

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI

OSTEOPOROZ PATOGENEZİNDE
ANTİOKSİDAN ENZİMLER ve RANKL

UZMANLIK TEZİ

DR. ENGİN TAŞTABAN

DANIŞMAN

PROF. DR. ÖMER FARUK ŞENDUR

AYDIN – 2008

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZİKSEL TIP VE REHABİLİTASYON ANABİLİM DALI

OSTEOPOROZ PATOGENEZİNDE
ANTIOKSİDAN ENZİMLER ve RANKL

UZMANLIK TEZİ

DR. ENGİN TAŞTABAN

DANIŞMAN

PROF. DR. ÖMER FARUK ŞENDUR

AYDIN – 2008

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
UZMANLIK TEZ DEĞERLENDİRME RAPORU

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Uzmanlık Öğrencisi Arş. Gör. Dr. Engin Taştaban'ın "Osteoporoz Patogenezinde Antioksidan Enzimler ve RANKL" isimli tezi, tez jürisi tarafından 25/02/2008 tarihinde değerlendirilerek oy birliği / çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. ÖMER FARUK ŞENDUR

Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Başkanı

Üye

Prof. Dr. BÜLENT ALPARSLAN

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı

Üye

Doç. Dr. ENGİN GÜNEY

Dahiliye Anabilim Dalı Başkanı

Üye

Yrd.Doç.Dr. YASEMİN TURAN

Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye

Yrd.Doç.Dr. GÜLNUR TAŞÇI BOZBAŞ

Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince, yanında çalışmaktan gurur duyduğum, klinik bilgi ve tecrübelerini paylaşarak yetişmemde büyük emeği olan; ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm; mesleki, etik ve insani değerlerini her zaman örnek alacağım değerli hocam Prof.Dr. Ömer Faruk ŞENDUR' a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimde katkılarını benden esirgemeyen Doç.Dr.Gülcan GÜRER'e, Yrd.Doç.Dr. Yasemin TURAN'a, Yrd.Doç.Dr. Gülnur Taşçı BOZBAŞ'a, Yrd.Doç.Dr. Ali AYDENİZ'e teşekkür ederim.

Rotasyonlarım sırasında eğitimime olan katkıları ve gösterdikleri yakın ilgileri nedeniyle sayın hocalarım; Prof.Dr. Bülent ALPARSLAN'a, Prof.Dr. Ali AKYOL'a, Doç.Dr. Engin GÜNEY'e teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde maddi katkılarından dolayı Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği Yönetim Kurulu üyelerine ve Aydın Şubesi Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Ömer Faruk ŞENDUR' a teşekkür ederim.

Tezde kullanılan biyokimyasal analizlerin yapılmasında desteklerini esirgemeyen öğretim görevlisi Yrd.Doç.Dr. Mukadder SERTER'e ve araştırma görevlisi Dr. Tülay KAVAK'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Ali Hakan AYDEMİR, Dr. Bengü Beydağ ODABAŐI, Dr. Ayőe İyiyapıcı ÜNÜBOL, Dr. Işıl Karataő BERKİT, Dr. Buket MİRANOĞLU'na ve klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan; destek, ilgi ve sevgilerini benden esirgemeyen ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan; üzerimde sonsuz hak ve emekleri olan, çok sevdiğim annem ve babama teşekkür ederim.

Sabır, özveri ve sevgi ile hep yanımda olan, çok sevdiğim eşim Meltem'e ve güzel kızım Asude Nur'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. TABLO DİZİNİ.....	i
2. ŞEKİL DİZİNİ.....	ii
3. KISALTMALAR DİZİNİ.....	iii
4. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
5. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Kemik Dokusu ve Metabolizması	
2.1.1 Normal Kemik Dokusu.....	2
2.1.2 Kemik Dokusunun Hücreleri.....	3
2.1.3 Kemik Yapım Ve Yıkımının Düzenlenmesi.....	5
2.1.4 Doruk Kemik Kütlesi.....	7
2.2 Osteoporoz.....	8
2.2.1 Osteoporoz Sınıflandırılması.....	8
2.2.2 Osteoporoz Epidemiyolojisi.....	12
2.2.3 Osteoporoz Patogenezi.....	12
2.2.4 Osteoporozda Klinik.....	16
2.2.5 Osteoporozda Görüntüleme Yöntemleri.....	17
2.2.6 Osteoporozda Laboratuvar Tetkikleri.....	19
2.2.7 Osteoporoz Tedavisi.....	22
2.3 Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler ve Nitrik Oksit.....	25
6. GEREÇ ve YÖNTEM.....	28
7. BULGULAR.....	30
8. TARTIŞMA.....	37
9. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
10. TÜRKÇE ÖZET.....	42
11. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY).....	43
12. KAYNAKLAR.....	44

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo I: Kemiğin yeniden yapılanmasında rol oynayan faktörler	6
Tablo II: Dünya Sağlık Örgütünün osteoporoz değerlendirmeleri	8
Tablo III: Osteoporozun sınıflandırılması	8
Tablo IV: Osteoporozun etiyolojiye göre sınıflandırılması	9
Tablo V: Tip I ve tip II osteoporozun karşılaştırılması	10
Tablo VI: Sekonder osteoporoz nedenleri	11
Tablo VII: Osteoporoz risk faktörleri	12
Tablo VIII: RANKL / OPG oranındaki artmaya neden olan faktörler	16
Tablo IX: Kemik dansitometrisi için hasta seçim kriterleri	19
Tablo X: Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri	20
Tablo XI: Kemik dokusunun biyokimyasal belirteçlerin kullanım amaçları	20
Tablo XII: Serbest radikallerin hücre bileşenlerine etkileri	26
Tablo XIII: Her iki grubun demografik bilgileri ve DEXA parametreleri	30
Tablo XIV: Her iki grupta biyokimyasal parametre ortalamalarının karşılaştırılması	31
Tablo XV: Osteoporoz hastalarında yaş menapoz yaşı, menapoz süresi, vücut kütle indeksi ve DEXA ortalamalarının RANKL ve diğer biyokimyasal parametrelerle ilişkisi	33

ŞEKİL DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1: Osteoklastların fonksiyonel yapısı	4
Şekil 2: Osteoklast matürasyonunda RANKL/RANK/OPG kompleksi	15
Şekil 3: Gennant radyolojik osteoporoz skorlama sistemi	17
Şekil 4: Her iki grupta serum RANKL düzeyi	31
Şekil 5: Her iki grupta serum malondialdehid düzeyi	32
Şekil 6: Her iki grupta serum nitrik oksit düzeyi	32
Şekil 7: Her iki grupta serum glutatyon redüktaz düzeyi	32
Şekil 8: Serum RANKL düzeyinin lomber KMY ile ilişkisi	34
Şekil 9: Serum RANKL düzeyinin femur KMY ile ilişkisi	34
Şekil 10: Serum RANKL düzeyinin serum MDA ile ilişkisi	35
Şekil 11: Serum RANKL düzeyinin eritrosit katalaz aktivitesi ile ilişkisi	36

KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	: Alkalen Fosfataz
BH	: Büyüme Hormonu
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz
DEXA	: Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre
GR	: Glutasyon Redüksidaz
GSH-Px	: Glutasyon Redüktaz
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IF-γ	: İnterferon- γ
IL	: İnterlökin
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu
M-CSF	: Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
MDA	: Malondialdehid
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentezleyen Enzim
OP	: Osteoporoz
OPG	: Osteoprotegerin
OPGL	: Osteoprotegerin Ligandı
PTH	: Paratiroid Hormon
RANK	: Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı
SS	: Standart Sapma
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikali

TGF- β : Transforming Growth Factor-beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha

VKİ : Vücut Kütle İndeksi

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Osteoporoz (OP), kemiğin kütlesinde azalma ve mikromimari yapısında bozulma sonucu kırılabilirliğinde artış ile karakterize sık rastlanılan bir kemik hastalığıdır (1-3). Osteoporoz önlenilebilir bir hastalık olmakla birlikte özellikle menopoz sonrası kadınların önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Osteoporoz kemiğin dayanıklılığını azaltmak suretiyle kırılabilirliğini arttırmakta ve günlük yaşam aktiviteleri sırasında minimal travmalarla (düşük enerjili travma) kırığa neden olabilmektedir (4). Osteoporoz, günümüzde yaşlı popülasyonda en sık kırık nedenlerinden biridir. Amerika Birleşik Devletlerinde OP nedeniyle her yıl yaklaşık 1,3-1,5 milyon kırık olgusuyla karşı karşıya kalınmaktadır. Bu kırıkların büyük çoğunluğu omurgada, kalça ve el bileğinde görülmektedir. Elli yaşın üzerindeki kadınlarda hayat boyu OP'a bağlı kırık riski yaklaşık %40 civarındayken, erkeklerde bu oran %13'lerde seyreder.

Son çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin yaşlanma sürecinde, ateroskleroz ve karsinogenez gibi birçok patolojik süreçte rol oynadığı bildirilmiştir. Serbest oksijen radikallerinin fizyolojik ve patolojik koşullar altında kemik metabolizması üzerine olan etkileri yeni araştırma konularına ilham kaynağı olmaktadır. Fizyolojik olarak osteoklast tarafından üretilen serbest oksijen radikalleri kalsifiye dokuların destrüksiyonunu hızlandırmakta ve böylece kemiğin yeniden yapılanma sürecini hızlandırmaktadır (5). Kemik metabolizmasında düzenleyici bir role sahip olan nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligandının (RANKL), kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanan birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı ortaya konmuştur. Osteoklastların matürasyonu ve fonksiyonlarında temel rol oynayan RANKL'in, oksidan stresin arttığı durumlarda salınımının arttığı ve bunun da kemik yıkımında artma ile sonuçlandığı yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ayrıca kemik hücreleri üzerinde bifazik etkisi olan nitrik oksit, kemik metabolizmasında önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, antioksidan enzim aktivitelerinin ve nitrik oksit seviyesinin postmenapozal OP patogenezindeki rolü ile bu enzimlerin RANKL ile ilişkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Osteoporozun ilk tarifi 1820 yılında histolojik olarak göze kemik anlamına gelen "porous bone" başlığı altında Strasbourg'lu patoloğ Jean Georges Lobstein tarafından yapıldı. 1940 yılında Fuller Albright OP'u klinik sendrom olarak tanımlayarak hastalığın iskeletteki kemik kaybına bağı gelişen ve sonuçta vertebral kırıklara neden olduğunu ortaya koymuştur. Östrojen eksikliğinin OP'a neden olabileceğini vurgulamıştır. Ayrıca Albright östrojen tedavisi ile negatif kalsiyum dengesinin düzeldiğini göstermiştir. 1982 yılında Riggs ve arkadaşları, iki OP formu olduğunu, bunlardan birinin menapozda östrojen eksikliği ile ilgili, diğersinin ise kalsiyum eksikliği ve iskeletin yaşlanmasından kaynaklandığını ileri sürmüştür. Bu görüşler yerini daha sonra bugünkü OP kavramına bıraktı.

Osteoporoz patogeneğine yönelik çalışmalar, kemik hücre fonksiyonlarının lokal ve sistemik düzenleyici faktörlerin arasındaki kompleks etkileşimlerden etkilendiğini ortaya koymuştur. Osteoporoz patogeneğinde yer alan bu düzenleyici mekanizmaların aydınlatılması, yeni tedavi seçenekleri konusundaki gelişmeleri beraberinde getirmektedir

2.1. Kemik Dokusu ve Metabolizması

2.1.1 Normal Kemik Dokusu

Kemik, mineralize kollajen çatısı olan özelleşmiş canlı ve dinamik bir bağ dokusudur. Ana görevi normal postürün ve bedensel hareketlerin sağlanmasının yanı sıra, beyin ve spinal kord gibi önemli yapıları korumak, başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere birçok mineral için depo görevi görmektir. Ayrıca hematopoezde ve immün sistem fonksiyonlarında da görev almaktadır. Dinamik bir süreç olan kemiğin yeniden yapılanması (bone remodelling), kemik rezorpsiyonu ve kemik yapımı süreçlerinden oluşmaktadır.

Kemik, organik ve inorganik maddelerden oluşur. Ağırlığının %70'i inorganik madde, %5-8'i su, geri kalanı ise organik ve ekstrasellüler matriksten oluşur. Organik matriksin %98'ini tip 1 kollajen ve nonkollajenöz proteinler, %2'sini ise kemik hücreleri oluşturur. Organik matriks kemiğin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin belirleyicisidir. İnorganik kısmını ise başlıca kalsiyum fosfatın yer aldığı hidroksiapatit kristalleri oluşturur.

Kemik kortikal (kompakt) ve trabeküler (spongiyöz) bölümlerden oluşmaktadır. Kortikal kemik uzun kemiklerin diafizinde ve yassı kemiklerin yüzeyinde bulunur. Kortikal kemik dışta periostal tabaka, içte trabeküler kemiğe ve kemik iliğine komşu endosteal yüzeyden oluşur. Trabeküler kemik ise, uzun kemiklerin uçlarında ve yassı kemiklerin iç kısımlarında bulunur ve kemik iliği içinde birbiriyle bağlantılı trabeküler lamellerden oluşur. Kemik trabekülleri, kompresif ve torsiyonel güçlere karşı direnci arttıracak şekilde dizilmiş

olup dıştaki kortikal tabakaya dayanıklılık sağlar. Bunun sonucu olarak vertebra ve kalçada karakteristik trabekül dizilimleri izlenir. Kortikal kemik esas olarak mekanik ve koruyucu bir fonksiyon üstlenirken, trabeküler kemik ise metabolik fonksiyondan sorumludur. Kemik döngüsü yüzeye bağımlı olduğundan, erişkinde trabeküler kemikte remodeling kortikal kemiğe oranla 5-10 kat daha fazla olmaktadır. Postmenopozal dönemde hızlı kemik kaybına bağlı olarak trabeküler kemik kaybı kortikal kemiğe göre erken ve çok hızlı olmaktadır. Bu nedenle OP'a bağlı kırıklar genellikle vertebra gibi trabeküler kemikten zengin bölgelerde meydana gelmektedir (6).

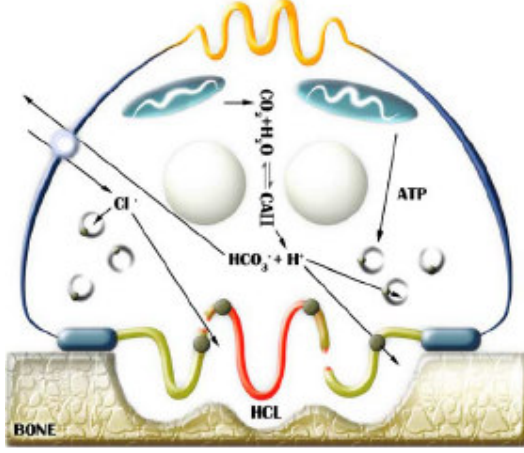
2.1.2 Kemik Hücreleri

Kemik dokusu hücreleri osteoblast, osteoklast ve osteositlerden oluşmaktadır.

Osteoblastlar kemik iliğinden (mezenşimal) köken alan, kemik formasyonu ve mineralizasyonundan sorumlu hücrelerdir. Aktif osteoblastlar kemik oluşumunu gerçekleştirirken, inaktif olan osteoblastlar kemik yüzeyini örten hücreleri meydana getirir. Osteoblastlar, %90'ı kollajenden meydana gelen kemik matriksini sentezlerler. Osteoblastlar tarafından sentezlenen matriks elemanları; tip 1 kollajen, osteokalsin, kemik sialoproteini, osteopontin, proteoglikanlar, sitokinler büyüme faktörleri ve alkalen fosfatazdan oluşur. Osteoblastlar kemik metabolizmasında rol alan mediatörler (parathormon, seks steroidleri, glukokortikoidler, 1,25(OH)₂ vitaminD₃, insülin benzeri büyüme faktörü gibi) için reseptörlere sahip olduklarından kemik döngüsünde önemli role sahiptirler. Osteoblastlar arası iletişim "gap junction"lar aracılığı ile yürütülmektedir.

