

**T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKUT METOTREKSAT KEMOTERAPİSİ ALAN RATLARDA MANGO GİNGER'İN
OSTEOKLASTOGENEZ VE KEMİK HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Füsun ERTEN

(132110202)

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Moleküler Biyoloji

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TUZCU
İkinci Danışman: Prof. Dr. Kazım ŞAHİN**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 26 Kasım 2018

ELAZIĞ -2019

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKUT METOTREKSAT KEMOTERAPİSİ ALAN RATLARDA MANGO GİNGER'İN
OSTEOKLASTOGENEZ VE KEMİK HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Fusun ERTEN

(132110202)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 26 Kasım 2018
Tezin Savunulduğu Tarih: 04.01.2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TUZCU (F.Ü.)

İkinci Danışman: Prof. Dr. Kazım ŞAHİN (F.Ü.)

Prof. Dr. Hakkı TAŞTAN (G.Ü.)

Prof. Dr. Ahmet ÇARHAN (Y.B.Ü.)

Prof. Dr. Ökkeş YILMAZ (F.Ü.)

Prof. Dr. Mustafa KARATEPE (F.Ü.)

Prof. Dr. Nurhan ŞAHİN (F.Ü.)

OCAK-2019

ÖNSÖZ

Kemoterapi çocukluk çağında kanser hastalarında kemik deformasyonları ve kemik mineral yoğunluğunun azalmasına neden olabilmektedir. Bir kemoterapötik ajan olan metotreksat (MTX) ve diğer sitotoksik ilaçların yoğun kullanımı, kemoterapi kaynaklı kemik kaybı mekanizmasının tam olarak anlaşılmasını ve koruyucu tedavilere yönelik çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir. Bu çalışmada, antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bir fitokimyasal olan mango ginger (MG) ve MTX'in birlikte kullanımının tibia ve femur kemik mineral yoğunluğu ile moleküler mekanizması araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde, maddi manevi yardımlarını esirgemeyen kıymetli tez danışmanlarım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TUZCU ve Sayın Prof.Dr. Kazim ŞAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tezime katkıda bulunan Prof.Dr. İbrahim H. ÖZERCAN, Doç.Dr. Tansel Ansal BALCI'ya ve emeği geçen diğer arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmayı destekleyen FÜBAP (FF.16.30) birimi koordinatörlüğüne ayrıca teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi öğrenim hayatım süresince de bana sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyen ve sabırlarını sunan sevgili annem, babam ve kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Fusun ERTEN
ELAZIĞ – 2019

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLOLAR LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER LİSTESİ	IX
1.GİRİŞ.....	1
1. 1. Metotreksat (MTX)	3
1. 2. Kemik Dokusu	9
1.2.1. Kemik Dokusu Hücreleri.....	10
1.2.1.1. Osteoblastlar	10
1.2.1.2. Osteositler.....	11
1.2.1.3. Osteoklastlar	11
1.3. Kemik Yıkımı.....	12
1.3.1. Kemik Yıkımı ile İlişkili Biyomarkerlar	14
1.3.1.1. Nükleer Faktör Kappa Beta Ligandı Reseptör-Aktivatörü (RANKL) ve Osteoprotegerinin (OPG).....	14
1.3.1.1.1. RANKL ve OPG'nin Yapısal Özellikleri.....	14
1.3.1.1.1.1. RANKL Kaynağı	14
1.3.1.1.1.2. OPG Kaynağı.....	15
1.3.1.1.2. RANKL ve OPG'nin İşlevi.....	16
1.3.1.1.2.1. RANKL	16
1.3.1.1.2.2. OPG	17
1.3.1.1.3. RANK/RANKL/OPG'nin Osteoklastogenezdeki Önemli Fizyolojik Rolü	18
1.3.1.2. Osteokalsin (OSC).....	20
1.3.1.2.1. Mineralizasyonda Osteokalsin Rolü.....	21
1.3.1.3. İnterlökin (IL)-6.....	22
1.3.1.4. Tümör Nekrozis Edici Faktör (TNF- α)	25
1.3.1.5. Tip 1 Kollajen.....	27
1.4. MTX Kullanımının Kemik Dokusu Üzerine Etkileri.....	28
1.5. Mango Ginger (MG).....	29
2. MATERYAL ve METOT	36
2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları	36
2.2. Laboratuvar Analizleri	38
2.2.1. Serum Parametreleri Analizi	38
2.2.2. Osteokalsin Düzeylerinin Analizi.....	39
2.2.2.1. Enzim Bağlı İmmün Test Yöntemi (ELISA).....	39

2.2.2.2. Osteokalsin Düzeyi Ölçümü	39
2.2.3. Kemik Mineral Yoğunluğu Analizi	42
2.2.4. RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 Kollajen Proteinlerinin Western Blot ile Analizi	42
2.2.4.1. Kemik Dokusuna Ait Örneklerinin Homojenizasyonu	42
2.2.4.2. Total Protein Miktarının Spektrofotometrik Analizi	43
2.2.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	44
2.2.4.4. SDS-PAGE Analizleri	45
2.2.4.5. Western Blot Analizleri	46
2.2.5. Kemik Histopatolojisi	48
2.3. İstatistiksel Analizler	49
3. BULGULAR	50
3.1. SERUM PARAMETRELERİ	50
3.2. Osteokalsin ve Kemik Mineral Yoğunluğu Düzeyleri	51
3.3. Kemik Dokusunda RANKL, OPG, IL-6, TNF-α ve Tip 1 Kollajen Proteinlerinin Düzeyleri	53
3.3.1. RANKL Düzeyleri	53
3.3.2. OPG düzeyleri	54
3.3.3. IL-6 Düzeyleri	55
3.3.4. TNF- α Düzeyleri	56
3.3.5. Tip 1 Kollajen Düzeyleri	57
3.4. Histopatolojik Bulgular	58
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	93

ÖZET

Folik asit antagonisti olan metotreksat (MTX), kemik deformasyonlarına ve kemik mineral yoğunluğunun azalmasına neden olmaktadır. Mango Ginger (MG) anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir. Bu çalışmanın amacı, ratlarda MG uygulamasının MTX kaynaklı kemik hasarına karşı potansiyel koruyucu rolünü araştırmaktır. Toplam 28 adet Sprague-Dawley erkek rat dört gruba ayrılmıştır: i) Kontrol; ii) MG grubu; ratlara 15 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozunda oral gavaj ile MG verildi, iii) MTX grubu; ratlara 8-12. günler arasında 5 gün boyunca subkutan olarak 0.75 mg/kg dozunda MTX enjekte edildi, iv) MTX + MG grubu; ratlara 15 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozda oral gavaj ile MG verildi ve 8-12. günler arasında 5 gün boyunca subkutan olarak 0.75 mg/kg dozunda MTX enjekte edildi. MTX; aminotransferaz enzim aktivitelerini ve üre ile kreatin düzeylerini anlamlı derecede artırırken, tibia osteokalsin düzeyini ve kemik mineral yoğunluğunu (KMY) azaltmıştır ($P < 0.001$). MG ön tedavisi, MTX + MG gruplarında aminotransferaz, kreatinin, tibia ve femur KMY'si ile osteokalsin düzeylerini belirgin olarak azaltmıştır. Gruplar arasında serum glikoz ve kolesterol düzeyleri bakımından fark yoktur. MTX kemik dokusunda nükleer faktör kappa beta ligandı reseptör-aktivatörü (RANKL), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekrozis faktör (TNF- α) düzeylerini artırıp ve osteoprotegerinin (OPG) ve Tip 1 kollajen düzeylerini azaltmıştır ($P < 0.001$). MG tedavisinin etkisi, MTX tarafından indüklenen RANKL, IL-6, TNF- α , OPG ve tip 1 kollajen seviyeleri üzerinde anlamlı etkiler gözlemlendi ($P < 0.05$). Benzer şekilde, MG'nin MTX'e karşı koruyucu etkisi histolojik inceleme ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, MG tedavisi, MTX'in kemik hasarı etkilerini azaltmış ve ratlarda KMY'yi ve RANKL, IL-6, TNF- α , OPG ve Tip 1 kollajen düzeylerini iyileştirmiştir.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat, Mango Ginger, Kemik Mineral Yoğunluğu, Osteoklastogenez

SUMMARY

The Effects of Mango Ginger on Osteoclastogenesis and Bone Damage Induced by Acute Methotrexate Chemotherapy in Rats

Methotrexate (MTX), a folic acid antagonist, causes bone defects in the form of low mineral density (BMD) and bone fractures. Mango ginger (MG) has anti-inflammatory and antioxidant properties. The purpose of the present study was to investigate the potential protective role of MG administration and its mechanisms against MTX induced bone damage in rats. A total of 28 Sprague-Dawley male rats were randomly allocated into four groups as follows; i) control; ii) MG group, rats were treated orally with 50 mg/kg/day of MG for 15 days, iii) MTX group, rats were injected subcutaneously with 0.75 mg/kg of MTX on 8th and 12th days for 5 days, and iv) MTX+MG group, rats were treated orally with 50 mg/kg/day of MG for 15 days and injected with MTX on 8th and 12th days for 5 days. MTX significantly increased serum aminotransferase enzyme activities and urea creatinine levels, while osteocalcin levels and tibia and femur BMD decreased ($P < 0.001$; for all). MG pretreatment markedly attenuated aminotransferases activities and creatinine levels and increased tibia osteocalcin levels and femur BMD in the MTX + MG groups. There was no difference in serum glucose and cholesterol levels among all groups. MTX increased bone nuclear factor kappa beta ligand receptor-activator (RANKL), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels and decreased the bone osteoprotegerin (OPG) and type1 collagen levels ($P < 0.001$). The effect of MG treatment on RANKL, IL-6, TNF- α , OPG and type1 collagen levels induced by MTX was observed actual effects ($P < 0.05$). Similarly, the protective effect of MG against MTX was confirmed by histological examination. In conclusion, MG treatment reduced the negative effects of MTX on bone damage by improving BMD and modulation of RANKL, IL-6, TNF- α , OPG and type1 collagen levels in the rats.

Key Words: Methotrexate, Mango Ginger, Bone Mineral Density, Osteoclastogenesis

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. Folik asit ile MTX arasındaki yapı benzerliği	5
Şekil 1.2. Osteoklast farklılaşması üzerine etkili olan moleküler faktörler.....	13
Şekil 1.3. Diyagramatik gösterimler.....	15
Şekil 1.4. RANK-RANKL bağlanması ve OPG tarafından RANK-RANKL bağlanmasının inhibisyonunu gösteren sinyal yollarının şematik gösterimi	17
Şekil 1.5. İnsan IL-6'nın amino asit dizisi ve X-ışını kristalografisi	23
Şekil 1.6. TNF- α 'nın osteoklast farklılaşması üzerine etkisi	26
Şekil 1.7. MG bitkisi (A), rizomlar (B) ve TS rizomu (C).....	30
Şekil 1.8. MG'nin uçucu bileşenleri.....	31
Şekil 1.9. MG'nin Terpenoidleri	32
Şekil 2.1. Standart solusyonun dilüsyonu.....	41
Şekil 3.1. Osteokalsin düzeyleri	51
Şekil 3.2. Tibia KMY düzeyleri	52
Şekil 3.3. Femur KMY düzeyleri	53
Şekil 3.4. Kemik dokusu RANKL düzeyleri.....	54
Şekil 3.5. Kemik dokusu OPG düzeyleri.....	55
Şekil 3.6. Kemik dokusu IL-6 düzeyleri	56
Şekil 3.7. Kemik dokusu TNF- α düzeyleri.....	57
Şekil 3.8. Kemik dokusu Tip 1 Kollajen düzeyleri	58
Şekil 3.9. MTX ile tedavi edilen ratlarda MG'nin histopatolojik parametreler üzerindeki etkileri.....	59
Şekil 3.10. Grupların kemik histopatolojik görünimleri.....	60

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. MG'nin taksonomik hiyerarşisi.....	29
Tablo 2.1. Deneysel çalışma grupları	37
Tablo 2.2. Deney hayvanlarına verilen standart yemin bileşimi	38
Tablo 2.3. Kullanılan reaktifler ve malzemeler	40
Tablo 2.4. Tablo ELISA standartlarının hazırlanması.....	40
Tablo 3.1. Serum parametre ölçümlerinin sonuçları	50



SEMBOLLER LİSTESİ

ALP	: Alkale Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AP-1	: Aktivatör Protein-1
APS	: Amonyum Persülfat
AST	: Aspartat Aminotransferaz
COL1A2	: Kollajen Tip 1 Alfa 2
CRP	: C-Reaktif Protein
CSF-1	: Koloni Uyarıcı Faktör-1
CSFs	: Koloni Uyarıcı Faktörler
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DPPH	: 1,1-Difenil-2-picrylhydrazyl
ELISA	: Enzim Bağlı İmmün Assay Yöntemi
FH₂	: Dihidrofolat
FH₄	: Tetrahidrofolik Asit
HRP	: Horseradish Peroksidaz
IL-1	: İnterlökin-1
IL-6	: İnterlökin- 6
ILs	: İnterlökinler
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu
LPS	: Lipopolisakkarit
M-CSF	: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MG	: Mango Ginger
MTX	: Metotreksat
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NFATc1	: Aktive edilmiş T-Hücrelerin Nükleer Faktörü 1
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal Öldürücü
OCIF	: Osteoklastogenez İnhibitör Faktör
OPG	: Osteoprotegerinin
OSC	: Osteokalsin
Osx	: Osteriks

