

HEMODİYALİZ HASTALARINDA RENİN ANJİOTENSİN SİSTEMİNİN KEMİK METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ: ANJİOTENSİN KONVERTİNG ENZİM GEN POLİMORFİZMİNİN GENETİK BELİRLEYİCİ ETKİSİ

ROLE OF RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM IN BONE METABOLISM IN HEMODIALYSIS PATIENTS: GENETIC INFLUENCE OF ACE GENE POLYMORPHISM ON BONE MASS

Bülent Altın, A.A.Kıyıkım, V. Seyrantepe, Mustafa Arıcı, Celalettin I salan, Yunus Erdem, MÇağlar,
Şükrü Ulusoy, Ünal Yasavul, Çetin Turgan, Şali Çağlar

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ankara

ÖZET

Amaç: Günümüzde bir büyüme faktörü olarak kabul edilen angiotensin H'nin (Ang II) tip I reseptörünün osteositler üzerinde gösterilmesi, renin anjiotensin sistemi ile kemik arasındaki ilintinin araştırılmasına neden olmuştur. Bu çalışmanın amacı hemodiyaliz hastalarında kemik metabolizması ile renin anjiotensin sistemi (RAS) arasındaki ilişkinin araştırılması idi.

Metod: Bu çalışmaya 48 hemodiyaliz hastası alındı (28E, 20K). Hastaların kemik mineral dansitesi (KMD) lomber vertebradan dual enerji X - ray absorptiometre ile ölçüldü. Ölçümler yaş cinsiyete göre Z-skoru olarak standartize edildi ve Z skoru - 2.0'den büyük değerler osteopeni olarak kabul edildi. Hastaların anjiotensin konverting enzim (ACE) genotipleri (II, ID, DD) saptandı ve hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası plama renin aktiviteleri (PRA), serum ACE aktiviteleri ölçüldü. Kemik yapımının biyokimyasal belirleyicisi olan serum osteokalsin (OC), serum kemik alkalin fosfat (bAP) ve serum karboksit terminal propeptid tip 1 kollajen (PICP) ile serum paratiroid hormon (iPTH) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Hemodiyaliz hastalarının ortalama Z skoru -1.21 ± 1.46 idi ve onaltı hastada osteopeni (33 %) saptandı. (-2.75 - $kO.65$). Osteopenik hasta grubu ile osteopenik olmayan hastaların PRA, ACE aktiviteleri benzer idi. Öte yandan, diyaliz esnasında her iki grupta aynı miktarda sıvı alınması sonucunda belirlenen ve RAS aktivasyonun göstergesi olan PRA 'deki artış oranı osteopenik olmayan grupta osteopenik hastalara göre daha yüksek idi (% 232.6 ± 41.9 vs. % 78.8 ± 10.7 $p < 0.05$). PRA'deki artış oranı ile Z skoru arasında pozitif korelasyon saptandı ($r=0.48$, $p=0.001$). Serum ACE aktivitesi serum iPTH ($R=0.29$, $p=0.02$), serum OC ($R=0.35$, $p=0.01$), serum bAP ($R=0.34$, $p=0.01$), serum PCIP ($R=0.36$, $p=0.01$). Serum OC ($r=0.35$, $p=0.01$) ile pozitif korelasyon göstermekte idi. KMD (0.98 ± 0.18 g/cm vs. 0.87 ± 0.14 g/cm, $p < 0.05$) ve Z skorları (-0.6 ± 1.5 , vs. -1.6 ± 1.3 $p < 0.05$) DD hasta grubunda II/ID grubuna göre yüksek idi.

Sonuç: Hemodiyaliz hastalarında kemik yapımının biyokimyasal belirleyicilerinin ve radyolojik görüntüsünün, renin anjiotensin sisteminin aktivasyonu ile birlikteliği bu sistemin kemik metabolizmasındaki rolünün bir göstergesi olabilir.

Anahtar Kelimeler : Renin anjiotensin sistemi, Anjiotensin konverting enzim gen polimorfizmi. Kemik, Hemodiyaliz

SUMMARY

Objectives: Recently, angiotensin II (Ang II) receptor-subtype I binding sites has been demonstrated on bone cell precursors and extensive area of research has been focused on the effects of renin angiotensin system (RAS) on bone formation. So the aim of this study is to address the influence of renin angiotensin system on the bone metabolism in hemodialysis patients.

Method: Forthly - eight hemodialysis patients (28 male, 20 female) were involved in this study. Bone mineral density (BMD) was estimated at lumbar spine using dual energy X - ray bone absorptiometry and expressed as Z-scores standardized by age and gender. Z score worse than - 2.0 were considered as osteopenia. Angiotensin converting enzyme (ACE) gene polymorphism (II, ID, DD) of the hemodialysis patients were determined and plasma renin activity (PRA), serum ACE activity were measured before and after hemodialysis. Intact parathyroid hormone (iPTH) and osteocalcin (BGP), bone alkaline phosphatase (bAP) and carboxy terminal propeptide type I collagen (PICP) were measured as the markers of bone formation.

Results: Z score of the hemodialysis patients was -1.21 ± 1.46 and sixteen patients (33 %) were osteopenia ($- 2.75$ - 0.65). The PRA, ACE activity were similar in the osteopenic and non-osteopenic patients. Activation of RAS by same amount of volume depletion in two groups resulted in a higher percent increment in PRA in the non-osteopenic group compared to osteopenic patients (% 232.6 ± 41.9 vs. % 78.8 ± 10.7 $p < 0.05$) at the end of dialysis session. Also PRA increments in hemodialysis patients were correlated with Z score ($p < 0.05$). ACE activity was positively correlated with serum iPTH ($R=0.29$, $p=0.02$), serum OC ($R=0.35$, $p=0.01$), serum bAP ($R=0.34$, $p=0.01$), serum PCIP ($R=0.36$, $p=0.01$). Bone mass (0.98 ± 0.18 g/cm vs. 0.87 ± 0.14 g/cm , $p < 0.05$) and Z scores (-0.6 ± 1.5 , vs. -1.6 ± 1.3 $p < 0.05$) were higher in DD group compared to II/ID group

Conclusion: Association of biochemical and radiological signs of increased bone formation with activated RAS in hemodialysis patients might be an additional evidence for the involvement of this system in the regulation of bone metabolism

Key Words: Renin angiotensin system, Angiotensin converting enzyme gene polymorphism, Bone, Hemodialysis

GİRİŞ

Sürekli olarak yeniden yapılanmanın olduğu kemik dokusunda hücre fonksiyonlarının kontrolünde hormonların yanısıra bazı büyüme faktörlerin rol oynadığı gösterilmiştir (1,2) Hüruma ve ark. osteoblast hücre kültürlerinde anjiotensin H'nin DNA sentezini arttırdığı ve bu etkinin anjiotensin tip I reseptör inhibitörünün ortama eklendiğinde ortadan kalktığını göstermesi ile renin anjiotensin sisteminin kemik dokusundaki etkisi merak konusu olmuştur (3). Daha sonra yapılan çalışmalarda ise anjiotensin H'nin hem osteoblastik hücre hem de osteoklastik hücre proliferasyonunu ve aktivitesini etkilediği saptanmıştır (4,5). Bu verilerin ışığında endotelden zengin olan kemikte lokal renin anjiotensin sisteminin varlığı da gündeme gelmiştir.

Ailelerde ve eş yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalarda bireylerin kemik kitleleri arasında ortaya çıkan farklılıklarda genetik yapının % 80'e varan oranlarda etkili olduğu belirlenmesi ile genetik faktörlerinde kemik kitlesinin oluşumundaki rolü araştırılmaya başlanmıştır (6). Kemik metabolizmasının birçok hormon ve büyüme faktörü ile ilintili olduğu gözönüne alındığında genetik kontrolün birden çok gen üzerinden sağlandığı düşünülmüştür. Bu amaçla vitamin D reseptör gen, estrogen reseptör gen, transforming growth faktör beta gen ve kollajen tip 1 gen yapıları araştırılmış ve bu genlerde bireylere göre değişkenlik gösteren genetik yapının bir başka deyişle genetik polimorfizmin sağlıklı bireylerde ve üremik kemik hastalığı olan hemodiyaliz hastalarının kemik kitlesinin belirlenmesinde rolü olduğu saptanmıştır (7,8,9).

Renin anjiotensin sistemini (RAS) oluşturan komponentlerin gen yapılarının aydınlatılması ile bu yapılar da polimorfizm gösteren bölgelerin varlığı belirlenmiştir. İlk olarak tanımlanan anjiotensin konverting enzim (ACE) gen polimorfizmi kromozom 17'de olan bu genin 16'nci intronunda 287 baz çiftinin varlığı (insersiyon, I) veya yokluğu (delesyon, D) ile karakterizedir (10). Bu bilgilerin ışığında DD, İD ve II olmak üzere üç ayrı genotip tanımlanmış ve delesyon polimorfizmi olan kişilerde doku ve serum ACE düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (11,12). Klinik çalışmalarda DD genotipinin hem bazı böbrek hastalıklarının progresyonunda hem de genel populasyonda ve hemodiyaliz hastalarında kardiyovasküler hastalıklar açısından bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (10).

Kemik biyopsisinin invazif bir metod olması nedeni ile kemik dönüşümünde önemli rol oynayan paratiroid hormon ile kemik yapımının biyokimyasal göstergesi olan serum osteokalsin, serum kemiğe spesifik alkalen fosfataz ve serum prokollajen tip I'in

karboksi terminal propeptid düzeylerinin üremik kemik hastalığın ayırıcı tanısında kullanımı gündeme gelmiştir (13,14). Yakın dönemde yapılan çalışmalarda histomorfometrik incelemelerde elde edilen veriler ile serum paratiroid hormon (İPTH) düzeyleri ve serum osteokalsin (OC), serum kemiğe spesifik alkalen fosfataz düzeyleri (bAP) ve serum prokollajen tip I'in karboksi terminal propeptid (PCIP) düzeyleri arasında ilintiler kurulmaya çalışılmıştır. Bunun yanısıra kemik mineral dansite ölçümleri, üremik kemik hastalığın takibinde invaziv olmayan bir metod olarak kullanılmaya başlanmıştır (15,16).

Bu çalışmada hemodiyaliz hastalarında renin anjiotensin sisteminin kemik metabolizması üzerine olan etkisi değerlendirildi. Bunun yanısıra kemik kitlesinin belirlenmesinde genetik faktörlerin önemli rol oynadığı göz önüne alınarak anjiotensin konverting enzim gen polimorfizminin hemodiyaliz hastalarının kemik kitlesinin oluşmasındaki rolü belirlenmeye çalışıldı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Hacettepe Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesinde tedavi gören son dönem böbrek yetmezliğinde olan 48 hasta (28 erkek, 20 kadın) dahil edildi. Hastaların yaşları 20 ila 66 (ortalama 42 ± 13) yıl arasında idi. Hemodiyalize giriş süreleri 12 ay ile 221 ay arasında idi (ortalama 93 ± 55 ay). Hastaların hepsi haftada üç kez beş saat süreyle kuprofan membran kullanarak hemodiyalize girmekte idi. Hastaların hepsinde bikarbonatlı solüsyon dializat olarak kullanılmaktaydı. Kullanılan dializat kalsiyum konsantrasyonu 1.2 mmol/l idi. Hastaların hiçbirisi kortikosteroid veya başka bir immünsüpresif ilaç kullanmıyordu. Son dönem böbrek yetmezliğine 22 hastada glomerülo nefrit, 6 hastada kronik pyelonefrit, 3 hastada ürolitiazis, 2 hastada amiloidoz, 2 hastada polikistik böbrek yol açmıştı. Onbir hastada ise sebep saptanamamıştı. 15 hasta son on yıl içinde renal transplantasyon nedeni ile immunosüpresif tedavi kullanmış idi. Hastaların hepsi fosfat başlıyıcı ajan olarak kalsiyum karbonat (3gr/gün) kullanmaktaydılar. Hastaların 24 tanesi oral aktif vitamin D3 tedavisi almakta (0,25-0,50µg/gün) idi.

Her hastadan hemodiyaliz seansının öncesinde ve sonunda 15 cc venöz kan örnekleri alındı. Kan örneklerinden hem normal santrifüj ile hem de soğuk santrifüj kullanılarak serum örnekleri elde edildi ve -70° C'da saklandı. Diyaliz seansı öncesinde alınan örneklerden serum PTH düzeyleri, serum ACE aktiviteyi, serum osteokalsin düzeyleri, serum prokollajen tip I'in karboksi terminal propeptid düzeyi, serum kemiğe spesifik alkalen fosfataz düzeyleri, ve plazma renin aktiviteyi belirlendi. Hemodiyaliz seansı

sonunda alınan örneklerden serum ACE aktiviteleri, ve plazma renin aktiviteleri belirlendi. Ayrıca hastaların anjiotensin konverting enzim genotipinin belirlenmesi için kan örnekleri EDTA ile antikoagule edilmiş tüplere alındı.

Serum intact PTH düzeyleri "solid phase chemiluminescent immunometric assay" (Immulate, Diagnostic Products Corporation, USA) metodu ile belirlendi. . Sağlıklı bireylerde yapılan intact PTH ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre 12 - 72 pg/ml arasındaki değerler normal kabul edilmekteydi. Serum osteokalsin düzeyleri osteokalsine karşı elde edilmiş antikorlar kulanılan immunoassay (NovoCalcin Metra Biosystems Inc, USA) metodu ile belirlendi. Sağlıklı bireylerde yapılan serum osteokalsin ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre erkeklerde 3.40 - 9.10 ng/ml kadınlarda ise 3.7- 10.0 ng/ml arasındaki değerler normal kabul edildi. Serum kemiğe spesifik alkalen fosfataz düzeyleri kemiğe spesifik alkalen fosfataza karşı elde edilmiş monoklonal antikorlar kullanılan immunoassay (Alkphase -B, Metra Biosystems Inc, USA) metodu ile belirlendi. Sağlıklı bireylerde yapılan serum kemiğe spesifik alkalen fosfataz ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre erkeklerde 15-41.3 U/L kadınlarda ise 25 - 55 yaşlar arasında 11.6-30.6 U/L, 56 yaş ve üstü için 14.8-43.4 U/L arasındaki değerler normal kabul edildi. Serum Prokollajen tip I'in karboksi terminal propeptidil düzeyleri bu propeptide karşı elde edilmiş monoklonal antikorlar kullanılan sandviç immunoassay (Prolagen-C, Metra Biosystems Inc, USA) metodu ile belirlendi. Sağlıklı bireylerde yapılan serum Prokollajen tip I'in karboksi terminal propeptid düzey ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre erkeklerde 70-150 ng/ml kadınlarda ise 75-165 ng/ml arasındaki değerler normal kabul edildi.

Plazma renin aktivitesi anjiotensin I oluşum hızının belirlendiği radyoimmunoassay (Ren-CT2, Cıs Bio International, France) metodu ile ölçüldü. Sağlıklı bireylerde yatar pozisyonda alınan örneklerde yapılan plazma renin aktivite ölçümlerinde elde edilen sonuçlara göre arasındaki değerler 0.2 - 2.8 ng/ml/saat normal kabul edildi. Serum anjiotensin konverting enzim aktivitesi kullanılan sfektorometrik metod (Angiotensin Converting Enzyme, Sigma Diagnostics, USA) ile belirlendi. Sağlıklı bireylerde elde edilen sonuçlara göre 8-52 U/L arasındaki değerler normal kabul edildi.

ACE gen polimorfizminin (I/D) laboratuvar koşullarında belirlenmesi 'polymerase chain reaction' (PCR) ile DNA amplifikasyonu ve elde edilen ürünlerin elektroforez ile ayrımı esasına dayanmaktadır. Bu amaçla 5 ccc venöz kan örneği EDTA ile antikoagule

edilen tüpe alındı. Alınan örnek 2500 rpm/de 20 dakika süre ile santifuje edildikten sonra plazma kısmı atıldı ve lökossitten zengin olan 'buffy coat' kısmı ayrıldı. Lenfosit DNA'sını elde edebilmek için ticari amaçlı hazırlanmış kit (QIAamp Blood Kıt QIAGEN) kullanıldı. Her hastadan elde edilen DNA miktarı sfektorometre altında 260 nm'de absorpsiyonu ile değerlendirildi.

ACE gen polimorfizmi için daha önceki çalışmalarda optimize edilmiş PCR koşulları kullanıldı (12). Bu koşullarda amplifiye olmuş PCR ürünler % 1,5'lik agaroz jelde koşturuldu. Agaroz jelde D alel için 319 baz çiftlik ve I aleli için 597 baz çiftlik bandlar elde edilecektir. DD genotipi için %10-15 oranında ortaya çıkan hatalı okumaları önlemek amacıyla insersiyon (I) spesifik primerler kullanılarak yapılan ikinci PCR ile sonuçlar kontrol edildi. Bu PCR ile elde edilen ürünler agaroz jelde koşturulduğunda sadece I alelin varlığında 335 baz çiftlik band oluştu.

Kemik mineral dansite ölçümleri için lübar bölgeden dual enerji X - ray absorpsiyometre ile yapıldı (QDR 4500 Fan Beam X-Ray Bone Dansitometer 1997 USA). Kemik mineral miktarı (gram) ve kemik mineral dansitesi (gram/cm²) belirlendi. Ölçümler 1 ile 4 üncü lübar vertebra aralığından yapıldı ve her vertebradan elde edilen sonuçlar kullanılarak ortalama hesaplandı. Sağlıklı bireylerin kemik mineral dansitesi kullanılarak elde edilen veri tabanına göre, hastaların ölçülen kemik dansometresi aynı yaş grubunda ve cinsiyetteki sağlıklı bireylerin ortalama kemik mineral dansitesinin standart sapması olarak Z değeri şeklinde ifade edildi. Her iki cinsiyette ve her yaş grubunda ortalama değerde Z değeri sıfır iken grubun ancak % 2,5'lük kısmında Z değeri -2'nin altında kalmaktadır. Ölçülen kemik mineral dansitesinin sağlıklı bireylerin veritabanına yerleştirildiğinde elde edilen değerinin Z değerinin -2'nin altında olması literatürdeki bilgiler ışığında (15) osteopeni olarak tanımlandı.

İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Kovarians etkiyi ortadan kaldırmak için bütün karakteristik parametreler için (yaş, cinsiyet, dializ süresi) multivariyet analiz yapıldı. Mann Whitney U testi hemodiyaliz hastalarının alt gruplarının karşılaştırılmasında kullanıldı. Korelasyon testleri için Pearson korelasyon testi kullanıldı. Korelasyon testi ile elde edilen pozitif sonuçlar regresyon analizi ile linear model oluşumu yönünden değerlendirildi. Sonuçlar ortalama standart sapma olarak verildi ve P değerinin 0,05'in altında olması istatistiksel anlamlılık kabul edildi. SPSS V5.01 (Statistical Package Program For Social Sciences) veritabanının analizinde kullanıldı.

SONUÇLAR

Hastaların kemik mineral dansite ölçümlerinde ortalama kemik mineral dansitesi 0.92 ± 0.17 g/cm² ve Z değeri -1.21 ± 1.46 olarak saptandı. Kırksekiz hasta içinde 16 hastanın (%33) Z değeri -2'nin altında ve osteopenik hasta grubunu oluşturmaktaydı (Grup 1). Osteopenik hasta grubunda ortalama kemik mineral dansitesi 0.79 ± 0.17 g/cm² ve Z değeri -2.75 ± 0.65 iken osteopenisi olmayanlarda (Grup2) ise kemik mineral dansitesi 0.98 ± 0.12 g/cm² ve Z değeri -0.44 ± 1.0 (p 0.01).

Hastaların diyaliz sonrası ortalama plazma renin aktivitesi (DSPRA) diyaliz öncesi plazma renin aktivitesinden (DÖPRA) anlamlı olarak yüksek idi (3.4 ± 3.8 ng/ml/saat vs. 1.93 ± 2.5 ng/ml/saat, p<0,05) Hemodializ işlemi ile PRA'deki ortalama artış oranı yüzde (%) olarak saptandı (% artış: $100 \times \text{DSPRA} - \text{DÖPRA} / \text{DÖPRA}$) Bu oran tüm hastalarda % 181.2 ± 35.4 idi. Hemodializ öncesi ve sonrası ortalama plazma renin aktivitesi hasta gruplarında benzer idi (**Tablo 1**). Ancak hemodializ işlemi sırasında alınan sıvı miktarı her iki grup arasında fark olmamasına ($1,7 \pm 0,4$ kg vs $1,6 \pm 0,5$ kg p>0,05) rağmen PRA'daki artış oranı osteopenik olmayan hasta grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulundu (% 232.6 ± 41.9 vs. % 78.8 ± 10.7 p<0,05). Hastaların tümünde ise PRA'daki artış oranı ile kemik mineral dansitesi (R=0,30, p=0,003) ve Z değeri arasında pozitif korelasyon (R=0,48, p=0,001) saptandı.

Hastaların hemodializ seansı öncesinde ve sonrasında serum ACE aktivitesi arasında fark saptanmadı (32.7 ± 15.7 vs. $33.7 \pm 17,0$ p>0,05). Her iki hasta grubunun ACE aktiviteleri benzer idi (p>0,05) (**Tablo 1**). Hastaların tümünde hemodializ seansı öncesindeki serum ACE aktiviteleri ile serum iPTH değerleri (R=0,29, p=0,02), serum osteokalsin düzeyleri (R=0,35, p=0,01), serum kemik alkalin fosfataz değerleri (R=0,34, p=0,01) (**Şekil 1**), serum prokollajen tip I'in karboks terminal propeptid düzeyleri (R=0,36, p=0,01) arasında pozitif korelasyon bulundu.

Hastaların anjiyotensin konverting enzim genotiplerinin dağılımı: 2 hastanın II (% 4,2), 26 hastanın İD (% 54,2), 20 hastanın DD (% 41,6) idi. Kemik mineral dansitesi de DD genotipindeki hastalarda II ve İD genotipindeki hastalara göre anlamlı olarak yüksek idi (0.98 ± 0.18 g/cm² vs. 0.87 ± 0.14 g/cm², p<0,05) (**Tablo 2**). II ve İD genotipinde olan hastaların DD genotipinde olan hastalara göre Z değerleri düşük idi (-1.6 ± 1.3 vs $-0.6 \pm 1,5$, p<0,05) (**Şekil 2**). Bu iki grubun serum osteokalsin düzeyi, serum kemik alkalin fosfataz değerleri, serum prokollajen tip I'in karboks terminal propeptid düzeyleri arasında fark saptanmadı (**Tablo 2**).

Tablo 1: Hemodializ hastalarının diyaliz öncesi ve sonrası plazma renin aktivitesi ve serum ACE aktivitesi

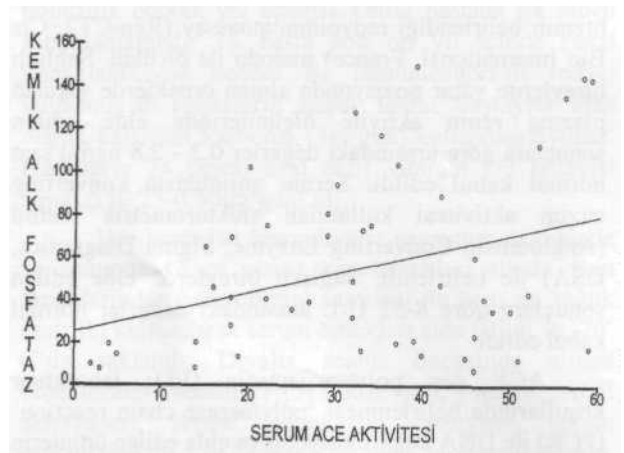
	Osteopenik Hastalar (Grup1)	Osteopenisi Olmayan Hastalar (Grup 2)
Dializ öncesi PRA (ng/ml/saat)	2.2±2.8	1.8±2.4
Dializ sonrası PRA (ng/ml/saat)	3.1±4.2	3.6±3.6
PRA da artış (%)	78.8±10.7	232.6±41.9*
Dializ öncesi ACE aktivitesi (U/L)	31.Ü14.3.	33.5±16.4
Dializ sonrası ACE aktivitesi (U/L)	31,5±15,2	34,5±17,6

* p<0.05

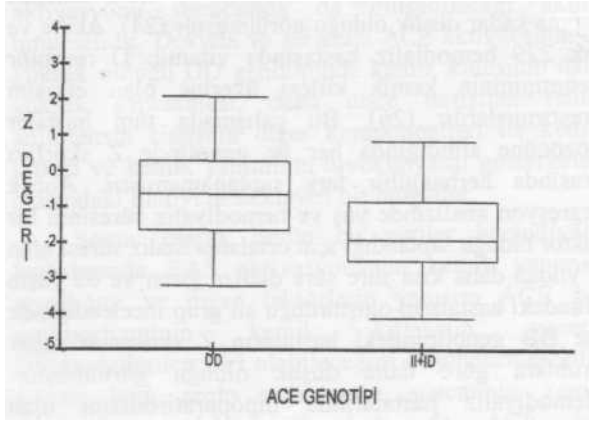
Tablo 2: Hemodializ hastalarının diyaliz öncesi ve sonrası plazma renin aktivitesi ve serum ACE aktivitesi

	II + ID Genotip (n= 29)	DD Genotip (n = 19)
Serum Osteokalsin (ng/ml)	42.3±15.5	46.5±13.4
Serum Kemik Alk P(U/L)	53.3±39.8	58.2±46.3
Serum PCIP (ng/ml)	216.5±97.2	252.5±87.9
Kemik Mineral Dansitesi (g/cm ²)	0.87±0.14	0.98±0.18*
Z Değeri	- 1.6±1.3	-0.6±1,5*

* p<0.05



Şekil 1: Serum ACE aktivitesi ile serum kemik alkalin fosfataz (ng/ml) düzeyleri arasındaki korelasyon (R=0,34, p=0,01).



Şekil 2: Hastaların ACE genotipine göre Z değerleri

TARTIŞMA

Son dönemlerde yapılan çalışmalarda transforming growth faktör, basic fibroblast faktör ve insulin like growth faktör 1 gibi büyüme faktörlerinin kemik hücre kültürlerinde büyümeyi düzenlemede rol oynadığı gösterilmiştir, insulin like growth faktör in vitro hem osteoblastik hücre replikasyonunu hem de bu hücrelerden kollajen yapımını arttırdığı saptanmıştır (1). Rekombinan insulin like growth faktör ile yapılan insan çalışmalarında bu faktörün kemik oluşumunu hızlandırdığı bildirilmiştir (17). Fibroblast growth faktörün de benzer şekilde in vitro osteoblast hücre proliferasyonunu ve kollajen yapımını arttırdığı saptanmıştır (18). Transforming growth faktörü ise osteoblast hücre proliferasyonunu ve matris yapımını arttırmaktadır (2). Anjiotensin H'in birçok dokuda büyüme faktörü olarak etki etmesinin yanısıra kemik dokunun lokal olarak RAS'ın varlığının bilindiği endotelde zengin olması, renin anjiotensin sisteminin kemik metabolizması ile olan ilintisinin araştırılmasına neden olmuştur, ilk kez Hiruma ve ark. yaptıkları çalışmada anjiotensin H'nin yenidoğan sıçanların kemik dokusundan elde ettikleri osteoblasttan zengin hücre kültürlerinde doza bağımlı olarak DNA sentezini arttırdığını bildirmişlerdir (3). Ortama anjiotensin II tip 1 reseptör antagonisti eklendiğinde bu etkinin ortadan kalktığını saptamışlardır. Bunun yanısıra anjiotensin II tip 1 reseptörünün aktivasyonunun göstergesi olan kültür ortamında inositol trifosfat düzeylerinin ve protein kinaz aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Bu bulguların ışığında anjiotensin H'in osteoblast hücre kültüründe tip 1 reseptörü aracılığı ile proliferasyona neden olduğu sonucuna varmışlardır. Hem fetal sıçan hem de yetişkin insan trabeküler kemik hücre kültürlerinde yapılan bir diğer çalışmada da anjiotensin

II'in DNA sentezini ve tip 1 prokollajen sentezini arttırdığı saptanmıştır (5). Bu çalışmada yapılan klonal hücre analizi ve otoradyografik incelemelerde osteoblastik prekürsörlerde anjiotensin II'in tip 1 reseptörlerinin varlığı saptanmış ancak matür osteoblastik hücrelerde reseptörlerin varlığı gösterilememiştir. Matür fenotipdeki osteoblast hücre kültüründe anjiotensin II' in herhangi bir etkisi gözlemlenmesine rağmen bu hücrelerin osteoblastik prekürsörler ile birlikte kültür ortamına konduklarında anabolik etki matür hücrelerde de saptanmıştır. Bu gözlem anjiotensin II'nin kemik hücrelerinin bir kısmını direk olarak etkilerken, bir kısmını ise parakrin yol ile etkilediği düşüncesinin ortaya atılmasına neden olmuştur (5). Parakrin etkininin de diğer bazı hücre serilerinde anjiotensin II'nin medyatörü olduğu bildirilen transforming growth faktör, insulin like growth faktör ve fibroblast growth faktör aracılığı ile oluşabileceği öne sürülmüştür. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılmakla beraber, bu çalışmada fetal sıçan kemik dokusunda ve erişkin insan kemik dokusunda elde edilen bulguların benzer olması, anjiotensin II'in kemik üzerine olan etkisinin belli bir organizma türüne ve/veya belli bir yaş dönemine özgü olmadığını akla getirmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise anjiotensin II'nin rat kalvariyyumunda osteoblast hücrelerin matürasyonunu yavaşlattığı, bunun sonucunda da bu hücrelerin proliferasyonunu arttırabileceği öne sürülmüştür (4). Öte yandan endotel tarafından üretilen maddelerden prostaglandinlerin, nitrik oksit, endotelinin ve platelet like growth faktörün kemik rezorpsiyonunu artırması nedeniyle (19) Hatton ve ark anjiotensin II'nin de osteoklastlar üzerine olan etkisini araştırmışlar ve anjiotensin II'nin izole olarak osteoklastların sayısını ve rezorpsiyon fonksiyonlarını arttırmadıkları saptamışlardır (20). Ancak anjiotensin II'in osteoklastların osteoblastik hücrelerle birlikte kültür ortamına konduğu koşulda rezorpsiyonu arttırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada anjiotensin I'inde anjiotensin II' ye benzer etkiler oluşturması ve ortama ACE inhibitörlerinin eklenmesi ile bu etkinin ortadan kalkması kemikte lokal bir renin anjiotensin sisteminin varlığı ihtimalini desteklemiştir. Görüldüğü üzere literatürde anjiotensin II'in in vitro olarak kemik hücrelerinin proliferasyonuna ve fonksiyonlarına olan etkilerinin araştırıldığı çalışmalar kısıtlı sayıdadır. Bunun yanısıra bu çalışmalarda muhtemelen farklı hücre kültürlerinin kullanımı farklı sonuçlar elde edilmesine neden olmuştur.

Hamilelik döneminde ACE inhibitörü kullanımının fetusda kafatası dokusunun oluşmaması ile sonuçlandığı bildirilmiştir (21,22). Bu gözlem in vivo olarak RAS ile kemik doku arasındaki ilişkinin bir

indirek bulgusu olarak yorumlanabilir. Tylavsky ve ark. menapoz öncesinde olan 47 bayan hastada kemik mineral dansitesi ile plazma renin aktivitesini arasındaki ilişkiyi araştırmışlar ve düşük plazma renin aktivitesi ile düşük kemik kitlesi birlikteliği saptamışlardır (23). PRA'sı düşük olan grubda radyal kemik kitlesini % 4,3 düşük saptamışlardır. Bunun yanısıra plazma renin aktivitesi ile kalsiyum alımının ve kalsiyum alımının sodyum alımına bölündüğünde elde edilen katsayı ile radyal kemik kalça ve tüm vücut kemik mineral dansitesi arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Bu bulguların ışığında günlük 3400 mg'ın üstünde sodyum alımının PRA'ni inhibe ederek kemik kitlesini azaltabileceğini öne sürmüşlerdir. Hemodiyaliz hastalarında yapılan bu çalışmada ise osteopenik olan hastalarda hemodiyaliz seansı sonundaki PRA'deki artış osteopenik olmayanlara göre daha düşük ve PRA'daki artış oranı ile Z skorları arasında pozitif korelasyon saptandı. Hemodiyaliz hastalarında elde edilen bu sonuçlar menapoz öncesi kadınlarda bildirilen bulgulara paralellik göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada kemik yapımının biyokimyasal parametreleri olan serum osteokalsin, serum kemik alkalin fosfat ve serum PCIP düzeyleri ile serum ACE aktivitesi arasında pozitif korelasyon bulundu. Bütün bu sonuçlar hemodiyaliz hastalarında RAS aktivitesinin kemik yapımını belirleyen faktörlerden biri olduğu düşüncesini kuvvetlendirmektedir.

Ailelerde ve eş yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalarda bireylerin kemik kitleleri arasında ortaya çıkan farklılıklarda genetik faktörlerin % 80'e varan oranlarda etkili olduğu belirlenmiştir (6). Sistemik ve lokal olarak birçok hormonun ve büyüme faktörlerin kemik metabolizması üzerine etkisi olduğu düşünüldüğünde genetik etkinin poligenik karakterde olacağı aşikardır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda vitamin D reseptör geninin, estrogen reseptör geninin, transformering growth faktör beta geninde ve kollajen tip I geninde ortaya çıkan değişikliklerin bir başka deyişle bu genlerdeki polimorfizmin kemik kitlesini etkilediği saptanmıştır (8,9,24). Bu polimorfizmlerden en çok vitamin D reseptör geninde ortaya çıkan mutasyonun hem sağlıklı bireylerde hem de üremik kemik hastalığı olan hastalarda kemik kitlesi ile olan ilişkisi araştırılmıştır (24,25). Mutasyonun varlığına veya yokluğuna göre BB, Bb, bb olmak üzere üç ayrı genotip tanımlanmıştır. İlk kez Morison ve ark sağlıklı erişkin ikizlerde yaptıkları çalışmada BB genotipinin daha düşük kemik kitlesine ve daha hızlı kemik kaybına eşlik ettiğini göstermişlerdir (7). Yakın dönemde literatürde yapılan 16 çalışmanın verileri meta analiz ile değerlendirilmiş ve BB genotipindeki bireylerin kalça, lomber ve radius kemik mineral dansite ölçümlerin bb

genotipinde olanlara göre ortalama 1,7 ila 2 standart sapma kadar düşük olduğu görülmüştür (24). Akibe ve ark 229 hemodializ hastasında vitamin D reseptör genotipinin kemik kitlesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır (26). Bu çalışmada tüm hastalar gözönüne alındığında her üç genotipde Z skorları arasında herhangi bir fark saptanamamıştır. Ancak regresyon analizinde yaş ve hemodiyaliz süresinin bir faktör olduğu saptandığı için ortalama dializ süresi olan 8 yıldan daha kısa süre süre dialize giren ve 65 yaşın altındaki hastaların oluşturduğu alt grup incelendiğinde ise BB genotipindeki hastaların Z skorunun diğer gruplara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Hemodiyaliz hastalarında hipoparatiroidizmi olan hastalarda BB genotipinin daha sık olduğu ve bb genotipi olan hastaların hipoparatiroidizm geliştirme risklerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (27). Bu bulguların yanısıra kortikosteroid kullanımı ile kemik kitlesinde oluşan azalmanın vitamin D reseptör genotipine göre değişiklik gösterdiği renal transplantasyonlu hastalarda bb genotipinde olan hastaların kemik kaybının daha az olduğu saptanmıştır (27). Benzer şekilde Tip I kollajen yapımını düzenleyen COLIA 1 genin aktivitesini düzenleyen bölgesinde saptanan nokta mutasyonu ile yapılan çalışmalarda S ve s olarak iki farklı alel ve buna bağlı olarak SS Ss ss olmak üzere üç ayrı genotip tanımlanmıştır. Menapoz öncesi kadınlarda yapılan çalışmalarda "s" alelinin varlığının osteoporozu arttırdığını dolayısıyla Ss ve ss genotipde olanlar da fraktür riskinin artmış olduğu saptanmıştır (9).

Son dönemlerde renin anjiyotensin sisteminin kemik metabolizması üzerine olan etkilerinin araştırıldığı deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen verilerin ışığında bu çalışmada anjiyotensin konverting enzim polimorfizminin hemodiyaliz hastalarının kemik kitlesi üzerine olan etkisi değerlendirildi. Hemodiyaliz hastalarında da ACE genotipinin sol ventrikül hipertofisi oluşumunda rol oynadığı ve hemodializ süresi arttıkça muhtemelen artan kardiyovasküler mortalite nedeni ile DD genotip sıklığının azaldığı bildirilmiştir (28). Bu bulgular ACE genotipinin hemodiyaliz hastalarında da genel populasyona benzer şekilde kardiyovasküler hastalıklar açısından bir risk faktörü olduğunu ve fenotipik önemi olduğunun bir göstergesidir. Bu çalışmada DD genotipinde elde edilen kemik kitlesi ve Z skorları II ve İD grubuna göre daha yüksek idi. İstatistiksel açıdan II grubunun sayısı yeterli olmadığı için II ile İD grubunu ayrı olarak değerlendirmek mümkün olmadı. ACE gen polimorfizminin hemodiyaliz hastalarının kemik kitlesine olan bu etkisi sistemik RAS aktivasyonunun yanısıra kemikte varlığı öne sürülen lokal RAS

aktivasyonu sonucunda da oluşabileceği akıldta tutulmalıdır. Dokuda ve serumda ACE aktivitesinin en yüksek olduğu DD genotipinde kemik kitlesinin daha yüksek saptanması, daha önce tartışılan renin anjiotensin sistemin diğer komponentleri ile kemik kitlesi ve kemik yapımının biyokimyasal göstergeleri arasındaki ilintiyi destekleyen bir bulgudur.

Sonuç olarak bütün bu veriler hemodiyaliz hastalarında RAS aktivasyonunun kemik yapımını artırdığını ve diğer faktörlerin yanısıra ACE gen polimorfizminin kemik kitlesinin genetik belirleyicilerden biri olabileceğini düşündürmektedir. Ancak hem renin anjiotensin sisteminin kemik metabolizmasındaki rolü hem de ACE gen polimorfizminin kemik dokudaki genetik etkilerinin belirlenmesi için bu yöndeki çalışmaların sayısının artması gereklidir.

KAYNAKLAR

- Hock JM, Centralla M, Canalis E. Insulin like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 1998; 122: 254-260.
- Centralla M, Me Carthy T, Canalis E. (1987). Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast enriched cell cultures. *J Biol Chem* 1987; 262: 2869-2874.
- Hiruma Y, Inoue A, Hirose S. Anjiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvaria. *Biochem Biophys Res Comtnun* 1997; 230: 176-178.
- Hagiwara H, Hiruma Y, Inoue A. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *J Endocrinol* 1998; 156:543-550.
- Lamparter S, Kling L, Schrader M. Effect of angiotensin II on bone cells in vitro. *J Cell Physiol* 1998; 175: 89-98.
- Pocock NA, Eisman JA, Hooper J, Yeates M, Sambrock PN, Elberl S. Genetic determinants of bone mass in adults. *J Clin Invest* 1987; 80: 706-710.
- Morrison NA, Qi JC, Tokito A. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; 367: 284-287.
- Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen reseptör gene. *J Bone Miner Res* 1996; 11:306-311.
- Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Spl binding site in the collagen type 1 alpha gene. *Nature Genet* 1996; 14: 203-205.
- Yoshida H, Kon V, Ichikawa I. Polymorphisms of the renin angiotensin system genes in progressive renal diseases. *Kidney Int* 1996; 50: 732-744.
- Rigat B, Hubert C, Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion and deletion polymorphism in the angiotensin I converting enzyme gene accounting for half variance in serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
- Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhanec G, Gelas F. Angiotensin converting enzyme in human circulating mononuclear cells: Genetic polymorphism of expression in T lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290: 33-40.
- Fletcher S, Jones RG, Rayner HC, et al. Assessment of renal osteodystrophy in dialysis patients: use of bone alkaline phosphatase, bone mineral density and parathyroid ultrasound in comparison with bone histology. *Nephron* 1997; 75: 412-419.
- Coen G, Ballanti P, Bonucci E, et al. Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 2294-22302.
- Stein MS, Packham DK, Ebeling PR, Wark JD, Becker JB. Prevalence and risk factors for osteopenia in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996; 28: 515-522.
- Ghan TM, Pun KK, Cheng KP. Total and regional bone densities in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1992;7:835-839.
- Ebeling PR, Jones JD, O'Fallon WM, Janes CH, Riggs BL. Short term effects of recombinant human insulin like growth factor I on bone turnover in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1384-1387.
- Centralla M, Canalis E, Me Carthy T. Effects of basic-fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J ClinInvest*1988;81: 1572-1577.
- Zaidi M, Alam T, Bax BE, et al. Role of the endothelial cell in osteoclast control: New perspectives. *Bone* 1993; 14:97-102.
- Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ. Angiotensin II generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 1997; 152: 5-10.
- Barr MJ, Cohen MMJ. ACE inhibitor fetopathy and hypocalvaria the kidney-skull connection. *Teratology* 1991;44:485-495.
- Mehta N, Modt N. ACE inhibitors in pregnancy. *Lancet* 1989; ii: s96.
- Tylavsky FA, Johnson KC, Wan JY, Harshtield G. Plasma renin activity is associated with bone mineral density in premenopausal women. *Osteoporosis Int* 1998; 8: 136-140.
- Cooper GS, Umbach DM. Are vitamin D gene polymorphism associated with bone mineral density ? A meta analysis. *J Bone Miner Res* 1996; 11: 1841-1849.
- Torres A, Salido E. Vitamin D receptor genotype its role in bone mass and turnover in non-renal and renal patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 1811-1812.

26. Akiba T, Ando R, Kurihara S, Heishi M, Tazawa H, Marumo F. Is the bone mass of hemodialysis patients genetically determined ? *Kidney Int Suppl* 1997; 62: 69-72.
27. Alonso CG, Diaz MN, Corte DC, Martin FL, Andia JB. Vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms: effect on bone mass, bone loss and parathyroid hormone regulation. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 73-77.
28. Qsonno E, Kurihara S, Hayama N et al. Insertion and deletion polymorphism in intron 16 of the ACE gene and left ventricular hypertrophy in patients with end stage renal failure. *Am J Kidney Disease* 1998; 32: 725-730.