

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

ÖSTROJEN RESEPTÖR ALFA GENİ XBA I VE PVU II
POLİMORFİZMLERİNİN POSTMENOPUZAL OSTEOPOROZLU
HASTALARDA İNCELENMESİ

Seza BULCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Halil KASAP

ADANA-2010

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

ÖSTROJEN RESEPTÖR ALFA GENİ XBA I VE PVU II
POLİMORFİZMLERİNİN POSTMENOPOZAL OSTEOPOROZLU
HASTALARDA İNCELENMESİ

Seza BULCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Halil KASAP

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TF2008YL6 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

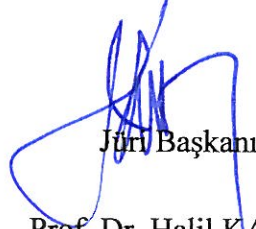
Tez No:

ADANA-2010

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Östrojen Reseptör Alfa Geni Xba I Ve Pvu II Polimorfimlerinin Postmenopozal Osteoporozlu Hastalarda İncelenmesi” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:10/03/2010




Jüri Başkanı

Prof. Dr. Halil KASAP

Çukurova Üniversitesi

Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

Öğretim Üyesi

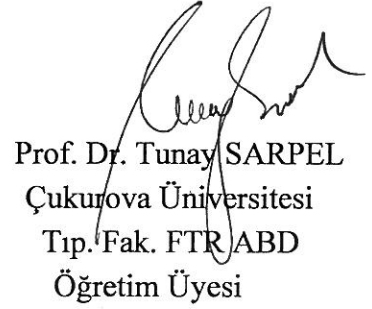


Prof. Dr. Mülkiye KASAP

Çukurova Üniversitesi

Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

Öğretim Üyesi



Prof. Dr. Tunay SARPEL

Çukurova Üniversitesi

Tıp Fak. FTR ABD

Öğretim Üyesi

Yukarıdaki tez, yönetim kurulununtarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halil KASAP

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, tez konumun seçilmesinde ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Halil KASAP'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazımında her türlü desteklerinden dolayı Uzm. Bio. Sabriye KOCATÜRK SEL, Doç. Dr. Ayfer PAZARBAŞI, Yrd. Doç. Dr. İrfan GÜZEL'e, Dr. Bertan YILMAZ'a, Yrd. Doç. Dr. Deniz TAŞTEMİR'e ve Uzm. Bio. Zeynep KARAKAN KARAKAŞ'a özellikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fiziksel Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tunay SARPEL'e, Yrd. Doç. Dr. Sibel BAŞARAN'a ve diğer Fiziksel Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı öğretim üyelerine, asistanlarına ve çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca merkez laboratuvar sorumlusu Uzm. Hatice ÖZÇÜRÜMEZ'e ve merkez laboratuvarı çalışanlarına göstermiş oldukları yardımlardan dolayı teşekkürlerimi iletiyorum.

İstatistik uygulamalarımnda yardımcı olan Ç.Ü. Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi İlker ÜNAL'a teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışması TF2008YL6 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Son olarak manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme, babama, ablama ve enişteme sonsuz sevgilerimi iletiyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Osteoporoz	3
2.1.1. Osteoporozun Tarihçesi	3
2.1.2. Osteoporozun Tanımı	3
2.1.2.1. Osteoporoz tanısında kullanılan WHO kriterleri	4
2.1.3. Kemiğin Yapısı	5
2.1.4. Osteoporozun Sınıflandırılması	7
2.1.4.1. Tip I osteoporoz (Post-menopozal osteoporoz)	9
2.1.4.2. Tip II osteoporoz (Senil osteoporoz)	10
2.1.5. Osteoporoz Gelişiminde Risk Faktörleri	13
2.1.5.1. Yaş, Cinsiyet	13
2.1.5.2. Irk ve Genetik	14
2.1.5.3. Üreme İle İlgili Faktörler	14
2.1.5.4. Yaşam Şekli ve Egzersiz	15
2.1.5.5. Beslenme Alışkanlıkları	15
2.1.5.6. İlaç Kullanımı	16
2.1.6. Osteoporoz Tanısı	16
2.1.7. Osteoporozun Klinik Bulguları	16
2.1.8. Osteoporozdan Korunma Yolları	17

2.1.9. Osteoporozda Tedavi	18
2.2. Östrojen Hormonu	19
2.2.1. Östrojen Hormonu Üretimi	19
2.2.2. Östrojen Hormonunun Etki Mekanizması	20
2.2.3. Östrojen Reseptör Proteini Alfa'nın (ESR α) Yapısı	21
2.2.4. ESR α 'nın Aktivasyonu	22
2.2.5. Östrojen Reseptör Geni	23
2.3. Osteoporoz Genetiği	24
2.3.1. Osteoporozla İlişkili Gen Polimorfizmleri	25
2.3.1.1. Östrojen ve Östrojen Reseptör Gen (ESR α) Polimorfizmi	26
2.3.1.2. Vitamin D ve Vitamin D Reseptör Gen (VDR) Polimorfizmi	28
2.3.1.3. İnterlökin ve İnterlökin Reseptör Gen (IL-R) Polimorfizmi	29
2.3.1.4. Tip 1 Kollajen Alfa A1 Zinciri Geni (CollA1)	29
2.3.1.5. Osteoporozla İlişkili Olduğu Düşünülen Diğer Genler	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Araç ve Gereçler	31
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	31
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	31
3.2. Kan Örneklerinin Sağlanması	32
3.2.1. Hasta Rızası	32
3.3. Yöntem	33
3.3.1. Periferik Kandan DNA Eldesi	33
3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması	34
3.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi	35
3.3.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) Yönteminin Uygulanması	35
3.3.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Yönteminin Uygulanması	36
3.3.5.1. PvuII Polimorfizminin Belirlenmesi için PCR Ürünlerinin PvuII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	37
3.3.5.2. XbaI Polimorfizminin Belirlenmesi için PCR Ürünlerinin XbaI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	38
3.4. İstatistiksel Analiz	38

4. BULGULAR	40
4.1. Osteoporozla İlgili Genel Kriterler	40
4.2. Moleküler Genetik Analizleri	45
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	60
7. KAYNAKLAR	63
EKLER	71
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Normal ve Osteoporotik Kemik	5
Şekil 2.2.	İnsan Östrojen reseptör α (ÖR α) proteininin işlevsel bölgeleri. AF-1 ;Aktivasyon işlevi 1, AF-2; Aktivasyon işlevi 2	21
Şekil 2.3.	ESR α 'nın Aktivasyonu	22
Şekil 2.4.	İnsan östrojen reseptör alfa geni intron ve ekson bölgeleri	23
Şekil 2.5.	İnsan östrojen reseptör 1 geni 1. intronunda yer alan PvuII ve XbaI polimorfizmlerinin yerleşimi	27
Şekil 4.1.	Bazı hastaların RFLP yöntemi ile oluşan Pvu II restriksiyon enzimi kesim bantları. M, marker DNA'lar, PP genotiplilerde 346 bç'lik tek bant (15, 18), Pp genotiplilerde 346, 242, 104 bç'lik üç bant (5, 13, 14, 16) ve pp genotiplilerde 242 ve 104 bç'lik iki bant (1, 2, 3, 4, 19, 20) görülmektedir.	46
Şekil 4.2.	Bazı hastaların RFLP yöntemi ile Xba I restriksiyon enzimi kesim bantları. M marker DNA, XX genotiplilerde 346 bç'lik tek bant (67, 80), Xx genotiplilerde 346, 195, 151 bç'lik üç bant (62, 90) ve xx genotiplilerde 195 ve 151 bç'lik iki bant (64, 88) görülmektedir.	46
Şekil 4.3.	Bazı kontrollerin RFLP yöntemi ile yukarıda Pvu II, aşağıda Xba I enzimleri kesim bantları	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Osteoporozun sınıflandırılması	8
Çizelge 2.2.	Osteoporozun etiyolojik sınıflaması	9
Çizelge 2.3.	Tip I ve Tip II Osteoporotik hastaların karşılaştırılması	11
Çizelge 2.4.	Osteoporozun lokalizasyona göre sınıflaması	12
Çizelge 3.1.	ESR α geninin Intron I amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri	35
Çizelge 3.2.	ESR α geni Intron I'in optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PCR koşulları	36
Çizelge 3.3.	ESR α geni Intron I'in optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PCR programı ısı döngüleri	36
Çizelge 3.4.	ESR α geni XbaI ve PvuII polimorfizmleri RFLP reaksiyon koşulları	37
Çizelge 4.1.	Hasta ve kontrol grubu yaş, boy, kilo, vki, menarş yaşı, menopoz yaşı, menopoz süresi ortalamaları ve istatistiksel analizi.	41
Çizelge 4.2.	Hasta ve kontrol grubu biyokimya parametreleri ortalamaları ve istatistiksel analizi	42
Çizelge 4.3.	Hasta ve kontrol gruplarının eğitim durumları, aile osteoporoz öyküsü ve giyim durumları	43
Çizelge 4.4.	Hasta ve kontrol grubunda fiziksel aktivite düzeyleri ile lombar BMD ortalamaları istatistiksel analizi	44
Çizelge 4.5.	Hasta ve kontrol grubunda güneşe maruz kalma süreleri ile lumbar BMD değeri istatistiksel analizi	45
Çizelge 4.6.	İncelenen polimorfizmlere göre genotipleri belirlenmiş olan hasta ve kontrollerde minor allel frekansı (MAF) ve Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE) p değeri	48
Çizelge 4.7.	Hasta ve kontrol gruplarının polimorfizmlere göre sayıları	48

Çizelge 4.8.	Hastaların ve kontrollerin Pvu II ve Xba I enzimleri kesim bantlarına göre genotipleri	49
Çizelge 4.9.	Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları	52
Çizelge 4.10.	Hasta ve kontrol grubunda haplotip dağılımları	52
Çizelge 4.11.	Hasta ve kontrol grubunun aile osteoporoz öyküsü ile Pvu II polimorfizminin ilişkisi	53
Çizelge 4.12.	Hasta ve kontrol grubunda Xba I polimorfizminde neck BMD ortalamaları ve istatistiksel analizi	53
Çizelge 4.13.	Hasta grubunda Xpp genotipi ile güneşe maruz kalma süresi istatistiksel analizi	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	Alkalen Fosfataz
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
bç	Baz Çifti
Ca	Kalsiyum
COL1A1	Tip 1 Kollajen Alfa A1 Zinciri Geni
DEXA	Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPA	Dual Foton Absorbsiyometri
E1	Östrone
E2	17 β -Östradiol
E3	Östriol
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ESRα	Östrojen Reseptör Alfa
EtBr	Etidyum Bromür
F	Flor
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
Gr	Gram
HRT	Hormon Replasman Tedavisi
HWE	Hardy-Weinberg Eşitliği
IL-6	İnterlökin 6
KMY	Kemik Mineral Yoğunluğu
KWT	Kruskal Wallis Test
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LH	Luteinize Edici Hormon
M	Molar
MAF	Minor Allel Frekansı
Mg	Magnezyum
MgCl₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre

μl	Mikrolitre
mM	Milimolar
mRI	Magnetik rezonans görüntüleme
Mrna	Mitokondrial Ribonükleik Asit
NaCl	Sodyum Klorid
Ng	Nanogram
NHP	Nottingham Health Profil
OP	Osteoporoz
P	Fosfor
PCR	Polymerase Chain Reaction
pmol	Pikomol
PTH	Parathormon
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TE	Tris-EDTA
QCT	Kantatif Bilgisayarlı Tomografi
Rpm	Dakikadaki rotor sayısı
SF-36	Short form of 36
SIP	Sickness Impact Profil
sn	Saniye
SPA	Single Foton Absorbsiyometri
TGF	Transforming Büyüme Faktörleri
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
VDR	Vitamin D Reseptör Geni
VKİ	Vücut Kitle İndeksi

ÖZET

Östrojen Reseptör Alfa Geni Xba I ve Pvu II Polimorfizmlerinin Postmenopozal Osteoporozlu Hastalarda İncelenmesi

Osteoporoz, kemik mineral yoğunluğunun (KMY) azalması ve kemik dokunun mikromimari yapısının bozulması ile karakterize multifaktöriyel bir hastalıktır. Kemik mineral yoğunluğunu etkileyen birçok çevresel faktör, genetik yapı ve osteoporoz patogenezi arasındaki ilişki incelenmiş ve birçok aday genin varlığı rapor edilmiştir. Ancak bu genlerin kemik kütlesi üzerine olan etkisi ile birbirleri ve çevresel etkenlerle olan etkileşimleri halen net değildir.

Bu çalışmada, 107 postmenopozal kemik mineral yoğunluğu açısından 73 normal ve 34 osteoporotik kadında osteoporozla ilgili kriterler, lomber omurga ve femur boynu KMY değerleri ile ER α geni XbaI, PvuII polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Ayrıca çalışmamızda bu polimorfizmlere ait genotip ve allel frekanslarının normal ve osteoporotik olgulardaki dağılımı incelenmiştir.

Çalışma sonuçlarımıza göre osteoporotik ve normal kadınlar genotip ve haplotip frekansları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark belirlenmemiştir. ER α geni, Xba I polimorfizmi bakımından osteoporotik bireylerde; xx genotipine sahip olguların neck BMD değeri, Xx genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu saptanmış ($p=0,05$) (XX genotipine rastlanmamıştır), Pvu II polimorfizmi ile neck ve lomber KMY arasında ise bir ilişki saptanamamıştır. Kontrollerde Xba I ve Pvu II polimorfizmleri ile neck ve lomber KMY arasında bir ilişki bulunamamıştır. Xba I polimorfizminde kontrollerde minor allel "X" alleli (G nükleotiti) (MAF=0,457) iken hastalarda "x" alleli (A nükleotiti) (MAF=0,467) olmuş, Pvu II polimorfizminde kontrolde minor allel "P" (C nükleotiti) (MAF=0,485) iken hastalarda minor allel "p" alleli (T nükleotiti) (MAF=0,418) olmuştur. Xba I polimorfizmi genotipleri bakımından hasta ve kontroller arasındaki fark anlamlı olmasa bile, yüksek KMY değeri ile ilişkili olan "x" allelinin hastalarda düşük kontrollerde yüksek olmasının önemli olduğu düşünülmüştür. PP, Pp ve pp genotipleri arasında kontrol grubunda önemli bir fark yok iken, hasta bireylerde pp genotipine sahip olan bireylerde anlamlı oranda aile osteoporoz öyküsünün daha az olduğu saptanmıştır ($p=0,037$). Hasta grubunda; Xxpp genotipine sahip olan bireylerden, günde 15 dakika ve üzeri güneşe maruz kalanların, gün içinde hiç güneşe maruz kalmayanlara göre lomber KMY değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,008$), kontrol grubunda ise bir fark bulunmamıştır.

Osteoporozla ilgili incelenen diğer kriterlerin hiçbirisi ile XbaI, PvuII polimorfizmleri arasında ilişki bulunamamıştır.

Anahtar Sözcükler: Osteoporoz, Östrojen Reseptör Alfa Geni (ESR α), Xba I, PvuII

ABSTRACT

Study of Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphisms Xba I and Pvu II in Postmenopausal Osteoporosis Patients

Osteoporosis is a multifactorial disease characterized by a decrease bone mineral density (BMD) and micro-architectural deterioration of bone structure. Although there are several environmental influences on BMD, a genetic contribution to the pathogenesis of osteoporosis has recently been recognized. The existence of many candidate genes which have effect on bone mass was reported. However, the effect of these genes on bone mass, the interaction among and between these genes and environmental effects are not presently clear.

In this study, the relationship between BMD values of lumbar vertebra and femoral neck, ER α gene XbaI, PvuII polymorphisms and osteoporosis-related criteria in 107 postmenopausal women (34 normal, 73 osteoporotic) in terms of bone mineral density, was researched. The distribution of genotype and allele frequencies belonging to these polymorphisms in normal and osteoporotic postmenopausal women was also evaluated.

According to our study results, there was no significant difference in terms of genotype and haplotype frequencies between osteoporotic and normal women. For osteoporotic women who had ER α gene Xba I polymorphism, neck average BMD value of women with xx genotype was significantly higher than women with Xx genotype ($p=0,05$) (XX genotype has not been found). There was no significant difference between neck-lumbar BMD and Pvu II polymorphism. In normal women minor allele was "X" (G nucleotide) (MAF=0,457) while in osteoporotic women minor allele was "x" (A nucleotide) (MAF=0,467) in terms of Xba I polymorphism and in normal women minor allele was "P" (C nucleotide) (MAF=0,485) while in osteoporotic women minor allele was "p" (T nucleotide) (MAF=0,418) in terms of Pvu II polymorphism. Although there is no significant difference between patient and control genotypes for Xba I polymorphism, "x" allele associated with higher BMD values being lower in patients and than in controls is thought to be important. There was no significant difference between PP, Pp and pp genotypes within the control group, where pp genotyped patients had significantly lower family history of osteoporosis ($p=0,037$). In the patient group; within the Xxpp genotyped individuals, lumbar BMD values were found to be higher in patients who exposed to sun over 15 minutes per day, as compared to patients who had no sun exposure ($p = 0.008$) but there was no difference in the control group.

None of the other criteria related to osteoporosis was associated with XbaI, Pvu II polymorphisms.

Key Words: Osteoporosis, Estrogen Receptor Alpha Gene (ESR α), Xba I, Pvu II

1. GİRİŞ

Osteoporoz (OP) düşük kemik kütlesi ve kemik dokusu mikro mimarisinde bozulma sonucu kemik kırılabilirliğinde ve kırılma riskinde artma ile karakterize kompleks bir iskelet hastalığıdır¹⁻⁷. Pek çok ülkede osteoporoz en önemli metabolik kemik hastalığıdır. Osteoporozun klinik önemi kırıklara neden olmasıdır. Pek çok kişide güçsüzlük ve hareket azlığına, pek çok kişide de kırığa ve sonrasında ölüme neden olmaktadır⁵.

Osteoporoz birçok hastada kırık oluşana kadar klinik bulgu vermeyebilir. Bu dönem “asemptomatik dönem” olarak adlandırılır ve sadece dansitometrik inceleme ile tanı konulabilir. Erken dönemde tanı konması kırıkların ve buna bağlı olarak gelişecek komplikasyonların önlenmesi açısından önem taşır. Bu nedenle postmenopozal dönemdeki kadınların ve premenopozal dönemde olup, risk grubunda olanların dikkatli bir anamnez ve fizik muayene ile birlikte dansitometrik incelemeleri yapılmaktadır⁸.

Osteoporoz milyonlarca postmenopozal kadını ve farklı yaşlardaki erkekleri etkileyen, sık rastlanan metabolik bir kemik hastalığıdır. Hastalık ağrılı omurga, kalça ve radius kırıkları ile belirginleşirken altta yatan patogenez karmaşık ve multifaktöriyeldir⁹.

Osteoporoz ve osteoporotik kırıklar ile ilgili risk faktörleri; yaşlanma, düşük kemik kütlesi, kadın olmak, erken menopoz, genetik faktörler, zayıf vücut yapısı, yaşam biçimi ve beslenme, medikal durumlar olarak sıralanabilir. Düşmeler ve düşme riskini artıran durumlar ise denge ve yürüme bozuklukları, duyu kayıpları, kas kuvvetinde azalmalar, görme ve işitme bozukluklarıdır¹⁰.

Osteoporoz, göğüs kanseri, kardiyovasküler hastalıklar, şeker hastalığı, demans gibi hastalıklarla da ilişkili olduğundan populasyonlarda osteoporoz riskinin saptanması bu hastalıkların iyileştirilmesine yardımcı toplumsal sağlığın geliştirilmesi ve sağlık harcamalarının azalması bakımından önemlidir.

Bugüne kadar osteoporozla ilişkili olan 5-7 aday genle ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Fakat osteoporozlu hastaların genetik açıdan ilgili genlere ait polimorfizmlerinin birbiri ile olan fiziksel bağlantısını ve fonksiyonel olarak hangi allel kombinasyonlarının gen fonksiyonlarını azaltıp çoğalttığını bilmeye ihtiyaç vardır.

Türk toplumunda aday genlerden VDR geninin Taq I, Apa I ve Bsm I, östrojen reseptör alfa ($ESR\alpha$) geninin Pvu II, Xba I ve COL1A1 geninin Sp1 polimorfizmleri araştırılmış ve postmenapozlu osteoporotik kadınlarda Taq I ve Pvu II polimorfizmleri ile Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır^{11,12}. Bu çalışmada, şimdiye kadar bazı toplumlarda osteoporozla bağlantısı olduğu saptanan aday genlerden östrojen reseptör geninin Pvu II, Xba I polimorfizmleri ve bu polimorfizmlerin haplotip dağılımlarının Çukurova bölgesindeki durumunun incelenmesi amaçlanmıştır¹³.

2. GENEL BİLGİ

2.1. OSTEOPOROZ

2.1.1. Osteoporozun Tarihçesi

Eski çağlardan beri kemiklerin güçsüzlüğü ve kırılabilirliği dikkat çekmiş ve insanların hayatlarının çeşitli devrelerinde bireyler arasında, kemik dayanıklılığında farklılıklar olduğu yapılan gözlemlerle öğrenilmiştir¹⁴.

İlk kez 19. yüzyılın başlarında osteoporoz kelimesi kullanılmaya başlandı. Bu terim önceleri bir betimleme deyimi olarak kullanılmaktaydı. Osteoporoz kelimesinin söylenmeye başladığı yıllarda, henüz ayrıntılı inceleme teknikleri mevcut olmadığından “süngersi, gözenekli kemik“ demek olan osteoporoz, radyoloji gözlemlerine değil, patolojik anatomi gözlemlerine dayanarak önerilmiş bir kelimedir. 19. yüzyıl sonlarındaki tıp sözcüklerinde osteoporoz, kemiklere gözenekli bir görünüm veren bir osteit türü olarak kabul edilmektedir. 20. yüzyılın başlarında radyolojinin gelişmesiyle osteoporoz, osteomalasi ve osteoartroz gibi kavramların birbirinden ayrılması sağlanmış ve 1948 de Albright’ın yazıları ile osteoporoz kavramının sınırları daha iyi belirlenmiştir¹⁵.

2.1.2. Osteoporozun Tanımı

Osteoporoz en sık görülen kemik hastalığıdır. OP’un ilk olarak kesin tanımı gözenekli kemik anlamına gelen “porous bone” başlığı ile Jean Georges Lobstein tarafından 1829’da yapılmıştır. Daha sonra Albright tarafından 1948’de “kemik içinde çok az kemik” (too little bone in bone) olarak tanımlanmıştır^{14,15}. Basit olarak birim hacim başına düşen kemik kütledeki azalma olarak tanımlanabilmektedir. En son yapılan tanımlama ile osteoporoz; düşük kemik kütlesi ve kemik mikro mimarisinde bozulma ve buna bağlı olarak kemikte kırılabilirliğin artması, genellikle omurga, radius ve kalçada olmak üzere kırık riskinin yükselmesi ile tanımlanan bir hastalık olarak kabul edilmektedir^{2,3,4,5,6,16,17,18,19}. Bu kırıklar kişide fiziksel yetersizliklere, yaşam kalitesinde bozulmaya, ölüm oranında artmaya ve dolayısıyla sağlığı korumak için gereken maliyette artışa yol açmaktadır^{6,20}. İnsan yaşamının uzaması ve dünya nüfusunun giderek yaşlanması ile osteoporoz ve osteoporozla ilişkili kırıklar

morbidite ve yaşam kalitesi üzerine olan olumsuz etkileri nedeniyle önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

Preklinik dönemde hastalık kırık olmaksızın düşük kemik kütlesi ile karakterizedir. Bu asemptomatik dönem osteopeni olarak adlandırılır. 1996 yılında Amsterdam'daki Dünya Osteoporoz Kongresi sonunda yapılan Konsensusa göre Osteoporoz tanımı yeniden düzenlenmiştir. Buradaki tanımlama tanı yöntemlerinden Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre (DEXA) kullanılarak elde edilen değerlere ve kırık varlığına göre yapılmaktadır^{5,14,21}. Değerlendirme hem kadın hem de erkeklerde T skoruna göre yapılmaktadır. Ancak çocuklarda ve ileri yaştaki kişilerde (65 yaş) değerlendirmede Z skoru önem kazanır. Yaşlılarda Z skorda -1 SD azalma geriye kalan yaşamdaki fraktür riskini iki kat artırır, -2,5 SD azalma ise kırık riskini 4 kat artırır²². Z skorunun -2 SD altında olduğu durumlarda sekonder osteoporoz araştırılmalıdır.

T skor: Kemik kütlesinin genç yetişkin referans populasyonun ortalama doruk kemik kütlesi ile kıyaslamasının standart deviasyon olarak tanımlanmasıdır.

Z skor: Ölçülen kişinin kemik kütlesinin yaş ve cinse göre referans değer ile kıyaslanarak standart deviasyon olarak tanımlanmasıdır²².

2.1.2.1. Osteoporoz tanısında kullanılan WHO kriterleri:

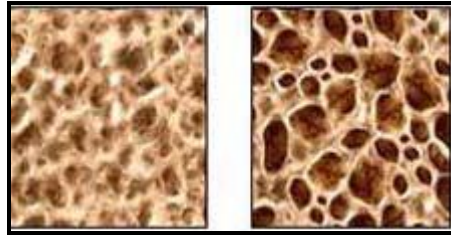
Osteoporoz tanısında günümüzde WHO kriterleri kullanılmaktadır.

- **NORMAL:** T skoru genç erişkin ortalamasına göre -1 standart deviasyona kadar olan kemik mineral yoğunluğu değerleri (T skoru > -1).
- **OSTEOPENİ (Düşük Kemik Kütlesi):** T skoru genç erişkin ortalamasına göre -1 ve -2.5 standart deviasyon arasında olan kemik mineral yoğunluğu değerleri (-1 < T skoru < -2.5).
- **OSTEOPOROZ:** T skoru genç erişkin ortalamasına göre -2.5 standart deviasyonun altında olan kemik mineral yoğunluğu değerleri (T skoru < -2.5).
- **YERLEŞMİŞ OSTEOPOROZ:** T skoru genç erişkin ortalamasına göre -2.5 standart deviasyonun altında olan kemik mineral yoğunluğu değerleri ve bir veya daha fazla osteoporotik kırık mevcudiyeti (T skoru < -2.5).

Vücutta kortikal kemik ve trabeküler kemik olmak üzere iki ayrı kemik türü vardır. Kortikal kemik tüm vücut kemiklerinin %80'ini oluştururken, trabeküler kemik, bir arı

peteği yapısında olan ve yüzey alanı daha geniş bir kemik türüdür. Trabeküler kemik omurgada ve uzun kemiklerin uç kısımlarında yer alır ve osteoporozla bağlı kırıklara en hassas bölgeler de buralardır. Trabeküler kemiğin yapım-yıkım hızının kortikal kemiğe göre 4–8 kat daha hızlı olması bu kemikleri kırıklara daha hassas hale getirmektedir^{16,23}.

Kemik kütlelerinin oluşmasında ve korunmasında en önemli faktörler genetik, hormonal durum, beslenme, kemiğe mekanik yüklenme, yeterli güneş ışını ve yaşam şeklidir. İnsanlarda doruk kemik yoğunluğu 30—35 yaşına kadar oluşmaktadır. Kadınlarda 40 yaşına kadar yapım-yıkım olayı dengeli bir şekilde devam ederken, bu yaştan itibaren yıllık % 0,5'lik bir oranda geri dönüşümsüz bir kemik kaybı olur²⁴. Kemik kaybını etkileyen faktörler arasında yaş ve menopoz ön sıralarda yer almaktadır^{3,5,23,25,26}. Özellikle menopozdan sonra östrojen eksikliğine bağlı olarak kemik kaybı hızlanır^{27,28} ve menopozda olan bir kadın her yıl trabeküler kemiklerinin %5'ini ve tüm vücut kemik dokusunun % 1–1,5'lük bir kısmını kaybeder. Bu kayıplar 10–15 yıllık hızlı bir dönemden sonra oldukça azalır. Düşük vücut kitle indeksi, sigara, alkol tüketimi, fiziksel aktivite azlığı, D vitamini üretim ve metabolizmasının yetersizliği ve sekonder hiperparatiroidizm yaşa bağlı kemik kaybını etkileyen diğer faktörlerdir^{29,30}. Kadınların yaşam boyu kemik kütlelerinin % 45–50' sini erkeklerin ise %20- 30'nu kaybettiği saptanmıştır. İşte bu aşamaya kadar kaybedilen kemik dokusu miktarı kadının ileride kemik kırığıyla karşılaşp karşılaşmayacağını belirleyen en önemli etkenlerden biridir. Zira bu süre içerisinde trabeküler kemiğin % 50'si kortikal kemiğin ise % 30'u kadar bir miktarı kaybedilmiş olabilir¹⁶.



Şekil 2.1: Normal ve Osteoporotik Kemik¹⁶

2.1.3. Kemiiğin Yapısı

Osteoporozun en iyi şekilde anlaşılabilmesi için iskeleti oluşturun kemiklerin yapı ve fonksiyonlarından bahsedilmesi gerekir. Kemik doku, hücreler ve ara maddeden (matriks) oluşmuştur. Kemik dokusu hücreleri osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Osteoblastlar, kemik ara maddesinin yapımını, mineralizasyonunu gerçekleştiren ve asıl kemik hücreleri olan osteositleri oluşturun yani bölünebilme yeteneğindeki genç kemik hücreleridir. Sert ve sünger kemik dokusunun asıl hücreleri osteositlerdir. Bölünebilme yeteneğini kaybetmiş olgunlaşmış osteoblastlar, osteositlere dönüşürler. Osteoklast hücreleri kan hücrelerinden monosit ve makrofojların birkaçının birleşmesi ile oluşur. Osteoklastlar kemik yıkımından sorumlu hücrelerdir. Kemik matriksi, organik ve anorganik maddelerden oluşur. Organik matriksin % 90'ı protein kökenli olan kollajen ipliklerden meydana gelir. Organik matriksin geri kalanını ise proteoglikanlar, alkale fosfataz (ALP), osteonektin gibi glikoproteinler ile osteokalsin gibi gamma karboksi glutamik asit içeren proteinler oluşturur. Bunlar kemik matriksinin esnekliğini sağlarlar ve bunların tümüne Osein de denir. Anorganik matriks ise en çok Ca olmak üzere P, Mg, F gibi minerallerden meydana gelir. Vücudumuzdaki kalsiyumun %98'i, fosforun da % 75'i kemiklerde depo edilir.

Canlı ve dinamik bir doku olan kemik doku, bir taraftan emilime (rezorpsiyon) uğrarken, diğerk taraftan emilime uğrayan kemik dokunun yerine yenisi oluşturularak, sürekli yenilenir. 30-40 yaşlarında bir bireyin bir yılda sünger kemik dokusunun % 25'i, sert kemik dokusunun % 3'ü yenilenmektedir. Kemik dokunun, bir taraftan emilirken diğerk taraftan yenisinin oluşturulması işleme kemiiğın yeniden yapılanması (remodeling) veya kemik dönüşümü (turnover) adı verilir^{31,32}. Kemiiğın yeniden yapılanması çeşitli evrelerden geçerek gerçekleşir. İskeleti oluşturun kemiklerin tümü aynı anda yeniden yapılanmaz. Belli bir sürede, kemiiğın sadece bir kısmı yenilenir. Bu işlemin başlangıcında kemik matriksinin bazı parçaları uzaklaştırılarak yerine yeniden yapılanma üniteleri yerleşir^{31,32}.

Kemik yıkımı ve yapımı farklı yaşlarda, farklı hızlarda gerçekleşir ve yaşam boyu devam eder. Örneğın; sünger kemik doku yapımı 10-20 yaşları arasında en üst seviyeye çıkarken, kadınlarda menopozy döneminden sonra kemik kaybı hızlanır³¹. Kadın ve erkekte 20-30'lu yaşlarda kemik kitlesi maksimum düzeye ulaşır³³. Yaklaşık 30 yaşında kemik yıkımı ve yapımı dengededir³¹. Her iki cinste de 50 yaş sonrasında

kemik kaybı ilerleyen şekilde başlar fakat ilerleme hızı ve sınırı kişiler arasında değişiklik gösterir. Pik KMY oluşumunun tamamen genetik kontrol altında olduğu, bireysel değişiklikler de genetik faktörlerin kısmen rol aldığı bildirilmiştir³³.

Kemik yapımı ve yıkımını düzenleyen etmenler aşağıda sıralandığı gibidir.

- Vücuttaki kalsiyumu düzenleyen hormonlar:

Kalsitonin, PTH (Parathormon), 1.25 - dihidroksivitD

- Sistemik hormonlar:

Büyüme Hormon (Growth hormonu), Glukokortikoidler, İnsülin,

- Lokal etmenler:

Prostaglandin E₂, Somatomedinler, Cinsiyet hormonları, Tiroksin hormonları, kemik, deri ve büyüme faktörleri, Lenfokinler, Transforming büyüme faktörleri (TGF), kemik yapısını oluşturan proteinler.

- İyonlar:

Kalsiyum, Magnezyum, Fosfat, Flor,

- Yaş, cinsiyet, genetik yapı ve vücut yapısı
- Sigara, alkol, beslenme alışkanlığı, yaşam biçimi ve egzersiz.
- Alınan ilaçlar ve bazı hastalıklar.

Kemik yapım ve yıkımını düzenleyen etmenlerden birinde meydana gelen değişme ve düzensizlikler, daha erken yaşlarda ve daha fazla kemik yıkımına neden olarak osteoporoz riskini artırır^{31,32}.

2.1.4. Osteoporozun Sınıflandırılması

Her hastalıkta olduğu gibi osteoporozda da farklı açılardan sınıflandırma yapmak mümkündür^{14,21} (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1: Osteoporozun sınıflandırılması¹⁴

Yaşa göre	1. Juvenil 2. Adult 3. Senil
Lokalizasyona göre	1. Genel 2. Bölgesel
Tutulan kemik dokuya göre	1. Trabeküler 2. Kortikal
Etyolojiye göre	1. Birincil (Primer) 2. İkincil(Sekonder)
Histolojik görünümüne göre	1. Hızlı kemik yapım yıkım döngülü 2. Yavaş döngülü

Albright Genel osteoporozu ilk olarak 3 gruba ayırmıştır:

1- 65 yaşa kadar kadınlarda görülen postmenopozal osteoporoz

2- 65 yaş üzerinde her iki cinste görülen senil osteoporoz

3- Ne menopoza, ne yaşlanma, ne de ayırt edilebilen başka bir nedenin olmadığı (idyopatik osteoporoz)

Riggs ve Melton bu sınıflamayı modifiye ederek Tip I ve Tip II OP tanımlarını gündeme getirmişlerdir. Tip I OP 65 yaşın altında oluşur ve el bileği ve vertebra kırıkları ile karakterizedir. Tip I ve Tip II OP arasında çakışmalar olmasına rağmen farklı antiteler olarak konuşulabilir, çünkü farklı klinik görünümleri ve etyopatogenezleri vardır.

Osteoporoz için muhtelif sınıflamalar kullanılmaktadır, ancak en fazla kabul gören etiyolojik sınıflamadır²¹ (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Osteoporozun etiyolojik sınıflaması²¹

1. Primer osteoporoz	2. Sekonder osteoporoz
1. Post-menopozal osteoporoz (tip I) 2. Senil osteoporoz (tip II) 3. Juvenil osteoporoz	1. Endokrin hastalıklar 2. Gastrointestinal hastalıklar 3. Hematolojik hastalıklar 4. Genetik hastalıklar 5. Karaciğer hastalıkları 6. İnflamatuvar bağ dokusu hastalıkları 7. İmmobilizasyon 8. Kronik alkolizm 9. Kronik ilaç kullanımları 10. Malignensiler

Bu sınıflama içinde en büyük hasta grubunu ise post-menopozal (Tip I) ve senil osteoporotik (Tip II) hastalar oluşturmaktadır³⁴.

2.1.4.1. Tip I Osteoporoz (Post-menopozal osteoporoz)

Kırk beş ve altmış beş yaş arası kadınlarda kemik kaybının başlıca nedeni gonadal fonksiyonların kaybı ile ilgilidir. Çalışmalarda kemik kaybının perimenopozal dönemde başlayıp menopoz sonrası 5–8 yıl içinde giderek azaldığı ve sonra da yaşlanmayla ilgili kemik kayıp hızında devam ettiği bildirilmiştir. Kortikal kemik kütleli tüm iskeletin %80 ni oluşturmakla birlikte trabeküler kemik hacmi kortikal kemik hacminin yaklaşık 4 misli olduğu için kemik kaybı trabeküler kemiklerde daha çok olmaktadır. Trabeküler kemikte kemik rezorbsiyonunun artması ile mikrofraktürler olmakta ve kemik yapısı bozulmaktadır. Kortikal kemikte ise ilk olarak endokortikal rezorbsiyon artmakta ve intrakortikal porozite olmaktadır. Kadın erkek oranı 6/1 dir. Kırıklar daha çok vertebra ve el bileğinde görülür. Etiyopatogeneizde östrojen düşüklüğü düşünülmektedir. Östrojen osteoblastlar ve osteositler üzerindeki reseptörleriyle doğrudan kemik üzerinde etki yapabilmektedir. Östrojen kemikte hücresel düzeyde sitokinler aracılığı ile osteoklastların olgunlaşmasını inhibe ederek sayılarını

azaltmaktadır³⁴. Azalmış serum estradiol düzeyinin düşük kemik mineral yoğunluğu ile ilişkili olduğu ve bunun da kırık riskini arttırdığı bilinmektedir. Dolaşımdaki östrojen; iskelet sisteminin yeniden şekillenmesini (remodeling) azaltarak, paratiroid hormonun kemik yıkımını uyarıcı etkisini inhibe ederek, kemik yapımında görevli olan osteoblastın ömrünü uzatarak, kemik yapımı için elzem önemi olan kalsiyumun gastrointestinal sistemden ve böbrekten geri emilimini arttırarak kemik üzerine koruyucu etkide bulunmaktadır³⁵.

Postmenopozal östrojen tedavisi kan östradiol düzeyini arttırarak KMY'nu arttırmaktadır. Hormon tedavisi ile vertebral KMY kaybının belirgin olarak geri çevrilebildiği rapor edilmiştir. Hormon tedavisi kullanıldığı sürece yukarıda anlatılan pozitif koruyucu etki sürekli devam eder³⁶. Bu pozitif etkilerinin yanı sıra yapılan bazı çalışmalarda Hormon Replasman Tedavisi'nin (HRT) bazı kanserler açısından riski arttırdığı gösterilmiştir^{37,38}.

2.1.4.2. Tip II Osteoporoz (Senil osteoporoz)

Senil osteoporoz 75 yaş üzerinde görülür. Kadın erkek oranı 2/1 dir. Kalça ve vertebralar başta olmak üzere tüm iskelet bölgelerinde kırıklara neden olabilir. Vertebra kırıkları nedeniyle dorsal kifozda artış olur. Sıklıkla tutulan kemikler kortikal ve trabeküler kemiklerdir. Senil osteoporozun patogenezinde, osteoblast fonksiyonlarında bozulma ve renal endokrin yetmezlik gibi yaşa bağlı gelişen değişiklikler rol oynar. Yaşa bağlı gelişen kemik kaybı, kadınlarda erkeklere göre distal radius bölgesi dışında tüm iskelet bölgelerinde daha fazladır. Kemik kaybı hızlı değildir. PTH fonksiyonu artmıştır³⁴ (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Tip I ve Tip II Osteoporotik Hastaların Karşılaştırılması³⁴

	Tip I	Tip II
Yaş	50–70	> 70
Kadın/Erkek Oranı	6/1	2/1
Kemik Kaybı	Trabeküler	Kortikal
Kemik Kayıp Hızı	Yavaş	Artmış
Yapım/Yıkım	Osteoplast aktivitesi artar	Osteoblast aktivitesi azalır
Kırıklar	Omurga (ezilme şeklinde) Distal radius	Omurga (çok sayıda kama şeklinde) Kalça
Serum Ca ve P	Normal	Normal
Total Alkalen Fosfataz	Normal (Kırık varsa artar)	Normal (Kırık varsa artar)
PTH fonksiyonu	Azalır	Artar
İdrarda Ca	Artar	Normal
Ca Absorbsiyonu	Azalır	Azalır
Nedenler	Menopoza bağlı faktörler	Yaşlanmaya bağlı faktörler

Lokalizasyona göre osteoporoz sınıflaması ise genel ve bölgesel olmak üzere 2 grupta toplanarak yapılmaktadır³⁴ (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Osteoporozun lokalizasyona göre sınıflaması³⁴

<p>A.Bölgesel (Rejyonel)</p> <ol style="list-style-type: none">1.Algonörodistrofi2.Geçici bölgesel osteoporoz3.Bölgesel migratuar osteoporoz4.Kalçanın geçici osteoporozu5.İmmobilizasyon/inaktivite <p>B.Genel</p> <p>I.Primer Osteoporoz</p> <ol style="list-style-type: none">1.Postmenopozal (Tip-I)2.Senil (Tip-II)3.Juvenil idiopatik <p>II. Sekonder Osteoporoz</p> <p>I. Endokrin</p> <ol style="list-style-type: none">1.Cushing sendromu-Kortikosteroid tedavisi2.Hiperparatiroidi3.Hipertiroidi4.Hipogonadizm5.Hamilelik6.Anoreksia nevroza7.Egzersiz ile ilgili amenore	<p>II. Fonksiyonel</p> <ol style="list-style-type: none">1. İmmobilizasyon/yerçekimi yokluğuna bağlı2. Obstruktif solunum yolu hastalıkları3.Romatoid artrit <p>III. Çevresel</p> <ol style="list-style-type: none">1.Kalsiyum eksikliği2.Alkolizm3.İlaçlar (Örneğin heparin)4.Mastositoz <p>IV. Genetik</p> <ol style="list-style-type: none">1.Osteogenesis imperfekta2.Ehler's-Danlos sendromu3.Homosistinuri4.Marfan sendromu
--	--

2.1.5. Osteoporoz Gelişiminde Risk Faktörleri

Osteoporoz gelişiminde birtakım risk faktörleri vardır. Bu faktörler kemik dansitesinde azalma ve kırık oluşum etiolojisinin anlaşılmasını sağlar. Ayrıca bu risk faktörleri, yüksek risk grubunda olan kişilerin önceden tanınması ve kırıklar oluşmadan önce koruyucu tedaviden yararlanması için de kullanılabilir.

2.1.5.1. Yaş, Cinsiyet

Bunlar kemik kütlesi ve kırık riski için en güçlü belirleyicilerdir. Pik kemik yoğunluğu uterus (fetal evrede) içinde başlayıp 40'lı yaşlarda tamamlanmakla beraber bu sürece esas katkı adolesan dönemde kazanılan kemik miktarı tarafından olmaktadır. Özellikle yumurta üretiminin kesildiği menopozun ilk yıllarında kemik kaybı hızlanır ve kemik kütlesi yaşla birlikte azalmaya devam eder²⁵. Bu nedenle pik kemik kütlesine ek olarak yaşlanma, başlı başına kemik kaybı için bir risk faktörüdür. Yaşlanma ile birlikte kemik dokusunda önemli değişiklikler meydana gelir. Kemikğin hem turnover hızında hem de yeniden şekillenme ünitelerinin sayısında bir artış olur. Bu durum, formasyonda (yapım) azalma ve rezorpsiyonda (yıkım) artma; yani kemik kaybının artması ile sonuçlanır.

Yaşlanma ile birlikte diyetle alınan kalsiyum miktarında ve kalsiyumun bağırsaktan emiliminde azalma olmaktadır. Osteoporozlu kadınlarda, aynı yaş grubundaki osteoporozu olmayan kadınlara göre kalsiyum emiliminde bir azalma bildirilmiştir³⁹. 65 yaşlarında ya da daha yaşlı kadınlarda hem düşük serum total estradiol konsantrasyonlarının (<5 pg/mL) hem de yüksek serum cinsiyet hormonu bağlayıcı globulin serum konsantrasyonlarının (≥ 1 $\mu\text{g/dL}$) kalça ve vertebra kırıkları için yüksek risk oldukları gösterilmiştir⁴⁰.

Erişkin erkeklerde yaş artışı ile birlikte kortikal kemik kütlesi doğrusal bir azalma göstermektedir. Ancak kadınlardaki azalma kadar hızlı değildir. Çünkü kadınlarda menopoza bağlı hızlı kayıp vardır. Erkeklerde kortikal kayıp daha azdır. Erkeklerde kortikal kalınlığın daha fazla olması apendiküler kemik kırıklarının daha az görülmesini açıklar. Kadınlar hem trabeküler incelme hem de trabeküler kayba eğilimlidirler. Oysa erkekler fazla trabeküler kayıp olmadan daha fazla trabeküler

incelme gösterir. Kırıklar 45 yaşından önce erkeklerde, 45 yaşından sonra ise kadınlarda daha siktir. Bu da ciddi travmalara bağlanmaktadır^{14,40}.

