



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

**ROMATOİD ARTRİTLİ VE OSTEOPOROZLU HASTALARDA RANKL,
OPG, KEMİK ALKALEN FOSFATAZ VE KATEPSİN-K DÜZEYLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. GÖKHAN ÇAKIRCA
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

DİYARBAKIR-2011



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

**ROMATOİD ARTRİTLİ VE OSTEOPOROZLU HASTALARDA RANKL,
OPG, KEMİK ALKALEN FOSFATAZ VE KATEPSİN-K DÜZEYLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. GÖKHAN ÇAKIRCA
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

Prof. Dr. NURİYE METE
(Tez Danışmanı)

DİYARBAKIR-2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
ÖNSÖZ	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
TABLolar VE ŞEKİLLER.....	viii
1. GİRİŞ.....	ix
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. RANKL ve OPG.....	1
2.2. Kemik Dokusu ve Metabolizması.....	5
2.3. Osteoporoz.....	8
2.4. Osteoporozda RANK/RANKL/OPG’ nin kemik yıkımı ile ilişkisi.....	14
2.5. Romatoid artrit.....	16
2.6. Romatoid Artritte RANK/RANKL/OPG’ nin kemik yıkımı ile ilişkisi.....	19
2.7. Romatoid Artrit ve Osteoporozun Katepsin K ile ilişkisi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
4. BULGULAR.....	25
5. TARTIŞMA.....	30
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	34
7. KAYNAKLAR.....	35

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım saygıdeğer tez danışman hocam Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nuriye METE' ye şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, yetişmemde çok değerli katkıları olan Biyokimya ABD'nin bütün kıymetli hocalarına; ayrıca tezimin hazırlanma aşamalarında emeği geçen asistan arkadaşlarıma ve tüm çalışanlara teşekkür ederim.

Dr. Gökhan ÇAKIRCA



ÖZET

Romatoid Artritli ve Osteoporozlu Hastalarda RANKL, OPG, Kemik Alkalen Fosfataz ve Katepsin K Düzeylerinin Karşılaştırılması

AMAÇ: Romatoid artritli ve osteoporozlu hastalarda Osteoprotegerin (OPG), Nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligandı (RANKL), kemik alkalen fosfataz (BAP), katepsin K düzeylerini ve bunların BMD (Kemik mineral yoğunluğu) ile ilişkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM: Çalışmaya postmenopoz (n:30), postmenopoz osteoporozlu (n:30; DEXA cihazı ile ölçülen lomber vertebra ve/veya femur boynu T skoru -2,5' un altında olan), premenopoz (n:27), postmenopoz RA'lı (n:30) ve premenopoz RA'lı (n:30) olmak üzere toplam 147 olgu alındı. Serum RANKL, OPG, katepsin K ve kemik alkalen fosfataz (BAP) ELİSA yöntemiyle çalışıldı.

BULGULAR: Postmenopoz osteoporozlu hastaların serum RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranı postmenopoz hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. RA'lı hastaların serum RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı postmenopoz ve premenopoz kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken, serum OPG düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Osteoporozu olan ve olmayan postmenopoz gruplar arasında katepsin K düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı. Postmenopoz RA ve premenopoz RA grupları arasında katepsin K düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı. BMD ile OPG arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon bulunurken RANKL düzeyi ile korelasyon bulunmadı.

SONUÇ: Bu sonuçlar RANKL/RANK/OPG sisteminin osteoporoz ve romatoid artrit patogenezinde rol aldığını ve OPG'nin kemik dansitesinin önemli belirleyicisi olabileceğini desteklemekle beraber daha çok sayıda ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

ANAHTAR KELİMELEER: Osteoporoz, Romatoid artrit, RANKL, OPG, Katepsin K

ABSTRACT

Comparison levels of RANKL, OPG, bone alkaline phosphatase, and cathepsin K between patients with rheumatoid arthritis and patients with osteoporosis.

Objective: We aimed to investigate osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), bone alkaline phosphatase (BAP), cathepsin-K levels in patients with rheumatoid arthritis and patients with osteoporosis and the relationship between them and bone mineral density (BMD).

Materials and methods: Our study consist of total of 147 cases including postmenopausal (n = 30), postmenopausal women with osteoporosis (n = 30; The spine and/or femoral neck T score under -2.5 measured by DEXA device), premenopoz (n = 27), postmenopause with RA (n = 30) and premenopoz with RA (n = 30). Serum RANKL, OPG, cathepsin K and BAP were measured by ELISA method.

Results: There was not a statistically significant difference between RANKL, OPG, RANKL/OPG levels of patients with Postmenopause osteoporosis and women with postmenopause. There was a statistically significant high serum RANK level and RANKL/OPG ratio of patients with rheumatoid arthritis than women with Postmenopause and women with premenopoz While there was no statistically significant difference between serum OPG level of them. There was no statistically significant difference between cathepsin K levels in postmenopause patients with RA and premenopause patients with RA. Was found no statistically significant difference between cathepsin K levels of postmenopause patients with osteoporosis and postmenopause patients without osteoporosis. In our study, was found a statistically significant negative correlation between BMD and OPG levels, but there was no significant correlation with the level of RANKL.

Conclusions: These results support that RANKL / RANK / OPG system played a role in the pathogenesis of osteoporosis and rheumatoid arthritis, and OPG may be important determinant of bone density, more numerous and extensive studies are needed.

Keywords: Osteoporosis, Rheumatoid arthritis, RANKL, OPG, Cathepsin K

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP: Aktivatör protein

BAP: Kemik Alkalen Fosfataz

BMD: Kemik Mineral Yoğunluğu

Ca: Kalsiyum

DEXA: Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre

IF- γ : İnterferon- γ

IL: İnterlökin

JNK: Jun N-terminal kinase

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

M-CSF: Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör

NF- κ B: Nükleer faktör kappa B

OC: Osteokalsin

OP: Osteoporoz

OPG: Osteoprotegerin

OPGL: Osteoprotegerin Ligandı

PTH: Paratiroid Hormon

RANK: Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü

RANKL: Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı

TGF- β : Transforming Growth Factor-beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

TRAF: TNF receptor-associated factor

TRANCE: Tümör nekrozis faktör ilişkili aktivasyon uyarıcı sitokin

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar VE ŞEKİLLER

Tablo 1: Osteoporozun sınıflandırılması.....	9
Tablo 2: Tip I ve Tip II Osteoporotik hastaların karşılaştırılması.....	9
Tablo 3: Osteoporozun etyolojiye göre sınıflandırılması.....	10
Tablo 4: Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri.....	12
Tablo 5: Bütün gruplarda ölçülen parametrelerin tanımlayıcı istatistikleri.....	25
Tablo 6: Çalışmaya katılan tüm örneklerin ölçülen parametrelerinin spearman korelasyon analizi sonucu hesaplanan ilişkileri.....	26
Tablo 7: Grupların OPG düzeylerinin karşılaştırılması.....	26
Tablo 8: Grupların RANKL düzeylerinin karşılaştırılması.....	27
Tablo 9: Grupların RANKL/OPG oranı düzeylerinin karşılaştırılması.....	27
Tablo 10: Grupların FN-BMD düzeylerinin karşılaştırılması.....	28
Tablo 11: Grupların LS-BMD düzeylerinin karşılaştırılması.....	28
Tablo 12: Grupların Katepsin K düzeylerinin karşılaştırılması.....	29
Tablo 13: Grupların BAP düzeylerinin karşılaştırılması.....	29
Şekil 1. RANKL bağlayıcı, sinyalizasyon ve yıkımı.....	3
Şekil 2. Öncül osteoklastın olgun osteoklasta farklılaşmasında OPG, RANK ve RANKL'ın rolü.....	5
Şekil 3. Östrojen eksikliğinin osteoklastik kemik yıkımındaki rolü.....	15
Şekil 4. RA te RANK/RANKL/OPG nin kemik yıkımı ile ilişkisi.....	19
Şekil 5. Osteoklastlar tarafından kemik yıkımı şematik gösterimi.....	21
Şekil 6. Romatoid eklemlerde kemik yıkımı ve kırıkta bozulması.....	21

GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoporoz (OP), düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikromimari yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize bir kas iskelet sistemi hastalığıdır (1). Osteoporozun tanısı, tedavisi ve izlenmesi için kemik metabolizmasının çok yönlü değerlendirilmesi gerekmektedir. Radyografik yöntemlerin yanı sıra hastalığın erken tanısı, klinik seyrinin ve tedaviye yanıtların değerlendirilmesi için günümüzde kemik döngüsünün biyokimyasal belirleyicilerinden yararlanılmaktadır (2).

OPG (Osteoprotegerin) kemik rezorpsiyonunun anahtar mediatörü olan RANKL (Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı)'a bağlanarak bir tuzak reseptör gibi fonksiyon görür ve RANK (Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü)'a bağlanmasını engeller. Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur ve RANKL kemik rezorpsiyonu oluşturmaz (3). Son yıllarda OPG/RANK/RANKL gibi kemik döngüsünü ortaya koyan yeni belirleyicilerin tespit edilmesi kemik yıkımının arttığı, kemik kütlesinin azaldığı ve kırık riskinin arttığı çeşitli kemik hastalıklarının tedavilerinin ve yeni terapötik ajanların belirlenmesi açısından önem teşkil etmektedir (4,5).

OPG/RANK/RANKL yolunun keşfiyle postmenopoz osteoporoz patogeneğinde östrojen düzeyi ile olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışıldı. Östrojen eksikliği sonucu; osteoblastların, RANKL üretimi artmakta ayrıca osteoblastın RANKL üretimi ve aktivitesini azaltan OPG üretiminde azalarak OP patogeneğinde rol alırlar (6). Romatoid artrit (RA)'te, OPG/RANK/RANKL sisteminin fokal ve jeneralize kemik kaybının yanı sıra eklem inflamasyonunun patofizyolojisinde de rol aldığı gösterilmiştir (7,8).

Çalışmalarda, inflame sinovyum, sinovyal fibroblast ve sinovyal dokuda aktive T hücreler RANKL'ın önemli kaynağı olarak gösterildi (9). Ayrıca RANKL/OPG oranının, osteoporozis, ankilozan spondilit, romatoid artrit, kemik tümörleri, kalça protezi ile ilişkili osteolizis veya kemik kırıkları gibi malign olmayan patolojilerde bir biyolojik teşhis aracı olarak kullanılabileceği belirtilmektedir (10). Katepsin K kemik matriks protein bileşenlerinin bozulmasında ve osteoklast fonksiyonlarda gerekli olan sistein proteazdır. Kemik yıkım makrofajları ve sinovyal fibroblastlardan üretilerek, osteonektin, tip 1 ve tip 2 kollajen proteinlerin parçalanmasında rol oynar (11). Bu yüzden Katepsin K; osteoporoz, osteolitik kemik metastazı ve romatoid artritte kemik remodelling ve yıkımında rol oynar (12,13)

Çalışmamızda 'Romatoid artritli ve osteoporozlu hastalarda Osteoprotegerin (OPG), Nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligandı (RANKL), kemik alkalin fosfataz (BAP), katepsin K düzeylerini ve bunların BMD ile ilişkili olup olmadığını araştırdık.

GENEL BİLGİLER

2.1. RANKL ve OPG

Rodan ve Martin'in (1981) hipotezi, 1981 ve 1990'ların ortaları arasında pek çok çalışmayla desteklendi. Simonet ve ark. (1997), olası terapötik kullanımlar için transjener farelerde çeşitli TNF reseptörleriyle ilgili cDNA'ların üretebilmek amacıyla yaptıkları çalışmalarda beklenmedik bir şekilde osteoprotegerini (OPG) keşfettiler. Özel bir cDNA'yı aşırı şekilde eksprese eden fareler kemiklerinde osteoklastları olmadığından belirgin osteoporozis geliştirmişlerdi ve bu gen tarafından kodlanan protein osteoprotegerin olarak adlandırıldı (14). Bağımsız bir şekilde bazı araştırmacılar standart yaklaşımlarla insan embriyonik fibroblastlarından osteoklastogenezisi inhibe eden faktörü saflaştıran Rodan ve Martin'in hipotezini test etmeye çalışırken, özdeş bir molekül keşfettiklerini bildirip OPG cDNA'sını klonladılar (15).

Her iki grup da hızla OPG'nin ligandını tanımladılar ve sırasıyla OPG ligand ve osteoklast differansiyasyon faktör olarak adlandırdılar (15). Daha sonra bu ligandın, daha önceki yıllarda RANKL (16) ve TNF ile ilişkili aktivasyonu indüklenmiş sitokin (TRANCE) olarak adlandırılan TNF ligand ailesi üyesiyle özdeş olduğu anlaşıldı. Kısa bir süre sonra OPG ligandı olarak belirlenen bu molekülün hücrese reseptörü Anderson ve arkadaşlarının (16) keşfettikleri RANK molekülü ile özdeş olduğu anlaşıldı. Anderson ve ark. (1997) RANK'ın immün sistemde T hücreleri aktivasyonunda yer aldığını buldular. Ardından direkt ekspresyon taraması ile RANKL'ı izole eden araştırmacılar Wong ve ark. (1997)'nin da bulduğu gibi RANKL'ın nahiv T hücre proliferasyonu ile stimüle edilen dendritik hücreleri ve RANK eksprese eden T hücrelerinin sağkalımını arttırdığını buldular. RANKL'ın osteoklastogeneziste ve T hücresi aktivasyonunda yer aldığını gösteren bu keşifler osteoimmünolojiyi doğurdu (5).

RANKL

RANKL osteoklast farklılaşma faktörü (ODF), osteoprotegerin ligand (OPGL), TNF ilişkili aktivasyonca indüklenmiş sitokin (TRANCE) ve TNF süper ailesi olarak da isimlendirilmektedir. RANKL da geniş bir ekstrasellüler reseptör bağlayıcı bölge, membrana bağlanan bölge ve bağlantı gövdesi ile birlikte membrana gömülü tip II reseptördür (17). RANKL dendritik hücreler ve olgun T hücreleri için sağkalım faktörü olarak hareket etmekte ve böylece bu hücrelerin proliferasyonlarını düzenlemektedir (18). RANKL'ın bu aktiviteleri, membran reseptörü olan RANK'a bağlandıktan sonra nükleer faktör kappa B (NF- κ B) transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile bağlantılıdır (19). Normal ve patolojik durumlarda

kemik rezorpsiyonunun anahtar mediyatörü olan RANKL, 45 kDa'luk membrana bağlı hücresel ve 39,5 kDa'luk biyolojik olarak aktif, çözünür iki formdan oluşmuş 312 aminoasitlik bir peptiddir (20).

Ekspresyon

İnsan RANKL ekspresyonu periferel lenf nodlar ve f tal karacigerde ve bazı osteosarkoma hücre hatlarında tespit edilmiştir. RANKL trabeküler kemikte, kemik iliğinde büyüme plaklarında, periosteum, dalak, timus, lenf nodları ve intestinal lenfoid yamalarda bol miktarda eksprese olur (21). İltihaplı eklemlerde sinoviyal hücreler tarafından eksprese edilir ve aktif T hücreleri tarafından salgılanır. Farelerde yapılan preklinik  alışmalar RANKL'ın aynı zamanda hamilelik sırasında meme epitel hücrelerinden de eksprese olduğunu ve meme epitel hücrelerinin laktasyonel hiperplazisi ve süt üretimi için gerekli olduğunu göstermiştir. RANKL ayrıca tümör hücresi proliferasyonunun indüklenmesinde de rol oynayabilir (5).

RANKL ekspresyonu aynı zamanda hipertrofik kondrositlerde de mevcuttur. Stromal hücreler ve osteoblastlardan RANKL ekspresyonu hormonlar, büyüme faktörleri ve peptidler, sitokinler ve diğer faktörler tarafından transkripsiyonel, translasyonel ve posttranslasyonel seviyelerde düzenlenir. RANKL; kalsitriol (Vit D), parathormon, TNF , glukokortikoidler, interlökin (IL)1 ve 11, tiroid hormon, lipopolisakkarit, histamin, IGF-1 ve çeşitli uyarılara cevaben osteoblastlar ve stromal hücreler tarafından üretilmektedir (22).

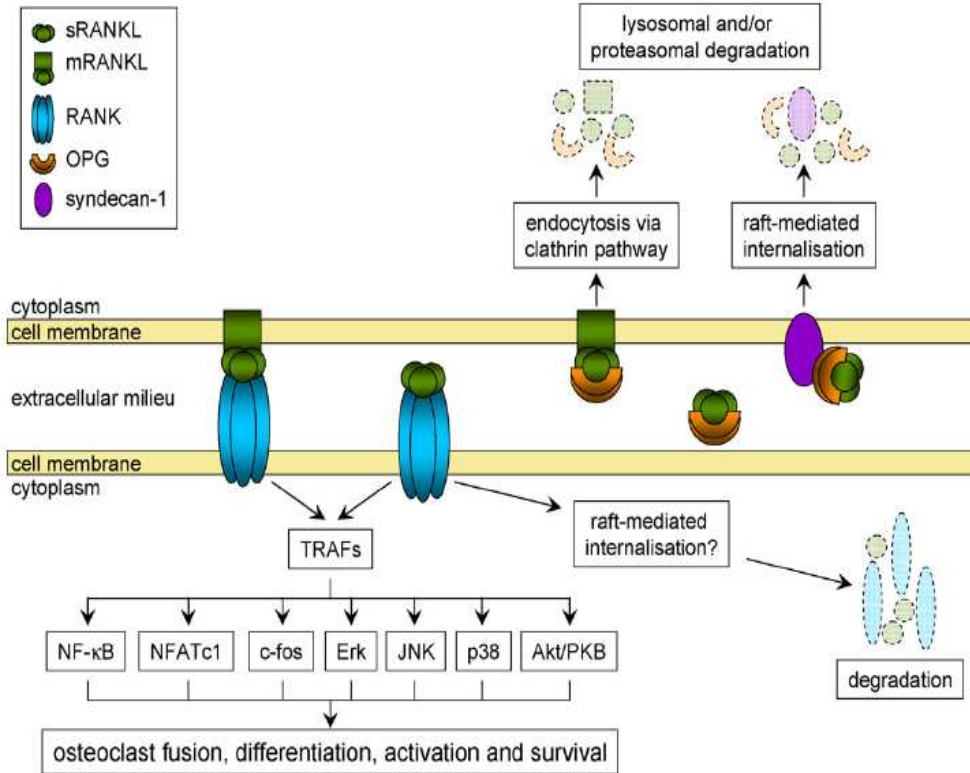
Yıkımı

RANKL'ın membran bağlı formu metalloproteinaz-disintegrin tümör nekroz faktör-  dönüştürücü (TACE) tarafından parçalanabilir ve RANKL'ı  z n r, fakat hala aktif olan bir hale sokar. RANKL-RANK kompleksleri muhtemelen raft'lar tarafından internalize edilip daha sonra lizozomlarda parçalanmaktadır. Yakın zamanda OPG ile kompleks oluşturmuş membran bağlı RANKL'ın kltrin kaplı pitaracılıklı bir yolla internalize olduğu ve her iki proteinin de lizozom ve proteozomlarla ayrıştırıldığını göstermiştir (şekil 1), (20).

Biyolojik fonksiyonu

Fizyolojik koşullar altında osteoblastlarca üretilen RANKL osteoklast öncüllerinin yüzeyindeki RANK'a bağlanmasıdan sonra sinyallemenin bir sonraki aşamasında, TRAF'ların (TNF receptor-associated factor) RANK'ın sitoplazmik bölgesinde yer alan sipesifik alanlara bağlanmaları gerekmektedir. TNF reseptörleri gibi transmembran protein olan RANK'ın sinyallemeyi gerçekleştirmek üzere protein kinazları aktive etmeye yönelik kabiliyeti yoktur. TRAF 1-3,5 ve 6 RANK'a bağlanır ama TRAF 6 ile olan bağlanma diğerlerinden daha önemli gözükmektedir. TRAF 6 osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunu düzenleyen sipesifik gen ekspresyonuna yol açan çok önemli bir adaptör proteinidir. TRAF1-

3,5 ve 6; NF- κ B, mitojen ile aktive edilmiş kinaz yolları [JNK (Jun N-terminal kinase), Erk ve p38 yoluyla] ve Akt / protein kinaz B yollarının stimülasyonunu içeren pek çok intrasellüler sinyalleme yolunun aktivasyonunda yer alır. Bu yollar osteoklastogenezise doğrudan aracılık etmelerinin yanısıra osteoklast aktivasyonuna ve bu hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerine aracılık eder. Aşırı OPG, RANKL'ı bağlar ve osteoklastların sayı ve fonksiyonlarını azaltarak RANK ile etkileşimini önler (20).



Şekil 1. RANKL bağlayıcı, sinyalizasyon ve yıkımı (20)

OPG

OPG 380 aminoasitten oluşan osteoklastogenezis inhibe edici faktör denilen hücre dışına 60 kDa'luk monomerik ve 120 kDa'luk disülfid bağı içeren homodimerik, çözünür bir glikoprotein olarak salgılanan bir sitokin reseptördür (1,2). OPG, tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNFR) süper ailesinin bir üyesi olup transmembran ve sitoplazmik kısımlar içermez. OPG yedi yapısal bölgeden oluşup 1. ve 4. bölgeleri osteoklastojenezisi inhibe edici aktiviteye sahiptir. Proteinin 5. ve 6. bölgelerinin bulunduğu C-terminalinde ölüm bölgeleri bulunmaktadır. Bu tip ölüm bölgeleri TNFR-1, DR3, CD95/Fas ve TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand (TRAIL) gibi apoptozis mediyatörlerinin sitoplazmik bölgesinde bulunur. OPG'nin 4. 5. ve 6. bölgelerinin apoptotik sinyalin iletimi ile ilişkili olduğu ve OPG'nin

TRAIL'e bağlanarak TRAIL'le indüklenen apoptozisi inhibe edebileceği belirtilmiştir. TRAIL de OPG'nin osteoklastojenezis üzerine olan inhibitör etkisini engelleyebilir. Proteinin 7. bölgesinde heparin bağlayan bir kısım bulunur. Heparin bağlayan bölgesiyle OPG kısmen lizozomlar aracılığı ile yıkılır (3).

Ekspresyon

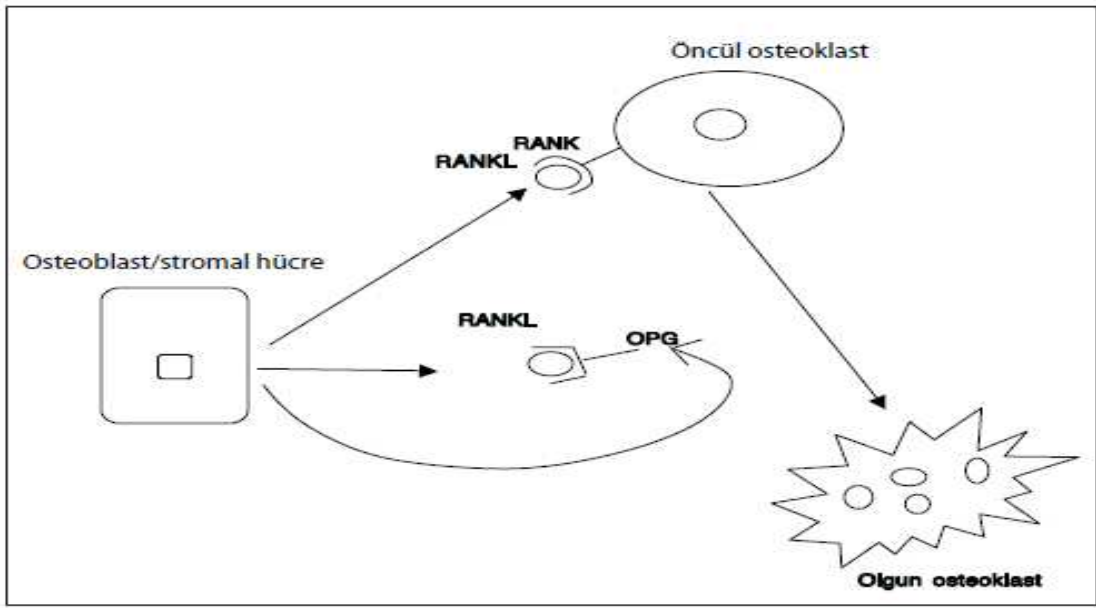
OPG mRNA'sı kemik, kıkırdak, aorta, deri, akciğer, böbrek, beyin ve pek çok dokuda tespit edilmiştir. Hücresel seviyede, OPG osteoblast, stromal hücreler, endotelial hücreler, aortik düz kas hücreleri, fibroblastlar, dendritik hücreler ve lenfoid hücre hatlarında eksprese olmaktadır (17). OPG proteinin ekspresyonu ve üretimi çeşitli sitokinler, peptitler, hormonlar ve ilaçlar tarafından ayarlanmaktadır. Transforme edici büyüme faktörü (TGF)- α , TGF- β , IL-1 α , IL-18, kemik morfojenetik proteinleri ve OPG mRNA seviyelerini artıran 17 β -östradiol bunlardan birkaçıdır. Glukokortikoidler, siklosporin A, paratiroid hormon (PTH), prostaglandin E ve fibroblast büyüme faktörü-2 ise OPG sentezini inhibe ederler (23-25).

Yıkımı

OPG, OPG heparin bağlayıcı alanla etkileşim yoluyla heparin sülfat yan zincirleriyle bir transmembran proteoglikan olan sindekan-1'e bağlanır ve daha sonra lizozomlarla kısmen parçalanır (20).

Biyolojik fonksiyonu

OPG, RANKL'a bağlanarak bir tuzak reseptör gibi fonksiyon görür ve RANK'a bağlanmasını engeller. Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur ve RANKL kemik rezorpsiyonu oluşturmaz (Şekil 2),(3). Bu sistemde, periferik sinyaller osteoblastlara kemik remodellingini arttırmaları yönünde talimat verdiklerinde RANKL salgılanır ve RANK reseptörüne bağlanır, böylece yeni osteoklastların proliferasyonu başlatılmış olur. Remodelling hızı azaltılması gerektiğinde RANKL yapımı azaltılır ve artmış osteoprotegerin rezidüel RANK ligandına bağlanarak RANK ligandı-RANK bağlanması minimize edilir, böylece osteoklast yapımı down-regule edilmiş olur (26).



Şekil 2. Öncül osteoklastın olgun osteoklasta farklılaşmasında OPG, RANK ve RANKL'in rolü (3).

2.2. Kemik Dokusu ve Metabolizması

2.2.1. Normal Kemik Dokusu

Kemik, mineralize kollajen çatısı olan özelleşmiş dinamik bir bağ dokusudur. Görevi bedensel hareketleri ve normal postürü sağlanmasının yanı sıra, beyin ve spinal kord gibi önemli yapıları korumak, başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere birçok mineral için depo görevi görmektir. Ayrıca hematopoezde ve immün sistem fonksiyonlarında da görev almaktadır (27).

Kemik, inorganik ve organik materyalden meydana gelir. Ağırlığının %70'ini mineraller veya inorganik madde, %5-8'ini su, geriye kalanını da organik veya ekstrasellüler matriks oluşturur. Organik matriksin %98'ini Tip 1 kollajen ve nonkollajenöz proteinler, %2'sini ise kemik hücreleri oluşturur. Organik matriks kemiğin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin belirleyicisidir. Büyüme faktörleri, sitokinler, osteopontin, osteokalsin, osteonektin, kemik sialoprotein, proteoglikan gibi ekstrasellüler matriks proteinleri, fosfoproteinler ve fosfolipidler total kemik volumünün çok az bir kısmını oluştururken, kemiğin biyolojik fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır (28). Kemikteki tip 1 kollajen mineralize olabilme kapasitesine sahip kemik matriksinin en önemli bileşenidir. İnorganik yapının %95'ini kalsiyum hidroksiapatit kristalleri oluşturur. Temel olarak kalsiyum, fosfat, az miktarda bikarbonat, magnezyum, sitrat, potasyum ve sodyum içerir. Hidroksiapatit kristalleri tip 1 kollajen boyunca belli bir düzende yerleşmişlerdir. Vücudun en sert ve sağlam

dokusu olan kemiğin bu özelliği, hidroksiapatit kristalleri ile kollajen arasındaki ilişkiye bağlıdır (27).

Makroskopik olarak kemiğin dış kısmına kortikal veya kompakt kemik, iç kısmına ise trabeküler, spongiyöz veya kansellöz kemik denir. İskeletin %80'ini kortikal kemik, %20'sini ise trabeküler kemik oluşturur. Kortikal kemik esas olarak mekanik ve koruyucu bir fonksiyon üstlenirken, trabeküler kemik ise metabolik fonksiyondan sorumludur. Kortikal veya kompakt kemik, başlıca appendikuler (ekstremiteler, skapula, klavikula, pelvis) iskelet sisteminde hakimdir (29). Vertebra korpusu, uzun kemiklerin epifiz ve metafizleri trabeküler kemik yapısındadır. Trabeküler kemik, kompresif güçlere karşı kemiğin direncini arttıracak biçimde düzenlenmiştir. Trabeküler kemiğin yüzey/volüm oranı, kortikal kemikten daha fazladır. Bu nedenle osteoporoza bağlı kırıklar genellikle vertebra gibi trabeküler kemikten zengin bölgelerde meydana gelmektedir (27).

2.2.2. Kemik Dokusunun Hücreleri

Osteoblastlar: Kemik yapısının organik bölümünü sentezleyen, inorganik kısmının oluşumuna aracılık eden hücrelerdir. Osteoblast serisi hücreler mezenşimal kökenli osteoprogenitor hücrelerden farklıdır. Bunlar, kırık iyileşmesi sırasında, osteojenik potansiyel taşıyan bağ dokusu hücrelerinden de farklılaşmış olabilirler (30).

Osteoblastlar, matriks sentezi süresince protein sentezleyen hücrelere özgü ince yapı özellikleri gösterirler. Matriks bileşenlerinin salgılanması hücrenin olgun kemik ile temas eden yüzeyinde gerçekleşir. Salgılanan bu ön matriks henüz kalsifiye olmamıştır ve osteoid olarak adlandırılır. Osteoid daha sonra, henüz çok iyi bilinmeyen bir mekanizmayla kalsifiye olur. Osteoblastın çevresi yeni sentezlediği kemik çatı ile tümüyle çevrildiğinde bu hücre lakunasının içindeki daimi yerini alır ve artık osteosit olarak adlandırılır. Olgun kemik hücreleri olarak tanımlanan ve lakunalarında tek olarak bulunan osteositler çoğalmazlar (31). Osteositler, kemik matriksinin devamlılığından sorumlu hücrelerdir ve osteoklastların yürüttüğü matriks yıkımı ile kontrollü hücre ölümüne giderler (32).

Osteoklastlar: Kemik rezorpsiyonundan sorumlu 150 µm'den daha büyük çapa sahip çok çekirdekli dev hücrelerdir. Monosit yolu ile hematopoetik kök hücrelerinden köken alır. Kemik yıkımını sağlayan kendilerine özgü niteliğe sahip osteoklastların yüzeyleri, işlevsel olarak iki farklı bölgeye ayrılmaktadır. Saydam bölge ya da yapışma bölgesi, eritilecek kemik yüzeyine sıkı bir şekilde tutunmayı sağlamaktadır. Fırçamsı kenar bölgesi kendi başına kemik yıkımı işlemini gerçekleştirmektedir. Fırçamsı kenara komşu alanda bulunan kemiğin organik ve inorganik bileşenlerini yıkan elemanların aktivasyonu, hücre dışı alanın asitleşmesine bağlıdır. Bu asitleştirme mekanizması bir $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATP}$ az proton pompası ile sağlanmaktadır

(33). Osteoklastların ürettiği pek çok çeşit katepsin, TRAP ve diğer eritici enzimler, kollajeni düşük PH’da yıkabilmektedirler.

Osteoklastların yol açtığı kemik yıkımı, metabolik kemik hastalıklarının patogeneğinde özellikle önem taşımaktadır. OP’de, osteoklastlara bağlı kemik yıkımı yalnızca kemik kütlesindeki kayıptan sorumlu olmakla kalmayıp, trabeküllerin devamlılığını bozarak kemikteki esnekliği azalmakta ve korteksin porozitesini arttırmaktadır (34).

2.2.3. Kemikğin yeniden yapılanması “remodelling”

Remodelling, vücudun mekanik ve metabolik gereksinmelerine iskeletin fizyolojik bir cevabıdır. Kemik remodellinginin, mekanik yüke göre kemik kütlesini ayarlama ve hasar olan yerleri onarma gibi iki önemli fonksiyonu vardır.

Mineralize doku içerisinde hasara duyarlı osteositler bu bilgiyi osteoblastik döşeyici hücrelere ulaştırırlar ve bu hücrelerden sitokinler salgılanır. Bu sitokinlerin etkisiyle osteoblastik öncü hücrelerin yüzeyinde RANKL oluşur. RANKL RANK ile birleştiğinde osteoblast öncü hücrelerinden salgılanan makrofaj koloni uyarıcı faktörün (MCSF) de aracılığıyla osteoklast öncü hücrelerinde farklılaşma ve aktivasyon sonucu olgun osteoklastlara dönüşüm sağlanır (21).

Olgun osteoklastlar oluşunca kemik yüzeyindeki integrinlere bağlanarak kemik yıkımı başlar. Kemik yıkımı aşaması 3 hafta sürer ve kemik lakunaları tamamlandığında olgun osteoklastlar ya apoptozise giderler ya da başka bir remodelling alanına göç ederler (35). Osteoklast uyarılması ile eş zamanlı olarak osteoblast öncü hücrelerinden OPG salgılanır ve RANK’a bağlanmak için RANKL ile yarışır. Bu yarışma sonucunda OPG RANK’a bağlanırsa RANK’ın neden olduğu osteoklast farklılaşma ve aktivasyonu engellenir (1).

Aktive olmuş osteoblastlar tarafından kemik oluşumu iki aşamada meydana getirilir. Osteoklastlar tarafından açılmış kemik lakunaları tip-1 kollagen ve diğer özel kemik matriks proteinleri ile doldurulur. Daha sonra osteoblast veziküllerindeki Ca ve P depozitlerinin salgılanmasıyla mineralizasyon sağlanır. Bu kemik formasyon aşaması 3-4 ay sürmektedir (36). Bu olayların meydana geldiği her bir birime yeniden şekillenme birimi (bone remodelling unit) adı verilir.

2.3. Osteoporoz

2.3.1. Osteoporoz Tanımı ve Epidemiyolojisi

Osteoporoz (OP), düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikromimari yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize bir kas iskelet sistemi hastalığıdır (1).

1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kemik mineral yoğunluğu ve kırık oluşumunun her ikisini de kapsayan bir osteoporoz tanımı geliştirilmiştir. 1996 yılında Amsterdam'daki Dünya OP Kongresi sonunda yapılan konsensusa göre OP tanımı yeniden düzenlenmiştir. Buradaki tanımlama, tanı yöntemlerinden Dual Enerji X- Ray Absorbsiyometre (DEXA) kullanılarak elde edilen değerlere ve kırık varlığına göre yapılmaktadır. 2000 yılında ise ilk OP konsensus konferansında; osteoporoz kırık riskinin artışına predispozisyon oluşturan kemik gücü kaybı ile karakterize kas iskelet sistemi bozukluğu olarak tanımlanmıştır (37).

Osteoporoz tanısında kullanılan WHO kriterleri:

Normal: T skoru genç erişkin ortalamasına göre -1 standart deviasyona kadar olan kemik mineral yoğunluğu değerleri (T skoru > -1).

Osteopeni: 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).

Yerleşmiş 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).

Tüm ırkları, her iki cinsiyeti değişik derecelerde etkilemektedir. Kadınlarda menapozda over fonksiyonlarının kaybı hızlı kemik kaybına yol açmaktadır. Böylece pek çok kadın 70 yaşında OP kriterlerini karşılamaktadır. Beyaz ırkta, 50 yaşın üzerindeki kadınların % 14'ünde, erkeklerin ise % 5'sinde yaşamlarının geri kalan sürelerinde osteoporozla bağlı kırık görülmektedir (38). Her yıl için yaşa bağlı oranın %1 artacağı varsayılırsa dünya çapında kalça kırığı sayısı 2050 yılında 8,2 milyon rakamına ulaşabilecektir (37).

2.3.2. Osteoporozun Sınıflandırılması

Her hastalıkta olduğu gibi osteoporozda da farklı açılardan sınıflandırma yapmak mümkündür (Tablo 1),(39).

Tablo1: Osteoporozun sınıflandırılması (39)

Sınıflandırma tipleri	
Yaşa göre	Juvenil Adult Senil
Lokalizasyona göre	Genel Bölgesel
Tutulan kemik dokuya göre	Trabeküler Kortikal
Etyolojiye göre	Birincil (Primer) İkincil (Sekonder)
Histolojik görünümü göre	Hızlı kemik yapım yıkım döngülü Yavaş döngülü

Albright genel osteoporozu; 65 yaşa kadar kadınlarda görülen postmenopozal osteoporoz, 65 yaş üzerinde her iki cinste görülen senil osteoporoz ve idyopatik osteoporoz olmak üzere 3 gruba ayırmıştır. Riggs ve Melton bu sınıflamayı modifiye ederek Tip I ve Tip II OP tanımlarını gündeme getirmişlerdir (40).

Tablo 2: Tip I ve Tip II Osteoporotik Hastaların Karşılaştırılması (41)

	Tip I	Tip II
Yaş	50–75	> 70
Kadın/Erkek Oranı	6/1	2/1
Kemik Kaybı	Trabeküler	Kortikal
Kemik Kayıp Hızı	Hızlı	Yavaş
Yapım/Yıkım	Osteoblast aktivitesi artar	Osteoblast aktivitesi azalır
Kırıklar	Vertebra, Distal radius	Vertebra, Kalça
Serum Ca ve P	Normal	Normal
Total Alkalen Fosfataz	Normal (Kırık varsa artar)	Normal (Kırık varsa artar)
PTH fonksiyonu	Normal, Düşük	Yüksek
İdrarda Ca	Yüksek	Normal
Ca Absorbsiyonu	Yüksek	Düşük
Nedenler	Menopoza bağlı faktörler	Yaşlanmaya bağlı faktörler

Osteoporoz için muhtelif sınıflamalar kullanılmaktadır, ancak en fazla kabul gören etyolojik sınıflamadır (42).

Tablo 3: Osteoporozun etyolojiye göre sınıflandırılması (42).

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

2.3.4. Osteoporoz Patogenezi

OP patofizyolojisinde 3 faktör önemlidir.

1. Doruk kemik kütlesi (DKK)
2. Kemik yapım-yıkım döngüsünün (turnover) hızı
3. Kemiğin organik matriksinde meydana gelen değişiklikler (43).

Yetişkinde kemik kütlesi iskelet gelişimi sırasında ulaşılan en fazla kemik miktarı olan DKK'ye ve daha sonra meydana gelen kemik kaybına bağlıdır. Ancak bunların en önemlisi kemik kütlesidir. Kemik kütlesindeki 1 SD değerindeki azalma, vertebra dışı kırıklarda % 50-100 artışa neden olmaktadır (44). BMD'nin her % 10 azalışında kırık riski 2 kat artar (45). DKK gelişiminde, genetik (%75-80) ve çevresel (%20-25) faktörlerin karşılıklı etkileşimlerinde önemlidir.

Kemik sürekli olarak kemik remodelling aktivite tarafından yenilenmektedir. Remodelling iskelet homeostazını devam ettirmek, kemik elastisitesini sağlamak ve ekstraselüler kalsiyumun düzenli kaynağını sağlamak için gereklidir. Kemikte bulunan osteoklastlar yaşlanan kemiğin hem mineral hem de protein matriksini rezorbe ederek bir boşluk oluştururlar. Daha sonra bu boşluk osteoblastlar tarafından kalsifiye olmamış kemik matriksi ile doldurulur. Bir latent periyoddan sonra matriks kalsiyum tuzları ile mineralize

edilir (46). Normal şartlar altında her iki olay dengeli bir biçimde devam eder. Remodelling döngüsünde bozulma, kemik kitlesi kaybı ve kırıklara karşı hassasiyetle sonuçlanır.

2.3.5. Osteoporozda Görüntüleme Yöntemleri

Radyografi

Radyografilerde kemik kaybının belirtileri genellikle kemik dansitesinde azalmadır. Radyografide osteopenik görünüm için kemik kütlelerinde en az %30 kayıp olması gerekmektedir (47).

Absorbsiyometri Yöntemleri

İlk geliştirilen kantitatif kemik mineral analizi tekniklerinden biridir. Kemik tarafından absorbe edilen foton radyasyon ölçümünü temel alır. 4 tipi vardır:

I. Single foton absorbsiyometri (SPA)

II. Dual foton absorbsiyometri (DPA)

III. Single enerji X ray absorbsiyometri (SXA)

IV. Dual enerji X ray absorbsiyometri (DEXA): DEXA radyoizotop olarak X ışınlarını kullanan bir ölçüm tekniği olup, osteoporozun değerlendirilmesinde klinikte altın standart olarak kabul edilmektedir. Tüm DEXA sistemlerinde X-ray kaynağı ve X-ray detektörü bulunur. DEXA ile vertebra, femur, önkol ve tüm vücut kemik mineral yoğunluğu ölçümleri yapılabilir. Omurgada standart olarak L1-L4 arası vertebralar seçilir. Femurda ise femur boynu, trokanter majus, intertrokanterik alan ve wards üçgeni ayrı ayrı değerlendirilir. BMD'yi g/cm^2 olarak ölçer. Skolyoz, dejeneratif değişiklikler ve aorta kalsifikasyonu BMD değerini artırarak osteoporozlu kişilerde yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (48,49). Tanımlamada kullanılan T skoru; kemik kütlelerinin genç erişkin referans popülasyonunun ortalama doruk kemik kitlesi ile kıyaslanmasıyla ortaya çıkan standart sapma, Z skoru ise hastanın kemik kütlelerinin yaş ve cinse göre referans değer ile kıyaslanması ile ortaya çıkan standart sapmadır (50).

Ayrıca Sintigrafi, Kantitatif kompüterize tomoğrafi, Ultrason, kemik biyopsi, Manyetik Rezonans osteoporotik fraktürlerin tespitinde ve metabolik kemik hastalıklarının ayırıcı tanısında yararlı yöntemlerdir (51).

2.3.6. Osteoporozda Laboratuvar Tetkikleri

Primer OP'de rutin biyokimya tetkikleri normal sınırlar içinde olduğu için kemik döngü hızını saptamak, primer ve sekonder OP ayırıcı tanısını yapmak, kırık riski yüksek olanları belirlemek, tedavi tipini seçmek ve özellikle antirezorbtif tedavinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerden yararlanılır (48).

Primer ve sekonder OP ayırımı için geniş klinik ve laboratuvar ayırıcı tanı yöntemlerine gereksinim vardır (52).

Tablo 4: Kemik Döngüsünün Biyokimyasal Belirteçleri (53)

Kemik yapımı	Kemik yıkımı
Serum	Serum
Osteokalsin	Tartarat Dirençli Asit Fosfataz Aktivitesi
Alkalen fosfataz	Tip I Kollajen N ve C-Terminal Çapraz
Prokollagen Tip I-C ve N Propeptidleri	Bağlı Telopeptidleri
	Kemik Sialoproteini
	İdrar
	İdrar Hidroksiprolin Düzeyi
	İdrarda Hidroksilizin Düzeyi
	Üriner Pridinolin ve Deoksiptidinolin Düzeyleri

Kemik Yapım Belirteçleri

Osteokalsin

Osteokalsin (OC), 5800 kDa molekül ağırlığında nonkollajen küçük bir protein olup osteoblast ve odontoblastların bir ürünüdür. Kemik döngüsünün arttığı durumlarda serum düzeyi artar. Ayrıca puberte, primer hiperparatroidi, hipertroidi, renal osteodistrofi, tedavi edilmemiş osteomalazi ve metastatik kemik hastalıklarında serum OC düzeyi artar (53).

Total ve Kemiğe Spesifik Alkalen Fosfataz (TALP, KALP)

Alkalen fosfataz, kemikte osteoblastlarda, karaciğer, barsak, böbrek ve plasentada bulunan bir izoenzim ailesidir. Karaciğer fonksiyonları normal olan yetişkinlerde total ALP'nin yaklaşık % 50'si karaciğerden, % 50'si ise kemikten kaynaklanır. Kemik dışı hastalıklarda özellikle karaciğer ve safra bozukluklarında total asit fosfataz (TALP) aktivitesi yükselir. Serum TALP düzeyleri primer OP'nin tanı ve takibi için hassas bir belirleyici değildir (54).

KALP aktivitesi en sık kullanılan kemik yapımı belirleyicilerindendir. KALP, osteoblastların membranında lokalize bir enzimdir ve osteoblastlardan salgılanarak dolaşıma katılır. Osteoblast fonksiyonu, kemik yapımı ve mineralizasyonu gösterir. Menopozdan hemen sonraki dönemde kemik döngüsündeki genel artış nedeniyle serum ALP düzeyi normalin iki katına kadar yükselebilir. Osteomalazi, Paget hastalığı, hiperparatroidi, tirotoksikoz ve kemik metastazlarında alkalen fosfataz artmaktadır (55).

Prokollagen Tip I Propeptidleri (PICP; PINP)

Tip I kollajen kemiğin organik matriksinin yaklaşık olarak % 90'ını oluşturur. Kollajen sentezinde fibrillerin oluşmadığı dönemde prokollajen peptidlerin C ve N terminalleri yeni oluşmakta olan molekülden ayrılıp dolaşıma geçerler. Bu peptidler; prokollajen karboksiterminal propeptid (PICP) ve aminoterminal propeptid (PINP) olarak bilinirler ve yeni kollajen sentezinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (56). Bu peptidlerin ölçümlerinin en büyük avantajı tip I kollajen sentezine spesifik göstergeler olmasıdır. Hiperparatroidi, Paget hastalığı ve normal adolesansda artarken Osteogenesis imperfectada azalır (57).

Kemik Yıkım Belirteçleri

Serum Tartarat Dirençli Asit Fosfataz (TRACP) aktivitesi

Asit fosfataz primer olarak kemik, prostat, trombosit, eritrosit ve dalak olmak üzere birçok dokuda bulunan bir enzimdir. Kemik rezorpsiyonu sırasında salınır. Multipl myeloma, Paget hastalığı, metastatik kemik hastalıkları gibi kemik döngüsü artışı ile seyreden çeşitli kemik hastalıklarında ve kadınlarda ooferektomi sonrası serum TRACP seviyesi yükselir. Diğer kemik yıkım belirleyicileri kadar hassas değildir (56).

İdrar Piridinolini ve Deoksipridinolini

Pridinolin (PYD) ve deoksipridinolin (DPD) lizin ve hidrosilizin posttranslasyonel modifikasyonu ile açığa çıkan ürünler olup temel görevleri ekstrasellüler matriks dokuda bulunan olgun kollajen molekülünün stabilizasyonunu sağlamaktır. Deoksipridinolinin kemik dokusuna spesifitesinin yüksek olması, kemik yıkımı ile doğru orantılı ve kemik kitlesi ile ters orantılı olması nedeniyle klinik kullanımda tercih edilen bir göstergedir (58).

Tip 1 Kollajen Telopeptid

Tip I kollajenin osteoklastlarca yıkılması neticesinde dolaşıma N-telopeptid (NTX) ve C telopeptid (CTX) salınır. NTX osteoporoz için tanısal bir test olarak değil, tedavi takibinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Telopeptidlerin üriner salınımları menopozdan sonra, primer hiperparatiroidi, hipertiroidi ve Paget hastalığında belirgin olarak artmaktadır. Antirezorptif tedavi gören osteoporotik hastalarda da telopeptidlerin üriner seviyelerinde belirgin azalma gözlenmiştir (59).

İdrar Hidroksiprolin (OHP) düzeyleri

Kollajen dokuda bulunan ve aminoasit yapısında olan OHP, kollajen yıkımı ile serbestlenir ve idrara geçer. Total vücut kollajeninin yaklaşık yarısı kemikte olduğundan OHP atılımı bir kemik rezorpsiyon göstergesi olarak düşünülmüştür (56). Adolesan büyüme sırasında, Multiple Myeloma Paget hastalığı, hiperparatiroidi, veya metastatik kemik

hastalıkları gibi kemik yıkımının arttığı durumlarda idrarda OHP/kreatinin oranı yükselir. Antiresorptif ilaç kullanımı ile OHP seviyesi azalır. Tanıdan ziyade tedavinin etkisini değerlendirmede kullanılır (59).

İdrarda Hidroksilizin düzeyi

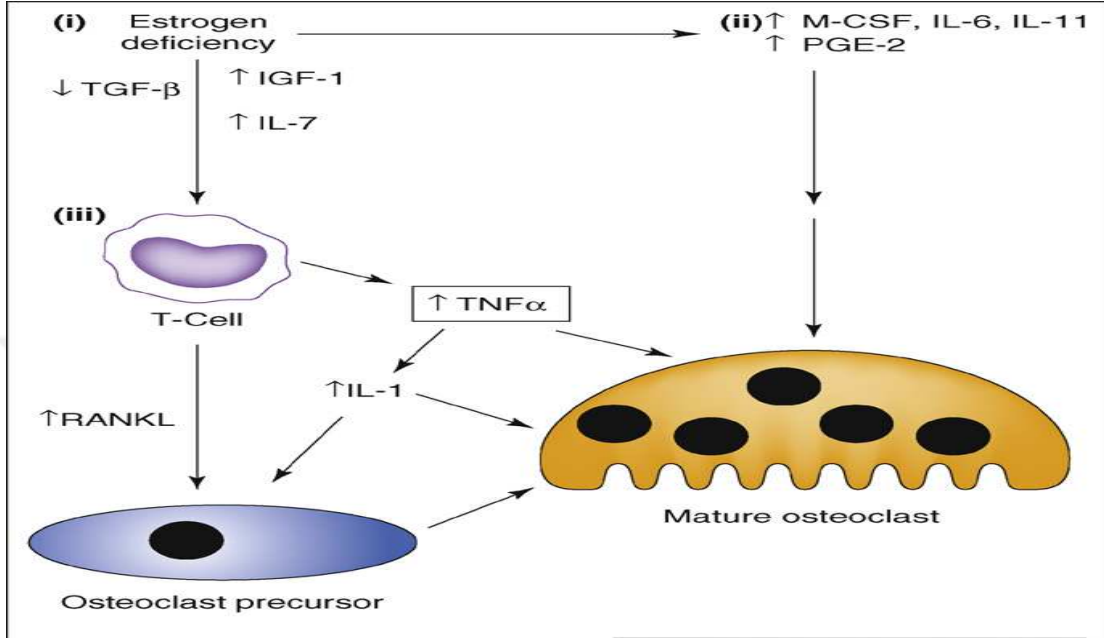
Hidroksilizin, kollajen ve kollajen benzeri peptidlerde bulunan bir diğer aminoasittir. Hidroksilizin Galaktozil hidroksilizin (GH) ve Glukozilgalaktozil hidroksilizin (GGH) olmak üzere iki glikolize formda bulunur. GH OHP'ye göre kollajen metabolizmasının daha spesifik belirteçidir. Hidroksilizinin avantajı, glikolize formların metabolize olmaması, tamamen değişmeden idrarla atılması ve diyet bileşenlerinden etkilenmemesidir (56). Üriner GH, yaşla birlikte ve Paget hastalarında artarken, postmenopoz OP'li hastalarda OHP'den daha sensitiftir (60).

2.4. Osteoporozda RANK/RANKL/OPG' nin kemik yıkımı ile ilişkisi

Kadınlarda postmenopozal dönemde ilk 10 yıl içerisinde tüm kemik kütlelerinde %15'e varan kayıplar söz konusudur. Kemik kütle kaybı menopoza kadar her iki cinsiyette aynı olurken, kadında menopoz ve menopoz sonrası dönemde hızlı bir artış olur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda östrojen eksikliği postmenopoz osteoporozun önemli bir nedeni olarak gösterildi (61). Tedavi yöntemi olarak östrojen verilenlerde, kırık görülme sıklığının azaldığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (62).

RANKL/RANK/OPG yolunun keşfiyle postmenopoz osteoporoz patogeneğinde östrojen düzeyi ile olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışıldı. Östrojen ve RANKL düzeyi arasındaki ilişkiyi destekleyen ilk kanıt overektomili sıçanlarda yüksek RANKL düzeyinin gösterilmesiyle oldu (63). Östrojen eksikliğinde, monosit, makrofaj ve osteoblastlardan interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımında artış meydana gelmektedir. Östrojen eksikliğine bağlı olarak sitokin artışı, stromal/osteoblastik hücrelerin sitokinlere daha sensitif hale gelmesine neden olmaktadır. Bu sitokinler ile stimüle edilen stromal hücreler ve preosteoblastlardan çok sayıda faktör salgılanmaktadır. Bunlar arasında IL-1, IL-6, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligandı (RANKL) bulunmaktadır. Bu faktörlerin tümü osteoklast prekürsörlerinin proliferasyonunu veya osteoklastogenezisi stimüle etmektedir (64). Ayrıca östrojen eksikliği sonucu matür osteoklastların aktivasyonu artmakta, apoptozu azalmaktadır (65). Östrojen eksikliği sonucu, osteoblastların, RANKL üretimi artmakta ayrıca osteoblastın RANKL üretimi ve aktivitesini azaltan osteoprotegerin (OPG) üretimi de azalmaktadır. Osteoblastların RANKL salınımı IL-1, IL-11, TNF- α ve PG-E2 gibi sitokinlerin yanı sıra deksametazon, 1,25(OH) $_2$ vitamin D3 ve

PTH gibi hormonlar tarafından da stimüle edilmektedir (66). TGF- β ise osteoblastların RANKL salınımını inhibe etmektedir (67). Östrojen eksikliği benzer mekanizmalarla osteoblastogenezisin azalmasına, osteoblastların ve osteositlerin yaşam sürelerinin kısılmasına yol açarak postmenopoz OP patogenezinde rol alırlar.



Şekil 3.(68) Östrojen eksikliğinin osteoklastik kemik yıkımındaki rolü. Östrojen düzeyindeki azalma Transforming growth factor- β (TGF- β) düzeyindeki azalma ve interlökin-7 (IL-7), insulin like growth factor-1 (IGF-1) düzeyindeki artışla ilişkilidir. Bu değişiklikler sonucu T hücreleri tarafından tumor necrosis factor (TNF- α) üretimi artar. TNF- α ve diğer sitokinlerin artışıyla veya aktive T hücreleri tarafından direk osteoklastları stimüle eder. Ayrıca östrojen eksikliği macrophage-colony stimulating factor (M-CSF), IL-6, IL-11 ve prostaglandin E-2 (PGE-2) düzeylerinin artmasına neden olarak daha fazla osteoklast aktivitesini uyarır.

Yapılan hayvan çalışmalarında, östrojen tedavisinin ooferektomize ratlarda IL-1 salınımını inhibe ettiği ve IL-1 'in etkisini bloke ederek kemik kaybını baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca östrojen tedavisi ile osteoblastların OPG üretimini artırdığı ve osteoklastogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Östrojen tedavisinin, osteoblast ve stromal hücrelerden OPG salınımını artıran “transforming growth factor beta (TGF- β) düzeylerinde artışa yol açarak osteoklast apoptozunu hızlandırdığı ve kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (69). Postmenapozal kadınlarda stromal hücrelerin ve T hücrelerinin premenapozal ya da östrojen tedavisi alan postmenapozal kadınlara göre daha fazla RANKL eksprese ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu hastalardaki RANKL salınımının östradiol verilmesi ile baskılandığı da ortaya konmuştur (70).

Hofbauer ve arkadaşları, sağlıklı genç kadınlarda oral kontraseptiflerin serum OPG seviyesini arttırdığını, OPG/RANKL oranında artışa neden olduğunu göstermişlerdir (71). Kostenuik ve arkadaşları (72) overiektomize edilmiş osteoporotik ratları, PTH, OPG ya da PTH-OPG kombinasyonunun 5.5 ay süreyle verildiği üç gruba ayırmış. Sadece PTH verilen gruba göre, OPG-PTH kombinasyonunun overiektomiye bağlı problemlerin geriye döndüğünü, BMD ve kemik gücüne olan katkısının daha fazla olduğunu göstermişlerdir

2.5. ROMATOİD ARTRİT

2.5.1. Tanım

Günümüzde en sık görülen enflamatuvar eklem hastalıklarından birisi olan Romatoid artrit (RA) primer olarak sinoviyal dokuları tutan, etyolojisi bilinmeyen, yangısal türde, sistemik, otoimmün bir hastalıktır. RA, bireylerin yaşam beklentisini kısaltır ve etkilenen hastaların çoğunda yaşam kalitesini bozar (73).

2.5.2. Epidemiyoloji

Dünyada (RA) prevalansı % 0.5-1 arasındadır (74). Kuzey Amerika ve Avrupa'da prevalans gelişmekte olan ülkelerden belirgin şekilde yüksektir. Türkiye'de yapılan prevalans çalışmasında RA prevalansı tüm populasyonda 0.49, kadınlarda %0.77 ve erkeklerde %0.15 olarak bulunmuştur. RA'da kadın/erkek oranı 2/1'dir (75).

2.5.3. Etiyoloji

RA'in nedeni tam olarak bilinmemekle beraber genetik, cinsiyet, gebelik, hormonal faktörler, çevresel faktörler (düşük sosyoekonomik düzey, sigara, obezite vs.) ve enfeksiyöz ajanlar (Mycoplasma, Tübeküloz, E.Coli vs.) gibi çeşitli faktörler suçlanmıştır (76-78).

2.5.4. Patogenez

Humoral ve hücrel bağışıklık sistemi RA patogenezinde birlikte rol oynar. İmmün yanıtın ilk basamağı bir peptid dizisinin antijen sunan hücreler tarafından T hücrelere sunulmasıdır. T hücreleri, antijenleri ancak reseptörleri vasıtasıyla tanıyabilirler (79).

Romatoid artritte temel patoloji, eklem kıkırdağı ve subkondral kemiğin ektopik ve hiperplastik bir sinovya tarafından yıkılmasıdır. Synovial eklem aralığında T hücreleri, makrofajlar ve plazma hücreleri gibi inflamasyon hücreleri birikir. Sinovitin ciddiliği ve gelişimi bu hücrelerin birikimi ve aktivasyonuna ve sitokinlerin salınımına bağlıdır. Romatoid artrit patogenezinde dokudaki inflamuar süreç CD4+ T hücre aktivasyonu ile başlamaktadır. Aktive olan bu hücreler, IFN- γ ve IL-2 gibi sitokinleri salgılayarak diğer T lenfosit hücrelerini, makrofajları ve fibroblastları uyarır. IFN- γ monosit / makrofaj hücrelerinin sentez ve sekresyon fonksiyonlarını aktive eder. Aktive olan makrofajlardan sürekli IL-1 ve TNF- α salgılanır (80).

Yardımcı T lenfositler tarafından aktive edilen B lenfositler, plazma hücrelerine dönüşüp İmmunglobulin (Ig) salgılayarak sinovyal membran, sinovyal sıvı ve eklem kıkırdagındaki antijenlerle birleşerek immün kompleksleri oluştururlar. Eklem boşluğuna serbestçe yayılan immün kompleksler, komplemanı aktive ederek kemotaktik faktörlerin salınmasına yol açarlar. Kemotaktik faktörler damarsal geçirgenliği arttırırlar, polimorfonükleer lökositlerin ve monositlerin bu bölgede toplanmasını sağlarlar. Bu hücreler, immün kompleksleri fagositte ederek doku hasarına neden olan prostaglandin, lökotrien, serbest radikal ve proteolitik enzimlerin yapım ve serbestleşmesine neden olurlar. Mast hücrelerinden salgılanan histamin gibi vazooaktif peptitler de inflamatuvar bölgeye inflamatuvar hücrelerin girişini sağlarlar. Sonuçta sinovyumı kaplayan hücrelerin sayısında artışla birlikte mononükleer hücrelerin perivasküler alanda infiltrasyonu görülmektedir (81).

Romatoid Artrit patogenezinde sitokinler önemli role sahiptir. Romatoid artrit sinovyasında sitokinlerin düzeyleri artar. En belirgin artış TNF- α ve IL-1 de görülür. Her iki sitokin de lenfosit kemotaksisini, anjiyogenezisi, damar geçirgenliğini ve metalloproteinaz üretimini arttırırlar. Ayrıca IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) gibi sitokinlerin de önemli rolü olduğu gösterilmiştir (82).

Sinovyal membran, intima ve subintima şeklinde 2 tabakadan oluşmaktadır. İntima Tip A sinovyal hücre ve Tip B sinovyal hücre olmak üzere iki tip hücre içerir. Hastalığın kronik fazında sinovyal tabakada hücre infiltrasyonu, özellikle tip A ve tip B sinovyal hücrelerde artma olmasıyla pannus oluşur. Pannusların etkili olduğu alan kıkırdak ile kemiğin birleştiği bölgelerdir. Pannusta bulunan makrofajların salgıladıkları proteinaz ve kollajenazların yıkıcı etkileri sonucu subkondral kemikte erozyonlar başlar. Pannus, kartilajı harap ederken eklem aralığı gittikçe daralır. Ayrıca subkondral kemik boyunca da ilerler ve bu bölgede yüzeysel kistik oluşumların ortaya çıkmasına neden olur. Sonuçta eklemlerde zamanla deformiteler gelişmeye başlar (83).

2.5.5. Romatoid artrit tanısı

Tanı 1987 yılında Amerikan Romatizma derneği tarafından belirlenen kriterlerden en az 4 tanesinin bulunması ve ilk 4 kriterin en az 6 haftadır devam ediyor olması gerekir (84).

RA sınıflama kritereleri;

1. Sabah tutukluğu (Eklem ve çevrelerinde en az 1 saat süren sabah tutukluğu)
2. Üç veya daha fazla eklemden artrit (Bir hekim tarafından tespit edilen sağ veya sol PIF, MKF, el bileği, dirsek, diz, ayak bileği ve MTF eklemlerinde aynı anda olmak üzere en az üç eklemden artrit varlığı)

3. El eklemlerinde artrit (El bileği, MKF ve PİF eklemlerinin en az birinde artrit)
4. Simetrik artrit (benzer eklem bölgelerinde aynı anda bilateral artrit varlığı)
5. Romatoid nodüller (Kemik çıkıntıları üzerinde, ekstansör yüzeylerde veya eklemlerin çevresinde hekim tarafından gözlenen subkutan nodüller)
6. Romatoid faktör pozitifliği (Herhangi bir metod ile anormal miktarda romatoid faktör pozitifliği)
7. Radyografik değişiklikler (Ön-arka el ve bilek radyografilerinde erozyonlar ve/veya periartiküler osteopeni)

2.5.6. Tedavi

2.5.6.1. Kısa Etkili İlaçlar

NSAİİ: Siklooksijenaz (COX) yolunu inhibe ederek inflamasyonu önleyip ağrıya karşı etkili olurlar. Analjezik ve anti-inflamatuvar özelliklerine karşın, hastalığın seyrini değiştirdikleri ya da eklem hasarını önleyebildikleri gösterilememiştir (85).

Kortikosteroidler: Anti-enflamatuvar ve immün süpresif etkileri nedeniyle RA tedavisinde kullanılırlar. Klinik pratikte düşük doz steroid tedavisi, metotreksat veya hastalığın seyrini değiştiren diğer ilaçların etkileri ortaya çıkana kadar, hastaların semptomlarının rahatlatılması için kullanılır (86).

2.5.6.2. Uzun Etkili İlaçlar

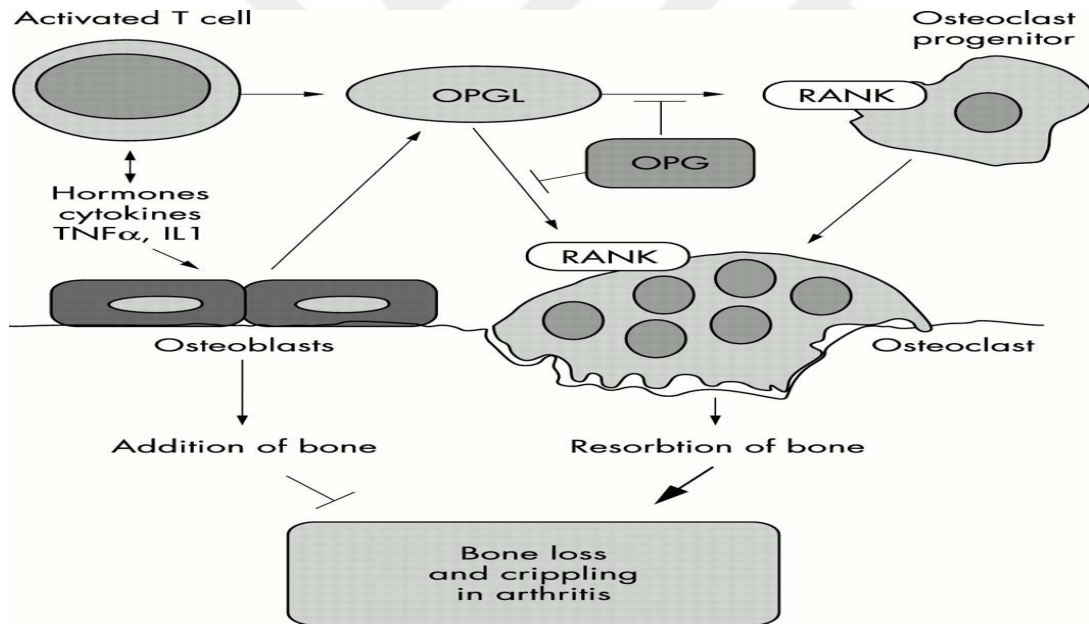
Uzun etkili ilaçlar (Methotreksat, Sülfasalazin, Antimalaryal İlaçlar, Leflunamid) ile tedaviden beklenen, hastalığın seyrini değiştirerek hastalığı kontrol altına almaktır. Bu grup ilaçlar yavaş etkilidir ve etkisi haftalar aylar sonra başlar. İnflamasyonu baskıladıklarından CRP ve ESH'ında düşüşe neden olurlar. Fonksiyonel kapasite de iyileşme sağlarlar (87).

2.5.6.3. Yeni Tedavi Ajanları:

RA etyopatogenezinin daha iyi anlaşılması sonucu RA tedavisi için biyolojik ajanların (İnfliksimab, Etanercept, Adalimumab, Anakinra, Rituksimab) kullanımı yönünde önemli gelişmeler olmuştur. RA'te kullanılabilecek biyolojik ajanlar; hücresel işlevlerin, sitokin/reseptör işlevlerinin baskılanması, immun cevabın Th1'den Th2'ye çevrilmesi, üç moleküllü kompleksin (TCR/peptid/MHC) inhibisyonu apapitoz/büyüme faktörü ile ilgili tedaviler olarak kısaca bahsedilebilir (88). Anti-TNF ve anti-IL-1 ajanlar en sık kullanılan yeni ilaçlardır. Anti TNF ilaçlar ile klasik tedaviye dirençli hastalarda iyi sonuçlar alınabilmekte ve radyolojik hasarın ilerlemesi engellenebilmektedir (89).

2.6. ROMATOİD ARTRİTTE RANKL/RANK/OPG'NİN KEMİK YIKIMI İLE İLİŞKİSİ

Romatoid artrit ilerleyici sinovyal inflamasyon ve eklem yıkımı karakterize kronik hastalıktır. Son zamanlarda romatoid artritte RANK/RANKL/OPG sisteminin fokal ve jeneralize kemik kaybının yanı sıra eklem inflamasyonunun patofizyolojisinde de rol aldığı gösterilmiştir (7,8). Çalışmalarda inflame sinovyum, sinovyal fibroblast ve sinovyal dokuda aktive T hücrelerin RANKL'ın önemli kaynağı olarak gösterildi (9). Aktif romatoid artritli hastaların sinovyal dokusundaki RANKL düzeyi remisyonundaki romatoid artritli hastalara göre yüksek bulundu (90). İmmünohistokimyasal ve in situ hibridizasyon çalışmalarıyla romatoid artritli hastaların inflame sinovyal dokusunda T lenfositlerin RANKL ekspresyonu olmasına rağmen osteoartritli hastalarda ve normal sinovyumda RANKL ekspresyonu gösterilmedi (9,91). İmmünohistokimyasal analizlerle romatoid artrit hastalarında yüksek düzeyde RANKL ekspresyonu pannusun kemik içine invazyonunda veya bitişğinde osteoklastların olduğu yerlerde gösterildi (9).



Şekil 4. RA' te RANK/RANKL/OPG nin kemik yıkımı ile ilişkisi (92)

Romatoid artritli hastalarda serum RANKL düzeyi ile kemik yıkım markerleri arasında pozitif korelasyon, kalça kemik mineral dansitesi ile ters korelasyon bulunmuş (93). İlginç olarak romatoid artritli hastalarda OPG ve RANKL serum düzeyi sağlıklı insanlardan yüksek bulunmasına rağmen OPG/RANKL oranı benzer bulunmuş (94,95). Anti TNF tedavisiyle artrit kemik erozyonunu stimüle eden OPG/RANKL oranını normalleştirdiği bulunmuş (96,97). Bu bulgulara dayalı olarak Kong et al; OPG' nin romatoid artrit kemik

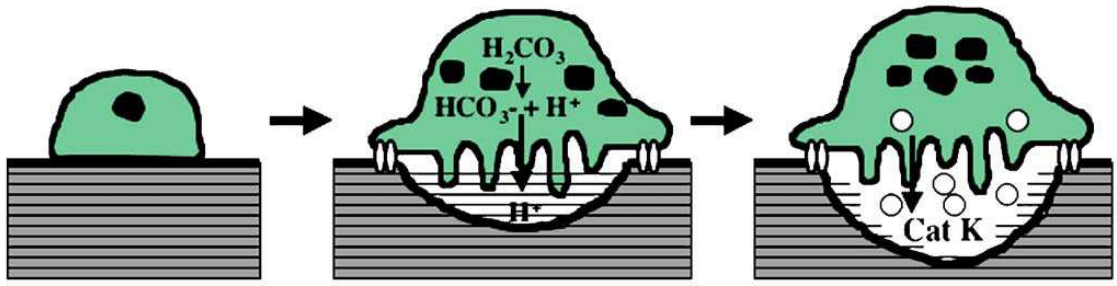
yıkımına karşı terapötik ajan olarak kullanılabileceğini önerdi (98). Adjuvan artritis ratların sinovyal dokusunda aktive T lenfositlerin RANKL üreterek romatoid artritte kemik ve eklem destrüksiyonuna neden olduğu rekombinant OPG nin verilmesiyle kemik yıkımını suprese ettiği gösterildi (9).

2.7. ROMATOİD ARTRİT VE OSTEOPOROZUN KATEPSİN K İLE İLİŞKİSİ

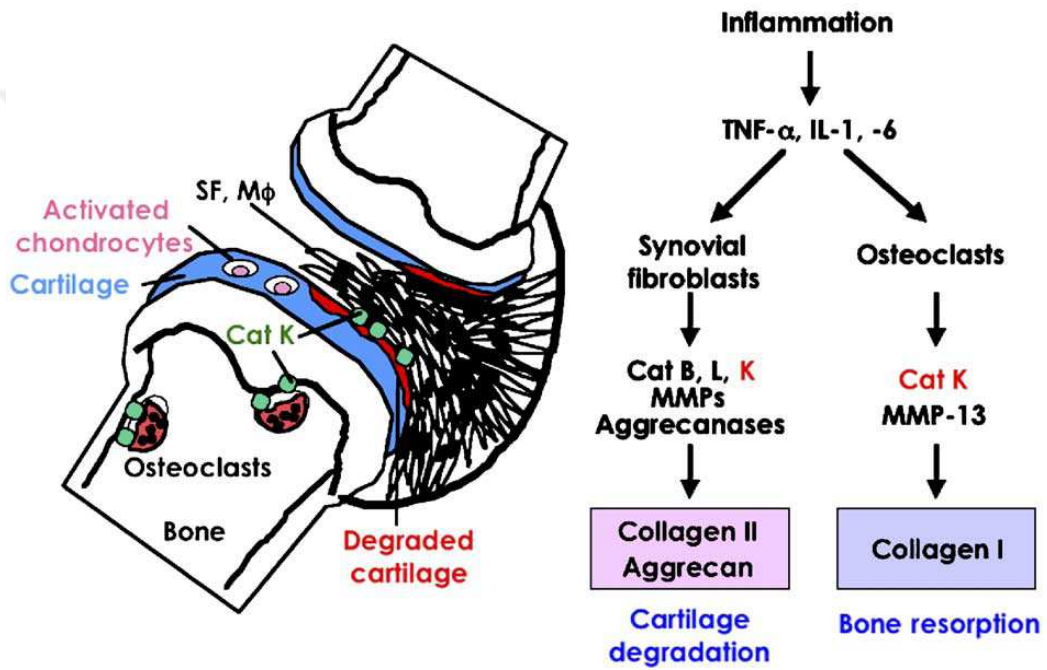
Katepsinler, sistein proteazların geniş proteolitik aktivitesi olan kapsamlı bir ailesidir; tip 2, 9, 11 kollajen ve proteoglikanlar üzerinde aktivitesi vardır. Katepsin K olarak adlandırılan yeni bir sistein proteaz, osteoklastlarca yapılan kemik rezorpsiyonunda rol alır. Nativ tip1 kollajeni bozulabilen katepsinler arasında tektir (99). Osteoklastlar tarafından kemik yıkımı inorganik kemik bileşenlerinin demineralizasyonu ve organik kemik matriksinin özellikle tip 1 kollajenin proteolitik yıkımıyla gerçekleştirir (Şekil 5),(100). Osteoklastlar proton pompası yoluyla rezorpsiyon lakunalar içine HCl asit sekrete ederek kemik demineralizasyonu yaparlar. Matriksin mineral içeriği osteoklastlar tarafından sağlanan asidik bir ortamda çözülür. Mineral serbest bırakıldıktan sonra demineralize matriks bozulur. Ayrıca asit, katepsin K ve diğer katepsinler dahil matriks yıkıcı enzimlerin osteoklastlardan salınmasına neden olur (101). Osteoklastlardan salgılanan katepsin K diğer kemik matriks proteinlerin ve kollajenlerin bozulmasına neden olur (102).

Osteoklast ve sinovyal fibroblastlardan üretilen katepsin K ekstraselüler departman içine sekrete edilip Tip 1 ve Tip 2 kollajeni parçalayarak; osteoklast fonksiyonu ve kemik matriks protein bileşenlerinin bozulmasına yol açar. Bu yüzden katepsin K; osteoporoz, osteolitik kemik metastazı ve romatoid artritte, kemik remodelling ve yıkımında rol oynar (11-13). IL-1 β ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler katepsin K salınımını sağlayarak, RA' nın iskelet komplikasyonları ve kemik yıkımında etkili rol oynarlar (Şekil 6), (100).

Yapılan çalışmalarda sistein proteaz inhibitörünün fare adjuvan artritis modelinde eklem zararını belirgin şekilde azalttığı bulunmuş (103). OPG osteoklast maturasyonunu önlemek için RANKL fonksiyonunu inhibe eder ve katepsin K ekspresyonunu etkiler. OPG kemik yıkımıyla ilgili katepsin K ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiş (104).



Şekil 5. Osteoklastlar tarafından kemik yıkımı şematik gösterimi. Olgun osteoklastlar rezorpsiyon lakunalar içine demineralizasyon için hidrojen sekresyonu ve tip 1 kollajenin bozulması için katepsin K sekresyonu yapar (100).



Şekil 6. Romatoid eklemlerde kemik yıkımı ve kıkırdak bozulması (100).

MATERYAL ve METOD

Materyal

Çalışmamıza 2010-2011 yılları arasında 70 yaşından küçük Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniğine başvuran;

1. Tedavi almamış veya son 3 aydır tedavi görmemiş; 30 postmenopoz osteoporoz hasta (DEXA'larında lomber vertebra veya femur boynu T skoru -2,5' un altında olan)
2. Sağlıklı 30 postmenopoz kadın,
3. Sağlıklı 27 premenopoz kadın
4. ACR romatoid artrit teşhis kriterlerini karşılayan ve biyolojik ajan kullanmayan 30 postmenopoz RA (Hastaların 20'si osteoporoz, 9'u osteopenik, 1'i normal DEXA'lı) ve 30 premenopoz RA olmak üzere, çalışmaya girmeyi kabul eden toplam 147 olgu alındı. Araştırma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan ve tüm katılımcılardan yazılı onay alınmıştır.

Çalışmadan Dışlanma Kriterleri

1. BMI>30 olan hastalar
2. Sigara veya alkolizm öyküsü olanlar
3. Diabetes Mellitusu olanlar
4. Koroner arter hastası veya kontrol edilemeyen hipertansiyonu olanlar
5. Tiroid hastalığı veya başka metabolik hastalığı olanlar
6. Hormon replasman tedavisi veya lipit düşürücü kullananlar
7. Yazılı onay vermek istemeyen hastalar

Çalışma Örneklerinin Alınması ve Ön İşlemler

Hastalardan vakumlu jelli (SST) tüplere alınan kanlar 30 dakika içerisinde 4000 devir/dk'da 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar, 2 ml'lik ependorf tüplere alınarak, derin dondurucuda -80°C'de çalışma gününe kadar saklandı.

Metod

RANKL: Serum sRANKL düzeyleri E11-037 lot numaralı Bio Vender Human sRANKL ELISA kiti kullanılarak "Sandwich ELISA" yöntemiyle belirlendi. Analizde kullanılan çözeltiler, kitte bildirilen prosedüre uygun olarak hazırlandı. Plak üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart ve örnekler konularak 2-8 derecede 20 saat inkübasyona bırakıldı. Hazırlanan yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandıktan sonra kurutuldu. Bütün kuyucuklara "biotinylated detection antibody" solüsyonundan 100µl konuldu ve plağın üzeri kapatılarak oda ısısında bir saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonunda kuyucuklardaki

solüsyonlar uzaklaştırıldı ve yıkama solüsyonu ile beş defa yıkandı. Yıkama solüsyonları uzaklaştırılıp kurutulmuş olan tüm kuyucuklara hazırlanan “Streptavidin-HRP conjugate” solüsyonundan 100 µl eklendi ve plağın üzeri kapatılarak 2-8°C'de bir saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile beş kez yıkandı ve kurutuldu. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB (Tetramethylbenzidine) substrat solüsyonu eklendi ve plak karanlık bir ortamda plağın üzeri kapatılmadan 20-30 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450nm'lik plak optik okuyucusunda dynex cihazında okunarak absorbans ölçümleri yapıldı.

OPG: Serum OPG düzeyleri 63703019 lot numaralı Osteoprotegerin ELISA kit eBioscience, Vienna, Austria kullanılarak belirlendi. 100 µl distile su tüm kuyucuklara konuldu. Üzerine 50 µl örnek eklenerek oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldıktan sonra kurutuldu. Her bir kuyucuğa 100 µl TMB (Tetramethylbenzidine) substrat solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450 nm'lik plak optik okuyucusunda dynex cihazında okunarak absorbans ölçümleri yapıldı.

KATEPSİN K: Serum katepsin K düzeyleri 00950530 lot numaralı Cusabio Biotech Human Cathepsin K ELISA Kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle belirlendi. Plak üzerindeki kuyucuklara 100 µl standart ve örnekler konularak 37 °C de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardan örnekler ve standartlar döküldü. Kuyucuklara 100µl biotin–antibody eklenerek 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra kurutuldu. 100 µl HRP – avidin bırakılarak 37 °C 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı. 90 µl TMB (Tetramethylbenzidine) substrat bırakılarak 37 °C 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450 nm'lik plak optik okuyucusunda dynex cihazında okunarak absorbans ölçümleri yapıldı.

KEMİK ALKALEN FOSFATAZ: Serum kemik alkaleen fosfataz düzeyi 907518 lot numaralı Microvue BAP EIA Kiti kullanılarak ELISA yöntemiyle belirlendi. Plak üzerindeki kuyucuklara 125µl assay buffer konulduktan sonra 20 µl standart ve örnekler konularak oda

sıcaklığında 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı. Kuyucuklara 150 µl substrat eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikrotitrasyon plağı 450 nm'lik plak optik okuyucusunda dynex cihazında okunarak absorbans ölçümleri yapıldı.

KEMİK MİNERAL DENSİTESİ: Tüm olguların kemik mineral yoğunluğu ölçümü DEXA cihazı ile lumbal vertebra ve femur (boyun, Ward, trokanter, total) bölgelerinde yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15,0 programı kullanıldı. Parametrik veriler için student t testi nonparametrik veriler için Mann Whitney U testi yapıldı. Normal dağılımın incelenmesi için Kolmogorov - Smirnov dağılım testi kullanıldı. Çoklu gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (Anova), test sonucunda farkların hangi gruplardan kaynaklandığını belirleyebilmek için Tukey HSD testi yapılmıştır. Korelasyon katsayısı olarak spearman korelasyon katsayısı kullanılmıştır. 0,05’den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Bu çalışmaya yaşları 21 ile 79 arasında olan 147 olgu alındı. Olguların ortalama yaşı $50,8 \pm 14,2$ idi. Bütün gruplarda değerlendirilen tüm parametre değerlerinin ortalamaları, standart sapmaları (SD), en küçük ve en büyük ölçülen değerleri tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5: Bütün gruplarda ölçülen parametrelerin tanımlayıcı istatistikleri

		Ortalama	Std. sapma	Minimum	Maksimum
BAP (U/L)	Postmenopoz RA	12.33	7.44	2.81	30.34
	Postmenopoz OP	14.31	11.22	0.55	40.97
	Premenopoz RA	9.29	8.28	0.32	34.98
	Postmenopoz	17.42	10.95	3.53	39.78
	Premenopoz	13.83	5.35	1.09	27.13
KATEPSİN K (pmol/L)	Postmenopoz RA	29.71	7.85	11.81	40.97
	Postmenopoz OP	28.99	7.65	12.36	41.64
	Premenopoz RA	28.42	8.29	6.76	39.11
	Postmenopoz	27.01	9.86	6.33	39.7
	Premenopoz	34.49	4.32	21.9	42.28
RANKL (pmol/L)	Postmenopoz RA	10.83	8.92	0.94	35.71
	Postmenopoz OP	5.45	2.58	2.46	13.03
	Premenopoz RA	8.73	5.74	1.03	28.07
	Postmenopoz	2.82	2.53	0.43	10.24
	Premenopoz	3.32	2.75	0.2	12.36
OPG (pg/ml)	Postmenopoz RA	176.75	169.71	45.03	639.2
	Postmenopoz OP	214.09	131.83	109.88	779.36
	Premenopoz RA	151.38	127.51	64.85	563.92
	Postmenopoz	126.66	93.20	44.61	432.77
	Premenopoz	126.66	93.20	44.61	432.77
FN-BMD (g/cm ²)	Postmenopoz RA	0.60	0.08	0.35	0.75
	Postmenopoz OP	0.62	0.10	0.45	0.87
	Premenopoz RA	0.77	0.11	0.52	0.98
	Postmenopoz	0.72	0.11	0.48	0.97
	Premenopoz	0.81	0.15	0.61	1.13
LS-BMD (g/cm ²)	Postmenopoz RA	0.72	0.11	0.5	1.06
	Postmenopoz OP	0.69	0.08	0.42	0.78
	Premenopoz RA	0.93	0.11	0.71	1.17
	Postmenopoz	0.92	0.09	0.79	1.14
	Premenopoz	0.99	0.20	0.68	1.55
RANKL/OPG	Postmenopoz RA	0.094	0.081	0.002	0.268
	Postmenopoz OP	0.027	0.017	0.009	0.085
	Premenopoz RA	0.074	0.055	0.005	0.222
	Postmenopoz	0.011	0.028	0.003	0.134
	Premenopoz	0.011	0.028	0.003	0.134
YAŞ	Postmenopoz RA	63.2	6.66	51	78
	Postmenopoz OP	61.77	7.00	48	79
	Premenopoz RA	39.76	7.55	26	54
	Postmenopoz	57.06	7.55	47	73
	Premenopoz	33.56	8.25	21	48

Değişkenler arasındaki kolerasyon Spearman Korelasyon testi ile yapıldı; OPG ile FN-BMD ve LS-BMD arasında negatif kolerasyon bulundu ($p < 0.01$), ayrıca FN-BMD ile LS-

BMD arasında anlamlı pozitif kolerasyon bulundu ($p<0.01$). Yaş ile FN-BMD, LS-BMD ve katepsin K arasında anlamlı negatif kolerasyon bulunurken, RANKL ve OPG ile anlamlı pozitif kolerasyon bulundu ($p<0.05$) (Tablo 6).

Tablo 6: Çalışmaya katılan tüm örneklerin ölçülen parametrelerinin spearman korelesyon analizi sonucu hesaplanan ilişkileri.

		BAP	KATEPSİN K	RANKL	OPG	FN-BMD	LS-BMD	YAŞ
BAP	r	1	0.033	-0.043	0.03	0.031	0.028	0.101
	p	.	0.696	0.644	0.769	0.729	0.758	0.223
KATEPSİN K	r	0.033	1	-0.169	0.031	0.086	0.007	-,165(*)
	p	0.696	.	0.07	0.768	0.351	0.941	0.05
RANKL	r	-0.043	-0.169	1	0	-0.145	-0.179	,216(*)
	p	0.644	0.07	.	0.998	0.149	0.074	0.018
OPG	r	0.03	0.031	0	1	-,404(**)	-,390(**)	,227(*)
	p	0.769	0.768	0.998	.	0	0	0.025
FN-BMD	r	0.031	0.086	-0.145	-,404(**)	1	,713(**)	-,561(**)
	p	0.729	0.351	0.149	0	.	0	0
LS-BMD	r	0.028	0.007	-0.179	-,390(**)	,713(**)	1	-,585(**)
	p	0.758	0.941	0.074	0	0	.	0
YAŞ	r	0.101	-,165(*)	,216(*)	,227(*)	-,561(**)	-,585(**)	1
	p	0.223	0.05	0.018	0.025	0	0	.

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

Grupların OPG düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$, tablo 7).

Tablo 7: Grupların OPG düzeylerinin karşılaştırılması

OPG düzeyine göre karşılaştırılan gruplar		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	0.754
	Premenopoz RA	0.913
	Postmenopoz	0.56
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	0.336
	Postmenopoz	0.088
Premenopoz RA	Postmenopoz	0.914

Postmenopoz RA'lı hastaların serum RANKL düzeyi osteoporozu olan ve olmayan postmenopoz kadınlardan ve premenopoz gruptan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.01$), ayrıca premenopoz RA'lı hastaların serum RANKL düzeyi postmenopoz ve premenopoz gruplarından istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$, $p<0.01$, tablo 8).

Tablo 8: Grupların RANKL düzeylerinin karşılaştırılması

RANKL düzeyine göre karşılaştırılan gruplar		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	0.005**
	Premenopoz RA	0.6
	Postmenopoz	0.001**
	Premenopoz	<0.000**
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	0.193
	Postmenopoz	0.661
	Premenopoz	0.672
Premenopoz RA	Postmenopoz	0.021*
	Premenopoz	0.006**
Postmenopoz	Premenopoz	0.999

* $p<0.05$ ** $p<0.01$

RA'lı hastaların RANKL/OPG oranı düzeyi, postmenopoz ve postmenopoz osteoporozlu kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.01$, tablo 9).

Tablo 9: Grupların RANKL/OPG düzeylerinin karşılaştırılması

RANKL/OPG oranına göre grupların karşılaştırılması		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	<0.000**
	Premenopoz RA	0.521
	Postmenopoz	<0.000**
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	0.006**
	Postmenopoz	0.685
Premenopoz RA	Postmenopoz	<0.000**

** $p<0.01$

Postmenopoz RA'lı hastalarda FN-BMD ve LS-BMD düzeyleri, postmenopoz ve RA'sı olan ve olmayan premenopoz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0.01$, tablo 10, tablo 11).

Postmenopoz osteoporozlu hastalarda FN-BMD ve LS-BMD düzeyleri, postmenopoz ve RA'sı olan ve olmayan premenopoz gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p<0.01$, tablo 10, tablo 11).

Tablo 10: Grupların FN-BMD düzeylerinin karşılaştırılması

FN-BMD düzeyine göre karşılaştırılan gruplar		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	0.982
	Premenopoz RA	<0.000**
	Postmenopoz	<0.001**
	Premenopoz	<0.000**
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	<0.000**
	Postmenopoz	<0.009**
	Premenopoz	<0.000**
Premenopoz RA	Postmenopoz	0.359
	Premenopoz	0.781
Postmenopoz	Premenopoz	0.067

** $p<0.01$

Tablo 11: Grupların LS-BMD düzeylerinin karşılaştırılması

LS-BMD düzeyine göre karşılaştırılan gruplar		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	0.844
	Premenopoz RA	<0.000 **
	Postmenopoz	<0.000 **
	Premenopoz	<0.000 **
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	<0.000**
	Postmenopoz	<0.000 **
	Premenopoz	<0.000 **
Premenopoz RA	Postmenopoz	0.993
	Premenopoz	0.632
Postmenopoz	Premenopoz	0.394

** $p<0.01$

Premenopoz kadınlarda katepsin K düzeyi premenopoz RA'lı hastalardan ve postmenopoz kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.05$). Postmenopoz RA'lı hastalarda katepsin K düzeyi premanopoz RA'lı hastalara göre ve postmenopoz osteoporozlu hastaların katepsin K düzeyi postmenopoz kadınlara göre yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$, tablo 12).

Tablo 12: Grupların katepsin K düzeylerinin karşılaştırılması

Katepsin K düzeyine göre karşılaştırılan gruplar		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	0.997
	Premenopoz RA	0.97
	Postmenopoz	0.687
	Premenopoz	0.133
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	0.999
	Postmenopoz	0.887
	Premenopoz	0.074
Premenopoz RA	Postmenopoz	0.96
	Premenopoz	0.027*
Postmenopoz	Premenopoz	0.003*

* $p < 0.05$

Postmenopoz kadınlarda BAP düzeyi premenopoz RA'lı hastalardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.01$, tablo 13).

Tablo 13: Grupların BAP düzeylerinin karşılaştırılması

BAP düzeyine göre karşılaştırılan gruplar		P
Postmenopoz RA	Postmenopoz OP	0.914
	Premenopoz RA	0.676
	Postmenopoz	0.19
	Premenopoz	0.965
Postmenopoz OP	Premenopoz RA	0.203
	Postmenopoz	0.683
	Premenopoz	1
Premenopoz RA	Postmenopoz	0.006**
	Premenapoz	0.279
Postmenopoz	Premenapoz	0.538

** $p < 0.01$

TARTIŞMA

Osteoporoz, kemiğin kütlesinde azalma, mikromimari yapısında bozulma sonucu kırılганlığında artış ile karakterize bir kemik hastalığıdır. Osteoporozun tanısı, tedavisi ve izlenmesi için kemik metabolizmasının çok yönlü değeriendirilmesi gerekmektedir. Radyografik yöntemlerin yanı sıra hastalığın erken tanısı, klinik seyrinin ve tedaviye yanıtların değeriendirilmesi için günümüzde kemik döngüsünün biyokimyasal belirleyicilerinden yararlanılmaktadır (2).

Son yıllarda OPG/RANK/RANKL gibi kemik döngüsünü ortaya koyan yeni belirleyicilerin tespit edilmesi kemik yıkımının arttığı, kemik kütlesinin azaldığı ve kırık riskinin arttığı çeşitli kemik hastalıklarının tedavilerinin ve yeni terapötik ajanların belirlenmesi açısından önem teşkil etmektedir (4,5). RANKL/RANK/OPG yolunun keşfiyle postmenopozal osteoporoz patogeneğinde ve romatoid artrit fokal ve jeneralize kemik kaybının yanı sıra eklem inflamasyonunun da patofizyolojisinde rol aldığı gösterilmiştir (7,8).

Jabbar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postmenopoz osteoporozlu hastalarda RANKL, OPG ve OPG/RANKL oranını postmenopoz kadınlara göre yüksek ayrıca kemik turnover markerlerinin (BTM) artmış düzeyleriyle ilişkili bulmuşlardır (105). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postmenopoz kadınlarda serum OPG düzeyini premenopoz kadınlardan yüksek, RANKL ve RANKL/OPG oranını düşük bulmuşlardır ayrıca normal, osteopenik ve osteoporotik olmak üzere gruplara ayrılmış postmenopoz kadınlar arasında OPG, RANKL ve RANKL/OPG düzeyleri arasında farklılık göstermediğini bulmuşlardır (106). Franchimont ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada artan ostopeni, osteoporoz ve kırıklarla ilgili olan Crohn hastası olan kişilerin sRANKL düzeylerinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (107). Uemura ve arkadaşları dolaşımdaki sRANKL düzeylerinin artmasının direkt veya indirekt olarak postmenopoz dönemdeki kadınların kemik kaybı ile açıklanacağını ileri sürmüşlerdir (108). Bucay ve arkadaşları OPG'nin bloke edildiği farelerde, osteoklast sayısı, kortikal ve trabeküler kemik porozitesinde artış ile kemik kırılганlığında artma olduğunu ve kemik gücü ve dansitesinde azalmayla birlikte erken dönemde ve hızla OP geliştiğini saptamışlardır (109). Shimizu ve arkadaşları overiektomize farelerden alınan kemiklerin ışık ve elektron mikroskopi çalışmalarında OPG verilmesi ile trabeküler kemikte anlamlı artış gözlemişlerdir (110). Bekker ve arkadaşları postmenopoz OP'li 52 hastanın yer aldığı çalışmada, hastalara tek doz rekombinant OPG injeksiyonu ile kemik yıkım belirteçlerinde anlamlı azalma olduğunu saptamışlardır (111). Browner ve arkadaşları hormon replasman tedavisi gören postmenopoz hastaların serum OPG düzeylerinin hormon replasman tedavisi görmeyen bireylerle karşılaştırdıkları çalışmalarında tedavi gören hastaların serum

OPG düzeylerinin daha yüksek bulduklarını bildirmişlerdir (112). Mizuno ve arkadaşları genetik yapısı değiştirilerek OPG üretimi durdurulan farelerde şiddetli osteoporoz geliştiği ve osteoklast sayısının arttığını saptamışlardır (113). Kim ve arkadaşları erkek ve genç yaşta olmalarına rağmen osteoporozu olan bireylerde sRANKL seviyelerinin sağlıklı kişilerden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir (114). Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar yapılan çalışmalara genelde benzer olarak, postmenopoz osteoporozlu hastaların serum RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranını postmenopoz kadınlara göre yüksek bulmamıza rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık. Östrojen eksikliği ve yaş gibi birçok faktör OPG/RANKL sisteminin dengesinin bozulmasına yol açarak stromal veya osteoblastik hücrelerde RANKL salınımına yol açıp osteoklastik kemik rezorpsiyonuna ve kemik kaybına katkıda bulunduğunu, artan OPG 'nin ise osteoklastik rezorpsiyona cevap olarak arttığını düşünmekteyiz.

Jabbar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada postmenopoz osteoporozlu hastalarda osteokalsin düzeyini osteoporoz olmayan postmenapoz kadınlara göre yüksek bulmuşlardır (105). Browner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada OPG ile OC arasında negatif korelasyon bulmuşlardır (112). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, OPG ile NTX'in üriner atılımı ile arasında pozitif korelasyon saptamışlarken RANKL ve RANKL/OPG oranı ile osteokalsin (OC) arasında ters ilişki bulmuşlardır (106). Olivieri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BMD ile kemik turnover biyokimyasal marker serum düzeyi (OPG veya RANKL) arasında herhangi bir ilişki bulmamışlardır (115). Bizim çalışmamızda OPG ve RANKL'ın serum düzeyi ile BAP arasında korelasyon bulunmadı. Olgu sayısının az olması ve hastalarımızın çoğunun remisyonda oluşundan dolayı korelasyon bulunmadığını düşünmekteyiz.

Yapılan çalışmalarda RANKL ve OPG'nin BMD ve BTM üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Stern ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada OPG ile BMD arasında anlamlı pozitif ilişki saptamışken, RANKL ile BMD arasında negatif ilişki bulmuşlardır (116). Jabbar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada lumber omurga ve femoral boyun BMD'sini en iyi OPG ve RANKL düzeyleri ile tahmin edildiğini bulmuşlardır (105). Kim ve arkadaşları dolaşımdaki OPG ve sRANKL seviyelerinin kemik kütlesi ve paratiroid hormon dışındaki kemik turnover markerleri ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir (114). Doumouchsis ve arkadaşları düşük femur boynu BMD'si olan hemodiyaliz hastalarının yüksek seviyede OPG değerlerine sahip olduklarını göstermişlerdir (117). Oh ve arkadaşları serum OPG değerlerinin omurga ve femur boynu BMD ile negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir (118). Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada RANKL, OPG seviyeleri ile BMD arasında korelasyona rastlamamışlardır (106). Fahrleitner ve arkadaşları düşük serum

OPG düzeyleri osteoporotik fraktür için risk faktörü olabileceğini tespit etmişlerdir (119). Yapılan diğer çalışmalarda postmenapoz kadınlarda BMD ile serum OPG düzeyleri arasında pozitif veya negatif korelasyon yada hiç korelasyon bulmamışlardır (112, 120, 121). Çalışmamızda BMD ile OPG arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptamışken RANKL düzeyi ile korelasyon bulunmadı. Bu sonuçlar; osteoklastogenezisin aktivitesine karşın OPG'nin artmasının kemik yıkımını azaltmak için bir kompanzasyon mekanizması olduğunu ve kemik dansitesinin önemli belirleyicisi olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yaş ile serum OPG arasında pozitif, RANKL ve RANKL/OPG oranı ile negatif korelasyon saptamışlardır (106). Junk ve arkadaşları serum OPG düzeyi ile yaş arasında ilişki bulmamışlardır (122). Eghbali ve arkadaşları premenopoz ve postmenopoz kadınlar arasında serum OPG düzeyini benzer bulmuşlardır (123). Zhao ve arkadaşları yaş ile serum OPG arasında pozitif, RANKL ile negatif korelasyon saptamışlardır (124). Uemura ve arkadaşları OPG ile yaş arasında pozitif korelasyon tespit etmişlerdir (108). Oelzner ve arkadaşları RANKL'ın yaş ile negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir (125). Çalışmamızda yaş ile serum RANKL ve OPG düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı. Bu sonuçlar doğrultusunda yaş ile artan OPG düzeyinin muhtemelen hızlı kemik rezorpsiyonuna karşı artmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Katepsin K kemik yıkım makrofajları ve sinoviyal fibroblastlardan üretilerek, osteonektin, tip 1 ve tip 2 kollajen proteinlerin parçalanmasında rol oynadığından dolayı osteoporoz, osteolitik kemik metastazı ve romatoid artritte kemik remodelling ve yıkımında rol oynar (11-13). Skoumal ve arkadaşları katepsin K düzeyini RA'lı hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (126). Skoumal ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada katepsin K ile RANKL ve OPG arasında korelasyon bulmamışlar ayrıca katepsin K ve RANKL düzeyinin yaş ile ilişkili olmadığını OPG'nin ise bağımlı olduğunu bulmuşlardır (127). Saftig ve arkadaşları katepsin K geninin silinmesiyle osteopetrotik fenotipe sahip fareler meydana geldiğini saptamışlardır (128). Esser ve arkadaşları sistein proteaz inhibitörünün fare adjuvan artrit modelinde eklem zararını belirgin şekilde azalttığı çalışmalarda, artritte kemik yıkımının mediyatörleri olarak katepsinlerin önemli bir rolü olduğunu saptamışlardır (103). Çalışmamızda postmenopoz RA'lı hastalarda katepsin K düzeyi premenopoz RA'lı hastalardan yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Postmenopoz osteoporozlu hastaların katepsin K düzeyi postmenopoz kadınlardan yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Katepsin K ile yaş arasında negatif korelasyon saptamışken RANKL ve OPG ile korelasyon bulunmadı.

RA'lı hastalarda katepsin K düzeyi osteoporozu olan ve olmayan postmenopoz ve premenopoz kadınlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Katepsin K düzeyindeki artışın osteoklast ve sinovyal fibroblastlardan katepsin K üretimine bağlı olduğunu ve çalışmalarındaki farklılığın kısmi olarak mevcut ELİSA testlerinin sensivite ve spesifite farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir.

Aktif sinoviyal lenfositlerden üretilen RANKL; trofoblast hücreleri, meme bezi epiteli, kondrosit, dendritik hücreler osteoklast ve osteoklast prekürsörünün üzerindeki RANK reseptörlerine bağlanır (92,129). Hem RANKL hemde RANK kondrositlerden salınarak (130) kondrosit büyümesi ve dengesinde rol oynar. OPG subkondral kemik yapısını inflamatuvar hücre infiltratlarına karşı koruyarak kırıkdağı koruyabilir. Horwood ve ark. romatoid artrit hastalarından elde edilen T lenfositlerinde RANKL mRNA'sı saptamışlardır (131). Skuamal ve arkadaşları RA'lı hastalarda serum RANKL düzeyi ile serum OPG konsantrasyonu arasında korelasyon bulmamışlardır (132). Ziolkowska ve arkadaşları sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında RA'lı hastalarda yüksek RANKL düzeyi bulmuşken benzer OPG/RANKL oranı saptamışlardır (133). Çalışmamızda RA'lı hastaların serum RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranını postmenopoz ve premenopoz kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulurken, serum OPG düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadık. RA'lı hastalarımızda RANKL'ın yüksek oluşunu; hastalarımızın glukokortikoid kullanmaları, biyolojik ajan (anti- TNF) tedavisi almamaları, inflame sinovyumdan RANKL ekspresyonu olması ve hastalık aktivitesinden dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Bu sonuçlar doğrultusunda RANKL'ın romatoid artritli hastalarda kemik ve kırıkdağı yıkımında önemli bir sitokin olduğunu düşünmekteyiz.

Haynes ve arkadaşları romatoid artritli hastaların sinovyumunda RANKL-eksprese eden lenfositlerin varlığını göstermişler ve RA sinovyal membranında OPG ve RANKL ekspresyonu arasında ters korelasyon saptamışlardır (134). Oelzner ve arkadaşları normal BMD, osteopeni ve osteoporozlu RA'lı hasta grupları arasında RANKL, OPG düzeyleri arasında anlamlı fark bulmamışlardır (125). Çalışmamızda postmenopoz RA'lı hastaların RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranı premenopoz RA'lı hastalardan yüksek bulunmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Postmenopoz RA'lı hastalarda RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranının yüksek oluşunu östrojen eksikliği, yaş ve hastalık süresinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Postmenopoz osteoporozlu hastaların serum RANKL, OPG düzeyi ve RANKL/OPG oranı postmenopoz hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

RA'lı hastaların serum RANKL düzeyi ve RANKL/OPG oranı postmenopoz ve premenopoz kadınlardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken, serum OPG düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Sonuç olarak, RANKL'in romatoid artritli hastalarda kemik ve kıkırdak yıkımında önemli bir sitokin olduğunu gösterdi.

Osteoporozu olan ve olmayan postmenopoz grupları arasında katepsin K düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı. Postmenopoz RA ve premenopoz RA grupları arasında katepsin K düzeyi açısından anlamlı fark bulunmadı.

BMD ile OPG arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon bulunurken RANKL düzeyi ile korelasyon bulunmadı.

Bu sonuçlar RANKL/RANK/OPG sisteminin osteoporoz ve romatoid artrit patogenezinde rol aldığını ve OPG'nin kemik dansitesinin önemli belirleyicisi olabileceğini desteklemektedir.

RANKL/RANK/OPG sistemi ve BMD arasındaki ilişkiyi daha net olarak anlayabilmek amacıyla OPG ve RANKL'in dolaşımdaki serum değerlerinin yanı sıra kemik dokudan alınacak örneklerinin de birlikte incelenip karşılaştırıldığı çalışmalar yapılmalıdır.

Çeşitli çalışmalar arasındaki çelişki OPG mRNA ve RANKL'in kemiğin yanında diğer dokularda sentezlenmesi nedeniyle OPG/RANKL sistem değişikliğinin kemik metabolizmasına spesifik olmayacağı ve mevcut ELİSA testlerinin sensivite ve spesifite farklılığı gibi nedenlerle açıklanabilir.

RA'lı hastalarda olgu sayısını artırıp, hastalık süresi, hastalık aktivitesi, yaş, T skoru ve radyolojik erozyonlara bakıp gruplara ayırarak araştırmayı yapmak, RANKL/RANK/OPG sisteminin ve katepsin K'nın romatoid artrit patofizyolojisindeki etkisinin daha açık bir şekilde anlaşılmasını sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Bartl R, Frisch B, Bartl C. Osteoporozun Tanımı. Tan AA, Osteoporoz. 1. Baskı, Ankara: Ortadoğu Reklam Tanıtım ve Yayıncılık A.S, 2006: 24-29.
2. Delmas PD. The role of markers of bone turnover in the assesment of fracture risk in postmenopausal women. Osteoporos Int; 1998;8: 32-36.
3. Kurban S, Mehmetoğlu İ. Osteoprotegerin Rank ve Rank Ligandı. Turk J Biochem 2007; 32 (4); 178–184
4. Kostenuik PJ, Shalhoub V. Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. Curr Pharm Des. 2001; 7: 613-35.
5. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. Arthritis Res Therap. 2007; 9S1: 1-7
6. Taştaban E. Osteoporoz patogeneğinde antioksidan enzimler ve RANKL. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, Uzmanlık Tezi, Aydın 2008.
7. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K: The role of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. J Clinical Endocrinol Metab 2007, 92: 4514-21.
8. Romas E, Sims NA, Hards DK, Lindsay M, Quinn JWM, Ryan PFJ, Dunstan CR, Martin TJ, Gillespie MT: Osteoprotegerin reduces osteoclast numbers and prevents bone erosion in collageninduced arthritis. Am J Pathol 2002, 161:1419-1427.
9. Gravallese, E.M. et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. Arthritis Rheum. 2000; 43, 250–258
10. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomba L, Redini F, Heymann D. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. Cell Mol Life Sci. 2007; 64: 2334-50.
11. Hou WS, Li Z, Gordon RE, Chan K, Klein MJ, Levy R, Keyszer M, Keyszer G, Bromme D: Cathepsin K is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. Am J Pathol 2001, 159:2167-2177.
12. Goto T, Yamaza T, Tanaka T: Cathepsins in the osteoclast. J Electron Microsc (Tokyo) 2003, 52: 551-558.
13. Rieman DJ, McClung HA, Dodds RA, Hwang SM, Holmes MW, James IE, Drake FH, Gowen M: Biosynthesis and processing of cathepsin K in cultured human osteoclasts. Bone 2001, 28:282-289

14. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.
15. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, „et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/ RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 3597–3602.
16. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997; 390:175-179.
17. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 64-81.
18. Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS III, Frankel WN. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997; 272:25190-25194.
19. Damay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA, Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK): interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappab and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*. 1998; 273: 20551–20555.
20. Blair JM, Zheng Y, Dunstan CR. RANK ligand. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 1077-1081.
21. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93, 165–176.
22. Troen BR. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. *Exp Gerontol*. 2003; 38: 605-614.
23. Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 1999;141: 195–210.
24. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*. 2001; 92: 460-70.

25. Brandstrom H, Bjorkmann T, Ljunggren O. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 280: 831–35.
26. Shoback D, Marcus R, Bikle D. Metabolic bone disease. In: Greenspan FS, Gardner DG (ed). *Basic & Clinical Endocrinology*. 7th edition USA 295-362, 2004.
27. Cassandra A, Thomas AE. The Bone Organ System: Form and Function. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (Eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, 2001;1; 3-20
28. Gowen M. Cytokines regulate bone cell function. *Rheumatology Rewiev* 1991; 1: 43-50
29. Bonner JF, Chesnut CH, Fitzsimmons A, Lindsay R. Osteoporosis. In: Delisa JA, Gans BM (Eds): *Physical Medicine and Rehabilitation*, Philadelphia, Lippincott. 1453-74,1998
30. Fawcett, D.W.A text book of histology (12 th edition).Chapman Hall, New York USA, 194-233,1994
31. Junquera, C. L.,Carneiro,J., Kelley, R. O. :Basic histology (8 th edition), Appleton Lange, Stanford,Connecticut,USA, 132-151, 1995
32. Rodan, G. A. Martin, T. J. :Role of osteoblast in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981; 33: 349-351,
33. Bekker, P. J. , Gay, C. V. :Characterization of an electrogenic vacuolar proton pump in purified chicken osteoclast plasma membrane vesicles. *J. Bone Miner Res.* 1990; 5: 569-579.
34. Weinreb, M, Rodan G. A., Thompson D. D.: osteopenia in the immobilized rat hind limb is associated with increased bone resorption and decreased bone formation.*Bone.* 1989; 10:187-194.
35. Dempster DW, Lindsay R. Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 1993;341:797-801
36. Teitelbaum LS. Bone remodeling and the osteoclast. *J of Bone and Mineral Research* 1993;8: 523-525
37. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367: 2010–18.
38. Bali M, Karakan T. Osteoporoz. *Saglıker Y. Harrison iç Hastalıkları Prensipleri*. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Matbacılık, 2226-2237. 2004.
39. Eryavuz M. Osteoporozun tanımı, sınıflandırması ve epidemiyolojik çalışmalar. Gökçe YK(editör). *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon*. 1–11,2002.
40. Riggs BL, Khosla S, Melton III LJ. Type I / Type II Model for involutional osteoporosis. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (Eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, 2001; 2: 49 58.
41. L Joseph Melton, B Lawrence Riggs Epidemiology and classification. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al, eds. *Rheumatology*. 2059- 2066, 2003.

42. Eryavuz M. Osteoporozun tanımı ve sınıflandırılması. Osteoporoz. Ed: Kutsal YG. İstanbul. 1-7,1998.
43. Tanakol Refik. Kalsiyum, Fosfor ve Kemik Metabolizması, Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları. Harper KD, Weber JJ.secondary Osteoporosis Diagnostic Considerations.Endokrinology And Metabolizm. Clin Nort Am 1998;2:325-347
44. Rizzoli R,Bonjour JP: Determinants of peak bone mass and mechanizm of bone loss. Osteop int. 1999;9: 17-23
45. Rodan AG, Rodan S B. The Cells of Bone. Osteoporosis Lippincott-Raven, Philadelphia. 1995;1-40
46. Who are candidates for prevention and treatment for osteoporosis? Osteoporosis Int. 1997; 7; 1-6
47. Kenneth G Faulkner Investigations of bone: densitometry. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. Rheumatology. 2003:2067-2074.
48. Sinaki M. Prevention and treatment of osteoporosis. Braddom RL(Ed): Physical Medicine and Rehabilitation, Philedelphia, Saunders. 894-912,2000.
49. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assesment of osteoporosis with densitometry. Osteoporos Int. 2000; 11: 192-202
50. Bordier P, Ryckewart A, Gueris J. On the pathogenesis of so-called idiopathic hypercalciuria. Am J Med 1977; 63: 398–409.
51. Saitoglu M. Erkeklerde Osteoporoz Risk Faktörleri ve Somatotip İlişkisi. Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ, 2006.
52. Schneider A, Shane E. Osteoporosis secondary to illnesses and medications. In: Marcus R, Feldman DD, Kelset J (Eds): Osteoporosis, San Diego, Academic Press, 2001; 2: 303-26
53. Patrick Garnero, Pierre D Delmas Investigation of bone: biochemical markers. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. Rheumatology. 2043-2057, 2003.
54. Seibel MJ, Robins SP, Blezikian JP. Markers of bone metabolism. In: Becker KL, editor. Principle and practice of Endocrinology and Metabolism. Lippincott Company. 498-508,1995.
55. Aydil S. Osteoporozda Egzersiz Programramının Solunum Fonksiyonlarına Ve Yaşam Kalitesine Etkisi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: İstanbul 70.yıl Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi;2005
56. R. Swaminathan. Biochemical Markers of Bone Turnover. Osteoporoz Dunyasından. 140-146,1999.

57. Risteli L, Risteli J. Biochemical workers of bone metabolism *Annal of Med* 1993;25: 385-93
58. Tekin Y, Bozdemir AE, Barutçuoglu B. Osteoporoz tanısında kullanılan biyokimyasal göstergeler. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2005; 3(2): 73-83.
59. Elçi A. Postmenapozal kadınlarda serum total osteokalsin ve gamma karboksi glutamat kalıntısı taşımayan osteokalsin oranı ile kemik mineral dansitesi ölçümünün karsılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Haydarpasa Numune Eğitim ve Arastırma Hastanesi, istanbul, 2004.
60. Garnero P, Delmas PD, et al. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27(2):303-23.
61. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, III Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23: 279-302.
62. Kerr D, Ackland T, Maslen B., Morton A., et al., Resistance training over 2 years increases bone mass in calcium-replete postmenopausal women, *J Bone Miner.* 2001, 16(1): 175-181
63. Miyazaki, T. et al. Changes in receptor activator of nuclear factor kB and its ligand, osteoprotegerin, bone type alkaline phosphatase and tartrate resistant acid phosphatase in ovariectomized rats. *J. Cell. Biochem.* 2004; 93: 503–512
64. Bashir A, Mak YT, Sankaralingam S et al. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids* 2005; 70: 847-855.
65. Aubin JE, Bonnellye E Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11: 905- 913.
66. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999; 25: 255-259
67. Takai H, Kanematsu M, Yano K et al. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998; 273:27091-27096.
68. Anandarajah. Allen P. Role of RANKL in bone diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2009; 20(2): 88-94.
69. Mezquita-Raya P, de la HM, Garcia DF et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005; 16: 1368-1374.

70. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003; 111:1221-1230.
71. Hofbauer LC, Schoppet M, Schuller P et al. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 214-219.
72. Kostenuik PJ, Capparelli C, Morony S et al. OPG and PTH-(1-34) have additive effects on bone density and mechanical strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 2001; 142:4295-4304.
73. Çalgüneri, M. Romatoid artrit. Yasavul Ü (Editör). Hacettepe İç Hastalıkları Kitabında Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları. 1477-95, 2004.
74. Gabriel SE. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2001; 27: 269 81.
75. Alamanos Y, Voulgari PV ve Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*, 2006; 36: 182-188.
76. Seçkin B, Başaran P Romatoid Artritin Etyoloji ve Patogenezi Harris ED, Budd CR, Frestein GS çeviri editörü: Arasıl T. Kelley Romatoloji 7. baskı. Ankara Güneş Kitabevi 2006;65: 996-1042
77. Klareskog L. Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006; 2: 425-33.
78. S M Carty, N Snowden and A J Silman. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004;63: 46-49
79. Matthews N, Emery P, Pilling D, Aakbar A, Salmon M: Subpopulations of primed T helper cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 603.
80. Irak A. Romatoid artrit hastalarında Anti-CCP, MCP-1 ve Anti-MCV Düzeylerinin Ankilozan Spondilit ve Normal Populasyonlarla Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Manisa: Celal Bayar Üniversitesi; 2010
81. Firestein G.S. (çeviren) Seçkin B. Başaran P. Romatoid artritin etyoloji ve patogenezi. Kelley Romatoloji. Arasıl T (çeviri editörü) . Ankara, Güneş kitabevi, 2006; 65: 996-1042
82. Sack U, Kinner R, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F. İnterleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. *Rheumatol İnt* 1993;13: 45-51.

83. John D Issacs, Larry W Moreland (eds). Romatoid artrit 1.Baskı, AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon Ltd.Şti. İstanbul, 2003.
84. Arnett. FC. Edworthy SM et al. The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the classification of rheumatoid arthritis Arthritis and Rheumatism 1988; 31(3): 315-24
85. Kayaalp S. O: Non Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar. Tıbbi Farmakoloji, Ankara Feryal Matbaacılık, 1992; 2035-2062,
86. Kirvan J. The effect of glucocorticoid on joint destruction in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 1995; 333:142-46
87. Landewe RB, Boers M, Verhoeven AC. COBRA combination therapy in patients with early rheumatoid arthritis: long-term structural benefits of a brief intervention. Arthritis Rheum. 2002; 46(2): 347-56.
88. Yücel E A: RA Tedavisinde Biyolojik Ajanlar. Hamuryudan V. (ed). Romatoid Artrit, MD Yayıncılık Ankara 2002; 102
89. Ertenli İ. Romatoid Artritte Yeni Tedaviler. Türkiye Klin. J Int Med Sci 2006; 2(25): 60-64
90. Crotti, T. et al. Receptor activator NF- κ B ligand (RANKL) expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathy, osteoarthritis and from normal patient; semiquantitative and quantitative analysis. Ann. Rheum. Dis. 2002; 61: 1047–1054.
91. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2000;43: 259–69.
92. D Holstead Jones, Y-Y Kong, J M Penninger¹. Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis. Ann Rheum Dis 2002;61: ii32-ii39
93. Guesens, P.P. et al. The ratio of circulating osteoprotegerin to RANKL in early rheumatoid arthritis predicts later joint destruction. Arthritis Rheum. 2006; 54: 1772–1777.
94. Guiliani N, Colla S, Rizzoli V: Update on the pathogenesis of osteolysis in multiple myeloma patients. Acta Bio Medica Ateneo Parmense 2004, 75: 143-152.
95. Oyajobi MO: Multiple myeloma/hypercalcemia. Arthritis Res ther 2007, 9(supp 1):S4.
96. Lubberts E, Berselaar L van den, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJ, Kolls JK, Joosten LA, Berg WB van den: IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF- κ B ligand/osteoprotegerin balance. J Immunol 2003, 170:2655-62.

97. Catrina AI, Af Klint E, Ernestam S, Catrina S, Makrygiannakis D, Botusan Ir, Klareskog L, Ulfgren AK: Anti-tumor necrosis factor therapy increases synovial osteoprotegerin expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54: 76-81.
98. Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;402:304–9.
99. P. Garnero, O. Borel, I. Byrjalsen, M. Ferreras, F.H. Drake, M.S. McQueney, N.T. Foged, P.D. Delmas, J.M. Delaisse, The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases, *J. Biol. Chem.*1998; 273:32,347.
100. Yasuda Y, Kaleta J, Brömme D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57(7): 973– 993.
101. Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, et al. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design* 2007;13(4):387-403.
102. Stoch SA, Wagner JA. Cathepsin K inhibitors: a novel target for osteoporosis therapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2008;83(1):172-6.
103. R.E. Esser, R.A. Angelo, M.D. Murphey, L.M. Watts, L.P. Thornburg, J.T. Palmer, J.W. Talhouk, R.E. Smith, Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis, *Arthritis Rheum*. 1994; 37(2): 236-47.
104. Wittrant Y, Couillaud S, Theoleyre S, Dunstan C, Heymann D, Redini F. Osteoprotegerin diVerentially regulates protease expression in osteoclast cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 293(1):38–44.
105. Jabbar S, Drury J, Fordham JN, et al. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Pathol*. 2011; 64(4): 354-7.
106. Liu JM, Zhao HY, Ning G., et al. Relationships between the changes of serum levels of opg and rankl with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75, *Calcif Tissue Int*, 2005; 76: 1-6.
107. Franchimont N., Reenaers C., Lambert C., et al. Increased experection of receptor activator of NF-kB ligand (RANKL), its receptor RANK and its decoy receptor osteoprotegerin in the colon of Crohn’s disease patients, *Clin Esp Immunol*, 2004, 138:491-498.

108. Uemura H., Yasui T., Miyatani Y., et al. Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa β ligand in post-menopausal women, *J Endocrinol Invest.* 2008; 31(2):163-168.
109. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998; 12: 1260-1268.
110. Shimizu-Ishiura M, Kawana F, Sasaki T Osteoprotegerin administration reduces femoral bone loss in ovariectomized mice via impairment of osteoclast structure and function. *J Electron Microsc (Tokyo).* 2002; 51: 315-325.
111. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 348-360.
112. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 631-637.
113. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247:610-615.
114. Kim JG., Kim JH., Lee DO., et al. Changes in the serum levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator for nuclear factor $\kappa\beta$ ligand after estrogen-progesterone therapy and their relationship with changes in bone mass in postmenopausal women, *Menopause.* 2008; 15(2):357-362.
115. Ulivieri FM, Piodi LP, Marchelli D, et al. Osteoprotegerin: a valid new marker of bone turnover in post-menopausal osteoporosis? *J Orthop Traumatol.* 2005;6: 88-90.
116. Stern A, Laughlin GA, Bergstrom J, et al. The sex-specific association of serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor B ligand with bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:555-62.
117. Doumouchtsis KK., Kostakis AI., Doumouchtsis SK., et al. Associations between osteoprotegerin and femoral neck BMD in hemodialysis patients, *J Bone Miner Metab.* 2008; 26: 66-72.
118. Oh K., Rhee E., Young LW., et al., Circulating Osteoprotegerin and Receptor Activator of NF- κ B ligand system are associated with bone metabolism in middle-aged males, *Clin Endocrinol.* 2005; 62: 92-98.

119. Fahrleitner-Pammer A, Dobnig H, Piswanger-Soelkner C. Osteoprotegerin serum levels in women: correlation with age, bone mass, bone turnover and fracture status. *Wien Klin Wochenschr.* 2003; 115:291–297.
120. Rogers A, Saleh G, Hannon RA. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87: 4470–4475.
121. Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone.* 2003; 32: 681–686.
122. Junk K, Lein M, Hosslin K. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-Kappa B ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. *Int J Biol Markers.* 2002; 17: 177–181.
123. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest.* 2003; 118:1221–1230.
124. H-Y.Zhao, J-M. Liu. et al. Relationships between insulin-like growth factor-1 and OPG, RANKL, bone mineral density in healthy Chinese women. *Osteoporos Int.* 2008; 19: 221–22
125. Oelzner P, Franke S, Lehmann G,,et al. Soluble receptor activator of NFkappa B-ligand and osteoprotegerin in rheumatoid arthritis relationship with bone mineral density, disease activity and bone turnover. *Clin Rheumatol.* 2007; 26: 2127–2135
126. Skoumal M, Kolarz G, Woloszczuk W, Hawa G, Klingler A. Serum cathepsin K levels of patients with destructive rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7:R65–R70
127. Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G,,et al. The imbalance between osteoprotegerin and cathepsin K in the serum of patients with longstanding rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2008; 28: 637–641
128. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(23):13453-58.
129. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 97(4):1566–1571
130. Komuro H, Olee T, Kuhn K, Quach J, Brinson DC, Shikhman A, Valbracht J, Creighton Achermann L, Lotz M. The osteoprotegerin/ receptor activator of nuclear factor kappa B/receptor activator of nuclear factor kappa B ligand system in cartilage. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 2768–2776

131. Horwood NJ, Kartsogannis V, Quinn JMW, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;265:144–50.
132. Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G,,et al. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int.* 2005; 26: 63-69
133. Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A, Luszczkiewicz G, Wiland P, Dziewczopolski W, Filipowicz-Sosnowska A, Pazdur J, Szechinki J, Kowalczewski J, Rell-Bakalarska M, Maslinski W. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor alpha treatment. *Arthritis Rheum.* 2002; 46: 1744–1753
134. Haynes DR, Barg E, Crotti TN, Holding C, Weedon H, Atkins GJ. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology.* 2003; 42: 123-134.