PGE2	: Prostaglandin E2
PGs	: Prostaglandinler
PTH	: Paratiroid Hormonu
RANK	: Nükleer Faktör Kappa Beta'nın Reseptör-Aktivatörü
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa Beta Ligandı Reseptör-Aktivatörü
RIPA	: Radyoimmünopresipitasyon Assay
RUNX2	: Runt İlişkili Transkripsiyon Faktör 2
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
sTNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü- α Salgı Formu
TACE	: TNF- α -Dönüştürücü Enzim
TEMED	: Tetrametilendiamin
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta
tmTNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü- α Transmembran Formu
TNFs	: Tümör Nekrozis Faktörleri
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü Alfa
TRAP	: Tartarat-Dirençli Asit Fosfataz ve Jelatinaz
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörün
Wnt	: Drosophila Kanatsız Int Geni

1. GİRİŞ

Kanser, dünyadaki ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (Chen vd., 2018). Dünya sağlık örgütünün 2015 yılı verilerine göre 8.8 milyon kişinin ölümüne yol açmıştır (URL-1, 2017). Kanser nedenli ölüm oranları yüksek olsa da; belirli kanser türlerinin tedavisinde ortaya çıkan son gelişmelerle birlikte hastaların hayatta kalma oranları, umut verici bir şekilde her geçen gün artmaya devam etmektedir. Kemoterapötik ajanların uygulamasını araştıran çalışmaların sayılarının ve buna bağlı olarak tedavi yöntemlerinin artmasına karşın kemoradyoterapi, tek başına radyoterapi yerine önerilen yöntem olmaktadır (Chen vd., 2018; Gao vd., 2018; Sridhar ve Symonds, 2009). Kanser tedavileri, hastalarda iskelet morbiditesi kaynaklı kemik kaybı riskini artırır (Kanis vd., 2003). Kemik kaybı riskinin belirlenmesi, anlaşılması, değerlendirilmesi ve hastalığı önleyici tedavinin belirlenmesinde hayati öneme sahiptir (Brufsky, 2008). Yetişkin ve büyüme çağındaki insanlarda kemoterapinin kemik üzerinde büyümeyi durdurucu ve kemik mineral yoğunluğunu (KMY) azaltıcı etkileri olmak üzere önemli yan etkileri vardır (Arikoski vd., 1999; Pfeilschifter ve Diel, 2000). Çocukluk çağı kanser kemoterapileri sonucu birçok ortaya çıkan akut hasarın yanı sıra uzun dönemde KMY’nda da azalma görülmektedir (Hadji vd., 2009; Pfeilschifter ve Diel, 2000). Bu tedaviler kemik gelişimine ve kemik kütlesine negatif etkilidir (Haddy vd., 2001). Bunun bir sonucu olarak pubertede kemik gelişiminde gerilemeye ve kemik kırığı riskinde artışa neden olur (Arikoski vd., 1999; Davies vd., 2005).

Metotreksat (MTX), pürin ve timidin sentezinde kullanılan folatı inhibe ederek DNA/RNA sentezi ve hücre çoğalmasının bozulmasına yol açan anti-metabolit etkili bir kemoterapötikdir (Xian vd., 2008). Çocukluk çağı kanserlerinde özellikle akut lenfoblastik lösemide sıkça kullanılan MTX, kemik gelişiminde durmaya ve kemik dansitesinde azalmaya neden olur (Athanasiadou vd., 2006; Lequin vd., 2002; Xian vd., 2007; Xian vd., 2008). Sıkça kullanılması ve tedavide başarılı sonuçlarının yanı sıra kemikle ilişkili yan etkileri nedeniyle bu etkilerin anlaşılması ve önlenmesine ilişkin çalışmalar MTX üzerine yoğunlaşmıştır (King vd., 2015). Geçmiş yıllardaki çalışmalar MTX tedavisini takiben kemik kütlesinde kayba ve kemik iyileşmesinde dengesizliklerin olduğunu göstermiştir (Crofton vd., 1998; Crofton vd., 2000). Bu etkiler, deney hayvanlarında uzun boyutlu kemiklerde görülmüştür. MTX’in akut etkileri osteoblast sayısında azalmaya, osteoklast sayısında ise artışa neden olmaktadır (Fan vd., 2009; Xian vd., 2007). Son

zamanlarda, MTX'in kemik iliği prekürsör hücreleri üzerine patolojik değişimlere neden olduğu gösterilmiştir. MTX'in kemik iliğindeki etkileri osteoblast sayısının azalmasına ve adiposit hücrelerinin artışına neden olmaktadır (Georgiou vd., 2012b; Georgiou vd., 2012c). Bunun yanında, MTX verilmesi osteoklast değişimini artıran kemik yıkıcı sitokinlerin artışına sebep olmaktadır (King vd., 2015). Günümüzde MTX'in kemik üzerine negatif etkilerini azaltabilecek, kabul edilmiş bir tedavi bulunmamaktadır (Garg vd., 2015) ve deneysel hayvan modellerinde bu yan etkilerin tedavisi için folik asit ve balık yağı gibi tedaviler denenmektedir (Raghu Nadhanan vd., 2013; Xian vd., 2008). Geleneksel kemik koruyucu tedavilerden bifosfanatlar ve NF-κB ligandı (RANKL) antikorumları kemik üzerine koruyucu etki gösterebilmektedir (Garg vd., 2015). Ancak bu tip ilaçlar genelde osteoporoz tedavisinde altın standart olarak kullanılmaktadır (Boquete-Castro vd., 2015; Domschke ve Schuetz, 2014). MTX genellikle başka ilaçlarla birlikte akut lenfositik lösemi, koriyokarsinoma, meme kanseri, çocuklardaki Burkitt lenfoma, baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Osteojenik sarkom ve koriyokarsinom da MTX'in yüksek doz kullanımı tedavi edicidir. Kemik iliği yan etkilerinden korunmak amacıyla MTX tedavisinin arkasından lökovin (sitrovorum faktörü) uygulanır. Aynı zamanda düşük doz MTX şiddetli psöriasis ve romatoid artrit gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde tek ilaç olarak kullanılır. Toksik etkilerinden dolayı bu hastaların yakından takip edilmesi gerekir (Mycek vd., 2016).

Kemoterapötik ajanlarla kombine olarak bitkisel ilaçların ve kimyasal önleyici fitokimyasal maddelerin, kanser hücrelerini tedaviye duyarlılaştırmada ve konvansiyonel terapidan kaynaklanan yan etkileri en aza indirgemede etkili olmaktadır (Liao vd., 2013). Bundan dolayı ilaçların yan etkilerinin azaltılması için bazı bitkisel tedavi desteklerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Curcuma cinsi, rhizomatous bitkilerinin 80 türünden daha fazlasını içeren *Zingiberaceae* ailesine aittir. Bunlar Hint-Malay bölgesi kökenlidir ve Asya'dan Afrika'ya ve Avustralya'ya tropik bölgede geniş bir alana dağılmıştır (Sasikumar, 2005). Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.) (MG) çok yıllık bir bitkidir. Bu bitkilerin rizomları morfolojik olarak zencefile benzer, ayrıca mango lezzeti vermiş olan car-3ene ve sisosimen gibi önemli uçucu bileşiklere sahiptir (Policegoudra vd., 2007a). Bu nedenle, rizomlar salataların ve turşuların hazırlamasında yaygın olarak kullanılır ve son derece değerlidir. MG rizomları morfolojik olarak zencefile benzese de, nişasta granülleri dahil biyokimyasal bileşiminde farklılık gösterir. MG, nişasta granüllerinin boyutu ve yapısı,

yüzeyinde çatlak olmaması ve ayrıca X-ışını sapması örneği olması nedeniyle zencefil nişastası ve zerdeçal nişastasından önemli ölçüde değişiklik gösterir. MG, zerdeçal ve zencefil nişastası arasında bir konuma sahiptir (Policegoudra vd., 2007a; Policegoudra vd., 2007b). Hindistan'da Ayurveda adında en eski tıp sisteminde, MG'nin rizomu bir iştah açıcı, ateş düşürücü, afrodizyak ve müshil olarak kullanılmıştır. Ayrıca, huysuzluk, kaşıntı, deri hastalıkları, bronşit, astım, hıçkırık ve yaralanmalara bağlı iltihaba karşı kullanılır. Yunan tıbbında ağız, kulakta iltihap, erkek cinsiyet organları üzerindeki ülser, uyuz, lumbago ve stomatite karşı kullanılır (Policegoudra vd., 2007a).

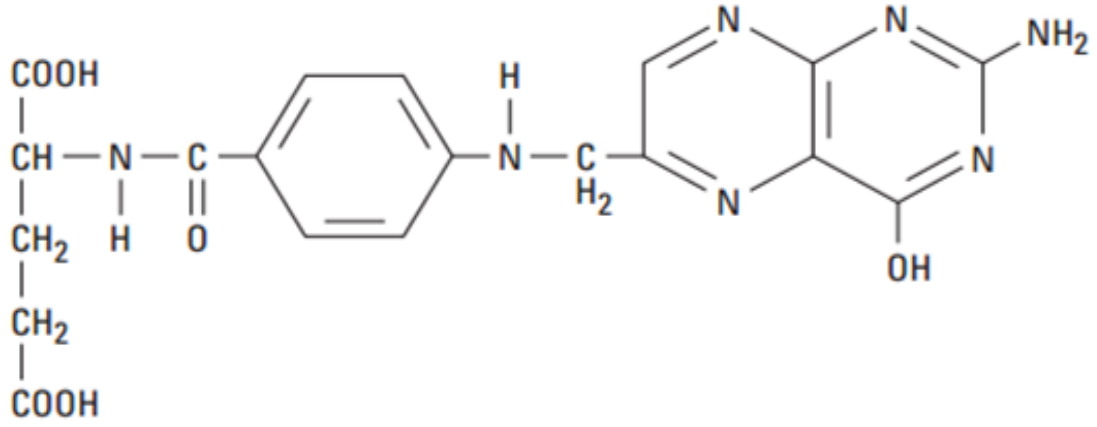
MG'nin etil alkol ekstresinin, akut ve kronik albino farelerde anti-inflamatuar aktivitesi gösterilmiştir (Mujumdar, vd., 2000). Tripsin enzimini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Policegoudra vd., 2007b) ve aynı zamanda hiperlipidemik sıçanlarda hipotrigliseridemik aktiviteyi artırdığı bulunmuştur (Srinivasan vd., 2008). Son zamanlarda, iki yeni biyoaktif terpenoidler, yani difurocumenonol ve amadan-nulen, MG rizomundan izole ve karakterize edilen önemli bir biyoaktif bileşik olduğu bulunmuştur (Policegoudra vd., 2007b). Bunlar antibakteriyel aktivite, trombosit agregasyon inhibe edici aktivitesi, lipoksigenaz önleyici aktivitesi ve sitotoksikite ve antioksidan faaliyetleri, 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) radikal süpürücü etki, lipid peroksidasyon inhibitör aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve süperoksit radikal süpürücü etki gibi çeşitli biyolojik aktiviteler göstermişlerdir (Policegoudra vd., 2007b; Policegoudra vd., 2007a). Lezzet, renk, savunma araçlarında öncüler olarak bir dizi fonksiyonda biyoaktif bileşiklerin katılımı gibi bilinen karakteristik özelliklerinin yanısıra meyve, sebze, yumrular ve rizomlarda sağlık açısından önemli olan çeşitli rolleri belgelenmiştir (Samanani vd., 2002; Tholl, 2006). Meyve, sebze ve baharatlar ile beslenme ve nutrasötikal bileşenlerin işlevlerini anlamaya yönelik dünya çapında çalışmalar olmasına karşın, rizomlara benzer yumrular ve kökler gibi kısımlar üzerinde yeterli çalışmalara rastlanılmamaktadır (Policegoudra vd., 2007a). Mevcut çalışmanın bu alanda literatüre bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

1. 1. Metotreksat (MTX)

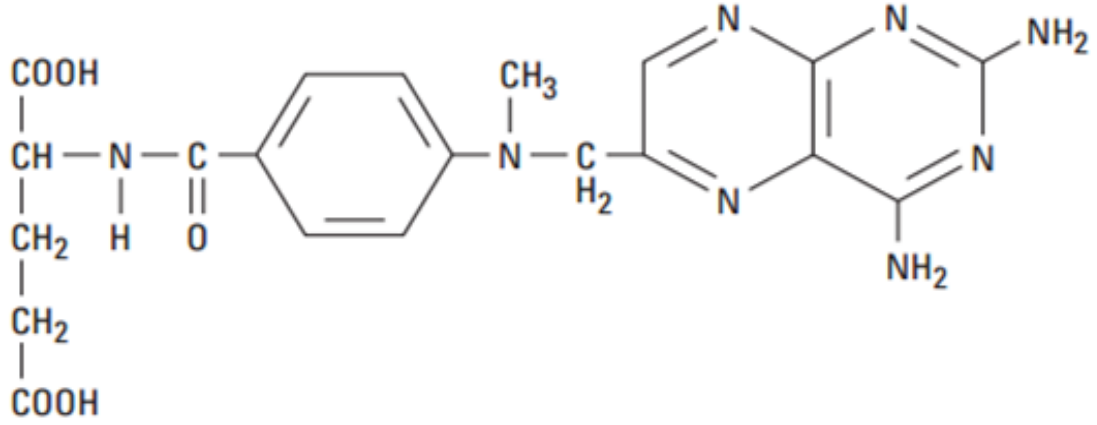
Antifolat kemoterapisi, kanser tedavi yöntemleri arasında özel bir yer tutmaktadır. Antifolat kemoterapi grubu ilaçları lösemi tedavisinde belirgin olup, ancak geçici remisyona sebep olur. Fakat solid bir tümör olan koryokarsinomda ise kürü sağlamışlardır.

Bu gelişmeler sayesinde kanser kemoterapisinin ilerlemesine büyük güç katmıştır. Folat antagonistleriyle başlayan bu ilgi daha sonraki aşamalarda çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi terapisinde kombine tedavi uygulamasının başlamasına neden olmuştur. Sistemik ve intratekal tedavide, MTX önemli bir rol oynamıştır. Folat düşürülmesi ile sağlanan konak toksisitesinin azalması sonucu yüksek doz düzeylerinde uygulanabilirler. Bunun yanında, leukovorinin (folik asit, sitrovorum faktörü, 5-formil tetrahidrofolat, N⁵-formil FH₄) sistemik ve SSS lenfomalarında, osteojenik sarkomlar ve lösemilerdeki etkinliğini daha da arttırmıştır (Brunton vd., 2009).

Yapısal olarak MTX, folik asite benzer (Şekil 1.1); MTX, dihidrofolat redüktazı inhibe ederek folik asidin aktif koenzim formu olan tetrahidrofolik asite (FH₄) dönüşmesini engeller. Bundan dolayı bir vitamin antagonisti gibi davranır. Folat tek karbon birimlerinin taşınması ile ilgili metabolik reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır (Mycek vd., 2016).



Folik Asit



Metotreksat

Şekil 1.1. Folik asit ile MTX arasındaki yapı benzerliği (Katzung vd., 2012)

Metotreksat'ın etki mekanizması; gıdalarla alınan veya bağırsak florasınca oluşturulan folik asit emildikten sonra, hücrede NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat)'a bağımlı dihidrofolat redüktaz (DHFR) tarafından tetrahidrofolat formuna (FH₄) indirgenir. MTX, hücreye normalde N⁵-metil FH₄'ün taşınmasını sağlayan aktif transport mekanizması yoluyla taşınır. Yüksek kontrasyonlarda difüzyonla da hücre içine girebilirler. MTX, DHFR'a yüksek afinite gösterir ve enzimi etkin bir şekilde inhibe eder. Tetrahidrofolatin kendisi gibi MTX-poliglutamat DHFR'ı de güçlü bir şekilde inhibe eder. Dihidrofolat redüktazın inhibisyonu hücrede çeşitli folat koenzimlerinin azalmasına yol açar ve biyosentezi için bu koenzimlere bağımlı olan bileşiklerin sentezinin azalmasına

sebeplerdir. Bu bileşikler, adenin, guanin ve timidin nükleotidleri, metiyonin ve serin amino asitleridir. DNA, RNA ve protein sentezi baskılanır ve hücre ölümüyle sonuçlanır. DHFR inhibisyonu ancak normal substratı olan dihidrofolatın (FH₂) MTX'in 10000 katı konsantrasyonda uygulamasıyla ya da bloke edilen enzimi devre dışı bırakarak folat havuzunu yenileyen lökovorinin uygulamasıyla engellenebilmektedir (Mycek vd., 2016).

Metotreksat'a direnç, indirgenmiş folat taşıyıcı veya folat reseptör proteini aracılığı ile azalan ilaç ulaşımı, sitotoksik MTX poliglutaratların oluşumunun azalması, gen amplifikasyonu ve diğer genetik mekanizmalar yoluyla hedef enzim DHFR'nin artan seviyesi ve DHFR proteinin MTX'a afinitesinin azalması yönündeki değişimi ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarla, ayrıca, birçok ilaca dirençli P170 glikoproteinin aktivasyonu ile azalan ilaç akümüülasyonunun ilaç direncine sebep olabileceğini işaret etmektedir (Katzung vd., 2012).

Metotreksat ağız yolundan normal dozda (10 mg/m²) alındığında maksimuma yakın bir oranda absorbe edilir. Plazma proteinlerine düşük oranlarda ve zayıf bir şekilde bağlanırlar. Sulfonamidler ve salisilatlar, MTX ile birlikte verilirlerse bağlanma oranını azaltırlar ve MTX'in toksisitesini artırabilirler. Tümör hücrelerinde, karaciğer ve böbrek hücrelerinde MTX uzun süre bağlı kalır. Tümör hücrelerindeki bu durumun tedavi yönünden bir değeri vardır. Antimetabolitler dinlenme halindeki hücrelerde sitotoksik etki yapmazlar ancak bu durumdaki hücrede uzun süre kalan MTX'in, latent sitotoksik etkisi vardır. Böylece hücre bölünmeye başladığı zaman bu etki belirgin hale geçer ve hücreyi öldürür. Standart doz uygulamalarında sinir sistemine ve beyin omirilik sıvısına (BOS) giremez. Ayrıca, terapötik konsantrasyonlara ulaşamaz; ancak yüksek doz uygulamalarında BOS'ta terapötik konsantrasyonlara ulaşıldığı bildirilmektedir. Meningeal tutulum yapan tümörlerde tedavi için intratekal verilmesi gerekir. Böbreklerden itrah suretiyle elimine edilirler. Eliminasyon yarılanma ömrü 8 saat kadardır (Kayaalp, 2002).

Metotreksat akut lenfositik lösemi, koryokarsinoma, çocuklardaki Burkitt lenfoma, meme kanseri ile baş ve boyun kanserlerinin tedavisinde genellikle diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Aynı zamanda düşük doz MTX psöriasis, romatoid artrit ve Crohn hastalığı gibi bazı inflamatuvar hastalıkların tedavisinde tek ilaç olarak etkilidir. Toksik etkileri sebebiyle bu hastaların takip edilmeleri gerekmektedir (Al Maruf vd., 2017; Katzung vd., 2012; Mycek vd., 2016).

Yüksek dozlarda MTX kullanımı, kemik iliği depresyonu, megaloblastik anemi, alopesi ve mukozite sebep olabilir. İnflamatuvar bağırsak hastalığında kullanılan dozlarda

bu yan etkiler nadir gözlenir. Ancak gözlemlendiği durumlarda ise dozun azaltılması gerekmektedir. İlave folat tedavisi, antiinflamatuvar etkiyi azaltmadan yan etkilerin oluşma riskini azaltır (Katzung vd., 2012; Ulugöl vd., 2017). MTX tedavisi alan psöriyazis hastalarında hepatik hasar yaygındır. Fakat inflamatuvar bağırsak hastalığı ve romatoid artritli kişilerde bu risk çok düşüktür. Renal yetmezlik durumu, hepatik birikime ve toksisite riskini artırır (Katzung vd., 2012).

Metotreksat tedavisine adjuvan (10–45 mg/kg/gün) olarak genistein verilen ilk çalışmalardan birinde 20 mg/kg doz kullanılarak kemik kaybında pozitif etkiler elde edilmiştir (Hertrampf vd., 2009; Li ve Yu 2003). 500 mg/kg'a kadar olan yüksek dozların osteopetrozise ve cinsiyet ayırmaksızın gonadal fonksiyon bozukluklarına neden olduğu bilinmektedir (McClain vd., 2006). 20 mg/kg'lık genistein dozu, yan etkilerin minimum düzeyde olduğu ve ratlar tarafından iyi tolere edilen bir doz olarak dikkate değerdir. Ancak hergün oral gavaj olarak yapıldığı için serum düzeyi hakkında bilgi vermemektedir (McClain vd., 2006; Turner vd., 2013). Yine de bu dozda genistein vermek (MTX'in oluşturduğu zararlı etkileri) tolere etmenin yanında gastrointestinal sistem üzerine de olumlu etkileri bulunmaktadır. Daha önce, kemoterapötik dozlarda MTX alan ratların gastrointestinal irritasyon ve yetersiz beslenmeden muzdarip olduğu gözlenmiştir (Carneiro-Filho vd., 2004; Xian, 2003). King ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları bir çalışmalarında da MTX ile tek başına tedavi edilen farelerde belirgin bir etki gözlemlenmişlerdir. Genistein alan ratların sadece MTX alan ratlara göre daha çok ağırlık kazandıkları ve kontrol grubuyla aynı kilolara ulaştıkları saptanmıştır. Genistein'in MTX nedenli bağırsak mukoza hasarını önleyerek sekonder bir fayda sağladığı da tespit edilmiştir (King vd., 2015).

Metotreksat Kullanımının Hepatotoksisiteye Etkileri: Hepatotoksisite MTX kullanımını sınırlayan önemli bir etkindir. Bu yüzden MTX ile birlikte verilen yardımcı ilaçlar bu hepatotoksisiteyi azaltmaya yardımcı olurlar (Howard vd., 2016). MTX, hepatotoksisitesi alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP) ve aspartat aminotransferaz (AST) düzeylerinin yüksekliği ile karakterize olan bir tablodur (Demiryılmaz vd., 2012). Hücresel düzeyde serbest radikallerin nötralizasyonunda antioksidanlar önemli rol alırlar (Goudarzi vd., 2017; Najafzadeh vd., 2011). Klorojenik asit, krisin, tiamin ve vitamin C gibi antioksidanlar MTX'in karaciğer toksisitesini önlemek için kullanılmaktadır (Ali vd., 2014; Ali vd., 2017; Demiryılmaz vd., 2012).

Metotreksat aracılı hepatotoksisitenin moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Fakat klinik ve deneysel çalışmalar folat türevlerinin azalmasına neden olan oksidatif stresin pürin metabolizması gibi önemli biyokimyasal yolları bozarak etki ettiğini göstermektedir (Vardi vd., 2010). Bu biyokimyasal değişimler MTX'in hem terapötik hemde toksik etkileri olmasına rağmen oksidatif stresi ve inflamatuvar olayları artırır (Koyama vd., 2003; Turesson ve Matteson, 2006).

Kronik MTX kullanılması hepatotoksisiteyi artıran en önemli nedenlerden biridir. Ayrıca yüksek doz kullanımı karaciğer yağlanması, safra taşı, fibrozis ve siroz gibi karaciğer hasarlarına neden olabilir. Karaciğer hücrelerinde poliglutamat birikmesi ve bunun sonucu olarak azalmış folat havuzu ve oksidatif stresin artışına neden olan yolların aktivasyonu MTX aracılı karaciğer hasarının kabul edilmiş iki yoludur (Khalifa vd., 2017).

Metotreksat tedavisinin neden olduğu hepatotoksisitenin altında yatan mekanizma açık değildir. Bununla birlikte, MTX'in karaciğer dokusunda oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir. Her ne kadar 7-OH metaboliti MTX metabolizmasının ana yolu olsa da, MTX metabolize edilir ve poliglutamine formda hepatositlerde depolanır (Chladek vd., 1997). Daha yüksek seviyelerde poliglutamatların varlığı, ilacın daha uzun bir hücre içi varlığına neden olur ve bu, hepatotoksisite için bir mekanizma olarak önerilmiştir. Ayrıca, MTX dihidrofolat redüktazı inhibe eder, dolaylı olarak timidin sentezini etkiler, böylece DNA sentezini bastırır. Ek olarak, sitosolik nikotinitid adenosin difosfat (NADP)-bağımlı dehidrojenazların ve NADP malik enziminin MTX tarafından inhibe edildiği, bu da ilacın hücrelerde NADPH mevcudiyetini azaltabileceğini göstermektedir. Normal koşullar altında, NADPH, glutatyon redüktaz tarafından, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı koruyan önemli bir sitozolik antioksidan olan hücresel glutatyonun azalan durumunu korumak için kullanılır. Böylece MTX tarafından indüklenen glutatyon (GSH) seviyelerindeki önemli azalma, antioksidan enzim savunma sisteminin seviyesinde azalmaya ve hücrelerin ROS'a duyarlı hale getirilmesine yol açar (Babiak vd., 1998; Caetano vd., 1997; Çetinkaya vd., 2006; Fan vd., 2014; Hemeida ve Mohafez, 2008; Jahovic vd., 2004).

King ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında, serum alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri değerlendirilerek, MTX tedavisinin osteoblast yoğunluğunu etkileyip etkilemediği açıklığa kavuşturulamamasına rağmen, kemik yapımında azalma olduğu tespit edilmiştir (King vd., 2015). Genisteinin *in vitro* osteoblastojenik etkileri

bilinmektedir. Genistein tedavisinin osteoporozu önlediği veya geciktirdiği deneylerde görülmüştür (Chang vd., 2003; Georgiou vd., 2012b; Georgiou vd., 2012c; Li vd., 2012; Liao vd., 2007; Sugimoto ve Yamaguchi, 2000).

1. 2. Kemik Dokusu

Kemik, hidroksiapatit ($[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]\text{Ca}(\text{OH})_2$) formunda kalsiyum fosfat ve mineralizasyon ile sertleştirilmiş özel bir bağ dokusudur. Kemik; dayanıklılık, vücuda şekil verme, vücut yapıları için koruma ve destek sağlama ve hareket etme gibi iyi bilinen mekanik fonksiyonlara sahiptir. Popüler inancın aksine kemik, aslında sürekli yenilenen son derece dinamik bir yapıdır. Bu özelliği, kırıktan sonra kendini tamir etmesine ve üzerine yerleştirilen kuvvetlere uyum sağlamasına olanak tanır (Datta vd., 2008).

Kemiklerin iki büyük türü, intramembranöz kemikleşme ile inşa edilen yassı kemikler ve endokondral ossifikasyondan çıkan uzun kemiklerdir. İntramembranöz kemik oluşumu, doğrudan kemik oluşturan osteoblastlara, farklılaşan mezenkimal kök hücrelerin yoğunlaşmasına dayanır. Buna karşılık, uzun kemiklerin endokondral ossifikasyonu esnasında, mezenkimal kök hücreler ilk önce osteoblastlarla değiştirilecek olan kondrositlere ayrılırlar. Uzun kemikler, (1) uzun kemiklerin uçlarındaki çıkıntılar olan epifizlerden; (2) shaftını teşkil eden diyafiz; ve (3) epifiz ve diyafiz arasında bulunan metafizlerden oluşurlar. Metafiz, kemiklerin boyuna büyümesi için gerekli olan proliferatif kırıkta tabakası olan büyüme plakası ile epifizden ayrılır. Büyüme tamamlandıktan sonra, bu kırıkta tabaka tamamen kemik içinde tekrardan oluşturulur (Schett, 2017).

Dış kısmında kemiğin yoğun, kavite gösteren yapıların olmadığı sert ve kalsifiye bir doku tabakası vardır. Bu tabakaya kompakt kemik tabakası (kemik korteksi) denir. Kemiğin diafizinde bu yapının iç kısmında, kemik iliğinin depolandığı medüller kavite vardır. Metafiz ve epifize doğru gittikçe, kemik korteksi progressif olarak incilir ve bu yapının iç yüzeyini ince kalsifiye trabeküler kemik yapı alır. Kortikal kemik ve trabeküler kemiklerin organizasyonları farklıdır; ancak bunlar histolojik olarak aynı elemanlardan oluşurlar. Kompakt kemikte kalsifikasyon oranı %80-90 arasında değişirken, trabeküler kemiğin sadece %15-25'i kalsifiye halde bulunur. Kortikal kemik daha çok mekanik ve koruyucu özellikleri ile ön planda iken, trabeküler kemik esas olarak metabolik fonksiyonların yoğun olduğu yapıdır. Trabeküler kısım, tüm iskelet yapının %20'sini; kemik döngüsünün olduğu ortamın ise %80'ini oluşturmaktadır (Çay ve Sezer, 2002).

Kortikal ve süngerimsi kemiklerin ikisi birlikte lamellar kemik formunu oluşturup, her ikisinde osteonları içerir. Lamellar kemik, organik matriks ve mineral matriks olmak üzere iki kısımdan oluşur. Organik matriks %95 oranında Tip 1 kollajenden oluşur ve gerilmelere karşı kemiğe direnç sağlar. Geri kalan %5'lik kısım ise proteoglikanların yanında, osteonektin, osteokalsin ve osteopontin adındaki proteinlerden oluşur. Mineral matriks basınçlara karşı dayanıklı olmasını sağlar ve toplam kemiğin yaklaşık olarak üçte ikisini oluşturur (Bayliss vd., 2012; Reece, 2004). Trabeküler kemik, ağ benzeri trabekül denen yapılar içerir ve bunların arasındaki boşluklar kemik iliği ile doludur. Trabeküler kemiğin yaklaşık %4'ü aktif rezorpsiyona katılırken, trabeküler yüzeylerin %10-15'i osteoidler ile korunur. Besinler kemik iliğinde kan damarlarından çıkıp, lamellerin kanaliküllerinden lakünadaki osteositlere difüzyon yoluyla geçerler (Fauci vd., 2013; Reece, 2004; Rizzo, 2015).

Kemiğin dış yüzü periosteum adı verilen hücre tabakasıyla kaplıdır. Bu hücre katmanının önemli özelliği kemiğin büyümesi ve tamiri için gerekli olan osteoprogenitör hücrelere sahip olmasıdır. Kemik iliği boşluğundaki endosteum tabakası da osteoprogenitör hücrelerle kaplıdır (Reece, 2004). Kemikte üç farklı hücre türü bulunur: matriks üreten osteoblast, doku emici osteoklast ve osteosit. Bunlar yetişkin bir iskeletteki tüm hücrelerin %90'ını oluşturur. Osteositler son derece uzmanlaşmış ve tamamen farklılaşmış osteoblastlar olarak görülebilir. Benzer şekilde, osteoblastlar yakın zamanda gelişmiş fibroblastlar olarak tanımlanmıştır. Fibroblastlar, osteoblastlar, osteositler ve adipositler pluripotent mezenşimal kök hücrelerden kaynaklanır. Aslında osteoklastlar hematopoietik kökenlidir. Prekürsörleri kemik iliğinin monositik fraksiyonunda bulunurlar (Sommerfeldt ve Rubin, 2001).

1.2.1. Kemik Dokusu Hücreleri

1.2.1.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik matriksinin organik bileşenlerin sentezinden yani Tip 1 kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden sorumludur. Kemiğin inorganik kısımlarının yapımının olabilmesi, canlı osteoblastların varlığına bağlıdır. Osteoblastlar kemik yüzeylerinde epitel hücrelerini andıran şekilde yan yana dizilirler. Matriks sentezini yapmaya başladıklarında şekilleri kübikten prizmatığe kadar değişebilir. Alkalen fosfataz

aktivitesi artar ve sitoplazma bazofilik hale gelir. Sentez faaliyetleri azaldıkça yassılaşırlar ve bazofilik özellikleri de azalır (Junqueira vd., 1998).

Osteoblast, endokrin fonksiyona da sahiptir. Kemiğin yapısal proteini olan osteokalsini sentezler. Osteokalsin, pankreastan insülin sekresyonunu uyarır ve adipositlerin insüline duyarlılığını arttırarak yağ dokunun büyümesini engeller (Saladin, 2015). Osteoblast, hücre membranında, paratiroid hormon (PTH) reseptörlerinde yüksek oranda bulunur. Bu membranda kalsitonine ait reseptör yoktur. Osteoblast hücre çekirdeğinde ise vitamin-D3 ve östrojen reseptörleri bulunmaktadır (Çay ve Sezer, 2002). Yapılan bazı çalışmalar, insan osteoblastlarındaki arjinin, alkalen fosfataz, nitrik oksit, Tip 1 kollajen ve IGF gibi kemik oluşumu markerleri adı verilen belirli parametreleri belirgin bir şekilde artırdığını göstermiştir. Bu belirteçler, kemik dokusunda hücresel düzeyde etkili olan kemik matriksinin sentezini arttırır. Arjinin'in kemik dokusu üzerindeki etkileri, doğrudan hücre çoğalma mekanizması üzerindeki etkisiyle ilişkilidir (Yaman vd., 2016).

1.2.1.2. Osteositler

Osteositler, kemik matriksi boyunca dağınık bulunan, osteoblastlara göre çok daha düşük kemik oluşturma aktivitesine sahip terminal diferansiyasyon hücrelerdir, ancak yetişkin kemik hücrelerinin %90'ından fazlasını oluştururlar. Osteoblastlara kıyasla osteositler, kemik yapısının belirlenmesinde ve bakımında merkezi bir rol oynamaktadır. Kemik matriksi, osteositleri birbirinden izole eder ve bunun yerine osteositler laküner canaliculi içinde çalışan osteositler (dendritik) işlemlerinin ayrıntılı bir ağıyla diğer osteositler ve kemik hücreleri ile etkileşir. Bu işlemler, kemiğin rezorpsiyonunu tetikleme potansiyeline sahip olabilir (Datta vd., 2008).

1.2.1.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar rezorbsiyona aktif şekilde giren kemik yüzeylerinde gözlemlenen çok büyük ve çok çekirdekli hücrelerdir ve sitoplazmaları zarsız ribozomlarca zengindir ve ayrıca sayısız lizozom mevcuttur (Reece, 2004). Bu hücreler kemik rezorpsiyonunun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış, Howship lakünası adı verilen, çukurcularda bulunurlar. Osteoklastların genellikle sitoplazmaları asidofiliktir (Junqueira vd., 1998). Osteoklastlar, monosit/makrofajlardan türeyen hücrelerdir. Osteoklast

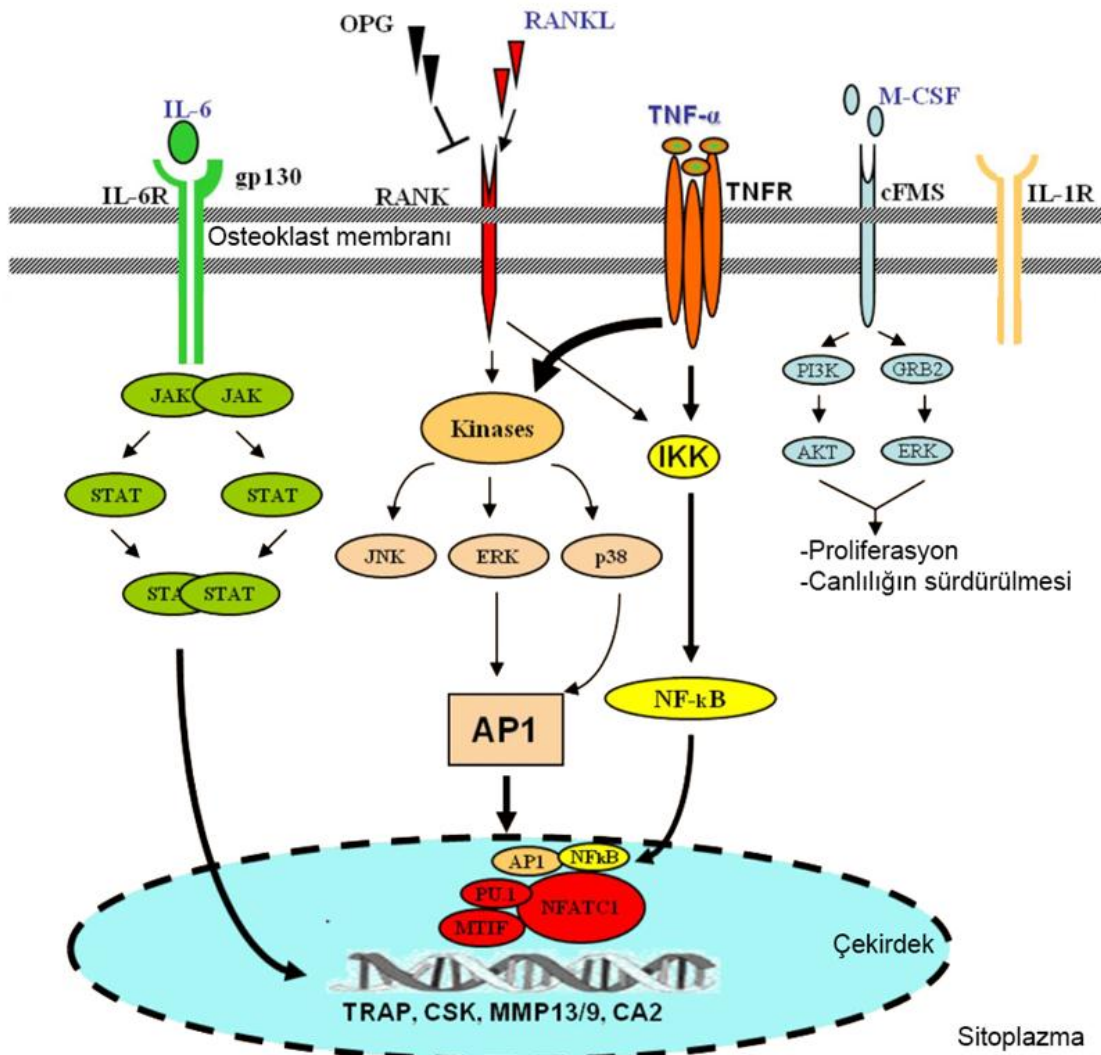
hücrelerinin fonksiyonları; osteoprotegerin, tümör nekroz faktörü tarafından uyarılan gen-6 (TSG-6) ve kalsitonin gibi bir dizi faktör tarafından düzenlenen kemik rezorbsiyonunda, kemik matriksinin ve mineral kısmının lokal olarak yıkımını sağlamaktır. Osteoklastik aktivite, osteoprotegerin ve kalsitonin tarafından azaltılır. Bununla birlikte, tiroid bezindeki parafoliküler hücreler, artan kalsiyum seviyesine karşı olarak kalsitonin sentezler ve kalsitonin direkt olarak osteoklastlar üzerindeki reseptörlere bağlanarak onların aktivitesini engeller (Bayliss vd., 2012).

Osteoklastlar, çeşitli faktörlerin etkisi altında, hematopoietik kök hücre dizisinin mononükleer hücrelerinden kaynaklanan terminal olarak farklılaşmış çok çekirdekli hücrelerdir. Bu faktörlerin arasında osteoprogenitör mezenkimal hücreler ve osteoblastlar tarafından salgılanan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve osteoblastlar, osteositler ve stromal hücreler tarafından salgılanan RANK ligandı da dahildir. Bu faktörler birlikte, osteoklastlarda transkripsiyon faktörlerinin ve gen ifadesinin aktivasyonunu teşvik ederler (Florencio-Silva vd., 2015). Osteoklast kemik resorpsiyon aktivitesinde artması nedeniyle osteoporoz, kemiğin Paget hastalığı, kemik kanseri metastazları ve iltihap artriti gibi birçok hastalık durumu oluşmaktadır (Datta vd., 2008).