2.1.5.2. Irk ve Genetik

Irksal değışiklikler özellikle osteoporotik kırıklarla ilgili epidemiyolojik çalışmalarda belirgindir^{1,41}. Genel olarak beyaz ırkta, siyah ve Asya toplumlarına oranla kalça kırığı hızı daha yüksektir^{18,42,43,44,45,46}. En yüksek ortalama KMY değerleri ve en düşük kalça kırığı oranları siyah kadınlarda tespit edilmiştir^{44,47}. Kırık riskini etkileyen diğer bir faktör de vücut tipidir. Özellikle yaşlı kadınlarda ince yapılı olmak yüksek kırık riskiyle ilişkilidir^{48,49}. Vücut ağırlığı, vücut yağ % 'si veya beden kitle indeksi düşük olan postmenopozal bayanlar, düşük kemik kütlesi ve hızlı kemik kaybı bakımından yüksek risk altındadırlar^{50,51,52}.

Osteoporoz multifaktöriyel ve multijenik hastalıklardan biridir. Hastalıktan birden fazla gen sorumlu tutulmaktadır. Yapılan çalışmalarda genetik faktörlerin kemik fenotipindeki değışikliklerin % 70-80'ninden sorumlu olduğu gösterilmiştir^{53,54}.

2.1.5.3. Üreme İle İlgili Faktörler

Bu risk faktörleri arasında geç menarş, erken menopoz, 6 aydan daha uzun süreli amenore, kısa doğurganlık süresi, ooferektomi sonrası gelişen iyatrojenik menopoz, doğum sayısı, doğum kontrol hapı kullanımı, emzirme varlığı ve süresi sayılabilir¹⁴.

Menopoz ile ortaya çıkan gonodal yetersizliğe bağlı gelişen östrojen eksikliği kadınlardaki hızlı kemik kaybından sorumludur. Menopoz ile östrojen düzeyleri düştüğünde kemik yıkımı hızlanır. Doğal menopozdan önceki bilateral ooferektominin kemik kaybını ve kalça kırık riskini arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca doğal erken menopoz veya geç menarş ile birlikte gelişen doğurganlık süresinin kısa olması perimenopozal kadınlardaki düşük kemik kütlesi ile ilişkilidir¹⁴. Birçok çalışmada geç menarş hikayesi olan kadınlarda daha düşük mineral dansitesi saptanmıştır⁵¹. Bu da iskelet gelişiminin en kritik dönemi esnasında, yetersiz hormon seviyelerine neden olmasına bağlanmıştır.

2.1.5.4.Yaşam Şekli ve Egzersiz

Fiziksel aktivite, pik kemik kütlelerinin oluşmasına, kazanılmış KMY'nun sürdürülmesine ve kendisine yük bindirilen iskelet bölgelerinde fraktür riskinin azalmasına katkıda bulunur^{3,52}. Kemiğin yeniden yapılanmasında etkili mekanik faktörler kas kontraksiyonu ve yerçekimidir. Uzun süreli kesin yatak istirahati hızlı ve anlamlı kemik kaybına neden olmaktadır. Sedanter bir yaşam tarzının artmış fraktür riskiyle birlikte olduğu hem ekolojik hem de vaka-kontrollü çalışmalarda bildirilmiştir.

Egzersiz yaşa bağlı kırık insidansını azaltması çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır. Genç erişkinlerde egzersiz doruk kemik kütlelerini arttırmakta ve böylece daha sonra görülebilecek kırık riski azalmaktadır⁵⁰. Erken menopozal kadınlarda östrojen yetersizliğine bağlı hızlı kemik kaybı egzersizle yavaşlayabilmektedir. Kemiğin yeniden yapılanması ve mekanik yüklenme arasındaki ilişki uzun yıllar incelenmiştir. Genel olarak kabul edilen görüş kemiğin mekanik yüklenmesinin kemik yapımını arttırdığıdır.

2.1.5.5. Beslenme Alışkanlıkları

Özellikle diyetle alınan kalsiyum, KMY ile kuvvetli korelasyon içindedir⁵⁵. Kalsiyum eksikliği ile osteoporoz ilişkisi ilk defa Nordin tarafından hayvan deneylerinde gösterilmiştir¹⁴. Yapılan birçok çalışmada büyüme sırasında alınan kalsiyum ile kemik mineral yoğunluğu ve kemik kütlesi doğrudan ilişkili bulunmuştur. Özellikle çocukluk ve adölesan dönemde süt ve sütlü gıdalardan zengin beslenen hastalarda, osteoporotik kırık riskinin azaldığı gösterilmiştir¹⁴.

Aşırı miktarda kahve tüketimi, idrar ve bağırsak kalsiyum atılımını etkilemektedir. Düşük dozlarda kafeinin etkisi ise önemsizdir. Sigara kullanımı ise kemik üzerinde toksik etkiye sahiptir. Çalışmaların çoğunda sigara içenlerde daha düşük kemik kütlesi, daha hızlı kemik kaybı ve menopoza 2 yıl daha erken girme söz konusudur^{56,57}. Sigara içmek kemik kaybını hızlandırdığı gibi kalça kırığı riskini de arttırmaktadır. Sigara içen kadınlarda kalça, vertebra ve el bileği kırıkları, içmeyenlere oranla 1.5–2.5 kat daha fazladır. Sigara içen erkeklerde vertebra kırıkları sıklığı artmaktadır. 1 yıl sigara içme kalça kırık riskini %1, vertebra kırık riskini % 0.8 arttırmaktadır¹⁴. Alkol alımı da kırık riskini arttırmaktadır. Aşırı alkol tüketimi kalsiyum

emilimini azaltırken, atılımı ise arttırmaktadır¹. Yine alkole bağlı endokrin değişiklikler sonucu testosteron azalması ve kortikosteroid artışı osteoporozu kolaylaştırmaktadır.

Osteoporozda kalsiyum eksikliğinin rolü D vitamini eksikliği ile birlikte değerlendirilmelidir. D vitamini eksikliği kalsiyumun bağırsaklardan emilimini bozmakta, hafif sekonder hiperparatiroidi geliştirebilmekte ve kemik kaybı artmaktadır²⁹.

2.1.5.6. İlaç Kullanımı

Bazı ilaçların kullanımı da osteoporoz için risk faktörüdür. Bunların en başında glikokortikoidler gelmektedir. Ayrıca siklosporin, diüretikler, antikoagülanlar ve antikonvülsanların kullanımı da osteoporoz için risk faktörleridir^{3,14,42}.

2.1.6. Osteoporoz Tanısı

Çoğu vakada osteoporoz sessiz bir hastalık olarak kalır. Hafif bir ağırlık kaldırma gibi günlük aktiviteler sırasında vertebra kırığı oluşana ya da düşme sonucu kalça kırığı gelişene kadar osteoporoz tanısı koyulmayabilir. Kırıklar oluşmadan önce kemiklerin zayıflığı ya da gücü hakkında bilgi sahibi olmak çok önemlidir. Osteoporoz tanısında anamnez, fizik muayene ve klinik bulguların yanı sıra kemik mineral yoğunluğunun değerlendirilmesinin, görüntüleme ve laboratuvar yöntemlerinin ve histomorfometrik değerlendirmenin de önemli yeri vardır^{42,58,59}.

Osteoporoz düşünülen her hastada yapılması gereken işlemlerin başında yeterli bir anamnez ve omurganın fizik muayenesi yer alır^{8,22,47}. Ancak bunlar primer osteoporoz tanısında hassas ve yeterli değildir, osteoporozun sekonder formlarını değerlendirmede önemlidir. Öykü ve fizik muayenede; fraktür ve aile hikayesi, kas iskelet ağrısının tipi ve lokalizasyonu, diyetle alınan kalsiyum miktarı, fiziksel aktivitenin seviyesi, sigara, alkol ve kafein tüketimi, güneş ışınlarıyla teması, geçirdiği hastalıklar, ilaç kullanımı, doğum sayısı, laktasyon süresi, menarş yaşı, menstrüel durumu gibi osteoporoz risk faktörleri sorgulanır, kilo ve boy ölçümleri yapılır^{47,60}.

2.1.7. Osteoporozun Klinik Bulguları

Osteoporoz kırık oluşana kadar tipik olarak sessiz bir hastalıktır. Osteoporotik vertebra kırıkları herhangi bir nedenle çekilen göğüs grafisinde tesadüfen görülebilir. İlerlemiş osteoporozda kırılabilirlik artışı sonucu hafif bir travmayı takiben görülen akut

vertebra kırığında, ani başlayan şiddetli sırt ağrısı vardır. Ağrı, hareketle artar ve istirahatle azalır. Genellikle spinal hassasiyet ve kas spazmı ile birliktedir ve büyük ölçüde omurga hareketleri kısıtlanmıştır. Nörolojik bulgular yoktur⁸. Yaşlanma ile birlikte ilerleyen osteoporozda, vertebra kırıklarının sayısı artarak, dorsal kifoz, servikal ve lomber lordozda artış, boy kısalması ve şekil bozuklukları görülebilir. Normal bir insanda boy ile her iki kol arasındaki kulaç mesafesi birbirine eşitken, dorsal kifozu ileri derecede artmış olan osteoporotik insanlarda, boy kulaca göre kısalır. Kısıtlayıcı tipte akciğer hastalığı gelişerek solunum fonksiyonları bozulabilir⁶¹. Klinik bulguların yanı sıra psikolojik problemlerle hastaların yaşam kaliteleri de etkilenir¹⁸.

Osteoporozlu hastalarda fiziksel semptomların yanında günlük yaşam aktivitelerinde ve sosyal aktivitelerinde de kısıtlanma olmakta ve sonuç olarak yaşam kalitesi bozulmaktadır. Yaşam kalitesi ölçümü için NHP (Nottingham Health Profil), Hastalık etki profili (SIP: Sickness Impact Profil), Quallefo, Kısa ağrı sorgulaması (Brief Pain Inventory), SF-36 (Short form of 36) sık olarak kullanılmaktadır^{8,62}. Osteoporozun tanı ve takibinde önemli bir yer tutan görüntüleme yöntemleri osteoporozun derecesini ve kırık riskini belirleme, kemik kayıp hızını takip etme ve uygulanan tedavinin etkinliğini izleme gibi genel amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır^{59,63}. Erken değişiklikler, SPA (single foton absorpsiyometri), (DPA) Dual Foton Absorpsiyometri, DEXA (Dual Enerji X-Ray Absorpsiyometre), QCT (Kantatif Bilgisayarlı Tomografi), Ultrason, MRI (Magnetik rezonans görüntüleme), Mikro MRI, Nötron aktivasyon analizi, Radiogrammetri, radyografik dansitometri, Sintigrafi kullanılarak omurga ve femur boynunda saptanabilir. DEXA, günümüzde en çok kullanılan ve altın standart kabul edilen bir yöntemdir^{1,4,8,59,64}.

2.1.8. Osteoporozdan Korunma Yolları

Kemik yoğunluğunda azalma, kemik kırılabilirliğinde artma ile tarif edilen osteoporozda korunma ve rehabilitasyonun anahtar kelimesi kırıktır. Bir başka deyişle kırık eğiliminin, kırığın ve komplikasyonlarının yarattığı ağrı ve sonuçta özürlü kalmaktır^{65,66}.

Osteoporozun önlenmesinde verilen tedavi ve rehabilitasyon programının etkinliği kadar güvenilirliği de önemlidir. Bu yüzden kişinin kemik yoğunluğunun doğru olarak bilinmesi ve doruk kemik kütlelerinin saptanması gerekmektedir.

Osteoporozdan korunma intrauterin hayatta başlar ve ömür boyu sürer. Osteoporozdan korunmada iki yaklaşım söz konusudur:

- **Primer korunma:** İskelet büyümesi sırasında doruk kemik kitlesine erişmek için alınan önlemlerdir.
- **Sekonder korunma:** Menopoz ve yaşlanmaya bağlı olarak kemik kütlesi kaybının önlenmesidir.

Primer korunmada amaç erişkin dönemde doruk kemik kitlesinin sağlanmasıdır. Bu amaçla yeterli kalsiyum, D vitamini ve protein içeren dengeli diyet, çocukluk ve adolesan döneminden itibaren kemiklere stres oluşturan düzenli fiziksel aktivite gereklidir.

Sekonder korunmada amaç doruk kemik kitlesinin korunması ve kemik kaybının önlenmesidir. Bu amaçla yüksek risk grubunun belirlenmesi ve değiştirilebilen risk faktörlerinin düzeltilmesi gereklidir. Düzenli fiziksel aktivite sağlanmalı, yeterli kalsiyum ve D vitamini alımı desteklenmelidir.

2.1.9. Osteoporozda Tedavi

Osteoporozun tedavisi çok yönlüdür. Bunlar:

- Medikal
- Beslenme
- Egzersiz
- Yeterli güneş ışını
- Yaşam şeklinin düzenlenmesi
- Cerrahi

Osteoporoz tedavisinde amaç^{67,68,69};

1. Kırıkların önlenmesi
2. Kemik mineral yoğunluğunun korunması ve artırılması
3. Kırık ve iskelet deformitelerine bağlı belirtilerin iyileştirilmesi
4. Yaşam kalitesinin artırılması

2.2. Östrojen Hormonu

Östrojen, ovaryumlardan salgılanan iki önemli cinsiyet hormonlarından biridir. Östrojenler hem erkeklerde hem de kadınlarda bulunmakla beraber, üreme yasındaki kadınlarda düzeyleri çok daha yüksektir. Embriyonik ve fetal gelişimde önemli bir role sahip olan östrojen hormonu, kadınların sekonder seksüel karakterizasyonu, üreme döngüsü, fertilitate ve gebeliğin devamlılığı üzerine etkileri vardır. Bunun yanı sıra endometrial hücre büyümesinde ve farklılaşmasında düzenleyici göreve sahiptir⁷⁰. Doğal olarak oluşan östrojenler, kolesterolden türeyen C18 steroidlerdir ve bunlar 17β-östradiol (E2), östrone (E1), and östriol (E3) olmak üzere üç tiptir⁷¹. Kadınlarda bulunan bu hormonlar arasında östradiol en baskın olanıdır. Menarş ile menopoz arasındaki başlıca östrojen östradioldür.

Östron, östradiolden daha zayıf etkili olup menopoz sonrası kadınlarda östradiol ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeylerde bulunur. Östrojen hormonunun temel kaynakları ovaryumlar ve plasentadır. Foliküllerin oluşumu ve oositlerin olgunlaşması LH, FSH ve östrojenin karşılıklı etkileşiminin gerekli olduğu karmaşık olaylardır⁷². Vücutta bunlar enzim reaksiyonları sonucu androjenlerden sentezlenir. Östradiol testosterondan, östron da androstenedion'dan sentezlenir.

2.2.1. Östrojen Hormonu Üretimi

Östrojenler esas olarak ovaryum ve testislerde sentezlenirler ancak, periferel dokularda androjenlerin aromatisasyonu ile de sentezlenmektedirler^{73,74}. Kadınlarda östrojen hormonu, temel olarak ovaryumlarda gelişen foliküller, korpus luteum ve plasenta tarafından üretilir.

FSH ve LH, yumurtlayan kadınlarda ovaryumlarda östrojen üretimini düzenlerler. Bazı östrojenler aynı zamanda düşük düzeylerde karaciğer, adrenal bezler ve memede sentezlenirler. Östrojenin bu ikincil kaynakları özellikle post menopozal kadınlar için önemlidir.

Östrojenin sentezi ovaryumlarda teka interna hücrelerinde kolesterolden androstenedonun senteziyle başlar. Bu bileşik, bazal membrandan çevredeki granuloza hücrelerine geçerek burada doğrudan veya testosteron üzerinden östron veya östradiole çevrilir. Testosterondan östradiole ve androstenediondan da östrona dönüşüm aromataz

enzimi sayesinde olmaktadır. Östradiol düzeyleri menstrual döngü boyunca farklılık gösterdiğinden ovulasyon öncesi oldukça yüksek seviyede ilerler⁷⁵.

2.2.2. Östrojen Hormonunun Etki Mekanizması

Hormonların hedef hücrelerine ulaştıklarında etkilerini gösterebilmesi için özgül reseptörlerine bağlanması gerekir. Hormonlar ya membran reseptörleri ile ya da çekirdek reseptörlerine bağlanarak biyolojik aktivitelerini gösterirler. Östrojenler etkilerini ligand ile aktive olan ve östrojen reseptörü olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleri aracılığı ile göstermektedir^{73,76}. Östrojen reseptörleri ayrıca hücre içi ikincil habercilerin ve zarla ilişkili olan sinyal komplekslerinin aktivitesine de aracılık etmektedir^{73,77}.

Östrojen reseptörleri hücre içi reseptörlerin çekirdek hormon ailesinin bir üyesi olup 17 β - östradiol hormonu ile aktive edilirler⁷⁵. Östrojen, çekirdek reseptör proteine bağlanarak doku ve organa özgül fizyolojik cevapları tetikler. Çekirdek reseptörleri, hormona bağlanma, transkripsiyonda görev alan DNA'ya bağlanma ve diğer protein faktörleri ile etkileşen düzenleyici bölgelerden oluşur⁷⁸.

Östrojen reseptörünün alfa (ESR α) ve Östrojen reseptörü beta (ESR β) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. İki reseptör proteininin de DNA bağlanma bölgesi oldukça benzer olmasına rağmen, molekülün genelindeki amino asit benzerliği düşüktür. Örneğin ligand bağlanma bölgesinde %55 oranında homoloji vardır. Bunun sonucu olarak da farklı ligandlar her iki reseptör proteinine farklı bağlanma ilgisi göstermektedir⁷¹.

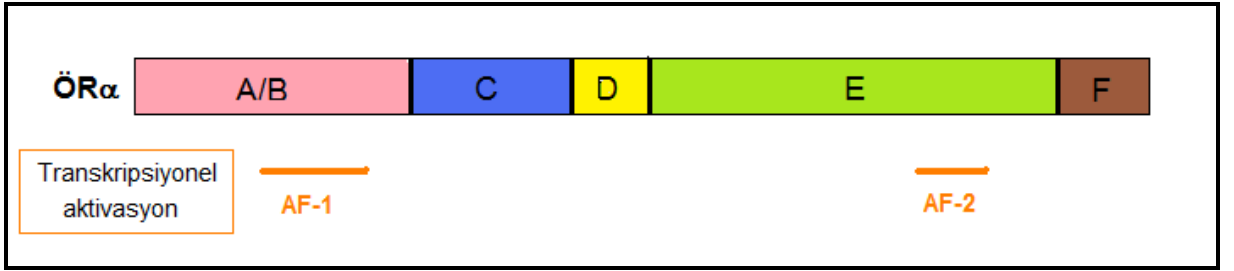
Kandaki serbest östrojen hormonu hücreye zardan hızlı difüzyon ile girer, özgül reseptörlere bağlanır, dimer oluşumu gerçekleşir ve reseptör hormon mesajını çekirdekte kromatine iletir. Bunun ardından protein sentezi ve hormonun karakteristik hücresel yanıtına neden olan mRNA yapımı gerçekleşir.

Östrojen reseptörlerinin yarı ömrü 2-4 saat olup yaklaşık olarak 6 saatte bağlanma kapasiteleri azalır. Bu nedenle östrojen etkisinin devamlılık gösterebilmesi için östrojen varlığının devamlı olması gerekmektedir⁷⁸.

2.2.3. Östrojen Reseptör Proteinini Alfa'nın (ESR α) Yapısı

ESR α ilk olarak 1958 yılında Elwood Jensen tarafından tanımlanmış, 1986 yılında ilk kez uterus klonlanmıştır^{76,79}. Bugüne kadar östrojen reseptörleri oositte⁸⁰, granuloza hücrelerinde⁸¹ ve overyum epitelyum hücrelerinde⁸² tanımlanmıştır. ESR α 595 amino asit içerir ve 66 kDa ağırlığındadır⁸³.

ESR α proteini amino ucundan karboksil ucuna doğru A'dan F'ye kadar isimlendirilen 6 bölgeye sahiptir⁸⁴ (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: İnsan Östrojen reseptör α (ESR α) proteininin işlevsel bölgeleri. AF-1;Aktivasyon işlevi 1, AF-2; Aktivasyon işlevi 2

A ve B bölgeleri; çekirdek reseptör ailesi içinde oldukça değişken bir bölge olup sahip olduğu Aktivasyon İşlevi 1 (AF-1) yoluyla bir genin ifadenmesini hücreye özgün şekilde düzenlemektedir⁸⁴. Bu sayede ESR α merkez transkripsiyon aygıtının bileşenleri ile doğrudan etkileşerek hedef genleri aktive eder ya da diğer proteinlere sinyal iletiminde rol oynayan koaktivatör proteinlerle doğrudan ilişki kurar. AF-1 bölgesi, hücre tipi ve kontrol bölgesi içerik özgünlüğüne sahip olmakla birlikte ESR β ' da bulunmamaktadır⁸⁵.

C Bölgesi; ESR α proteininin DNA bağlanma bölgesidir. Hedef genlerin Östrojen Cevap Elementlerine bağlanmasından sorumlu olup reseptör dimerizasyonunda görev alır^{73,86}.

D Bölgesi; DNA bağlanma bölgesini ligand bağlanma bölgesi ile ayıran 40-50 amino asitlik bir bölgedir. Reseptör proteininin dimerizasyonunda görev alır aynı zamanda korepressör proteinler ile etkileşmektedir^{84,87}.

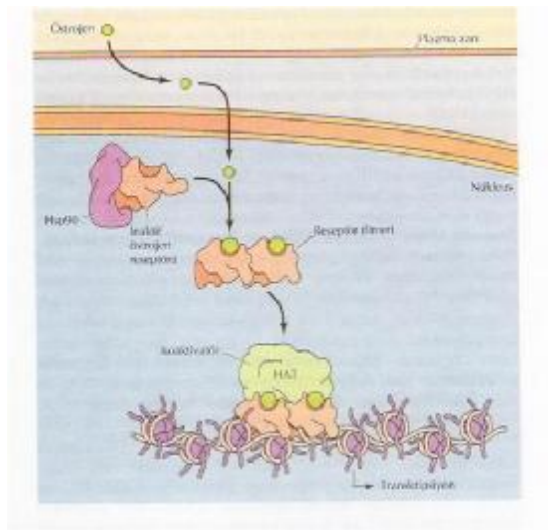
E Bölgesi; Ligand bağlanma bölgesini ve Aktivasyon İşlevi 2'yi (AF-2) içermektedir. Aynı zamanda dimerizasyon ve reseptör proteinin çekirdek yerleşiminden de sorumludur. E bölgesinin C ucunda yer alan ve çekirdek reseptör süper ailesi içinde

oldukça korunmuş bir yapı olan AF-2, çeşitli koaktivatörler tarafından tanınmakta olup bazı korepressörler için bir tutunma yeri görevi üstlenmektedir⁸⁴.

F bölgesi; Karboksil uçta yer alan bu bölge, ESR α proteininin gen aktivasyon kapasitesine katkıda bulunmakta ve proteininin dimerizasyonu ve kofaktör bağlanmasında da etki göstermektedir⁸³.

