



### Postmenopozal Osteoporoz ile Östrojen Reseptör Alfa Geni (ER $\alpha$ ) Xbal ve Pvull Polimorfizmlerinin İlişkisi

Association of Estrogen Receptor Alpha Gene Xbal and Pvull Polymorphisms with Postmenopausal Osteoporosis

Seza Bulca<sup>1</sup>, Halil Kasap<sup>1</sup>, Tunay Sarpel<sup>2</sup>, Sabriye Kocatürk Sel<sup>1</sup>, Sibel Başaran<sup>2</sup>, M Bertan Yılmaz<sup>1</sup>, Ayfer Pazarbaşı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, ADANA

Cukurova Medical Journal 2014;39(1):105-116.

#### ÖZET

**Amaç:** Osteoporoz, kemik mineral yoğunluğunun (KMY) azalmasına bağlı olarak kemik mikromimarisinin bozulması ile ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Kemik mineral yoğunluğunu etkileyen birçok çevresel faktör bilinmesine rağmen genetik yapının osteoporoz patogenezi ile ilişkisi son zamanlarda incelenmiş ve kemik kütlesi üzerine etkisi olan 150 kadar aday genin varlığı rapor edilmiştir. Ancak bu etkinin dereceleri ile genler ve çevresel faktörlerin etkileşimleri halen net değildir. Bu çalışmada, lomber omurga ve femur boynu KMY değerleri ve osteoporozla ilgili önemli kriterler ile ER $\alpha$  geni Xbal, Pvull polimorfizmleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Materyal ve Metod:** Bu çalışmaya 73 osteoporotik ve 34 osteoporozu olmayan (kontrol) toplam 107 postmenopozal kadın alındı. Osteoporozla ilgili kriterler ve lomber omurga ve femur boynu KMY değerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) tekniklerini kullanarak belirlenen ER $\alpha$  geni Xbal, Pvull polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Hasta ve kontrollerle ilgili araştırma verileri, çeşitli laboratuvar testleri ve standardize sorgulama formlarından elde edilmiştir.

**Bulgular:** Osteoporotik ve osteoporotik olmayan kadınlar arasında Xbal ve Pvull polimorfizmlerinin genotip, allel ve haplotip frekansları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Xbal polimorfizminde kontrollerde minor allel "X" alleli (G nükleotiti) (MAF=0,457) iken hastalarda "x" alleli (A nükleotiti) (MAF=0,467) olmuş, Pvull polimorfizminde, kontrolde minor allel "P" (C nükleotiti) (MAF=0,485) iken hastalarda "p" alleli (T nükleotiti) (MAF=0,418) olmuştur. Pvull polimorfizmi ile boyun - lomber KMY arasında xx genotipli hastalarda femur boyun KMY ortalama değerinin, XX ve Xx genotipine sahip bireylerden daha yüksek olduğu (p=0,05), kontrol grubunda ise önemli bir farkın olmadığı bulunmuştur. Pvull polimorfizminde ise hasta ve kontrollerin femur boyun-lomber KMY değerleri arasında hiçbir fark saptanmamıştır. Aile osteoporoz öyküsü bakımından PP, Pp ve pp genotipleri arasında kontrollerde önemli bir fark yok iken (p=0,31), hasta grubundaki fark önemli (p=0,04) olup en yüksek osteoporoz öyküsü PP genotipinde (%85,7) bulunmuştur. Hasta grubunda, Xxpp genotipine sahip olan bireylerden, günde 15 dakika ve üzeri güneşe maruz kalanların, gün içinde hiç güneşe maruz kalmayanlara göre lomber KMY değerlerinin yüksek olduğu saptanmış (p=0,01), kontrol grubunda ise bir fark bulunmamıştır. Osteoporozla ilgili incelenen diğer kriterlerin hiçbirisi ile Xbal, Pvull polimorfizmleri arasında ilişki bulunamamıştır.

**Sonuç:** Osteoporotik hastalarda x ve p allel frekansları daha düşük ve genotipi xx olan hastaların da femur boyun-lomber KMY değerleri daha yüksektir. Xbal polimorfizmi genotipleri bakımından hasta ve kontroller arasındaki fark anlamlı olmasa bile, yüksek KMY değeri ile ilişkili olan "x" allelinin hastalarda düşük kontrollerde yüksek olmasının önemli olduğu düşünülebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Osteoporoz, Östrojen Reseptör Alfa Geni (ER $\alpha$ ), Xbal, Pvull

## ABSTRACT

**Purpose:** Osteoporosis is a multifactorial disease characterized by a decrease bone mineral density (BMD) and micro-architectural deterioration of bone structure. Although several environmental factors are known to have influences on BMD, genetic contribution to the pathogenesis of osteoporosis has recently been recognized. The existence of about 150 candidate genes which have effects on bone mass was reported but the degree of these effects and interaction of genes and environment are presently unclear. In this study, it was aimed to investigate any relationship between BMD values of lumbar vertebra and femoral neck, osteoporosis-related criteria and ER $\alpha$  gene *Xba*I, *Pvu*II polymorphisms.

**Material and Methods:** We evaluated the relationship between the osteoporotic factors and ER $\alpha$  gene *Xba*I, *Pvu*II polymorphisms in 107 postmenopausal women (73 osteoporotic as study group and 34 non-osteoporotic as a control group) by using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) technics. Data about the osteoporosis-related factors about all subjects were either based on the laboratory analyses and results of a standardized questionnaire.

**Results:** The distributions of genotype, allele and haplotype frequencies of both *Xba*I and *Pvu*II polymorphisms were not significantly different between osteoporotic and control group. In control group of *Xba*I polymorphism, minor allele was "X" (nucleotide G) with the frequency MAF=0,457 but in osteoporotic women it was "x" (nucleotide A) with MAF=0,467 and in control group of *Pvu*II polymorphism, minor allele was "P" (nucleotide C) (MAF=0,485) and in osteoporotic women it was "p" (nucleotide T) (MAF=0,418). In patients xx genotypes of *Xba*I polymorphism had significantly higher femoral neck-lomber average BMD value than XX and Xx genotypes ( $p=0,05$ ) while no significant difference was found among control genotypes. *Pvu*II genotypes showed no differences for femoral neck-lomber BMD values both in patients and controls. For the family history of osteoporosis, PP, Pp and pp genotypes did not significantly differ in controls but differences among patient genotypes were significant reaching the highest ratio (% 85.7) in PP genotypes ( $p=0,04$ ). Xxpp genotyped patients who exposed to sun over 15 minutes per day had higher BMD values than in patients who had no sun exposure ( $p=0,01$ ) but there was no difference in control group. None of the other criteria related to osteoporosis was found to be associated with *Xba*I, *Pvu*II polymorphisms.

**Conclusion:** Osteoporotic women have higher femoral neck-lomber BMD values for xx genotypes but all osteoporotic women have lower x and p allele frequencies. Although there was an insignificant difference for *Xba*I genotypes between patients and controls, less occurrence of "x" allele associated with higher BMD values in patients may be of some clinical diagnostic importance.

**Key Words:** Osteoporosis, Estrogen Receptor Alpha Gene (ER $\alpha$ ), *Xba*I, *Pvu*II polymorphism

## GİRİŞ

Osteoporoz (OP) düşük kemik kütlesi ve kemik dokusu mikromimarisinde bozulma sonucu kemik kırılma riskinde ve kırılma riskinde artma ile karakterize kompleks bir iskelet hastalığıdır<sup>1</sup>. Postmenopozal osteoporoz (Tip I Osteoporoz) kırk beş ve altmış beş yaş arası kadınlarda gonadal fonksiyonların azalmasına bağlı kemik kaybından ileri gelir. Kadınlarda erkekler göre 6 kat daha fazla görülür<sup>2</sup>. Senil osteoporoz (Tip II Osteoporoz) ise 75 yaş üzerinde görülür ve kadın erkek oranı 2/1'dir. Osteoporoz gelişiminde hormonlar, yaş ve cinsiyet<sup>3-5</sup>, düşük kemik kütlesi, kadınlarda erken menopoz, zayıf vücut yapısı, ırk ve genetik<sup>6-10</sup>, üreme ile ilgili faktörler<sup>11</sup>, yaşam şekli ve egzersiz<sup>12,13</sup> ve beslenme alışkanlıkları<sup>14,11,15</sup> gibi

birtakım risk faktörleri rol oynar. Genetik yönü ile osteoporoz, hormonal, çevresel, yaşam şekli (sigara içilmesi, fiziksel egzersizler gibi) ve beslenme faktörlerinin (kalsiyum alımı, alkol tüketimi) kontrol ettiği multifaktöriyel (poligenik) bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır<sup>16-18</sup>.

En önemli risk faktörlerinden olan östrojen hormonu, menopoz döneminde önemli derece eksildiğinden kemik kaybı çok hızlı gelişir. Doğal menopozdan önceki bilateral oofektominin kemik kaybını ve kalça kırık riskini arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca doğal erken menopoz veya geç menarş ile birlikte gelişen kısa doğurganlık süresi perimenopozal kadınlarda düşük kemik kütlesine neden olur<sup>11</sup>. Birçok çalışmada geç menarş hikayesi olan kadınlarda daha düşük mineral yoğunluğu bulunduğu saptanmıştır<sup>19</sup>.

Östrojen, ovaryumlardan salgılanan iki önemli cinsiyet hormonundan biridir. Doğal olarak oluşan östrojenler, kolesterolden türeyen C18 steroidlerdir ve bunlar 17 $\beta$ -östradiol (E2), östrone (E1), and östriol (E3) olmak üzere üç tiptir<sup>20</sup>. Östradiol kadınlarda (özellikle menarş ile menopoz arasında) en baskın olanıdır<sup>20</sup>. Östrojenler esas olarak ovaryum ve testislerde sentezlenirler ancak, periferalmenopoz dokularında androjenlerin aromatisasyonu ile de sentezlenmektedirler<sup>21,22</sup>. Östrojenler etkilerini östrojen reseptörü olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleri aracılığı ile göstermektedir<sup>21,23</sup>. Östrojen reseptörünün alfa (ER $\alpha$ ) ve beta (ER $\beta$ ) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. İki reseptör proteininin de DNA bağlanma bölgesi oldukça benzer fakat amino asit benzerliği düşüktür. ER $\alpha$  proteini amino ucundan karboksil ucuna doğru A'dan F'ye kadar isimlendirilen 6 bölgeye sahiptir<sup>24</sup>.

Günümüzde kemik kütlesi yaygın olarak DEXA (çift enerjili X-ışını absorpsiyometre) yöntemi ile ölçülür ve ölçüm değeri Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) olarak adlandırılır. KMY değeri -2,5 veya altında ise osteoporoz olarak kabul edilir. KMY üzerine pek çok çevresel faktörün etkili olup bireyler arasında görülen farklılıkların %50-80'i ise genetik kökenlidir<sup>16,25</sup>. Bu güne kadar osteoporozla ilişkili 150 aday gen üzerine yapılan çalışmada çok az genin (sadece 9 gen) KMY ile önemli derecede ilişkili olduğu saptanmıştır. Osteoporozla ilişkili genlerin 7 tanesinin kuvvetli etkili- nadir allelleri (majör genler), 10 kadar genin de zayıf etkili- daha yaygın allelleri olduğu belirtilmiştir<sup>26</sup>. Zayıf etkili- yaygın allelleri olan genlerden birisi östrojen reseptör 1 (alfa) geni (ER $\alpha$ )'dir. ER $\alpha$  geni, 6. kromozomda (6q2.5) 140 kb'lık bir bölgeyi kapsar ve 8 ekzon, 7 intron ile promotor bölgesinde en az 7 çeşit mRNA transkripsiyonu yapacak çoklu kontrol bölgesini içermektedir<sup>27,28</sup>. Çoklu kontrol bölgesinden dolayı mRNA'lar farklı intron çıkartılması ve ekzon birleştirilmesi işlemine (alternatif splicing) uğrayabileceğinden sonuçta çeşitli ER $\alpha$  proteini izoformları tanımlanmıştır<sup>29</sup>.

ER $\alpha$  geni ile osteoporoz arasındaki ilişkilerde PvuII, XbaI nukleotit polimorfizmleri (SNP) ve kontrol bölgesindeki TA tekrar polimorfizmleri (CNV) üzerine yoğunlaşmıştır. PvuII polimorfizmi, intron 1' de, 2. eksonun başlangıcından 397 nukleotit yukarısındaki C $\rightarrow$ T dönüşümü sonucu oluşur<sup>30</sup>. PvuII enziminin kesim bölgesinin olması p alleli ya da T alleli, olmaması ise P alleli veya C alleli olarak isimlendirilmektedir<sup>31</sup>. Bu çalışmada kesim bölgesinin olması p, kesim bölgesinin olmaması P ile belirtilmiştir. XbaI polimorfizmi, intron 1' de, 2. eksonun başlangıcından 351 nukleotid önce PvuII polimorfik bölgesinden 46 baz aşağı kısımda A $\rightarrow$ G dönüşümü ile gerçekleşir<sup>32</sup>. XbaI enziminin kesim bölgesinin olması x alleli veya A alleli olarak adlandırılmaktadır. Enzimin kesim bölgesinin olmaması ise X alleli veya G alleli olarak isimlendirilmektedir. Bu çalışmada kesim bölgesinin olması x, kesim bölgesinin olmaması X ile belirtilmiştir. TA tekrar polimorfizmi ise birinci eksonun 1kb'lık üst bölgesinde yer almaktadır<sup>31</sup>.

Halen ilgili aday genlerin allellerinden hangisinin osteoporoz ilişkili olduğu (haplotipi) toplumlara göre belirlenmesi devam etmektedir. Türk toplumunda aday genlerden VDR, ER $\alpha$ , COL1A1, CYP17 ve CYP19 (P450 sitokromları)<sup>33-35</sup> polimorfizmleri araştırılmış postmenopozlu osteoporotik kadınlarda, ER $\alpha$  geninin TaqI ve PvuII polimorfizmleri ile KMY arasında önemli bir ilişki olduğu saptanmıştır<sup>33,34</sup>. Bu çalışmada, şimdiye kadar bazı toplumlarda osteoporozla bağlantısı olduğu saptanan aday genlerden ER $\alpha$  geninin Pvu II, Xba I polimorfizmleri ve bu polimorfizmlerin genotip ve allelik dağılımlarının Çukurova bölgesindeki durumunun incelenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Hasta

Çalışma grubu Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Osteoporoz polikliniğinde takip edilen menopoza girmiş hastalardan oluşturuldu.

Kalsiyum ve fosfor metabolizma hastalıkları, endokrinolojik hastalıkları (hipertiroidizm, diyabet vs.), kronik karaciğer ve böbrek hastalıkları, iskelet hastalıkları (paget, romatoid arthrit vs.) olanlar, kemik yoğunluğu ve metabolizmasını etkileyecek ilaç alanlar (kortikosteroid, antikonvülzan, kalsitropik ilaçlar vs.), hormon replasman tedavisi ve estrogen reseptör modülatörleri alanlar çalışmaya dahil edilmedi. Bu çalışmada aralarında akrabalık olmayan 73 osteoporotik hasta, 34 osteoporotik olmayan (kontrol) toplam 107 postmenopozal kadın hasta çalışmaya alındı. Bütün hastalar osteoporozla ilgili kriterler, laboratuvar yöntemleri ve moleküler yönden incelendi.

Çalışmaya katılanlardan Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları Araştırma Projesi Bilgi ve Taahhüt Formunda belirtilen kurallara göre bilgilendirme yapılarak onam alındı.

#### Moleküler Genetik Analiz

Hasta ve kontrol gruplarının tümünde osteoporozla ilgili genel kriterler değerlendirildikten sonra moleküler analizler için EDTA'lı tüplere alınan periferik kandan Miller ve arkadaşlarının geliştirdiği salting out (tuzla çöktürme) yöntemi modifiye edilerek DNA elde edildi<sup>36</sup>. Elde edilen DNA'dan PCR ile *PvuII* ve *XbaI* restriksiyon enzimleri kesim bölgeleri içeren 346 bp'lik dizi RFLP analizi için çoğaltıldı. *ERα* geninin Intron I bölgesini çoğaltmak için Joyce B.J. van Meurs ve arkadaşlarının<sup>37</sup> kullandıkları primerler kullanıldı: ER-F 5'-GATATCCAGGGTTATGTGGCA-3' ve ER-R 5'-GGTGTTCCTATTATATTAACCTTGA-3'. *ERα* geni Intron I'in çoğaltılması için ön denatürasyon 94.0 °C 3 dk, denatürasyon 94.0 °C 45 sn, yapışma (annealing) 60.0 °C 1 dk ve sentez (extention) 72.0 °C 45 sn olmak üzere 30 PCR döngüsü yapılmış, 22.0 °C'de uzun süreli saklanmıştır. Agaroz jel (çoğunlukla %2'lik) elektroforeziyle amplifikasyon kontrolü yapılan örneklerin *XbaI*, *PvuII* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim reaksiyonları Joyce B.J. van Meurs ve arkadaşlarının<sup>37</sup> yöntemine göre

gerçekleştirilmiştir. *PvuII* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonuna alınan 346 bp'lik DNA'da C→T (rs2234693) nükleotit değişimi yoksa *PvuII* enziminin tanıma bölgesi bulunmaz (P alleli), değişim varsa (p alleli) enzimin kesim noktası vardır. PCR sonrası elde edilen 346 bp'lik DNA ürününün *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesiminde; A→G nükleotit değişimi (rs9340799) olması halinde *XbaI* enziminin tanıma bölgesi olduğundan kesim gerçekleşmekte (X alleli) eğer nükleotit değişimi olmamış ise yani adenin içeriyorsa (x alleli) enzim kesimi gerçekleşmektedir.

#### İstatistik Analiz

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

## BULGULAR

### Osteoporozla ilgili genel kriterlerin değerlendirilmesi

Moleküler analizlerden önce çalışmaya katılan tüm kadınların serum kalsiyum (Ca), inorganik fosfat (P), alkalin fosfataz (ALP), osteokalsin, 25 OH vitamin D3 [(25(OH)D3)], parathormon (PTH),  $\beta$ -Crosslaps, Estradiol (E2), total testosteron, DHEASO4 ve DEXA [lomber (L1-L4) ve femur (boyun)] analizleri yapıldı. DEXA analizlerin t skorları -2,5 ve altında olanlar osteoporotik, -2,5'in üzerinde olanlar normal kabul edildi. Çalışmaya dahil edilen kadınların, yaşı, boyu, kilosu, eğitim durumu, mesleği, menarş ve menopoz yaşı, canlı doğum sayısı, ailede osteoporoz öyküsü, eşlik eden hastalıkları, ilaç kullanımı, fiziksel aktivite düzeyi, süt ve süt ürünleri tüketimi, kafeinli gıda tüketimi, alkol ve sigara kullanımı, güneşe maruz kalma süresi, giyim tarzı, yakınması ve ağrı düzeyleri yapılan anketlerle sorgulandı.

Hasta ve kontrol grubu karşılaştırmasında; yaş, boy, kilo, vücut kütle indeksi (VKİ), menarş yaşı, menopoz yaşı, menopoz süresi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu ( $p < 0,05$ ). Hasta grubunda kontrol grubuna göre yaşın ve menarş yaşının daha yüksek olduğu, ancak menopoz yaşının daha düşük olduğu, menopozun daha uzun (17,5 yıl) sürdüğü, boyun kısa, vücut ağırlığı ve vücut kütle indeksinin düşük olduğu saptanmıştır.

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

geleneksel giyimli (başı ve kolları kapanacak şekilde) iken, kontrol grubunun %26,5'i geleneksel giyimlidir ( $p=0,05$ ). Haftada yapılan fiziksel aktivite saati, süt ve süt ürünleri tüketimi, güneşe maruz kalma süreleri ve canlı doğum sayıları açısından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Hasta grubunda, haftada 7 saatten fazla fiziksel aktivitede bulunan bireylerin lomber KMY değerinin düşük olduğu ( $p=0,05$ ), haftada 1 saatten az, 1-2 saat, 2-4 saat ve 4-7 saat arasında fiziksel aktivitede bulunanların lomber KMY değerleri arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Kontrol grubunda ise hiçbir farklılık saptanamamıştır.

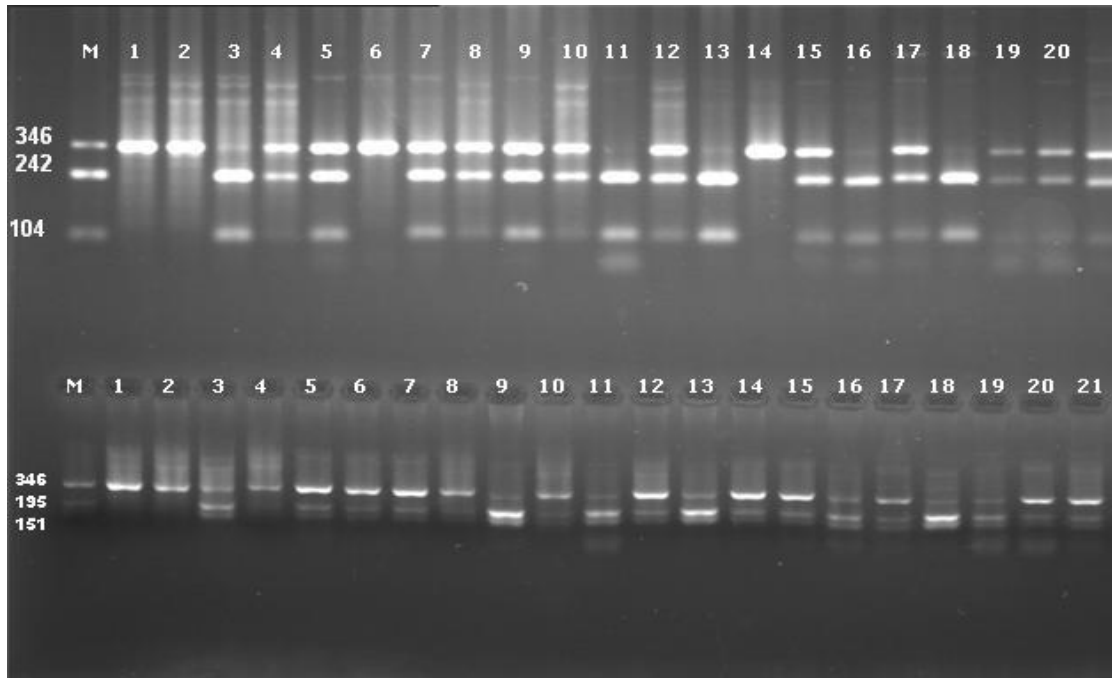
Süt ve süt ürünleri, giyim tarzı, kafeinli gıda tüketimi ve sigara kullanımı ile lomber ve femur boyun KMY değerleri karşılaştırıldığında aralarında bir ilişki olmadığı belirlenmiştir. Hasta grubunda gün içinde direk güneşe hiç maruz kalmayanların lomber KMY değerlerinin, en az 15 dakika güneşe maruz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

Femur boyun KMY değeri ile güneşe maruz kalma süresi arasında bir ilişki saptanamamıştır. Femur boyun KMY ( $r=0,463$ ) ve lomber KMY ( $r=0,341$ ) ile VKI arasında zayıf bir ilişki olduğu ortaya çıkmıştır. Her iki KMY değeri arttıkça VKI değerinin de arttığı belirlenmiştir. Hasta grubunda serum Ca ile lomber KMY değerleri arasında ( $r=0,287$ ) zayıf, femur boyun KMY ile  $Ca^{++}$  arasında hiçbir korelasyon bulunmamıştır. Hasta grubunda E2 değerleri ile lomber KMY değerleri arasında pozitif bir korelasyon ( $r=0,385$ ) varken femur boyun KMY değerleriyle hiçbir korelasyon bulunmamıştır. Hem kontrol hem hasta grubunda osteokalsin ile  $\beta$ -Crosslaps değerleri ( $r=0,762$ ) arasında önemli bir korelasyon varken, Ca ile P değerleri arasında ( $r=0,264$ ) çok zayıf bir korelasyon vardır.

### Osteoporozla ilgili moleküler genetik analizler

PCR yöntemi ile çoğaltılan ER $\alpha$  geninin 346 bç'lik parçası, *PvuII* endonukleazı ile kesildiğinde C→T nükleotit değişimi olmayan homozigot bireylerde (PP genotipli) 346 bç'lik tek bant, her iki allelinde değişim görülen homozigot bireylerde (pp genotipli) 242 ve 104 bç'lik iki bant, heterozigot bireylerde (Pp genotipli) ise her üç bant elde edildi. ER $\alpha$  geninin 346 bç'lik parçası *XbaI* endonukleazı

ile kesildiğinde allelinde A→G nükleotit değişimi olan homozigot bireylerde (XX genotipli) 346 bç'lik tek bant, her iki allelinde değişim görülmeyen homozigotlarda (xx genotipli) 195 ve 151 bç'lik iki bant, heterozigot bireylerde (Xx genotipli) ise her üç bant elde edildi. Şekil 1'de bazı kontrollerin *PvuII* ve *XbaI* enzimleri kesim bantları gösterilmektedir.



**Şekil 1.** Bazı kontrollerden ER $\alpha$  geninden elde edilen 346 bç'lik DNA'nın *PvuII* (yukarda) ve *XbaI* endonukleazı kesimi ile elde edilen bantların %2'lik agaroz gel görünümü.

ER $\alpha$  polimorfizmlerinin hasta ve kontrollerdeki allel frekanslarının Hardy-Weinberg Eşitliğinden (HWE) çok fazla sapma göstermediği (HWE uygunluk olasılığı  $p=1$  ise %100 olur) ancak her iki polimorfizmde MAF (minör allel frekansı)'ın hasta ve kontroller arasında yer değiştirmiş olduğu bulundu. Minor allel, *PvuII* polimorfizminin kontrolünde P alleli (C nükleotiti) olup MAF=0,485 iken hastalarda p alleli (T nükleotiti) MAF=0,418 olmuş, *XbaI* polimorfizminde ise kontrollerde X alleli (G nükleotiti) MAF=0,457 iken hastalarda x alleli (A nükleotiti) MAF=0,467 olmuştur.

Çalışmamıza dahil olan postmenopozal osteoporozlu 73 hasta ve 34 kontrolün *PvuII* polimorfizmi ve *XbaI* polimorfizmi bakımından hasta ve kontrol genotipleri ayrı ayrı ve birlikte değerlendirildiğinde dağılımın her durumda HWE'den önemli bir sapma göstermediği Tablo 1'den anlaşılmaktadır.

İki polimorfizme ait genotip kombinasyonlarının hasta ve kontrol grubundaki dağılımları ve bu dağılımların Kappa istatistiksel analizine göre istatistiksel önemi Tablo 2'de verilmiştir. Ancak bu tabloda görüldüğü gibi

çalışmamızda sadece hastalarda *XXPp* genotipine, her iki grupta ise *XXpp*, *xxPP* genotiplerine hiç rastlanmamıştır. Hasta grubunda  $k=0,53$ , kontrol grubunda ise  $k=0,51$  olup her iki durumda da genotip bakımından orta derecede uyumluluk tespit edilmiştir (Tablo 2). Tablo 2'den haplotiplerin toplam değerlerinin hastalarda  $XP=26$  (%28,88),  $xP=8$  (%8,88),  $Xp=13$  (%14,44),  $Xp=43$  (%47,77);

kontrollerde  $XP=14$  (%41,17),  $xP=4$  (%11,76),  $Xp=5$  (%14,70),  $xP=11$  (%32,35) olduğu hesaplanmıştır; bu değerlendirmeye *XxPp* genotipine sahip olan bireyler haplotipleri belirlenemediği için dahil edilmemiştir. Haplotiplerin dağılımı bakımından hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır (Ki-Kare,  $p=0,11$ ).

**Tablo 1. Hasta ve kontrol grubunda *Pvu*II ve *Xba*I polimorfizmi genotiplerinin dağılımı.**

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

**Tablo 2. Hasta ve kontrol gruplarında *Pvu*II ve *Xba*I polimorfizmlerinin genotip ve haplotip dağılımları**

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

\**XxPp* genotipine sahip bireylerin haplotipleri belirlenememektedir.

Polimorfizmler bakımından aile osteoporoz öyküsünün varlığı incelendiğinde, hasta ve kontrol grupları arasında *Xbal* bakımından önemli bir farkın olmadığı, *Pvull* bakımından kontrol grubunun sadece %30'unda osteoporoz öyküsünün olduğu, hasta grubunda ise çok daha yüksek bir oranın (%73,6) olduğu saptanmıştır. Ayrıca PP, Pp ve pp genotipleri arasında kontrol grubunda önemli bir fark yok iken ( $p=0,31$ ), hasta grubundaki fark önemli ( $p=0,04$ ) olup en yüksek osteoporoz öyküsü PP genotipinde (%85,7) bulunmuştur.

*Pvull* polimorfizmi ile femur boyun KMY arasında ise bir ilişki saptanamamıştır. *Xbal* polimorfizminde hastalarda xx genotipinde femur boyun KMY ortalama değerinin, XX ve Xx genotipine sahip bireylerden daha yüksek ( $0,66\pm 0,11$ ) olduğu ( $p=0,05$ ) kontrol grubunda ise önemli bir farkın olmadığı bulunmuştur. Diğer taraftan *Xbal* ve *Pvull* polimorfizmleri ile t ve z skorları ve lomber KMY değeri arasında anlamlı bir farklılık yoktur. Ayrıca hasta grubunda Xxpp genotipine sahip olan bireylerden, günde 15 dakika ve üzeri güneşe maruz kalanların, gün içinde hiç güneşe maruz kalmayanlara göre lomber KMY değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır ( $p=0,01$ ).

## TARTIŞMA

Multifaktoriyel bir iskelet hastalığı olan osteoporoz katkıda bulunan genetik varyasyonlara ait bilgilerin çoğu aday genlerle KMY çalışmalarından gelmektedir. Meta analizlere göre vitamin D reseptör geni (*VDR*), östrojen reseptör alfa geni (*ER $\alpha$* ), tip 1 kollajen alfa A1 zinciri geni (*Col1A1*) ve İnterlökin 6 (*IL-6*) ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)-benzeri protein 5 (*LRP5*) genlerinin polimorfizmlerinin osteoporozla ilişkili olup *Col1A1* hariç diğer dört gen pleiotropik etki (master gen) gösterir; bu genlerin osteoporozdan başka yaşlanmaya bağlı bazı hastalıklar, göğüs ve kolorektal kanserlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir<sup>17,25,38</sup>. Son yıllarda yapılan osteoporoz genetiği ile ilgili çalışmaların çoğu

özellikle *ER* ve *VDR* genleri üzerinde yoğunlaşmıştır<sup>16, 25</sup>. Joyce ve ark.<sup>39</sup> hem kadın hem de erkeklerde östrojen ile kemik kütlesi arasında pozitif ilişki saptamış<sup>37</sup> olup bu çalışmanın hasta grubunda da E2 değerleri ile lomber KMY değerleri arasında ( $r=0,385$ ) pozitif bir ilişki belirlenmiştir; femur boyun KMY değerleriyle ise bir korelasyon saptanamamıştır.

İnsan *ER $\alpha$*  *Pvull* ve *Xbal* polimorfizmleri ile pre ve post menopozdaki kadınların kemik kütleleri arasında Japon popülasyonunda bir ilişki bulunmuşsa da Belçika, Danimarka, İtalya ve Kore popülasyonlarında hiçbir ilişki bulunmamış, Çin ve Amerikan popülasyonlarında ise çelişkili sonuçlar alınmıştır<sup>16,17</sup>. Bu polimorfik alleller aralarında 46 bç'lik mesafe bulunan bağlı alleller olduğundan haplotipleri etnik gruplar arasında çok fark göstermez ancak Px haplotipi Kafkas toplumlarına göre Asya toplumlarında iki kez daha fazladır. Çoğu Asya toplumlarında PP ve/veya xx genotiplerinde, Avrupa kökenli Kafkas toplumlarında pp ve/veya xx, İngiltere'de ise Px genotiplerinde osteoporotik riskin arttığı saptanmıştır<sup>16</sup>. Özdemir-Erdoğan M<sup>34</sup> PP genotipinde lomber omurga ortalama KMY değerinin pp genotipi değerinden anlamlı derecede yüksek olduğunu ve *Xbal* polimorfizmi genotip ve allel frekansları açısından ise fark bulunmadığını göstermişlerdir. Yaklaşık 5000 menopozal kadının dahil olduğu bir meta analiz<sup>39</sup> XX genotipinin xx genotipine oranla daha yüksek lomber omurga KMY değerlerine sahip olduğunu göstermiştir. Bustamante ve ark.'nın<sup>31</sup> çalışmasında P haplotipini yüksek femur boyun KMY ile ilişkilendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise hasta grubunda xx genotipi femur boyun KMY değerinin, Xx genotipine göre daha yüksek olduğu saptanmış, kontrol grubunda ise bir farklılık belirlenememiştir.

Özdemir-Erdoğan M<sup>34</sup> pp genotip frekansının osteopenik ve osteoporotik olgulara göre kontrollerde anlamlı düzeyde düşük olduğunu ve *Pvull* polimorfizminde osteoporotik olguların p allel



frekansının normal olgulardan anlamlı düzeyde yüksek olduğunu saptamışlardır. Bustamante ve ark.<sup>31</sup> postmenopozal osteoporozlu hastada PvuII polimorfizmi minor allelinin "P" (C nükleotiti) frekansını (MAF) 0,46, Xbal polimorfizminde minor allelin "X" (G nükleotiti), frekansının MAF=0,38 olduğunu bulmuştur<sup>31</sup>. Bu çalışmada ise kontrolde minor allele "P" (C nükleotiti) (MAF=0,49) iken hastalarda minor allele "p" (T nükleotiti) (MAF=0,42) olmuş, Xbal polimorfizminde minor allele kontrollerde "X" (G nükleotiti) (MAF=0,457) iken hastalarda "x" alleli (A nükleotiti) (MAF=0,467) olmuştur. Çalıştığımız hasta ve kontrol gruplarının genotip ve haplotip frekansları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yapılan çalışmalarda osteoporoz ile ERα Xbal ve PvuII polimorfizmleri arasındaki ilişkilendirmelerde görülen farklar düşük istatistiksel güce, etnik gruplar arasındaki varyasyonlara, yaşa, menopoz durumuna ve çevresel faktörlere bağlanabilir.

Xbal ve PvuII polimorfizmleri intronda bulunduğundan kemik kütlesi ve osteoporoz arasındaki ilişki açıklanamamasına karşın post menopozdaki kadınlarda ERα ile VDR arasında gen-gen etkileşiminin olduğu bilinmektedir<sup>17,25</sup>.

Özdemir-Erdoğan M<sup>40</sup>, ALP, Ca, P, osteokalsin, PTH, 25(OH)D<sub>3</sub> bakımından hasta ve kontroller arasında anlamlı farklılıklar bulunmamış ancak osteoporozlu grupta β-Crosslaps osteopeni ve kontrol gruplarından daha yüksek olduğu bulunmuştur (p<0.05). Çalışmamızda ise hasta grubunda Ca, 25(OH)D<sub>3</sub> ve PTH değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek, ALP değerlerinin ise düşük olduğu ve P, osteokalsin ve β-Crosslaps değerlerinde gruplar arasında fark olmadığı bulunmuştur. Parker ve ark.<sup>41</sup> vücut ağırlığı ile femur boyun ve L2-L4 KMY değerleri arasındaki anlamlı korelasyona ve vücut ağırlığının osteoporozla karşı koruyucu etkisinin olduğuna işaret etmektedir. Postmenopozal osteoporozda obezitenin kemik mineral yoğunluğuna etkisi de araştırılmış olup genel olarak obezitenin kemik mineral yoğunluğu üzerine etkisinin olumlu olduğu

kabul edilmektedir. Asomaning ve ark.<sup>42</sup> düşük VKİ 'li kadınların osteoporoz için artmış risk taşıdığını belirtmişler; VKİ'ndeki her bir birimlik değişikliğin, KMY'nu fiziksel aktivite, fonksiyonel kapasite, kalsiyum alımı, sigara ve alkol alışkanlığı gibi değiştirilebilir diğer risk faktörlerinden daha fazla etkilediğini vurgulamışlardır. Ülkemizde yapılan klinik çalışmalarda da VKİ ile osteoporoz arasında pozitif yönde ilişki saptanmış ve obezitenin osteoporozdan koruyucu bir faktör olabileceği belirtilmiştir<sup>43,44</sup>. Obezitenin KMY üzerinde oluşturduğu olumlu etkiye neden olan mekanizmalardan birinin iskelet üzerine yük binmesi ve mekanik stres oluşması olarak kabul edilmektedir. Omurga ve kalça KMY'si üzerine yapılmış klinik çalışmalar<sup>45,46</sup> iskelet üzerine binen yükün mekanik stres oluşturduğu görüşünü desteklemektedir. Bununla beraber obez hastalarda, ağırlık taşımayan üst ekstremitelerde de kemik yoğunluğunun yüksek olduğunun saptanması, mekanik stres ve iskelet üzerine yük binmesinden başka nedenler olabileceğini düşündürmektedir<sup>47</sup>. Obezitenin KMY'na olan olumlu etkisine ilişkin diğer bir mekanizmanın da özellikle menopozdan sonra yağ dokusundaki östrojen yapımı ile ilgili olduğu düşünülmektedir<sup>48</sup>. Bizim çalışmamızda da femur boyun KMY (r=0,463) ve lomber KMY (r=0,341) ile VKİ arasında zayıf bir ilişki olduğu ortaya çıkmış her iki KMY değeri arttıkça VKİ değerinin de arttığı belirlenmiştir. KMY değerlerinin, ailesinde osteoporoz öyküsü olan grupta aile öyküsü negatif olan gruba oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük, osteoporoz sıklığının ise yüksek olduğu bulunmuştur<sup>49-51</sup>. Çalışmamızda da, ailede osteoporoz öyküsü olan hasta grubunda (% 69,8) kontrol grubuna (%29,4) göre çok daha fazla aile osteoporoz öyküsü tespit edilmiştir (p=0,000). Eğitim düzeyi ile osteoporoz ilişkisini değerlendiren çalışmalarda<sup>51,52</sup> osteoporoz bilgisinin eğitim düzeyi ile direkt olarak ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada, lise ve üzeri eğitim görenlerin oranı kontrol grubunda %61,8 iken hasta grubunda çok

daha düşük (%38,2) düzeyde olduğu bulunmuştur ( $p=0,04$ ). Yine Aksu ve ark.<sup>51</sup> geleneksel (kapalı) ve modern giyim tarzı olan yaklaşık sayıdaki iki grupta, kapalı giyim şekli olan katılımcılarda modern giyim şekli olanlara göre daha fazla sıklıkta osteoporoz olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada da geleneksel giyimli (başı ve kolları kapanacak şekilde) olanların hasta grubunda (%46) kontrol grubuna (%26,5) göre daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır ( $p=0,05$ ).

Sonuç olarak, Osteoporotik hastaların x ve p allel frekansları daha düşük ayrıca genotipi xx olan hastaların da femur boyun-lomber KMY değerleri daha yüksektir. Xbal polimorfizmi genotipleri bakımından hasta ve kontroller arasındaki fark anlamlı olmasa bile, yüksek KMY değeri ile ilişkili olan "x" allelinin hastalarda düşük kontrollerde yüksek olmasının önemli olduğu düşünülebilir.

#### KAYNAKLAR

- Gass, M. ,B. Dawson-Hughes. Preventing osteoporosis-related fractures: an overview. *Am J Med.* 2006;119:3-11.
- Kavuncu, V. Osteoporozda Sınıflama. Osteoporozda tanı ve tedavi. T. Göksoy. İstanbul, Özlem Grafik Matbaacılık. 2000;205-14.
- Papakitsou, E. F., et al. Body mass index (BMI) and parameters of bone formation and resorption in postmenopausal women. *Maturitas.* 2004;47:185-93.
- Nas, K. Osteoporozda Risk Faktörleri. Osteoporozda Tanı ve Tedavi. T. Göksoy. İstanbul, Özlem Grafik Matbaacılık. 2000:69-94.
- Cummings, S. R., et al. Endogenous hormones and the risk of hip and vertebral fractures among older women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N Engl J Med.* 1998;339:733-8.
- Lane, N. E. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194:3-11.
- Bauer, D. C., et al. Classification of osteoarthritis biomarkers: a proposed approach. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:723-7.
- Genant, H. K., et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1999;10: 259-64.
- van der Voort, D. J., et al. Risk factors for osteoporosis related to their outcome: fractures. *Osteoporos Int.* 2001;12:630-8.
- Ravn, P., et al. Low body mass index is an important risk factor for low bone mass and increased bone loss in early postmenopausal women. Early Postmenopausal Intervention Cohort (EPIC) study group. *J Bone Miner Res.* 1999;14:1622-7.
- Uslu, H. Postmenopozal raloksifen HCL kullanımının serum homosisteini, lipid profili, koagülasyon profili ve kemik mineral yoğunluğu T skorları üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın-Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul. 2004.
- Tuck, S. P. ,R. M. Francis. Osteoporosis. *Postgrad Med J.* 2002;78:526-32.
- Welsh, L. ,O. M. Rutherford. Hip bone mineral density is improved by high-impact aerobic exercise in postmenopausal women and men over 50 years. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1996;74:511-7.
- Nguyen, T. V., et al. Osteoporosis in elderly men and women: effects of dietary calcium, physical activity, and body mass index. *J Bone Miner Res.* 2000;15:322-31.
- Kato, I., et al. Prospective study of factors influencing the onset of natural menopause. *J Clin Epidemiol.* 1998;51:1271-76.
- Gennari, L., et al. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;81:1-24.
- Rizzoli, R., et al. Osteoporosis, genetics and hormones. *J Mol Endocrinol.* 2001;26:79-94.
- Ralston, S. H. Genetic control of susceptibility to osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2460-66.
- Gerdhem, P. , K. J. Obrant. Bone mineral density in old age: the influence of age at menarche and menopause. *J Bone Miner Metab.* 2004;22:372-5.
- Gruber, C. J., et al. Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecol Endocrinol.* 2002;16:431-41.

21. Enmark, E. ,J. A. Gustafsson. Oestrogen receptors - an overview. J Intern Med. 1999;246:133-8.
22. Gray, G. A., et al. Oestrogen and the cardiovascular system: the good, the bad and the puzzling. Trends Pharmacol Sci. 2001;22:152-6.
23. Dubey, R. K., et al. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism. Hypertension. 2001;37: 640-4.
24. Klinge, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Res. 2001;29: 2905-19.
25. Ferrari, S. L. ,R. Rizzoli. Gene variants for osteoporosis and their pleiotropic effects in aging. Mol Aspects Med. 2005;26:145-67.
26. Ralston SH, U. A. Genetics of osteoporosis. Endocr Rev. 2010;31:629-62.
27. Walter, P., et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 1985;82:7889-93.
28. Andersen, T. I., et al. Oestrogen receptor (ESR) polymorphisms and breast cancer susceptibility. Hum Genet. 1994;94:665-70.
29. Kos M, R. G., Denger S, Gannon F. Genomic Organisation of The Human ER alpha Gene Promoter Region. Mol Endocrinol. 2001;15:2057-63.
30. "ESR1 estrogen receptor 1 [ Homo sapiens (human) ]". Retrieved 16.02.2010, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp&cmd=search&term=ESR1>.
31. Bustamante M, N. X., at al. COL1A1, ESR1, VDR and TGFB1 polymorphisms and haplotypes in relation to KMY in Spanish postmenopausal women. Osteoporosis Int. 2007;18:235-43.
32. Matsubara Y, M. M., Kawano K, Zama T, Aoki N, Yoshino H, et al. Genotype distribution of estrogen receptor polymorphisms in men and postmenopausal women from healthy and coronary populations and its relation to serum lipid levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:3006-12.
33. Duman, B. S., et al. Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in postmenopausal osteoporotic and healthy women. Med Princ Pract. 2004;13: 260-6.
34. Özdemir-Erdoğan, M. Postmenopozal Kadınlarda Kemik Mineral Yoğunluğu ile Östrojen Reseptör Alfa ve Kollajen Tip 1 Alfa 1 Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi. Tıbbi Genetik ABD, Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora: 2008;88.
35. Yılmaz MB, P. A., Guzel AI, Kocaturk-Sel S, Kasap H, Kasap M, Urunsak IF, Basaran S, Alptekin D, Demirhan O. . Association of serum sex steroid levels and bone mineral density with CYP17 and CYP19 gene polymorphisms in postmenopausal women in Turkey. Genetics and Molecular Research. 2011;10:1999-2008.
36. Miller, S. A., et al. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988;16:1215.
37. Joyce B.J van Meurs, S. C. E. S. et al. Association of 5' estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density, vertebral bone area and fracture risk. Human Molecular Genetics,. 2003;12:1745-54.
38. Thakkinstian A, D. E. C., Eisman J, Nguyen T, Attia J. Meta-Analysis of Molecular Association Studies: Vitamin D Receptor gene Polymorphisms and KMY as a Case Study. Journal Of Bone And Mineral Research. 2004;19:419-28.
39. Rapuri, P. B., et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with changes in bone remodeling markers and treatment response to estrogen. Maturitas. 2006;53:371-9.
40. Özlem S, S. N., Karayalçın B, Bilgilişoy M, Gürbüz Ü, İllez Ö, Gültekin M. Postmenopozal Osteoporoz ve Osteopenide Plazma Homosistein Düzeyleri ile Biyokimyasal Kemik Döngüsü Belirteçleri Arasındaki ilişki. Osteoporoz Dünyasından. 2006;12:22-6.
41. Paker N, S. M., B, Tekdöş D, Kaya B, Buğdaycı S,D. Postmenopozal Kemik Kaybı Olan Kadınlarda Kemik Döngüsü. Osteoporoz Dünyasından 2005;4:155-8.
42. Asomaning K, B.-J. E., Nasca Pc, Hooven F, Pekow Ps. The Association Between Body Mass Index And Osteoporosis In Patients Referred For A Bone Mineral Density Examination. J Womens Health. 2006;15:1028-34.

43. Yaraman N, Ç. C., Karaođlan B. Postmenopozal Kadınlarda Osteoporoz ile Çok Yönlü Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. Fiziksel Tıp Dergisi . 2002;5:23-6.
44. Şahin Y, K. Y., Akşit R. Erken Dönem Postmenopozal Kadınlarda Obesiteyle Kemik Mineral Yoğunluğu Arasındaki İlişki. Fiziksel Tıp Dergisi. 1998;1:19-24.
45. Mole, P. A., et al. Evaluation of peripheral dual energy X-ray absorptiometry: comparison with single photon absorptiometry of the forearm and dual energy X-ray absorptiometry of the spine or femur. Br J Radiol. 1998;71:427-32.
46. Kroger, H., et al. Bone mineral density and risk factors for osteoporosis--a population-based study of 1600 perimenopausal women. Calcif Tissue Int. 1994;55:1-7.
47. Nishizawa, Y., et al. Obesity as a determinant of regional bone mineral density. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1991;37: 65-70.
48. Kin, K., et al. Bone mineral density of the spine in normal Japanese subjects using dual-energy X-ray absorptiometry: effect of obesity and menopausal status. Calcif Tissue Int. 1991;49:101-6.
49. Keen RW, H. D., et al. Family. Family history of appendicular fracture and risk of osteoporosis: a population-based study. Osteoporosis Int. 1999;10:161-6.
50. Özdemir, F.. Postmenopozal Osteoporotik Kadınlarda Aile Hikayesinde Osteoporoz Varlığının Önemi. Osteoporoz Dünyasından. 2006;12:60-3.
51. Aksu A, Z. M., Karaođlan B, Akın S, Kutsal G.Y, Atalay F, G.Dinçer. Osteoporoz, Eğitim Durumu ve Farkındalık Düzeyi Araştıırma Sonuçları. Osteoporoz Dünyasından. 2005;11:36-40.
52. Magnus JH, J. R., Berntsen GK, et al. What do Norwegian women and men know about osteoporosis? Osteoporosis Int. 1996;6:31-6.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:**

Dr. Halil Kasap  
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakóltesi  
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
01330 Balcalı-ADANA  
e-mail: hkasap@cu.edu.tr

geliş tarihi/received :29.07.2013

kabul tarihi/accepted:16.09.2013