

Osteokalsin (BGP)

I. Biyokimyasal Özellikleri

Gül GÜNER

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Osteokalsin-kemik Gla (gamma-karboksiglutamik asid) proteini mineralize dokuların organik matrisinde yer alan, K vitamini bağımlı bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Kemğin "non-kollajenöz" proteinlerinin %10-20'sini oluşturan bu bileşik, insan vücudunda en yüksek oranda bulunan on proteinden biridir. Osteokalsin günümüzde kemik metabolizmasının bir "biomarker"i olarak görülmektedir. Bu yazının amacı, sözü edilen proteinle ilgili, son on yılda yayımlanmış literatür bilgilerini derlemek ve değerlendirmektir. İki kısımdan oluşan çalışmanın bu bölümünde osteokalsin'in biyokimyasal özellikleri ele alınırken, ikinci bölümde, klinik önemi üzerinde durulacaktır.

Anahat sözcükler: Osteokalsin; kemik Gla proteini.

SUMMARY

Osteocalcin-bone Gla (gamma-carboxyglutamic acid) protein is a vitamin K-dependent calcium-binding protein localized in the organic matrix of mineralized tissues. Forming 10-20% of the total non collagenous bone proteins, bone Gla protein is one of the ten most abundant proteins of human body. It is presently accepted that osteocalcin is a "biomarker" of bone metabolism. The objective of this study is to overview and discuss the literature data on this subject pertaining to the last 10 years. This study is comprised of two parts; part I will deal with "Biochemical Properties" while part II will overview "Clinical Aspects".

Key words: Osteocalcin; bone Gla protein

Osteokalsin, diğer adıyla, kemik Gla (gamma-karboksiglutamik asid) proteini-BGP (bone Gla protein)-kemik, dentin ve benzer mineralize dokuların organik matrisinde bol miktarda yer alan, K vitamini bağımlı bir kalsiyum bağlayıcı proteindir (1-8). Çarpıcı yapısal özelliği, Gla kalıntıları içermesidir. "Osteokalsin" kelimesi, "osteo" (Yunanca'da kemik), "calc" (Latince'de

kalsiyum tuzları) ve "in" (Latince'de protein) köklerinden türemiş olup, proteinin kalsiyuma olan afinitesini(9) ve kemik dokusundaki yaygın yerleşimini(10) vurgulamaktadır. Osteokalsin'in türe, yaşa ve yerleşim bölgesine bağlı olarak, kemik non-kollajenöz proteinlerinin %10-20'sini oluşturduğu ve insan vücudunda en çok bulunan proteinler arasında, ilk on sırada yer aldığı bildirilmektedir(6,11,12).

Ekstrasellüler bir protein olan osteokalsin'in molekül kütlesi 5700 dalton dolaylarında olup, molekülünde kalsiyum bağlayıcı bir amino asid olan gama-karboksiglutamik asid (Gla) kalıntılarında üç adet içermektedir(1). Bu protein 10000 daltonluk bir öncül halinde osteoblastlar tarafından sentezlenir(13,16). "Gla" kalıntıları, translasyon sonrasında, K vitamini ve CO₂'ye bağımlı bir karboksilaz enzim kompleksi tarafından glutamik asid kalıntılarının karboksillenmesiyle oluşmaktadır. Kalsiyum varlığında, Gla kalıntıları, molekülün yapısında spesifik konformasyonel değişimlere yol açarak osteokalsin'in hidroksiapatit'e bağlanmasını ve bunun sonucu olarak da kemik matrisinde birikimini sağlamaktadır(9).

Sentezlenmiş olan osteokalsin'in büyük bir bölümü kemik ile ilişkili olmakla beraber, "nanomolar" konsantrasyonları da kan dolaşımında bulunmaktadır(4,17). Serum osteokalsin düzeylerinin kemik "turnover"ını, ve hatta, daha spesifik olarak, yeni kemik oluşumunu yansıttığı ve kemik mineralizasyon hızı ile korelasyon gösterdiği, histomorfometrik yöntemlerle saptanmıştır(18).

Osteokalsin'in, kemik metabolizmasının bir "biomarker"i olarak klinik değerinin aydınlatılması konusundaki araştırmalar, son on yılda giderek yoğunlaşmış olup, özellikle son 4 yılda, bu alanda 250'nin üzerinde bilimsel makale yayınlanmış bulunmaktadır.

Çalışmanın amacı, osteokalsin'in biyokimyasal özellikleri ve klinik yönünün, son literatür bulgularının ışığında değerlendirilmesi ve irdelenmesidir. İki bölümde incelenecek olan konunun bu bölümünde biyokimyasal özellikler ele alınacaktır.

I. OSTEOKALSİN'İN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

Molekül Kütlesi

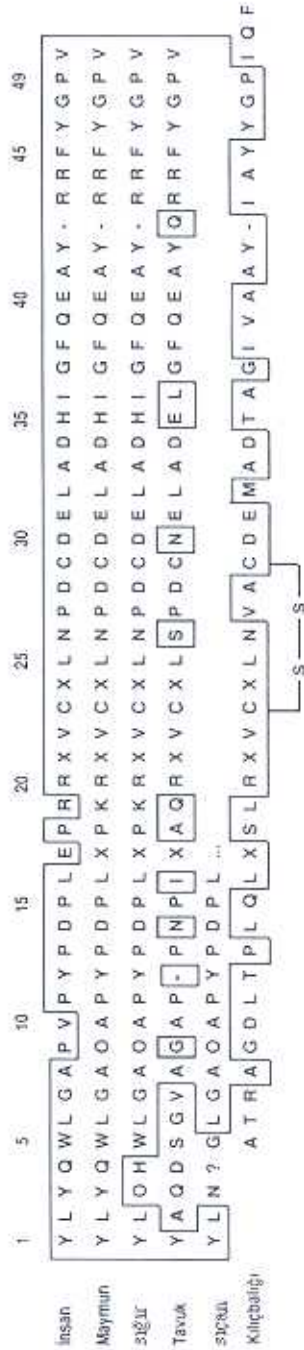
Çeşitli araştırmacıların osteokalsin molekülünün kütlesi için bildirdikleri değerler, 5200-5900 dalton arasında değişmektedir (5,6,19).

Amino Asid Bileşimi ve Dizilimi

Altı değişik türden elde edilen osteokalsinlerin amino asid bileşimleri Tablo I'de sunulmuştur. Değişik türlerde osteo-kalsinlerin amino asid kalıntısı sayılarının 47 ile 52 arasında değiştiği saptanmıştır(5). Osteokalsin molekülünde kütlein önemsiz bir bölümü de bağlı karbohidrat ve fosfattan oluşur. Çeşitli türlerin osteokalsinlerinin birincil yapıları-amino asid dizilimleri incelenmiş olup, Tablo I'de amino asid bileşimleri verilmiş olan değişik türlerin osteokalsinlerinin birincil yapıları Şekil I'de gösterilmiştir. "Gla" kalıntılarının 17, 21 ve 24. pozisyonlarda bulunduğu, disülfid köprüsünün ise, tüm osteokalsinlerde, Cys 23 ile Cys 29' u bağladığı göze çarpmaktadır. Osteokalsinlerin amino asid dizilimindeki farklılıklar, filojenik yaklaşımla açıklanmaktadır (23).

Konformasyon

Dairesel Dikroizm, Ultraviyole ve Floresans Spektroskopi yöntemleri, osteokalsin yapısında alfa helikon konformasyonunu ortaya çıkarmış ve kalsiyum (Ca⁺⁺) ile daha başka spesifik katyonların milimolar seviyelerinin, yüksek derecede anyonik karakterdeki osteokalsin molekülündeki elektrostatik itme kuvvetlerini yenmek için



Şekil 1. Çeşitli türlerde bulunan osteokalsin'in primer yapısı (amino asit dizilimi). İnsan (13,20), maymun (19), siğir (7), tavuk (21), sıçan (13) ve kılıçbalığı (22) osteokalsinlerinin amino asit dizilimi, maksimum homolojiyi belirtmek üzere sıralanmış olup, IUPAC-IUB, 1969'un tek harfli amino asit simgeleri kullanılmıştır. Gla, "X" ile, Hyp ise "O" ile simgelenmiştir.

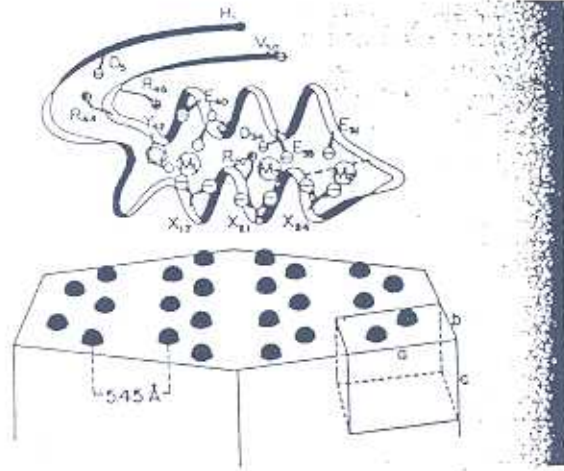
Tablo 1. Osteokalsin'in amino asit bileşimi ve molekül kütlesi (Aminoasitler, hem klasik kısaltmalarla, hem de IUPAC-IUB, 1969'un tek harfli simgeleriyle verilmiştir).

Amino asit	TÜR					
	İnsan (13,20)	Maymun (19)	Siğir (7)	Tavuk (21)	Kılıçbalığı (22)	Sıçan (13)
Gla [X]	3	3	3	3	3	3
Glu [E]	3	2	2	2	3	2
Gln [Q]	2	2	2	3	1	2
Asp [D]	3	4	4	3	3	5-7
Asn [N]	1	1	1	1	1	1
Hyp [O]	0	1	1	0	0	1
Pro [P]	7	6	6	5	2	5
Thr [T]	0	0	0	0	3	2
Ser [S]	0	0	0	2	1	0-1
Gly [G]	3	3	3	4	3	4
Ala [A]	3	4	4	6	8	4
Cys [C]	2	2	2	2	2	2
Val [V]	3	2	2	3	3	2
Met [M]	0	0	0	0	1	0
Ile [I]	1	1	1	1	3	2
Leu [L]	5	6	5	3	5	5
Tyr [Y]	5	5	4	3	3	4
Phe [F]	2	2	2	2	1	1
His [H]	1	1	2	1	0	2
Lys [K]	0	1	1	0	0	1
Trp [W]	1	1	1	0	0	0
Arg [R]	4	3	3	3	2	2
Kalıtı sayısı	49	49	49	47	47	50-53
Molekül kütlesi (Dalton)	5879	5869	5850	5669	5149	-

gerektiğini, böylece molekülün tam kapasitesi olan %40 alfa helikon yapısına kavuşabildiğini göstermiştir (9,24). Kimyasal, immünokimyasal ve spektral araştırmalar sonunda, osteokalsin molekülünün üç boyutlu yapısı için bir "Corey-Pauling Koltun" (CPK) modeli ortaya çıkmıştır(9). Bu model (Şekil 2), iki adet, "Gla helikon" adı verilen antiparalel alfa helikon bölgesinden (16-25, kalıntılar) ve de "Asp-Glu helikon" bölgesinden (30-41, kalıntılar) oluşur. Bu iki helikon beta-dönüşlü bir peptid segmanı(26-29, kalıntılar) ile bağlanmış ve de Cys23, Cys28 arasındaki disülfid köprüsü ile stabilize olmuştur. Başka beta dönüşleri 5-8, pozisyonlar ve 12-15, pozisyonlar arasında da saptanmış olup, serbest karboksil ucunda 42-48, kalıntılar arasında bir beta kırmalı tabaka yer almaktadır. Bu model ayrıca çözelti halindeki osteokalsin üzerindeki Lazer Raman Spektroskopisi (25) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) çalışmaları (26,27) ile de desteklenmiştir. Bu yapı osteokalsin'in hidroksiapatit yüzeylerine sıkıca adsorpsiyonunu açıklamaktadır.

H. OSTEOKALSIN'IN FONKSİYONLARI

Osteokalsin'in kemikteki fonksiyonu henüz kesin olarak aydınlatılabilmemiş değilse de, yukarıda ayrıntılı olarak açıklanan yapısal özellikleri, osteokalsin'in mineralize kemik matrisinin oluşumunda görev aldığı düşünülmüştür. Nitekim, proteinin, kemikteki "ilk" mineral depolanması ile beraber birikmeye başladığı bildirilmiştir(28). Kemik bileşiminde osteokalsin ve hidroksiapatit sabit bir oran göstermekte ise de,



Şekil 2. Osteokalsin'in Ca⁺² ile indüklenmiş üç boyutlu yapısının modeli. Hidroksiapatit kristal şebekesi yapısındaki Ca⁺² ile muhtemel etkileşim durumu gösterilmektedir. Tavuk osteokalsin'inin 50 amino asit kalıntısı içeren polipeptid helikemiği, kristal ile aynı ölçekte çizilmiş bir şerit olarak simgelenmiştir. Önemli aminoasitler bir harflik kodla(UPAC-IUB'69) gösterilmiş [D, Asp; E, Glu; H, His; Q, Gln; R, Arg; V, Val; X, Gla; Y, Tyr], amino asit kalıntısının polipeptid zincirindeki pozisyonu ise, harfin alt kısmındaki sayı ile belirtilmiştir. Elektriksel yükler, pH 7-8'de beklendiği şekilde gösterilmiştir. Amino grublu uçtan başlayarak (H1); 5-8 ve 12-15, pozisyonlarda beta dönüşler yer almaktadır. "Gla helikon", 16-25, kalıntılar arasını doldurur; 26-29, pozisyonları bir beta dönüş, Cys23-cys29 arasındaki disülfid köprüsü ile stabilize olmuştur; "Asp-Glu helikon", 30, kalıntıdan 41.ye kadar uzanır; V50 ile sonlanan serbest ucu ise, 42-48, segmanda beta kırmalı yapı gösterir ve de amino grublu uca çok yaklaşmıştır. Muhtemelen, helikonların hidrofobik özellikteki arka yüzlerini örtmektedir. Metal bağlayıcı yüzeyler M₁, M₂, ve M₃ olarak gösterilmiş ve bazı koordine oksijen içeren yan gruplar işaretlenmiştir. Üç adet "Gla" kalıntısından herbirinin, "Gla helikon"unun bir yüzünde, aynı yönde uzanmış bulunmaları ilginçtir. Gla kalıntılarının periyodik yerleşimleri (5.4 Å) ile "Asp-Glu" helikonunun ters yöndeki anyonik yan gruplarının, hidroksiapatit şebekesinin xy planındaki heksagonal biçimde yerleşime gösteren Ca⁺² ların interatomik uzaklığı olan 5.4 Å ile yüksek derecede uyum gösterdiğine dikkat ediniz. Bu model osteokalsin'in bu tür yüzeylere sıkıca adsorpsiyonunu açıklamaktadır [Häuschka ve Carr (9)'dan alınmıştır].

büyüme durumunda olan deney hayvanlarına akut olarak sodyum warfarin verildiğinde, osteokalsin düzeyleri düşmekle birlikte, mineralizasyonun devam ettiği saptanmıştır(29). Bilindiği gibi warfarin, K vitamini eksikliği oluşturmak yoluyla Gla kalıntısız ya da düşük sayıda Gla kalıntılı osteokalsin oluşumuna yol açmaktadır(30). Diğer taraftan, kronik olarak sekiz ay sodyum warfarin uygulanmış sıçanlarda, epifizin kapanması biçiminde ileri mineralizasyon bulguları saptanmıştır. Bu bulgular, osteokalsin'in hidroksiapatit birikimini engelleyici bir fonksiyonu olduğunu düşündürmüştür(31).

Osteokalsin'in diğer bazı nitelikleri, kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde görev aldığı yolunda ipuçları vermiştir: hidroksiapatit kristal yüzeyine Gla'ya bağımlı olarak adsorpsiyon özelliği, hidroksiapatite bağlanmasındaki değişikliklerin kalsiyum homeostazının düzenlenmesine katkısı olabileceği yolunda bir takım varsayımlara neden olmuştur(9,29). Model sistemlerde, osteokalsin yönünden düşük olan kemik partiküllerinde, normal kemik partiküllerine oranla, rezorpsiyonda %50'lik bir düşüş kaydedilmiştir(32). Ayrıca, osteokalsin'in, kemik rezorpsiyonundan sorumlu olan osteoklast, insan periferik monositleri, makrofajlar gibi hücreler üzerinde kemotaktik etkileşim özelliği de kanıtlanmıştır(32,33).

Osteokalsin'in kalsiyum ve hidroksiapatit bağlama dışında önemli bir diğer özelliği, membranların fosfolipid komponentleri ile etkileşimidir(34). Mineralize dokularda bu tür protein-lipid etkileşimlerinin, mineral birikiminin bağlamasında ya da sonlanmasında görev alan bileşikler lokalize etme, konsantre etme ya da yönlendirme yönünde fonksiyon görebileceği

şeklinde yorumlar yapılmaktadır. Kan dolaşımındaki BGP'nin, fosfolipid yüzeylere bağlanması olası değildir. Plazma BGP konsantrasyonu nanomolar düzeydedir ve bu konsantrasyon, BGP-fosfolipid etkileşiminin KD'si olan $5\mu\text{M}$ 'in çok altındadır. Ancak, insan kemiğinde BGP mikromolar konsantrasyonlarda saptanmış olup, lipid yüzeyi ile BGP yanyana geldiğinde etkileşimin olabileceği varsayılmaktadır(34). Osteokalsin'in lipid yüzeylere bağlanması, inisiyal kalsiyum ve fosfat birikim yüzeylerini maskeleyecektir. Böylece lipide bağımlı mineralizasyon, osteokalsin tarafından engellenmiş ya da durdurulmuş olacaktır. Dolayısıyla, osteokalsinin kemik mineralizasyonu üzerinde düzenleyici fonksiyonu göz ardı edilemez.

III. OSTEOKALSİN'İN BİYOSENTEZİ

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenen spesifik bir üründür. Osteokalsin'in biosentez yolunun tanımlanması konusunda bazı yeni gelişmeler şöyledir: 1) Osteokalsin geninin izolasyonu ve promotör düzenleyici elemanların karakterizasyonu, 2) "Preproosteokalsin"i kodlayan cDNA'ların diziliminin aydınlatılması, 3) "Proosteokalsin" in karakterizasyonu, 4) Propeptid'in, K vitamini bağımlı karboksilaz enziminin tamama yüzeyi olarak muhtemel rolünün aydınlatılması, 5) Gla kalıntılarının in-vitro sentezi: osteokalsin'in işleme girmesi ve fizyolojik fonksiyonların tanımlanması üzerinde çalışmalar, 6) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve diğer osteoblast aktivite düzenleyicilerinin osteokalsin sentezi üzerindeki modülator görevinin araştırılması.

Osteokalsin Geni

Birinci kromozom üzerinde bulunduğu belirlenmiştir(13). Kemik oluşumu için önemli olan al-

kalen fosfataz geni de yine aynı kromozom üzerindedir. Sekans analizinde, mRNA'nın dört ekzon ve üç introndan oluşan bir DNA segmentinde tanımlandığı ortaya çıkmıştır. Sıçan osteokalsin geni üzerinde yapılan çalışmalarda, siklik nükleotide duyarlı elemanlar, hormon reseptör bağlayıcı yüzeyler, 1,25(OH)₂ D₃ vitamini (kalsitriol)'ne duyarlı bölgeler saptanmıştır(35).

Osteokalsin Biyosentez Yolu

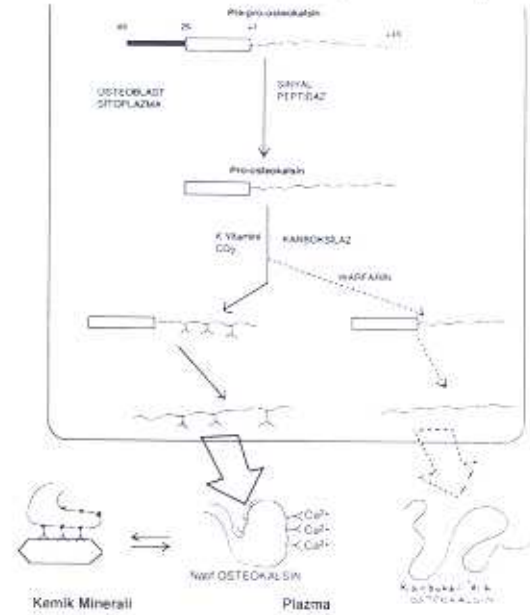
Translasyonun ilk ürünlerinin osteokalsin'in daha büyük molekül kütleli öncül formları olduğu yolunda bulgular mevcuttur.

Osteokalsin biyosentez yolunun günümüzdeki bilgiler ışığındaki durumu Şekil 3 ve Şekil 4'de özetlenmiştir. Olgun osteokalsin'in aşağı yukarı iki katı bir "preproosteokalsin" molekülü öncelikle sentezlenmektedir(13, 36). Sinyal peptidaz enziminin etkisiyle 23 kalıntılık hidrofob "propeptid" in ayrılmasından sonra, intrasellüler proosteokalsin, üç Gla kalıntısının K vitamini ve CO₂'e bağımlı sentezi ile, "posttranslasyonel modifikasyon" a uğrar(37). Yirmialtı kalıntılık propeptidi ayıran intrasellüler proteinaz henüz kesin olarak aydınlatılmamıştır. Proosteokalsin'in Golgi aparatında öteki birçok salgı proteinleri ve K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri gibi, glikozilasyona uğrayıp uğramadığı konusunda da literatür bilgisi mevcut değildir.

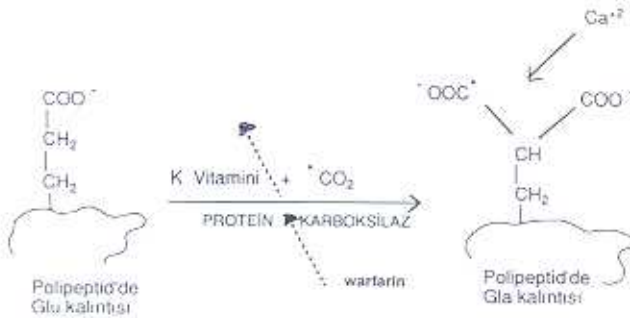
IV. OSTEOKALSİN'İN KATABOLİZMASI

Intravenöz enjeksiyonu takiben, işaretli sığır osteokalsin'inin sıçan plazmasından hemen uzaklaştırıldığı ve özellikle böbrek, karaciğer ve kemik tarafından alındığı saptanmıştır. Hem karaciğer, hem böbrek dokusunun, in-vivo ve in-

vitro, osteokalsin'i süratle küçük molekül kütleli komponentlere yıktığı bildirilmiştir. Yıkıcı enzimin aktivitesi, mikrozomal, mitokondrial ve süpernatant fraksiyonlarda saptanmıştır. Önemli bir nokta, osteokalsin'in vasküler sistemde çok az yıkılıma uğradığıdır. Dolaşımında, büyük molekül kütleli bir taşıyıcı tarafından mı yıkılıma karşı



Şekil 3. Osteoblastlar tarafından osteokalsin biyosentezi ve hücre dışına salgılanması. "Preproosteokalsin" in molekül kütlesi 10.000 Dalton olup, 23 amino asit kalıntısı içeren bir "prepeptid", 26 kalıntılık bir "propeptid" ve 46-50 kalıntılık (tipik olarak 49) bir osteokalsin dizilimi içerir. Ala-27 ile Lys-26 arasında "Sinyal peptidaz" enzimi tarafından kırılır; serbestleşen "proosteokalsin" 26 kalıntılık propeptidi ile, "karboksilasyon" reaksiyonuna zemin hazırlar; "Y" olarak sembolize edilen Gla, 17, 21 ve 24. kalıntılarda oluşur. K vitamini eksikliğinde ya da warfarin'in etkisinde, karboksilasyon ya hiç oluşmaz, ya da kısmen gerçekleşir. Sonuçta, hatalı bir osteokalsin ortaya çıkar. "Karboksilsiz" osteokalsin, normal osteokalsine karakteristik olan, Ca²⁺'a bağımlı alfa-helikon konformasyonel değişime uğramaz ve gerek Ca²⁺'a, gerekse hidroksiapatit yüzeylere olan afinitesi düşüktür [Hauschka PV, Lian JB, Cole EC, Gundberg CM'den (3)].



Şekil 4. Karboksiglutamik asid (Gla) sentezi reaksiyonunu katalizleyen "Protein karboksilaz" enzimi K vitaminine bağımlı olup, pürtlüklü endoplazmik retikulumda yerleşim gösterir. Spesifik glutamik asid kalıntılarının karboksilasyonu, CO₂ ve indirgenmiş formda K vitamini (K₁H₂) gerektirir. Warfarin, K₁H₂ vitamininin enzimle katalizlenen rejenerasyonunu bozarak Gla kalıntılarının sentezini engeller.

korunduğu görüşü henüz açıklık kazanmamıştır. Dolaşımdaki osteokalsin'in son ürünleri, daha ileri metabolize edilmeden idrarla kantitatif olarak çıkarılan Gla kalıntılarıdır. Ancak, idrarda bulunan Gla kalıntıları, yalnızca osteokalsinden değil, tüm K vitaminine bağımlı pıhtılaşma proteinlerinden, özellikle protrombinden kaynaklanmaktadır(38).

V. SERUM'DA OSTEOKALSİN VE ÖLÇÜMÜ

Hayvan deneyleri dolaşımda bulunan osteokalsinin kemik rezorpsiyonundan kaynaklanmadığını, diğer bir deyişle, kemik matriksinden salgılanmış olmadığını göstermiştir. Dolaşımda bulunan osteokalsin'in kaynağı, yeni protein sentezidir(39).

Serumda osteokalsin'in konsantrasyonu, yeni sentezlenmiş proteinin kemiğin mineral fazına bağlanmayıp direkt olarak dolaşıma verilen bölümünü yansıtmaktadır. Normal yetişkin bir insanda, sentezlenen osteokalsin'in yaklaşık üçte biri dolaşıma verilir(40). Serum osteokalsin düzeyinde normalden sapmalar, proteinin sentez ya da yıkılımdaki değişikliklerden kaynaklanır. Osteokalsinin glomerüler filtrasyon ya da renal katabolizma hızı, dolaşımdaki osteokalsin düzeyini etkiler. Serum osteokalsin konsantrasyonunu etkileyen fizyolojik faktörler ile, serum osteokalsin düzeyi ölçümünde kullanılan yöntemler aşağı da kısaca gözden geçirilecektir.

Fizyolojik Faktörler

Serum osteokalsin düzeyi yaş, cinsiyet, sirkadiyen ritim, diyet ve bölgesel farklılıklar, gebelik ve süt verme, menstrüel siklus, ekzersiz gibi fizyolojik faktör ve durumlardan etkilenir(41-55). Kırkaltı ve ark. (56). 41-50 yaşları arasındaki kadınlarda serum osteokalsin düzeylerinde göze çarpan bir düşme gözlemlenmiştir. Bu gözlem menopoz sırasında kemik formasyonunda kritik bir fizyolojik azalma ve kemik kaybına bağlanabilir. Buna karşı, 61-80 yaşları arasındaki artış da, yaşlı kadınlarda serum parathormon düzeyinde gözlenen fizyolojik artışla açıklanabilir. Parathormonun, indirekt olarak, osteoblastları stimüle ettiği bilinmektedir. Diğer taraftan, aynı çalışmada, 11-20 yaşlarındaki erkeklerde, serum osteokalsin düzeylerinin, aynı yaşlardaki kadınlara göre daha yüksek olduğu da gösterilmiştir.

Literatürde, osteokalsin düzeyindeki yaşa bağlı değişiklikler, oldukça çelişkilidir. Bu çelişkiler, incelenen popülasyonlar arasında kemik "turnover"ı konusunda heterojiniteyi yansı-

tabildiği gibi, çeşitli osteokalsin ölçüm yöntemlerinde kullanılan antikorların spesifisite ve sensitivitesi ile de ilgili olabilir.

Endokrin Etkiler

Hormonal statusun serum osteokalsin düzeyleri üzerindeki etkileri önem taşır. Östrojenler, tiroid hormonlar, parathormon(PTH), kalsitriol ve cAMP osteokalsin geninin transkripsiyonunu ve mRNA düzeylerini direki olarak etkiler (35,57,58). Serum osteokalsin düzeyleri yorumlanırken, endokrin durum göz önünde tutulmalıdır. Osteoklastik aktiviteyi ve kemik rezorpsiyonunu azaltan bir kalsitropik hormon olan kalsitonin'in serum osteokalsin değerlerini düşürdüğü kabul edilmektedir(33,58,60,61).

Kalsitriol'ün serum osteokalsin düzeyi üzerindeki etkisi şöyle özetlenebilir(15,60,61): Deney hayvanları üzerindeki ve de "in vitro" çalışmalar, korelasyonu kanıtlarken, klinik gözlemler kalsitriol'ün osteokalsin düzeylerini arttırdığını doğrulamakta fakat korelasyon yönünde bir bulgu vermemektedir. Yine de, klinikte osteokalsin'in kalsitriol terapisini izlemede yararlı olduğu kabul edilmektedir.

Parathormon'un başlangıç etkisi osteoblast aktivitesini azaltmak yoluyla, serum osteokalsin'ini düşürmektir. Ancak, kronik hiperparatirodizm gibi durumlarda, kemik turnover'nun artışına paralel olarak, osteokalsin, dolaşımında 2-4 kez artmaktadır(62).

Gerek in-vitro(62) gerekse klinik çalışmalar, ekzojen kortikosteroidlerin, osteoblast fonksiyonunu suprese ederek serum osteokalsin konsantrasyonunu düşürdüğünü ortaya çıkarmıştır(63).

Büyüme hormonu ve tiroid hormonlar, serum osteokalsin konsantrasyonunu, kemiğin gelişmesi

üzerine etkileri ölçüsünde değiştirmektedirler(64).

İnsülin benzeri büyüme faktörü I ve serum testosteron'unun, 10-14 yaşlarındaki erkek çocuklarla 9-12 yaşlarındaki kız çocuklarda serum BGP ile anlamlı şekilde korelasyon gösterdiği Johansen ve ark.(66) tarafından kanıtlanmıştır.

Osteokalsin Ölçüm Yöntemleri

Serum osteokalsin ölçümü ile ilgili olarak çok sayıda yayımlanmış radioimmunoassay (RIA) (67,72) ve enzyme immunoassay (17,73) yöntemleri mevcuttur. Birçok laboratuvar poliklonal antikorlar üretmiştir. Power ve ark. (70) poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanarak yapmış oldukları karşılaştırmalı çalışmada, serum osteokalsin konsantrasyonları için saptadıkları normal sınırların, kullanılan antikora bağımlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Diğer taraftan, Delmas ve ark. (74), osteokalsin yönteminin standardizasyonu yönünde yapmış oldukları bir çalışmada, laboratuarlara bağlı farklılıkları giderebilmek için, değerlerin, normal bireylerden oluşan bir populasyonun serum osteokalsin değerlerinin yüzdesi olarak verilmesinin son derece yararlı olacağını vurgulamışlardır.

SONUÇ

Biyokimyasal özellikleri yönünden son derece ilginç olan bu protein, K vitamini'ne bağımlı çok sayıda proteinden biri olmakla birlikte, kendine özgül biyokimyasal özellikleri nedeniyle, kemik metabolizmasında önemli bir konumdadır. Vücutta ilk on sırada yer almasına rağmen, bu proteinin özelliklerinin tam olarak aydınlatılması son on yıla rastlamaktadır. Kemik metabolizmasına bağlı hastalıklar başta olmak üzere, osteokalsin'in klinikteki önemi, çalışmanın ikinci bölümünde ele alınacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lian JB, Gundersberg CM. Osteocalcin, biochemical considerations and clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1988; 226: 267-291.
2. Fournier B, Gireyts E, Delmas PD. Evidence that free gamma carboxyglutamic acid circulates in serum. *Clinica Chimica Acta* 1989; 182: 173-182.
3. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gundersberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* 1989; 69(3): 990-1047.
4. Price PA, Nishimoto SK. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2234-2238.
5. Gundersberg CM, Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Osteocalcin: isolation, characterization and detection. *Methods in Enzymology* 1984; 107: 516-544.
6. Hauschka PV, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium binding amino acid γ -carboxyglutamate in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3925-3929.
7. Price PA, Otsuka AS, Poser J, Kristaponis J, Raman N. Characterization of γ -carboxyglutamic acid-containing proteins from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1447-1451.
8. Power MJ, O'Dwyer B, Breen E, Fottrell PF. Osteocalcin concentrations in plasma prepared with different anticoagulants. *Clin Chem* 1991; 37(2): 281-284.
9. Hauschka PV, Carr SA. Calcium dependent alpha-helical structure in osteocalcin. *Biochemistry* 1982; 21: 2538-2547.
10. Conn KM, Termine JD. Matrix protein profiles in calf bone development. *Bone* 1985; 6: 33-36.
11. Hauschka PV, Fienkel J, Demuth R, Gundersberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight γ -carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem* 1983; 258: 176-182.
12. Lian JB, Roudosse AH, Ren B, Glimcher MJ. Concentration of osteocalcin and phosphoprotein as a function of mineral content and age in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 1982; 34(Suppl 2): 82-87.
13. Celeste AJ, Rosen Y, Buecker H, Kriz R, Wang EA, Wozney JM. Isolation of the human gene for bone Gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones. *EMBO J* 1986; 5: 1885.
14. Lian JB, Couttes MC, Canalis E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvaria. *J Biol Chem* 1985; 260: 8706-8710.
15. Silve C, Grosse B, Tau C et al. Response to parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of bone derived cells isolated from normal children and children with abnormalities in skeletal development. *J Clin Endocrinol Met* 1986; 62: 583.
16. Mackowiak S, Gerstenfeld L, Hauschka PV, Lian JB. Cell free translation of the vitamin K-dependent bone protein osteocalcin. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 722-17.
17. Power MJ, Fottrell PLF. Solid-phase enzymeimmunoassay for osteocalcin in human serum or plasma, with use of a monoclonal antibody. *Clin Chem* 1989; 35(10): 2987-2992.
18. Brown JP, Delmas PD, Malaval L, Edouard C, Chapuy MC, Meunier PJ. Serum bone GLA protein: A specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 1984; i: 1091-1093.
19. Hauschka PV, Carr SA, Biemann K. Primary structure of monkey osteocalcin. *Biochemistry* 1982; 21: 638-642.
20. Poser JW, Esch FS, Ling NC, Price PA. Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone: undecarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem* 1980; 255: 8685-8691.
21. Carr SA, Hauschka PV, Biemann K. Gas chromatographic mass spectrometric sequence determination of osteocalcin, a gamma-carboxyglutamic acid containing protein of chicken bone. *J Biol Chem* 1981; 256: 9944-9950.
22. Price PA. Osteocalcin. In: Peck W.A, ed. *Bone and Mineral Research*. Amsterdam: Excerpta Med 1983; 1: 157-190.
23. Lailla Hug N, Teh LC, Christie DL, Chapman GE. The amino acid sequences of goat, pig and wallaby osteocalcins. *Biochemistry International* 1984; 8(4): 521-527.
24. Iwami K, Dohi Y, Moriyama T, Hamaguchi K. Metal binding and metal-induced conformational change of frog bone gamma-glutamic acid-containing protein. *J Biochem Tokyo* 1987; 102: 75-82.

25. Dendramis AL, Poser JW, Schwinn EW. Laser Raman spectroscopy of calf Gla protein. *Biochim Biophys Acta* 1983; 742: 525-529.
26. Prigodich RV, O'Connor T, Coleman JE. ^3H , ^{13}C and ^{31}P NMR of osteocalcin (bovine gamma-carboxyglutamic acid containing protein). *Biochemistry* 1985; 24: 6291-6298.
27. Svard M, Drakenberg T, Andersson T, Fernlund P. Calcium binding to bone gamma-carboxyglutamic acid protein from calf studied by ^{43}Ca NMR. *Eur J Biochem* 1986; 158: 373-378.
28. Lian JB, Roufosse AH, Reit B, Glimcher MJ. Concentration of osteocalcin and phosphoprotein as a function of mineral content and age in cortical bone. *Calcif Tissue Int* 1982; 345: 84-88.
29. Hauschka PV. Osteocalcin: The vitamin K-dependent Ca^{+2} binding protein of bone matrix. *Haemostasis* 1986; 16: 258-261.
30. Price PA, Williamson MK. Effects of warfarin on bone. Studies on the vitamin K-dependent protein of rat bone. *J Biol Chem* 1981; 260: 14971-14975.
31. Price PA, Williamson MK, Hala T, Dell RB, Jee WS. Excessive mineralization with growth plate in chronic warfarin treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7734-7738.
32. Lian JB, Duun K, Key LL. In vitro degradation of bone particles by human monocytes is decreased with the depletion of the vitamin K-dependent bone protein from the matrix. *Endocrinology* 1986; 118: 1636-1640.
33. Mundy GR, Poser JW. Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein in bone. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 164-168.
34. Gendreau MA, Krishnaswamy S, Mann KG. The interaction of bone Gla protein (osteocalcin) with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 1989; 264(12): 6972-6978.
35. Lian J, Stewart C, Puchacz E et al. Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1143-1147.
36. Pan LC, Price PA. The propeptide of rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein shares homology with other vitamin K dependent protein precursors. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 6109-6113.
37. Pan LC, Williamson MK, Price PA. Sequence of the precursor to rat bone gamma-carboxyglutamic acid protein that accumulates in warfarin-treated osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 1985; 260: 13398-13401.
38. Farrugia W, Melick RA. Metabolism of osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 234-238.
39. Price PA, Williamson MK, Lothringer JW. Origin of the vitamin K-dependent bone protein found plasma and its clearance by kidney and bone. *J Biol Chem* 1981; 256: 12760-12766.
40. Melick RA, Farrugia W, Quelch KJ. Plasma osteocalcin in man. *Aust N Z J Med* 1985; 15: 410-416.
41. Delmas PD, Stenner D, Wahner HW, Mann KG. Increase in serum bone gamma-carboxyglutamic acid protein with aging in women. *J Clin Invest* 1983; 71: 1316-1321.
42. Johansen JS, Thomsen K, Christiansen K. Plasma bone Gla protein concentrations in healthy adults. Dependence on sex, age and glomerular filtration. *Scand J Clin Lab Invest* 1987; 47: 345-350.
43. Gundberg CM, Lian JB, Gallop PM. Measurements of gamma-carboxyglutamate and circulating osteocalcin in normal children and adults. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 1-8.
44. Melick RA, Farrugia W, Quelch KJ. Plasma osteocalcin in man. *Aust N Z J Med* 1985; 15: 410-416.
45. Catherwood BD, Marcus R, Madvig P, Cheung AK. Determinants of bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein in plasma of healthy aging subjects. *Bone* 1985; 6: 9-13.
46. Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA et al. Concurrent assays of circulating bone Gla-protein and bone alkaline phosphatase: effects of sex, age, and metabolic bone disease. *J Clin Endoc Met* 1988; 66(5): 951-957.
47. Ruffie A, Fossats A, Colle M. Valeurs normales de l'osteocalcine serique au cours de la vie. *Ann Biol Clin* 1989; 47: 629-634.
48. Epstein S, McClintock R, Bryce G, Poser J, Johnston CC, Hui S. Differences in serum bone Gla protein with age and sex. *Lancet* 1984; 307-310.
49. Cantatore FP, Carozzo M, Magli D, D'Amore M, Pipitone V. Serum osteocalcin levels in normal humans: of different sex and age. *Panminerva Medica* 1988; 30(1): 23-25.
50. Vanderschueren D, Gevers G, Raymaekers G, Devos P, Dequeker J. Sex and age-related changes in bone and serum osteocalcin. *Calcif Tissue Int* 1990; 46: 179-182.
51. Garcia-Carroso M, Grison M, Christine de Vemejoul M, Denne MA, Miravet L. Osteocalcin and bone morphometric parameters in adults without bone disease. *Calcif Tissue Int* 1988; 42: 13-17.

52. Galli M, Caniggia M. Osteocalcin in normal adult humans of different sex and age. *Horm Metabol Res* 1985; 17: 165-166.
53. Steinberg KK, Rogers TN. Alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in serum of normal subjects. *Annal Clin Lab Med* 1987; 17 (4): 241-250.
54. Rodan A, Duncan A, Quartero W P et al. Serum concentration of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy. *J Clin Endoc Metab* 1989; 68(6): 1123-1127.
55. Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, Mosekilde L. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J Clin Endoc Metab* 1990; 70(5): 1431-1437.
56. Kırkalı (Bilgin) G, Yenisey Ç, Güner G. Serum osteocalcin, alkaline phosphatase and calcium levels in normal humans of different sex and age. X. Ulusal Biyokimya Kongresi, İzmir, 15-17 Ağustos 1991.
57. Noda M, Yoon K, Rodan GA. Cyclic AMP-mediated stabilization of osteocalcin mRNA in rat osteoblast-like cells treated with parathyroid hormone. *J Biol Chem* 1988; 263: 18574-18577.
58. Yoon K, Rutledge SJC, Buenaga RE, Rodan GA. Characterization of the rat osteocalcin gene: stimulation of promoter activity by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* 1988; 27: 8521-8526.
59. Delmas PD, Wilson DM, Mann KG, Riggs BL. Effect of renal function on plasma levels of bone Gla-protein. *J Clin Endocr Met* 1983; 57/5: 1028-1030.
60. Caniggia A, Nuti R, Galli M et al. Effect of a long-term treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on osteocalcin in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1986; 38: 328.
61. Wentroub S, Price P, Reddi AH. The dictomy in the effects of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃ and 24,25-dihydroxyvitamin D₃ on bone alfa-carboxyglutamic acid-containing protein in serum and bone in vitamin D-deficient rats. *Calcif Tissue Int* 1987; 40: 166-171.
62. Rico H, Hernandez ER. Serum levels of osteocalcin in hypercalcemia of primary hyperparathyroidism and tumor-related hypercalcemia (letter). *Rev Clin Esp* 1986; 178: 358-361.
63. Beresford JN, Gallagher JA, Pöser JW, Russel RGG. Production of osteocalcin by human bone cells in vitro: Effects of 1,25 (OH)₂ D₃, 24,25 (OH)₂ D₃, parathyroid hormone, and glucocorticoids. *Metab Bone Dis Rel Res* 1984; 5: 229.
64. Slovik RM, Gundberg GM, Neer RM, Lian JB. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 228.
65. Delmas PD, Demiauwx B, Malaval L, Bonne G. Serum bone Gla-protein in growth hormone deficient children. *J Bone Min Res* 1986; 1: 333-336.
66. Johansen JS, Giwercman A, Hartwell D et al. Serum bone Gla-protein as a marker of bone growth in children and adolescents: Correlation with age, height, serum insulin-like growth factor I, and serum testosterone. *J Clin Endoc Metab* 1988; 67(2): 273-278.
67. Johansen JS, Hansen JEM, Christiansen C. A radioimmunoassay for bone Gla protein (BGP) in human plasma. *Acta endocrinologica (Copenh)* 1987; 114: 410-416.
68. Jüppner H, Schettler T, Giebel G, Wenner S, Hesch RD. Radioimmunoassay for human osteocalcin using an antibody raised against the synthetic human (h 37-45) sequence. *Calcif Tissue Int* 1986; 39: 310-315.
69. Pastoureau P, Merle B, Delmas PD. Specific radioimmunoassay for bovine bone gla-protein (osteocalcin). *Acta endocrinologica (Copenh)* 1988; 119: 152-160.
70. Power MJ, Gosling JP, Fottrell PF. Radioimmunoassay of osteocalcin with polyclonal and monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1989; 35/7: 1408-1415.
71. Tracy RP, Andrianorivo A, Riggs BL, Mann KG. Comparison of monoclonal and polyclonal antibody-based immunoassays for osteocalcin: a study of sources of variation in assay results. *J Bone Min Res* 1990; 5/5: 451-461.
72. Taylor AK, Linkhart SG, Mohan S, Baylink DJ. Development of a new radioimmunoassay for human osteocalcin: Evidence for a midmolecule epitope. *Metabolism* 1988; 37/9: 872-877.
73. Tanaka H, Kuwada M, Shiraki M, Katayama K. An enzyme immunoassay for osteocalcin. *J Immunol Methods* 1986; 94: 19-24.
74. Delmas PD, Christiansen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Min Research* 1990; 5/1: 5-11.