Osteoklastlar hematopoetik sistemin monosit / makrofaj prekürsörlerinden orjin alan hücrelerdir. 150 µm'den daha büyük çapa ve 4 ila 20 çekirdeğe sahip hücrelerdir. Osteoklastik hücrelerin farklılaşması için osteoblastların, stromal hücrelerin ve ortamda 1,25(OH)₂vitaminD₃ varlığı gerekmektedir. Osteoklast farklılaşmasında en önemli transkripsiyon faktörleri arasında RANKL sitokini bulunmaktadır. Osteoklastlar tartarat-rezistan asit fosfataz, kollajenaz ve katepsinleri içeren lizozomal enzimlerden zengindir ve bu enzimler aracılığıyla kemik matriksini rezorbe ederler. Osteoklastlar mineralize kemiğin yüzeyine yakın bir yerde bulunurlar. Mineral ile temas, osteoklast aktivasyonu için gereklidir. Osteoklastlar; integrinler, osteopontin, kemik sialoprotein, trombospondin, osteonektin ve tip1 kollajen aracılığıyla kemik yüzeyine bağlanarak rezorpsiyonda rol oynarlar. Hücrenin merkezine doğru membran katlantıları artarak karakteristik dalgalı sınırı meydana getirir (Şekil 1). Katlantılı sınırın hemen altında, lizozomal enzimler ve proton pompasının yer aldığı rezorpsiyon çukuru bulunmaktadır. Proton pompası ile hidrojen iyonlarının ekstraselüler

aralığa salınımı ile ortamın asitleştirilmesi sağlanmış olur. Böylece lizozomal enzimler aktifleşerek osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonu başlar (7).



Şekil 1: Osteoklastların Fonksiyonel Yapısı (8)

Osteoklastların farklılaşmalarındaki anormallik ya da sayısındaki azalma osteopetroz veya osteoskleroz ile sonuçlanır. Artmış osteoklast aktivitesi ise postmenapozal OP, Paget hastalığı, litik kemik metastazları ve inflamatuvar artrit gibi hastalıklarda osteopeni ya da OP'a yol açar. Bundan dolayı osteoklastlar kemik homeostazında önemli rol oynamaktadırlar (9). Kemik rezorbe eden osteoklastlar fazla miktarda süperoksit anyonu üretmekte ve kalsiyotrofik hormonlar bu anyon üretimini stimüle ya da inhibe etmektedirler (10). Oksidan stresin arttığı ve antioksidan enzimler ile karşılanamadığı durumlarda osteoklastların bu yıkıcı etkisi ön plana çıkmaktadır.

Diğer kemik dokusu hücresi olan osteositler ise mekanik uyarıları algılayarak kemikte yeniden yapılanmaya neden olmaktadır. Mekanik uyarı sonrası glukoz 6-fosfat dehidrojenaz, nitrik oksit, prostaglandinler ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi kimyasal habercilerin uyarılmasıyla osteositler aktifleşmektedir. Osteositlerin uzantıları, matriksi katederek hücreler arası ilişkileri düzenlerler. Şu ana kadar anlatılan kemik hücreleri çeşitli faktörlerin etkisiyle kemik yapım ve yıkımını düzenlemektedirler. Bu düzenlemenin nasıl gerçekleştiği aşağıda verilmiştir.

2.1.3 Kemik Yapım ve Yıkımının Düzenlenmesi

İskelet ileri derecede özelleşmiş hücreler, mineralize olmuş ve mineralize olmamış konnektif doku matriksi ile kemik iliği kavitesi ve lakünleri içeren ve sürekli değişime uğrayan dinamik bir organdır. İskelet, büyüme ve gelişme sürecinde ve henüz büyüme plaklarının açık olduğu dönemde, şeklini ve büyüklüğünü kazandığı bir yapılanma (modeling)

süreci geçirir. Erişkin iskelette egzersiz gibi biyomekanik strese yanıt olarak yapılanma mümkünse de ilerleyen yaşla birlikte bu kapasite zamanla azalır.

İskelet maturasyonu tamamlandıktan sonra eski kemiğin yenisiyle periyodik olarak yer değiştirdiği bir süreç olan yeniden yapılanma (remodeling), rezorpsiyon ve onu takip eden formasyon sürecinden oluşur. Kemiğin strese karşı adaptasyonu, mikrofraktürlerin tamiri ve mineral hemostazın devamlılığı için kemiğin yeniden yapılanması önem taşımaktadır. Kemiğin yeniden yapılanması süreci ile mekanik destek görevine katkıda bulunulurken aynı zamanda kalsiyum hemostazın sağlıklı bir şekilde sürmesi sağlanır. Yeniden yapılanma sürecinde osteoklastların aktivasyonu, kemiğin yıkımı ve yeni kemik oluşumu şeklinde olaylar gerçekleşir. Kemiğin yıkım süreci yaklaşık bir ay, yapım süreci ise yaklaşık beş ay sürmektedir. Yeniden yapılanma siklusu toplam altı ayda tamamlanmakla birlikte çeşitli nedenlerle bu süre bir yıla kadar uzayabilir.

Kemiğin yeniden yapılanmasının düzenlenmesinde rol oynayan faktörler tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I: Kemiğin Yeniden Yapılanmasında Rol Oynayan Faktörler (6)

HORMONLAR	
I. Polipeptid hormonlar	Paratiroid hormon Kalsitonin İnsülin Büyüme hormonu
II. Steroid hormonlar	1,25-dihidroksivitaminD ₃ Glukokortikoid Seks steroidleri
III. Tiroid hormonlar	
LOKAL FAKTÖRLER	
I. Kemik hücre kaynaklı	İnsülin benzeri büyüme faktörü β_2 -mikroglobulin TGF- β
II. Kartilaj kaynaklı	İnsülin benzeri büyüme faktörü Fibroblast büyüme faktörü
III. Kan hücre kaynaklı	İnterlökin-1 TNF- α
IV. Diğer	RANKL Osteoprotegerin Prostoglandin Nitrik oksit Makrofaj koloni uyarıcı faktör Mekanik yüklenme

Kemikteki yeniden yapılanma süreci; istirahat, aktivasyon, rezorpsiyon, sürecin tersine dönüşü ve formasyon fazlarından oluşur. Erişkinde herhangi bir zamanda trabeküler kemiğin %80'i, kortikal kemiğin %95'i istirahat halindedir. İstirahat halinde bulunan ve dölşeyici hücrelerle kaplı kemik yüzeyinde, yeniden yapılanma aktivasyon süreci ile başlar. Aktivasyonun başlayabilmesi için kemik üzerindeki ince mineralize olmamış osteoid dokunun öncelikle rezorpsiyonu gerekir. Aktivasyon sürecinde osteoklast kemotaksisi olmakta, osteoklastlar kemik yüzeyine yapışmaktadırlar. Rezorbsiyon için osteoklastların kemik yüzeyine bağlanması gerekir ve bu, osteopontin, kemik sialoprotein, trombospondin ve osteonektin aracılığı ile olur. Bu aşamadan sonra osteoklastlar 2-4 hafta sürecek olan yıkım sürecini başlatır. Yıkım sürecinin sonu ile yapım sürecinin başlamasından önceki ara döneme tersine dönüş fazı denilir ki bu faz 1-2 hafta sürmektedir. Yıkım fazının son döneminde kavitenin dibinde mononükleer hücreler toplanmaya başlarken bu arada meydana gelen tersine dönüş çizgisi üzerinde osteopontin birikir. Osteoblastlar için reseptör görevi gören bu molekül, kavitede osteoblastların birikmesine neden olur. Kemik yapım fazında yeni oluşan osteoid, daha sonra kalsiyum hidroksiapatit kristalleri ile mineralize olur. Bu süreçte 1,25(OH)₂ vitaminD₃ önemli rol oynamaktadır.

Osteoporozda kemik kaybı, kemik yıkımı ile yapımı arasındaki dengesizlik sonucu meydana gelmektedir (11). Kemik remodeling alanlarının artması, kemik rezorpsiyon yüzeyinin artmasına ve sonuçta yerine konan kemiğin yetersiz kalmasına yol açacaktır. Kemikteki mikro hasarın tamirinde eksiklik olması kemiğin kırılabilirliğini arttırmaktadır.

2.1.4 Doruk Kemik Kütlesi

Doruk kemik kütlesi, normal büyüme sırasında kazanılan en yüksek kemik kütlesi düzeyidir. Doruk kemik kütlesinin bilinmesi daha sonra gelişecek kemik kaybını ve kırık riskini tahmin etmek açısından önemlidir. Doruk kemik kütlesine erişme yaşı en erken 17-18, en geç 35 yaş olarak bilinmektedir. Kadınlarda menopoz dönemi ile birlikte daha hızlı bir kemik kütle kaybı gerçekleşmektedir. Menapoz öncesi kadınlarda yılda %0,25-1 oranında kayıp olurken perimenapozal-postmenapozal dönemde yılda %2-5, postmenapozal ilk 10 yıldaki kayıp ise yaklaşık %15 (bu oranın %50'si ilk 5-6 yılda) olarak gerçekleşir. Kemik kütlesindeki her %10'luk kayıp kırık riskini iki katına çıkarmaktadır (12).

Doruk kemik kütlesini etkileyen çok sayıda faktör vardır. Bu faktörlerden en fazla etkisi olan genetik faktörlerdir. Doruk kemik kütlesinin kazanılmasında genetik faktörlerin yanı sıra daha az da olsa vitamin D reseptör gen polimorfizmi de sorumludur (13). Kemik dokusu protein ve mineralden oluşur. Bunların herhangi birindeki eksiklik, kemiğin boyutunu veya yoğunluğunu, bazen de her ikisini birden etkilemektedir (14). Yapılan bir çalışmada

büyüme sırasında alınan kalsiyum ile KMY ve kemik kütlesi arasında doğrudan ilişkili bulunmuştur (15). Düşük protein alımı halinde büyüme hormonu rezistansı ortaya çıkmakta, insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) düzeyleri azalmaktadır. IGF-1, osteoblastları uyarak kemik yapımını arttırdığı gibi epifiz plağında kondrosit proliferasyonu ve farklılaşması yaratarak longitudinal büyüme sağlamaktadır. IGF-1 eksikliği hem doruk kemik kütlesine erişimi hemde boy uzamasını engellemektedir (16). Fiziksel aktivite, orta yaş grubunda yaş ve menapoz ile ilişkili kemik kaybını azaltır, yaşlılarda ise kuvvet ve koordinasyonu iyileştirme yoluyla düşme insidansını azaltarak OP'a bağlı kırık ve diğer olumsuzluklar üzerinde yararlı etkiler gösterir. Vücut ağırlığı, kemik kütlesinin önemli belirleyicilerinden olup iskelet üzerine mekanik yük bindirerek kemik yoğunluğunu etkilemektedir. Ayrıca yağ dokusunda depolanan östrojenlerin de kemik yoğunluğu üzerine pozitif etkileri söz konusudur. Sigaranın OP'a bağlı kemik kaybı ve kırık üzerinde önemli rolü bulunmaktadır (17).

2.2 OSTEOPOROZ

Osteoporoz düşük kemik kütlesi, kemiğin mikro mimarisinde değişiklikler ve bunun sonucunda kemik kırılabilirliğinde artışla karakterize sistemik bir hastalıktır. Son yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) konsensusu, OP tanısı için Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre (DEXA) sonuçlarına göre bazı tanımlamalar bildirmiştir (tablo II). Bu son tanımlamaya göre OP tanımı için kırık şart değildir (18).

Tablo II: Dünya Sağlık Örgütünün Osteoporoz Değerlendirmeleri

Normal	T skor > -1.0
Osteopeni	-1 > T skor > -2.5
Osteoporoz	T skor < -2.5
Yerleşik Osteoporoz	T skor < -2.5 ve bir veya daha fazla kırık

2.2.1 Osteoporozun Sınıflandırılması

Günümüzde OP ile ilgili birçok sınıflama kullanılmaktadır. Tablo III'te ayrıntılı bir OP sınıflaması verilmiştir.

Tablo III: Osteoporozun Sınıflandırılması (19)

1-Etiyolojiye göre	- Primer osteoporoz - Sekonder osteoporoz
2-Yaşa göre	- Juvenil osteoporoz - Erişkin osteoporoz - Senil osteoporoz
3-Tutulan kemik dokuya göre	- Trabeküler osteoporoz - Kortikal osteoporoz
4-Lokalizasyona göre	- Genel osteoporoz - Bölgesel osteoporoz
5-Histolojik görünümüne göre	- Hızlı döngülü osteoporoz - Yavaş döngülü osteoporoz

Osteoporoz, etyolojisine göre primer veya sekonder olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo IV). Primer OP'de neden bilinmemektedir. Sekonder OP'de ise altta yatan birçok hastalık ya da çeşitli faktörler rol oynamaktadır.

Tablo IV: Osteoporozun Etiyolojiye Göre Sınıflandırılması (19)

1-Primer Osteoporoz
A. İdyopatik osteoporoz
- Juvenil
- Adult
B. İnvolyusyonel osteoporoz
- Tip I- Postmenopozal osteoporoz
- Tip II- Senil osteoporoz
2-Sekonder Osteoporoz

Tip I OP 50-75 yaş arası postmenopozal kadınlarda ortaya çıkar ve östrojen eksikliği ile karakterizedir. Kemik kaybı, kortikal kemiğe göre trabeküler kemikte daha belirgindir ve menopoz sonrası ilk 3-4 yılda daha fazla olmaktadır. Postmenopozal kemik kaybı, başlıca artmış osteoklastik aktiviteden kaynaklanır. Yapım ve yıkım arasındaki denge bozulmuştur. Bunun başlıca nedenleri; düşük östrojen seviyeleri, osteoklastik aktiviteyi arttıran sitokin düzeyleri ve artmış osteoblast apoptozudur. Bu dönemde parathormon sekresyonu ve

1,25(OH)₂ vitamin D₃ yapımı azalır, kalsitonin sekresyonu artar. En belirgin klinik bulgu düşük enerjili travmalar sonucu ortaya çıkan vertebra ve distal radius kırıklarıdır.

Tip II OP ise 70 yaş üzerindeki kadın ve erkekleri eşit olarak etkiler. Trabeküler ve kortikal kemik kaybı eşittir. Kemik kaybından sorumlu iki mekanizma, azalmış osteoblastik aktivite ve sekonder hiperparatirodizmdir. Bunun dışında tip II OP'nin patofizyolojisinde genel hücresel yaşlanma, büyüme hormonu ve insülin-benzeri büyüme faktör seviyelerinde azalma ve sitokinlere karşı hücresel cevapta yetersizlik rol oynamaktadır. Bu tip OP'da proksimal femur ve tibia ile pelvis kırıkları sık görülmektedir.

Tip I ve tip II OP arasındaki farklı klinik ve etyopatogenez tablo V'te gösterilmiştir.

Tablo V: Tip I Ve Tip II Osteoporozun Karşılaştırılması (19)

	<u>Tip I</u>	<u>Tip II</u>
Yaş	50-75	>70
Kadın/Erkek	6/1	2/1
Kemik tutulumu	Trabeküler	Kortikal / Trabeküler
Kırık lokalizasyonu	Vertebra, distal radius	Kalça
Kemik kaybı	Hızlı	Yavaş
PTH	N, ↓	↑
Serum Ca, P	N	N
ALP	N	N
İdrarda Ca	↑	N
Ca Emilimi	↑	↓
D vitamini metabolizması	Sekonder azalmış	Primer azalmış

Kemik mineral yoğunluğu düşük hastalarda sekonder OP nedenleri mutlaka gözden geçirilmelidir (Tablo VI).

Tablo VI: Sekonder Osteoporoz Nedenleri (20)

Endokrin Hastalıklar-Metabolik nedenler	Gastrointestinal Sistem Hastalıkları
1- Östrojen eksikliği Erken menopoz Ooforektomi Atletlerde amenore	1- Malabsorpsiyon sendromu/malnutrisyon 2- Çölyak hastalığı 3- Gastrik cerrahi 4- Kronik karaciğer hastalığı (Primer biliyer siroz, kronik obstrüktif sarılık) 5- Anokreksiya nervoza 6- Alkolizm
2- Testosteron eksikliği 3- Hipertiroidi 4- Hiperparatiroidi 5- Cushing sendromu 6- Prolaktinoma 7- Hipopituitarizm 8- Akromegali 9- Gebelik 10- Erişkin hipofofatazisi 11- Porfiri	Hematolojik ve malign hastalıklar 1- Multipl myeloma 2- Gaucher hastalığı 3- Mastositozis 4- Talasemi 5- Lösemi, lenfoma
Konnektif Doku Hastalıkları 1- Osteogenesis imperfekta 2- Homosistinüri 3- Ehler-Danlos sendromu 4- Marfan sendromu 5- Skorbüt	İlaçlar 1- Alüminyum içeren antasitler 2- Fenotiazin deriveleri 3- Siklosporin A 4- Metotreksat 5- Kortikosteroidler 6- Heparin 7- Antikonvülzanlar 8- Lityum 9- Tiroid hormonları 10- Gonadotropin serbestleştirici hormon agonistleri
Beslenme Bozuluğu ve Eksikliği 1- Diyetle kalsiyum ve vitamin D azlığı 2- Aşırı alkol alımı 3- Artmış protein tüketimi	Diğer 1- İmmobilizasyon 2- Malignensi
Kronik İnflamatuvar Hastalıklar 1- Romatoid artrit 2- Ankilozan Spondilit	

2.2.2 Osteoporoz Epidemiyolojisi

Osteoporoz, yeryüzünde en yaygın olarak rastlanan metabolik kemik hastalığıdır. Osteoporoz prevalansı, ortalama yaşam süresinin artması ile birlikte (21) yükselme göstermekte ve buna bağlı olarak osteoporotik kırıklar önemli bir sağlık problemi haline gelmektedir (22). Osteoporoz ve osteoporotik kırıklar için risk faktörlerin belirlenmesi, bu hastalıktan korunmada ilk adımdır. Tablo VII' de Kanada Osteoporoz Klavuzunda hastaların OP açısından risk faktörleri bildirilmiştir.

Tablo VII: Osteoporoz Risk Faktörleri

• Yaş > 65	• Romatoid artrit
• Vertebral kompresyon kırığı	• Klinik hipertiroidizm öyküsü
• 40 yaş üzerinde kırık	• Antikonvülzan ilaç kullanımı
• Ailede osteoporozla bağlı kırık	• Diyetle az miktarda kalsiyum alımı
• Sistemik glukokortikoid kullanımı (>3 ay)	• Sigara kullanımı
• Malabsorbsiyon sendromu	• Aşırı alkol alımı
• Primer hiperparatiroidizm	• Aşırı kafein tüketimi
• Direkt grafide osteopenik görünüm	• Düşük vücut ağırlığı (< 57 kg)
• Hipogonadizm	• Kronik heparin tedavisi
• Erken menapoz (< 45 yaş)	• Fiziksel aktivite

2.2.3 Osteoporoz Patogenezi

Osteoporoz patogenezinde doruk kemik kütlesi, kemik yapım-yıkım döngüsünün hızı ve kemiğin organik matriksindeki değişiklikler önemli rol oynamaktadır. Doruk kemik kütlesi esas olarak genetik olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte yeterli kalsiyum alımı, normal pubertal gelişim ve fiziksel aktivite doruk kemik kütlesinin diğer belirleyicileridir. Kemiğin yapım ve yıkım süreci, yaşam boyunca devam etmekte olup bir denge halinde bulunmaktadır.

Östrojen eksikliğine bağlı osteoklast aktivitesindeki artış ile osteoblast aktivitesindeki azalma, kemik kütlesinde azalma ile sonuçlanmaktadır. Östrojen eksikliğinde, monosit, makrofaj ve osteoblastlardan interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımında artış meydana gelmektedir. Bu spontan artışın nedeni şu ana kadar aydınlatılamamıştır. Östrojen eksikliğine bağlı bu

sitokinlerdeki artış, infeksiyon ya da doku yaralanması halinde görülen sitokin artışına göre daha az belirgin olmaktadır (23).

Östrojen eksikliğine bağlı olarak sitokin artışı, stromal/osteoblastik hücrelerin sitokinlere daha sensitif hale gelmesine neden olmaktadır. Bu sitokinler ile stimüle edilen stromal hücreler ve preosteoblastlardan çok sayıda faktör salgılanmaktadır. Bunlar arasında IL-1, IL-6, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve nükleer faktör kappa B reseptör aktivatörü ligandı (RANKL) bulunmaktadır. Bu faktörlerin tümü osteoklast prekürsörlerinin proliferasyonunu veya osteoklastogenezisi stimüle etmektedir (24). Ayrıca östrojen eksikliği sonucu matür osteoklastların aktivasyonu artmakta, apoptozu azalmaktadır (25). Özetle postmenapozal OP patogenezinde östrojen eksikliğinin neden olduğu bozukluklar sadece kalsiyum dengesi ile ilgili olan faktörlerle sınırlandırılmaz. Östrojen, osteoklast oluşumunu ve fonksiyonunu stimüle eden faktörleri inhibe etmekte, osteoklast apoptozisini hızlandırmakta olup östrojen eksikliği sonucu osteoklastogeneziste artma, osteoklastların yaşam sürelerinin uzaması ile osteoblastların ve osteositlerin yaşam sürelerinin azalması gibi çeşitli hücresele değişiklikler meydana gelmektedir (26).

Östrojen eksikliği sonucu, osteoblastların, RANKL üretimi artmakta ayrıca osteoblastın RANKL üretimi ve aktivitesini azaltan osteoprotegerin (OPG) üretimi de azalmaktadır. Östrojen eksikliği benzer mekanizmalarla osteoblastogenezisin azalmasına, osteoblastların ve osteositlerin yaşam sürelerinin kısalmasına yol açarak postmenapozal OP patogenezinde rol alırlar.

Yapılan hayvan çalışmalarında, östrojen tedavisinin ooferektomize ratlarda IL-1 salınımını inhibe ettiği ve IL-1 'in etkisini bloke ederek kemik kaybını baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca östrojen tedavisi ile osteoblastların OPG üretimini arttırdığı ve osteoklastogenezisi inhibe ettiği gösterilmiştir. Östrojen tedavisinin, osteoblast ve stromal hücrelerden OPG salınımını arttıran "transforming growth factor beta" (TGF- β) düzeylerinde artışa yol açarak osteoklast apoptozunu hızlandırdığı ve kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (27).

RANKL, osteoprotegerin ligandı (OPGL) ya da osteoklast farklılaşma faktörü (ODF) olarak da tanımlanmaktadır. RANKL, aynı zamanda osteoklastların farklılaşmasında en temel düzenleyici faktörlerden biri olup membrana bağlı TNF ailesindedir. Membrana bağlı ve serbest formları bulunmakta ve stromal fibroblastlar, osteoblastlar, T hücreleri ile tümör hücreleri tarafından salınmaktadır. RANKL mRNA'nın kalp, akciğer, tiroid ve plasenta dokularından da salınabildiği gösterilmiştir. RANKL sadece kemik remodeling sürecinde değil aynı zamanda postmenapozal OP, romatoid artrit, maligniteye bağlı kemik yıkımı gibi

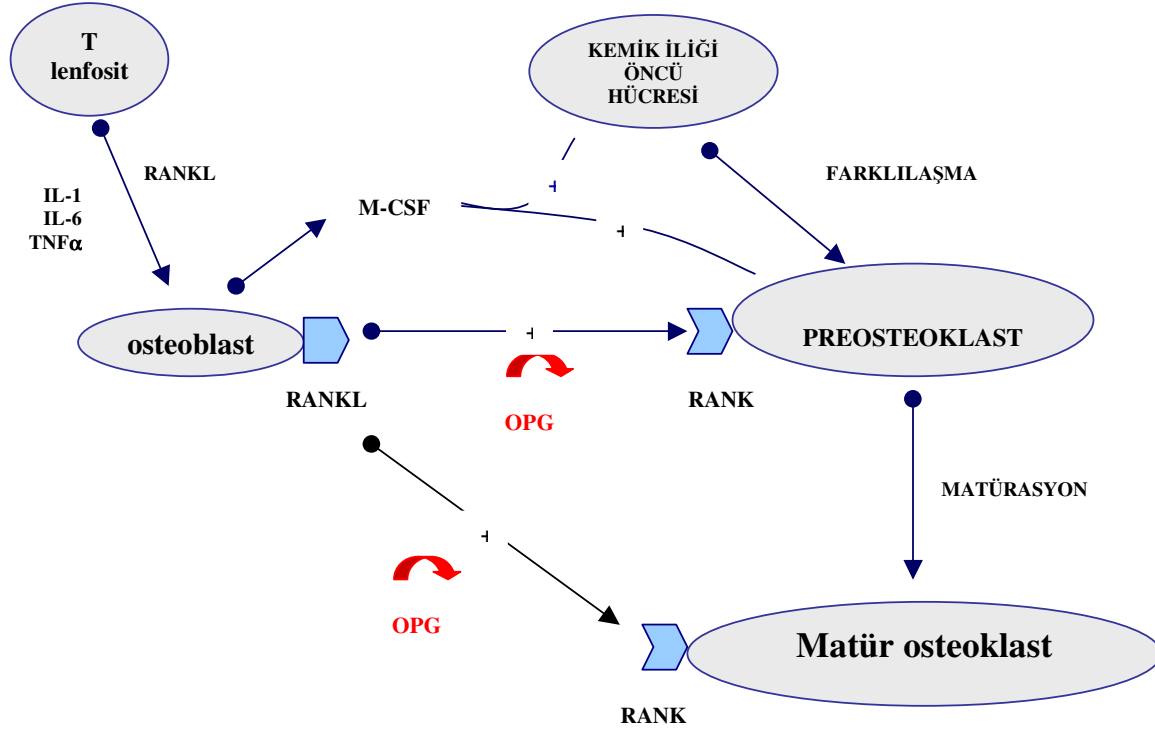
patolojik kemik kaybının görüldüğü durumlarda da önemli rol oynamaktadır. Osteoblastların RANKL salınımı IL-1 β , IL-11, TNF- α ve PG-E2 gibi sitokinlerin yanı sıra deksametazon, 1,25(OH)₂ vitaminD₃ ve PTH gibi hormonlar tarafından da stimüle edilmektedir (28). TGF- β ise osteoblastların RANKL salınımını inhibe etmektedir (29).

RANK-RANKL etkileşimi ile osteoklast prekürsör hücrelerin matürasyonu başlamaktadır. RANKL, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) varlığında, preosteoklastlardaki reseptörü RANK'a bağlanarak osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu stimüle etmekte, apoptozunu ise inhibe etmektedir. RANKL ya da RANK'ın bloke edildiği deney hayvanlarında matür osteoklastların total kaybı gözlenmiştir. Bununla birlikte solubl RANKL uygulanan farelerde doza bağlı şiddetli hiperkalsemi ve kemik kaybı gözlenmiş ve bu etkilerinin OPG ile bloke edilebileceği gösterilmiştir (30).

Postmenapozal kadınlarda stromal hücrelerin ve T hücrelerinin premenapozal ya da östrojen tedavisi alan postmenapozal kadınlara göre daha fazla RANKL eksprese ettiği gösterilmiştir (31). Ayrıca bu hastalardaki RANKL salınımının östradiol verilmesi ile baskılandığı da ortaya konmuştur. Osteoklast aktivitesinde önemli rol oynayan RANKL'ın keşfedilmesi yeni bir terapötik hedefi açığa çıkarmıştır. Yapılan çalışmalarda spesifik anti-RANKL antikoru olan denosumabın, kemik rezorpsiyonunu hızlı ve önemli oranda azalttığı gösterilmiştir. RANKL'ın inhibisyonu OP ve diğer ilişkili hastalıklarda yeni bir tedavi seçeneği olarak kullanılabilir (32).

RANK, 616 aminoasitli, tip 1 membran proteini olup TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. Osteoklastlar, pre-osteoklastlar ve dendritik hücreler tarafından salınmaktadır. Ayrıca kalp, akciğer, beyin, iskelet kası, böbrek, karaciğer ve deri dokularından da salındığı gösterilmiştir. RANKL/RANK/OPG kompleksi, kemik yıkımı ile karakterize hastalıklardaki patolojik osteoklast aktivasyonunda önemli rolü olan faktörlerdir (33).

Osteoklastların farklılaşma ve matürasyonunda önemli rol oynayan RANKL/RANK/OPG kompleksi arasındaki etkileşim şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2: Osteoklast Matürasyonunda RANKL/RANK/OPG Kompleksi

Osteoprotegerin, osteoklastogenezis inhibitör faktör (OCIF) olarak bilinir, 401 aminoasitli, solubl bir glikoproteindir. OPG, en fazla büyümekte olan kemiklerdeki osteoblastlar tarafından üretilmektedir. Bunun dışında kalvarium, deri, karaciğer, akciğer ve kalp dokularından da OPG mRNA'nın salınımını saptanmıştır. İn vivo ve in vitro olarak osteoklastların matürasyonu ve aktivitesi üzerinde inhibitör etki göstermektedir. RANKL için tuzak reseptör olan OPG, RANKL'a güçlü bir şekilde bağlanır ve onun osteoklast uyarıcı etkisini bloke eder. Osteoblastlardaki OPG salınımı IL-1 α , IL-1 β , TNF- α gibi sitokinler (34) ve 1,25(OH) $_2$ vitaminD $_3$, östrojen (35) ve özellikle TGF- β (36) tarafından stimüle edilir. Hofbauer ve arkadaşları, sağlıklı genç kadınlarda oral kontraseptiflerin serum OPG seviyesini arttırdığını, OPG/RANKL oranında artışa neden olduğunu göstermişlerdir (37). Buna karşın, glukokortikoidler, PTH ve PGE $_2$ 'nin OPG salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir (38).

Osteoprotegerinin bloke edildiği farelerde, osteoklast sayısı, kortikal ve trabeküler kemik porozitesinde artış ile kemik kırılabilirliğinde artma olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kemik gücü ve dansitesinde azalmayla birlikte erken dönemde ve hızla OP geliştiği gözlenmiştir (39). Yapılan hayvan çalışmalarında overiektomize ratlarda OPG tedavisinin kemik kütlelerini koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Kostenuik ve arkadaşları (40) overiektomize edilmiş

osteoporotik ratları, PTH, OPG ya da PTH-OPG kombinasyonunun 5.5 ay süreyle verildiği üç gruba ayırmış. Sadece PTH verilen gruba göre, OPG-PTH kombinasyonun overiektomiye bağlı problemlerin geriye döndüğünü, KMY ve kemik gücüne olan katkısının daha fazla olduğunu göstermişlerdir Bir diğer hayvan çalışmasında ise overiektomize farelerden alınan kemiklerin ışık ve elektron mikroskopi çalışmalarında OPG verilmesi ile trabeküler kemikte anlamlı artış gözlenmiş (41). Postmenapozal OP'li 52 hastanın yer aldığı çalışmada, hastalara tek doz rekombinant OPG injeksiyonu ile kemik yıkım belirteçlerinde anlamlı azalma olduğu gözlenmiş (42).

RANKL/OPG oranında artışa neden olan faktörler tablo VIII'de gösterilmiştir (25;43).

Tablo VIII: RANKL / OPG Oranında Artmaya Neden Olan Faktörler

- Glukokortikoidler
- IL-1, IL-4, IL-6, IL-11, IL-17, TNF- α
- Fibroblast büyüme faktörü-2
- PTH
- Prostaglandin E₂
- 1,25(OH)₂ vitamin D₃

Östrojen ve TGF- β , osteoblastlarda OPG sekresyonunu arttırıp RANKL üretimini inhibe ederek RANKL/OPG oranında azalmaya neden olmaktadır (44,45).

2.2.4 Osteoporozda Klinik











Osteoporoz, kırık oluşana kadar sessiz bir hastalıktır. Çok uzun bir subklinik dönemi vardır. Genellikle ağrısız olup ilerlemiş vakalarda sırt ağrısı, boy kısalması, spinal deformitelere neden olur. Ağrı hareketle veya yük kaldırmakla artmakta, kemiklere basmakla hassasiyet bulunmaktadır.

Kırıklar çoğu kez herhangi bir travma olmaksızın veya minimal bir travmayla (düşük enerjili travma) ile oluşur. Akut vertebra kırıklarında ise ani ve şiddetli ağrı yanında paravertebral kas spazmı vardır. Ağrı öksürük, ıkınma gibi durumlarda artar. Kronik ağrı, postür bozukluğuna, ligamentlerin uygun olmayan gerilmesine ve kompresyon kırıklarına bağlı olarak meydana gelir. Torakal vertebranın alt kısmı ile üst lomber omurga, kalça (proksimal femur) ve distal radius (colles kırığı) sık karşılaşılan osteoporotik fraktür bölgeleridir.

2.2.5 Osteoporozda Görüntüleme Yöntemleri

a) Radyografi

Radyografilerde kemik kaybının belirtileri genellikle kemik dansitesinde azalmadır. Radyografide osteopenik görünüm için kemik kütlelerinde en az % 30 kayıp olması gerekmektedir (46). Osteoporozla ilgili vertebra deformiteleri kama, bikonkav ve kompresyon vertebra olmak üzere üç şekilde görülmektedir. Kama vertebra vertebra anterior yüksekliğinde %20 veya daha fazla azalma, bikonkav vertebra orta yükseklikte %20 veya daha fazla azalma, kompresyon vertebra ise vertebra anterior-orta ve posterior yüksekliğinde %20 veya daha fazla azalma olmaktadır (Şekil 3).

	Normal (Grade 0)	Kamalaşma	Bikonkavite	Kompresyon
				
Hafif Deformite (Grade 1)				
Orta Derecede Deformite (Grade 2)				
Ciddi Deformite (Grade 3)				

Şekil 3: Gennant Radyolojik Osteoporoz Skorlama Sistemi (47)

b) Kemik Sintigrafisi

Teknesyum 99m kullanılarak kemikte tutulan radyoizotop miktarı değerlendirilir. Kemik fonksiyonel durumu hakkında bilgi vermektedir. Kemikte biriken farmasötik ajanın miktarı, kemik turnover hızına ve kanlanmasına bağlıdır.

c) Kemik mineral yoğunluğu ölçüm yöntemleri

- 1. Tek Foton Absorbsiyometri (SPA):** Bu metod, iyot-125 kaynağından elde edilen foton hüzmesinin bir ekstremiteden geçişinin bir detektör ile saptanmasına dayanır. Yumuşak doku kalınlığı, ölçüm sonuçlarını etkilediği için bu teknik ile yumuşak dokunun sabit olduğu distal radius ve ulna ölçümleri ile sınırlıdır
- 2. Dual Foton Absorbsiyometri (DPA):** Femur, omurga ve tüm vücut kemik mineral yoğunluğu hakkında kantitatif değerler verir. Radyoizotop maliyetinin yüksek olması, bir yıl içinde yenileme zorunluluğu ve hata payının yüksek olması dezavantajlarıdır.

3. **Kantitatif Bilgisayarlı Tomografi:** Trabeküler ve kortikal kemiği ayrı değerlendirebilmekte, hacimsel mineral yoğunluk ölçümünü verebilir. En büyük dezavantajı pahalı bir yöntem olmasıdır.
4. **Ultrason:** Genellikle topuk, önkol gibi periferik iskelet bölgelerinden ölçüm yapılabilir. Toplumun kemik yoğunluğu taramalarında kullanılabilir.
5. **Manyetik Rezonans Görüntüleme:** Trabeküler kemik yapıyı belirlemek ve trabeküler kemik yoğunluğunu ölçmek amacıyla kullanılan, üç boyutlu görüntüleme sağlayan tekniklerden biridir.
6. **DEXA (Dual Energy X-ray Absorbtiometry):** Günümüzde altın standart kabul edilen DEXA, DPA'ya benzer, ancak radyasyon kaynağı olarak çift enerjili X ışını kullanılır. Böylece görüntülerde daha yüksek bir rezolüsyon, daha kısa tarama zamanı, daha düşük radyasyon dozu elde edilir. DEXA ile omurga, kalça, tüm vücut, ön kol, kalkaneus ölçümleri yapılabilir. Ayrıca geliştirilen yazılımlarla özel amaçlı ölçümler yapılabilir.

2002 yılında osteoporoz bilimsel araştırma konseyinin konsensusuna göre kemik dansitometrisi endikasyonları tablo IX'da gösterilmiştir.

Tablo IX: Kemik dansitometrisi için hasta seçim kriterleri (3)

-
- 65 yaş üzeri kadınlar
 - Birden fazla riski olan genç postmenapozal kadınlar
 - Uzun süreli kortikosteroid kullanımı (altı aydan fazla >7.5 mg/gün)
 - Prematür menapoz (45 yaş altı)
 - Düşük enerjili travma sonrası kırığı olanlar
 - Primer hipogonadizm
 - Osteoporoz ile ilişkili kronik hastalıklar
 - Annede kalça kırığı öyküsü
 - Vücut kütle indeksinin düşük olması (VKİ <19kg/m²)
 - Radyografilerde osteopeni ve/veya vertebral deformite varlığı
 - Boyda kısalma (≥ 4 cm), dorsal kifozda artış
-

2.2.6 Osteoporozda Laboratuvar Tetkikleri

Laboratuvar tetkiklerinden primer ve sekonder OP ayırıcı tanısını yapmak, kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerini saptamak, kırık riskini belirlemek, tedavi seçimini belirlemek ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla yararlanılır (48).

Kemik Döngüsünün Biyokimyasal Belirteçleri

Kemik dokusu, organik matriks ve bunun üzerinde minerallerin birikmesi ile oluşmuş ve hayat boyu yeniden yapılanma süreci devam eden sert bir bağ dokusudur. Kemik döngüsü, osteoblast ve osteoklastların enzimatik aktivitelerinin ve yapım-yıkım sırasında dolaşıma geçen kemik matriks elemanlarının ölçülmesiyle değerlendirilir (49). Kemik döngüsünün hızı, postmenapozal kadınlarda KMY ile negatif ilişki göstermektedir. Kemik dokusunun biyokimyasal belirteçleri tablo X, kullanım amaçları tablo XI'de gösterilmiştir.

Tablo X: Kemik Döngüsünün Biyokimyasal Belirteçleri (50)

Kemik Yapımı

Serum

- Osteokalsin
- Alkalen fosfataz
- Prokollagen Tip I-C ve N Propeptidleri

Kemik Yıkımı

Serum

- Tartarat Dirençli Asit Fosfataz Aktivitesi
- Tip I Kollajen N ve C-Terminal Çapraz Bağlı Telopeptidleri
- Kemik Sialoproteini

İdrar

- İdrar Hidroksiprolin Düzeyi
- İdrarda Hidroksilizin Düzeyi
- Üriner Pridinolin ve Deoksi pridinolin Düzeyleri

Tablo XI: Kemik Dokusunun Biyokimyasal Belirteçlerin Kullanım Amaçları (51)

- Osteoporoz patogenezinin değerlendirilmesi
- Hızlı kemik kaybı olan ve osteoporotik kırık riski taşıyan hastaların saptanması
- Bireysel olarak erken hastalık tanısı koymak
- Diğer metabolik kemik hastalıklarının ayırıcı tanısını yapmak
- Tedavi seçimine yardımcı olmak
- Tedaviye yanıtları değerlendirmek ve ilaçların etkinliğini izlemek

Kemik Yapımının Biyokimyasal Belirteçleri

Kemik formasyon göstergeleri, osteoblast gelişiminin farklı dönemlerinde aktif osteoblastlar tarafından doğrudan veya dolaylı olarak sentezlenen ürünlerdir.

1) Serum Alkalen Fosfataz

Kemiğe spesifik alkalen fosfataz osteoblastlardan salgılanarak dolaşıma katılır. Alkalen fosfatazın başlıca rolü, pirofosfatı hidrolize etmek ve yeni sentez edilmiş mineralleşmekte olan osteoid dokuya, hidroksiapatit kristallerinin yerleşmesine olanak sağlamaktır. Kemik döngüsünün arttığı durumlarda osteoblast yapımının artışına bağlı olarak serum düzeyi artmaktadır. .

2) Osteokalsin

Kemik için spesifik olup osteoblastlardan sentezlenmektedir. Primer hiperparatroidi, hipertroidi, renal osteodistrofi, tedavi edilmemiş osteomalazi, metastatik kemik hastalıkları ve akromegali gibi kemik döngüsünün arttığı durumlarda serum düzeyi artar (50).

3) Prokollagen Tip I Propeptidleri

Tip I kollajen, kemiğin organik matriksinin yaklaşık olarak %90'ını oluşturur. Kollajen sentezinde, prokollajen peptidlerin C ve N terminalleri molekülden ayrılıp dolaşıma geçerler. Bu peptidler; prokollajen karboksiterminal propeptid ve aminoterminal propeptid olarak bilinirler.

Kemik Yıkımının Biyokimyasal Belirteçleri

1) Serum Tartarat Dirençli Asit Fosfataz (TRAP) Aktivitesi

Asit fosfataz primer olarak kemik, prostat, trombosit, eritrosit ve dalak olmak üzere birçok dokuda bulunan lizozomal bir enzimdir. Multipl myeloma, Paget, metastatik kemik tümörü gibi kemik döngüsü artışı yapan kemik hastalıklarında ve kadınlarda oofektomi sonrası serum seviyeleri yükselmektedir (50).

2) Üriner Pridinolin ve Deoksi pridinolin Düzeyleri

Pridinolin ve deoksi pridinolin, ekstraselüler matriksteki kollajeni stabilize eden çapraz bağlardır. Pridinolin, esas olarak kemik ve artiküler kartilajda bulunurken, deoksi pridinolin sadece kemik ve dentinde bulunur. Kemik matriksin osteoklastlar tarafından yıkımıyla salınırlar. İki ve arkadaşları serum osteokalsin ve hidroksi pridiniyum bileşiklerinin osteopenik olguların progresyonunu izlemede daha yararlı olduğunu bildirmektedirler (51).

3) Tip I Kollajen N-Telopeptid ve C-Telopeptid Yıkım Ürünleri

Tip I kollajenin biri amino grup diğeri karboksi terminalinde olmak üzere iki adet çapraz bağ bölgesi vardır. Telopeptidlerin üriner salınımları menopozdan sonra, primer hiperparatroidi, hipertroidi ve Paget hastalığında belirgin olarak artmaktadır. Antirezorptif

tedavi gören osteoporotik hastalarda da telopeptidlerin üriner seviyelerinde belirgin azalma gözlenmiştir (48).

4) İdrar Hidroksiprolin Düzeyi

Kollajen dokuda bulunan ve aminoasit yapısında olan hidroksiprolin (OHP), kollajen yıkımı ile idrara geçer. Total vücut kollajenin yaklaşık yarısı kemikte olduğundan OHP atılımı bir kemik rezorbsiyon göstergesi olarak düşünülmüştür.

5) İdrarda Hidroksilizin Düzeyi

Hidroksilizin, kollajen yapısında bulunan bir aminoasittir. Kollajen yıkımı sırasında dolaşıma karışır ve idrarda ölçülebilir (49).

2.2.7 Osteoporoz Tedavisi

Osteoporoz, kemik yapımı ile yıkımı arasındaki dengenin, yıkım lehine artması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle tedavide, kemik yıkımını önleyen veya kemik yapımını artıran ilaçlar kullanılmaktadır.

1) Kalsiyum

Kalsiyum kemik sağlığı için yaşam boyu gerekli olan en önemli minerallerdendir. Kalsiyum alımı, doruk kemik kütlelerinin gelişmesinde, korunmasında ve yaşa bağlı kemik kaybının azaltılmasında önemlidir. Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (National Institutes of Health) yayınladığı klavuzda diyetle alınması önerilen günlük kalsiyum miktarı, hormon replasman tedavisi alan postmenapozal kadınlar için 1000 mg ve diğer postmenapozal kadınlar ve 65 yaş üzeri tüm bireyler için 1500 mg'dır (52).

2) D Vitamini

Kalsiyum homeostazının düzenleyicilerinden biri olan D vitamini, kalsiyum ve fosforun ince bağırsaktan emilimlerini sağlarken böbrekten atılımlarını da azaltır. D vitamini vücuda diyetle ya da güneş ışığına maruz kalma yolu ile alınmaktadır. Daha sonra sırasıyla karaciğerde 25hidroksi vitaminD [25(OH)D] ve böbrekte 1,25-dihidroksi vitaminD'ye hidroksilasyonu gerçekleşmektedir. Son yıllarda yayınlanan ve 18 ülkenin katıldığı bir çalışmada OP'li kadınların D vitamini yetersizliği araştırılmış. Bu çalışmada Türkiye'deki kadınların ortalama 25(OH) vitaminD değeri 21,8±1,0 ng/ml (normal değeri 30 ng/ml) olarak saptanmıştır. Bunun nedeni olarak risk faktörlerinden Asyalı olmak, vücut kütle indeksinin artmış olması, ekvator bölgesinin dışında yaşama, yeterli D vitamini alınmaması, D vitamini hakkında yeterli bilginin olmaması ve güneşten yeterince yararlanamamak suçlanmıştır. (53).

3) Kalsiyum ve Vitamin D Kombinasyonu

Kalsiyum ve vitamin D'nin kombinasyonu OP tedavisinin temelini teşkil etmektedir. Yapılan randomize kontrollü bir çalışmada, üç yıl boyunca, 1200 mg kalsiyum, 800 IU vitamin D verilen grupta yeni kalça kırık ve vertebra dışı kırık riskinin azaldığı gözlenmiştir (54). Sairinen ve arkadaşları, postmenapozal OP'u olan 55 hastaya 4 yıl boyunca 0,5 mcg kalsitriol ve 800 mg kalsiyum vermişler. Bu çalışmanın dördüncü yılında femur boynu KMY'de %3 artış, lomber omurga KMY'de %2,3 artış saptamışlar (55). OP'lu hastalarında günlük 1200-1500mg kalsiyum, 10-20µg (400-800 IU) vitamin D alınması önerilmektedir (56).

4) Kalsitonin

Vücutta tiroid hücrelerinden salgılanan kalsitonin, osteoklastların fonksiyonlarını doğrudan etkiler ve bu hücrelerin kemik remodeling alanında toplanmasını engeller (57). Kalsitoninin postmenopozal kadınlardaki vertebra kırıkları üzerindeki etkilerini inceleyen, 5 yıllık, plasebo kontrollü, randomize, çift-kör bir çalışmada 200 IU kalsitonin kullanan kadınlarda, yeni vertebra kırıklarının meydana gelme riskinin plaseboya göre %33 oranında azaldığı saptanmış (58).

5) Bisfosfonatlar

Bisfosfonatlar hidroksiapatit kristallerine bağlanarak ve osteoklastların fonksiyonlarını inhibe etmek suretiyle etki göstermektedirler. Osteoklastların apoptozunu arttırmak, asit üretimini ve lizozomal enzim üretimini azaltmak suretiyle etki göstermektedirler (57). Bisfosfonatlar, postmenapozal OP'lu hastalarda vertebral ve non-vertebral kırığı önlemede, erkek OP'unda ve glukokortikoide bağlı OP'nin tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. (59). Alendronat ile yapılan bir çalışmada vertebral kırık riskini %45, kalça kırık riskini %53, el bilekte kırık riskini %31 oranında azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışma sonucunda alendronatın semptomatik osteoporotik kırık riskini etkili bir şekilde azalttığı sonucuna varılmıştır (60). Risedronat ile yapılan bir çalışmada ise vertebra kırığı olan postmenopozal kadınlarda yeni kırık oluşumunu önlemede risedronatın yeni kırık riskini birinci yılda %60 ve üç yılın sonunda %45 azalttığı saptanmış (61).

6) Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri

Raloksifen ikinci kuşak bir selektif östrojen reseptör modülatörü olup, östrojen reseptörüne bağlanmaktadır. Delmas ve arkadaşları postmenopozal OP'li kadında raloksifenin etkilerini yayınlamıştır (62). Bu çalışmada raloksifenin kemik yıkımını azatlığını ve kemik mineral dansitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bunun yanında, serum total kolesterol, LDL

kolesterol, fibrinojen düzeylerinde belirgin azalmaya, fakat trigliserid ve HDL kolesterol düzeylerinde herhangi bir değişime neden olmadığı rapor edilmiştir.

7) Hormon Replasman Tedavisi

Geçmiş yıllarda östrojen yetersizliği olan kadınlarda HRT'nin birinci basamak tedavi olarak önerilmesi konusunda görüş birliği vardı (63). Ancak ilacın meme kanseri, tromboembolik hastalık ve inme riskinde artma gibi yan etkilerinden dolayı bu görüş günümüzde değişmiştir (64). Progesteron ile birlikte ya da progesteron olmaksızın uzun süreli östrojen kullanımı, sağlıklı postmenapozal kadınlarda profilaktik tedavi olarak verilebileceği görüşü benimsenmiştir.

8) Stronsiyum Ranelat

Stronsiyumun etki mekanizmasının çift yönlü olduğu ileri sürülmektedir. Preosteoblastların osteoblastlara dönüşümü ve osteoblast aktivitesini artırarak kemik yapımını stimüle ederken aynı zamanda osteoklast oluşumunu ve aktivitesini azaltarak kemik yıkımını baskılamaktadır (65). Stronsiyum ile yapılan çalışmada, üç yılın sonunda yeni vertebral kırık riskinde %41, major periferik kırık riskinde %35, kalça kırığı riskinde ise %41 azalma bulunmuştur. KMY'da ise lomber vertebrada %14, femurda %8.3 artış sağlanmıştır (66).

9) Paratiroid hormon (PTH)

Paratiroid hormonun (PTH) aşırı salgılanması ve sürekli intravenöz infüzyonu kemik rezorpsiyonunda artma ve kemik kaybına yol açmaktadır. Kurland ve arkadaşlarının, çift kör, plasebo kontrollü çalışmalarında, 18 ay süreyle intermitan PTH tedavisi alan OP hastalarında, lomber vertebra kemik kütlelerinde %13,5, femur boynunda ise %2,9 artış saptamışlardır (67).

10) Florid

Florid, kemik formasyonunun potent stimülatörüdür. Florid verilen hastaların spinal KMY değerlerinde artış sağlanmasına rağmen, vertebral kırık insidansını azalttığına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle postmenapozal OP tedavisinde vertebral ve non-vertebral kırıkları önlemede etkili olmadığı kabul edilmektedir.

11) Büyüme hormonu ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

Büyüme hormonu (GH) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), kemik kütlelerinde artış sağlayan potansiyel anabolik ajanlar olarak kullanılmaktadır. IGF-1, osteoblastların farklılaşmasında ve longitudinal kemik büyümesinde etkilidir. Rubin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada IGF-1'in doza ve süreye bağlı olarak OPG ve RANKL üzerinden kemik metabolizmasını etkilediğini ortaya koymuşlardır (68). Bu çalışma sonunda

IGF-1'in hem kemik yapımını hem de RANKL/OPG kompleksiyle kemik yıkımını arttırdığı sonucuna varılmıştır.

12) Denosumab

Denosumab, RANKL'a yüksek afinite ile bağlanan insan monoklonal antikorudur. Osteoprotogerinin anti-osteoklastik etkisine benzer olarak, RANKL ile RANK etkileşimini bloke etmektedir. Osteoporozu olan 412 postmenapozal kadının yer aldığı bir çalışmada 12 aylık denosumab tedavisi sonrasında, lomber omurga, total kalça ve distal radius kemik mineral dansitelerinde anlamlı artış saptanırken kemik yıkımının biyokimyasal belirteçlerinde doza bağımlı azalma gözlenmiş. Bu çalışma sonunda denosumabın OP'a bağlı fraktürleri önlemede etkili olabileceği vurgulanmıştır (69).

2.3 Oksidatif Stres, Antioksidan Enzimler ve Nitrik Oksit

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Yapısında çiftlenmemiş elektron bulunduran ve başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren moleküllere "oksidan moleküller" veya "serbest oksijen radikalleri" (SOR) denmektedir. Serbest oksijen radikallerinin ortamda artması ve antioksidan enzimlerin azalması sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir (70).

Aerobik organizmalarda, aerobik solunum ve substratların oksidasyonu sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri, antioksidan enzim sistemleri ile detoksifiye edilirler. Hidroksil radikaller, süperoksid radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest oksijen radikalleri, aerobik organizmalarda iç ve dış stimuluslara bağlı olarak üretilirler. Serbest oksijen radikallerinin düşük konsantrasyonları, hücre farklılaşmasında, apoptoziste ve bağışıklık sisteminde rol almakta ayrıca antibakteriyel etkisi de bulunmaktadır (70). Serbest oksijen radikallerinin yüksek konsantrasyonları ya da yetersiz inaktivasyonu durumunda biyolojik makromoleküllerin (protein, karbonhidrat, lipid ve nükleik asit) hasarına yol açan oksidatif strese neden olurlar. Serbest radikallerin hücre bileşenlerine etkileri tablo XII'de gösterilmiştir (71).

Tablo XII: Serbest Radikallerin Hücre Bileşenlerine Etkileri

-
- Hücre organelleri ve membranlarındaki lipid ve proteinlerin yapısında bozulma
 - Lipid peroksidasyonu
 - Mitokondri aerobik solunumda bozulma
 - DNA yapısında bozulma
 - Litik enzimlerin (elastaz, proteaz, fosfolipaz, ksantin oksidaz gibi) aktivasyonu
 - Hücre zar yapı ve fonksiyonlarında değişiklik
 - Kapiller permeabilitede bozulma
 - Protein denatürasyonu
-

Vücutta, serbest radikal üretimi ile serbest oksijen radikallerindeki artışı baskılayan antioksidan enzimler arasında bir denge mevcuttur. Oksidatif hasar, bu dengenin bozulduğu durumda ortaya çıkmaktadır. Fazla miktarda oluşan serbest radikaller, membran lipidlerindeki yağ asitlerine zarar vererek lipid peroksidasyon ürünleri olan malondialdehid (MDA), 4-hidroksinoneal gibi moleküllerin oluşmasına neden olur (72). Oksijenle yaşayan canlılar, aşırı reaktif oksijen ürünlerine karşı korunma amacıyla antioksidan savunma sistemi geliştirmişlerdir. Antioksidanların etkileri dört ana başlıkta toplanabilir:

- a. Serbest oksijen radikallerinin çeşitli reaksiyonlar aracılığıyla veya direkt olarak inaktive edilmesi
- b. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunun inhibe edilmesi
- c. Metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşumunun engellenmesi
- d. Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesi

Katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimler, artan oksidatif strese karşı savaşan hücre içi antioksidan savunma enzimlerindedir. Çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan süperoksit anyonu ve hidrojen peroksiti elimine eder ve bu serbest radikallerin oluşmasına neden olan reaksiyonları inhibe ederler (70).

Hidrojen peroksit, katalaz enziminin katalizörlüğünde su ve oksijen moleküllerine dönüştürülür veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimi ile glutatyon molekülü ile etkileşime girerek su molekülüne dönüşür. Bu reaksiyonda glutatyon, okside hale dönüşmekte ve glutatyon redüktaz (GR) enzimi ile indirgenir. Glutatyon redüktaz, glutatyonun biyolojik açıdan önemli olan indirgenmiş formda kalmasını sağlamakta ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu etki göstermektedir. Fazla miktarda oluşan oksidan moleküller, hücre ya da kapiller

membrandaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olurlar. Artan lipid peroksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler, eritrosit membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. İn vitro koşullarda, eritrositlerin MDA ile muamele edilmesinin, regülasyon yeteneğinde ve yaşam süresinde azalmaya yol açtığı gözlemlenmiş ve oksidatif stres sonucu eritrosit yaşlanmasında rolü olabileceği bildirilmiştir (73).

Nitrik oksit (NO), membranları kolayca geçebilme özelliği olan oldukça lipofilik bir moleküldür. Nitrik oksit sentezleyen enzimlerin (nitrik oksit sentaz, NOS) katalize ettiği reaksiyon ile oluşmaktadır. Nitrik oksit sentezleyen enzimin üç farklı izoformu vardır. Bu izoenzimlere özgü genler kromozom 7 (endotelyal NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur. i-NOS başlıca IL-1, TNF- α , interferon- γ (IFN γ) ve endotoksin tarafından aktive edilirken glukokortikoidler ve IL-4, IL-10 ve TGF- β ile inhibe edilir (74).

Nitrik oksit kardiyovasküler, nörolojik, immünolojik ve diğer pek çok sistemde farklı rolleri olan biyolojik bir düzenleyicidir. Nitrik oksit vazodilatasyon, nörotransmisyon, trombosit agregasyonu, inflamasyon gibi birçok fizyolojik süreçte rolü olmakla birlikte östrojen ve çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin kemik metabolizmasındaki etkilerini de düzenlediği tespit edilmiştir (75). Ayrıca mikroorganizmaların, mitokondrial proteine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip DNA sentezini bozarak savunma sisteminde de rol oynar. Nitrik oksidin süperoksitle reaksiyonu sonunda peroksinitrit ve hidroksil radikali oluşur ki bunlar oldukça güçlü doku hasarına yol açan bir maddelerdir. Bu moleküllerin sitotoksik ve oksidatif özellikleri mevcut olup nitrik oksitin inflamatuvar etkilerinden sorumludur. Bu oksidan özelliği nedeniyle bakterisidal ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterirler. Güçlü bir oksidan madde olan peroksinitrit, glutatyon ve glutatyon redüktaz enzimleri katalizörlüğünde toksik olmayan moleküllere indirgenmektedir (76).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Osteoporoz Polikliniğine Ağustos 2007 ile Ekim 2007 tarihleri arasında başvuran, sistemik hastalığı, kronik ilaç kullanım öyküsü olmayan, sigara, alkol kullanmayan ve ilk kez DEXA taraması yaptıran 87 postmenapozal kadın hasta çalışmaya dahil edildi. Araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınmış olup ayrıca tüm katılımcıların yazılı onayları da alınmıştır.

DEXA sonuçlarına göre lomber vertebra veya kalça total T skoru $-2,5'$ in altında olup OP tanısı alan ve öncesinde tedavisi almamış olanlar çalışma grubunu; OP tanısı almamış kadın hastalar ise normal sağlıklı kontrol grubunu oluşturdu. Çalışma grubu 45, kontrol grubu ise 42 kişiden oluşmaktaydı.

Sistemik hastalık hikayesi ve buna bağlı kronik ilaç kullanımı olanlar, glukoz ve lipid metabolizmasına ait anormallikleri olan ve bu amaçla ilaç kullananlar, kanser hastaları, sigara ve alkol kullananlar, cerrahi menapozu girenler ve yazılı onay vermek istemeyen hastalar çalışma dışında tutuldu. Her iki gruptaki katılımcıların yaşı, menopoz yaşı ve DEXA sonuçları kayıt edildi.

Çalışma Örneklerinin Alınması ve Ön İşlemler

Hastalardan sabah aç karnına olmak üzere EDTA'lı, sodyum sitratlı ve düz tüplere kan alındı. Düz tüpe alınan kan 3000 rpm'de 10 dakika $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildikten sonra serum MDA, NO, RANKL ölçümleri için $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. EDTA'lı tüpe alınan kandan GSH ve sodyum sitratlı tüpe alınan kandan GR ölçümleri yapıldı.

1. Oksidan-Antioksidan Durumun Saptanması:

- a) **Nitrik oksit metaboliti tayini:** NO'in parçalanma ürünlerinden olan nitrat'ın düzeyini saptamak amacıyla Navarro-Gonzalves ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntem kullanıldı (77). Standartlar sodyum nitrit (NaNO_2 , SIGMA, katalog numarası S-3421) kullanılarak hazırlandı. Örnekler ve standartlar ELISA mikropate reader'de 540 nm'de okutuldu.
- b) **Serum Malondialdehid düzeyi ölçümü:** Yoshioka ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre yapıldı (78). Örnekler ve standartlar Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 532 nm'de okundu.
- c) **Glutatyon tayini:** Fairbanks ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre yapıldı (79). GSH düzeyleri DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asid)] ile renklendirme

esasına dayanan yöntem ile çalışıldı. GSH madde miktarı bu sarı bileşiğin 412 nm dalga boyunda optik dansitesi saptanarak değerlendirildi.

- d) **Katalaz aktivitesi tayini:** Hugo Aebi'nin tarif ettiği yöntemle göre yapıldı (80). Tampon ile dilüe edilmiş örneğe, H₂O₂'li tamponun eklenmesi ile başlayan absorptans değişimi Shimadzu UV-160 A spektrofotometrede 240 nm'de izlenip, 15 saniyedeki absorptans değişimi saptanarak formüle göre hesaplama yapıldı.
- e) **Glutatyon Redüktaz Tayini:** Carlberg ve Mannervik'in tarif ettiği yöntemle göre yapıldı (81). Shimadzu UV 160 A spektrofotometrede 340 nm'de 1. ve 3 dakikalar arasındaki sürede absorptans değişimi izlenerek örneklerin GR aktivitesi hesaplandı.
2. **RANKL Düzeyinin Saptanması:** ELISA kit (BIOMEDICA, BI.20422H) kullanılarak serum RANKL düzeyi ölçüldü. Absorptanslar ELISA mikropate okuyucuda okutuldu.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde "SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 14,0" programı kullanıldı. Katılımcıların demografik bilgileri, biyokimyasal parametreleri ve KMY ölçümlerinin ortalamaları standart sapma olarak verildi. İki bağımsız grubun ortalamaları arasındaki farklılığı saptamak için student- t testi yapıldı. İki değişken arasında ilişki olup olmadığını belirlemek için ise pearson korelasyon testi kullanıldı. Anlamlılık P<0,05 düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Hasta ve kontrol gruplarının yaş ortalamaları sırasıyla 55,6 (SS=2,9) yıl ile 56,6 (SS=2,4) yıl iken menapoz yaşları sırasıyla 48,7 (SS=1,3) yıl ile 49,1 (SS=1,5) yıl idi. Her iki grubun yaş ve menapoz yaş ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Her iki grubun demografik verileri ve DEXA sonuçları tablo XIII' te gösterilmiştir.

Tablo XIII: Her iki grubun demografik verileri ve DEXA parametreleri

	Kontrol (n=42)	Hasta (n=45)	P
Yaş (SS)	56,6 (2,4)	55,6 (2,9)	0,087
Menapoz yaşı (SS)	49,1 (1,5)	48,7 (1,3)	0,131
Menapoz süresi (SS)	7,5 (2,3)	6,8 (2,8)	0,280
VKİ (SS)	27,8 (1,6)	27,4 (1,7)	0,266
Lomber 1-4 T skoru	-0,49 (0,9)	-2,92 (0,2)	<0,001*
Femur total T skoru	-0,33 (0,8)	-1,9 (0,5)	<0,001*
Lomber 1-4 KMY (g/cm²)	0,83 (0,1)	0,73 (0,1)	<0,001*
Femur total KMY (g/cm²)	0,83 (0,1)	0,74 (0,1)	<0,001*

Student-t testi, * = istatistiksel olarak anlamlı, VKİ= Vücut Kütle İndeksi

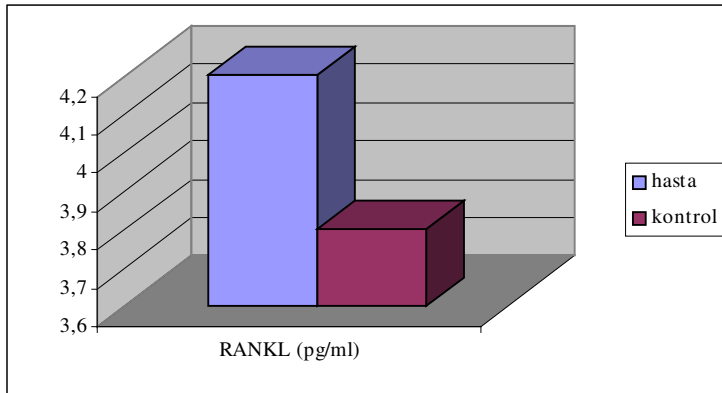
Hasta ve kontrol gruplarının serum RANKL ve antioksidan enzim sonuçları tablo XIV'te gösterilmiştir.

Tablo XIV: Her iki grupta biyokimyasal parametre ortalamalarının karşılaştırılması

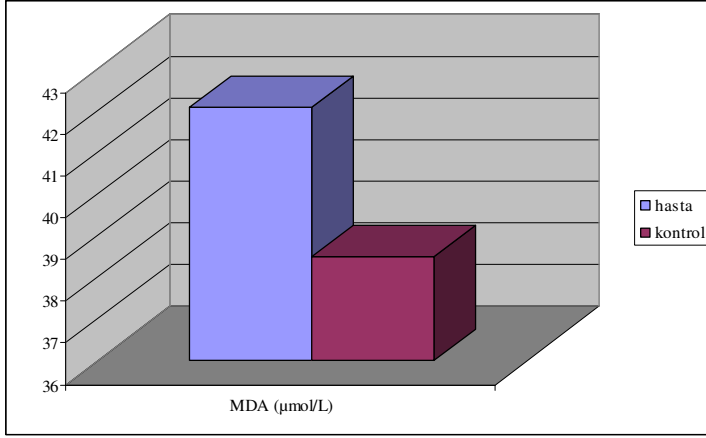
	Kontrol (n=42)	Hasta (n=45)	P
RANKL (pg/ml)	3,8 (0,7)	4,2 (0,4)	0,003*
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	4,2 (0,8)	4,8 (0,8)	0,003*
NO ($\mu\text{mol/L}$)	38,5 (5,7)	42,1 (6,2)	0,007*
GSH (mg/gHb)	3,1 (0,9)	2,9 (0,9)	0,257
GR ($\mu\text{mol/dk/gHb}$)	13,6 (3,8)	11,3 (3,8)	0,004*
CAT (k/gHb)	723,5 (164,3)	682,1 (107,5)	0,166

Student-t testi, * = istatistiksel olarak anlamlı

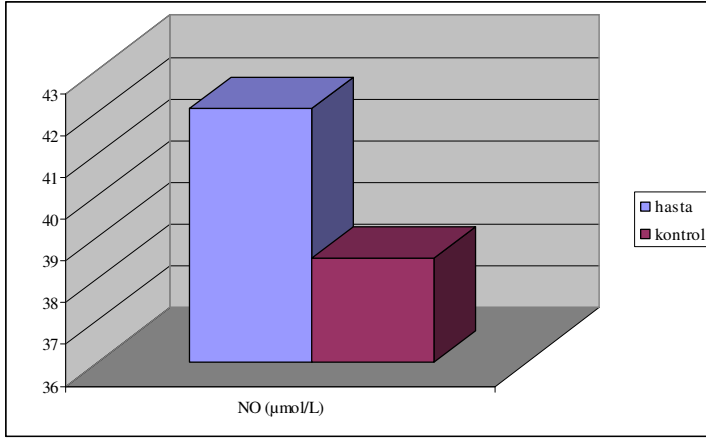
Osteoporoz grubunda, serum RANKL düzeyindeki artış ($P=0,003$), lipid peroksidasyonu son ürünü olan serum MDA düzeyindeki artış ($P=0,003$) ve serum NO düzeyindeki artış ($P=0,007$) ile serum GR düzeyindeki azalma ($P=0,004$) kontrol grubuna göre anlamlı bulundu. (Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6 ve Şekil 7)



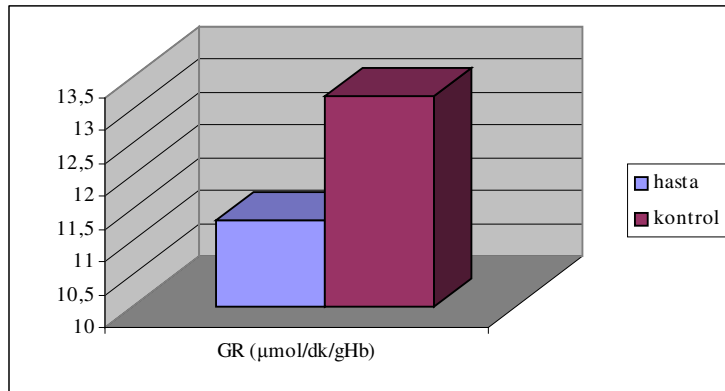
Şekil 4: Her iki grupta serum RANKL düzeyi



Şekil 5: Her iki grupta serum malondialdehid düzeyi



Şekil 6: Her iki grupta serum nitrik oksit düzeyi



Şekil 7: Her iki grupta serum glutatyon redüktaz düzeyi

Serum GSH düzeyindeki azalma (P=0,257) ve serum CAT düzeyindeki azalma (P=0,166) ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Osteoporoz hastalarının yaş, menapoz yaşı, vücut kütle indeksleri ve kemik dansitometri sonuçlarının, RANKL ve antioksidan enzim sonuçları ile ilişkisi tablo XV'te gösterilmiştir.

Tablo XV: Osteoporoz hastalarında yaş, menapoz yaşı, menapoz süresi, vücut kütle indeksi ve DEXA ortalamalarının RANKL ve diğer biyokimyasal parametrelerle ilişkisi

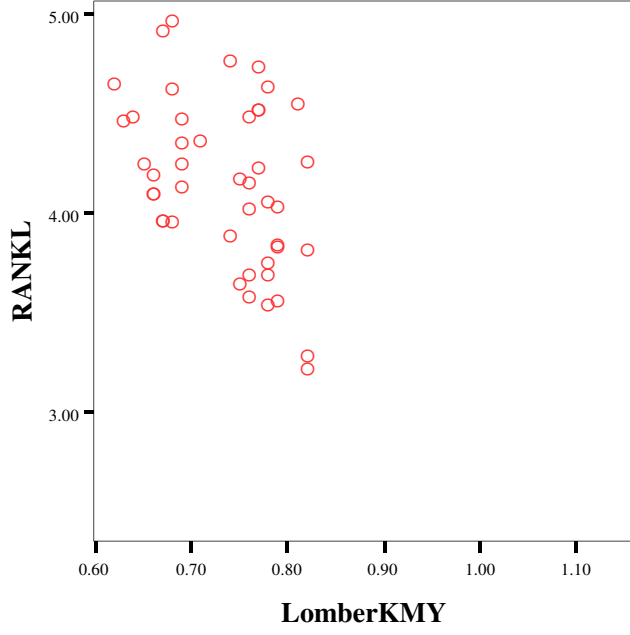
		RANKL	MDA	CAT	NO	GSH	GR
Yaş	r	0,234	0,135	-0,010	0,075	-0,081	0,142
	P	0,122	0,378	0,950	0,623	0,597	0,351
Menapoz yaşı	r	0,187	-0,060	0,016	0,071	-0,083	0,228
	P	0,219	0,695	0,915	0,644	0,588	0,132
Menapoz süresi	r	0,162	0,171	-0,018	0,051	-0,036	0,041
	P	0,287	0,261	0,904	0,737	0,812	0,788
VKİ	r	-0,128	0,006	0,049	0,130	-0,011	-0,132
	P	0,403	0,968	0,749	0,394	0,943	0,386
Lomber 1-L4 T skoru	r	-0,411	-0,305	0,343	0,092	-0,212	-0,183
	P	0,005**	0,041*	0,021*	0,546	0,162	0,230
Femur total T skoru	r	-0,319	-0,272	0,208	-0,040	-0,272	-0,019
	P	0,033*	0,071	0,170	0,795	0,071	0,902
Lomber 1-L4 KMY (g/cm²)	r	-0,446	-0,271	0,147	0,033	0,050	0,011
	P	0,002**	0,072	0,336	0,830	0,744	0,941
Femur total KMY (g/cm²)	r	-0,322	-0,464	0,181	-0,071	-0,289	-0,055
	P	0,031*	0,001**	0,234	0,645	0,054	0,721

r = Pearson korelasyon katsayısı

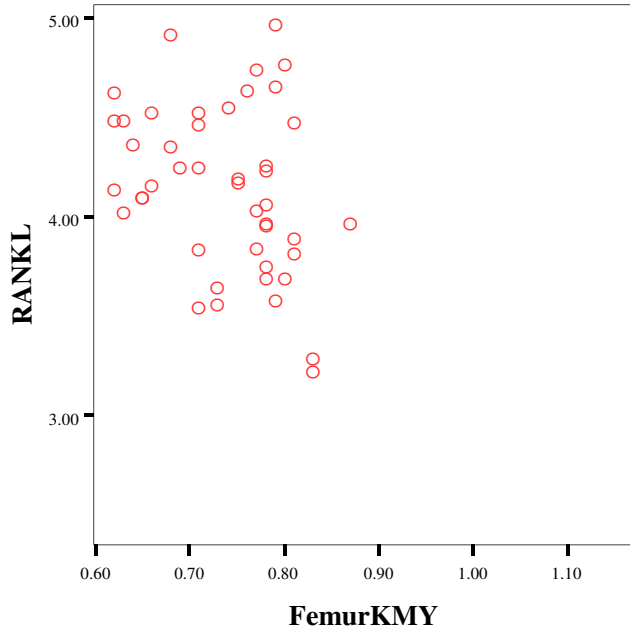
** : P<0,01

* : P<0,05

Bu sonuçlara göre, hasta grubunda serum RANKL düzeyinin, hem lomber hem de femur total T skoru ve total KMY ile negatif anlamlı ilişki gösterdiğini saptadık. Sonuçlar Şekil 8 ve Şekil 9'da gösterilmiştir.



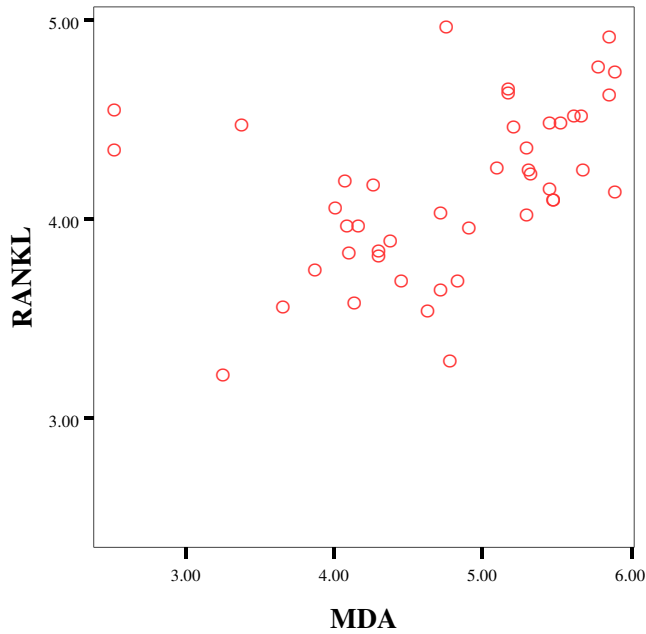
Şekil 8: Serum RANKL düzeyinin lomber KMY ile ilişkisi



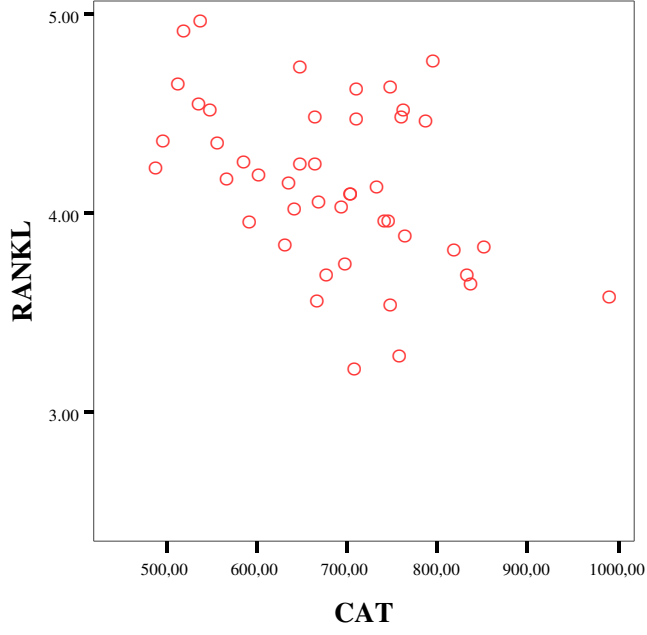
Şekil 9: Serum RANKL düzeyinin femur KMY ile ilişkisi

Yine serum MDA değerlerinin lomber total T skoru ve femur total KMY ile anlamlı ilişki gösterdiğini saptadık. Serum nitrik oksit düzeyi de lomber 1-4 KMY (P=0,795) ve femur total KMY (P=0,645) ile negatif ilişki gösteriyordu ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Serum RANKL düzeyi ve antioksidan enzimlerin, hasta yaşı, menapoz yaşı ve menapoz süreleri açısından ilişki saptanmadı.

Osteoporoz hastalarında serum RANKL düzeyinin serum MDA düzeyi ile anlamlı pozitif (Şekil 10), serum CAT düzeyi ile anlamlı negatif ilişki (Şekil 11) gösterdiğini saptadık. Bununla birlikte serum RANKL düzeyi ile serum NO düzeyi ($r=-0,239$, $P=0,114$), GSH düzeyi ($r=-0,065$, $P=0,670$) ve GR düzeyi ($r=-0,175$, $P=0,251$) arasında bir ilişki saptanmadı.



Şekil 10: Serum RANKL düzeyinin serum MDA ile ilişkisi (P=0.005)



Şekil 11: Serum RANKL düzeyinin serum CAT aktivitesi ile ilişkisi (P=0.002)

5. TARTIŞMA

Osteoporoz, kemiğin kütlesinde azalma, mikromimari yapısında bozulma sonucu kırılabilirliğinde artış ile karakterize bir kemik hastalığıdır. Yaygın morbidite ve hatta mortalite nedeni olmasından dolayı önemli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilmektedir. Bu denli yaygın ve ciddi sonuçlara yol açabilen bu hastalığın, erken tanı ve tedavisi ancak etyopatogenezinin iyi anlaşılması ile mümkün olacaktır. Bu bağlamda OP'un etiyopatogenezine yönelik çalışmalara sıklıkla rastlanılmaktadır.

Günümüzde yapılan çalışmalarda, oksidatif stresin ateroskleroz, serebrovasküler hastalık, diyabetes mellitus gibi birçok sistemik hastalığın patogenezinde rol oynadığı ortaya konmuştur. Dinamik bir doku olan kemiğin yaşam boyunca devam eden yapım ve yıkım sürecinin, oksidatif stres artışından ve/veya antioksidan enzimlerin yetersizliğinden etkilendiğine yönelik çalışmalara literatürde rastlanmaktadır. Osteoporoz patogenezinde, oksidatif stresin antioksidan enzimler ile karşılanamaması ve kemik yıkımında etkili kompleks süreçlerin bu dengesizlikten etkilendiğine yönelik sonuçlar yeni araştırma konularını beraberinde getirmektedir.

Yapılan çalışmalarda OP'lu hastalarda, antioksidan enzim düzey ve aktivitelerindeki azalmadan dolayı, serbest radikal oluşumunun antioksidan enzimler ile karşılanamadığı ve lipid peroksidasyonunun şiddeti ile kemik mineral dansitesi arasında negatif ilişki olduğu gösterilmiştir. Basu ve arkadaşları (82) OP'lu hastalarda oksidatif stresin ve lipid peroksidasyonunun nonenzimatik göstergesi olan idrar 8-iso-PGF2 α düzeyini ölçerek lipid peroksidasyonunun şiddetini araştırmışlar. Bu çalışma sonucunda oksidatif stresin artması ile KMY'da azalma arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Sontakke ve Tare (83) kontrol grubuna göre postmenapozal OP'lu kadın hastalarda, serum MDA düzeylerinin arttığını, SOD ve GSH-Px düzeylerinin ise azaldığını saptamışlar ve kemik metabolizması üzerinde serbest oksijen radikallerinin potansiyel rolü olduğunu iddia etmişlerdir. Maggio ve arkadaşları (84) OP hastalarında, plazma antioksidan enzim düzeyleri ile KMY arasındaki ilişkiyi araştırmışlar. Araştırmacılar plazma vitamin A, C, E ve MDA düzeylerini, eritrosit ve plazma süperoksit dismutaz ile plazma glutatyon peroksidaz aktivitelerini araştırmışlar. Osteoporozu olan grupta vitamin düzeylerinde, SOD ve GSH-Px aktivitelerinde anlamlı azalma, plazma MDA düzeylerinin ise aynı düzeyde olduğunu saptamışlar. Aynı zamanda OP olan hasta grubunda vitamin A, C ve GSH-Px düzeylerinin, femur boyun KMY ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Yapılan çalışmaların bu sonuçlarına karşın Wolf ve arkadaşlarının (85) yaptığı kohort çalışmada, serum antioksidan düzeyleri ile KMY arasında herhangi bir ilişki

bulunmamıştır. Ayrıca antioksidan enzimlerin diyetle ya da ilaç olarak alınmasının kemik mineral yoğunluğunu etkilemediği sonucuna varılmış. Yakın zamanda Özgöçmen ve arkadaşlarının (86) yaptığı bir çalışmada, OP'u olan kadın hastalarda, OP'u olmayanlara göre plazma ve eritrosit MDA ve NO seviyelerinin artmış olduğu; eritrosit katalaz ve GSH-Px aktivitesinin ise azalmış olduğu saptanmış. Bu çalışmanın sonucunda oksidatif stresin postmenapozal kemik kaybında rolü olabileceği ve OP tedavisinde kullanılan ilaçların da oksidatif stresi azaltıcı yönde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Oksidatif stresin, osteoklast farklılaşması ve fonksiyonları üzerindeki rolü araştırılmış. Bu konuda Lean ve arkadaşları (87) rodentlerde overiektomi sonrasında glutasyon ve tioredoksin seviyelerinde azalma olduğunu ortaya koymuşlardır. Tek doz 17- β östrodiol ve antioksidan (N-asetil sistein, askorbat) verilmesi ile glutasyon ve tioredoksin seviyeleri normal düzeylerine ulaştıklarını göstermişlerdir. Yine aynı çalışmada, RANKL ve TNF- α aktivasyonunun baskılanması ile osteoklast oluşumunun sınırlanabileceği, 17- β -östradiol ilave edilmesinin ise overiektomiye bağlı kemik kaybına karşı koruyucu etkisi olduğu ileri sürmüştür. Bai ve arkadaşları ise (88) RANKL'in salınımında serbest oksijen radikallerinin rolünü araştırmışlar. Serbest oksijen radikallerinin RANKL salınımını stimüle ettiği ve osteoklastogenezde önemli stimulan etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmalara paralel olarak, Mthusami ve arkadaşları (89) overiektomize edilmiş ratlarda lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit düzeyinin arttığını; SOD, GSH-Px ve glutasyon-S transferaz gibi enzimatik antioksidanların düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonunda hidrojen peroksidin osteoklast farklılaşmasında önemli rolü olduğunu iddia etmişlerdir. Jagger ve arkadaşlarının (90) yaptığı çalışmada, önceki sonuçlara benzer olarak, östrojen eksikliğinin thiol antioksidan enzim düzeyini azalttığını ve kemik erimesinde önemli rol oynayan TNF- α salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Bunlara ilave olarak, osteoklast farklılaşmasında serbest oksijen radikallerinin RANK regülasyonu ile etki gösterdiğine yönelik yapılan bir çalışmada, α -lipoik asitin kemik erozyonu ile seyreden hastalıklarda tedavi edici etkisi olduğu ortaya konmuştur (91). Sheweita ve arkadaşları (92) önceki çalışmaların sonuçlarına paralel olarak, oksidan stresin kemik döngüsünde kalsiyum metabolizmasına etkisini araştırmışlar. Süperoksit dismutaz ve glutasyon redüktaz gibi antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmanın, osteoklastlardaki artmış serbest oksijen radikali üretimine bağlı olduğunu ve serum MDA düzeyinin artışının bunu yansıttığını belirtilmişlerdir. Bu çalışma sonunda serum MDA düzeyinin, lipid peroksidasyonunun son ürünü olmakla birlikte osteoklast aktivitesini de yansıtan bir biyokimyasal belirteç olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Tüm bu çalışmalar bizim sonuçlarımız ile hemen hemen uyumludur. Osteoporoz hastalarında serum MDA ve RANKL düzeylerindeki anlamlı artma ile glutatyon redüktazın anlamlı azalması, OP patogenezinde oksidan stresin varlığını desteklemektedir. Bu bilgilerin ışığında, oksidan stres ile antioksidan enzim dengesizliğinin OP patogenezinde kemik kaybına neden olabileceği ve antioksidan takviyesinin kemik kaybını azaltmada etkili olabileceği düşünülebilir.

Literatürdeki çalışmalarda, NO'nun kemik metabolizmasında önemli düzenleyici rolü olduğu ortaya konmakla birlikte bu konuda çelişkili sonuçlar ve farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. Proinflamatuvar sitokinlerin artışı halinde ve mekanik stres durumlarında, kemik hücrelerinde nitrik oksit üretiminin arttığı gösterilmiştir. Nitrik oksit, serbest oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek veya oksijenli ortamlarda oksitlenerek, kendisinden çok daha reaktif türlerin oluşumuna neden olmaktadır.

Nitrik oksidin osteoklastik kemik rezorpsiyonu üzerinde bifazik etkisi bulunmaktadır. Ralston ve arkadaşlarının yaptığı in vivo çalışmada, düşük konsantrasyonda nitrik oksitin, IL-1 aracılı kemik rezorpsiyonunu arttırdığını ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte iNOS yolağı aktivasyonunun IL-1 aracılı kemik rezorpsiyonu için önemli olduğu ve NOS inhibitörlerinin bu mekanizma üzerinden etki gösterdiği gözlenmiştir (93). Nitrik oksitin yüksek konsantrasyonları ise osteoklast matürasyonunu ve aktivitesini inhibe etmektedir. Hücre ve organ kültürlerinde yapılan deneysel çalışmalarda, IL-1 ve/veya TNF- α ile kombine edilmiş IFN γ 'nın güçlü bir şekilde iNOS salınımını artırarak artmış NO'ya bağlı kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (94). Nitrik oksitin osteoblast üzerinde de bifazik etkisi olduğu gözlenmiştir. Yapılan in vitro çalışmalarda osteoblastlarda üretilen nitrik oksitin düşük konsantrasyonlarının hücrenin matürasyonu ve sitokin üretimini arttırdığı gözlenmiştir (95). Bununla birlikte nitrik oksitin osteoblast fonksiyonları üzerinde ekili olmadığı gibi yüksek konsantrasyonlarının inhibitör etki gösterdiği de iddia edilmiştir (96). Wimalawansa ve arkadaşları (97) overiektomize ratlarda NOS inhibitörlerinin, östrojenlerin kemik üzerindeki koruyucu etkilerini ortadan kaldırdığını, nitro-gliserin verilmesi ile bu etkinin azaldığını gözlemlemişler. Östrojenlerin endotel hücrelerinde ve osteoblastlarda eNOS aktivitesini ve mRNA seviyelerini arttırması, seks hormonlarının kemik dokusunda bu yol üzerinden etkili olduğunu göstermektedir (98). Ayrıca Armour ve arkadaşları (99) eNOS bloke edilmiş farelerde östrojenlerin kemik yapımındaki etkilerinin azaldığını ortaya koymuşlardır. Bu bilgiler, östrojenlerin kemik üzerindeki hem rezorptif hemde anabolik etkilerinin nitrik oksit aracılığı ile olduğunu göstermektedir. iNOS blokajı yapılan osteoklast öncü hücrelerinde IL-1'e RANK aktivasyonunun olduğunu ama bunun geçici bir yanıt olduğu

gözlenmiş (100). Bu da osteoklast prekürsörlerinin RANK aktivasyonunda nitrik oksitin önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca Van't Hof ve arkadaşları (101) nNOS' un bloke edildiği farelerde kemik kütlelerinin arttığını ve kemik döngüsünün azaldığını bildirmişlerdir. Buna göre nNOS izoformlarının kemik kütlelerinin ve kemik regülasyonunda önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır. Benzer olarak Caballero ve arkadaşları (102) OP' olan kadın hastaların iliak biyopsi ve femur boyun (postmortem femur boyun biyopsi) kemik biyopsilerinde nNOS ve eNOS izoformlarının düzeylerinin arttığı ve nNOS yüzdesinin ise artmış olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara zıt olarak Baecker ve arkadaşları (103) NO'nun kemik yıkımını ya da yapımını etkilemediğini ortaya koymuşlardır. Nitrik oksitin osteoklast aktivitesini inhibe etmesinde katepsin K modifikasyonunun rolü olduğu düşünülmektedir. Ayrıca proinflamavuar sitokinlerin stimülasyonu sonucu artmış NO'nun, osteoblastların matürasyonunu inhibe ettiği, bu etkilerinin, osteoblastların pro-apoptotik etkilerini arttırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (83).

Bizim çalışmamızın sonuçları da bu mekanizmaları desteklemektedir. Çalışmamızda NO düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Bu sebeple NO düzeyi artışının OP hastalarında yıkım belirteci olarak kullanılabileceği düşünülebilir. Bu konuda yapılacak daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda RANKL düzeyi ile antioksidan enzim düzeyleri arasında anlamlı ilişki saptandı. Bu konuda literatürde benzer bir çalışmaya rastlamadık. Bu konuyu aydınlatmak bağlamında yapılacak başka çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Yapılan çalışmalara ve kendi çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak hücre içi antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ile serum RANKL düzeyindeki artışın OP'da görülen kemik kaybı ile ilişkili olabileceğini düşünebiliriz. Ayrıca NO'nun belki de RANKL'ın içinde olduğu kompleks mekanizmalar ile kemik kaybında rolü olabileceği sonucuna varabiliriz. Sonuç olarak, OP hastalarında antioksidan enzim düzeyleri ve RANKL düzeyi oldukça önemlidir. İleri yıllardaki OP tedavisinde bu enzimleri etkileyen tedavi protokolü geliştirilebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Osteoporoz, kemik gücünü azaltan ve kırık riskini arttıran bir iskelet hastalığı olup önemli oranda morbidite ve mortalite sebebidir. Bu bağlamda önemli bir halk sağlığı problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın etyopatogenezinin aydınlatılması bu açıdan büyük bir önem taşımaktadır. Biyolojik olarak aktif bir doku olan kemiğin, birçok sistemik ve lokal faktörlerin etkisi altında, hayat boyunca devam eden bir yapılanma süreci sözkonusudur. Fizyolojik şartlarda, serbest radikaller osteoklastları uyarmak suretiyle kalsifiye dokuların yıkımını hızlandırmakta ve kemik döngüsünün idamesinde rol oynamaktadırlar. Osteoklast aktivitesinin anormal arttığı bir hastalık olan OP'da, serbest oksijen radikallerinin kemik yıkımında rolü olan RANKL üzerinden etki gösterebileceği sonucuna vardık. Bu bağlamda OP hastalarında antioksidanların takviyesinin OP'a karşı koruyucu etki gösterebileceği düşünülebilir.

Kemik metabolizmasında düzenleyici bir etkiye sahip olan RANKL'ın OP patogenezinde temel bir rol oynadığı bilinmektedir. RANKL'ın ekspresyonu birçok sitokin ve hormon tarafından düzenlenmekte ve osteoklastların farklılaşması ve fonksiyonları için belirleyici olmaktadır. Bu düzenleyici yol, kemik rezorpsiyonu üzerinden etki gösterecek tedavi ajanları için yeni bir hedef teşkil etmektedir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular neticesinde, OP patogenezinde oksidan stres artışı ile antioksidan enzim yetersizliğinin kemik kaybında rolü olduğu ve ayrıca kemik döngüsü üzerinde bifazik etkisi olan NO'nun bu kompleks mekanizmalardan etkilenebileceği sonucuna vardık. RANKL'ın antikor ya da OPG ile blokajı veya antioksidan ilaçlar ile RANKL ve nitrik oksitin baskılanması, bize OP'un gelecekteki tedavi seçenekleri konusunda yol göstermektedir.

Sonuç olarak; önemli bir halk sağlığı sorunu olan OP'un, tanısının erken konulabilmesi, etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ve oluşabilecek kırıkların etkili bir biçimde önlenmesi hastalığın morbiditesi üzerinde büyük etkide bulunacak ve daha düşük ölçüde de olsa mortaliteyi azaltacaktır. Bu amaçla, OP hastalığı patogenezinin daha iyi anlaşılabilmesi önem taşımaktadır.

7. TÜRKÇE ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada, antioksidan enzim ve nitrik oksit seviyelerinin postmenapozal OP patogenezindeki rolleri ile bu enzimlerin RANKL ve kemik mineral yoğunluğu ile ilişkilerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM: Çalışmaya OP'u olan 45 postmenapozal kadın ile OP'u olmayan 42 postmenapozal sağlıklı kadın alındı. Çalışma grubundaki hastalar daha önce OP tanısı almamış ya da tedavi görmemiş kişiler arasından seçildi. Öncesinde OP tanısı almış ya da metabolik kemik hastalığı nedeni ile tedavi almış olanlar, kırık öyküsü olanlar, sigara ya da alkol kullananlar ve antioksidan ilaç takviyesi alan katılımcılar çalışmaya alınmadı.

Hastaların DEXA sonuçları, vücut kütle indeksleri ve demografik verileri kayıt edildi. Serum katalaz (CAT), glutatyon (GSH) ve glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu son ürünü olan serum malondialdehid (MDA) düzeyleri spektrofotometrede, serum RANKL ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ise ELISA mikroplate okuyucuda ölçüldü.

BULGULAR: Çalışma grubunda, serum RANKL, MDA ve NO düzeylerindeki artış ile serum GR düzeyindeki azalma kontrol grubuna göre anlamlı bulundu. Osteoporoz hastalarında serum RANKL düzeyi ile serum MDA düzeyi arasında pozitif bir ilişki varken, serum CAT düzeyi ile negatif bir ilişki gösterdiği saptandı. Ayrıca serum RANKL ve serum MDA düzeylerinin, DEXA sonuçları ile negatif bir ilişki gösterdiği görüldü. OP grubundaki hastaların serum RANKL ve antioksidan enzim düzeyleri ile yaş, menapoz yaşı, menapoz süreleri ve vücut kütle indeksi arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

SONUÇ: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular neticesinde OP hastalarında serum MDA ve RANKL düzeylerindeki anlamlı artma ile glutatyon redüktazın anlamlı azalması, OP patogenezinde oksidan stresin varlığını desteklemektedir. Bununla birlikte NO düzeyinin de kontrol grubuna göre yüksek olması, OP hastalarında NO'nun kemik kaybından sorumlu olabileceğini destekleyebilmektedir. Sonuç olarak, oksidan stres varlığı ve serum nitrik oksit düzeyindeki artışın postmenapozal OP patogenezinde RANKL üzerinden kemik kaybında önemli bir rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

ANAHTAR KELİMELER: Osteoporoz, RANKL, antioksidan enzim, nitrik oksit

8. İNGİLİZCE ÖZET

OBJECTIVE: The first aim of this study was to compare the role of serum antioxidant enzymes and nitric oxide levels in pathogenesis of postmenopausal osteoporosis (OP). The second endpoint was to assess the relationship between these enzyme levels with RANKL and bone mineral density.

MATERIALS AND METHODS: Forty-five osteoporotic women and 42 non-porotic postmenopausal healthy controls were included in this study. Postmenopausal women without previous OP diagnosis and postmenopausal women who had no OP treatment history were included. Individuals that had previous diagnosis of OP or another bone metabolism disorders, self-reported fracture or subjects which has used antioxidant supplementation were excluded. None of these participants were smokers or having alcohol. DEXA results, body mass index and demographic data of these patients were noted. Serum catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione reductase (GR) enzyme activities and malondialdehyde (MDA) were measured by using atomic absorption spectrophotometer. Serum RANKL and nitric oxide (NO) levels were measured with ELISA.

RESULTS: Women with OP had significantly higher serum RANKL, MDA and NO levels. However they had lower serum GR enzyme activity when compared with controls. There was positive corelation between serum RANKL level and serum MDA level while, negative corelation between serum RANKL level and serum CAT levels were determined. Also there was correlation between serum RANKL and MDA levels with DEXA results. There was no correlation between serum RANKL and antioxidant enzyme levels with other parameters (age, age at menopause, duration of menopause, body mass index of the patients).

CONCLUSIONS: This study showed us that oxidant stress must be considered in pathogenesis of OP because of high serum MDA, RANKL levels and low serum GR level have determined in OP patients. In addition, it can be postulated that high serum NO level might be responsible for bone loss in OP patients. In conculusion, it was asserted that the presence of oxidant stress and high level of NO might have a major role in pathogenesis of postmenopausal OP by RANKL.

KEY WORDS: Osteoporosis, RANKL, antioxidant enzyme, nitric oxide.

9. KAYNAKLAR

1. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94:646-650.
2. Kanis JA, Gluer CC An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000; 11:192-202.
3. Brown JP, Josse RG 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ* 2002; 167:S1-34.
4. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 2001; 285:785-795.
5. Yang S, Ries WL, Key LL, Jr. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the formation of superoxide in osteoclasts. *Calcif Tissue Int* 1998; 63:346-350.
6. Nancy Lane, Jan Dequeker, Gregory R Mundy Bone structure and function. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. *Rheumatology*. 2003:2029-2041.
7. Ross FP, Teitelbaum SL alphavbeta3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 2005; 208:88-105.
8. Vaananen K Mechanism of osteoclast mediated bone resorption--rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:959-971.
9. Miyamoto T, Suda T Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med* 2003; 52:1-7.
10. Datta HK, Rathod H, Manning P et al. Parathyroid hormone induces superoxide anion burst in the osteoclast: evidence for the direct instantaneous activation of the osteoclast by the hormone. *J Endocrinol* 1996; 149:269-275.
11. Siris E Alendronate in the treatment of osteoporosis: a review of the clinical trials. *J Womens Health Gend Based Med* 2000; 9:599-606.
12. Recker R, Lappe J, Davies K et al. Characterization of perimenopausal bone loss: a prospective study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1965-1973.
13. Tofteng CL, Jensen JE, Abrahamsen B et al. Two polymorphisms in the vitamin D receptor gene--association with bone mass and 5-year change in bone mass with or without hormone-replacement therapy in postmenopausal women: the Danish Osteoporosis Prevention Study. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1535-1544.
14. Bonjour JP Dietary protein: an essential nutrient for bone health. *J Am Coll Nutr* 2005; 24:526S-536S.

15. Nieves JW, Golden AL, Siris E et al. Teenage and current calcium intake are related to bone mineral density of the hip and forearm in women aged 30-39 years. *Am J Epidemiol* 1995; 141:342-351.
16. Kasukawa Y, Miyakoshi N, Mohan S The anabolic effects of GH/IGF system on bone. *Curr Pharm Des* 2004; 10:2577-2592.
17. Wong PK, Christie JJ, Wark JD The effects of smoking on bone health. *Clin Sci (Lond)* 2007; 113:233-241.
18. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843:1-129.
19. L Joseph Melton, B Lawrence Riggs Epidemiology and classification. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. *Rheumatology*. 2003:2059-2066.
20. Melton LJ, III, Atkinson EJ, Khosla S et al. Secondary osteoporosis and the risk of vertebral deformities in women. *Bone* 1999; 24:49-55.
21. Lane NE Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:S3-11.
22. O'Neill TW, Roy DK The epidemiology and scale of the problem. *Hosp Med* 2003; 64:517-520.
23. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* 2002; 23:90-119.
24. Bashir A, Mak YT, Sankaralingam S et al. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids* 2005; 70:847-855.
25. Aubin JE, Bonnellye E Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11:905-913.
26. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, III Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002; 23:279-302.
27. Mezquita-Raya P, de la HM, Garcia DF et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005; 16:1368-1374.

28. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999; 25:255-259.
29. Takai H, Kanematsu M, Yano K et al. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem* 1998; 273:27091-27096.
30. Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-176.
31. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003; 111:1221-1230.
32. McClung M Role of RANKL inhibition in osteoporosis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 Suppl 1:S3.
33. Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004; 4:268-275.
34. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC et al. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250:776-781.
35. Saika M, Inoue D, Kido S et al. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 2001; 142:2205-2212.
36. Murakami T, Yamamoto M, Ono K et al. Transforming growth factor-beta1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:747-752.
37. Hofbauer LC, Schoppet M, Schuller P et al. Effects of oral contraceptives on circulating osteoprotegerin and soluble RANK ligand serum levels in healthy young women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60:214-219.
38. Locklin RM, Khosla S, Turner RT et al. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem* 2003; 89:180-190.
39. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; 12:1260-1268.

40. Kostenuik PJ, Capparelli C, Morony S et al. OPG and PTH-(1-34) have additive effects on bone density and mechanical strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 2001; 142:4295-4304.
41. Shimizu-Ishiura M, Kawana F, Sasaki T Osteoprotegerin administration reduces femoral bone loss in ovariectomized mice via impairment of osteoclast structure and function. *J Electron Microsc (Tokyo)* 2002; 51:315-325.
42. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2001; 16:348-360.
43. Hofbauer LC, Heufelder AE Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-253.
44. Browner WS, Lui LY, Cummings SR Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:631-637.
45. Thirunavukkarasu K, Miles RR, Halladay DL et al. Stimulation of osteoprotegerin (OPG) gene expression by transforming growth factor-beta (TGF-beta). Mapping of the OPG promoter region that mediates TGF-beta effects. *J Biol Chem* 2001; 276:36241-36250.
46. Kenneth G Faulkner Investigations of bone: densitometry. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. *Rheumatology*. 2003:2067-2074.
47. Leidig-Bruckner G, Genant HK, Minne HW et al. Comparison of a semiquantitative and a quantitative method for assessing vertebral fractures in osteoporosis. *Osteoporos Int* 1994; 4:154-161.
48. Garnero P, Sornay-Rendu E, Claustrat B et al. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res* 2000; 15:1526-1536.
49. Delmas PD, Eastell R, Garnero P et al. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2000; 11 Suppl 6:S2-17.
50. Patrick Garnero, Pierre D Delmas Investigation of bone: biochemical markers. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. *Rheumatology*. 2003:2043-2057.
51. Iki M, Morita A, Ikeda Y et al. Biochemical markers of bone turnover may predict progression to osteoporosis in osteopenic women: the JPOS Cohort Study. *J Bone Miner Metab* 2007; 25:122-129.

52. Shea B, Wells G, Cranney A et al. Calcium supplementation on bone loss in postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;CD004526.
53. Lips P, Hosking D, Lippuner K et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med* 2006; 260:245-254.
54. Chapuy MC, Arlot ME, Delmas PD et al. Effect of calcium and cholecalciferol treatment for three years on hip fractures in elderly women. *BMJ* 1994; 308:1081-1082.
55. Sairanen S, Karkkainen M, Tahtela R et al. Bone mass and markers of bone and calcium metabolism in postmenopausal women treated with 1,25-dihydroxyvitamin D (Calcitriol) for four years. *Calcif Tissue Int* 2000; 67:122-127.
56. Boonen S, Body JJ, Boutsen Y et al. Evidence-based guidelines for the treatment of postmenopausal osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int* 2005; 16:239-254.
57. Anthony D Woolf, Kristina Akesson Management of osteoporosis. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al., eds. *Rheumatology*. 2003:2093-2108.
58. Chesnut CH, III, Silverman S, Andriano K et al. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med* 2000; 109:267-276.
59. Delmas PD The use of bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17:462-466.
60. Hochberg MC, Thompson DE, Black DM et al. Effect of alendronate on the age-specific incidence of symptomatic osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2005; 20:971-976.
61. Reginster J, Minne HW, Sorensen OH et al. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *Osteoporos Int* 2000; 11:83-91.
62. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 337:1641-1647.

63. Rozenberg S, Vandromme J, Kroll M et al. Osteoporosis prevention with sex hormone replacement therapy. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994; 39:262-271.
64. Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD et al. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003; 289:3243-3253.
65. Rizzoli R A new treatment for post-menopausal osteoporosis: strontium ranelate. *J Endocrinol Invest* 2005; 28:50-57.
66. Reginster JY, Malaise O, Neuprez A et al. Strontium ranelate in the prevention of osteoporotic fractures. *Int J Clin Pract* 2007; 61:324-328.
67. Kurland ES, Cosman F, McMahon DJ et al. Parathyroid hormone as a therapy for idiopathic osteoporosis in men: effects on bone mineral density and bone markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:3069-3076.
68. Rubin J, ckert-Bicknell CL, Zhu L et al. IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:4273-4279.
69. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2006; 354:821-831.
70. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez dC, I Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32:595-603.
71. Lee YJ, Galoforo SS, Berns CM et al. Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogen-activated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 1998; 273:5294-5299.
72. Therond P, Bonnefont-Rousselot D, vit-Spraul A et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3:373-384.
73. Yerer MB, Yapislilar H, Aydogan S et al. Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin. *Clin Hemorheol Microcirc* 2004; 30:77-82.
74. Van't Hof RJ, Ralston SH Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001; 103:255-261.
75. Hukkanen M, Platts LA, Lawes T et al. Effect of nitric oxide donor nitroglycerin on bone mineral density in a rat model of estrogen deficiency-induced osteopenia. *Bone* 2003; 32:142-149.
76. Hogg N, Singh RJ, Kalyanaraman B The role of glutathione in the transport and catabolism of nitric oxide. *FEBS Lett* 1996; 382:223-228.

77. Navarro-Gonzalvez JA, Garcia-Benayas C, Arenas J Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 1998; 44:679-681.
78. Yoshioka T, Kawada K, Shimada T et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135:372-376.
79. Fairbanks VF, Klee GG Biochemical Aspects of Hematology. In: Burtis CA AE, ed. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1999:1642-1710.
80. Aebi H Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
81. Carlberg I, Mannervik B Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 1985; 113:484-490.
82. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288:275-279.
83. Sontakke AN, Tare RS A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta* 2002; 318:145-148.
84. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M et al. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1523-1527.
85. Wolf RL, Cauley JA, Pettinger M et al. Lack of a relation between vitamin and mineral antioxidants and bone mineral density: results from the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:581-588.
86. Ozgocmen S, Kaya H, Fadillioglu E et al. Effects of calcitonin, risedronate, and raloxifene on erythrocyte antioxidant enzyme activity, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Arch Med Res* 2007; 38:196-205.
87. Lean JM, Davies JT, Fuller K et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest* 2003; 112:915-923.
88. Bai XC, Lu D, Liu AL et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem* 2005; 280:17497-17506.
89. Muthusami S, Ramachandran I, Muthusamy B et al. Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clin Chim Acta* 2005; 360:81-86.
90. Jagger CJ, Lean JM, Davies JT et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates osteopenia caused by depletion of antioxidants. *Endocrinology* 2005; 146:113-118.

91. Kim HJ, Chang EJ, Kim HM et al. Antioxidant alpha-lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor-kappaB DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:1483-1493.
92. Sheweita SA, Khoshhal KI Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 2007; 8:519-525.
93. Ralston SH, Ho LP, Helfrich MH et al. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1040-1049.
94. Brandi ML, Hukkanen M, Umeda T et al. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2954-2958.
95. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1995; 10:439-446.
96. MacPherson H, Noble BS, Ralston SH Expression and functional role of nitric oxide synthase isoforms in human osteoblast-like cells. *Bone* 1999; 24:179-185.
97. Wimalawansa SJ, De MG, Gangula P et al. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone* 1996; 18:301-304.
98. Armour KE, Ralston SH Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1998; 139:799-802.
99. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2001; 142:760-766.
100. Van't Hof RJ, Armour KJ, Smith LM et al. Requirement of the inducible nitric oxide synthase pathway for IL-1-induced osteoclastic bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:7993-7998.
101. Van't Hof RJ, Macphee J, Libouban H et al. Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology* 2004; 145:5068-5074.
102. Caballero-Alias AM, Loveridge N, Lyon A et al. NOS isoforms in adult human osteocytes: multiple pathways of NO regulation? *Calcif Tissue Int* 2004; 75:78-84.
103. Baecker N, Boese A, Schoenau E et al. L-arginine, the natural precursor of NO, is not effective for preventing bone loss in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2005; 20:471-479.