GLUKOKORTİKOİD ve OVEREKTOMİ ile İNDÜKLENEN OSTEOPOROZDA AVANAFİL ve ZAPRİNAST'IN KEMİK ve OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE ETKİSİ

Zübeyir HUYUT

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nuri BAKAN

Doktora Tezi - 2016

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLUKOKORTİKOİD ve OVEREKTOMİ ile İNDÜKLENEN OSTEPOROZDA AVANAFİL ve ZAPRİNAST'IN KEMİK ve OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE ETKİSİ

Zübeyir HUYUT

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nuri BAKAN

ERZURUM
2016

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

GLUKOKORTİKOİD ve OVEREKTOMİ ile İNDÜKLENEN OSTEOPOROZDA AVANAFİL ve ZAPRİNAST'IN KEMİK ve OKSİDATİF HASAR ÜZERİNE ETKİSİ

Zübeyir HUYUT

Tez Savunma Tarihi	: 18/02/2016	**İmza**
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Nuri BAKAN (Atatürk Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Mustafa GÜL (Atatürk Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ (Atatürk Üniversitesi)	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Mehmet Ramazan ŞEKEROĞLU (YYÜ)	
Jüri Üyesi	: Prof. Dr. Sevinç KUŞKAY (Kocaeli Üniversitesi)	

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM – 2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR V

ÖZET VI

ABSTRACT VII

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ X

TABLOLAR DİZİNİ XVI

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **7**

2.1. Kemik Dokusu 7

2.2. Kemik Hücreleri 7

2.2.1. Kemik hücrelerini etkileyen sistemik ve lokal etkenler 10

2.3. Kemik Dokusunun Makro ve Mikro Yapısı 12

2.3.1. Makroskobik Yapı 12

2.3.2. Mikroskobik Yapı 13

2.4. Kemiğin Yeniden Yapılanması 13

2.5. Kemik Döngüsünün Biyokimyasal Belirteçleri 15

2.6. Kemik Kalitesi Ölçüm Parametreleri 18

2.7. Osteoporoz ve Tarihçesi 18

2.8. Osteoporoz Gelişiminde Risk Faktörleri 20

2.8.1. Değiştirilemeyen Risk faktörleri 20

2.8.2. Değiştirilebilen Risk faktörleri 22

2.9. Osteoporoz'un Epidemiyolojisi ve Çeşitleri 24

2.10. Glukokortikoidler (GCs) ve Osteoporoz İlişkisi 28

2.11. Glukokortikoid ile İndüklenen Osteoporoz (GIO)'un Patogenezi 30
2.12. Glukokortikoid Alan Hastalarda GIOP'un Önlenmesi ve Tedavisi 34
2.13. Overektomi ile İndüklenen Osteoporoz'un Patogenezi 36
2.14. Osteoporetik Kemik ile Normal Kemik Arasındaki Farklılıklar 37
2.15. Osteoporozda Klinik Belirti ve Bulgular 38
2.16. Osteoporozda Tanı Yöntemleri 39
2.17. Osteoporozun Önlenmesi ve Tedavisi 40
2.18. Osteoporozda Yeni Tedavi Yaklaşımları 45
2.19. Oksidatif Stres 45
2.20. Fosfodiesteraz İzoenzimleri (FDEs) 49
2.21. Fosfodiesteraz-5 İnhibitörleri (FDE-5Is) 50
2.22. Çalışmada Kullanılan Fosfodiesteraz-5 İnhibitörleri 50
2.22.1. Avanafil 50
2.22.2. Zaprinast 51
3. MATERYAL VE METOT 52
3.1. Materyal 52
3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar 52
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler 52
3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı 53
3.2. Deney Hayvanları Temin Edilmesi ve Grupların Oluşturulması 55
3.3. Dişi Sıçanlarda Overektomi ile Osteoporoz İndükleme Yöntemi 56
3.4. Overektomi İle Osteoporoz Oluşturulan Gruplarda İnhibitör Uygulama Yöntemi . 58
3.5. Glukokortikoid ile Osteoporoz İndükleme Yöntemi 58
3.6. Glukokortikoid ile Osteoporoz İndüklenen Gruplarda İnhibitör Uygulama Yöntemi 58

3.7. Tedavi Öncesi ve Sonrası Kemik Yoğunluğu Ölçümü 58
3.8. Tedavi Öncesi ve Sonrası Numune Alma 59
3.9. Biyokimyasal Ölçümler İçin Kan ve Plazma Ayırma İşlemleri 59
3.10. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü 59
3.11. MDA Ölçümü 59
3.12. CoQ10 Ölçümü 60
3.13. 8-OHdG ve dG Ölçümü 61
3.14. Kemik Dokularında Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Ölçüm 61
3.15. İstatistiksel Değerlendirme 63
4. BULGULAR 64
4.1. Çalışma Gruplarında Kemik Yoğunluğu (KMY) Ölçüm Sonuçları 64
4.2. Uygulama, Tedavi Öncesi ve Sonrasında Alınan İdrar Örneklerinde Piridinolin (PD) Ölçüm Sonuçları 66
4.3. Uygulama, Tedavi Öcesi ve Sonrasında Alınan İdrar Örneklerinde Deoksipiridinolin (DPD) Ölçüm Sonuçları 69
4.4. Uygulama ve Tedavi Sonrası eNOS Ölçüm Sonuçları 71
4.5. Uygulama ve Tedavi Sonrası NO Ölçüm Sonuçları 72
4.6. Uygulama ve Tedavi Sonrası FDE-5 Ölçüm Sonuçları 74
4.7. Uygulama ve Tedavi Sonrası cGMP Ölçüm Sonuçları 75
4.8. Uygulama ve Tedavi Sonrası PKG Ölçüm Sonuçları 76
4.9. Uygulama ve Tedavi Sonrası PICP Ölçüm Sonuçları 78
4.10. Uygulama ve Tedavi Sonrası CTCP Ölçüm Sonuçları 79
4.11. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi Gruplarda Östrojen, Erkek Gruplarda Kortizol Ölçüm Sonuçları 81
4.12. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi Gruplarda Histopatoljik ve

İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları 83
4.13. Uygulama ve Tedavi Sonrası Erkek Gruplarda Histopatoljik Değerlendirme Sonuçları 93
4.14. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi ve Erkek Gruplarda MDA Ölçüm Sonuçları.101
4.15. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi ve Erkek Gruplarda Mitokondri Hasar Göstergelerinden Okside CoQ10/Redükte CoQ10 Oranlarına Ait Sonuçlar 103
4.16. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi ve Erkek Gruplarda 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin ve Deoksiguanozin Ölçüm Sonuçları 104
5. TARTIŞMA 107
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 124
KAYNAKLAR 125
EKLER 157
EK-1. ÖZGEÇMİŞ. 157
EK-2. ETİK KURUL KABUL YAZISI 158
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU 159
EK-4. ETİK KURUL ÇALIŞMA BAŞLIĞI DEĞİŞTİRME KABUL YAZISI ... 160
EK-5. ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ 161

TEŞEKKÜR

Doktora çalışması olarak sunduğum bu çalışmanın her safhasında, bana her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nuri BAKAN'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın bütün safhalarında Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı'nın imkânlarını kullanmama yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a ve öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ, Prof. Dr. Zuhal UMUDUM, Prof. Dr. Hülya AKSOY, Prof. Dr. Fatih AKÇAY, Prof. Dr. M. Sait KELEŞ ve Prof. Dr. Abdulkadir YILDIRIM, Yrd. Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK ile anabilim dalı araştırma görevlileri, idari ve teknik personeline, Yüzüncü Yıl Üniversitesi (YYÜ) Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuar imkânlarını kullanmama yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı ve Yüksek Lisans tez danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Ramazan ŞEKEROĞLUN'na, YYÜ Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. H. Hakan ALP ve diğer öğretim üyesi hocalarıma, çalışmalarım esnasında bana yardımıcı olan YYÜ Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM'a, YYÜ Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Levent EDİZ'e, YYÜ Deney Hayvanları Birimi müdürü Yrd. Doç. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN'a, eğitim hayatım boyunca beni yetiştiren ve bugünlere gelmemde her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen anneme, babama, kardeşlerime ve çalışmalarım esnasında benim her türlü sıkıntılarıma katlanan değerli eşime, kızım Hümeyra ve oğlum Ömer Asaf'a teşekkürü bir borç bilirim.

Zübeyir HUYUT

ÖZET

Glukokortikoid ve Overektomi ile İndüklenen Osteoporozda Avanafil ve Zaprinast'ın Kemik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi

Amaç: Osteoporoz birçok faktör ile ilişkili olan ve 50 yaşın üzerindeki kadınların %50'sinden fazlasını etkileyen önemli bir halk sağlığı problemidir. Daha önce yapılan çalışmalarda nitrik oksit (NO)'in anjiyogenez'i ve kan akışını hızlandırdığı ve kemik oluşumunda pozitif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda; NO sinyal yolağındaki siklik guanozin mono fosfat (cGMP)'ı hidroliz eden fosfodiesteraz-5 (FED-5) inhibitörlerinden zaprinast ve avanafil'in, NO ile sinyal yolu, kemik mineral yoğunluğu (KMY) ve oksidatif hasar üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod: Bu çalışmada 24 adet dişi, 24 adet erkek sıçan kullanılmıştır. 6'şar edet dişi sıçandan oluşan 4 gruptan ilki, şahm grubu olarak ayrılmış ve abdomen bölgesi 2 cm açılarak tekrar kapatılmıştır. Diğer üç grupta ise overektomi yapılmıştır. 6'şar adet erkek sıçandan oluşan 4 gruptan ilki sağlıklı kontrol grubu olarak ayrılmış, diğer üç gruba ise dexamethazone (DEX) verilmiştir. Hem dişi hem erkek sıçanlarda 3. ve 4. gruplara yukarıdaki işlemlere ek olarak sırasıyla günde 10 mg/kg dozda (sırasıyla 60 ve 30 gün) zaprinast ve avanafil verilmiştir. Bu uygulamalardan önce tüm gruplarda dansitometreyle KMY ve enzim bağlı immünoassay (ELISA) yöntemiyle idrarda piridinolin (PD) ve deoksipiridinolin (DPD) değerleri ölçülmüştür. Overektomi, uygulama işlemleri ve tedavi sonrası, tüm gruplarda ELISA yöntemiyle plazma endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS), NO, cGMP, FDE-5, protein kinaz-G (PKG), prokollagen peptid (PICP), c-terminal kollagen peptid (CTCP) düzeyleri ile idrar PD, DPD düzeyleri ve tüm gruplarda KMY düzeyleri ölçülmüştür. Bu parametlere ilaveten bütün gruplarda histopatolojik olarak sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu, epifizeal genişlik değerleri ve kemik iliğinde anjiyogenez ise immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Ayrıca oksidatif stres parametrelerinden malondialdehit (MDA), okside CoQ10/redükte CoQ10 ve 8-OHdG/10^6dG düzeyleri yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC) yöntemiyle ölçülmüştür.

Bulgular: Zaprinast ve özellikle de avanafil gruplarında FDE-5'in inhibe olduğu, cGMP ve PKG düzeylerinin arttığı ve KMY'da pozitif kontrol gruplarına göre ciddi artışların olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca zaprinast ve avanafil'in, sağ femur trabeküler kemik yoğunluğunu, epifizeal kemik genişliğini ve kemik iliğindeki anjiyogenez'i artırdığı ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Overektomili dişi ve DEX verilen pozitif kontrol gruplarında MDA, okside CoQ10/redükte CoQ10 ve 8-OHdG/10^6dG düzeylerinin yükseldiği ($p<0.05$), ancak zaprinast ve avanafil verilen gruplarda oksidatif stresin artmadığı ve sahm grubu değerlerine benzer olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu sonuçlara göre, *in vivo* olarak zaprinast ve avanafil'in, NO metabolik yolu aracılığıyla anjiyogenez'i artırarak osteoporozlu hastaların KMY'a önemli katkı yaptığı ve oksidatif stresi azalttığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, avanafil, zaprinast, overektomi, dexametazon, kemik mineral yoğunluğu, oksidatif hasar

ABSTRACT

The Effect on Bone and Oxidative Damage of Avanafil and Zaprinast in Glucocorticoid and Ovariectomy-Induced Osteoporosis

Aim: Osteoporosis is a major public health problem and associated with many factors. It affect more than 50% of women over the age of 50. In previous studies, it has been reported that nitric oxide (NO) accelerates angiogenesis and the flow of blood. Also, it has positive effect on bone formation. In our study, we investigated of effects of avanafil and zaprinas, phosphodiesterase-5 (PDE-5) enzyme inhibitors, on NO signaling pathway, bone mineral density (BMD) and oxidative damages.

Material and Methods: In this study, 24 female and 24 male rats were used. Female rats were divided into 4 equal groups. The first group was sham group. In this group, abdomen area was closed again after opening up to 2 cm surgically. The other groups were ovariectomized. In addition, 24 male rats were divided into 4 equal groups. The first group was healthy control group. Dexamethasone (DEX) was given to the other groups. In addition to the above process, 10 mg/kg avanafil and zaprinast are given to 3st and 4th groups of both female (60 days) and male rats (30 days), respectively. After these applications, BMD was measured by densitometry and PD, DPD measured in urine using by enzyme-linked immunoassay (ELISA) methods. Then, in all groups endothelial nitric oxide synthase (eNOS), NO, CGMP, PDE-5, protein kinase G (PKG), procollagen peptide (PICP), c-terminal collagen peptide (CTCP) in serum and PD, DPD in urine were measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA). In addition to these parameters, in all groups, right femoral trabecular bone density and epiphyseal bone width as histologically, and angiogenesis in bone marrow were determined as immunohistochemically. Furthermore, malondialdehyde (MDA), ubiquinone-10 (CoQ10) / ubiquinol-10 (CoQ10H) and 8-OHdG/ 10^6dG from the oxidative stress parameters were deteced by high pressure liquid chromatography (HPLC).

Results: In zaprinast group particularly in avanafil group it was determined that PDE-5 was inhibited. In contrast to the parameters of BMD, cGPM and PKG values had been significantly increased when compared to the positive control groups. Also, avanafil and zaprinast enhanced the right femoral trabecular bone density, epiphyseal bone width and angiogenesis in bone marrow ($p<0.05$). In both female and male positive control groups MDA, okxide CoQ10/reducting CoQ10 ve 8-OHdG/106dG increased, however, these values and oxidative stress have not changed in zaprinast and avanafil groups. These results are similar to sahm and healthy control group values.

Conclusion: These results clearly show that avanafil and zaprinast had positive effects on trabecular bone density, epiphyseal bone width and angiogenesis in bone marrow by NO metabolic signal pathway and decreased oxidative stress in osteoporosis, as in vivo.

Key Words: Osteoporosis, avanafil, zaprinast, ovariectomy, dexamethasone, bone mineral density, oxidative damage

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Apc	Adenomatöz polipozis koli
BSU	Kemik yapısal ünitesi
BRU	Kemik yeniden yapılanma ünitesi
CTCP	c-Terminal kollagen peptid
DEX	Dexamethasone (Sentetik glukokortikoid)
DEXA	Dual enerji X ray absorptiometri
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
ERs	Östrojen reseptörleri
eNOS	Endoteliyal nitrik oksit sentaz
FDEs	Fosfodiesteraz izoenzimleri
FDE-Is	Fosfodiesteraz enzim inhibitörleri
GSK	Glikojen sentaz kinaz
GCs	Glukokortikoidler
GIO	Glukokortikoid ile indüklenmiş osteoporoz
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL	İnterlökin
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KDH	Yeniden yapılanma hızı
KMY	Kemik mineral yoğunluğu
LT	Lökotrien
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
LRP	Lipoprotein reseptör ilişkili protein
MDA	Malondialdehit
LRP	Lipoprotein reseptör ilişkili protein

OP	Osteoporoz
OPG	Osteoprotogerin
OVX	Cerrahi müdahale ile overium'ları çıkarılan grup
PKG	Protein kinaz-G
PPAR γ2	Peroksizom proliferatör aktive reseptör γ2
Pg	Prostaglandin
PTH	Paratroid hormon
PTHrP	Paratroid hormon reseptör
ROS	Reaktif oksijen türleri
S-NTX	N-terminal telopeptid çapraz bağları
TAOC	Total antioksidan kapasite
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü-β
TNF-α	Tümör nekroz faktör-α
TRAP	Tartrat rezzistan asit fosfataz
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
8-OHdG	8-Hidroksi-2-deoksi guanozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No **Sayfa No**

Şekil 1.1. Temel moleküllerin lokalizasyonu, NO'in cAMP ve cGMP sinyal yolu ile ilişkisi 2

Şekil 1.2. Endotel düz kas hücrelerinde FDE-5'in fosfodiesteraz izoenzim inhibitörleri (FDE-Is) tarafından regülasyonu 4

Şekil 2.1. Osteoklast oluşumu ve işlevini düzenleyen moleküler mekanizmalar 10

Şekil 2.2. Normal ve osteoporetik kemik dokusuna ait KMY görüntüleri 19

Şekil 2.3. Tip I postmenapozal OP'nin patogenezi 26

Şekil 2.4. Tip II OP'nin patogenezi 27

Şekil 2.5. Kemik hücreleri üzerine GCs'in direkt etkileri 32

Şekil 2.6. Wnt Sinyal Yolu 34

Şekil 2.7. Selektif östrojen reseptör modülatörlerinin etki mekanizması 48

Şekil 2.8. Oksidatif metabolizma esnasında veya sonucunda oluşan bazı hasarlı DNA'lar 49

Şekil 3.1. İnhibitör uygulama öncesi dişi ratlarda uygulanan overektomi işlemlerine ait bazı resimler 57

Şekil 4.1. Dansitometre ile, uygulama ve tedavi öncesi KMY ölçüm işlemleri 64

Şekil 4.2. Overektomi öncesi, sonrası ve inhibitör uygulama sonrası dişi sıçanlardan elde edilen KMY değerlerinin karşılaştırılması 66

Şekil 4.3. DEX ve inhibitör uygulama öncesi ve sonrası erkek sıçan gruplarına ait KMY ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması 68

Şekil 4.4. Overektomi ve inhibitör uygulama öncesi elde edilen PD'e ait standart grafik 67

Şekil 4.5. Overektomi ve tedavi öncesi ile overektomi ve tedavi sonrası dişi sıçan gruplarına ait PD değerlerinin karşılaştırılması 68

Şekil 4.6. DEX ve tedavi öncesi ile DEX ve tedavi sonrası erkek sıçan gruplarına ait PD değerlerinin karşılaştırılması..... 68

Şekil 4.7. Overektomi ve inhibitör uygulama öncesi elde edilen DPD'e ait standart grafik 69

Şekil 4.8. Overektomi ve tedavi öncesi ile overektomi ve tedavi sonrası dişi sıçan gruplarına ait DPD değerlerinin karşılaştırılması 71

Şekil 4.9. DEX ve tedavi öncesi ile DEX ve tedavi sonrası erkek sıçan gruplarına ait DPD değerlerinin karşılaştırılması..... 71

Şekil 4.10. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen eNOS'a ait standart grafik……..……71

Şekil 4.11. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen NO'e ait standart grafik 73

Şekil 4.12. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen FDE-5'e ait standart grafik 74

Şekil 4.13. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen cGMP'a ait standart grafik 75

Şekil 4.14. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen protein kinaz-G'ye ait standart grafik 77

Şekil 4.15. Dişi sıçanlarda NO sinyal yolundaki parametre değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması. 78

Şekil 4.16. Erkek sıçanlarda NO sinyal yolundaki parametre değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması 78

Şekil 4.17. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen PICP'a ait

standart grafik 79

Şekil 4.18. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen CTCP'e ait standart grafik 80

Şekil 4.19. Overektomi ve tedavi sonrası dişi sıçanlarda PICP ve CTCP değerlerinin karşılaştırılması 81

Şekil 4.20. DEX ve inhibitör ile tedavi sonrası erkek sıçanlarda ölçülen PICP ve CTCP değerlerinin karşılaştırılması 81

Şekil 4.21. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen östrojen'e ait standart grafik. 82

Şekil 4.22. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen kortizol'e ait standart grafik 82

Şekil 4.23. Dişi sıçanlarda östrojen ve erkek sıçanlarda kortizol düzeylerinin karşılaştırılması 83

Şekil 4.24. Dişi şahm grubunda sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü .. 84

Şekil 4.25. Overektomi yapılan ve inhibitör verilmeyen grupların sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü 85

Şekil 4.26. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde 10 mg/kg zaprinast verilen grupların sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü..... 85

Şekil 4.27. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde 10 mg/kg avanafil verilen grupların sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü..... 86

Şekil 4.28. Dişi sağlıklı kontrol (şahm) grubu sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü 87

Şekil 4.29. Overektomi yapılan ve inhibitör verilmeyen dişi pozitif kontrol grubu sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü 87

Şekil 4.30. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde tek doz 10 mg/kg zaprinast verilen dişi grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü .. 88
Şekil 4.31. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde tek doz 10 mg/kg avanafil verilen dişi grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü .. 88
Şekil 4.32. Dişi gruplarda sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu ve yeni damarsal oluşuma ait entegre görsel yoğunluk ile ilgili %'de değerlerinin karşılaştırılması 89
Şekil 4.33. Dişi sağlıklı kontrol (şahm) grubu sağ femur gelişme plağına ait görüntü .. 99
Şekil 4.34. Overektomi yapılan ve inhibitör verilmeyen pozitif kontrol grubu sağ femur gelişme plağına ait görüntü 90
Şekil 4.35. Overektomi yapılan ve 2 ay boyunca günde 10 mg/kg zaprinast verilen grubun sağ femur gelişme plağına ait görüntü. 91
Şekil 4.36. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde 10 mg/kg avanafil verilen grubun sağ femur gelişme plağına ait görüntü 91
Şekil 4.37. Dişi gruplara ait sağ femur epifizeal genişlik değerlerinin karşılaştırılması.92
Şekil 4.38. Erkek sağlıklı kontrol grubu sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü 93
Şekil 4.39. DEX verilen ve tedavi edilmeyen pozitif kontrol grubu sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü 94
Şekil 4.40. DEX ile birlikte zaprinast verilen grubun sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü..... 94
Şekil 4.41. DEX ile birlikte avanafil verilen grubun sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü. 95
Şekil 4.42. Erkek sağlıklı kontrol grubu sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. 96

Şekil 4.43. Yalnızca DEX verilen pozitif kontrol grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü 96
Şekil 4.44. DEX ile birlikte zaprinast verilen grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü 97
Şekil 4.45. DEX ile birlikte avanafil verilen grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü 97
Şekil 4.46. Erkek sıçanlarda sağ femur entegre trabeküler kemik yoğunluğu ve yeni damar oluşumunun karşılaştırılması 98
Şekil 4.47. Erkek sağlıklı kontrol grubu sağ femur gelişme plağına ait görüntü 99
Şekil 4.48. Yalnızca DEX verilen pozitif kontrol grubunun sağ femur gelişme plağına ait görüntü 99
Şekil 4.49. DEX ile birlikte zaprinast verilen pozitif kontrol grubunun sağ femur gelişme plağına ait görüntü 100
Şekil 4.50. DEX ile birlikte avanafil verilen pozitif kontrol grubunun sağ femur gelişme plağına ait görüntü 100
Şekil 4.51. Erkek gruplara ait sağ femur epifizeal kemik genişliği değerlerinin karşılaştırılması 101
Şekil 4.52. Standart MDA numunelerine ait pikler 102
Şekil 4.53. MDA standart grafiği 102
Şekil 4.54. CoQ10 standardına ait pik 103
Şekil 4.55. 8-OHdG standardına ait pik 105
Şekil 4.56. dG standardına ait pik 105
Şekil 4.57. Overektomi, uygulama ve tedavi sonrası dişi sıçanlarda oksidatif stres parametre değerlerinin karşılaştırılması 106

Şekil 4.58. DEX ve inhibitör uygulama sonrası erkek sıçanlarda oksidatif stres parametre değerlerinin karşılaştırılması..... 106

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2.1. Plazma ve idrarda biyokimyasal kemik yapım ve yıkım belirteçleri..... 17

Tablo 2.2. DSÖ'nün OP'u tanımlama kriterleri..... 20

Tablo 2.3. Osteoporoz riskini belirlemede etkili olan genler..... 21

Tablo 2.4. Primer ve sekonder OP sınıfları..... 24

Tablo 2.5. Çeşitli tip OP sınıfları..... 25

Tablo 2.6. Kadınlarda östrojen eksikliğine yol açan etkenler..... 25

Tablo 2.7. İkincil OP'un oluşumu için belirlenen en önemli sebepler..... 27

Tablo 2.8. GIOP'un önlenmesi ve tedavisi için mevcut önerilen reçete..... 35

Tablo 2.9. OP'un tanı ve kısa süreli tedavisinin takibinde ölçülmesi gereken biyokimyasal testler..... 40

Tablo 2.10. Tedavide kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması.....42

Tablo 2.11. Endojen kaynaklı oksidatif stres oluşturucuları..... 47

Tablo 4.1. Dişi deney gruplarında overektomi ve tedavi öncesi ile overektomiden 6 ay ve FDE-5Is ile 2 ay tedaviden sonra elde edilen KMY'na ait ölçüm sonuçları..... 65

Tablo 4.2. Erkek sıçanlarda DEX ve inhibitör uygulama öncesi ile sonrasında elde edilen KMY'na ait ölçüm sonuçları..... 66

Tablo 4.3. Dişi sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda PD ölçüm sonuçları..... 67

Tablo 4.4. Erkek sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda PD ölçüm sonuçları..... 68

Tablo 4.5. Dişi sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası

alınan idrarlarda DPD ölçüm sonuçları..... 70

Tablo 4.6. Erkek sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda DPD ölçüm sonuçları..... 70

Tablo 4.7. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen eNOS değerlerinin karşılaştırılması..... 72

Tablo 4.8. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen NO değerlerinin karşılaştırılması..... 73

Tablo 4.9. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen FDE-5 değerlerinin karşılaştırılması..... 75

Tablo 4.10. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen cGMP değerlerinin karşılaştırılması..... 76

Tablo 4.11. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen PKG değerlerinin karşılaştırılması..... 77

Tablo 4.12. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen PICP değerlerinin karşılaştırılması..... 79

Tablo 4.13. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen CTCP değerlerinin karşılaştırılması..... 80

Tablo 4.14. Uygulama ve tedavi sonrası dişi gruplarda östrojen ve erkek gruplarda kortizol değerlerinin karşılaştırılması..... 83

Tablo 4.15. Dişi gruplara ait sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu, yeni damarsal oluşum ve epifizeal kemik genişlik değerlerinin karşılaştırılması..... 92

Tablo 4.16. Erkek gruplara ait sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu, yeni damarsal oluşum ve epifizeal kemik genişlik değerlerinin karşılaştırılması..... 101

Tablo 4.17. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen MDA değerlerinin karşılaştırılması..... 103

Tablo 4.18. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen CoQ10/CoQ10H oranlarının karşılaştırılması 104

Tablo 4.19. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen 8-OHdG/10^6dG oranlarının karşılaştırılması 106

1. GİRİŞ

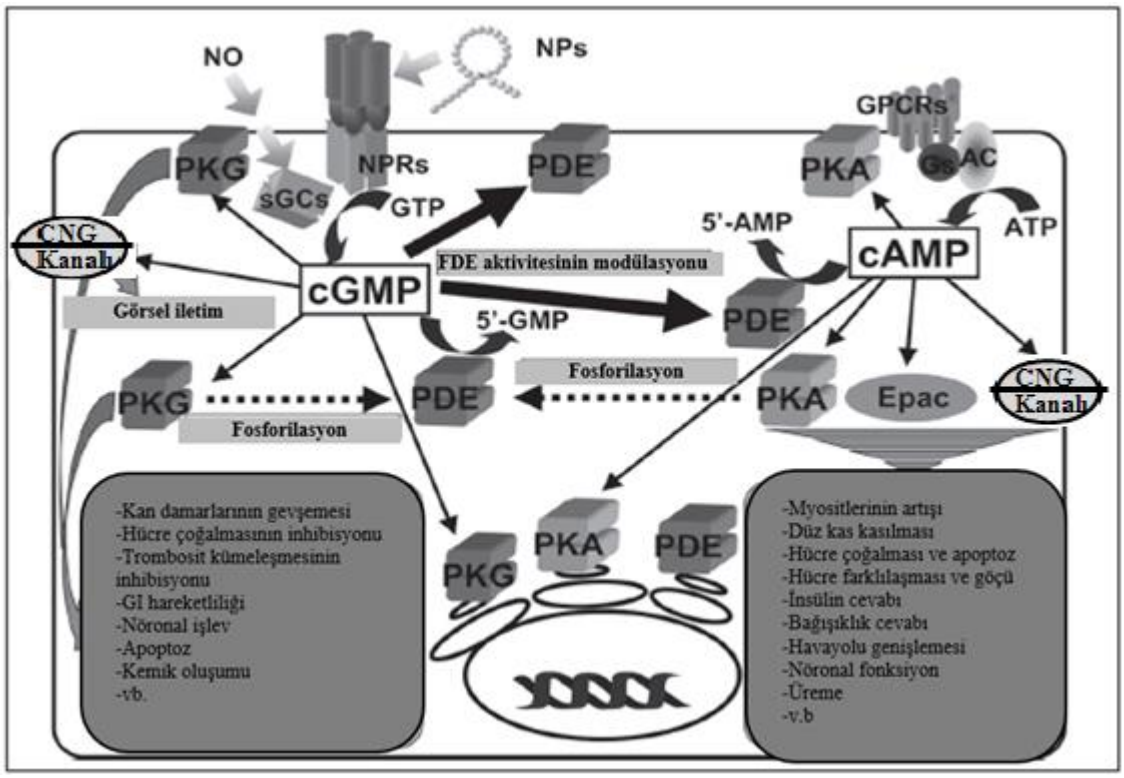
Osteoporoz (OP) kemik doku mikroyapısının kötüleşmesi ve yoğunluğunun azalması ile karakterize olan ve artan kırılganlık riskiyle sonuçlanan oldukça yaygın bir hastalıktır.[1] Özellikle kalça, vertebra, el bileği kırıkları gelişmiş ülkelerde OP koşulları ile ilişkili olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Alkol tüketimi, sigara, kafein, fiziksel haraketsizlik, cinsiyet hormonları eksikliği, malign hastalıklar gibi faktörler canlıları osteoporetik kırıklara yatkın hale getirebilir.[1]

OP dünyada yaygın olarak görülen ve giderek yaşlanan dünya nüfusunda daha da ciddi bir problem olacağı varsayılan en önemli klinik problemlerden biri olduğu için[2], OP'un önlenmesi ve tedavisi veya herhangi bir grup OP'dan kaynaklanan kemik hasarlarının iyileşmesi, günümüzde oral ve maksillofajiyal cerrahi müdahalelelerin en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir.[3,4]

Kemik hasarları ve kırıklarının iyileşmesi için vasküler bir cevabın gerekliliği bilinmektedir. Kemiklerde hasarın meydana gelmesinden birkaç gün sonra kırıkların yeniden tamirinde vasküler farklılaşmayla ilişkili olarak bölgesel kan akışının belirgin biçimde arttığı tespit edilmiştir.[5]

Nitrik oksit (NO), L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi katalizörlüğünde sentezlenen ve aynı zamanda artrit, inflamasyon ve kemik hasarlarının tamiri ile ilişkili olan yüksek reaktiviteye sahip bir moleküldür.[6] NOS enziminin endotelyal NOS (eNOS), nöronal NOS (nNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır.[7] Uygun fizyolojik uyaranlara cevap vermede, vasküler yatakların perfüzyon basıncı ve kan akışını düzenlemede etkili rolü olduğu bilinmektedir.[4] OP'lu hastalarda NO'in hücre içi etkilerine siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılık etmekte ve protein kinaz-G (PKG) ile de bu etki ilerlemektedir.[7] Şekil

1.1'de NO'in cGMP ve siklik adenozin monofasfat (cAMP) sinyal yolu ile ilişkisi ve temel moleküllerin lokalizasyonu görülmektedir.



Şekil 1.1. Temel moleküllerin lokalizasyonu, NO'in cAMP ve cGMP sinyal yolu ile ilişkisi.[9]

"cAMP ve cGMP'nin efektör molekülleri oklarla gösterilmektedir. Protein kinaz-A (PKA) ve PKG tarafından FDE izoenzimlerinin fosforilasyonu noktalı oklarla gösterilmiştir. cGMP tarafından FDE'ın modülasyonu kalın oklarla gösterilmiştir. Siklik nükleotid sinyallerinin hücresel ve fizyolojik sonuç ve çıktıları gri renkli kutularda gösterilmiştir. AC: Adenilil siklaz, CNG: siklik nükleotid geçiş kanalı, Epac: cAMP tarafından aktive edilen değişim proteini, GI: Mide-barsak sistemi, GPCRs: G proteinine bağlı reseptörler, Gs: GTP bağlatıcı prtotein subünitesi, NO: Nitrik oksit, NPs: Natriüretik peptidler, NPRs: Natriüretik peptid reseptörleri, sGCs: Çözünebilir guanilil siklaz"

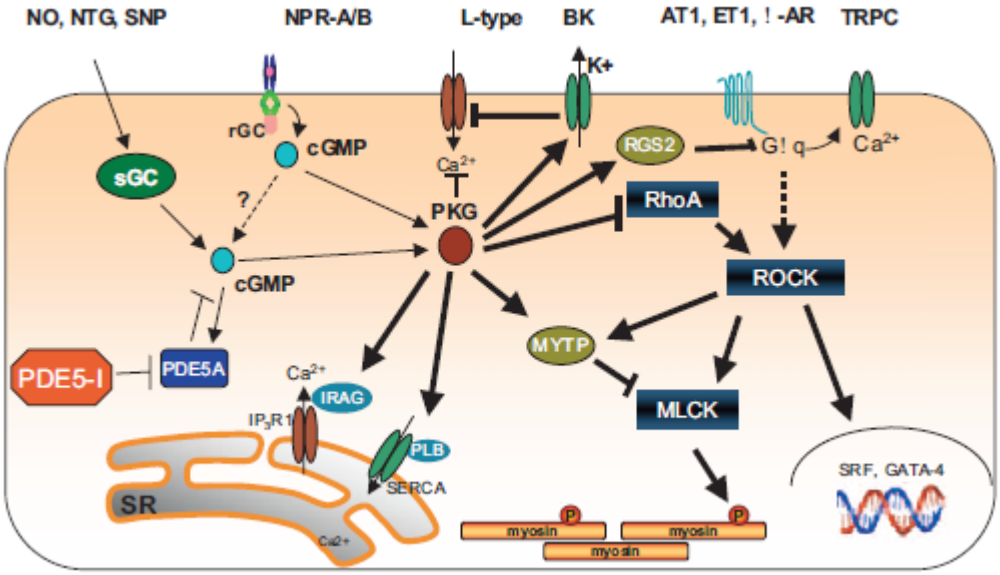
cAMP ve cGMP kardiyovasküler düzenlemede, gen expresyon ve morfoloji fonksiyonunu etkilemede merkezi role sahip intrasellüler habercilerdir.[7] cAMP ve cGMP bir dizi hücresel cevabı oluşturmada hormonlar, nörotransmitterler, stokinler gibi hücre dışı ajanlar vasıtasıyla osteoblastların kemik oluşumuna katkıda bulunması için hücre içi ikincil haberciler olarak rol oynarlar. cAMP aynı zamanda insan ve ratlardaki osteoblast benzeri hücrelerden osteokalsin salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynar.

Hormonal olarak kontrol edilen cAMP yolunun iyi bilinen bir özelliği, ilk önce artan daha sonra gittikçe azalan intrasellüler cAMP seviyesidir.[5] cAMP'nin intrasellüler konsantrasyonu, cAMP bağımlı adenilat siklaz tarafından oluşumu ve fosfodiesteraz izoenzimleri (FDEs) tarafından yıkılmasına bağlıdır.

Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar kemik hücrelerinin NO ve nitrik oksit sentaz izoenzimlerini (NOSs) salgıladığını göstermiştir. NO'in osteoblastik aktivitesi üzerine yapılan çalışmalar açık değildir. Bazı yazarlar NO dönorlarının cGMP, alkalen fosfataz aktivitesini (ALP) artırdığını ve *in vitro* olarak osteokalsin salınımı kadar kemik nodüllerinin de oluşumuna katkı sağladığını göstermişlerdir. Kimi yazarlar da inhibitör etki ortaya koyduğunu bulmuşlardır. Bu zıtlıklara rağmen, osteoblastik aktivitenin NO üretimini artırıyor gibi gözüken fizyolojik süreçler vardır.[8] Buna ek olarak kemik hasarlarının iyileşmesine katkı sağlayan NO'in osteoblast, osteoklast ve osteositler üzerine pozitif etkileri olduğu ve osteoblast metabolizmasında önemli düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir.[5]

NO'in kardiyovasküler bağışıklık ve merkezi sinir sistemini de içeren birçok fizyolojik alanda efektör bir molekül olarak önemli role sahip olduğu ortaya konulmuştur.[8] Kırılmış kemiklerin iyileşmesi için yüksek aktivite göstermesinde gerekli olan NO'in kaynağı, kemik çevresinde düz kas hücreleri, iskelet kası hücreleri, nötrofiller, makrofaj/histiosit türü hücreler ve kondrositler olabilir.[5]

Daha önce yapılan çalışmalarda FDE-5 inhibitörlerinin cGMP ve PKG üzerinden vasküler tonu artırmada, kardiyovasküler düzenlemede etkili olduğu[8] ve yine FDE-5 inhibitörlerinden sildenafil'in pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde yararlı etkilerinin olduğu saptanmıştır.[10] Şekil 1.2'de endotel düz kas hücrelerinde FDE-5 izoenziminin fosfodiesteraz-5 inhibitörleri (FDE-Is) tarafından hücre içi sinyal düzenleme mekanizması görülmektedir.



Şekil 1.2. Endotel düz kas hücrelerinde FDE-5'in fosfodiesteraz izoenzim inhibitörleri (FDE-Is) tarafından regülasyonu.[7]
"sGC: Çözünebilir guanilat siklaz, NO: Nitrik oksit, NTG: Nitrogliserin, NPR: Natriüretik peptid reseptör, rGC: Guanilat siklaz reseptörü, PKG: Protein kinaz G, MLCK: Miyozin hafif zincir kinaz, BK: K_{Ca} kanalı, RhoA: Rho kinaz ve RSG2'yi regüle eder, AT1: Anjiyotensin reseptörü, ET1: Endotelin reseptörü, α-AR: Alfa adrenerjik reseptör, TRPC: Geçişli reseptör potansiyel kanalı"

FDE-5'in, NO'in hücre içi etkilerine aracılık eden cGMP ve cAMP'yi hidroliz etmektedir. Bu sebeple avanafil, zaprinast, sildenafil, vardenafil, tadalafil ve udalafil gibi FDE-5 inhibitörlerinin, cAMP ve cGMP konsantrasyonunu ve aktivitesini koruması yoluyla, NO sinyal yolu üzerinden osteoblast hücrelerinin olgunlaşarak osteoklastlara dönüşmesinde etkili olabileceği ve kemik kalsifikasyonuna pozitif katkı yapabileceği ile ilgili görüşler bulunmaktadır.[8] Bu bilimsel görüşlerden ve bulgulardan yararlanarak FDE-5 inhibitörlerinden olan avanafil[11] ve zaprinast[12]'ın da kemik kalsifikasyonuna pozitif etki yapabileceğini söyleyebiliriz.

Yapılan çalışmaya benzer bir çalışma, Yaman ve ark. tarafından yapılmıştır. Yaman ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada, anestezi altında 3 mm uzunluk, 3 mm genişlik ve 2 mm derinliğinde cerrahi olarak kemik hasarı oluşturulan FDE-5 inhibitörlerinden sildenafil sitrat'ın kemik iyileşmesine olumlu katkı yaptığını ortaya koyuşlardır.[4] Bu bilgiler ışığında, OP oluşturulmuş deney hayvanlarında avanafil ve

zaprinast gibi FDE-5 inhibitörlerinin[11,12] NO metabolik yolu üzerinden (cGMP yolu) hasarlı kemik çevresinde vasküler tonu ve kan akışını hızlandırarak, OP'lu hastaların kemik mineralizasyonunun hızlanmasına ve hastalığın daha kısa sürede iyileşmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Yapılacak bu çalışmada, OP oluşturulmuş ratlarda FDE-5 izoenziminin, FDE-5 inhibitörlerinden olan avanafil ve zaprinast ilaçları ile inhibe ederek NO'in hücre içi etkilerine aracılık eden cGMP ve PKG fonksiyonunun artırılması aracılığıyla kemik oluşumu üzerine etkisinin nasıl olacağının belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda erkek ratlarda glukokortikoid (GC) indüklemesi yöntemiyle oluşturulan OP ile dişi ratlarda overektomi ile akut östrojen eksikliğine bağlı olarak oluşturulan OP'da karşılaştırmalı olarak avanafil ve zaprinast'ın etkisi ile ilgili nasıl bir durumun ortaya çıkacağı gözden geçirilecektir. Ayrıca yapılan literatür taramasında, FDE-5 inhibitörlerinden avanafil ve zaprinast'ın, OP'un önlenmesi ve tedavisi sürecinde OP ile ilgili biyokimyasal ve diğer parametrelerin değişimiyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, dişi sıçanlarda overektomi ve tedavi öncesi ile sonrasında, erkek sıçanlarda DEX verilmeden önce ve sonra tüm gruplarda kemik mineral yoğunluğu (KMY) ile metabolik kafeste alınan idrarlarda piridinolin (PD) ve deoksipiridinolin (DPD) değerlerinin ölçülmesi planlanmıştır. Ayrıca hem dişi hem erkek sıçanlarda inhibitör uygulama sonrası anestezi altında alınan kemik doku örneklerinde histopatolojik değerlendirmelerin yanısıra intrakardiyak olarak alınan kan örneklerinde de FDE-5, PKG aktiviteleri, kemik yıkım yapım göstergeleri olan c-terminal kollajen peptid (CTCP), c-terminal prokollajen peptid (PICP) ve NO ile cGMP düzeyleri ölçülecektir. Bununla birlikte NO'in sentezini sağlayan NOS izoenzimlerinden eNOS aktivitesi tespit edilerek, OP'da NO'nun artışı ya da azalışına bir açıklık getirilmiş olunacaktır. Ayrıca

erkek rat gruplarında plazma kortizol düzeyleri ve overektomi ile osteoporoz oluşturulan dişi gruplarda da östrojen seviyesi de ölçülecektir.

NO, yararlı etkilerinin yanısıra peroksinitrit (ONOO-) radikallleri gibi bazı reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşmasına yol açarak oksidatif strese sebep olduğu bilinmektedir.[13] PDE izoenzim inhibitörleri olan avanafil ve zaprinast'ın, NO'in metabolik yolu üzerine etki etmesi sebebiyle OP oluşturulmuş ratlarda NO seviyesi ve oksidatif stres üzerine nasıl bir etki oluşturacağı da merak konusudur. Bu amaçla; bütün gruplarda oksidatif stresin göstergesi ve lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, oksidatif DNA hasar göstergesi 8-OHdG/10^6dG ve mitokondri hasar göstergesi okside CoQ10/redükte CoQ10 analizleri yapılarak da NO'in etkinliğinin artırılmasının oksidatif hasar üzerine etkisi de incelenmiş olunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Bir dizi hormon, fizyolojik ihtiyaç ve dış uyarana karşı cevap veren kemik dokusu yaşayan, dinamik ve canlı bir dokudur.[14] Kemik doku genel anlamda hücreler ve ekstrasellüler matriks olmak üzere iki ana bileşenden meydana gelmiştir. Kemiğin yapısındaki matriks, organik ve inorganik maddelerden oluşur. Organik matriksin yaklaşık %90'ını protein kökenli kollagen, diğer kısmını ise proteoglikanlar, ALP, osteonektin gibi glikoproteinler ile osteokalsin gibi gama karboksi glutamat içeren proteinler oluşturur. Tümüne birden osein adı verilen bu proteinler, kemik matriksine esneklik kazandırırlar. İnorganik matriks'in çoğu kalsiyum (Ca) olmak üzere fosfor (P), magnezyum (Mg), florür (F) gibi minerallerden meydana gelmiştir. Vücudumuzdaki total kalsiyumun yaklaşık %98'i, fosforun %75'i kemiklerde depolanır ve ihtiyaç halinde reabsorbe edilir. Diğer kemik ana bileşeni olan hücreler ise osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik yüzey hücreleri olmak üzere 4 sınıfa ayrılmıştır.[15]

2.2. Kemik Hücreleri

Kemik dokusunda mekanik, manyetik, kimyasal veya elektriksel kaynaklı meydana gelen cevaplar ve metabolik olaylar, özgünleşmiş kemik hücrelerinde bulunan membran veya hücre içi reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Kemik dokusunun yapısında bulunan bu özgünleşmiş hücreler osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve kemik yüzey hücreleridir.[16]

Osteoblastlar: Osteoblastlar kemik ara maddesinin yapımını ve mineralizasyonunu sağlayan ve asıl kemik hücreleri sayılan osteositlerin oluşumunda fonksiyon icra eden genç kemik hücreleridir.[15] Nükleer faktör kappa B ligandı (RANK-

L) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) osteoblast farklılaşmasında en önemli faktörlerdendir.[17,18] Osteoblastlar üzerinde paratroid hormon (PTH), paratroid hormon reseptör (PTHrP), östrojen, androjen, progestin, glukokortikoid, 1,25$(OH)_2$vitD (Vit D_3), prostanoidler, IGF-1, IGF-2, TGF-β, TNF-α, IL-1, 3, 4, 8, 11, endotelin ve nitrik oksit reseptörleri yer almaktadır.[19]

Osteoblastlar yaklaşık 20-30 μm çapında, kübik, büyük oval çekirdekli ve çok sayıda çekirdekçik içeren genç kemik hücreleridir. Erişkin yaşamda kemik iliğinde bulunan *pluripotent* ana hücreden gelişir.[15] Osteoblastlar;

• Başta kollagen olmak üzere tüm kemik matriksi elemanlarının sentezi, organizasyonu ve mineralizasyonunun sağlanması,

• Kemiğin yeniden yapılanmasını kontrol eden lokal ve sistemik faktörlere ait reseptörleri aracılığı ile kendilerine gelen uyarıyı algılayıp, hücresel iletim mekanizması ile uyarının diğer hücrelere aktarımının sağlanmasını gerçekleştirme,

• Osteoklastların kemik iliğinde oluşumu ve PTH tarafından aktivasyonunda görev yapma,

gibi fonksiyonları vardır.[15]

Olgunlaşan osteoblastların bir kısmı (yaklaşık %35) yüzey hücresi veya osteosite dönüşürken, geriye kalanlar da (yaklaşık %65) programlanmış hücre ölümüne (*apoptozis*) uğrarlar.[15]

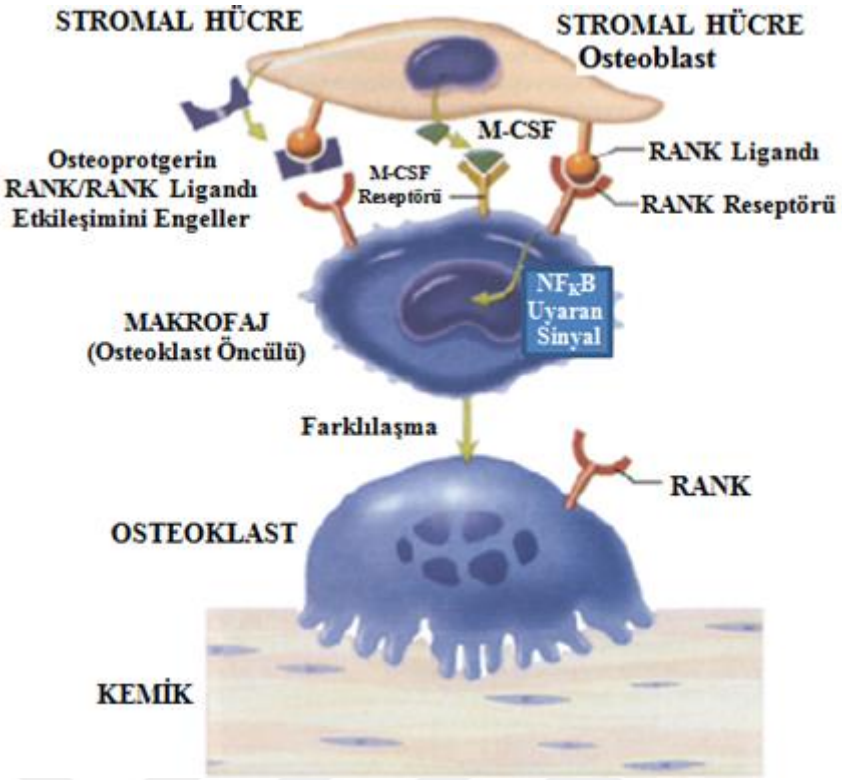
Osteositler: Bölünme yeteneğini kaybetmiş olgun osteoblastlar, osteositlere dönüşürler. Sert ve sünger kemik dokusunun asıl hücreleri osteositlerdir.[15] Aynı zamanda kanaliküller içindeki diğer hücresel uzantıları aracılığıyla osteoblastlar ve yüzey hücreleri ile ilişkileri olan matriks içine gömülü hücrelerdir.[16] Osteotik osteoliz, kemik yapımı ve mekanik uyarıyı algılayarak yanıt verme en önemli görevlerindendir.[16]

Osteoklastlar: Osteoklast hücreleri kan hücrelerinden monosit ve makrofajların birkaçının birleşmesiyle oluşan çok çekirdekli hücrelerdir.[15,20] Ayrıca osteoklastlar hematopoetik kök/öncül (ata) hücrelerden (HSPCs) farklılaşan somatik hücrelerdir.[22] Kendi serisinden monosit ve makrofajlardan da meydana gelebilir. Osteoklastlar kemik mineralini çözerek kemik matriksini dağıtan ve kemik yıkımını gerçekleştiren hücrelerdir.[15,16]

Osteoklastlar trabeküler kemik yüzeyinde gruplar halinde *howship* lakünaları meydana getirirken, kortikal kemik içinde tünel şeklinde *hawersian* kanalları oluşturur. Osteoklastların yaşam süresi yaklaşık 3-4 hafta kadardır ve bir dizi programlanmış hücre ölümü sinyal yolu ile apoptoza uğrarlar (Şekil 2.1) .[16]

Bu hücreler önemli işlevsel özellikleri olan iki farlı yapısal alan içerir. Bu alanlar fırçamsı kenar ve çekirdeksiz stoplazmik bölgedir. Fırçamsı kenar kemik yüzeyindeki yıkım bölgesi ile osteoklastlar arasında etkileşimi sağlayan ve pek çok stoplazmik uzantılar içeren kıvrımlı membran yapısıdır. Organelsiz stoplazmik kısım ise frıçamsı kenarı çevreleyen ve kontraktil proteinlerce zengin olan bir alandır. Burada bulunan mikroflamanların organize olması ile meydana gelen prodozom adlı yapılar, osteoklastlara hareket özelliği kazandırır.[16] Osteoklast oluşumu ve işlevini düzenleyen moleküler mekanizmalar Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Osteoklastların kemik erimesi ile ilgili mekanizmada aktive osteoklast, integrinler (transmembran adhezyon reseptöleri) aracılığıyla kemik yüzeyine yapışır ve fırçamsı kenar ile çekirdeksiz stoplazmik bölgeyi meydana getirir. Fırçamsı kenardaki H^+-ATPaz pompası ile H^+ iyonları salgılanarak asidik ortam (düşük pH) oluşturulurken diğer taraftan salgılanan kollagenaz ve lizozomal sistein proteinazlar (katepsin K) gibi hidrolitik enzimler vasıtasıyla kemik yıkımı gerçekleştirilir.[22]



Şekil 2.1. Osteoklast oluşumu ve işlevini düzenleyen moleküler mekanizmalar.[16]

2.2.1. Kemik hücrelerini etkileyen sistemik ve lokal etkenler

Paratroid hormon: Plazma Ca düzeyi düştüğünde seviyesi artar. Kemik döngüsünü hızlandırır. Kortikal kemikte daha belirgin olmakla beraber osteoklastik aktiviteyi artırarak kemiklerden kalsiyum mobilizasyonunu sağlar. Menapoz sonrası OP tedavisinde 1-34 PTH fragmanı aralıklı olarak verildiğinde trabeküler kemik sayısının artışına bağlı olarak trabeküler kemik kütlesi artar. Renal Ca geri emilimini ve kalsitriol sentezini artırır.[16]

Kalsitriol (1,25 $(OH)_2$ vit D): Kemiklerden Ca mobilizasyonunu artırır. Barsaklardan Ca ve P emilimini artırarak kemik mineralizasyonuna pozitif katkı sağlar.[16]

Kalsitonin: Plazma Ca seviyesi azaldığında salınır ve kemik mineralizasyonunu artırır. Farmakolojik dozlarda osteoklast aktivitesi ve kemik yıkımını baskılar.[16]

Büyüme hormonu (GRH) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF): İskeletin gelişmesinde, özellikle de büyüme plağı (epifizeal kemik) yüzeyinde ve enkondral kemik gelişiminde önemli olduğu ifade edilmektedir.[16]

Cinsiyet hormonları: Cinsiyet hormonlarında östrojen osteoblast ve osteoklastlarda bulunan reseptörleri aracılığıyla kemik döngüsünü ve kemik yıkım hızını azaltır. Osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu sağlayan osteoblastik faktörlerin sentez ve salgılanmasını azaltır. Osteoklast apoptozunu artırarak sayılarını azaltır. Böbreklerin PTH'a duyarlılığını azaltarak Ca geri emiliminde azalmaya ve barsakların aktif Vit. D_3'ye duyarlılığını azaltarak Ca emiliminin azalmasına yol açar. Vit. D ve PTH sentezini baskılayarak serum düzeylerinin düşmesine yol açar. Kemiğin PTH'a duyarlılığını artırır.[16]

Troid hormonları: Fizyolojik düzeyleri kemiğin sağlıklı gelişimi için gerekli olmakla birlikte farmakolojik dozları (hipertroidi) kemik döngüsünü hızlandırarak kortikal kemik porozitesini artırır. Kortikal kemikte daha belirgin olmakla birlikte trabeküler kemik kütlesinde da azalmaya yol açar.[16]

Ayrıca troid hormonu, yeniden yapılanma ve ünite sayısı ile aktivasyonunu artırır. Osteoklastik aktiviteyi artırarak yıkımı hızlandırırken, osteoblastik aktiviteyi artırarak kemiğin yapımını da artırır. Ancak yıkım hızı yapım hızından daha fazla olduğu için her bir ünitede kemik dengesi negatifdir. Ayrıca yeniden yapılanma ünite sayısının artması bu etkiyi daha belirgin hale getirmektedir. Kemik, böbrek ve barsak üzerine etkileri sonucu vücut Ca dengesi negatifdir.[16]

Glukokortikoidler: Fizyolojik olarak osteoblast farklılaşmasında rol alır. *İn vivo* olarak fazlalığı (Cushing Sendromu v.b) veya farmakolojik olarak kullanımı osteoklastogenezi artırarak kemik yıkımını hızlandırırken, daha sonraki dönemlerde de

ostaoblast sayı ve aktivitesini düşürerek kemik yapım hızını azaltır. Sonuç olarak trabeküler kemikte daha belirgin olmak üzere diffüz kemik kaybı meydana gelir.[16]

Diğerleri: Yukarıda ifade edilenlerin dışında bazı stokinler (IL 1, 4, 6, 7, 11, 13, 18, TNF-α, LIF, γ-INF), FGF, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), prostaglandin (Pg), lökotrien (LT), NO, TGF-β, BMP kemik hücrelerine etki eden diğer faktörlerdir.[16]

2.3. Kemik Dokusunun Makro ve Mikro Yapısı

2.3.1.Makroskobik yapı

Makroskobik olarak iki çeşit kemik yapısı ile karşılaşılmaktadır. Bunlar; Dış kısımda kılıf benzeri kortikal kemik, iç kısımda üç boyutlu trabeküler ağın meydana getirdiği trabeküler kemiktir. Bu düzeydeki yapılanma en az ağırlıkla en fazla mekanik işlevin gerçekleştirilmesini sağlar.[16]

Trabeküler kemik: Birbiriyle bağlantılı plaklar şeklinde üç boyutlu dantel görüntüsüne benzer bir yapısal oluşum içerir. Geniş yüzey alanına sahip olması nedeniyle yüksek metabolik aktiviteye sahiptir. Kemiğe gelen basınçsal yüklere karşı kemiğin dayanma gücünü artırır. En fazla uzun kemiklerin uç kısımları ve vertebralarda bulunur.[16]

Kortikal kemik: Basınçsal yüklerin yanında eğilme ve torsiyonel güçlere karşı kemiği korur. Diyafizde kalındır ve kemik iliğinin bulunduğu boşluğu çevreler. Metafiz ve epifize doğru giderek incelir ve burada kemiğin içini ince ve kalsifiye trabekülaların oluşturduğu trabeküler kemik doldurur.