2.2.4. ESR α 'nın Aktivasyonu

ESR α 'nın aktivasyonu ligand (östrojen) bağımlı ve ligandtan bağımsız olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Östrojen bağımlı aktivasyon durumunda reseptör proteini, DNA bağlanma bölgesini kapatan ve reseptörü inaktif bir pozisyonda tutan şaperonlar ile bağlıdır. Reseptöre östrojen bağlanması durumunda reseptör proteini Hsp 90, Hsp 70 ve diğer proteinlerden ayrılıp konformasyonel değişiklikler geçirerek dimerizasyon oluşur ve bu şekilde sitoplazmadan çekirdeğe geçer^{71,85}. Reseptörün ligand bağlanması ile aktive olmasını reseptörün inaktif durumunda bağlı olduğu Hsp 90 şaperonununun ATP'yi hidrolize etmesi tetiklemektedir. Bu durumda östrojen reseptör dimeri DNA üzerindeki Östrojen Yanıt Elementi ile etkileşime girer ve hücrel transkripsiyon kompleksi diğer bileşenleri ile etkileşir⁸⁸. Amino uçta yer alan AF-1 ve ligand bağlanma bölgesinde yer alan AF-2'nin birbirleriyle etkileşimleri sonucu doku, hücre ve kontrol bölgesine özgü olan yardımcı düzenleyici kompleksler hedef gen bölgesinde toplanarak hedef genlerin aktivasyonu veya baskılanması yönünde etkilerini gösterirler^{85,88}.



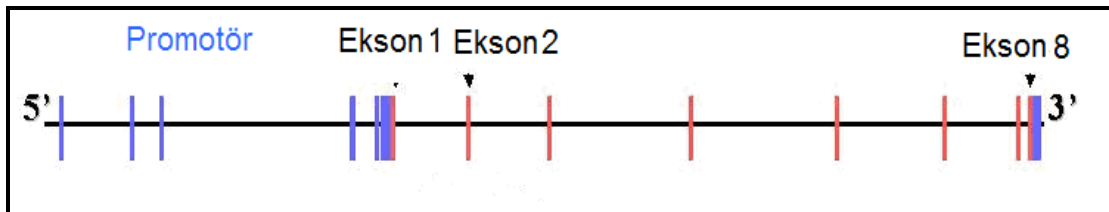
Şekil 2.3. ESR α 'nın Aktivasyonu⁸⁹

ESR α ' yı da içeren tüm steroid reseptör proteinleri kendilerine özgü ligandların bağlanmasından sonra fosforile edilirler. Steroid hormon reseptörlerinin fosforilasyonu reseptörün gendeki kendi yanıt elementine bağlanmasında ve bundan sonra gerçekleşen transkripsiyonun aktivasyonunda önemli bir rol oynar⁹⁰. Genel olarak AF-1 bölgesindeki serin amino asitlerinin fosforilasyonu koaktivatör toplanmasını arttırmakta ve ESR α aracılı transkripsiyonun artışıyla sonuçlanmaktadır. Serin 236 fosforilasyonu, reseptör dimerizasyonunda ve DNA' ya bağlanmada rol oynamaktadır⁹¹.

ESR α ' nın ligand bağımsız aktivasyonu ise hücrel kinaz ve fosfatazların aktivitelerini değiştiren moleküler yollarla gerçekleşmektedir⁷⁹. Östrojen yokluğunda farklı sinyallerle aktifleşen kinazların aktive olması ile östrojen reseptörü geri dönüşümlü olarak fosforile edilip aktivasyonu sağlanır⁸⁸. Bu mekanizma özellikle büyüme faktörleri, sitokinler ve nörotransmitterler gibi hücre dışı sinyal moleküllerinin yerel konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda ve erkeklerde veya menopoz sonrası kadınlarda olduğu gibi serum östrojen konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda etkili olabilmektedir⁹².

2.2.5. Östrojen Reseptör Geni

ESR α ve ESR β sırasıyla ESR1 ve ESR2 genlerinden ifadenmektedir^{73,93}. ESR2 geni 14. kromozomda (14q23.2) 40 kb'lık bir bölgeyi içermektedir. ESR1 geni, 6. kromozomda (6q25) 140 kb'lık bir bölgeyi kapsar ve 8 ekson, 7 intron içermektedir (Şekil 2.4). Eksonlar sırasıyla 684, 191,117, 336, 139, 134, 184 ve 4537 bç (toplam 6322 bç) büyüklüğündedir^{72,94,95}.



Şekil 2.4. İnsan östrojen reseptör α geni intron ve ekson bölgeleri.

ESR α geninin transkripsiyonu karmaşıktır ve bir kaç tane kontrol bölgesinin aktivitesi rol almaktadır⁹⁶. ESR α ' nın da yer aldığı çekirdek reseptör ailesinin diğer üyelerinden elde edilen bulgular, çoklu kontrol bölgelerinin, steroid hormon

reseptörlerinin ortak bir özelliği olduğunu göstermektedir. İnsan ESR α geninin, en az 7 kontrol bölgesine bağlı 7 çeşit mRNA transkripsiyonu yapılmaktadır. Bu kontrol bölgelerinin bazıları reseptörün ligandı olan östrojenle düzenlenmektedir. Çoklu kontrol bölgelerinin en önemli olası işlevi, kontrol bölgelerinin dokuya özgün düzenlenmesi ve dokulardaki farklı mRNA varyantlarının ifadenmesinin düzenlenmesinde iş görebileceğidir. Örneğin normal meme ve uterin dokusunda kontrol bölgesi A, kontrol bölgesi B' ye oranla daha az kullanılmaktadır. Farklı kontrol bölgeleri gelişimin farklı aşamalarında kullanılabilir. Sıçan embriyonik gelişiminde ESR α mRNA varyantlarının düzeylerinde farklılıkların olduğu belirlenmiştir⁹⁷.

Çoklu kontrol bölgesi mekanizmasının diğer bir işlevi de farklı kontrol bölgelerinden üretilen mRNA'ların farklı alternatif intron çıkartılması ve ekson birleştirilmesi işlemine (alternatif splicing) uğrayabileceği ve bunun da çeşitli protein izoformlarını kodlayan mRNA' larla sonuçlanabileceğidir. Bu sayede ESR α ' nın farklı mRNA işlenmesine uğramış formları tanımlanmıştır⁹⁷.

2.3. Osteoporoz Genetiği

Osteoporoz, hormonal, çevresel, yaşam şekli (sigara içilmesi, fiziksel egzersizler gibi) ve beslenme faktörlerinin (kalsiyum alımı, alkol tüketimi) etkisi altındaki genetik faktörlerin kontrol ettiği multifaktoriyel (poligenik) bir hastalıktır^{33,98,99}. KMY üzerine pek çok çevresel faktörün etkili olmasına rağmen kemik kitlesi bakımından bireyler arasında görülen farklılıkların %50-80'i genetik kökenlidir^{33,100}.

Son yıllarda yapılan çalışmalar osteoporozda ırk ve etnik köken, yaş ve pozitif aile öyküsünün rol aldığını, normal dağılım ve devamlı varyasyon gösteren bir hastalık olduğunu, bu nedenle istenmeyen koşulların belli bir eşik değerin üstünde olması halinde ortaya çıkan bir hastalık (eşik model) olduğunu göstermiştir. Genlerin kemik yoğunluğu üzerindeki etkisi iskeletin farklı yerlerinde farklı genler tarafından (yerine özgü) regüle edilebileceğini düşündürmektedir³³.

Osteoporozun ortaya çıkmasına neden olan çok sayıdaki genlerden bazılarının KMY üzerine etkisi oldukça fazla (majör genler), bazılarının etkisi ise oldukça azdır (minör genler). Osteoporoz için; kalsitropik hormonlar ve reseptörleri (vitamin D ve reseptörü, kalsitonin ve reseptörü, Parathormon ve reseptörü, kalsiyum reseptörü),

adezyon molekülleri (integrin gibi) ve ligandları, kemik matriks proteinleri (kollajenik veya kollajenik olmayan), sitokinler, büyüme faktörleri ve reseptörleri (IL-6,IL-1,IGF-I gibi), bazı enzimler (aromatase, metalloproteinase vb), cinsiyet hormonları ve reseptörleri (östrojen ve androjen) potansiyel aday genlerdir³³.

Osteoporoz benzeri kompleks hastalıkların patogeneğinde rol alan genleri belirlemek için ikiz çalışmaları, çok nesilli geniş ailelerde linkage analizi, kardeşler arasında (sib-pair) allel paylaşım yöntemi, akraba olmayan kontrol ve hastalarda assosiyasyon çalışmaları ve hayvanlarda çaprazlama deneyleri gibi birkaç farklı yaklaşım olmakla birlikte pratikte fenotiple polimorfik genetik marker ilişkisi saptanmaktadır. Osteoporozla katkıda bulunan genetik varyasyonlara ait bilgilerin çoğu aday genlerle KMY (kemik mineral yoğunluğu) çalışmalarından gelmektedir. Bu çalışmaları değerlendiren meta analizlere göre vitamin D reseptör geni (VDR), östrojen reseptör alfa geni (ESR α), tip 1 kollajen alfa A1 zinciri geni (Col1A1) ve İnterlökin 6 (IL-6) geninin allelik varyasyonları ile KMY ve/veya kırıklar arasında önemli ilişkilerin olduğu saptanmıştır. VDR, ESR1, Col1A1 ve interlökin-6 (IL-6) genlerinden başka ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) – benzeri protein 5 (LRP5) genlerinin polimorfizmlerinin de osteoporozla ilişkisi çalışılmaktadır. Col1A1 hariç diğer dört gen pleiotropik etkili (master gen) olup bazı çalışmalarda osteoporozdan başka yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklar, göğüs kanseri ve kolorektal ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir^{98,100,101}.

Bazı fenotipler ise genetiğin ve çevre faktörlerinin etkileşimi sonucu ortaya çıkar; sorumlu alleller olduğu halde fenotipte görülmemesi (eksik penetrans) veya sorumlu allel olmadığı halde bazı bireylerin yaşlanma gibi genetik olmayan faktörler sonucu osteoporozla yakalanması gibi³³.

2.3.1. Osteoporozla İlişkili Gen Polimorfizmleri

Kemik oldukça dinamik bir dokudur ve kemiğin metabolik kontrolü büyüme faktörleri, sitokin, nitrik oksit, hücre sinyal yolları gibi lokal faktörlerle ve sistemik yollarla kontrol edilir. Hormonların sistemik yolla endokrin regülasyonu, ya hücre zarındaki reseptörler yolu ile ya da steroid/tiroid reseptör süper ailesinde olduğu gibi transkripsiyon faktörü olarak nükleus seviyesinde gerçekleşir. Vitamin D ve seks

hormonları kemik hücresi fonksiyonlarının önemli regülatörleri olup nükleus seviyesinde görev yapmaktadırlar³³.

Steroid hormon reseptör genlerinden östrojen reseptör geni (ESR) (14 polimorfizm), Vit D Reseptör (VDR) geni, androjen reseptör geni ve progesteron reseptör genine ait polimorfizimlerle osteoporozun ilişkisi çalışılmıştır. Osteoporoz genetiği ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmaların çoğu özellikle ESR ve VDR üzerinde yoğunlaşmıştır^{33,100}.

2.3.1.1. Östrojen ve Östrojen Reseptör Gen (ESR α) Polimorfizmi

Polimorfizm, bir toplumda farklı allellere bağlı olarak genetik açıdan belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir¹⁰². Eğer toplumda herhangi bir lokusta en az iki tane yaygın bulunan allel varsa bu lokusun polimorfizm gösterdiği söylenir ve bir allelin toplumdaki sıklığı %1'den fazla olursa bu allel polimorfik olarak adlandırılır^{103,104}.

ESR α genindeki polimorfizmler ve çeşitli klinik fenotipler arasındaki ilişkileri araştıran çalışmalarda PvuII, XbaI ve kontrol bölgesindeki TA tekrar polimorfizmleri üzerine yoğunlaşmıştır¹⁰⁵.

PvuII polimorfizmi, intron 1' de sitozin nükleotidinin timine dönüşümü (C>T) sonucu oluşur. Pvu II enziminin tanıma dizisi timin nükleotidini içeren; TTCATCTGAGTTCCAAATGTC~~C~~CAGCTGTTTTATGCTTTGTCTCTGTTTCCC şeklindedir, orijinal dizisi ise sitozin nükleotidini içeren; TTCATCTGAGTTCCAAATGTC~~C~~CAGCCGTTTTATGCTTTGTCTCTGTTTCCC şeklindedir¹⁰⁶. Bu dönüşümün belirlenmesinde kullanılan restriksiyon enziminden yola çıkarak bu polimorfizme PvuII polimorfizmi denilmektedir. C>T dönüşümü 2. eksonun başlangıcından 397 nükleotit yukarısında gerçekleşmektedir¹⁰⁶. PvuII enziminin kesim bölgesinin olması p alleli ya da T alleli olarak adlandırılmaktadır. Enzimin kesim bölgesinin olmaması ise P alleli veya C alleli olarak isimlendirilmektedir¹⁰⁷. Bu çalışmada kesim bölgesinin olması p, kesim bölgesinin olmaması P ile belirtilmiştir.

PvuII polimorfizminin ESR α mRNA'sında intronların çıkması ve eksonların birleşmesine (splicing) etki ettiği ve meydana gelen C>T dönüşümünün protein sentezinde bir değişime yol açtığı düşünülmektedir¹⁰⁸.

XbaI polimorfizmi, intron 1' de adenin nükleotidinin guanine dönüşümü A>G sonucunda oluşmaktadır. Xba I enzimi orijinal diziyi keser ve bu orijinal dizi adenin nükleotidini içeren;

TTTCCCAGAGACCCTGAGTGTGGTCTAGAGTTGGGATGAGCATTGGTCTCTA

şeklinindedir. Aynı dizide adenin nükleotidinin guanine dönüşüğü

TTTCCCAGAGACCCTGAGTGTGGTCTGGAGTTGGGATGAGCATTGGTCTCTA

şeklindeki diziyi ise kesmez¹⁰⁶. Bu dönüşümün belirlenmesinde kullanılan restriksiyon

enziminden yola çıkarak bu polimorfizm XbaI polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır.

A>G değişimi 2. eksonun başlangıcından 351 nükleotid önce gerçekleşmektedir. XbaI

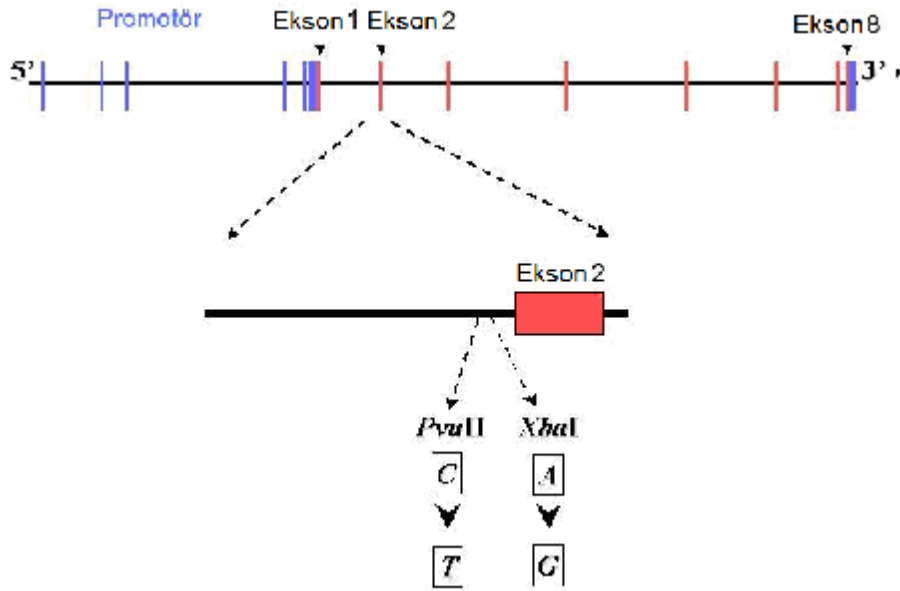
polimorfizmine neden olan A>G değişimi, PvuII polimorfik bölgesinden 46 baz aşağı

kısımda yer almaktadır¹⁰⁸ (Şekil 2.5). XbaI enziminin kesim bölgesinin olması x alleli

ya da A alleli olarak adlandırılmaktadır. Enzimin kesim bölgesinin olmaması ise X alleli

veya G alleli olarak isimlendirilmektedir¹⁰⁷. Bu çalışmada kesim bölgesinin olması x,

kesim bölgesinin olmaması X ile belirtilmiştir.



Şekil 2.5. İnsan östrojen reseptör α geni 1. intronunda yer alan PvuII ve XbaI polimorfizmlerinin yerleşimi

ESR α geninin kontrol bölgesinde yer alan TA tekrar sayısına bağlı olarak oluşan TA tekrar polimorfizmi birinci eksonun 1kb'lık üst bölgesinde yer almaktadır. ESR α

gen kontrol bölgesi alternatif eksonlar ve farklı gen transkriptlerinin ifade edilmesi ile sonuçlanan alternatif kesim bölgeleri içeren çoklu kontrol bölgelerine sahip oldukça karmaşık bir genomik organizasyona sahiptir⁹⁷. TA dinükleotid tekrar uzunluğunun, alternatif kontrol bölgesi kullanımını etkileyerek belirli dokularda farklı ESR α ifadenmesine yol açtığı bildirilmiştir¹⁰⁹. Diğer taraftan steroid yanıt elementi gibi davranabilecek bir düzenleyici elementinin TA tekrarının yaklaşık 200 bç aşağısında yer aldığı belirlenmiştir¹¹⁰. Her ne kadar bu enhancer'ın rolü belirlenememiş olsa da polimorfik tekrar bölgesine yakınlığı onu TA tekrar büyüklüğünün işlevsel etkileri için potansiyel bir hedef yapmaktadır.

2.3.1.2. Vitamin D ve Vitamin D Reseptör Gen (VDR) Polimorfizmi

Vitamin D'nin doğal şekli olan kolekalsiferol (vitamin D₃) ya günlük gıdalarla alınır ya da derideki 7-dehidrokolesterolün ultraviyole ışığı etkisi ile vitamin D₃'e dönüşmesinden elde edilir. Vitamin D₃, karaciğerde 25(OH)₂ Vit D₃'e böbrekte de aktif form olan kalsitriole [1,25(OH)₂D₃] metabolize olur^{32,111}.

Vitamin D gerçek steroid hormon olmamakla birlikte, steroid hormonlar gibi nukleer reseptörler aracılığı ile görev yapmaktadır. Kalsitriol [1,25(OH)₂D₃], VDR'ye bağlanarak kalsiyumun bağırsaktan emilmesini, böbrekten kalsiyum ve fosfatın geri emilimini ve paratiroid hormon düzeyini ayarlamaktadır. VDR osteoporoz aday genlerinden kemik kitlesi üzerinde etkisi olduğu belirlenen ilk gendir. İkiz ve populasyon çalışmalarında KMY ile ilgili varyasyonların % 75'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir¹¹².

VDR geninde (12q12-14) transkripsiyona uğramayan ilk ekzonla birlikte toplam 10 ekzon, 8 intron vardır ve büyüklüğü yaklaşık 100 kb'dır. İnsan VDR geninde önemli sayıda RFLP polimorfizmi saptanmıştır. Genin 3' ucunda Taq I, Apa I ve Bsm I enzimlerinin, 2. ekzonda transkripsiyon başlangıç noktasında Fok I enzimini kesim yaptığı polimorfik bölgeler bulunur. Her bir endonukleaz için restriksiyon alanının bulunması geleneksel olarak enzimin ilk harfinin küçüğü ile (t, a, b, f), restriksiyon bölgesinin olmaması da büyük harfleri (T, A, B veya F) ile gösterilmektedir. Kesim durumuna göre bireylerin genotipi homozigotlar için tt, aa, bb, ff veya TT, AA, BB, FF ve heterozigotlar için Tt, Aa, Bb ve Ff olur.

Genin 3' ucundaki 3 kesim noktasının oluşturduğu Taq I, Apa I ve Bsm I polimorfizmine ait alleler birbirine çok yakın (bağlı alleller) olup örneğin t allelinin varlığı diğer ikisinin de (a, b) olduğuna veya A ve B allellerinin (Bsm I ve Apa I restriksiyon alanlarının) yokluğuna işaret etmektedir.

Ekzon 2 de bulunan Fok1 polimorfizmi fonksiyonel olup kesimin olduğu allelde (f) transkripsiyon ilk ATG dizisinden başladığından normal, kesim yoksa (F alleli) transkripsiyon bir sonraki allelden başladığından transkrip daha kısa (ama gene fonksiyonel) olur. Yapılan çalışmalarda Fok1 allelik varyantlarının KMY üzerine etkisi ırk, yaş, menopoz durumu ve iskelet bölgesine göre değişmekte, ayrıca kalsiyum alımı gibi çevresel faktörlerden de etkilenmektedir³³.

2.3.1.3. İnterlökin ve İnterlökin Reseptör Gen (IL-R) Polimorfizmi

IL-6 pleiotropik bir sitokin olup immünite, enflamatuvar ve akut faz cevaplarında, hemotopoez, aterogenez ve çeşitli endokrin ve metabolik olaylarda merkezi görev yapar³³. Kemikte osteoblast, monosit ve T hücreleri tarafından üretilen IL-6 osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunda rol oynadığından post-menopozal dönemdeki kemik kaybında da önemli bir rol oynar³³. IL-6 promotorunda bulunan iki SNP (-174 G>C ve -572 G>C) ile yaş, menopoz, KMY, östrojen durumu ile kalsiyum ve Vitamin D alımı arasında önemli ilişkiler saptanmıştır^{98,100}. Örneğin östrojeni düşük ve kalsiyum alımı zayıf kadınlarda KMY -174CC genotiplerinde en yüksek, GC genotiplerinde orta, GG genotiplerinde ise düşük bulunmuştur^{33,100}. Özetle IL-6 promotor varyantları interlökin 6 aktivitesi ve yaşlanmaya bağlı osteoporoz ve ateroskleroz gibi hastalıkları etkilemektedir³³.

2.3.1.4. Tip 1 Kollajen Alfa A1 Zinciri Geni (CollA1)

Tip 1 kollajen üreten genler (CollA1 ve CollA2) osteoporoz patogenezi açısından önemli aday genlerdendir. CollA1 geninin transkripsiyonunu düzenlediği düşünülen ve bir transkripsiyon faktörü olan Sp1'in bağlanma bölgesinde oluşan bir polimorfizmin osteoporotik kırıklarla ilişkili olduğu belirtilmiştir. CollA1 polimorfizmi ile osteoporotik kırıkların oranı arasında etnik farklılıklar bulunmaktadır. Bu polimorfizim Kafkas populasyonunda oldukça yaygın olmasına rağmen Afrikalılar da ve Asyalılar da nadiren görülmektedir^{99,113}.

2.3.1.5. Osteoporozla İlişkili Olduğu Düşünölen Diğer Genler

- Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) – Benzeri Protein 5
- Androjen Reseptör Geni
- Progesteron Reseptör Geni
- Transforming Büyüme Faktörü β
- Apolipoprotein E Geni
- Paratiroid Hormon (PTH)
- Paratiroid Hormon Reseptörü Geni ^{33,99,100,11}

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda belirtilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Taq DNA polimeraz enzimi (Fermentas)
- Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (Fermentas)
- PCR tamponu (Fermentas)
- Primerler (TIB Molbiol)
- dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Roche)
- Restriksiyon enzimleri PvuII ve XbaI (Fermentas, Roche)
- Etidiyum bromid (Sigma)
- Agaroz (Promega)
- Tris-baz (Sigma)
- Borik asit (Sigma)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- TritonX100 (Sigma)
- Sükroz (Merck)
- Proteinaz-K (Sigma)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Merck)
- Etil alkol (Merck)
- Distile ve bidistile su

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Soğutmalı santrifüj (Universal 16R)
- Mikrosantrifüj (Techne force 16)
- Su banyoları (Grant)

- Hassas terazi (Sartorius)
- Terazi (Shimadzu 321-33557)
- pH metre (İnolab)
- UV jel görüntüleme sistemi (UVItec)
- Otomatik pipetler (Gilson, Biohit, Socorex)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Etüv (Dedeoğlu)
- Elektroforez güç kaynağı (EC3000-90)
- Horizontal (yatay) elektroforez sistemi (Biogen)
- PCR cihazı (Thermal cyclers Ependorf Mastercycler)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Deepfreez (Siemens, Bosch)
- Otoklav (Trans)

3.2 Kan Örneklerinin Sağlanması

Çalışma grubu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Osteoporoz polikliniğinde takip edilen menopoza girmiş hastalardan oluşturuldu. Kalsiyum ve fosfor metabolizma hastalıkları, endokrinolojik hastalıkları (hipertiroidizm, diyabet vs.), kronik karaciğer ve böbrek hastalıkları, iskelet hastalıkları (paget, romatoid arthrit vs.) olanlar, kemik yoğunluğu ve metabolizmasını etkileyecek ilaç alanlar (kortikosteroid, antikonvülzan, kalsitropik ilaçlar vs.), HRT (hormone replacement therapy), tiroid replasman tedavisi ve estrogen reseptör modülatörleri alanlar çalışmaya dahil edilmedi. Bu çalışmada, 34 normal, 73 osteoporotik olmak üzere toplam 107 birbiri ile akraba olmayan postmenopozal kadın osteoporozla ilgili kriterler ve moleküler düzeyde incelendi.

Bu kişilerden EDTA'lı tüplere kanlar alındı. Tüpler alt üst edilerek kanların pıhtılaşması önlendi. Bu kan örnekleri DNA elde etmek üzere kullanıldı.

3.2.1. Hasta Rızası

Bu çalışmada yer alan tüm hastalar ve kontrol grubu, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen

kurallara uygun olarak hazırlanmış Bilgilendirilme Onam Formları doldurularak çalışmaya katılmıştır.

3.3. Yöntem

3.3.1. Periferik Kandan DNA Eldesi

DNA üzerinde değişik amaçlı ve çok yönlü analiz yapmamıza imkan veren gen teknolojisi uygulamalarının ilk basamağı DNA'nın elde edilmesidir. Genomik DNA nükleuslu hücrelere sahip periferik kan, kemik iliği, amniyon sıvısı, koryonik villüs gibi herhangi bir insan doku parçasından elde edilebilir.

Periferik kandan DNA eldesi için Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği salting out (tuzla çöktürme) yöntemi modifiye edilerek uygulandı¹¹⁴.

1. 1,5 ml lik ependorf tüpü içerisine iyice alt üst edilmiş kan örneğinden 700 µl, eritrosit lizis (Ek-1.1) solüsyonundan da 700 µl konulup dikkatlice alt üst edilerek 3-5 dk. oda ısısında bekletildi. 4500 rpm'de 5 dk Santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

2. Elde edilen pellet üzerine 700 µl eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Tüp kuvvetlice çalkalanarak pellet çözdürüldü. 4500rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

3. Pellet üzerine 1000 µl (1 ml) fizyolojik tampon (Ek-1.2) eklenip pellet çözdürüldü. 4500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı atıldı.

4. 300 µl TE-9 (Ek-1.3) tamponu ilave edilip pellet çözdürüldü. Bunun üzerine 100 µl SDS (Ek-1.4) ile 20 µl Proteinaz-K (Ek-1.5) ilave edildi. Vorteks üzerinde tüp içeriği iyice karıştırıldı. 65 °C de 1-2 saat benmaride tutuldu. 20 dk da bir tüp alt üst edildi.

5. İnkübasyon sonunda tüp içerisine 200 µl 6M NaCl (Ek-1.6) ilave edildi. Oluşan beyaz görünümlü yapıyı dağıtmak için tüp kuvvetlice çalkalanıp 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonunda süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tekrar 13500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi.

7. Yine süpernatant başka bir tüpe alınıp pellet atıldı. Tuzdan arınmış olan süpernatantın üzerine 900 µl %100'lük etil alkolden eklendi. Tüp iyice karıştırıldı. Bu aşamada DNA ipliksi formunda görülebilmektedir.

8. 13500 rpm. de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

9. Tüpün dibine yapışan DNA'yı kaldırmak için %70'lik etil alkolden (Ek-1.7)1000 µl eklendi. 13 500 rpm'de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.

10. Süpernatant dökülüp tüp ters çevrilip DNA'nın tüpe yapışması için 15 dk beklendi.

11. DNA'nın büyüklüğüne göre 50-100 µl TE (Tris-EDTA) (Ek-1.8) konuldu.

12. DNaz aktivitesini ortadan kaldırmak için 70-80 °C benmaride, 10-15 dk inkübasyona bırakıldı.

13. DNA örnekleri +4 °C de kullanılmaya kadar muhafaza edildi. Uzun süreli muhafazalar için ise -20 °C ye alındı.

3.3.2. Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR sonrasında elde edilen ürünlerin varlığını kontrol etmek için kolay ve hızlı hazırlanması sebebi ile agaroz jellerden yararlanıldı. Genellikle %2 oranında agaroz jel hazırlandı.

1. Çalışmaya başlamadan önce jel kabı iyice temizlenip kurutulup jel dökme kalıbına yerleştirildi. Bu kalıp, düzgün bir yüzeye kondu. Kuyucuk oluşturmak için kullanılan taraklar düzgünce yerlerine yerleştirildi.

2. Jel dökme kabının boyutları ile jelin kalınlığı dikkate alınarak hesaplama yapıldı. 8 X 9cm boyutundaki jel kabına % 2 konsantrasyonunda jel dökmek için 0,8 g agaroz tartılıp, erlenmayer içindeki 40 ml elektroforez tamponuna (1 X TBE (Ek-2.1)) eklendi. Mikrodalga fırında agaroz iyice eriyene kadar ısıtıldı.

3. Jelin içine 3,5 µl stok EtBr (Etidiyum bromür) (Ek-2.2) solüsyonundan ilave edildi. Etidiyum bromür kuvvetli mutajen ve toksik olduğundan bu boyayı içeren çözeltilerle çalışırken her zaman eldiven kullanıldı.

4. Agaroz çözeltisinin sıcaklığı 45-50 °C'ye (el yakmayacak sıcaklığa) gelinceye kadar soğutuldu.

5. Ilık agaroz çözeltisi hava kabarcığı oluşturulmadan dikkatlice jel dökme kabına döküldü.

6. Jel, oda sıcaklığında yaklaşık 30-45 dakikada polimerize oldu.

7. Jel elektroforez tankına alındı, üzerini örtecek kadar 1 X TBE tamponu ilave edildi. Taraklar dikkatlice çekilerek yükleme yapmak için kuyucuklar oluşturuldu.

3.3.3. Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

Kontrol edilmek istenen DNA örnekleri jel yükleme tamponu (Loading dye) (Ek-2.3) ile birlikte yükledi.

Jel yükleme (veya DNA yükleme) tamponu;

- Örneğin yoğunluğunu arttırarak DNA'nın kuyucuğa düzgün olarak damlamasını sağlar.
- Örneği renklendirerek kuyulara yüklenme işlemini basitleştirir.
- Elektriksel alanda göç hareketinin takip edilmesini kolaylaştırır.
- Jelin sağındaki veya solundaki ilk kuyuya moleküler ağırlığı bilinen marker DNA'dan 5 µl yüklendi. Mikropipet ile 4 µl PCR ürünü ile 1 µl yükleme tamponu karıştırılıp toplam 4µl kuyucuklara yüklendi. 100 voltta 20 dakika elektrik akımına maruz bırakılarak yürütüldü.
- Jel UVİdoc cihazında ultraviyole ışık altında görüntülendi ve jel görüntüleri diskete kaydedildi.

3.3.4. PCR (Polymerase Chain Reaction) Yönteminin Uygulanması

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki dizisi bilinen herhangi bir bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı in-vitro DNA sentez yöntemidir.

Çalışmamızda ESR α geninin Intron I bölgesini çoğaltmak için Joyce B.J. van Meurs¹¹⁵ ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları primerler seçilmiştir. Kullanılan primer çiftlerinin dizileri aşağıda gösterilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. ESR α geninin Intron I amplifikasyonu için kullanılan primer çiftleri¹¹⁵

ER-F	5'-GATATCCAGGGTTATGTGGCA-3'
ER-R	5'-AGGTGTTGCCTATTATATTAACCTGA-3'

Örneklerimizin uygun amplifikasyon koşullarını saptanmak için çeşitli denemeler yapıldı. Primerlerin, Taq polimerazın ve magnezyum klorürün (MgCl₂) farklı konsantrasyonları ile PCR programında farklı ısı döngüleri ve annealing (yapışma) ısıları denendi; her denemede sadece bir değişken dışındakiler sabit tutuldu. Optimal amplifikasyonun gerçekleştiği koşullar, bütün PCR reaksiyonları için kullanıldı.

PCR reaksiyonunu gerçekleştirmek için kullanılan malzemelerin tümü ticari olarak alınıp kullanılmıştır. Amplifiye olan ürünler ileriki çalışmalar için +4 °C de saklandı.

Çizelge 3.2. ESR α geni Intron I'in optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PCR koşulları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (μ l)	Final Konsantrasyon
10X PCR Tamponu	2,5 μ l	1 X PCR Tamponu
MgCl ₂	1,5 μ l	20 mM
dNTP	0,25 μ l	10 mM
Taq Polimeraz enzimi	1 μ l	0,05 U/ μ l
Primer 1	1 μ l	10 pmol
Primer 2	1 μ l	10 pmol
Genomik DNA (1/10 sulandırılmış)	2 μ l	100 ng
Bidistile Su	15,75 μ l	
Total Hacim	25 μ l	

Çizelge 3.3. ESR α geni Intron I'in optimal amplifikasyonlarının gerçekleştiği PCR programı ısı döngüleri

Döngüler	Sıcaklık	Süre
1. Ön Denatürasyon	94.0 °C	3 dk
2. Denatürasyon	94.0 °C	45 sn
3. Yapışma (Annealing)	60.0 °C	1 dk
4. Sentez (Extention)	72.0 °C	45 sn
5. Her seferinde 2. döngüye giderek toplam 30 döngü		
6. Final uzama (Final Extention)	72.0 °C	7 dk
7. Saklama	22.0 °C	Uzun süre

3.3.5. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Yönteminin Uygulanması

Agaroz jel elektroforeziyle amplifikasyon kontrolü yapılan örnekler, Joyce B.J. van Meurs¹¹⁵ ve arkadaşlarının yöntemine göre Xba I, Pvu II restriksiyon endonükleaz

enzimleri ile (her birinden 10U) 37 °C’de bir gece boyunca kesim reaksiyonuna alındı. Aşağıda belirlenen oranlarda reaksiyon bileşenleri hazırlandı.

Çizelge 3.4. ESR α geni XbaI ve PvuII polimorfizmleri RFLP reaksiyon koşulları¹⁸⁴

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar (μ l)
Tampon	2,5 μ l
Restriksiyon Enzimi	0,5 μ l
Amplifiye Ürün (PCR ürünü)	10 μ l
Steril Bidistile Su	12 μ l
Toplam Hacim	25 μ l
Reaksiyon Süresi	1 gece 37 °C

Reaksiyon ürünleri %2’lik agaroz jele yüklenerek 100V ve 70 mAmp akımda 40 dakika süreyle elektroforeze tabi tutuldu. EtBr ile boyanan DNA’lar UVİdoc jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi ve değerlendirildi.

3.3.5.1. PvuII Polimorfizminin Belirlenmesi için PCR Ürünlerinin PvuII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

PvuII, *Proteus vulgaris* ‘den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA’ yı;

5’-CAG ↓ CTG-3’

3’-GTC ↑ GAC-5’

dizisinden tanıyarak küt uçlu kesim yapmaktadır. PCR ile elde edilen 346 bç’lik hedef gen bölgesi PvuII restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede timin içeren allel (p) PvuII kesim noktası taşımaktadır. Sitozinden timine (C→T) bir nükleotit değişimi yoksa PvuII enziminin tanıma bölgesi bulunmaz (P alleli). Sitozin nükleotitinden timin nükleotitine değişimi olmayan (PP genotipli) bireylerde 346 bç’lik tek bant, heterozigot bireylerde (Pp genotipli) 346, 242 ve 104 bç’lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (pp genotipli) 242 ve 104 bç’lik iki bant görülecektir¹⁰⁶.

3.3.5.2. XbaI Polimorfizminin Belirlenmesi için PCR Ürünlerinin XbaI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

XbaI, *Xanthomonas badrii* 'den elde edilen bir restriksiyon enzimidir. Çift zincirli DNA'yı;

5'-T ↓ CTAGA-3'

3'-AGATC ↑ T-5'

dizisinden tanıyarak yapışkan uçlu kesim yapmaktadır. PCR tepkimesi sonrası 346 bç'lik PCR ürünü XbaI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Bu bölgede adenin içeren allel (x) nükleotid kesim noktası taşımaktadır. Adeninden→Guanine (A →G) nükleotit değişimi olması halinde XbaI enziminin tanıdığı bölge ortadan kalkmaktadır (X alleli). Bu nükleotid değişimi olan (XX genotipli) bireylerde 346 bç'lik tek bant, heterozigot bireylerde (Xx genotipli) 346,195 ve 151 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim olmayan bireylerde (xx genotipli) 195 ve 151 bç'lik iki bant görülecektir¹⁰⁶.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 18.0 (PASW 18.0) paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sayısal ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum-maksimum) olarak özetlendi. Hasta ve kontrol grupları içinde KMY ölçümlerini etkileyen parametreleri belirlemek için çeşitli testler kullanıldı. Buna göre Hasta ve kontrol grupları içinde kategorik ölçümlerin genlerle etkileşimi incelemede trend Ki kare testi kullanıldı. Genlerle sayısal ölçümler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) veya alternatifif olan Kruskal Wallis Testi (KWT) kullanıldı. Burada farklılık bulunduğu durumda genler içinde ikili genotip karşılaştırmaları için Bonferroni, Sidak testlerinden uygun olanına başvuruldu. Osteoporoz düzeyini göstermede kullanılan KMY değerlerini (Lomber, Femur Femur boyun) etkileyen sayısal ölçümleri tespit etmek için Pearson Korelasyon katsayısı (r) veya Spearman Korelasyon katsayısı (r) ile kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi $p \leq 0.05$ alındı. Hasta ve kontrol gruplarında genotip dağılımları Kappa istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Kapa testinde k değeri; 0-0,40 arasında olanlar zayıf uyum, 0,40-0,75 arasında olanlar orta uyum ve 0,75-1 arasında olanlar yüksek uyum olarak kabul edildi.

Polimorfizmlere göre allel frekansları ve Hardy-Weinberg Dengesinin hesaplanmasında HAPLOVIEW istatistik programı¹⁰⁷ kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Osteoporoz polikliniğinde takip edilen 34 normal, 73 osteoporotik olmak üzere toplam 107 postmenopozal kadın osteoporozla ilgili kriterler ve moleküler düzeyde incelendi. Çalışmaya katılan tüm kadınların Serum kalsiyum (Ca), inorganik fosfat (P), alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin, 25 OH vitamin D3 (25(OH)D3), parathormon (PTH), β -Crosslaps, Estradiol (E2), total testosteron, DHEA-SO₄ ve DEXA (lomber (L1-L4) ve femur femur boyun) analizleri yapıldı. DEXA analizlerin t skorları -2,5 ve altında olanlar osteoporotik, t skorları -2,5'in üzerinde olanlar normal kabul edildi. Çalışmaya dahil edilen kadınların, yaşı, boyu, kilosu, eğitim durumu, mesleği, menarş ve menopoz yaşı, canlı doğum sayısı, ailede osteoporoz öyküsü, eşlik eden hastalıkları, ilaç kullanımı, fiziksel aktivite düzeyi, süt ve süt ürünleri tüketimi, kafeinli gıda tüketimi, alkol ve sigara kullanımı, güneşe maruz kalma süresi, giyim tarzı, yakınması ve ağrı düzeyleri yapılan anketlerle sorgulandı. Kişilerin kanlarından tuzla çöktürme yöntemiyle elde edilen DNA'lardan, PCR ile Pvu II ve Xba I restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri içeren ÖR α geninin 346 bç'lik bölgesi RFLP analizi için çoğaltıldı.

4.1. Osteoporozla İlgili Genel Kriterler

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında; yaş, boy, kilo, vki, menarş yaşı, menopoz yaşı, menopoz süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir. Hasta grubunda kontrol grubuna göre yaşın ve menarş yaşının daha yüksek olduğu, ancak menopoz yaşının daha düşük olduğu, menopozun daha uzun (17,5 yıl) sürdüğü, boyun kısa, vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksinin düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubu yaş, boy, kilo, vki, menarş yaşı, menopoz yaşı, menopoz süresi ortalamaları ve istatistiksel analizi.

		Hasta Grubu	Kontrol Grubu	T-Test
Yaş (yıl)	Ortalama	63,32±9,91	58,88±8,72	P=0,03
	Median(Min-Max)	61 (44-84)	56,50 (47-90)	
Boy (cm)	Ortalama	156,06±5,94	159,53±5,16	P=0,01
	Median(Min-Max)	156 (130-165)	160 (149-172)	
Kilo (kg)	Ortalama	63,29±11,77	76,62±13,70	P=0,00
	Median(Min-Max)	62 (45-90)	74,5 (46-110)	
VKİ (kg/m²)	Ortalama	26,01±4,87	30,20±5,32	P=0,00
	Median(Min-Max)	25,6 (16,5-38,7)	29,2 (18-43)	
Menarş yaşı (yıl)	Ortalama	13,49±1,29	13±0,92	P=0,03
	Median(Min-Max)	13 (11-15)	13 (11-15)	
Menopoz yaşı (yıl)	Ortalama	45,79±4,88	49,03±3,80	P=0,001
	Median(Min-Max)	46 (35-55)	48,5 (40-55)	
Menopoz süresi (yıl)	Ortalama	17,52±10,85	9,85±8,70	P=0,00
	Median(Min-Max)	15 (1-40)	7 (1-42)	

Hasta ve kontrol grubu arasında yapılan istatistiksel analize göre biyokimya değerleri çizelgede görüldüğü gibidir (Çizelge 4.2). Hasta grubunda kontrol grubuna göre Ca, osteokalsin, β crosslaps, vit D3, E2, total testesteron ve PTH değerlerinin yüksek, P, ALP, DHEA-SO₄ değerlerinin ise düşük olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Hasta ve kontrol grubu biyokimya parametreleri ortalamaları (\pm SD) ve istatistiksel analizi.

		Hasta Grubu	Kontrol Grubu	Mann-Whitney Test
Ca (mg/dl)	Ortalama	9,74 \pm 0,42	9,39 \pm 0,37	P=0,00
	Median(Min-Max)	9,8 (8,9-10,6)	9,3 (8,8-10,4)	
P (mg/dl)	Ortalama	3,58 \pm 0,52	3,79 \pm 0,57	P=0,17
	Median(Min-Max)	3,6 (2,3-4,6)	3,7 (2,8-5,3)	
ALP (U/L)	Ortalama	180,17 \pm 72,72	195,41 \pm 40,57	P=0,02
	Median(Min-Max)	166 (73-496)	189,5 (115-310)	
Osteokalsin (ng/ml)	Ortalama	21,05 \pm 16,56	19,90 \pm 6,32	P=0,68
	Median(Min-Max)	18,8(6,6-136,9)	18,6 (7,3-41,49)	
β-Crosslaps (ng/ml)	Ortalama	0,29 \pm 0,21	0,25 \pm 0,12	P=0,84
	Median(Min-Max)	0,23(0,03-0,96)	0,24 (0,07-0,65)	
Vit D3	Ortalama	35,01 \pm 18,80	19,68 \pm 11,69	P=0,00
	Median(Min-Max)	32 (5-98)	19 (4-49)	
E2 (pg/ml)	Ortalama	18,54 \pm 8,271	14,66 \pm 20,17	P=0,00
	Median(Min-Max)	19,83 (5-49,05)	10,01 (5-118,7)	
DEHASO₄ (μg/ml)	Ortalama	87,02 \pm 52,72	88,36 \pm 48,27	P=0,85
	Median(Min-Max)	74,1 (17,9-229,8)	74,6 (22,6-186)	
Testosteron (ng/ml)	Ortalama	0,29 \pm 0,26	0,21 \pm 0,32	P=0,01
	Median(Min-Max)	0,23 (0,05-1,71)	0,14 (0,02-1,9)	
PTH (pg/ml)	Ortalama	59,39 \pm 24,08	44,88 \pm 14,19	P=0,002
	Median(Min-Max)	57,5 (20,4-164,7)	44 (18,8-79,2)	

Hasta grubu ve kontrol grubu karşılaştırmasında; eğitim durumu, aile osteoporoz öyküsü ve giyim tarzı bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmıştır. Hasta grubunda ortaokul ve öncesi eğitim görenlerin oranı daha fazla (%58,7) iken, kontrol grubunda lise ve üzeri eğitim görenlerin oranının daha fazla (%61,8) olduğu görülmüştür (p= 0,04). Aile osteoporoz öyküsü varlığı açısından; hasta grubunun % 69,8'inde aile osteoporoz öyküsü varken, kontrol grubunun %29,4'ünde aile osteoporoz öyküsü vardır (p=0,00). Giyim tarzı bakımından; hasta grubunun %46'sı geleneksel giyimli (başı ve kolları kapanacak şekilde) iken, kontrol grubunun %26,5'i geleneksel

giyimlidir ($p=0,05$) (Çizelge 4.3). Haftada yapılan fiziksel aktivite saati, süt ve süt ürünleri tüketimi, güneşe maruz kalma süreleri ve canlı doğum sayıları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol gruplarının eğitim durumları, aile osteoporoz öyküsü ve giyim durumları.

		Hasta Grubu (%)	Kontrol Grubu (%)	Ki Kare Testi
Eğitim durumu	Ortaokul ve öncesi eğitim	%58,7	%38,2	P=0,04
	Lise ve üzeri eğitim	%41,3	%61,8	
Aile osteoporoz öyküsü	Var	%69,8	%29,4	P=0,00
	Yok	%30,2	%70,6	
Giyim	Geleneksel	%46	%26,5	P=0,05
	Batı	%54	%73,5	

Hasta grubunda; haftada 7 saatten fazla fiziksel aktivitede bulunan bireylerin lomber KMY değerinin düşük olduğu ($p=0,05$), haftada 1 saatten az, 1-2 saat, 2-4 saat ve 4-7 saat arasında fiziksel aktivitede bulunanların lomber KMY değerleri arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Kontrol grubunda ise bir farklılık saptanamamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol grubunda fiziksel aktivite düzeyleri ile lomber KMY ortalamaları istatistiksel analizi.

		Hasta Grubu	Kontrol Grubu
Fiziksel aktivite düzeyi	N	Lomber KMY (g/cm²)(ortalama±SD)	Lomber KMY (g/cm²)(ortalama±SD)
Haftada 1 saatten az	24	0,71±0,11	0,91±0,04
Haftada 1-2 saat	11	0,75±0,92	0,96±0,10
Haftada 2-4 saat	14	0,73±0,10	0,96±0,09
Haftada 4-7 saat	16	0,78±0,13	0,96±0,09
Haftada 7 saat ve üzeri	8	0,64±0,12	0,91±0,06
ANOVA		F=2,58	F=1,04
		P=0,05	P=0,41

Süt ve süt ürünleri, giyim tarzı, kafeinli gıda tüketimi ve sigara kullanımı ile lomber ve femur boyun KMY değerleri karşılaştırıldığında aralarında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Hasta grubunda gün içinde direk güneşe hiç maruz kalmayanların lomber KMY değerlerinin, en az 15 dakika güneşe maruz kalanlardan daha düşük olduğu ($p=0,03$) ve 15 dakikanın üzerinde kalanların da lomber KMY değerlerinde çok büyük bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Kontrol grubunda ise güneşe maruz kalma süresi ile lomber KMY arasında bir ilişki saptanamamıştır. Femur boyun KMY değerinin ise güneşe maruz kalma süresi ile bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grubunda güneşe maruz kalma süreleri ile lomber KMY değeri istatistiksel analizi.

Güneşe maruz kalma süresi (dk)	N		Hasta Grubu	Kontrol Grubu
	Hasta	Kontrol	Lomber KMY(g/cm ²) (ortalama±SD)	Lomber KMY(g/cm ²) (ortalama±SD)
Güneş almıyor	11	3	0,67±0,11	0,96±0,04
15 dk ve altı	15	9	0,79±0,11	0,97±0,11
16-30 dk	22	11	0,72±0,06	0,89±0,04
31-60 dk	18	9	0,76±0,14	0,95±0,07
61-120 dk	1	2	0,63±0	0,93±0,09
121 dk ve üzeri	6	0	0,65±0,15	0
ANOVA			F=2,57	F=1,59
			P=0,03	P=0,20

Femur boyun KMY ($r=0,463$) ve lomber KMY ($r=0,341$) ile VKI (Vücut Kitle İndeksi) arasında zayıf bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. Her iki KMY değeri arttıkça VKI değerinin de arttığı belirlenmiştir.

Hasta grubunda serum Ca ile lomber KMY değerleri arasında ($r=0,287$) zayıf bir korelasyon saptanmışken, femur boyun KMY ile Ca arasında bir korelasyon saptanamamıştır.

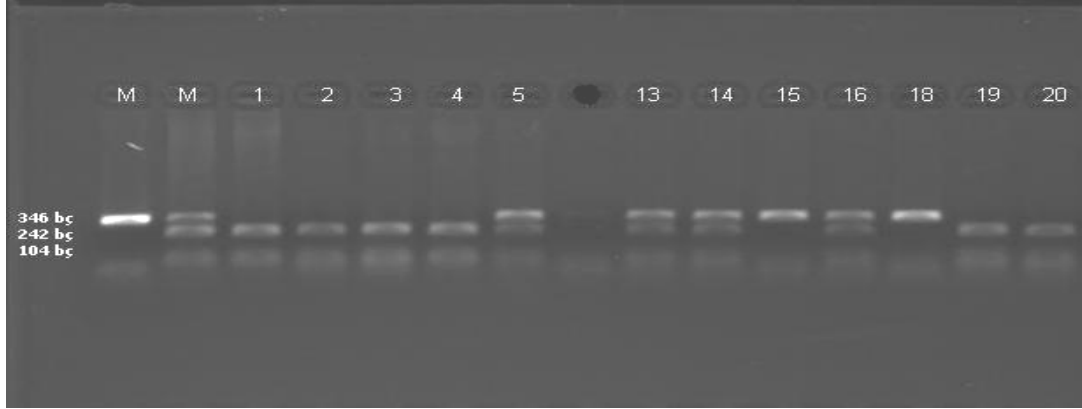
Hasta grubunda E2 değerleri ile lomber KMY değerleri arasında ($r=0,385$) pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Femur boyun KMY değerleriyle ise bir korelasyon belirlenememiştir.

Hem kontrol hem hasta grubunda osteokalsin ile β -Croslabs değerleri ($r=0,762$) arasında önemli bir korelasyon varken, Ca ile P değerleri arasında ($r=0,264$) çok zayıf bir korelasyon vardır.

4.2. Moleküler Genetik Analizleri

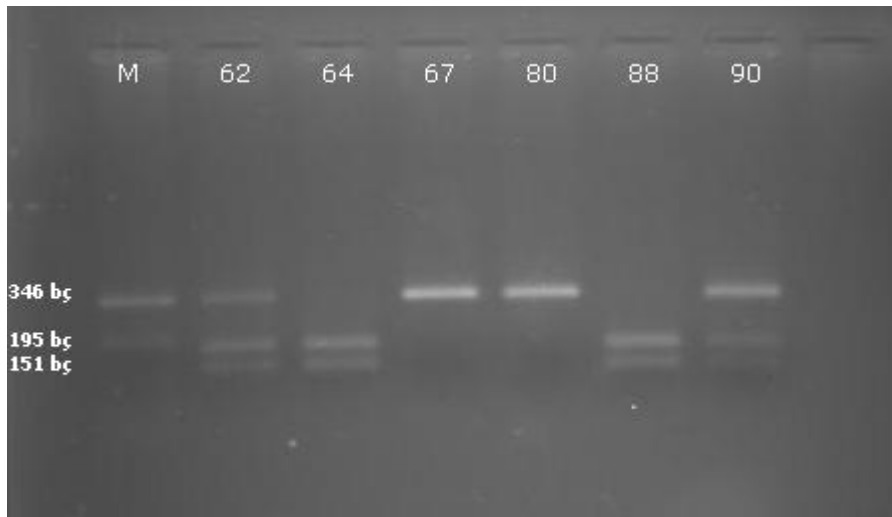
PCR yöntemi ile çoğaltılan ESR α geninin 346 bç'lik bölgesi RFLP yöntemi ile Pvu II ve Xba I restriksiyon enzimleriyle kesildi. Pvu II polimorfizmi için sitozinden → timine (C>T) nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (PP genotipli) 346 bç'lik tek bant, heterozigot bireylerde (Pp genotipli) 346, 242 ve 104 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen bireylerde (pp genotipli) 242 ve 104 bç'lik iki bant

görüldü. Şekil 4.1’de örnek olarak bazı hastaların Pvu II enzimi kesim bantları gösterilmektedir.



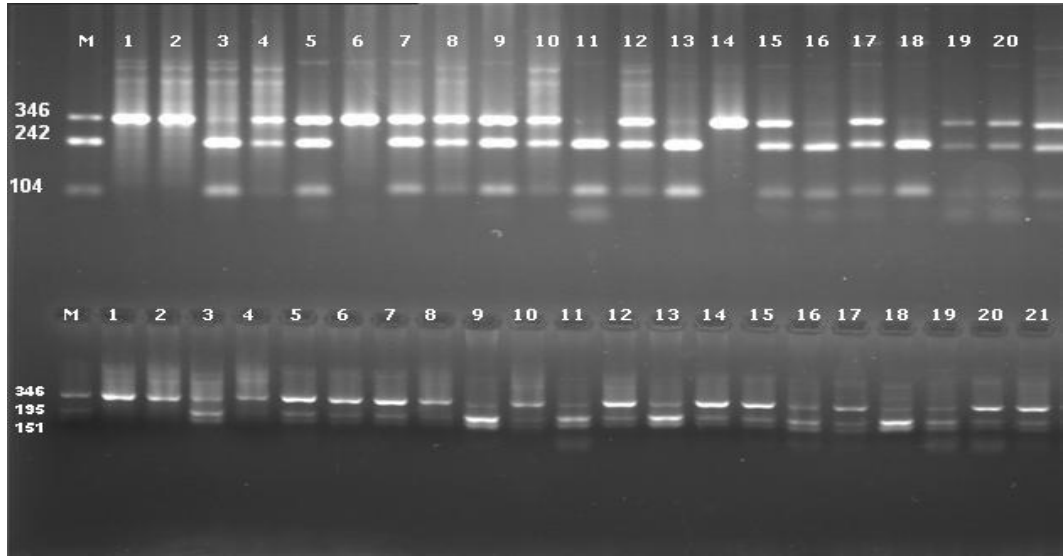
Şekil 4.1. Bazı hastaların RFLP yöntemi ile oluşan Pvu II restriksiyon enzimi kesim bantları. M, marker DNA’lar, PP genotiplilerde 346 bç’lik tek bant (15, 18), Pp genotiplilerde 346, 242, 104 bç’lik üç bant (5, 13, 14, 16) ve pp genotiplilerde 242 ve 104 bç’lik iki bant (1, 2, 3, 4, 19, 20) görülmektedir.

Xba I polimorfizminde ise allelinde Adeninden→Guanine (A →G) nükleotit değişimi olan homozigot bireylerde (XX genotipli) 346 bç’lik tek bant, heterozigot bireylerde (Xx genotipli) 346, 195 ve 151 bç’lik üç bant, her iki allelinde değişim görülmeyen bireylerde (xx genotipli) 195 ve 151 bç’lik iki bant görüldü. Şekil 4.2’de örnek olarak bazı hastaların Xba I enzimi kesim bantları gösterilmektedir.



Şekil 4.2. Bazı hastaların RFLP yöntemi ile Xba I restriksiyon enzimi kesim bantları. M marker DNA, XX genotiplilerde 346 bç’lik tek bant (67, 80), Xx genotiplilerde 346, 195, 151 bç’lik üç bant (62, 90) ve xx genotiplilerde 195 ve 151 bç’lik iki bant (64, 88) görülmektedir.

Şekil 4.3’de ise bazı kontrollerin Pvu II ve Xba I enzimleri kesim bantları gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Bazı kontrollerin RFLP yöntemi ile yukarda Pvu II, aşağıda Xba I enzimleri kesim bantları.

ESR1 polimorfizmlerinin hasta ve kontrollerdeki allel frekansları ve allel frekanslarının Hardy-Weinberg Eşitliğinden (HWE) çok fazla sapma göstermediği Çizelge 4.6’da görülmektedir. Ancak her iki polimorfizmde minor allel hasta ve kontroller arasında yer değiştirmiştir. Minor allel, Pvu II polimorfizminde kontrolde (P alleli) C nükleotiti (MAF=0,485) iken hastalarda (p alleli) T nükleotiti (MAF=0,418) olmuş, Xba I polimorfizminde ise kontrollerde (X alleli) G nükleotiti (MAF=0,457) iken hastalarda (x alleli) A nükleotiti (MAF=0,467) olmuştur.

Çizelge 4.6. İncelenen polimorfizmlere göre genotipleri belirlenmiş olan hasta ve kontrollerde minor allel (MA) ve Hardy-Weinberg Eşitliği (HWE) p değeri.

	Polimorfizm	rs Kimlik No ^a	MA			HWE p değeri ^c
			Allel ^b	Nükleotit	Frekans	
Hasta	Pvu II	rs2234693	p	T	0,418	0,6701
Kontrol			P	C	0,485	0,7929
Hasta	Xba I	rs9340799	x	A	0,467	0,2071
Kontrol			X	G	0,457	0,0631

^ars=SNP referans numarası

^bAllellerin simgesi materyal metotta tanımlandığı şekilde verilmiştir.

^cHardy-Weinberg Eşitliğine uygunluk olasılığı (p=1 ise %100 uygunluk)

Çalışmamıza dahil olan postmenopozal osteoporozlu 73 hastanın Pvu II polimorfizmi bakımından; 14'ünün PP, 34'ünün Pp ve 25'inin pp genotipine, Xba I polimorfizmi bakımından ise; 12'sinin XX, 43'ünün Xx, 18'inin de xx genotipine sahip olduğu yapılan RFLP analizleriyle belirlenmiştir. Hasta ve kontrol genotipleri ayrı ayrı ve birlikte değerlendirildiğinde dağılımın her durumda HWE'den önemli bir sapma göstermediği Çizelge 4.7'den anlaşılmaktadır. Çalışmaya dahil olan 34 postmenopozal kontrolün ise Pvu II polimorfizmi bakımından; 8'inin PP, 19'unun Pp, 7'sinin pp genotipine, Xba I polimorfizmi bakımından; 6'sının XX, 24'ünün Xx, 4'ünün de xx genotipine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol gruplarının polimorfizmlere göre sayıları

	Pvu II Polimorfizmi			Xba I Polimorfizmi		
	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
Hasta	14	34	25	12	43	18
Kontrol	8	19	7	6	24	4
Ki Kare Testi	P=0,22			P=0,27		

Çizelge 4.8. Hastaların ve kontrollerin Pvu II ve Xba I enzimleri kesim bantlarına göre genotipleri.

Hasta No	Pvu II	Xba I
1	pp	Xx
2	pp	Xx
3	pp	Xx
4	pp	Xx
5	Pp	Xx
7	Pp	Xx
8	Pp	Xx
9	PP	XX
10	Pp	Xx
11	Pp	Xx
12	PP	XX
13	pp	Xx
14	PP	XX
15	Pp	Xx
16	pp	Xx
17	Pp	Xx
18	Pp	Xx
19	PP	XX
21	PP	Xx
22	PP	XX
23	Pp	Xx
24	Pp	Xx
25	PP	XX
26	pp	Xx
27	Pp	Xx
28	pp	Xx
29	Pp	Xx
30	Pp	Xx
31	Pp	Xx
32	PP	XX
33	Pp	Xx
34	pp	Xx
35	Pp	Xx
37	Pp	Xx
38	pp	Xx
39	pp	xx
40	Pp	Xx
42	Pp	Xx
43	pp	Xx
44	pp	xx
45	Pp	Xx
46	Pp	xx
47	Pp	xx

Çizelge 4.8.(Devamı)

48	pp	Xx
49	Pp	xx
50	pp	Xx
51	PP	Xx
52	pp	xx
53	PP	XX
54	Pp	xx
55	PP	XX
56	PP	XX
57	pp	xx
58	pp	xx
59	Pp	Xx
61	pp	xx
62	pp	Xx
63	pp	Xx
64	PP	XX
65	Pp	Xx
67	PP	XX
68	Pp	Xx
69	pp	xx
70	pp	Xx
71	pp	xx
72	Pp	Xx
73	Pp	Xx
74	Pp	Xx
75	pp	xx
76	Pp	Xx
77	Pp	Xx
78	Pp	xx
79	pp	Xx
K1	PP	XX
K2	PP	XX
K3	pp	Xx
K4	Pp	XX
K5	Pp	Xx
K6	PP	Xx
K7	Pp	Xx
K8	Pp	Xx
K9	Pp	xx
K10	Pp	Xx
K11	pp	xx
K12	Pp	Xx
K13	pp	xx
K14	PP	Xx
K15	Pp	Xx
K16	pp	Xx

Çizelge 4.8.(Devamı)

K17	Pp	Xx
K18	pp	xx
K19	Pp	Xx
K20	Pp	Xx
K21	Pp	Xx
K22	PP	Xx
K23	Pp	Xx
K24	Pp	Xx
K25	PP	XX
K27	pp	Xx
K28	PP	XX
K29	PP	XX
K30	Pp	Xx
K31	Pp	Xx
K32	Pp	Xx
K33	Pp	Xx
K34	pp	Xx
K35	Pp	Xx

Çalışmamızda hasta ve kontrol gruplarında iki polimorfizme ait genotip kombinasyonlarının genotip dağılımları Kappa istatistiksel analizine göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9). Değerlendirmeye göre; XXPP genotipine sahip 12 hasta, 5 kontrol, XXPp genotipine sahip 1 kontrol, XxPP genotipine sahip 2 hasta, 3 kontrol, XxPp genotipine sahip 28 hasta, 17 kontrol, Xxpp genotipine sahip 13 hasta, 4 kontrol, xxPp genotipine sahip 6 hasta, 1 kontrol ve xxpp genotipine sahip 12 hasta, 3 kontrol olduğu belirlenmiştir. Ancak çalışmamızda XXPp genotipinde hastaya ve XXpp, xxPP genotiplerinde hasta ve kontrole hiç rastlanmamıştır. Hasta grubunda genotip bakımından uyumluluk $k=0,53$, kontrol grubunda ise $k=0,51$ olarak belirlenmiş, her iki durumda da orta uyumluluk tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının genotip dağılımları

Genotip	Haplotip	Hasta Grubu (Genotip sayısı-%)	Kontrol Grubu (Genotip sayısı-%)
XXPP	XP	12 (%16,44)	5 (%14,7)
XXPp	XP, Xp	0	1 (%2,94)
XXpp	Xp	0	0
XxPP	XP, xP	2 (%2,74)	3 (%8,82)
XxPp*		28 (%38,35)	17 (%50)
Xxpp	Xp, xp	13 (%17,8)	4 (%11,76)
xxPP	xP	0	0
xxPp	xP, xp	6 (%8,21)	1 (%2,94)
xxpp	xp	12 (%16,44)	3 (%8,82)
Kappa		k=0,53	k=0,51

*XxPp genotipine sahip bireylerin haplotipleri belirlenememektedir.

Çalışmamızda haplotip dağılımlarına göre hasta grubunda; 26 XP, 8 xP, 13 Xp, 43 xp, kontrol grubunda ise 14 XP, 4 xP, 5 Xp ve 11 xp haplotipi belirlenmiştir. Ancak bu değerlendirmeye XxPp genotipine sahip olan bireyler haplotipleri belirlenemediği için dahil edilmemiştir. Hasta ve kontrol grupları arasında haplotip frekansı bakımından anlamlı bir fark saptanamamıştır (p=0,11) (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Hasta ve kontrol grubunda haplotip dağılımları.

Haplotip	Hasta Grubu (birey sayısı-%)	Kontrol Grubu (birey sayısı-%)
XP	26 (%28,88)	14 (%41,17)
xP	8 (%8,88)	4 (%11,76)
Xp	13 (%14,44)	5 (%14,70)
xp	43 (%47,77)	11 (%32,35)
Ki Kare Testi	P=0,11	

Yapılan istatistiksel analize göre; PP, Pp ve pp genotipleri arasında kontrol grubunda önemli bir fark yok iken, hasta bireylerde pp genotipine sahip olan bireylerde anlamlı oranda aile osteoporoz öyküsünün daha az olduğu saptanmıştır (p=0,04)

(Çizelge 4.11). Xba I polimorfizmi ile aile osteoporoz öyküsünün varlığı arasında ise önemli bir ilişki saptanamamıştır.

Çizelge 4.11. Hasta ve kontrol grubunun aile osteoporoz öyküsü ile Pvu II polimorfizminin ilişkisi.

	Hasta Grubu (Genotip sayısı-%)			Kontrol Grubu (Genotip sayısı-%)		
	PP	Pp	pp	PP	Pp	pp
Aile osteoporoz öyküsü var	6 (%85,7)	24 (%82,8)	9 (%52,9)	4 (%57,1)	3 (%17,6)	2 (%33,3)
Ki Kare Testi	P=0,04			P=0,31		

Hasta grubunda; xx genotipine sahip bireylerde femur boyun KMY değerinin, XX ve Xx genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,05). Kontrol grubunda ise bir farklılık bulunmamıştır. Pvu II polimorfizmi ile femur boyun KMY arasında ise bir ilişki saptanamamıştır (Çizelge 4.12).

Ayrıca Xba I ve Pvu II polimorfizimleri ile t ve z skorları ve lomber KMY değeri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Çizelge 4.12. Hasta ve kontrol grubunda Xba I polimorfizminde femur boyun KMY ortalamaları ve istatistiksel analizi.

	Hasta Grubu (Genotip)			Kontrol Grubu (Genotip)		
	XX	Xx	xx	XX	Xx	xx
Femur boyun KMY(g/cm²) Ortalama	0,66 ±0,11	0,63 ±0,82	0,70 ±0,11	0,85 ±0,12	0,87 ±0,10	0,82 ±0,48
ANOVA	F=3,13 P=0,05			F=0,73 P=0,49		

Hasta grubunda; Xxpp genotipine sahip olan bireylerden, günde 15 dakika ve üzeri güneşe maruz kalanların, gün içinde hiç güneşe maruz kalmayanlara göre lomber KMY değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,01) (Çizelge 4.13). XXpp genotipine sahip olan bireylerin çalışmamızda hiç gözlenmemiş olması bu anlamlı

sonucun X'e baęlı olabileceęini dūřündürmektedir. Kontrol grubunda ise bir fark gözlenmemiřtir.

Çizelge 4.13. Hasta grubunda Xxpp genotipi ile güneşe maruz kalma süresi istatistiksel analizi.

	Hasta Grubu
Güneşe maruz kalma (dk)	Xxpp genotipi lomber KMY(g/cm²)(ortalama±SD)
0 dk	0,49±0,13
15 dk ve üzeri	0,77±0,12
ANOVA	F=9,44
	P=0,01

5. TARTIŞMA

Osteoporoz, hormonal, çevresel, yaşam şekli (sigara içilmesi, fiziksel egzersizler gibi) ve beslenme faktörlerinin (kalsiyum alımı, alkol tüketimi) etkisi altındaki genetik faktörlerin kontrol ettiği multifaktoriyel (poligenik) bir iskelet hastalığıdır^{33,98,99}. KMY üzerine pek çok çevresel faktörün etkili olmasına rağmen kemik kitlesi bakımından bireyler arasında görülen farklılıkların %50-80'i genetik kökenlidir^{33,100}.

Son yıllarda yapılan çalışmalar osteoporozda ırk ve etnik köken, yaş ve pozitif aile öyküsünün rol aldığını, normal dağılım ve devamlı varyasyon gösteren bir hastalık olduğunu, bu nedenle istenmeyen koşulların belli bir eşik değerin üstünde olması halinde ortaya çıkan bir hastalık (eşik model) olduğunu göstermiştir. Genlerin kemik yoğunluğu üzerindeki etkisi iskeletin farklı yerlerinde farklı genler tarafından (yerine özgü) regüle edilebileceğini düşündürmektedir³³.

Osteoporoz benzeri kompleks hastalıkların patogeneğinde rol alan genleri belirlemek için ikiz çalışmaları, çok nesilli geniş ailelerde linkage analizi, kardeşler arasında (sib-pair) allel paylaşım yöntemi, akraba olmayan kontrol ve hastalarda assosiyasyon çalışmaları ve hayvanlarda çaprazlama deneyleri gibi birkaç farklı yaklaşım olmakla birlikte pratikte fenotiple polimorfik genetik marker ilişkisi saptanmaktadır. Osteoporozda katkıda bulunan genetik varyasyonlara ait bilgilerin çoğu aday genlerle KMY çalışmalarından gelmektedir. Bu çalışmaları değerlendiren meta analizlere göre vitamin D reseptör geni (VDR), östrojen reseptör alfa geni (ESR1), tip 1 kollajen alfa A1 zinciri geni (Col1A1) ve İnterlökin 6 (IL-6) geninin allelik varyasyonları ile KMY ve/veya kırıklar arasında önemli ilişkilerin olduğu saptanmıştır. VDR, ESR1, Col1A1 ve interlökin-6 (IL-6) genlerinden başka ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) – benzeri protein 5 (LRP5) genlerinin polimorfizmlerinin de osteoporozla ilişkisi çalışılmaktadır. Col1A1 hariç diğer dört gen pleiotropik etkili (master gen) olup bazı çalışmalarda osteoporozdan başka yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklar, göğüs kanseri ve kolorektal ile de ilişkili olduğu belirtilmiştir^{98,100,101}.

Bazı fenotipler ise genetiğin ve çevre faktörlerinin etkileşimi sonucu ortaya çıkar; sorumlu alleller olduğu halde fenotipte görülmemesi (eksik penetrans) veya

sorumlu allel olmadığı halde bazı bireylerin yaşlanma gibi genetik olmayan faktörler sonucu osteoporozla yakalanması gibi³³.

Steroid hormon reseptör genlerinden östrojen reseptör geni (ESR) (14 polimorfizm), androjen reseptör geni, progesteron reseptör geni ve Vit D Reseptör (VDR) genine ait polimorfizimlerle osteoporozun ilişkisi çalışılmış ve son yıllarda osteoporoz genetiği ile yapılan çalışmaların çoğu özellikle ESR ve VDR üzerinde yoğunlaşmıştır^{33,100}.

Hem östrojen hem de androjen kemik metabolizmasında önemli roller oynamaktadır. Çeşitli popülasyon araştırmalarında hem kadın hem de erkeklerde östrojen ile kemik kitlesi arasında pozitif ilişki saptanmıştır¹¹⁵. Bizim çalışmamızda da hasta grubunda E2 değerleri ile lomber KMY değerleri arasında ($r=0,385$) pozitif bir korelasyon belirlenmiştir, femur boyun KMY değerleriyle ise bir korelasyon saptanamamıştır.

İnsan ESR α geni kromozom 6q25 yerleşimli gen ürünü (östrojen) ligantla aktive olan bir transkripsiyon faktörüdür; 8 ekzon ve 7 introndan oluşan 140 kb büyüklüğünde bir gendir³³.

Intron I deki Xba I ve Pvu II genotipleri ile pre ve post menopozdaki kadınların kemik kütleleri arasında Japon popülasyonunda bir ilişki bulunmuşsa da Belçika, Danimarka, İtalya ve Kore popülasyonlarında bir ilişki saptanamamış, Çin ve Amerikan popülasyonlarında bu enzimlerin kesim noktalarına ilişkin genotiplerde çelişkili sonuçlar alınmıştır^{33,98}. Xba I ve Pvu II etnik gruplar arasında fark göstermediğinden ve 46 bp lik bir mesafede olduklarından P ile X ve p ile x allelleri bağlı durumdadır; ancak Px haplotipi daha fazla görülürken pX haplotipi pek görülmez ve Px haplotipi Kafkas toplumlarına göre Asya toplumlarında iki kez daha fazladır. Asya kökenli toplumlarda yapılan çalışmaların çoğunda PP ve/veya xx genotipli bireylerin çoğunda KMY değerleri düşük iken Avrupa kökenli Kafkas toplumlarında pp ve/veya xx genotiplerinde osteoporotik risk artmıştır, İngiltere’de Px genotipinde düşük kemik kitlesi saptanmıştır³³. Yine Erdoğan ve ark.¹² PP genotipine sahip olguların lomber omurga ortalama KMY değeri, pp genotipli olguların lomber omurga ortalama KMY değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğunu ve XbaI polimorfizmi ile yapılan değerlendirmelerde gruplar arasında KMY değerleri, genotip ve allel frekansları açısından fark bulunmadığını, sonuç olarak, çalışma gruplarındaki postmenopozal

kadınlarda lomber omurga KMY değeri üzerine ER α geni PvuII polimorfizminin etkili olduğunu göstermişlerdir. Oi ve ark.'ları da pp genotipli Avustralyalı kadınlarda düşük lomber omurga KMY değeri olduğunu gözlemlemiştir¹³. Kobayashi ve ark.'ları ise Japon popülasyonunda PPxx genotipine sahip bireylerde düşük lomber omurga KMY değeri olduğunu saptamışlardır¹³. 5000'in üzerinde kadının dahil olduğu bir meta analize göre; XX genotipine sahip bireylerin, xx genotipine sahip bireylere oranla daha yüksek lomber omurga KMY değerlerine ve daha düşük kırık riskine sahip oldukları belirlenmiştir¹³. Bustamante ve ark.'nın çalışmasında Px haplotipi yüksek femur femur boyun KMY ile ilişkilendirilmiştir¹⁰⁷. Bizim çalışmamızda ise; hasta grubunda; xx genotipine sahip bireylerde femur boyun KMY değerinin, Xx genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu saptanmış (p=0,05), kontrol grubunda ise bir farklılık belirlenememiştir. Xba I polimorfizmi genotipleri bakımından hasta ve kontroller arasındaki fark anlamlı olmasa bile, yüksek KMY değeri ile ilişkili olan "x" allelinin hastalarda düşük kontrollerde yüksek olmasının önemli olduğu düşünülmüştür. Pvu II polimorfizmi ile ise femur boyun ve lomber KMY arasında bir ilişki saptanamamıştır. Yapılan çalışmalardaki bu tutarsızlıklar; düşük istatistiksel güce, etnik gruplar arasındaki varyasyonlara, yaşa, menopoz durumuna ve çevresel faktörlere bağlanabilir.

Erdoğan ve ark.¹² ER α geni PvuII polimorfizmi, pp genotip frekansı açısından normal olgular ile osteopenik ve osteoporotik olgular arasında anlamlı fark bulmuş, pp genotip frekansının, normal olgularda anlamlı düzeyde düşük olduğunu ve yine ER α geni PvuII polimorfizmine ait P ve p allel frekansları değerlendirildiğinde osteoporotik olguların p allel frekansının normal olgulardan anlamlı düzeyde yüksek olduğunu saptamışlardır. Bustamante ve ark.'nın 719 postmenopozal osteoporozlu hastada yaptıkları çalışmaya göre Pvu II polimorfizmi bakımından minor alleli "P" (C nükleotiti), minor allel frekansını 0,46, Xba I polimorfizmi bakımından ise minor alleli "X" (G nükleotiti), minor allel frekansını 0,38 bulmuştur¹⁰⁷. Bizim çalışmamızda ise Pvu II polimorfizminde kontrolde minor allel "P" (C nükleotiti) (MAF=0,485) iken hastalarda minor allel "p" (T nükleotiti) (MAF=0,418) olmuş, Xba I polimorfizminde ise kontrollerde minor allel "X" (G nükleotiti) (MAF=0,457) iken hastalarda "x" alleli (A nükleotiti) (MAF=0,467) olmuştur. Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları genotip ve haplotip frekansları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Moleküler mekanizması açıklanamamakla beraber post menapozdaki kadınlarda ESR α ile VDR arasında gen-gen etkileşimi olmaktadır^{98,100}. Xba I ve Pvu II polimorfizmlerinin intronda bulunması nedeni ile kemik kitlesi ve osteoporozla ilişkili moleküler mekanizması anlaşılamamıştır.

Özlem ve ark.'larının yaptığı çalışmada, ALP, Ca, P, osteokalsin, PTH, vit-D3 düzeyleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiş, gruplar serum β -CrossLaps düzeyleri açısından karşılaştırıldığında ise, osteoporozlu grubun β -CrossLaps düzeylerinin osteopeni ve kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$)¹¹⁶. Çalışmamızda ise hasta grubunda Ca, vitD3 ve PTH değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek olduğu, ALP değerlerinin ise anlamlı oranda düşük olduğu ve P, osteokalsin ve β -CrossLaps değerleri arasında ise bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

Paker ve ark.'larının yaptığı çalışma, vücut ağırlığı ile femur boyun ve L2-L4 KMY değerleri arasındaki anlamlı korelasyon ve vücut ağırlığının osteoporozla karşı koruyucu etkisi olduğuna işaret etmektedir¹¹⁷.

Postmenopozal osteoporozda obezitenin kemik mineral yoğunluğuna etkisi bugüne kadar pek çok araştırmaya konu olmuştur. Genel olarak obezitenin kemik mineral yoğunluğu üzerinde olumlu bir etki oluşturduğu kabul edilmektedir. Asomaning ve ark. düşük VKİ 'li kadınların osteoporoz için artmış risk taşıdığını belirtmişler; VKİ'ndeki her bir birimlik değişikliğin, KMY'nu fiziksel aktivite, fonksiyonel kapasite, kalsiyum alımı, sigara ve alkol alışkanlığı gibi değiştirilebilir diğer risk faktörlerinden daha fazla etkilediğini vurgulamışlardır¹¹⁸. Yanık ve ark.'larının yaptığı çalışmada, VKİ ile femur boynu ortalama KMY değerleri ve femur boynu t skorları arasında pozitif yönde anlamlı ilişki saptanmıştır, KMY ve VKİ arasında pozitif korelasyon bulunmuştur¹¹⁹. Barrera ve ark.'nın çalışmasında ileri yaştaki hastalarda yüksek VKİ'nin, femur boynu KMY üzerine koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Ülkemizde yapılan klinik çalışmalarda da VKİ ile osteoporoz arasında ilişki incelenmiş ve aralarında pozitif yönde ilişki saptanmış; obezitenin osteoporozdan koruyucu bir faktör olabileceği belirtilmiştir^{120,121}. Obezitenin kemik mineral yoğunluğu üzerinde oluşturduğu olumlu etkinin mekanizması, birçok klinik çalışma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bu etkinin oluşmasında rol oynadığı kabul edilen mekanizmalardan biri iskelet üzerine yük binmesi ve mekanik stres oluşmasıdır. Omurga ve kalça KMY

üzerine yapılmış klinik çalışmalar^{122,123} iskelet üzerine yük binme ve mekanik stres görüşünü desteklemektedir. Bununla beraber obez hastalarda, ağırlık taşımayan üst ekstremitelerde de kemik yoğunluğunun yüksek olduğunun saptanması, mekanik stres ve iskelet üzerine yük binmesinden başka nedenler olabileceğini düşündürmektedir¹²⁴. Obezitenin KMY'na olan olumlu etkisine ilişkin diğer bir mekanizmanın da özellikle menopozdan sonra yağ dokusundaki östrojen yapımı olduğu düşünülmektedir¹²⁵. Bizim çalışmamızda da Femur boyun KMY ($r=0,463$) ve lomber KMY ($r=0,341$) ile VKI arasında zayıf bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. Her iki KMY değeri arttıkça VKI değerinin de arttığı belirlenmiştir.

Keen ve ark.'nın¹²⁶ yaptıkları bir çalışmada; olguların 138'inde anne ve/veya kız kardeşte osteoporotik fraktür öyküsünün mevcut olduğu ve aile hikayesi pozitif olan bu grubun KMY değerlerinin, aile öyküsü negatif olan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunu saptamışlardır. Özdemir ve ark.'nın çalışması sonunda, KMY değerleri ailesinde osteoporoz öyküsü olan grupta, aile öyküsü negatif olan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olarak bulunmuştur¹²⁷. Aksu ve ark.'nın çalışmasında da ailede osteoporoz öyküsü olanlarda osteoporoz sıklığının olmayanlara göre anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür. Çalışmamızda da, ailede osteoporoz öyküsü varlığı açısından karşılaştırıldığında; hasta grubunda % 69,8, kontrol grubunda %29,4 aile osteoporoz öyküsünün olduğu gözlenmiştir ($p=0,000$)¹²⁸.

Aksu ve ark.'nın çalışmasında öğrenim durumuna yönelik yapılan sorgulama sonucunda 558 kişinin % 50.1'inin üniversite mezunu, % 13.2'sinin lise mezunu, % 13.5'inin ortaokul mezunu, 16.6'sının ilkokul mezunu, % 2.8'inin okuyup yazabiliyor olduğu ve % 3.8'inin ise okuma yazma bilmediği görülmüştür. Yaptıkları istatistiksel analizde üniversite mezunları ile diğer tüm eğitim düzeyleri arasında, üniversite, lise, ortaokul mezunları ile diğer eğitim düzeyleri arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p<0.05$). Spearman korelasyon testi ile yaptıkları değerlendirmede eğitim düzeyi arttıkça osteoporoz hakkında bilgi düzeyinin arttığını ancak arada zayıf bir ilişki olduğunu gözlemlemişlerdir ($r=0.285$)¹²⁸. Magnus ve arkadaşları¹²⁹ tarafından 16 ile 79 yaşları arasındaki 1514 birey üzerinde yapılan çalışmada osteoporoz bilgisinin eğitim düzeyi ile direkt olarak ilişkili olduğu saptanmıştır. Benzer şekilde çalışmamızda da

hasta grubunun toplam % 58,7'si ortaokul ve öncesi eğitim görmüşken, kontrol grubunun %61,8'i lise ve üzeri eğitim görmüştür (p= 0,037).

Yine Aksu ve ark.'nın çalışmasında kadın katılımcılar giyim şekline göre geleneksel ya da modern olarak gruplandırıldığında her iki grup sayılarının birbirine yakın olduğu, kapalı giyim şekli olan katılımcılarda modern giyim şekli olanlara göre daha fazla sıklıkta osteoporoz olduğu tespit edilmiştir (p<0.05)¹²⁸. Aynı şekilde çalışmamızda da giyim tarzı bakımından; hasta grubunun %46'sı geleneksel giyimli (başı ve kolları kapanacak şekilde) iken, kontrol grubunun %26,5'i geleneksel giyimlidir (p=0,047).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Osteoporoz polikliniğinde takip edilen 34 normal, 73 osteoporotik olmak üzere toplam 107 postmenopozal kadını osteoporozla ilgili kriterler ve moleküler düzeyde incelendiğimiz çalışmamızda aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

1. Hasta grubunda; xx genotipine sahip bireylerde femur boyun KMY değerinin, Xx genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu saptanmış ($p=0,05$), kontrol grubunda ise bir farklılık belirlenmemiştir. Pvu II polimorfizmi ile femur boyun ve lomber KMY arasında bir ilişki saptanamamıştır.

2. Pvu II polimorfizminde kontrolde minor allel "P" (C nükleotiti) ($MAF=0,485$) iken hastalarda minor allel "p" (T nükleotiti) ($MAF=0,418$) olmuş, Xba I polimorfizminde ise kontrollerde minor allel "X" (G nükleotiti) ($MAF=0,457$) iken hastalarda "x" alleli (A nükleotiti) ($MAF=0,467$) olmuştur. Çalışmamızda hasta ve kontrol grupları genotip ve haplotip frekansları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

3. PP, Pp ve pp genotipleri arasında kontrol grubunda önemli bir fark yok iken, hasta bireylerde pp genotipine sahip olan bireylerde anlamlı oranda aile osteoporoz öyküsünün daha az olduğu saptanmıştır ($p=0,037$).

4. Hasta grubunda; Xxpp genotipine sahip olan bireylerden, günde 15 dakika ve üzeri güneşe maruz kalanların, gün içinde hiç güneşe maruz kalmayanlara göre lomber KMY değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,008$), kontrol grubunda ise bir fark bulunmamıştır.

5. Hasta grubunda E2 değerleri ile lomber KMY değerleri arasında ($r=0,385$) pozitif bir korelasyon belirlenmiştir, femur boyun KMY değerleriyle ise bir korelasyon saptanamamıştır. Hasta grubunun Ca, vitD3 ve PTH değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda yüksek, ALP değerlerinin anlamlı oranda düşük olduğu ve P, osteokalsin ve b-CrossLaps değerleri bakımından ise bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.

6. Femur boyun KMY ($r=0,463$) ve lomber KMY ($r=0,341$) ile VKI arasında zayıf bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. Her iki KMY değeri arttıkça VKI değerinin de arttığı belirlenmiştir.

7. Aile osteoporoz öyküsü varlığı açısından; hasta grubunun % 69,8'inde aile osteoporoz öyküsü varken, kontrol grubunun %29,4'ünde aile osteoporoz öyküsünün olduğu gözlenmiştir (p=0,000).

8. Hasta grubunun toplam % 58,7'si ortaokul ve öncesi eğitim görmüşken, kontrol grubunun %61,8'i lise ve üzeri eğitim görmüştür (p= 0,037).

9. Giyim tarzı bakımından; hasta grubunun %46'sı geleneksel giyimli (başı ve kolları kapanacak şekilde) iken, kontrol grubunun %26,5'i geleneksel giyimlidir (p=0,047).

Yapılan çalışmalarda Xba I ve Pvu II polimorfizmleri ile, genotip, haplotip, allel frekansları ve KMY değerleri arasında etnik gruplara ve popülasyonlara bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak çalışılan hasta ve kontrol sayımızın toplumumuza ait genotip yapısı hakkında kesin bir sonuç bildirmek için yetersiz olduğunu ve ileride hasta sayısını arttırarak yapılacak çalışmaların bu bilgileri güçlendireceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. **Lane NE.** Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. American Journal of Obstetrics and Gynecology, **2006**; 194:3-11.
2. **Dennison E, Cole Z, Cooper C.** Diagnosis and epidemiology of osteoporosis. Current Opinion in Rheumatology, **2005**;17:456-461.
3. **Tuck SP, Francis RM.** Osteoporosis. Postgrad Med J, **2002**;78:526-532.
4. **Lomberdi I Jr, Oliveira LM, Monteiro CR, Confessor YQ, Barros TL, Natour J.** Evaluation of physical capacity and quality of life in osteoporotic women, **2004**;15(1):80–5.
5. **Erdoğan C.** Osteoporoz: Tanımı ve sınıflaması. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, **2001**; 4: 484–487.
6. **Choi JW, Pai SH.** Bone mineral density correlates strongly with basal metabolic rate in postmenopausal women. Clin Chim Acta, **2003**;333(1):79-84.
7. **Gass M, Dawson-Hughes B.** Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. Am J Med, **2006**;119(4 Suppl 1):3-11.
8. **Bağış S.** Osteoporozda klinik bulgular, tanı ve ayırıcı tanı. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, **2002**;1:83-88.
9. **Eskiyurt N.** Osteoporozda korunma ve rehabilitasyon. Gökçe Kutsal Y (Ed). Osteoporoz cep kitabı. Ankara, Güneş Kitabevi; **2005**. s.147-58.
10. **Duthie EH Jr. Falls.** Med Clin North Am **1989**; 73(6): 1321-36.
11. **Duman B.S, Tanakol R, Erensoy N, Öztürk M, Yılmaz S.** Vitamin D Receptor Alleles, Bone Mineral Density and Turnover in Postmenopausal Osteoporotic and Healthy Women. *Med Princ Pract.* **2004**;13:260–266.
12. Erişim: <http://tez2.yok.gov.tr/> Erişim tarihi:**2009**.
13. **P.B. Rapuri , J.C. Gallagher , J.A. Knezetic , V. Haynatzka.** Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with changes in bone remodeling markers and treatment response to estrogen. Maturitas 53 (**2006**) 371–379.
14. **Merih Eryavuz Sarıdoğan.** Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, **2002**:2(1); 1-11.
15. **Hatemi H.** Osteoporoz Kavramının Gelişme ve Tarihçesi. Osteoporozda tanı ve tedavi. Ed:Göksoy T İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık, **2000**:7–10.
16. **Göksoy T.** Osteoporoz tanımı ve giriş. Osteoporozda tanı ve tedavi. Ed: Göksoy T İstanbul:Özlem Grafik Matbaacılık, **2000**:3–6.
17. **Cummings SR, Melton LJ.** Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. Lancet,**2002**;359:1761-7.
18. **Genant HK, Cooper C, Poor G, Reid I, Ehrlich G, Kanis J, Nordin BE, Barrett- ConnorE, Black D, Bonjour JP, Dawson-Hughes B, Delmas PD, Dequeker J, Ragi Eis S, GennariC, Johnell O, Johnston CC Jr, Lau EM, Liberman UA, Lindsay R, Martin TJ, Masri B, Mautalen CA, Meunier PJ, Khaltav N, et al.** Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis, **1999**;10(4):259–64.

19. **Srivastava M, Deal C.** Osteoporosis in elderly: prevention and treatment. *Clin Geriatr Med*, **2002**; 18:529-55.
20. **Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJ.** Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res*, **1997**;12(1):24-35.
21. **Eryavuz M.** Osteoporozun tanımı ve sınıflandırılması. *Osteoporoz*. Ed: Kutsal YG. İstanbul **1998**: 1-7.
22. **Sindel D.** Tanı yöntemleri. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon*, **2002**;2(1);17-30.
23. **Batmaz F.** Osteoporoz, Osteoporozla Bağlı Ağrı ve Tedavisi. In: *Klinikte Menopoz: Değerlendirme ve Yönetim*. Hassa H (Ed.). Eskişehir: Gestet Basım Tanıtım Hizmetleri, **1996**:39-52.
24. **Jones G, Nguyen T, Sambrook P, Kelly P J, Eisman J A.** Progressive loss of bone in the femoral femur boyun in elderly people: longitudinal findings from the Dubbo osteoporosis epidemiology study. *BMJ*, **1994**;309:691-695.
25. **Papakitsou EF, Margioris AN, Dretakis KE, Trovas G, Zoras U, Lyritis G, Dretakis EK, Stergiopoulos K.** Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas*, **2004**;47(3):185-93.
26. **Michael R. McClung.** Clinical risk factors and evaluation of the risk of osteoporosis in clinical practice. *Ann Med Interne*, **2000**: 151(5); 392-398.83.
27. **Felsenberg D, Boonen S.** The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther*, **2005**;27:1-11.
28. **Seeman E.** The structural and biomechanical basis of the gain and loss of bone strength in women and men. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **2003**;32:25-38.
29. **Lips P.** Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*, **2001**;22(4):477-501.
30. **Ensrud KE, Lipschutz RC, Cauley JA, Seeley D, Nevitt MC, Scott J, Orwoll ES, Genant HK, Cummings SR.** Body size and hip fracture risk in older women: a prospective study. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Am J Med*, **1997**;103(4):274-80.
31. Erişim: <http://www.humanity.ankara.edu.tr/timurmakale/B16.pdf> Erişim tarihi: **09.2009**.
32. **Uslu H.** Postmenopozal raloksifen hel kullanımının serum Homosisteini, lipid profili, koagülasyon profili ve kemik Mineral yoğunluğu t skorları üzerine etkisi, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın - Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul , **2004**.
33. **Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi M L.** Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *The Journal of Steroid Biochemistry and molecular Biology*, **2002**; 81(1): 1-24.
34. **Kavuncu V.** Osteoporozda Sınıflama. Osteoporozda tanı ve tedavi. Ed: Göksoy T İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık, **2000**:205-214.
35. **Ettlinger B, Pressman A, Sklarin P, Bauer DC, Cauley JA, Cummings SR.** Associations between low levels of serum estradiol, bone density, and fractures among elderly women: the study of osteoporotic fractures. *J Clin Endocrinol Metab*, **1998**;83(7):2239-43.
36. **Vytrisalova M, Kubena A, Vlcek J, Palicka V, Hala T, Pavelka K.** Knowledge of osteoporosis correlated with hormone therapy use and health status. *Maturitas*, **2007**;56(1):21-9.

37. **Ito K.** Hormone replacement therapy and cancers: the biological roles of estrogen and progestin in tumorigenesis are different between the endometrium and breast. *Tohoku J Exp Med*, **2007**;212(1):1-12.
38. **Beral V;** Million Women Study Collaborators, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, **2007**;19;369(9574):1703-10.
39. **Nas K.** Osteoporozda Risk Faktörleri. Osteoporozda tanı ve tedavi. Ed: Göksoy T İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık, **2000**:69-94.
40. **Cummings SR, Browner WS, Bauer D, Stone K, Ensrud K, Jamal S, et al.** Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med*, **1998**;339:733-8.
41. **Bauer DC, Browner WS, Cauley JA, Orwoll ES, Scott JC, Black DM, Tao JL, Cummings SR.** Factors associated with appendicular bone mass in older women. The Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med*. **1993**;118(9):657-65.
42. **North American Menopause Society.** Management of osteoporosis in postmenopausal women: 2006 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. **2006**;13(3):340-67.
43. **Eryavuz M.** Osteoporoz Epidemiyolojisi. Osteoporoz. Ed: Kutsal YG. İstanbul, **1998**: 8-32.
44. **Fang J, Freeman R, Jeganathan R, Alderman MH.** Variations in hip fracture hospitalization rates among different race/ethnicity groups in New York City. *Ethn Dis*, **2004**;14:280-4.84.
45. **Furstenberg AL, Mezey MD.** Differences in outcome between black and white elderly hip fracture patients. *J Chronic Dis*, **1987**;40:931-8.
46. **Kellie SE, Brody JA.** Sex-specific and race-specific hip fracture rates. *Am J Public Health*, **1990**;80:326-8.
47. **National Institutes of Health.** NIH consensus statement: osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens Statement*, **2000**;17:1-45.
48. **Van der Voort DJ, Geusens PP, Dinant GJ.** Risk factors for osteoporosis related to their outcome: fractures. *Osteoporos Int*, **2001**;12:630-638.
49. **De Laet C, Kanis JA, Oden A.** Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*, **2005**; 16:1330-1338.
50. **Ravn P, Cizza G, Bjarnason NH, Thompson D, Daley M, Wasnich RD.** Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res*, **1999**;14:1622-7.
51. **Gerdhem P, Obrant KJ.** Bone mineral density in old age: the influence of age at menarche and menopause. *J Bone Miner Metab*, **2004**;22:372-375.
52. **Welsh L, Rutherford OM.** Hip bone mineral density is improved by high-impact aerobic exercise in postmenopausal women and men over 50 years. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, **1996**;74: 511-517.
53. **Arasıl T.** Günümüzde osteoporoz. Gökçe Kutsal Y (Ed). Osteoporoz cep kitabı. Ankara. Güneş Kitapevi; **2005**. s. 1-8.
54. **Eryavuz Sarıdoğan M.** Osteoporozda risk faktörlerinin değerlendirilmesi. Eryavuz Sarıdoğan M, Gökçe Kutsal Y (Ed). Osteoporoz tanı ve tedavi klavuzu. 1. Baskı. İstanbul, Deomed Medikal Yayıncılık; **2005**. s. 15-23.

55. **Nguyen TV, Center JR, Eisman JA.** Osteoporosis in elderly men and women: effects of dietary calcium, physical activity, and body mass index. *J Bone Miner Res*, **2000**;15:322-31.
56. **Kato I, Toniolo P, Akhmedkhanov A, Koenig KL, Shore R, Zeleniuch-Jacquotte A.** Prospective study of factors influencing the onset of natural menopause. *J Clin Epidemiol*, **1998**;51(12):1271-6.
57. **Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A.** Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*, **2005**;16(2):155-62.
58. **Baran DT, Faulkner KG, Genant HK, Miller PD, Pacifici R.** Diagnosis and management of osteoporosis: guidelines for the utilization of bone densitometry. *Calcif Tissue Int*, **1997**;61(6):433-40.
59. **Moyad MA.** Osteoporosis: a rapid review of risk factors and screening methods. *Urol Oncol*, **2003**;21(5):375-9.
60. **South-Paul JE.** Osteoporosis: Part I. Evaluation and assessment. *Am Fam Physician*, **2001**;63(5):897-904,908.
61. **Tamaya-Orozco J, Arzac-Palumbo P, Peon-Vidales H.** Vertebral fractures associated with osteoporosis: patient management. *Am J Med*, **1997**;18:445-85.
62. **Koçyiğit H, Aydemir Ö, Fişek G, Ölmez N, Memiş A.** Kısa Form-36 (KF-36)'nın Türkçe versiyonunun güvenilirliği ve geçerliliği. *İlaç ve Tedavi Dergisi*, **1999**;12(2):102-106.
63. **Levis S, Altman R.** Bone densitometry. *Arthritis Rheumatol*, **1998**;41:577-587.
64. **Wade JP.** Rheumatology: 15. Osteoporosis. *CMAJ*, **2001**;165(1):45-50.
65. **Angela M, Cheung, Denice S, Feig, Moira Kapral, Natalia Diaz-Granados, Sylvie Dodin,** Canadian Task Force on Preventive Health Care. Prevention of osteoporosis and osteoporotic fractures in postmenopausal women: recommendation statement from the Canadian Task Force on Preventive Health Care. *CMAJ*, **2004**;170(11).
66. **Nelson HD, Helfand M, Woolf SH, Allan JD.** Screening for postmenopausal osteoporosis: a review of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, **2002**;137(6):529-41.
67. **NIH Consensus Statement Online.** Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. **2000**;17(2):1-34.
68. **Going S, Lohman T, Houtkooper L, Metcalfe L, Flint-Wagner H, Blew R, Stanford V, Cussler E, Martin J, Teixeira P, Harris M, Milliken L, Figueroa-Galvez A, Weber J.** Effects of exercise on bone mineral density in calcium-replete postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Osteoporos Int*, **2003**;14(8):637-43.
69. **Delmas PD.** Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, **2002**;359:2018-2026.
70. **Maruyama T, Sachi Y, Furuke K, Kitaoka Y, Kanzaki H, Yoshimura Y, et al.** Induction of thioredoxin, a redox-active protein, by ovarian steroid hormones during growth and differentiation of endometrial stromal cells in vitro. *Endocrinology*. **1999**;140(1):365-72.
71. **Gruber CJ, Wieser F, Gruber IM, Ferlitsch K, Gruber DM, Huber JC.** Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecol Endocrinol* **2002**;16(6):431-41. Review.
72. **Sundarrajan C, Liao W, Roy AC, Ng SC.** Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Mol Hum Reprod* **1999**;5:797-802.

73. **Enmark E, Gustafsson JA.** Oestrogen receptors - an overview. *J. Intern Med.* **1999**; 246(2):133-8. Review.
74. **Gray GA, Sharif I, Webb DJ, Seckl JR.** Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling. *Trends Pharmacol Sci* **2001**;22(3):152-6. Review.
75. **Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, et al.** International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* **2006**;58(4):773-81. Review.
76. **Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M.** Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. *Hypertension* **2001**;37:640-4.
77. **Klinge CM.** Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* **2001**;29(14):2905-19. Review.
78. **Atasü T, Tahmay S.** Jinekoloji (Kadın Hastalıkları). Birinci Baskı. İstanbul: Universal Bilimsel Yayınları,1996.
79. **Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS.** Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology.* **1999**;140(12):5855-65.
80. **Wu TC, Wang L, Wan YJ.** Detection of estrogen receptor Messenger ribonucleic acid in human oocytes and cumulus-oocyte complexes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Fertil Steril* **1993** Jan;59(1):54-9.
81. **Hurst BS, Zilberstein M, Chou JY, Litman B, Stephens J, Leslie KK.** Estrogen receptors are present in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* **1995** ;80(1):229-32.
82. **Hillier SG, Smyth CD, Whitelaw PF, Miró F, Howles CM.** Gonadotrophin control of follicular function. *Horm Res* **1995**;43(5):216-23.
83. **Babiker FA, De Windt LJ, Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doenemdans PA.** Estrogenic Hormone Action in The Heart: Regulatory Network and Function, *Cardiovasc. Res* **2002**; 53:709–719.
84. **Klinge CM.** Estrogen Receptor Interaction with Co-activators and Corepressors. *Steroids.* **2000**; 65:227-251.
85. **Hall JM, Couse JF, Korach KS.** The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem* **2001**; 276: 36869-36872.
86. **Metzger D, Ali S, Bornert J, Chambon P.** Characterization of the Amino-terminal Transcriptional Activation Function of the Human Estrogen Receptor in Amino and Yeast Cells. *J. Biol. Chem* **1995**; 270: 9535-9542.
87. **Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Oeimo A, Hosoi T, et al.** The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor β (hER β) and Its Heterodimerization with ER α in Vivo and in Vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **1998**;243:122-126.
88. **Kong EH, Pike ACW, Hubbard RE,** Structure and Mechanism of the Oestrogen Receptor, *Biochem. Soc. Trans* **2003**; 31: 56-59.
89. **Geoffrey Cooper and Robert E. Housman.** *The Cell. A molecular approach* 3th Ed.U.S.A.,ASM Press,2004.
90. **Ho KJ, Liao JK.** Non-nuclear actions of estrogen: new targets for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Mol Interv* **2002** ;2(4):219-28. Review.

91. **Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S.** Phosphorylation of Human Estrogen Receptor α by Protein Kinase A Regulates Dimerization. *Mol. Cell. Biol* **1999**; 19: 1002–1015.
92. **Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Anderson G, et al.** Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev* **2001**; 81:1535-1565.
93. **Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA.** Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**; 93(12):5925-30.
94. **Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, et al.** Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1985**;82(23):7889-93.
95. **Andersen TI, Heimdal KR, Skrede M, Tveit K, Berg K, Borresen AL,** Oestrogen Receptor (ESR) Polymorphisms and Breast Cancer Susceptibility. *Hum. Genet.* **1994**;94:665-670.
96. **Schuur ER, Loktev AV, Sharma M, Sun Z, Roth RA, Weigel RJ.** Ligand-dependent interaction of estrogen receptor- α with members of the forkhead transcription factor family. *J Biol Chem.* **2001**;276(36):33554-60.
97. **Kos M, Reid G, Denger S, Gannon F.** Genomic Organization of the Human ER α Gene Promoter Region. *Mol. Endocrinol* **2001**; 15, 2057- 2063.
98. **Rizzoli R, Bonjour J-P, Ferrari S L.** Osteoporosis, genetics and hormones. *Journal of Molecular Endocrinology*, **2001**; 26: 79–94.
99. **Ralston S H.** Genetic Control of Susceptibility to Osteoporosis *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **2002**; 87(6):2460–2466.
100. **Ferrari SL, Rizzoli R.** Gene variants for osteoporosis and their pleiotropic effects in aging. *Molecular Aspects of Medicine*, **2005**;26: 145–167.
101. **Thakkinstian A, D’Este C, Eisman J, Nguyen T, Attia J.** Meta-Analysis of Molecular Association Studies: Vitamin D Receptor gene Polymorphisms and KMY as a Case Study *Journal Of Bone And Mineral Research*, **2004**; 19(3): 419–428.
102. **Passarge E.** Renkli Genetik Atlası, Formal Genetik: Polimorfizm. Luleci G, Sakizli M. 2.baskı, İstanbul: Nobel Tıp - Yüce Yayınları; **2000**. s.156.
103. **Carey J, White B.** Medical Genetics. Third Edition. Missouri: Mosby; **2006**.p.29.
104. **Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF.** Genetics in medicine. Sixth Edition Philadelphia: Saunders Elsevier; **2004**.p.87.
105. **Pollak A, Rokach A, Blumenfeld A, Rosen LJ, Resnik L, Dresner Pollak R.** Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism with the angiographic extent of coronary artery disease. *Eur Heart J* **2004**;25(3):240-5.
106. Erişim : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=ESR1> Erişim tarihi: **16.02.2010**.
107. **Bustamante M, Nogue X et al.** COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to KMY in Spanish postmenopausal women. *Osteoporos Int* **2007** 18:235-243.
108. **Matsubara Y, Murata M, Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, et al.** Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **1997**;17(11):3006-12.

109. **Becherini L, Gennari L, Masi L, Mansani R, Massart F, Morelli A, et al.** Evidence of a linkage disequilibrium between polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and their relationship to bone mass variation in postmenopausal Italian women. *Hum Mol Genet* **2000**;9(13):2043-50.
110. **Cohn CS, Sullivan JA, Kiefer T, Hill SM.** Identification of an enhancer element in the estrogen receptor upstream region: implications for regulation of ER transcription in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* **1999**;158(1-2):25-36.
111. **Malloy P J, Pike J W, Feldman D.** The Vitamin D Receptor and the Syndrome of Hereditary 1,25-Dihydroxyvitamin D-Resistant Rickets. *Endocrine Reviews*, **1999**; 20(2): 156–188.
112. **Morrison N, Qi JC, Tokita A et al.** Prediction of bone density from Vitamin D Receptor Alleles. *Nature*, **1994**; 367:284-287.
113. **Aerssens J, Dequeker J, Peeters J, Breemans S, Broos P, Bonen S.** Polymorphisms of the VDR, ER and COL1A1 Genes and Osteoporotic Hip Fracture in Elderly Postmenopausal Women. *Osteoporos Int*, **2000**; 11: 583-591.
114. **Miller SA, Dykes DD and Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, **1988**; 16(3): 215.
115. **Joyce B.J van Meurs, Stephanie C.E. Schuit et al.** Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. *Human Molecular Genetics*, **2003**, Vol. 12, No. 14 1745-1754.
116. **Özlem S, Saman N, Karayalçın B, Bilgilişoy M, Gürbüz Ü, İllez Ö, Gültekin M.** Postmenopozal Osteoporoz ve Osteopenide Plazma Homosistein Düzeyleri ile Biyokimyasal Kemik Döngüsü Belirteçleri Arasındaki İlişki. (*Osteoporoz Dünyasından* **2006**; 12 (2): 22-26).
117. **Paker N, Sarıca M, B, Tekdöş D, Kaya B, Buğdaycı S,D.** Postmenopozal Kemik Kaybı Olan Kadınlarda Kemik Döngüsü. *Osteoporoz Dünyasından* **2005**; 4: 155-158.
118. **Asomaning K, Bertone-Johnson Er, Nasca Pc, Hooven F, Pekow Ps.** The Association Between Body Mass Index And Osteoporosis In Patients Referred For A Bone Mineral Density Examination. *J Womens Health (Larchmt)* **2006**;15: 1028-34.
119. **Yank B, Atalar H, Külcü G.D, Gökmen D.** Postmenopozal Kadınlarda Vücut Kütle İndeksinin Kemik Mineral Yoğunluğuna Etkisi. *Osteoporoz Dünyasından* **2007**;13:56-9.
120. **Yaraman N, Çelik C, Karaoğlan B.** Postmenopozal Kadınlarda Osteoporoz ile Çok Yönlü Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. *Fiziksel Tıp Dergisi* **2002**; 5: 23-26.
121. **Şahin Y, Kirazlı Y, Akşit R.** Erken Dönem Postmenopozal Kadınlarda Obesiteyle Kemik Mineral Yoğunluğu Arasındaki İlişki. *Fiziksel Tıp Dergisi* **1998**; 1: 19-24.
122. **Mole PA, McMurdo ME, Paterson CR.** Evaluation of peripheral dual energy X-ray absorptiometry: comparison with single photon absorptiometry of the forearm and dual energy X-ray absorptiometry of the spine or femur. *Br J Radiol* **1998**; 71: 427-32.
123. **Kröger H, Tuppurainen M, Honkanen R, Alhava E, Saarikoski S.** Bone mineral density and risk factors for osteoporosis-A population based study of 1600 premenopausal women. *Calcif Tissue Int* **1994**; 55: 1-7.
124. **Nishizawa Y, Koyama H, Shoji T, Aratani H, Hagiwara S, Miki T, et al.** Obesity as a determinant of regional bone mineral density. *J Nutr Sci Vitaminol* **1991**; 37: 65-70.

125. **Kin K, Kushida K, Yamazaki K, Okamoto S, Inoue T.** Bone mineral density of the spine in normal japanese subjects using dual-energy x-ray absorptiometry: Effects of obesity and menopausal status. *Calcif Tissue Int* **1991**; 49: 101-6.
126. **Keen RW, Hart DJ, et al.** Family history of appendicular fracture and risk of osteoporosis: a population-based study. *Osteoporosis Int* **1999**; 10: 161-6.
127. **Özdemir F, Demirbağ D.** Postmenopozal Osteoporotik Kadınlarda Aile Hikayesinde Osteoporoz Varlığının Önemi *Osteoporoz Dünyasından* **2006**;12:60-3.
128. **Aksu A, Zinnuroğlu M, Karaoğlan B, Akın S, Kutsal G.Y, Atalay F, G.Dinçer.** Osteoporoz, Eğitim Durumu ve Farkındalık Düzeyi Araştırma Sonuçları. *Osteoporoz Dünyasından* **2005** 11 (1): 36-40
129. **Magnus JH, Joankimsen RM, Berntsen GK, et al.** What do Norwegian women and men know about osteoporosis? *Osteoporosis Int* **1996**;6:31-36.

EKLER

ÇALIŞMALARDA KULLANILAN KİMYASAL VE SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Kullanılan kimyasal ve solüsyonların hazırlanmasında kaynak olarak “Molecular Cloning” esas alınmıştır.

Hazırlanan solüsyonlar genel olarak konsantre stoklar halindedir. Çalışma konsantrasyonlarını elde etmek için stoklardan belli oranlarda alınarak seyreltilir. Konsantrasyon dönüştürmelerinde basitçe şu formülden yararlanılabilir.

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M1 = Hazırlanan stok konsantrasyon (M, N veya %)

V1 = Stoktan alınması gereken miktar (v)

M2 = Çalışma (son) konsantrasyonu (M, N veya %)

V2 = Hazırlanacak olan çözelti (çalışma çözeltisi) miktarı (v)

EK-1. DNA Eldesi Solüsyonları

1.1 Eritrosit Lizis Tamponu (pH=7,5)

1 Litre için;

0,32 M Sükroz

Sükroz = 109,563 gr

10 mM Tris-HCl (pH=7,5)

Tris-HCl = 1,211 gr

5mM MgCl₂

MgCl₂ = 1,015 gr

%1 Triton X 100

Triton X 100 = 10 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlandı. Triton X otoklavlanmadan sonra ilave edildi.

1.2. Fizyolojik Tampon (pH=7,5)

1 Litre için

0,075 M NaCl

NaCl = 4,383 gr

0,025 M EDTA

EDTA = 9,305 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 7,5 olarak ayarlandı

1.3. TE-9 (pH=9)

1 Litre için

500 mM Tris baz

Tris baz = 60,5 gr

20 mM EDTA

EDTA = 7,44 gr

10 mM NaCl

NaCl = 0,58 gr

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 9 olarak ayarlandı.

1.4. %10'luk SDS

20 ml için;

2 gr SDS tartılıp, üzerine bir miktar (20 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözdürüldü.

Son hacim 20 ml olacak şekilde ayarlandı.

1.5. Proteinaz-K (10mg/ml)

100 ml için;

10 gr PK tartılır, üzerine bir miktar (100 ml'den az) saf su ilave edilip iyice çözdürüldü.

Son hacim 100 ml olacak şekilde ayarlandı.

1.6. 6 M NaCl

1 litre için;

321.4 gr NaCl tartılıp, üzerine bir miktar (1000 ml'den az) bidistile su ilave edilip iyice çözdürülüp son hacim 1000 ml olacak şekilde ayarlandı.

1.7. % 70 Etil Alkol

100 ml için;

70 ml etil alkol (absolut) ve 30 ml bidistile su ilave edildi.

1.8. TE tamponu (Tris/EDTA) (pH= 8)

10 mM Tris-Cl (pH=8)

0,1 mM EDTA (pH=8)

1 litre için gereken malzemeler belirtilen oranlarda tartılıp, son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. pH = 8 olarak ayarlandı.

EK-2. Elektroforez Analiz Solüsyonları

2.1. 10 X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) Stok solüsyonu

108 gr Tris baz (890 mM)

55 gr borik asit (890 mM)

40 ml 0,5 M EDTA, pH 8.0 (20 mM)

Bir miktar bidistile su içinde çözüldükten sonra pH 8.0 olarak ayarlanıp solüsyon 1 litreye tamamlandı.

1 X TBE (1 litre için)

100 ml 10 X TBE stok solüsyonu

900 ml bidistile su

2.2. Etidyum bromid solüsyonu (10 mg/ml)

0,1 gr etidyum bromid

10 ml bidistile su içinde çözünüp ışık almayan bir cam şişe içinde buzdolabında muhafaza edildi.

2.3. DNA Yükleme Tamponu (Loading dye) (6X)

40 gr sükröz

0,25 gr bromfenol mavisi

100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözüldü. Ependorf tüplerine paylaştırılarak buzdolabında muhafaza edildi.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 2001 yılında ÇEAŞ Seyhan Anadolu Lisesi'nden mezun oldu, aynı yıl Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2006 yılında lisans eğitimini tamamladı ve 2006'da Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladı.