

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

POSTMENAPOZAL OSTEOPOROZLU HASTALARDA
SOST GEN POLİMORFİZMLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ŞÜKRİYE DERYA DEVECİ GÖRÜR

ELAZIĞ-2011

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Hüseyin YÜCE



Prof. Dr. Yusuf ÖZKILIÇ



Prof. Dr. Halit ELYAS



Prof. Dr. Ramazan BAL



Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN



TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimimin her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocam Prof. Dr. Halit ELYAS'a, her konuda bilgisini, katkı ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Hüseyin YÜCE'ye, birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Ebru Önalın'a, Dr. Deniz Erol'a hasta seçimindeki yaklaşımlarından ötürü, Kadın Doğum AD.'dan Yrd. Doç. Dr. Sema ÖZKAN'a, Nükleer Tıp AD.'dan Yrd. Doç. Dr. Tansel BALCI'ya, teknisyen arkadaşım Neşe'ye ve tüm hayatım boyunca destekleri ile beni bugünlere getiren, eğitimimin her aşamasında yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışmayı finanse eden FÜBAB'a (Proje No:) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY SAYFASI	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
KISALTMALAR LİSTESİ	XI
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. OSTEOPOROZ SEBEPLERİ.....	5
3.1.1. Endokrin sebepler.....	5
3.1.2. Diğer Hastalıklar	6
3.1.2.1. Malign Hastalıklar	6
3.1.2.2. Gastrointestinal Hastalıklar.....	6
3.1.2.3. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı	6
3.1.2.4. Homosistinüri	6
3.1.2.5. Hemokromatoz	6
3.1.2.6. Bağ Dokusu Hastalıkları	6
3.1.3. İlaçlar	6
3.1.4. Yaşama biçimi ve genetik faktörler.....	7
3.2. Hipogonadizm ve osteoporoz	7
3.3. Glukokortikoidlere bağlı osteoporoz.....	8

3.4. Hipertiroidi ve tiroksin tedavisi	8
3.5. Gastrointestinal hastalıklar	8
3.6. Malign Hastalıklar ve osteoporoz	9
3.7. Sistemik mastositoz.....	9
3.8. Diabetes mellitus.....	10
3.9. BMD sınıflandırması.....	10
3.10. Prevalans.....	10
3.11. Patofizyoloji.....	11
3.12. Beslenme.....	11
3.13. Egzersiz	11
3.14. Sigara ve Alkol Kullanımı	12
3.15. Menapoz	12
3.16. Genetik	12
3.16.1. Kemik kütle artışı	13
3.16.2. Kemik kaybı	13
3.16.3. Herediter bağlantı	14
3.16.4. İkiz modeli	14
3.16.5. Ebeveyn- evlat kıyaslama modeli.....	15
3.17. Aday genler.....	16
3.17.1. G protein bağlı reseptör 177 (GRP177).....	19
3.17.2. Catenin (kadherin-ilişkili protein) beta 1 (CTNNB1)	19
3.17.3. MADS kutu transkripsiyon iletici faktör 2, polipeptid C (MEF2C).....	19
3.17.4. STARD3N- terminal benzeri (STARD3NL)	20

3.17.5. (FLJ42280).....	20
3.17.6. Cinsiyet belirleyici bölge Y-kutu (SOX6)	20
3.17.7. Çift kortin bağlayıcı bölge (DCDC5;DCDC1)	20
3.17.8. Forkhead gen ailesi üyeleri (FOXC2; FOXL1).....	20
3.17.9. Kortikotropin serbest bırakıcı faktör reseptör 1 (CRHR1)	21
3.17.10. Spektrin, beta, eritrositik olmayan 1 (SPTBN1)	21
3.17.11. Matriks, ekstraselüler, fosfoglikoprotein (MEPE)	21
3.17.12. Rho GTPase aktive edici protein 1 (ARHGAP1; LRP4).....	21
3.17.13. Histon deasetilaz 5 (HDAC5; C17orf53).....	22
3.17.14. Vitamin D endokrin yolağı	22
3.17.14.1. Vitamin D bağlayıcı protein (DBP)	22
3.17.15. Östrojen reseptör 1 (ER1)	23
3.17.16. Östrojen reseptör 2 (ER2)	23
3.17.17. Sitokrom p450 aile 19 alt üyesi polipeptid 1 (CYP19A1).....	23
3.17.18. Sitokrom p450 aile 17 alt üyesi polipeptid 1 (CYP17A1).....	23
3.17.19. Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilgili protein 5 (LRP5)	24
3.17.20. Transforme edici gelişim faktör β (TGFB β) Süper ailesi.....	24
3.17.20.1. TGFB1.....	24
3.17.21. Kemik morfogenetik protein (BMP)	24
3.17.22. Smad aile üyesi 6 (SMAD 6)	25
3.17.23. Smad ubiquitin düzenleyici faktör 1 (Smurf 1).....	25
3.17.24. Kollajen tip 1 alfa 1 (COL1A1)	26
3.17.25. Osteopontin (SPP1)	26
3.17.26. Paratiroid hormon (PTH)	26

3.17.27. Androjen reseptör (AR)	27
3.17.28. İntegrin bağlayıcı sialoprotein gen (IBSP).....	27
3.17.29. Tümör nekrozis faktör (TNF).....	27
3.17.30. Siklerostin (SOST)	28
3.18. Polimorfizmler ve hastalıklarla ilişkileri	29
3.18.1. Genetik varyasyon ve polimorfizm	29
3.18.2. SOST gen polimorfizmlerinin osteoporoz ve hastalıklarla olan ilişkisi	31
3.19.Çalışmanın Amacı	32
4. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4.1. Çalışma Grubu	33
4.2. DNA izolasyonu.....	34
4.2.1. Kullanılan solüsyon ve gereçler	34
4.2.2. İzolasyon işlemi.....	34
4.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin ölçülmesi	35
4.3. PZR Çalışması	36
4.3.1. PZR protokolü	36
4.3.2. Kullanılan solüsyonlar	37
4.3.3. Kullanılan Cihazlar.....	37
4.3.4. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan kimyasallar	38
4.3.5. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan çözeltiler	38
4.4. SOST genindeki polimorfizmlerin çalışılması	38
4.4.1. SOST genindeki (rs17885799) polimorfizminin çalışılması	39
4.4.2. SOST genindeki (rs851054) polimorfizminin çalışılması	41

4.4.3. SOST genindeki rs17886183 polimorfizminin çalışılması.....	42
4.4.4. SOST genindeki rs865429 polimorfizminin çalışılması	43
4.5. PZR Kurulması İşlemi.....	44
4.6. Agaroz Jel Elektorforezi.....	45
4.7. PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi.....	45
4.8. Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde incelenmesi	45
4.9. İstatistik Analizler	47
5. BULGULAR.....	48
5.1. Hasta ve kontrollerde SOST rs17885799 (-22, G>A) polimorfizm dağılımları	48
5.2. Hasta ve kontrollerde SOST rs851054 (4534, G>A) polimorfizm dağılımları	50
5.3. Hasta ve kontrollerde SOST rs865429 (220+675, C>T) polimorfizm dağılımları	52
5.4. Hasta ve kontrollerde SOST rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizm dağılımları	57
6. TARTIŞMA.....	61
6.1. Öneriler.....	68
7. KAYNAKLAR	71
8. EKLER.....	78
8.1. Bilgilendirilmiş Hasta Onay Formu	78
9. ÖZGEÇMİŞ	79

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo1. Osteoporozda araştırılan genlerin KMY ile ilgili kromozomal lokalizasyonları	18
Tablo 2. SOST genine ait rs17885799(-22 G>A) polimorfizmi için dizayn edilen primerler.	40
Tablo 3. SOST genine ait rs851054 (4534 G>A) polimorfizmi için dizayn edilen primerler	41
Tablo 4. SOST genine ait rs17886183 (*1004 G>A) polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve NlaIII (Hsp92I) restriksiyon enzim kesim bölgesi..	42
Tablo 5. SOST genine ait rs865429 (220+675 C>T) polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve NcoI restriksiyon enzim kesim bölgesi.	43
Tablo 6. Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri	48
Tablo 7. SOST rs17885799(-22, G>A) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları.	49
Tablo 8. SOST rs851054 (4534, G>A) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları	51
Tablo 9. SOST rs865429 (220+675, C>T) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları.....	53
Tablo 10. SOST rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmin grup I ve II için allel dağılımları.....	53
Tablo 11. SOST rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları.....	57

Tablo 12. SOST rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizmin grup I ve II için allel dağılımları.....	58
Tablo13. rs865429 ve rs17886183 polimorfizmleri ve kemik mineral yoğunluğu arasındaki korelasyon analizi	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 1.** SOST genindeki rs17885799 (-22, G>A) polimorfizmi için PZR'ye yönelik ARMS 'nin agaroz jel elektroforez görüntüsü 49
- Şekil 2.** SOST genindeki rs17885799(-22, G>A) polimorfizmi için GG genotipine ait DNA dizileme görüntüsü 50
- Şekil 3.** SOST genindeki rs851054 (4534, G>A) polimorfizmi için PZR'ye yönelik ARMS'nin agaroz jel elektroforez görüntüsü 51
- Şekil 4.** SOST genindeki rs851054 (4534, G>A) Polimorfizmi için AA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü 52
- Şekil 5.** SOST genindeki rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmi için PZR'ye yönelik RFLP'nin NcoI restriksiyon enzimle kesim ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü 54
- Şekil 6.** SOST genindeki rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmi için CC genotipine ait DNA dizileme görüntüsü 55
- Şekil 7.** SOST genindeki rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü 56
- Şekil 8.** SOST genindeki rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizmi için PZR'ye yönelik RFLP'nin NlaIII restriksiyon enzimle kesim ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü 58
- Şekil 9.** SOST genindeki rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizmi için GG genotipine ait DNA dizileme görüntüsü 59

KISALTMALAR LİSTESİ

ALL	: Acut Lymphoblastic Locemie (Akut lenfoblastik lösemi)
ARMS	: Amplification refractory mutation system
Bç	: Baz çifti
BMC	: Bone mineral content (Kemik mineral miktarı(KMM))
BMD	: Bone mineral dansity (Kemik mineral yoğunluğu (KMY))
BMP	: Bone morphogenetic protein (Kemik morfogenetik protein)
BMP2	: Bone morphogenetic protein 2 (Kemik morfogenetik protein 2)
BMP4	: Bone morphogenetic protein 4 (Kemik morfogenetik protein 4)
CaMK	: Ca ²⁺ /kalmodilin bağlı kinaz
CRHR1	: Corticotrophin-releasing factor receptor 1 (Kortikotropin salgılatıcı hormon reseptör 1)
CTGF	: Bağ doku büyüme faktörü
CTNNB1	: Catenin(cadherin-associated protein), beta1(Katenin, beta1)
DCDC5	: Double cortin domain containing 1 (Çift kortin bağlı alan içeren 1)
DEXA	: Dual enerji x ışını absorbsiyometri
DZ	: Dizigotik ikizler
ESR1	: Estrogen receptor 1 (Östrojen reseptör 1)
EtBr	: Etidyum bromür
FOXL1	: Forkhead box L1

FN BMD	: Femoral neck bone mineral density (Femur boynu kemik mineral yoğunluğu (FN BMD))
GPR177	: G protein coupled receptor (G protein bağlı reseptör)
HDACs	: Histone deasetilazlar
HDAC5	: Histone deacetylase 5 (Histone deasetilaz 5)
LRP4(ARHGAP1)	: Rho GTPase activating protein 1(Rho GTPaz aktive edici protein 1)
LRP5	: Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilgili protein 5)
LS BMD	: Lumbar spine bone mineral density (Lumbar vertebrakemik mineral yoğunluğu (LS BMD))
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinazlar
MEF2C	: MADS box transcription enhancer factor2, polypeptide C (MADS kutu transkripsiyon iletici faktör 2, polipeptid C)
MEPE	: Matrix, extracellular, phosphoglycoprotein (Matriks ekstraselüler, fosfoglikoprotein)
MZ	: Monozigotik ikizler
PTH-rP	: PTH-iliskili protein
PTH	: Parathyroid hormone (Paratiroid hormon)
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism (Sınırlı fragment uzunluk polimorfizmi)
SD	: Standart deviasyon

SNP	: Single nucleotid polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi)
SOST	: Siklerostin
SOX6	: SRY (sex determining region Y)- box 6 (Cinsiyet tespit edici bölge Y- kutu 6)
SP7	: Sp7 transcription factor (Sp7 transkripsiyon faktör)
SPTBN1	: Spectrin, beta, nonerythrocytic 1 (Spektrin, beta, nonerythrocytic 1)
STARD3NL	: STARD3 N-terminal like
TNF	: Tumor necrosis factor (Tümör nekrozis faktör)
TNFSF11	: Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11 (Tümör nekrozis faktör süper aile üyesi 11)
TNFRSF11A	: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a (Tümör nekrozis faktör süper aile üyesi 11a)
TNFRSF11B	: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (Tümör nekrozis faktör süper aile üyesi 11b)
UTR	: Untranslated region (Transle olmamış bölge)
VBD	: Van buchem disease (Van buchem hastalığı)
VDR	: Vitamin D reseptörü
VKİ	: Vücut kitle indeksi
WHO	: Dünya sağlık örgütü
Wnt	: Wingless type (Wingless tip)
ZBTB40	: Zinc finger and BTB domain-containing protein 40 (Z ve BTB alan içeren protein 40)

1. ÖZET

Osteoporoz, kemik yoğunluğunda azalma ve mikromimarisinde bozulma ile seyreden multifaktöriyel, sistemik bir iskelet hastalığı olup, kemik kırılганlığında artma ve kırıklara yatkınlıkla karakterizedir. Kadınlarda osteoporozun iki önemli nedeni vardır: Bunlar östrojen eksikliği ve yaşlanmadır. Osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonu, osteoblast aracılı kemik yapımının önüne geçmektedir. Bu sürecin en önemli tetikleyicisi östrojen eksikliğidir. Çünkü östrojen, kemik yıkımında görevli sitokinlerin en önemli baskılayıcısıdır. Bu sürecin moleküler boyutunda ise genler devreye girmektedir. Bugüne kadar osteoporozun genetik komponentine yönelik olarak çok çeşitli genler çalışılmıştır. Hedef genlerden biri de 17q12-21 bölgesinde yerleşen SOST genidir. SOST geninde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmlerinin, kemik mineral yoğunluğu üzerine etkisini incelemek için prospektif, randomize, kontrollü bir çalışma planlandı. Çalışmaya Fırat Üniversitesi Araştırma Hastanesi Nükleer Tıp polikliniğine başvuran ve kemik mineral yoğunluğu ölçümü ile osteoporoz tespit edilen 126 kadın (Grup I) ile kemik mineral yoğunluğu ölçümünde normal değerler tespit edilen 78 kadın (Grup II) dahil edildi. İki grupta SOST geninin rs177885799, rs17886183, rs851054 ve rs865429 polimorfizmleri PZR yöntemi ile incelendi. rs17885799 polimorfizmi için her iki grupta G allelin artmış sıklığa sahip olduğu tespit edildi. Rs851054 polimorfizminde ise varyant A allelin her iki grupta %100 arttığı gözlemlendi. rs865429 ve rs17886183 polimorfizmlerinde, varyant allel yönünde değişim tespit edilirken, genotip ve allel sıklıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

Verilerimizin doğrulanabilmesi için farklı toplumlarda aynı polimorfizmlerin çalışılarak verilerimizin daha fazla çalışmayla desteklenmesine ihtiyaç vardır. Geniş popülasyonlarda SOST gen polimorfizmlerinin kemik mineral yoğunluğu üzerine etkilerinin çalışılması osteoporozun tedavisi için yeni seçeneklerin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Postmenapozal osteoporoz, polimorfizm, SOST gen.

2. ABSTRACT

Osteoporosis is a multifactorial systemic bone disease that is described as reduction of bone mineral density, destruction of bone microarchitecture and tendency of fracture with increased fragility. Estrogen deficiency and aging are the main factors for woman osteoporosis. Osteoclast mediated bone resorption dominates osteoblast mediated bone mineralization. The most important trigger of this process is estrogen deficiency because estrogen is one of the most important suppressor of bone resorptive cytokines. When we look at the molecular basis of osteoporosis, there have been multiple genes that were investigated in association with bone mineral density. Recently, one of the studied genes of osteoporosis is SOST gene which is localized on 17q12-21 region. We performed a randomized, prospective, controlled study to investigate the possible effect of SOST gene single nucleotide polymorphisms on bone mineral density. The study was consisted of postmenopausal 126 women, with complaint of osteoporosis that was detected with bone mineral density measurement (Group I) and 78 women with high bone mineral density (Group II) who applied to Firat University Hospital, Department of Nuclear Medicine. Rs177885799, rs17886183, rs851054, rs865429 polymorphisms of SOST gene were studied with polymerase chain reaction technique. We determined increased G allele frequency for rs17885799 polymorphism in both groups. For rs851054 polymorphism, we detected 100% variant A allele in both groups. For rs865429 and rs17886183 polymorphisms, we established variant allele exchange, but there was not any significant difference between groups for genotype and allele frequencies.

Expanded and different population studies are needed to confirm our results. In our opinion, investigation of SOST gene polymorphisms, which effect bone mineral density, could facilitate to improve new treatment modalities for osteoporosis.

Key Words: Postmenopausal osteoporosis, polymorphism, SOST gene.

3. GİRİŞ

Osteoporoz, kemik kütlesinde azalma ve mikromimarisinde bozulmayla seyreden, progresif bir kemik hastalığıdır. Hastalık, kemik direncinde azalmaya bağlı olarak, kırık riskinde artışa neden olduğu için oldukça önemlidir.

Osteoporoz, primer ve sekonder olarak iki başlık altında toplanmaktadır. Primer osteoporoz, kadın ve erkeklerde her yaşta gelişebilmekle birlikte sıklıkla kadınlarda menopoza takiben oluşmaktadır. Primer osteoporoz Tip I ve Tip II olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. Tip I osteoporoz, menopoza sonrası devrede, kadınlarda görülen ve yaşa bağlı kemik mineral azalmasını aşacak derecede olan osteoporozdur. Tip II osteoporoz ise, erkekte veya kadında görülen senil osteoporoz tipidir. Sekonder osteoporoz, yaşlanma veya postmenopozal osteoporoz dışında, başka patolojik sebeplere bağlanabilen tedaviye veya hastalıklara bağlı olarak gelişen osteoporoz türleridir. Hipogonadizm, hipertiroidizm, hiperparatiroidizm, malign hastalıklar, bazı gastrointestinal hastalıklar, bazı ilaçların alınması, bağ dokusu hastalıkları sekonder osteoporoz sebepleri arasındadır (2).

3.1. OSTEOPOROZ SEBEPLERİ

3.1.1. Endokrin sebepler

Primer ve sekonder hipogonadizm
Glukokortikoid fazlalığı (endogen ve eksogen)
Hiperparatiroidizm
Hipertiroidizm
Hipokalsitoninemi
Hiperprolaktinemi
Tip I diabetes mellitus

3.1.2. Diğer Hastalıklar

3.1.2.1. Malign Hastalıklar

Sistemik mastositoz

Multiple myeloma

Lenfoproliferatif hastalıklar

Myeloproliferatif hastalıklar

3.1.2.2. Gastrointestinal Hastalıklar

Primer biliyer siroz

İltihabi barsak hastalıkları

Spru-çölyak hastalığı

Post-gastrektomi durumu

3.1.2.3. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

3.1.2.4. Homosistinüri

3.1.2.5. Hemokromatoz

3.1.2.6. Bağ Dokusu Hastalıkları

Romatoid artrit

Osteogenesis imperfecta

Ankilozan spondilit

Diğer bağ dokusu sebepleri

3.1.3. İlaçlar

Glukokortikoidler, heparin, siklosporin, warfarin, tiroid hormonu, antiepileptikler, kimyasal kastrasyon yapan ilaçlar, GnRH analogları, lityum, metotreksat.

3.1.4. Yaşama biçimi ve genetik faktörler

Ailede osteoporoz anamnezi

Beyaz ırktan olmak

Beslenme ile ilgili faktörler (alkol, aşırı kafein, aşırı protein almak, kalsiyumca fakir diyet, anorexia nervosa)

Aşırı egzersiz

Sigara kullanmak

Hareketsiz yaşama

Yatağa bağımlı yaşama (2).

3.2. Hipogonadizm ve osteoporoz

Hipogonadizmde osteoporoz patogenezi konusundaki görüşler, genellikle hipogonadizm osteoporozunun kemik yapımında azalma ile ilişkili olduğu şeklindedir. Bununla beraber, bazı etkileşimlerin uyardığı mekanizmaların araya girmesiyle, hipogonadizmde kemik yıkımında artış görülebilir. Hipogonadizmde kemik yapımında azalması, gonad steroidleriyle bağlantılı olan yerel büyüme faktörlerinin azalışına bağlıdır. Gonad hormonları hem büyüme hormonunun hem büyüme faktörlerinin salgılanışını etkiler (2).

Postmenopozal osteoporoz da bir tür hipogonadizme bağlı osteoporozdur. Menopoz dışındaki hipogonadizme bağlı osteoporoz tipleri vardır. Erkek veya kadında hipogonadizm;

a) Hipogonadotropik b) Normogonadotropik c) Hipergonadotropik

olmak üzere üç alt başlık altında toplanır. Bu tiplerin her üçüne de osteoporoz eşlik edebilir. Hipogonadizmin erkekte ve kadında ortak bir sebebi,

hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon salgılanmasındaki eksiklik olabilir. Kadınlarda daha fazla görülen anorexia nervosa hem hipogonadizm, hem osteoporoz sebebidir (2).

3.3. Glukokortikoidlere bağı osteoporoz

Gerek Cushing hastalığında, gerek tedavi amacıyla kortikosteroid kullanılmasında osteoporoz görülmesi, kortizon fazlalığının osteoporoz için bir risk faktörü olduğunu kanıtlamaktadır. Kortikosteroidler (kortizon ve glukokortikoidler) kemik yapımı üzerine osteoblast fonksiyonunu baskılayarak, kemik rezorpsiyonunu arttırarak negatif yönde etki ederler. Bu etkinliklerini yerel sitokinler ve büyüme faktörleri üzerinden gerçekleştirirler. Hiperkortizolizmin sebep olduğu osteoporozun sadece artmış yıkıma bağı olduğu sanılırken, osteoblastik yapım eksikliği de osteoporoz patogenezinde rol oynamaktadır (2).

3.4. Hipertiroidi ve tiroksin tedavisi

Hipertiroidide, kortikal kemik kaybolduğı ve rezorpsiyon artışı göstergelerinin de artarak, tirotoksikoz osteoporozunun, artmış kemik yıkımına bağı olduğu ortaya konulmuştur. Daha önce tirotoksikoz geçirmiş olan hastalarda kalça kırığı insidansının artmış olduğu bulunmuştur (2).

3.5. Gastrointestinal hastalıklar

Gastrointestinal hastalıklar da osteoporoz için risk oluşturlar. Bu hastalıkların osteoporoza yol açması, gastrointestinal kanaldan kalsiyum

emiliminin azalışı ile olur. Kalsiyum ve D vitamini emilimindeki azalma, paratiroidlerin uyarılmasına yol açar. Sekonder hiperparatiroidizme bağlı kemik rezorpsiyonu artışı da patogeneze faktörlerini etkiler. Spru (Çölyak hastalığı) durumunda osteomalazi sık görülmektedir. Primer biliyer sirozda da osteoporoz ve kırık insidansı artar. Osteomalazi, primer biliyer sirozda sık görülür. Primer biliyer sirozlu kadınlarda kemik kaybı vardır. Biliyer sirozda osteoblast fonksiyonu gerilemiş, kemik yapımı yavaşlamış ve kemik yıkımı belirgin derecede artmıştır (2).

3.6. Malign Hastalıklar ve osteoporoz

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) geçirenlerde, hastalıksız sağ kalım süresi önemli derecede uzamış olduğundan, bu hastalarda osteopeni görülebilmektedir. Multiple myeloma da osteoporoza yol açan patolojik koşullar arasında olup, kemik oluşumu göstergesi olan alkalen fosfataz artmamıştır. Plazma hücreleri, B hücrelerinden farklılaşarak oluşurlar. Anormal plazma hücrelerinden, osteoklast uyarıcı sitokinlerin salgılanması (interleukin-1, interleukin- 6, tümör nekroz faktör ve lenfotoksin) osteopeniye yol açar (2).

3.7. Sistemik mastositoz

Sistemik mastositoz, nadir görülen bir hastalık olup, etyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Bu hastalıkta deride, kemik iliğinde, lenf bezlerinde, karaciğer ve dalakta mast hücrelerinde artış olur. Deride kaldığı sürece, hastalık urticaria pigmentosa adını alır. Hastaların %70'inde tipik kemik lezyonları vardır. Yaygın olduklarında, bu lezyonlar sklerotik veya litik olabilirler. Sistemik

mastositozdaki kemik lezyonları yüksek “turn over” kemik lezyonları grubundandır (2).

3.8. Diabetes mellitus

Diabetes mellitusta, osteoporozun niteliği ve patogenezi oldukça tartışmalı bir durumdur. Tip I diabetik (insüline bağlı diabet) olan çocuklarda ve gençlerde kemik kütesinin azaldığı gözlemlenmiştir. Diabet osteoporozunun patogenezi, önceleri sadece beslenme yetersizliği neden gösterilirken günümüzde, yerel büyüme faktörleri ve sitokinlerin de rolü olduğu kabul edilmektedir (2).

3.9. BMD sınıflandırması

Kemik yapısının Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) kemik mineral yoğunluğuna (BMD; Bone mineral density (KMY)) göre sınıflaması şu şekildedir (3):

Normal: Genç erişkin ortalama değerin 1 Standart deviasyona (SD) kadar altında olması (T skoru <-1).

Osteopeni: Genç erişkin ortalama değerin $> 1SD$ ancak $< 2,5 SD$ kadar altında olması (T skoru ≥ -1 ve $< -2,5$)

Osteoporoz: Genç erişkin ortalama değerin $> 2,5 SD$ altında olması (T skoru $\geq -2,5$) (3, 21).

3.10. Prevalans

Amerika Birleşik Devletleri’nde 50 yaş ve üzeri beyaz kadınlarda osteoporoz insidansı %20 dolaylarında iken, İngiltere’de %30 oranında

izlenmektedir (38). Ülkemizde osteoporoz kadınlarda %9, erkeklerde %0.6 oranında gözlenirken; menapoz döneminde kadınlarda kemiklerde kırılma oranının %16.7'ye kadar çıktığı belirtilmiştir (38).

3.11. Patofizyoloji

Osteoporoz gelişmesinde rol oynayan en önemli faktör kişinin maksimum kemik kütlesidir. İskelet gelişimi anne karnında başlar ve doğum sonrası ilk iki yıl en önemli dönemdir. Bu nedenle annenin beslenmesi ve yaşam stili doğrudan kişinin ileri dönemdeki kemik kalitesini belirler. Kemik kütlesini etkileyen faktörler arasında genetik, yaşam tarzı, kadında menapoz yaşı ve tipi yer almaktadır (2, 29, 58).

3.12. Beslenme

Kemik gelişiminde ve sürdürülmesinde dengeli beslenme çok önemlidir. Kalsiyum ve vitamin D'den zengin gıdaların (süt, yoğurt, beyaz peynir, yeşil sebze vb.) alınımı esas olsa da potasyum, magnezyum ve taze yiyecekler (sebze, meyve) de kemik gelişiminde önemlidir (44, 49, 56, 63, 88).

3.13. Egzersiz

Egzersizin kemik kütlesi üzerine etkisi, osteoblast aktivitesini arttırmasıdır (21). Sporun diğer önemli etkisi, dengenin artmasına bağlı olarak düşme riskinin azalmasıdır (33).

3.14. Sigara ve Alkol Kullanımı

Sigara içenlerde KMY daha düşük olduğu bulunmuştur (28). Sigara kullanımı hem kalsiyum emilimini, hem de 17β östradiol seviyesini azaltmaktadır (24). Aşırı alkol kullanımı, KMY'yi kötü yönde etkileyerek ve düşme riskini artırarak kırık riskini arttırmaktadır (10, 23, 25,39, 40, 43, 47).

3.15. Menapoz

Östrojen, kemik dokusunda hem reseptörler aracılığıyla osteoblast ve osteoklast fonksiyonunu etkiler, hem de sitokinler üzerinde baskılayıcı etkiyle kemik metabolizmasını olumlu yönde etkilemektedir (34, 55, 61).

Osteoporoz oluşumunda birçok risk faktörü görev almaktadır. Bu faktörlerin büyük bir kısmını yaş, cinsiyet, alkol ve sigara kullanımı gibi çevresel etkenler oluşturmaktadır. Aile ve ikiz çalışmaları ile osteoporozun genetik komponentleri aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Osteoporozun genetik kontrolünde yapısal ve düzenleyici birçok gen görev almakta ve yapılan çalışmalar bu genler üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu çalışmalarda kemik kütlesini ve mineral içeriğini kontrol eden genlerdeki değişimler önemli yer tutmaktadır (41, 42, 77, 81).

3.16. Genetik

Pubertal dönemde kemik kütlesindeki artışın büyüklüğü ve hızı ile hayatın ilerleyen dönemlerindeki kemik kaybı, iskelet bölgeleri arasında farklılık gösterdiği gibi, bireyler arasında da farklılık arzeder. Kemik kütle artışı, esas olarak kemik dış boyutlarının büyümesine ve minimal olarak da mikromimarisindeki değişikliğe bağlıdır. Buna zıt olarak postmenapozal ve

yaşlanmaya bağlı kemik kütle kaybı ise kemiğin hem trabeküler hem de kortikal bölümünde azalmayla mikromimarinin bozulmasıyla kendini göstermektedir (13, 24, 25, 28,30, 47, 50).

3.16.1. Kemik kütle artışı

Puberteden önce ve yeni doğanlarda iskelet bölgelerinde cinsiyete göre BMD(KMY) (g/cm^2) farkı yoktur (2, 12, 14, 20, 58, 59) ve bu durum puberteye kadar devam eder (16, 17, 18). Puberte boyunca, kemik yoğunluğu özellikle lomber vertebrada ikiye katlar (4). Bu olay dişilerde erkeklerden iki yıl önce başlar. Ortalama bu dönemde cinsiyet-bağımlı kemik kütle farkı saptanır hale gelir. Bu fark erkek cinsiyette kemik kütle artış süresinin daha uzun olmasına ve kortikal kemik kalınlığı ile kemik boyutlarında bayanlara göre artışa neden olur (51). Bundan dolayı erkeklerde pik kemik mineral içeriği (BMC: Bone mineral content; g)(KMM) lomber vertebra ve proksimal femurda bayarlardan daha fazla iken, volumetrik kemik yoğunluğu (g/cm^3) puberte sonunda iki cinsiyet arasında farklılık göstermez (16,17,18). Diğer taraftan siyahilerde volumetrik kemik yoğunluğu beyazlardan daha fazladır (16,17, 53) ve trabekül sayısı benzer iken trabekül yapısı siyahilerde daha kalın örölmektedir (22, 74).

3.16.2. Kemik kaybı

Proksimal femur gibi, bazı kemik bölgelerinde, menopooldan önce kemik kaybı oluşur (34, 35, 46, 48, 66, 76). Maksimum kemik kütlesi kazanıldıktan sonra, hayatboyu kemik boyunda küçük oynamalar olur. Özellikle erişkin erkeklerde, kortikal kemikte ekspansiyon oluşabilir (12, 36, 51). Fakat yaşla

beraber her iki cinsiyette artan periosteal ekspansiyon, kemik iliği mesafesindeki endosteal resorpsiyona bağlı genişlemeden daha azdır ve bunun sonucunda kemik korteksi incelmektedir (33, 22).

3.16.3. Herediter bağlantı

Osteoporotik kadınların kız çocuklarında da KMY'lerinin düşük olduğu bulunmuştur (51). Yapılan bir çalışmada, peri-postmenopozal KMY'leri düşük olan kadınların kızlarının KMY'leri ile, normal KMY'li kadınların kızlarının KMY'leri kıyaslanmış ve annelerinde osteoporoz olanların KMY'leri daha düşük çıkmıştır (3,9). Ciddi osteopozlu orta-yaşlı 38 erkeğin akrabalarında da KMY düşük bulunmuştur (5). Bu çalışmalar osteoporoz taramasında aile hikayesinin önemini vurgulamakta olup, risk altındaki grupta erken yaşlarda genetik belirleyici faktörlerin belirlenmesinin gerektiğine dikkat çekmektedir. Geçirilmiş kırık hikayesi olası kırık riskini ikiye katlamaktadır (20, 29).

Toplumdaki KMY varyasyonunu açıklamada, genetik faktörlerin keşfedilmesinde, temel iki insan modeli kullanılmıştır (27).

3.16.4. İkiz modeli

Genlerini %100 paylaşan monozigotik (MZ) ikizlerle, %50 paylaşan dizigotik (DZ) ikizlerin KMY'leri paylaşım korelasyonu açısından kıyaslanmıştır. Mono ve dizigotik ikizlerdeki yüksek korelasyon, maksimum kemik kütlelerinin, genetik yapıdan etkilendiğini göstermektedir ve lomber vertebra ile proksimal femurda KMY varyasyonu %80 kadar yüksek bulunmuştur (43, 62).

Sidney osteoporoz ikiz çalışmasında genetik ve çevresel faktörlerin, yağsız vücut kütlesi ile vücut yağ kütlesine etkileri 102 bayan ikiz çiftinde (ortalama yaş± SD 52.8± 13 yaş) incelenmiştir (40). Yağsız vücut kütlesi ile vücut yağ kütlesindeki varyasyon sırasıyla %80 ve %65 oranında genetik faktörlere bağlı bulunmuştur. Fakat bu genetik faktörler, lomber vertebra ve femur boynunda KMY'yi çok küçük bir oranda etkilemektedir. Bu sonuçlar, geçmiş yıllarda kemik kütlesine genetiğin indirekt etkisini değerlendirmede kullanılan yağsız vücut kütlesine bağlı sonuçlardan farklılık arz etmektedir. Şu an için yağsız vücut kütlesi ile kemik kütlesi arasındaki bağlantının esas olarak genetik mi yoksa çevresel mi olduğu netlik kazanmamıştır (51).

3.16.5. Ebeveyn- evlat kıyaslama modeli

İkiz modelindeki kadar yüksek olmasa da KMY için %60 oranında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (60). 138 premenapozal anne (ortalama yaş: 40.0±4.0 yaş) ile prepubertal kızlarında (ortalama yaş: 8.1±0.7 yaş) KMM, areal+ volumetrik KMY ile lomber vertebra ve femur (boyun, trohanter ve diafiz) kemik alanlarında korelasyon bulunmuştur. Bu kız çocuklarının 2 yıl sonra yani puberte başlangıcında KMY'leri tekrar değerlendirildiğinde prepubertal değerleri ve anne/kız oranlarında benzer korelasyon gösterilmiştir (87).

Yapılan bir ikiz çalışmasında, falanx ve kalkaneusta kantitatif ultrasound yöntemiyle kemik yapısı değerlendirilip kalıtsal etkilenimin %55- %82 arasında olduğu bulunmuştur. Bu sonuç DEXA (dual enerji x-ışını absorbsiyometri; Dual energy X-ray absorptiometry) yöntemiyle lomber vertebra ve femur boynunda yapılan KMY sonuçlarına benzer olarak yorumlanmıştır (7).

İlginç olarak erkekten erkeğe ve erkekten bayana kemik kütlesinin genetik aktarımı değişebilir (31, 28, 55). Bu konu henüz netlik kazanmamışken bayan popülasyonundaki bulguları, erkek popülasyonuna yorumlamamak gerekir.

Osteoporoz için major risk olan menopozun oluşum yaşı, %63 oranı ile güçlü bir genetik geçiş göstermektedir.

3.17. Aday genler

Kemik mineral yoğunluğu, kırık riskinin ölçülmesinde ve osteoporozun klinik teşhisinde kullanılan kalıtlılabilir kompleks bir özelliktir.

Kemik dokusunun oluşum, gelişim ve yıkımında görev alan genler en kuvvetli bağlantıyı bulmak adına incelenmektedir. Çalışılan bu genler;

Tip1 kollajen A1 ve A2 (COL1A1) (COL1A2) , tip 2 kollajen A1, fibrillin tip1, osteopontin, sitokinler ve büyüme faktörleri (koloni stimüle edici faktör 1(colony-stimulating factor 1; CSF-1), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor; EGF)), interlökin-1 α (Interleukin-1 α ; IL-1 α), IL-4, IL-6, IL-11, transforme edici büyüme faktörü- β 1 (Transforming growth factor β 1; TGF- β 1), tümör nekroze edici faktör- α ve β (Tumor necrosis factor; TNF- α ve β) endokrin sistemin üyeleri (androjen reseptörü (AR), vitamin D reseptör (VDR), kalsiyum-algılayıcı reseptör, östrojen reseptörü-1(ER), insülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor 1; IGF-1), paratiroid hormon (Parathyroid hormone; PTH), PTH-ilışkili protein (PTH-rP), PTH reseptör tip1, kemik morfogenetik proteinler (Bone morphogenetic protein; BMP2, BMP4).

Fernando Rivadeneira ve ark. yaptığı çalışmada ise 20 KMY lokusu tanımlamışlardır. Bunlar :

1p31.3(GPR177): G protein-coupled receptor 177, 2p21(SPTBN1): spectrin, beta, non-erythrocytic 1), 3p22(CTNNA1): catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 4q21.1(MEPE): matrix, extracellular, phosphoglycoprotein, 5q14(MEF2C): MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C, 7p14(STARD3NL): STARD3 N-terminal like, 7q21.3(FLJ42280), 11p11.2(LRP4, ARHGAP1): Rho GTPase activating protein 1, 11p14.1(DCDC5): doublecortin domain containing 1, 11p15(SOX6): SRY (sex determining region Y)-box 6), 16q24(FOXL1): forkhead box L1, 17q21(HDAC5): histone deacetylase 5, 17q12(CRHR1): corticotrophin-releasing factor receptor, 1p36(ZBTB40): Zinc finger and BTB domain-containing protein 40, 6q25(ESR1): estrogen receptor 1, 8q24(TNFRSF11B): tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b, 11q13.4(LRP5): low density lipoprotein receptor-related protein 5, 12q13(SP7): Sp7 transcription factor, 13q14(TNFSF11): tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11 ve 18q21(TNFRSF11A): tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a (67). Bu genler ve kromozomal lokalizasyonları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo1. Osteoporozda araştırılan genlerin KMY ile ilgili kromozomal lokalizasyonları

Gen	İsmi	Kromozom Lokalizasyonu
GPR177	G protein coupled receptor	1p31.3
SPTBN1	Spectrin, beta,nonerythrocytic 1	2p21
CTNNB1	Catenin(cadherin-associated protein), beta1	3p22
MEPE	Matrix, extracellular, phosphoglycoprotein	4q21.1
MEF2C	MADS box transcription enhancer factor2, polypeptide C	5q14
STARD3NL	STARD3 N-terminal like	7p14
FLJ42280	FLJ42280	7q21.3
LRP4(ARHGAP1)	Rho GTPase activating protein 1	11p11.2
DCDC5	Double cortin domain containing 1	11p14.1
SOX6	SRY (sex determining region Y)- box 6	11p15
FOXL1	Forkhead box L1	16q24
HDAC5	Histone deacetylase 5	17q21
CRHR1	corticotrophin-releasing factor receptor	17q12
ZBTB40	Zinc finger and BTB domain-containing protein 40	1p36
ESR1	estrogen receptor 1	6q25
TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	8q24
LRP5	low density lipoprotein receptor-related protein 5	11q13.4
SP7	Sp7 transcription factor	12q13
TNFSF11	tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 11	13q14
TNFRSF11A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a	18q21

3.17.1. G protein bağı reseptör 177 (GRP177)

1p31.3'de lokalizedir. FN-BMD (Femoral Neck-BMD) ve LS-BMD (Lumbar Spine-BMD) ile ilgili iki tane yaygın polimorfizm tespit edilmiştir. Bu 2 tek nükleotid polimorfizmi (SNP; single nucleotid polymorphism) GRP117'nin intronunda lokalize olup, kemik hücre farklılaşması ve gelişiminde görevli genlerdir (67).

3.17.2. Catenin (kadherin-ilişkili protein) beta 1 (CTNNB1)

3p22'de lokalizedir. FN-BMD ile ilgili genidir. CTNNB1 Wnt (wingless-type) sinyal yolağının integraline β -catenini kodlar ve KMY düzenlenmesi için adaydır. Wnt sinyali osteoblastlarda TNFRSF11B ekspresyonunu negatif olarak düzenleyerek kemik resorpsiyon yolağını kontrol eder (67).

3.17.3. MADS kutu transkripsiyon iletici faktör 2, polipeptid C (MEF2C)

5q14'de lokalizedir. Sadece FN-BMD'ye özgüdür. MEF2C bir transkripsiyon faktördür. Kaslarda eksprese olur. Histon deasetilazlardan (HDACs) sinyal bağının ayırımı ile mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ve Ca^{2+} /kalmodilin bağı kinaz (CaMK) arasında MEF2C uyumu sağlayarak transkripsiyonu gerçekleştirir. HDAC4 ve HDAC5 MEF2C ile iletişimi sağlayarak MEF2C'nin transkripsiyonel aktivitesini engellerler (67).

3.17.4. STARD3N- terminal benzeri (STARD3NL)

7p14-p13'de lokalizedir. LS-BMD ile ilişkilidir. Asya bireylerinde yapılan çalışmada 7p14'de bir SNP tespit edilmiştir (67).

3.17.5. (FLJ42280)

7q21.3'de lokalize olmuştur. Bu bölgede birkaç SNP tespit edilmiştir. LS-BMD ve FN-BMD ile ilişkilidir (67).

3.17.6. Cinsiyet belirleyici bölge Y-kutu (SOX6)

611p15'de lokalizedir. FN-BMD ile ilişkilidir. SNP SOX6 geninin upstreaminde lokalizedir. Bu gen değişik dokularda eksprese olup çoğunlukla da iskelet kasında eksprese olmuştur. Diğer SOX ailesi üyeleri endochondral ossifikasyon boyunca mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını RUNX2 aracılığıyla düzenler (67).

3.17.7. Çift kortin bağlayıcı bölge (DCDC5;DCDC1)

11p14.1'de lokalize olmuştur. LS-BMD ile ilişkilidir. DCDC1 geninin alt ucunda lokalize olmuştur (67).

3.17.8. Forkhead gen ailesi üyeleri (FOXC2; FOXL1)

16q24.3'de lokalizedir. LS-BMD ile ilişkilidir. Bu gen ailesi başlıca gastrointestinal mukozada (FOXL1) veya adiposit metabolizmasında eksprese olur ve kondrojenik farklılaşma (FOXC2) başlangıç aşamasıdır. FOXC2 Wnt- β katenin sinyallerinin aktivasyonu yoluyla mezenkimal hücrelerin osteoblast

farklılaşmasını stimüle ederken FOXC2 ekspresyonu kemik morfogenetik proteinler tarafından düzenlenir. FOX gen demetini etkileyen mutasyonlar ve delesyonlar insanlarda vertebral malformasyonları içeren VACTER tipin ciddi malformasyonlarına sebep olabilir (67).

3.17.9. Kortikotropin serbest bırakıcı faktör reseptör 1 (CRHR1)

17q12-22'de lokalizedir. LS-BMD ile ilişkili olup CRHR1 geninde lokalize olmuştur (67).

3.17.10. Spektrin, beta, eritrositik olmayan 1 (SPTBN1)

2p21'de lokalizedir. LS-BMD ile ilişkili olup major sitoskeletal skaffold protein kodlar (67).

3.17.11. Matriks, ekstraselüler, fosfoglikoprotein (MEPE)

4q21.1'de lokalize olmuştur. Yapısal olarak bir demeti içerir. Filogenetik olarak kemik formasyonu ve gelişiminde fonksiyona sahip matriselüler fosfoglikoproteinleri kodlar. MEPE insan kemiğinde osteositler tarafından eksprese olup, kemik formasyonunda inhibe olurlar (67).

3.17.12. Rho GTPase aktive edici protein 1 (ARHGAP1; LRP4)

11p11.2 bölgesi birkaç geni ihtiva eder. C11orf49, LRP4, CKAP5, F2 ve ARHGAP1. FN-BMD ile ilişkilidir (67).

3.17.13. Histon deasetilaz 5 (HDAC5; C17orf53)

17q21 bölgesi 30'dan fazla geni içerir. Bunlardan iki tanesi kalça eklemi ile ilişkilidir. HDAC5 class II histon deasetilazı kodlar ve histon korunun (H2A, H2B, H3, H4) N terminal kısmı üzerinde lizin kalıntısının deasetilasyonundan sorumludur. Histon asetilasyon ve deasetilasyonu transkripsiyonel düzenlenme, hücre siklus ilerlemesi ve gelişimsel olaylar özellikle de myosit farklılaşması için önemlidir. Farklılaşmamış myoblastlarda, HDAC5 çekirdekte mevcuttur. HDAC5 myosit ilerletici MEF2C'ye bağlanarak transkripsiyonu baskılar ve kas maturasyonunu inhibe eder. Kemikte classII histon deasetilasyonun asetilasyonu örneğin HDAC5 Smad3 tarafından Runx2'nin inhibisyonu ile meydana gelen TGF- β aracılı osteoblast farklılaşması için gereklidir (67).

3.17.14. Vitamin D endokrin yolağı

Vitamin D endokrin sistemi pleotropiktir ve kemik metabolizmasında önemli rol oynar. Vitamin D etkinliğini vitamin D reseptörü (VDR) aracılığıyla hedef genlerde vitamin D cevap elementleriyle etkileşime girerek gen ekspresyonunu bir nükleer transkripsiyon faktör olarak düzenler. VDR'ün hormon bağlayıcı alanındaki missens mutasyonlar kalıtsal vitamin D rezistansı üzerinden raşitizme sebep olur. VDR osteoporosisde çalışılan ilk aday gendir (67, 78).

3.17.14.1. Vitamin D bağlayıcı protein (DBP)

Vitamin D bağlayıcı protein (vitamin D binding protein; DBP) kemik metabolizmasında 2 fonksiyona sahiptir. Birincisi hedef dokuya Vitamin D'yi taşıyarak ve bağlayarak kalsiyum homeostasisinde önemli rol oynar. İkincisi

DBP, direkt olarak aktive edici osteoklastlar yoluyla, kemik rezorpsiyonu aracılığında, DBP- makrofaj aktive edici faktöre dönüştürebilir. Birkaç çalışmada DBP polimorfizmleri ve KMY arasında ilişki rapor edilmiştir (67).

3.17.15. Östrojen reseptör 1 (ER1)

Östrojen, endokrin sistem kemik kitlesinin düzenlenmesinde ve osteoporosisin meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır. Osteoporosisde sık çalışılan aday genlerden biridir. KMY ile ilişkisi bulunmuştur (67, 26).

3.17.16. Östrojen reseptör 2 (ER2)

ER1'e göre, osteoporozda, kemik kitlesi üzerinde daha az önemli olduğu düşünülmektedir. (67, 26).

3.17.17. Sitokrom p450 aile 19 alt üyesi polipeptid 1 (CYP19A1)

CYP19A1, aromataz olarak bilinen sitokrom P450 enzimini kodlar. Aromataz androjeni östrojene çevirerek fonksiyon görür. Çalışmalarda CYP19A1 polimorfizmleri ve KMY arasında ilişki bulunmuştur (67).

3.17.18. Sitokrom p450 aile 17 alt üyesi polipeptid 1 (CYP17A1)

Androjenlerin ve östrojenlerin sentezinde önemli rol oynamaktadır. Mutasyonu azalmış iskelet gelişimi ve diffuz osteoporozise sebep olur (67).

3.17.19. Düşük dansiteli lipoprotein reseptör ilgili protein 5 (LRP5)

Kemik kitlesinin düzenlenmesinde LRP5'in anahtar rolü, nadir insan monojenik iskelet hastalıklarında ilk kez tespit edilmiştir. LRP5 mutasyonları, otozomal resesif osteoporosis-pseudogliomaya neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda LRP5 genindeki bu SNP'ler ve KMY arasında ilişki bulunmuştur (67).

3.17.20. Transforme edici gelişim faktör β (TGFB β) Süper ailesi

Transforme edici gelişim faktör β ve BMP bu ailenin üyeleridir. Pek çok hücre tipinde farklılaşma, proliferasyonun kontrolü ve diğer pek çok fonksiyona sahip peptidlerin bir grubundan oluşmaktadır (67).

3.17.20.1. TGFB1

TGFB1'i kodlar, osteoporoside çok yaygın çalışılan genlerden biridir. TGFB1 çoğunlukla kemik dokuda eksprese olur. Kemik oluşumu ve emilimin kontrolünde anahtar rol oynar. TGFB1'deki mutasyonlar artmış KMY ile karakterize nadir bir durum olan otozomal dominant Camurati-Engelmann hastalığına neden olur (22, 67).

3.17.21. Kemik morfogenetik protein (BMP)

20p12.3 bölgesi osteoporozla ilişkili olan bir bölgedir. Bu bölgede BMP2 başta olmak üzere, C20orf42, C20orf154, and CHGB olmak üzere 4 farklı gen yer almaktadır. Bu genler kemik iliği veya osteoblast hücre hatlarında eksprese olurlar. BMP2 osteoblast farklılaşması ve kemik oluşumundaki kritik rolü

nedeniyle umut verici bir aday gen olarak kabul edilmektedir. BMP4 de kemik oluşumunda ve iskelet gelişiminde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda BMP2, BMP4 ve BMP7 gen polimorfizmlerinin KMY, osteoporoz ve vasküler kalsifikasyon arasında beraberlik olduğu ileri sürülmüştür (19, 36, 59, 60, 73, 93, 95). BMP'lerin inhibitörü noggindir. Kemik oluşumunda, osteoblast farklılaşmasında BMP inhibitörü görevi görür. Biyolojik yaşlanma sürecinde aşırı ekspresyonu osteoblast oluşumu ve fonksiyonunda kayıpla sonuçlanabilir ve kemik kaybı gerçekleşir (90).

3.17.22. Smad aile üyesi 6 (SMAD 6)

SMAD proteinlerinden biridir. Son yıllarda postmenapozal kadınlarda yapılan çalışmalarda, SMAD6 intronik polimorfizmlerin KMY ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (67). BMP'ler osteoblast proliferasyonunu ve farklılaşmasını Smad proteinler aracılığıyla gerçekleştirirler (92).

3.17.23. Smad ubiquitin düzenleyici faktör 1 (Smurf 1)

Smad 1'in degradasyonu E3 ubiquitin ligaz smurf1 tarafından gerçekleştirilir. Fakat Cbfa1 için sorumlu spesifik E3 ligaz henüz tespit edilmemiştir. Smurf 1 kemik oluşumunda anahtar moleküllerin hücre içi konsantrasyonunu kontrol eder. Yapılan çalışmalarda osteoblastlarda mutant Smurf 1 formun etkileri incelendiğinde belirgin olarak ilerlemiş osteoblast farklılaşmasında mutant Smurf 1'in eksprese olduğu bulunmuştur. Smurf 1 osteoblast farklılaşmasında önemli bir düzenleyici faktör olarak görülebilir.

Kemik anabolik ajanların tanımlanmasında potansiyel bir moleküler ajandır (93, 94).

3.17.24. Kollajen tip 1 alfa 1 (COL1A1)

Tip I kollajenin alfa 1 zincirini kodlar. Kemik ekstraselüler matriksin başlıca komponentidir. COL1A1 genindeki mutasyonlar osteogenesis imperfektaya neden olur. Aynı zamanda COL1A1 geni osteoporozda yaygın çalışılan aday genlerden biridir (51). COL1A1 yaklaşık olarak 18kb.hacminde ve 17q21.3–q22’da lokalize olmuştur (19).

3.17.25. Osteopontin (SPP1)

Sekrete olmuş fosfoprotein 1, kemik düzenlenmesiyle ilişkili olup, osteopontin olarak da bilinir. Kromozom 4q21-25’de lokalize olmuştur. 7 ekzon içerir. 314 aminoasitlik residüden oluşan bir proteindir. Osteopontin fosforile olmuş bir matriks glikoproteindir (72).

3.17.26. Paratiroid hormon (PTH)

Paratiroid hormon, kalsiyum homeostasisinde ve kemik yeniden düzenleniminde anahtar bir düzenleyicidir. Osteoporozisile ilgili olarak yapılan çalışmalarda PTH ile KMY arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Osteoporozla PTH yolağındaki dört genin ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bunlar PTH, PTHLH (paratiroid hormon-benzeri hormon), PTHR1 (PTH reseptör 1) ve PTHR2 (PTH reseptör 2)’ dir (51).

3.17.27. Androjen reseptör (AR)

Kemik metabolizması ve gelişiminde androjenler önemli rol oynarlar. AR, insan osteoblast hücrelerinde ve osteoklastlarda eksprese olur. Androjenler direkt kemik hücrelerinde etkilidirler. AR'yi kodlayan gen Xq11-12 üzerinde lokalize olmuştur. Premenaposal bayanlarda yapılan çalışmalarda, α AR'nin CAG tekrar polimorfizmi ve osteoporoz arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir (91).

3.17.28. İntegrin bağlayıcı sialoprotein gen (IBSP)

IBSP geni, kemik matriksinin ana yapısal bir proteinini kodlar. İnsan kemiğinde kollajen olmayan proteinlerin %12'sini oluşturur (82).

3.17.29. Tümör nekrozis faktör (TNF)

Tümör nekrozis faktörler $\text{TNF}\alpha$ ve $\text{TNF}\beta$ olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. $\text{TNF}\alpha$, östrojen yetersizliğinde artmış osteoklastik kemik rezorpsiyonunda rol oynar. $\text{TNF}\alpha$ TNF reseptör (TNFR) aracılığıyla görev yapar. TNFR'de TNFRI ve TNFRII olmak üzere iki kısımdan oluşur. *İn vitro* çalışmalarda iki reseptörün farklı olarak osteoklastogenesi düzenlediği bildirilmiştir.

$\text{TNF}\beta$ osteoklast aktivitesinin lokal aracısıdır. Artmış aktivitesi yaşla ilgili kemik kaybıyla ilişkilidir. Bu yüzden TNF-TNFR sistem genleri osteoporozise neden olabilecek aday genler arasındadır (45).

3.17.30. Siklerostin (SOST)

İnsan kemiğinde osteositler tarafından eksprese edilen bir protein olan siklerostini kodlar. Siklerostin ve kemik morfogenetik protein (BMP) ailesi benzer DNA yapısına sahip olmasına rağmen sikleostin, BMP antagonisti olarak görev yapmamaktadır. Bunun yerine siklerostin LRP5 ve LRP6'ya bağlanarak, Wnt sinyal yolağının antagonisti olarak fonksiyon görmektedir. SOST ilk kez nadir monojenik hastalıkların araştırıldığı bir çalışmada kemik kitlesinin negatif anahtar düzenleyicisi olduğu tespit edilmiştir (51).

Osteoporozla ilişkili olarak çalışılan genlerden biri de SOST genidir. SOST geni kromozom 17q12-21'de yer almakta, 2 ekzon içermekte ve 24kDa moleküler ağırlığına sahip 213 aminoasitlik bir propeptid kodlamaktadır. İlk 23 rezidüsü sekresyon için sinyal sekansı görevini görmektedir (2, 9). Yapısında sistein düğüm motifine sahip 8 sistein ve bir glisin amino asidinden oluşan bir yapı vardır. Bu yapı dimerizasyon ve reseptöre bağlanmaya yardımcı olmaktadır. Bu motif ilk defa TGF- β ve bağ doku büyüme faktörü (CTGF) gen ailelerinde tanımlanmıştır (43, 8). Sonradan von Willebrand faktör ve müsinler gibi proteinlerde de bu yapı bulunmuştur (30). Sistein düğümlü büyüme faktörü süper ailesinin değişik üyeleri, reseptörlerine bağlanmadan önce hetero ve homodimer oluşturmakta bu da değişik biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır (2).

SOST geni siklerostin proteinini kodlamaktadır. Siklerostin sistein bağlı kalıpta sekrete olmuş bir proteindir. Baskın olarak osteogenesisin gerçekleştiği kemik dokusu alanlarında bulunmaktadır. Siklerostin ekspresyonunun gerçekleştiği major yerler osteositik kanalikul ve osteositlerdir. *In vitro*

Çalışmalarda, BMP sinyal basamağında, sclerostinin düzenleyici etkileri tespit edilmiştir. *In vivo* transgenik fare model çalışmalarında, insan SOST geninin, özellikle fragil kemiklerde ve kemik formasyonunda azalma gösteren kemiklerde yüksek düzeyde eksprese olduğu bulunmuştur. Kemik homeostasisinde önemli bir aracı olan siklerostin, kaspaz 3' aktive ederek insan osteoblastik hücrelerin apoptosisini başlatmaktadır (3, 89). SOST geninde fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar, sclerosteosis'e sebep olmaktadır. Genin alt ucundaki 52kb.'lık delesyon, kromozomal yeniden düzenlenmeye yol açmaktadır. Van Buchem hastalığı (Van Buchem Disease:VBD) ve Siklerosteozis otozomal resesif hastalıklar olup, craniotbler hyperostosisin görüldüğü heterojen hastalıklardır. Her iki hastalıkta, radyografik bulgular yaygın olup, iskeletin siklerozisi ve aşır gelişimi mevcuttur (3). Genel popülasyondan farklı, kendine spesifik fenotip oluşturan genler, tek gen kemik hastalıklarının patogenezinde rol oynadıkları için bu genler KMY düzenlenmesinde potansiyel adaydırlar. Bu konuda perimenapozal sağlıklı İngiliz kadınlarında yapılan bir çalışmada, KMY parametreleri ve SOST geninin 5 SNP'si arasında bir ilişki bulunamamıştır (4).

3.18. Polimorfizmler ve hastalıklarla ilişkileri

3.18.1. Genetik varyasyon ve polimorfizm

Tr içerisinde gözlemlenen farklılıklara genetik varyasyon denir. Kalıtsal olmayan faktörlerin etkisiyle canlının dış görünüşünde gözlemlenen ve kalıtsal olmayan değişikliklere modifikasyon veya kalıtsal olmayan varyasyon denir. Polimorfizm, bir popülasyonda iki ya da daha fazla sayıda birbirinden ayrılmış

farklı fenotiplerin bulunması olarak tanımlanabilir. DNA dizisinde, doğal olarak meydana gelen varyasyonlar birkaç şekilde oluşabilir;

1. Tek nükleotid değişimi
2. Tek ya da birkaç nükleotidin insersiyonu veya delesyonu,
3. Tekrarlayan dizi sayısındaki değişimler ve kromozom yapısındaki büyük değişimler.

İnsan genomunda tek nükleotid değişimleri oldukça yüksek sıklıkta bulunmaktadır. Bu oran her 1000 bazda 1 olarak tahmin edilmektedir. Bunlar sıklıklarına ve hastalık yapma yeteneklerine bağlı olarak polimorfizm ya da mutasyon olarak adlandırılmaktadırlar (8). Mutasyon, DNA ya da kromozom yapısında bir değişiklik oluşturan olaydır. Mutasyonlar hastalık nedeni olabilir. Polimorfizmler hastalık nedeni değildir, ancak hastalığa yatkınlık nedeni olabilirler. Normal popülasyonda %1'den daha fazla sıklıkta olan değişimler, polimorfizm olarak kabul edilmektedir (8, 14, 15). Polimorfizmler, mutasyonlardan popülasyonda daha yüksek sıklıkta varyant alleller olarak bulunmalarıyla ayrılırlar. %1'den daha az sıklıkta olanlar ise genellikle hastalıkla sonuçlanmaktadır. Sadece hastalıklarla sonuçlanan mutasyonlar değil, aynı zamanda bazı polimorfizmler de fonksiyonel olarak önemli olup, hastalık patogeneğinde rol oynamaktadır. Tek nükleotidi içeren değişimler, tek nükleotid polimorfizmi (SNP; single nucleotide polymorphism) olarak adlandırılır. Bir polimorfizmde yaygın olan dizi wild-type allel, nadir olan ise varyant alleldir. SNP'ler genetik polimorfizmlerin en yaygın formudur. Pozisyonlarına göre ve genetik kodu değiştirme yollarına göre, farklı alt tiplere ayrılmaktadır. Bir genin 5'UTR (untranslated region) veya 3'UTR gibi promotorda, lokalize SNP'ler üreten

protein miktarını çeşitli yollarla etkileyebilirler. Nükleotid değişiklikleri, spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirebilir. Böylece transkripsiyon oranını etkileyebilir ya da küçük mRNA stabilitesini etkileyebilir ve üretilen protein seviyesini değiştirebilir. Farklı tipteki SNP'ler, bir proteinin fonksiyonu veya regülasyonu ve ekspresyonunu değiştirebilir. En yaygın tipi, sinonim olmayan (nonsynonymous) SNP'lerdir. Bu tipteki allellerde protein ürünündeki amino asit farklıdır. Kodlayıcı bölgedeki SNP'ler klinik olarak oldukça önemli potansiyele sahiptirler. Yapısal/ fonksiyonel olarak farklı bir amino asit değişimi sadece proteinin yapısı ve / veya stabilitesini etkilemez. Aynı zamanda protein-protein etkileşim yollarını da bozabilir. Bu yapıyla ilgili etkilere ilave olarak, daha kompleks seviyelerde gerçekleşen polimorfizmlerde vardır. Özellikle intron-ekzon sınırlarında olmak üzere ekzon veya intronlardaki varyasyonlar alternatif splicingi etkileyebilir ve böylece farklı protein formlarının üretilmesine yol açabilir. Locus kontrol bölgelerindeki polimorfizmler ise potansiyel olarak gen ekspresyonunu etkileyebilir, hastalıklarla sonuçlanabilir. Böylece SNP'ler çok farklı etkilere sahip olabilirler (8).

3.18.2. SOST gen polimorfizmlerinin osteoporoz ve hastalıklarla olan ilişkisi

Yapılan çalışmalarda, SOST geniyle ilgili olarak, 26 polimorfizm tanımlanmıştır. Genin en fazla SNP 3, 5, 6, 8 ve 9 varyantları çalışılmıştır. Gen varyantları 1016'sı kadın, 923'ü erkek olan, yaşları 55 ile 80 arasında değişen, 1939 yaşlı, beyaz bireyde çalışılmıştır. İleri yaşlı kadınlarda SOST geninin, promotor bölgesinde (SRP3) oluşan 3bp.lık insersiyonun, allel-doz bağımlı

olarak, femur boynu ve lomber vertebra KMY'sinde anlamlı bir azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Benzer biçimde Van Buchem Hastalığı delesyon bölgesindeki G varyantının (SRP9), erkeklerde femur boynu ve lomber vertebra KMY'sinde anlamlı artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SOST-COLIA1 Sp1 polimorfizminin yaşla orantılı olarak, lomber KMY üzerinde additif etki yaptığı bulunmuştur. SRP3 ve SRP9 polimorfizmlerinin, KMY üzerine etkilerinin küçük olduğu, fakat yaş arttıkça bu etkinin doğru orantılı olarak artma eğilimi gösterdiği bulunmuştur. Kadın ve erkekteki varyantların farklı olması ve yaşla beraber KMY üzerindeki etkilerinin artmasından dolayı, bu polimorfizmlerin cinsiyet ve yaşla modifiye olduğu rapor edilmiştir (68).

3.19.Çalışmanın Amacı

SOST gen polimorfizmleri ile siklerosteozis ve Van Buchem gibi hastalıklar arasında ilişkiler bulunmuştur (6,11). Fakat literatür taramalarında, postmenapozal osteoporoz ile SOST gen mutasyon ve polimorfizmleri arasındaki ilişkilerin araştırıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Kemik mineral dansite ölçümü ile osteoporozu tespit edilen ve osteoporoz tespit edilmeyen postmenapozal hastalarda, SOST gen polimorfizmi ve KMY arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Çalışma Grubu

Mayıs 2008- Eylül 2009 tarihleri arasında, Fırat Üniversitesi Hastanesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı polikliniğine osteoporoz tanısı amacıyla başvuran hastalardan, kemik erimesi kemik yoğunluk ölçümü DEXA ile tespit edilmiş 126 osteoporozlu kadın (Grup I) ile kemik yoğunluğu normal değerler içeren 78 kadın (Grup II) olmak üzere toplam 204 postmenopozal kadın çalışma kapsamına alınmıştır. Hasta olarak kullanılacak bireylere çalışma hakkında bilgi verilerek hasta rıza formu doldurularak izinleri alındı.

Olgular, osteoporozu olanlar (kemik mineral yoğunluğu, lomber T skoru<-2,5) hasta grubu (**Grup I**) ve kemik mineral yoğunluğu çok iyi olanlar (lomber T skoru>+1) kontrol grubu (**Grup II**) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tüm olguların yaş, gravida, parite, menopoz süresi, menopoz tipi, sistemik hastalık varlığı gibi anamnez bilgileri not edildi. Olguların boy (cm), kilo (kg), vücut kitle indeksi (VKİ) bulguları da not edildi.

Olguların kemik mineral yoğunluğu ölçümünde dual enerji x-ışını absorbsiyometri (DEXA, LUNAR DPX) yöntemi kullanıldı. L1-L4 vertebra ve femur başı KMY ölçümleri yapıldı. Lomber vertebra ve total kalça KMY ölçümleri istatistikte kullanıldı.

Postmenopozal kırık hikayesi olanlar, böbrek yetmezliği olanlar, diabetik olanlar, karaciğer yetmezliği olanlar ve osteoporoz eğilim oluşturan tedavi alan hastalar çalışmaya alınmadı.

4.2. DNA izolasyonu

İncelemeye alınan tüm olguların DNA izolasyonları gerçekleştirilerek polimorfizm çalışmaları için ayrıldı.

4.2.1. Kullanılan solüsyon ve gereçler

DNA purifikasyon kiti (Promega Cat.#1125), 1.5 ml'lik tüpler (Axygen scientific MCT-150-A), 100 ve 1000 µl'lik pipet (Eppendorf Research Series2100 pipettes, Germany), pipet uçları (Deltalab 327-17), mikrosantrifüj, vorteks, izopropil alkol, % 70'lik etil alkol.

4.2.2. İzolasyon işlemi

1. 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 900 µl cell lizis solüsyonu eklendi.
2. Kan tüpü kanın tamamen karışması sağlanana kadar hafifçe sallandı, sonra 300 µl kan cell lysis solusyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Karışması için tüp 5-6 kez alt-üst edildi.
3. Kırmızı kan hücrelerinin lizisi için 10 dakika oda ısısında bekletildi, bu esnada tüp 2-3 defa alt-üst edildi. 13000-16000 rpm'de de 20 saniye santrifüj edildi.
4. Görünen beyaz pellete dokunmaksızın süpernatant yaklaşık 10-20 µl residüel sıvı bırakacak şekilde atıldı.
5. Beyaz kan hücreleri resüspanse olana dek tüp 10-15 saniye kadar hafifçe vortekslendi.
6. 300 µl Nuclei lysis solüsyonu resüspanse hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi. Beyaz kan hücrelerinin lizisi için solüsyon 5-6 kere pipetlendi.

Solüsyonun visköz bir hale geldiği gözlemlendi. Karıştırma sonunda, hücre çökeltileri görünürse, bunlar çözülene kadar, solüsyon 37°C de inkübe edildi. Eğer 1 saat sonra hala çökeltiler görülüyorsa, ek olarak 100 µl nuclei lysis solüsyonu ilave edilip inkübasyon tekrarlandı.

7. 1.5 µl Rnase solüsyonu eklendi ve tüp 25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Karışım 37°C de 15 dakika inkübe edildi. Devam etmeden önce, karışımın oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
8. Nükleer pellete, 100 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi. 10-20 saniye vortekslendi. Vortekslemeden sonra küçük protein çökeltileri görüldü.
9. 13 000-16 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Koyu kahverengi protein pelleti görüldü.
10. İçinde DNA bulunan süpernatant, içine 300 µl isopropanol konulmuş temiz bir 1.5 ml lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak karıştırıldı.
11. Solüsyon alt-üst edilerek ağ şeklinde DNA kütlesi görülene kadar karıştırıldı.
12. 13 000-16 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. DNA küçük beyaz bir pellet şeklinde görüldü.
13. Süpernatant atılarak 300 µl %70 lik etanol eklendi ve -20°C'de saklandı.

4.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin ölçülmesi

DNA konsantrasyonu ve saflık derecesinin belirlenmesi UV spektrofotometresi ile yapılabilmektedir. DNA örneğinin içerisinde bulunduğu

solüsyon tarafından absorbe edilen UV miktarı örnekteki DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Absorbans 260 nm dalga boyunda ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçümlerde çift iplikli DNA için absorbans değeri 50 ug/ml’lik konsantrasyon değerlerine karşılık gelir. UV absorbansı DNA’nın saflığının belirlenmesinde de kullanılabilir (260nm.’de nükleik asitler, 280 nm.’de de proteinler maksimum absorbans verir). Saf bir DNA örneğinin, spektrofotometrede 260 ve 280 nm’deki absorbans oranı (A_{260nm}/A_{280nm}) 1.8’dir. Bulduğumuz değer 1.8’e ne kadar yakınsa kalite o kadar yüksektir. Bu değer elimizdeki DNA örneğinin kalitesini gösterir. RNA’da ise 2 dir. Eğer ortamda fenol ve protein fazla ise oran bu değerlerden daha düşük olur. Bu değer 2 nin üstünde ise RNA ortamda fazladır. Bu durumda eldeki materyal kontamine olmuştur demektir. Bu da ya çeşitli yöntemler uygulanarak saflaştırılmalıdır ya da yeniden elde edilmelidir (70). Hasta ve kontrol grubuna ait DNA örnekleri ölçülerek konsantrasyonları ve saflıkları belirlendi. 1.8’e yakın olmayan değerlere sahip örneklerin DNA’ ları tekrar izole edildi.

4.3. PZR Çalışması

4.3.1. PZR protokolü

- 20°C’de saklanmış olan DNA’lar çıkartılarak 1 dakika 13000 rpm’de santrifüj edildi ve üstte kalan % 70’lik etanol atıldı. DNA örneklerinin üzerine 50 µl distile su konarak oda ısısında 1 saat, takiben 37°C ‘lik etüvde bir gece beklemeye bırakıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu DNA’nın bir bölümünü in vitro ortamda çoğaltıp, manuple edilir hale getirmek için kullanılan hızlı bir yöntemdir. PZR tekniği, DNA’nın istenilen bölgesinin, 20-30 bazlık spesifik oligonükleotid

primerler kullanılarak, ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz olan Taq DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılması işlemine dayanır.

4.3.2. Kullanılan solüsyonlar

Hasta DNA'ları, H₂O, dNTP seti, MgCl₂, 10X Taq DNA Polimeraz Buffer, Taq polimeraz, agaroz, DNA boyut markırı, 5XTBE tamponu, yükleme tamponu, EtBr (Etidium Bromür) ve NlaIII, Nco I restriksiyon enzimleri. SOST geni için kullanılan primerler aşağıda verilmiştir.

4.3.3. Kullanılan Cihazlar

Agaroz jel tankı ve düzeneği, agaroz jel elektroforez güç kaynağı (Consort N.V. Parklaan 36 B-2300 Turnhout, Belgium), eppendorf mastercycler gradient (Netheler Mlnz GmbH, 23331 Hamburg, Germany), UV lambası ve ilgili okuma, kaydetme, fotoğraflama ünitesi (TCP-20-M, Vilber Lourmat, Cedex, France), otomatik mikropipetler (Eppendorf, France), soğutmalı mikrosantrifüj (Ole Dich Intrumentmakers APS, type 157MP, Germany), elektronik hassas terazi (Shimadzu Corporation Libror AEG-320, Japan), etüv(Nüve, NP 400, Türkiye), elektro-mag(Türkiye), PH metre (Hana Intruments HI8521 pHmeter, Italy), otoklav (Nüve, Türkiye), buzdolabı (Arçelik, Türkiye), derin dondurucu -20°C, Uğur (Türkiye), su banyosu (Kötterman labortechnik type 3643, Germany), vorteks (Labinco L46, The Netherlands).

4.3.4. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan kimyasallar

Borik asit (Merck, Frankfurt, Germany)

EDTA (Sigma, Germany)

Tris Hcl (Sigma, Germany)

Etidium bromide (Sigma, Germany)

Ficol (Serva, Germany)

Bromofenol mavisi (Serva, Germany)

Xylene cyanol(Serva, Germany)

Mutlak etanol (Kimetsan, Türkiye)

100bç.'lik DNA boyut markırı (Fermentas, Litvanya)

Agaroz (Sigma, Germany)

4.3.5. Polimorfizmlerin tayininde kullanılan çözeltiler

Agaroz jel yükleme tamponu (6X)

%15 ficol

%0.05 bromfenol mavisi

%0.05 ksilen siyanol

4.4. SOST genindeki polimorfizmlerin çalışılması

SOST geninde rs17885799, rs851054, rs17886183, rs865429 polimorfizmlerinin değerlendirilmesi için www.ensembl.org web adresi kullanılarak genlerin tam dizilerine ulaşıldı ve primer dizayn edildi. Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde amplification refractory mutation system

(ARMS) ve restriction fragment length polymorphism (RFLP) yöntemleri kullanıldı.

ARMS yöntemi, herhangi bir restriksiyon enzim kesim bölgesi değişikliğine neden olmayan nokta mutasyonlarının tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hasta bireye ait DNA örneği, mutasyonlu ve normal bölgeye özgü primerler ile iki farklı tüpte, aynı reaksiyon koşulları altında amplifiye edilir. Ayrıca, her iki reaksiyon tüpünün içinde, amplifikasyon kontrolü için kontrol-primerler kullanılır. Amplifikasyon sonucu, kontrol bölgenin tüm bireylerde amplifikasyon pozitif olması beklenir. Bununla birlikte, homozigot mutant bireyler, mutant bölge için amplifikasyon pozitif; homozigot normal bireyler, normal bölge için amplifikasyon pozitif ve heterozigotlar hem mutant hem de normal bölge için amplifikasyon pozitif olurlar.

RFLP yönteminde PZR ile çoğaltılan ilgili DNA molekülü, restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak kesilir. Restriksiyon endonükleaz enzimleri DNA'nın bilinen nükleotit dizilimlerini tanıyıp, spesifik olarak bu noktalardan keserler. Daha sonra kesilmiş DNA'nın agaroz jel üzerinde seperasyonu yapılır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri tanıma bölgelerinin bulunup bulunmamasına bağlı olarak allelik varyantlar agaros jelde görüntülenmekte ve genetik farklılık tespit edilebilmektedir. RFLP yöntemi kullanılırken özellikle seçilen enzimin star aktiviteye sahip olmaması tercih edildi.

4.4.1. SOST genindeki (rs17885799) polimorfizminin çalışılması

SOST(rs17885799) genindeki G'den A'ya (-22 G>A) dönüşümünde polimorfizmin tespitinde ARMS yöntemi kullanıldı.

Tablo 2. SOST genine ait rs17885799(-22 G>A) polimorfizmi için dizayn edilen primerler.

AGTTGGGACCAATGGGATTCTTTAAAAGCATCTTTTGCCTCTGGCTGGGTCTATGG
GGGTCAAACAGAAACGCCTTGGGCCATTTGTTGGTGGGGTGACAAATGAACTTGGCC
TGAGAAATGGAATAGGCCGGGCTCAGCCCCGCGAAGCACTCAGAACTGCACATTTTC
TTTGTTGAGCGGGTCCACAGTTTGTGTTTGAAGAATGCCCCAGGGCCCAGGGAGACAGAC
AATTAAAAGCCGGAGCTCATTTTGATATCTGAAAACCACAGCCGCCAGCACGTGGGA
GGTGCCGGAGAGCAGGCTTGGGCCTTGCTCACACGCCCCCTCTCTCTGGGTCACCTG
GGAGTGCCAGCAGCAATTTGGAAGTTTGCTGAGCTAGAGGAGAAGTCTTTGGGGAG
GGTTTGCTCTGAGCACACCCCTTTCCCTCCCTCCGGGGCTGAGGGAAACATGGGACC
AGCCCTGCCCCAGCCTGTCCTCATTGGCTGGCATGAAGCAGAGAGGGGCTTTAAAA
AGGCGACCGTGTCTCGGCTGGAGACC**AGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGGCGTGC**
CCTCCTCTGGCTGGTACCATGCAGCTCCCACTGGCCCTGTGTCTCGTCTGCCTGCTGGT
ACACACAGCCTTCCGTGTAGTGGAGGGCCAGGGGTGGCAGGCGTTCAAGAATGATG
CCACGGAAATCATCCCCGAGCTCGGAGAGTACCCCGAGCCTCCACCGGAGCTGGAG
AACAACAAGACCATGAACCGGGCGGAGAACGGAGGGCGGCCTCCCCACCACCCCTTT
GAGACCAAAGGTATGGGGTGGAGGAGAGAATTCTTAGTAAAAGATCCTGGGGAGGTT
TTAGAAACTTCTCTTTGGGAGGCTTGGAAGACTGGGGTAGACCCAGTGAAGATTGCTG
GCCTCTGCCAGCACTGGTCGAGGAACAGTCTTGCTGAGGTGGGGGAAGAATGGCT
CGCTGGTGCAGCCTTCAAATTCAGGTGCAGAGGCATGAGGCAACAGACGCT

Primerler http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html web

adresinde verilen program kullanılarak dizayn edildi.

Forward(ileri iç) primer(G allele): 5' CAGAGCCTGTGCTACTGGAAGGTGTCG-3'

Reverse (geri iç) primer (A allele): 5'-GCATGGTACCAGCCAGAGGAGGGAAT-3'

Forward (ileri dış) primer: 5'-GAAGTCTTTGGGGAGGGTTTGCTCTGAG-3'

Reverse (geri dış) primer: 5'-GGATGATTTCCGTGGCATCATTCTTGAA-3'

PZR sonucunda A alleli için 161 bç. (baz çifti)'lik, G alleli için 205 bç'lik ve 2 dış primer için ise 313 bç'lik büyüklükte ürünler elde edilmektedir.

4.4.2. SOST genindeki (rs851054) polimorfizminin çalışılması

SOST (rs851054)geninin G'den A'ya dönüşümünde (4534 G>A), polimorfizmin tespitinde ARMS yöntemi kullanıldı.

Tablo 3. SOST genine ait rs851054 (4534 G>A) polimorfizmi için dizayn edilen primerler

GTGCCTGTCACAGTGCACAGGATCCCTGAGGAGCATGAGCTGGGATTTCCTCTGTGCT		
GTCCATCACAGGAGCCTGAGTGACCAGCGCATCCTCGATTGTAAACCAGAATCCTGC		
CCTCTCTCCCAAGCGGGCACCCCTTGCTCTGACCCTCTAGTTCTCTCTCTTGCCTTCCA		
GAGAATACCAAGAGAGGCTTTCTTGTTAGGACAATGAATGCTGAGACTTGTGGAGT		
TGGGACCAATGGGATTTCTTTAAAAGCATCTTTTGCCTCTGGCTGGGTCTATGGGG		
GTCAAACAGAAACRCCTTGGGCCATTTGTTGGTGGGGTGACAAATGAACTTGGCC		
TGAGAAATGGAATAGGCCGGGCTCAGCCCCGCGAAGCACTCAGAACTGCATTTTCTTT		
GTTGAGCGGGTCCACAGTTTGTTTTGAGAATGCCCGAGGGCCCAGGGAGACAGACA		
TTAAAAGCCGGAGCTCATTTTGATATCTGAAAACCACAGCCGCCAGCACGTGGGAGG		
TGCCGGAGAGCAGGCTTGGGCCTTGCCCTCACACGCCCCCTCTCTCTGGGTACCTGGG		
AGTGCCAGCAGCAATTTGGAAGTTTGC		
Primerler	http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html	web

adresinde verilen program kullanılarak dizayn edildi.

Forward (ileri iç) primer (C allele):5'-TGGCTGGGTCTATGGGGGTCAAACAGACAC-3'

Reverse (geri iç) primer (T allele):5'-CACCCACCAACAAATGGCCCAATGA-3'

Forward (ileri dış) primer:5'-ACCAGAATCCTGCCCTCTCTCCCAAGCG-3'

Reverse (geri dış) primer:5'-TAATTGTCTGTCTCCCTGGGCCCTCGGG-3'

PZR sonucunda A alleli için 192 bç'lik, T alleli için 223 bç'lik ve 2 dış primer için ise 359 bç'lik büyüklükte ürünler elde edilmektedir.

4.4.3. SOST genindeki rs17886183 polimorfizminin çalışılması

SOST (rs17886183) genindeki G'den A'ya dönüşümünde kullanılan primer ve enzim aşağıda verilmiştir.

Tablo 4. SOST genine ait rs17886183 (*1004 G>A) polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve NlaIII (Hsp92I) restriksiyon enzim kesim bölgesi

TGACAAACTCCTGGAAGAAGCTATGCTGCTTCCCAGCCTGGCTTCCCCGGATGTTTGG
CTACCTCCACCCCTCCATCTCAAAGAAATAACATCATCCATTGGGGTAGAAAAGGAG
AGGGTCCGAGGGTGGTGGGAGGGATAGAAATCACATCCGCCCAACTTCCCAAAGA
GCAGCATCCCTCCCCGACCCATAGCCATTTTAAAGTCACCTCCGAAGAGAAGTG
AAAGGTTCAAGGACACTGGCCTTGCAGGCCGAGGGAGCAGCCATCACAACTCACA
GACCAGCACATCCCTTTTGAGACACCGCCTTCTGCCCACCACTCACGGACACATTTTC
TGCCTAGAAAACAGCTTCTTACTGCTCTTACATGTGATGGCATATCTTACACTAAAAG

Primerler http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html web adresinde verilen program kullanılarak dizayn edildi.

Forward outer(ileri dış) primer:5'-GTAGAAAAGGAGAGGGTCCGAGGGTGGT-3'

Reverse outer(geri dış) primer:5'-CTAGGCAGAAATGTGTCCGTGAGTGGTG-3'

Amplifikasyon sonucunda 247 bç'lik PZR ürünü elde edilmektedir.

Restriksiyon enzimi: NlaIII enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır.



Restriksiyon enzim kesim sonrası A alleli için 176 bç. ve G alleli için 127 bç'lik ürünler elde edildi.

Wild: 127bç (GG)

Mutant: 247bç (AA)

Heterozigot: 247bç +176bç +127bç (AG)

4.4.4. SOST genindeki rs865429 polimorfizminin çalışılması

SOST (rs865429) genindeki C'den T'ye dönüşümünde kullanılan primer ve enzim aşağıda verilmiştir.

Tablo 5. SOST genine ait rs865429 (220+675 C>T) polimorfizmi için dizayn edilen primerler ve NcoI restriksiyon enzim kesim bölgesi.

TAAGGGAGCCTCCCATCCACAGAACAGCACCTGTGGGGCACCGGACACTCTATGCTG
GTGGTGGCTGTCCCCACCACACAGACCCACATCATGGAATCCCCAGGAGGTGAACCC
CCAGCTCGAAGGGGAAGAAACAGGTTCCAGGCACTCAGTAACTTGGTAGTGAGAAG
AGCTGAGGTGTGAACCTGGTTTGATCCAAGTAGCCCTGGTGTGTGGGGGG
GTGTGGGGGACAGATCTCCACAAAGCAGTGGGGAGGAAGGCCAGAGAGGCACCCCT
GCAGTGTGCATTGCCCA^YGGCCTGCCCAGGGAGCTGGCACTTGAAGGAATGGGAGTT
TTCGGCACAGTTTTAGCCCCTGACATGGGTGCAGCTGAGTCCAGGCCCTGGAGGGGA
GAGCAGCATCCTCTGTGCAGGAGTAGGGACATCTGTCCTCAGCAGCCACCCCAGTCC
CAACCTTGCCCTCATTCCAGGGGAGGGAGAAGGAAGAGGAACCCTGGGTTCCTGGTC
AGGCCTGCACAGAGAAGCCCAGGTGACAGTGTGCATCTGGCTCTATAATTGGCAGGA
ATCC TGAGGCCATG GGGGCGTCTG AAATGACACT

Primerler http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/primer1.html web adresinde verilen program kullanılarak dizayn edildi.

Forward outer(ileri dış) primer:5'-CAGGAGGTGAACCCCCAGCTCGAAGGGG-3'

Reverse outer(geri dış) primer:5'-AGGCAAGGTTGGGACTGGGGTGGCTGCT-3'

Amplifikasyon sonucunda 365 bp'lık PZR ürünü elde edilmektedir.

Restriksiyon Enzimi: NcoI enziminin özgün kesim bölgeleri aşağıda yer almaktadır.



Restriksiyon enzim kesim sonrası C alleli için 193bç. ve T alleli için 228 bç.'lik ürünler elde edildi.

Wild: 193bç (CC)

Mutant: 228bç (TT)

Heterozigot: 193bç + 228bç + 365bç (CT)

SOST genine ait rs17885799, rs851054, rs865429 ve rs17886183 olmak üzere bu dört polimorfizmin doğrulanması için DNA dizileme yapıldı. Bu amaçla her bir polimorfizm için wild, heterozigot ve mutant olduğu ARMS ve RFLP yöntemi ile tespit edilen örnekler PZR ile çoğaltıldı. Laboratuvarlarımızda DNA dizileme cihazı bulunmadığından örnekler Ortadoğu Teknik Üniversitesine bağlı Ref Gen, Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Merkezine gönderildi. Tüm DNA dizilemeleri bu birim tarafından gerçekleştirildi.

4.5. PZR Kurulması İşlemi

Her bir tüpe 10 µl hasta DNA'sı ve üzerine 6 µl MgCl₂ (2.5mM), 6 µl 10X buffer, 6 µl dNTP (2.5mM), 1 µl primer 1 (30pmol), 1 µl primer 2 (30pmol), 0.3 U Taq DNA polimeraz ve 19.7 µl ddH₂O konuldu. Hazırlanan tüpler vortekslendi ve PZR cihazında çift sarmal DNA moleküllerini denatüre etmek için yalnızca bir döngü olmak üzere 96°C'de 3 dakika, denatürasyon (melting) için 96°C'de 30 saniye, yapışma (annealing) için 56°C'de 1 dakika, uzatma (extension) için 72°C'de 1 dakika olmak üzere toplam 35 döngü gerçekleştirildi. En son döngüdeki uzatma periyodu 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi ve

örnekler 4°C'ye kadar hızla soğutuldu. Daha sonra bu PZR amplikonları agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

4.6. Agaroz Jel Elektorforezi

Elde edilen PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde koşturuldu. % 2'lik agaroz jelin hazırlanmasında 2 gr agaroz tartılarak üzerine 100 ml 0.5XTBE eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. Eriyen agaroz-TBE solüsyonu içerisine 7 µl EtBr konuldu ve agaroz-TBE solüsyonu içinde iyice karışması sağlandı. Hazırlanan solüsyon daha önce kenarları bantlanmış olan elektroforez aparatına döküldü ve donmaya bırakıldı.

PZR ürünlerinden 13 µl alınarak 3 µl yükleme boyasıyla karıştırılıp kuyucuklara yüklendi. Her yükleme işleminde 100 bp'lik DNA boyut markırı kullanılarak karşılaştırma ve kontrol işlemleri yapıldı.

4.7. PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi

Kesim 20 µl üzerinden yapıldı. 10 µl PZR ürünü, 2 µl 10X buffer, 4 ünite restriksiyon enzimi ve bunlara ilave olarak suyla toplam hacim 20 µl'ye tamamlandı. Kesim işlemi 37° C'de 16 saat bekletilmek suretiyle gerçekleştirildi. İki enzim için de aynı restriksiyon enzim kesim protokolü uygulandı.

4.8. Kesim ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde incelenmesi

DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması için, standart bir metot olarak, agaroz jel kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforezi ile yaklaşık 60-0.1kb. uzunluğunda DNA parçaları ayrılabilir. Jeldeki DNA bantları

jelin bir floresans boya alan etidyum bromür(EtBr) ile boyanması ve jelin ultraviyole ışık altında incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA kolayca saptanabilir.

Agaroz jel boyunca DNA parçacıklarının elektroforetik yürüme hızları temel olarak dört parametreye bağlıdır. Bunlar; DNA'nın moleküler büyüklüğü; DNA'nın konformasyonu agaroz konsantrasyonu ve uygulanan akımdır.

Yapılan bu çalışmada PZR ile çoğaltılmış PZR ürünlerinin tanımlanması ve restriksiyon enzimi ile kesimi yapılan PZR örneklerinin görüntülenmesi için agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Elde edilen büyüklükteki ürünleri tanımlayabilmek için %2,5'luk jel kullanıldı. Kullanılan elektroforez düzeneğine uygun hacim; toz halindeki agarozun 0.5X TBE tamponunda manyetik karıştırıcı bir mikrodalga fırında 55-60°C'de kaynatılarak çözülmesi ile oluşturuldu. Ardından kaynamış çözelti soğutulurken, 0.25µg/ml EtBr ilave edildi. Kuyuları oluşturacak olan tarak, tabağına yerleştirildikten sonra hazırlanan jel, hava kabarcığı kalmayacak şekilde buraya döküldü. Jelin polimerizasyonu sonrası tarak dikkatlice çıkarılarak jel platformu 0.5X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Bu tampondan jelin üzerine 1-2mm. geçecek kadar eklendi. Örnekler ve belirteç DNA, 6 X yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılarak her bir kuyuya 15 µl. yüklendi. Güç kaynağı 90V'a ayarlandı. Yaklaşık yarım saat sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel görüntüleme sisteminde UV ışını altında jeldeki bantlar incelendi (1, 14).

4.9. İstatistik Analizler

İstatistiklerin hazırlanmasında SPSS for Windows 12,0 paket istatistik programı (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc. Chicago IL USA) kullanıldı. Parametreler arası ilişkiler Pearson korelasyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Hasta ve kontroller genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Ki-kare analizi ile yapıldı. Gruplar arası farkların değerlendirilmesinde nonparametrik bir test olan varyans analizi kullanıldı. Değerlendirmelerde $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Grup I'de 126, grup II'de 78 olmak üzere toplam 204 hasta değerlendirildi. Yaş ortalamaları grup I için $58\pm6,26$ yıl, grup II için $54\pm6,31$ yıl idi. Kilo ortalamaları grup I'de $67\pm12,77$ kg ve grup II'de $77\pm11,27$ kg idi. Boy ortalamaları grup I'de $151\pm6,23$ cm ve grup II'de $156\pm5,78$ cm idi. Lomber kemik yoğunluğu grup I'de $0,882\pm0,102$ gr/cm² ve grup II'de $1,147\pm0,249$ gr/cm² idi. Femur kemik yoğunluğu grup I'de $0,880\pm0,110$ gr/cm² ve grup II'de $1,070\pm0,150$ gr/cm² idi. Grupların demografik özellikleri Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 6. Grupların Demografik ve Klinik Özellikleri

Parametreler	Grup I (lomber T skor < -2,5)	Grup II (lomber T skor > +1)
Yaş (yıl)	$58\pm6,26$	$54\pm6,31$
Kilo (kg)	$67\pm12,77$	$77\pm11,27$
Boy (cm)	$151\pm6,23$	$156\pm5,78$
Lomber kemik mineral yoğunluğu (gr/cm ²)	$0,882\pm0,102$	$1,147\pm0,249$
Total kalça kemik mineral yoğunluğu (gr/cm ²)	$0,880\pm0,110$	$1,070\pm0,150$

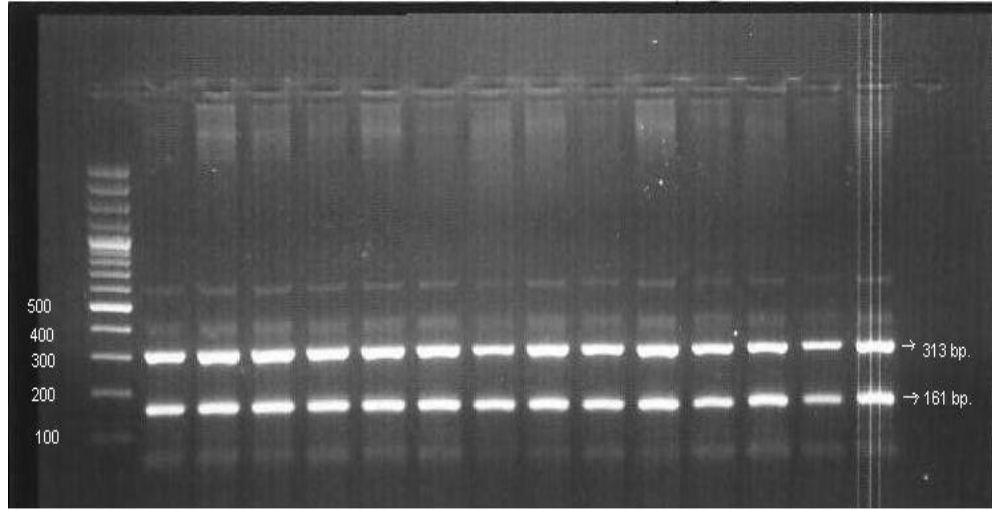
5.1. Hasta ve kontrollerde SOST rs17885799 (-22, G>A) polimorfizm dağılımları

ARMS yöntemi kullanılarak yapılan PZR çalışmasında, polimorfizm kontrol ve hasta grubunda başarıyla genotiplendirildi. DNA dizilemeyle ARMS sonuçları kontrol edildi ve doğrulandı. Şekil 1'de SOST polimorfizmine ait agaroz jel görüntüsü yer almaktadır. Şekil 2'de genotiplerin DNA dizileme sonuçları gösterilmektedir. Grup I ve II için genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Tablo

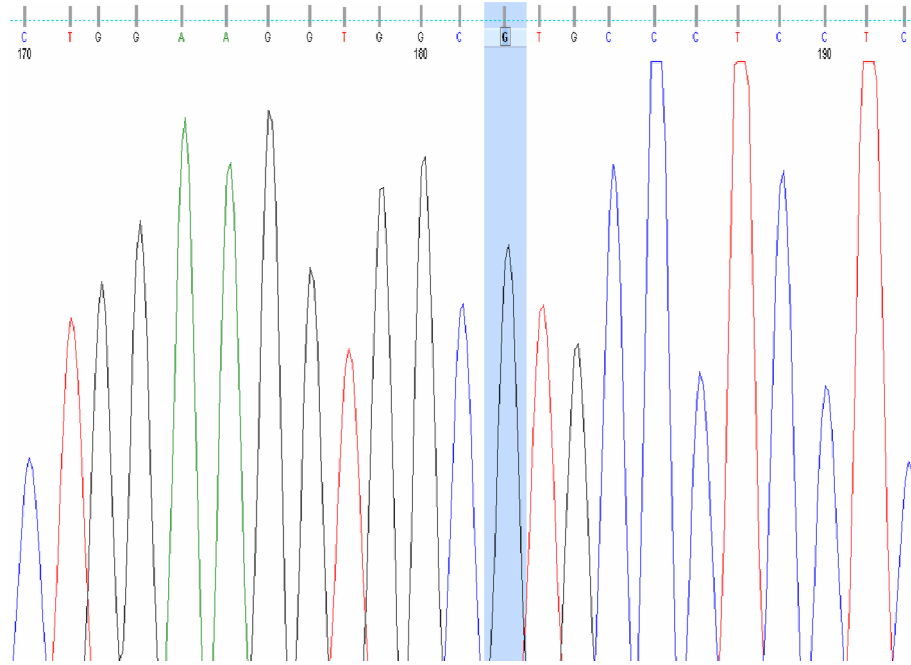
7’de gösterildi. Grup I ve II’de polimorfizm tespit edilmemiştir. G allelin grup I ve II’de artmış sıklığa sahip olduğu tespit edildi.

Tablo 7. SOST rs17885799(-22, G>A) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları.

Genotipler	GG(%)	AA(%)	AG(%)
	(Wild allele)	(Mutant allele)	(Heterozigot allele)
Grup I (n=126)	100	-	-
Grup II (n=78)	100	-	-
Alleller	G	A	
Grup I (n= 126)	%100	0	-
Grup II (n= 78)	%100	0	-



Şekil 1. SOST genindeki rs17885799 (-22, G>A) polimorfizmi için PZR’ye yönelik ARMS ‘nin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1:100 bç’lik DNA boyut markırı. Sütun 2: Dış Primer 313 bç G alleli,161 bç, A alleli 205 bç.

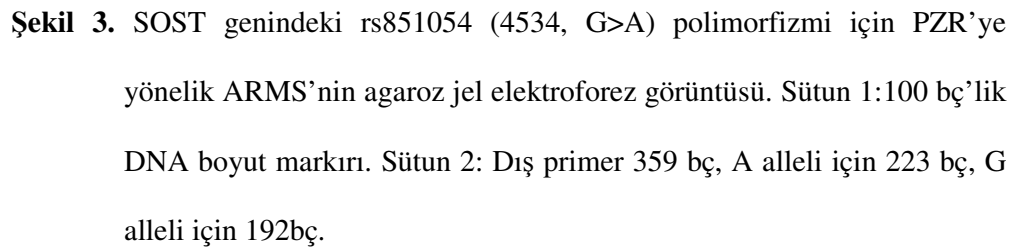


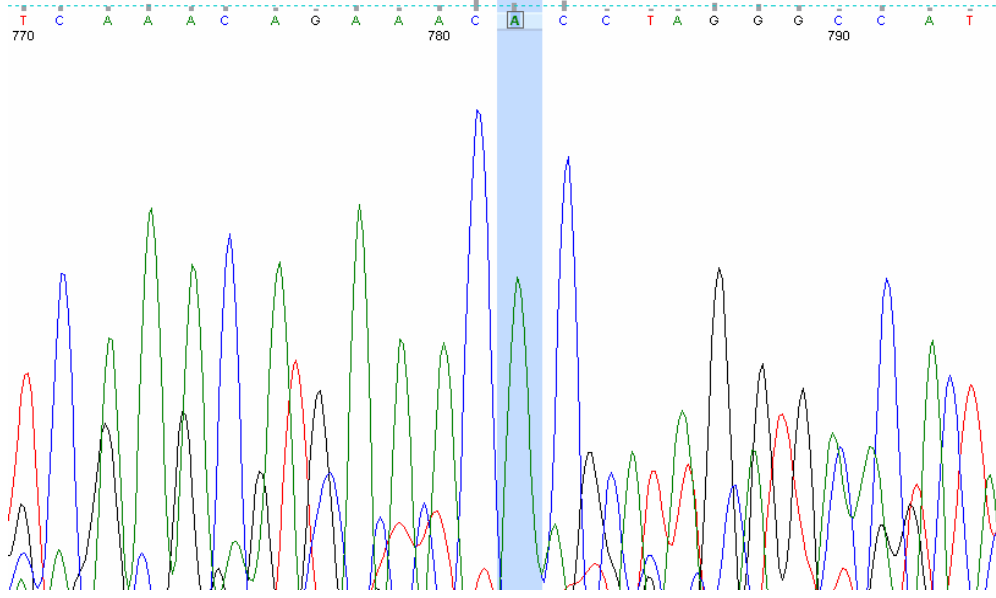
Şekil 2. SOST genindeki rs17885799(-22, G>A) polimorfizmi için GG genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (ggaagtggc↓tgcctcctc)

5.2. Hasta ve kontrollerde SOST rs851054 (4534, G>A) polimorfizm dağılımları

ARMS yöntemi kullanılarak yapılan PZR çalışmasında polimorfizm kontrol ve hasta grubunda başarıyla genotiplendirildi. DNA dizilemeyle ARMS sonuçları kontrol edildi ve doğrulandı. Şekil 3’de SOST polimorfizmine ait agaroz jel görüntüsü yer almaktadır. genotiplerin DNA dizileme sonuçları Şekil 4’de gösterildi. Grup I ve II için genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Tablo 8 ‘de gösterildi. Grup I ve II’de rs851054 polimorfizmi tespit edilmiştir. SOST allel sıklıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında varyant A allel her iki grupta tespit edilmiştir.

Genotipler	GG(%)	AA(%)	AG(%)
	(Wild allele)	(Mutant allele)	Heterozigot allele)
Grup I (n= 126)	0	100	-
Grup II (n= 78)	0	100	-
Alleller	G	A	
Grup I (n= 126)	0	%100	-
Grup II (n= 78)	0	%100	-





Şekil 4. SOST genindeki rs851054 (4534, G>A) Polimorfizmi için AA genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (aaacagaaac↓ccttgggcca)

5.3. Hasta ve kontrollerde SOST rs865429 (220+675, C>T) polimorfizm dağılımları

Wild tip bölgeyi kesen NcoI enzimi kullanılarak RFLP yöntemiyle polimorfizm her iki grupta başarıyla genotiplendirildi. DNA dizilemeyle RFLP sonuçları kontrol edildi ve doğrulandı. Şekil 5’de SOST polimorfizmine ait agaroz jel görüntüsü yer almaktadır. genotiplerin DNA dizileme sonuçları Şekil 6 ve 7’de gösterilmektedir. Grup I için genotip dağılımı; CC: 8 hasta (%6,3), TT: 93 hasta (%73,8), CT: 25 hasta (%19,8) ve Grup II için genotip dağılımı; CC:6 hasta (%7,7), TT: 61hasta (%78,2), CT: 11 hasta (%14,1). Grup I için allel frekansları; varyant allel (T) frekansı 211 (%85,73), wild allel (C) frekansı 41 (%16,26) ve Grup II için allel frekansları; varyant allel (T) frekansı 133 (%85,26), wild allel (C) frekansı 23 (%14,74) olarak tespit edildi. Her iki grupta varyant alleli tespit

edildi. Gruplar arasında hem genotip hem de allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p=0,563$). Grup I ve II için genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Tablo 9 ve Tablo 10 'da gösterilmiştir.

Tablo 9. SOST rs865429 (220+675, C>T) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları

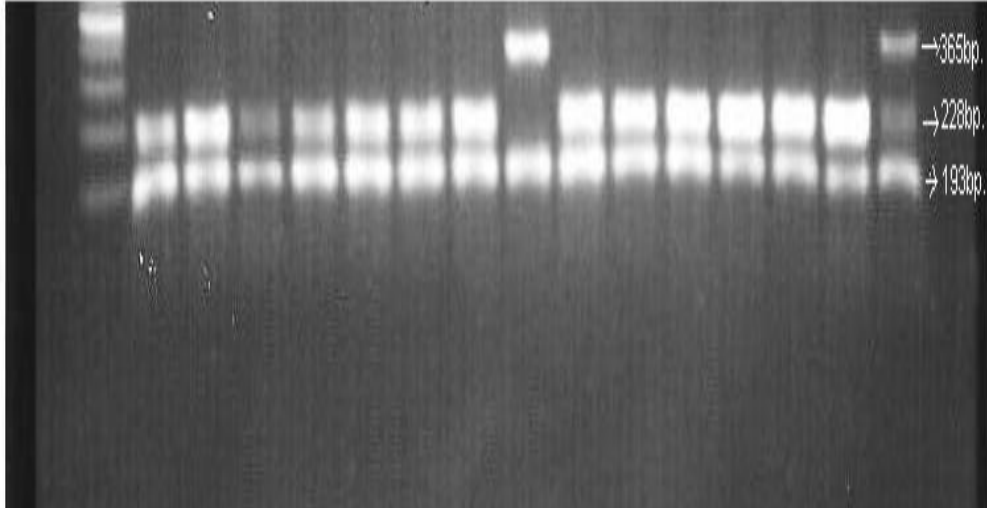
Genotip	Grup I	Grup II
CC	8(%6,3)	6(%7,7)
TT	93(%73,8)	61(%78,2)
CT	25(%19,8)	11(%14,1)
Toplam	126 (%100)	78 (%100)

P değeri:0,563

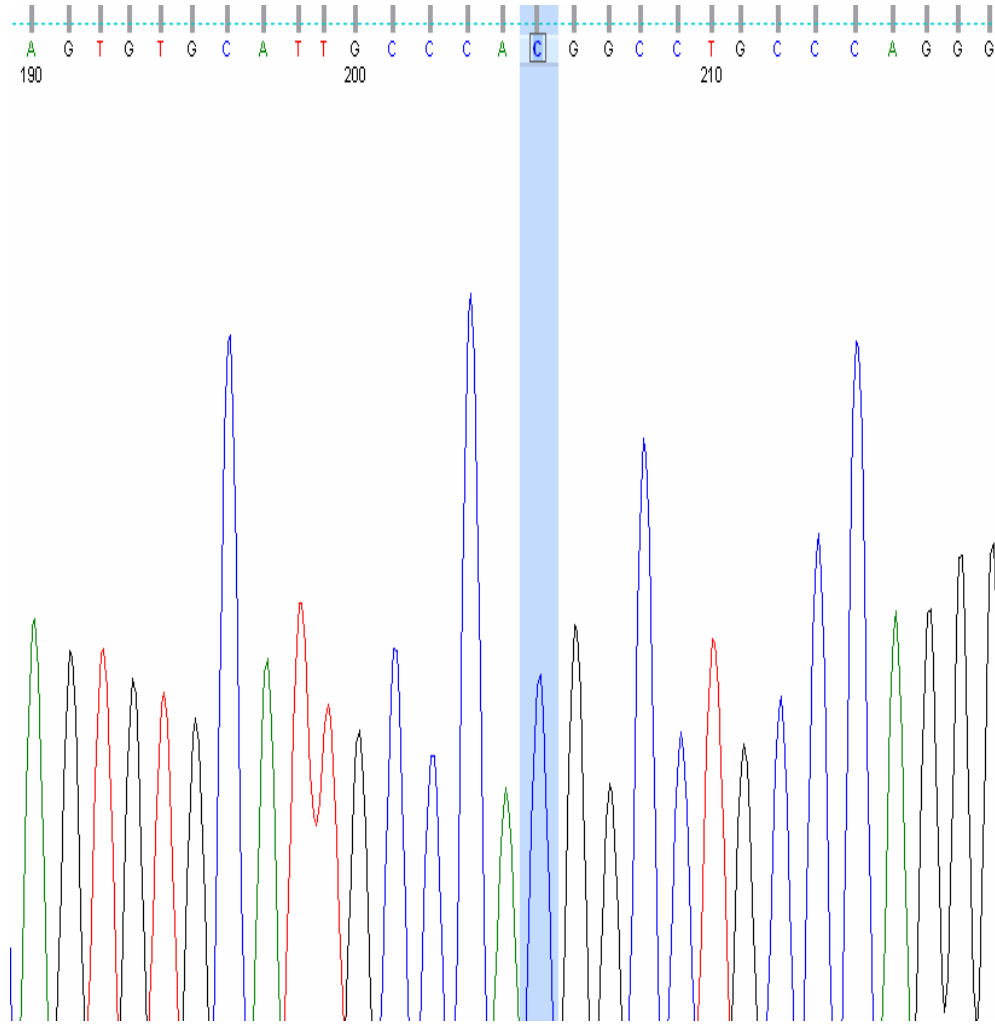
Tablo 10. SOST rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmin grup I ve II için allel dağılımları

Alleller	Grup I (%)	Grup II (%)
C	41(16,26%)	23 (14,74%)
T	211(85,73%)	133 (85,26%)
Toplam	252	156

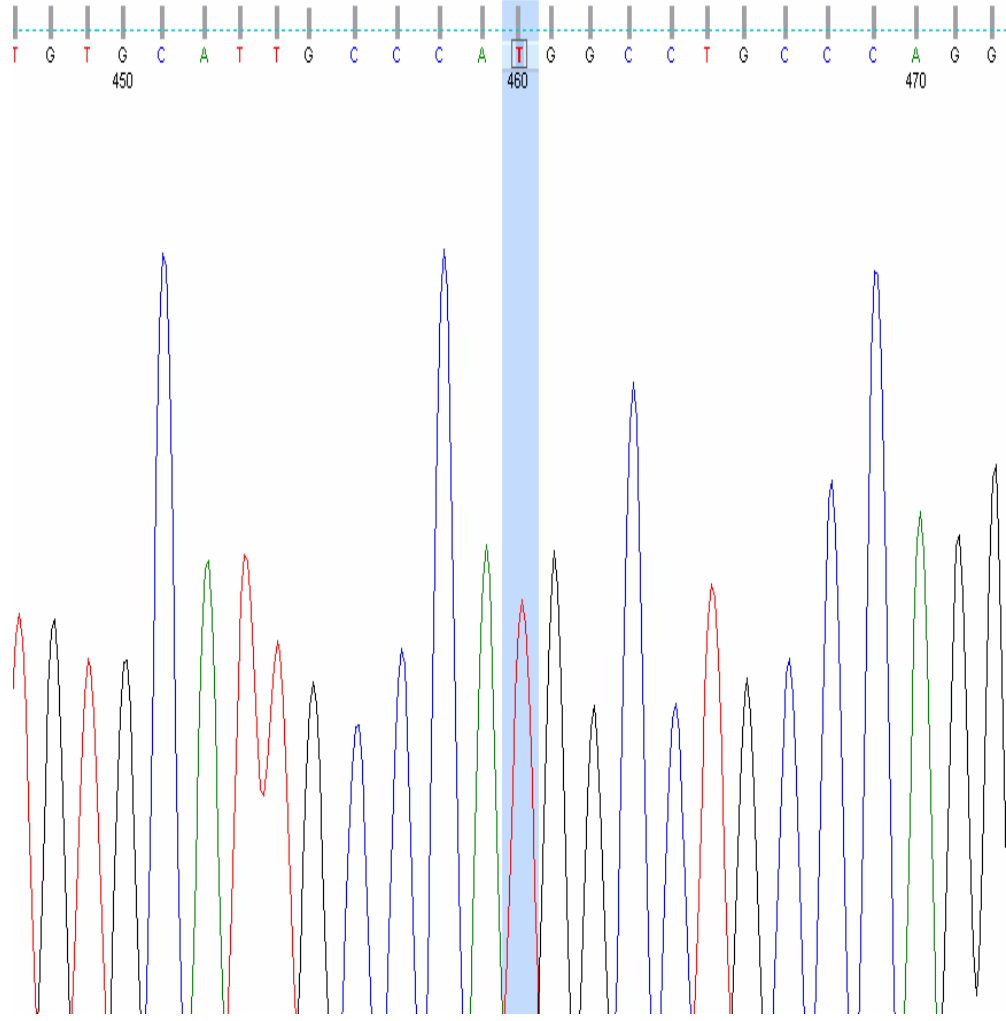
$p>0,05$



Şekil 5. SOST genindeki rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmi için PZR'ye yönelik RFLP'nin NcoI restriksiyon enzimle kesim ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun1:100 bç'lik DNA boyut markırı. Sütun 2: 228 bç (TT: mutant örnek), Sütun 8: 193bç (CC: wild örnek), Sütun 15: 193 bç+228 bç+365 bç (CT: Heterozigot örnek).



Şekil 6. SOST genindeki rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmi için CC genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gcattgccca↓ggcctgccca)



Şekil 7. SOST genindeki rs865429 (220+675, C>T) polimorfizmi için TT genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (gcattgccca↓ggcctgccca)

5.4. Hasta ve kontrollerde SOST rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizm dağılımları

Wild tip bölgeyi kesen NlaIII enzimi kullanılarak, RFLP yöntemiyle yapılan polimorfizm çalışması, gruplarda başarıyla genotiplendirildi. DNA dizilemeyle, RFLP sonuçları kontrol edildi ve doğrulandı. Şekil 8’de SOST polimorfizmine ait agaroz jel görüntüsü yer almaktadır. Genotiplerin DNA dizileme sonuçları Şekil 9’da gösterilmektedir.

Grup I için allel frekansları: A allel frekansı 10 (%3,97), G allel frekansı 242 (%96,03) ve Grup II için allel frekansları: A allel frekansı 6 (%3,85), G allel frekansı 150 (%96,15) olarak saptandı. Grup I için genotip dağılımı: AA: 3 hasta (%2,4), GG: 119 hasta (%94,4), AG: 4 hasta (%3,2) ve Grup II için genotip dağılımı: AA: 3 hasta (%3,8), GG: 75 hasta (%96,2) olarak saptandı. Her iki grupta rs17886183 varyant alleli tespit edildi. Gruplar arasında hem genotip hem de allel sıklıkları açısından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p=0,241$). Grup I ve II için genotip ve allel sıklıklarının dağılımı Tablo 11 ve Tablo 12 ‘de gösterildi.

Tablo 11. SOST rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizm genotiplerinin grup I ve II için dağılımları

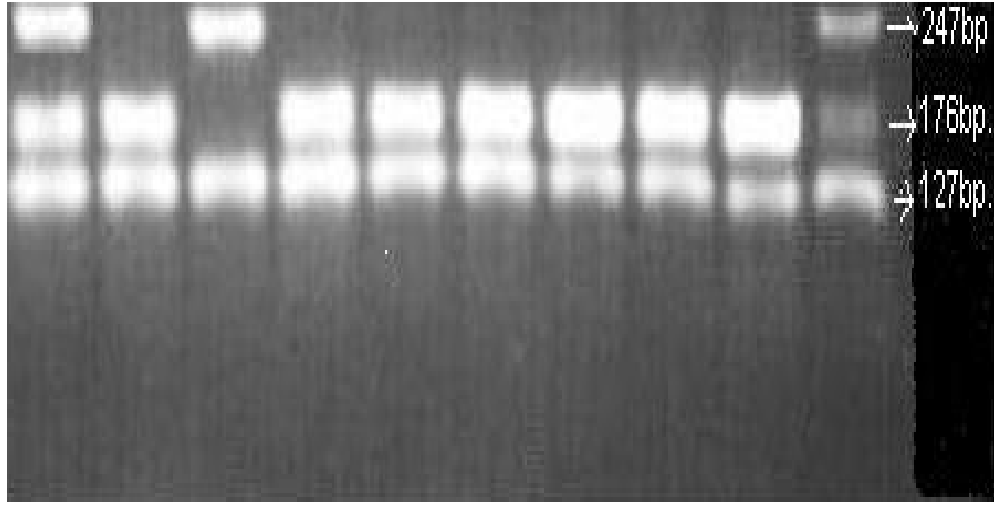
Genotip	Grup I	Grup II
AA	3(%2,4)	3(%3,8)
GG	119(%94,4)	75(%96,2)
AG	4(%3,2)	0(%0)
Toplam	126	78

p: 0,241

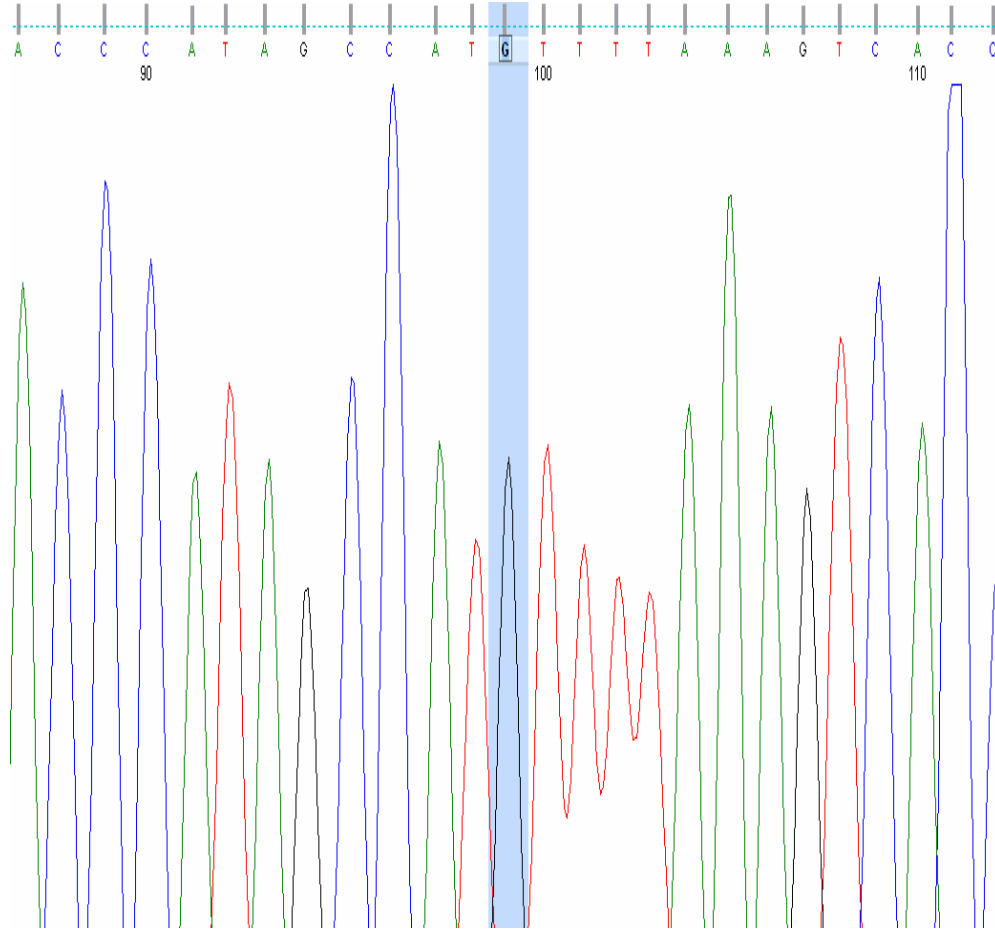
Tablo 12. SOST rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizmin grup I ve II için allel dağılımları

Alleller	Grup I (%)	Grup II (%)
A	10(3,97%)	6 (3,85%)
G	242(96,03%)	150 (96,15%)
Toplam	252	156

p>0,05



Şekil 8. SOST genindeki rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizmi için PZR'ye yönelik RFLP'nin NlaIII restriksiyon enzimle kesim ürününün agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 2: 247 bç.(AA: mutant örnek), Sütun 1 ve 10: 247 bç +176 bç +127 bç (AG: heterozigot örnek), Sütun 3: 127 bç (GG: wild örnek).



Şekil 9. SOST genindeki rs17886183 (*1004,G>A) polimorfizmi için GG genotipine ait DNA dizileme görüntüsü (ccatagccat↓ttttaaagtc)

Tablo13. rs865429 ve rs17886183 polimorfizmleri ve kemik mineral yoğunluğu arasındaki korelasyon analizi

Referans SNP (refSNP)	Lomber BMD	Femur BMD
Rs 865429	p:0,862	p:0,793
Rs 17886183	p:0,168	p:0,235

Kemik mineral yoğunluğu ile rs865429 ve rs17886183 polimorfizmleri arasında bağlantı olup olmadığını araştırmak için yapılan korelasyon analizinde istatistiksel anlamlı bir bağlantı tespit edilmedi.

6. TARTIŞMA

İlk kez Brunkow ve ark. tarafından, 2001’de tanımlandığından bu yana, SOST gen ve hastalıklar arasındaki ilişkilerin araştırıldığı pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda SOST gen polimorfizmleri ve çeşitli hastalıklar arasında ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalıklardan ‘siklerosteozi’ ve ‘Van Buchem Hastalığı’ kemik displazisi ile yakından ilgili olup, endosteal hiperosteozi olarak sınıflandırılıp, jeneralize olmuş osteosklerozis ve ilerlemiş kemik kalınlığıyla karakterize hastalıklardır (10). Van Buchem hastalığında SOST geninde delesyon tespit edilmiştir (79). Siklerosteozi’li bir ailede yapılan çalışmada da SOST geninde homozigot nonsense mutasyonlar tespit edilmiştir (44).

Siklerostin osteositler tarafından eksprese edilen, kemik oluşumunun bir inhibitörüdür. Van Bezooijen RL ve arkadaşları, Van Buchem’li hastalarda, osteositlerde ve sementositlerde siklerostin ekspresyonunun azaldığını veya olmadığını tespit etmişlerdir. Siklerostin mineralize olmuş matriks içinde farklılaşmış 3 hücre tipi olan osteosit, sementosit ve hipertrofik kondrositlerde eksprese olmaktadır (11).

SOST geni, -22, G>A polimorfizmini genotip ve allel sıklıkları açısından, lomber KMY’si normal (n=78) ve lomber KMY’si osteoporozlu (n=126) gruplarımızda varyant allel tespit edilmedi ($p>0.05$). Çalıştığımız bir diğer SOST genindeki polimorfizm 4534, G>A’dır. Polimorfizmin genotip ve allel sıklıklarını lomber KMY’si normal (n=78) ve lomber KMY’si osteoporozlu (n=126) grupta varyant allel (A) saptandı. Bu çalışmada, SOST genindeki 220+675, C>T

polimorfizmini, lomber KMY'si normal (n=78) ve lomber KMY'si osteoporozlu (n=126) gruplar arasında karşılaştırıldığında, varyant genotipin KMY'si normal grupta, KMY'si osteoporozlu gruba göre arttığı tespit edildi. Ama bu artış, istatistiksel bir anlamlılık göstermedi (Grup II: 61 (%78,2), $p>0.05$). SOST genindeki *1004, G>A polimorfizminde wild genotipin her iki grupta artmış olduğunu tespit ettik ($p: 0.242$). Bu artışın, kemik mineral yoğunluğuyla, anlamlı bir bağlantısı yoktu ($p>0.05$).

SOST genindeki rs17886183 (*1004, G>A) ve rs17885799 (-22, G>A) polimorfizmleri, ilk defa çalışılan polimorfizmlerdir. Her iki polimorfizm, ne erkek ne de kadınlarda premenapozal ve postmenapozal hasta gruplarında çalışılmamıştır. Sonuçlarımızın desteklenebilmesi için benzer yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

LRP5, vit. D reseptör ve PTH reseptör ve SOST genlerindeki mutasyonların kemik oluşumunda düzensizliklerle sonuçlandığı tespit edilmiştir. SOST/Siklerostin, insan osteoblastik hücrelerinde kaspaz 3'ü aktive ederek apoptosisi başlatır. Sutherland ve ark. osteojenik hücrelerin yanısıra, hipertrofik kondrositler ve osteoblastları kapsayan osteositlerde Siklerostinin eksprese olduğu tespit etmişlerdir. Siklerostinin, mekanistik biyolojisinin anlaşılması, siklerosteozis patolojisinin açıklanmasına yardımcı olacaktır. Siklerostinin aktivitesini bloke eden ajanların geliştirilmesi kemik kaybını restore etmek için umut doğuracaktır (83). Çalışmamızda SOST gen polimorfizmleri ile osteoporoz arasındaki ilişkiyi bir miktarda olsa aydınlatmaya çalıştık. Daha ileri çalışmalar ile osteoporoz tedavisi için umut doğuracağı kanaatindeyiz.

SOST genindeki mutasyonların yüksek kemik kütlesi sendromu olan van Buchem hastalığına sebep olduğu bilinmektedir. SOST polimorfizmlerinin, Rotterdam çalışmasında, KMY ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Sims ve arkadaşları KMY'si normal ve osteoporozlu hasta gruplarında yaptıkları çalışmada, SOST geninin üç SNP'sinden (rs851054, rs851056, rs2023794) rs851054 ve rs851056'nın KMY ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (75). Çalışmamızda ise KMY ile direkt bir bağlantı bulamadık. Ama olası ilişki için rs865429 polimorfizminde varyant genotipin KMY'si normal grupta artış olduğunu bulduk. Bu sonuç ileri çalışmalara ihtiyaç duymakta ve osteoporoz tedavisinde kemik kaybını önleyici yolun geliştirilmesi bakımından umut vaat etmektedir.

Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı, Moffet ve arkadaşları SOST'un 5' bölgesindeki iki SNP rs851054 ve rs851056'nın KMY'si yüksek ve KMY'si düşük bireylerde incelediklerinde KMY ile ilişkisini tespit etmişlerdir. Fakat, Balemans ve arkadaşları ise KMY'si normal ve osteoporozlu perimenapozal beyaz kadınlarda, SOST geninin 5' promotor polimorfizmi ile kemik mineral yoğunluğu arasında bir bağlantı bulamamışlardır. (37). Allel frekansların populasyon dağılımları diğer ırklarda, Beyaz ırkda A: % 67 G: % 33, Çinlilerde A: % 38 G: % 62, Japonlarda A: % 42, G: %58, Afrika kökenli Amerikalılarda A: %56 G: % 44 olarak bulunmuştur. Biz de çalışmamızda hem lomber KMY'si normal hem de lomber KMY'si osteoporozlu gruplarımızda, rs851054 (4534, G>A)'de varyant A allelinin artmış olduğunu tespit ettik.

Huang ve arkadaşları osteoporozlu hastalarda yaptıkları polimorfizm çalışmasında, rs865429 (220+675, C>T)'un, total kalça KMY'si ile allelik

ilişkinin anlamlı olduğunu göstermişlerdir (37). Bu çalışmada, sadece varyant genotipin (TT) frekansını, kemik mineral yoğunluğu normal olan grupta, daha yüksek bulundu. Bu sonuç varyant genotipin, kemik mineral yoğunluğu normal olan grupta, protein ekspresyonunu değiştirerek, siklerostin yapımını arttırarak, etki gösterdiği, şeklinde yorumlanabilir.

Yapılan geniş skalalı bir genom meta-analizinde, SOST gen polimorfizminin hem kemik mineral yoğunluğunu etkilediği, hem de KMY'den bağımsız olarak kırık riskini artırdığı rapor edilmiştir (65). SOST, bilindiği üzere Wnt sinyal antagonisti olarak, başlıca osteositlerde eksprese olmaktadır ve kemik kireçlenmesinin osteositik kontrolünü içerdiği düşünülmektedir (5).

MARK3 genindeki rs201028 ve SOST genindeki, rs1513670, rs7220711 ve rs1107748 polimorfizmlerinin değerlendirildiği bir çalışmada, küçük travma kırıkları ile bu SNP'ler arasında zayıf bir ilişki bulunmuştur. Stykarsdottir ve arkadaşları, bu ilişkiden yola çıkarak KMY üzerinde bu varyantların etkin olduğu yorumunu yapmışlardır (82).

Kemik yapısının genetik belirleyicilerini tespit etmeyi amaçlayan bir çalışmada, KMY varyasyonuna sahip postmenapozal kadınlardan alınan kemik biyopsilerinde, bazı genlerde, transkripsiyonel değişiklikler tanımlanmıştır. Bunlar ACSL3 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 3), NIPSNAP3B (nipsnap homolog 3B), DLEU2 (Deleted in lymphocytic leukemia, 2), C1ORF61 (Chromosome 1 open reading frame 61), DKK1, SOST, ABCA8, (ATP-binding cassette, sub-family A, member 8) ve karakterize olmamış (AFFX-M27830-M-at)'dır. Bunlar arasında sadece SOST geninin, KMY ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Genlerin çoğunluğu, kemik fenotipiyle ilişkili değildir. Moleküler

analizlerde, SOST DKK1 ile pozitif korelasyona sahip olup, her ikisinin de Wnt sinyal yolağının üyeleri olduğu rapor edilmiştir (64).

Huang Yang–Qing ve arkadaşları allelik, genotipik ve haplotipik açıdan yedi monojenik kemik hastalığı genini araştırdıkları bir çalışmada KMY ve SOST geni rs1230399 -9247 polimorfizmi arasında, genotipik ve allelik açıdan ilişki bulmuşlardır. rs1230399 polimorfizminin östrojen reseptör fonksiyonunu düzenleyen iki transkripsiyon faktörü C/EBP alfa ve FOXA1'in hatırlama bölgesinde lokalize olduğu ve polimorfizm sonucu ligandlarının, sklerostin genine bağlanmasının bozulduğunu düşünmektedirler (37). Bu veriye dayanılarak rs1230399 polimorfizmi ve KMY arasındaki ilişkinin östrojen reseptörü ERalfa/FOXA1 sinyal yolağı üzerinden etkili olabileceği öne sürülmektedir.

Uitterlinden ve arkadaşları, 1939 Alman kadın-erkek karışık yaşlı popülasyonda baktıkları 8 SOST gen polimorfizminden, sadece promotor rs17882799 SNP'nin (SRP3) azalmış lomber/femoral kemik mineral yoğunluğu ile ilişkisini allel/doz bağımlı şeklinde rapor etmişlerdir. Bu çalışmada polimorfizmler ile kırık riski arasında bir bağlantı bulunamamıştır (88).

Huang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı Moffet ve arkadaşları, erkek hastalarda çalışmışlardır. Rs1230399'u incelediklerinde, KMY ölçümleri ve genotip/allel frekansları arasında beraberlik olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışma, beyaz popülasyonda, KMY'nin düzenleniminde, SOST geninin önemini güçlü bir şekilde desteklemektedir. SOST geninin upstreaminde düzenleyici bölgesinde rs1230399'un, hem Çinli hem de beyaz popülasyonda kemik mineral yoğunluğu ile anlamlılık gösterdiği bulunmuştur. T allelinin frekansı osteoporoz riski yüksek olanlarda, daha yüksek bulunmuştur (37). İlginç olarak bu

polimorfizm, ER α fonksiyonunu etkileyen, iki transkripsiyon faktörünün (C/EBP alfa-FOXA1) tanıma bölgesinde lokalizedir.

Birkaç çalışmada, LRP5'in SOST ile etkileşime geçerek, Wnt yolağında LRP6'yı inhibe ettiği belirlenmiştir (37). SOST geni tarafından kodlanan siklerostin, sadece kemik morfogenezik protein antagonisti değildir. Aynı zamanda Wnt indüklü, Lrp kompleks oluşumunu bozarak Wnt sinyaline engel olurlar (82).

SOST geni üzerine yapılan bir çalışmada, genin 5' bölgesi içinde ve intronik bölgenin 3'UTR bölgesinde 26 farklı SOST polimorfizmi tanımlanmıştır. Sadece SNP15 genin kodlayıcı dizisi içindedir. Bu bölge, 10. pozisyonda valinin izolösine değişimine neden olur. Bu aminoasit değişikliği koruyucu olup, siklerostin proteinin sinyal dizisinde meydana gelir. Bundan dolayı olgun sklerostin polipeptidi değişmemektedir (5).

Siklerosteozisli bir Türk ailesinde yapılan çalışmada, SOST geninin ekzon 2'sinde bir missense (c.499T>C; p.Cys167Arg) mutasyon tespit edilmiştir. Etkilenmiş sistein kalıntısında, ER'de mutant proteinin alıkonmasına yol açarak, sistein kalıntısının kaybına neden olur. Beraberinde LRP5'e bağlanma kabiliyeti zayıflatılarak, Wnt sinyali inhibe edilir. Bu da sklerostinin tamamen fonksiyon kaybına yol açarak, Cys167Arg mutasyonuna sebep olur ve sklerosteozisin karakteristik fenotipi şekillenir (61).

Çinli araştırmacılar 11'i Avrupalı kadınlarda bakılan aday gen olmak üzere toplamda 21 geni Çinli kadınlarda çalışmışlardır. Osteoporotik kırık ve KMY ile bu genler arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. ZBTB40, ESR1, OPG, RANK, LRP5 ve SOST genleri ile lomber omurga ve/veya total kalça KMY'leri arasında ilişki tespit etmişlerdir. Özellikle SOST ve SPTBN1 ile osteoporotik kırık arasında

anlamli iliŖki bulmuŖlardır. Bu sonuçlar, hem Avrupalı hem de Çinli bayanlarda osteoporoza yatkınlık oluŖturan genleri sunmaktadır (52).

Yapılan son alıŖmalarda hiperlipidemi ve hipertansiyon tedavisinde yaygın olarak kullanılan statinler ve beta blokerlerin kemik metabolizmasında önemli rol oynadıkları gsterilmiŖtir. Statinler, HMG-CoA redüktazı ve mevolanat yolağını inhibe ederler. Osteoklastik ve osteoblastik aktiviteyi düzenlerler. Mevolanat metabolitleri, kemik hücre biyolojisi ile iliŖkilidir. Sempatik sinir sistemi de aynı zamanda osteoblastlar üzerine, onun direkt etki yoluyla, kemik oluŖumunu kontrol eder. Beta blokerlerin ilavesi kırık riskinin azalmasına ve kemik yoğunluğunun artmasına yol açabilir. Statinler ve beta blokerler kemik metabolizmasında anabolik etkiye sahiplerdir. Bu yüzden osteoporozun tedavisinde potansiyel olabilirler (84).

Sonuç olarak, SOST geni ve osteoporozla iliŖkisi, çok yeni bir araŖtırma alanı olup, gün geçtikçe yeni veriler açıklanmaktadır. Polimorfizm değerlendirmesinin, daha geniŖ popülasyonlar baz alınarak yapılmasına ihtiyaç vardır. Osteoporoz çok geniŖ kitleleri etkilemesi ve sebep olduğu kırık riskinden ötürü, önleyici tıbbın birebir ilgilendiği hastalık grubundadır. Osteoporoz etyopatogenezindeki genetik faktörlerin aydınlatılması, ilaç sektörünün buna yönelik tedavi protokolleri geliŖtirmesine ıŖık tutacaktır. Osteoporoz multifaktöriyel bir hastalık olup, çevresel faktörlerin kontrol altına alınması hastalığın ortaya çıkmasını engelleyememektedir. Bu da altta yatan genetik patolojilerin tespit edilmesinin, tedavide çığır aacak dönüm noktası olacağını dŖndrmektedir.

6.1. Öneriler

Yapılan son çalışmalarda, insan genomundaki doğal genetik varyasyonlar ve bunların fonksiyonel ve klinik açıdan taşıdıkları önemleriyle yakından ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar bize, bazı multifaktöriyel hastalıkların oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan genetik faktörlerin anlaşılmasında yol gösterici olacaktır. İnsan genomunda, polimorfizmlerin çoğu fonksiyonel olarak nötral olup, genin oluşturduğu protein yapısını ya da fonksiyonunu etkilemezler. Bazı polimorfizmler ise gen yapısındaki kodlayıcı alanları ya da düzenleyici bazı dizileri etkileyerek gen transkripsiyonu, mRNA stabilitesi, RNA splicingi, protein yapısı ve fonksiyonu etkileyebilmektedirler. Böyle değişiklikler hastalık yatkınlığını ve ciddiyetini arttırma ya da azaltma, tedaviye cevap ve ilacın yan etkilerine karşı hassasiyet gibi farklı klinik etkiler ortaya çıkarabilirler (1).

Polimorfizmlerin değerlendirilmesinde kullanılan restriksiyon enzim uzunluk polimorfizm yöntemi, gerçek zamanlı PZR gibi yöntemlerin gelişmesine rağmen, hala spesifik, hızlı ve diğer yöntemlerle kıyaslandığında daha ekonomik bir şekilde polimorfizm ve mutasyonların tespitini sağlamaktadır. Çalışmamızda seçilen polimorfizmlerin değerlendirilmesinde ARMS ve RFLP yöntemleri kullanılmıştır. Değerlendirilen polimorfizmlerin tümü başarıyla genotiplendirilmiştir. Çalışılan polimorfizmler ilk olduğu için, DNA dizilemeyle veriler doğrulanmıştır. Postmenapozal osteoporozlu hastalarda, daha önce SOST genindeki rs17885799, rs865429, rs17886183 polimorfizmleri çalışılmamıştır. Literatür değerlendirmemizde, bu tezle ilgili genlerdeki polimorfizmlerin postmenapozal osteoporozlu hastalarda çalışıldığı ilk araştırmadır. SOST

genindeki polimorfizmlerin çalışılmasında gereç ve yöntemde ayrıntılı olarak anlatılan ARMS ve RFLP yöntemlerinin literatüre referans oluşturacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sonuçları ışığında, lomber KMY'si yüksek grup, lomber KMY'si düşük grupta karşılaştırıldığında, SOST rs17885799 ve rs851054 polimorfizmlerinde wild ve varyant genotiplerinde artış olduğunu tespit ettik. SOST genindeki artmış rs865429 (220+675, C>T) varyant sıklığı, kemik mineral yoğunluğu normal olan grupta, protein ekspresyonu üzerinden sklerostin sentez miktarını etkileyerek, kemik kaybını önlüyor olabilir. Bu da osteoporoz etyopatogenezindeki genetik komponente ışık tutacak bir veri olabilir. SOST genindeki rs851054 (4534, G>A) polimorfizminde varyant allelin hem lomber KMY'si normal grupta, hem de lomber KMY'si osteoporozlu olan grupta artmış olduğunu tespit ettik. Ancak, yapılan diğer polimorfizm çalışmaları değerlendirildiğinde, KMY ve SOST gen arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir (37).

Postmenapozal osteoporozlu hastalarda, daha önce SOST genindeki rs17885799 ve rs17886183 polimorfimler çalışılmamıştır. Literatür değerlendirmemize göre bu çalışma ile ilgili gendeki polimorfizmlerin postmenapozal osteoporozlu hastalarda çalışıldığı ilk araştırmadır. Çalışılan hasta populasyonu genişletilerek yapılacak çalışmada, Türk populasyonunda anlamlılığın ortaya konulabileceği kanaatindeyiz. Verilerimizin doğrulanabilmesi için farklı toplumlarda aynı polimorfizmlerin çalışılarak, verilerimizin daha fazla çalışmayla desteklenmesine ihtiyaç vardır. Aynı zamanda geniş populasyonlarda SOST gen polimorfizmlerinin çalışılması, osteoporozun etyopatogenezinin

aydınlatılmasında bir araç olacaktır. SOST gen aktivasyonunu düzenleyecek ajanlar veya siklerostin aktivitesini bloke eden ajanlar geliştirilebilirse, kemik kaybını önleyici tedavilerde bir çıkır açılabilir (70).

7. KAYNAKLAR

1. Andrews AT.:Electrophoresis, 2nd ed.Clarendon pres, Oxford, UK, 1986.
2. Anonim.(1999). Osteoporozun Etiyolojisi ve Sekonder Osteoporozlar. Erişim: (<http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs>) Erişim Tarihi: 26.02.2010.
3. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. World Health Organ Tech Rep Ser 1994; 843: 1-129.
4. Balemans W., Ebeling M., Patel N. et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST) Hum Mol Genet. 2001;5:537-43.
5. Balemans W., Foerzler D., Parson C. Lack of association between the SOST gene and bone mineral density in perimenopausal women: analysis of five polymorphisms. Bone. 2002; 31(4): 515-519.
6. Balemans W., Clerian E., Siebers U. et al. A generalized skeletal hyperostosis in two siblings caused by a novel mutation in the SOST gene. Bone. 2005;6:943-7.
7. Barker DJP. Programming the baby. In Mothers, Babies and Disease: Later Life. London: BMJ Publishing Group, 1994: 14-36.
8. Balasubramanian SP, Cox A, Brown NJ, Reed MW.(2004). Candidate gene polymorphisms in solid cancers. Eur J Surg Oncol 30(6): 593-601.
9. Barthe N, Basse-Cathalinat B, Meumer PJ, Ribot C et al. 1998. Measurement of bone mineral density in mother-daughter pairs for evaluating the family influence on bone mass acquisition: a GRIO survey. Osteoporosis International ; 8: 379-384.
10. Bezooijen R L. van, Dijke P. ten, Papapoulos SE., Lowik CWGM. (2005). SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. Cytokine & Growth Factor Reviews. 16: 319–327.
11. Bezooijen van RL, Bronckers AL, Gortzak RA, Hogendoorn PC, van der Wee-Pals L, Balemans W, Oostenbroek HJ, Van Hul W, Hamersma H, Dijkers FG et al. (2009). Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. J Dent Res. 88(6): 569-574.
12. Bonjour JP, Theintz G, Buchs B, Slosman D & Rizzoli R 1991. Critical years and stages of puberty for spinal and femoral bone mass accumulation during adolescence. . Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 73: 555-563.
13. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. FEBS Lett. 1993;2:125-30.
14. Bottema CD., Sommer SS. (1993). PCR amplification of spesific alleles:rapid detection of known mutation and polymorphisms. Mutat. Res. 288: 93-102.
15. Brooks AJ. (1999). The esence of SNPs. Gene 234(2): 177-186.
16. Brunkow ME., Gardner JC., Van Ness J. et al. (2001). Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. Am. J. Hum. Genet. 68:577-589.

17. Cohen-Solal ME, Baudoin C, Omouri M, Kuntz D & De Vernejoul MC (1998). Bone mass in middle-aged osteoporotic men and their relatives: familial effect. *Journal of Bone and Mineral Research*; 13: 1909-1914.
18. Cusack S, Cashman KD. (2003). Impact of genetic variation on metabolic response of bone to diet. *Proc Nutr Soc.* 62(4):901-912.
19. Dagleish R. (1997). The human type I collagen mutation database. *Nucleic Acids Research.* 25 (1): 181–187.
20. Danielson ME, Cauley JA, Baker CE, Newman AB et al. (1999). Familial resemblance of bone mineral density (BMD) and calcaneal ultrasound attenuation: the BMD in mothers and daughters study. *Journal of Bone and Mineral Research*; 14: 102-110.
21. Devlin, R.D., Du, Z., Pereira, R.C., Kimble, R.B., Economides, N., Jorgetti, V. and Canalis, E. (2003). “Skeletal over-expression of noggin results in osteopenia and reduced bone formation”, *Endocrinology* 144, 1972–1978.
22. Dick IM, Devine A, Li S, Dhaliwal SS, Prince RL. The T869C TGF beta polymorphism is associated with fracture, bone mineral density, and calcaneal quantitative ultrasound in elderly women. *Bone.* 2003 Sep;33(3):335-41
23. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Kannel WB, Kiel DP. (1995). Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women: The Framingham Study. *Am J Epidemiol.* 142: 485-492.
24. Garn SM, Wagner B, Rohmann CG & Ascoli W. (1967). Further evidence for continuing bone expansion. *American Journal of Physical Anthropology*; 26: 313-318.
25. Garn SM, Rohmann CG, Wagner B & Ascoli W (1968). Continuing bone growth throughout life: a general phenomenon. *American Journal of Physical Anthropology* ; 28: 219-222.
26. Gennari L, Merlotti D, De Paola V, Calabro A, Becherini L, Martini G, Nuti R. (2005). Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 15;161(4):307-20.
27. Geusens P, Cantatore P, Nijs J, Proesmans W, Emma F & Dequeker J 1991. Heterogeneity of growth of bone in children at the spine, radius and total skeleton. *Growth, Development and Aging*; 55: 249-256.
28. Gilsanz V, Gibbens DT, Roe TF, Carlson M et al. (1988). Vertebral bone density in children: effect of puberty. *Radiology* ; 166: 847-850.
29. Gilsanz V. (1998). Phenotype and genotype of osteoporosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 9: 184-190.
30. Gilsanz V, Skaggs DL, Kovanlikaya A, Sayre J, Luza Loro M, Kaufman F & Korenman SG. (1998). Differential effect of race on the axial and appendicular skeletons of children. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 83: 1420-1427

31. Gilsanz V, Roe TF, Mora S, Costin G & Goodman WG (1991). Changes in vertebral bone density in black girls and white girls during childhood and puberty. *New England Journal of Medicine*. 325: 1597-1600.
32. Glastre C, Braillon P, David L, Cochat P, Meunier PJ & Delmas PD (1990). Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy X-ray absorptiometry on normal children: correlations with growth parameters. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 70: 1330-1333.
33. Gutin B, Kasper JM. (1992). Can vigorous exercise play a role in osteoporosis prevention? A review. *Osteoporosis Int.* 2: 55-69.
34. Han ZH, Palnitkar S, Rao DS, Nelson D & Parfitt AM (1996). Effects of ethnicity and age or menopause on the structure and geometry of iliac bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 11: 1967-1975.
35. Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A., Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N. (2004). "Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia", *J Cell. Biol.* 165, 433–445.
36. Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. (1998). The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell*. 5:673-83.
37. Huang Q.Y., Li GHY., Kung AWC. (2009). The -9247 T/C polymorphism in the SOST upstream regulatory region that potentially affects C/EBP α and FOXA1 binding is associated with osteoporosis. *Bone* 45: 289–294.
38. İnanıcı-Ersöz F, Gökçe-Kutsal Y, Öncel S, et al. (2002). A multicenter, case control study of risk factors for low tibial speed of sound among residents of urban areas in Turkey. *Rheumatol Int.* 22:20-26.
39. Jensen J, Christiansen C, Rodbro P. (1985). Cigarette smoking, serum estrogens and bone loss during hormone replacement therapy early after menopause. *N Engl J Med* 313: 973-5.
40. Johnell O, Nilsson BE, Wiklund PE. (1982). Bone Morphometry of alcoholics. *Clin Ortop.* 165: 253-8.
41. Kato S. (2005). Molecular mechanism of tissue-specific actions of sex steroid hormones and SERM for bone remodeling. *Clin Calcium*. 15(5): 825-830.
42. Kelly PJ, Morrison NA, Sambrook PN, Nguyen TV & Eisman JA. (1995). Genetic influences on bone turn-over , bone density and fracture. *European Journal of Endocrinology*. 133: 265-271.
43. Kiel DP, Zhang Y, Hannan MT et al. 1996The effect of smoking at different life stages on bone mineral density in elderly men and women. *Osteoporosis Int.* 6: 240-8

44. Kim CA, Honjo R, Bertola D, Albano L, Oliveira L, Jales S, Siqueira J, Castilho A, Balemans W, Piters E et al. (2008). A known SOST gene mutation causes sclerosteosis in a familial and an isolated case from Brazilian origin. *Genet Test*.12(4): 475-479.
45. Kim H., Chun S., Ku S.Y., Suh C. S., Choi Y. M., Kim J. G. (2009). Association between polymorphisms in tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor genes and circulating TNF, soluble TNF receptor levels, and bone mineral density in postmenopausal Korean women. *Menopause*. 16: 5: 1014-1020.
46. Klotzbuecher CM, Ross PD, Landsman PB, Abbott TA 3rd & Berger M (2000). Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *Journal of Bone and Mineral Research*;11: 306-311.
47. Kral EA, Dawson-Hughes B. (1991). Smoking and bone loss among postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 6: 331-338.
48. Krall EA., Dawson HB. (1993). Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *Journal of Bone and Mineral Research*; 8:1-9.
49. Kurabayashi T, Matsushita H, Kato N, Nagata H, Kikuchi M, Tomita M, Yahata T, Honda A, Tanaka K. (2004). Effect of vitamin D receptor and estrogen receptor gene polymorphism on the relationship between dietary calcium and bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Metab*. 22(2):139-47.
50. Laval- Jeantet AM, Bergot C, Carroll R & Garcia-Schaefer P (1983). Cortical bone senescence and mineral bone density of the humerus. *Calcifal Tissue International*; 35: 268-272.
51. Li WF., Hou SX., Yu B., Li MM., Férec C, Chen JM. (2010). Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. *Hum Genet* 127:249–285.
52. Liu JM, Zhang MJ, Zhao L, Cui B, Li ZB, Zhao HY, Sun LH, Tao B, Li M, Ning G. (2010) Analysis of Recently Identified Osteoporosis Susceptibility Genes in Han Chinese Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 16.
53. Luckey MM, Wallenstein S, Lapinski R & Meier DE (1996). A prospective study of bone loss in African-American and white women – a clinical research center study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* ; 81: 2948-2956.
54. Mazess RB, Barden HS, Etunger M, Johnston C, Dawson-Hughes B et al. (1987). Spine and femur density using dual-photon absorptiometry in US white women. *Bone and Mineral*. 2: 211-219.
55. Mosekilde L & Mosekilde L (1990). Sex differences in age-related changes in vertebral body size, density and biomechanical competence in normal individuals. *Bone*. 11: 67-73
56. National Institutes of Health. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. (1994). *JAMA*. 272: 1942-1948.
57. National Osteoporosis Society. [http:// www.nos.org.uk](http://www.nos.org.uk)
58. Nguyen TV, Howard GM, Kelly PJ & Eisman JA. (1998). Bone mass, lean mass, and fat mass: same gene sor same environments? *American Journal of Epidemiology*. 147: 3-16.

59. Ohnaka K, Takayanagi R. (2004). Statin and BMP. *Clin Calcium* 14 (2):286-288.
60. Osuga J. (2004). Statin and bone metabolism. *Clin Calcium*. 14 (2):235-240.
61. Piters E, Culha C, Moester M, Van Bezooijen R, Adriaensen D, Mueller T, Weidauer S, Jennes K, de Freitas F, Löwik C et al. (2010). First missense mutation in the SOST gene causing sclerosteosis by loss of sclerostin function. *Hum Mutat*. 31(7): 1526-1543.
62. Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG, Sambrook PN & Ebert S (1987). Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study. *Journal of Clinical Investigation*. 80: 706-710.
63. Reid DM, Macdonald HM. (2001). Nutrition and Bone: is there more to it than just calcium and vitamin D? *Q J Med*. 94: 53-6.
64. Reppe S, Refvem H, Gautvik VT, Olstad OK, Høvring PI, Reinholt FP, Holden M, Frigessi A, Jemtland R, Gautvik KM. (2010). Eight genes are highly associated with BMD variation in postmenopausal Caucasian women. *Bone*. 46(3): 604-612.
65. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, Hsu YH, Zillikens MC, Wilson SG, Mullin BH. (2009). Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med*. 151(8): 528-537.
66. Riggs BL, Wahner HW, Melton LJ, Richelson LS, Judd HL & Offord KP. (1986). Rates of bone loss in the appendicular and axial skeletons of women: evidence for substantial vertebral bone loss before menopause. *Journal of Clinical Investigation*. 77: 1487-1491.
67. Rivadeneira F., Styrkársdóttir U., Estrada K., Halldórsson BV, Hsu YH., Richards JB., Zillikens MC., Kavvoura FK., Amin N., Aulchenko YS. et al. (2009). Twenty bone-mineral-density loci identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature Genetics*. 41(11): 1199-1205.
68. Rizzoli R, Bonjour JP, Ferrari SL. (2001). Osteoporosis, genetics and hormones. A review. *Journal of Molecular Endocrinology*. 26: 79-94.
69. Rodin A, Murby B, Smith MA et al. (1990). Premenopausal bone loss in the lumbar spine and neck of femur: a study of 225 Caucasian women. *Bone*. 11: 1-5.
70. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
71. Schlienger RG, Meier CR. (2003). HMG-CoA reductase inhibitors in osteoporosis: do they reduce the risk of fracture? *Drugs Aging*. 20(5):321-36.
72. Schmidt-Petersen K, Brand E, Telgmann R, Nicaud V, Hagedorn C, Labreuche J, Dörmelmann C, Elbaz A, Gautier-Bertrand M, Fischer JW et al. (2009). Osteopontin gene variation and cardio/cerebrovascular disease phenotypes. *Atherosclerosis*. 206 (1): 209-15.
73. Seeherman H, Wozney JM. (2005). Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev*. 3.

74. Seeman E 1997. From density to structure growing up and growing old on the surface of bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 12: 509-521.
75. Sims AM. , Shephard N., Carter K., Doan T., Dowling A., Duncan EL., Eisman J., Jones G., Nicholson G., Prince R.et all. (2008). Genetic Analyses in a Sample of Individuals With High or Low BMD Shows Association With Multiple Wnt Pathway Genes. *J Bone Miner Res.* 23(4): 499-506.
76. Slemenda CW, Turner CH, Peacock M, Christian JC, Sorbel J et al. (1996). The genetics of proximal femur geometry, distribution of bone mass and bone mineral dens. *Osteoporosis International.* 6: 178- 182.
77. Snieder H, MacGregor AJ & Spector TD. (1998). Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 83: 1875-1880.
78. Sowers M, Willing M, Burns T, Deschenes S, Hollis B et al. (1999). Genetic markers, bone mineral density, and serum osteocalcin levels. *Journal of Bone and Mineral Research*; 14: 1411-1419.
79. Staehling-Hampton K, Proll S, Paeper BW, Zhao L, Charmley P, Brown A, Gardner JC, Galas D, Schatzman RC, Beighton P, Papapoulos S, Hamersma H, Brunkow ME. (2002). A 52-kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with van Buchem disease in the Dutch population. *Am J Med Genet.* 15:110(2): 144-152.
80. Stepan JJ, Alenfeld F, Boivin J, Feyen JHM, Lakatos P. (2003). Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocrine Regulations.* 37: 227-40.
81. Stewart TL and Ralston S H. (2000). Role of genetic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *Journal of Endocrinology.* 166: 235–245
82. Styrkarsdottir U, Halldorsson BV, Gretarsdottir S, Gudbjartsson DF, Walters GB, Ingvarsson T, Jonsdottir T, Saemundsdottir J, Snorraddottir S, Center JR. (2009). New sequence variants associated with bone mineral density *Nature Genetics.* 41: 1
83. Sutherland MK., Geoghegan JC., Yu C, Turcott E., Skonier JE., Winkler DG., Latham JA . (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation *Bone* 35: 828– 835.
84. Taguchi M, Takeuchi Y. Anabolic effects of statin and beta-blocker on bone metabolism. *Clin Calcium.* 2004 Dec;14(12):89-94.
85. Theintz G, Buchs B, Rizzoli R, Slosman D, Clavien H, Sizonenko PC & Bonjour JP (1992). Longitudinal monitoring of bone mass accumulation in healthy adolescents: evidence for a marked reduction after 16 years of age at the levels of lumbar spine and femoral neck in female subjects. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 75: 1060-1065.

86. Trotter M & Dixon BB. (1974). Sequential changes in weight, density and percentage ash weight of human skeletons from an early fetal period through old age. *Anatomical Record*; 179: 1-18.
87. Tylavsky FA, Bortz AD, Hancock RL & Anderson JJB (1989). Familial resemblance of radial bone mass between premenopausal mothers and their college-age daughters. *Calcified Tissue International*; 45: 265-272.
88. Uitterlinden AG, Arp PP, Paeper BW. et al. (2004). Polymorphisms in the sclerosteosis/van Buchem disease gene (SOST) region are associated with bone-mineral density in elderly whites. *Am J Hum Genet.* 6:1032-45.
89. Weinstein RS, Manolagas SC. (2000). Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med.* 108:153-64.
90. Wu, X.B., Li, Y., Schneider, A., Yu, W., Rajendren, G., Iqbal, J., Yamamoto, M., Alam, M., Brunet, L.J., Blair, H.C., Zaidi, M. And Abe, E. (2003). "Impaired osteoblastic differentiation, reduced bone formation, and severe osteoporosis in noggin-overexpressing mice" *J. Clin. Investig.* 112: 924–934.
91. Yamada Y., Ando F., Niino N., Shimokata H. (2005). Association of polymorphisms of the androgen receptor and klotho genes with bone mineral density in Japanese women. *J Mol Med.* 83: 50–57 AR
92. Yoshida, Y., Tanaka, S., Umemori, H., Minowa, O., Usui, M., Ikematsu, N., Hosoda, E., Imamura, T., Kuno, J., Yamashita, T., Miyazono, K., Noda, M., Noda, T. and Yamamoto, T.(2000). Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts. *Cell.* 103: 1085–1097.
93. Zhao, M., Qiao, M., Oyajobi, B., Mundy, G.R. and Chen, D. (2003). E3 ubiquitin ligase Smurf1 mediates core-binding factor α 1/Runx2 degradation and plays a specific role in osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 278: 27939–27944.
94. Zhao, M., Qiao, M., Harris, S.E., Oyajobi, B., Mundy, G.R. and Chen, D. (2004). Smurf1 inhibits osteoblast differentiation and bone formation in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 279: 12854–12859.
95. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. and Thomsen, G.H.A. (1999). SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687–693.

8. EKLER

8.1. Bilgilendirilmiş Hasta Onay Formu

Osteoporozun genetik nedenlerini bulmak üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi 'Postmenapozal Osteoporozlu Hastalarda SOST Gen Polimorfizminin Araştırılması'dır. Çalışmaya katılmak gönüllülük esasına dayalıdır. Bu araştırmayı yapabilmek için 4 ml. kan alınması gerekmektedir. Bu kandan genetik materyal yani DNA elde edilecektir.

Böyle bir araştırma osteoporozun genetik nedenlerinin ortaya konmasında yararlı olacaktır. Şu anda çalışma size ya da çocuklarınıza doğrudan bir fayda sağlamayabilir. Ancak ileride hastalığa neden olan etkenlerin ortaya konması ileride hastalıktan etkilenmiş bireylere fayda sağlayacaktır.

Bu formu yakınlarınızla görüşmek için evinize götürebilir ve onlarla görüşerek, çalışmaya katılıp katılmama kararını daha sonra verebilirsiniz. Çalışma sonuçları ve hastalığın gidişatı göz önünde bulundurularak hasta doktorundan çalışma sonuçları hakkında bilgi alabilir. Hasta çalışmadan ayrılmak istediğinde formunu geri alabilir. Formunu geri çeken hastanın örneklerine hiçbir işlem yapılmayacaktır.

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon ABD'da ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD ile birlikte bir araştırma yapılacağı görüşülerek bu araştırmayla ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu araştırmaya katılımcı olarak davet edildim. Bu araştırma için kan alınmasını gönüllü olarak kabul ettiğimi, çalışmanın konusu, çalışmaya katıldığım takdirde herhangi bir ücret talep edilmeyeceği ya da bana herhangi bir ücret verilmeyeceği ve çalışma sonuçlarının tedavi sürecimi etkilemeyeceği konularında bilgilendirildiğimi beyan ederim. Çalışmaya katılmak zorunda değilim. Çalışmadan çıkmam durumunda bu durumun hekimimle olan ilişkiye zarar vermeyeceğini biliyorum.

Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında formda yer alan kişisel bilgilerimin saklı kalacağı konusunda bilgilendirildim. Araştırmacıların, çalışma sonucunda elde edilen verilerin yayınlanmasında serbest olduklarına dair iznimi veriyorum.

Katılımcı

Adı, Soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Görüşme Tanığı

Adı, Soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, Soyadı, Ünvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

9. ÖZGEÇMİŞ

17.09.1976 tarihinde Kayseride doğdum. İlk, orta, lise ve Üniversite tahsilimi Elazığda aldım. 2000 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldum. 2001 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisansa başladım. 2004 yılında aynı bölümde doktora eğitimime başladım. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.