Kemik dokuda iç (periostal) ve dış (endosteal) yüzey olmak üzere iki yüzey alanı mevcuttur. Organize kemik hücreleri bu yüzeylerde *periatium* ve *endostium*

katmanlarını meydana getirir. Kemiğin dış yüzeyini oluşturan periost iki katmanlıdır. İç katmanı olan kambium olarak da adlandırılan bölüm kondrosit ve osteoblast öncülü olan fibroplast benzeri hücrelerden meydana gelmiştir. Bu katmanın kemiğin gelişme döneminde, kemiğin büyümesinde ve ileriki yaşlarda kemik çapınının artmasında rol oynadığı bildirilmiştir. Dış kısımdaki fibröz katman, kas ve diğer yumuşak doku hücreleri ile bağlantılıdır ve farklılaşmış fibroplast benzeri hücreleri içerir.[16]

2.3.2. Mikroskobik yapı

Mikroskobik olarak iki farklı kemik yapısı ile karşılaşılmaktadır.

Lameller: Kolajen liflerinin biribirine paralel ve düzenli dizilmesiyle oluşmuş erişkin döneme özgü katmanlar şeklindeki kemik yapısıdır.

Woven kemik: Kollajen liflerinin biribirinden ayrık ve düzensiz bir şekilde dizilimiyle oluşan embriyonik yaşam ve büyüme dönemine özgü kemik yapısıdır. Lokal bölgelerde kalsifikasyon meydana gelir. Yeniden yapılanma süreci sonunda, erişkin döneme özgü lameller kemiğe dönüşür. Woven kemikler sağlıklı erişkin kişide bulunmaz. Ancak paget hastalığı, fibrozis ve kırıkların iyileşme dönemi gibi patolojik şartlarda oluşabilir.[16]

2.4. Kemiğin Yeniden Yapılanması

Kemik doku bir taraftan demineralizasyon (emilim)'a uğrarken, diğer taraftan yıkılan kemik dokunun yerine sürekli yenisi yapılmaktadır. 30-40 yaşlarında orta yaşlı bir bireyin sünger kemik dokusunun bir yılda yaklaşık %25'i, sert kemik dokusunun ise yaklaşık %3'ü yenilenmektedir. Kemik dokunun sürekli bu şekilde yapım ve yıkım mekanizmasının bütününe kemik turnover'i veya *remodeling* mekanizması adı verilir.[23]

Yeniden yapılanma, uterusta başlayıp yaşam boyunca sürekli devam eden bir süreçtir.[24,25] Kemiğin yeniden oluşumu, kemiği oluşturan osteoblastlar ve kemik erimesi ile ilgili osteoklastlar arasındaki denge için gereklidir.[26-28] Bu dengenin bozulması halinde klinik olarak kırık riskinde artışa sebep olan düşük kemik yoğunluğu, patolojik olarak da osteoklastik kemik erimesini artıran KMY azalmayla karakterize olan OP meydana gelir.[28-30]

Yeniden yapılanma işlemi iskelet olgunlaşması tamamlandıktan sonra endosteal kemik yüzeyinde, kemik hücerelerince gerçekleştirilen kemiğin yıkımı ve yeniden yapımıdır. Yapılanma iki çeşittir:

1. Hawersian tip yeniden yapılanma (Kortikal kemikte)
2. Endosteal tip yeniden yapılanma (Trabeküler kemik yüzeyi boyunca)

Kemik döngüsünün dinamik birimi yeniden yapılanma ünitesi (BRU)'dir. BRU'daki hücresel olayların tamamlanması kemik yapısal ünitenin (BSU) oluşmasına sebep olur. BSU kortikal kemikte sekonder osteon veya silindirik şekil hawersian sistemi, trabeküler kemikte yassı şekildedir.[16]

Kemiğin yeniden yapılanma döngüsünün süresi yaklaşık üç aydır. Bu siklus aktivasyon, yıkım (3 gün), dönüş (14 gün), yapım (70 gün) ve dinlenme olmak üzere 5 aşamadan meydana gelir.[16]

Kemik dokuda trabeküler kemik, iskeletin %20'sini oluşturmasına rağmen kemik döngüsünün yaklaşık %80'ine, kortikal kemik ise iskeletin %80'ini oluşturmasına rağmen kemik döngüsünün yaklaşık %20'sine katkıda bulunur. Bu sebepten ötürü kemik döngüsünün anormalliği sonucu ortaya çıkan OP, ilk önce ve yoğun olarak trabeküler kemikte gözlenmektedir.[24,25]

Yeniden yapılanma hızı (KDH) total kemiğin yılda yaklaşık 2 ile 10 (%) aralığında bir hacimde gerçekleşmektedir. KDH troid hormon, paratroid hormon, aktif vitamin D ve GH tarafından artarken, östrojen ve glukokortikoidler (GCs) tarafından azalır. Büyüme dönemi ve genç erişkin kişilerde kemikte yeniden yapılanma işlemi sonucunda oluşan kemik, yıkımdan daha fazla olduğu için kemik dengesi pozitiftir. Sağlıklı ve erişkin kişilerde kemikte yeniden yapılanma sürecinde belirgin bir güç kaybı meydana gelmez. Ancak anormal kemik döngüsü durumlarında çeşitli sebeplerle kemik minaral kaybı söz konusu olur.[16]

2.5. Kemik Döngüsünün Biyokimyasal Belirteçleri

Kemik oluşumunun göstergeleri aktif osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Bunlar arasında prokollagen Tip I propeptidler (PICP, PINP), osteokalsin ve kemiğe spesifik ALP proteinleri yer almaktadır.[31]

Prokollagen tip I propeptidler (PICP, PINP): Tip I kollagen kemik organik matriksinin yaklaşık %90'ını oluşturur. Kollagen sentezinde fibrillerin oluşmadığı dönem içinde, prokollagen peptidlerin C ve N terminalleri yeni oluşmakta olan molekülden ayrılarak dolaşıma geçer. Bu peptidler karboksiterminal (PICP) ve aminoterminal (PINP) olarak bilinir ve yeni kollagen sentezinin bir göstergesi olarak kabul edilir.[31]

Osteokalsin (kemik GLA proteini): Öncelikli olarak osteoblastlar tarafından sentezlenen nonkollagenöz bir proteindir. Kemik döngüsünün arttığı dönemlerde serum osteokalsin düzeyleri yükselmektedir. Yaş ve diürnal değişime göre serum düzeyleri değişmektedir. Ayrıca dolaşımda çabuk metabolize olur. Primer hiperparatroidi, renal osteodistrofi, puberte ve kemik metastazlarında serum osteokalsin düzeyleri artar. Ostekalsin OP'dan ziyade tedavinin takibi amacıyla ölçülür.[31]

ALP: ALP'nin osteoblast, böbrek, karaciğer ve plasenta kaynaklı izoenzimleri mevcuttur. Sağlıklı ve karaciğer fonksiyonları normal olan kişilerde serum ALP düzeylerinin yaklaşık %50'sini kemik kaynaklı ALP temsil eder. Kemiğe spesifik ALP, osteoblastların membranlarında lökalizedir ve osteoblast fonksiyonu, kemik yapımı ve mineralizasyonunu gösteren bir belirteçtir. Menapoz sonrası kemik döngüsündeki artışa bağlı olarak ALP normal düzeylerinin iki katına kadar çıkabilir. Kemik metastazları, osteomalazi, paget hastalığı, primer hiperparatroidi ve osteoporoz gibi durumlarda serum ALP düzeyleri artmaktadır.[31]

Kemik yıkımının biyokimyasal belirteçleri osteoklastik aktivite ile kollagen yıkım ürünlerinin ölçülmesi ile belirlenmektedir. Bu yıkım ürünleri;

PD ve DPD: PD ve DPD kemiğin yapısındaki Tip I kollagen liflerinin yapısında bulunur. PD kemik ve kıkırdak kollageninde bulunurken, DPD ise sadece kemikte bulunur. PD ve DPD'in idrardaki yüksek seviyeleri kemik rezorpsiyonunun arttığını göstermektedir.[31]

Hidroksiprolin (OHP): Prolin aminoasidinin prolil hidroksilaz enzimiyle hidroksillenmesi sonucu meydana gelen ve kemik dokusunda kollagenin yapısında çapraz hidrojen bağlarının oluşumu ile kemiğe sağlamlık kazandıran bir kalıntıdır. Hidroksiprolin kollagen yıkımıyla serbest hale geçerek dolaşıma katılır. Yaklaşık %90'ı karaciğerde metabolize olurken %10'u idrarla atılır. Kemik yıkımında idrar OHP değerleri yüksektir. Ancak diyetteki hayvansal proteinler ve akut enfeksiyonlara bağlı olarak serum ve idrar düzeylerinin yükselmesinden dolayı özgünlüğü düşüktür.[31]

Tartrat rezistan asit fosfataz (TRAP): Kemik, dalak, prostat, trombosit ve eritrosit'de bulunan lizozomal bir enzimdir. Plazma TRAP düzeyi osteoklastik aktiviteyi ve kemik yıkımını gösterir. Ancak duyarlılık ve özgünlüğü düşük olan bir

parametredir.[31] Tablo 2.1'de serum ve idrarda biyokimyasal olarak kemik yapım ve yıkım belirteçleri toplu halde gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Serum ve idrarda biyokimyasal kemik yapım ve yıkım belirteçleri.[31]

Numune	Kemik Yapım Belirteçleri	Kemik Yıkım Belirteçleri
Serum	-Kemik ALP (B-ALP) -Total ALP -Kemik Gla Protein -Prokollagen Tip I N Terminal -Peptid (PINP) -Prokollagen Tip I C Terminal -Peptid (PICP)	-Tartrat rezistan fofataz (TRAP) -Serbest piridinolin/deoksipiridinolin -Kemik sialoprotein (BSP) -N-terminal telopeptid çapraz bağları (S-NTX) -C-terminal telopeptid çapraz bağları (S-CTX)
İdrar		-Hidroksiprolin ve glikozidleri -Serbest piridinolin/deoksipiridinolin -N-terminal telopeptid çapraz bağları (U-NTX) -C-terminal telopeptid çapraz bağları (U-CTX) -Kalsiyum

Kemik yapım ve yıkımındaki biyokimyasal belirteçler osteoporoz tanısında birincil öneme sahip olmasa da, tedavide kullanılan antiresorptif ilaçların etkinliğini ve KMY'ndaki değişiklikleri, radyografik ölçümler için uzun süreler beklemeden izleme olanağı sağlar. Ayrıca KMY ile karar verilemeyen kırık riski hakkında önemli ipuçları sağlar. Delmas ve ark. (2000) bu testlerin yüksek olduğu kişilerde kırık riskinin iki kat daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.[32] Ancak bu belirteçler değerlendirilirken serum ve idrar düzeylerini etkileyebilecek yaş, cinsiyet, genetik ırk, böbrek fonksiyonları, laktasyon, immobilite, diürnal ritm, mevsimsel değişiklikler, diyet egzersiz, ilaç ve kırık varlığı gibi durumlar göz önüne alınmalıdır.[33,34]

2.6. Kemik Kalitesi Ölçüm Paremetreleri

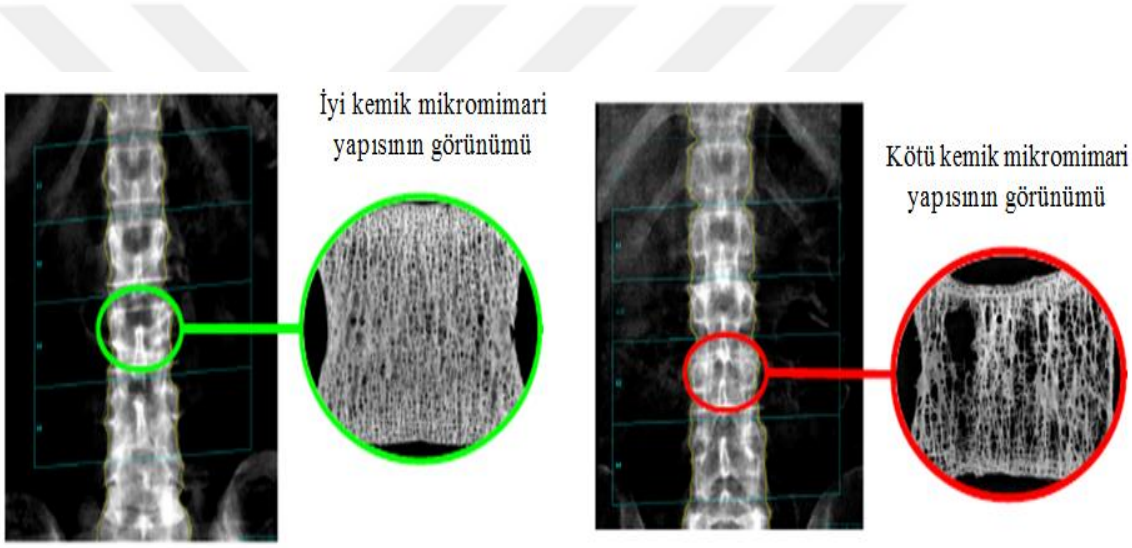
Kemik kalitesi günümüzde klinik durumlarda tam olarak ölçülememektedir. Fakat Kemik kalitesi, kemiğin makro ve mikromimari yapısına, geometrisine, mineralizasyonuna, mikrohasar derecesine, kollajen ve mineral matriksin özelliklerine bağlıdır.[35,36] Bu parametreler vertebral kemiğin kırığa direnci ile korele olan göstergelerdir. Günümüzde dual enerji X-ray absorptiometri (DEXA), ve dansitometre ile KMY ölçümü kemik kalitesinin ölçümünde sıklıkla kullanılan yöntemlerdir.

2.7. OP ve Tarihçesi

OP en sık görülen kemik hastalığıdır. İlk olarak 1929 yılında Jean Geroges Lobstein tarafından "*porous bone*" (gözenekli kemik), daha sonra 1948'de Albright tarafından "*too litle bone in bone*" (kemik içinde çok az kemik) diye tanımlanan çeşitli OP tanımlamaları yapılmıştır. OP'un kelime anlamı basitçe delikli kemik olup birim hacim başına düşen kemik kütlesinde veya yoğunluğunda azalma olarak da tanımlanabilir. Ayrıca dünya sağlık örgütü (DSÖ) OP'u düşük kemik kalitesi ve kemik dokusunun mikromimari yapısının bozulması sonucu, kemik kırılganlığında ve kırıklarda artma ile karakterize olan sistemik bir iskelet hastalığıdır şeklinde tanımlamaktadır.[16] OP en yaygın olan ve yılda yaklaşık sedece Amerikada 34 milyon dolar maliyeti ile karşımıza çıkan kemik hastalıklarından biridir. Amerikada 50 yaşın üzerinde yaklaşık 10 milyon civarında kişiyi etkileyen bu hastalık ile ilgili olarak, 34 milyon kişinin risk altında olduğu düşünülmektedir. Dünyada her yıl 9 milyon OP ile ilişkili kırıkların meydana geldiği tahmin edilmektedir. 50 yaşındaki kadınların yaklaşık %10'u zaten OP ile ilişkili kırık ile karşı karşıya kalmaktadır. Ayrıca erkekler de yaygın bir şekilde OP'dan etkilenmektedir. Kalça ve omurga kırıklarına artan meyil ile hastalıklar artmakta ve bazı durumlarda ölüm artışı ile ilişkili olabilmektedir.[37]

KMY kemik direncinin yaklaşık %60-90'ından sorumlu olan bir faktördür. Osteoporetik kemikler dış görünüşü itibariyle normal kemikler ile aynı boy ve görünüme sahip olmasına rağmen, içte daha kırılgan ince kortikal kemik tabakasına ve trabeküler kemik kaybına sahiptirler. Osteoporetik kemiklerde KMY düşüktür. KMY azaldıkça kemik zayıflar ve kırılganlık risk artışına olan eğilimi yükselir.[38]

DEXA tarafından KMY ölçümü, klinik olarak osteoporozis'in teşhisi için temel veri oluşturmaktadır.[37] Şekil 2.2'de KMY yoğunluğu ölçülerek normal ve osteoporetik kemiğe ait resimler görülmektedir.



Şekil 2.2. Normal ve osteoporetik kemik dokusuna ait KMY görüntüleri.

DSÖ 1994 yılında postmenapozal kadınlarda DEXA tanılama yöntemini kullanarak KMY'nu ölçmüş ve normal kişiler ile hastaların KMY değerlerinin tepe noktasını karşılaştırmıştır. Bu son tanımlamaya göre, OP tanısı için kırıkların meydana gelmesinin şart olmadığı ve tanı koyabilmek için, DEXA yöntemi ve KMY ölçümü sonucunun tanı koymada rahatlıkla kullanılabileceği ifade edilmiştir.[39,40] Tablo 2.22de DSÖ'nün OP'u tanılama kriterleri ve T skorları görülmektedir.

Tablo 2.2. DSÖ'nün OP'u tanımlama kriterleri.[16]

Tanımlama	T-Skoru
Normal Kemik	>-1 SD
Osteopeni	1-2,5 SD
Preklinik osteoporoz	<-2,5 SD
Şiddetli (yerleşmiş) osteoporoz	<-2,5 SD ve ≥1 frajilite kırığının bulunması

2.8. OP Gelişiminde Risk Faktörleri

OP gelişiminde düşük kemik yoğunluğu, genetik yatkınlık, düşük vücut kitle indeksi, immobilizasyon, östrojen eksikliği, kronik hastalıklar, besinsel eksiklikler, yaşlanma ve glukokortikoid (GC) ve diğer ilaçlar ile muamele gibi çeşitli değiştirilemeyen ve değiştirilebilir risk faktörleri tanımlanmıştır.[20,36]

2.8.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri

Irk: Genel olarak Amerika-Afrika'lı kadınlar beyaz kadınlara göre yüksek kemik kütlesine sahiptirler ve yaşa bağlı olarak kemik kütlesi kaybına daha dirençlidirler. Bu sebeple afrikalı kadınlar beyaz kadınlara göre daha düşük kemik kırığı riskine sahiptirler.[41,42]

Yaş ve cinsiyet: Gelişme çağında kemiğin yapım hızı yıkım hızından fazla olduğu için 20'li yaşlara kadar kemik kütlesi artmakta ve DKK'ya ulaşılmaktadır. DKK 40 yaş civarlarına kadar korunmakta ve kemik yapım hızı ile yıkım hızı dengede olmaktadır. 40'lı yaşlardan sonra kemik rezorpsiyonu arttığından fizyolojik kemik kütlesinde kayıplar başlamakta ve yılda yaklaşık %0,5-1 oranında kayıplar meydana gelmektedir.[43] İlerleyen yaşlarda bu oran daha da yükselmeye başlamaktadır.

DKK'da cinse bağlı farklılık, kortikal kalınlık ve çap ile ilişkilidir. Yaş artışı ile birlikte kortikal kemik kaybı erkeklerde doğrusal bir artış gösterirken kadınlarda

menapoz sonrası daha hızlı olmaktadır. Trabeküler kemik kayıp hızı her iki cinste neredeyse aynıdır. Erkeklerde trabeküler kemik kaybı olmadan trabeküler incelme meydana gelirken, kadınlarda hem trabeküler kayıp hemde trabeküler incelme söz konusu olmaktadır.[41,44]

Genetik faktörler: KMY'ndaki değişkenliğin yaklaşık %80'inden sorumludur. Kadınların yaşamları boyunca karşılaşacakları DKK pikini ve gelecekteki kemik kaybı oranını belirlemede önemli rol oynar.[41,45] Tablo 2.3'de görüldüğü gibi OP'da birçok genin sorumlu olduğu ifade edilmektedir. Bu genlerin birbirleri ve çevre faktörleri ile etkileşimleri, KMY ve OP riskinin en önemli belirleyicileri arasında yer alır.

Tablo 2.3. OP riskini belirlemede etkili olan genler.[16]

-Vit. D reseptör (VDR) geni	-Kalsiyuma duyarlı reseptör (CaSR) genindeki metilen tetrahidrofolat redüktaz geni
-Apolipoprotein E (Apo E) geni	-Runt-Related gen 2 (RUNX2)/Core binding Faktör a1(CBFA1)'in DNA polimorfizmi
-Östrojen reseptör (ER) geni	-Vit D bağlayıcı protein (DBP) geni
-Osteokalsin geni	-Stokin genleri ve kemik hücre fonksiyonlarını regüle eden faktörlerin genleri
-Osteoprotogerin (OPG) geni	-Transforme edici büyüme faktörü (TGF) b-1 Geni
Kalsitonin ve PTH reseptör geni	-Kollagen Tip 1 a-1 (COL1A1) geni

Gebelik ve emzirme: Gebelik ve emzirme döneminde mineral ihtiyacı arttığından KMY'unda kısa süreli bir azalma olur. Ancak gebelik ve emzirme süresinin sonunda normale döner. Gebelik döneminde artan kemik rezorpsiyonu ve sütle atılan Ca kaybı, besinler veya diğer materyaller ile yeterli oranda desteklenemez ise negatif Ca kaybı meydana gelir. Ancak yine de bu iki fizyolojik durum ileriki yıllarda oluşabilecek OP riskini pek etkilemez.[42,45]

Jinekolojik profil ile ilgili faktörler: Menapoz sonrası OP oluşumundaki başlıca patojen faktördür. Menapoz ile ortaya çıkan gonadal yetersizliğe bağlı olarak gelişen östrojen eksikliği, kadınlardaki hızlı kemik kaybından sorumlu en önemli faktördür. HPT almayan postmenapozal kadınlar, kemik dokularının her yıl %3-5 kadarını kaybederler. Bu kayıp menapoz sonrası ilk 5-10 yıl çok hızlıdır ve femur boynunda yaşam boyu oluşan kaybın %20'den fazlasını oluşturur.[46,47]

Cerrahi menapoz, erken menapoz, geç menarş, gonadal disgenezi olgularında hastaların östrojensiz hayat süresi uzun olduğu için OP açısından daha fazla risk altındadırlar. İskelet gelişiminin en kritik döneminde yetersiz östrojen seviyesine sebep olan geç menarş, düşük KMY'na sebep olur.[48,49]

Genç erişkin adolesan dönemde hipotalamik amenoresi (atletik bayanlar, anoreksia nervoza, hiperprolaktinemi) olan kadınlarda, erişkin dönemde düşük DKK'ya ve ileriki yaşlarda artmış OP riskine rastlanmaktadır.[48,49]

2.8.2. Değiştirilebilen risk faktörleri

Fiziksel aktivite, mikrogravite ve immobilite: Kemik yapısı ve kütlesinin devamlılığı için mekanik yüklenmeye cevap olarak gelişen östrojenik aktiviteye ihtiyaç vardır. Çocukluk ve genç yetişkin çağında kemiğin egzersize verdiği yanıt diğer dönemlerden daha fazladır. Egzersize karşı verilen yanıt kişinin genetik ve biyolojik potansiyeline göre değişkenlik gösterebilir. Premenapozal dönemlerde veya menapoz sonrası erken dönemlerde direnç ve ağırlık verici dayanıklılık egzersizleri ileriki yaşlarda görülecek OP ve osteoporetik kırık riskini azaltır.[50,51] Ancak düşük aktiviteli ve düzenli egzersizlerin yüksek aktiviteli ağır egzersizlere göre kemik kütlesinde daha fazla artışa sebep olduğu bildirilmiştir.[52]

Yerçekiminin olmadığı uzay uçuşlarında mikrogravite etkisi alanında demineralizasyon ve osteoblastların inhibisyonundan dolayı kemiklerde kayıplar meydana gelir. Uzay yolculuklarında kemik kütlesinde bir ayda yaklaşık %4'lük bir kayıp oluşmaktadır.[53]

Yatağa bağımlı hastalarda kemik yıkımı çok hızlıdır (trabeküler kemik kaybı haftada yaklaşık % 1, kortikal kemik kaybı 1 ayda yaklaşık % 1). Kayba uğrayan kemiğin yerine yenisinin oluşması için geçen süre yıkım süresinden çok daha uzun olduğu (trabeküler kemiğin bir ayda ancak %1'i oluşur) için kemik kütlesi negatif dengededir.[52]

Ağır egzersiz: Sürekli yorucu egzersizler, diyet ve vücut ağırlığının çok sıkı kontrolü, vücut yağında azalmaya veya menstüral periyodu düzensizleştirecek veya tamamen duruduracak düzeyde östrojen eksikliğine yol açarak ileriki yaşlarda OP riskini artırabilir.[38]

Düşük vücut ağırlığı: Düşük vücut ağırlığına sahip kadınlarda daha az mekanik yüklenme, beslenme eksikliği ve yetersin Ca alımı, postmenapozal düşük östrojen düzeyi, düşmelerde koruyucu yağ dokusunun ince olmasına bağlı olarak OP ve osteoporetik kırığa olan meyli artırır.[54-56]

Yüksek ağırlıklı kadınlarda yağ hücreleri tarafından üretilen östrojen metabolitlerine bağlı olarak postmenapozal yüksek östrojen düzeyi, vücut ağırlığına bağlı daha fazla mekanik yükleme, artan Ca emilimi, PTH'a duyarlılıkta azalma ile birlikte çevresel Ca'un daha iyi kullanımı, OP ve osteoporetik kırılganlığa olan yatkınlığı azaltır. Ancak aşırı vücut ağırlığının diz ve ayak bileği eklemlerinde deformiteye sebep olması gibi olumsuz yönleri de vardır. Düşük vücut ağırlığına bağlı KMY düşüklüğü ve kırık riskinde artış kadın ve erkekleri eşit düzeyde etkiler.[57]

Alkol alımı: Alkol, Ca dengesini sağlayan hormon düzeylerini etkiler. Kemik yapım ve döngüsünü azaltarak trabeküler kemik oluşumunda azalmaya yol açmak suretiyle osteopeni oluşturur. Ca emilimini azaltırken atılımını ise artırır. Stokrom p450 enzimlerini indükleyerek karaciğer (KC)'de 25-OH vitamin D yıkımını artırır. Ayrıca alkol alımıyla ilişkili olan sekonder durumlar (hipogonadizm, metabolik asidoz, hiperkortizolizm, malnutrisyon, KC sirozu) osteopeni gelişimini artırır. Adrenal gland'ın androstenedion yapımını uyardığından, periferik dokularda androstenedion'un östrona çevrilmesi kemik üzerinde olumlu etki yapar. Ancak kemik üzerindeki defromasyonları ve fazla miktarda olumsuz etkileri sebebiyle kemik üzerine total negatif etkileri çok daha baskındır.[57]

Depresyon, sigara içimi, ilaçlar, yanlış beslenme yetersiz Ca ve Vit. D alımı gibi diğer değiştirilebilir faktörler, OP için önemli risk etmenleridir.[57]

2.9. OP'un Epidemiyolojisi ve Çeşitleri

En önemli OP sınıflandırma çeşidi primer ve sekonder OP olarak 2 sınıfa ayrılan OP çeşididir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Primer ve sekonder OP sınıfları.[58,59]

Primer Osteoporoz	İdiyopatik OP	Juvenil
		Yetişkin
	İnvolusyonel OP	Tip I-postmenapozal OP
		Tip II-senil OP
Sekonder Osteoporoz		

Fakat yaş, etyoloji, tutulan kemik doku, lokalizasyon, histolojik görünüm gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak yapılan OP sınıflamaları da mevcuttur.[31] Bu sebeple çeşitli

tip OP sınıflamaları yapılmıştır (Tablo 2.5). Ancak OP genel olarak primer ve sekonder olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmıştır ve en çok kullanılan sınıflama çeşididir.[37]

Tablo 2.5. Çeşitli tip OP sınıfları

Yaşa Göre	Lokalizasyona Göre	Tutulan Kemik Dokuya Göre	Etyolojiye Göre	Histolojik Görünümüne Göre
Juvenil OP	Genel OP	Trabeküler OP	Primer OP	Hızlı Döngüsel OP
Erişkin OP	Bölgesel OP	Kortikal OP	Sekonder OP	Yavaş Döngüsel OP
Senil OP				

Primer OP, yaşlanma ve postmenapozal kadınlarda meydana gelen OP'a işaret eder. İkincil OP, postosteoporoza sebep olan ve bilinen bir hastalık veya ilaç kullanımıyla ilişkilidir.[37]

Postmenapozal kadınların yaklaşık olarak 3'te biri, premenapozal kadınların ve ayrıca erkeklerin yarısı ikincil OP'dan sıkıntı çekmektedir.[37] Otuz yaşından sonra her iki cinsiyette de kemik yoğunluğu düşmeye başlar. Bu düşüş kadınlarda menapozdan sonra östrojen eksikliğine bağlı olarak hızlanır.[35]

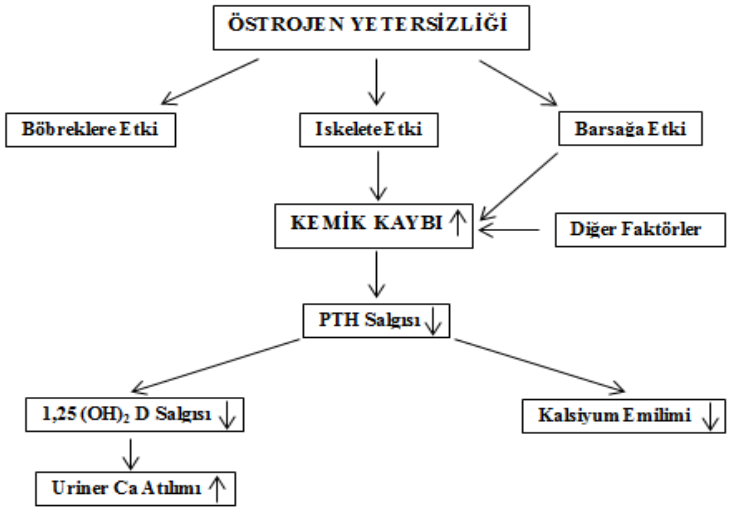
Tablo 2.6. Kadınlarda östrojen eksikliğine yol açan etkenler

Geç Menarş	Anoreksia Nervoza
Cerrahi ve Doğal Menapoz	Turner Sendromu
Hiperprolaktinemi, Laktasyon Aşırı ve ağır egzersiz	GnRH analogları ile uzun süreli tedavi sonucu farmakolojik over supresyon

Osteoporetik kırıklar yüksek veya daha alçak yerden düşme sonucu meydana gelir. Üç kritik bölge kırılmaya genelde daha yatkın olur. Bunlar vertebra, femur boyun ve distal radius bölgesidir ve bu bölgelerde oluşan kırıklar genelde daha yaygındır.[35] Ancak, bu kırıkların yarısı neredeyse omurgada meydana gelmektedir. Bu durumun

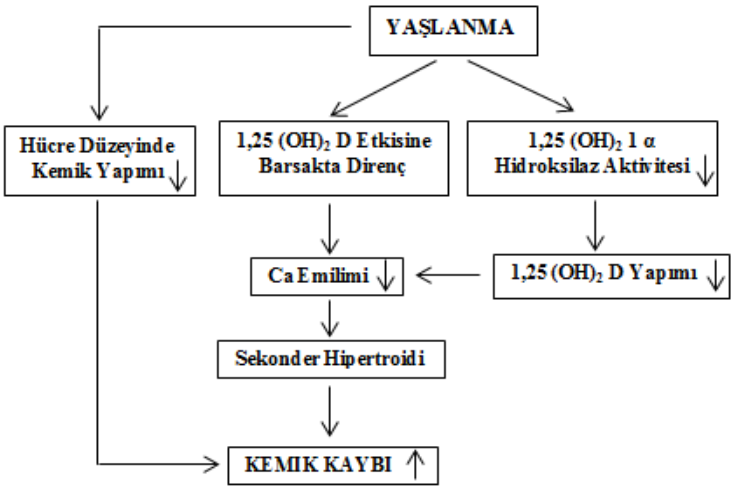
gelecek 10 yılda çok ciddi sosyo-ekonomik sorunları ortaya çıkaracağı ifade edilmektedir.[36]

Omurga kemiğinin en önemli fonksiyonu mekanik güce karşı direnç sağlamaktır. Düşük KMY osteoporetik vertebra kırıklarının yüksek riskini oluşturur. Postmenapozal OP vertebra kırıklarının en yaygın sebebidir. Bu hastalar arasında vertebra gibi kırıklar zenginleştirilmiş süngerimsi kemik alanlarında daha çok meydana gelir.[36] Şekil 2.3 ve 2.4'te tip I ve Tip II OP'un patogenezine ait faktörler ve birbiri üzerindeki etkileri görülmektedir.



Şekil 2.3. Tip I postmenapozal OP'nin patogenezi.[16]

Çoğu OP çeşitleri yaşlanma ve postmenapoz ile ilişkilidir. Ancak hastalık ve bazı patolojik durumların sonucu ikincil OP olarak adlandırılan OP gelişebilir. Onların yönetimi idiyopatik OP'dan farklı olabilir. İkincil OP'un sebepleri çoktur. Fakat klinisyenler için sorun teşkil eden ve klinik olarak önemli ve yaygın olanlar Tablo 2.7'de verilmiştir.[60]



Şekil 2.4. Tip II OP'nin patogenezi.[16]

Tablo 2.7. İkincil OP'un oluşumu için belirlenen en önemli sebepler.[60]

Endokrin	**Nörolojik Hastalıklar**	**İlaçlar**
Diyabet	Parkinson	Glukokortikoidler
Hiperparatroidizm	Hemipleji	Alkol
Hipogonadizm	Serebral Palsi	Anti-androjenler
Tirotoksikoz	Multiple skleroz	Heparin
İkincil amenore	Anoreksia nervoza	Aromataz inhibitörleri
Vitamin D eksikliği	Omurilik immobilizasyonu	Kemoterapi
Kemik İliği Hastalıkları	**Kalıtsal Hastalıklar**	Metoksiprogesteron asetat
Multiple Miyelom	Osteogenesis İmperfekta	Tiyazolidindionlar
Mastositoz	Marfan Sendromu	Asit baskılayıcı ilaçlar
Lösemi	Homosistinüri	Antiepileptik ilaçlar
		Antihipertansif ilaçlar v.b.
İnflamatuar Hastalıklar	**Gastrointestinal**	**Diğerleri**
Romatoid Artrit	Çölyak Hastalığı	Gebelik/laktasyon
İltihaplı Barsak Hastalığı	Gastrektomi	Ankilozan spondilit
Kistik Fibrozis	Karaciğer Hastalığı	Hiperkalsiürik nefrolitiazis
	Bariatik Cerrahi	Depresyon ve HIV
		Konjestif kalp yetmezliği
		Kronik akciğer hastalığı

2.10. Glukokortikoidler (GCs) ve Osteoporoz İlişkisi

GCs astım, kronik akciğer hastalığı, romatizmal artrit gibi hastalıklarla birlikte diğer bağ dokusu hastalıkları, iltihaplı barsak hastalığı ve nöromüsküler hastalıkların tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılan, bağışıklık sistemini baskılayan ve antiinflamatuar olarak kullanılan maddelerdir.[61] Sentetik GCs klinik uygulamada otoimmün hastalıklar, romatizma, gastrointestinal hastalıklar, tümörler, organ nakli gibi hastalıkların tedavisinde yıllardan beri kullanılmaktadır.[62] Ancak GCs'in kemik, böbrek ve barsakta glukokortikoid reseptörleri (GR) aracılığıyla kemik ve kalsiyum metabolizması üzerine etki ettiğine inanılmaktadır.[63,64] GC aktivitesi lokal olarak 11-hidroksisteroid dehidrogenaz izoenzimleri tip 1 ve 2 (11β-HSD1 ve 11β-HSD2) izoenzimlerinin aktivitesi ile kontrol edilir. 11β-HSD aktif GCs'in dönüşümünü katalize eder (insanlarda kortizol ve kemirgenlerde kortikosteron).[63,64] 11β-HSD1 yaygın bir şekilde dağılmıştır ve dolaşımdaki inert 11-ketosteroidlerden aktif GCs'i yeniden oluşturduğu ileri sürülmüştür. Bu yolla GC aktivitesini yükselttiği bildirilmiştir.[64] 11β-HSD2 ise distal nefroni kolon ve ter bezleri gibi aldosteron ilişkili organlarda salınır ve GCs tarafından mineralokortikoid reseptör (MR)'lerinin işgalini önler. Bu yolla hedef hücrelerde diğer seçici olmayan MR'in aldosteron erişimine müsaade eder.[64]

GCs'in tedavi edici etkileri tam olarak teyit edilmiş olmasına rağmen, uzun süreli kullanımında birçok yan etkiler ortaya çıkarması kaçınılmazdır.[62] Uzun süre GCs'e maruz kalmanın ilk etkisi, GCs'in osteoklast ve osteoblastların yaşam ömrü, aktivitesi ve farklılaşmasının inhibisyonuna yol açmak suretiyle kemik oluşumunun azalması üzerinedir.[61] Klinik ve deneysel veriler, uzun süre GCs'e maruz kalan kişilerde trabeküler kemik kaybı ve OP'in oluştuğunu göstermiştir.[65] GC ile indüklenen OP (GIO) ikincil OP'lardan en yaygın olanıdır.[63,64] GIO'in gelişimi prednisolon ve onun eşdeğerlerinin günlük 2,5 ile 7,5 mg arasında alınmasında bile meydana

gelebilmektedir.[66] GIO'nin, hekimler için önemli bir sorun olmaya devam eden ikincil OP'un en önemli sebebi olduğu düşünülmektedir.[65] GIO, kemik oluşumunu azaltan osteoblast apoptozis'inde artış ve osteogenesis'de azalma ile ilişkilidir.[65] GIO'in sonuçları uzun dönem GCs ile muamele edilen hastaların yaklaşık %30-50'sinde meydana gelen kemik yoğunluğu kaybı ve yapının kırılganlığa olan artışıdır.[67] Önceki veriler uzun süre (6 ay ve üzeri) GC ile tedavi edilen hastaların %30'unda edinilmiş OP meydana geldiğini rapor etmişlerdir.[62] Doza bağlı kemik kaybının hızlı olması nedeniyle GIO'lu yetişkin hastalar sırt ağrısı, kamburlaşma, yükseklik kaybı ve hatta kırıklardan muzdariptirler. GC ile indüklenen kırıklar toplum ve ailelere ağır yükler getiren sakatlıklara sebep olabilir. Organ nakli, romatizmal artrit, sistemik lupus, eritematoz, astım gibi hastalıklarda, GC ile muamele edilen çeşitli pediatrik hastalarda KMY kaybı belirlenmiştir.[65] Populasyon temelli yapılan bir çalışma dört kür GC ile muamele edilen çocuklarda kırık riskinin arttığını göstermiştir.[65] GIO'e maruz kalan hastalarda, birincil OP'lu kişilerden daha yüksek oranda vertebra kırıkları mevcuttur.[68] GIO'un, görülme sıklığı ve şiddetine rağmen patogenezi hala belirsiz kalmaya devam etmektedir.[69]

Daha önce yapılan çalışmalar GIO'un kemik metabolik dengesini bozabileceğini göstermiştir. Kemik metabolik dengesi, GCs'e maruz kalmanın başlangıç fazında kemik rezorpsiyonunu artırmak için GCs'in osteoklastlar üzerine etkisi ve sonraki fazda kemik oluşumunu azaltmak için osteoblastlar üzerine etkisi ile bozulur.[70,71] Önceki araştırmalar GCs tarafından osteoblast çoğalması ve farklılaşmasının inhibisyonu ve osteoblast apoptozis'inin indüklenmesinin, kemik oluşumunun azalması ile ilişkili olduğunu göstermiştir.[72,73] Her ne kadar GCs'in osteoblast ve osteoklastlar üzerine etkilerini izah etmek için çok sayıda çalışma yapılmış ise de bu, hücreler üzerine GCs'in

düzenleyici etkisinin altında yatan bütün moleküler olayların ileriki süreçlerde daha fazla izaha ihtiyacı vardır.[69]

2.11. Glukokortikoid ile İndüklenen Osteoporoz (GIO)'un Patogenezi

GIO'nun patogenezindeki merkezi özellik, kemik oluşumunun baskılanmasıdır.

GCs'in birincil etkisi osteblast ve osteositlerin üzerinedir. GCs'in, osteoblastların sayısını ve fonksiyonunu azalttığına dair kanıtlar vardır. Çünkü GCs osteoblastogenezi azaltır ve osteoblastik farklılaşma ve olgunlaşmayı etkiler. Bu anlamda GCs osteoblastik türlerin yerine adiposit türlerin hücrelerine doğru kemik iliği stromal hücrelerinin farklılaşmasını tercih eder. Peroksizom proliferatör aktive reseptör γ 2 (PPARγ 2) bu stromal hücrelerin yeniden yönlendirilmesinde rol oynar. Ek olarak olgun osteoblastlara doğru mezenşimal hücrelerin farklılaşması için kritik olan Wnt/B-katenin sinyal yolu, ostaoblastogenesis'in azalmasına katkı sağlayacak şekilde GCs tarafından inhibe edilir.[74,75] Olgun osteoblastların sayısı Wnt sinyal yolunda rol oynayan glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β) ve apoptozis'in başlangıcı için anahtar bir rol oynayan kaspaz 3'ün aktivasyonu ile, osteoblastların apoptozundaki artıştan dolayı etkilenir.[76] Osteoblastik fonksiyon aynı zamanda GCs tarafından azalır. Çünkü onlar tip I kollajen sentezini azaltır. Ayrıca GCs kemik oluşumunu artıran bir faktör olan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1)'in sentezini baskılar.[74]

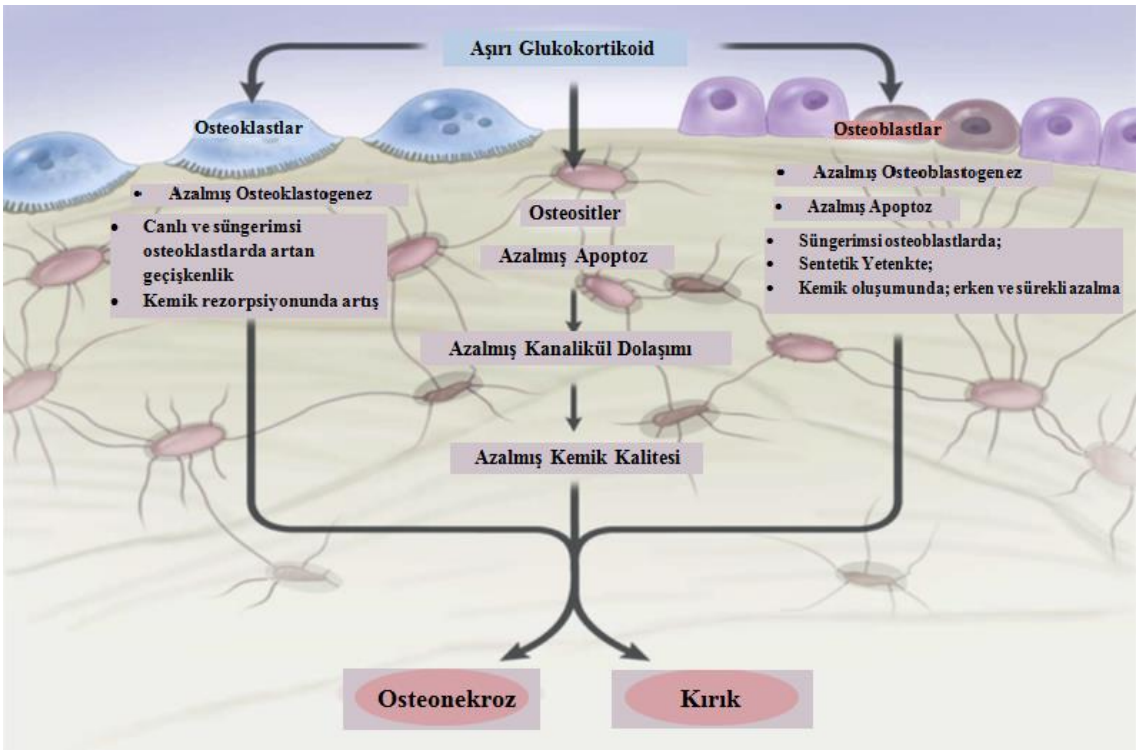
Osteositler GIO'da diğer önemli rol oynayıcıdırlar. Çünkü GCs kaspaz 3'ün aktivasyonundan dolayı osteositlerin de apoptozisini artırırlar. Bu durum ile ilişkili olarak c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve fökal yapışma ilişkili trozin kinaz (Pyk2) gibi intrasellüler kinazların GCs tarafından artırılan osteosit apoptozis'i ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.[77,78] Son çalışmalar kortizol türevi olan DEX muamelesi ile osteosit otofajisinin arttığını göstermiştir.[79,80] GC'lerin diğer bir ilişkili etkisi kemiğin yeterli

materyal özellikleri için zorunlu olan osteosit laküner kanalikül ağının bozulmasıdır.[74] Osteosit apoptozisi ile birlikte, bu değişiklikler kemik çevresindeki biyokimyasal özelliklerin bozulmasını[75] ve KMY kaybından önce kemik gerilim gücünün kaybındaki durumu açıklayabilir.[66]

GIO'da osteoklastlar üçüncü oyunculardır ve bunun içinde artmış kemik resorpsiyonunun erken ve geçişli fazı vardır. Kemik rezorpsiyonundaki bu geçiş fazı artışının altında yatan sebepler tam olarak açıklanamamışsa da, GCs makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve nükleer faktör kappa B (NF-KB) ligandının reseptörü (RANK-L)'nin expresyonunu artırır ve osteblastik ve stromal hücrelerde, RANK-L'nin çözünebilir tuzak reseptörü olan osteoporojentin'in expresyonunu azaltır.[81] Bunun sonucu olarak osteokalsitogenezde ve osteoklastların yaşam ömrünün uzamasında erken bir artış söz konusu olur.[75] Bununla birlikte RANK-L'ın üretimi osteoblastik hücrelerde dikkate değer bir azalmayla birlikte daha sonra düşmeye başlar. Gerçekte GIO'in patogenezinde azalmış osteoklastogenezin meydana geldiği ima edilmiştir.[66] Ancak osteoklastlarda azalan apoptozis ve sonradan osteoklastların yaşam ömründe artış, GCs'in tedavisi süresince osteoklastların etkili fonksiyonları ile ilişkili olabilir.[66,76] Kemik hücreleri üzerine direkt etkilerine ek olarak, GC kullanımının kas kütlesi ve gerilmesinin üzerine ters etkileri ile GIO'in kırık riskinde etkili olduğu ifade edilmiştir. Böylece GCs iskelet kası atrofisine katkıda bulunan protein sentez oranının azalmasına ve protein yıkım oranının artmasına sebep olur.[82] Ayrıca böbrek ve barsaklardan kalsiyum kaybının artışı, GIO'a dolaylı olarak katkıda bulunur. Hipogonadizm ve hiperparatroidizm önceki inanışların aksine GIO'in patogenezinde merkezi bir role sahip değildir.[66,75]

GIO'in patogenezindeki merkezi özellik osteoblastik kökenli hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasının yanısıra replikasyonunu da azaltarak kemik oluşumunun

baskılanmasıdır.[83] GC'lerin etki mekanizmalarından biri, onların Wnt/β-katenin sinyal yolunu etkilemeleri aracılığıyla ostaoblastik fonksiyonu baskılıyor gibi gözükmeleridir. Wnt sinyal yolu osteoblastogenez'in kritik önemli bir bileşeni olarak ortaya çıkmaktadır. Wnt sinyal yolunun sadece osteoblastogenezde değil aynı zamanda embriyogenez, organogenez ve tümörogenez gibi diğer farklı süreçlerin sinyal yolunda zorunlu olduğuna da dikkat çekilmiştir.

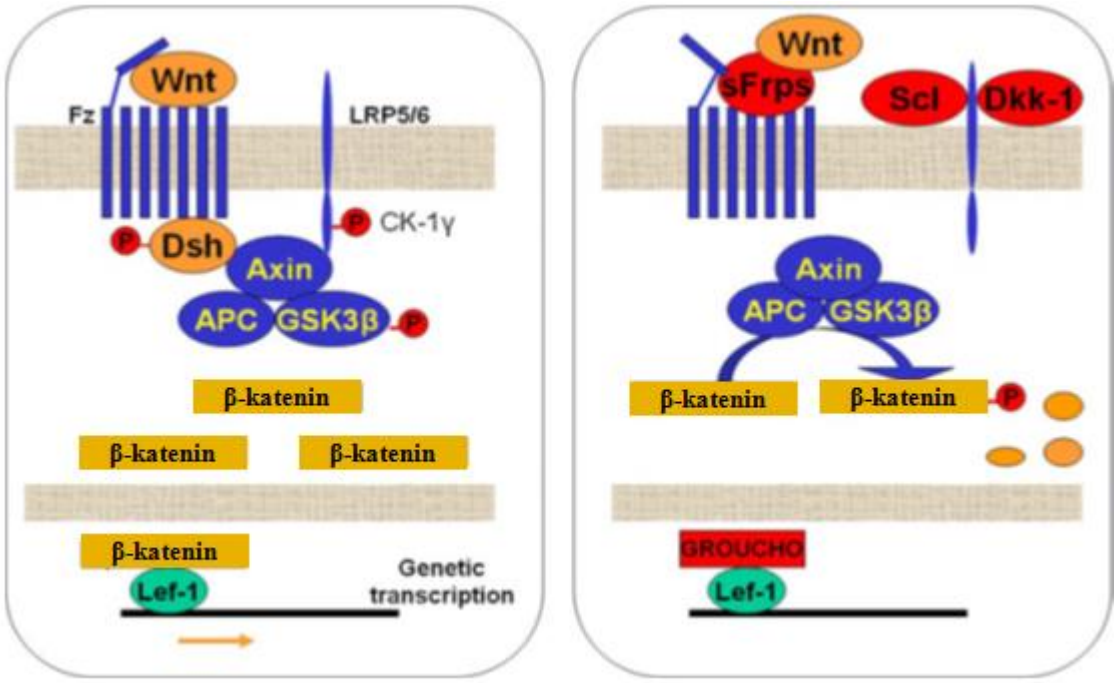


Şekil 2.5. Kemik hücreleri üzerine GCs'in direkt etkileri.[84]
"Osteonekroz ve osteoporoza yol açan aşırı GC'den kaynaklanan olumsuz iskelet değişiklikleri gösterilmiştir. Kahverengi yoğunlaştırılmış hücreler apoptotik osteoblastlar ve osteositlerdir"

Wnt sinyal yolunun aktivasyonu çeşitli hücre içi sinyal proseslerini tetikler. Bu hücre içi sinyal prosesleri üç önemli sinyal yoluna ayrılmıştır. Bunlar kurallı Wnt/β-katenin yolu, kuralsız Wnt-düzlemsel hücre polaritesi yolu ve Wnt-kalsiyum yoludur.[85] Bunlardan kurallı Wnt/β-katenin yolu özellikle osteoblast ve osteosit fonksiyonu aracılığıyla osteoblastogenesis'in ana düzenleyicisi olarak ortaya çıkmıştır. Kurallı sinyal yolu stozolik β-katenin'in stabilizasyonu üzerine dayanır ve dual reseptör

kompleksine Wnt ailesinden olan protein üyeleri (19 farklı glikoprotein ailesi)'nin bağlanmasıyla başlatılır.[83] Bu bilinen 19 farklı Wnt proteinlerinin kemik homeostazı ile ilişkili olduğu bilinse de, kurallı Wnt ligandı olan Wnt10b kemik oluşumunun pozitif düzenleyicisi olarak en iyi karakterize edilenlerdendir.[85] Dual reseptör kompleksi düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör (LDLR) ilişkili protein 5 (LRP5) veya 6 (LRP6) ile kıvrım (Fz) oluşturmuş bir yapı meydana getirir**.** Bu bağlanma glikojen sentaz kinaz (GSK) 3β, tümör baskılayıcı adenomatöz polipozis koli (Apc) ve yapı proteininin fosforilasyonunu engellemek suretiyle β-katenin kompleksinin bozulması olan multiproteinin inaktivasyonu ile sonuçlanır. Bu fosforilasyonun önlenmesi yolu ile stoplazmada β-katenin ve çekirdekte WISP1 ve RUNX2 gibi kurallı Wnt ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri ailesinden Tcf/lenfoid artırıcı bağlayıcı faktör 1(lef-1) ile ilişkili arka translokasyonları birikir.[83,85] Kısacası Wnt eksikliğinde β-katenin fosforillenmiş ve bozulmuştur. Wnt mevcut olduğunda β-katenin'in fosforilasyonu inhibe olmuştur. Bu yol ile kemik homeostazı üzerine pozitif etki yapan gen ekspresyonlarını düzenleyen trankripsiyon faktörleri ile ilişkili olarak, bozulma inhibe olmuştur (Şekil 2.6).

Bu bağlamda Wnt sinyali olgun osteoblastlara doğru osteoblast perkürsörlerinin farklılaşmasını tetikler ve kemik yoğunluğunda önemli değişikliklere yol açan osteoblast ve osteosit apoptozunu önler. Wnt/ß-katenin sinyal yolu sadece osteoblastogenez ve normal osteosit fonksiyonları için kritik değildir.[87] Aynı zamanda osteoklastogenez ile de ilişkilidir. Bu nedenle Wnt sinyal yolunun osteoporogentin'in artan salınımı ve Wnt3 gibi Wnt ligandlarının doğrudan inhibisyonu aracılığıyla kemik rezorpsiyonu ve osteoklastogenez'i inhibe ettiği gösterilmiştir.[85] Ek olarak son çalışmalarda, osteositlerin RANKL'ın en önemli kaynağı olduğu gösterilmiştir.[81]



Şekil 2.6. Wnt sinyal yolu.[86]
"Sol tarafta Wnt proteini GSK3β'ı fosforile eden membran reseptörlerine (Frizzled and LRP) bağlanır. Böylece β-katenin'in çekirdeğe geçişini ve gen transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlar. Sağda ise sklerostin, Dkk-1 and sFrps membran reseptörlerine bağlanır. Axin-APC-GSK3 kompleksi aktive olur ve β-katenin fosforillenerek bozulduğundan çekirdeğe geçemez"

2.12. Glukokortikoid Alan Hastalarda GIOP'un Önlenmesi ve Tedavisi

Çoğunluğunu kadınların oluşturduğu yaşlı hastalar, uzun aylar veya yıllar kemiği kötüleştiren GC ile tedavi olan bireyler, osteoporosis ve kırılganlık ile ilgili yüksek risk altında bulunmaktadırlar. GIOP iki fazlıdır. İlk fazda, bir yılda kemik mineral yoğunluğu %6-12 arasında hızlıca azalırken, ikinci fazda ise bir yılda yaklaşık %3 civarında nispeten daha yavaş bir azalma ile devam eder. GC terapisinin başlamasından sonraki ilk 3 ay zarfında yaklaşık %75 göreceli kırılganlık riski, önemli kemik yoğunluğu azalmasından sonra meydana gelir. GCs kemiklerin mikro yapısını değiştirir ve böylece kırıklar yüksek KMY değerlerinde bile meydana gelir.[88,89] KMY kaybı ilk ayda en fazla meydana geldiği için, GIOP'un önlenmesi ve tedavisi, GC ile tedavi başlangıcı ile birlikte gerçekleştirilmelidir.[90] Bu tavsiyelere rağmen, GC ile tedavi edilen birçok hasta kemik kaybı önleyicilerini almazlar.[91] Romatizmal hastalarda

GIOP'un önlenmesi için PMR için spesifik olan *British Society of Rheumatology* (BSR) ve *American College of Rheumatology* (ACR) gibi derneklerin genel yönlerini belirttiği kurallar vardır. Her iki kural örnekleri, GCs alan hastalar için bifosfonatların alınmasını tavsiye eder.[92] GC alımında edinilmiş OP oluşumunu engellemek veya tedavi etmek amacı ile ilişkili reçete Tablo 2.8'de önerilmiştir.

Tablo 2.8. GIOP'un önlenmesi ve tedavisi için mevcut önerilen reçete.[93]

İlaç adı	GIOP'da tavsiye edilen kullanım amacı	Yorumlar
Antiresorptif İlaçlar Bifosfonatlar	Tedavi için onaylanmıştır.	
Alendronat (Fosfomax)	Tedavi için onaylanmıştır.	Genel alternatifleri vardır. Bifosfonat seçeneklerine göre GIOP'da kırık riski azalması üzerine az veri vardır. Orjinal klinik deneme uzantısında vertebral kırık azalması görülmüştür.
Risedronat (Actonel atelvia)	Önleme ve Tedavi için onaylanmıştır.	Plasebo kontrollü GIOP çalışmalarının %50'den daha fazlası azalan vertebral kırık riski
Zolendronat (Reclast)	Önleme ve Tedavi için onaylanmıştır.	İntravenöz seçenekeleri vardır. Diğer tedavi seçeneklerinin dozaj takvimi ile uyumlu bir şekilde verilmesi veya gastrointestinal yan etkileri sebebiyle, oral bifaosfanat'a duyarlı hastalarda düşünülmelidir. BMD etkisi gösterilmiştir.
Anabolik ilaçlar (Teriparatid) (Forteo)	GIOP/yüksek kırılganlık riski için onaylanmıştır.	Her ne kadar çalışma bu sonucu belirlemek için güçlü değilse de, GIOP'da randomize kontrollü çalışmalarda azalan vertebra kırıklarında aldronat'a üstünlük sağlamıştır.

2.13. Overektomi ile İndüklenen OP'un Patogenezi

Birçok çalışma OP'un farklı durumlarda kemik iyileşmesini bozduğunu onaylamıştır.[94,95] Bu multifaktöriyel problem, bozulmuş anjiyogenez[96], büyüme hormonu salınımında azalma[97], yaşla ilişkili olarak mezenşimal hücrelerde azalma[98] ve osteoblastların mekanik sinyallere düşük duyarlılığını[99] içerir. Kemik iyileşme sürecinde ilişkili olan biyolojik ve mekanik faktörler, yaşlanma ve östrojen eksikliğinden etkilenmektedir. Yaşlanma ve OP'un, mekanik yüklemeye karşı kemik duyarlılığını azalttığı rapor edilmiştir.[100] Öte yandan yüksek yaş, kemik büyüme kapasitesinin azalmasına sebep olsa da, yaşın mekanik duyarlılık üzerine herhangi bir etkisi olmadığına dair karşıt görüşler de vardır.[101,102] Son yıllarda çoğu raporlar kemik üzerine mekanik yükleme ve östrojen aksiyonunun bağımsız olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır.[103] Bazı raporlar, overektomi'nin mekanik uyarıya karşı kortikal kemiklerin duyarlılığını artırdığını[104] ve ilginç bir şekilde düşük östrojen seviyeli dişi ratların erkek ratlardan daha iyi mekanik cevap gösterdiğini bildirmektedir.[105]

Östrojen eksikliğinin acil etkileri, östrojen reseptörleri (ER-α ve ER-β olarak bilinen ERs) tarafından yukarıdaki olguyu açıklayacak şekilde, ligand bağımsız fonksiyonu sayılan östrojen reseptörleri tarafından algılanır ve geciktirilir.[106] ER-α'nın, östrojen eksikliğinde[107] diğer sinyal moleküllerinin kombinasyonunda bir sınıf geçiş molekülü olarak hareket ettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda ER-α, osteoblastik kemik hücrelerinde mekanik sinyal transdüksiyonu yolunda zorunludur.[108] Diğer yandan ER-β kemik oluşumu, yeniden yapılanması ve kemik iyileşme prosesine zıt olarak, ER-α'ya antagonist olarak hareket edebilir.[109,110] Bu arada ER-α veya β'nın bilinen miktarlarının kemiğin oluşumu ve iyileşmesinin belirlenmesinde anahtar bir role sahip olduğunu ifade eden kanıtlar da vardır.[100] ERs'nin, östrojen mevcudiyeti ile pozitif olarak düzenlendiği tanımlanmıştır.[111,112] ERs'nin özellikle de ER-α tarafından mekanik sinyallere cevap

vermede fonksiyonu, kemik oluşumunda oldukça etkilidir.[109,113] ER-α ve β arasındaki ilişki tamamen açıklanamamıştır.[114,115] Ancak kemik metabolizmasında her iki alt tip arasında düşük de olsa total benzerlik ve DNA bağlanma alanında yüksek dereceli benzerlikten dolayı ER-β, ER-α az olduğunda ER-α'nın destekleyicisi olarak, fazla olduğunda ise antagonisti olarak hareket eder.[110,116] Bu yüzden her birinin nisbi miktarları kemik metabolizmasında osteogenetik cevap üzerine belirleyici bir etkiye sahiptir.[117,118] Chow ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada ERs ekspresyonunun hem miktar hem de overektomi ile indüklenen osteoporetik kırıkların geciktirilmiş iyileşme sürecinde, engelleyici faktörlerden biri olduğu sonucuna varmışlardır.[100] Aynı zamanda overektomi ile indüklenen osteoporetik kırıkları boyut, kalite ve gecikme açısından yara dokusu oluşumundaki bozulmaları karakterize etmişlerdir. Ayrıca ER-α'nın ER-β'ye oranının artmasının kemik iyileşmesini, pozitif yönde geliştirdiğine dair kanıtları elde etmişlerdir.[100]

Yumurtalık (over)'ların alınması ile, kemik oluşumunun dinamik olduğu süreçte gözlenen akut (ani) östrojen eksikliği, farelerde kemik kaybına sebep olur.[119] Yukarıda ifade edilenler ışığında overektomili deneklerde, postmenapozal kişilerde olduğu gibi östrojen eksikliğine bağlı olarak ilk önce ER-α ve onun kısa süreli destekleyicisi olan ER-β ile mekanik duyarlılığa ilginin arttığını, ancak geçen zaman süresine bağlı olarak östrojen eksikliği ve muhtemelen de ligand bağımsız ER fonksiyonunun azalması ile edinilmiş OP'un geliştiğini söyleyebiliriz.

2.14. Osteoporetik Kemik ile Normal Kemik Arasındaki Farklılıklar

-Kemiğin yaşam boyunca sürekli yük altında kalması, öncelikli olarak moleküler düzeyde değişimlerden başlayarak giderek kemiğin elastisite özelliğinin kaybolması sonucu yapısal yetersizlik olarak tanımlanan mikromimari yapısının bozulması,

-Yeniden yapılanmanın uyarılarak, kortikal ve trabeküler kemikte mikromimari yapının bozulması sonucu kırılganlık riski artmış olan kemik yapısı,

-Artan kırık riskinden dolayı moleküler yüklere karşı direnç göstermede azalma,

-Mineralizasyon defekti sonucu, mineralizasyonundaki heterojenite ve kemik bileşimindeki değişikliklere bağlı olarak artmış kırılganlık riskine sahip kemik yapısı,

-Trabeküla bağlantılarındaki kayıplara bağlı olarak, trabeküler ağda bozulma ve özellikle yatay trabekülerde kayıplar,

-Kemik döngü hızı ve PTH'a bağlı olarak yıkım boşluklarının yeterince dolmaması sonucu porozitede artış,

-Kemik döngü hızının artışına bağlı olarak, kortikal ve trabeküler kemiklerde yeniden yapılanma siklusundan arta kalan çizgi şeklinde ve yapısal direnci az kollagen lifleri olan cement çizgilerinin aşırı birikmesi, gibi farklılıklar osteoporetik kemik ile normal kemik arasındaki en önemli farklılıklardan bazılarıdır.[24]

2.15. OP'da Klinik Belirti ve Bulgular

OP, genelde sessiz seyreden ve kırık oluşana kadar fark edilmeyen bir hastalıktır. Başlangıç dönemlerinde ağrısız olan bu hastalık, ilerlemiş olan vakalarda vertebranın ani çöküşüne bağlı olarak sırt ağrısı, boy kısalması, spinal deformasyon ve kırıkların artışı ile seyreder.[120] Bunlar ile birlikte vücudun öne doğru eğilmesi, çenenin sternuma değmesi, yürüyüş bozukluğu, sırt derisinde kıvrımların oluşması, öne doğru çıkıntı gösteren karın, alveolar kemik kaybı sonucu dişlerin sallanması veya dökülmesi meydana gelebilir.[16]

Menapoz sonrası OP'da trabeküler kemik kaybı daha yoğun olduğundan vertebra, femur boyun ve distal radius kırıkları daha sık görülmektedir. Senil OP'da hem trabeküler hem de kortikal kemik kaybı olduğu için kalça, uzun kemik ve vertebra

kırıkları daha çok karşımıza çıkmaktadır. Proksimal femur ve distal radius kırıkları ise daha çok düşme ile meydana gelirken, vertebral kırıklar spontan veya minimal bir travma sonucu meydana gelmektedir.[120]

50 yaşındaki bir kadının bütün hayatı boyunca vertebral kırık geçirme riski yaklaşık %15,6'dır. Bu kırıklar ağırlık kaldırma, eğilme, egzersiz gibi günlük fiziksel aktiviteler sonucu meydana gelirken spontan olarak da oluşabilir. Bu kırıklar her zaman bir belirti ortaya koymayabilir ve radyografik görüntülerde tesadüfen görülebilir.[121]

Bazen de hastalar akut ve kronik sırt ve bel ağrısı şikayeti ile kliniklere başvurabilir. Akut vertebra kırıklarında ani ve şiddetli ağrıyla birlikte paravertebral kas spazmı söz konusudur. Ağrılar genelde lokalize ve spazm şeklindedir ve dermatomal yayılım gösterir. Hapşırma, öksürme, ayakta durma gibi fiziksel aktiviteler ve palpasyon gibi muameleler ile şiddetlenir. Kronik ağrı ise ligamanların gerilmesi, spinal deformite ve postür değişikliklerine bağlıdır.[57]

Progresif kifoz ve vertebral kollaps sonucu hastaların boyu giderek kısalır. Her bir vertebra kırığı yaklaşık 1 cm boy kısalmasına sebep olduğundan çoklu kırıkları olan hastalarda 10 ile 20 cm arası boy kısalması söz konusu olabilir. Dorsal kifozu artmış bazı hastalarda toraks volümü ve total akciğer kapasitesi azalır, egzersiz toleransı bozulabilir.[122] Ayrıca osteoporetik hastalarda, kostaların pelvise dayanması ile troakoabdominal basınç arttığından reflü, konstipasyon, hiatal herni ve hazımsızlık gibi gastrointestinal sorunlar ortaya çıkabilir. Ancak OP'un en ciddi klinik komplikasyonu, mortalite ve morbidite oranı en yüksek olan kalça kırıklarıdır.[31]

2.16. OP'da Tanı Yöntemleri

Osteoporetik hastaların tanı, tedavi ve takibinde radyografik görüntüleme yöntemleri, biyokimyasal testler ve kemik biyopsisi kullanılmaktadır. Primer OP'lu

hastalarda biyokimyasal testler genelde normal değerler içindedir. Ancak primer ve sekonder OP'un ayırıcı tanısında ve kısa süreli olarak tedavi etkinliğinin izlenmesinde Tablo 2.9'da belirtilen biyokimyasal testler mutlaka yapılmalıdır.[123] Bu testler OP tedavisinin kısa süreli etkinliği, kemik kayıp hızı ve kırık riski hakkında önemli ipuçları sağlar.

Tablo 2.9. OP'un tanı ve kısa süreli tedavisinin takibinde ölçülmesi gereken biyokimyasal testler.[31]

Başlangıç için Gerekli Olan Testler	**Başlangıç Testlerinin Yeterli Olmadığı Durumlarda Gerekli Olan Testler**
-Serum Ca, P	-Plazma testesteron ve östradiol düzeyleri
-Total ALP	-Serum PTH, 25(OH)D, vit. $1,25(OH)_2D$,
-Kreatinin	-TSH, serbest T_3 ve T_4
-Karaciğer fonksiyon testleri	-LH, FSH, Prolaktin, Kortizol
-Eritrosit sedimentasyon hızı	-24 saatlik idrarda Ca ve Na
-Tam kan sayımı	-Bence jones proteinleri
-Tam idrar tahlili	-Serum protein elektroforezi

2.17. OP'un Önlenmesi ve Tedavisi

OP'un primer ve sekonder olmak üzere iki farklı amaca yönelik koruma programları mevcuttur. OP'un primer önlenmesine yönelik programların amacı, iskelet sisteminin fötal dönem, bebeklik, çocukluk ve gençlik dönemlerinde kemiğin gelişmesi sırasında kemik kalitesini ve dayanıklılığını en üst düzeye çıkarmak ve sonraki dönemlerde de korumaktır.[124]

OP'un primer önlenmesine yönelik olan süreçte yapılması gerekenler;

-Fötal dönemde annenin yeterli Ca alımının sağlanması

-Çocukluk ve erişkin dönemde emziren annenin yeterli Ca alması, çocuklarda Ca, vit. D, vit. C ve proteinden zengin beslenmesi

-Kemik kütlesi oluşumunun tamamlandığı ileri adolesan dönemde yeterli Ca, vit D alımı, aşırı prtotein alınmaması, düzenli fiziksel egzersiz ve güneş ışığından yararlanma şeklinde sıralanabilir.

OP'un sekonder önlenmesi, yaşlanma ve menapoz ile birlikte meydana gelen kemik kayıplarını geciktirmek, en aza indirmek ve kırık riskini azaltmaktır.[124]

Bu süreçte yapılacaklar;

-Ca, vit. D, güneş ışığı ve diğer gerekli vitamin ve minerallerce zengin diyetle beslenme,

-Kemik kaybının geciktirilmesi amacıyla Ca, vit. D ekleri ve HRT kulanımı

-KMY osteoporetik değerlere düştüğünde kemiği koruyucu ve düşmeyi önleyici tedbirlerin alınması,

-Düzenli fiziksel egzersiz,

-Kemik yapımını uyaran yeterli vücut ağırlığına sahip olma,

-OP'a yol açan ilaçların (GCs ve türevleri) kullanım doz ve süresinin imkanlar ölçüsünde azaltılması

-Kemik hasarı oluşturan hastalıkların veya kırıkların varlığında tedavilerin düzenli ve zamanında yapılması, şeklinde ifade edilebilir.[16]

OP tedavisi tek bir tedavi yöntemiyle idame ettirilebilecek bir hastalık değildir. Farklı tedavi şekillerinin birkaçının bir arada kombine olarak uygulanmasıyla gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Başlıca OP tedavisi, ağrı tedavisi, fiziksel aktivite ve egzersiz, düşmelerin engellenmesi, iskelet sağlığını koruyucu yaşam tarzının benimsenip uygulanması, kemiğe yararlı maddelerin besinlerle alınması ve düzenli beslenme, vit. D ve Ca eklerinin kullanılması, ARZ tedavisi (bifosfonatlar, raloksifen, kalsitonin), OAB tedavisi (florür, stronsiyum, anabolizanlar, PTH) ve diğer ilaçlar (statinler büyüme faktörleri, tetrasiklinler, leptin gibi) olmak üzere farklı tedavi

şekillerini kapsar. Bu tedavi şekilleri, hastaların gereksinimi ve ihtiyacına göre birkaçının birlikte veya kompleks tedavi yöntemlerini içermelidir.[38]

Osteoporetik ağrı genelde akuttur ve ani başlar. Bu durum alt torasik yada lomber vertebralardaki kırıklardan kaynaklanır. Omurga ksları çok gergin ve ağrılı olduğu, birkaç haftadan birkaç aya kadar devam edebileceği için bu dönemde bifosfonatlar ve opiatlar ile birlikte analjeziker ve yatak istirahati de tercih edilmelidir.[38] Kırığa bağlı akut ağrı genelde 10 hafta içinde geriler. Kırık iyileştikçe ağrı azalır veya kırık etrafında deformiteye, kaslardaki düzensiz yük dağılımına vertebral eklemlerdeki hasara bağlı olarak sıklıkla gece gelen kronik ağrılara dönüşebilir. Bu dönemde fiziksel tedavi ve hastanın yaşına uygun düzenli egzersiz tercih edilebilir.[38] Kemik erimesi, bifosfonatlar ve kalsitonin gibi ilaç tedavisi için bir hedef olmuştur.[125,126] OP tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanlar ya anabolik etkilidirler ve direkt olarak kemiği uyarırlar veya kemik rezorpsiyonunu önleyerek kemik kütlesine sekonder kazanç sağlarlar. İdeal olanı bu ilaçların kemik gücünü ve kalitesini artırmasıdır.[127] Günümüzde osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçlar Tablo 2.10'da özetlenmiştir.

Tablo 2.10. Tedavide kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırması

Antikatabolik Etkili	**Anabolik Etkili**	**Pozitif Maskeleyici**	**Kompleks Etkili**
Östrojen	Fluroid	Stronsiyum	Vit D ve türevleri
SERM	PTH		Anabolik
Bifosfonatlar	Growth Hormon		Steroidler
Kalsitonin	IGF-1		İpriflavon
Ca			Tibalone

OP tedavisinde amaç, kemik kütlesini ve mikromimari yapısını geliştirerek kemik gücünü restore etmek ve sonuç olarak vertebra ve periferik kırık riskini azaltmaktır. Antirezorptif etkili ilaçlar ile osteoklastik aktivite inhibe edilirken kemik

döngüsü azalır, KMY artar. Yeni vertebral ve periferik kırık riski %20-50 oranında azalır. Bu etkiler seçilen tedavi ajanına ve tedavi süresine göre değişir.[127]

Bifosfonatlar: Kalsiyum karbonat'ın presipitasyonunu inhibe eden pirofosfat analoglarıdır. Progenitör hücrelerin olgun osteoklastlara dönüşümünü engelleyerek erken apoptoz ile osteoklast sayısında azalmaya ve osteoklast aktivitesini inhibe etmek suretiyle antirezorptif etkilerini gösterirler. Bifosfonatlar kemik döngüsü ve KMY'ndaki pozitif etkilerine ek olarak kemiğin kalitesi, mikromimari yapısı ve direnci üzerine olan etkileri, kırık riskinde azalmaya neden olmaktadır.

Bu amaçla kullanılan alendronat ve risedronat, postmenapozal osteoporetik kadınlarda omurga ve kalça KMY'nu artırır. Vertebra ve vertebra dışı kırıkların önlenmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bifosfonatlar postmenapozal OP'da olduğu gibi steroid'e bağlı OP ile erkeklerde yaşa bağımlı OP'da da etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ıbandront ve zolendronat son yıllarda üzerinde çalışılan bifosfonatlardır.

Kalsium ve Vitamin D: Ca ve vitamin D kombinasyonu OP tedavisinde en önemli yeri tutmaya devam etmektedir. Özellikle vücut ağırlığı az olan kişilerde koruyucu özelliğe sahiptir. Yapılan çalışmalarda Ca desteği ile kemik kayıp hızında azalma ve KMY'nda artış olduğu ifade edilmiştir.[127,128]

Vitamin D_3'ün PTH gibi kemik üzerine karmaşık etkileri vardır. Bir taraftan kemik rezorpsiyonunu artırırken diğer taraftan osteoblastların mutarotasyonuna katkıda bulunur. OP tedavisinde Ca ve vit. D diğer ajanlarla birlikte kullanılmalıdır.[127,128]

Kalsitonin: Troid bezinin parafolliküler veya C hücrelerinden salınan peptid yapısında bir hormondur. Osteoblast formasyonunu azaltarak kemik rezorpsiyonunu inhibe eder. 200 İU/gün salmon kalsitonin ile, postmenapozal kadınlarda yeni vertebral kırık oluşumunun yaklaşık %33 oranında azaldığı ifade edilmiştir. Bu durum

kalsitonin'in kemik kalitesi üzerine olumlu etkileri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca kalsitonin akut ağrılı vertebra kırıklarında analjezik etkiye sahiptir.[127-129]

Hormon replasman tedavisi (HRT): Uzun süreli kullanımında yan etki olarak özellikle meme kanseri riski artırdığı için kullanımı sınırlandırılmaktadır. Koruyucu etkisi ek bir fayda olarak görülmeli ve kullanımı 5 yılı aşmamalıdır.[127,128]

Selektif östrojen reseptör modülatörleri (SERM): Bu ilaçlar östrojen reseptörlerindeki yapısal değişmeyi bloke ederler. Kemik ve kardiyovasküler sistemde östrojen agonisti, uterus ve meme dokusunda ise östrojen antagonisti olarak hareket eder.[130] SERM'ler, ER-α ve ER-β gibi östrojen reseptörlerine bağlanmak suretiyle osteoklast farklılaşmasını teşvik eden stokinlerin yapımını bloke ederek ve osteoblast aktivasyonunu baskılayan TGF-β3'ü aktive ederek kemik rezorpsiyonunu baskılar[38]. Bu grup ilaçlardan olan raloksifen ile tedavi edilen postmenapozal kadınlarda, 3 yılda vertebral kırık insidansı yaklaşık %30 azalırken, vertebra dışı kırıklarda önemli bir değişikliğin gözlenmediği rapor edilmiştir.[130] Ek olarak yeni meme kanseri olgularında %72 gibi belirgin bir azalma ve risk grubundaki kadınlarda kardiyovasküler sorunlarda önemli azalmalar ortaya konmuştur.[127,128,131]

2.18. OP'da Yeni Tedavi Yaklaşımları

PTH: PTH'ın kemik üzerinde hem anabolik hemde katabolik etkileri vardır. Devamlı yüksek düzeyleri kemik rezorpsiyonunu artırırken, aralıklı olarak düşük dozlarda verilmesi kemik oluşumunu artırır. Anabolik etkisini, osteoblastlar için mitojenik olan IGF-1 ve TGF-β ile gösterir. rhPTH 1-34 (teriparatid)'in subkutan günlük enjeksiyonları osteoporozda değerlendirilmiş ve yaygın vertebral kırıkları olan postmenapozal kadınlarda 21 aylık sürede yeni vertebral kırık oluşumu vakalarında %65-69 oranında azalma, vertebra dışı kırık vakalarında ise yaklaşık %53-54 civarında

bir azalma olduğu rapor edilmiştir. PTH diğer ilaçlara cevap vermeyen veya yan etkileri sebebiyle kullanılması kısıtlanan şiddetli OP vakalarında yeni bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilmektedir.[127,128,132]

Strontium ranelate: Preosteoblastların osteoblastlara replikasyonu, osteoblast aktivitesini artırarak kemik yıkımını inhibe eder. Stronsiyum'un kemik trabeküler mikromimari yapısını iyileştirdiği ve kortikal kemik hacmini artırdığı bilinmektedir. SOTİ ve TROPOS çalışmalarında stronsiyum ile 3 yıllık bir tedavi sonunda vertebral kırık riskinde %41, majör periferik kırık riskinde %3, kalça kırığı riskinde %41 oranlarında azalmalar olduğu ifade edilmiştir. KMY'nda ise lomber vertebrada %14, femurda %8,3 artış sağlandığı bildirilmiştir.[133,134]

Osteoprotogerin (OPG): OPG, TGF reseptör ailesinde suda çözünebilir bir protein olup osteoklastogenez üzerine inhibitör etkisi ile kemik homeostazında yer almaktadır. OPG bu etkisini, homepoetik prekürsör hücrelerinde bir transmembran reseptörü olan RANK'a bağlanma ve osteoklast prekürsörlerinin osteoklastlara dönüşümünü sağlayan RANK-RANKL etkileşimini bloke etmek suretiyle gerçekleştirir.[135]

Diğerleri: Katepsin-K inhibitörü (AAE581), growth hormon, IGF-1, izoflavonlar, leptin, vit. K, anabolik steroidler, statinler, flor tuzları tedavide kullanılabilen diğer ajanlardır.[127,128]

2.19. Oksidatif Stres

Canlı sistemlerde meydana gelen bütün fizyolojik olaylar; enzim, hormon ve eser elementleri gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen yükseltgenme ve indirgenme reaksiyonlarından ibarettir.[136] Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi ile meydana gelen yükseltgenme işlemidir. Redoks potansiyeli yüksek olan

madde yükseltgenirken düşük olan indirgenir. İnsan vücudunda ve besinlerde bulunan lipitler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, oksidasyona uğrarken canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri (reaktif oksijen ve azot türleri) oluşabilmektedir.[137,138]

Oksidatif stres, antioksidan savuma sistemi ve ROS arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. ROS'nin besinler üzerinde ağır etkilerinin bulunması dolayısıyla, ROS'nin, kanser dahil birçok farklı kronik hastalık ile ilişkilendirilmiştir.[139] Canlı sistemlerde bulunan redoks dengesindeki herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve dolayısıyla dokuların fonksiyonlarının bozulmasına sebep olur ve bu durum zamanla ölümle sonuçlanabilir.[140]

Günümüzde insanlık, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi diğer hastalıklar ile karşı karşıyadır. Diyabet gibi bazı metabolik hastalıklar lipoprotein oksidasyondaki artışla ilişkilidir. Merkezi sinir sistemi, minimal total antioksidan kapasite değişiminde bile serbest radikal hasarına karşı oldukça duyarlı hale gelir. Dokularda üretilen ROS lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi makromoleküllere hasar verebilir. Lipid peroksidasyonu bir kez başladı mı zincir reaksiyonları şeklinde cereyan eder. Bu yüzden lipid peroksidasyon ürünleri olan MDA, 4-hidroksi-2-nonenol ve F2-izoprastanlar biyolojik sistemlerde birikir. DNA bazları da ROS'ne karşı oldukça hassastırlar. *İn vivo* olarak DNA oksidasyon ürünlerinden olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) belli oranda artarak kolaylıkla ölçülebilir. DNA'nın oksidasyonu mitokondri ve çekirdek DNA'sında mutasyonlara sebep olabilir. ROS'nin başlıca kaynaklarından sorumlu organellerden biri olan mitokondride, DNA tamir mekanizmaları çekirdekteki gibi olmadığından dolayı, oksidatif stresten daha fazla etkilenir. Bu oksidatif modifikasyonlar çeşitli tip proteinlerde enzim aktivitesi ve yapısal özelliklerde değişimlere yol açar. Benzer şekilde transkripsiyon faktörlerinin redoks düzenlemesi,

DNA bağımlı spesifik aktiviteleri değiştirebilir ve gen expresyonunun modifikasyonuna yol açabilir.[13]

Tablo 2.11. Endojen kaynaklı oksidatif stres oluşturucuları

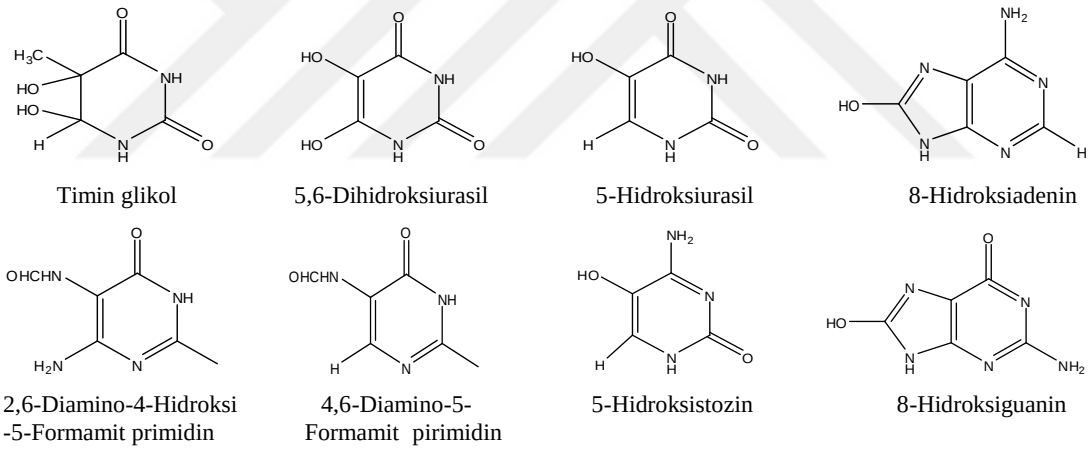
Radikallerin sızması	Membrana bağlı enzimler	NADPH oksidaz
• Oksijen aktivasyonu	• Elektron transport sistemleri • Çözünebilir hücre bileşenleri • Ksenobiyotik metabolizma enzimleri	• Karışık fonksiyonlu oksidazlar • Geçiş metalleri, tiyol grupları içeren proteinler, epinefrin, metaloproteinler, flavoproteinler, demir bağlı proteinler • Cyt-P450 bağımlı monooksijenazlar • Cyt-b5 ve NADPH bağımlı stokrom redüktazlar
• ROS'nin tetiklenmesi ve üretimi	• Çözünebilir stozolik enzimler • Fagositik hücreler • Lokal iskemi	• Ksantin oksidazlar, süperoksid dismutaz, katalaz • İnflamasyon, solunum patlaması, toksik moleküllerin uzaklaştırılması ile ilişkili nötrofiller, makrofajlar ve monositler. • Akut kan kaybı

Nitrik oksit radikali ($NO^{\cdot}$): NO memelilerde önemli bir sinyal molekülü ve aynı zamanda serbest radikal çeşididir. Oksijen çok hızlı bir şekilde toksik etkiye sahip olan azot dioksit (NO_2) meydana getirebilir. Kan damarlarında bulunan endotelyal hücrelerinin, nonradikal ürünler sağlamak için NO ile reaksiyona girebilen az miktarda süperoksit ürettiği bilinmektedir. NO ve süperoksit üretimindeki bu değişiklik, vasküler özellikleri ve bunun sonucu olarak da kan basıncını düzenleyen bir mekanizma oluşturmaktadır.[141]

Serbest radikallerden yararlı fizyolojik etkisi olanlara örnek olarak NO radikali verilebilir. NO, NOS tarafından L-argininden sentezlenir. NO damar genişlemesi süreçlerinde eNOS, sinir uyarılarınn iletilmesi sürecinde ise nNOS tarafından sentezlenir. Ancak stres varlığında NO, iNOS'ın katalitik etkisiyle oluşturulur. NO ya

direkt olarak veya süperoksit ile reaksiyona girerek çok reaktif molekül olan peroksinitrit ($ONOO^-$) radikallerine dönüşmek suretiyle proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir.[13]

Elektron taşıma sisteminin mitokondride yer alması ve mRNA sentezi esnasında RNA polimerazın bir hata okuma (proofreading) mekanizmasına sahip olmaması nedeniyle, oksidatif hasar mitokondride kromozomal DNA'ya göre daha sıklıkla meydana gelir. Mitokondriyal solunum sonucu oluşan serbest radikaller ($O_2^{\cdot -}$, H_2O_2, $OH^{\cdot}$ v.b.), tek zincir kırıklarına, 8-oksoguanin ve timin glikol gibi hasarlı bazların oluşmasına sebep olur.[142] Oksidatif metabolizma esnasında veya sonucunda oluşan bazı hasarlı DNA'lar Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Oksidatif metabolizma esnasında veya sonucunda oluşan bazı hasarlı DNA'lar

Günümüzde en çok araştırılan biyolojik olaylardan biri olan yaşlanma da dahil olmak üzere, birçok hastalığın oksidatif hasarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca oksidasyon sadece lipitlerde zararlı etkilere yol açmaz. Reaktif oksijen ve azot türleri, DNA bazlarını hasara uğratması sonucu mutasyonlara da sebep olmaktadır. $O_2^{\cdot -}$, $OH^{\cdot}$,

$ONOO^-$, DNA hasarının birçok türünün sebebi olarak bilinir. DNA hasarı kanserden sorumlu temel faktördür.[143]

2.20. Fosfodiesteraz İzoenzimleri (FDEs)

FDEs, hücre içi ikincil haberci olarak rol oynayan cAMP ve cGMP'yi hidroliz eden bir grup enzimdir.[1] Bunlar, 11 farklı gen ailesinden oluşan ve spesifik doku / hücre /hücre organel dağılımları bulunmaktadır. Bu genlerin herbiri 1-4 arasında farklı gen bölgelerini içerir ve sıklıkla çeşitli bağlayıcı ürünleri ifade eder.[5] FDE-4, 7 ve 8 gibi bazı fosfodiesterazlar cAMP'ye spesifik iken FDE-5, 6 ve 9 cGMP'ye spesifiktirler. FDE-1, 2, 3, 10 ve 11 gibi diğer FDEs ise karışık spesifiteye sahiptirler. FDEs arasında FDE-5 beyin, düz kas, akciğer, trombosit ve böbrek gibi birçok dokuda bulunmaktadır.[1] FDE-5 inhibitörleri, cGMP'nin fosfodiester bağlarını koparark hidrolizini gerçekleştiren FDE-5'in aktivitesini bloke etmek suretiyle, intrasellüler cGMP'nin etkilerinin devam etmesinde önemli rol oynarlar.[144] Hormonal cevabın süresi ve genişliği, cAMP'nin hidrolizini sağlayan FDEs'ne bağlıdır.[145] Aynı zamanda bu durum cGMP bağımlı guanilat siklaz ile cGMP oluşumu ve FDEs'nin aktivitelerine bağlı olarak cGMP için de geçerlidir.[7]

FDEs hücrenin sinyal iletiminde önemli bir role sahiptir. Kemik hücrelerinde FDEs hakkında çok az şey bilinmektedir.[5] Ancak bu enzimlerden FDE-5, diğer fosfodiesterazlara kıyasla kendi bağlanma bölgelerine cGMP'nin daha yüksek afinite göstermesinden dolayı daha önemli hale gelmiş[7] ve çalışmalar daha çok FDE-5 üzerinde yoğunlaşmıştır. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda FDE-5'in vasküler pulmonerler, viseral düz kaslar, iskelet kasları gibi dokularda bulunduğu tespit edilmiştir.[146]

2.21. Fosfodiesteraz-5 İnhibitörleri (FDE-5Is)

FDE-5Is, korpus kavernozum ve onu besleyen kan damarlarında cGMP düzeyini yeterli tutmak suretiyle cinsel uyarıya cevap olarak NO'in gevşetici etkilerini artırmaktadır. Korporal sinüzoidler, meydana gelen artmış dilatasyon etkisiyle ereksiyonu indükleyen kan akışının daha fazla olmasına izin verir.

Yapılan çalışmalarda sildenafil[147,148] zaprinast[147] tadalafil, vardenafil, avanafil ve udalafil maddelerinin FDE-5Is olduğu rapor edilmiştir.[148]

2.22. Çalışmada Kullanılan FDE-5 İnhibitörleri

Çalışmamızda, FDE-5Is'nden olan Avanafil ve Zaprinast kullanıldı.

2.22.1. Avanafil

Avanafil (4-[(3-kloro-4-metoksibenzil) amino]-2-(2-(hidroksimetil)-1-prolidinil]-N-(2-pirimidinilmetil)-5-pirimidin karboksamid) Mitsubishi Tanabe İlaç Anonim Şirketi (Osaka, japan) tarafından geliştirilen seçici bir PDE inhibitörüdür.[149,150] Avanafil, FDE-6'ya karşı sildenafil ve vardenafil ile karşılaştırıldığında sırasıyla yaklaşık 7 ve 6 kat olmak üzere daha yüksek seçici özelliğe sahiptir FDE-1'e karşı inhibisyon özelliği sildenafil ve vardenafil ile karşılaştırıldığında sırasıyla yaklaşık 30 ve 10 kat daha fazla seçici özelliğe sahip iken, PDE-11'i inhibe etmediği rapor edilmiştir. Renk görme bozukluklarının bazı FDE inhibitörlerinin spesifik olmayan inhibisyonuna bağlı olduğuna inanılmaktadır.[151,152]

Daha önce yapılan iki çalışmada, sağlıklı erkek gönüllülerde avanafil'in farmakokinetik özellikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmalardan birincisi 48 kişide yapılmış ve deneklere 50, 100 ve 200 mg tek doz olarak avanafil verilmiştir. İkinci çalışma 15 kişide yapılmış ve vücut kitle indeksine göre 7 gün boyunca günde 200 mg

tek doz olmak üzere avanafil ile doz analizi tekrarlanmıştır. Bu sağlıklı gönüllülerde avanafil iyi tolere edilmiş ve en sık bildirilen yan etkilerin baş ağrısı, kızarma ve burun tıkanıklığı olduğu rapor edilmiştir. Ortalama T_{max} 35 dakika olarak bulunmuştur.[148] Preklinik çalışmalar avanafil'in yarışmalı olarak güçlü bir şekilde FDE-5'i de inhibe ettiğini (maksimum inhibisyon konsantrasyonu 5,2 nM) ortaya koymuştur.[150,153]

2.22.2. Zaprinast

Zaprinast (5- [2-propoksifenil] -1H- [1,2,3] triazolo [4,5-d] pirimidin-7 [4H]-one) kimyasal olarak sildenafil gibi FDE-5 inhibitörleri ile ilişkili bir prekürsördür. Zaprinast seçici bir FDE-5, 6, 9 ve 11 inhibitörüdür.[154] Bu enzim üzerine sırasıyla enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerleri sırasıyla 0.76, 0.15, 29 ve 12 μM'dır.[155,156] Zaprinast'ın aynı zamanda insan ve hayvanlarda GPR35 olarak da bilinen G proteinine bağlı reseptör aktivatörü olduğu gösterilmiştir.[155] Bu durumun klinik önemi henüz belirlenememiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalkalayıcı	: JEIO TECH, model SK-300 (Kore)
Dansitometre	: Hologic
Derin dondurucu (-20 ve -80^{o}C)	: SANYO (Japan)
Dijital fotoğraf makinası	: FUJİFİLM Corporatioon Dijital Camera, FinePix S2995
ELISA cihazı	: Biotek
HPLC cihazı	: Agilent (Germany)
Hasas terazi	: Shimadsu, model AUX320
İnkübatör	: JEIO TECH, model ON-11, (Kore ve Wiseven)
Leica ışın mikroskobu	:
Magnetik karıştırıcı	: NÜVE, model MK418
Otomatik pipetler	: Eppendorf, Gilson
pH metre	: HANNA, model H12211 ve Thermo
Saf su cihazı	: Mes, MP Minipure
Vorteks	: JEIO TECH, model UM 96EB (Kore)

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4), triklor asetik asit (TCA), sodyum asetat ($NaCH_3COO$), hidroklorik asit (HCl), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), metiyonin, etanol (C_2H_5OH), sodyum hidroksit (NaOH), metanol (CH_3OH), asetik asit (CH_3COOH) MERCK'den, Lityum perklorat ($LiClO_4$), Benzoquinone [$C_6H_4(=O)_2$], dG

standardı, 8-OHdG standardı, CoQ10, 1,1,3,3-tetraetoksipropan, FDE-5 inhibitörü olarak kullanılan zaprinast ($C_{13}H_{13}N_5O_2$) Sigma Aldrich Company'den, avanafil ($C_{23}H_{26}ClN_7O_3$) Mitsubishi Tanabe Pharma Corporation (STENDRA:Licensor: ©2014 Auxilium Pharmaceuticals, Inc. STE-00460)'dan temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı

A) MDA tayininde kullanılan çözeltiler

1.Ortofosfrik asit çözeltisi (0.44 M): %85'lik ve yoğunluğu 1.685 g/mL olan ortofosforik asit'den 1.003 mL alındı ve bir miktar distile suya ilave edildi. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.TBA çözeltisi (42 mM): 0.606 g TBA tartılarak bir miktar distile suda, magnet yardımıyla uzun süre karıştırılarak çözüldü. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.NaOH çözeltisi (1 M): 4 g NaOH tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim 100 mL'ye tamamlandı.

4.Alkali metanol çözeltisi: 50 mL metanol'e 4.5 mL 1 M'lık NaOH ilave edilerek hazırlandı.

5.Mobil faz: 4:6 oranlarında 50 mM fosfat tamponu (pH:8) ile metanol karıştırılarak hazırlandı.

6.Standart çözelti (200 µM): 50 µL tetraetoksi propan alınarak bir miktar distile suya ilave edildi. Son hacim distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

B) Redükte CoQ10 tayininde kullanılan çözeltiler

1.Benzoquinon çözeltisi (2 mg/mL): 200 mg benzoquinon tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.Lityum perklorat çözeltisi (50 mM): 0.532 g lityum perklorat tartılarak bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

3.Standart Çözelti (58 nm): 50 mg CoQ10H tartıldı ve bir miktar 5:1 oranında propanol-su karışımında çözüldü. Son hacim 5:1 oranındaki propanol-su karışımı ile 1 L'ye tamamlandı.

4. Mobil faz: 50 mM lityum perkolorat çözeltisi, 700 mL etanol ve 200 mL metanol karışımı üzerine ilave edilerek hazırlandı.

C) Okside CoQ10 tayininde kullanılan çözeltiler

1.Benzoquinone çözeltisi (2 mg/mL): 200 mg benzoquinone tartıldı ve bir miktar distile suda çözüldü. Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.Standart Çözelti: 50 mg CoQ10 tartılarak bir miktar 5:1 oranındaki propanol-su karışımında çözüldü. Son hacim 5:1 oranındaki propanol-su karışımı ile 1 L'ye tamamlandı.

3. Mobil faz: 13:7 oranında olacak şekilde 650 mL etanol ve 350 mL metanol karıştırılarak hazırlandı.

D) 8-OHdG tayininde kullanılan çözeltiler

1.Triton X-100 (50 mM): 756 µL alındı ve saf su ile 25 mL'ye tamamlandı.

2.Tris Tamponu (50 Mm, pH:8): 0.304 g katı tris tartılarak yaklaşık 40 mL suda çözüldü ve pH'ı 8'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

3.Fosfat Tamponu (50 mM, pH:5.5): 8.7 g K_2HPO_4 tartılarak 900 mL suda çözüldü. pH metre yardımıyla pH'ı 5.5'e ayarlandı. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

4.Mobil faz: 50 mM'lık 970 mL fosfat tamponu üzerine 30 mL asetonitril ilave edilerek hazırlandı.

5.Standart çözelti (3.53 µM): 1 mg 8-OHdG bir miktar saf suda çözüldü. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

3.2. Deney Hayvanlarının Temin Edilmesi ve Grupların Oluşturulması

Bu çalışma için Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurul Başkanlığı (YÜHADYEK)'ndan etik kurul izni alınarak, çalışma için gerekli olan 24 adet dişi ve 24 adet erkek albino ırkı deney hayvanı (sıçan) YYÜ Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilmiştir. Deney hayvanları eşit sayıda 8 gruba ayrılarak, her bir grup 6 adet deney hayvanından oluşturulmuştur (n=6).

İlk 4 grup, 8 aylık dişi ratlardan seçilerek overektomi yöntemi ile OP çalışmasında kullanılmak üzere ayrılmıştır. Diğer 4 grup ise 8 aylık erkek ratlardan oluşturulmuş ve GC indüklemesi yöntemi ile OP oluşturma çalışmasında kullanılmıştır. Overektomi ve GC indükleme yöntemi ile OP oluşturulacak gruplar ile şahm grupları, aşağıdaki şekilde planlanmıştır:

1- Sadece dişi ratlardan oluşan ve abdomen bölgesi 2 cm kadar açılıp tekrar kapatılan ve herhangi bir müdahale yapılmayan şahm grubu (Grup 1)

2- Sadece dişi ratlardan oluşan ve overektomi yöntemiyle OP oluşturulan ve tedavi uygulanmayan pozitif kontrol grubu (Grup 2)

3- Sadece dişi ratlardan oluşan ve overektomi yöntemiyle OP oluşturulan ve günde tek doz olmak üzere 60 gün boyunca oral yolla 10 mg/kg dozda zaprinast ile tedavi edilen grup (Grup 3)

4- Sadece dişi ratlardan oluşan ve overektomi yöntemiyle OP oluşturulan ve günde tek doz olmak üzere 60 gün boyunca oral yolla 10 mg/kg dozda avanafil ile tedavi edilen grup (Grup 4)

5- Sadece erkek ratlardan oluşan ve herhangi bir müdahale yapılmayan GC temelli sağlıklı kontrol grubu (Grup 5)

6- Sadece erkek ratlardan oluşan ve günde tek doz olmak üzere 30 gün boyunca deri altı (subkutan) 120 µg/kg DEX verilen ve tedavi edilmeyen pozitif kontrol grubu (Grup 6)

7- Sadece erkek ratlardan oluşan ve günde tek doz olmak üzere 30 gün boyunca deri altı (subkutan) 120 µg/kg DEX ile birlikte günde tek doz olmak üzere oral yolla 10 mg/kg dozda zaprinast ile tedavi edilen grup (Grup 7)

8- Sadece erkek ratlardan oluşan ve günde tek doz olmak üzere 30 gün boyunca deri altı (subkutan) 120 µg/kg DEX ile birlikte günde tek doz olmak üzere oral yolla 10 mg/kg dozda avanafil ile tedavi edilen grup (Grup 8)

3.3. Dişi Sıçanlarda Overektomi ile OP İndükleme Yöntemi

Overektomi yöntemiyle çalışılacak ilk 4 gruptan birincisinin anestezi altında abdomen bölgesi %75'lik etanol solüsyonu ile dezenfekte edildikten sonra cerrahi girişimle yaklaşık 2 cm kadar açıldı ve tekrar kapatıldı (şahm grubu). Diğer üç gurubun overektomi ile indüklenen OP oluşturma prosedürü Lien ve ark. (2009)'nın kullandığı metoda göre[157], cinsel olgunluğa ulaşan dişi sıçanların abdomen bölgesi %75'lik etanol solüsyonu ile dezenfekte edildikten sonra cerrahi girişimle açıldı. Overiumları bağlanıp kesildikten sonra rahim ve yağ dokusu geri konularak dikildi ve postoperatif bakımları ayrı ayrı kafeslerde yapıldı. Postoperatif bakımdan sonra overleri çıkarılan gruplarda OP oluşumu için yaklaşık 6 ay beklendi.[157] Şekil 3.1'de overektomi işlemlerine ait prosedürlerin pratikte uygulanması ile ilgili bazı resimler gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İnhibitör uygulama öncesi dişi ratlarda uygulanan overektomi işlemlerine ait bazı resimler

3.4. Overektomi İle OP Oluşturulan Gruplarda İnhibitör Uygulama Yöntemi

Overektomi yöntemi ile yapılacak çalışmada sağlıklı ve pozitif kontrol grupları dışındaki tedavi uygulanacak gruplara inhibitör uygulama işlemi Yaman ve ark. (2011)'nın kullandığı metoda göre yapıldı.[4] Tedavi gruplarından birine günde tek doz olmak üzere 10 mg/kg dozda 60 gün boyunca oral olarak avanafil, diğer gruba ise 60 gün boyunca günde tek doz olmak üzere 10 mg/kg dozda zaprinast verildi.[4]

3.5. Glukokortikoid ile OP İndükleme Yöntemi

8 aylık erkek sıçanlardan sağlıklı kontrol grubu dışındaki diğer gruplara Elvy Suhana ve ark. (2013)'nın uyguladıkları metodun[158] modifiye edilmesiyle 30 gün boyunca günde tek doz olmak üzere subkutan 120 μg/kg kortizol türevi olan DEX verilerek OP gelişmesi sağlandı.[158]

3.6. GC ile OP İndüklenen Gruplarda İnhibitör Uygulama Yöntemi

GC ile OP indükleme yöntemi erkek sıçanlarda sağlıklı ve pozitif kontrol grubu dışındaki gruplardan birisine 30 gün boyunca günde tek doz olmak üzere oral olarak avanafil (10 mg/kg), diğer gruba ise 30 gün boyunca günde tek doz olmak üzere oral olarak zaprinast (10 mg/kg) verildi.

3.7. Tedavi Öncesi ve Sonrası KMY Ölçümü

Kontrol grupları ve OP oluşturulmuş diğer gruplarda tedavi öncesi ve sonrası anestezi altında kemik yoğunluğu daha önce ratlara uyumlu kalibrasyon örneği ile kalibre edilen dansitometre (Hologic) cihazı ile ölçüldü.

3.8. Tedavi Öncesi ve Sonrası Numune Alma

Overektomi ve GC ile indüklenen OP gruplarının tedavi öncesi ve sonrasında olmak üzere metabolik kafeste 24 saatlik idrarları toplandı ve çalışılıncaya kadar -80^{o}C'de bekletildi. Tedavi sonrasında deney hayvanları anestezi altında uyutuldu ve intrakardiyak olarak kanları ve kemik dokuları alındı.

3.9. Biyokimyasal Ölçümler İçin Kan ve Plazma Ayırma

İntrakardiyak olarak enjektör yardımıyla hemogram tüplerine alınan tam kanın bir kısmı, 2500 g'de 15 dk santrifüj edildi ve elde edilen plazmalar parçalara bölünerek çalışılıncaya kadar -80^{o}C'de bekletildi. Ayrıca tam kan ve idrar örnekleri *küçük numuneler* şeklinde -80^{o}C'de bekletildi.

3.10. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Deney hayvanlarından alınan kan numunelerinden elde dilen plazma örneklerinde, ticari olarak elde edilen ve ELISA yöntemiyle ile çalışan kitler (Eastbiopharm marka) ile eNOS, FDE-5 aktiviteleri, cGMP, NO ve kemik aktivitesini ve oluşumunu gösteren CTCP, PICP ile idrarda kemik yıkım marker'ları olarak bilinen PD ve DPD ve dişi sıçanlarda östrojen, erkek sıçanlarda kortizol düzeyleri kit prospektüslerine uygun olarak çalışıldı. Yine GC ile indüklenen OP oluşturulmuş gruplarda plazma kortizol düzeyleri, overektomi ile osteoporoz oluşturulan gruplarda plazma östrojen seviyesi Architect İ4000 cihazında ölçüldü.

3.11. MDA Ölçümü

50 µL plazma örneği alınarak bir tüpe konuldu. Üzerine 750 µL 0.44 M H_3PO_4, 250 µL TBA ve 450 µL distile su ilave edildi. Tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak 60 dk.

kaynar su banyosunda bekletildi. Sonra buzda veya çeşme suyunda soğutuldu. Üzerine alkalen metanolden (50 ml metanol + 4.5 mL ve 1 M NaOH) 1:1 oranında (1.5 mL) ilave edildi. 2500 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Üst bölümde kalan süpernatandan 200 µL alınarak bir viale kondu ve HPLC cihazına verildi.

HPLC için ölçüm kolonu olarak 150x4.6 mm ve 5µm patikül genişliği RP18 kolon kullanıldı. Mobil faz için 400 mL 50 mM fosfat tamponu (pH:6.8) ve 600 mL metanol birbirine karıştıralarak hazırlandı. Cihazın akış hızı 0.8 mL/dk'ya enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı. 527 nm eksitasyon 551 nm emisyon dalga boylarında floresan dedektörde farklı konsantrasyonda hazırlanan standart numunelere karşı okuma yapıldı.

3.12. CoQ10 Ölçümü

Okside CoQ10; 200 µL numuneye 50 µL benzokinon (2mg/mL) ilave edildi ve 10 sn. vortekslendi. Çözünme tam olmamış ise bu işlem tekrarlandı. 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 1 mL propanol ilave edildi. 10 sn. vortekslendikten sonra 4000 *g*'de 6 dk. santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatandan 200 µL bir viale kondu ve HPLC cihazına verildi.

Mobil faz için 650 mL etanol ve 350 mL metanol karışımı kullanıldı. Kolon olarak 25x4.6 mm 5 µm partikül genişliğine sahip C18 kolon kullanıldı. Cihazın akış hızı 0.8 mL/dk'ya enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı. UV dedektörde 275 nm'de farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlara karşı okuma yapıldı.

Total CoQ10; 200 µL numuneye 50 µL benzokinon (2 mg/mL) ilave edildi ve 10 sn vortekslendi. Çözünme tam olmamış ise bu işlem tekrarlandı. Sonra 1 mL lityum perklorat eklendi. 10 dk. oda sıcaklığında inkübasyondan sonra 1 mL propanol ilave edildi. 10 sn. vortekslendikten sonra 4000 g'de 6 dk. santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatandan 200 µL bir viale kondu ve HPLC cihazına verildi.

Mobil faz için 70:20:10 oranlarında etanol-metanol-lityum perklorat (50 mM) karışımı kullanıldı. Kolon olarak 25x4.6 mm 5 µm partikül genişliği olan C18 kolon kullanıldı. Cihazın akış hızı 0.8 mL/dk'ya enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı. UV dedektörde 275 nm'de farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartlara karşı okuma yapıldı.

3.13. 8-OHdG ve dG Ölçümü

DNA izolasyon kiti (invitrogen marka) ile kit prospektüsüne uygun şekilde tam kan örneklerinden lökosit DNA'sı izole edildi. Sonra 150 µL'lik DNA örneğine aynı hacimde formik asit ilave edilerek 150 ^{o}C'ye ayarlanmış etüvde yaklaşık 30 dk. inkübasyondan sonra üzerine 100 µL asetonitril ilave edilerek viallere kondu ve HPLC cihazında 600 mV'a ayarlanan ECD'de 8-OHdG ve 275 nm'ye ayarlanan UV dedektörde dG, farklı standartlara karşı okutuldu.

Mobil faz: 970 mL fosfat tamponu (pH:5.5 ve 50 mM) üzerine 30 mL asetonitril karıştırılarak hazırlandı. Kolon olarak 15x4.6 mm 5 µm partikül genişliğine sahip C18 kolon kullanıldı. Cihazın akış hızı 0.8 mL/dk'ya enjeksiyon hacmi 20 µL'ye ayarlandı.

3.14. Kemik Dokularında Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Ölçüm

Yapılan nekropsi sonucu histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan femur dokuları %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra, dekalsifikasyon için, dekalsifikasyon solüsyonu olan osteosoft (MERC, HC313331, Made in Germany) içerisinde 96-120 saat bekletilerek yumuşatıldıktan sonra akan çeşme suyunda 24 saat yıkandı. Doku takibinde %80'lik alkolde (12 saat x 2 defa), %90'lik alkolde (12 saat x 2 defa), %96'lik alkolde (12 saat x 2 defa), %100'lik alkolde (12 saat x 2 defa), kloroform (5 saat x 3 defa), sıvı parafinde (12 saat) işlemlerinden geçtikten sonra parafin bloklara

gömüldü. Her bloktan 4 μm kalınlığında kesitler alınıp lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar, Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu (Leica DM 1000) ile incelendi.

İmmunperoksidaz inceleme amacıyla adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden geçirilerek, deparafinize ve dehidrate edildi. Daha sonra distile suda 5 dk yıkandı. Kesitler, çekirdekteki antijen maskelenmesini önlemek amacıyla, antijen retrival (sitrat buffer, pH:6.1) solüsyonu içerisinde 5'er dk. süreyle 4 kez mikrodalga fırında ısıya tabi tutuldu. Mikrodalga fırından çıkarıldıktan sonra 30 dk. süreyle oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Bu sürenin sonunda distile su ile yıkanıp, kesitlerin etrafı kurulanarak özel cam kalemi ile çizildi. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH:7.2) ile 5dk. yıkanıp, %3'lük H_2O_2 solüsyonu içerisinde 10 dk. tutularak, endojen peroksidaz inaktive edildi. PBS de 5-10 dk. yıkandıktan sonra, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek için tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan protein blok ile 5 dk. inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solüsyonunun fazlası döküldükten sonra yıkama yapılmadan primer antikorlar (CD 31) damlatıldı. Primer antikora uygun olarak 1 saat oda sıcaklığında ya da 1 gece +4°C'de bekletildi. PBS ile 2 kez 5'er dk. yıkanıp, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. süreyle inkübe edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz içinde 10-30 dk. süreyle bekletildikten sonra, PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere AEC (3-amino-9-etil-carbazol) kromojen damlatılarak, kromojeni almasına göre 5-10 dk. süre ile bekletildi. Zemin boyanması için *Mayer's hematoksilen'*de 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Su bazlı yapıştırıcı kullanılarak lamel ile kapatıldı.[159]

3.15. İstatistiksel değerlendirme

Çalışmamızdaki sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; Medyan, ortalama ve standart sapma değerleri olarak ifade edilirken, bu değişkenler bakımından grup ortalamalarını karşılaştırmada Kruskal-Wallis analizi yapıldı. Dişi sıçanlarda overektomi öncesi, overektomi sonrası ve inhibitör uygulama ve tedavi sonrası zamanlar arası ortalamaları karşılaştırmada Tekrarlı Ölçümlü Varyans Analizi yapıldı. Farklı grupları belirlemede Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede gruplarda ayrı ayrı olmak üzere Pearson korelasyon katsayıları hesaplandı. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (version 20) istatistik paket programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarında KMY Ölçüm Sonuçları

Bu işlem için 10 mg/kg dozda ketamin verilerek anestezi altına alınan deney gruplarının tamamında, çalışma öncesi KMY ratlara uyumlu dansitometre (HOLOGIC marka) cihazında ölçüldü (Şekil 4.1) . Dişi rat gruplarından elde edilen sonuçlara göre grup ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Dansitometre ile, uygulama ve tedavi öncesi KMY ölçüm işlemleri

Overektomi ve inhibitör uygulama öncesi dişi sıçanlarda KMY değerlerinin grup ortalamalarının 0.188±0.013 ile 0.190±0.006 aralığında değiştiği ve biribirine yakın olduğu belirlendi (Tablo 4.1). Overektomi işleminden 6 ay sonra deney hayvanlarında OP'un gelişip gelişmediğini kontrol için gerçekleştirilen KMY ölçümü sonuçlarının yaş

artışına bağlı olarak sağlıklı kontrol grubunda arttığı ve 0.209±0.005 seviyesine kadar çıkığı tespit edildi. Ancak bu artışın overektomi yapılan diğer gruplarda durduğu ve hatta kısmende olsa azaldığı gözlendi. FDE-5Is ile 2 ay tedaviden sonra elde edilen KMY ölçümlerinde, zaprinast ve avanafil grubu ortlamalarının sırasıyla 0.205±0.002 ve 0.218±0.007'ye kadar yükseldiği tespit edildi. Pozitif kontrol grubunda ise herhangi bir değişim belirlenmedi (Şekil 4.2) . Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1'de tolu olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Dişi deney gruplarında overektomi ve tedavi öncesi ile overektomiden 6 ay ve FDE-5Is ile 2 ay tedaviden sonra elde edilen KMY'na ait ölçüm sonuçları

Gruplar	**Overektomiden Önce KMY (g/cm^2)**	**Overektomiden 6 ay Sonra KMY (g/cm^2)**	**Tedaviden Sonra KMY (g/cm^2)**
Şahm Grubu	0.188±0.013	0.209±0.005	0.208±0.001
Pozitif Kontrol	0.186±0.003	0.182±0.004*	0.183±0.006*
Zapinast Grubu	0.190±0.006	0.185±0.006*	0.205±0.002*,#
Avanafil Grubu	0.187±0.006	0.183±0.006*	0.218±0.004*,**,#

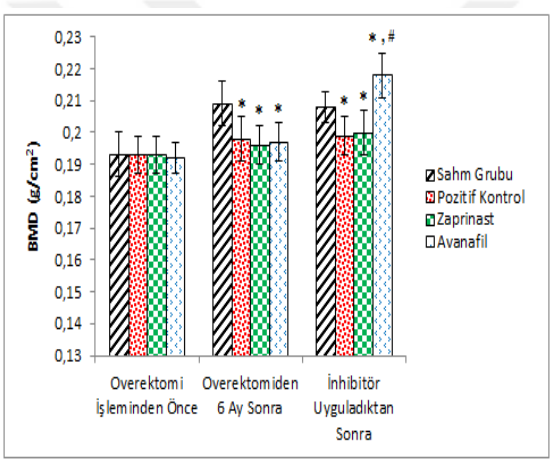
"*" : Şahm grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).
"**" : Pozitif kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).
"#" : Aynı gruplarda tedavi öncesi ve sonrası fark anlamlı ($p<0.05$).

Erkek rat gruplarında uygulama ve tedavi öncesi elde edilen sonuçlarda bütün gruplarda grup ortalama KMY değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu ve 0.200±0.008 ile 0.206±0.005 aralığında değiştiği görüldü (Tablo 4.2). Erkek deney gruplarında uygulama ve tedavi sonrasında bütün grupların yaş artışına bağlı olarak KMY değerlerinin yükseldiği gözlendi. Ancak en düşük değerin, 0.215±0.005 ile yalnızca DEX verilen pozitif kontrol grubuna ait olduğu görüldü. Ayrıca DEX uygulaması yapılan gruplarda en yüksek değerin 0.232±0.005 ile avanafil grubuna ait olduğu belirlendi (Şekil 4.3).

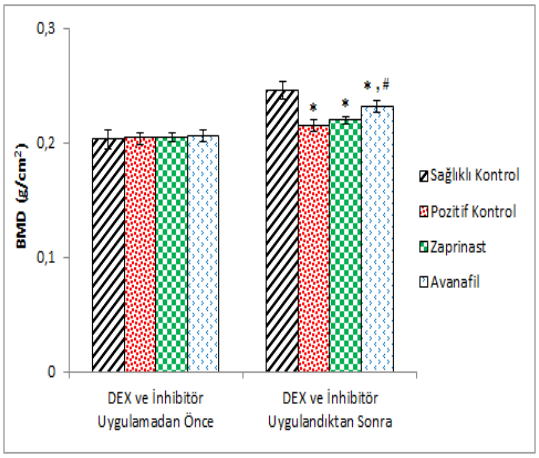
Tablo 4.2. Erkek sıçanlarda DEX ve inhibitör uygulama öncesi ile sonrasında elde edilen KMY'na ait ölçüm sonuçları

Gruplar	Uygulama ve Tedavi Öncesi KMY (g/cm^2)	Uygulama ve Tedavi Sonrası KMY (g/cm^2)
Sağlıklı Kontrol	0.203±0.008	0.246±0.008
Pozitif Kontrol	0.204±0.005	0.215±0.005*
Zapinast Grubu	0.205±0.004	0.220±0.003*
Avanafil Grubu	0.206±0.005	0.232±0.005*,**

"*":Sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$)
"**"Pozitif kontrol ve zaprinast grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$)



Şekil 4.2. Overektomi öncesi, sonrası ve inhibitör uygulama sonrası dişi sıçanlardan elde edilen KMY değerlerinin karşılaştırılması



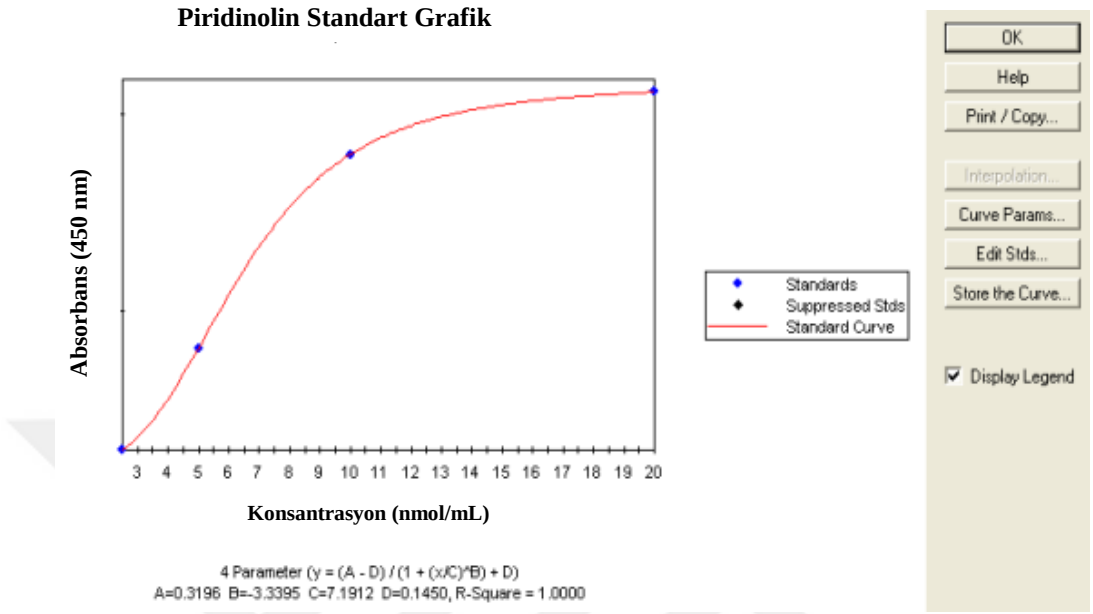
Şekil 4.3. DEX ve inhibitör uygulama öncesi ve sonrası erkek sıçan gruplarına ait KMY ölçüm sonuçlarının karşılaştırılması

"*: Şahm veya sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$). "#": Diğer gruplara göre anlamlı ($p<0.05$)"

4.2. Uygulama, Tedavi Öncesi ve Sonrasında Alınan İdrar Örneklerinde PD Ölçüm Sonuçları

Overektomi ve tedavi işlemleri öncesinde deney gruplarındaki tüm ratlardan idrar örnekleri alındı. Alınan idrar örneklerinde kemik yıkım marker'ları olan PD ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile ELISA cihazında kit prospektüsüne uygun şekilde ölçüldü. 2.5, 5, 10 ve 20 nmol/mL konsantrasyonda hazırlananan standartların

absorbansı ölçülerek PD'e ait absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Overektomi ve inhibitör uygulama öncesi elde edilen PD'e ait standart grafik.

Elde edilen absorbans değerleri standart grafiklere ait denklemde yerine konularak sonuçlar hesaplandı. Elde edilen değerler nmol/mL şeklinde ifade edildi. Elde edilen sonuçlarla yapılan karşılaştırma sonucunda grupların medyan, ortalama, standart sapma değerleri ile p sayıları Tablo 4.3.ve 4.4'de verildi.

Tablo 4.3. Dişi sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda PD ölçüm sonuçları

Gruplar	**Overektomi ve Tedavi Öncesi PD Değerleri (nmol/mL)**	**Overektomi ve Tedavi Sonrası PD Değerleri (nmol/mL)**
Şahm Grubu	$11.933\pm0.964^{B,b}$	$14.254\pm3.341^{B,a}$
Pozitif Kontrol	$11.677\pm1.057^{B,b}$	$17.146\pm2.989^{A,a}$
Zapinast Grubu	$11.548\pm0.893^{B,a}$	$8.887\pm3.278^{C,b}$
Avanafil Grubu	$13.890\pm1.995^{A,a}$	$6.906\pm2.516^{C,b}$

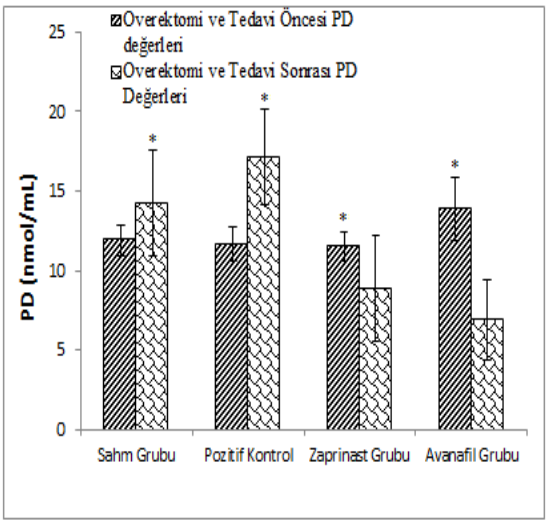
"A,B,C": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan grup değerleri diğer grup değerlerine göre anlamlı ($p<0.05$).
"a,b": Aynı satırda farklı küçük harfi alan grup değerleri birbirlerine göre anlamlı ($p<0.05$).

Dişi gruplarda PD ortalama değerlerinin uygulama ve tedavi öncesinde 11.933±0.964 ile 13.890±1.995 aralığında değişirken, overektomi ve tedavi sonrası ise 6.906±2.516 ile 17.146±2.989 arasında olduğu görüldü (Şekil 4.5). Erkek gruplarda PD ortalama değerlerinin, uygulama ve tedavi öncesinde 11.744±0.314 ile 14.123±1.568 aralığında değişirken, uygulama ve tedavi sonrasında ise 5.871±1.643 ile 7.701±1.313 aralığında değiştiği tespit edildi (Tablo 4.4, Şekil 4.6).

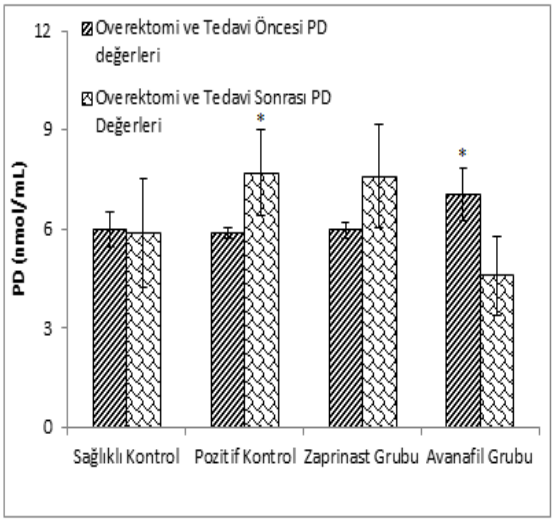
Tablo 4.4. Erkek sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda PD ölçüm sonuçları

Gruplar	Uygulama ve Tedavi Öncesi PD (nmol/mL)	Uygulama ve Tedavi Sonrası PD (nmol/mL)
Sağlıklı Kontrol	5.993 ± 0.538^{B}	5.871 ± 1.643^{AB}
Pozitif Kontrol	$5.872\pm0.157^{B,b}$	$7.701\pm1.313^{A,a}$
Zapinast Grubu	$5.970\pm0.238^{B,a}$	$7.595\pm1.556^{A,a}$
Avanafil Grubu	$7.061\pm0.784^{A,a}$	$4.601\pm1.179^{C,b}$

"A,B,C": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan grup değerleri diğer grup değerlerine göre anlamlı ($p<0.05$).
"a,b": Aynı satırda farklı küçük harfi alan grup değerleri birbirlerine göre anlamlı ($p<0.05$).



Şekil 4.5. Overektomi ve tedavi öncesi ile overektomi ve tedavi sonrası dişi sıçan gruplarına ait PD değerlerinin karşılaştırılması

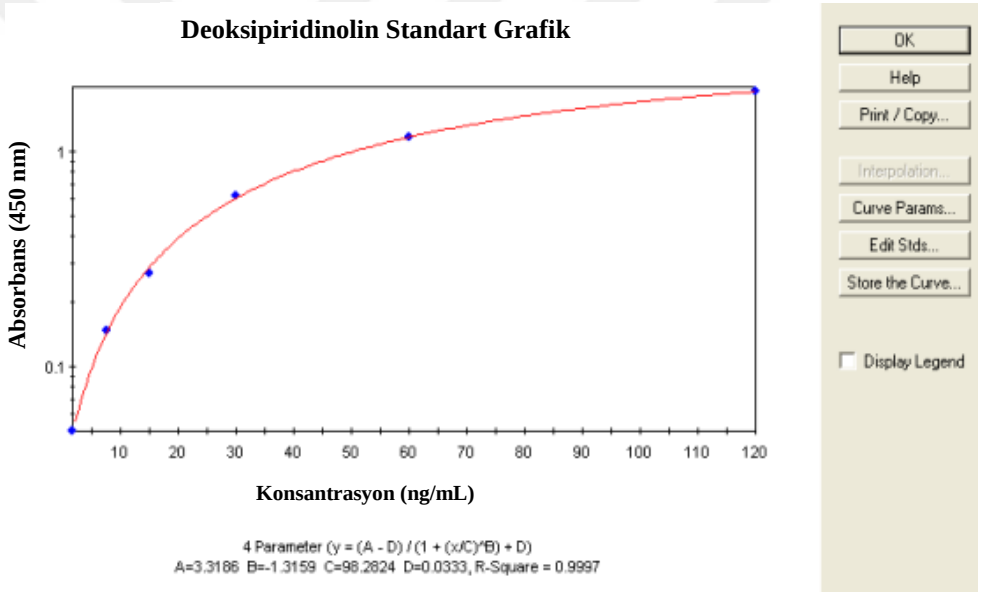


Şekil 4.6. DEX ve tedavi öncesi ile DEX ve tedavi sonrası erkek sıçan gruplarına ait PD değerlerinin karşılaştırılması

'*': Aynı grup içinde uygulama ve tedavi öncesi ile sonraki değerler arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$)

4.3. Uygulama, Tedavi Öcesi ve Sonrasında Alınan İdrar Örneklerinde DPD Ölçüm Sonuçları

Overektomi ve tedavi işlemleri öncesinde ve sonrasında ayrı ayrı olmak üzere deney gruplarındaki tüm deneklerden idrar örnekleri alındı. İdrar örneklerinde kemik yıkım marker'ları olan DPD ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile ELISA cihazında kit prospektüsüne uygun şekilde ölçüldü. 1.875, 7.5, 15, 30, 60, 120 nmol/mL konsantrasyonda hazırlananan standartların absorbansı ölçülerek DPD'e ait absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Overektomi ve inhibitör uygulama öncesi elde edilen DPD'e ait standart grafik.

Dişi gruplarda DPD ortalama ve standart sapma değerlerinin overektomi ve tedavi öncesinde 51.201±3.796 ile 54.962±4.721 aralığında değiştiği belirlendi. Ancak overektomi ve tedavi uygulama sonrası tüm gruplarda DPD değerlerinin 51.477±8.212 ile 70.321±8.360 aralığında değiştiği görüldü (Tablo 4.5). Erkek gruplarda DPD ortalama değerlerinin uygulama ve tedavi öncesinde 35.858±4.921 ile 36.684±3.321

aralığında değiştiği gözlendi. Ancak DEX uygulanan grupta uygulama ve tedavi sonrası tüm gruplarda DPD değerlerinin 30.938±7.966 ile 46.452±8.623 aralığında değiştiği tespit edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Dişi sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda DPD ölçüm sonuçları

Gruplar	Overektomi ve Tedavi Öncesi DPD Değerleri (nmol/mL)	Overektomi ve Tedavi Sonrası DPD Değerleri (nmol/mL)
Şahm Grubu	51.688±5.489	59.819±6.737
Pozitif Kontrol	52.920±2.440	70.321±8.360$^{\#}$
Zapinast Grubu	51.201±3.796	61.741±7.473
Avanafil Grubu	54.962±4.721	51.477±8.212*

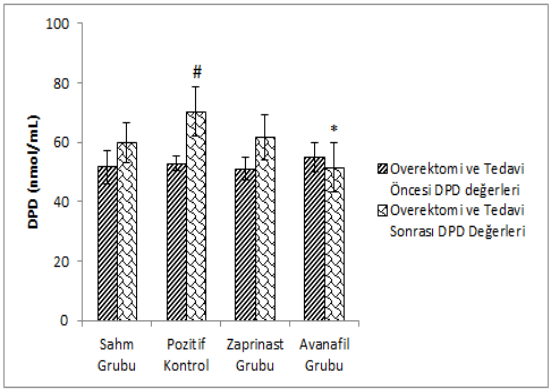
''*'': Overektomi ve tedavi sonrası pozitif kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$).
''#'': Overektomi ve tedavi öncesi ile overektomi ve tedavi sonrası pozitif kontrol grubu değerleri birbirlerine göre anlamlı ($p<0.05$).

Tablo 4.6. Erkek sıçanlarda uygulama ve tedavi öncesi ile uygulama ve tedavi sonrası alınan idrarlarda DPD ölçüm sonuçları

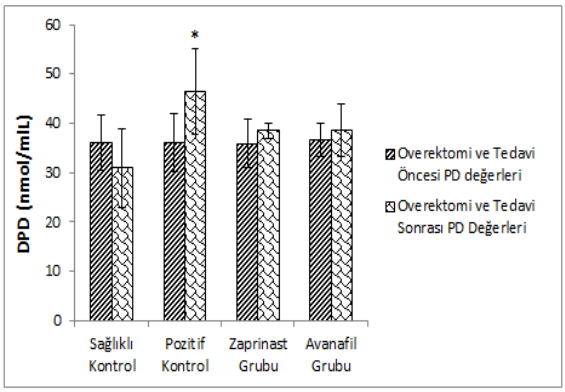
Gruplar	Uygulama ve Tedavi Öncesi DPD Değerleri (nmol/mL)	Uygulama ve Tedavi Sonrası DPD Değerleri (nmol/mL)
Sağlıklı Kontrol	36.144±5.750	30.938±7.966
Pozitif Kontrol	36.079±5.992	46.452±8.624*
Zapinast Grubu	35.858±4.921	38.457±1.582
Avanafil Grubu	36.684±3.321	38.712±5.367

''*'': Uygulama ve tedavi sonrası sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$).

Overektomi ve uygulama öncesi ile sonrası dişi rat gruplarındaki PD ve DPD düzeylerinin DEX ve inhibitör uygulama öncesi ve sonrası erkek rat gruplarındaki PD ve DPD değerlerinden daha yüksek olduğu görüldü. Ayrıca hem dişi hem de erkek rat gruplarında PD ve DPD düzeyleri toplamlarının dişi sıçanlarda erkek sıçanlara göre daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.8 ve 4.9).



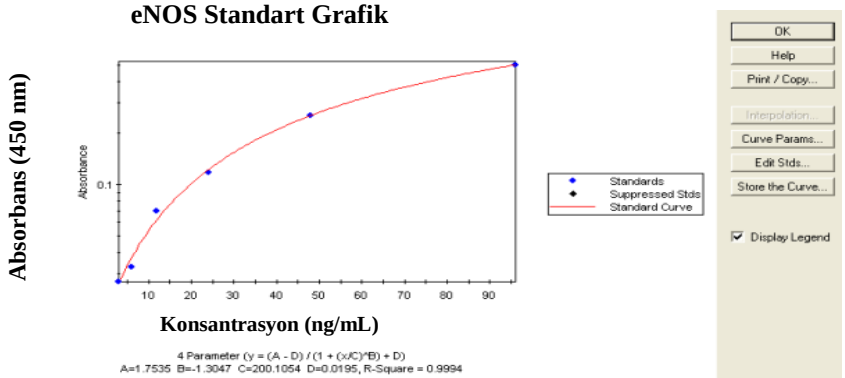
Şekil 4.8. Overektomi ve tedavi öncesi ile overektomi ve tedavi sonrası dişi sıçan gruplarına ait DPD değerlerinin karşılaştırılması
"*": Uygulama ve tedavi sonrası kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$). "#": Overektomi ve tedavi öncesi ile overektomi ve tedavi sonrası pozitif kontrol grubu değerleri birbirlerine göre anlamlı



Şekil 4.9. DEX ve tedavi öncesi ile DEX ve tedavi sonrası erkek sıçan gruplarına ait DPD değerlerinin karşılaştırılması
"*": Uygulama ve tedavi sonrası sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$).

4.4. Uygulama ve Tedavi Sonrası eNOS Ölçüm Sonuçları

Dişi ve erkek gruplarında uygulama sonrası anestezi altına intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazma örneklerinde eNOS değerleri ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile kit prospektüslerine uygun olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçüldü. 3, 6, 12, 24, 48 ve 96 ng/mL konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen eNOS'a ait standart grafik.

Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre istatistiksel karşılaştırma sonucunda grupların medyan, ortalama ve standart sapma değerleri ile p sayıları Tablo 4.7'de verildi.

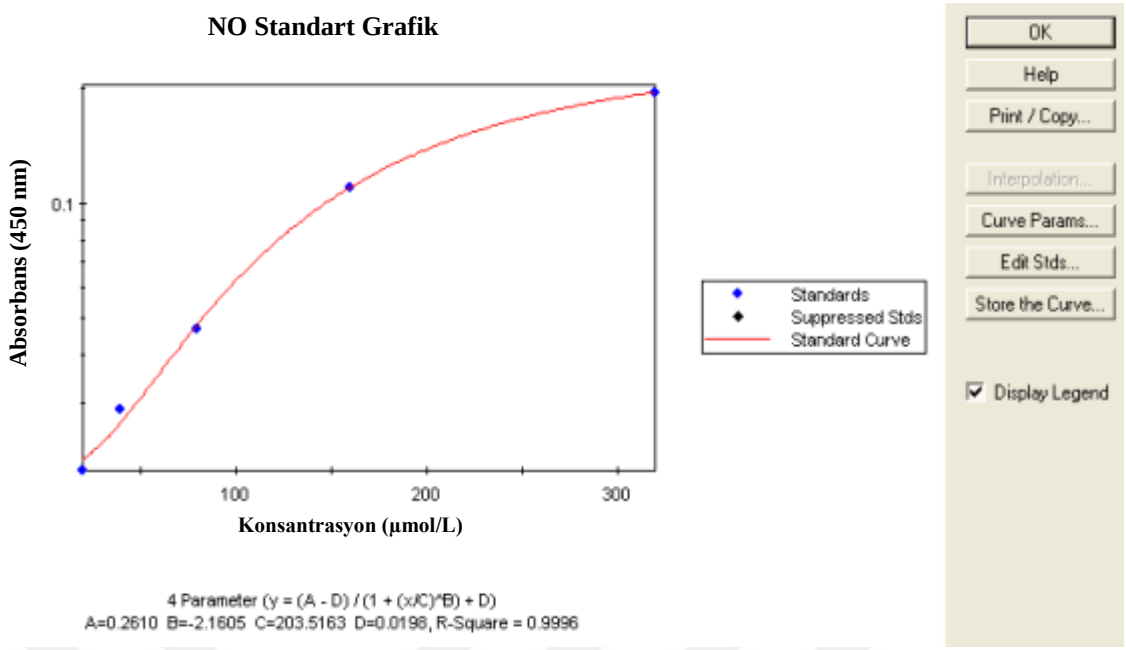
Tablo 4.7. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen eNOS değerlerinin karşılaştırılması.

	eNOS (ng/mL)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		**Erkek**	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	49.011	48.888 ± 0.428^{D}	51.833	51.804 ± 0.333^{B}
Pozitif Kontrol	51.178	51.035 ± 0.374^{C}	56.249	56.038 ± 0.660^{A}
Zaprinast	53.471	53.509 ± 0.291^{B}	56.508	56.460 ± 0.500^{A}
Avanafil	56.649	56.466 ± 0.753^{A}	56.173	56.279 ± 0.421^{A}
		$p<0.001$		$p<0.003$

''ABCD'': Aynı sütunda farklı harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (dişi $p<0.05$, erkek $p<0.03$).

4.5. Uygulama ve Tedavi Sonrası NO Ölçüm Sonuçları

Dişi ve erkek gruplarında uygulama sonrası anestezi altında intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazma numunelerinde NO değerleri, ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile kit prospektüslerine uygun olarak 450 nm dalga boyunda ELISA yöntemiyle cihazında ölçüldü. 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 µmol/L konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen NO'e ait standart grafik.

Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre yapılan istatistiksel değelendirme sonucunda grupların medyan, ortalama ve standart sapma değerleri p sayıları Tablo 4.8'de verildi.

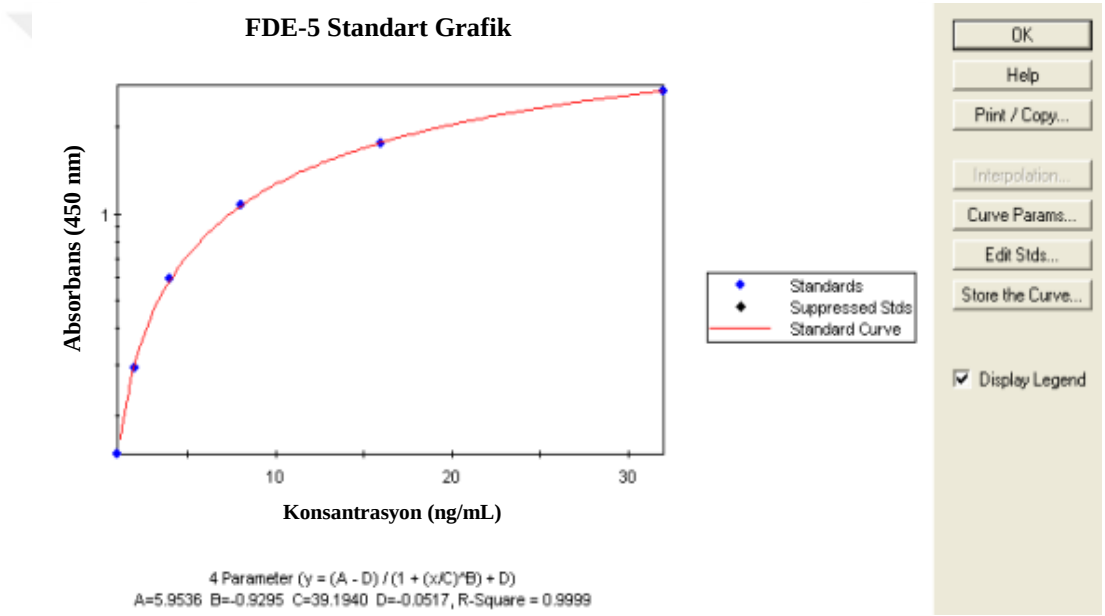
Tablo 4.8. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen NO değerlerinin karşılaştırılması.

	NO (µmol/L)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		**Erkek**	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	155.629	155.659 ± 2.191^{D}	185.920	186.554 ± 2.290^{C}
Pozitif Kontrol	183.398	183.269 ± 3.091^{B}	202.634	202.109 ± 3.394^{A}
Zaprinast	168.168	167.591 ± 2.829^{C}	195.434	196.561 ± 3.966^{B}
Avanafil	195.294	194.705 ± 3.640^{A}	199.385	199.212 ± 3.522^{B}
	$p<0.001$		$p<0.001$	

"ABCD": Aynı sütunda farklı harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir ($p<0.001$).

4.6. Uygulama ve Tedavi Sonrası FDE-5 Ölçüm Sonuçları

Dişi gruplarda everektomi ve inhibitör uygulama sonrası, erkek gruplarda DEX ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen plazma numunelerinde FDE-5 değerleri ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile, kit prospektüsüne uygun olarak ELİSA yöntemiyle 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçüldü. 2, 4, 8, 16, ve 32 ng/mL konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen FDE-5'e ait standart grafik.

Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre yapılan istatistiksel değelendirme sonucunda grupların medyan, ortalama ve standart sapma değerleri ile p değerleri Tablo 4.9'da verildi.

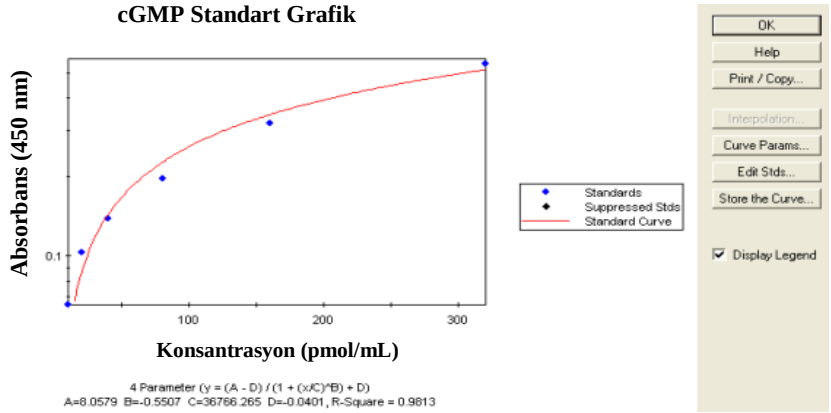
Tablo 4.9. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen FDE-5 değerlerinin karşılaştırılması.

	FDE-5 (ng/mL)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		Erkek	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama±S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama±S.Sapma**
Sağlıklı Kontrol	4.377	4.411 ± 0.190^{A}	5.247	5.247 ± 0.046^{A}
Pozitif Kontrol	4.308	4.335 ± 0.220^{A}	4.871	5.038 ± 0.377^{AB}
Zaprinast	3.920	3.988 ± 0.266^{B}	4.683	4.656 ± 0.605^{B}
Avanafil	3.842	3.860 ± 0.250^{B}	3.915	3.877 ± 0.554^{C}
		p<0.007		p<0.006

"ABCD": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (dişi p<0.007, erkek p<0.006).

4.7. Uygulama ve Tedavi Sonrası cGMP Ölçüm Sonuçları

Dişi ve erkek gruplarında uygulama sonrası anetezi altında intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazmada, cGMP değerleri ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile, kit prospektüsüne uygun olarak ELISA yöntemiyle 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçüldü. 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 pmol/mL konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen cGMP'a ait standart grafik.

Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak örnek konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda grupların medyan, ortalama ve standart sapma değerleri ile p sayıları Tablo 4.10'da verildi.

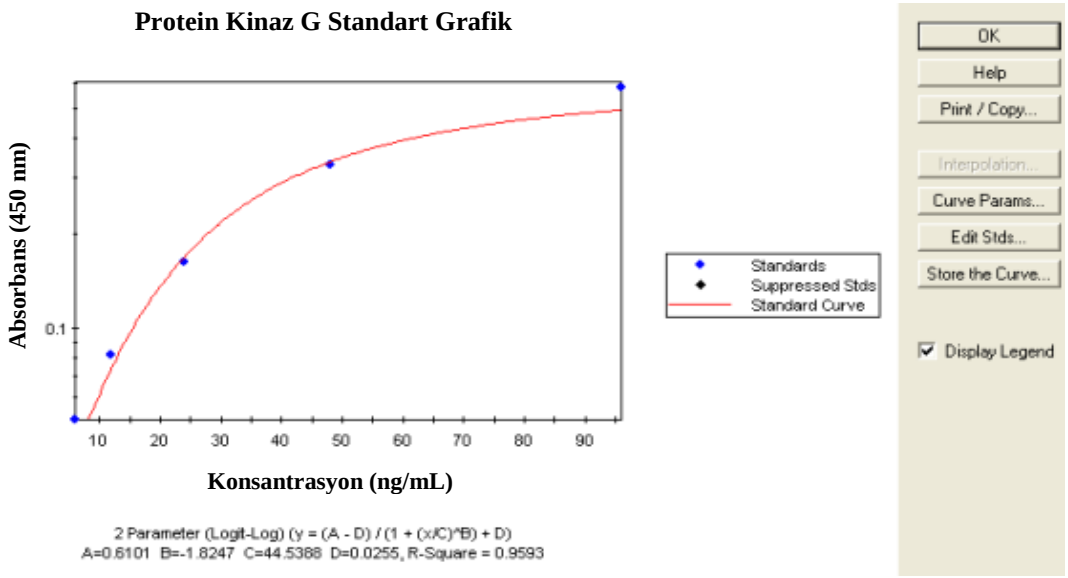
Tablo 4.10. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen cGMP değerlerinin karşılaştırılması.

	cGMP (pmol/L)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
Gruplar	**Dişi**		**Erkek**	
	Medyan	**Ortalama±S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama±S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	42.834	42.968 ± 0.606^{D}	38.061	37.901 ± 0.440^{D}
Pozitif Kontrol	47.092	47.305 ± 0.445^{C}	40.744	40.752 ± 0.645^{C}
Zaprinast	48.721	48.608 ± 0.422^{B}	42.515	42.515 ± 0.348^{B}
Avanafil	50.249	50.343 ± 0.619^{A}	45.325	45.481 ± 0.511^{A}
		$p<0.001$		$p<0.001$

"^{ABCD}": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir ($p<0.001$).

4.8. Uygulama ve Tedavi Sonrası PKG Ölçüm Sonuçları

Dişi ve erkek gruplarında uygulama sonrası anestezi altında intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazmalarda PKG değerleri ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile kit prospektüslerine uygun olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçüldü. 6, 12, 24, 48 ve 96 ng/mL konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.14). Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere yapılan istatisyiksel değerlendirme sonucunda grupların medyan, ortalama ve standart sapma değerleri ile p sayıları Tablo 4.11'de verildi.



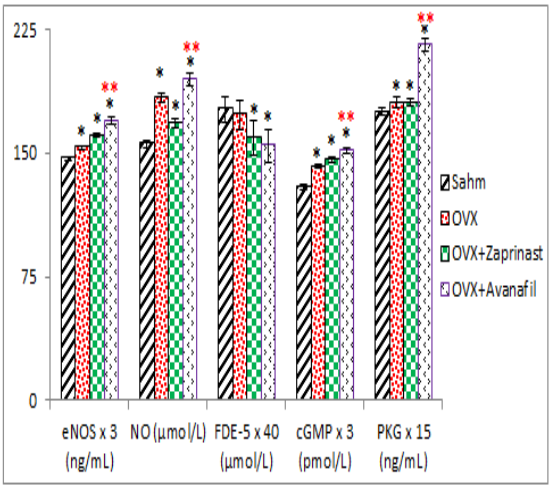
Şekil 4.14. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen protein kinaz-G'ye ait standart grafik.

Tablo 4.11. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen PKG değerlerinin karşılaştırılması.

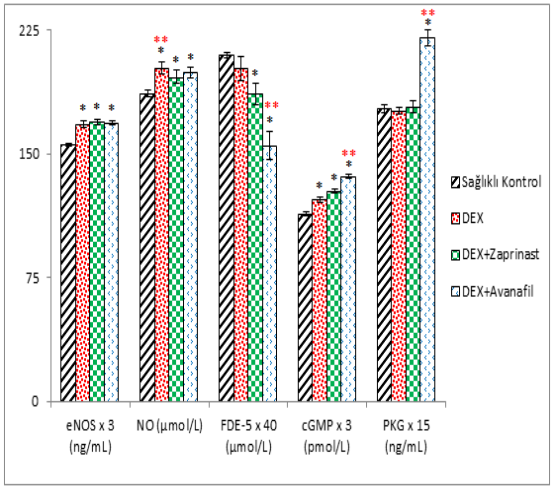
	PKG (ng/mL)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		Erkek	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama±S.Sapma**	**Medyan**	**Ortalama±S.Sapma**
Sağlıklı Kontrol	11.659	11.669 ± 0.126^{C}	11.831	11.821 ± 0.164^{B}
Pozitif Kontrol	12.058	12.041 ± 0.229^{B}	11.771	11.744 ± 0.161^{B}
Zaprinast	12.051	12.037 ± 0.122^{B}	11.872	11.914 ± 0.238^{B}
Avanafil	14.314	14.371 ± 0.246^{A}	14.779	14.710 ± 0.332^{A}
		p<0.001		p<0.002

"ABCD": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (dişi p<0.001, erkek p<0.002).

Şekil 4.15 ve 4.16'da sırasıyla dişi ve erkek sıçanlara ait eNOS, NO, FDE-5, cGMP ve PKG değerlerine ait grafikler karşılaştırmalı olarak toplu şekilde verilmiş ve aralarındaki istatistiksel farklar karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.15. Dişi sıçanlarda NO sinyal yolundaki parametre değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması
"*": Şahm grubuna göre anlamlı ($p<0.05$).
"**": Diğer gruplara göre anlamlı ($p<0.05$).

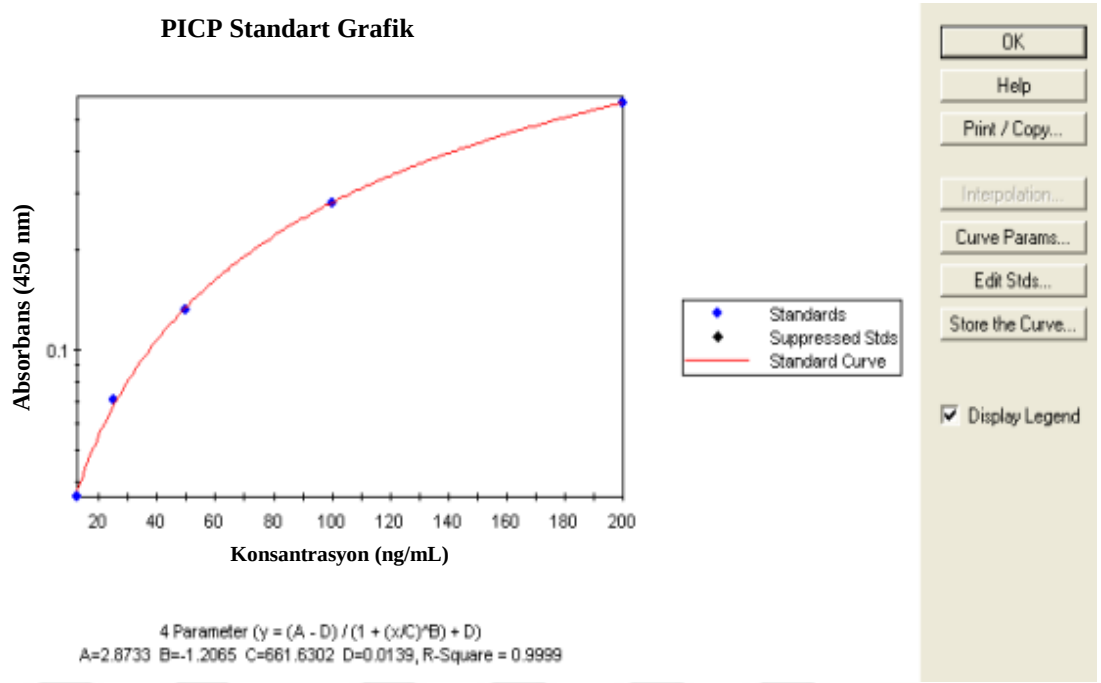


Şekil 4.16. Erkek sıçanlarda NO sinyal yolundaki parametre değerlerinin toplu olarak karşılaştırılması
"*":Sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$). "**": Diğer gruplara göre anlamlı ($p<0.05$). "ϕ": Sağlıklı ve DEX gruplarına göre anlamlı ($p<0.05$).

4.9. Uygulama ve Tedavi Sonrası PICP Ölçüm Sonuçları

Dişi ve erkek gruplarında uygulama sonrası anestezi altında intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazmalarda PICP değerleri ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile kit prospektüslerine uygun olarak 450 nm dalga boyunda ELISA yöntemiyle cihazında ölçüldü. 12,5 25, 50, 100 ve 200 ng/mL konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-konsantrasyon standart grafiği çizildi (Şekil 4.17).

Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre yapılan istatsitiksel değerlendirme sonucunda grupların ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.12'de verildi.



Şekil 4.17. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen PICP'a ait standart grafik.

Tablo 4.12. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen PICP değerlerinin karşılaştırılması.

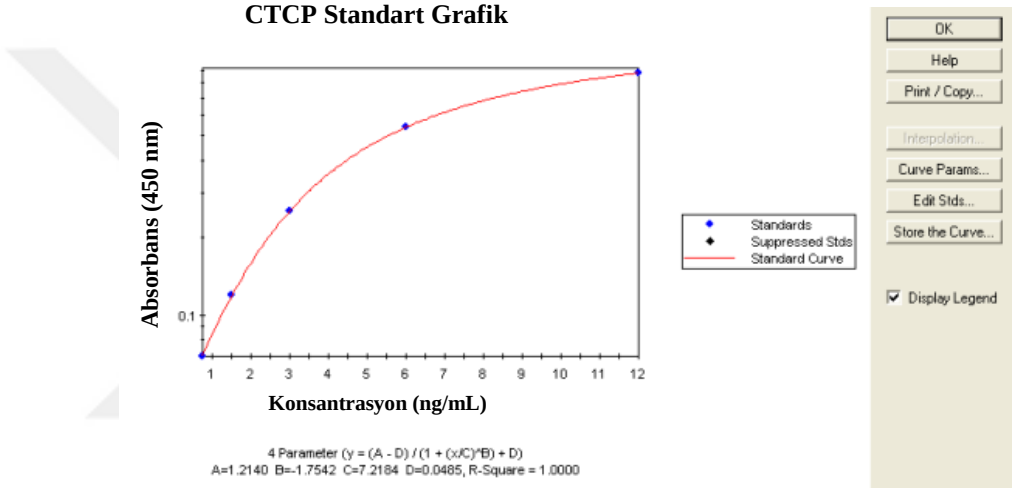
	PICP (ng/mL)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		**Erkek**	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama±S.Sapma**	**Medyan**	**Ortalama±S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	62.231	62.291 ± 0.637^{C}	68.100	68.105 ± 0.781^{B}
Pozitif Kontrol	72.140	72.141 ± 0.299^{A}	72.595	72.595 ± 0.434^{A}
Zaprinast	70.868	70.595 ± 0.666^{B}	63.625	63.625 ± 0.317^{C}
Avanafil	70.596	70.413 ± 0.893^{B}	62.897	62.897 ± 0.724^{D}
		$p<0.001$		$p<0.001$

"ABCD": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir ($p<0.001$).

4.10. Uygulama ve Tedavi Sonrası CTCP Ölçüm Sonuçları

Dişi ve erkek gruplarında uygulama sonrası anestezi altında intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazmalarda CTCP değerleri ticari olarak satın

alınan kit (Eastbiopharm) ile, kit prospektüsüne uygun olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçüldü. 3.375, 0.750, 1.5, 3, 6 ve 12 ng/mL konsantrasyondaki standart numunelerden elde edilen absorbans değerlerine göre standart grafik çizildi (Şekil 4.18). Numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğriye ait denklemde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda grupların ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.13'de verildi.



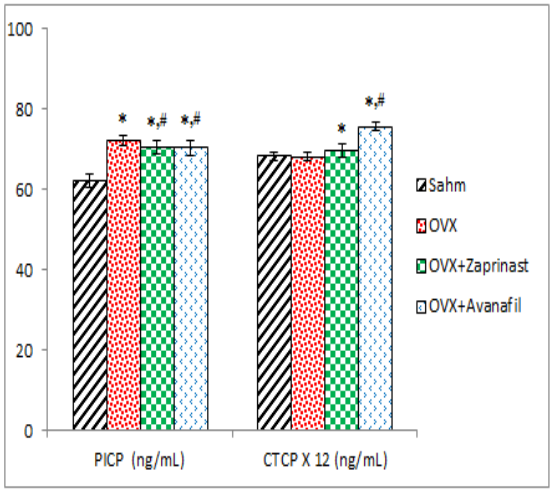
Şekil 4.18. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen CTCP'e ait standart grafik.

Tablo 4.13. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen CTCP değerlerinin karşılaştırılması.

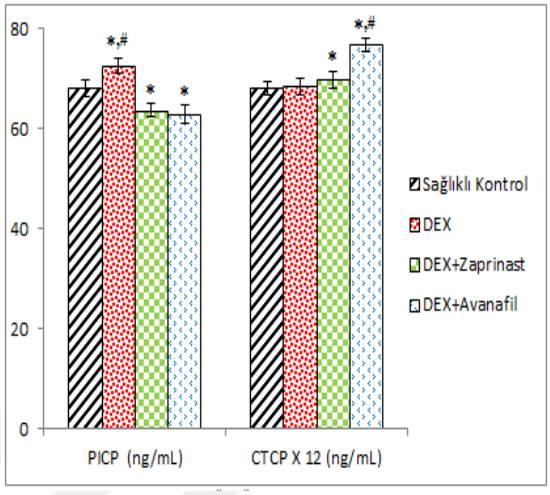
	CTCP (ng/mL)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		**Erkek**	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama±S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama±S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	5.696	5.696 ± 0.085^{C}	5.672	5.668 ± 0.026^{C}
Pozitif Kontrol	5.679	5.679 ± 0.092^{C}	5.686	5.702 ± 0.061^{C}
Zaprinast	5.818	5.809 ± 0.061^{B}	5.819	5.813 ± 0.058^{B}
Avanafil	6.312	6.315 ± 0.098^{A}	6.384	6.389 ± 0.023^{A}
	p<0.001		p<0.001	

"ABCD": Aynı sütunda farklı büyük harfi alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (p<0.001).

Şekil 4.19 ve 4.20'de sırasıyla dişi ve erkek sıçanlara ait CTCP ve PICP değerleri toplu olarak karşılaştırılmış ve istatistiksel farklar gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Overektomi ve tedavi sonrası dişi sıçanlarda PICP ve CTCP değerlerinin karşılaştırılması

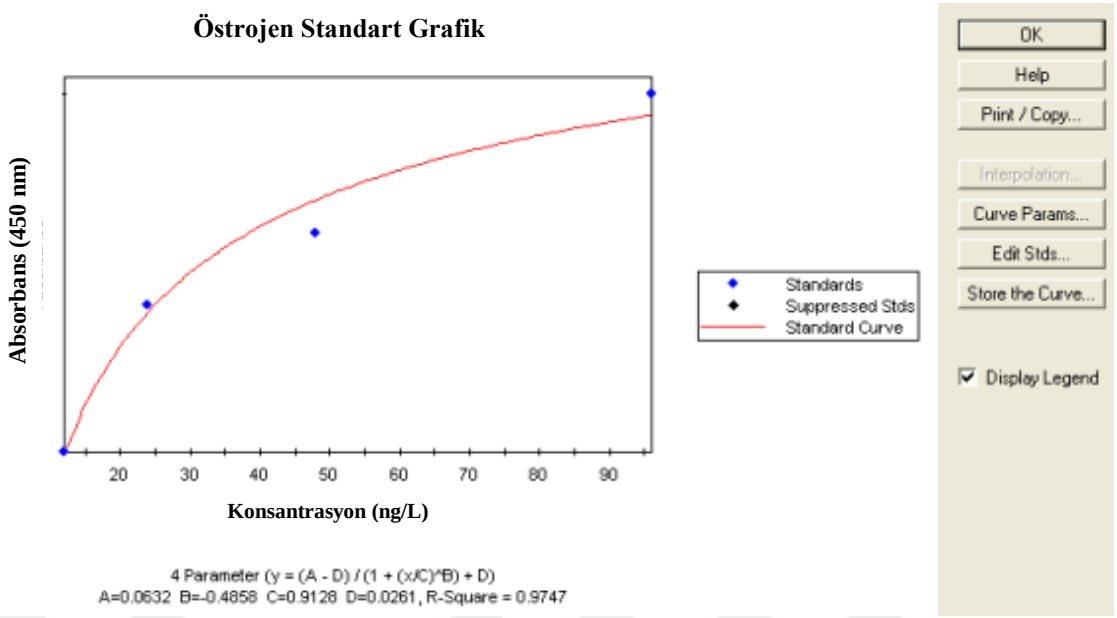


Şekil 4.20. DEX ve inhibitör ile tedavi sonrası erkek sıçanlarda ölçülen PICP ve CTCP değerlerinin karşılaştırılması

"*:Şahm veya sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0.05$). "#": Diğer gruplara göre anlamlı ($p<0.05$)"

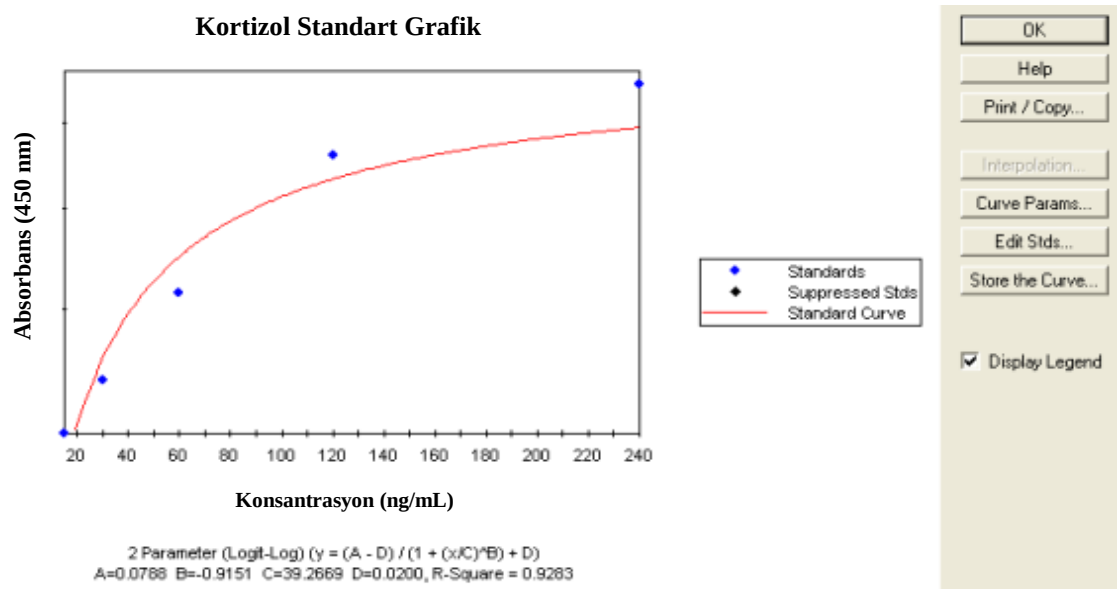
4.11. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi Gruplarda Östrojen, Erkek Gruplarda Kortizol Ölçüm Sonuçları

Uygulama ve tedavi sonrası anestezi altında intrakardiyak olarak alınan tam kan örneklerinden elde edilen plazmalarda, dişilerde östrojen ve erkek gruplarında kortizol değerleri ticari olarak satın alınan kitler (Eastbiopharm) ile kit prospektüslerine uygun olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında ölçüldü. 12, 24, 48 ve 96 ng/L konsantrasyondaki standart östrojen numunelerinden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-östrojen konsantrasyonu standart grafiği çizildi (Şekil 4.21). Erkek gruplarında kortizol ölçümü için 30, 60, 120 ve 240 ng/mL konsantrasyondaki standart kortizol numunelerinden elde edilen absorbans değerlerine göre absorbans-kortizol konsantrasyonu standart grafiği çizildi (Şekil 4.22).



Şekil 4.21. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen östrojen'e ait standart grafik.

Kortizol ve östrojen değerleri için, numunelerden elde edilen absorbans değerleri standart eğrilere ait denklemlerde yerine konularak numune konsantrasyonları hesaplandı. Elde edilen değerlere göre yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda grupların ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.14 ve Şekil 4.23'de verildi.

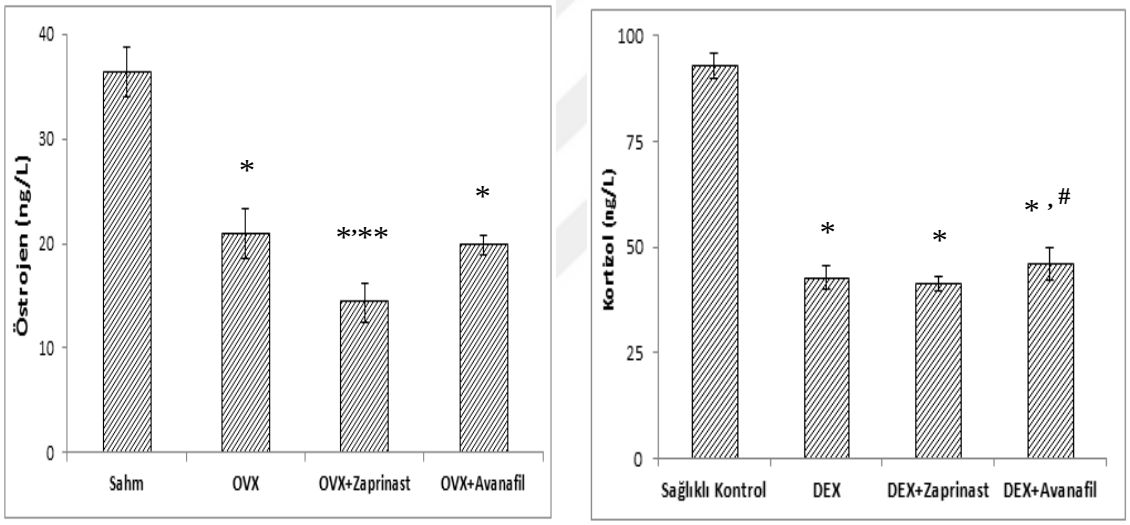


Şekil 4.22. Overektomi ve inhibitör uygulama sonrası elde edilen kortizol'e ait standart grafik.

Tablo 4.14. Uygulama ve tedavi sonrası dişi gruplardan östrojen ve erkek gruplarda edilen kortizol değerlerinin karşılaştırılması.

	Dişi Gruplarda Östrojen Değerleri (ng/L)		Erkek Gruplarda Kortizol Değerleri (ng/L)	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama± S.Sapma**	**Medyan**	**Ortalama± S.Sapma**
Sağlıklı Kontrol	36.170	36.335 ± 2.411^{A}	93.284	92.817 ± 2.872^{A}
Pozitif Kontrol	21.591	20.914 ± 2.432^{B}	42.996	42.742 ± 2.685^{BC}
Zaprinast	14.830	14.384 ± 1.867^{C}	41.256	41.282 ± 1.731^{C}
Avanafil	19.646	19.839 ± 0.912^{B}	45.159	46.037 ± 3.712^{B}
		p<0.001		p<0.001

"^{ABCD}": Aynı sütunda farklı harf alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (p<0.001).

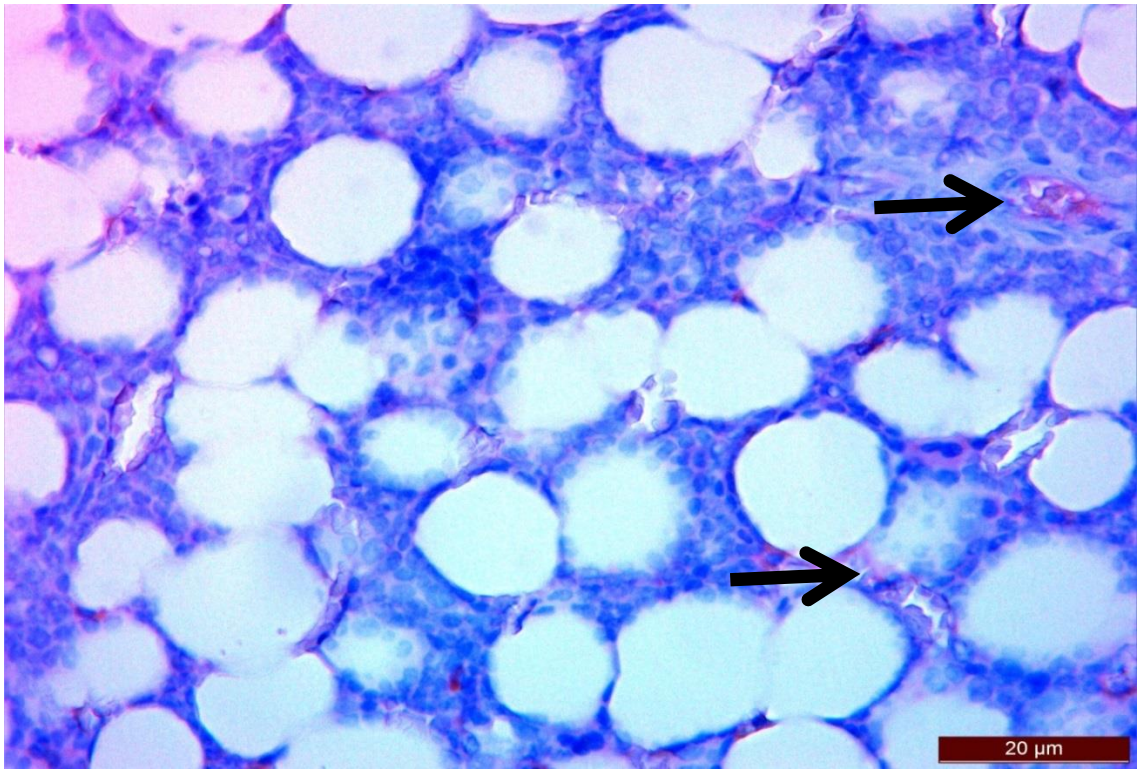


Şekil 4.23. Dişi sıçanlarda östrojen ve erkek sıçanlarda kortizol düzeylerinin karşılaştırılması
"*: Şahm veya sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05). "#": Diğer gruplara göre anlamlı (p<0.05)"

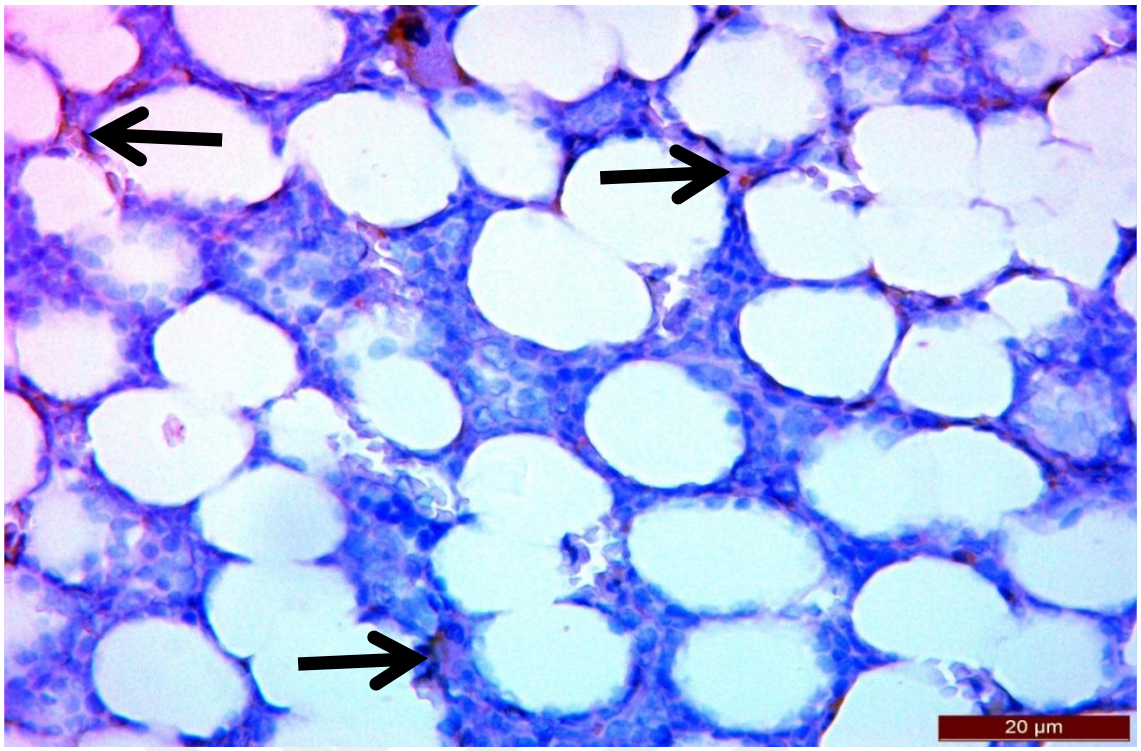
4.12. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi Gruplarda Histopatoljik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

Dişi grupların sağ femurlarında yapılan immünohistokimyasal incelemede şahm grubu sağ femurlarının kemik iliğinde damarların normal histopatoljik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 4.24). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra herhangi bir ilaç verilmeyen pozitif kontrol grubundaki deneklerde ise çok hafif bir anjiyogenez olduğu

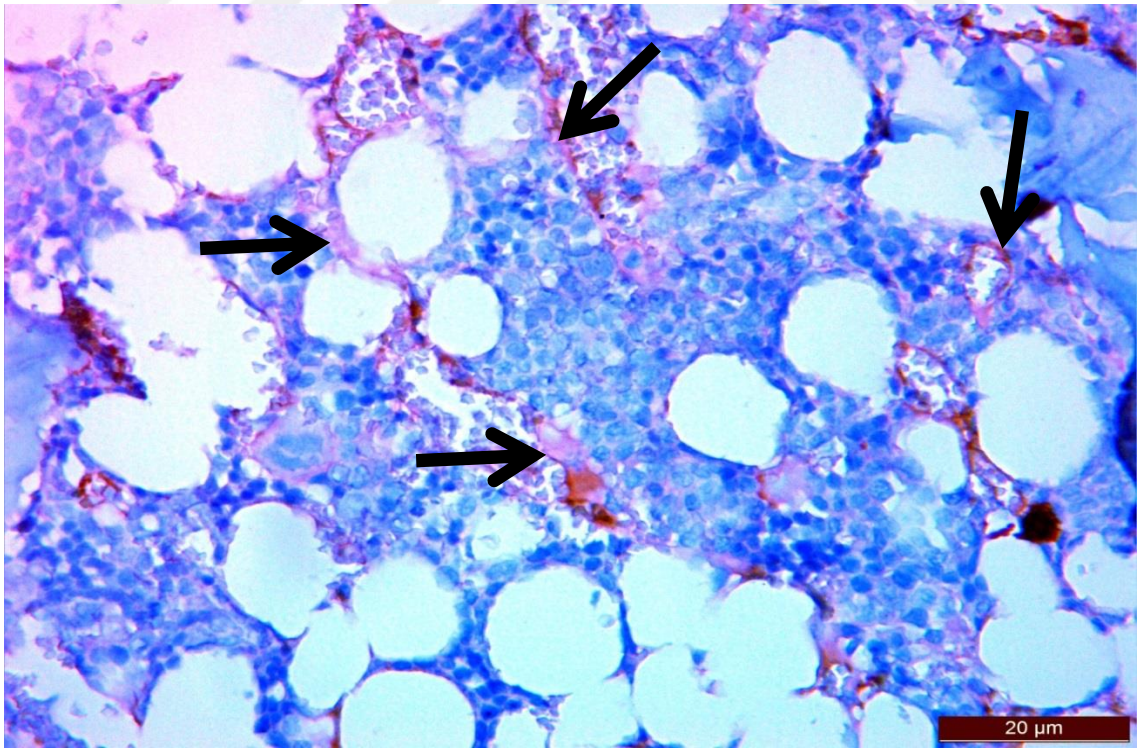
gözlendi. (Şekil 4.25). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra oral olarak 2 ay boyunca günde 10 mg/kg zaprinast verilen 3'üncü gruptaki deneklerde anjiyogenezde belirgin bir artış söz konusuydu (Şekil 4.26). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra 2 ay boyunca günde 10 mg/kg avanafil verilen 4'üncü gruptaki dişi deneklerin kemik iliğinde ise ciddi düzeyde anjiyogenez olduğu belirlendi (Şekil 4.27).



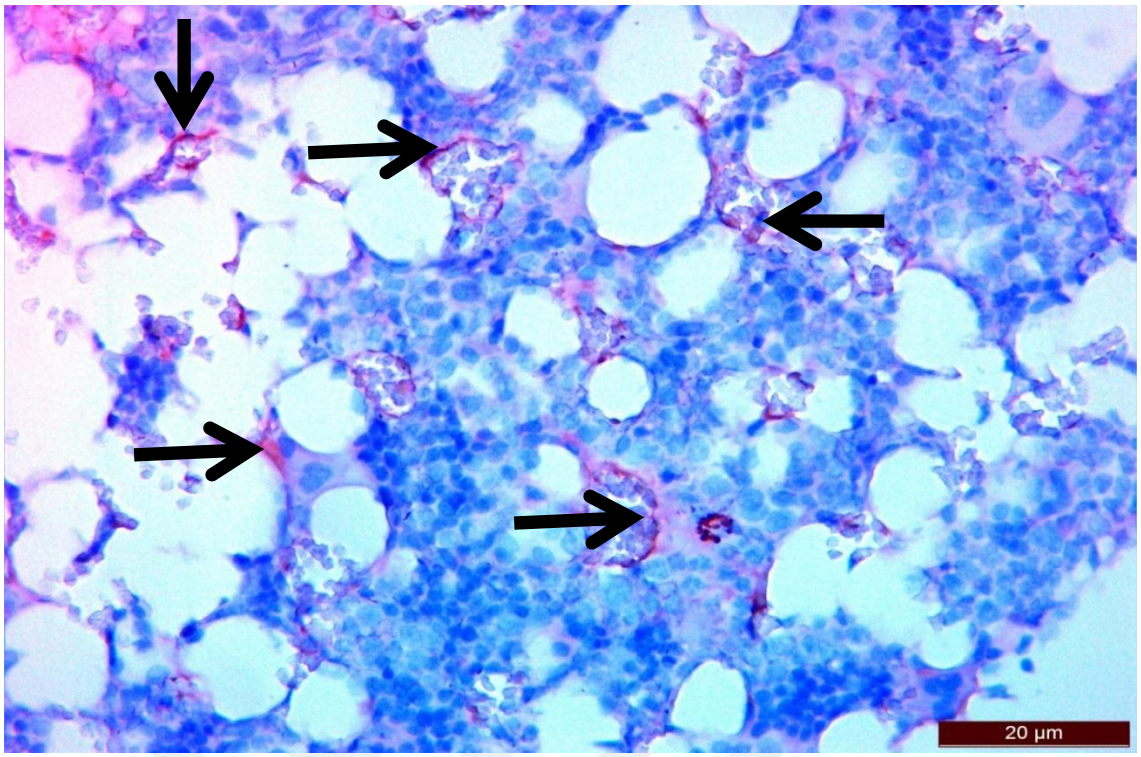
Şekil 4.24. Dişi şahm grubunda sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü. "Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"



Şekil 4.25. Overektomi yapılan ve inhibitör verilmeyen grupların sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü."Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"

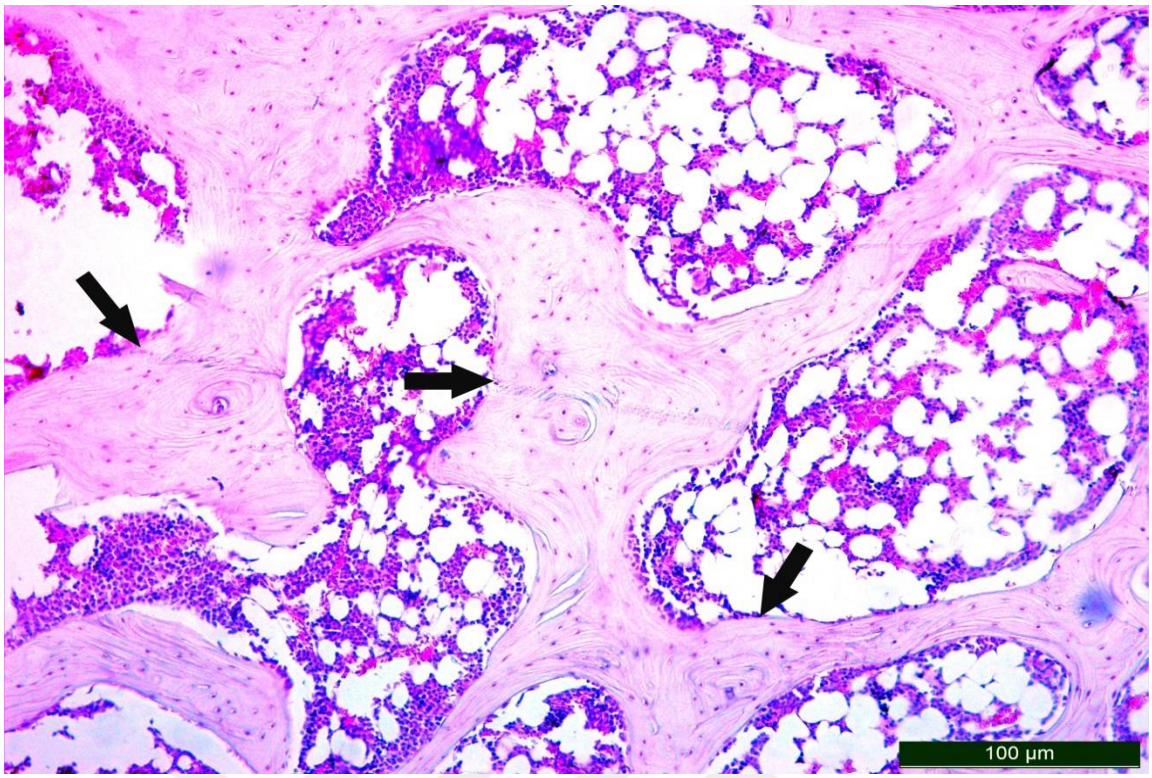


Şekil 4.26. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde 10 mg/kg zaprinast verilen grupların sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü."Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"

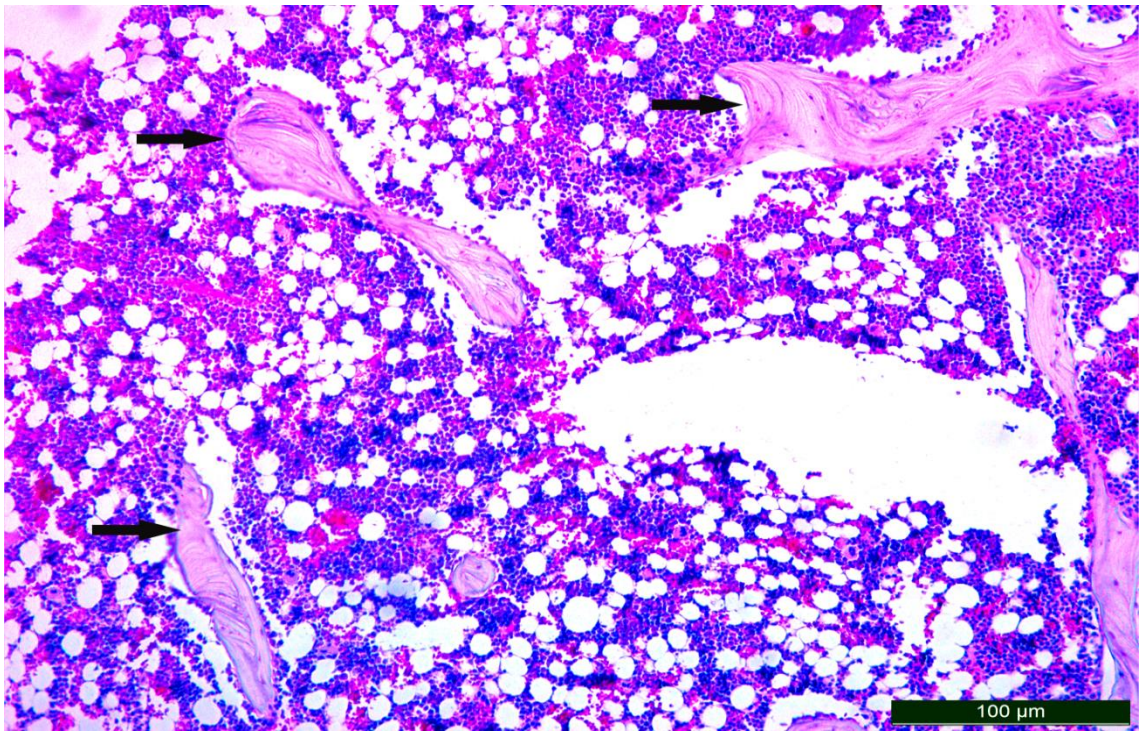


Şekil 4.27. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde 10 mg/kg avanafil verilen grupların sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü."Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"

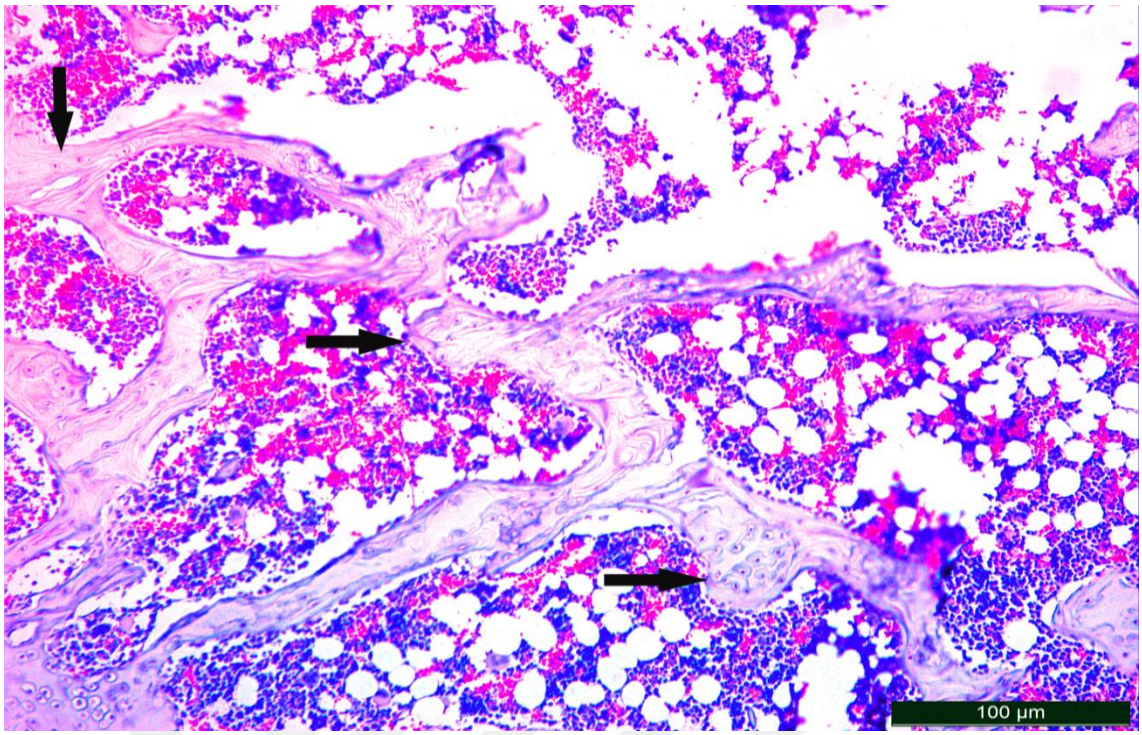
Çalışma yapılan dişi grupların sağ femurlarında yapılan histopatolojik incelemede, sağlıklı kontrol grubu (şahm operated grup) femurlarının trabeküler kemik yoğunluklarının normal histopatolojik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 4.28). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra herhangi bir ilaç verilmeyen pozitif kontrol grubundaki deneklerde, kemik trabeküllerinin ise sayıca çok az ve ince olduğu görüldü (Şekil 4.29). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra 2 ay boyunca günde 10 mg/kg zaprinast verilen 3'üncü gruptaki deneklerde kemik trabeküllerinde ise hafif bir incelme gözlendi (Şekil 4.30). Ancak overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra 2 ay boyunca günde 10 mg/kg avanafil verilen 4'üncü gruptaki dişi deneklerin kemik trabeküllerinde ise kayda değer bir patolojik durum tespit edilmedi (Şekil 4.31).



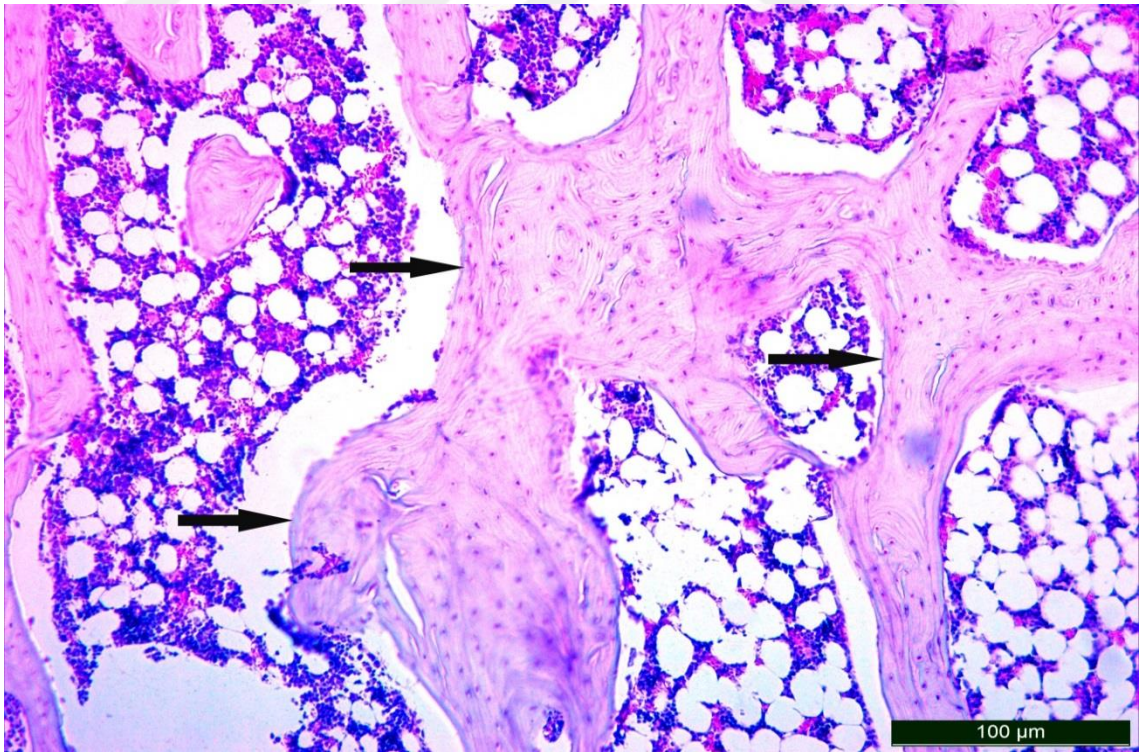
Şekil 4.28. Dişi sağlıklı kontrol (şahm) grubu sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



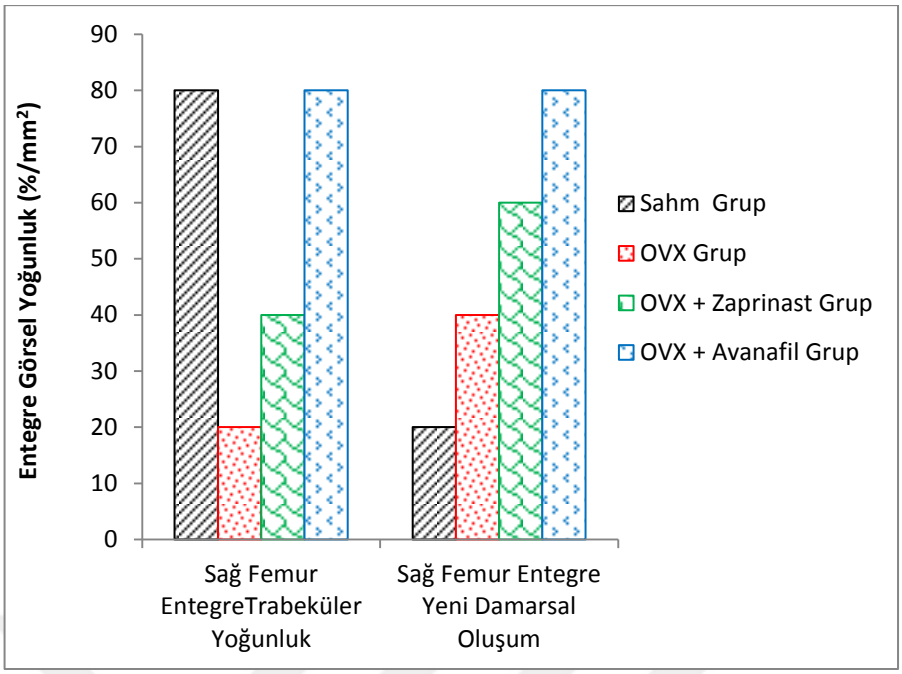
Şekil 4.29. Overektomi yapılan ve inhibitör verilmeyen dişi pozitif kontrol grubu sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.30. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde tek doz 10 mg/kg zaprinast verilen dişi grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"

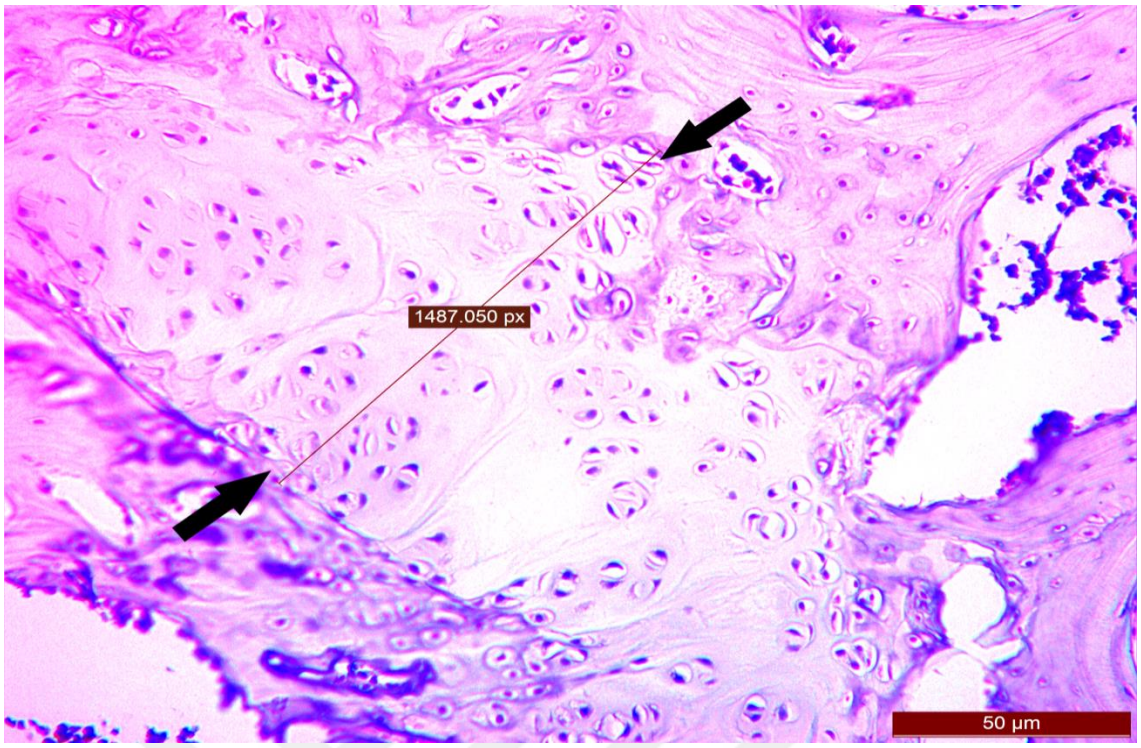


Şekil 4.31. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde tek doz 10 mg/kg avanafil verilen dişi grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"

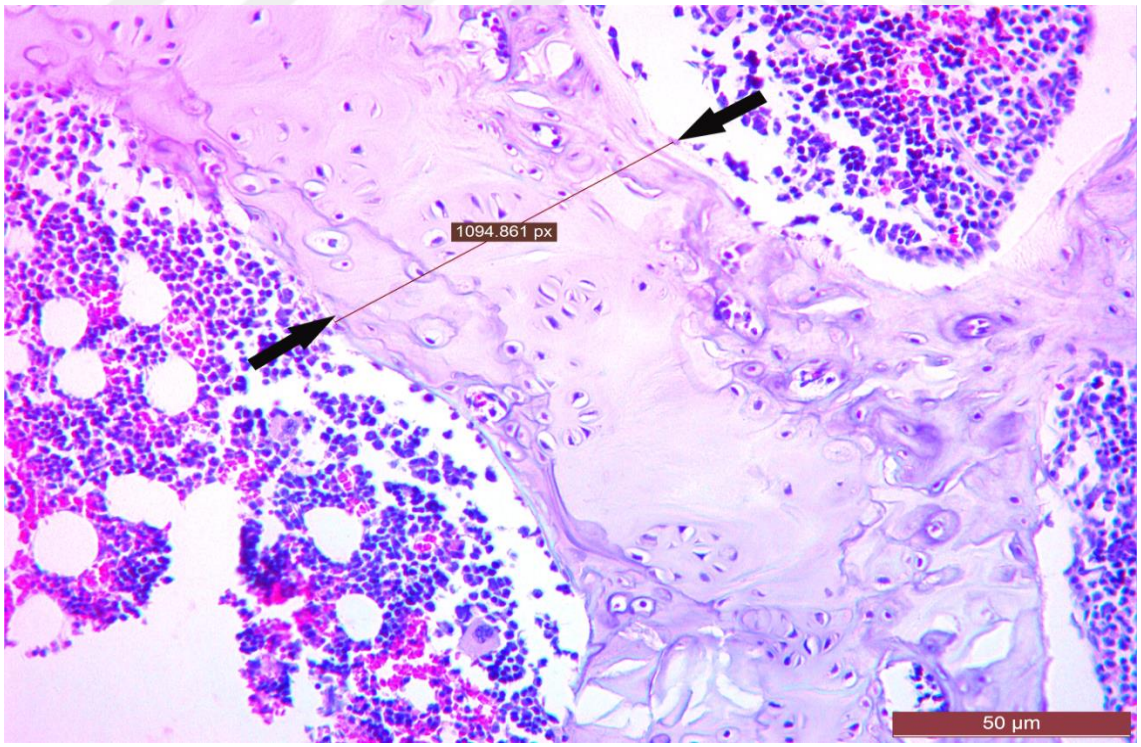


Şekil 4.32. Dişi gruplarda sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu ve yeni damarsal oluşuma ait entegre görsel yoğunluk ile ilgili % değerlerinin karşılaştırılması
"Sağ femur entegre görsel trabeküler ve sağ femur entegre yeni damar oluşum yoğunluğu değerlendirilirken verilen %'de değerleri, kategorik olarak belirlenen pozitif 10 değeri, 100 olarak kabul edilmiş ve karşılaştırmalar bu değere göre yapılmıştır."

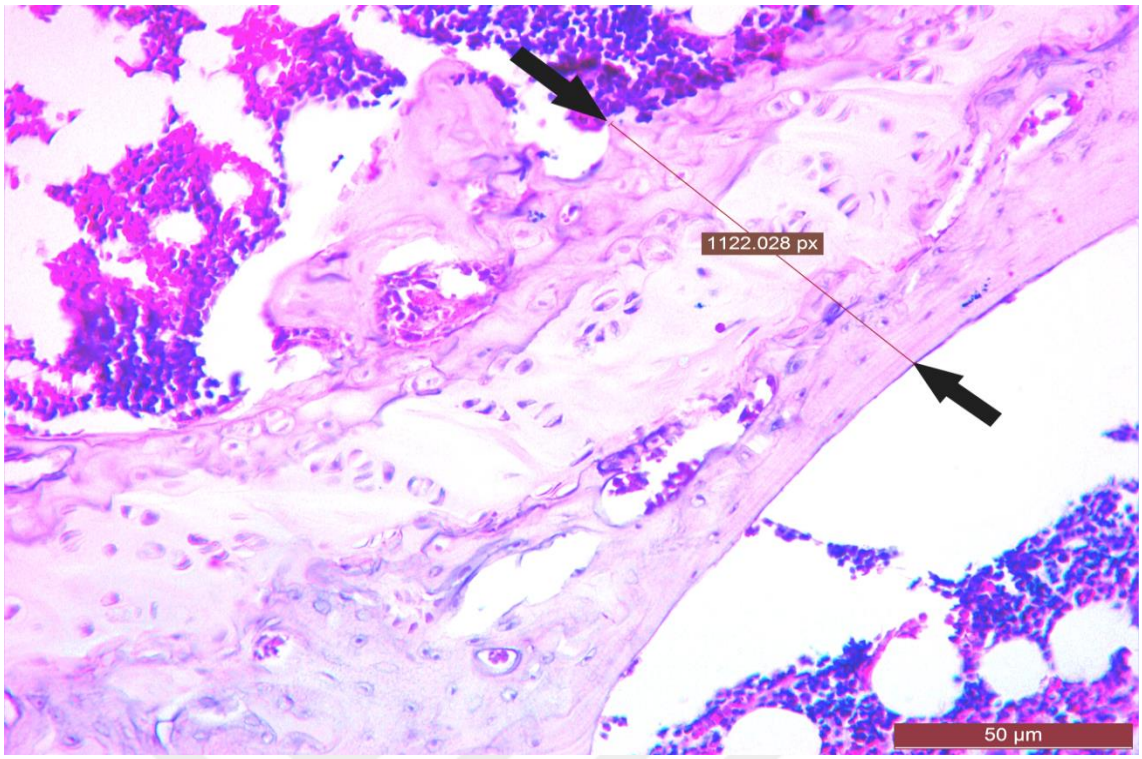
Dişi gruplarda sağ femurlarda yapılan histopatolojik incelemede sahm grubu femurlarının gelişme plağı (epifizeal kemik)'nın normal histopatoljik yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.33). Overektomi yapılan ve herhangi bir ilaç verilmeyen pozitif kontrol grubundaki deneklerde kemik trabeküllerinin ise sayıca çok az ve ince olduğu, epifizeal kemikte atrofi ve kıkırdak katmanlarında dejenerasyon olduğu belirlendi (Şekil 4.34). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra 2 ay boyunca günde 10 mg/kg zaprinast verilen 3'üncü gruptaki deneklerde epifizeal kemikte çok az bir atrofi ve kemik trabeküllerinde ise hafif bir incelme tespit edildi (Şekil 4.35). Overektomi yapılan ve 6 ay geçtikten sonra 2 ay boyunca günde 10 mg/kg avanafil verilen 4'üncü gruptaki dişi deneklerin kemik trabeküllerinde ve epifizeal kemikte ise herhangi bir patolojik durum tespit edilmedi (Şekil 4.36).



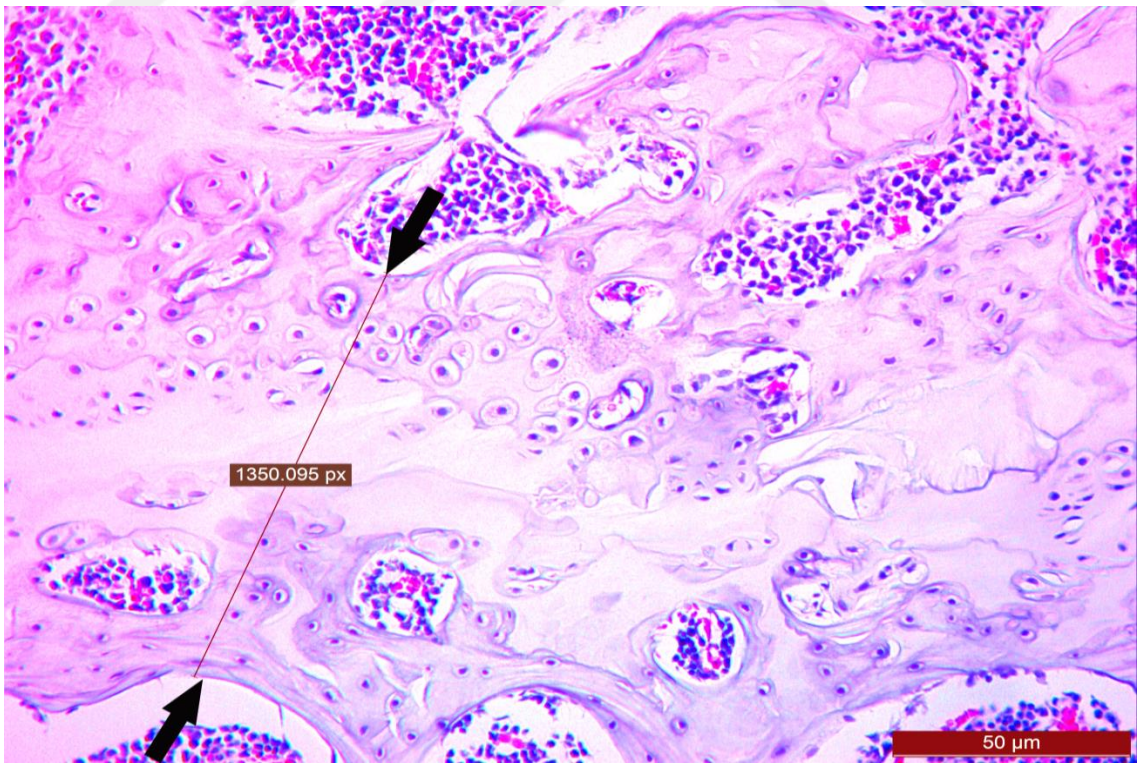
Şekil 4.33. Dişi sağlıklı kontrol (şahm) grubu sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



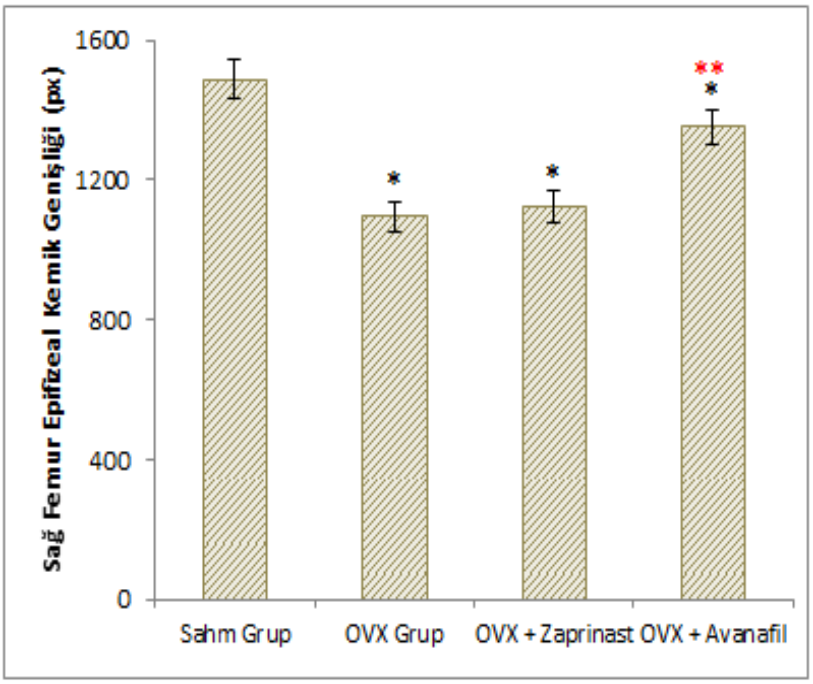
Şekil 4.34. Overektomi yapılan ve inhibitör verilmeyen pozitif kontrol grubu sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.35. Overektomi yapılan ve 2 ay boyunca günde 10 mg/kg zaprinast verilen grubun sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.36. Overektomi yapılan ve 2 ay süreyle günde 10 mg/kg avanafil verilen grubun sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağını (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.37. Dişi gruplara ait sağ femur epifizeal genişlik değerlerinin karşılaştırılması "*": Sahm grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$). "**":OVX ve OVX+zaprinast gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

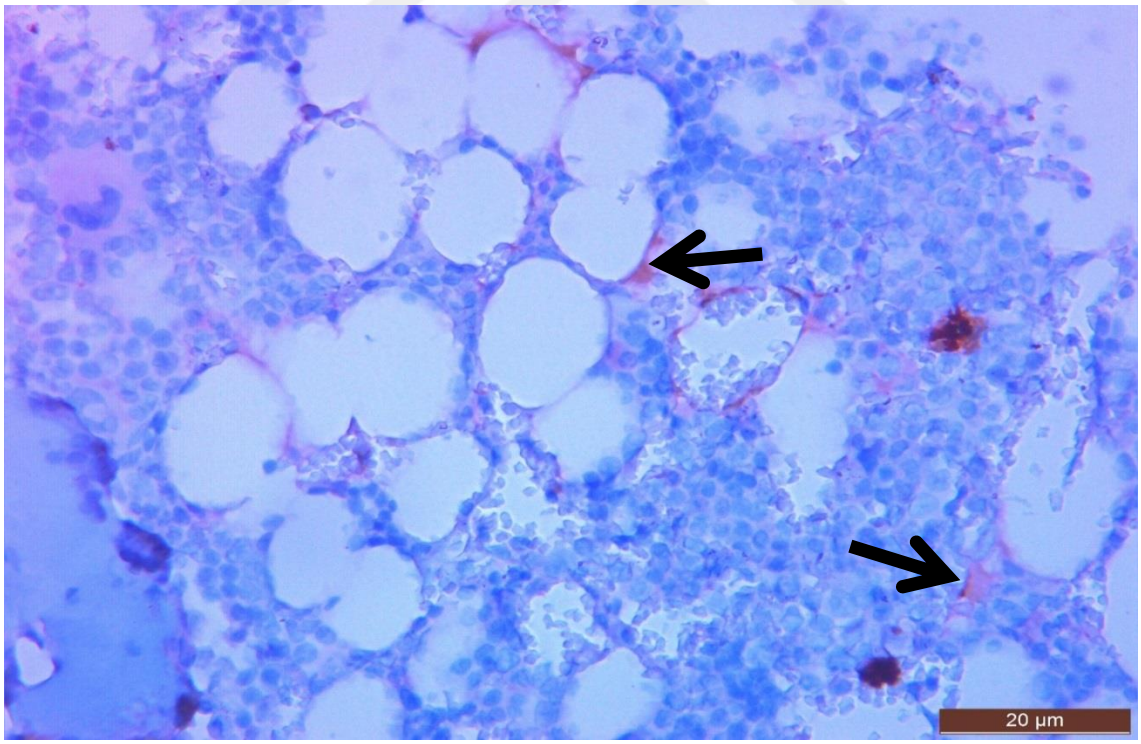
Tablo 4.15. Dişi gruplara ait sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu, yeni damarsal oluşum ve epifizeal kemik genişlik değerlerinin karşılaştırılması.

Grup Adı	Sağ Femur Entegre Görsel Trabeküler Yoğunluk (mm^2)	Sağ Femur Entegre Görsel Yeni Damar Yoğunluğu (mm^2)	Sağ Femur Epifizeal Genişlik (px)	
			Medyan	Ortalama ± S.Sapma
Şahm	+8	+2	1484.075 A	1487.032 ± 54.689^{A}
OVX	+2	+4	1097.700 C	1094.853 ± 43.030^{D}
OVX+Zaprinast	+6	+6	1116.555 C	1122.032 ± 45.017^{C}
OVX+Avanafil	+8	+8	1345.225 B	1350.100 ± 50.012^{B}
				$p<0.001$

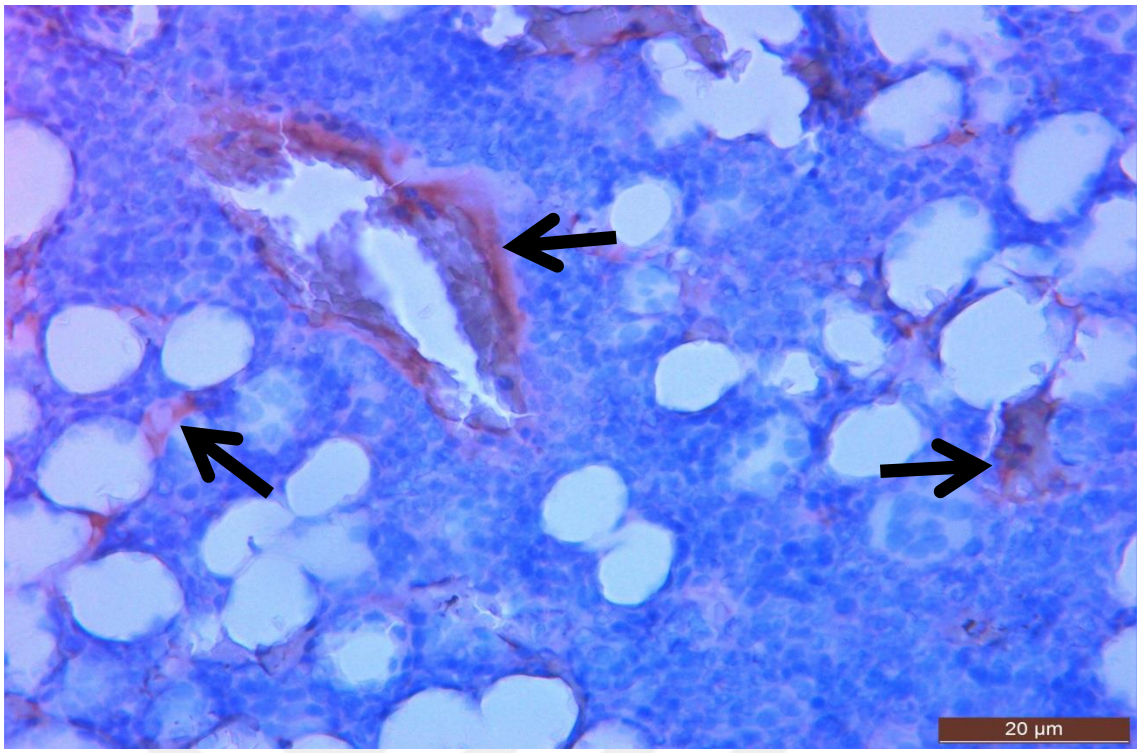
"Sağ femur entegre görsel yoğunluk ve entegre yeni damar yoğunluğu değerlendirilirken verilen sayılar, kantitatif değerlendirme kapsamında pozitif kategorik değerlerdir."
''ABCD'': Aynı sütünda farklı harf alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir ($p<0.001$).

4.13. Uygulama ve Tedavi Sonrası Erkek Gruplarda Histopatoljik Değerlendirme Sonuçları

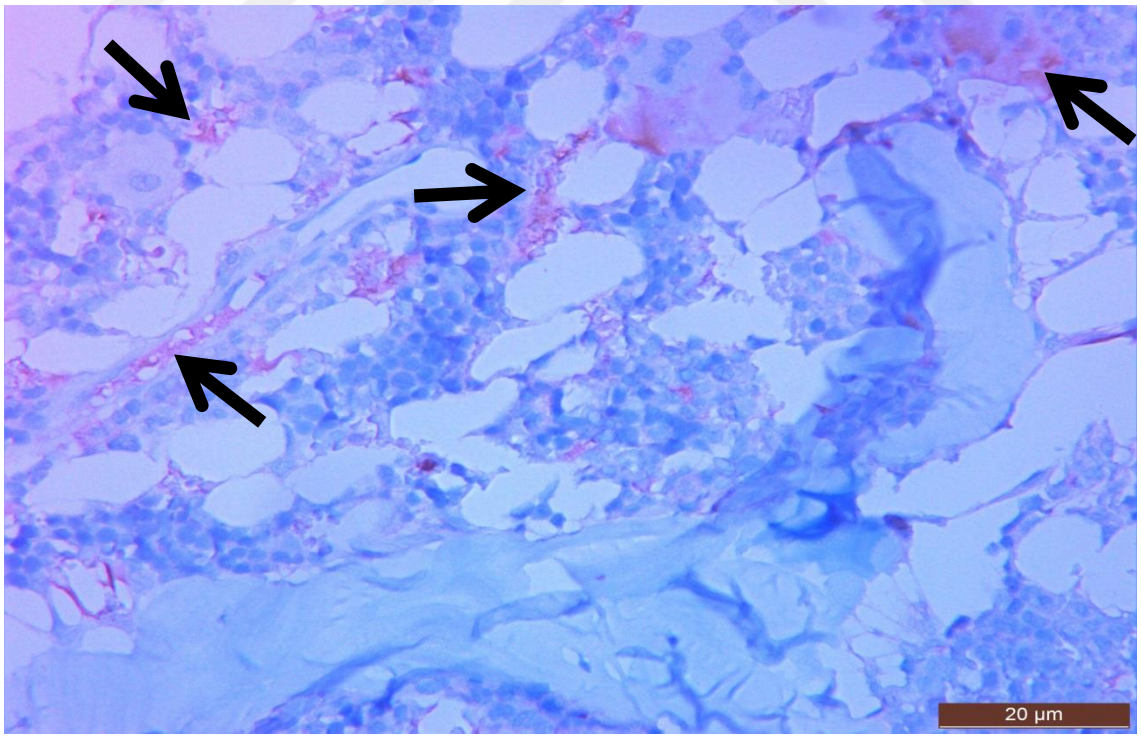
Erkek sıçanların sağ femurlarında yapılan immünohistokimyasal incelemede sağlıklı kontrol grubu femurlarının kemik iliğinde damarların normal histopatoljik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 4.38). DEX verilen ve herhangi bir ilaç verilmeyen pozitif kontrol grubundaki deneklerde ise hafif bir anjiyogenez olduğu gözlendi. (Şekil 4.39). DEX ile birlikte 30 gün boyunca günde 10 mg/kg zaprinast verilen 3'üncü gruptaki deneklerde anjiyogenezde artış söz konusuydu (Şekil 4.40). DEX ile birlikte 2 ay boyunca günde 10 mg/kg avanafil verilen 4'üncü gruptaki erkek sıçanların kemik iliğinde ise ciddi düzeyde anjiyogenez olduğu belirlendi (Şekil 4.41).



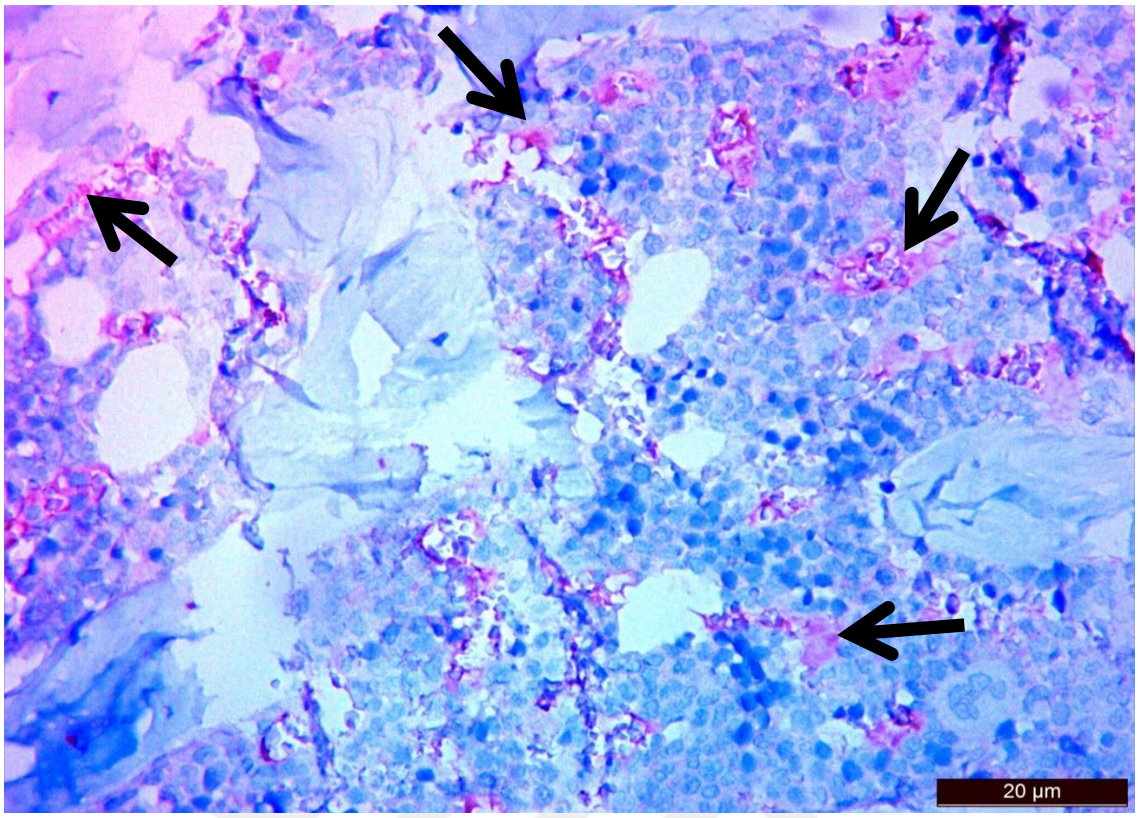
Şekil 4.38. Erkek sağlıklı kontrol grubu sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü. "Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"



Şekil 4.39. DEX verilen ve tedavi edilmeyen pozitif kontrol grubu sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü. "Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"

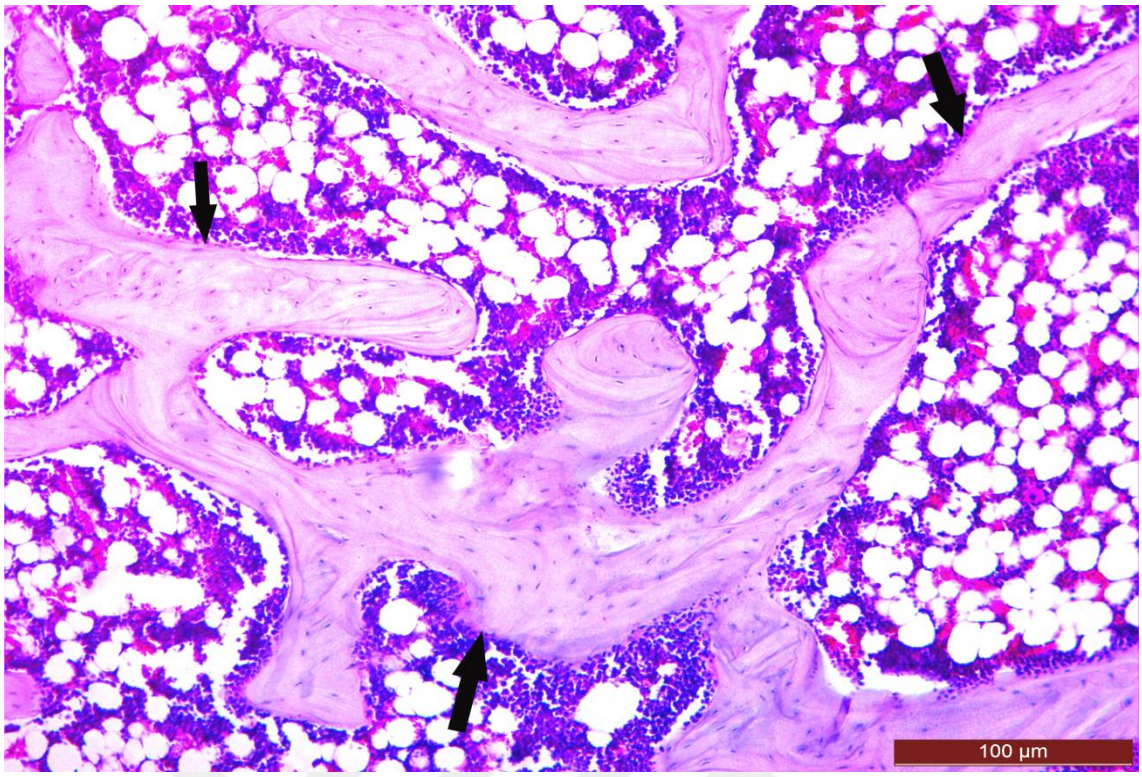


Şekil 4.40. DEX ile birlikte zaprinast verilen grubun sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü. "Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"

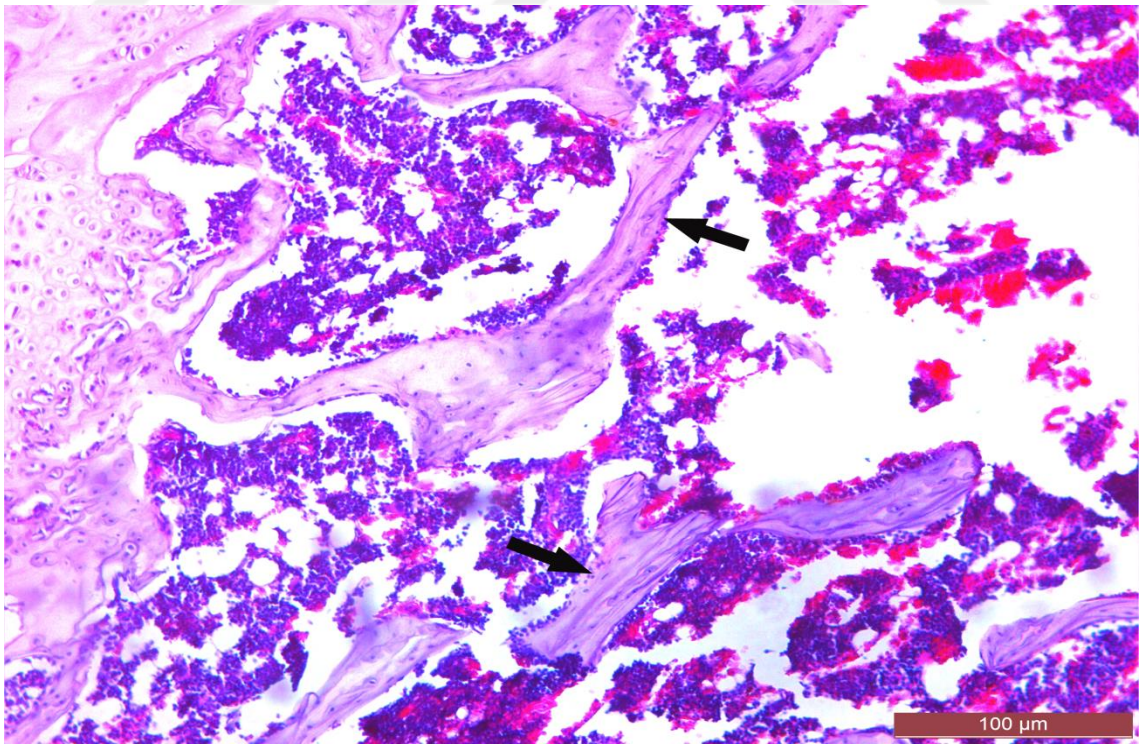


Şekil 4.41. DEX ile birlikte avanafil verilen grubun sağ femur kemik iliği damar oluşumuna ait görüntü. "Siyah ok ile gösterilen bölümler yeni damar oluşum bölgelerini göstermektedir"

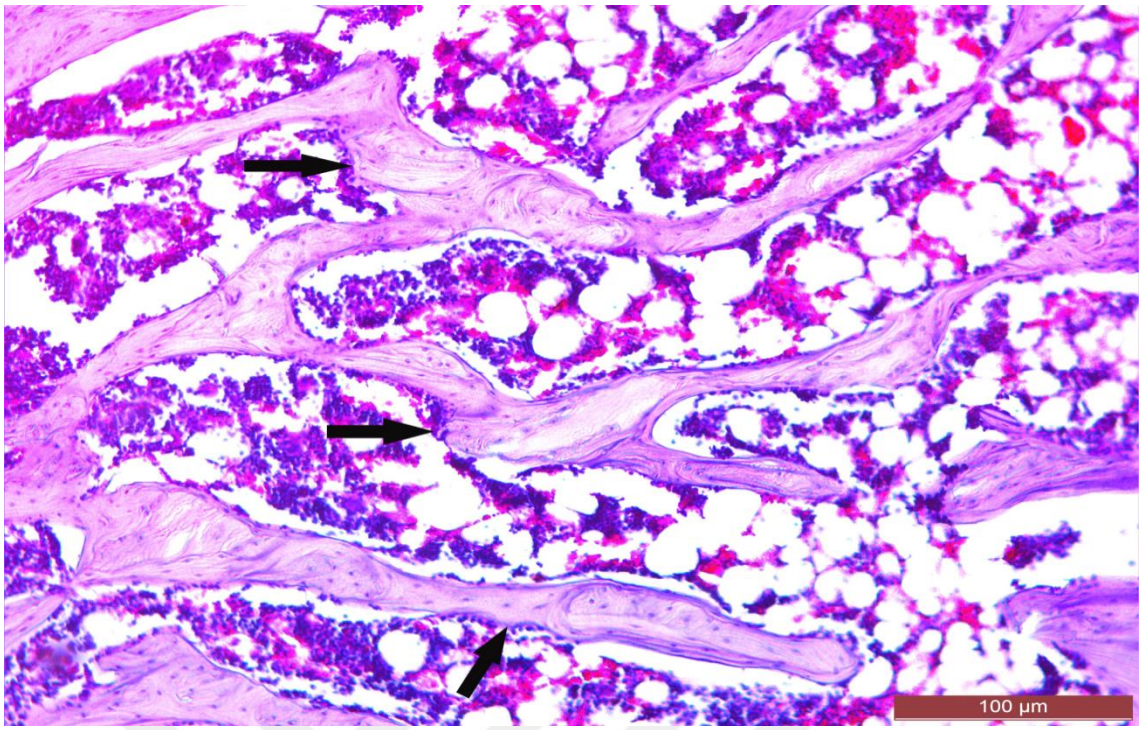
GC ile indüklenen OP için kullanılan erkek sıçanların sağlıklı kontrol grubunda yapılan histopatolojik incelemede sağ femurların trabeküler kemik yoğunluklarının normal histolojik yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.42). Sadece DEX verilen pozitif kontrol grubunda ise kemik trabeküllerinde sayıca azalma ve incelme tespit edildi (Şekil 4.43). 30 gün süreyle günde 10 mg/kg zaprinast verilen 3'üncü gruptaki deneklerin sağ femurlarında ise kemik trabeküllerinde az da olsa bir incelme görüldü (Şekil 4.44). Ancak aynı süreyle günde 10 mg/kg avanafil verilen 4'üncü grubun sağ femurlarında yapılan histopatolojik incelemede ise kemik trabeküllerinde önemli bir patolojik durum ile karşılaşılmadı (Şekil 4.45).



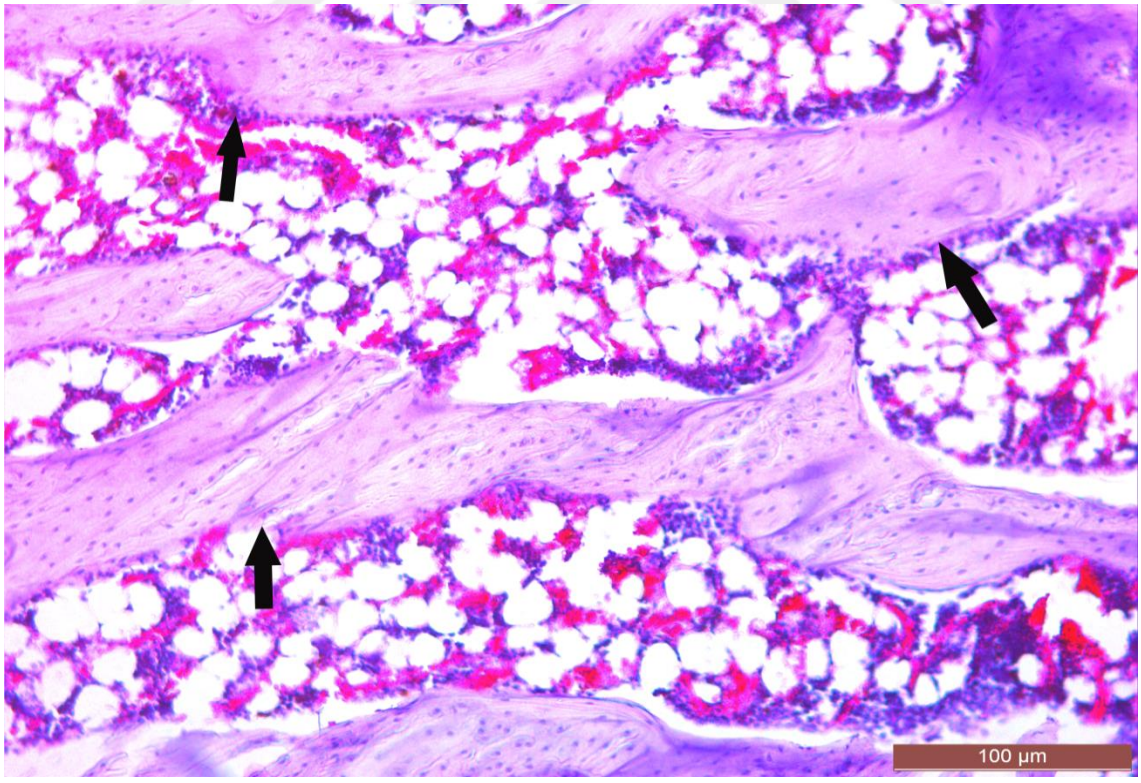
Şekil 4.42. Erkek sağlıklı kontrol grubu sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



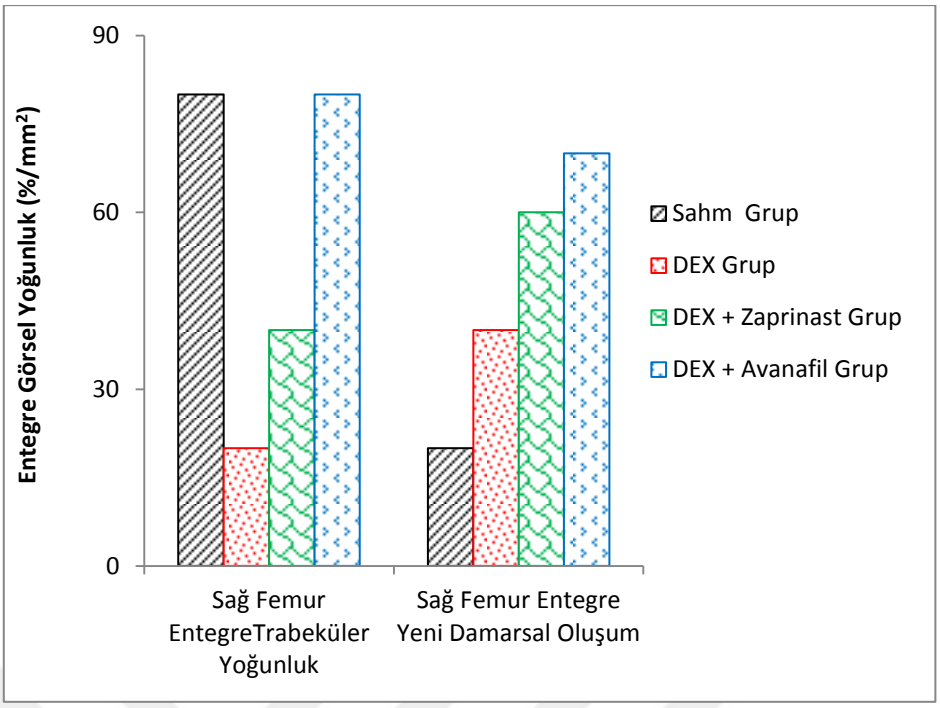
Şekil 4.43. Yalnızca DEX verilen pozitif grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.44. DEX ile birlikte zaprinast verilen grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"

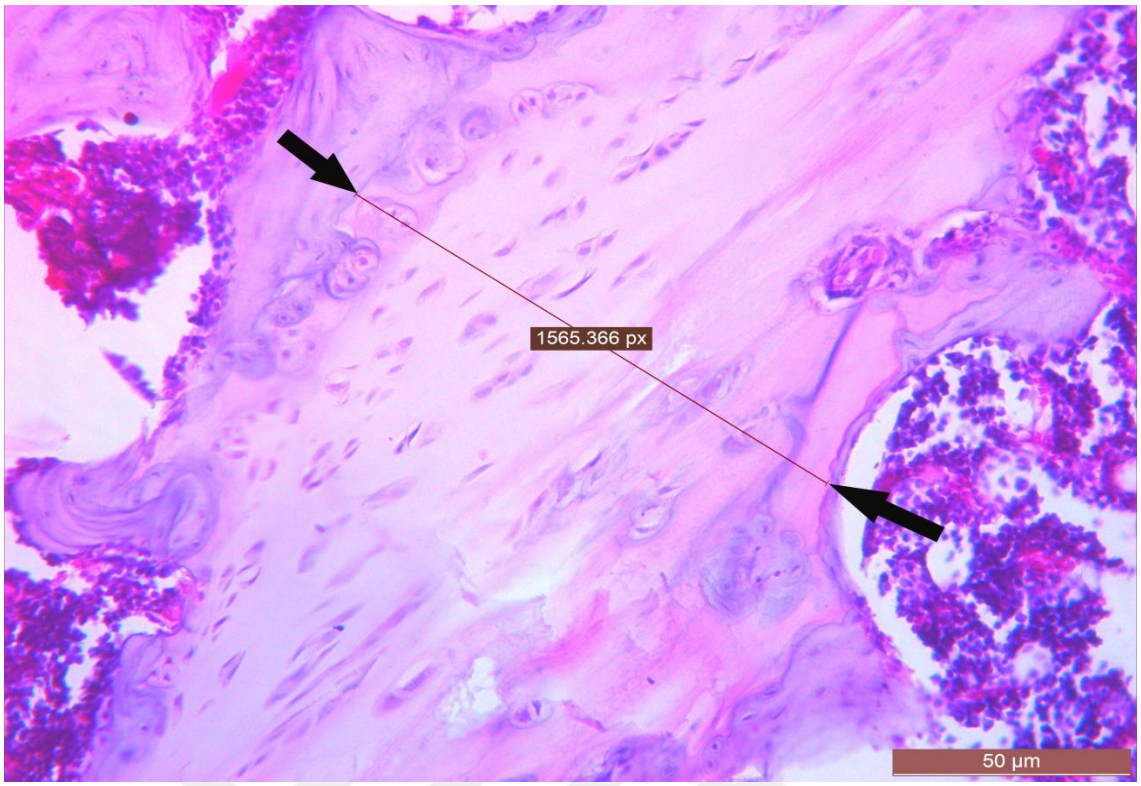


Şekil 4.45. DEX ile birlikte avanafil verilen grubun sağ femur trabeküler kemik yoğunluğuna ait görüntü. "Siyah okların karşısında görülen alan trabeküler kemik yoğunluğu ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"

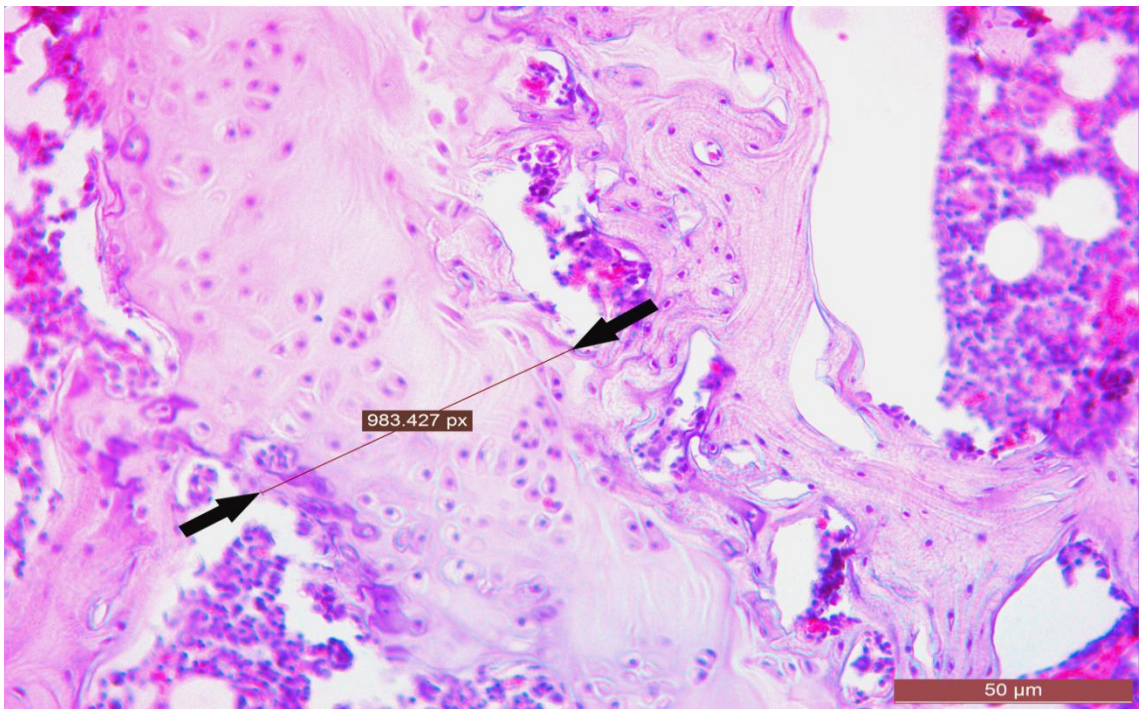


Şekil 4.46. Erkek sıçanlarda sağ femur entegre trabeküler kemik yoğunluğu ve yeni damar oluşumunun karşılaştırılması. "Sağ femur entegre görsel trabeküler ve yeni damar oluşum yoğunluğu değerlendirilirken kategorik olarak belirlenen pozitif 10 değeri, 100 kabul edilmiş ve karşılaştırmalar bu değere göre % değerleri olarak ifade edilmiştir."

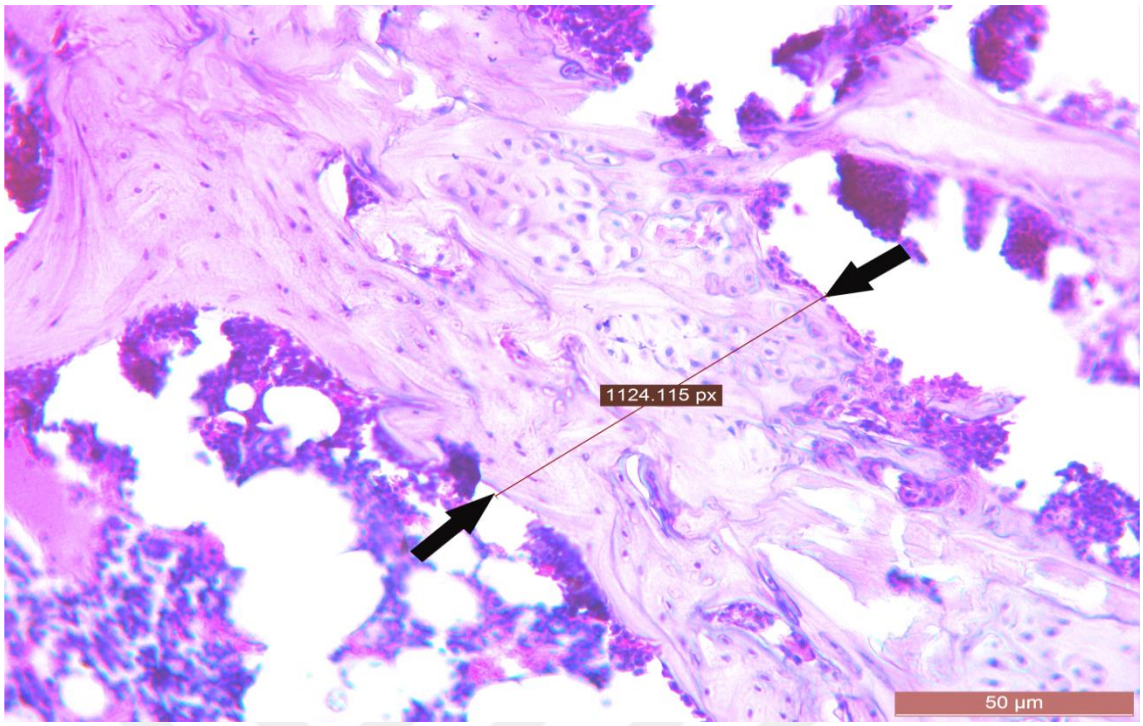
Erkek gruplarında sağ femurlarda yapılan histopatolojik değerlendirmede, sağlıklı kontrol grubunun sağ femur gelişme plağının normal histopatolojik yapıda olduğu gözlendi (Şekil 4.47). Pozitif kontrol grubunda deneklerin sağ femurlarında epifizeal kemikte atrofi, kıkırdak katmanlarında dejenerasyon ve incelme tespit edildi (Şekil 4.48). DEX ile birlikte zaprinast verilen 3'üncü grupta ise deneklerin sağ femurlarında epifizeal kemikte hafif bir atrofi ve incelme belirlendi (Şekil 4.49). DEX ile birlikte avanafil verilen 4'üncü grupta sağ femurlarda epifizeal kemikte önemli bir patolojik durum gözlenmedi (Şekil 4.50)



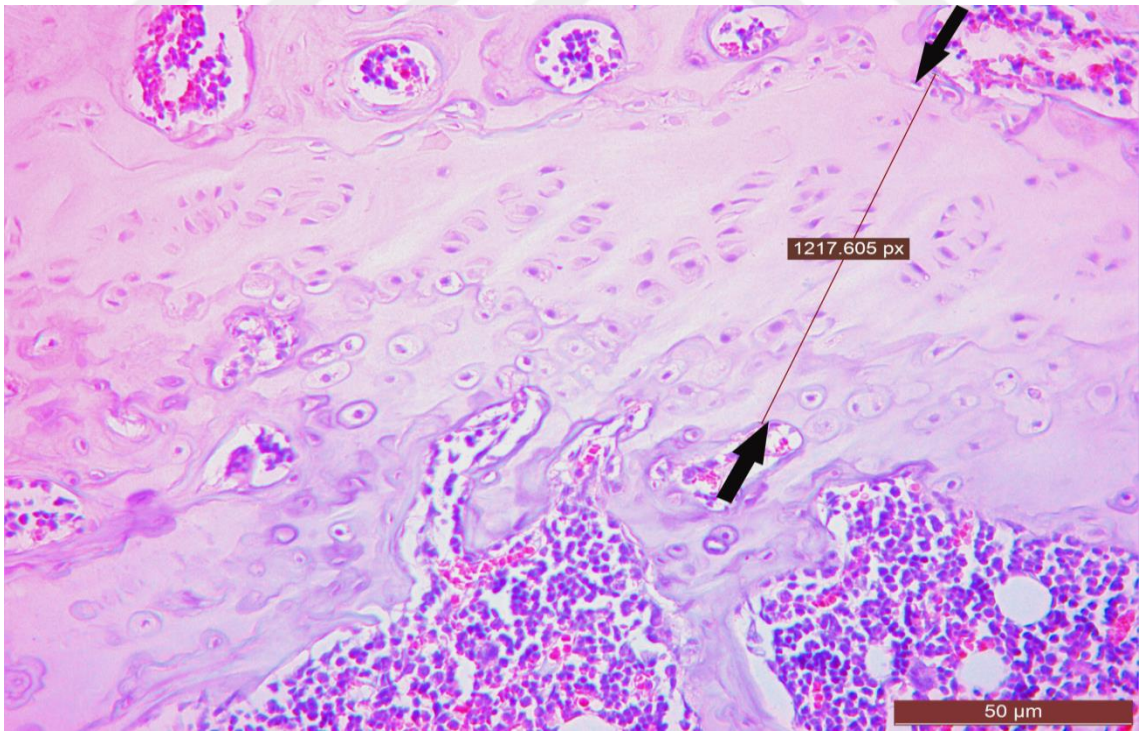
Şekil 4.47. Erkek sağlıklı kontrol grubu sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



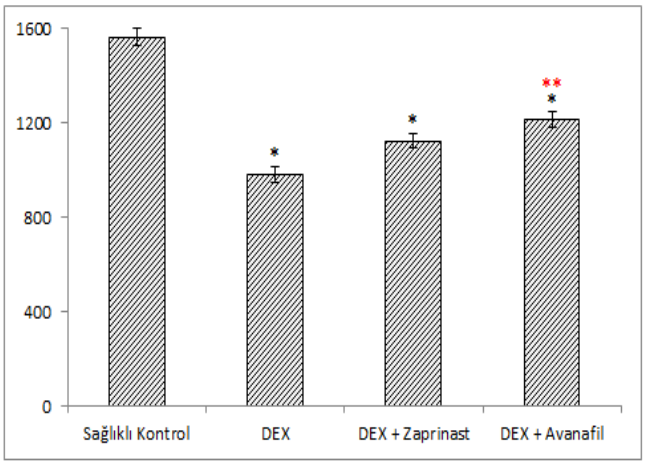
Şekil 4.48. Yalnızca DEX verilen pozitif kontrol grubunun sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.49. DEX ile birlikte zaprinast verilen pozitif kontrol grubunun sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.50. DEX ile birlikte avanafil verilen pozitif kontrol grubunun sağ femur gelişme plağına ait görüntü. "Siyah okların arasında görülen alan gelişme plağı (epifizeal kemik) ve genişliğini gösteren alanları işaret etmektedir"



Şekil 4.51. Erkek gruplara ait sağ femur epifizeal kemik genişliği değerlerinin karşılaştırılması (Uzunluk Birimi: px)
"*": Sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$). "**": DEX ve DEX+zaprinast gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$).

Tablo 4.16. Erkek gruplara ait sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu, yeni damarsal oluşum ve epifizeal kemik genişlik değerlerinin karşılaştırılması.

Grup Adı	Sağ Femur Entegre Görsel Trabeküler Yoğunluk (mm^2)	Sağ Femur Entegre Görsel Yeni Damar Yoğunluğu (mm^2)	Sağ Femur Epifizeal Genişlik (px)	
			Medyan	Ortalama±S.Sapma
Sağlıklı Kontrol	+8	+2	1579.165	1565.357 ± 33.640^{A}
DEX	+2	+4	971.995	983.433 ± 34.633^{D}
DEX + Zaprinast	+6	+6	1128.340	1124.123 ± 32.196^{C}
DEX + Avanafil	+8	+8	1227.940	1217.607 ± 33.102^{B}
				$p<0.001$

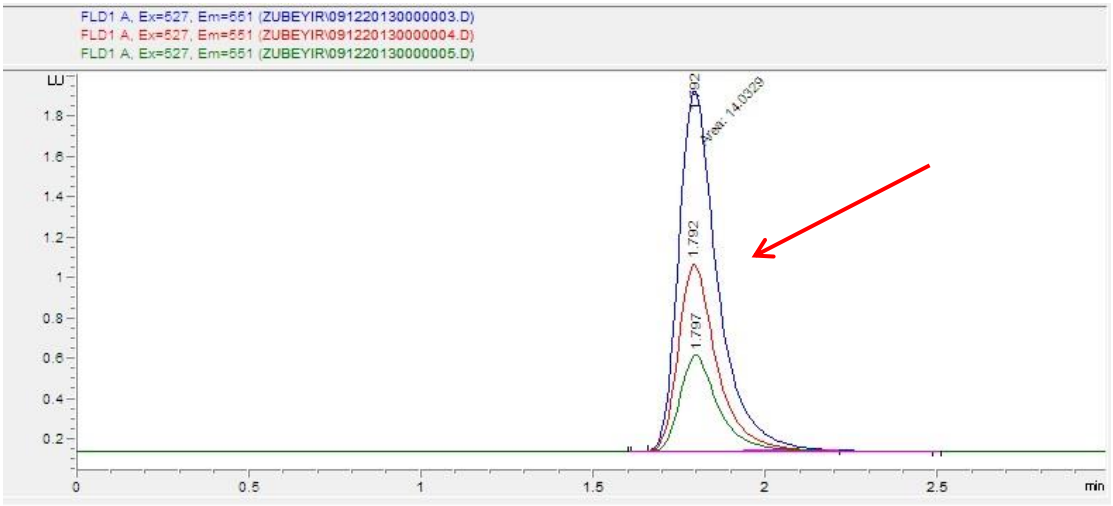
"Sağ femur entegre görsel yoğunluk ve entegre yeni damar yoğunluğu değerlendirilirken verilen sayılar, kantitatif değerlendirme kapsamında pozitif nominal değerlendirmedir."
''^{ABCD}'': Aynı sütünda farklı harf alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir ($p<0.001$).

4.14. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi ve Erkek Gruplarda Oksidatif Hasar Göstergelerinden MDA Ölçüm Sonuçları

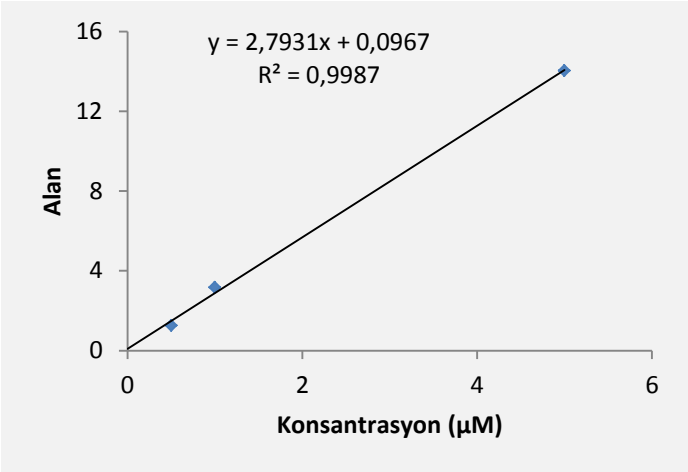
Uygulama ve tedavi sonrası bütün gruplarda lipid peroksidasyon son ürünü olan plazma MDA düzeyleri bölüm 3.11'de açıklanan yönteme göre yüksek basınçlı likid kromatografisi yöntemiyle ölçüldü. Bunun için önce 0.5, 1 ve 5 µM konsantrasyonlarda

hazırlanan standartlar, HPLC cihazında floresan dedektörde okunarak elde edilen piklerin (Şekil 4.52) altında kalan alan değerleri ile standart grafik çizildi (Şekil 4.53).

Numunelere ait piklerin altında kalan alan, standart piklerin alanlarıyla karşılaştırılarak numune konsantrasyonları µM olarak hesaplandı (Tablo 4.17). Dişi gruplarda MDA değerleri 1.883±0.099 ile 1.992±0.090 aralığında değişirken, erkek gruplarda 1.702±0.047 ile 2.150±0.124 arasında değiştiği tespit edildi.



Şekil 4.52. Standart MDA numunelerine ait pikler (0.5, 1 ve 5 µM)



Şekil 4.53. MDA standart grafiği

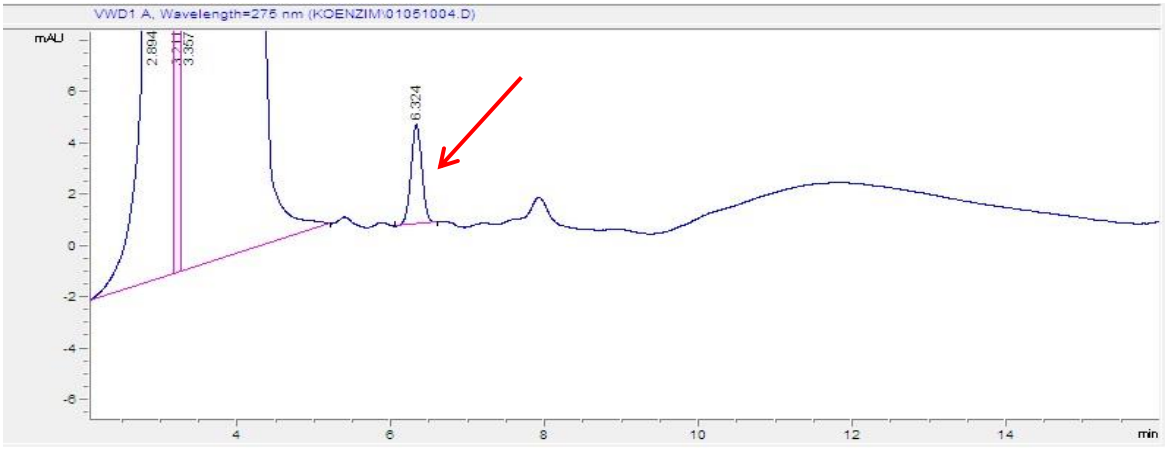
Tablo 4.17. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen MDA değerlerinin karşılaştırılması.

	MDA (µM)			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		Erkek	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	1.915	1.933±0.144	1.695	$1.702±0.047^{C}$
Pozitif Kontrol	2.015	1.992±0.090	2.161	$2.150±0.124^{A}$
Zaprinast	1.895	1.883±0.099	2.004	$2.006±0.101^{B}$
Avanafil	1.955	1.918±0.148	1.985	$1.980±0.104^{B}$
		p<0.440		p<0.001

"ABCD": Aynı sütünda farklı harf alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (erkek p<0.001).

4.15. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi ve Erkek Gruplarda Mitokondri Hasar Göstergelerinden Okside CoQ10/Redükte CoQ10 Oranlarına Ait Sonuçlar

Uygulama ve tedavi sonrası bütün gruplarda mitokondri hasar göstergelerinden plazma total ve okside CoQ10 düzeyleri bölüm 3.12'de açıklanan yöntemlere göre yüksek basınçlı likid kromatografisi yöntemiyle ölçüldü. Bunun için önce 58 µM konsantrasyonda hazırlanan standart CoQ10 için UV dedektör ile ölçüm yapıldı (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. CoQ10 standardına ait elde edilen pik

Aynı parametreler için aynı dedektör ile ölçülen numunelere ait piklerin altında kalan alan, standart pikinin altında kalan alan ile karşılaştırılarak numune konsantrasyonları µM olarak hesaplandı. Total CoQ10 değerlerinden okside CoQ10 değerleri çıkarılarak redükte CoQ10 değerleri belirlendi. Okside CoQ10 değerleri redükte CoQ10 değerlerine oranlanarak okside CoQ10/redükte CoQ10 değerleri elde edildi (Tablo 4.18) .

Tablo 4.18. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen CoQ10/CoQ10H oranlarının karşılaştırılması.

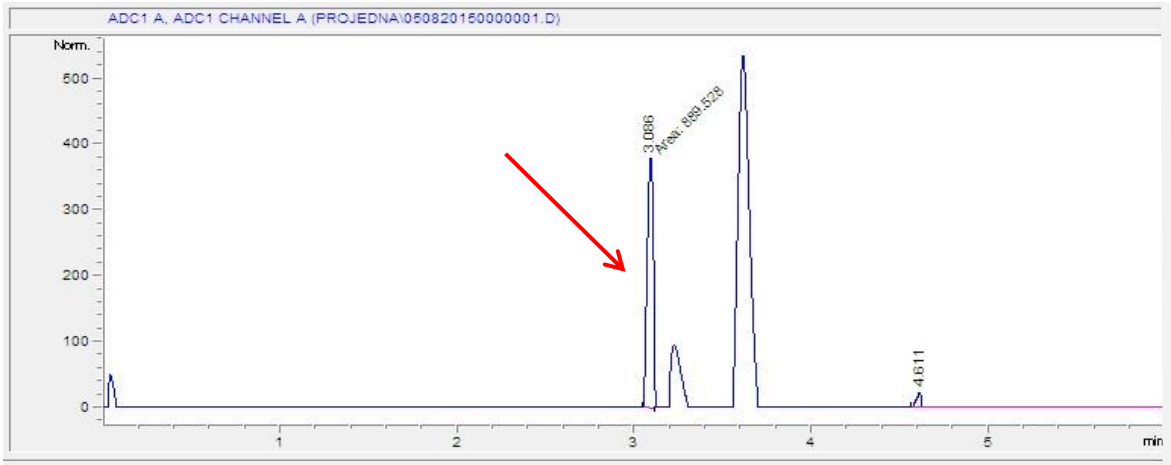
	Okside CoQ10/Redükte CoQ10			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		**Erkek**	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	0.272	0.271±0.033	0.304	0.301 ± 0.032^{B}
Pozitif Kontrol	0.255	0.279±0.059	0.395	0.402 ± 0.026^{A}
Zaprinast	0.264	0.268±0.031	0.320	0.331 ± 0.044^{B}
Avanafil	0.275	0.265±0.027	0.321	0.332 ± 0.029^{B}
		p<0.974		p<0.009

''ABCD'': Aynı sütünda farklı harf alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (erkek p<0.009).

4.16. Uygulama ve Tedavi Sonrası Dişi ve Erkek Gruplarda Oksidatif DNA Hasar Gösterglerinden 8-OHdG ve dG Ölçüm Sonuçları

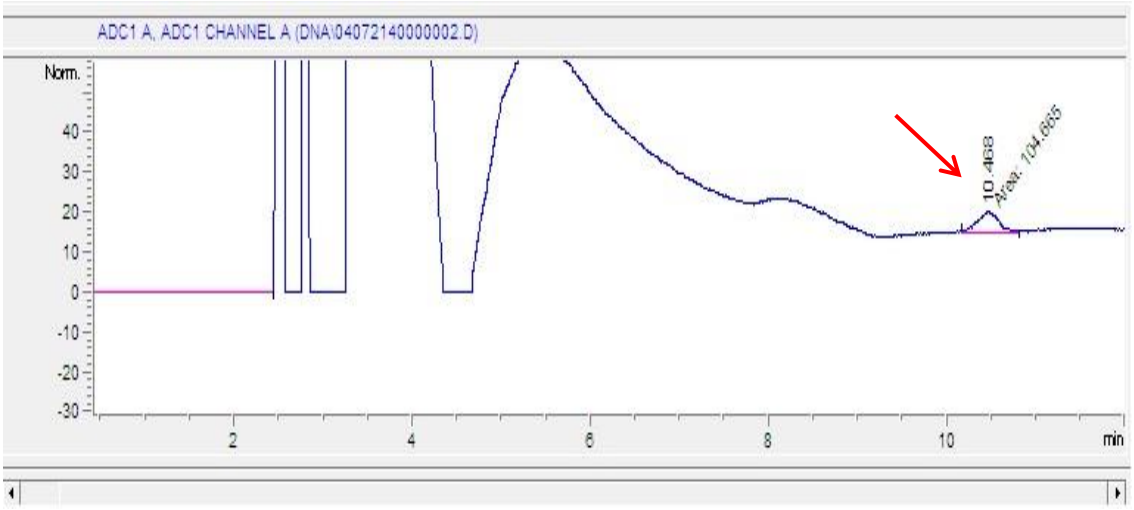
Uygulama ve tedavi sonrası bütün gruplarda oksidatif DNA hasar göstergelerinden 8-OHdG düzeyleri bölüm 3.13'e açıklanan yönteme göre yüksek basınçlı likid kromatografisi yöntemiyle ölçüldü. Bunun için önce 0.486 µM konsantrasyonda hazırlanan 8-OHdG standardı ECD ile belirlendi (Şekil 4.55). Uygulama ve tedavi sonrası bütün gruplarda dG düzeyleri bölüm 3.13'de açıklanan yönteme göre yüksek basınçlı likid kromatografisi yöntemiyle ölçüldü. Bunun için önce

1.87 µM konsantrasyonda hazırlanan dG standardı ECD dedektör ile belirlendi (Şekil 4.56).



Şekil 4.55. 8-OHdG standardına ait pik.

Numunelere ait elde edilen piklerin altında kalan, standarda ait pikin altında kalan alan ile karşılaştırılarak numune konsantrasyonları µM olarak hesaplandı. Elde edilen 8-OHdG değerleri dG değerlerine oranlanarak, 8-OHdG/10^6dG oranı olarak hesaplandı (Tablo 4.19).



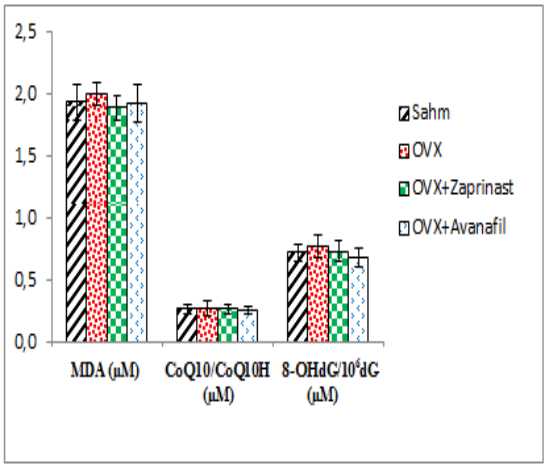
Şekil 4.56. dG standardına ait pik

Tablo 4.19. Uygulama ve tedavi sonrası dişi ve erkek gruplardan elde edilen 8-OHdG/10^6dG oranlarının karşılaştırılması.

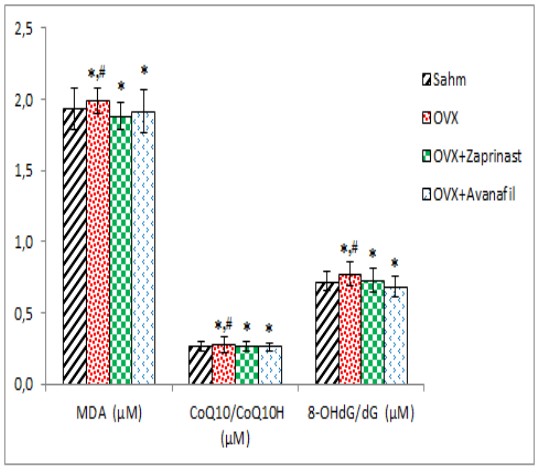
	8-OHdG/10^6dG			
	Deney Hayvanı Cinsi			
	Dişi		Erkek	
Gruplar	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**	**Medyan**	**Ortalama ± S. Sapma**
Sağlıklı Kontrol	0.726	0.721±0.067	0.646	$0.666±0.097^{B}$
Pozitif Kontrol	0.772	0.774±0.086	0.814	$0.831±0.073^{A}$
Zaprinast	0.721	0.732±0.081	0.473	$0.500±0.094^{C}$
Avanafil	0.677	0.684±0.069	0.499	$0.486±0.095^{C}$
		p<0.307		p<0.001

"ABCD": Aynı sütünda farklı harf alan değerler birbirine göre istatistiksel olarak anlamlı değerleri göstermektedir (erkek p<0.001).

Şekil 4.57 ve 4.58'de dişi ve erkek sıçanların MDA, CoQ10/CoQ10H ve 8-OHdG/10^6dG değerlerine ait oksidatif stres parametre sonuçları toplu olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.57. OVX, uygulama ve tedavi sonrası dişi sıçanlarda oksidatif stres parametre değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.58. DEX ve inhibitör uygulama sonrası erkek sıçanlarda oksidatif stres parametre değerlerinin karşılaştırılması

"*:Şahm veya sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı (p<0.05). "#": Diğer gruplara göre anlamlı (p<0.05)

5. TARTIŞMA

OP, kemik kırıkları ve kırılganlığa olan eğilimin artması sonucunu doğuran, kemik yapısındaki bozulma ve yoğunluğunun azalmasıyla karakterize olan ve giderek artan bir şekilde 50 yaşın üzerindeki kadınların %30'undan fazlasını etkileyen önemli bir halk sağlığı problemidir.[1,160] Ülkemizde yapılan bir çalışmada erkeklerde OP oranı 50-59 yaş gruplarında %15.8, 60-69 yaş grupları arasında %31.8, 70-79 yaş grubunda %25 ve 80-89 yaş grubunda ise %26.8 olarak bulunmuştur.[161] OP oluşumunu etkileyen birçok faktör varsa da, OP'un herhangi bir tipinin meydana gelmesinde etkili olan sebepler bilinmektedir. Osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunun azalması, osteoblastlar tarafından kemik oluşumunun azalması veya her ikisinin kombine etkisiyle OP'un meydana gelmesi bu sebeplerden bazılarıdır.[3] Bunlara ek olarak OP'da yaş ve östrojen eksikliği bilinen en önemli iki fizyolojik etkendir.[160]

İskelet üzerine koruyucu etkiye sahip olan östrojen eksikliğinin postmenapozal OP'un gelişmesinde önemli rol oynadığına inanılmaktadır.[162,163] Daha önce overektomi yapılmış ratlarda enzim immunoassay yöntemiyle ölçülen östrojen seviyeleri 16.8±0.9 pg/mL bulunarak, 29.6±1.1 pg/mL olarak bulunan şahm grubundan yaklaşık % 45 daha düşük olduğu belirlenmiştir.[100] Çalışmamızda, overektomi ile dişi ratlarda akut östrojen eksikliğine bağlı olarak OP oluşturduğumuz overektomili pozitif kontrol, zaprinast ve avanafil gruplarının östrojen değerlerinin sahm grubuna göre oldukça (yaklaşık 49.44%) düşük olduğu görülmüştür (Bölüm 4.11, Şekil 4.23). Bu sonuçlar ışığında elde edilen verilerin, daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olduğunu ve overektomi ile gerçekleştirmek istediğimiz akut östrojen eksikliğinin başarılı bir şekilde uygulandığını göstermektedir.

GCs kemik hücrelerinin farklılaşması ve metabolik aktivitesini değiştirmede önemli bir role sahiptir.[5] Ancak GCs'in tedavi amaçlı alımı, Cushing Sendromu gibi patolojik şartlarda daha fazla salgılanması, ve kronik strese bağlı olarak dolaşımdaki seviyelerinin artışı, OP ile ilişkili patolojik şartları artırabileceği ifade edilmektedir.[1] Antiinflamatuar ve immünosupressif ilaç olarak uzun süreli kullanıldıklarında kemik oluşumunda azalmaya ve OP meydana gelmesine yol açmaktadırlar. GCs yukarıda ifade edilen etkilerini, osteoblastların yaşam ömrünü azaltarak ve yeni osteoblast hücrelerinin oluşmasını engelleyerek, kemik oluşumunu inhibe etmektedirler.[5] Kann ve ark. (2001) sağlıklı ve primer OP'lu kadın hastalarda yaptıkları çalışmada oral olarak sentetik GC türevi olan DEX verilmesinin, serum kortizol düzeylerini yaklaşık % 15.4 düzeylerinde baskıladığını ortaya koymuştur.[164] Çalışmamızda 120 µg/kg subkutan olarak DEX verdiğimiz erkek sıçanlarda plazma kortizol düzeylerinin daha önce yapılan çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde şahm grubuna göre oldukça düşük olduğu (yaklaşık 53.29%) bulunmuştur (Bölüm 4.11, Şekil 4.23). Bu sonuç, yüksek DEX verilme düzeyine karşı organizmanın verdiği fizyolojik cevaptan kaynaklanmış olabilir.

OP'lu postmenapozal kadınların tedavisi için östrojenler, seçici östrojen reseptör modülatörleri, bifosfonatlar ve kalsitonin farmakolojik dozlarda kullanılmaktadır. Bu tedaviler, kemik rezorpsiyonunu azaltarak kemik yoğunluğunu artırır ve kırılganlığı azaltırlar. Mevcut durumda kullanılan kalsitonin, bifosfonatlar, östrojenler, östrojen reseptör modülatörleri[10] gibi moleküllere ek olarak başka moleküllerin farklı mekanizmalarla kemik mineralizasyonuna katkı yapabileceği ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır.[165,166] Pan ve ark. (2005) yaptıkları bir çalışmada daidzein, genistein gibi izoflavonların gen aktivitesini düzenleyerek osteoblastik hücrelerin farklılaşmasını ve yeniden şekillenmesini sağlayarak kemik anabolizması üzerine olumlu katkı sağladığını ve kemik yoğunluğunu artırdığını bulmuşlardır.[167]

OP'un gelişmesini önleyen birçok faktör vardır. Bu muhtemel faktörlerden biri de NOS enzim ailesi tarafından sentezlenen ve *in vitro* olarak osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe eden ve *in vivo* olarak kemiğin yeniden oluşumunu regüle eden eNO'dir.[162,163] NO, NOS ailesi tarafından L-arginin'den sentezlenen ve tüm memeli hücrelerinde çeşitli hücresel fonksiyonları ile küçük, çözünebilir, kısa ömürlü ve yüksek reaktiviteye sahip bir moleküldür.[168] Wimalawansa ve ark. (2000) NO'in insanlarda kemik kaybını azaltabileceğini göstermiştir.[169] NO'in *in vitro* çalışmalarda rapor edilen etkileri, *in vivo* olarak osteoblastik fonksiyonu artırabileceğine dair ipuçları vermektedir. NO'in, *in vitro* olarak osteoklast indekslerini değiştirdiği ve osteoklastik rezorpsiyonun, eNOS inhibisyonu süresince güçlendiği ifade edilmiştir.[170] Yapılan çalışmalar eNOS'ın osteoblastlar üzerine östrojenin etkilerine aracılık etmede tercihan ilişkili olabileceğini göstermektedir.[171] Armour ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada eNOS sinyal yolunun, osteoblastik fonksiyonu regüle etme suretiyle kemik turnover'ini ve yoğunluğunu düzenlemede önemli rol oynadığını göstermişlerdir.[172] Ayrıca eksojen östrojen verilmesinin zaman ilerledikçe eNOS seviyelerini ve kemik yoğunluğunu artırdığını ortaya koymuşlardır.[172] eNOS kemik rezorpsiyonunun kontrolünde anahtar bir role sahip olduğundan dolayı, bu proteine ait gen polimorfizmi OP için duyarlı bir faktör olabilir.[173] eNOS'dan türevlenen NO'in kurucu sinyal yolunun, kemik turnover'i ve kemik hücre fonksiyonunun regüle edilmesinde anahtar bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Çeşitli çalışmalar eNOS'un, kemik türevli hücrelerde ve yetişkin kemiğinde exprese edilen baskın izoformu olduğunu göstermiştir.[172,174] *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalar kardiyovasküler sistem kadar kemikte de östrojenin uyarıcısı olarak hareket edebileceğine işaret etmektedir.[172] Ayrca osteoblast farklılaşması ve fonksiyonu için zorunlu olduğu ve eNOS eksikliğinin kemik yoğunluğu azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.[172]

NO, guanilat siklaz ve cGMP üretimini artırır. cGMP vasküler düz kas hücrelerinde intrasellüler Ca seviyelerinin düzenlenmesinde ikinci mesajcı olarak rol oynar. cGMP'nin GMP'ye hidrolizi tip-5 fosfodiesteraz enzimine bağlıdır.[175,176] NO in, sinyal yolu aracılığıyla FDE-5 expresyonunu artırdığı ve kan akışının regülasyonunu sağladığına dair önemli kanıtlar vardır.[177] Gen çalışmalarından elde edilen kanıtlar, kemik oluşumunun en azından bir kısmının NO aracılı olduğunu göstermiştir.[178] Çünkü eNOS'u eksik olan veya eNOS eksikliğinde efektör cAMP bağımlı protein kinaz'ı baskılanmış olan farelerde kemik anomalilerinin meydana geldiği[179,180] , aynı zamanda iNOS'u kusurlu veya boş olan farelerde osteogenezde dengesizlik ve kemik iyileşmesinde anomali olduğu görülmüştür.[181] Yaşlı insan ve hayvanlarda yapılan çalışmaların sonuçları, NO ile muamele edilmenin kemik kaybını azalttığına işaret etmektedir.[182,183] Sildenafil, avanafil ve zaprinast gibi FDE-5Is, cGMP'nin etkisinin artırılması yolu ile vazodilatasyonu ve kan akışını artırır.[184,185] NO'in hücre içi etkilerine aracılık eden cGMP, PKG üzerinden NO'in etkilerini daha ileriye götürmektedir. FDE-5Is'nin farmakolojik aksiyonu, penis ve endotel düz kas hücrelerinde NO'in sinyal yolunu daha uzun süre aktif halde tutmaktır.[186] Sildenafil ile muamelenin beyin türevli endotelyal hücrelerde kapiller benzeri tüp oluşumunu tetiklediği bulunmuştur.[187] Bu raporlara ek olarak sildenafil'in, iskemik beyinde VEGF'nin seviyesini artırdığı ifade edilmiştir.[188] Yapılan bir başka çalışmada FDE-5 inhibitörü olan vardenafil'in kan akışını önemli düzeyde artırdığı ve VEGF ve HIF-1α protein expresyonlarını artırması yoluyla iskemik bacak kasında kapiller kollateral oluşumunu artırdığı gösterilmiştir.[189] Ayrıca Zhang ve ark. (2003) FDE-5 inhibitrölerinden olan sildenafil'in, felçli rat modellerinde iskemik sınır bölgelerinde anjiyogenezi teşvik ettiğini ortaya koymuşlardır.[187] Anjiyogenez hücre dışı matriks endotelyal hücre ilişkisinin yanısıra önemli bir şekilde iki farklı büyüme faktörü olan

VEGF ve anjiyopoietin tarafından kontrol edilir.[188] Kim ve ark. (2006) sildenafil'in VEGF, HGF ve FGF-2 gibi çeşitli anjiyogenik faktörleri artırdığını ortaya koymuşlardır.[190] Senthilkumar ve ark. (2007) sildenafil'in PKG aktivitesi ve cGMP seviyelerini artırılması yoluyla doku iskemisine cevap olarak anjiyogenezi artırdığını göstermişlerdir.[191]

Histopatolojik veya immünohistokimyasal değerlendirme dokuların takibi, doku atrofisi ve meydana gelen değişikliklerin belirlenmesinde önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalarda anjiyogenezi belirlemek için CD31'in kullanıldığı bilinmektedir. CD31 normal olarak endotelyal hücrelerde, trombositlerde, makrofajlarda, kupffer hücrelerinde, granulositlerde, NK hücrelerinde, lenfositlerde, megakaryositlerde, osteoklastlarda ve nötrofillerde bulunur. CD31 genellikle histolojik kesitlerde endotelyal hücrelerin varlığını göstermek için kullanılır. Ayrıca tümörlerde büyüme hızını gösteren anjiogenezin derecesini göstermek ve bazı hemangioendotelioma gibi damar tümörlerinin tesbit edilmesinde kullanılmaktadır.[192]

Yaptığımız çalışmada, kemik dokuda anjiyogenezi belirlemek amacıyla immünohistokimyasal olarak en önemli damar boyama yöntemlerinden olan CD31 faktörü kullanılmıştır.[192] Overerektomi ile akut östrojen eksikliğine bağlı dişi pozitif kontrol ve DEX ile muamele edilen erkek pozitif kontrol gruplarında şahm grubuna göre az da olsa bir anjiyogenez'in olduğu gözlenmiştir. Bu durum kemik yoğunluğu kaybına bağlı olarak, organizmanın kendini fizyolojik koruma cevabı olarak düşünülebilir. Ayrıca overektomi ile OP geliştirilen ve FDE-5 inhibitörlerinden zaprinast ile avanafil verilen dişi gruplarda ve DEX ile birlikte zaprinast ve avanafil verilen erkek gruplarında yapılan immünohistokimyasal incelemede, dişi sıçanlarda şahm grubuna göre, erkek sıçanlarda sağlıklı kontrol grubuna göre ciddi anjiyogenez'in meydana geldiği görülmüştür. Ancak anjyogenezdeki en önemli artışın avanafil

gruplarına ait olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, FDE-5Is'nin diğer dokularda olduğu gibi, kemik dokuda da anjiyogenez'i artırabileceği ile ilgili görüşleri desteklemektedir. FDEs'nin inhibe edilmesiyle artan cGMP konsantrasyonunun, kemik dokudaki yeni kapiller yapıların oluşumu (anjiyogenez)'nun artırılması ve buna bağlı olarak osteoblast hücrelerinin osteoklastlara dönüşümünü hızlandıracağı ile ilgili görüşler bulunmaktadır. Bu konu ile ilişkili olarak daha önce Kınoshıta ve ark. (2000)'nın yaptığı çalışmada genel fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoxifylline ve PDE-4 inhibitörü olan rolipram'ın normal farelerde kemik yoğunluğunu önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuşlardır.[3] Yine Yaman ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada anestezi altında 3-3-2 mm genişlik ve derinliğinde kemik hasarı oluşturulan sıçanlarda, FDE-5 inhibitörlerinden sildenafil sitrat'ın kemik iyileşmesine olumlu katkı yaptığını göstermişlerdir.[4] Çalışmamızda, FDE-5 inhibitörlerinden zaprinast ve avanafil'in kan dolaşımını artırarak yeni kapillerin oluşumu aracılığıyla kemik turnover'ini etkileyerek OP'lu hastalarda kemik mineralizasyonuna pozitif katkı yapabileceği düşünülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında, zaprinast ve avanafil'in NO, NO'i sentezleyen enzim ailesinden eNOS ve NO sinyal yolundaki cGMP ve PKG seviyeleri üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Avanafil ve zaprinast'ın eNOS, NO, cGMP, FDE-5 ve PKG üzerine etkilerine dair yaptığımız araştırmada, dişi ve erkek sıçanların pozitif kontrol gruplarında, ilgili parametrelerin kısmen de olsa arttığı gözlenmiştir. Ancak bu artış, şahm grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca avanafil kullandığımız gruplarda cGMP ve PKG düzeylerinin şahm grubu değerlerine göre oldukça yüksek olması, avanafil'in zaprinast'a göre NO sinyal yolunu daha fazla aktive edebildiğini göstermektedir (Bölüm 4.8, Şekil 4.19, 4.20).

KMY, kemik kalitesinin ölçümü ve OP teşhisinde kullanılan en önemli parametrelerdendir.[37] Kemik miktarı KMY ile verilir. Düşük KMY osteoporetik

vertebral kırıkların yüksek riskini gösteren belirteçlerden biridir.[36] Nitekim yapılan birçok çalışmada KMY, OP'un tanısında ve tedavinin takibinde en önemli referans değerleri arasında yer almaktadır.[37] Daha önce overektomi ile OP oluşturulan ratlarda KMY'nun azaldığı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Li ve ark. (2014) overektomize ratlarda KMY'nun şahm grubuna göre düştüğünü, ancak farklı dozlarda kullanılan ve antioksidant olan naringin'in, KMY azalmasını önemli ölçüde koruduğunu ortaya koymuştur.[193] Yine Im ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada overektomili sıçanlarda KMY değerlerinin şahm grubuna göre düştüğü ve AMD3100 (CXCR4 antagonist) kullanılan grupta ise KMY değerlerinin sahm grubu değerlerine benzer olduğunu göstermiştir.[194] Daha önceki çalışmalar GCs'e maruz kalmanın KMY'nu artırdığı veya azalttığına dair birbirine zıt sonuçları içermektedir.[195,196] Bu durum çalışmada kullanılan deney hayvanlarının yaşı ve uygulanan GC dozu ile ilişkilidir. Ancak bununla birlikte diğer hayvan türlerindeki klinik ve deneysel çalışmalar, GCs'in KMY'nu azalttığını ve sonuçta OP'a sebep olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.[36] Böcker ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada overektomili dişi ve GC verilen erkek pozitif kontrollerinde KMY'nun sahm grubuna göre azaldığını rapor etmişlerdir.[36] Çalışmamızda, daha önceki çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde, overektomi yapılan dişi ve DEX verilen pozitif kontrol gruplarında KMY değerlerinin düşük olması (Bölüm 4.1, Şekil 4.2 ve 4.3) uygulama yapılan sıçanlarda OP geliştiğini göstermektedir.

Ayrıca yaptığımız literatür taramasında zaprinast ve avanafil'in KMY üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma tesbit edilememiştir. Yaptığımız çalışmada, zaprinast ve avanafil gruplarına ait KMY değerlerinin pozitif kontrol grubuna göre yüksek olması, zaprinast ve avanafil'in KMY üzerine olumlu etki yaptığını göstermektedir. Ayrıca KMY değerleri incelendiğinde bu olumlu etkinin avanafil

grubunda daha fazla olması, avanafil'in akut östrojen eksikliği ve DEX alımına bağlı olarak gelişen KMY kaybını zaprinast'a göre daha iyi önlediğini göstermiştir.

Çalışmamızda ayrıca plazmada CTCP, PICP ile idrarda DPD ve PD değerleri de araştırılmıştır. Osteokalsin, kollagen peptid-I (CTX), PICP ve homosistein, kemik oluşumu ve turnover'inde yer alan ve osteoblastik aktiviteyi yansıtan en önemli serum marker'leri olarak bilinmektedir.[197] İdrarda PD ve DPD ise kemik yıkım marker'ları olarak kullanılmaktadır. Araştırmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda, avanafil ve zaprinast kullandığımız overektomili dişi gruplarda CTCP düzeyleri şahm ve overektomili pozitif kontrol grubuna göre daha yüksekti. Ek olarak bu yüksek düzeyin avanafil gruplarında daha fazla olması, diğer ölçtüğümüz parametreler ile uygunluk gösterecek şekilde osteoblastik aktivite ve kemik turnover'inin avanafil gruplarında daha fazla olduğunu ortaya koymuştur. Dişi sıçanlarda PICP değerleri üzerine elde ettiğimiz sonuçlar, overektomili gruplarda PICP düzeylerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak zaprinast ve avanafil gruplarına ait değerlerin overektomili pozitif kontrol grubuna göre daha düşük olması izah edilememiştir.

Erkek sıçanlarda DEX verilen pozitif kontrol grubunda PICP değerleri yükselmişken zaprinast ve avanafil grubunda ise dişi gruplarıyla paralellik arzedecek şekilde düşmüştü. Ancak erkek sıçanlarda ölçtüğümüz CTCP değerleri zaprinast ve avanafil grubunda osteoblastik aktiviteyi yansıtacak şekilde şahm ve DEX grubuna göre artmıştı. Bu sonuçlar osteoblastik aktiviteyi yansıtan PICP ve CTCP parametreleri üzerine zaprinast ve avanafil'in zıt etkilerini ortaya çıkarmıştır. Ancak zaprinast ve avanafil'in NO metabolik yolu üzerine etkileri ve kemik yoğunluğu, gelişme plağı genişliği ile ilgili patolojik sonuçlarla kombine edildiğinde, osteoblastik aktiviteyi yansıtan CTCP düzeylerini korele bir şekilde artırdığını göstermiştir (Bölüm 4.10, Şekil

4.19 ve 4.20). Bu durumun neden kaynaklandığı ve moleküler düzeyde farklı etkileşimlerin olup olmadığı araştırmaya değer bir konudur.

Ayrıca dişi sıçanlarda overektomi yapıldıktan sonra pozitif kontrol grubunda idrarda ölçülen PD ve DPD değerleri, overektomi yapılmadan önceki değerlere göre oldukça yüksekti ($p<0.05$). Ancak zaprinast ve avanafil kullanılan gruplarda bu değerler overektomi öncesine göre daha da azalmıştı ve pozitif kontrol grubuna göre oldukça düşüktü ($p<0.05$). Erkek sıçanlarda ise DEX verildikten sonra PD ve DPD değerleri pozitif kontrol grubunda oldukça yüksek iken, zaprinast ve özellikle de avanafil gruplarında oldukça düşmüştü (sırasıyla Bölüm 4.2, Şekil 4.5 ve 4.6 ile Bölüm 4.3, Şekil 4.8 ve 4.9). Bu sonuçlar, yukarıda değerlendirdiğimiz parametreler ile de önemli ölçüde uygunluk göstermekte ve özellikle de avanafil kullanılan gruplarda kemik yıkımının çok daha az olduğunu ortaya koymaktadır.

Kemik dokuda, trabeküler mikromimarinin korunmasının önemli ölçüde kemik gücüne katkıda bulunduğu ve KMY'undan bağımsız olarak kırık riskinde azalmaya sebep olduğu ifade edilmişltir.[198] Vertebral kemikler baskın olarak trabeküler kemikten oluşur (trabeküler kemik 95%, kortikal kemik 5%).[36] Bu nedenle yapılan birçok OP çalışmasında trabeküler kemik yoğunluğunun ölçümü önem arzetmektedir. Li ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, overektomize ratlarda femur ve femur başının kırılganlık riskinin arttığını ve koruyucu olarak kullandıkları naringin'in kırılganlığı önemli ölçüde iyileştirdiğini ortaya koymuşlardır.[193] GCs ile muamele, proksimal femur ve distal radius gibi uzun kemiklerde bulunan kortikal kemiklerden ziyade, trabeküler kemiği etkiler.[199] Yapılan çalışmalar büyüyen farelerde yüksek doz GC muamelesinden sonra trabeküler bölge osteosit apoptozunun arttığını ortaya koymaktadır.[63] Ayrıca GCs'in, femural trabeküler kemik oranını azalttığı ve GC ile indüklenen OP'li ratların KMY içeriğini artıran EGb'yi düşürdüğü gösterilmiştir.[200] Shi ve ark. (2014) DEX ile

muamele edilen osteoblastların osteoklastogenez'i ve kemik rezorpsiyonunu artırdığını göstermişlerdir.[69] Biz de çalışmamızda hem dişi hem de erkek sıçanların sağ femur trabeküler kemik yoğunluğu üzerine yaptığımız histopatolojik incelemede, overektomili dişi ve DEX kullanılan erkek pozitif kontrol gruplarında, sağlıklı kontrol ve sahm gruplarına göre sağ femur trabeküler kemik yoğunluklarının daha önceki çalışmalarla uyumlu olacak şekilde oldukça azalarak inceldiği görüldü. Ancak hem dişi hem erkek sıçan gruplarında kullandığımız zaprinast'ın, sağ femur trabeküler kemik yoğunluğunu önemli ölçüde koruduğunu ve bu gruplarda meydana gelebilecek atrofiyi önemli ölçüde engellediğini gördük. Ek olarak hem dişi hem de erkek sıçanlarda kullandığımız avanafil gruplarında trabeküler kemik yoğunluğu sağlıklı kontrol ve şahm gruplarına ait trabeküler kemik yoğunluğuna benzerdi ve herhangi bir atrofi gelişmemişti. Ayrıca, çalışmamızda her iki cinsiyete ait gruplarda sağ femur gelişme plağı üzerine histopatolojik inceleme de gerçekleştirdik. Overektomili dişi ve yalnızca DEX verilen pozitif kontrol gruplarında, sağlıklı kontrol ve şahm gruplarına göre gelişme plağı genişliği oldukça incelmişti ve ciddi düzeyde atrofi vardı. Ancak zaprinast kullandığımız dişi ve erkek gruplarında gelişme plağı atrofisi daha azdı. Avanafil kullandığımız dişi ve erkek gruplarında ise gelişme plağı genişliği sağlıklı kontrol ve şahm gruplarına benzerdi ve önemli bir atrofi söz konusu değildi (Bölüm 4.12, Şekil 4.37 ve Bölüm 4.13, Şekil 4.51). Bu sonuçlar zaprinast ve avanafil'in, overektomili dişi ve DEX kullanılan erkek sıçanlarda kemik mineralizasyonuna önemli katkı yaptığını ve kemik atrofisini önemli ölçüde engellediğini ortaya koymaktadır.

Yapılan çalışmalarda fizyolojik konsantrasyonların üzerindeki aşırı ROS'nin, OP'un gelişmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir.[197] Orta düzey ROS, çok sayıda hücresel prosesi etkiler. Fizyolojik konsasntrasyonların üzerinde olan ROS, OP gibi yaş ile ilişkili hastalıkların gelişimiyle ilişkilendirilmiştir.[201] Böylece oksidatif stres,

postmenapozal ve akut östrojen eksikliği ile indüklenen OP'a önemli bir katkı yapabilir.[202] OP'un serbest radikaller ve antioksidan aktivite arasındaki dengesizliğin bir sonucu olduğu bilinmektedir.[203] OP, hücreler için tehlikelidir ve nükleik asitler, proteinler, membranlar ve lipidlere zararı da içerecek şekilde, inflamasyonda önemli rol oynayabilir.[204] İnsanlardaki epidemiyolojik ve hayvanlardaki mekaniksel çalışmalar, oksidatif hasarın OP'un kritik patogenik faktörü olduğunu göstermiştir.[205] Postmenapozal kemik kaybı ve yaşlanmayı da içeren patofizyolojik süreçlerde oksidatif stresin anahtar bir rol oynadığı ifade edilmiştir.[202,206] Menapozda OP oluşumunun, lipoperoksidasyon artışı ile lipid profilinde değişikliklere yol açan östrojen eksikliği ile meydana gelebileceği ifade edilmiştir.[207] Osteoporetik postmenapozal kadınlarda KMY'ndaki azalmanın yüksek plazma lipid oksidasyonu ve süperoksid dismutaz (SOD), katalaz gibi enzimlerin aktivitesinin düşmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.[202] Nitekim konu ile ilgili olarak çok sayıda çalışma, oksidatif stresin yaş ile ilgili mekanizmalardan veya östrojen eksikliğinden kaynaklanan kemik kaybının önemli bir patojenik faktörü olduğunu ortaya koymuştur.[208] Ek olarak, oksidatif stres sadece hücre canlılığını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hücre farklılaşmasına da etki eder. Nitekim daha önce yapılan çalışmalar hücre hasarında ortaya çıkan H_2O_2'in fare osteoblastik MC3T3-E1 hücre kültürlerinde, osteogenik farklılaşmayı inhibe ettiğini göstermiştir.[209,210]

Overektomi yapılan sıçanların femurlarında oksidatif stresin arttığı ve antioksidan savunma kapasitesinin azaldığı ifade edilmektedir.[211] Bu sebeple oksidatif stresin postmenapozal osteoporozise önemli katkı yaptığı değerlendirilmektedir.[202]

MDA, ROS'i tarafından tetiklenen lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve diğer oksidatif stres parametreleri ile beraber ortaya çıkar.[212,213] Serbest radikaller aracılığıyla hücre membran stabilitesinin bozulması ile lipid peroksidasyonunun

gerçekleşmesi sonucu meydana gelen MDA, oksidatif stresin belirlenmesinde en önemli belirteç olarak kullanılmaktadır.[212] Yu-Bin Zhang ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada oksidatif modifiye lipid birikiminin yaş ile ilişkili kemik kaybı ile negatif korele olduğunu ortaya koymuşlardır.[214] Huang ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada overektomi yapılan sıçanlarda MDA düzeylerinin şahm grubuna göre yükseldiğini ve overektomi yapılan diğer gruplarda antioksidan olarak kullanılan mirisetin'in ise overektomi yapılan pozitif kontrol grubuna göre MDA düzeylerini önemli ölçüde düşürdüğünü tespit etmişlerdir.[208] Yalin ve ark. (2005) primer erkek OP'lu hastalarda MDA düzeylerinin sağlıklı kontrolllerden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.[215] Yine Muthusami ve ark. (2005) overektomili sıçanların femur dokusunda MDA düzeylerinin normal sıçanlara göre arttığını göstermişlerdir.[211] Ek olarak Effendy ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada overektomi yapılan ratlarda 6 ve 9. haftada MDA düzeylerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır.[216]

Yukarıda ifade ettiğimiz bilimsel çalışma ve bulgular ile uyumlu olacak şekilde, biz de cerrahi girişimle overektomi yaptığımız pozitif kontrol grubunda sahm grubuna göre MDA seviyelerinin kısmen de olsa yükseldiğini gördük. Fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca overektomi yapılan dişi gruplarda daha önceki çalışmalar ile uygunluk gösterecek şekilde MDA artışı ile ilişkili olarak şahm grubu dışındaki gruplarda KMY düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir (Bölüm 4.16, Şekil 4.57 ve 4.58)

Östrojen eksikliğinden kaynaklanan kemik yoğunluğu, yaşlanma ve östrojen eksikliğinin, ROS'nin seviyesini yükseltmesi üzerine antioksidanların koruyucu etki yapabileceğine dair güçlü kanıtlar vardır.[217] ROS'nin aşırı üretimi kemikteki osteoblastların yaşam süresini kısaltır. Bu sebeple overektomili veya yaşlanmış farelerde osteoblast apoptozis'ini inhibe eden antioksidanların verilmesinin faydalı olabileceği ile ilgili görüşü destekleyen kanıtlar giderek artmaktadır.[218,219]

İnsanlar ve hayvanlar üzerine yapılan son çalışmalarda, FDE-5 inhibitörlerinin (sildenafil, vardenafil, tadalafil, avanafil, zaprinast gibi) anjiyogenez etkileri dışında farklı dokularda antioksidant etkiye de sahip olduğunu rapor edilmiştir.[220-222] FDE-5 inhibitörleri arasında en çok çalışılan sildenafil'in antioksidant redoks sistemini destekleme ve serbest radikal oluşumunu inhibe etmek suretiyle oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.[223] Ek olarak iskemi reperfüzyon yaralanması ile fötal rat beyin modellerinde tadalafil'in GSH-Px ve diğer antioksidan enzim aktivitelerini artırmak suretiyle endojen süperoksid indirgenmesinde etkili olduğu ifade edilmiştir.[224] Abdollahi ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, tükürükte ve tükürük bezlerinde kurşun ile indüklenen lipid peroksidasyonu artışını sildenafil'in önlediğini ve tükürük bezi ve salgısında total antioksidan kapasite (TAOC)'yi artırdığını bulmuşlardır.[225]

Yaptığımız literatür taramasında *in vivo* ve *in vitro* olarak OP'lu insanlarda veya hayvan modellerinde, FDE-5 inhibitörlerinden olan zaprinast ve avanafil'in antioksidan kapasite, lipid profili, lipid peroksidasyonu, mitokondri ve oksidatif DNA hasarı üzerine yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak, yukarıda FDE-5Is'nden sildenafil ile ilgili yapılan çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde dişi sıçanlarda kullandığımız FDE-5 inhibitörlerinden zaprinast ve avanafil'in, overektomi yapılan pozitif kontrol grubuna göre MDA düzeylerini önemli ölçüde koruduğunu gözledik. Ancak grup ortalamaları arasında önemli farklar olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi.

İnsanlarda yapılan çalışmalar idrar ve serum 8-OHdG düzeylerinin oksidatif DNA hasarının biomarker'i olarak sıklıkla kullanılmaktadır.[226] Isomura ve ark. (2004) yaptıkları hayvan çalışmasında postmenaposal ratlarda idrar sekresyonunda 8-OHdG düzeylerinin oksidatif stresin dikkate değer bir indikatörü olduğunu ortaya

koymuşlardır.[227] Qian ve ark. (2012) osteopeni'li postmenapozal kadınlarda yaptıkları çalışmada placebo gruplarında başlangıç, 1, 3 ve 6. aylarda yaptıkları ölçümlerde idrar 8-OHdG (ng)/kreatinin(mg) düzeylerinin diğer ilaç gruplarına göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.[226] Yaptığımız literatür taramasına göre zaprinast ve avanafil'in mitokondri hasar göstergelerinden okside CoQ10, redükte CoQ10 veya CoQ10 /redükte CoQ10 oranları ile oksidatif DNA hasar göstergelerinden 8-OHdG seviyesi veya 8-OHdG/10^6dG oranları üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Yaptığımız çalışmada okside CoQ10/redükte CoQ10 oranları üzerine elde ettiğimiz değerlere baktığımızda, overektomi yapılan pozitif kontrol grubunda mitokondri hasarının çok az düzeyde arttığını gözledik. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca zaprinast ve avanafil kullanılan diğer overektomili gruplarda herhangi bir artış söz konusu değildi ve okside CoQ10/redükte CoQ10 oranları şahm grubu değerlerine benzerdi. Ek olarak overektomi yapılan pozitif kontrol grubunda, şahm grubuna göre 8-OHdG/10^6dG oranları yükselmişti. Ancak zaprinast ve avanafil grubu 8-OHdG/10^6dG oranları korunmuştu ve pozitif kontrol grubuna göre oldukça düşmüştü. Ancak bu farklılıklara rağmen gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmedi (Şekil 5.8).

Elde edilen sonuçlar dişi sıçanlarda overektomi ile akut östrojen eksikliğine bağlı olarak oksidatif stresin arttığı ile ilgili daha önce yapılan çalışmaları ve görüşleri desteklemektedir. Ayrıca overektomili sıçanlarda zaprinast ve avanafil'in, oksidatif stres artışını engelleyerek daha önce çalışılan diğer FDE-5 inhibitörlerinin (sildenafil, tadalafil v.b) antioksidan fonksiyonları ile uygunluk gösterdiği belirlenmiştir.

Steroid hormonların bir türü olarak GCs'in verilmesi, otoimmün hastalıklar ve inflamasyon gibi hastalıklarda yaygın bir terapi çeşididir.[228] Yüksek doz veya uzun süre GCs'in verilmesi, OP ve kemik kırıkları dA dahil birçok yan etkisinden dolayı,

klinisyenleri büyük bir dikkate sevk etmektedir.[229,230] OP'un yükek maliyetinden dolayı, GC ile indüklenen osteotoksisitenin altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasını daha önemli kılmaktadır.[231] GC olarak DEX, sentetik ve uzun süren etkisi sebebiyle yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. DEX doz ve süreye bağlı olarak osteoblast hücre kültürlerinde osteoblastik aktivite üzerine pozitif veya negatif etkiler ortaya koyabilmektedir.[232,233] *İn vitro* çalışmalar 10^{-8} M DEX'un kemik ilik stromal hücre farklılaşmasını uyardığını[1-6], oysa 10^{-7} M DEX'a maruziyetin ise osteoblast farklılaşmasını azalttığı ve yağ hücre farklılaşmasını artırdığını ortaya koymuştur.[234] Bununla birlikte DEX'un mineralize kemik matriks depolarını tahrip etme mekanizmasını nasıl gerçekleştirdiği tam olarak aydınlatılamamıştır. GC ile indüklenen OP ile ilişkili muhtemel bir mekanizma, oksidatif strestir. DEX antioksidan enzimlerin inhibisyonu veya antioksidan moleküllerin azalması suretiyle dolaylı olarak oksidatif stresi tetikleyebilir.[231] Nitekim Feng ve Tang (2014), DEX verildikten sonra antioksidanların azalmasının, ROS'nin ve lipid peroksidasyonunun artmasının GC'e bağlı OP oluşumunun etyopatogenezinde önemli rol oynayabileceğini ifade etmişlerdir.[231] Çünkü *in vivo* çalışmalar osteoporetik kadınlarda antioksidanların seviyelerinin azaldığını ve lipid peroksidasyonunun artttığını göstermiştir.[235] Aynı araştırıcılar, ayrıca 0.1, 1, 10 μM DEX verilmesinin Cbfa1'in expresyonunu azalttığını ve artan oksidatif stresin etkisiyle osteoblast fonksiyonu ve farklılaşmasını inhibe ettiğini göstermişlerdir.[231]

GC ile inüklenen oksidatif stresin, en duyarlı olandan daha az duyarlı olana doğru sıralandığında beyin, böbrek, kalp gibi dokular üzerine etkili olduğu ifade edilmektedir.[236] Yüksek doz DEX'a maruz kalmaya cevap olarak sıçan hipokampal kesit kültürlerinde, vasküler endoteliyal hücrelerde, timosit ve miyelom hücrelerinde anahtar antioksidan enzimlerin inhibisyonu ve lipid peroksidasyonunun artışı ile

oksidatif hasarların arttığına dair bazı çalışmalar vardır.[237,238] Bu yüzden osteoblastlar ve kemik doku üzerine GCs ile indüklenen oksidatif stresin etkilerine daha fazla dikkat çekilmelidir.[231] H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres, osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinde osteoblastik hücre farklılaşmasını inhibe ettiği rapor edilmiştir.[210,239] H_2O_2 ile muamele edilen osteoblastlar Cbfa1'i de içeren çeşitli osteoblastik marker'ların expresyonunun azalmasına yol açar.[240,241] DEX ile muamele edilen timositlerde oksidatif stresin artışıyla direkt ilişkili olan kompleks III ubiquinone döngüsünde, mitokondrial H_2O_2'in üretiminin artırdığı gözlenmiştir.[242] GCs mitokondride oksidatif fosforilasyonunu uyarır ve mitokondri RNA'sının seviyelerini ve solunum zinciri aktivitesini artırır. Mitokondri DNA'sında 6 dizilim bölgesi, GCs'in genomik etki bölgesine benzerdir. Bu bulgular, mitokondri transkripsiyonu ile GCs'in aktivasyonu arasındaki ilişki, mitokondri elektron transport zincirinde ROS'nin GCs tarafından artırıldığını ortaya koymaktadır.[241] DEX ile mumelenin T lenfositlerde glutatyon-S-transferaz messenger RNA expresyonunu artırdığını, tiyoredoksin, glutatyon peroksidaz, katalaz ve SOD'ın mesajcı RNA'sını baskıladığı gösterilmiştir.[243,244] Ayrıca DEX'un beyin ve hipokampal hücre kültürlerinde ROS'nin üretimini artırdığı ve serebral antioksidan enzimlerin bazal aktivitelerini düşürdüğü bildirilmektedir.[245] Yine *in vitro* çalışmalar GCs'e maruz kalmanın serebral granül hücreleri[246] ve hipokampal nöronlarda[247] oksidatif stres ile indüklenen hücre ölümünü artırdığını göstermiştir.

Ortaya çıkan kanıtlar, uzun süre yüksek doz GCs'e maruz kalmanın direkt olarak mitokondriyal disfonksiyona sebep olan, hücresel enerji verimini azaltan ve çeşitli hücre tiplerinin apoptozuna ve oksidatif strese yol açan mitokondrial geçirgenliği ve stozolik Ca'un artmasına yol açtığı gösterilmiştir.[248,249] DEX'un, apoptotik hücre ölümünü ve oksidatif hasarı regüle edebildiğine dair başka kanıtlar da ortaya konmuştur.[250] Nitekim DEX'un, hücre içi Ca düzeyini artırdığı, antipoptotik

proteinlerin salınımını azalttığı, stokrom c salınımını artıran ve caspase 3'ü aktive eden Bax gibi proapoptotik protein expresyonunu ve intranükleozomal DNA parçalarını artırdığı ve hücre apoptozisi ile sonuçlanan hasarları tetiklediği gösterilmiştir.[251] Ayrıca DEX'un yüksek seviyelerinin, oksidatif stres ile sonuçlanan H_2O_2 ve lipid peroksidasyonu seviyelerini yükselttiği, T-AOC ve SOD seviyelerini ise azalttığı rapor edilmiştir.[252] Assaf ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada DEX verilmesinin serum asetilkolin esteraz (Ach-E) aktivitesi ile MDA ve NO seviyesini artırdığını, katalaz, GSH-Px ve GST aktivitelerini azalttığını ortaya koymuşlardır.[253] Feng ve Tang (2014) yaptıkları çalışmada 0.1, 1, 10 μM DEX ile muamelenin ROS ve MDA üretimini artırdığını ve T-AOC'yi düşürdüğünü bulmuşlardır.[231] Çalışmamızda, DEX ile muamele edilen pozitif erkek sıçan gruplarında MDA seviyelerinin daha önce yapılan çalışmalar ile uygunluk gösterecek şekilde ciddi oranda arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Yapılan literatür taramasında, zaprinast ve avanafil'in GCs ile indüklenen osteporozda lipid profili, lipid peroksidasyonu veya oksidatif stres parametreleri üzerine yapılan herhangi bir çalışma belirlenememiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, DEX ile birlikte zaprinast ve avanafil kullandığımız gruplarda MDA düzeylerinin pozitif kontrol grubuna göre oldukça düşük olduğunu gösterdi ($p<0.05$). Ayrıca erkek sıçanlarda okside CoQ10/redükte CoQ10 ve 8-OHdG/10^6dG oranları üzerine yaptığımız araştırmada, DEX verilen tüm gruplarda CoQ10/redükte CoQ10 ve 8-OHdG/10^6dG oranları oldukça yükselmişti ($p<0,05$). Ancak DEX ile birlikte zaprinast ve avanafil verdiğimiz gruplarda CoQ10/redükte CoQ10 ve 8-OHdG/10^6dG oranları, pozitif kontrol grubuna oldukça düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Bu sonuçlar erkek sıçanlarda daha önce yapılan çalışmalar ile uygun olacak şekilde, DEX verilmesiyle beraber oksidatif stresin oldukça arttığını, ancak DEX ile birlikte zaprinast ve özellikle de avanafil verilmesinin oksidatif stresi önemli ölçüde önlediğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, overektomi yapılan dişi sıçanlarda akut östrojen eksikliğine bağlı olarak oksidatif stresin arttığını ortaya koymuştur. Ancak çalışmamızda kullandığımız zaprinast ve avanafil, overektomi ile akut östrojen eksikliğine bağlı meydana gelen OP'da, NO metabolik yolunu aktive ederek kemik dokuda anjiyogenez'i önemli ölçüde artışmış, KMY kaybını, kemik atrofisini ve östrojen eksikliğine bağlı oksidatif stresi önemli ölçüde engellemiştir. Ayrıca zaprinast ve avanafil, dişi sıçanlarda olduğu gibi, DEX verilen erkek sıçanlarda da kemik dokuda anjiyogenez'i belirgin şekilde artırmış ve KMY kaybını, kemik atrofisini ve DEX'a bağlı oksidatif stresi ciddi düzeyde azaltmıştır. Bu sonuçlar zaprinast ve avanafil'in akut östrojen eksikliği ve GC alımına bağlı olarak meydana gelebilecek oksidatif stresi, KMY kaybını ve kemik atrofisini önleyebileceğine dair kanıtları ortaya koymaktadır. Ancak zaprinast ve avanafil'in akut östrojen eksikliği ve DEX verilmesine bağlı KMY kaybını, kemik atrofisini ve oksidatif stresi nasıl engellediği ile ilgili, moleküler düzeyde yeni çalışmaların yapılmasını önemli hale getirmektedir.

Ek olarak, zaprinast ve avanafil 'in, osteoblastik aktiviteyi yansıtan Dkk-1, EGb, Bcl2 gibi proteinlerin yanısıra, osteoblast apoptozuna yol açan Bax, kaspaz 3 ve 9 gibi proapoptotik proteinlerin gen expresyonu üzerine etkileri ile KMY'na katkı sağladığı ortaya konulan teriparatid gibi proteinler üzerine etkileri ile ilgili moleküler düzeyde yeni ve ayrıntılı çalışmaların yapılmasının, FDE-5 inhibitörlerinin OP'da klinik uygulamalarda ilaç olarak kullanılıp kullanılamayacağı sorusuna cevap oluşturabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1- Sun, X, Fengbo L, Xinlong MA, Jianxiong MA, Zhao B, Zhang Y, Yanjun L, Jianwei LV and Meng X. The effects of combined treatment with naringin and treadmill exercise on osteoporosis in ovariectomized rats. *Scientific Reports,* 2015; 5(13009): 1-9. DOI: 10.1038/srep13009

2- Hui-Ping M, Lei-Guo M, Bao-Feng G, Yuan-Kun Z, Peng S, Cory JX and Ke-Ming C. Icarin is more potent than genistein in promoting osteoblast differentiation and mineralization *in vitro*. *Journal of Celluler Biochemistry,* 2011; 112: 916-923.

3- Kinoshita S, Kobayashı S, Ebara Y, Yoshımura H, Hhoriuchi T, Tsutsumımoto Wakabayashı S. and Takaoka K. Phosphodiesterase inhibitors, Pentoxifylline and Rolipram, increase bone mass mainly by promoting bone formation in normal mice. *Elsevier Science Inc*, 2000; 8: 11-817.

4- Yaman F, Atılgan S, Günes N, Agacayak S, Gunay A, Ucan MC, Bakir S, Erol B, Kose, I, Atalay Y. Phosphodiesterase-5 inhibitors may facilitate bone defect recovery. *European Review For Medical and Pharmacological Sciences*, 2011; 15(11): 1301-1305.

5- Corbett SA, Hukkanen M, Batten J, McCarthy ID, Polak JM, Hughes SP. Nitric oxide in fracture repair. Differential localisation, expression and activity of nitric oxide synthases. *Journal of Bone and Joint Surgery British*, 1999; 81: 531-537.

6- Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, Garcia VF. Nitric oxide: an oerview. *American Journal of Surgery*, 1995; 170: 292-303.

7- Kass DA, Takimoto E, Nagayama T, Chamption HC. Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovascular Research*, 2007; 75: 303-314.

8- Mancini N, Moradi-Bidhendi L, Becherini V, Martineti I. et al. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications,* 2000; 274: 477-481.

9- Wendy KY, Rosenblatt Y, Brock CB. et al. Phosphodiesterase inhibitör in vascular ischemia: A case report and review of their use in ischemic conditions. *Can J Plast Surg*, 2010; 18: 5-9.

10- Kılıçkesmez K ve Küçükoğlu MS. Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde fosfodiesteraz 5 inhibitörleri. İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü, Kardiyoloji AD, İstanbul, Turkiye, *Anodolu Kardiyoloji Dergisi*, 2010; 2(10): 16-18.

11- Jun K, Hideki M, Hirotaka I, Tsunehisa N, Kotomi F, Takashi S, Tamaki K, Koki K, Shiyin Y, Yasuhiro Y, Kohei K. and Kenji O. Avanafil, a potent and highly selective phosphodiesterase-5 inhibitor for erectile dysfunction. *The Journal of Urology*, 2012; 188: 668-674.

12- Cheryl AF and Madeline ER. Zaprinast, a phosphodiesterase-5 inhibitor, overcomes sexual dysfunction produced by Fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor in hamsters. *Neuropsychopharmacology*, 2003; 28: 310-316.

13- Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Sandip-Chakraborty S, Kuldeep D. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay. *BioMed Research International*, Rewiev, 2014; 19 pages.

14- Zhang L, Li L, Yang M, Xu K, Boden G, Yang G. The rhPTH treatment elevates plasma secreted protein acidic and rich in cysteine levels in patients with osteoporosis. *Osteoporosis International*, 2013; 24: 1107-1112.

15- Bulca S. Östrojen reseptör alfa geni XBA I ve PVUII polimorfizmlerinin postmenapozal osteoporozlu hastalarda incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitütüsü,

Tıbbi Biyoloji Anabilm Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2010: 1-30.

16- Altunbayrak O. Pasif sigara içimi postmenapozal osteoporoz için bir risk faktörü müdür? Aile hekimliği. Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2008: 1-36.

17- Boyle WJ, Simonet WS and Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003; 423: 337-342.

18- Quinn JW. and Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. Biochemical *Biophysical Research Communication*, 2005; 328: 739-745.

19- Lian JB. and Stein G. Osteoblast biology. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, 2001, 1:21-71.

20- Brincat SD, Borg M, Camilleri G, Calleja-Agius J. The role of cytokines in postmenopausal osteoporosis. *Minerva Ginecol*, 2014; 66: 391-407.

21- Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology*, 2007; 7: 292-304.

22- Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. İçinde: *PTH, Kalsitonin, Ca ve Fosfat Metabolizması, D vitamini, Kemik ve Dişler*, Çavusoglu H, Yegen BÇ (Çev. Ed.) 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007: 978-994

23- Uslu H. Postmenopozal raloksifen-HCL kullanımının serum homosisteini, lipid profili, koagülasyon profili ve kemik mineral yoğunluğu t skorları üzerine etkisi. Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları. Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın-Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2004.

24- Biberoglu S. Osteoporoz. İçinde: *Osteoporoz Patogenezi*, Gökçe-Kutsal Y (Çeviri editörü). Understanding Osteoporosis, Marcus R. 2. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2005: 37-60.

25- Marcus R. Understanding Osteoporosis. The *Western Journal of Medicine,* 1991; 155: 53-60.

26- Usui M, Yoshida Y, Tsuji K, Oikawa K, Miyazono K, Ishikawa I, Yamamoto T, Nifuji A and Noda M. Tob deficiency superenhances osteoblastic activity after ovariectomy to block estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Proceedings of the National Academy os Sciences USA*, 2004; 101: 6653-6658.

27- Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SE, Wakkach A and Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *Journal of Experimental Medicine*, 2012; 209: 537-549.

28- Turner RT. Mice, estrogen, and postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1999; 14: 187-91.

29- Van-den Bergh JP, Van-Geel TA and Geusens PP. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012; 8: 163-172.

30- Kim T, Ha H, Shim KS, Cho WK and Ma JY. The anti-osteoporotic effect of Yijung-tang in an ovariectomized rat model mediated by inhibition of osteoclast differentiation. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013; 146: 83-89.

31- Aydil S. Osteoporozda egzersiz programının solunum fonksiyonlarına ve yaşam kalitesine etkisi. Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon. Uzmanlık Tezi, İstanbul: İstanbul 70. Yıl Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2005: 3-48.

32- Delmas PD, Eastell R, Garnero P. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis Internatioanl*, 2000; 6: 2-17.

33- Kanis JA. and Gluer CC. An update on the diagnosis and assesment of osteoporosis with densitometry. *Osteoporosis International*, 2000; 11: 192-202.

34- Garnero P and Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (eds). Osteoporosis, 2nd ed, San Diego, Academic Press, 2001; 2: 459-78.

35- Nanes MS and Kalen CB. Osteoporosis, Seminars in Nuclear Medicine, 2014; 44(6): 439-450.

36- Böcker W, Khassawna T, Bauer N. et al. Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. *European Spine Journal*, 2014; 23: 2437-2448.

37- Fabio MU, Barbara CS, Francesso S. et al. Utility of the trabecular bone score (TBS) in secondary osteoporosis. *Endocrine*, 2014; 47: 435-448.

38- Bartl R and Frisch B. Osteoporoz Teshisi Korunma Tedavi. Çeviri: Tan AA. *Osteoporoz Teşhis Korunma Tedavi,* 1. Baskı. Ankara, Ortadogu Yayıncılık, 2006: 128-143.

39- Fitt NS, Mitchell SL, Cranney A, Gulenchyn K. et al. Influence of bone densitometry results on the treatment of osteoporosis. *Canadian Medical Association Journal*, 2001; 164(6): 777-781.

40- Bağış S, Camdeviren H, Şahin G, Bölgen-Çimen Ö. et al. Osteoporoz risk sorgulama formunun DEXA ölçümü yapılacak hastaları ayırdetmede kullanımı. *Osteoporoz Dünyasından*, 2003, 9(3): 96-99.

41- Eskiyurt N, Arasıl T, Sarıdogan M, Gökçe-Kutsal Y. II. Ulusal osteoporoz kongresi raporu. *Osteoporoz Dünyasından*, 2005; 11(3): 133-136.

42- Wade JP. Clinical Basics: Rheumatology: 15.Osteoporosis. *Canadian Medical Association Journal*, 2001; 165(1): 45-50.

43- Gökçe-Kutsal Y. *Osteoporoz Tanısında Görüntüleme Yöntemleri*, 2. Baskı. Ankara, Günes Kitabevi, 2005: 103-124.

44- Stevenson JC, Lees B, Devenport M, Cust MP. et al. Determinants of bone density in normal women: Risk factors for future osteoporosis? *British Medical Journal*, 1989; 298: 924-928.

45- Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL, Yeates MG. et al. Genetic determinants of bone mass in adults (A Twin Study). *Journal of Clinical Investigation*, 1987; 80: 706-710.

46- Hedlund LR and Gallagher JC. The effect of age and menopause on bone mineral density of the proximal femur. *Journal of Bone Mineral Research*, 1989; 4: 639-642.

47- Peck WA. Estrogen therapy after menopause. *Journal of the American Medical Women's Association*, 1990; 45: 87-90.

48- Davies MC, Hall ML, Jacobs HS. Bone mineral loss in young women with amenorrhoea. *British Medical Journal*, 1990; 301: 790-793.

49- Karahan G, Yaraman N, Karaoglan B. The relationship between spine and femoral bone mineral density each other and age of women patients who applies our hospital. *Osteoporoz Dünyasından*, 2004; 10(3): 102-106.

50- Martin AD and Houston CS. Osteoporosis, calcium and physical activity. *Canadian Medical Association Journal*, 1987; 136: 587.

51- Chow RK, Harrison JE, Brown CF. et al. Physical fitness effect on bone mass in postmenopausal women. *Archives of Physicial Medicine and Rehabilitation*, 1986; 67: 231-234.

52- Donaldson CL. et al. Effect of prolonged bed rest on bone mineral. *Metabolism*, 1970, 19: 1071-1084.

53- Kirazlı Y. Mikroyerçekimi ve osteoporoz. *Osteoporoz Dünyasından*, 2006; 12: 64-69.

54- Chow RK, Harrison JE, Notarius C. Effect of two randomised exercise programmes on bone mass of healthy postmenopausal women. *British Medical Journal*, 1987; 295: 1441-1444.

55- Yahata Y, Aoyagi K. et al. Metacarpal bone mineral density, body mass index and lifestyle among postmenopausal japanese women: relationship of body mass index, physical activity, calcium intake, alcohol and smoking to bone mineral density: The hizen-oshima study. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2002; 196: 123-129.

56- Baheiraei A, Pocock NA, Eisman JA et al. Bone mineral density, body mass index and cigarette smoking among Iranian Women: Implications for prevention. *Bmc Musculoskelet Disorders*, 2005; 6: 34.

57- Berek JS. Novak Jinekoloji. Çeviri: Erk A, Demirtürk F. *Novak Jinekoloji*, 13. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011: 1109-1142.

58- Gökçe-Kutsal Y. *Erkeklerde osteoporoz*. İçinde: Gökçe-Kutsal Y (Ed). Prospect Tıp Dergisi,Osteoporoz özel sayısı,1998,s:155-160.

59- Göksoy T. Osteoporozda Tanı ve Tedavi. İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık; 2000: 47-59.

60- Soriano R, Herrrena S, Xavier N, Diez-Perez A. Current and future treatments of secondary osteoporosis. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2014; 28: 885-894.

61- Sugiura T, Kashi M, Matsuo Y. et al. Intermittent administration of teriparatide enhances graft bone healing and accelerates spinal fusion in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *The Spin Journal*, 2015; 15: 298-306.

62- Lin S, Huang J, Zheng L, Liu Y, Liu G, Li N, Wang K, Zou L, Wu T. et al. Glucocorticoid-Induced osteoporosis in growing rats. *Calcified Tissue International*, 2014; 95: 362-373.

63- Stewart PM and Krozowski Z.S. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitamins & Hormones*, 19995; 7: 249-324.

64- Seckl JR and Walker BR. Minireview: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology*, 2001; 142: 1371-1376.

65- Leonard MB. Glucocorticoid-induced osteoporosis in children: impact of the underlying disease. *Pediatrics*, 2007; 119: 166-174.

66- Weinstein RS. Glucocorticoid-induced bone disease. In: Rosen CF (editör). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 8th ed. American Society for Bone and Mineral Research. Iowa, USA: Wiley; 2013: 473-81.

67- Fraser LA and Adachi JD. Glucocorticoid-induced osteoporosis: treatment update and review. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2009; 1: 71-85.

68- Manning LI, Briggs AM, Van Doornum S, Kale A, Kantor S, Wark JD. Glucocorticoid-induced bone loss is associated with abnormal intravertebral areal bone mineral density distribution. *International Journal of Endocrinology*, 2013; ID 768579, 9 pages.

69- Shi C, Qi J, Huang P, Jiang M, Zhoua Q. et al. MicroRNA-17/20a inhibits glucocorticoid-induced osteoclast differentiation and function through targeting RANKL expression in osteoblast cells. *Bone,* 2014; 68: 67-75.

70- Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*. 2013; 5: 136-48.

71- Nakashima T. Regulation mechanism of bone remodeling. *Kokubyo Gakkai Zasshi*, 2013; 80: 75-80.

72- Mazziotti G, Giustina A, Canalis E, Bilezikian JP. Treatment of glucocorticoid-induced osteoporsis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 2009; 1: 27-34.

73- Tanaka Y. Glucocorticoid and bone metabolism and disease. *Clinical Calcium*, 2013; 23: 22935.

74- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis International*, 2007; 18: 1319-28.

75- Compston J. Management of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 2010; 6: 82-8.

76- Bultink IEM, Baden M, Lems WF. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on current pharmacotherapy and future directions. *Expert Opinion of Pharmacotherapy*, 2013; 14: 185-97.

77- Bellido T. Antagonistic interplay between mechanical forces and glucocorticoids in bone: a tale of kinases. *Journal of Cellular Biochemistry,* 2010; 111: 1-6.

78- Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Glucocorticoids induce osteocyte apoptosis by blocking focal adhesion kinase-mediated survival: evidence for inside-out

signaling leading to anoikis. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282: 24120-30.

79- Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, Yao W, Lane NE, Bonewald LF. et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2010; 25: 2479-88.

80- Sambrook PN, Hughes DR, Nelson AE, Robinson BG, Mason RS. Osteocyte viability with glucocorticoid treatment: relation to histomorphometry. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003; 62: 1215-7.

81- Xiong J. and O'Brien CA. Osteocyte RANKL: new insights into the control of bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2012; 27: 499-505.

82- Schakman O, Kalista S, Barbe C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2013; 45: 2163-72.

83- Canalis E. Wnt signaling in osteoporosis: mechanisms and novel therapeutic approaches. *Nature Reviews Endocrinology*, 2013; 9: 575-83.

84- Buehring B, Viswanathan R, Binkley N and Busse W. Glucocorticoid-induced osteoporosis: An update on effects and management. Clinical reviews in allergy and immunology. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 2013; 132(5): 1019-1030.

85- Baron R, Kneissel M. Wnt signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine*, 2013; 19: 179-92.

86- Guanabens N, Gifre L, Peris P. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid induced osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports*, 2014; 12: 90-97.

87- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, 26: 229-38.

88- Perez Edo L, Alonso Ruiz A, Roig Vilaseca D, Garcia Vadillo A, Guanabens Gay N. et al. Actualizacion 2011 del consenso sociedad Espanola de Reumatologia de osteoporosis. *Reumatologia Clinica*, 2011; 7: 357-379.

89- Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, de Laet C, Melton LJ. et al. A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004; 19: 893-899.

90- Aguado MP. Osteoporosis inducida por glucocorticoides: Que hay de nuevo? *Reumatologia Clinica*, 2007; 3(1): 3-8.

91- Gudbjornsson B, Juliusson UI, Gudjonsson FV. Prevalence of long term steroid treatment and the frequency of decision making to prevent steroid induced osteoporosis in daily clinical practice. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2002; 61: 32-36.

92- Naranjo A, Lopez R, Garcia-Magallon B, Caceres L. et al. Lungitudinal practice patterns of prophylaxis of glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with polymyalgia rheumatica. *Rheumatology Internatonal*, 2014; 34: 1459-1463.

93- Warriner AH and Soag KG. Prevention and treatment of bone changes associated with exposure to glucocrticoids. *Current Osteoporosis Reports*, 2013; 11: 341-347.

94- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J. et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*, 2001; 28(1); 80-86.

95- Wang JW, Li W, Xu SW. et al. Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chinese Journal of Traumatology,* 2005; 8(2): 111-116.

96- Rivard A, Fabre JE, Silver M. et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*, 1999; 99(1): 111-120.

97- Zhang G, Qin L, Hung WY. et al. Flavonoids derived from herbal Epimedium Brevicornum Maxim prevent OVX-inducedosteoporosis in rats independent of its enhancement in intestinal calcium absorption. *Bone,* 2006; 38(6): 818-825.

98- D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research,* 1999; 14(7): 1115-1122.

99- Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L. et al. Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain. *Journal of Biomechanics*, 1995; 28(12): 1411-1418.

100- Chow SK, Leung K, Qin L, Wei F, Cheung W. Callus formation is related to the expression ratios of estrogen receptors-alpha and beta in ovariectmy-induced osteoporetic fracture healing. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery,* 2014; 134: 1405-1416.

101- Cheung WH, Sun MH, Zheng YP. et al. Stimulated angiogenesis for fracture healing augmented by low-magnitude, high frequency vibration in a rat model-evaluation of pulsed-wave doppler, 3-D power doppler ultrasonography and micro-CT microangiography. *Ultrasound in Medicine and Biology,* 2012; 38(12): 2120-2129.

102- Shi HF, Cheung WH, Qin L, Leung AH, Leung KS. Low magnitude high-

frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. *Bone*, 2010; 46(5): 1299-1305.

103- Leppanen OV, Sievanen H, Jokihara J, Pajamaki I, Kannus P, Jarvinen TL. Pathogenesis of age-related osteoporosis: impaired mechano-responsiveness of bone is not the culprit. *PLoS One*, 2008; 3(7): 2540.

104- Rubinacci A, Marenzana M, Cavani F. et al. Ovariectomy sensitizes rat cortical bone to whole-body vibration. *Calcified Tissue International*, 2008; 82(4): 316-326.

105- Jarvinen TL, Kannus P, Pajamaki I. et al. Estrogen deposits extra mineral into bones of female rats in puberty, but simultaneously seems to suppress the responsiveness of female skeleton to mechanical loading. *Bone*, 2003; 32(6): 642-651.

106- Aguirre JI, Plotkin LI, Gortazar AR. et al. A novel ligand independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechano transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(35): 25501-25508.

107- Sunters A, Armstrong VJ, Zaman G. et al. Mechano transduction in osteoblastic cells involves strain-regulated estrogen receptor alpha-mediated control of insulin-like growth factor (IGF) I receptor sensitivity to Ambient IGF, leading to phosphatidylinositol 3 kinase/AKT-dependent Wnt/LRP5 receptor independent activation of beta-catenin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2010; 285(12): 8743-8758.

108- Armstrong VJ, Muzylak M, Sunters A. et al. Wnt/beta catenin signaling is a component of osteoblastic bone cell early responses to load-bearing and requires estrogen receptor alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(28): 20715-20727.

109- Saxon LK and Turner CH. Estrogen receptor beta: the antimechanostat? *Bone*, 2005; 36(2): 185-192.

110- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S. et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ER-alpha-regulated gene transcription, supporting a ‘‘ying yang’’ relationship between ER-alpha and ERb-eta in mice. *Molecular Endocrinology*, 2003; 17(2): 203-208.

111- He YX, Zhang G, Pan XH et al. Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: a drillhole defect model. *Bone*, 2011; 48(6): 1388-1400.

112- Hoyland JA, Baris C, Wood L. et al. Effect of ovarian steroid deficiency on oestrogen receptor alpha expression in bone. The *Journal of Pathology*. 1999; 188(3): 294-303.

113- Zaman G, Cheng MZ, Jessop HL, White R, Lanyon LE. Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells. *Bone*, 2000; 27(2): 233-239.

114- Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, 1998; 19(4): 253-286.

115- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and actions of estrogens. *New England Journal of Medicine*, 2002; 346(5): 340-352.

116- He YX, Liu Z, Pan XH. et al. Deletion of estrogen receptor beta accelerates early stage of bone healing in a mouse osteotomy model. *Osteoporosis International*, 2012; 23(1): 377-389.

117- Cheung WH, Chin WC, Qin L, Leung KS. Low intensity pulsed ultrasound enhances fracture healing in both ovariectomy induced osteoporotic and age-matched normal bones. *Journal of Orthopaedic Research*, 2012; 30(1): 129-136.

118- Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. *Injury*, 2007; 38: 90-99.

119- Adapala NS, Holland D, Scanlon V, Barbe MF. Loss of CbI-PI3K interaction in mice prevents significant bone loss following ovariectomy. *Bone*, 2014; 452:795-800.

120- Kanis JA. and Johnell O. Ten year risk of osteoporotik fracture and the effect of risk factors on screening strategies. *Bone*, 2002; 30(1): 251-58.

121- Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ. et aI. Relative contribution of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *New England Journal of Medicine*, 1984; 311: 1273-1275.

122- Schlaich C. and Minne HW, Brucker T. Reduced pulmonay functions in patients with spinal osteoporotik fractures. *Osteoporosis International*, 1998; 8: 261-67.

123- Sepici V. Osteoporoz tanı ve takibinde laboratuar yöntemleri. İçinde: *Osteoporoz*. Kutsal YG (Edit.). 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2005:125-45.

124- Atalay F. Osteoporozdan Korunma. İçinde: Gökçe-Kutsal Y (Editör). *Osteoporoz*, 2. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2005, 195-212.

125- Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature Medicine*, 2007; 13: 791-801.

126- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2000; 21: 115-137.

127- Hatemi HH. ve Tuzun F. Osteoporoz Sempozyumu, 2005; İstanbul, Türkiye

128- Gökçe Kutsal Y: Görüntüleme Yöntemleri. İçinde: *Osteoporozda Kemik Kalitesi* Gökçe Kutsal Y. (Ed.) Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2004: 193-211.

129- Civitelli R. Calcitonin for treatment of osteoporosis. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (eds). Osteoporosis, 2nd ed, San Diego, Academic Press, 2001; 2: 651-73.

130- Papapoulos SE. Bisphosphonates in the management of postmenopausal osteoporosis. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, 2001, 2: 631-50.

131- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with Raloksifene: Results from a 3 year randomized clinical trial. The *Journal of the American Medical Association*, 1999; 282: 637-45.

132- Mosekilde L. and Reeve J. Treatment with PTH peptides. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, 2001, 2: 725-46.

133- Meunier PJ. Strontium ranelate reduces the vertebral fracture risk in women with postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2002; 13: 45.

134- Reginster JY. Strontium ranelate reduces the risk of hip fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*. 2002; 13: 14.

135- Lacey DL. Osteoprotogerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differientiation and activation. *Cell*, 1998; 93: 165-76.

136- Cuttler RG. İn free radical in biology; Pryor, W. A., Ed; Academic Orlands, FL, 6, 1987;371-423.

137- Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, 1996; 31: 77-82.

138- Çetinkaya Y, Göçer H, Menzek A, Gülçin İ. Synthesis and antioxidant properties of (3,4-dihydroxyphenyl)(2,3,4-trihydroxyphenyl) methanone and its derivatives. *Archive Der Parmazie*, 2012; 345: 323-334.

139- Mayne ST. Oxidative stress, dietary antioxidant supplements, and health: Is the glass half full or half empty? *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 2013; 22: 2145-2147.

140- Huyut Z. Kanın depo edilmesi süresince eritrositlerin oksidasyona duyarlılığı: Melatonin ve Propofol'ün etkisi, 2007, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fak. Biyokimya A.D., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Van, Türkiye.

141- Ak T. Kurkumin'nin antioksidan ve antiradikal özelliklerinin incelenmesi. 2006, Yüksek Lisans Tezi, Fen Fak. Kimya Bölümü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.

142- Bütüner BD and Kantarcı G. Mutation, DNA damage, repair mechanism and the relatipon of cancer. *Ankara Eczacılık Faültesi. Dergisi*, 2006; 35: 149-170.

143- Guyton KZ and Kensler TW. Oxidative mechanism in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 1993; 49: 523-544.

144- Grimsley SJ, Khan MH, Jones GE. Mechanism of phosphodiesterase-5 inhibitor relief of prostatitis symptoms. *Medical Hypotheses*, 2007; 69: 25-26.

145- Ahlstrom M, Pekkinen M, Huttunen M, Lamberg-Allardt C. Dexamethasone down-regulates cAMP-phosphodiesterase in human osteosarcoma cells. *Biochemical Pharmacology*, 2005; 69: 267-275.

146- Carson CC and Lue TF. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction. *Bju International*, 2005; 96: 257-80.

147- Frye CA and Rhades ME. Zaprinast a phosphodiesterase-5 inhibitor, overcomes sexual dysfunction produced by fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitör in hamsters. *Neropsychopharmacology*, 2003; 28: 310-316.

148- Kotera J, Mochida H, Inove H. et al. Avanafil a potent and highly selective phosphodiesterase-5 inhibitor for erectile dysfunction. *The Journal of Urology*, 2012; 188: 668-674.

149- Kloner RA, Comstock G, Levine LA. et al. Investigational noncardiovascular uses of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Expert Opin Pharmacother*, 2011; 12: 2297.

150- Kotera J, Fujishige K, Michibata H. et al. Characterization and effects of methyl-2-(4-aminophenyl)-1,2-dihydro-1-oxo-7-2-pyridinylmethoxy)-4-(3,4,5-trimethoxyphe nyl)-3 isoquinoline carboxylate sulfate (T-1032), a novel potent inhibitor of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochemical Pharmacology*, 2000; 60: 1333.

151- Fujishige K, Kotera J. and Omori K. Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A: Isolation and characterization of a rat PDE10A. *European Journal of Biochemistry*, 1999; 266: 1118.

152- Sasaki T, Kotera J, Yuasa K. et al. Identification of human PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000; 271: 575.

153- Gamanuma M, Yuasa K, Sasaki T. et al. Comparison of enzymatic characterization and gene organization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 8 family in humans. *Cellular Signaling*, 2003; 15: 565.

154- Choi SH, Choi DH, Song KS, Shin KH, Chun BG. Zaprinast, an inhibitor of cGMP-selective phosphodiesterases, enhances the secretion of TNF-alpha and IL-1beta and the expression of iNOS and MHC class II molecules in rat microglial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 2002; 67(3): 411-421.

155- Taniguchi Y, Tonaikachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Letters*, 2006; 580 (21): 5003-5008.

156- Keswani AN, Peyton KJ, Durante W, Schafer AI, Tulis DA. The cyclic GMP modulators YC-1 and zaprinast reduce vessel remodeling through antiproliferative

and proapoptotic effects. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 2009; 14(2): 116-124.

157- Lien TF, Hsu YL, Lo DY, and Chiou RYY. Supplementary health benefits of soy aglycons of isoflavone by improvement of serum biochemical attributes, enhancement of liver antioxidative capacities and protection of vaginal epithelium of ovariectomized rats. *Nutrition & Metabolism*, 2009; 7075: 6-15.

158- Elvy-Suhana MR, Suhaimi F, Siti Fadziyah MA, Fairus A, Ima NS. Glycyrrhizic acid (GCA) as 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor exerts protective effect against glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2013; 31: 262-273.

159- Taylor CR and Cote RJ. *Immunomicroscopy*. İçinde: A diagnostic tool for the surgical pathologist. Elsevier Saunders (3edittörs): Philadelphia, 2005.

160- Yi Z, Zhuo LZ, Xiao-Xu G, Wei-Wei H, Hai-Yang Y. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: The possible mechanism for caffeine-induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Medical Hypotheses*, 2009; 73: 83-85.

161- Arslan M, Çomu FM, Keleş I, Arslan A. Evaluation of erythrocyte deformability in experimentally induced osteoporosis in male rats and the effects of vitamin C supplementation on erythrocyte deformability and bone mineral density. *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2012; 58: 121-125.

162- Evans DM. and Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1996; 11: 300-305.

163- Fan X, Roy E, Zhu L, et al. Nitric oxide regulates receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin expression in bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, 2003; 145: 751-9.

164- Kann P, Laudes M, Piepkorn B, Heintz A. et al. Germany suppressed levels of serum cortisol following high-dose oral dexamethasone administration differ between healthy postmenopausal females and patients with established primary vertebral osteoporosis. *Clinical Rheumatology*, 2001; 20: 25-29.

165- Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez Luna JL, Gonzales-Macias J. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast like cells. *Journal of Bone and Mineral. Research*, 1995; 10: 439-445.

166- Fox SW and Chow JWM. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone*, 1998; 23: 1-6.

167- Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB, Jiang CH, Deng HW, Li YJ, Zhou HH, Xiao ZS. Genistein stimulates the osteoblastic differantion via NO/cGMP in bone marrow culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005; 94: 307-316.

168- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 1997; 15: 323-350.

169- Wimalawansa SM, Shankar VS, Simmins DJ, Wimalawansa SJ. The mechanism of bone resorption by cyclosporin: involvement of the NO-cGMP pathway. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2000; 1: 141-3.

170- Kasten TP, Collin-Osdoby P, Patel N. et al. Potentiation of osteoclast bone resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1994; 91: 3569-73.

171- Firat SC, Cetin Z, Samancia N, Aydinc F, Balci N, Gungor M, Firat MZ, Luleci G, Karauzum SB. Evaluation of eNOS gene polymorphisms in relation to BMD in postmenopausal women. *Maturitas*, 2009; 63: 352-356.

172- Armour KA, Armour KJ, Gallagher ME, Decke AG, Helfrich MH, Reid DM, and Ralston SH. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 2001; 142(2): 760-766.

173- Singh M, Singh P, Singh S, Juneja PK, Kaur T. A susceptibility haplotype within the endothelial nitric oxide synthase gene influences bone mineral density in hypertensive women. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2014; 32: 580-587.

174- Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1997; 12: 1108-1115.

175- Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *British Journal of Pharmacology*, 2006; 147: 252-257.

176- Corbin JD and Francis SH. Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *Internationa Journal of Clinical Practice*, 2002; 56(6): 453-9.

177- Clark AS, Meerts SH, Guarraci FA. Zaprinast, a phosphodiesterase type-5 inhibitor, alters paced mating behavior in female rats. *Physiology & Behavior*, 2009; 96: 289-293.

178- Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim MS, Choi DY, Bang BG, Kim HR. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1997; 49: 897-902.

179- Aguirre J, Buttery L, O'Shaughnessy M, Afzal F, Fernandez-deMarticorena I, Hukkanen M, Huang P, MacIntyre I, Polak J. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation,

reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *American Journal of Pathology*, 2001; 158:247-257.

180- Chikuda H, Kugimiya F, Hoshi K, Ikeda T, Ogasawara T, Shimoaka T, Kawano H, Kamekura S, Tsuchida A, Yokoi N, Nakamura K, Komeda K, Chung UI, Kawaguchi H. Cyclic GMP dependent protein kinase II is a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. *Genes & Development*, 2004; 18: 2418-2429

181- Van't-Hof RJ, Armour KJ, Smith LM, Armour KE, Wei XQ, Liew FY, Ralston SH. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2000; 97: 7993-7998.

182- Lu R, Hu CP, Wu XP, Liao EY, Li YJ. Effect of age on bone mineral density and the serum concentration of endogenous nitric oxide synthase inhibitors in rats. *Comparative Medicine*, 2002; 52: 224-228.

183- Hao YJ, Tang Y, Chen FB, Pei FX. Different doses of nitric oxide donor prevent osteoporosis in ovariectomized rats. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2005; 435: 226-231.

184- Kim SW, Jeong S, Munarriz R, Kim NN, Goldstein I, Traish AM. An in vivo rat model to investigate female vaginal arousal response. *Journal of Urology*, 2004; 171: 1357-61.

185- Al-Hijji J, Larsson B, Batra S. Nitric oxide synthase in the rabbit uterus and vagina: hormonal regulation and functional significance. *Biology of Reproduction*, 2000; 62: 1387-92.

186- Andersson KE. Pharmacology of penile erection. *Pharmacological Reviews*, 2001; 53: 417-450.

187- Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, Chopp M. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circulation Research*, 2003; 92: 308-313.

188- Vidavalur R, Penumathsa SV, Zhan L, Thirunavukkarasu M, Maulik N. Sildenafil induces angiogenic response in human coronary arteriolar endothelial cells through the expression of thioredoxin, hemeoxygenase and vascular endothelial growth factor. *Vascular Pharmacology*, 2006; 45: 91-95.

189- Sahara M, Sata M, Morita T, Nakajima T, Hirata Y, Nagai RA. Phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil enhances angiogenesis through a protein kinase G dependent hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2015; 20: 1316-1324.

190- Kim IY, Oh IS, Park SM, Kim HG. Sildenafil citrate induces migration of mouse aortic endothelial cells and proteinase secretion. *Biotechnology and Biprocess Enginering*, 2006; 11; 02-407.

191- Senthilkumar A, Smith RD, Khitha J, Arora N, Veerareddy S, Langston W, Chidlow JH, Barlow SC, Teng X, Patel RP, Lefer DJ, Kevil CG. Sildenafil promotes ischemia-induced angiogenesis through a PKG-dependent pathway. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 2007; 107: 1947-1954.

192- Miettinen M, Lindenmayer A E and Chanbal A. Endothelial cell markers CD31, CD34, and BNH9 antibody to H- and Y - antigens: evaluation of their specificity and sensitivity in the diagnosis of vascular tumors and comparison with von Wi11ebrand factor. *Modern Patholology*, 1994; 7: 82- 90.

193- Li F, Sun X, Ma J, Ma X, Zhao B, Zhang Y, Tian P, Li Y, Han Z. Naringin prevents ovariectomy-induced osteoporosis and promotes osteoclasts apoptosis

through the mitochondria-mediated apoptosis pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014; 452: 629-635.

194- Im JY, Min WK, Park MH, N Kim N, Lee JK, Jin HK, Choi JY, Kim SY and Bae J. AMD3100 improves ovariectomy-induced osteoporosis in mice by facilitating mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *BMB Reports*, 2014; 47(8): 439-444.

195- Ogoshi T, Hagino H, Fukata S, Tanishima S, Okano T, Teshima R. Influence of glucocorticoid on bone in 3-, 6-, and 12-month-old rats as determined by bone mass and histomorphometry. *Modern Rheumatology*, 2008; 18: 552-561.

196- King CS, Weir EC, Gundberg CW, Fox J, Insogna KL. Effects of continuous glucocorticoid infusion on bone metabolism in the rat. *Calcified Tissue International*, 1996; 59: 184-191.

197- Zhang DW, Deng H, Qi W, Zhao G and Cao W. Osteoprotective effect of cordycepin on estrogen deficiency-induced osteoporosis in vitro and in vivo. *BioMed Research International*, 2015, 6: 1-6.

198- Akhter MP, Alvarez GK, Cullen DM, Recker RR. Disuse-related decline in trabecular bone structure. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 2011; 10; 423-429.

199- Graves LLB. Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 2004; 2: 79-90.

200- Lucinda BMF, Aarestrup BJV, Brandao JS, Peters VM, Reis JE, Guerra M. The effect of Ginkgo biloba extract treatment in the Bcl-2 expression by osteoblasts in the femoral trabecular bone of Wistar rats with glucocorticoid-induced osteoporosis. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 2014; 24: 363-366.

201- Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting-catenin from T cell factor- to Forkhead box O-mediated transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 37: 27298-305.

202- Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, et al. Antioxidant status in patients with osteoporosis: A controlled study. *Joint Bone Spine*, 2009; 76: 514-518.

203- Hale, G.E., Robertson, D.M., Burger, H.G. The perimenopausal women: endocrinology and management. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2014; 142; 121-131.

204- Kancheva VD and Kasaikina OT. Bio-antioxidants a chemical base of their antioxidant activity and beneficial effect on human health. *Current Medicinal Chemistry*, 2013; 20(37): 4784-805.

205- Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2010; 31: 266-300.

206- Linnane AW and Eastwood H. Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems: A new perspective on the free radical theory of aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2006; 1067: 47.

207- Kolesnikova L, Semenova N, Madaeva I, Suturina L, Solodova E, Grebenkina L, Darenskaya M. Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. *Maturitas*, 2015; 81: 83-87.

208- Huang Q, Gao B, Wang L, Hu Y.Q, Lu, WG, Yang L, Luo ZJ, Liu J. Protective effects of myricitrin against osteoporosis via reducing reactive oxygen species and bone-resorbing cytokines. *Toxicology and Applied Pharmacolog*, 2014; 280: 550-560.

209- Liu AL, Zhang ZM, Zhu BF, Liao ZH, Liu Z. Metallothionein protects bone marrow stromal cells against hydrogen peroxide-induced inhibition of osteoblastic differentiation. *Cell Biology International*, 2004; 28: 905-911.

210- Arai M, Shibata Y, Pugdee K, Abiko Y, Ogata Y. Effects of reactive oxygen species (ROS) on antioxidant system and osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2007; 59: 27-33.

211- Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B, Vasudevan G, Prabhu V, Subramaniam V, Jagadeesan A. Narasimhan S. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clinica Chimica Acta*, 2005; 360: 81-86.

212- Çevik Ö and Arslan AH. Effects of Alendronate on kidney tissue of ovariectomized rats. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2013; 19(5): 767-772.

213- Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences,* 2006; 43: 143-181.

214- Yu-Bin Zhang MM, Zhao-Ming Zhong MD, Gang Hou MM, Hui Jiang MD and Jian-Ting Chen MD. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *Journal of Surgical Research*, 2011; 169: 37-42.

215- Yalin S, Bagis S, Polat G, Dogruer N, Cenk Aksit S, Hatungil R. et al. Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2005; 23: 689-92.

216- Effendy NM and Shuid AN. Time and dose-dependent effects of labisia pumila on bone oxidative status of postmenopausal osteoporosis rat model. *Nutrients*, 2014; 6: 3288-3302.

217- Manolagas, SC. De-fense! De-fense! De-fense: scavenging H_2O_2 while making cholesterol. *Endocrinology*, 149;3264-6.

218- Huang Q, Shi J, Gao B, Zhang HY, Fan J, Li XJ, Fan JZ, Han YH, Zhang Liu Yang J, Luo ZJ, Liu J. Gastrodin: An ancient chinese herbal medicine as a source for anti-osteoporosis agents via reducing reactive oxygen species. *Bone*, 2015; 73: 132-144.

219- Huang Q, Gao B, Wang L, Zhang, HY, Li XJ, Shi J, Wang Z, Zhang JK, Yang L, Luo ZJ, Liua J. Ophiopogonin D: A new herbal agent against osteoporosis. *Bone*, 2015; 74: 18-28.

220- Morano S, Mandosi E, Fallarino M, Gatti A, Tiberti C, Sensi M, Gandini L, Buchetti B, Lenti L, Jannini EA, Lenzi A. Antioxidant treatment associated with sildenafil reduces monocyte activation and markers of endothelial damage in patients with diabetic erectile dysfunction: a double-blind, placebo-controlled study. *European Urology*, 2007; 52(6): 1768-1774.

221- Fan YF, Zhang R, Jiang X, Wen L, Wu DC, Liu D, Yuan P, Wang YL, Jing ZC. The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil reduces oxidative stress while reversing pulmonary arterial hypertension. *Cardiovascular Research*, 2013; 99(3): 395-403.

222- Koka S, Das A, Salloum FN, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013; 60: 80-88.

223- Perk H, Armagan A, Naziroğlu M, Soyupek S, Hoscan MB, Sütcü R, Ozorak A, Delibas N. Sildenafil citrate as a phosphodiesterase inhibitor has an antioxidant

effect in the blood of men. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2008; 33(6): 635-640.

224- Ceci R, Duranti G, Sgro P, Sansone M, Guidetti L, Baldari C, Sabatini S, Di Luigi L. Effects of tadalafil administration on plasma markers of exercise-induced muscle damage, IL6 and antioxidant status capacity. *European Journal of Applied Physiology*, 2015; 115: 531-539.

225- Abdollahi M, Fooladian F, Emami B, Zafari K. and Bahreini-Moghadam A. Protection by sildenafil and theophylline of lead acetate-induced oxidative stress in rat submandibular gland and saliva. *Human & Experimental Toxicology*, 2003; 22: 587, 592.

226- Qian G, Xue K, Tang L, Wang F, Song X, Chyu MC, Pence BC, Shen CL, Wang JS. Mitigation of oxidative damage by green tea polyphenols and Tai Chi Exercise in postmenopausal women with osteopenia. *PLOS ONE*, 2012; 7(10): 48090.

227- Isomura H, Fujie K, Shibata K, Inoue N, Iizuka T. et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology*, 2004; 197: 93-100.

228- Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Current Osteoporosis Reports*, 2005; 3(3): 98-102.

229- Igarashi M, Kamiya N, Hasegawa M, Kasuya T, Takahashi T, Takagi M. Inductive effects of dexamethasone on the gene expression of Cbfa1, osterix and bone matrix proteins during differentiation of cultured primary rat osteoblasts. *Journal of Molecular Histology*, 2004; 35: 3-10.

230- Mikami Y, Omoteyama K, Kato S, Takagi M. Inductive effects of dexamethasone on the mineralization and the osteoblastic gene expressions in mature osteoblast-

like ROS17/2.8 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007; 362: 368-373.

231- Feng YL and Tang XL. Effect of glucocorticoid-induced oxidative stress on the expression of Cbfa1. *Chemico-Biological Interactions*, 2014; 207: 26-31.

232- Eijken M, Koedam M, Van Driel M, Buurman CJ, Pols HA, Van Leeuwen JP. The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006; 248: 87-93.

233- Leclerc N, Luppen CA, Ho VV, Nagpal S, Hacia JG, Smith E, Frenkel B. Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004; 33: 175-193.

234- Shao J, Xu X, Li G, Zhang W, Qi J, Wang J, Cai M, Cui L, Zhang L, Zhao Q, Deng L. Inhibitory effects of pharmacological doses of dexamethasone on mineralization of mesenchymal progenitor cells *in vitro*. *Pharmazie,* 2009; 64: 674-679.

235- Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003; 88: 1523-1527.

236- Costantini D, Marasco V, Moller AP. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental*, 2011; 181: 447-456.

237- Bera S, Greiner S, Choudhury A, Dispenzieri A, Spitz DR, Russell SJ, Goel A. Dexamethasone-induced oxidative stress enhances myeloma cell radio

sensitization while sparing normal bone marrow hematopoiesis. *Neoplasia*, 2010; 12: 980-992.

238- Sato H, Takahashi T, Sumitani K, Takatsu H, Urano S. Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 2010; 47: 224-232.

239- Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004; 314: 197-207.

240- Almeida M, Han L, Ambrogini E, Weinstein RS, Manolagas SC. Glucocorticoids and tumor necrosis factor α increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 2011;52:44326-35.

241- Bjelakovic G, Beninati S, Pavlovic D, Kocic G, Jevtovic T, Kamenov B, Saranac LJ, Bjelakovic B, Stojanovic I, Basic J. Glucocorticoids and oxidative stress. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacolog*, 2007; 18: 115-127.

242- Qiao S, Okret S, Jondal M. Thymocyte-synthesized glucocorticoids play a role in thymocyte homeostasis and are down-regulated by adrenocorticotropic hormone. *Endocrinology*, 2009; 150: 4163-4169.

243- Briehl MM, Cotgreave IA and Powis G. Downregulation of the antioxidant defence during glucocorticoid-mediated apoptosis. *Cell Death and Differentation*, 1995; 2: 41-46.

244- Baker AF, Briehl MM, Dorr R, and Powis G. Decreased antioxidant defence and increased oxidant stress during dexamethasone-induced apoptosis: bcl-2 prevents the loss of antioxidant enzyme activity. *Cell Death and Differentation*, 1996; 3: 207-213.

245- McIntosh LJ, Hong KE, Sapolsky RM. Glucocorticoids may alter antioxidant enzyme capacity in the brain: baseline studies. *Brain Research*, 1998; 791: 209-214.

246- Ahlbom E, Gogvadze V, Chen M, Celsi G, Ceccatelli S. Prenatal exposure to high levels of glucocorticoids increases the susceptibility of cerebellar granule cells to oxidative stress-induced cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000; 97: 14726-14730.

247- Behl C, Lezoualch F, Trapp T, Widmann M, Skutella T. et al. Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons *in vitro*. *Endocrinology*, 1997; 138: 101-106.

248- Psarra AM, Solakidi S, Sekeris CE. The mitochondrion as a primary site of action of steroid and thyroid hormones: presence and action of steroid and thy-roid hormone receptors in mitochondria of animal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006; 246: 21-33.

249- Filipovic D, Zlatkovic J, Inta D, Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Gass P. Chronic isolation stress predisposes frontal cortex but not the hippocampus to thepotentially detrimental release of cytochrome-C from mitochondria and the activation of caspase-3. *Journal of Neuroscience Research*, 2011; 89: 1461-1470.

250- Suwanjang W, Abramov AY, Govitrapong P, Chetsawang B. Melatonin attenuates dexamethasone toxicity-induced oxidative stress, calpain and caspase activation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 2013; 138: 116-122.

251- Chai JJ, Xiong QQ, Zhang PP, Zheng RR, Peng JJ, Jiang S. Induction of Ca^{2+}sig-nal mediated apoptosis and alteration of IP3R1 and SERCA1 expression levels by

stress hormone in differentiating C2C12 myoblasts. *General and Comparative Endocrinology*, 2010; 166: 241-249.

252- Hu TJ, Shuai XH, Chen JR, Wei YY, Zheng RL. Protective effect of a Potentilla anserine polysaccharide on oxidative damages in mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2009; 45: 279-283.

253- Assaf N, Shalby AB, Khalil WKB, Ahmed HH. Biochemical and genetic alterations of oxidant/antioxidant status of the brain in rats treated with dexamethasone: protective roles of melatonin and acetyl-L-carnitine. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2012; 68: 77-90.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:
Adı-Soyadı: Zübeyir HUYUT **Doğum Yeri ve Tarihi:** Van / 06.11.1979 **Medeni Hali:** Evli ve iki çocuk babası **Adres:** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı 65200 Tuşba/VAN **Tel:** 0505 237 38 82 **e-mail:** zubeyir.huyut@gmail.com
Eğitim:
Lise: Kazım Karabekir Lisesi (1994-1997) **Lisans:** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü (1997-2001) **Yüksek Lisans:** Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (2004-2007) **Doktora 1:** Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalı (2011-2014) **Doktora 2:** Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı (2012-2015).
Yabancı Dil Bilgisi:
İngilizce: Orta (ÜDS puanı: 66.25, Ocak-2011)
Yaptığı Görevler:
2002-2009: MEB'da Öğretmenlik (7 yıl) **2010-2011:** MEB'da Lise Müdür Yardımcılığı (yaklaşık 2 yıl) **2012-2015:** Yüzüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Görevliliği (Halen devam etmekte).
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar:
Yok
İlgi Alanları ve Hobiler:
Yüzme, kitap okuma, tarihi eserleri gezme, uzmanlık alanı ile ilgili çalışmalar yapma.

EK-2. ETİK KURUL KABUL YAZISI

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı:27552122–381– 02/12/2013
Konu :

Sayın: Prof. Dr. Nuri BAKAN
(Tıp Fakültesi)

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 28.11.2013 tarih ve 13 sayılı kararı gereğince; Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Glukokortikoid ve Overektemi Temelli Osteoporoz Oluşturulmuş Ratlarda Avanafil ve Zaprinast'ın Kemik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi" adlı projenize raportör değerlendirme sonucuna göre YUHADYEK tarafından 30.12.2014 tarihine kadar geçerli olacak şekilde çalışma onayı verilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce, çalışmalarınızı kurul üyelerinin denetimine açmanız zorunludur.

Projenizi denetlemek için Fen Fakültesinden Yrd. Doç. Dr. Atilla DURMUŞ ve Deney Hayvanları Ünitesinden Vet. Hekim Yrd. Doç. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN görevlendirilmiştir. İlgili denetleyiciler ile çalışmaya başlamadan önce temasa geçmeniz gerekmektedir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. İdris TÜREL
YUHADYEK Başkanı

Eki:
Araştırma Başvuru Onay Belgesi (1 Adet)

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAY BELGESİ

	Araştırmanın Adı	Glukokortikoid ve Overektemi Temelli Osteoporoz Oluşturulmuş Ratlarda Avanafil ve Zaprinast'ın Kemik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi
	Araştırmanın Yürütücüsü	Prof. Dr. Nuri BAKAN
	Yardımcı Araştırıcılar	Öğr. Gör. Zübeyir HUYUT
	Kurumu	Tıp Fakültesi
	Araştırmanın Tahmini Süresi	13 Ay
	Kullanılacak Hayvan Türü ve Sayısı	Rat 42 Adet
	Destekleyecek Kuruluş (lar)	
	Başvuru Tarihi	08.11.2013

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:2013/13-...**	**Tarih:28.11.2013**
	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi/elemanı Prof. Dr. Nuri BAKAN sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak ilgi başvuru belgeleri incelendi. Çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna, projenin aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve proje yürütücüsüne iletilmesine oy birliği / oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması. 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması. 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihlerinin bildirilmesi. 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması. 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ

BAŞKAN **Prof. Dr. İdris TÜREL**	**BAŞKAN YARDIMCISI** **Prof. Dr. Hasan ÜLKER**
ÜYELER	
Prof. Dr. Murat DEMİREL	**Prof. Dr. Duran BOLAT**
Doç. Dr. Fazıl ŞEN	**Doç. Dr. Fatma İLHAN**
Doç. Dr. Sıddık KESKİN	**Yrd. Doç. Dr. Birkan Taha ÖZKAN**
Yrd. Doç. Dr. Fatih GARÇA	**Yrd. Doç. Dr. Atilla DURMUŞ**
Yrd. Doç. Dr. Barış Atalay USLU	**Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU**
Vet. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN	**Orhan SOFUOĞLU (Sivil Üye)**

***Bu form YÜHADYEK tarafından doldurulacaktır.**

EK-4. ETİK KURUL ÇALIŞMA BAŞLIĞI DEĞİŞTİRME KABUL YAZISI

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı: 27552122–384– **05.08.2015**
Konu:

Sayın Prof. Dr. Nuri BAKAN
(Tıp Fakültesi)

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30.07.2015 tarih ve 09 sayılı kararı gereğince; Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Glukokortikoid ve Overektemi Temelli Osteoporoz Oluşturulmuş Ratlarda Avanafil ve Zaprinast'ın Kemik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi" adlı proje ile ilgili 13.07.2015 tarihli dilekçede, çalışma adının **"Glukokortikoid ve Overektemi ile İndüklenen Osteoporozda Avanafil ve Zaprinast'ın Kemik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi"** olarak değiştirilmesi talebinin kabulüne karar verilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Semiha DEDE
YÜHADYEK Başkanı

EK-5. ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı *Title of the Research*	Glukokortikoid ve Overektomi ile İndüklenen Osteoporozda Avanafil ve Zaprinast'ın Kemik ve Oksidatif Hasar Üzerine Etkisi The Effect on Bone and Oxidative Damage of Avanafil and Zaprinast in Glucocorticoid and Ovariectomy-Induced Osteoporosis
Araştırıcı(lar) *Investigator(s)*	Yürütücü / *Chief investigator : Prof. Dr. Nuri BAKAN* Yardımcı Araştırıcı(lar) / *Co-investigator(s): Dr. Zübeyir HUYUT*
Araştırmanın Başlama Tarihi / *Research Starting Date: 28.11.2023*	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / *Research Completion Date:30.11.2015*	
Proje Süresi / *Total Time of Project:2 yıl-Two years*	
Proje No / *Project Number:28.11.2013 - 2013/13*	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / *Funding institution(s) (if available):Yok (No)*	
Destek Şekli ve Miktarı / *Type and amount of funding: --*	

Karar:
Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 28/01/2016 tarih ve 2016/01 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.
Decision:
Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 28/01/2016 *(decision number* 2016/01*).*

Başkan / Chair
Prof. Dr. Semiha DEDE

Üyeler/Members

Prof. Dr. Duran BOLAT — Prof. Dr. Sıddık KESKİN
Prof. Dr. Fazıl ŞEN — Doç. Dr. Atilla DURMUŞ
Doç. Dr. Şenol GÜZEL — Doç. Dr. Nalan ÖZDAL
Doç. Dr. M. Fatih GARÇA — Doç. Dr. Abdulbaki AKSAKAL
Yrd. Doç. Dr. Fatih KAZANCI — Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ
Vet. Hek. Yrd. Doç. Dr. Yıldıray BAŞBUĞAN — Vet. Hekim İsmail Hakkı BEHÇET
Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU