

Postmenopozal Osteoporoz ve Osteopenide Plazma Homosistein Düzeyleri ile Biyokimyasal Kemik Döngüsü Belirteçleri Arasındaki İlişki

Plasma Homocysteine Levels in Postmenopausal Osteoporosis and Osteopenia: The Relation With Biochemical Markers of Bone-Turnover

Sebahat Özlem, Nehir Samancı**, Binnur Karayalçın***, Meral Bilgilişoy**
Ülkü Gürbüz**, Özge Gülsüm İllez**, Meral Gültekin*****

Özet

Bu çalışma postmenopozal kadınlarda plazma homosistein, vitamin-B12 ve folat düzeyleri ile kemik mineral yoğunluğu ve biyokimyasal kemik döngüsü belirteçleri arasındaki ilişkileri araştırmak amacıyla planlandı.

Çalışma postmenopozal osteoporozlu 148 ve osteopenili 75 hastada gerçekleştirildi. Kontrol grubu kemik mineral yoğunluğu normal olan benzer yaştaki sağlıklı 61 postmenopozal kadından oluşturuldu. Çalışma gruplarında plazma homosistein, serum vitamin-B12, folat düzeyleri, biyokimyasal kemik yapım ve kemik yıkım belirteçleri ve lomber vertebra (L2-4) kemik mineral yoğunluğu ölçüldü.

Osteoporozlu grupta plazma homosistein ve ayrıca serum ve idrar kemik yıkım belirteçlerinin artmış olduğu saptandı. Ayrıca bu hastalarda vitamin-B12 düzeylerinin azaldığı ve osteokalsin düzeyleri ile anlamlı bir korelasyon gösterdiği tespit edildi. Osteoporozlu gruptaki kadar belirgin olmasa da osteopenili grupta da benzer bulgular saptandı.

Sonuç olarak postmenopozal osteoporozlu kadınlarda vit-B12 düzeylerindeki azalmanın hem homosistein düzeylerini arttırarak indirekt olarak kemik yıkımını arttırarak hem de vitamin-B12'nin osteoblastlar üzerindeki direkt stimulan etkisinin azalması sonucu kemik dokusu üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği ve kemik yapım-yıkım dengesini yıkım yönüne kaydırarak osteoporoz gelişimine katkıda bulunabileceği kanısına varıldı. Dolayısıyla osteoporozlu hastalarda plazma homosistein ve vitamin-B12 düzeylerinin saptanmasının ve gerektiğinde vitamin-B12 destek tedavisi uygulanmasının osteoporoz tedavisinde yararlı olabileceği düşünüldü. (*Osteoporoz Dünyasından 2006; 12 (2): 22-26*)

Anahtar kelimeler: Plazma homosistein düzeyleri, biyokimyasal kemik döngüsü belirteçleri

Summary

The present study was planned to investigate the relations of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover with plasma levels of homocysteine, vitamin B12 and folate in postmenopausal women.

The study was performed in 148 osteoporotic and 75 osteopenic postmenopausal patients. Control group included 61 age-matched healthy postmenopausal women with normal bone mineral density. Plasma homocysteine, serum vitamin B12, folate levels, biochemical markers of bone formation and resorption and lumbar vertebra (L2-L4) bone mineral density were determined in study groups.

In osteoporotic group, plasma homocysteine levels and both serum and urine markers of bone resorption were found to be increased and, vitamin B12 levels which were found to be significantly decreased had a significant correlation with osteocalcin levels. Although less marked, similar findings were obtained in osteopenic group, as well.

In summary, it was concluded that the reduction in vitamin-B12 levels in osteoporotic postmenopausal women may cause negative effects on bone tissue both by increasing bone resorption indirectly through an increment in homocysteine levels and by a reduction in the direct stimulatory effect of vitamin-B12 on osteoblast and may contribute to development of osteoporosis by shifting the balance between bone formation and resorption in favor of the latter. Therefore, it was suggested that determination of plasma homocysteine and vitamin B12 levels and vitamin B12 supplementation in deficient cases might be useful in treatment of osteoporosis. (*Osteoporoz Dünyasından 2006; 12 (2): 22-26*)

Key words: Plasma homocysteine levels, biochemical markers

(*) Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Klinik Biyokimya Bölümü

(**) Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı

(***) Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziksel Nükleer Tıp Anabilim Dalı

(****) Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü

Giriş

Osteoporoz, kemik kütlelerinde azalma ve kemik dokusunun mikro-mimarisinde bozulma sonucu kemik kırılabilirliğinde artış ile karakterize bir iskelet sistemi hastalığıdır (1,2). Osteoporozla bağlı kırıklar ise önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (3). Kırıklara bağlı ekonomik ve fonksiyonel kayıplar da osteoporozu önemli bir sağlık sorunu haline getirmektedir. Ortalama yaşam süresinin ve dolayısıyla yaşlı nüfusun ve osteoporoz prevalansının artması, bu hastalığın önemini daha da arttırmaktadır (4-6). Homosistein (Hcy), metiyonin metabolizması sırasında oluşan ve tiol içeren bir aminoasittir. Hcy'in, doğum defektleri, hamilelik komplikasyonları, psikiyatrik hastalıklar, kognitif yetersizlikler, kardiyovasküler, serebrovasküler ve periferik vasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların patogenezinde rol oynadığı bildirilmektedir (7-15). Son yıllarda Hcy'in osteoporoz etyopatogenezinde de rolü olabileceğini gösteren kanıtlar elde edilmiş ve Hcy'in yaşlılarda gözlenen osteoporozda bağımsız bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (16, 17). Nadir görülen ve Hcy düzeylerinde artma ile karakterize otozomal resesif bir hastalık olan homosisteinüri'li hastalarda klinik tablonun osteoporozu da içerdiği ise uzun yıllardır bilinmektedir (18 -20).

B12 vitamini (Vit-B12) ve folat, Hcy metabolizmasında kofaktör olarak kullanılır ve düzeylerindeki azalma Hcy düzeylerindeki artışa neden olur. Bu kofaktörler ile kemik mineral yoğunluğu (KMY) arasında pozitif (21), Hcy ile KMY arasında ise negatif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (22). Ancak Hcy ile osteoporoz arasındaki ilişkide bu kofaktörlerdeki değişikliklerin olası rolleri halen aydınlatılmamıştır. Dolayısıyla bu çalışma postmenopozal kadınlarda plazma Hcy, vit-B12, folat düzeyleri ile kemik metabolizmasının biyokimyasal belirteçleri arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla planlanmıştır.

Hasta Seçimi ve Yöntem

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı polikliniklerine ayaktan başvuran, postmenopozal osteoporoz ve osteopeni saptanan hastalar alındı. Osteoporoz ve osteopeni tanısı, lomber vertebra (L2-L4) KMY ölçümlerine göre konuldu. KMY, "dual-energy X-ray absorptiometry" (DEXA) (Norland XR-36, Norland Corporation, Fort Atkinson, WI, USA) ile değerlendirildi. KMY'si genç referans gruba göre -2.5 standart sapmadan küçük olanlar osteoporoz, -1 ve -2.5 arasında olanlar osteopeni, -1'den büyük olanlar ise normal olarak kabul edildi. Cerrahi ve premenopozal hastalar, KMY ve kemik metabolizmasına etkili hastalığı ve ilaç kullanım öyküsü olanlar (inflamatuar

romatizmal hastalıklar, endokrin ve metabolik bozukluklar, kronik böbrek ve karaciğer hastalıkları, malabsorbsiyona neden olabilen gastrointestinal hastalıklar, steroid, antidepressan ve hormon replasman tedavisinde kullanılan ilaçlar), ayrıca uzun süre immobil olanlar, omurga operasyonu geçirenler ve kırığı bulunan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Hastaların hiçbirisi osteoporozla yönelik herhangi bir medikal tedavi almamıştı ve hiçbirinde megaloblastik anemi tablosu yoktu. Yukarıdaki çalışma kriterlerine uyan, postmenopozal olup KMY normal olan, yaş ve menopoz süreleri benzer sağlıklı kadınlar ile kontrol grubu oluşturuldu. Tüm hastaların ve kontrol grubunun ayrıntılı öyküleri alınarak demografik verileri kaydedildi. Çalışma grubuna dahil edilen tüm hasta ve kontrollerden yazılı aydınlatılmış onam alındı.

Biyokimyasal ölçümler için venöz kan ve idrar örnekleri sabah alındı. Kan ve idrar örnekleri çalışılacakları zamana kadar -80 °C'da saklandı.

Tüm çalışma gruplarında plazma Hcy, serum vit-B12, folat, kalsiyum (Ca), inorganik fosfat (P), intakt parathormon (PTH), alkalen fosfataz (ALP), N-mid-osteokalsin (OC), β -CrossLaps, 25-OH vitamin D3 (vit-D3) ve idrar N-Telopeptid düzeyleri ölçüldü.

Plazma homosistein düzeyleri Drew DS30 total Hcy sistemi ile serum vit-B12, folat, PTH, OC, β -CrossLaps düzeyleri ise Roche Modular E170 immünokimya cihazında elektrokemilüminesans yöntemi (ECLIA) ile, ölçüldü. Vit-D3 düzeyi RIA yöntemi ile Biosource marka ticari kit kullanılarak belirlendi. Serum ALP; standardize kolorimetrik metod ile, P; fosfomolibdat kolorimetrik metod ile, Ca; okresolftalein endpoint kolorimetrik metod ile Roche/Hitachi MOD P otoanalizöründe ölçüldü. İdrar N-Telopeptid, ELISA yöntemi kullanılarak ticari bir kit ile (Osteomark kit, Ostex, USA) saptandı.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 11.0 paket istatistik programı ile gerçekleştirildi. Tüm sonuçlar ortalama \pm standart deviasyon olarak verildi. Grup ortalamaları arasındaki farkların anlamlılığı ANOVA ve Student-t testleri ile değerlendirildi. Ölçümler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon analizi ile incelendi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

Sonuçlar

Çalışmaya alınan osteoporotik hastaların (148 hasta) yaş ortalaması 63.89 ± 9.88 yıl, osteopenili hastaların (75 hasta) yaş ortalaması 62.92 ± 7.35 yıl, kontrol grubunun ise (61 kadın) 63.18 ± 8.67 yıl idi. Gruplar arasında yaş ve menopoz süreleri açısından anlamlı farklılık yoktu (tablo 1). Gruplar plazma Hcy düzeyleri açısından karşılaştırıldıkla-

Tablo 1: Grupların demografik verileri

	Osteoporoz Grubu	Osteopeni Grubu	Kontrol Grubu
N	148	75	61
Yaş (yıl)	63.89 ± 9.88	62.92 ± 7.35	63.18 ± 8.67
Menopoz süresi (yıl)	14.86 ± 9.01	13.88 ± 8.14	12.01 ± 9.30
P>0.05			

rında, osteoporozlu grupta Hcy düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu tespit edildi (tablo 2). Osteopenili grup ile karşılaştırıldığında Hcy düzeyleri osteoporozlu grupta daha yüksek olmakla birlikte fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Benzer şekilde osteopenili grupta Hcy düzeyi kontrol grubundan daha yüksek olmasına karşın, iki grup arasındaki fark anlamlı değildi.

Vit-B12 düzeyleri ise hem osteoporoz hem de osteopenili grupta kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşüktü ($p<0.05$). Serum folat, ALP, Ca, P, OC, PTH, vit-D3 düzeyleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Gruplar serum β -CrossLaps düzeyleri açısından karşılaştırıldığında ise, osteoporozlu grubun β -CrossLaps düzeylerinin osteopeni ve kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$). İdrar N-Telopeptid düzeyleri de osteoporozlu grupta kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.05$).

Osteoporoz ve osteopenili gruplarda homosistein, vit-B12 ve folat düzeyleri ile KMY ölçümleri arasında anlamlı her hangi bir ilişki tespit edilmedi. Bununla birlikte, osteoporozlu grupta Hcy ile N-Telopeptid ($r=0.40$, $p<0.05$) ve β -CrossLaps ($r=0.52$, $p<0.05$) düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerin olduğu görüldü. Yine bu grupta vit-B12 ve OC arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu da tespit edildi ($r=0.42$, $p<0.05$).

Tartışma

Hcy'in kemik dokusu üzerindeki etkisi konusunda farklı görüşler öne sürülmüştür. Bunlardan birisi Hcy'in kollajenin solubilité ve stabilitesi için gerekli çapraz bağların (cross-link) oluşumunu bozduğu şeklindedir (23-26). Kollajenin çapraz bağlarının sentezlenebilmesi için aktif lizin ve hidroksilizin aldehid yapılarının olması gerekir. Bu al-

dehid gruplarının oluşumu için lizil oksidaz enzimi kullanılmaktadır. Hcy'in aktif metaboliti olan tiyolaktonun lizil oksidazı inhibe ettiği gösterilmiştir (27) Ayrıca Hcy'in bu aktif aldehid grupları ile stabil tiazin halkası oluşturduğu, böylece çapraz bağ yapısını bozduğu gösterilmiştir (28). Çapraz bağ yapısının bozulması kollajenin daha kolay yıkılmasına neden olabilir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar, eskilerin aksine yeterli mineralizasyon için kemik matriks yapısının özellikle önemli olduğunu göstermektedir (27,29). Dolayısıyla, çapraz bağ yapılarının Hcy ile bozulması, kemik matriks yapısının ve mineralizasyonun bozulmasına ve dolaylı olarak da osteoporozda bulunabilir. Ayrıca, Hcy'in osteoblast fonksiyonlarını bozduğu (30), osteoklast aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (31).

Biz de yapmış olduğumuz bu araştırmada literatürle uyumlu olarak postmenopozal osteoporozlu kadınlarda plazma Hcy düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu saptadık. Yine osteoporozlu grupta Hcy'in yanısıra Tıp I kollajen yıkım belirteçlerinden olan serum β -CrossLaps ve idrar N-Telopeptid düzeylerinin kontrol grubundan anlamlı derecede daha yüksek olduğunu tespit ettik. Kemik rezorpsiyon belirteçleri ile Hcy düzeyleri arasında ise pozitif ilişkiler olduğunu belirledik. Bu korelasyonlar Hcy'nin yukarıda anlatılan varsayımlardan bir veya birkaçı ile kemik Tıp I kollajen yapısının bozulmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bu bulgular baz alındığında, Hcy düzeyindeki artmanın kemik yıkımına katkıda bulunabileceği düşünülebilir. Diğer taraftan bu çalışmada KMY ölçümleri ile Hcy düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmaması ($r=0.16$, $p>0.05$), Hcy ile KMY arasında ilişki olmadığını ya da sadece zayıf bir ilişki bulunduğunu bildiren diğer çalışmalarla (17,32-34) uyumludur.

Eastell ve ark'ları pernisyöz anemili kişilerde osteoporoz riskinin arttığını bildirmişlerdir (35). Goerss ve

Tablo 2: Grupların lomber kemik mineral yoğunlukları ve biyokimyasal kemik döngüsü belirteçleri

	Osteoporoz Grubu (n=148)	Osteopeni Grubu (n=75)	Kontrol Grubu (n=61)
Lomber (L2-L4) T skoru	-3.36 ± 0.84 # *	-1.75 ± 0.8 **	0.12 ± 0.98
L2-L4 KMY (g/cm ²)	0.73 ± 0.12 # *	0.89 ± 0.09**	1.08± 0.18
Plazma Hcy (µmol/l)	12.14 ± 4.44 *	11.15 ± 4.19	10.18 ±3.69
Serum Ca (mg/dl)	9.74 ± 0.49	9.87 ± 0.59	9.77 ± 0.47
Serum P (mg/dl)	3.78 ± 0.53	3.79 ± 0.45	3.92 ± 0.46
Serum ALP (U/l)	192.56 ± 62.19	198.52 ± 62.32	185.59 ± 51.95
Serum OC (ng/ml)	29.15 ± 26.19	25.85 ± 11.70	23.99 ±9,47
Serum PTH (pg/ml)	52.34 ± 26.20	50.18 ± 21.28	49.34 ± 15.87
Serum Vit-B12 (pg/ml)	263.41 ± 95.72*	275.65 ± 93.77**	434.13 ± 173.63
Serum Folat (ng/ml)	9.08 ± 1.95	8.63 ± 2.30	9.62 ± 2.86
Vit-D3 (ng/ml)	62.10 ± 35.30	55.63 ± 26.26	55.62 ± 35.12
Serum β -Cross-Laps (ng/ml)	0.53 ± 0.34 # *	0.38 ± 0.22	0.36 ± 0.17
N-Telopeptid/kre(nmol/l BCE)	77.57 ± 28.66*	62.49 ± 43.58	54.53 ± 13.78

#: Osteoporoz ve osteopeni grubu karşılaştırıldığında $p<0.05$, *: Osteoporoz ve kontrol grubu karşılaştırıldığında $p<0.05$, **: Osteopeni ve kontrol grubu karşılaştırıldığında $p<0.05$.

KMY: Kemik mineral yoğunluğu, Hcy: homosistein, Ca: kalsiyum, P: inorganik fosfat, ALP: Alkalen fosfataz, OC: Osteokalsin, PTH: İntakt parathormon, Vit-B12: vitamin B12, Vit-D3: 25-OH vitamin D3, Kre: idrar kreatinin.

ark'ları da 131 pernisyöz anemili hastada yaptıkları çalışmada, genel toplum ile karşılaştırıldığında bu hastalarda proksimal femur kırıklarınının 1.9, vertebra kırıklarınının 1.8 ve distal önkol kırıklarınının ise 2.9 kat daha fazla görüldüğünü saptamışlardır (36). Osteoblastların vit-B12 ile stimüle edildikleri, osteoblast proliferasyonu için belirli bir konsantrasyonda vit-B12'ye gereksinim olduğu bilinmektedir (37). Carmel ve ark'ları vit-B12 eksikliğinde OC ve kemik ALP düzeylerinin kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğunu tespit etmişlerdir (38). Melton ve ark'ları ise pernisyöz anemili bir hastada vit-B12 tedavisi ile KMY'nun düzeldiğini göstermişlerdir (39). Biz de yapmış olduğumuz bu çalışmada serum vit-B12 düzeylerinin hem osteoporoz hem de osteopenili grupta kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte osteoporozlu grupta vit-B12 ile OC düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olduğunu gördük. Bu bulgu vit-B12'nin osteoblastlar üzerindeki etkisini yansıtıyor olabilir. Dolayısıyla vit-B12 düzeyindeki azalmanın Hcy düzeyinde artmaya neden olarak kemik yıkımına katkıda bulunması, ayrıca vit-B12'nin osteoblastlar üzerindeki direkt uyarıcı etkisinin azalması sonucu kemik yapımı üzerinde de etkili olması beklenebilir. Kemik rezorpsiyon belirteçlerindeki artmayı dengelemek için kemik yapım belirteçlerinde de artma beklenebilir. Ancak, bu çalışmada OC ve ALP düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşmaması osteoblast fonksiyonlarında göreceli bir azalmaya işaret edebilir. Folat eksikliğinin Hcy düzeylerinde artmaya neden olarak kemik metabolizmasını etkileyebileceği bildirilmektedir (22). Ancak biz çalışmamızda gruplar arasında folat düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit etmedik. Folat eksikliğinin en sık nedeninin besinsel kaynaklı olduğu gözönünde bulundurulursa, çalışma gruplarımızda yöresel beslenme alışkanlıkları (taze sebze yeme) ile ilişkili olarak folat düzeylerinde değişme olmadığı düşünülebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada postmenopozal osteoporozlu kadınlarda vit-B12 düzeylerindeki azalmanın Hcy düzeylerini arttırarak indirekt olarak kemik yıkımına katkıda bulunabileceği, ayrıca vit-B12'nin osteoblastlar üzerindeki direkt stimulan etkisinin azalması sonucu kemik yapımı üzerinde de olumsuz bir etki yapabileceği düşünüldü. Vit-B12 düzeylerindeki azalmanın kemik yapım ve yıkım dengesinin yıkım yönüne kaymasına yardımcı olarak osteoporoz gelişimine katkıda bulunduğu kanısına varıldı. Osteoporozlu hastalarda plazma homosistein ve vit-B12 düzeylerinin saptanmasının ve gerektiğinde vit-B12 destek tedavisi uygulanmasının osteoporoz tedavisinde yararlı olabileceği, ayrıca osteoporoz ve vit-B12 arasındaki ilişkinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha kapsamlı ve geniş çalışmalara gereksinim duyulduğu sonucuna ulaşıldı.

Kaynaklar

1. Kanis JA, Delmas P, Burckhardt P, et al. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. *Osteoporos Int* 1997; 7: 390-406.
2. Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Peck WA, Chairman. *Am J Med* 1993;94:646-50.

3. NIH. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis, Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA* 2001;285:785-95.
4. Lips P. Epidemiology and predictors of fractures associated with osteoporosis. *Am J Med* 1997; 103: 3-8.
5. Boonen S, Autier P, Barette M, et al. Functional outcome and quality of life following hip fracture in elderly women: A prospective controlled study. *Osteoporos Int* 2004;15:87-94.
6. Sankaran KS. Osteoporosis prevention and treatment. *Drugs Aging* 1996; 9: 472-477.
7. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocyst(e)ine metabolic defects and the risk of placental abruption, pre-eclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 1999;20:519-29.
8. Vollset SE, Refsum H, Irgens LM, et al. Plasma total homocysteine, pregnancy complications, and adverse outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* 2000;71:962-8.
9. Nilsson K, Gustafson L, Falldt R, et al. Hyperhomocysteinemia-a common finding in a psychogeriatric population. *Eur J Clin Invest* 1996;26:853-9.
10. Smith AD. Homocysteine, B vitamins, and cognitive deficit in the elderly [Editorial]. *Am J Clin Nutr* 2002;75:785-6.
11. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-28.
12. Berwanger CL, Jeremy JY, Stansby GD. Homocysteine and vascular disease. *Br J Surg* 1995;82:726-31.
13. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995;274:1049-57.
14. Brattstrom LE, Hardebo JE, Hultberg BL. Moderate hyperhomocysteinemia: a possible risk factor for arteriosclerotic cerebrovascular disease. *Stroke* 1984;15:1012-16.
15. Clarke R. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; 288:2015-22
16. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004;350:2042-9.
17. Van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004;350:2033-41.
18. Brenton DP. Skeletal abnormalities in homocystinuria. *Postgrad Med J* 1977;53:488-96.
19. Harpey JP, Rosenblatt DS, Cooper BA, et al. Homocystinuria caused by 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: a case in an infant responding to methionine, folic acid, pyridoxine, and vitamin B12 therapy. *J Pediatr* 1981;98:275-8.
20. Mudd SH, Skovby F, Levy HL, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* 1985;37:1-31.
21. Tucci JR, Tonino RP, Emkey RD, et al. Effect of three years of oral alendronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Am J Med* 1996; 101: 488-501
22. Gjesdal CG, Vollset SE, Ueland PM, et al. Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland Homocysteine Study. *Arch Intern Med*. 2006;166(1):88-94
23. Eyre D. Collagen cross-linking amino acids. *Meth Enzymol* 1987;144:115-141.
24. Reiser K, McCormick R, Rucker R. Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J* 1992;6:2439-49.
25. Robins S, Duncan A. Cross-linking of collagen. Location of pyridinoline in bovine articular cartilage at two sites of the molecule. *Biochem J* 1983;215:175-82.
26. Yamauchi M, Young DR, Chandler GS, et al. Crosslinking

- and new bone collagen synthesis in immobilized and recovering primate osteoporosis. *Bone* 1988;9:415-18.
27. Khan M, Yamauchi M, Srisawasdi S, et al. Homocysteine decreases chondrocyte-mediated matrix mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micro-mass cultures. *Bone* 2001;28:387-98.
 28. Kang AH, Trelstad RL. A Collagen Defect in Homocystinuria. *J Clin Invest* 1973;52:2571-8.
 29. Paschalis EP, Shane E, Lyritis G, et al. Bone fragility and collagen cross-links. *Bone Miner Res* 2004;19:2000-4.
 30. Sakamotoa W, Isomuraa H, Fujiea K, et al. Homocysteine attenuates the expression of osteocalcin but enhances osteopontin in MC3T3-E1 preosteoblastic cells. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:12-6
 31. Herrmann M, Widmann T, Colaianni G, et al. Increased osteoclast activity in the presence of increased homocysteine concentrations. *Clin Chem* 2005; 51: 2348-2353.
 32. Golbahar J, Hamidi A, Aminzadeh MA, et al. Association of plasma folate, plasma total homocysteine, but not methylenetetrahydrofolate reductase C667T polymorphism, with bone mineral density in postmenopausal Iranian women: a cross-sectional study. *Bone* 2004;35:760-5.
 33. Dhonukshe-Rutten RAM, Pluijm SMF, de Groot LCPGM, et al. Homocysteine and vitamin B12 status relate to bone turnover markers, broadband ultrasound attenuation, and fractures in healthy elderly people. *J Bone Miner Res* 2005;20:921-9.
 34. Herrmann M, Kraenzlin M, Pape G, et al. Relation between homocysteine and biochemical bone turnover markers and bone mineral density in peri- and postmenopausal women. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:1118-23.
 35. Eastell R, Vieira NE, Yergey AL, et al. Pernicious anaemia as a risk factor for osteoporosis. *Clin Sci (Lond)* 1992; 82: 681-685.
 36. Goerss JB, Kim CH, Atkinson EJ, et al. Risk of fractures in patients with pernicious anemia. *J Bone Miner Res* 1992; 7:573-579.
 37. Kim GS, Kim CH, Park JY, et al. Effects of vitamin B-12 on cell proliferation and cellular alkaline phosphatase activity in human bone marrow stromal osteoprogenitor cells and UMR106 osteoblastic cells. *Metabolism* 1996;45:1443-6.
 38. Carmel R, Lau KH, Baylink DJ, et al. Cobalamin and osteoblast-specific proteins. *N Engl J Med* 1988;319:70-5.
 39. Melton ME, Kochman ML. Reversal of severe osteoporosis with vitamin B12 and etidronate therapy in a patient with pernicious anemia. *Metabolism* 1994; 43:468-469.