

**T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI BAŐKANLIĐI**

**İDİYOPATİK HİPOGONADOTROPİK HİPOGONADİZMLİ ERKEKLERDE VİTAMİN
D RESEPTÖR GEN LOKUSUNDAKİ POLİMORFİZM İLE KEMİK MİNERAL
YOĞUNLUĞU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ

88535

**GÖKHAN ÖZİŐİK
Tbp. Yzb.**

ANKARA - 1999

**T.C. YÖKSEKÖĐRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

ÖNSÖZ

Kemik kitlesinin sıkı genetik kontrol altında olduğu bilinmektedir. İkizler ve anne-kız çiftleri üzerinde yapılan çalışmalar kalıtımın, hem kadınlarda hem de erkeklerdeki kemik yoğunluğu (dansite) değişkenliğinin neredeyse %70'inden sorumlu olduğunu göstermektedir. Bunda rol oynayan genlerin tanımlanması osteoporoz patogenezinin daha iyi anlaşılmasına, bu hastalık için risk taşıyan bireylerin belirlenmesine ve daha rasyonel koruyucu ve tedavi edici yöntemlerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu aday genlerden birisi vitamin D reseptör geni olup bu genin bulunduğu lokustaki normal allelik varyasyonun, sağlıklı erişkin kadınlarda kemik yoğunluğu üzerindeki total genetik etkinin yaklaşık %75'ini oluşturduğu bildirilmiştir. Erkeklerde optimal zirve kemik kitlesinin uygun zamanda gerçekleşen androjen sekresyonu ile ilişkili olması ve hipogonadizmin erkeklerde görülen sekonder osteoporoz nedenleri arasında yer alması, idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizmlili (IHH) erkeklerde de vitamin D reseptör allellerinin kemik yoğunluğundaki varyasyon üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tezin hazırlanmasında ve uzmanlık eğitimim süresince beni yönlendiren ve teşvik eden hocam Doç.Tbp.Yb. Metin ÖZATA'ya, uzmanlık öğrenciliğim süresince değerli katkılarını esirgemeyen sayın hocalarım GATA İç Hastalıkları A.D. Başkanı Prof.Tbp.Tuğgeneral Atilla YALÇIN'a, İç Hastalıkları B.D. Başkanı Prof.Tbp.Kd.Alb. Fikri KOCABALKAN'a, Prof.Tbp.Kd.Alb. Nurettin ÖZCAN'a, Endokrinoloji ve Metab. B.D. Başkanı Prof.Hv.Tbp. Kd.Alb. İ. Çağlayan ÖZDEMİR'e, Prof.Tbp.Kd.Alb. İ. Hakkı KOÇAR'a, Prof.Tbp.Kd.Alb. Selahattin ERİKÇİ'ye, Prof.Tbp.Kd.Alb. Mustafa KUTLU'ya, Prof.Tbp.Kd.Alb. Ahmet ÇORAKÇI'ya, başta Doç.Hv.Tbp.Alb. Ömer AZAL, Doç.Hv.Tbp.Yb. Cengiz BEYHAN ve Doç.Tbp.Bnb. M. Refik MAS olmak üzere İç Hastalıkları A.D.'a bağlı B.D. başkanlıklarında görevli bütün değerli öğretim üyelerine, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü-Moleküler Biyoloji B.D. öğretim üyelerinden Prof.Dr. Cihan ÖNER ve Yrd.Doç. Hatice MERGEN'e, Doç.Tbp.Kd.Bnb. Mustafa TURAN'a, Yrd.Doç.Dz.Tbp.Yzb. Seyfettin ILGAN'a aynı ekipte çalışma mutluluğuna eriştiğim İç Hastalıkları B.D. Başkanlığında görevli bütün uzmanlık öğrencisi meslektaşlarıma ve diğer sağlık personeline, ayrıca beni sabırla destekleyen ve daima yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Eylül 1999

Gökhan ÖZAKIŞIK
Tbp. Yzb.

İÇİNDEKİLER

<u>I. GİRİŞ</u>	1
<u>II. GENEL BİLGİLER</u>	3
<u>A. VİTAMİN D</u>	3
<u>1. Vitamin D Homeostazi</u>	3
<u>2. Vitamin D Reseptörü</u>	3
<u>B. ERKEK HİPOGONADİZMİ</u>	4
<u>C. ERKEKTE OSTEOPOROZ</u>	5
<u>1. Hipogonadizme bağlı osteoporoz</u>	7
<u>2. Tedavi</u>	8
<u>D. Restriksiyon Fragmanı Boyunca Olan Polimorfizm (RFLP) Analizi</u>	8
<u>III. GEREÇ VE YÖNTEM</u>	10
<u>IV. BULGULAR</u>	13
<u>V. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	21
<u>VI. ÖZET</u>	26
<u>VII. İNGİLİZCE ÖZET</u>	27
<u>VIII. KAYNAKLAR</u>	28

I. GİRİŞ

1948 yılında Albright ve Reifenstein'in androjen eksikliğinin osteoporoza yol açtığı ve androjen replasmanının kalsiyum dengesini düzelttiği hipotezini ortaya atmalarından yıllar sonra kemik hücrelerinde androjen reseptörleri, androjen metabolizması ve androjenik etkilerinin varlığı gösterilmiştir (4,5,8,37,42,44,50). Optimal zirve kemik kitlesinin uygun zamanda ve yeterli miktarda sekrete edilen androjenler ile ilişkili olduğu düşünülmekle birlikte (52), erkeklerde zirve kemik kitlesine (genç erişkin döneminde ulaşılan kemik kitlesi düzeyi), erişimin kadınlarda olduğu gibi, genetik faktörlerin etkisi altında olduğu kabul edilmektedir (41). Erkek iskeletinin farklı bölgelerinde yapılan ölçümler neticesi kalıtımın etkisinin % 40 ile % 83 arasında değiştiği gösterilmiştir (34).

Hipogonadal erkeklerde kemik yoğunluğu düşüktür (6,19,22,23,27,48,49,56). Bu erkeklerde eğer hipogonadizm zirve kemik kitlesine erişilmeden önce mevcut ise, hem kortikal hem de trabeküler kemik yoğunluğu azalmaktadır (16). Buna karşın, Klinefelter sendrom'lu hastalarda, muhtemelen bunlarda görülen farklı derecedeki hipogonadizme ya da mevcut kromozomal anormallığe bağlı olarak, sadece kortikal kemik yoğunluğunda düşüklük söz konusudur (56). Düşük kortikal kemik yoğunluğunu puberte sonrasında androjen replasmanı ile düzeltmek hem bu grup hastalarda hem de hipogonadotropik hipogonadizimli hastalarda oldukça zordur (16,56). Bu da, kortikal zirve kemik kitlesi için pubertenin belirleyici olduğunu göstermektedir. Hipogonadizmin zirve kemik kitlesine ulaşıldıktan sonra ortaya çıktığı durumlarda ise (yaşlı erkeklerde olduğu gibi) kemik döngüsü (turnover) artmakta ve trabeküler yoğunluk azalmaktadır (22,49). Kortikal kemiklerde ne olduğu ise henüz açık değildir.

Vitamin D'nin kemik ve kalsiyum homeostazının potent bir regülatörü olması ve aktif metaboliti olan kalsitriyol'ün oldukça spesifik bir reseptör olan vitamin D reseptörü aracılığı ile etki etmesi, araştırmacıların dikkatini vitamin D reseptör lokusunda (VDR) bulunan allelik varyasyonlar üzerine çekmiş ve bu gendeki polimorfizmin kemik döngüsü ve kemik yoğunluğundaki değişiklikler üzerinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (38,39). Vitamin D reseptör geninin hangi moleküler mekanizmalarla kemik yoğunluğunu regüle ettiği kesin olmamakla birlikte, bu genin 3'-UTR (untranslated region [translasyona uğramayan bölge])'deki allelik farklılıkların mRNA düzeylerini ya da transkripsiyonel regülasyonu değiştirebileceği düşünülmektedir (38,53). Bir diğer olası açıklama ise, vitamin D reseptör genotipi, kalsiyum emilimi ve diyetdeki kalsiyum düzeyi arasında önemli etkileşimlerin olabileceğidir (45). Bu görüşü

destekler şekilde, belirli genotiplere sahip postmenapozal kadınların düşük kalsiyum alımına kalsiyum emilim düzeyini arttırarak adapte olabildikleri gösterilmiştir (12). Teorik olarak, vitamin D reseptör genindeki allelik varyasyon reseptör sayısında, reseptörün kalsitriyolu bağlama yeteneğinde ya da ligand-reseptör kompleksinin DNA'ya bağlanmasında değişikliğe yol açabilir. Bu değişikliklerin her biri kalsitriyolün etkinliğini azaltarak osteoporoza zemin hazırlayabilir (45).

Erkeklerde osteoporozun ve osteoporotik kemik kırıklarının giderek önem kazanması ile birlikte VDR genotipleri ile kemik yoğunluğu arasında kadınlarda gösterilen ilişkinin erkeklerde de bulunup bulunmadığı değişik yaşlardaki sağlıklı ya da osteoporotik erkek gruplar üzerinde araştırılmıştır (15,18,24). Ancak, IHH'li erkeklerde VDR genotipi ile kemik mineral yoğunluğu arasındaki ilişki araştırılmamıştır. Biz bu çalışmamızda IHH'li erkeklerde kemik mineral yoğunluğu (bone mineral density, BMD) ve vitamin D reseptör gen lokusundaki polimorfizm arasındaki ilişkiyi araştırdık.



II. GENEL BİLGİLER

A. VİTAMİN D

1. Vitamin D Homeostazi

Vitamin D kompleks etkilere ve sentez mekanizmasına sahip bir hormon olup kemik ve kalsiyum homeostazi yanında birçok hedef dokuda hücrel diferansiyasyon ve replikasyonunun potent bir regülatörüdür (39). Ciltte, ultraviyole radyasyonun etkisi altında, endojen kaynaklı 7-dehidrokolesterol ve bitkisel kaynaklı ergokalsiferol (ergosterol, vitamin D₂)’den kolekalsiferol (vitamin D₃) sentezi gerçekleşir. Tam biyolojik aktivite için iki ardışık hidroksilasyon gereklidir: Birincisi karaciğerde – 25-hidroksikolekalsiferol – ikincisi de böbrekte olan bu modifikasyonlar neticesi vitamin D’nin en potent biyolojik metaboliti olan 1,25-dihidroksikolekalsiferol (1,25[OH]₂D₃, kalsitriyol) sentezlenmiş olur. Vitamin D’nin esas etkisi intestinal mukozadan kalsiyum (kasiyum bağlayıcı protein sentezini artırarak) ve fosfat emilimini hızlandırmaktır. Ayrıca glomerüler filtrattaki kalsiyum ve fosfatın geri emilimini de kolaylaştırır (51).

Kalsitriyol hem PTH sekresyonu hem de paratiroid hücre proliferasyonunun en önemli regülatörü olup PTH ile birlikte kalsiyum, fosfat ve magnezyum dengesi yanında kemiğin normal mineralizasyonu ve bütünlüğünden sorumludur (35,40).

2. Vitamin D Reseptörü

Vitamin D reseptörü, ligandı olan kalsitriyolün etkisine, hormon-sensitif genlerin ekspresyonunu kontrol ederek aracı olur. Bu reseptör proteinlerin 50-60 kDa’luk intrasellüler polipeptidler olduğu ve kalsitriyolü spesifik olarak bağlayarak çeşitli biyolojik etkilere yol açmak üzere hedef hücrenin nükleusu ile etkileştikleri gösterilmiştir. İnsan vitamin D reseptör cDNA (complementary DNA)’sının nükleotid dizilimi 4605 bp (baz çifti, base pair) uzunluğunda olup klonlanmış reseptör molekülü steroid ve tiroid hormon reseptörlerince tanımlanan transkripsiyonel regülatör faktörler süperfamilyasına aittir. Dokuz ekzona sahip cDNA molekülünün 5’-UTR bölgesinde 115 bp, 3’-UTR bölgesinde ise 3209 bp bulunmaktadır ve vitamin D reseptör gen lokusu (VDR) 12q14’te yerleşmiştir (1).

DNA’ya bağlanan kısmı (domain) sistein, lizin ve arjinin’den oldukça zengin olan ve tiroid hormon reseptörüne daha fazla benzeyen bu reseptörler hipofiz, pankreas, paratiroidler, gonadlar ve plasentada da bulunmaktadır (1,26). Bunların hangi mekanizmalar ile gen ekspresyonunun regülasyonuna aracılık ettikleri ise bir çok araştırmaya konu olmuştur. Örneğin, ligand-reseptör kompleksi DNA üzerindeki spesifik bölgelere (vitamin D response elements) bağlanarak PTH gen

ekspresyonunu inhibe eder (13). Bu noktadan hareketle reseptör disfonksiyonun hem primer hem de sekonder hiperparatiroidizm patogeneğinde rol aldığı ileri sürülmüştür. Benzer şekilde, reseptörü kodlayan gendeki mutasyonlar vitamin D'ye rezistan raşitizme yol açmaktadır. Vitamin D reseptörü osteokalsin (kemikte en fazla bulunan non-kollajen protein) geninin en potent regülatörü olup bu genin promoter'ında (mRNA'nın bağlandığı bölge) yer alan spesifik response elementler ile etkileşerek geni aktive ettiği, dolayısı ile kalsitriyolün osteokalsin sentezini indüklediği gösterilmiştir (39).

B. ERKEK HİPOGONADİZMİ

Erkek hipogonadizmi testis tarafından yapılan testosteron sentezinin ve spermatozoa üretiminin ya da her ikisinin yetersizliği olarak tanımlanır. Başlıca primer ve sekonder olarakkiye ayrılır. Testiküler yetmezlik primer hipogonadizm (hipergonadotropik hipogonadizm) olarak adlandırılırken, hipotalamik ya da hipofizer yetmezlik ise sekonder hipogonadizm (hipogonadotropik hipogonadizm) olarak adlandırılır.

Primer hipogonadizmde, Leydig hücrelerinden testosteron üretimi, seminifer tubuluslardan sperm üretimi ya da her ikisini birden etkileyen testiküler bir defekt vardır. Azalmış testosteron düzeyi ve sperm üretimi primer hipogonadizmi akla getirir ve yüksek gonadotropin düzeyleri tanıyı kuvvetlendirir. Sekonder hipogonadizmde ise hipotalamusta (sıklıkla) veya hipofizde bir patoloji vardır ve her iki durumda da gonadotropinlerin yetersiz salınımı söz konusudur. Testosteron düzeyi ve sperm üretimi azalmış olmakla birlikte gonadotropin düzeyleri de düşüktür. Primer ve sekonder hipogonadizm arasındaki en belirgin fark gonadotropinler veya GnRH replasmanı ile sekonder hipogonadizmde spermatogenezin sıklıkla sağlanabilmesidir. Erkek hipogonadizminin etiyolojik sınıflandırması aşağıda gösterilmiştir (43,54).

1. Primer hipogonadizm

- a) Klinefelter sendromu (47 XXY, seminifer tubuli disgenezi)
- b) Diğer kromozomal anomaliler (XX erkek, XY/XXY ve XX/XXY mozaizizm, XXXY, XXXXY, XXYY, XYY)
- c) Bilateral anorşi
- d) Noonan sendromu
- e) Kriptorşidizm (inmemiş testis)
- f) Erişkin leydig hücre yetersizliği (travma, enfeksiyon, ilaçlar ve radyasyon)

2. Sekonder hipogonadizm

- a) Panhipopituitarizm
- b) İzole LH yetersizliği (fertil önük sendromu)
- c) LH ve FSH yetersizliği
 - Prader-Willi sendromu
 - Laurant-Moon-Biedl sendromu
 - Serebellar ataksi
 - Biyolojik inaktif LH
- d) LH ve/veya FSH rezistansı
- e) GnRH eksikliği
 - Kallmann sendromu
 - İdyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH)

3. Androjen rezistansı

- a) Komplet androjen rezistansı (testiküler feminizasyon)
- b) İnkomplet androjen rezistansı
 - Tip I : Reifenstein sendromu
 - Tip II : 5-alfa-redüktaz eksikliği

4. Kombine hipogonadizm

- a) Yaşlılık
- b) Siroz
- c) Orak hücreli anemi

C. ERKEKTE OSTEOPOROZ

Her ne kadar osteoporozun bir kadın hastalığı olduğu inancı yaygın olsa da, osteoporoz epidemiyolojisi ile ilgili ilk çalışmalarda, kadınlarda görülen klasik olarak yaşa bağlı kırık artışının erkekler için de söz konusu olduğu dikkati çekmektedir. Ancak, erkekte osteoporoz probleminin önemli bir halk sağlığı problemi olduğu henüz 1990'lı yıllarda fark edilmiştir (41).

Erkeklerde de, kadınlarda olduğu gibi, kemik kitlesinde adolesan dönemde dramatik bir artış meydana gelir. Ancak pubertenin kronolojik başlangıcı kızlardan daha geç olduğundan zirve kemik kitlesine erişim daha sonra tamamlanır. Cinsiyetin erişkin kemik kitlesi üzerindeki en belirgin etkisi kemik yoğunluğundan daha çok kemik boyutlarındadır. Örneğin, radyal genişlik ve kortikal kalınlık erkeklerde belirgin olarak fazladır; aynı durum vertebraların kesit alanı için de söz

konusudur (2,21). Sonuçta, total vücut kemik mineral miktarı erkeklerde daha fazla olmakla birlikte (genç erkeklerde 3100-3500g, genç kadınlarda 2300-2700g) maksimum mineral yoğunluğu sanıldığı gibi erkeklerde fazla olmayıp aslında bunun kullanılan ölçüm metodlardan kaynaklanan bir artefakt olduğu kabul edilmektedir (41).

Erkeklerde zirve kemik kitlesine erişim kadınlarda olduğu gibi genetik faktörlerin etkisi altındadır ve kalıtımın rolünün %40 ila 83 arasında değiştiği (iskeletin farklı bölgelerinde) tahmin edilmektedir (34). Ancak, yaşlanma ile birlikte olan kayıp kalıttan bağımsızdır.

Erkek osteoporozu oldukça heterojen bir kavram olup değişik etiyoloji ve klinik prezentasyonları kapsar. Erkeklerde düşük kemik kitlesi ile birlikte olan durumların başlıcaları aşağıda gösterilmiş olup en önemlileri glukokortikoid fazlalığı, hipogonadizm, alkolizm, gastrektomi ve diğer gastrointestinal bozukluklar ve hiperkalsiüridir (41).

I. Primer

- Senil
- İdiyopatik

II. Sekonder

- Hipogonadizm
- Glukokortikoid fazlalığı
- Alkolizm
- Gastrointestinal bozukluklar
- Hiperkalsiüri
- Sigara alışkanlığı
- Antikonvülzanlar
- Tirotoksikoz
- İmmobilizasyon
- Osteogenesis imperfekta
- Homosistinüri
- Sistemik mastositozis
- Neoplastik hastalıklar
- Romatoid artrit

1. Hipogonadizme bağı osteoporoz

Kemik metabolizmasının regülasyonunda seks steroidlerinin rolü oldukça önemlidir. Menapozun osteoporoz konusundaki öneminin dikkatleri östrojenin rolü üzerine çekmesinden sonra androjenlerin kemik yeniden yapılanması (remodeling) üzerindeki hücresel etkilerine ait bilgiler osteoblastik hücrelerde fizyolojik olarak anlamlı konsantrasyonda androjen reseptörünün gösterilmesi ile artmaya başlamıştır (9,31). Androjenler proliferasyon, büyüme faktörü ve sitokin salınımı, ayrıca kemik matrix proteini (kollajen, osteokalsin, osteopontin) üretimi gibi bazı osteoblastik fonksiyonları etkilemektedir (30). Kemik rezorpsiyonu üzerinde östrojenlerin inhibe edici etkileri daha iyi bilinmekle beraber, kemik iliği stromal hücrelerinde ve osteoklast benzeri multi-nükleer hücrelerde androjen reseptörlerinin bulunduğu gösterilmesi androjenlerin kemik rezorpsiyonunu direkt olarak inhibe edebileceğini düşündürmektedir (52).

Osteoblast benzeri hücrelerin androjenleri östrojenlere aromatize edebilmeleri, ayrıca insan osteoblastlarında 5-alfa-redüktaz aktivitesinin saptanması, androjenlerin kemik homeostazını hem androjen reseptörleri (testosteron veya 5-alfa-dihidrotestosteron) hem de östrojen reseptörleri aracılığı ile etkileyebileceğine işaret etmektedir (50,52).

Erkeklerde hem prepubertal hem de postpubertal hipogonadizmin osteoporoz için bağımsız bir risk faktörü olduğu kabul edilmekle birlikte, artmış osteoporoz riski ile ilişkili olan bir eşik serbest testosteron düzeyinin bulunup bulunmadığı tartışmalıdır (41,52). Ayrıca, erişkin ögonad erkeklerde serum testosteron konsantrasyonları kemik yoğunluğu ile korelasyon göstermemektedir. Her ne kadar yaşlı erkeklerde serbest testosteron düzeyleri ile kemik dansitesi arasında zayıf bir korelasyon bulunmuşsa da bu durum diğer çalışmalarda doğrulanmamıştır (52). Ancak, vertebral kırık ve osteoporoz nedeniyle incelenen erişkin erkeklerin %5 ila 33'ünde hipogonadizmin bulunması, yaşlı erkeklerde kalça kırıklarına hipogonadizm varlığında belirgin olarak daha sık rastlanması, androjenlerin kemik kitlesinin idamesinde gerekli olduğunu göstermektedir (41). Yaşlı erkeklerde hipogonadizme daha sık rastlanmakla birlikte, ki bunların çoğunda androjen eksikliği hafif düzeydedir, düşük fiziksel aktivite ve vücut kitlesinde azalma gibi sık eşlik eden faktörler de bulunduğundan, osteoporoz ve artmış osteoporotik kırık riskini sadece hipogonadizme bağlamak mümkün görünmemektedir (52).

Adolesans ile beraber hem trabeküler hem de kortikal kemikteki artış her iki cinsten gonadal olgunlaşma ile yakını ilişkilidir. Pubertal erkek çocuklarda androjen sekresyonunda meydana gelen artış hem epifiz alanlarında trabeküler kemik oluşumunu artırır hem de periosteal ve endosteal büyüme yoluyla kortikal kalınlığın artmasını teşvik eder (41). İskelet gelişim hızı

üzerinde adrenarjin bir etkisi olup olmadığı ise bilinmemektedir. Anormal bir puberte geçirmiş erkeklerde (Klinefelter sendromu, IHH, Kallmann sendromu gibi) düşük kemik dansitesi söz konusudur (17,23,27). Bu grup hastalarda primer anormallik pubertal dönemde zirve kemik kitlesine erişmedeki yetersizliktir (17). Konstitüsyonel gecikmiş pubertenin dahi kemik dansitesinde kalıcı azalmalar ile birlikte olması optimal zirve kemik kitlesi için zamanlaması uygun androjen sekresyonunun ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (41).

2. Tedavi

Hipogonad adolesanlarda gonadal fonksiyonları restore etmek amacıyla uygulanan tedavilerin kemik yoğunluğu üzerindeki etkinliği kesin olarak bilinmemektedir. Yaş ve hipogonadizmin ortaya çıkışından itibaren geçen süre gibi faktörlerin de ne gibi rolü olduğu kesinlik kazanmamıştır (41). Kritik pubertal dönem geçtikten sonra uygulanan androjen replasmanının sadece Klinefelter sendrom'lu hastalarda değil, hipogonadotropik hipogonadizimli hastalarda da azalmış kortikal kemik dansitesini düzeltmede beklenen sonuçları vermediği gösterilmiştir (16,52,56). 16 yıl süre ile konvansiyonel ya da transdermal testosteron replasman tedavisi uygulanan relatif olarak geniş bir hipogonad hasta grubunda yapılan bir çalışmada, önceden tedavi görmemiş düşük kemik dansiteli hastalarda, kemik dansitesindeki en fazla artışın tedavinin ilk yılında gerçekleştiği; ayrıca, uzun dönem tedavi ile kemik dansitesinin normal sınırlara çıkartılabileceği ve transdermal yolun enjeksiyon kadar etkili olduğu bildirilmiştir (3). Bir grup IHH'li hastada yapılan diğer bir çalışmada ise testosteron düzeyleri tedavi ile normal sınırlara çıkartılan hastalarda kemik turnover'ını ve kemik dansitesini normale getirebilmek için hCG dozunun artırılması gerektiği vurgulanmıştır(25).

Adolesan veya erişkin yaşa ulaşmış hipogonad erkeklerde hipogonadizme bağlı kemik hastalığını tedavi etmeye yönelik diğer yöntemler (egzersiz, kalsiyum alımını artırma, bifosfonatlar, kalsitonin, florid gibi) konusunda ise henüz yeterli bilgi yoktur (41).

D. Restriksiyon Fragmanı Boyunca Olan Polimorfizm (RFLP) Analizi

1960'lı yıllarda DNA'yı belirli nükleotid sekanslarında kesebilen enzimlerin keşfi gen teknolojisinin ilerlemesinde bir dönüm noktası olmuş ve bu buluş 1978 yılında Cenevre Üniversitesi'nden biyokimyacı Werner Arber ve arkadaşlarına Nobel ödülü kazandırmıştır. "Restriksiyon endonükleazlar" ya da "restriksiyon enzimleri" adı verilen bu enzimler bakterilerde yaygın olarak mevcuttur ve virus DNA'larını adeta bir makas gibi keserek hücrenin kendi genomunu virustan korurlar. Bugüne kadar farklı bakteri türlerinden yüzlerce değişik

restriksiyon enzimi izole edilmiştir ve bunların herbiri kendisine özgü hedef sekansı (genellikle 4-7 bazlık palindromik bir sekanstır) tanıyarak o noktadan veya hemen yakınından DNA'yı keser. Yakın zamana kadar farklı canlılara ait genomların restriksiyon haritalarının çıkarılmasında kullanılan bu enzimlerin günümüzde esas kullanım alanı rekombinant DNA teknolojisi olup bazı kalıtsal hastalıkların teşhisinde de yararlanılmaktadır (36).

Farklı bireylerden elde edilen DNA'lar üzerinde yapılan analizler dikkat çekici herhangi bir fenotipik etkiye neden olmayan çok miktarda sekans (nükleotid dizilimi) farklılığı bulunduğunu göstermiştir. İşte böyle sessiz bir değişikliğin herhangi bir populasyonda sık görülmesine "polimorfizm" adı verilir. Fenotipe yansımamaları, bu farklılıkların çoğu zaman genler arasında, intronlar (ekspresse olmayan sekanslar) arasında, intronlar içinde ya da tekrarlayıcı sekanslar içinde yer almaları, hatta kod dejenerasyonu (aynı amino asidin birden fazla kod ile transkribe olabilmesi) ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Genomun herhangi bir bölgesinin restriksiyon haritasında farklılığa yol açan bu sekans değişikliğine "restriksiyon fragmanı boyunca olan polimorfizm (RFLP) adı verilir ve bunlar gerçek allelik varyasyonlardır. Aslında iki birey arasındaki polimorfizmin derecesi etnik kökenlere dayanmaktadır. Buna karşın, aynı toplum içinde dahi, belirli bir geni içine alan restriksiyon bölgesinde varyasyon olması mümkündür (11,36,55).

RFLP analizi, temel olarak, belirli bir DNA segmentini bir veya birden çok kesim enzimi ile muamele ederek ortaya çıkan fragmanların Southern blot yöntemi ile izole edilmesi (hibridizasyon) veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile önceden amplifiye edilmiş bir hedef DNA segmentinin kesim enzimleri ile inkübasyonu neticesi ortaya çıkan değişik uzunluktaki fragmanların jel elektroforez yöntemi ile birbirinden ayrılması prensibine dayanır.

Eğer genetik bir hastalıktan sorumlu olan bir genle yakın bağlantılı bir polimorfizm saptanırsa bu prenatal teşhis amacıyla kullanılabilir. RFLP analizi, kromozomal yerleşimi bilinen fakat sorumlu genin (dolayısı ile kodladığı proteinin) henüz tanımlanamadığı hastalıkların prenatal teşhisinde halen mevcut tek yöntemdir. Örneğin, Huntington hastalığına yol açan otozomal dominant genin 4. kromozomun kısa kolunun uç kısmına lokalize olmuş bir RFLP bölgesi ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Erişkin polikistik böbrek hastalığı da bu gruba örnek verilebilir.

Sorumlu genin bilindiği bazı hastalıklarda da RFLP analizinden prenatal teşhiste yararlanılmaktadır. Örneğin, otozomal resessif bir hastalık olan ve beta-globin genindeki tek bir nükleotidin değişmesi (T yerine A) ile karakterize orak hücreli anemide bu mutasyon MstII restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırır. Amniyotik sıvı örneğinden yapılan RFLP analizi ile bu kesim noktasının kaybolduğunun saptanması teşhis için yeterlidir (36,55).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

HASTALAR

Bu çalışmaya IHH tanısı almış ve daha önce hiç tedavi görmemiş 27 erkek hasta (ortalama yaş 21.48 ± 2.22 yıl) alındı. Hastalara yaş ve vücut kitle indeksi (BMI, kg/m^2) olarak uyumlu 25 sağlıklı erkek (ortalama yaş 21.56 ± 1.78 yıl) ise kontrol grubuna alındı. Kontrol grubundakilerin hepsinde spontan puberte oluşmuştu; klinik görünüşleri, fizik muayene bulguları ve hormon profilleri normal sınırlarda olup hiç birinde osteopeni ya da osteoporozu düşündürecek radyolojik bulgu yoktu.

IHH tanısı şu kriterlere göre konuldu: 1) Kronolojik olarak 18 yaşın üzerinde olması, 2) Hipogonadizmin klinik belirti ve bulgularının varlığı, 3) Serbest testosteron düzeylerinin düşük olması, 4) LH ve FSH düzeylerinin normal veya normalin altında olması, 5) GnRH stimülasyon testinde gonadotropin düzeylerinde beklenen cevabın olması, 6) Kompüterize tomografi ya da manyetik rezonans görüntüleme ile hipotalamus ve hipofizde radyolojik bulguların normal olması, ve 7) Anozmi ya da hipozmi anamnezinin bulunmaması.

Çalışmaya katılan bütün bireylere araştırmanın amacı ve yapılacak işlemler hakkında ayrıntılı bilgi verilerek gönüllü olarak katıldıklarına dair imzalı onay alındı. Kronik hastalığı olanlar, son altı ay içinde herhangi bir ilaç, vitamin veya kalsiyum preparatı alanlar çalışma dışına çıkarıldı.

DNA ANALİZİ

Genomik DNA periferik lökositlerden Yen ve ark. tarafından daha önce tarif edilen yöntemde şu modifikasyonlar yapılarak hazırlandı (57). 200 μL tam kan örneği, iki kez 500 μL TE tampon (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0) ile 13000 rpm'de bir dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant atıldıktan sonra yıkanmış lökositler 400 μL eritici tampon (TE tampon içinde 100 $\mu\text{g/mL}$ proteinaz K, % 1'lik sodyum dedosil sülfat ve 0.1 M NaCl bulunan) ile karıştırıldı ve 56 $^{\circ}\text{C}$ 'de bir saat süreyle inkübe edildi. Karışım daha sonra 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrılıp buna 1:1'lik fenol/kloroform karışımı ilave edildi. 2500 rpm'de 2 dk tekrar santrifüj edilip sıvı faz toplandıktan sonra üzerine 800 μL %100 soğuk etanol eklendi. Açığa çıkan kromatin yumağı 500 μL %70'lik etanol ile yıkandı. İzole edilen DNA 100 μL steril distile su içinde çözüldü.

Vitamin D reseptör gen lokusundaki (VDR) üç RFLP'nin genotipi, PCR amplifikasyonunu takiben ürünlerin BsmI, ApaI ve TaqI enzimlerince kesilmesi ile belirlendi. Genin 7. ekzonu ile 3'-UTR'si arasında yer alan kesim noktaları BsmI, ApaI ve TaqI için sırasıyla intron 8, intron 9 ve ekzon 9'da (ATT yerine ATC, izolösin için sinonim kod değişikliği) bulunmakta idi (C,J). BsmI bölgesi için kullanılan forward primer 5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3', reverse primer ise 5'-AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3' idi. ApaI ve TaqI bölgeleri için kullanılan forward primer BsmI için kullanılan ile aynı olup reverse primer ise 5'-CACTTCCGAGCACAAGGGGCGTTA-3' idi (C,R).

PCR amplifikasyonu şu şekilde yapıldı: 1 µg DNA, içinde 10 µL 10X tampon, 2.5 ünite Taq polimeraz, 1.5 mM MgCl₂, 200 mM dNTP ve F- ve R-primerden 100'er pmol bulunan reaksiyon karışımına ilave edildi. Thermal cycler (MJ Laboratories Inc., USA) için PCR protokolü; 94 °C'de 45 sn denatürasyon, 65 °C'de 45 sn annealing (hibridizasyon) ve 72 °C'de 90 sn polimerizasyon (35 cycle) idi. Daha sonra 2000 ve 825 bp'lik PCR ürünleri kesim enzimleri ile inkübe edilerek kesilen DNA fragmanları %2' lik agaroz jel içinde elektroforez ile ayrıldı.

BsmI, ApaI ve TaqI için karşılık gelen genotipler sırasıyla B, A, T (restriksiyon bölgesi yok) veya b, a, t (restriksiyon bölgesi var) şeklinde gösterildi (38) [BsmI ve ApaI enzimleri hedef sekansta değişiklik varsa keserken TaqI enzimi değişiklik yoksa kesmemektedir. Buna göre, BsmI ve ApaI için normal bireyler sırasıyla BB ve AA, homozigot mutantlar ise bb ve aa şeklinde; TaqI için normal birey tt, homozigot mutant ise TT şeklinde gösterilmiştir].

HORMON ÖLÇÜMLERİ

Serum FSH, LH ve serbest testosteron düzeyleri Nükleer Tıp A.D. RIA laboratuvarında kemilüminesans yöntemi ile ölçüldü. Ölçümler için FSH ve LH (Chiron/Diagnostics, Halstead, Essex, C09 2DX, UK) ve serbest testosteron (Diagnostic Systems Laboratories Inc. Webster, TX, USA) kitleri kullanıldı. Hormonların normal değerleri; FSH için <15 mIU/mL, LH için <15 mIU/mL, serbest testosteron için ise 8-55 pg/mL idi.

KEMİK MİNERAL DENSİTESİ (BMD) ÖLÇÜMÜ

Kemik mineral dansitesi (g/cm²) DEXA (dual energy X-ray absorptiometry) yöntemi ile L2-L4 arasında ölçüldü. BMD ölçümü için Norland XR 36-WBL (Norland Inc., USA) cihazı kullanıldı. BMD düzeyleri t-skoru (genç normal erkeklerdeki ortalamanın üzerinde ve altındaki

standart sapma ünitesinin sayısı) olarak da belirtildi. T-skoru ≤ -2.5 osteoporotik, -2.5 ila -1 arası osteopenik, >-1 ise normal olarak kabul edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm sonuçlar ortalama (mean) $\pm$ standart sapma (standart deviation, SD) olarak verildi. Genotip alt grupları gibi birden fazla grubun değerlerinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi, anlamlı fark edilen durumlarda ise post-hoc değerlendirmeler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Allel sıklığı gibi isimsel değerlerin görülme sıklıklarının gruplar arasında karşılaştırılması için çok gözlü ki-kare testinden yararlanıldı. Genotip ile BMD arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile araştırıldı. İstatistiksel hesaplamalar paket istatistik yazılımı (SPSS 7.5, SPSS Inc., USA) kullanılarak yapıldı ve $p<0.05$ anlamlı kabul edildi.



IV. BULGULAR

BsmI, ApaI ve TaqI için karşılık gelen genotipler sırasıyla B, A, T (restriksiyon bölgesi yok) veya b, a, t (restriksiyon bölgesi var) şeklinde gösterildi. BsmI ve ApaI hedef sekansta değişiklik varsa keserken TaqI değişiklik yoksa kesmektedir. Buna göre BsmI ve ApaI için BB ve AA genotipleri normal, bb ve aa genotipleri homozigot, Bb ve Aa genotipleri ise heterozigot bireyleri göstermektedir. TaqI için karşılık gelen genotipler ise sırasıyla tt, TT ve Tt şeklinde gösterilmiştir.

Hipogonad olguların laboratuvar bulguları ve genotipleri Tablo I'de verilmiştir. Ortalama değerleri BMI için $21.74 \pm 3.33 \text{ kg/m}^2$, serbest testosteron (ST) için $2.67 \pm 1.58 \text{ pg/mL}$, FSH için $0.72 \pm 0.26 \text{ mIU/mL}$, LH için $1.18 \pm 0.98 \text{ mIU/mL}$, t-skoru için -3.45 ± 1.68 , BMD için $0.77 \pm 0.14 \text{ g/cm}^2$ idi. T-skoruna göre, 4 hasta (%14.8) normal, 3 hasta (%11.1) osteopenik, 20 hasta (%74.1) ise osteoporotik idi.

TABLE 1: HIPOG ... OLGULARIN LABORATUVAR BULGULARI VE GENOTIPLERI

Sıra	Yaş (yıl)	BMI (kg/m ²)	Serbest Testosteron (pg/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	L2 - L4 t-skor	BMD (g/cm ²)	Apa I	Bsm I	Taq I	Haplotip
1	20	17,7	1,6	0,3	0,2	-5,12	0,61	AA	BB	tt	BAT
2	24	23,3	4,2	2,3	3,6	-3,92	0,742	aa	bb	TT	baT
3	20	22,7	3,9	1,9	1,3	-4,58	0,692	AA	bb	TT	bAT
4	23	19,1	2,8	0,8	1,4	-5,68	0,59	AA	BB	tt	BAT
5	22	23,4	1,6	0,3	0,2	-0,52	1,053	aa	bb	TT	baT
6	21	16,1	1,7	1	0,1	-3,67	0,77	AA	BB	tt	BAT
7	20	17,7	6,4	8,6	4,8	-3,9	0,749	aa	bb	TT	baT
8	21	22,9	1,9	2,8	1,8	-5,29	0,624	Aa	bb	tt	bAT/bat
9	20	18,7	0,3	0,3	0,1	-5,73	0,584	Aa	Bb	Tt	bAT/bat
10	21	20,1	0,4	0,3	0,1	-4,61	0,685	AA	Bb	Tt	BAT/bAT
11	21	23,1	2,2	0,3	0,1	-0,97	1,012	AA	BB	tt	Bat
12	29	23,2	2,1	0,5	0,7	-2,79	0,849	aa	bb	TT	baT
13	23	29,7	3,2	0,7	1	-2,33	0,87	Aa	Bb	Tt	bAT/bat
14	20	25,9	2	0,3	0,2	-3,8	0,758	Aa	bb	tt	bAT/bat
15	21	23,9	2,4	0,3	0,1	-2,84	0,845	Aa	bb	TT	bAT/bAT
16	21	17,3	1,1	0,3	0,1	-6,63	0,504	AA	BB	tt	Bat
17	24	26,2	3,2	0,9	0,7	-3,26	0,742	AA	BB	TT	BAT
18	21	19,4	1,7	0,7	0,1	-4,18	0,712	Aa	bb	TT	bAT/bAT
19	20	20,3	2,2	0,3	0,4	-3,96	0,728	Aa	bb	TT	bAT/bAT
20	20	22,5	0,7	0,3	0,2	-2,96	0,812	Aa	Bb	Tt	bAT/bat
21	24	20,1	1,9	0,5	0,6	-3,81	0,755	AA	BB	tt	Bat
22	21	15,4	1,6	2,1	0,7	-4,02	0,684	AA	Bb	Tt	BAT/bAT
23	20	24,2	3	2,7	2,8	-4,24	0,718	AA	BB	tt	Bat
24	20	23,2	2,1	5,8	3,7	-0,97	1,013	Aa	Bb	Tt	bAT/bat
25	20	23,9	3,9	0,9	1,5	0,25	1,122	Aa	bb	TT	bAT/bAT
26	25	23,6	1	1,9	0,2	-1,78	0,834	Aa	Bb	Tt	BAT/bat
27	18	23,4	4	0,4	5,2	-1,88	0,816	Aa	Bb	Tt	bAT/bat
	21.48±2.22	21.74±3.33	2.67±1.58	0.72±0.26	1.18±0.98	-3.45±1.68	0.77±0.14				

Kontrol grubunun laboratuvar bulguları ve genotipleri ise Tablo II’de verilmiştir. Ortanca değerleri BMI için $22.37 \pm 1.44 \text{ kg/m}^2$, ST için $23.94 \pm 6.22 \text{ pg/mL}$, FSH için $2.44 \pm 1.15 \text{ mIU/mL}$, LH için 2.40 ± 0.95 idi.

TABLO II: KONTROL GRUBUNUN LABORATUAR BULGULARI VE GENOTİPLERİ

Sıra	Yaş (yıl)	BMI (kg/m ²)	ST (pg/mL)	FSH (mIU/mL)	LH (mIU/mL)	Apa I	Bsm I	Taq I
1	19	18.8	14.8	0.6	0.4	aa	bb	TT
2	20	22.4	25.5	1.2	0.8	Aa	bb	TT
3	23	23.5	17.9	3.6	2.7	AA	Bb	Tt
4	21	19.1	12.1	0.8	3.8	Aa	Bb	Tt
5	23	22.9	36.3	2.3	3.3	Aa	Bb	Tt
6	22	23.1	15.8	1.7	0.7	AA	Bb	Tt
7	21	22.4	31.4	6.7	0.3	AA	BB	tt
8	21	23.2	29.7	3.1	2.1	AA	BB	tt
9	23	22	45.6	3.3	0.5	Aa	bb	TT
10	23	22.8	17.2	1.2	3.3	aa	bb	TT
11	20	24.1	38.2	3.7	4.1	Aa	bb	TT
12	22	23.8	25	2.5	1.2	Aa	bb	TT
13	20	23.9	17.4	0.6	2.3	Aa	bb	TT
14	20	22.3	15.4	5.1	2.7	Aa	Bb	Tt
15	21	20.9	25.6	4.1	2.3	AA	BB	tt
16	22	21.9	31.1	2.8	2.8	AA	Bb	Tt
17	19	21.5	41.3	3.4	3.9	AA	BB	tt
18	23	24.5	28.4	1.8	3.9	Aa	Bb	Tt
19	23	23.5	23.3	1.4	4.5	AA	BB	tt
20	20	23.9	21.7	1.2	2.1	Aa	Bb	Tt
21	20	23.4	16.4	2.1	2.0	Aa	bb	tt
22	21	22.8	13.9	2.3	3.7	AA	Bb	Tt
23	20	20.5	17	1.2	1.9	Aa	Bb	Tt
24	21	20.9	19.2	3.2	2.0	Aa	bb	TT
25	21	21.2	18.3	1.1	2.9	AA	BB	tt
	21.56±1.78	22.37±1.44	23.94±6.22	2.44±1.15	2.40±0.95			

Hipogonad grubunda genotip dağılımı ve ortalama BMD değerleri Tablo III’te gösterilmiştir. ApaI polimorfizmine göre frekansı en yüksek genotip Aa (hipogonadlar için %44.4, kontrol grubu için %52), frekansı en düşük genotip ise aa (sırasıyla %14.8 ve %8) idi. BsmI polimorfizmine göre hipogonad grubunda frekansı en yüksek genotip bb (%40.7), kontrol grubunda ise Bb (%40) idi. Frekansı en düşük genotipler ise hipogonad grubunda BB (%29.6) ve Bb (%29.6), kontrol grubunda ise BB (%24) idi. TaqI polimorfizmine göre hipogonad grubunda frekansı en yüksek genotip TT (%37), kontrol grubunda ise Tt (%40) idi. Frekansı en düşük genotipler ise sırasıyla Tt (%29.6) ve tt (%28) idi. Hasta ve kontrol grubu arasında VDR genotiplerinin sıklıkları yönünden bir fark saptanmadı (ApaI, BsmI ve TaqI için χ^2 ve p değerleri sırasıyla $\chi^2=0.678$, $p>0.05$; $\chi^2=0.632$, $p>0.05$ ve $\chi^2=0.618$, $p>0.05$).

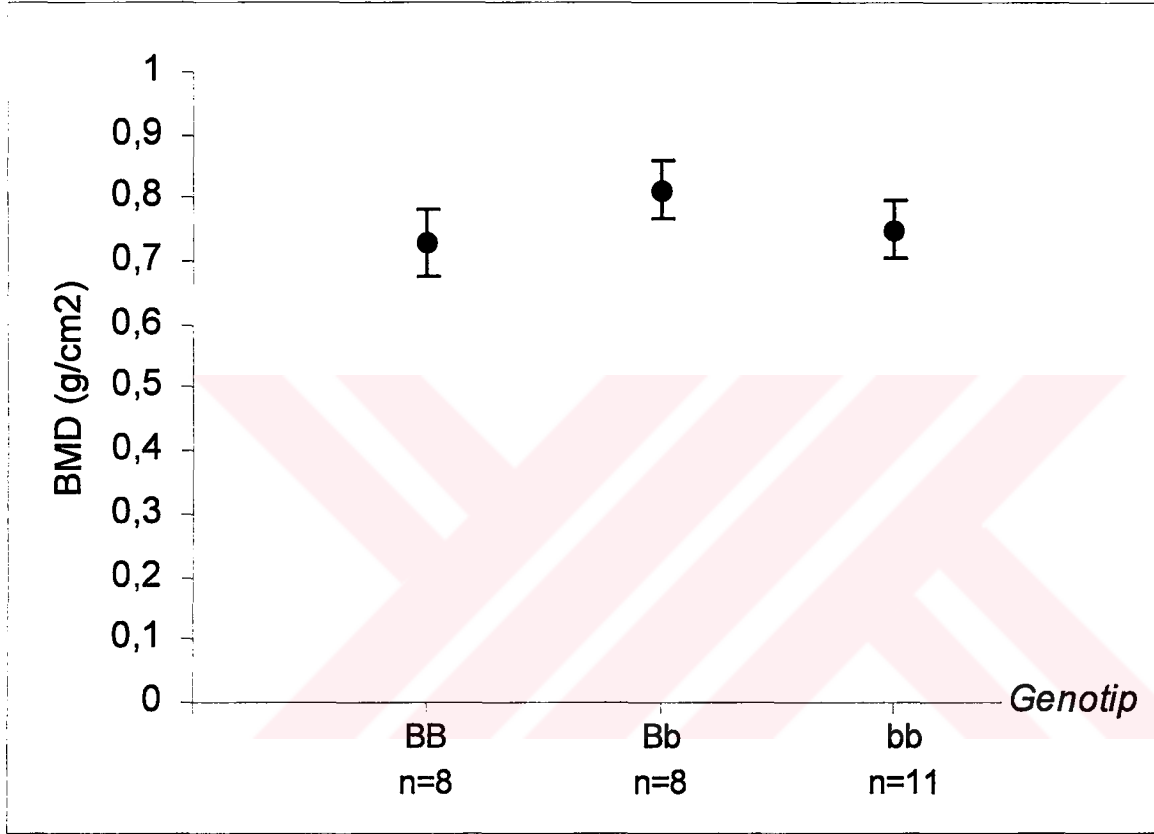
TABLO III: HIPOGONAD GRUBUNDA GENOTİP DAĞILIMI VE ORTALAMA BMD

Restriksiyon Endonükleaz	Genotip	n (%)	BMD (g/cm ²) ortalama±SD
Apa I	AA	11 (40.7)	0.70±0.12
	Aa	12 (44.4)	0.82±0.15
	aa	4 (14.8)	0.81±0.12
Bsm I	BB	8 (29.6)	0.73±0.15
	Bb	8 (29.6)	0.80±0.13
	bb	11 (40.7)	0.78±0.15
Taq I	TT	10 (37.0)	0.77±0.14
	Tt	8 (29.6)	0.82±0.13
	tt	9 (33.3)	0.73±0.14

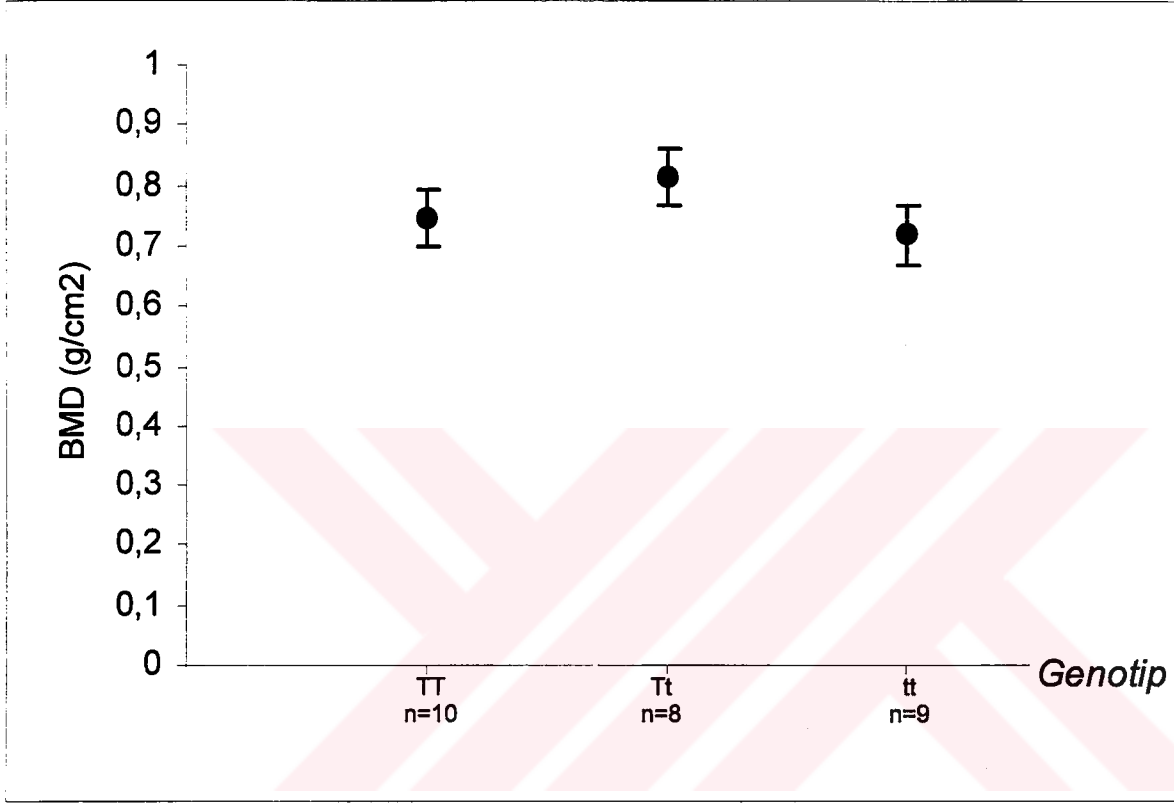
Tablo III'te görüldüğü gibi hasta grubunda ortalama BMD değeri en yüksek genotip Aa, en düşük genotip ise AA idi. Heterozigot hastaların ortalama BMD değerleri ise her üç grupta da en yüksekti.

Her üç polimorfizm için de homozigot olan hastalardan (BBAAtt ve bbaaTT) elde edilen haplotiplerin-üç genotipin birlikte ifade edilmesi- (BAAt ve baT) sıklığı sırasıyla %11.1 ve %14.8 idi. Bu haplotiplere sahip hastaların ortalama BMD değerleri arasında ise anlamlı fark yoktu ($0.65\pm0.04\text{g/cm}^2$ ve $0.84\pm0.08\text{g/cm}^2$, $p>0.05$).

Hasta grubunda genotip ile BMD arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile araştırıldığında, BsmI ve TaqI polimorfizmi için bir ilişki bulunamadı (sırasıyla $p>0.05$, $R^2=0.068$ ve $p>0.05$, $R^2=0.116$) [Şekil 1 ve 2].



Şekil 1: BsmI Polimorfizmi ve BMD İlişkisi

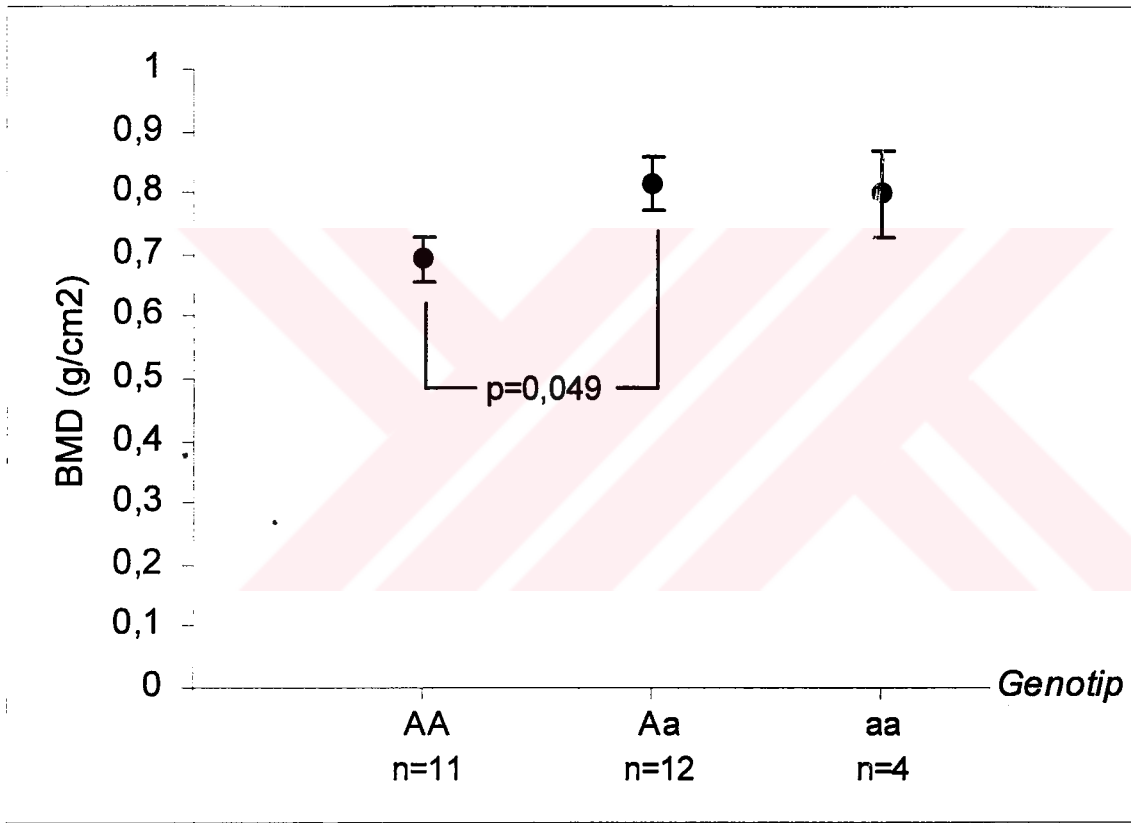


Şekil 2: TaqI Polimorfizmi ve BMD İlişkisi

ApaI polimorfizmi ile BMD arasında ise anlamlı bir ilişki olduğu saptandı ($p=0.049$, $R^2=0.146$) ve aşağıdaki formülle gösterildi:

$$\text{BMD}=0.07946\text{genotip} + 0.635$$

ApaI polimorfizmi için genotipler ile BMD arasında bir ilişki bulunmasından hareketle bu ilişkiyi oluşturmada en etkin genotipin hangisi olduğunu belirlemek için genotip subgruplarının ortalama BMD değerleri karşılaştırıldığında Kruskal-Wallis testi bir fark göstermediği ($\chi^2=5.517$, $p>0.05$) halde AA ve Aa genotipleri arasında Mann-Whitney U testi ile anlamlı bir fark bulundu ($z=-1.969$, $p=0.049$) [Şekil 3].



Şekil 3: ApaI Polimorfizmi ve BMD İlişkisi

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

Herhangi bir yaştaki kemik kitlesi, dolayısı ile kırık riski, zirve kemik kitlesi, kemik kaybının başladığı yaş ve bu kaybın hızına bağlıdır. Bu nedenle, osteoporoz konusundaki araştırmalar sadece başarılı tedavi yaklaşımlarının belirlenmesini değil, osteoporozun önlenmesine yönelik olarak, kemik dansitesi üzerinde belirleyici olan faktörlerin tanımlanmasını da amaçlamaktadır. Kalıtımın, her iki cinste de, kemik dansitesindeki farklılığın yaklaşık % 70'inden sorumlu olduğu gözönünde bulundurulduğunda, düşük kemik dansitesine zemin hazırlayabilecek gen ya da genlerin tanımlanması önleyici tedbirlerin çok önemli olabileceği dönemlerde (zirve kemik kitlesinin kazanıldığı adolesan dönem gibi) riskli bireylerin saptanmasını kolaylaştıracaktır.

Osteoporozun genetik nedenleri üzerinde yapılan araştırmalar kemik homeostazında önemli rol oynayan kalsitriyolün etkisine aracılık eden ve birçok dokuda varlığı gösterilen spesifik reseptörü üzerinde yoğunlaşmış ve dikkatleri bu reseptörü kodlayan gendeki polimorfizme yöneltmiştir (47). Hormonal sinyalleri birçok gen aracılığı ile amplifiye eden steroid hormon reseptörlerinin ekspresyon ya da fonksiyonundaki küçük farklılıklar hedef genlerin regülasyonunda büyük değişikliklere yol açabilir. Dolayısı ile vitamin D reseptörü, kemik ve kalsiyum homeostazı ve kemik yoğunluğunun primer regülatörü olmaya oldukça iyi bir adaydır.

Morrison ve ark. vitamin D reseptör genindeki doğal allelik polimorfizmin kemik yoğunluğu üzerindeki total genetik etkinin neredeyse %75'inden sorumlu olduğu ve bu lokusun genotiplendirilmesinin osteoporoza yatkınlığı tahmin etmede kullanılabileceğini ileri sürdüler (38). Bu çalışmada, BsmI restriksiyon enzimi ile tanımlanan b allelinin kemik yoğunluğu ile kuvvetli ve pozitif bir korelasyon gösterdiği ve bu allele sahip sağlıklı pre/postmenapozal kadınların kemik yoğunluğunun B alleleline sahip kadınlara göre daha fazla olduğu gösterildi (vertebralarda %8, kalçada %4). Serum kalsitriyol düzeyleri de BB genotiplilerde Bb ve bb genotiplilere göre daha yüksekti. Bu bulgulara ilaveten, ApaI ve TaqI enzimleri de kullanılarak tanımlanan iki homozigot haplotipten (BBAAtT ve bbaaTT genotipli bireyler) BA haplotipinin baT haplotipine göre daha fazla gen transkripsiyonu ya da mRNA stabilitesi ile ilişkili olabileceği ileri sürüldü (38). Bu araştırmacılar daha önce de ApaI, BsmI ve EcoRV enzimleri ile tanımlanan VDR polimorfizminin serum osteokalsin düzeyindeki normal fizyolojik varyasyonu etkileyebileceğini ve BB, AA ve EE grubunda osteokalsin düzeylerinin bb, aa ve ee grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdi (39).

Sainz ve ark. ise, prepubertal ve relatif olarak homojen bir kız çocuğu grubunda aa ve bb genotiplerinin AA ve BB genotiplerine göre daha fazla vertebral ve femoral kemik yoğunluğu ile birlikte olduğunu; ayrıca VDR allelleri ile serum kalsiyum, kalsiyotropik hormonlar ve kemik turnover markerları (osteokalsin, kemik spesifik ALP gibi) arasında bir ilişki olmadığını gösterdiler (46).

Değişik etnik kökenlere ait toplumlarda VDR'deki ApaI, BsmI, TaqI ve EcoRV polimorfizmlerine bakıldığında BsmI allel sıklığının ırksal farklılık gösterdiği bildirilmiştir (28). Sainz ve ark. Meksika kökenli Amerika'lı kızlarda en sık VDR genotipinin Aa (%55) olduğunu bildirmişlerdir (46). Bizim çalışmamızda BsmI, ApaI ve TaqI enzimleri kullanılarak tanımlanan VDR genotiplerinin sıklığı bakımından IHH'li ve sağlıklı genç erişkin erkekler arasında bir fark olmadığı ve her iki grupta da en sık genotipin Aa (sırasıyla %45 ve %52) olduğu gösterildi.

Hustmyer ve ark. ise sağlıklı erişkin kadınlarda VDR polimorfizmi ile farklı anatomik bölgelere ait kemik yoğunlukları arasında bir ilişki olmadığını ileri sürdüler (29). Carling ve ark. primer hiperparatiroidizmli olgularda VDR polimorfizminin paratiroid hücre fonksiyonları ile ilişkili olduğunu ve baT haplotipinin in vitro ortamda PTH salınımını daha az baskılayabildiğini (BaT'ye göre) gösterdiler. Ancak, paratiroid hücreleri içindeki kalsiyum düzeyi ile VDR allelleri arasında bir ilişki saptayamadılar (6).

Howard ve ark. bb genotipli premenapozal kadınlarda kalsitriyol verilmesini takiben PTH düzeylerindeki düşmenin, BB genotiplilere göre, daha fazla olduğunu gösterdiler. Dawson-Hughes ve ark. da VDR allellerinin kadınlarda intestinal kalsiyum emiliminin regülasyonu ile ilişkili olduğunu ve diyetdeki kalsiyum miktarı düşük olduğunda BB genotipli kadınların kalsiyum absorpsiyonunda bb genotiplilere göre daha yetersiz olduklarını ileri sürdülerse de Kinyamu ve ark. bunu destekleyen sonuçlar elde edemediler (12,33).

Verbaek ve ark. ise, daha önceki verilerden farklı olarak, 3'-UTR'deki t alleli stabilitesinin T alleline göre %30 daha az olduğunu ve iki allel arasındaki farkın mRNA stabilitesinden çok transkripsiyonel regülasyondaki bir varyasyona bağlı olabileceğini ileri sürdüler (53).

VDR allelleri ile kemik yoğunluğu arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalardan elde edilen veriler ışığında yapılan bir meta-analiz ise VDR allelleri ile değişik anatomik bölgelerdeki kemik dansitesi arasında zayıf bir ilişki bulunduğunu ve çalışma sonuçları arasındaki farkın çalışılan grupların büyüklüğü ve yaşları, etnik kökenleri ve davranış biçimlerindeki (egzersiz, beslenme alışkanlığı, kalsiyum alımı gibi) farklılığa bağlı olabileceğini gösterdi (10).

Vertebral çökme kırığı saptanan ileri yaştaki ve sağlıklı erişkin erkekler arasında sadece TaqI polimorfizmine bakılarak yapılan bir çalışmada ise TaqI enzimi ile saptanan VDR polimorfizmi ile femoral ve vertebral kemik yoğunluğu arasında herhangi bir ilişki bulunmadığı; fraksiyonel kalsiyum Emilimi bakımından da değişik alleller arasında farklılık olmadığı gösterildi (18). Bu çalışmada tt genotipinin sıklığı en fazla olarak bulunmuş iken aynı etnik kökene sahip kadınlar arasında yapılan bir diğer çalışmada predominant genotipinin TT olduğu bildirilmişti (32).

Bizim çalışmamızda ise IHH'li erkek hastalarda VDR genotipleri ile vertebral kemik yoğunluğu arasındaki ilişkinin sadece ApaI subgrupları arasında anlamlı olduğu gösterildi (AA vs. Aa; $z=-1.969$, $p=0.049$). En yüksek kemik yoğunluğu heterozigotlarda (Bb, Aa veya Tt genotipli), en düşük kemik yoğunluğu ise AA genotipli bireylerde mevcut idi. Bugüne kadar IHH'li erkek hastalarda VDR genotipleri ve BMD arasındaki ilişkiyi araştıran başka bir çalışma bildirilmemiştir.

Ferrari ve ark. sağlıklı genç erkeklerde VDR'deki 3'- ve 5'-polimorfizm (BsmI ve FokI enzimlerini kullanarak), vertebral ve femoral kemik yoğunluğu ile kalsiyum ve fosfat metabolizması arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve kemik yoğunluğunun BsmI ile tanımlanan alleller arasında anlamlı olarak farklılık gösterdiğini ve f allelini taşıyan BB genotipli bireylerde en düşük olduğunu bildirmişlerdi. Ayrıca, BB genotipinde bazal serum PTH düzeylerinin daha yüksek olduğunu ve kalsiyum-fosfordan hem fakir hem de zengin diyetle beslenme sonrası bu durumun değişmediğini; kalsiyum-fosfordan fakir diyetle beslenme sırasında renal inorganik fosfat (P_i) reabsorbsiyon kapasitesinin ve plazma P_i düzeylerinin azaldığını göstermişlerdi (15).

Gunnes ve ark. ise her iki cinsten sağlıklı çocuk ve adolesanlardan oluşan bir grupta BsaMI ile tanımlanan VDR genotipleri ile önkol, kalça ve vertebral kemik yoğunluğu arasında bir ilişki bulunmadığını; ayrıca önkoldaki kemik yoğunluğu kazanımının üç genotipin hiçbirisi ile bağlantılı olmadığını ileri sürdüler (24).

Gennari ve ark. postmenapozal kadınlarda VDR ve ER (östrojen reseptörü) gen polimorfizmi (her iki gen için sırasıyla ApaI, BsmI, TaqI ve PvuII, XbaI enzimleri kullanılarak tanımlanan) ile vertebral ve femoral kemik yoğunluğu arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve VDR genotipleri ile sadece vertebral kemik yoğunluğu arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu; BA_T haplotipinde kemik yoğunluğunun ba_T haplotipine göre %13 daha az olduğunu göstermişlerdir (bu sonuç BA_T haplotipinde mRNA transkripsiyonu ve stabilitesinin daha fazla olduğunu bildiren çalışmadaki sonuçlar ile ters düşmektedir). Ayrıca, osteoporotik olgularda BBAA_{tt} genotipine daha sık,

nonosteoporotiklerde ise bbAaTT ve bbaaTT genotiplerine daha sık rastlandığını belirtmişlerdir (20). ER polimorfizmi ile kemik dansitesi arasında ise anlamlı bir ilişki bildirilmemiştir.

Bizim çalışmamızda ise IHH'li hastalar arasında BA_T ve ba_T haplotiplerinin sıklığı benzer olup (sırasıyla %11.1 ve %14.8) bu haplotiplere sahip bireylerin vertebral BMD değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu.

Dikkati çeken önemli bir nokta ise, ER geninde mutasyona bağlı östrojen insensitivitesi gelişen 28 yaşındaki bir erkek hastada epifizlerde inkomplet kapanma, normal serum androjen konsantrasyonu ve ileri derecede artmış serbest östrojen konsantrasyonu ile birlikte kemik mineral dansitesinde belirgin azalma ve kemik turnover'ında artışın bildirilmiş olmasıdır. Bu da, kemik dokusunda androjenlerin sadece direkt androjen reseptörü üzerinden etki etmesinin yetmediğini, normal kemik homeostazı için androjenlerin aromatisasyonunun gerekli olduğunu düşündürmektedir (52). Ancak, her iki cinste de VDR genotipleri, kemik yoğunluğu ve seks steroidleri arasında bir ilişki olup olmadığı henüz araştırılmamıştır.

BA_T haplotipinin artmış mRNA transkripsiyonu ya da stabilitesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüşse de bunun aksini iddia eden ve hatta bu haplotipe sahip postmenapozal kadınlarda kemik yoğunluğun daha düşük olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (20,38,53). Biz ise IHH'li erkeklerde ba_T haplotipinde kemik yoğunluğun, anlamlı olmamakla beraber, daha fazla olduğunu saptadık. Ayrıca, en yüksek kemik dansitesinin heterozigot bireylerde olması IHH'li olgularda her iki allelin birarada bulunmasının kemik dansitesi üzerinde daha olumlu etkiye yol açabileceğini düşündürmektedir.

Vitamin D reseptör geninin hangi moleküler mekanizmalarla kemik dansitesini regüle ettiği bilinmemektedir. RFLP analizi ile saptanan 3'-UTR bölgesindeki allelik farklılıkların mRNA düzeylerini değiştirebileceği düşünülebilir, ancak vitamin D reseptörünün bir çok farklı dokuda eksprese olduğu ve kalsitriyolün kalsiyum homeostazı ve immün sistem üzerinde birden çok etkiye sahip olduğu düşünüldüğünde, kemik yoğunluğu üzerinde bu kadar büyük etkiye sahip olduğu bilinen bir gendeki polimorfizmin neden vitamin D endokrin sistemin tamamında daha geniş bozukluklara yol açmadığı şaşırtıcıdır. Diğer taraftan, gen ekspresyonunun regülasyonunda hücre tipine özgü faktörler de önemlidir ve herhangi bir mRNA'nın yarı ömrü bir hücreden diğerine değişebilir. Sonuç olarak, VDR'deki polimorfizmin etkileri (reseptör sayısı ve/veya fonksiyonunda ya da ligand-reseptör kompleksinin hedef sekansa-enhancer- olan affinitesinde değişiklik gibi) hücre tipine bağlı olabilir ve sadece kemik hücrelerinde ya da intestinal mukozada hücrelerinde gerçekleşiyor olabilir.

Diğer kompleks özelliklerde olduğu gibi kemik dansitesi de birçok genetik ve çevresel faktörün etkisi altındadır. Zirve kemik kitlesini belirleyen genetik faktörler hakkındaki bilgilerin, özellikle erkekler için, halen çok yetersiz olması nedeniyle değişik etnik kökene ait sağlıklı ya da osteoporoz riski taşıyan gruplar üzerinde kapsamlı çalışmalara (iyi tanımlanmış ailelerde ya da ikizlerde yapılacak genetic-linkage analizi gibi) ihtiyaç vardır. VDR'deki allelik varyasyonun kemik yoğunluğu üzerindeki genetik etkinin büyük bölümünden sorumlu olup olmadığı kesinlik kazanmamış olmakla birlikte, bu polimorfizmin aynı kromozom üzerinde bulunan ve henüz tanımlanmamış bir başka gen ile yakın bağlantılı (linked) olması mümkündür.

Çalışmamız, IHH'li erkekler ile genç sağlıklı erkekler arasında farklı VDR genotipleri bakımından fark bulunmadığını, ayrıca IHH'li erkeklerde VDR'deki allelik farklılığın vertebral kemik yoğunluğu ile ilişkili olduğunu ve bu hastalarda görülen osteoporozda genetik faktörlerin de rolü olabileceğini göstermektedir.



VI. ÖZET

Optimal zirve kemik kitlesinin uygun zamanda ve yeterli miktarda sekrete edilen androjenler ile ilişkili olduğu düşünölmekle birlikte, erkeklerde zirve kemik kitlesine (genç erişkin döneminde ulaşılan kemik kitlesi düzeyi), erişimin kadınlarda olduğu gibi, genetik faktörlerin etkisi altında olduğu kabul edilmektedir. Erkek iskeletinin farklı bölgelerinde yapılan ölçümler neticesi kalıtımın etkisinin %40 ila 83 arasında değiştiğı gösterilmiştir. Erkeklerde osteoporozun ve osteoporotik kemik kırıklarının giderek önem kazanması ile birlikte VDR genotipleri ile kemik yoğunluğu arasında kadınlarda gösterilen ilişkinin erkeklerde de bulunup bulunmadığı değişik yaşlardaki sağlıklı ya da osteoporotik erkek gruplar üzerinde araştırılmıştır. Biz de bu çalışmamızda, IHH'li erkeklerde kemik mineral yoğunluğu ve VDR polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştırdık. Çalışmaya IHH tanısı almış ve daha önce hiç tedavi görmemiş 27 erkek hasta (ortalama yaş 21.48 ± 2.22 yıl) ve bunlara yaş ve vücut kitle indeksi açısından uyumlu 25 sağlıklı erkek (ortalama yaş 21.56 ± 1.78 yıl) alındı.

VDR polimorfizmine ApaI, BsmI ve TaqI restriksiyon enzimleri kullanılarak RFLP analizi ile bakıldı. IHH ve kontrol grubu arasında VDR genotiplerinin sıklıkları yönünden bir fark saptanmadı (ApaI, BsmI ve TaqI için χ^2 ve p değerleri sırasıyla $\chi^2=0.678$, $p>0.05$; $\chi^2=0.632$, $p>0.05$ ve $\chi^2=0.618$, $p>0.05$). IHH grubunda en yüksek kemik yoğunluğu heterozigotlarda (Bb, Aa veya Tt genotipli), en düşük kemik dansitesi ise AA genotipli bireylerde mevcuttu. Her üç polimorfizm için de homozigot olan IHH'li hastalardan elde edilen haplotiplerin (BAAt ve baT) sıklığı sırasıyla %11.1 ve %14.8 olup bu iki haplotipin ortalama BMD değerleri arasında anlamlı fark yoktu (0.65 ± 0.04 g/cm² ve 0.84 ± 0.08 g/cm², $p>0.05$). VDR genotipleri ile BMD arasındaki ilişki araştırıldığında ApaI polimorfizmi ile BMD arasında anlamlı bir ilişki olduğu ($p=0.049$, $R^2=0.146$) ve Aa genotipli hastaların kemik yoğunluğunun AA genotiplilere göre daha fazla olduğu saptandı ($z=-1.969$, $p=0.049$).

Sonuç olarak, IHH'li erkeklerde vertebral kemik yoğunluğunun VDR polimorfizmi ile ilişkili olması VDR'deki allelik varyasyonların bu hastalarda görölen osteoporoz gelişiminde rol oynayan genetik faktörlerden biri olabileceğini göstermektedir.

VII. SUMMARY

Optimal peak bone mass is closely related with sufficient and appropriately timed androgen release. However, attainment of peak bone mass in men, as in women, is under profound genetic control. Heredity may contribute as much as 83% of bone mass at various sites of the male skeleton. With increasing recognition of the problem of osteoporosis and related fractures in men interest has been raised whether the relation between bone density and VDR polymorphism in women does also exist in both healthy and osteoporotic men with a wide range of age. Thus, we investigated the influence of VDR polymorphism on bone density in a group of men with IHH (mean age 21.48 ± 2.22 yr) and 25 age- and BMI-matched healthy male controls (mean age 21.56 ± 1.78 yr).

VDR polymorphisms are determined by RFLP analysis using 3 different restriction endonucleases: ApaI, BsmI and TaqI. Frequencies of different VDR genotypes were similar in both patients and control subjects (χ^2 and p values for ApaI, BsmI and TaqI were $\chi^2=0.678$, $p>0.05$; $\chi^2=0.632$, $p>0.05$ and $\chi^2=0.618$, $p>0.05$, respectively). Interestingly, bone density was high in heterozygous patients (Aa, Bb and Tt) and low in patients with the AA genotype. The frequency of the two homozygous haplotypes were 11.1% (BA_t) and 14.8% (ba_T), and mean bone densities at lumbar spine were also similar (0.65 ± 0.04 g/cm² and 0.84 ± 0.08 g/cm², respectively, $p>0.05$). A relation between lumbar bone density and the three RFLPs could be demonstrated only with the ApaI polymorphism ($p=0.049$, $R^2=0.146$). Patients with Aa genotype had significantly higher lumbar bone density compared to those with AA genotype ($z=-1.969$, $p=0.049$).

In conclusion, we have demonstrated that VDR polymorphisms may influence lumbar bone density in men with IHH. Thus, allelic variation in the VDR might contribute to osteoporosis in such patients.

VIII. KAYNAKLAR

1. Baker, AR., McDonnell, PD., Hughes, M., Crisp, TM., Mangelsdorf, DJ., Haussler, MR., Pike, JW., Shine, J.: Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci* 85:3294-3298, 1988.
2. Beck, TJ., Ruff, CB., Plato, CC., Tobin, JD., Quan, CA.: Sex differences in geometry of the femoral neck with aging. *Calcif Tissue Int* 50:24-29, 1992.
3. Behre, HM., Kliesch, S., Leifke, E., Link, TM., Nieschlag, E.: Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 82(8):2386-2390, 1997.
4. Benz, DJ., Haussler, MR., Thomas, MA., Speelman, B., Komm, BS.: High-affinity androgen binding and androgenic regulation of $\alpha 1$ -procollagen and TGF- β steady state mRNA levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* 128:2723-2730, 1991.
5. Bruch, HB., Wolf, L., Budde, R., Romalo, G., Schweikert, HU.: Androstenedione metabolism in cultured human osteoblast-like cells. *J Clin Endocrinol Metab* 75:101-105, 1992.
6. Carling, T., Ridefelt, P., Hellman, P., Rastad, J., Akerström, G.: Vitamin D receptor polymorphisms correlate to parathyroid cell function in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 82(6):1772-1775, 1997.
7. Christian, JC., Yu, P-L., Slemenda, CW., Johnston, Jr CC.: Heritability of bone mass: a longitudinal study in aging male twins. *Am J Hum Genet* 44:429-433, 1989.
8. Colvard, DS., Eriksen, EF., Keeting, PE., Wilson, EM., Lubahn, DB., Riggs, BL., Spelsberg, TC.: Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:854-857, 1989.
9. Colvard, DS., Eriksen, EF., Keeting, PE., Wilson, EM., Riggs, BL., Spelsberg, TC.: Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:854-857, 1989.
10. Cooper, GS., Umbach, DM.: Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. *J Bone Miner Res* 11:1841-1849, 1996.
11. Dawson, Powell, Gannon: *Gene Technology*. BIOS Scientific Publishers Inc. 13-15, 1996.
12. Dawson-Hughes, B., Harris, SS., Finneran, S.: Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to Vitamin D receptor genotype. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3657-3661, 1995.

13. Demay, MB., Kiernan, MS., De Luca, HF., Kronenberg, HM.: Sequences in human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8097-8101, 1992.
14. Farrow, S.: Allelic variation and the vitamin D receptor. *The Lancet* 343:1242, 1994.
15. Ferrari, S., Manen, D., Bonjour, JP., Slosman, D., Rizzoli, R.: Bone mineral mass and calcium and phosphate metabolism in young men: Relationships with vitamin D receptor allelic polymorphisms. *J Clin Endocrinol Metab* 84(6):2043-2048, 1999.
16. Finkelstein, JS., Klibanski, A., Neer, RM., Doppelt, SH., Rosenthal, DI., Segre, GV., Crowley, WF.: Increases in bone density during treatment of men with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 69:776-783, 1989.
17. Finkelstein, JS., Klibansky, A., Greenspan, SL., Rosenthal, DI., Crowley, Jr WF.: Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Ann Int Med* 106:354-361, 1987.
18. Francis, RM., Harrington, F., Turner, E., Papiha, SS., Datta, HK.: Vitamin D receptor gene polymorphism in men and its effect on bone density and calcium absorption. *Clin Endocrinol* 46:83-86, 1997.
19. Francis, RM., Peacock, M., Aaron, JE., Selby, PI., Taylor, GA., Thompson, J., Marshall, DH., Horsman, A.: Osteoporosis in hypogonadal men: Role of decreased plasma 1,25-dihydroxyvitamin D, calcium malabsorption and low bone formation. *Bone* 7:261-268, 1986.
20. Gennari, L., Becherini, L., Masi, L., Mansani, R., Gonnelli, S., Cepolaro, C., Martini, S., Lentini, G., Brandi, ML.: Vitamin D and estrogen receptor allelic variants in Italian postmenopausal women: Evidence of multiple gene contribution to bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3):939-944, 1998.
21. Gilsanz, V., Beochat, MI., Loro, ML., Sayre, JW., Goodman, WG.: Gender differences in vertebral body sizes in children and adolescents. *Radiology* 190:673-677, 1994.
22. Goldray, D., Weisman, Y., Jaccard, N., Merdler, C., Chen, J., Matzin, H.: Decreased bone density in elderly men treated with the gonadotropin-releasing hormone antagonist Decapeptyl. *J Clin Endocrinol Metab* 76:288-290, 1993.
23. Greenspan, SL., Neer, RM., Ridgway, C., Klibanski, A.: Osteoporosis in men with hyperprolactinemic hypogonadism. *Ann Int Med* 104:777-782, 1986.

24. Gunnes, M., Berg, JP., Halse, J., Lehman, EH.: Lack of relationship between vitamin D receptor genotype and forearm bone gain in healthy children, adolescents and young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 82(3):851-855, 1997.
25. Guo, CY., Jones, TH., Eastell, R.: Treatment of isolated hypogonadotropic hypogonadism effect on bone mineral density and bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab* 82(2):658-665, 1997.
26. Hochberg, Z., Borochowitz, Z., Benderli, A., Vardi, P., Oren, S., Spirer, Z., Heyman, I., Weisman, Y.: Does 1,25- dihydroxyvitamin D participate in the regulation of hormone release from endocrine glands? *J Clin Endocrinol Metab* 60(1):57-61, 1985.
27. Horowitz, M., Wishart, JM., O'Loughin, PD., Morris, HA., Need, AG., Nordin, BEC.: Osteoporosis and Klinefelter's syndrome. *Clin Endocrinol* 36:113-118. 1992.
28. Hustmayer, FG., De Luca, HF., Peacock, M.: ApaI, BsmI, EcoRV and TaqI polymorphisms at the human vitamin D receptor gene locus in Caucasians, Blacks and Asians. *Hum Mol Genet* 2:487, 1993.
29. Hustmayer, FG., Peacock, M., Hui, S., Johnston, CC., Christian, J.: Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J Clin Invest* 94:2130-2134, 1994.
30. Kapur, SP., Reddi, AH.: Influence of testosterone and dihydrotestosterone on bone matrix induced endochondral bone formation. *Calcif Tissue Int* 44:108-113, 1989.
31. Kasperk, CH., Wededal, JE., Farley, JR., Baylink, DJ.: Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 124:1576-1578, 1989.
32. Keen, RW., Major, PJ., Lanchbury, JS., Spector, TD.: Vitamin D receptor gene polymorphism and bone loss. *Lancet* 345:990, 1995.
33. Kinyamu, H., Gallagher, JC., De Luca, HF., Lanspa, J., Agarwal, R.: Relationship between intestinal vitamin D receptor, VDR genotypes, calcium absorption and serum 1,25(OH)₂D in normal women. *J Bone Miner Res* 10(suppl. 1):94, 1995.
34. Krall, EA., Dawson-Hughes, B.: Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J Bone Miner Res* 8:1-9, 1993.
35. Kremer, R., Bolivar, I., Goltzman, D., Hendy, GN.: Influence of calcium and 1,25(OH)₂D₃ on proliferation and proto-oncogene expression in primary cultures of bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 125:935-941, 1989.

36. Mange, AP., Mange, EJ.: Genetics: Human Aspects. Sinauer Associates Inc. 2nd edition (270-287), 1990.
37. Masuyama, A., Ouchi, Y., Sato, F., Hosoi, T., Nakamura, T., Orimo, H.: Characteristics of steroid hormone receptors in cultured LC3T3-E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. *Calcif Tissue Int.* 51:376-381, 1992.
38. Morrison, NA., Qi, JC., Tokita, A., Kelly, PJ., Crofts, L., Nguyen, TV., Sambrook, PN., Eisman, AJ.: Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 367:284-287, 1994.
39. Morrison, NA., Yeoman, R., Kelly, PJ., Eisman, JA.: Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci* 89:6665-6669, 1992.
40. Nygren, P., Larsson, R., Johansson, H., Rastad, J., Akerström G.: 1,25(OH)₂D₃ inhibits hormone secretion and proliferation but not functional differentiation of cultured bovine parathyroid cells. *Calcif Tissue Int* 43:213-218, 1988.
41. Orwoll, ES., Klein, RF.: Osteoporosis in men. *Endocrine Rev* 16(1):87-116, 1995.
42. Orwoll, ES., Stribrska, L., Ramsey, EB., Keenan, EJ.: Androgen receptors in osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int.* 49:183-187, 1991.
43. Plymate, SR.: Hypogonadism. *Endocrine Metab Clin North America* 23:749-773, 1994.
44. Prohit, A., Flanagan, AM., Reed, MJ.: Estrogen synthesis by osteoblast cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 61:152-157, 1992.
45. Riggs, BL.: Vitamin D-receptor genotypes and bone density. *The New England J Med* 337(2):125-126, 1997.
46. Sainz, J., Tornout, JMV., Loro, L., Sayre, J., Roe, TF., Gilsanz, V.: Vitamin D receptor gene polymorphisms and bone density in prepubertal American girls of Mexican descent. *The New England J Med* 337(2):77-82, 1997.
47. Sambrook, PN., Kelly, PJ., Morrison, NA., Eisman, JA.: Genetics of osteoporosis. *Br J Rheumatol* 33:1007-1011, 1994.
48. Smith, DAS., Walker, MS.: Changes in plasma steroids and bone density in Klinefelter's syndrome. *Calcif Tissue Int* 22:225-229, 1977.
49. Stepan, JJ., Lachman, M., Zverina, J., Pacovscky, V., Baylink, DJ.: Castrated men exhibit bone loss: Effect of calcitonin treatment on biochemical indices of bone remodeling. *J Clin Endocrinol Metab* 69:523-527, 1989.

50. Tanaka, S., Haji, M., Nishi, Y., Yanase, T., Takayanagi, R., Nawata, H.: Aromatase activity in human osteoblast-like osteosarcoma cell. *Calcif Tissue Int.* 52:107-109, 1993.
51. Tierney, LM., McPhee, SJ., Papadakis, MA.: *Current Medical Diagnosis and Treatment.* 34th edition, 971-973, 1995.
52. Vanderschueren, D., Bouillon, R.: Androgens and bone. *Calcif Tissue Int* 56:341-346, 1995.
53. Verbaek, W., Gombart, AF., Shiohara, M., Campbell, M., Koeffler.: Vitamin D receptor: no evidence for allele-specific mRNA stability in cells which are heterozygous for the TaqI restriction enzyme polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 238(1):77-80, 1997.
54. Waldstreicher, J., Seminara, SB., Jameson, JL., Geyer, A., Nachtigall, LB., Boepple, PA., Holmes, LB., Crowley, FR.: The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 81(12):4388-4395, 1996.
55. Williams, Ceccarelli, Spur: *Genetic Engineering.* BIOS Scientific Publishers Inc. 33-39, 1993.
56. Wong, FHW., Pun, KK., Wang, C.: Loss of bone mass in patients with Klinefelter's syndrome despite sufficient testosterone replacement. *Osteoporosis Int* 3:3-7, 1993.
57. Yen, MY., Yen, TC., Pang, CY., Liu, JH., Wei, YH.: Mitochondrial DNA mutation in Leber's hereditary optic neuropathy. *Invest Opht Visual Sci* 33:2561-2566.