.0 mg/L'dir. Gün içi CV değeri %5.0, 1.33 mg/dl düzeyindeki serumda intra-assay CV değeri %3.46, inter-assay CV değeri ise %3.96' dir.

III.2.4.2. DPD Tayini

DPD, kemik yıkımı sonucu olgun kollajenden salınan indirgenemeyen çapraz bağlardır. DPD düzeyleri Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Hormon laboratuvarında bulunan Siemens firmasına ait Immulite 2000 otoanalizöründe kemiluminesans yöntemle spot idrar örneklerinden tayin edildi. Spot idrar örneklerinin sabah ilk ya da ikinci idrar olmasına dikkat edildi. Kullanılan DPD testinin referans değerleri; kadınlar için 3.0–7.4 nmol DPD / mmol kreatinin, erkekler için ise 2.3–5.4 nmol DPD / mmol kreatinin'dir. Kitin intra-assay CV değerleri; 25 nmol konsantrasyonda %10, 78 nmol konsantrasyonda %5.9, 120 nmol konsantrasyonda %5.3 olarak, kitin inter-assay CV değerleri; 25 nmol konsantrasyonda %12, 78 nmol konsantrasyonda %7.1, 120 nmol konsantrasyonda %6.3 olarak belirtilmiştir.

III.2.4.3. Spot İdrarda Kreatinin Tayini

Kreatinin düzeyleri Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında bulunan Beckmann Coulter firmasına ait DXC 800 otoanalizöründe spot idrardan, Jaffe metoduyla spektrofotometrik olarak tayin edildi. Tayin metodu kreatininin pikrik asitle alkali ortamda kreatinin-pikrat kırmızı renkli kompleksini oluşturması temeline dayanır. Absorbans değişiklikleri 520 nm'de okunur, yapılan okumalar standart eğrisi ile karşılaştırılarak sonuç verilir. Kreatinin düzeyleri taze serum, plazma veya idrardan ölçülür. Beckman Coulter firmasının kreatinin kiti için verdiği analitik aralık; serum veya plazmada 0.3–25 mg/dl, spot idrarda 10–400 mg/dl'dir. Testin idrardaki referans değerleri; kadınlar için 800–2000 mg/24 saat, erkekler için 600–1800 mg/24 saat'dir. 10 mg/dl konsantrasyonda kitin intra-assay CV değeri %2, 100 mg/dl konsantrasyonda inter-assay CV değeri %3 olarak belirtilmiştir.

III.2.4.4. Spot İdrarda GGT Tayini

GGT düzeyleri, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında bulunan Beckman Coulter firmasına ait DXC 800 otoanalizöründe spot idrardan spektrofotometrik olarak tayin edildi. Metod; GGT varlığında, γ -glutamil-p-nitroanilin ve glisilglisinine reaksiyona girerek γ -glutamil-glisilglisin ve renkli p-nitroanilin oluşturması esasına dayanır. Absorbans değişiklikleri 520 nm'de okunur, yapılan okumalar standart eğrisi ile karşılaştırılarak sonuç verilir. İdrar GGT aktivitesi, serumdaki formundan farklı olarak idrar kreatininini ile oranlanarak kemik rezorpsiyon markırı olarak kullanılmaktadır (8). Beckman Coulter firmasının GGT kiti için verdiği analitik aralık; serum veya plazmada 5–750 IU/L'dir. Spot idrar için herhangi bir analitik aralık belirtilmemiştir. Referans değerler yine serum için kadınlarda 38 IU/L, erkeklerde 55 IU/L'dir. İdrar için referans değer belirtilmemiştir. 85.7

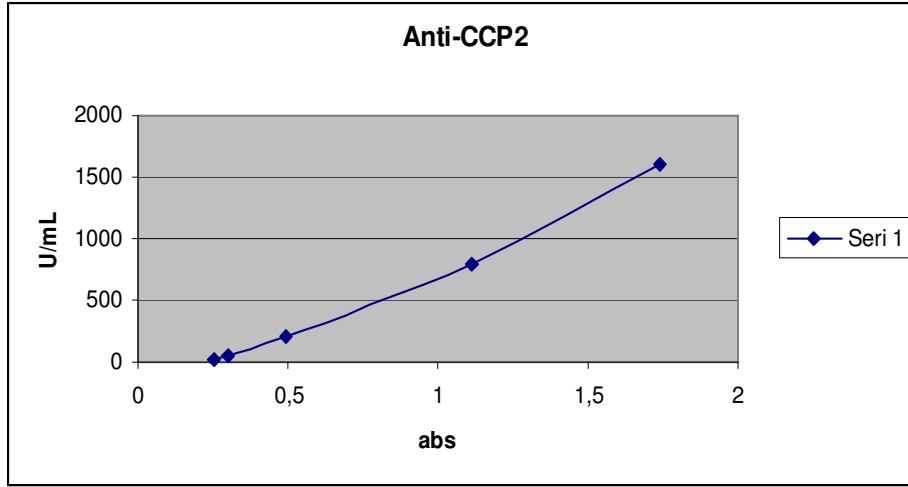
IU/L konsantrasyon için kitin intra-assay CV değeri %3.5, inter-assay CV değeri ise %5.3 olarak verilmiştir.

III.2.4.5. Anti-CCP2 Tayini

Anti-CCP2 düzeyleri, serumdan enzim immünassay (ELISA) yöntemi ile hazır ticari kit kullanılarak ölçüldü (Euro-Diagnostica Malmö, İsviçre). Öncelikle serum örnekleri 1:50 oranında dilüent buffer ile dilüe edildi ve yıkama solüsyonu distile su ile 20 kat sulandırıldı. CCP2 peptidi ile kaplı kuyucuklar kitin içinde kullanıma hazırdı. Ölçümün ilk basamağında standartlar, kontroller ikişer kez ve serumlar ise bir kez olmak üzere kuyucuklara 100'er µl pipetlendi. Blank için ayrılan iki kuyucuğa da 100 µl dilüent buffer konuldu ve test 60 dk oda ısısında orbital karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Ardından plate ters çevrilerek kuyucukların içi boşaltıldı. Bir çoklu pipet yardımıyla tüm kuyucuklar 300'er µl yıkama solüsyonu ile dolduruldu ve sonra tekrar ters çevirilip boşaltıldı. Kuyucukların bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Kit içinde hazır bulunan konjugat solüsyonu tüm kuyucuklara 100'er µl pipetlendikten sonra test 30 dk oda ısısında tekrar orbital karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. 30 dk sonrasında plate tekrar ters çevrilerek kuyucuklar boşaltıldı ve kuyucuklara 3 kez yıkama işlemi uygulandı. Ardından kit içinde hazır bulunan substrat solüsyonu tüm kuyucuklara 100'er µl olacak şekilde pipetlendi ve tekrar 30 dk oda ısısında orbital karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Sonrasında tüm kuyucuklara 100'er µl stop solüsyonu pipetlenerek 10 dk içinde standart ve örneklerin absorbansları ELİSA okuyucuda 450 nm'de okutuldu. Konsantrasyon değerleri 1600 U/mL, 800 U/mL, 200 U/mL, 50 U/mL, 25 U/mL olarak verilmiş olan standartların okutulan absorbans değerleri ve konsantrasyonları kullanılarak çizilen standart grafiğinden serum örneklerinin konsantrasyonları hesaplandı. Anti-CCP2 için kitin önerdiği referans değer; 25 U/mL'nin altındaki değerler için negatif, 25 U/mL'nin üzerindeki değerler için pozitif sonuç verilmesidir. Kitin RA için sensitivitesi %70.5–79.8, sjögren

için spesifitesi %71.3–99.8'dir. Kitin intra-assay CV değerleri; 95.7 U/mL konsantrasyonda %7.0, 240.1 U/mL konsantrasyonda %6.5 olarak, inter-assay CV değerleri; 93.1 U/mL konsantrasyonda %6.0, 257.4 U/mL konsantrasyonda %7.9 olarak belirtilmiştir. Çalışmamızın standart grafiği aşağıda verilmiştir (Grafik 1).

Grafik 1: Anti-CCP2 testine ait standart grafiği



III.2.4.6 COLIA1 ve VDR Gen Polimorfizmi Tayini

III.2.4.6.1 DNA Ekstraksiyonu İşlemi

Kanların ekstraksiyonunda Invisorb Spin Blood Mini Kit (Invitex GmbH, Berlin, Almanya) kullanıldı. Ekstraksiyon kanı olarak heparinli mor kapaklı vakumlu tüplere alınmış ve en çok 1 hafta buzdolabında + 2-8°C'de bekletilmiş kanlar kullanıldı. Bizim kullandığımız ekstraksiyon prosedürünün basamakları aşağıda açıklanmıştır.

1. Her kan örneği için 200 µl'den gereken miktar hesaplanarak Elution Buffer D 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılıp kullanılacağı son basamağa kadar 56°C'de muhafaza edildi.

2. Çalışacağımız örneklerin her birisi için 1.5 ml'lik ependorf tüpler numaralanarak çalışma sporuna dizildi.

3. 56°C'lik termomikserde 10 dakikalık parçalanma aşaması:

1.5 ml 'lik tüplere 200 µl tam kan örneği, üzerine de 200 µl Lysis Buffer A ve 20 µl Proteinaz K konulup 15 saniye vortekslendikten sonra 56°C'ye ayarlanmış termomikserde 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

4. Optimal bağlanma koşullarının sağlanması:

400 µl Binding Buffer B6 inkübasyonu biten örneklere ilave edilip tekrar 15 saniye vortekslendi.

5. Filtrelerin yerleştirilip DNA'nın bağlanması:

2 ml' lik ependorf tüplere kit içindeki özel filtreler her bir tüpe bir adet olmak üzere yerleştirildi. Kan örnekleri bu filtrelerin üzerine döküldü ve 1 dakikalık beklemeden sonra 12.000 rpm'de 2 dakika santrüfigasyon işlemine tabi tutuldu. DNA'nın bağlandığı filtre yeni bir 2 ml'lik ependorf tüpe aktarılırken filtratın süzöldüğü tüp atıldı.

6. I. Yıkama:

500 µl Wash Buffer I ilave edilen tüpler 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre yeni bir tüpe aktarıldı. Süzölen filtrat atıldı.

7. II. Yıkama:

800 µl Wash Buffer II ilave edilen ependorf tüpler 12.000 rpm'de 1 dakika daha santrifüj edildi. Tüplerin dibindeki filtrat döküldü. Filtreler tekrar aynı tüplere yerleştirildi. Yıkama solüsyonlarındaki etanolün tamamen uzaklaştırılması için filtreleri yerleştirilmiş tüpler maksimum hızda 4 dakika boyunca santrifüj edildi.

8. DNA'nın elde edilmesi:

Filtreler, 1.5 ml'lik yeni ependorf tüplere aktarılıp, her bir tüpe 200 µl işlemin başında 56°C'a ısıtılmış olan Elution Buffer D ilave edildi. 1 dakikalık inkübasyondan sonra ependorf tüpler 10.000 rpm' de 1 dakika santrifüj

edilerek DNA'nın tüpün dibine szlmesi sağlandı. Filtre atılıp, tüpün dibine szlmş olan içinde DNA bulunan filtrat kullanıma hazır hale geldi. Ekstraksiyon sonrası DNA'lar numaralandırılarak -80°C'de DNA ters hibridizasyonuna kadar bekletildi.

III.2.4.6.2 Ayraların Hazırlanması

+ 2-8°C'de saklanan ayraçlar, kullanımdan önce oda sıcaklığına gelinceye dek beklendi. Hibridizasyon solüsyonu (solüsyon 2) ve Sert yıkama solüsyonu (solüsyon 3) sıcak su banyosunda 45°C' ye kadar ısıtıldı. Konsantre konjuge kullanılmadan hemen önce konjugasyon solüsyonu ile 1:100 oranında (her strip için 10 µl konsantre konjuge 1 ml konjugasyon solüsyonu ile olacak Şekilde) seyreltildi ve iyice karıştırıldı.

Kullandığımız ters hibridizasyon kiti (Genome Identification Diagnostics GmbH, Straşberg, Almanya), COLIA1 genindeki Sp1 (S/s) polimorfizmi ve VDR genindeki Bsml (B/b) polimorfizmini iki paralel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve ard arda hibridleme metodunu kullanarak tanımlamaktadır. İki PCR, kandan izole edilen DNA kullanılarak yürütülür. Bu yolla, COLIA1 ve VDR geninin bir fragmanı biyotinle işaretlenmiş özel primerlerle çoğaltılır. oğaltılmış gen parçalarının karakterizasyonu, nitroselüloz stripler üzerine sabitlenmiş sekans-spesifik oligonükleotid probleleriyle (SSOP) hibridizasyon reaksiyonunda gerçekleşir (ters hibridizasyon). Hibridizasyon sırasında, denature edilmiş ampikon scribe yapıştırılmış gen problemlerine bağlanır. Oldukça spesifik yıkama işlemi, sekans problemleri oğaltılmış DNA ile %100 uyumlu ise hibridlerin hayatta kalmasını sağlar. Streptavidin alkalın fosfataz gen probuna ve biyotinle işaretlenmiş ampikona bağlanır. Bu kompleks yapı alkalın fosfatazdaki NBT/BCIP renk reaksiyonu ile tanımlanır. Band yapısı sunulan örnekle analiz edilebilir.

III.2.4.6.3 Test Prosedürü

1. Tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi, 45 °C' ye ısıtılması gereken Hibridizasyon solüsyonu (solüsyon 2) ve Sert yıkama solüsyonu (solüsyon 3) ısıtıldı. İnkübasyon tablaları örnek sayısına göre ve yapılacak kontrol sayısına göre hazırlandı. Kullanılacak kuyucuklar kenarından işaretlendi. Daha önce kullanılan çukurlar kullanılmadı.
2. İşaretli çukurlara pipetle 40 µl denatüre edici ayraç eklendi (solüsyon 1) (tek bir PCR'dan amplicon kullanılıyorsa 20 µl).
3. Denatüre edici ayraça PN-VDR ve PN-COLIA'lı PCR'lardan pipetle 20 µl amplicon eklendi, iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
4. Önceden ısıtılmış, karıştırılmış 1 ml hibridizasyon solüsyonu (solüsyon 2) özenle her çukura pipetle ilave edildi.
5. Stripler pens ile tüpten çıkartıldı ve inkübasyon tablasına konuldu. Striplerin tamamen sıvıyla kaplandığından ve kaplı tarafın yukarı baktığından emin olundu. Dönen stripler, örneğin yıkama solüsyonu eklendiğinde, strip bir ucundan pens ile tutularak tekrar ters çevrildi.
6. Tabla sıcak su çalkalayıcısında, 45 °C' de 30 dakika inkübe edildi.
7. Hibridizasyon solüsyonu tamamen boşaltıldı ve stripler her defasında 1 dakikalığına olacak şekilde, dikey çalkalayıcıda hafif hareketlerle, 1 ml önceden ısıtılmış ve karıştırılmış Sert Yıkama Solüsyonuyla (solüsyon 3) 2 kez yıkandı.
8. Her scribe 1 ml önceden ısıtılmış Sert Yıkama Solüsyonu eklendi ve 15 dakika 45 °C' de yıkama banyosunda yavaşça sallayarak inkübe edildi.
9. Bu aşamadan itibaren işleme oda sıcaklığında devam edildi. Sert Yıkama Solüsyonu hafifçe vurularak uzaklaştırıldı ve stripler her defasında 1 dakika boyunca 1 ml Durulama 1 solüsyonu (solüsyon 4) ile yatay çalkalayıcıda 2 defa yıkandı.
10. Her scribe 1 ml hazırlanmış konjugat (konjugasyon solüsyonu ile 1:100 oranında seyreltilmiş konjugat) (solüsyon 5) eklendi ve 30 dakika boyunca yatay çalkalayıcıda, oda sıcaklığında inkübe edildi.

11. Konjugat uzaklaştırılarak her strip yatay çalkalıyıcıda 1 ml Duruluma II (solüsyon 6) ile 3 kez yıkandı.
12. Oda sıcaklığına getirilmiş substrat (solüsyon 7) her scribe 1 ml pipetle eklendi ve 10 – 20 dakika kadar inkübe edildi.
13. Son olarak 1 ml distile suyla iki defa yıkanarak reaksiyon durduruldu.
14. Stripler kuyucuklardan çıkarıldı ve emici kağıt ile kurulandı. Analiz edilen stripler ışıktan korundu.

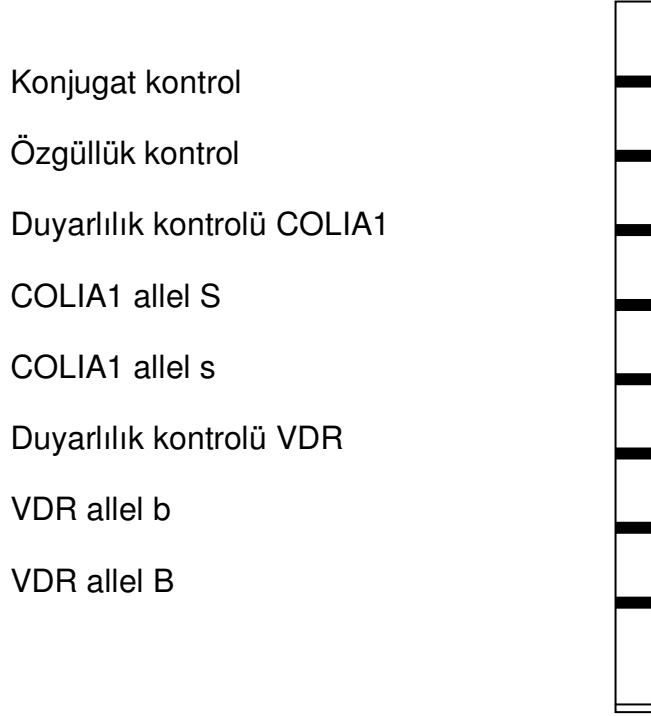
III.2.4.6.4 Değerlendirme

Stripler kurutulduktan sonra kit üreticisi tarafından temin edilen özel kağıtlara yapıştırıldı. Sonuçları değerlendirmek için üzerinde reaksiyon bölgeleri işaretlenmiş olan, kite özel şablonu kullanıldı. Şablonun alt çizgisinin stripler üzerindeki numaraların üzerindeki siyah çizgiye tam olarak hizalanmasına dikkat edildi.

Her strip duyarlılık, özgüllük ve konjugat kontrol alanı içermektedir. Duyarlılık ve konjugat kontrol alanı test sırasında tamamen oluşmalıdır. Eğer bu kontrol alanları oluşmazsa yanlış bir negatif sonuçla karşılaşılır. Eğer özgüllük alanı oluşmuşsa yanlış bir pozitif sonuç çıkacaktır. Bu durumlarda test tekrar edilmelidir. Bizim tüm striplerimizde duyarlılık ve konjugat kontrol alanları oluştu, özgüllük kontrol alanı oluşmadı. Böylece striplerimiz değerlendirmeye alınabildi.

III.2.4.6.5 Sonuçların Yorumlanması

Toplam 8 reaksiyon alanı tanımlanmıştır (Diyagram 1).



Diyagram 1: Nitroselüloz strip üzerinde Kontrol alanları ve gen problemleri.

- Konjugat kontrolü

Bu reaksiyon alanı konjugat bağlanması etkinliğini belgeler. Daima oluşması gerekir.

- Özgüllük kontrolü

Bu reaksiyon alanı yıkama sıcaklığı çok düşük olduğunda oluşur. Özgül olmayan bir hibridleşmeye işaret eder.

- Duyarlılık kontrolü COLIA1

Bu kontrol alanı daima oluşmalıdır. Hibridizasyonun optimal duyarlılığını ve PN mix PN-COLIA1 çoğaltma kontrolünü gösterir.

- COLIA1 allel S

Bu reaksiyon alanı COLIA1 geninde allel S mevcut ise oluşur.

- COLIA1 allel s

Bu reaksiyon alanı COLIA1 geninde allel s mevcut ise oluşur.

- Duyarlılık kontrolü VDR

Bu kontrol alanı daima oluşmalıdır. Hibridizasyonun optimal duyarlılığını ve PN mix PN-VDR çoğaltma kontrolünü gösterir.

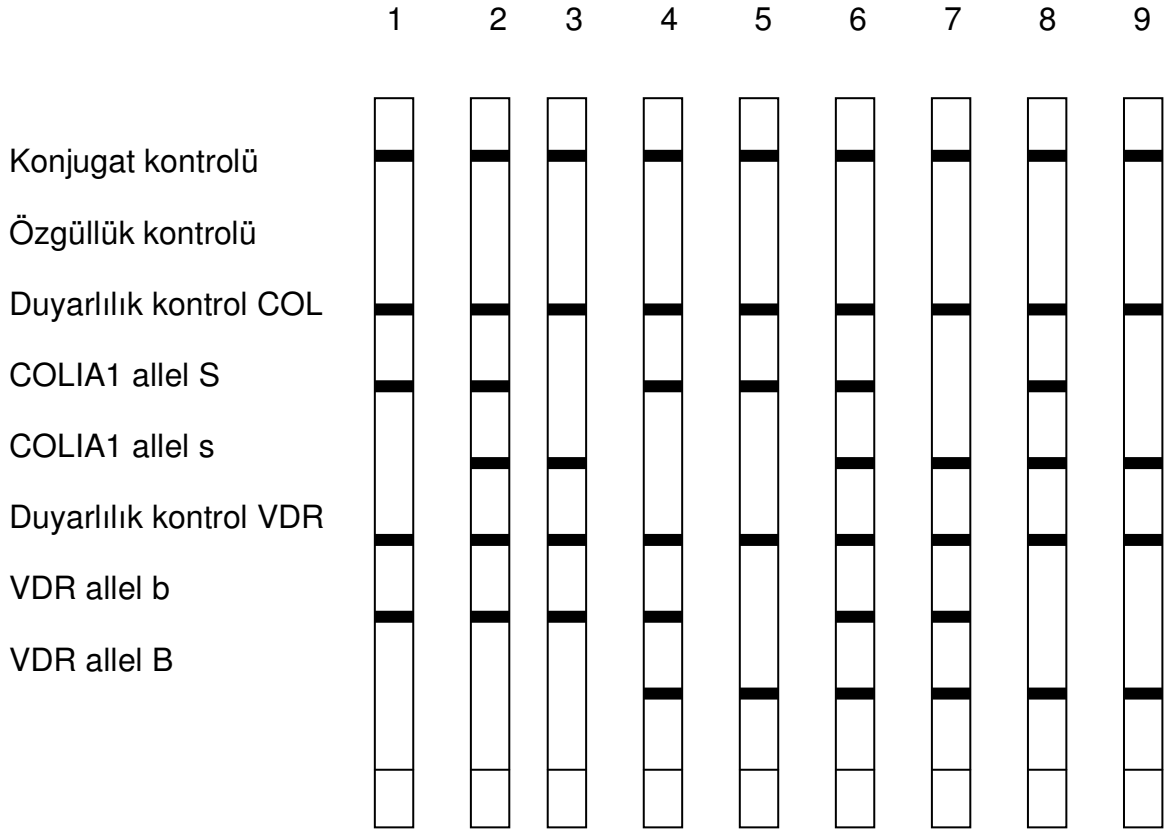
- VDR allel b

Bu reaksiyon alanı VDR geninde allel b mevcut ise oluşur.

- VDR allel B

Bu reaksiyon alanı VDR geninde allel B mevcut ise oluşur.

Aşağıda Diyagram 2 değerlendirmeye yardımcı olması amacıyla, PN-COLIA1 ve PN-VDR'nin birlikte hibridlenmesi ile oluşan amplifikasyon ürünlerinin olası tüm band yapılarını göstermektedir.



Diyagram 2: PN-COLIA1 ve PN-VDR birlikte hibridlendikten sonra oluşan amplifikasyon ürünlerinin band yapısı

- | | |
|--------------------------|--------------------|
| 1. COLIA1 homozigot SS | VDR homozigot bb |
| 2. COLIA1 heterozigot Ss | VDR homozigot bb |
| 3. COLIA1 homozigot ss | VDR homozigot bb |
| 4. COLIA1 homozigot SS | VDR heterozigot Bb |
| 5. COLIA1 homozigot SS | VDR homozigot BB |
| 6. COLIA1 heterozigot Ss | VDR heterozigot Bb |
| 7. COLIA1 homozigot ss | VDR heterozigot Bb |
| 8. COLIA1 heterozigot Ss | VDR homozigot BB |
| 9. COLIA1 homozigot ss | VDR homozigot BB |

III.2.5. Kemik Dansitometresi Ölçümleri

Çalışmaya katılan tüm kişilerin kemik dansitometri ölçümlerinde, Celal Bayar Üniversitesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı' nda bulunan Lunar DPX Pro (Amerika Birleşik Devletleri) cihazı kullanıldı. Ölçümler femur boynu ve lomber vertebralar üzerinden standart olarak aynı teknisyen tarafından yapıldı ve sonuçların değerlendirilmesinde Türkiye standartları kullanıldı (88).

III.3. İstatistiksel Analiz

Çalışma verileri, SPSS 10.0 istatistik paket programı ile değerlendirildi.

Ayrı ayrı hasta grupları ve kontrol grubunun yaş ortalamalarının tesbiti için tek yönlü varyans analizi yapıldı.

Tüm romatolojik hastalardan oluşan grup ve kontrol grubu arasında osteopeni veya osteoporozun var ya da yokluğunun, COLIA1 ve VDR genotiplerinin dağılımının değerlendirilmesi için ki-kare analizi kullanıldı.

Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda genotiplerin osteopeni veya osteoporoz ile ilişkilerinin değerlendirilmesinde lojistik regresyon analizi kullanıldı. COLIA1 ve VDR genotiplerinin osteopeni veya osteoporoz gelişmesi açısından kaç kat risk oluşturduğu tahmini rölatif risk ve %95 güven aralığında (OR) hesaplaması şeklinde belirtildi.

Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda genotiplerin BMD, DPD, idrar GGT / idrar kreatinin ile olan ilişkileri ve ayrıca hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki ilişkiler çift yönlü kovaryans analizi ile değerlendirildi.

Anti-CCP2 ve CRP pozitif veya negatifliği, sensitivite, spesifite, +PD (pozitif prediktif değer), -PD (negatif prediktif değer) ayrı ayrı tüm gruplar açısından ki-kare testi ile belirlenmiştir.

IV. BULGULAR

IV.1. Araştırma Grubunun Tanımlayıcı Özellikleri

Tablo 10: Hasta ve kontrol gruplarının kişi sayısı ve yaş ortalamaları

GRUPLAR	HASTA SAYISI	YAŞ ORTALAMASI	CİNSİYET
Sjögrenli hastalar (Grup 1)	n = 17	46.94 ± 10.56	K
(RA + Sjögren)'li hastalar (Grup 2)	n = 16	53.44 ± 11.63	K
RA'li hastalar (Grup 3)	n = 25	48.76 ± 10.87	K
Sağlıklı kişiler (Kontrol)	n = 18	44.56 ± 9.89	K
Toplam	n = 76	48.34 ± 10.97	K

Tek yönlü varyans analizi ile yaş ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0.114$).

Tablo 11: Tüm romatolojik hastalar ve kontrol grubunda osteopeni veya osteoporozdan en az birisinin var ya da yok olması.

	Osteopeni/Osteoporoz		Toplam	
	Var	Yok		
Tüm romatolojik hastalar	Kişi sayısı (n)	40	18	58
	Yüzde dağılım (%)	69	31	100
Kontrol grubu	Kişi sayısı (n)	9	9	18
	Yüzde dağılım (%)	50	50	100

Tüm romatolojik hastalar ve kontrol grubu arasında osteopeni veya osteoporozun var ya da yok olması açısından ki-kare analizi ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.142$).

COLIA1 ve VDR gen analizleri, testlerin pahalı olması nedeniyle her gruptan 16'şar kişi, toplam 48 kişi üzerinde çalışıldı.

Tablo 12: Tüm romatolojik hastalar ve kontrol grubunda COLIA1 genotiplerinin dağılımı

		SS	Ss + ss	Toplam
Tüm romatolojik hastalar	Kişi sayısı (n)	21	27	48
	Yüzde dağılım (%)	43.8	56.3	100
Kontrol grubu	Kişi sayısı (n)	11	5	16
	Yüzde dağılım (%)	68.8	31.3	100

Tüm romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunun COLIA1 genotip dağılımları arasında ki-kare analizi ile anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.114$).

Tablo 13: Tüm romatolojik hastalar ve kontrol grubunda VDR genotiplerinin dağılımı

		bb	Bb + BB	Toplam
Tüm romatolojik hastalar	Kişi sayısı (n)	16	32	48
	Yüzde dağılım (%)	33.3	66.7	100
Kontrol grubu	Kişi sayısı (n)	10	6	16
	Yüzde dağılım (%)	62.5	37.5	100

Tüm romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunun VDR genotip dağılımları arasında ki-kare analizi ile anlamlı bir ilişki saptanmadı ($p=0.068$).

IV.2. Genotiplerin Osteopeni veya Osteoporoz Varlığı İle İlişkileri

Tablo 14: Romatolojik hasta grubunda COLIA1 genotiplerinin osteopeni veya osteoporoz varlığıyla ilişkisi

	Osteopeni veya Osteoporoz		OR (%95 GA)	P değeri
	Var	Yok		
SS (n=21)	12 (%57.1)	9 (%42.9)	referans	
Ss + ss (n=27)	21 (%77.8)	6 (%22.2)	2.63 (0.75 – 9.19)	0.131

Romatolojik hasta grubunda en az bir 's' alleleline sahip olan kişilerde, SS genotipine sahip olan kişilere göre osteopeni veya osteoporoz gelişmesi riski 2.63 kat (%95 GA, 0.75 – 9.19, p=0.131) olarak saptandı.

Tablo 15: Kontrol grubunda COLIA1 genotiplerinin osteopeni veya osteoporoz varlığıyla ilişkisi

	Osteopeni veya Osteoporoz		OR (%95 GA)	P değeri
	Var	Yok		
SS (n=11)	5 (%45.5)	6 (%54.5)	referans	
Ss + ss (n=5)	2 (%40.0)	3 (%60.0)	0.8 (0.093 – 6.85)	0.893

Kontrol grubunda en az bir 's' alleleline sahip olan kişilerde, SS genotipine sahip olan kişilere göre osteopeni veya osteoporoz gelişmesi riski 0.8 kat (%95 GA, 0.093 – 6.85, p=0.893) olarak saptandı.

Tablo 16: Romatolojik hasta grubunda VDR genotiplerinin osteopeni veya osteoporoz varlığıyla ilişkisi

	Osteopeni veya Osteoporoz		OR (%95 GA)	P değeri
	Var	Yok		
bb (n=16)	12 (%75.0)	4 (% 25.0)	referans	
Bb + BB(n=33)	21 (%65.6)	11(% 34.4)	0.636 (0.166 – 2.45)	0.511

Romatolojik hasta grubunda en az bir 'B' alleleline sahip olan kişilerde, bb genotipine sahip olan kişilere göre osteopeni veya osteoporoz gelişmesi riski 0.636 kat (%95 GA, 0.166 – 2.45 , p=0.511) olarak saptandı.

Tablo 17: Kontrol grubunda VDR genotiplerinin osteopeni veya osteoporoz varlığıyla ilişkisi

	Osteopeni veya Osteoporoz		OR (%95 GA)	P değeri
	Var	Yok		
bb (n=10)	4 (% 40)	6 (% 60)	referans	
Bb + BB (n=6)	3 (% 50)	3 (% 50)	1.5 (0.195 – 11.54)	0.697

Kontrol grubunda en az bir 'B' alleleline sahip olan kişilerde, bb genotipine sahip olan kişilere göre osteopeni veya osteoporoz gelişmesi riski 1.5 kat (%95 GA, 0.195 – 11.54, p=0.697) olarak saptandı.

Genotiplerin osteopeni veya osteoporoz ile ilişkilerinin değerlendirilmesinde lojistik regresyon analizi kullanıldı. Sonuçların hiçbirisinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilemedi.

IV.3. Genotipler ile BMD, DPD ve İdrar GGT/İdrar Kreatinin İlişkileri

Tablo 18: Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda COLIA1 genotiplerinin BMD (g/cm²), DPD (nmol/mmol Cr) ve idrar GGT/İdrar kreatinin (IU/g Cr) ile ilişkisi

	SS (Ortalama ±ss)	Ss + ss (Ortalama ±ss)	P değeri (genotipler arası)	P değeri (gruplar arası)
L2-L4 BMD				
Romatolojik	1.14 ± 0.162	1.06 ± 0.121	0.448	0.128
Kontrol	1.16 ± 0.129	1.17 ± 0.151		
Boyun BMD				
Romatolojik	0.94 ± 0.155	0.88 ± 0.134	0.915	0.033*
Kontrol	0.98 ± 0.099	1.03 ± 0.146		
Wards BMD				
Romatolojik	0.77 ± 0.179	0.71 ± 0.155	0.793	0.049*
Kontrol	0.80 ± 0.114	0.88 ± 0.129		
TrokanterBMD				
Romatolojik	0.76 ± 0.128	0.72 ± 0.118	0.881	0.437
Kontrol	0.76 ± 0.099	0.79 ± 0.136		
Toplam BMD				
Romatolojik	0.97 ± 0.153	0.92 ± 0.133	0.822	0.166
Kontrol	0.99 ± 0.100	1.02 ± 0.143		
DPD				
Romatolojik	8.45 ± 2.712	7.04 ± 2.370	0.138	0.002*
Kontrol	5.56 ± 2.220	4.75 ± 1.284		
İdr. GGT / idr. Kreatinin				
Romatolojik	0.53 ± 0.129	0.47 ± 0.126	0.618	0.842
Kontrol	0.46 ± 0.124	0.56 ± 0.188		

Tablo 19: Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda VDR genotiplerinin BMD (g/cm²), DPD (nmol/mmol Cr) ve idrar GGT/idrar kreatinin (IU/g Cr) ile ilişkisi

	bb (Ortalama ±ss)	Bb + BB (Ortalama ±ss)	P değeri (genotipler arası)	P değeri (gruplar arası)
L2-L4 BMD				
Romatolojik	1.08 ± 0.149	1.10 ± 0.146	0.360	0.077
Kontrol	1.14 ± 0.115	1.20 ± 0.157		
Boyun BMD				
Romatolojik	0.90 ± 0.099	0.91 ± 0.165	0.640	0.033*
Kontrol	0.98 ± 0.128	1.01 ± 0.090		
Wards BMD				
Romatolojik	0.72 ± 0.105	0.75 ± 0.191	0.401	0.049*
Kontrol	0.81 ± 0.129	0.85 ± 0.112		
TrokanterBMD				
Romatolojik	0.73 ± 0.097	0.75 ± 0.135	0.646	0.401
Kontrol	0.76 ± 0.115	0.76 ± 0.105		
Toplam BMD				
Romatolojik	0.94 ± 0.099	0.95 ± 0.162	0.922	0.174
Kontrol	1.00 ± 0.121	1.00 ± 1.102		
DPD				
Romatolojik	7.39 ± 2.657	7.79 ± 2.596	0.827	0.002*
Kontrol	5.58 ± 2.262	4.85 ± 1.421		
İdr. GGT / idr.				
Kreatinin				
Romatolojik	0.47 ± 0.116	0.51 ± 0.134	0.690	0.988
Kontrol	0.49 ± 0.122	0.48 ± 0.197		

Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda COLIA1 ve VDR genotiplerinin BMD, DPD ve idrar GGT/idrar kreatinin düzeyleri ile ilişkisi çift yönlü kovaryans analizi ile değerlendirildi. BMD değerleri, DPD, idrar GGT/idrar kreatinin düzeyleri genotipler açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı. *Gruplar arası değerlendirmede ise boyun BMD ($p=0.033$), wards BMD ($p=0.049$) düzeyleri romatolojik hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük, DPD ($p=0.002$) düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

Tüm hasta ve kontrollerimizin değerleri birlikte ele alındığında DPD düzeyleri ile idrar GGT/idrar kreatinin düzeyleri arasında pozitif korelasyon ($r=0.257$, $p=0.025$) saptandı.

IV.4. Anti-CCP2 ve CRP değerlendirilmesi

Tablo 20: CRP'nin ayrı ayrı çalışma gruplarına göre pozitif / negatif olma oranları.

	CRP Pozitif (%)	CRP Negatif (%)	Total (%)
Sjögren (n=17)	17.6	82.4	100
Sjögren+RA (n=16)	50	50	100
RA (n=25)	28	72	100
Sağlıklı kişiler (n=18)	11.1	88.9	100

Tablo 21: Anti CCP2'nin ayrı ayrı çalışma gruplarına göre pozitif / negatif olma oranları (Anti-CCP2 için ≥ 25 U/mL pozitif olarak alınmıştır).

	Anti-CCP2 Pozitif (%)	Anti-CCP2 Negatif (%)	Total (%)
Sjögren (n=17)	11.8	88.2	100
RA+sjögren (n=16)	62.5	37.5	100
RA (n=25)	28	72	100
Sağlıklı kişiler (n=18)	0	100	100

Tablo 22: Ayrı ayrı hasta gruplarına göre anti-CCP2'nin tanısal değerleri

	Sensitivite	Spesifite	(+)PD	(-)PD
Sjögren (n=17)	11.8	100	100	54.5
Sjögren+RA (n=16)	62.5	100	100	75
RA (n=25)	28	100	100	50
Toplam RA (n=41)	41.5	100	100	42.9

CRP ve anti-CCP2'nin ayrı ayrı gruplara göre pozitiflik / negatiflik oranları ve anti-CCP2 testine ait sensitivite, spesifite, (+)PD, (-)PD değerleri ki-kare analizi ile hesaplandı. CRP ve anti-CCP2'nin pozitifliği ile anti-CCP2'nin tanısal değerleri hasta grupları içinde RA+sjögren grubunda en yüksek, sjögren grubunda ise en düşük düzeyde saptandı.

V. TARTIŞMA

Günümüzde osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikroyapısının bozulmasına bağlı olarak kemik kırılabilirliğinde artış ile karakterize çok nedenli ve sık rastlanan bir iskelet sistemi hastalığı olarak tanımlanmaktadır (1). Osteoporoz belirgin kemik kaybı olmadan tanı konulursa önlenir ve etkin bir şekilde tedavi edilebilir. Çeşitli yöntemlerle riskler belirlenip tıbbi veya davranışsal risk faktörleri kontrol altına alınırsa akut ve kronik sorunların büyük bölümü engellenebilir.

Osteoporoz gelişiminde genetik faktörler kritik bir öneme sahiptir. Bu alanda yapılan çalışmalarla kayda değer sonuçlara ulaşılmış, çok sayıda polimorfizm iskelet sağlığıyla ilişkili bulunmuştur. Kemik mineral dansitesindeki toplam varyansın %80'i genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır (27). Osteoporozda genetik çalışmalarda incelenen ilk gen vitamin D reseptör (VDR) genidir. D vitamini normal kemik metabolizmasında vazgeçilmezdir. VDR genindeki çeşitli polimorfizmlerin kemik mineral yoğunluğu, kemik turnover ve osteoporotik kırık riski ile ilişkisi olup olmadığına dair pek çok çalışma vardır. Osteoporozla ilişkili en çok çalışılan genlerden bir diğeri ise COLIA1 genidir. VDR ve COLIA1 genleri çeşitli hastalık grupları ve etnik popülasyonlarda çalışılmıştır (27,28).

E.M.C Lau ve ark. (6) Hong Kong'da yaşları 50-79 olan 450 kadın ve yaşları 70-79 olan 233 erkek hastada yaptıkları bir çalışmada COLIA1 Sp1 (S/s) ve COLIA2 EcoR1 ve Puv II gen polimorfizmlerinin BMD (kemik mineral yoğunluğu) ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışılan 100 erkek ve kadın hastada COLIA1 genine hiç rastlanmamış, fakat erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p<0.05$) COLIA2 'nin EE ve PP genotiplerine rastlanmıştır. EE ve PP genotipli erkeklerde BMD değeri ee ve pp genotipi olanlara göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Hong Kong' lu kadınlarda ise benzer bir anlamlı ilişki saptanamamıştır ($p>0.05$). Sonuç olarak; Hong

Kong' lularda COLIA1 S/s polimorfizmi saptanamazken, COLIA2 EcoR1 ve Puv II genetik polimorfizmleri erkek hastalarda BMD ile ilişkili bulunmuştur.

P. Gerdhem ve ark. (89) tümü 75 yaşında olup bir taramaya katılan 1044 İsveç'li kadında COLIA1 Sp1 polimorfizminin femoral BMD ve yaygın el bileği kırıklarıyla ilişkisini araştırmışlardır. En azından bir 's' geni taşıyan kadınlarda femoral BMD %2.7 oranında düşük bulunmuş ($p < 0.027$), yaygın el bileği kırığı gözlenen 181 kadında ise 's' geni taşıma insidansı yüksek bulunmuştur (%22.1). Yine yaygın el bileği kırığı gözlenen kadınlarda SS geni ile karşılaştırıldığında; ss homozigot geni için odds ratio 2.73 (%95 GA 1.1-6.8), Ss heterozigot geni için odds ratio 1.4 (%95 GA 1.0-2.0) hesaplanmıştır. 75 yaşındaki İsveç'li kadınlarda yapılan bu geniş kapsamlı çalışmada COLIA1 Sp1 polimorfizmi ile kemik kütlesi ve kırık riski arasında ilişki olduğu saptanmıştır.

M. Bernard ve ark. (90) COLIA1 gen polimorfizmi ile lumbal bölge ve kalça BMD'si ve kırık prevalansı arasındaki ilişkiyi 319 İspanyol postmenapozal kadın üzerinde araştırmışlardır. 319 hastanın 98'i nonosteoporotik, 221'i osteoporotik bulunmuştur. 221 osteoporotik hastanın ise 139'unda kırık yok iken 82'sinde kırık gözlenmiştir. Tüm osteoporotik grup için genotiplerin görülme yüzdeleri; SS homozigot için %49.2, Ss heterozigot için %39.5, ss homozigot için %11.3 olarak saptanmıştır. ss genotipinin görülme yüzdeleri nonosteoporotik ve osteoporotik grup arasında önemli derecede farklı gözlenmiştir (%6.1 , %13.6). ss genotipinin görülme yüzdeleri osteoporotik kırıksız ve osteoporotik kırıklı grup arasında da anlamlı derecede farklı iken (%6.2 , %28), bu anlamlı farklılık ss genotipi ile lumbal bölge BMD'si ve kalça BMD'leri arasında saptanamamıştır.

S M F Pluijm ve ark. (91) COLIA1 Sp1 polimorfizminin olası osteoporoz ve/veya intervertebral disk dejenerasyonu ile ilişkisini Amsterdam'da 65 yaş üzeri toplam 966 kadın ve erkek üzerinde araştırmışlardır. Tüm hastalara kantitatif ultrasonografi yapılmış, serum osteokalsin ve idrar DPD düzeyleri ölçülmüştür. Vertebral deformiteler ve intervertebral disk dejenerasyonları direkt radyografik tetkikle değerlendirilmiştir (n=517). 485 kişilik gruptan tüm

vücut BMD, 512 kişilik gruptan ise lumbal bölge ve kalça BMD ölçümleri yapılmıştır. ss genotipli grubun SS ve Ss genotiplilerle karşılaştırıldığında yüksek disk dejenerasyon riskine sahip olduğu hesaplanmıştır (OR=3.6; %95 GA 1.3-10). Erkekler için en az bir 's' alleli olanların (Ss+ss) olmayanlara göre (SS) osteokalsin düzeyleri yüksek bulunmuştur (2.19 ± 0.09 nmol/L; 1.96 ± 0.06 nmol/L, $p=0.02$). COLIA1 polimorfizmi BMD ve kantitatif ultrasonografik değerlerin düşüklüğü, yüksek DPD düzeyleri ve artmış kırık riskiyle ilişkili bulunmamıştır.

R. W. Keen ve ark. (92) Londra'nın kuzeydoğusunda geniş bir popülasyondan cohort analizle seçtikleri 185 sağlıklı kadında, COLIA1 polimorfizminin (ortalama yaş; 54.3 ± 4.6) BMD düşüklüğü, kırık riski ve kollajen turnover artışıyla ilişkisini araştırmışlardır. BMD ölçümleri DXA ile, kırık tesbitleri radyografi ile, COLIA1 genotipi PCR ve endonükleaz sindirim teknikleriyle çalışılmış, elektroforetik olarak görüntülenmiştir. Genotiplerin görülme yüzdeleri; SS için %61.1, Ss için %36.2, ss için %2.7 olarak bulunmuştur. En az bir 's' alleli taşıyor olmak, lumbal bölgede BMD düşüklüğüyle ($p=0.02$), total kemik kırık riskinde önemli bir artışla ($p=0.04$) ilişkili bulunmuştur. İdrar DPD düzeyleri ise risk allelini (s) taşıyanlarda önemli düzeyde artış göstermiştir ($p<0.05$). Tüm bu sonuçlar; COLIA1 polimorfizminin total vücut tip I kollajen turnoverında da fizyolojik etkileri olduğunu göstermektedir.

Jesus Saintz ve ark. (93) COLIA1 polimorfizmini 6.7-12.3 yaşları arasında 109 sağlıklı, Meksika-Amerikan kökenli prepubertal kız üzerinde, ileride osteoporotik kırık riski gelişebilecek olan çocukları ayırt edebilmek amacıyla çalışmışlardır. Çalışmaya katılanların COLIA1 polimorfizmi belirlenmiş, vertebral BMD ölçümleri ve vertebral kemik boyutlarının ölçümleri yapılmıştır. SS genotipi ile karşılaştırıldığında Ss genotipi olanların ($n=22$) BMD'si %6.7, ss genotipi olanların ($n=1$) BMD'si %49.4 daha düşük bulunmuştur. Vertebral kemik boyutlarının ölçümleriyle COLIA1 polimorfizmi arasında ise herhangi bir ilişki tesbit edilememiştir.

M. Liden ve ark. (94) primer osteoporozu olan İsveç'li 64 hasta ve 72 sağlıklı gönüllüde sakıncalı "s" allelinin düşük BMD ile ilişkili olup olmadığını incelemiştir. Omurgada ve femoral boyunda BMD'si ile COLIA 1 genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Vertebra kırığı ve ciddi seviyede osteoporozu olan 36 hastada gözlenen genotip frekansları, aynı yaş grubundaki 67 sağlıklı gönüllü ile benzer bulunmuştur. Bu veriler; COLIA 1 genindeki Sp1 polimorfizminin, postmenopozal osteoporoz riski altındaki İsveç'li kişileri teşhis etmede klinik bir değeri olmadığını göstermektedir.

Jens P Berg ve ark. (95) COLIA1 Sp1 polimorfizminin tekil foton absorpsiyometresi (SPA) kullanılarak ölçülmüş önkol BMD kazanımıyla ve dual X-ray absorpsiyometresi (DEXA) ile ölçülmüş önkol, omurga, kalça, ve tüm vücut BMD'leri ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmaya yaşları 8.2 ± 16.5 arasında değişen 269 sağlıklı erkek ve kız dahil edilmiştir. İlk karşılaşmada ve 3.8 \pm 0.1 yıl sonra elde edilen önkol BMD değerleri BMD'deki yıllık yüzde değişimini hesaplamak için kullanılmıştır. Kalsiyum alımı ve fiziksel aktivite, yine ilk karşılaşmada ve 1 yılın sonunda detaylı bir sorgulama ile belirlenmiştir. Önkol BMD kazanımı veya önkol, omurga ve tüm vücut BMD'leri ile gözlenen üç COLIA genotipi arasında (SS, Ss, ss) önemli bir farklılık saptanamamıştır. Sonuç olarak, sağlıklı erkeklerde ve kızlarda COLIA1 geninde Sp1 bölgesindeki polimorfizm BMD veya önkol BMD'sinin kazanımı ile bağlantılı bulunmamıştır.

P. Garnero ve ark. (96) VDR genotipleri ve kırık riskini ortaya koymak amacıyla yaş ortalaması 62 olan 589 Fransız postmenopozal kadını ortalama 11 yıl boyunca izlemiştir. Çalışmaya dahil edilen kadınların vertebral ve nonvertebral kırık insidansları hesaplanmış, vertebra, total kalça ve radius kemik mineral yoğunlukları tesbit edilmiş, kemik turnover belirteçleri (serum CTx, serum kemik ALP, idrar CTx) ve endojen hormonları (serum östradiol, serum DEHA-S, SHBG, IGF-I, serum PTH, serum 25 (OH) vit D, serum kalsiyum) ölçülmüştür. VDR 'nin BsmI (B/b) genotipleri postmenopozal kadınlarda BMD'den, önkoldaki BMD kaybından,

kemik turnover belirteçleri ve endojen hormonlardan bağımsız olarak kemik kırık riskiyle ilişkili bulunmuştur (tüm vücuttaki kırık riski için $p=0.04$, vertebra kırık riski için $p=0.01$). bb genotipi ($n=213$) ile karşılaştırıldığında Bb genotipi ($n=286$) için odds ratio 1.5 (%95 GA, 0.95-2.4), BB genotipi ($n=90$) için odds ratio 2.1 (%95 GA, 1.16-3.79) olarak hesaplanmıştır.

Sumegra Mitra ve ark. (97) VDR polimorfizmleri (Apol, Bsml, Fakl, Tagl)'nin BMD ile ilişkisini araştırmak amacıyla yaş ortalaması 54.2 ± 3.4 olan 246 Hintli kadını dahil ettikleri bir çalışma yapmışlardır. aa, bb (Apol ve Bsml'ye ait restriksiyon bölgelerine sahip) FF, TT (Fakl ve Tagl'ye ait restriksiyon bölgeleri olmayan) genotipi olanların ortalama BMD'leri AA, BB, ff, tt genotipi olanlardan %10 daha fazla tesbit edilmiştir. BB, ff, tt genotipleri osteoporotik kemik kitlesi olan kadınlarda mevcut bulunmuş, tt ve BB genotiplerinin 55 yaş üzeri kadınlarda odds ratioları oldukça yüksek bulunmuştur. tt için odds ratio; 2.78 (%95 GA, 1.13-4.57), BB için odds ratio; 5.23 (%95 GA, 2.45-11.17). VDR gen polimorfizmleri Hintli kadınlarda BMD ile ilişkili bulunmuştur.

C. Vidal ve ark. (98) yaş ortalamaları 54.9 ± 6.8 olan 104 Malta'lı postmenapozal kadında VDR geninin Fakl ve Bsml (B/b) polimorfizmlerinin BMD ile korelasyonunu araştırmışlardır. Tesbit ettikleri allel dağılımları Fakl için; FF %60.4, Ff %30.7, ff %8.9, Bsml için; bb %31.7, Bb %51.9, BB %16.4 şeklinde olmuştur. FF ve bb allellerinde hem lumbal hem de femoral BMD'ler yüksek bulunmuş fakat bu yükseklik istatistiksel bir anlam ifade etmemiştir.

K. Zajickova ve ark. (99) yaş ortalamaları 62.5 ± 8.9 olan 114 postmenapozal Çekoslovak kadın üzerinde yaptıkları bir çalışmada VDR geninin Fakl, Bsml, Apal, Tagl polimorfizmlerinin BMD ve biyokimyasal kemik turnover markırları (ALP, osteokalsin, PICP, DPD, β_2 mikroglobulin) ile ilişkisini araştırmışlardır. VRD gen polimorfizmleri PCR ve endonükleaz sindirim tekniğiyle elde edildikten sonra elektroforetik olarak görüntülenmiştir. Lumbal bölge ve kalça BMD ölçülmesi DEXA ile yapılmıştır. Fakl bölgesine ait Ff alleleline sahip olanlara göre ff alleleline sahip

kadınların kalça BMD'leri %9.4 daha düşük tesbit edilirken ($p = 0.0459$), FF allellilerin kalça BMD'leri orta düzeyde bulunmuştur. ff alleleline sahip olanlarda lumbal bölde BMD'sinde de istatistiksel olarak anlamlı olmayan benzer bir düşüklük tesbit edilmiştir. VDR'nin Bsml, Apal, Tagl polimorfizmleri ise BMD ile hiçbir şekilde ilişkili bulunamamıştır. Ayrıca, osteoporotik kadınlarla non-osteoporotik sağlıklı kontroller arasında VDR gen polimorfizmleri açısından anlamlı bir fark saptanamamıştır. Apal bölgesine ait Aa alleli taşıyan kişilerde aa alleli taşıyanlara göre PICP seviyeleri daha yüksek saptanırken ($p = 0.0459$), VDR'nin Fakl, Bsml, Tagl polimorfizmleri ile kemik turnover markırları arasında herhangi bir ilişkisi saptanamamıştır.

B. L. Langdahl ve ark. (100) 192 osteoporozlu kadın ve erkek hasta ve 207 sağlıklı gönüllü kadın ve erkek üzerinde VDR geninin Fokl, Bsml, Apal, Tagl polimorfizmlerinin BMD, kemik turnover ve osteoporotik kırık prevalansı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Fakl polimorfizmi ile kemik kütlesi, kemik turnover ve osteoporotik kırık prevalansı arasında bir ilişki bulunamamıştır. Bsml polimorfizmi için ise; BB+Bb genotipliler osteoporotik kırıklı hastalar içinde daha yaygın olarak tesbit edilmiştir. Ayrıca bb genotiplilerin intertorakanterik bölge ($p < 0.0001$) ve total kalça ($p < 0.001$) BMD'leri daha yüksek bulunmuştur. Apal polimorfizmleri BMD ile ilişkili bulunmamıştır. Tagl bölgesi için; TT genotiplilerin intertorakanterik bölge BMD'leri, Tt veya tt genotiplilerle kıyaslandığında yüksek bulunmuş ($p < 0.01$), ancak lumbal bölge, femoral boyun, trokanterik bölge ve wards üçgeni BMD'lerinde herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.

Peter Rass ve ark. (101) VDR geninin Bsml polimorfizmini yaş ortalamaları 51.2 ± 23.2 olan 64 romatoid artritli kadın ve erkek hasta ve yaş ortalamaları 46.7 ± 19.4 olan kadın ve erkek 40 sağlıklı kontrol üzerinde araştırmışlardır. Osteoporoz gelişim patogenezi, yapılmış olan pek çok çalışmaya göre VDR geninin Bsml polimorfizmini kapsamaktadır. RA pek çok faktöre bağlı olarak kemik mineral yoğunluğu düşüklüğü ile ilişkilidir ancak RA ve VDR gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran az sayıda

çalışma mevcuttur. 'B' alleli taşıyan RA hastalarının BMD' lerinin düşük olduğu ve bir yıldan fazla bir sürede kemik kayıplarının arttığı saptanmıştır. RA'li grup ve kontrol grubu arasında VDR BsmI polimorfizmlerinin görülme oranları açısından istatistiki bir anlamlılık saptanmamıştır. bb genotipi için BB ve Bb genotipleriyle karşılaştırıldığında L2-L4 BMD düzeyleri anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.05$), DPD düzeyleri anlamlı düzeyde düşük ($p<0.05$) bulunurken, BB genotipi için Bb ve bb genotipleriyle karşılaştırıldığında idrardan kalsiyum atılımı anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.05$), RA gelişiminde bağımsız bir faktör olan RF ise anlamlı düzeyde düşük ($p<0.05$) bulunmuştur. BB genotipi taşıyanlarda osteokalsin düzeyleri diğer genotiplere oranla yüksek saptanmış ancak bu yükseklik istatistiksel olarak bir anlam ifade etmemiştir. 'B' ve 'b' allel ekspresyonundaki dengesizlik osteoporoz ile ilişkili RA patogeneğinde etkilidir ancak salt RA gelişimi ile VDR gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için daha ileri çalışmalar gerekmektedir

J. R. Garcia-Lozano ve ark. (102) kadın ve erkek 120 İspanyol RA'li hastada ve 200 kişilik sağlıklı gönüllüde VDR genotiplerini çalışmışlardır. VDR geninin BsmI, ApaI, TaqI polimorfizmleri PCR ve ardından enzimatik sindirim metodlarıyla çalışılmış, elektroforetik olarak görüntülenmiştir. VDR allellerinin dağılımı hasta ve kontrol grubu için benzer özellik gösterdiğinden VDR polimorfizmlerinin RA'li hasta grubuna bir etkisi olduğu gösterilememiştir. BB/tt genotipi düşük BMD ile pek çok çalışmada ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada da BB/tt genotipine sahip subgrupla RA'in erken evresindeki kadın hastalar arasında zayıf bir ilişki tesbit edilmiştir. VDR polimorfizminin RA ile hangi mekanizma ile bir ilişkisinin olduğu bilinmemekle birlikte, bu ilişkinin D vitamininin immünoregülatör etkilerine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Tuan V. Nguyen ve ark. (103) yaş ortalamaları 70 ± 7 olan 677 Avustralya'lı postmenapozal kadın üzerinde yaptıkları bir çalışmada VDR ve COLIA1 genlerinin kalça kırığı oluşumu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışmaya dahil edilen hastalar 14 yıl boyunca izlenmiş ve

bu süre içinde 69 postmenapozal kadında kalça kırığı oluşmuş. VDR geninin Taql polimorfizmi ve COLIA1 gen polimorfizmleri PCR ve elektroforetik yürütme teknikleriyle çalışılmıştır. VDR Taql' in tt genotipi (%16) ve COLIA1'in ss geotipi (%5)'nin artmış kalça kırığı riskiyle ilişkili olduğu tesbit edilmiştir. tt alleli için OR; 2.6 (%95 GA; 1.2-5.3), ss alleli için OR; 3.8 (%95 GA; 1.3-10.8) olarak hesaplanmıştır. Avusturalya'lı postmenapozal kadınlarda VDR geninin tt genotipi ve COLIA1 geninin ss genotipi BMD ile ve yaştan bağımsız olarak artmış kalça kırığı riskiyle ilişkili bulunmuştur.

Stiina Valimaki ve ark. (104) VDR ve COLIA1 gen polimorfizmlerinin Finlandiya'lı 513 erken postmenapozal kadında; kemik kütlesi (lumbal bölge ve kalça BMD'si), kemik turnover markırları [osteokalsin, PICP (prokollajen karboksi propeptid), PINP (aminoterminal propeptid), ICTP (tip I kollajen karboksi terminal telopeptid)] ve kemik kırıkları ile, 172 çok yaşlı kişide (>85 yaş) de kalça kırıkları ile ilişkisini araştırmışlardır. PICP, PINP ve ICTP RIA yöntemiyle, osteokalsin ise IRMA yöntemiyle saptanmıştır. Finlandiya'lı erken postmenapozal kadın popülasyonunda VDR ve COLIA1 polimorfizmleri kemik kütlesi veya kemik turnover oranını yansıtmamaktadır. Düşük enerjili kırıkları olan ve olmayan kadınlarda ve yine kalça kırığı hikayesi olan ve olmayan çok yaşlı popülasyondan oluşan grupta da VDR ve COLIA1 polimorfizmleri açısından bir özellik saptanamamıştır.

Genetik faktörler ve BMD ile ilişkili kadınlar üzerinde yapılmış pek çok çalışma olmakla birlikte osteoporotik erkeklerle bu konuda yapılmış çok fazla çalışma yoktur. V. Braga ve ark. (105) yaş ortalamaları 58.41 ± 5.64 olan 253 İtalyan erkek üzerinde yaptıkları çalışmada VDR, COLIA1 ve CTR (kalsitonin reseptör gen) gen polimorfizmlerinin kemik kütlesi, kemik turnover markırları (total ALP, kemik ALP, DPD) ve erkek seks hormonlarıyla (total testosteron, SHBG, östradiol, free androjen indeks) ilişkisini araştırmışlardır. VDR geni BsmI ve FokI polimorfizmleri ile COLIA1 polimorfizmlerinin BMD ile ilişkisi saptanamazken, lumbal bölge ($p < 0.005$) ve femoral boyun bölgesi ($p < 0.001$) BMD düşüklükleri ile CTR'nin CC genotipi arasında bir ilişki olduğu

saptanmıştır. CTR genotipleri ALP ($p<0.05$), kemik ALP ($p<0.001$) ve östradiol ($p<0.05$) düzeyleri ile de ilişkili bulunmuştur.

Çalışmaların bir kısmında, VDR veya COLIA1 genlerinin BMD ile ilişkisinin varlığı konusunda anlamlı sonuçlar elde edilirken, bir kısmında bu ilişki saptanamamıştır. Çalışma metodlarının farklılığı, değişik toplumlarda çalışılmış olması veya BMD ölçümlerinin farklı eklemlerden yapılmış olmasının bu sonuçlara yol açtığı düşünülmektedir. VDR ve COLIA1 gen polimorfizminin yanında, tanımlanmayı bekleyen daha birçok genin kemik yoğunluğu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Biz yaptığımız çalışmada bu iki genin polimorfizmlerini Sjögren sendromlu, romatoid artrit+Sjögren sendromlu ve romatoid artritli hastaları içeren bir grup romatolojik hasta üzerinde çalıştık. COLIA1 ve VDR genotipleri, romatolojik hasta grubumuz ve kontrol grubumuz için ayrı ayrı, hem osteopeni veya osteoporoz gelişmesi riski yönünden hem de BMD'yi etkilemesi açısından değerlendirildi ancak istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi. Çalışmamızın daha geniş hasta gruplarıyla yapılan çalışmalarla desteklenmesi uygun olacaktır.

İskelet hayat boyu yapılanmasını devam ettiren dinamik bir dokudur. Bu aktivitesini kemik yapımından sorumlu osteoblastlar ve yıkımından sorumlu osteoklastlar ile devam ettirir. Kemik döngüsü, osteoblastlar ve osteoklastların enzimatik aktivitelerinin ve yapım-yıkım sırasında dolaşıma geçen biyokimyasal markırlar olarak adlandırılan kemik matriksi elemanlarının ölçülmesiyle değerlendirilebilir. Biyokimyasal markırlar non-invazivdir ve kemik turnoverındaki akut değişimleri ortaya koyabilirler. Osteoporoz teşhisinde DEXA ile BMD ölçümü gold standart olarak kabul edilen bir teknik olmasına rağmen hastalığın takip aşamasında yüksek maliyeti ve sınırlı ulaşılabilirliği nedeniyle yerini artık biyokimyasal kemik markırlarına terk etmek üzeredir (51,52).

Markku T. Parviainen ve ark. (106) semptomatik osteoporozu olan postmenapozal kadınlarda üriner kemik yıkım markırlarının klinik yararlılığını randomize çift körlü plasebo kontrollü bir çalışmayla araştırmışlardır. Bir grup hasta ($n=14$, yaş ort. 63 ± 5) 24 ay boyunca bir hormon analogu (2.5 mg

Livial) ve 800 mg kalsiyumla tedavi edilirken, diğeri bir grup hastaya (n=19, yaş ort. 66±7) plasebo ve 800 mg kalsiyum verilmiştir. Üriner kemik yıkım markırlarından; piridinolin (PYD), deokspiridinolin (DPD) ve tip I kollajenin N-telopeptidleri (NTx) enzim immunasay metoduyla, üriner hidroksiprolin (HOP) ise HPLC metoduyla çalışılmıştır. Çıkan tüm sonuçlar mmol kreatinin'e oranlanmıştır. Her iki çalışma grubunda da tüm üriner kemik yıkım markırlarında bir düşme olduğu saptanmıştır. PYD ve HOP için Z skoru (tedavi uygulanmış grubu plasebo verilmiş gruptan ayırabilme gücü) diğerlerine kıyasla daha düşük saptanmıştır (PYD için; 0.06-1.52, HOP için; 0.68-1.47). Tedavinin 12. (p=0.0471) ve 24. (p=0.0466) ayları için DPD'nin iki çalışma grubu arasındaki farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (z skoru = 0.45-1.90). NTx'in özellikle tedavi uygulanan grupta tedavinin 6. ayında diğeri gruba göre düşüklüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0.0015, z skoru = 2.11-3.82). Lumbal bölge ve femoral boyun bölgesinin DEXA sonuçları ise iki yıllık çalışmanın sonucunda gruplar arasında istatistiksel bir anlamlılık ifade etmemiştir. Tip bir kollajen yıkım ürünlerinden NTx ve DPD gibi biyokimyasal üriner kemik yıkım markırlarının ölçülmesi, postmenapozal hastalarda hormon replasman tedavisi sonrasındaki pozitif klinik etkinin gözlenmesi açısından faydalı olabilmektedir.

Yutaru Asaba ve ark. (65) genetik fare modelleri ve insan denekleri kullanarak, idrar GGT'nin kemik rezorpsiyonu için potansiyel bir markır olup olmadığını araştırmışlardır. Kreatinine oranlanmış idrar GGT'nin, OPG null osteoporotik farelerde ve 10 postmenapozal osteoporozlu hastada (67-83 yaş arası) artmış olduğu gözlenmiştir. Her iki grupta aledronat tedavisinden sonra idrar GGT düzeylerinde DPD ve NTx'e paralel olarak düşme olduğu gözlenmiştir. Osteopetrotik farelerde ise osteoklastlar M-CSF ile indüklendikten sonra ve PTH infüzyonundan sonra idrar GGT, DPD'ye paralel bir artış göstermiştir. 551 postmenapozal kadından oluşan başka bir hasta grubunda da idrar GGT atılımı DPD ile yüksek bir korelasyon göstermiştir (p=0.49, p<0.0001). DPD 7.6 nmol/mmol Cr düzeyi üzerindeki hastalardaki osteoporozda idrar GGT atılımı için cut off değeri 40IU/g Cr

olarak tanımlandığında; sensitivitesi %61, spesifitesi %92 olarak hesaplanmıştır.

N. Yılmaz ve ark. (53) Gaziantep'te yaptıkları bir çalışmada premenapozal ve postmenapozal toplam 77 kadında DPD (deoksipiridinolin), PYD (piridinolin), total ALP, kemiğe spesifik ALP, osteokalsin, total kalsiyum, fosfor ve kreatinin düzeylerini ölçmüşlerdir. Hastaların DEXA'ları çekilerek gruplar hastaların BMD değerlerine göre oluşturulmuştur. DPD ve PYD düzeyleri; postmenapozal osteoporotik grupta (n=40) (8.7 ve 18.7 umol/mg kreatinin) postmenapozal non-osteoporotik grup (n=24) (5.1 ve 11.7 mumol/mg kreatinin, $p<0.0001$) ve premenapozal non-osteoporotik gruba (n=13) (6.0 ve 13.0 umol/mg kreatinin, $p<0.0005$) göre daha yüksek bulunmuştur. Yapılan ROC analizlerine göre osteoporoz tayininde DPD en yüksek diagnostik değere sahip bulunurken (0.846), bunu PYD (0.802) izlemiştir. Kemiğe spesifik ALP ve osteokalsin ise postmenapozal osteoporoz ayırımının yapılmasında yeterince etkin bulunmamıştır. Bu çalışma, postmenapozal osteoporoz teşhisinde kemik yıkım markırlarının yapım markırlarından daha etkin olduğuna işaret etmektedir.

Atsushi Komemushi ve ark. (107) Japonya'da kemik turnover markırları, kemik mineral yoğunluğu ve vertebroplasti sonrasında yeni oluşan kompresyon kırıkları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla, osteoporoza sekonder kompresyon kırığı olan 23 hasta üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Hastalar 4 haftadan uzun bir süre düzenli kontrollerine gelmişlerdir. Çalışma grubu öncelikle iki gruba ayrılmıştır; vertebroplasti sonrasında yeni kırık oluşmuş hastalar (grup F) ve yeni kırık oluşmamış hastalar (grup N). Bu iki grup arasında kemiğe spesifik ALP, üriner Tip I kollajenin N Telopeptidi (NTx), DPD ve BMD düzeyleri arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Daha sonra hastalar yüksek riskli (grup H: üriner tip I kollajenin N-telopeptidi >54.3 nmol BCE/mmol Cr veya üriner deoksipiridinolini >7.6 nmol/mmol Cr, ve serum kemik ALP <29.0 U/l) ve düşük riskli olmak üzere tekrar ikiye ayrılmış, bu iki grup arasında da yeni

kırık gelişme riskinin oranı araştırılmıştır. F ve N grupları arasında kemik turnover markırları ve BMD açısından herhangi bir farklılık saptanmamıştır. H ve L grupları arasında ise yeni kırık oluşması açısından önemli derecede farklılık saptanmıştır (p=0.03). Kemik yıkım markırlarının yüksek seviyeleri ile kemik yapım markırlarının normal seviyelerinin perkutan vertebroplasti sonrasındaki yeni kırık oluşumlarıyla ilişkili olabileceği bulunmuştur.

Son yıllarda bu markırlarla ilgili yapılmakta olan pek çok çalışma vardır. Biz de yaptığımız çalışmada kemik markırlarından deoksidridinolin ve idrar gama-glutamiltransferazı kullandık. DPD ve idrar GGT'yi çalıştığımız VDR ve COLIA1 genotipleriyle korele ettiğimizde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edemedik ancak romatolojik hasta grubu ve kontrol grubu arasında yapılan korelasyonda boyun BMD (p=0.033), wards BMD (p=0.049) düzeyleri romatolojik hasta grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük, DPD (p=0.002) düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptandı.

Romatoid artrit, popülasyonun %0.5-1'ini etkileyen en sık rastlanan otoimmün hastalıklardan bir tanesidir. Romatoid artrit yaygın, ilerleyici eklem hasarına sebep olan ve çoğu kez ciddi sakatlık ve zayıf yaşam kalitesiyle sonuçlanan sinovyumun kronik olarak inflamasyonu ile karakterize olmuş, sistematik bir hastalıktır. Temel olarak hastalığın klasifikasyonu Amerikan Romatoloji Koleji'nin (ACR) tanımladığı kriterlere göre yapılır. Hastalığın kliniğinin oturmasını beklemek yerine, eklem hasarının gösterilmesi ile erken tanı konulması önem kazanmıştır (108,109). En eski ve en iyi bilinen bir markır olan romatoid faktör (RF)' den sonra sitrulinated peptidlere karşı oluşan yeni bir antikor grubunun (anti-CCP, cyclic citrullinated peptide) tanımlanması erken tanı için umut verici olmuştur (110). Son dört yıl içerisinde yayınların artan bir kesimi ikinci jenerasyon anti-CCP (anti-CCP2) testinin erken RA teşhisi için, yaygın olarak kullanılan fakat daha az spesifik olan rheumatoid faktör testiyle karşılaştırılabilir derecede yüksek spesifiklikte olduğunu ve bu bakımdan günümüz için seçilen bir erken tanı markırı haline gelebileceğini bildirmiştir. Ayrıca, anti-CCP2 pozitifliği

gelecekteki RA gelişmelerini hem asemptomatik bireylerde hem de farklılaşmamış artritli olan hastalarda tahmin edebilmektedir. Buna ilaveten, sunulan antikör seviyeleri eroziv hastalığa doğru gidişle korelasyon gösterebilmektedir (111)

V. P. Nell ve ark. (109) erken inflamatuvar eklem hastalığı bulunan 200 hasta üzerinde yaptıkları bir çalışmada RA tanısı ve erken artritli vakaların sonuçlarının tahmininde RF, anti CCP ve anti-RA33'ün değerliliğini araştırmışlardır. Bu otoantikörler hastalarla ilk karşılaştığında ölçülmüştür. Hastaların 102'si zaman içinde RA tanısını alırken, 98 kişide diğer inflamatuvar eklem hastalıkları gelişmiştir. RF için 50 cut-of değeri olarak alındığında; anti-CCP ve anti-RA33' ün tanıya ek bir katkı getirmediği gözlemlenmiştir. Yüksek titre RF ve anti-CCP' nin sensitivite-spesifite değerleri birbirine yakın bulunurken (RF; sensitivite %45,spesifite %96, anti-CCP; sensitivite %41,spesifite %98), anti-RA33'ün sensitivite-spesifite değerleri (sensitivite %28, spesifite %90) daha düşük bulunmuştur. RA gelişen grupta bu otoantikörlerden en az birisi %72 oranında pozitif bulunurken RA gelişmeyen grupta bu oran %15 olarak hesaplanmıştır. Yüksek titre RF (+PD %78, p=0.002) ve anti-CCP (+PD %88, p<0.001) eroziv hastalık gelişeceğinin habercisi olurken, anti-RA33 (+PD %61, p=0.51) daha ılımlı hastalıkla ilişkili olarak tesbit edilmiştir. Erken inflamatuvar eklem hastalığı gelişenlerde sırasıyla RF, anti-CCP (eğer RF < 50 U/ml ise) ve son olarak ta anti-RA33 bakılması RA gelişecek hastaların erken ayırt edilmesinde büyük yarar sağlayacağı bildirilmiştir.

Sumeet Agrawal ve ark. (112) RA tanısı almış 129 hasta üzerinde; bir grup otoantikörün hastaların mevcut erozyon, deformite ve ekstraartiküler tutulumlarıyla olan ilişkisini araştırmışlardır. Otoantikörlerden IgM RF; nefelometrik, IgA RF ve anti-CCP; ELISA, AKA ise indirekt immunofloresan yöntemle tayin edilmiştir. Bu otoantikörlerin prevalansları; IgM RF %82.2, anti-CCP %82.2, AKA %51.9, IgA RF %45 olarak hesaplanmıştır. Anti-CCP (p=0.02, p=0.007), AKA (p=0.002, p=0.048) ve IgM RF (p=0.02, p=0.07) erozyon ve deformitelerle ilişkili bulunurken, IgA RF erozyon ve

deformitelerle ilişkili bulunamamıştır. Hiçbir otoantikörün ekstraartiküler tutulumla ilişkisi saptanamamıştır.

J. Venkovsky ve ark. (113) bir grup parametrenin erken RA'li hastalardaki progresif ve eroziv ilerleyişi önceden tahmin etme yeteneğini değerlendirmek amacıyla 2 yıldan az bir süredir RA hastalığı olan 104 hasta üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Bakılan parametrelerden anti-CCP, IgM, IgA ve IgG RF'ler ELİSA yöntemiyle çalışılırken AKA (anti keratin antikörler) ve APF (anti perinükleer faktör) indirekt immunofloresan yöntemle çalışılmıştır. Hastalar, erozyon olup olmamasına göre ve 24 ay sonunda Larson skorlarında ilerleme olup olmamasına göre ikiye ayrılmışlardır. Erozyon olan (n=67) ve olmayan (n=37) iki grup arasında anti-CCP (p=0.002), AKA (p=0.001), APF (p=0.021), IgM RF (p=0.008), IgA RF (p=0.024), IgG RF (p=0.021) pozitifliği açısından istatistiksel yönden önemli farklılık olduğu gözlenmiştir. 24 ayın sonunda Larson skorlarında ilerleme olan ve olmayan iki grup arasında da benzer şekilde anti-CCP (p<0.001), AKA (p<0.001), APF (p=0.005), IgM RF (p=0.05), IgA RF (p=0.003), IgG RF (p<0.001) açısından istatistiksel yönden önemli farklılık olduğu gözlenmiştir. Anti-CCP ve IgM RF'nin birlikte bakılması ise erozyon (p=0.019) ve progresyonun (p<0.001) en iyi şekilde gösterilmesini sağlamıştır .

Annette HM van der Helm-van ve ark. (114) 228'i anti-CCP(+), 226'sı anti-CCP(-) olan 454 RA' li hasta ile yaptıkları bir çalışma da anti-CCP(+) olan ve anti-CCP(-) olan hastaların farklı klinik prezentasyon gösterip göstermediklerini araştırmışlardır. İki grup 4 yıl boyunca; hastalığın erken semptomları, şişmiş eklemlerin sayısı ve hassasiyeti, C-reaktif protein düzeyleri ve şişmiş eklemlerdeki radyolojik destrüksiyon açısından izlenmiştir. Sabah sertliği, erken semptomların tipi, dağılımı ve lokalizasyonu, hastalığın aktiflik derecesi, C-reaktif protein düzeyleri, etkilenen eklem sayıları ve ortalama hassasiyeti açısından gruplar arasında bir farklılık gözlenmezken, anti-CCP(+) olan hastaların etkilenen eklemlerinin daha çok şişmiş olduğu ve daha çok ciddi radyolojik destrüksiyona uğradığı tesbit edilmiştir. Anti-CCP (+) ve (-) grupların klinik prezentasyonları benzer

olsa da, aslında anti-CCP(+) olanların hastalığının daha ağır bir yol izlediği bildirilmiştir.

F. A. Van Galen ve ark. (84) yaptıkları bir çalışmada anti-CCP1 ve anti-CCP2 testlerinin diagnostik performans ve prognostik değerlerini klinik bir çalışmayla karşılaştırmayı amaçlamışlardır. Anti-CCP1 ve anti-CCP2'nin bazal değerleri yeni artrit tanısı almış 467 hastanın serumundan ELISA yöntemiyle çalışılmıştır. 1 yılın sonunda testin RA'li hastaları RA'i olmayanlardan ayırt edebilme yeteneğini ortaya koyan sensitivite, spesifite, değerleri hesaplanmıştır. Spesifite değerleri (anti-CCP1; %97, anti-CCP2; %96, $p=0.8$) benzer bulunsada, anti-CCP2 (%54) anti-CCP1'e (%42) göre daha yüksek sensitivite değerine sahip bulunmuştur ($p=0.05$). RA'li hastalardaki radyografik eklem hasarlanmalarındaki ilerleyiş 4 yıl boyunca takip edilmiş ve CCP testlerinin prognostik değerlerinin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Anti-CCP2 testi anti-CCP1'e göre yüksek oranda eklem hasarı progresyonu olan daha fazla sayıda hastayı ayırt edebilmektedir. Çoklu regresyon analizlerinde anti-CCP2 eklem hasarı gösterilmesinde en iyi belirteç olarak saptanmıştır. Sonuç olarak; anti-CCP2'nin, anti-CCP1'e göre daha iyi bir diagnostik ve prognostik değere sahip olduğu bildirilmiştir.

F. A. Van Galen ve ark. (85) yeni artrit tanısı almış 936 hasta üzerinde RA' e spesifik siklik sitrulinated peptidlere karşı oluşan otoantikörlerin tanısal değerini ortaya koymak amacıyla diğer bir çalışma yapmışlardır. 936 hastanın bazal anti-CCP2 düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. 2 hafta sonunda herhangi bir hastalık grubuna dahil edilemeyen hastalar tanımlanamamış artritli vakalar ($n=318$) olarak sınıflandırılmıştır. Tanımlanamayan artriti olan bu 318 hasta 3 yıl boyunca izlenmiş ve hastalıklarının American Romatoloji Koleji' nin (ACR) tanımlamasına uyan RA' e dönüşüp dönüşmediği gözlemlenmiştir. 3 yıl sonunda bu 318 hasta içinden, anti-CCP2' si (-) olan 249 kişinin 63' ünde (%25) RA gelişirken, anti-CCP2' si (+) olan 69 kişinin 64'ünde (%95) RA gelişmiştir (toplam 127 kişi), [OR; 37.8 (%95 CI, 13.8-111.9)]. Anti-CCP2 için tanısal özellikler; sensitivite=%50, spesifite=%97, pozitif prediktif değer=%93, negatif prediktif

değer=%75 olarak hesaplanmıştır. Tanımlanamamış artritli olan vakalarda anti-CCP2 tayini, ACR kriterlerini tam karşılayan RA gelişecek hastaların büyük bir bölümünü doğru bir şekilde tahmin etmeyi sağladığı bildirilmiştir.

J. E. Gottenberg ve ark. (8) anti-CCP ve AKA (anti keratin antikolları)'nın primer Sjögren sendromundaki prevalansını ortaya koymak amacıyla, Avrupa/Amerika konsensus kriterlerine göre tanısı konmuş 149 sjögren hastası üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Anti-CCP testi ELISA yöntemiyle, AKA testi ise indirekt immunofloresan yöntemle çalışılmıştır. Ayrıca hastaların el ve ayak grafileri çekilmiştir. 149 hastanın 15' inde (9 hasta non-eroziv, 6 hasta eroziv artritli) aynı zamanda RA varlığı da tesbit edilmiş ve bu hastalara RA' e sekonder gelişmiş sjögren hastalığı teşhisi konulmuştur. Geriye kalan 134 primer sjögrenli hastadan; 80 hastada (%59) RF IgM (+), 10 hastada (%7.5) anti-CCP (+), 7 hastada (%5.2) AKA (+), 5 hastada (%3.7) AKA ve anti-CCP (+) olarak saptanmıştır. Anti-CCP (+) ve (-) olan hastalar arasında RF pozitifliği, klinik ve biyolojik özellikler açısından herhangi bir farklılık saptanmamıştır. RA için ACR kriterlerini karşılayan 9 non-eroziv artritli sjögren hastasının hepsinde anti-CCP (+) saptanmıştır. Primer sjögrenli hastaların çoğunda anti-CCP ve AKA negatif saptanmıştır. Anti-CCP' si (+) olan hastalar RA gelişimine aday olduğu ve. bu hastaların uyarıya ve radyografik takibe ihtiyacı olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda da primer sjögrenli (n=17), RA+sjögrenli (n=16), RA'lı (n=25) hasta grupları ve kontrol grubundan (n=18) anti-CCP2 ve CRP çalışıldı. Anti-CCP2'nin prevalansı sjögrenli grupta %11.8, RA+sjögrenli grupta %62.5, RA'lı grupta %28, olarak bulundu. Anti-CCP2'nin tanısal değerleri hesaplandığında ise; en yüksek sensitivite (%62.5), spesifite (%100), +PD (%100), -PD (%75) değerleri literatürle uyumlu olarak, RA kliniğinin daha ağır seyrettiği RA+sjögren grubunda saptanırken, sjögren için hesaplanan sensitivite (%11.8), spesifite (%100), +PD (%100), -PD (%54.5) sonuçları daha zayıf tanısal değerlilikte bulundu.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Bölgemizde; ilk kez yapılan tip I kollajen alfa1 (COLIA1) Sp1 gen polimorfizmi tayinlerinde romatolojik hasta grubunda (n=48) COLIA1 geninin SS genotipi %43, Ss+ss genotipleri %56.3 oranında, kontrol grubunda (n=16) ise bu genotipler sırasıyla %68.8 ve %31.3 oranlarında saptandı.
2. Bölgemizde; ilk kez yapılan vitamin D reseptör (VDR) gen BsmI polimorfizmi tayinlerinde romatolojik hasta grubunda (n=48) VDR geninin bb genotipi %33.3, Bb+BB genotipi %66.7 oranında, kontrol grubunda (n=16) ise bu genotipler sırasıyla %62.5 ve %37.5 oranlarında saptandı Hasta ve kontrol gruplarındaki her iki genotipik dağılım istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
3. Romatolojik hasta grubunda en az bir 's' alleleline sahip olan kişilerde, SS genotipine sahip olanlara göre osteopeni veya osteoporoz gelişme riski [odds ratio (OR) 2.63 (%95 GA, 0.7–9.19, p=0.131)] kontrol grubuna oranla daha yüksek bulunmasına rağmen [OR 0.8 (%95 GA, 0.093–6.85, p=0.893)] sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi.
4. Romatolojik hasta grubunda en az bir 'B' alleleline sahip olan kişilerde, bb genotipine sahip olanlara göre osteopeni veya osteoporoz gelişme riski [OR 0.636 (%95 GA, 0.166–2.45, p=0.511)] kontrol grubuna oranla daha düşük bulundu [OR 1.5, (%95 GA 0.195–11.54, p=0.697)], sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi.
5. Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda COLIA1 ve VDR genotiplerinin BMD, DPD ve idrar GGT / idrar kreatinin düzeyleri ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.
6. Gruplar birbiri ile kıyaslandığında boyun BMD, wards BMD düzeyleri romatolojik hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı düşük (p=0.033, p=0.049), DPD düzeyleri ise anlamlı yüksek (p=0.002) bulundu.

7. Tüm hasta ve kontrollerimizin değerleri birlikte ele alındığında DPD düzeyleri ile idrar GGT / idrar kreatinin düzeyleri arasında pozitif korelasyon ($r=0.257$, $p=0.025$) saptandı.

8. COLIA1 ve VDR genotipleri, hem osteopeni veya osteoporoz geliştirmesi riski yönüyle hem de BMD'yi etkilemesi açısından değerlendirilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilemedi.

9. Anti-CCP2'nin pozitif olma yüzdesi, sensitivite, spesifite, (+)PD, (-)PD gibi tanısal değerler sjögrenli hasta grubunda romatoid artritlilere oranla daha düşük bulundu, böylece anti-CCP2'nin sjögren tanısı konulmasında iyi bir markır olmadığı sonucuna varıldı.

10. Çalışmamızın, anti-CCP2'nin ELİSA testi ile Biyokimya laboratuvarında denenerek rutin test olarak uygulanmaya başlanmasında yararı olmuştur.

VII. ÖZET

Amaç: Osteoporoz risk allellerinden vitamin D reseptör (VDR) gen BsmI polimorfizmi, tip I kollajen alfa1 (COLIA1) Sp1 gen polimorfizmi ve kemik yıkım markırları arasındaki ilişkiyi ve anti-siklik sitrulline protein antikolları (anti-CCP2)'nın Sjögren sendromu için tanı markırı olarak kullanılabilirliğini araştırmak amaçlandı.

Materyal-metod: Celal Bayar Üniversitesi Romatoloji polikliniğine geliş sırasına göre 17 primer Sjögren sendromlu (Grup 1), 16 romatoid artritli beraber Sjögren sendromlu (Grup 2), 25 romatoid artritli kadın hasta (Grup 3) ile sağlıklı 18 kadın çalışmaya dahil edildi. Hasta ve kontrol gruplarından COLIA1 ve VDR gen polimorfizmi tayinleri, kemik dansitometrisi (DEXA) ölçümleri, deokspiridinolin (DPD), idrar gama-glutamil transferaz (GGT), idrar kreatinin, C-reaktif protein (CRP), anti-CCP2 tayinleri yapıldı. İstatistiksel analizlerinde SPSS 10.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Romatolojik hasta grubunda en az bir 's' alleleline sahip olan kişilerde, SS genotipine sahip olan kişilere göre sekonder osteopeni ve/veya osteoporoz gelişmesi riski 2.63 kat (%95 GA, 0.75–9.19, p=0.131), kontrol grubunda ise 0.8 kat (%95 GA, 0.093–6.85, p=0.893) artmış, yine romatolojik hasta grubunda en az bir 'B' alleleline sahip olan kişilerde, bb genotipine sahip olan kişilere göre osteopeni veya osteoporoz gelişmesi riski 0.636 kat (%95 GA, 0.166–2.45, p=0.511), kontrol grubunda ise 1.5 kat (%95 GA, 0.195–11.54, p=0.697) artmış olarak saptandı. Romatolojik hasta grubu ve kontrol grubunda COLIA1 ve VDR genotiplerinin BMD, DPD/kreatinin ve idrar GGT/kreatinin düzeyleri ile ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamazken, gruplar arası değerlendirmede boyun BMD(p=0.033) ve wards BMD(p=0.048) düzeyleri romatolojik hasta grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı düşük, DPD (p=0.001) düzeyleri ise anlamlı yüksek bulundu. Anti-CCP2 pozitifliği (≥ 25 U/mL) sırasıyla Grup1, Grup2, Grup 3'te %11.8, %62.5, %28 oranında

bulundu. Anti-CCP2'nin sensitivite, spesifite, (+)PD, (-) PD değerleri Sjögren grubunda sırasıyla %11.8, %100, %100, %45, RA+Sjögren grubunda %62.5, %100, %100, %75, RA grubunda %28, %100, %100, %50, olarak hesaplandı.

Sonuçlar: Romatolojik hasta grubunda BMD düzeyleri anlamlı düşük, DPD düzeyleri ise anlamlı yüksek bulunmuştur. Genetik incelemelerde istatistiksel fark bulunamamasının grupların sayıca yetersiz olmasıyla ilişkili olabileceği ve daha geniş popülasyonlarla yapılan çalışmalarda daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, Romatoid artrit, Sjögren sendromu, Kollajen, Deokspiridinolin, Gen polimorfizmi, Kemik mineral yoğunluğu.

VII. İNGİLİZCE ÖZET / ABSTRACT

The Assessment Of Anti-CCP2 Levels and Collagen Type 1 α 1 S/s, Vitamin D Receptor B/b Binding Site Polymorphisms In Rheumatoid Arthritis And Sjogren's Syndrome

Aim: To evaluate the relationship between risk alleles of osteoporosis [Bsm1 polymorphism of vitamin D receptor (VDR) gene, Sp1 polymorphism of the collagen I alpha 1 (COLIA1) gene], biochemical markers of bone turnover and to evaluate the feasibility of using anti-CCP2, as a possible diagnostic marker for sjogren syndrome.

Methods: We enrolled 48 consecutive patients from Celal Bayar University Rheumatology out patient clinic follow-up patients consisting of 17 primary Sjogren's syndrome (Group 1), 16 Sjogren's syndrome with rheumatoid arthritis (Group 2) and 25 rheumatoid arthritis (Group 3) female patients. Our control group consisted of age-matched 18 healthy female volunteers. COLIA1 and VDR gene polymorphisms, Dual X-ray absorptiometry (DEXA) measurements, deoxypyridinoline (DPD), urine gamma-glutamyl transferase (GGT), urine creatinine, C-reactive protein (CRP) and anti-cyclic citrullinated protein antibodies (anti-CCP2), assesments were done from the patient and the control groups. SPSS 10.0 program was used in the statistical analysis.

Results: The odds ratio for secondary osteopeni and/or osteoporosis was for having at least one 's' allele 2.63 (95% CI, 0.75–9.19, p=0.131) in rheumatologic disease patients, 0.8 (95% CI, 0.093–6.85, p=0.893) in the control group, when compared with the SS homozygotes. The odds ratio for secondary osteopeni and/or osteoporosis was for having at least one 'B' allele 0.636 (95% CI, 0.166–2.45, p=0.511) in rheumatologic disease patients, 1.5 (95% CI, 0.195–11.54, p=0.697) 0.8 (95% CI, 0.093–6.85, p=0.893) in the control group, when compared with the bb homozygotes. When the relationships of COLIA1 and VDR genotypes with bone mineral density (BMD), DPD, and urine GGT/urine kreatinine levels were assessed in terms of genotypes in rheumatologic disease patients group and control group no

significant relationship was found, whereas in within groups evaluations, neck BMD ($p=0.033$) and wards BMD ($p=0.049$) levels in rheumatologic patient group were statistically lower and DPD levels ($p=0.002$) were statistically higher relative to the control group. Anti-CCP2 positivity (≥ 25 U/mL) in Group 1, Group 2, Group 3 was found as 11.8%, 62.5% and 28% respectively. The calculated sensitivity, specificity, pozitiv predictivity, negativ predictivity for anti-CCP2 was, in the Sjogren group 11.8%, 100%, 100%, 45%, in the RA+Sjogren group 62.5%, 100%, 100%, 75% and in the RA group 28%, 100%, 100%, 50% respectively.

Conclusions: BMD levels in rheumatologic patient group were statistically lower and DPD levels were statistically higher relative to the control group. The statistical insignificance in genetic assesments could be related to the limited number of patients in groups, further research is needed conducted with larger populations.

Key Words: Osteoporosis, Rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, Collagen, Deoxypyridinoline, Gene polymorphism, Bone mineral density.

IX. KAYNAKLAR

1. Eryavuz M. Osteoporozun tanımı ve sınıflandırılması. Kutsal YG, ed; Osteoporoz (içinde). İstanbul: Sürat Matbaacılık, 1998:1-7.
2. Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. Osteoporos Int. 1994 Nov;4(6):368-81.
3. Melton LJr 2000 Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. J Bone Miner Res 15:2309-2314.
4. Sindel D. Tanı yöntemleri. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi Osteoporoz Özel Sayısı 2002;2(1):17-29.
5. Barbara M. Obermayer-Pietsch, Gerwig E. Frühauf, Kornelia Chararas, Sabine Mikhail-Reinisch, Wilfried Renner, Andrea Berghold, Lukas Kenner, And Carolin Lackner. Association Of The Vitamin D Receptor Genotype *Bb* With Low Bone Density In Hyperthyroidism. Journal Of Bone And Mineral Research October 2000;15,(10):1950-6.
6. E.M.C Lau, D.T.K Choy, M. Li, J. Woo, T. Chung, A. Sham. The Relationship Between COLIA1 polymorphisms (Sp1) and COLIA2 polymorphisms (Eco R1 and Puv II) with Bone Mineral Density in Chinese Men and Women. Calcif Tissue Int 2004;75:133-137.
7. Tsuneyo Mimori. Clinical Significance of Anti-CCP Antibodies in Rheumatoid Arthritis. Internal Medicine 2005;44:1122-1126.
8. C Labarre, O Meyer, J Sibilis and X Mariette J-E Gottenberg, S Mignot, P Nicaise-Rolland, J Cohen-Solal, F Aucouturier, J Goetz. Prevalence of anti-cyclic citrullinated peptide and anti-keratin antibodies in patients with primary Sjögren's syndrome. Ann Rheum Dis 2005;64:114-117.

9. Göksoy Turgut. Osteoporoz Tanımı ve Giriş. Göksoy T, ed; Osteoporozda Tanı ve Tedavi (içinde). İstanbul; Bilmedya Grup, 2000:3-6.
10. Bartl R, Frisch B. Osteoporozun Tanımı. Akıncı A, Çeviri editörü. Osteoporoz Teşhis, Korunma, Tedavi Tanı.1.baskı Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınları, 2000:24.
11. Conference Report. Consensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis. The Aim of Medicine 1993;94:646-650
12. Kavuncu V. Osteoporozda sınıflama. Göksoy T, ed; Osteoporozda Tanı ve Tedavi (içinde). İstanbul: Bilmedya Grup, 2000:204-213.
13. Eskiuyurt N. Osteoporozda Risk Faktörleri. Prospect Osteoporoz Sayısı 1998;2(3):110-111.
14. R Rizzoli, J-P Bonjour and S L Ferrari. Osteoporosis, genetics and hormones Journal of Molecular Endocrinology 2001;26:79-94.
15. Buck Walter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. J Bone and Joint Surg 1995:77-A;1256-1289.
16. Stevenson J, Marsh M. Kemik Yapısı. Curtes J 2nd ed; Osteoporoz Atlası (içinde). Spain: Parthenon Publishing Group 2000:14-18.
17. Rodan AG, Rodan SB. The cells of bone. In: Riggs BL, Melton III LJ eds. Osteoporosis. Lippincott-Raven, Philadelphia: 1995:1-40.
18. Oral A. Osteoporozda Patofizyoloji. Kutsal Y, ed; Modern Tıp Seminerleri, Osteoporoz (içinde). Ankara: Güneş Kitabevi, 2001:28-44.
19. Tüzün F, Akarırmak Ü, Dinç A. Osteoporoz Patogenezi. Tüzün F, Akarırmak Ü, ed; Kemik ve Eklem Dekadında Osteoporoz (içinde). İstanbul 2002:25-45.
20. Vernejoul M. Bone Structure and Function. In: Guenses P, Osteoporosis in Clinical Practice, London: 1998:1-4.
21. Manolagos SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. N Engl J Med 1995, 332:305-311.

22. Lane N, Jergas M, Genant H. Osteoporosis and Bone Mineral Assesment. In: Kopman WJ eds. Arthritis and Allied Conditions a Textbook of Rheumatology, 13.th ed. Baltimore: Williams and Wilkins 1997:153-168.
23. Melton LJ.3rd, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL, Perspective. How many women have osteoporosis? J Bone Miner Res 1992;7:1005-10.
24. Burckhardt P, Michel C. The peak bone mass concept. Clin Rheumatol. 1989 Jun;8 Suppl 2:16-21. Review.
25. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman D, Rizzoli R. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. J Clin Endocrinol Metab. 1991 Sep;73(3):555-63.
26. Chesnut CH 3rd. Theoretical overview: bone development, peak bone mass, bone loss, and fracture risk. Am J Med. 1991 Nov 25;91(5B):2S-4S. Review.
27. Ralston SH. Genetics of osteoporosis. Proc Nutr Soc. 2007 May; 66(2):158-65. Review.
28. Kelly PJ, Hopper JL, Macaskill GT, Pocock NA, Sambrook PN, Eisman JA. Genetic factors in bone turnover. J Clin Endocrinol Metab. 1991 Apr;72(4):808-13.
29. Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. J Bone Miner Res. 1996 Mar;11(3):306-11.
30. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993 Jun;94(6):646-50. Review.
31. Block JE, Genant HK, Black D. Greater vertebral bone mineral mass in exercising young men. West J Med. 1986 Jul;145(1):39-42.
32. Nilsson BE, Westlin NE. Bone density in athletes. Clin Orthop Relat Res. 1971;77:179-82.

33. Davies KM, Pearson PH, Huseman CA, Greger NG, Kimmel DK, Recker RR. Reduced bone mineral in patients with eating disorders. *Bone* 1990;11(3):143-7.
34. Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and purposes of bone remodeling. Implications for the understanding of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. San Diego, California: Academic Press 1996:315-329.
35. Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop Relat Res*. 1987 Feb;(215):260-71.
36. Mellish RW, Garrahan NJ, Compston JE. Age-related changes in trabecular width and spacing in human iliac crest biopsies. *Bone Miner*. 1989 Jul;6(3):331-8.
37. Kassem M, Melton LJ III, Riggs BL. The type I / type II model for involutional osteoporosis. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. San Diego, California: Academic Press 1996:691-702.
38. Eastell R, Yergey AL, Vieira NE, Cedel SL, Kumar R, Riggs BL. Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function and age in women: evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. *J Bone Miner Res*. 1991 Feb;6(2):125-32.
39. Quesada JM, Coopmans W, Ruiz B, Aljama P, Jans I, Bouillon R. Influence of vitamin D on parathyroid function in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Aug;75(2):494-501.
40. 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. Review.
41. Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation,

- resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J Bone Miner Res.* 1990 Apr;5(4):311-9.
42. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996 Aug;11(8):1043-51. Review.
43. Cohen-Solal ME, Shih MS, Lundy MW, Parfitt AM. A new method for measuring cancellous bone erosion depth: application to the cellular mechanisms of bone loss in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1991 Dec;6(12):1331-8.
44. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, McCracken R, Avioli LV. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Jun 15;88(12):5134-8.
45. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992 Jul 3;257(5066):88-91.
46. Cantürk F. Osteoporozda Klinik Bulgular. Kutsal Y, ed; *Modern Tıp Seminerleri Osteoporoz (içinde)*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2001:93-98.
47. Nevitt MC. Epidemiology of osteoporosis In: Lane NE ed. *Rheumatic Disease Clinics of North America Osteoporosis*. WB Saunders Company Philadelphia: 1994 Aug 20: 535-551.
48. Geusens P. Dual Energy X-Ray Absorptiometry in Daily Clinical Practice. In: Geusens P ed. *Osteoporosis in Clinical Practice*. London: 1998;59-64.
49. Tüzün F, Akarırmak Ü, Dinç A. Osteoporozda Kemik Yoğunluk Ölçümleri. Tüzün F, Akarırmak Ü, ed; *Kemik ve Eklem Dekadında Osteoporoz (içinde)*. İstanbul 2002:69-79.

- 50.Güven Z. Görüntüleme yöntemleri ve Histomorfometri. Kutsal Y, ed; Modern Tıp Seminerleri Osteoporoz (içinde). Ankara: Güneş Kitabevi, 2001:107-123.
- 51.Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. Clin Chim Acta. 2001 Nov;313(1-2):95-105.
- 52.Bauer DC. Biochemical markers of bone turnover: the study of osteoporotic fracture. Bone markers biochemical and clinical perspectives. Eastell R, Baumann M, Hoyle NR, Wiczorek L. ed. Martin Dunitz Ltd 2001, 219-223.
- 53.Yılmaz N, Bayram M, Erbağcı AB, Kiliçer MS. Diagnostic value of biochemical markers of bone turnover and postmenopausal osteoporosis. Clin Chem Lab Med. 1999 Feb;37(2):137-43.
- 54.Ross PD, Kress BC, Parson RE, al. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. Osteoporos Int. 2000;11:76-82.
- 55.Peel N, Eastell R. Measurement of bone mass and turnover. Baillieres Clin Rheumatol. 1993;7:479-498.
- 56.Lorenz C. Hofbauer Armin E. Heufelder. Role of receptor activator of nuklear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J. Mol. Med. 2001;79:243-253.
- 57.Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki S. Acid phosphatases as markers of bone metabolism. J. Chromatogr. B. 2002;781:345-358.
- 58.Moro R, Mucelli RSP, Gazzarini C, et al: Urinary 1-galactosyl-O-hydroxylysine (GH) as a marker of collagen turnover of bone. Calcif Tissue Int 1988;42:87-90.
- 59.Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E, Riis B, Christiansen C: Urinary excretion of pyridinoline cross-links correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. J Bone Miner Res 1991;6:639-644.
- 60.Chesnut CH 3rd, Bell NH, Clark GS, Drinkwater BL, English SC, Johnson CC Jr, Notelovitz M, Rosen C, Cain DF, Flessland KA,

- Mallinak NJ. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *Am J Med.* 1997 Jan;102(1):29-37.
61. Civitelli R, Gonnelli S, Zacchei F, Bigazzi S, Vattimo A, Avioli LV, Gennari C. Bone turnover in postmenopausal osteoporosis. Effect of calcitonin treatment. *J Clin Invest.* 1988 Oct;82(4):1268-74.
62. Greenspan SL, Resnick NM, Parker RA. Early changes in biochemical markers of bone turnover are associated with long-term changes in bone mineral density in elderly women on alendronate, hormone replacement therapy, or combination therapy: a three-year, double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 May;90(5):2762-7. Epub 2005 Feb 15.
63. Hassager C, Fabbri-Mabelli G, Christiansen C. The effect of the menopause and hormone replacement therapy on serum carboxyterminal propeptide of type I collagen. *Osteoporos Int.* 1993 Jan;3(1):50-2.
64. Lorenz C, Hofbauer Armin E, Heufelder. Role of receptor aktivator of nuclear factor- κ B ligand and osteoproteogerin in bone cell biology. *J. Mol. Med.* 2001;79:243-253.
65. Asaba Y, Hiramatsu K, Matsui Y, Harada A, Nimura Y, Katagiri N, Kobayashi T, Takewaka T, Ito M, Niida S, Ikeda K. Urinary gamma-glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. *Bone.* 2006 Dec;39(6):1276-82. Epub 2006 Aug 30.
66. Riggs BL, Melton LJ 3rd. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1992 Aug 27;327(9):620-7. Review.
67. Arasıl T. Osteoporozda medikal tedavi, Yeni Tedavi Stratejileri, Kombine Tedaviler. Kutsal Y, ed; *Modern Tıp Seminerleri Osteoporoz (içinde)*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2001:171-187.
68. Arnaud CD, Sanchez SD. The role of calcium in osteoporosis. *Annu Rev Nutr.* 1990;10:397-414. Review.

69. Aloia JF, Vaswani A, Yeh JK, Ross PL, Flaster E, Dilmanian FA. Calcium supplementation with and without hormone replacement therapy to prevent postmenopausal bone loss. *Ann Intern Med.* 1994 Jan 15;120(2):97-103.
70. Feldman D, Malloy PJ, Gross C. *Vitamin D Metabolism and Action.* Marcus R, Feldman D, Kelsey J eds. *Osteoporosis*, Academic Press, 1996:205-235.
71. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, Delmas PD, Meunier PJ. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med.* 1992 Dec 3;327(23):1637-42.
72. Rolf W, Irene M. *Bisphosphonates in Bone Diseases.* Pharm. World Sci 1998;20(5):206-213. Review.
73. Watts NB: Treatment of osteoporosis with bisphosphonates. *Osteoporosis* 2001;27(1):197-215.
74. Kanis J. A., Mc Cluskey E. V. Effect of calcitonin on vertebral and other fractures *QSM* 1999;92:143-149.
75. Bijoy Kundu, Sanjay K. Khare, Geeta Singh. Role of polypeptides in the treatment and diagnosis of osteoporosis. *Peptides* 1999;20:523-537.
76. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, Ravoux AC, Shah AS, Huster WJ, Draper M, Christiansen C. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med.* 1997 Dec 4;337(23):1641-7.
77. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women. *JAMA.* 1999 Jun 16;281(23):2189-97.

78. Ott SM, Oleksik A, Lu Y, Harper K, Lips P. Bone histomorphometric and biochemical marker results of a 2-year placebo-controlled trial of raloxifene in postmenopausal women. Bone histomorphometric and biochemical marker results of a 2-year placebo-controlled trial of raloxifene in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):341-8.
79. Notelovitz M. Estrogen replacement therapy: indications, contraindications, and agent selection. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Dec;161(6 Pt 2):1832-41. Review.
80. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S265-72. Epub 2002 May 9. Review.
81. Fleming A, Benn RT, Corbett M, et al: early rheumatoid disease. II Patterns of joint involvement. *Ann Rheum Dis* 1976;35:361-364.
82. F.C. Arnett, S.M. Edworthy, D.A. Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries and N.S. Cooper et al., The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 31 (1988), pp. 315–324.
83. van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2006 Nov;6(1):37-41. Epub 2006 Apr 19. Review
84. van Gaalen FA, Visser H, Huizinga TW. A comparison of the diagnostic accuracy and prognostic value of the first and second anti-cyclic citrullinated peptides (CCP1 and CCP2) autoantibody tests for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Oct;64(10):1510-2. Epub 2005 Mar 30.
85. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes RE, Huizinga TW. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar;50(3):709-15

86. Pillemer SR, Matteson EL, Jacobsson LT, et al. Incidence of physician-diagnosed primary Sjögren syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001;76:593–99.
87. Öbek Aydoğan. Sjögren sendromu. Öbek A. ed; İç Hastalıkları (içinde). Bursa Güneş Kitabevi, 1990:892-893.
88. Güzin Dilşen, Turgut Göksoy, H.S. Barden, Nedim Selim, Halim İşsever. Sağlıklı Türk toplumunda kemik mineral yoğunluğu değerleri. *Aktüel Tıp Dergisi*, 6 (1):2001:96-108.
89. Gerdhem P, Brändström H, Stiger F, Obrant K, Melhus H, Ljunggren O, Kindmark A, Akesson K. Association of the collagen type 1 (COL1A1) Sp1 binding site polymorphism to femoral neck bone mineral density and wrist fracture in 1044 elderly Swedish women. *Calcif Tissue Int.* 2004 Mar;74(3):264-9.
90. Bernad M, Martinez ME, Escalona M, González ML, González C, Garcés MV, Del Campo MT, Martín Mola E, Maderò R, Carreño L. Polymorphism in the type I collagen (COL1A1) gene and risk of fractures in postmenopausal women. *Bone*. 2002 Jan;30(1):223-8.
91. Pluijm SM, van Essen HW, Bravenboer N, Uitterlinden AG, Smit JH, Pols HA, Lips P. Collagen type I alpha1 Sp1 polymorphism, osteoporosis, and intervertebral disc degeneration in older men and women. *Ann Rheum Dis*. 2004 Jan;63(1):71-7.
92. Keen RW, Woodford-Richens KL, Grant SF, Ralston SH, Lanchbury JS, Spector TD. Association of polymorphism at the type I collagen (COL1A1) locus with reduced bone mineral density, increased fracture risk, and increased collagen turnover. *Arthritis Rheum*. 1999 Feb;42(2):285-90.
93. Sainz J, Van Tornout JM, Sayre J, Kaufman F, Gilsanz V. Association of collagen type 1 alpha1 gene polymorphism with bone density in early childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):853-5.
94. Lidén M, Wilén B, Ljunghall S, Melhus H. Polymorphism at the Sp 1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene does not predict bone

mineral density in postmenopausal women in sweden. *Calcif Tissue Int.* 1998 Oct;63(4):293-5.

95. Berg JP, Lehmann EH, Stakkestad JA, Haug E, Halse J. The Sp1 binding site polymorphism in the collagen type I alpha 1 (COL1A1) gene is not associated with bone mineral density in healthy children, adolescents, and young adults. *Eur J Endocrinol.* 2000 Aug;143(2):261-5.
96. Garnero P, Munoz F, Borel O, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with the risk of fractures in postmenopausal women, independently of bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Aug;90(8):4829-35. Epub 2005 May 10.
97. Mitra S, Desai M, Ikram Khatkhatay M. Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Maturitas.* 2006 Aug 20;55(1):27-35. Epub 2006 Feb 7.
98. Vidal C, Grima C, Brincat M, Megally N, Xuereb-Anastasi A. Associations of polymorphisms in the vitamin D receptor gene (Bsm1 and FokI) with bone mineral density in postmenopausal women in Malta. *Osteoporos Int.* 2003 Nov;14(11):923-8. Epub 2003 Oct 14.
99. Zajicková K, Zofková I, Bahbouh R, Krepelová A. Vitamin D receptor gene polymorphisms, bone mineral density and bone turnover: FokI genotype is related to postmenopausal bone mass. *Physiol Res.* 2002;51(5):501-9.
100. Langdahl BL, Gravholt CH, Brixen K, Eriksen EF. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and bone mass, bone turnover and osteoporotic fractures. *Eur J Clin Invest.* 2000 Jul;30(7):608-17.
101. Rass P, Pákozdi A, Lakatos P, Zilahi E, Sipka S, Szegedi G, Szekanecz Z. Vitamin D receptor gene polymorphism in rheumatoid arthritis and associated osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2006 Sep;26(11):964-71. Epub 2006 Jan 31.

102. Garcia-Lozano JR, Gonzalez-Escribano MF, Valenzuela A, Garcia A, Núñez-Roldán A. Association of vitamin D receptor genotypes with early onset rheumatoid arthritis. *Eur J Immunogenet.* 2001 Feb;28(1):89-93.
103. Nguyen TV, Esteban LM, White CP, Grant SF, Center JR, Gardiner EM, Eisman JA. Contribution of the collagen I alpha1 and vitamin D receptor genes to the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Dec;90(12):6575-9. Epub 2005 Sep 13.
104. Välimäki S, Tähtelä R, Kainulainen K, Laitinen K, Löyttyniemi E, Sulkava R, Välimäki M, Kontula K. Relation of collagen type I alpha 1 (COLIA 1) and vitamin D receptor genotypes to bone mass, turnover, and fractures in early postmenopausal women and to hip fractures in elderly people. *Eur J Intern Med.* 2001 Feb;12(1):48-56.
105. Braga V, Sangalli A, Malerba G, Mottes M, Mirandola S, Gatti D, Rossini M, Zamboni M, Adami S. Relationship among VDR (Bsm1 and FokI), COLIA1, and CTR polymorphisms with bone mass, bone turnover markers, and sex hormones in men. *Calcif Tissue Int.* 2002 Jun;70(6):457-62. Epub 2002 May 27.
106. Parviainen MT, Jääskeläinen K, Kröger H, Arnala I, Alhava E. Urinary bone resorption markers in monitoring treatment of symptomatic osteoporosis. *Clin Chim Acta.* 1999 Jan;279(1-2):145-54.
107. Komemushi A, Tanigawa N, Kariya S, Kojima H, Shomura Y, Tokuda T, Nomura M, Terada J, Kamata M, Sawada S. Biochemical Markers of Bone Turnover in Percutaneous Vertebroplasty for Osteoporotic Compression Fracture. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2007 Dec 12.
108. Avouac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis.* 2006 Jul;65(7):845-51. Epub 2006 Apr 10.
109. Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G. Autoantibody profiling as early diagnostic and

- prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Dec;64(12):1731-6. Epub 2005 May 5.
110. Vander Cruyssen B, Peene I, Cantaert T, Hoffman IE, De Rycke L, Veys EM, De Keyser F. Anti-citrullinated protein/peptide antibodies (ACPA) in rheumatoid arthritis: specificity and relation with rheumatoid factor. *Autoimmun Rev.* 2005 Sep;4(7):468-74. Review
111. van Venrooij WJ, Zendman AJ, Pruijn GJ. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2006 Nov;6(1):37-41. Epub 2006 Apr 19. Review
112. Agrawal S, Misra R, Aggarwal A. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA. *Clin Rheumatol.* 2007 Feb;26(2):201-4. Epub 2006 Mar 30.
113. Vencovský J, Macháček S, Sedová L, Kafková J, Gatterová J, Pesáková V, Růzicková S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003 May;62(5):427-30.
114. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(5):R949-58. Epub 2005 Jun 14.