1.3. Kemik Yıkımı

Osteoklastlar, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve NF-kB ligandının reseptör etkinleştiricisi (RANKL) ile uyarıldıktan sonra monosit kök hücreleri osteoklast prekürsörlerinden ayrılırlar (Boyle vd., 2003; Kong vd., 1999). Osteoblastlar ve kök hücreleri tarafından ifade edilen RANKL, osteoklast olgunlaşmasını ve aktivitesini uyarır. Osteoprotegerin (OPG) osteoblastik kök hücreleri tarafından sentezlenir ve RANKL reseptörünü bloke ederek, osteoklastogenezi inhibe eder (Kong vd., 1999). RANKL ve M-CSF, osteoklast formülasyonu için kritik faktörler olmasına rağmen, birçok pro-inflamatuar sitokinlerin osteoklast oluşumunu ve aktivitesini arttırdığı bilinmektedir; bunlar tümör nekroz faktörü (TNF- α), IL-1 ve IL-6 dır (Blair vd., 2005; Wei vd., 2005). Bu sitokinler aynı zamanda romatoid artriti gibi inflammatuar hastalıklarda lokalize osteoklast aktivitesinin ve kemik erozyonunda önemli rollere sahiptir. En sonunda RANKL reseptörü RANK ile olan etkileşimi ve proinflammatuar sitokinler transkripsiyon faktörü ve NF-kB'nin aktivasyonuna yol açar ve bunun ardından osteoklast farklılaşması, aktivasyonu ve hücre yaşamını destekleyen genlerin sentezlenmesine neden olur (Goldring, 2003; King

vd., 2012; Tanaka vd., 2005; Xing vd., 2002). RANKL varlığında, TNF- α , IL-6 ve IL-1 dahil olmak üzere çeşitli pro-inflamatuar sitokinler kooperatif olarak gelişmiş osteoklastogenezi düzenler. TNF- α , NF- κ B ve mitojen ile aktive protein kinazlar (MAPK'lar) ve IL-6 yoluyla JAK-STAT yolu üzerinden sinyaller verir. Belirtilen inflammatuar mekanizmalarla osteoklastların aktivasyonu aşırı sistemik ve lokal kemik kaybına yol açar (Şekil 1.2) (Osta vd., 2014).



Şekil 1.2. Osteoklast farklılaşması üzerine etkili olan moleküler faktörler (Osta vd., 2014).

1.3.1. Kemik Yıkımı ile İlişkili Biyomarkerlar

1.3.1.1. Nükleer Faktör Kappa Beta Ligandı Reseptör-Aktivatörü (RANKL) ve Osteoprotegerinin (OPG)

Moleküler biyolojik gelişmeler kemik yıkımında rol alan mekanizma ve proteinleri anlamada önemli yer tutmaktadır. Bu süreç RANK (nükleer faktör kappa beta'nın reseptör-aktivatörü), ligandı RANKL (nükleer faktör kappa beta ligandı reseptör-aktivatörü) ve OPG (osteoprotegerinin) olmak üzere üç protein içermektedir. Bu sistem osteotropik hormon ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. OPG/RANKL oranı (Glukokortikoidleri, interlökin-1 (IL-1), paratiroid hormonu (PTH), prostaglandin E2 (PGE2), vitamin D3 gibi glukokortikoidleri, inflamatuvar sitokinleri) azaltmakta ya da transforme edici büyüme faktörü- beta (TGF- β) ve östrojenleri artırmaktadır (Stejskal vd., 2001).

1.3.1.1.1. RANKL ve OPG'nin Yapısal Özellikleri

1.3.1.1.1.1. RANKL Kaynağı

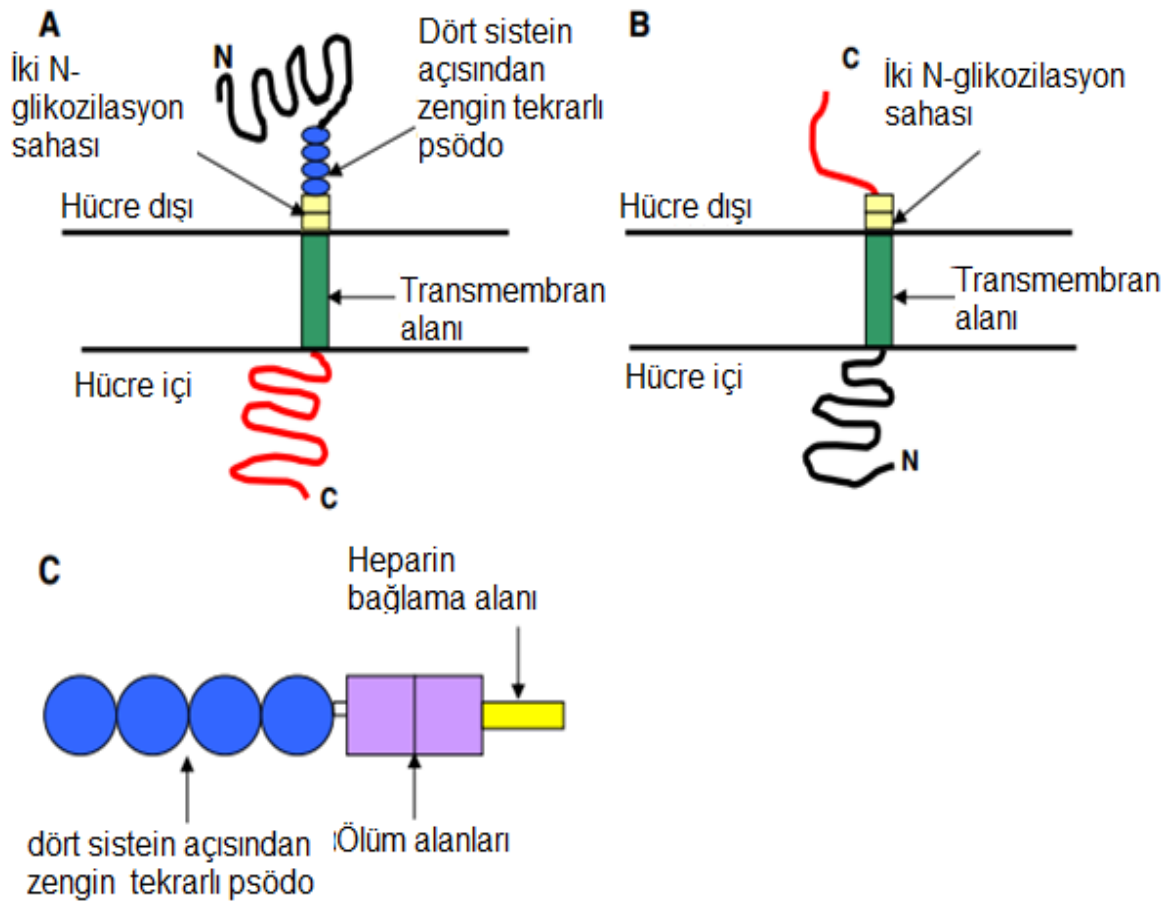
RANKL, RANK'ın aynı kökenli ligandı olup, birçok çalışma grubu tarafından rapor edilmiştir (Wright vd., 2009). RANKL, tümör nekroz faktörü (TNF) ile ilişkili bir protein olup, osteoblastlar ve bunların prekürsörleri, T lenfositler, B lenfositler ve mega karyositler gibi çok sayıda kemik hücreden sentezlenmektedir (Bord vd., 2004; Drugarin vd., 2003; Eghbali-Fatourehchi vd., 2003; Hofbauer ve Schoppet, 2004).

RANKL tek gen tarafından kodlanıp, üç izoforma sahiptir (Şekil 1.3, b). İnsanlarda tip 2 transmembran glikoproteini olarak iki izoformu bulunur (bu izoformlardan ikisi, 317 veya 270 aa'nın tip 2 transmembran bağlı glikoproteinleri olup, sonuncusu sadece daha kısa bir hücre içi etki ile diğerlerinden farklılık göstermektedir) (Ikeda vd., 2001). Üçüncü izoform ise solübl ligand (sRANKL) şeklindedir (bunlarda sadece 243 aa'lık üçüncü izoformlarda hem transmembran hem de sitoplazmik alanlar yoktur) (Ikeda vd., 2001; Sordillo ve Pearse, 2003). Herbir izoform osteoklastogenezi aktive etme özelliğine sahiptir (Drugarin vd., 2003; Ito ve Hata, 2004).

İnsan ve fare RANKL proteinleri %83-87 oranında homoloji gösterir (en büyük murin transmembran izoformu 316 aa'dır). İnsan RANKL (317 aa) ve fare RANKL (316

aa) genlerinin sekans analizlerinde, fare RANKL geninin N-glikozilasyon parçalarında ve aminoasit fragmanlarında farklar gözlenmektedir (197 aa ve 263 aa) (Wright vd., 2009).

Farklı varyantlarının olması RANKL izoformlarının farklı görevleri olduğu kanısını ortaya koymaktadır. Çoğu izoformun tam olarak işlevi bilinmemesine rağmen membrana bağlı RANKL, osteoklast ve diğer prekürsörlerin hücre-hücre ilişkisini düzenleyerek difüzyonun ve hedef hücrelerin aktive olmasını sağlayabilirler. En başta RANKL eksprese eden hücreler, doğru remodelling sürecinde kemik yıkımına yakın lokalize olmalıdır. İkinci olarak rezorbsiyon sistemik olarak devam edebilir. sRANKL hücre membranının MMP-14 ile parçalanmasıyla da oluşabilir (Hikita vd., 2005).



Şekil 1.3. Diyagramatik gösterimler: a) RANK, b) RANKL ve c) OPG (Wright vd., 2009).

1.3.1.1.2. OPG Kaynağı

OPG ilk olarak rat intestinal cDNA sekans çalışmaları sırasında TNFR ailesiyle homolog sekanslara sahip olarak tanımlanmıştır (Simonet vd., 1997). Kemik üzerindeki

koruyucu etkilerinden dolayı protein olarak adlandırılmıştır. OPG, osteoblastlar ve kemik iliği stromal hücreleri gibi mezenkimal hücrelerden salınan solübl bir glikoproteindir (Kondo vd., 2004; Woo vd., 2002).

401 aa'lık yapı OPG'ye 60 kDa moleküler ağırlık oluşturur ve heparinin bağlandığı 400 aa'lık sistein parçası 120 kDa'luk dimer oluşturmaktadır (Yamaguchi vd., 1998). Monomerik ve dimerik OPG molekülleri oluşmadan önce, olgun 380 aa'lık OPG molekülü oluşturmak için N terminal ucundan sinyal molekülü ile ayrılır (Anderson vd., 1997; Simonet vd., 1997).

RANK ve RANKL moleküllerinin aksine OPG'nin, transmembranal ya da sitoplazmik herhangi bir parçası yoktur. İnsan ve rat OPG molekülleri, N terminal bölgede sisteinden zengin 4 tekrar içeren C terminalinde de heparin bağlanma bölgesi bulunan ve 21 aa'lık sinyal peptidi bulunan toplam 401 aa'dan oluşmaktadırlar (Şekil 1.3, c). Sisteinden zengin 4 tekrar RANKL trimerini etkileyerek RANK'la etkileşmesini ve bunun sonucu olarakta osteoklastogenezi önler (Sordillo ve Pearse, 2003; Wright vd., 2009).

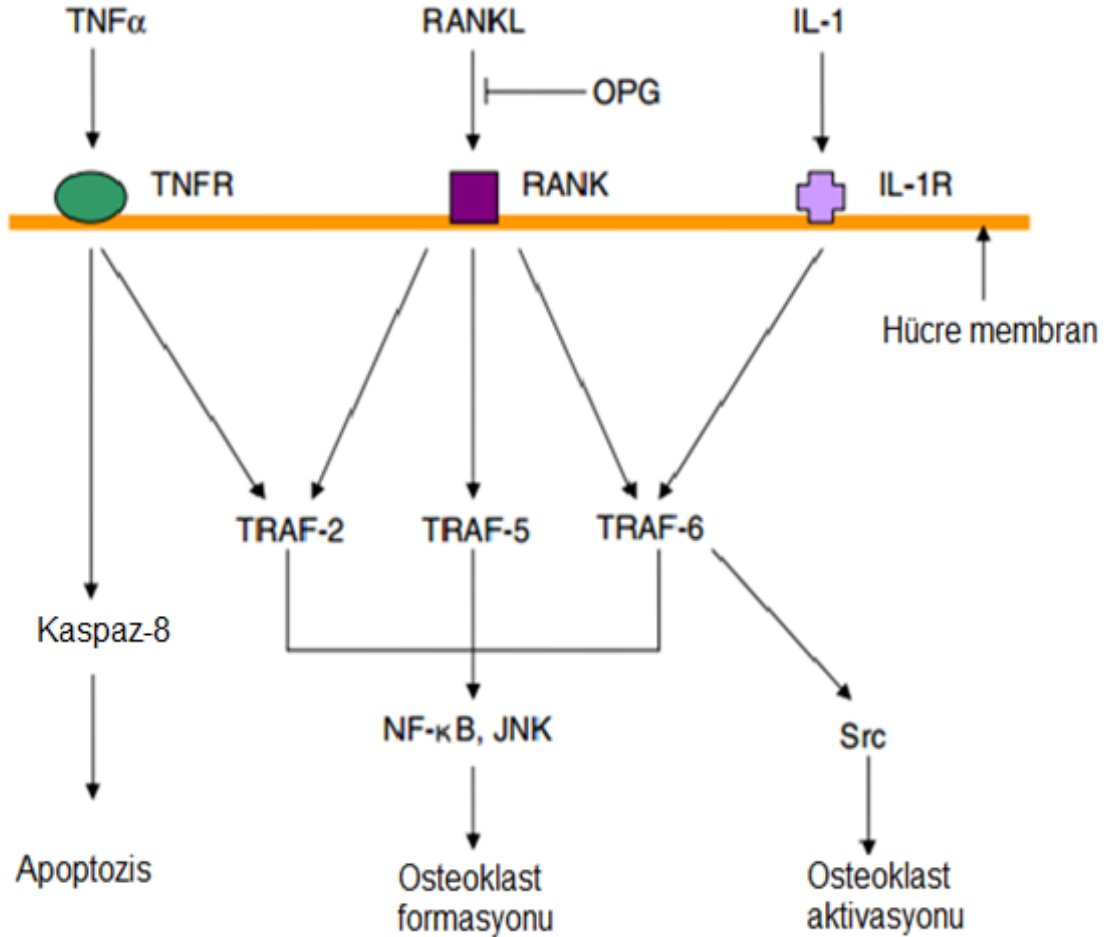
1.3.1.1.2. RANKL ve OPG'nin İşlevi

1.3.1.1.2.1. RANKL

RANKL ekspresyonu kalsitropik hormonun etkisiyle çok sayıda sitokin aracılığıyla oluşur (bu sitokinler IL-1, TNF- α ve IL-11 ve PTH, 1,25-dihidroksivitamin D3 (1,25D₃) ve prostaglandin E2'yi içeren kalsitropik hormonlardır) (Hofbauer ve Heufelder, 2001; O'Brien vd., 2001). Artmış RANKL oluşumu osteoklast oluşumunu sağlayarak kemik yıkımını artırır. OPG reseptörü dahili kemik döngüsü üzerine anahtar rol oynamaktadır (Wright vd., 2009).

Wnt sinyal yolağı embriyoneenez, kanser ve normal fizyolojik süreçlerinde ve de kemik yapımı ve yıkımını düzenleyici özellikleri nedeniyle ilgi toplayan bir alandır. Özet olarak doğal Wnt yolağı B-catenin çekirdeğe translokasyonu ile sonuçlanan sinyal yolağıdır. B-catenin reseptöre bağlanınca hedef gende transkripsiyon başlar. Wnt sinyal yolağı osteoblastın normal fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gereklidir (Glass vd., 2005; Hopwood vd., 2007). Osteoblastlar tarafından solübl Wnt inhibitörü olarak sentezlenen sFRP proteininin, sRANKL proteinine bağlandığı rapor edilmiştir. Bu da osteoblastların osteoklast oluşumunu önlediği başka bir yolak olarak gösterilebilir. Bu ilişki aynı zamanda

kemik yıkımının Wnt sinyal yolağında inhibe ederek kontrol edilebileceğini gösteren bir diğer yoldur (Şekil 1.4) (Wright vd., 2009).



Şekil 1.4. RANK-RANKL bağlanması ve OPG tarafından RANK-RANKL bağlanmasının inhibisyonunu gösteren sinyal yollarının şematik gösterimi (Wright vd., 2009'dan modifiye edilerek alınmıştır).

1.3.1.1.2.2. OPG

OPG, RANK ve RANKL bağlanmasını engeller. OPG RANKL'a bağlanarak osteoklast oluşumunu engeller buda kemik yıkımının önüne geçer (Kong vd., 2000). IL-1, TNF- α ve TGF- β , OPG sekresyonunu artırıcı yönde; PTH, PGE₂ ve 1,25D₃'te OPG sekresyonunu azaltıcı yönde etki eder (Hofbauer ve Schoppet, 2004; Kondo vd., 2004; O'Brien vd., 2001). Fare kafatası kemiği prostaglandin üretimini bloklamak için verilen indometazin kullanılarak yapılan çalışmalarda, OPG molekülünün osteoklast adezyonunu

modüle ettiği görülmüştür. Aynı çalışmada, OPG'nin osteoklast salınımı ve kemik yüzeyine yapışmasını önlediği bulunmuştur (O'Brien vd., 2001).

RANKL'dan daha az affiniteye sahip olmasına rağmen, OPG molekülünün TRAIL'e bağlandığı gösterilmiştir (Emery vd., 1998; Lam vd., 2001). TRAIL 33-34 kDa kütleinde özellikle kanser hücreleri olmak üzere apoptotik hücre ölümüne aracılık etmektedir. TRAIL hücre yüzeyinde sitoplazmik ölüm parçalarına bağlanmaktadır. Bağlanmadan sonra TRAIL apoptozisi başlatan sinyali oluşturur (Gochuico vd., 2000). OPG'nin TRAIL'e bağlanması TRAIL aracılı apoptozisi Jurkat hücre kültürlerinde inhibe ettiği bulunmuştur (Emery vd., 1998). Ancak OPG'nin TRAIL'e bağlanmasının önemi henüz anlaşılamamıştır. OPG aynı zamanda heparin/heparin sülfata bağlanabilmektedir. Heparin sülfatlar hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlardan sentezlenmektedir. HSPGs, hücre yüzey sinyal mekanizmasında, hücre kontrolünde, aktin hücre iskeleti düzenlenmesinde, hücre adezyon ve migrasyonunda görev almaktadırlar (Mosheimer vd., 2005).

1.3.1.1.3. RANK/RANKL/OPG'nin Osteoklastogenezdeki Önemli Fizyolojik Rolü

Osteoklastlar, kemik yıkımında öncelikli sorumlu olan hematopoetik orjinli çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoblast ve türevi hücrelerden sentezlenen faktörlerin, osteoklast gelişimi ve farklılaşmasını etkilediği uzun zamandan beri bilinmektedir. CSFs (koloni uyarıcı faktörler), TNFs (tümör nekroz faktörleri), ILs (interlökinler) ve prostaglandinler (PGs) gibi çok sayıda sitokin ve kalsiotropik faktörlerin, osteoklastojenik etkiyi düzenlediği gösterilmiştir. Ancak kemik iliği ile stromal hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantısı için daha başka faktörlere ihtiyaç vardır. Osteoklastogenezin sitümülasyonuna ek olarak stromal hücreler osteoklastojenezi inhibe eden sinyalleri oluşturabilirler. Bu yüzden kemik yapımı ve yıkımını dinamik bir şekilde düzenlerler (Dougall ve Chaisson, 2006; Martin, 2004).

Hücre kültürlerinde fibroblastlardan elde edilen osteoklastogenez inhibitör faktörün, (OCIF) *in vitro* ortamda osteoklastları inhibe ettikleri görülmüştür. Başka bir çalışmada da aynı protein rat intestinal cDNA'sında tanımlanmış ve ad olarakta osteoprotegerin (OPG) verilmiştir. OPG; TNF reseptör ailesinin bir parçasıdır. OPG monomer olarak sentez edilip, disülfid bağlı homodimer olarak sentez edilir. OPG'nin transgenik olarak yüksek olarak eksprese eden farelerin iskelet dansitesinin artmış olması

gösterilerek, OPG'nin kemik kütlesi üzerine olan düzenleyici etkisi ortaya konmuştur. Osteoklast sayısının düşmüş olmasına bağlı olarak osteopetrosis ve kemik dansitesinde önemli artışlar gözlenmiştir. OPG'nin aktivasyonunun baskılandığı farelerde kemik yıkımı artmış ve osteoporoz andıran değişiklikler olmuştur. Bulgular birlikte değerlendirildiğinde, OPG'nin kemik yıkımını azaltıcı bir molekül olduğu kararına varılmıştır (Dougall ve Chaisson, 2006).

OPG'nin TNF süper ailesinin bir üyesi olan RANKL'a bağlandığını ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. RANKL tip 2 transmembran proteinidir ve kemik iliğinden ve aktive T hücrelerden eksprese edilir. RANKL solübl formu proteoliz sonucu ya da alternatif mRNA splicing sonucu ortaya çıkar. RANKL geninin tamamen eksik olduğu farelerde osteoklast eksikliği ve osteopetrozis oluşur. CSF-1'in varlığında RANKL stroma hücrelerini osteoklasta dönüştürebilir ve RANKL^{-/-} olmayan hematopoetik hücrelerin RANKL'la muamele edilmesinden sonra osteoklast dönüşümünün gerçekleşmesi RANKL'ın osteoklast oluşumundaki rolünü açıklamaktadır. Daha önemlisi RANKL sadece osteoklast oluşumu için değil, ayrıca osteoklastın aktive edilmesi ve yaşamının sürdürülmesini de sağlamaktadır (Dougall ve Chaisson, 2006; Ikeda vd., 2001; Kong, 1999; Lynch vd., 2005).

RANKL'ın stromal hücreler tarafından sentez edilmesi, kemik yıkımını sitümüle eden hormonlar ve faktörler tarafından regüle edilmektedir (Boyle vd., 2003). Etki gösteren moleküller arasında CSF-1 (koloni uyarıcı faktör-1), TNF (tümör nekroz faktörleri), protaglandinler, steroidler, PTH (paratiroid hormonu), PTH ile ilişkili proteinler (PTHrP), interlökinler (IL-1, IL-6 ve IL-11) bulunmaktadır (Martin, 2004). Osteoklastogenezin regülasyonu RANKL (IL-1, IL-6, IL-11, IL-17, PGE2, PTH, PTHrP, glukokortikoidler) sentezinin artması ve OPG (PTH, PTHrP, PGE2, glukokortikoidler) ekspresyonunun azalması ile olmaktadır (Boyle vd., 2003).

RANKL; RANK'a bağlanıp aktive eden bir TNFR ailesi mensubudur. RANKL olmayan farelerde olduğu gibi, RANK olmayan farelerde de osteoklast aktivitesi azalır ve osteopetrozis olur. Osteoklast eksikliği hematopoetik hücrelerin, hücre otonom defektidir. RANK olmayan fareler, PTHrP, IL-1 ve TNF- α gibi kalsiotropik faktörlerin etkilerine dirençlidir. Buna ek olarak, RANKL değişimi ve OPG reseptör tuzağı dışında osteoklastogenezin regülasyonu, RANK ekspresyonu ile de olur. Sonuç olarak, RANKL ve RANK birleşmesi osteoklastogenez için temel pozitif uyarıdır. Bunu dengeleyen ise, OPG aktivitesidir (Dougall ve Chaisson, 2006; Li vd., 2000; Wada vd., 2006; Wei vd., 2005).

1.3.1.2. Osteokalsin (OSC)

Osteokalsin primer olarak osteoblastlar tarafından sentezlenen ve hidroksiapatit kristali şeklinde kemik mineral matriksinde depolanan 46-50 aa'lık kemik γ -karboksiglutamik asit (Gla) veya BGP proteini olarak isimlendirebileceğimiz bir moleküldür. Osteokalsin keşfedildiğinden günümüze kemik yapım belirteci olarak görülmektedir (Zanatta vd., 2014; Zocha vd., 2016). Küçük miktarlarda osteokalsin odontoblastlardan ve hipertrofik kondrositlerden de sentez edilir. Protein ilk olarak insan ve hayvan kemiklerinde Gla içeren proteinlerin majör fraksiyonu olarak izole edilmiştir. Bu proteinde koagülasyon süreçlerinde aktif olan vitamin K-bağımlı protein ailesinin birer alt gruplarıdır (Zocha vd., 2016).

1989 yılında 12. kromozomun kısa kolunda 3.9 kb'lık bir gen tarafından kodlandığı bulunmuştur. Promotor bölgeleri vitamin K transkripsiyonundan sorumlu maddelerden ve düzenleyici bölgelerden oluştuğu ortaya koyulmuştur. Prepromolekül 84 aa'ten oluşmaktadır ve vitamin K bağımlı posttranskripsiyonel süreçlerden sonra propeptidlerden kurtulmaktadır. Üç glutamik asid rezidüsü üzerinden karboksile olarak Gla proteini adını alır ve bu protein hidroksiapatit mineral Osteoid matriks üzerine yüksek affiniteye sahiptir (Zanatta vd., 2014). İnsan osteokalsin geni 1. kromozomda 1q25–q31 lokalize ve 98 aa'lık preproprotein olarak eksprese edilmektedir. Olgun peptit oluşana kadar γ -glutamil karboksilazın enzimatik olarak aktif olduğu üç karboksilasyon evresi gerçekleşir. Enzim CO_2 , O_2 ve K vitaminini kofaktör olarak kullanır (Stafford, 2005; Zocha vd., 2016).

Tüm vitamin K bağımlı Gla proteinleri kalsiyum bağlamaları ve karboksilaz bağlanma bölgelerinin aynı olmasından dolayı aynı kökenden geldiği düşünülmektedir. K Gla proteinleri kanın pıhtılaşması sırasında kalsiyum bağlar, osteokalsin ise hidroksiapatit oluşumunda kalsiyumları bağlama görevi görür (Sunnerhagen vd., 1996; Willems vd., 2014).

Gla proteininin gerçek fizyolojik önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun nedeni, hayvan deneylerinde azlığı ve çokluğunun kemik genotipi üzerine olan etkileri gösterilememesidir. Reabsorbsiyon lakunasında kemik mineral matriks asidifikasyonu sürecinde karboksile osteokalsin glutamik asitlerini kaybeder. Böylece kemiğe olan affinitesi azalır ve hormonal olarak aktif olan kısmı kana salınır (Zanatta vd., 2014).

Osteokalsin kemiğe özgü bir protein olup, içinde γ -karbonunun karboksile edildiği üç glutamat eklentisine sahiptir. Bu karboksilasyon reaksiyonu, K vitaminine bağımlı bir

süreçtir. Osteokalsinin sentezi D vitamininin hormonal formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D ile düzenlenmektedir. Osteokalsin, hidroksiapatit kalıntılarının oluşumunu baskılıyor görünmektedir. Bu nedenle mineralizasyonu da baskılıyor olabilir. Osteokalsin kandaki lökositleri kimyasal olarak cezbeder. Bu da rezorbsiyon ve tekrar modelleme ihtiyacı olan kemik bölgesine osteoklastların çekilmesinde bir rol oynadığını düşündürmektedir (Reece, 2004).

Osteokalsinin tüm vücut metabolizması üzerinde hormonal etkileri vardır. İnsüline cevap olarak düşük pH da kemik yıkımında osteoblastlar tarafından hormon gibi sentez edilip kana salınır. Osteokalsin insülin sensitivitesini artırıcı yönde etki gösterir, bu etkisi yağ dokusundan sentez edilen adiponektinin artışına kısmen bağlı olabilir. Osteokalsin pankreasta insülin sentezinin artırılmasının yanısıra, beta hücre sayısını da artırıcı etki gösterir. Tüm bunlara ek olarak, beyinde nörotransmitter sentezini ve testislerde de testosteron sentezini artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (Zocha vd., 2016).

1.3.1.2.1. Mineralizasyonda Osteokalsin Rolü

Olgun osteokalsin proteini, kemik üzerinde kalsiyum iyonlarının hidroksiapatit kristalleri içinde birikmesini sağlar. Ancak yeni çalışmalar ise, osteokalsinin kemik mineralizasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. K vitamini karboksilasyonunu önleyerek etki eden warfarinin, fareler üzerine kronik uygulanmasını takip eden kemiğin aşırı mineralize olması ve büyüme plağının erken kapanmasının gözlenmesi, osteokalsinin kemik mineralizasyonunu önleyici etki gösterdiğini destekler niteliktedir (Zocha vd., 2016).

Bir çalışmada, osteokalsin molekülünün kemik üzerine olan etkilerinin tam anlatılabilmesi için osteokalsin eksprese etmeyen fareler kullanılmış ve çalışmada yaşa bağlı fare kemiklerinin kütlelerinde artış gözlenmiş; fakat kemik yıkımına etkisi olmadığı görülmüştür. Kemik matriksinin Fourier mikrospektroskopisi ile analizinde de mineral matriks oranı yaşlı farelerde artmış olduğu bulundu. Ek olarak, hidroksiapatit kristallerinin boyutu artmıştı. Ancak dentin oluşumu osteokalsin olmayan farelerde odontoblastlar tarafından normal şekilde oluşturulmuştu ve farelerdeki osteokalsin overekspresyonun normal kemik mineralizasyonu ile ilişkili olduğu analiz edilmiştir. Bu yüzden, osteokalsinin kemik matriksi üzerine olan etkisi anlaşılamamıştır ve osteokalsinin kemik mineralizasyonu üzerine olan inhibitör etkileri matriks gla proteinden (MGP) az olduğu,

MGP olmayan farelerde aort kalsifikasyonun olması ihtimalinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Boskey vd., 1998; Bronckers vd., 1998; Murshed, 2004).

Başka çalışmalar, osteokalsin'in kemik matriksi üzerine mekanik etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Osteopontin ile birlikte kollajen oluşumu ve hidroksiapatit kristallerine sıkıca bağlanma yeteneği, osteokalsinin kemiğin matriks ile mineral fraksiyonları arasında bir köprü işlevi olabileceğini göstermektedir. Bu öngörü, kemik kırıklarındaki iyileşme süreçlerinde bariz olarak ortaya çıkar. Bu durumda, osteokalsin ve osteopontin kırık büyümesini dengelemek için beraber hareket eder. Osteopontin veya osteokalsinin tek başlarına ya da birlikte bulunmadığı farelerde kemik kırık sertliğinin azalması bu görüşleri destekler niteliktedir (Nikel vd., 2013; Poundarik vd., 2012; Zocha vd., 2016).

1.3.1.3. İnterlökün (IL)-6

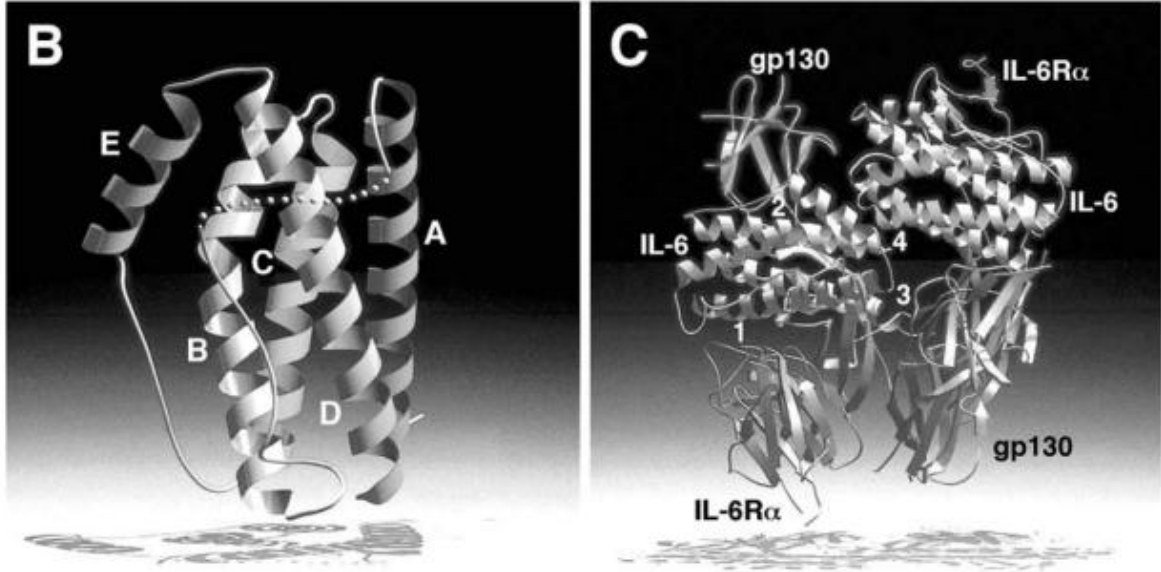
Geçmiş çalışmalarda, aktive B hücrelerini antikor üreten hücrelere ayırmak için tetikleyen T hücre kaynaklı faktör olarak Interleukin-6 (IL-6)'ı tespit edilmiştir. İnsan IL-6, kromozom 7p21'de bulunan bir gen tarafından kodlanan 212 amino asitten oluşan 26 kDa'lık bir proteindir (Marina vd., 2017). IL-6 proteini, posttranskripsiyonel olarak glikolize edilmiş ve serin kalıntıları üzerinde fosforile edilmiştir. Glikozilasyon, IL-6'nın biyolojik aktivitesi için gerekli görünmemektedir. Çünkü prokaryotlar (*Escherichia coli*) tarafından üretilen rekombinant IL-6 proteini fonksiyonel görünmektedir. İnsan IL-6 fare hücrelerinde işlevsel olarak aktiftir. Ancak fare IL-6 insan hücrelerinde aktif değildir. Şekil 1.5 b'de gösterildiği gibi, insan IL-6'nın X-ışını kristal yapısı, birçok "sitokin" in kristal yapısına benzer dört helezonlu bir demettir ve ilave olarak "heliks E" şeklindedir. A ve B sarmalları aynı yönde ilerler ve C ve D sarmalları ters yöndedir (Kamimura ve Hirano, 2003).

A

```

MNSFSTSAFG PVAFSLGLLL VLPAAFPAPV PPGEDSKDVA APHRQPLTSS 50
ERIDKQIRYI LDGIALRKE T***KN***SNM***CES SKEALAENNL NLPKMAEKDG 100
helix A
CFQSGFNEET CLVKIITGLL EFEVYLEYLO N***R***FES***SEEQA RAVQMSTKVL 150
helix B helix C
IQFLQKKAKN LDAITTPDPT TNASLLTKLO AQ***NQWLQDMT TH***LILRSFKE 200
helix E helix D
FLQSSLRALR QM 212

```



Şekil 1.5. İnsan IL-6'nın amino asit dizisi ve X-ışını kristalografisi. (A) İnsan IL-6'nın amino asit dizisi. Amino asitler tek harfli kod kullanılarak ifade edilmiştir. Sinyal peptidi gölgeli, dört-sistein motifi kutuya konulmuş ve potansiyel N-bağlantılı glikozilasyon bölgeleri yıldız işaretleriyle gösterilmiştir. A'dan E'ye heliceslerin altı çizilir. (B) Rekombinant insan IL-6'nın 1.9-Å X-ışını kristalografisi yapısı. IL-6'nın, elektron yoğunluk haritasında görünmeyen N-terminali 18 amino asitleri noktalı çizgi ile gösterilir. (C) IL-6/IL-6Rα/gp130 kompleksinin heksamer modeli. Önerilen bağlanma alanları etiketlenmiştir ve IL-6'daki 1 ile 4 arasındaki bölgelere karşılık gelmektedir (Kamimura ve Hirano, 2003).

İnterlökin (IL) -6, T ve B lenfositleri ve sinovyal fibroblastlarında içinde bulunduğu çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen pleiotropik bir sitokindir. T hücresi aktivasyonu, B hücresi olgunlaşması, akut faz cevabının indüksiyonu ve hematopoietik öncü hücre büyüme faktörlerinin uyarılmasında dahil olmak üzere çeşitli etkileri vardır (Choy, 2008). Klonlamadan önce B hücresi uyarıcı faktör, hepatosit uyarıcı faktör ve interferon β 2 olarak tanımlanmış ve tüm bu aktivitelerin tek bir moleküle atfedilebildiğini göstermiştir (Kishimoto, 2006). IL-6, membrana bağlı reseptör IL-6R 'ya bağlanır ve bu kompleks protein gp130 ile ilişkili olup dimerizasyonunu indükler ve JAK/STAT yolağı vasıtasıyla hücre içi sinyali aktive eder (Davies ve Choy, 2014; Rose-John, 2012). Gp130 yaygın olarak üretilen bir zar proteinidir. IL-6R ise yalnızca hepatositleri ve bazı lökositler de dahil olmak üzere vücuttaki birkaç hücrede bulunur. IL-6 ile bağlanan ve daha sonra trans-

sinyalleşme adı verilen bir süreç olan gp130 ile bir kompleks oluşturabilen çözünebilir bir IL-6 reseptör (sIL-6R) formu da mevcuttur. Membrana bağlı IL-6R yoluyla klasik IL-6 sinyali, rejeneratif veya anti-inflamatuar süreçler için de gerekli olmasının yanında IL-6 trans-sinyalizasyonunun pro-inflamatuar olduğuna dair kanıtlar vardır (Jones vd., 2011). IL-6 gibi proinflamatuar sitokinlere yanıt olarak, STAT-3, Janus kinazları yoluyla tirozin fosforilasyonu ile aktive edilir (Ganesan ve Rasool, 2017).

Genellikle, IL-6'nın vücutta farklı rolleri vardır. IL-6'nın ana rolü bir pro-inflamatuar sitokin gibi olmaktır. IL-6, inflammatuar yanıtları çoğaltabilir. IL-6'nın, otoimmünite indüksiyonunda bölünmesi, B hücrelerinde ve nöronal hücrelerin farklılaşmasında rol oynaması, akut faz proteinlerinin indüksiyonu (hepatositlerde C-reaktiv protein (CRP) ve serum amiloid proteini A, haptoglobin, α -1 antikom tripsin ve fibrinojen gibi) rolleri vardır. IL-6, hepatositlerde fibronektin, albumin, transferrin ve sitokrom P450 üretimini azaltır. İnflamatuar hipoferremia ve hipozenkemi aynı zamanda karaciğer çinko alımını ve hipozincemi artıran bağırsak demir taşıyıcısı ferroportin-1'i ve çinko taşıyıcısı (Zip14) indüklemeye götürecektir hepatosit üzerinde etkili olan IL-6 hepcidin indüksiyonu ile ilişkilidir. IL-6'nın diğer rolleri: osteoklastları ve kemik rezorpsiyonunu aktive edecek olan kemik iliği stromal hücrelerinde NF-kappa ligandının (RANKL) reseptör aktivatörünün indüklenmesi, fibroblastlar ve organ anjiyogeneziden vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) indüksiyonu ve salgılanması, fibroblastlar ve kan koagülasyonunun alevlenmesinde kollajen ve düz kas aktin üretimidir. IL-6, fibroblastlar, miyositler, osteoblastlar ve endotel hücreleri gibi inflammatuar olmayan hücreler ve inflammatuar hücrelerin (lenfositler, makrofajlar, monositler, nötrofiller) dahil olduğu çeşitli hücreler tarafından üretilir (Zahir-Jouzdani vd., 2017).

IL-6, osteoklast farklılaşmasının kuvvetli bir uyarıcısıdır. Bununla birlikte sIL-6R ile kompleksler oluşturarak, ardından osteoklast soy hücrelerini membrana bağlı gp130 aracılığıyla stimüle ederek mononükleer hücrelerin osteoklastlara farklılaşmasını doğrudan uyarabilirler. IL-6 aynı zamanda osteoblast soy hücreleri üzerinde etki yapar, nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörünü indükler ve dolaylı olarak osteoklastogenezi uyarır. IL-6R'nın blokajının *in vivo* ve *in vitro* olarak IL-6'nın bu osteoklastogenik etkisini durdurduğu gösterilmiştir (Axmann vd., 2009; Davies ve Choy, 2014; Yoshitake vd., 2008).

1.3.1.4. Tümör Nekrozis Edici Faktör (TNF- α)

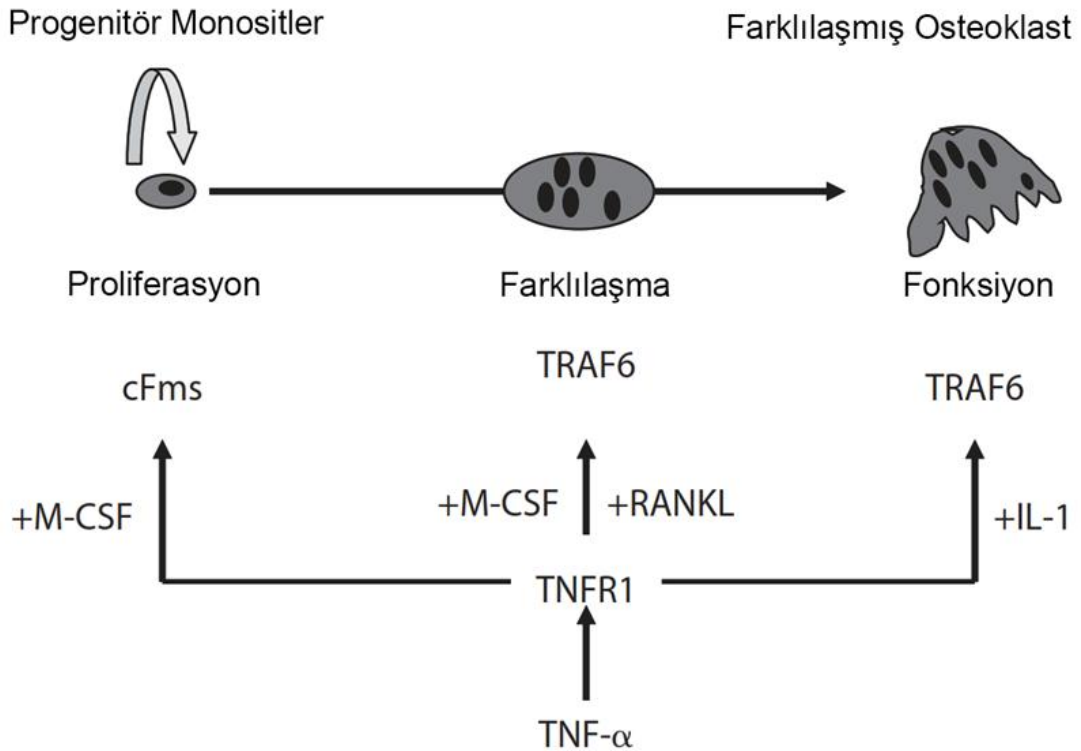
Tümör nekrozis faktörü alfa (TNF- α), çeşitli hücre sinyal yollarını harekete geçiren transmembran reseptörlere düzenleyiciler olarak bağlanan büyük bir sitokin ailesinin prototipidir. Çeşitli TNF üyeleri, hücreye özgü farklılaşma ve apoptoz kontrolü ile ilgilenmektedir. En önemlisi, TNF- α 'nın lenfoid organların gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, TNF- α , akut veya kronik inflamasyonun yanı sıra patojenlere karşı konakçı savunmada önemli bir düzenleyicidir. Böylece, TNF- α hem uyarlanabilir hem de doğuştan gelen bağışık yanıtların kilit bir elemanıdır (David ve Schett, 2010). TNF- α , ayrıca, diğer çeşitli sitokinler ve kemokinlerin salgılanmasına neden olur (Koca vd., 2008).

TNF- α , tümör hücrelerine karşı sitotoksitesinin keşfedilmesinin ardından 1984 yılında adlandırılmıştır. İki biyoaktif formda bulunur: sırasıyla 26 ve 17 kD'lik molekül ağırlığına sahip transmembran formu (tmTNF- α) ve salgı formu (sTNF- α). Sekretuar TNF- α , metalloproteaz TNF- α -dönüştürücü enzim (TACE) tarafından tmTNF- α 'den proteolitik bölünme ile salınır (Tian vd., 2015; Zhou vd., 2017).

TNF- α , her yerde bulunan bir sitokindir (Tian vd., 2015). TNF- α temel hücre kaynağı aktive olan mononükleer fagositlerden oluşmaktadır. Bununla birlikte aktif T hücreleri, NK hücreleri ve mast hücreleri de TNF kaynağıdır. TNF salınımı makrofajlarda en güçlü uyarıcı lipopolisakkarit (LPS)'dir. Bunun yanı sıra, T hücreleri ve NK hücreleri tarafından üretilen INF- γ , LPS ile uyarılmış makrofajlardan TNF salınım miktarını artırmaktadır. TNF- α 'nın temel fonksiyonu nötrofillerin ve monositlerin enfeksiyon alanına toplanmasını uyarmaktır. Bu uyarım etkisini vasküler endotel hücrelerin ve lökositlerin fonksiyonlarını etkileyerek gerçekleştirmektedir. TNF, vasküler endotel hücrelerden adezyon moleküllerinin salınımına neden olarak öncelikle nötrofillerin ve sonrasında monosit ve lenfositlerin endotel yüzeyine yapışmasını sağlamaktadır. Ayrıca endotel hücrelerden ve makrofajlardan kemokin salınımına yol açar. Dolayısıyla lökosit kemotaksisini ve enfeksiyon alanına toplanmasını uyarır. Şiddetli enfeksiyonlarda, sistemik düzeyde klinik ve patolojik düzensizliklerin gelişmesine yüksek oranda TNF üretimine neden olur. Eğer üretimine neden olan uyarı çok güçlü ise TNF kan dolaşımına geçer ve bir endokrin hormonu gibi fonksiyon gösterir (Lee vd., 2011). TNF- α ayrıca, sitotoksite, farklılaşma, büyüme stimülasyonu, bağışıklık modülasyonu ve proinflamatuvar

aktivite, apoptozisle gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarla da ilişkilidir (Bahcecioglu vd., 2008).

TNF- α kemik homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynar ve osteoblast farklılaşmasını inhibe ederken osteoklastogenezisi aktive eder. Dolayısıyla TNF- α inhibe edilince kemik oluşumunda artma görülür (Osta vd., 2014). TNF- α , TNFR1 ve 2 olmak üzere iki reseptör aracılığıyla etkisini gösterir. TNFR1 kaspaz ve NF- κ B gibi aktivatör faktörlerin aktivasyonu yoluyla pro-inflamatuar sitokinlerin, kemokinlerin ve anti-apoptotik moleküllerin transkripsiyonuyla sonuçlanan apoptotik sinyalleme başlatarak osteoklastik farklılaşmada rol alır (MacEwan, 2002). RANKL, RANK'a bağlandıktan sonra osteoklast farklılaşması için gereken NF- κ B, AP-1 ve NFATc1 transkripsiyon faktörlerinin sentezini aktive eder (Karsenty, 2008). TNF- α , RANKL ile ilişkili osteoklastogenezisi RANK reseptörlerinin ekspresyon seviyesini artırarak gösterir. Ancak osteoklastların rezorptif aktiviteleri üzerine tam etkilerini IL-1 ile birlikte gösterebilir (Şekil 1.6) (Zhang vd., 2001).



Şekil 1.6. TNF- α 'nın osteoklast farklılaşması üzerine etkisi (David ve Schett, 2010).

1.3.1.5. Tip 1 Kollajen

Kollajenler üçlü heliks yapısına sahip fibröz özellikte büyük bir protein ailesidir. Vertebralardaki total protein miktarının yüzde otuzu kollajenden oluşturmaktadır. Kollajenlerin ana rolü fibrilleri güçlü şekilde bir arada tutarak omurga yapısını oluşturmaktır. Ancak kollajenler hücre sinyal yolları diferansiyasyonu, hareket iletişim ve apoptozisinde önemli roller almaktadır. Kollajenler büyüme faktörlerine bağlanarak doku tamiri ve rejenerasyonunda görevler üstlenir (Ferraro vd., 2017).

29 farklı tipi tanımlanan kollajenin en çok bulunan tipi, Tip 1 kollajendir. Fibril oluşturan kollajenler Tip 1-2-3-4-11-24 ve 27'dir. Bunlar kollajen ailesinin yüzde doksanını oluşturmaktadır. Tip 1 kollajen kemiğin yüzde 90'nını oluşturmakta ve tendon deri ligament ve korneanın ana yapı taşıdır. Gerilme gücü, döndürülmeye karşı sertlik ve yüklere karşı dayanıklılık özelliklerini vertebraya kazandıran Tip 1 kollajendir (Ferraro vd., 2017). Kollajen bilinen ilk proteinlerden biri olmasına ve üzerine yapılan çalışmalar 1940'lara kadar gitmesine rağmen üçlü heliks yapıya sahip olduğunun gösterilmesi 1994 yılında X ray kristalografi sayesinde olmuştur. Mikrofibrillerin kısmi altıgen yapısı, telopeptidlerin yeri, tropokollajen monomerlerin çapraz kovalent bağlanmaları, ancak 2001 yılında ortaya çıkarılmıştır ve iç yapısı hala tam olarak anlaşılmamıştır (Liu vd., 2015a; Shoulders ve Raines, 2009). Tip 1 kollajen deri tendon ve kemik gibi kesim sırasında kolaylıkla ayrılabilen hayvan dokulardan direkt elde edilebilir (Ferraro vd., 2016; Liu vd., 2015a).

Tip1 kollajen epitelyal dokular, kartilaj, tendon, kas dokuları, dişler ve damar duvarı gibi dokularda bolca bulunabilen memelilerde en fazla bulunabilen protein türlerinden biridir. Kozmetoloji, doku mühendisliğinde ve biyomedikal cerrahisinde kollajenin geniş uygulama alanları vardır (Franch vd., 1994; Liu vd., 2015a; Walters ve Stegemann, 2014). Skolyoz, ehler danlos, osteoporoz, marfan sendromu gibi çok sayıda Tip 1 kollajen fibrillerinden kaynaklanan tıbbi durumlar bulunmaktadır. Mesela, ehler danlos sendromunda kollajen fibrillerinin çapı genişlemiştir. Buna ilaveten, moleküllerin düzenli şekilde dizilip paketlenmesi bozulmuştur. Fibrillerin böyle geniş yapıda ve farklı paketlenmiş olması, yara iyileşmesi ve doku tamirini etkiler. Kollajen fibrillerin oluşumu etrafıca araştırılmıştır (Kim vd., 2017).

Kollajen I $\alpha 2$ (COL1A2) geni iki A1 zinciri ve bir $\alpha 2$ zinciri içeren üçlü heliks yapıda olan Tip 1 kollajenin pro- $\alpha 2$ zincirini kodlar. Tip 1 kollajen fibrilden zengin olup kemik kornea dermis ve tendon gibi çoğu bağ dokusu parçalarında fazlaca bulunmaktadır. COL1A2 normal endotele göre tümör endotelinde yüksek miktarda bulunmaktadır. Bu bulgu tümör hücrelerinde anjiogenez ve desmoplazi oluşumunda etkili olabileceğini göstermektedir. Bunlara ilaveten, COL1A2, medullablastoma ve mide kanseri gibi tümörlerle ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Anderton vd., 2008; Liang vd., 2008; Zhu vd., 2011).

1.4. MTX Kullanımının Kemik Dokusu Üzerine Etkileri

Son zamanlarda, kemoterapi ilaçlarının kullanımı sayesinde hayatta kalma oranını artırmasına rağmen kemikle ilgili yan etkiler ön plana çıkmıştır. MTX kullanımı, pediatrik kanser hastalarında kemik büyümesini durdurabilir. Ayrıca kemoterapi sonrası hem pediatrik hemde yetişkin hastalarda KMY’nda azalma görülmüştür (Arikoski vd., 1999; Hadji vd., 2009; Pfeilschifter ve Diel, 2000). Bununla birlikte, MTX kullanımı kanser hastalarında kırık insidanslarında artışa ve KMY’ye yol açmakta, buna bağlı oluşan KMY de uzun dönemlerde kemikte defektlere neden olmaktadır. Deneysel ortamda, kemoterapi verilen hayvan modellerinde, kemoterapötik ajanlar, kemik kütlesini azaltıp ve trabeküler kemik yapısını bozarak, kemiğin fiziksel dayanıklılığını bozmuştur (Cegiela vd., 2005).

Bir anti-metabolit olan MTX, kemoterapötik dozlarda, dihidrofolat redüktaz inhibisyonu yoluyla RNA/DNA sentezi inhibe eder. MTX tedavisi sonrasında kemik oluşumu zayıflar ve kemik sentezi (osteokalsin seviyeleri ile gösterilir) ve mineralizasyonu deprese olur (Halton vd., 1996). Bu sonuçlar çeşitli faktörlerle bağlantılıdır. Bunlar kemik hücrelerinin mekanik strese olan tepkisi, osteoblastların depresyonu ve dolaşımdaki düşük vitamin D3 seviyeleridir (Elliot vd., 2004; Fan vd., 2009; Halton vd., 1996; Xian vd., 2007). Yapılan bazı çalışmalar KMY’deki azalmaya kemik sentezinde azalmanın neden olduğu, ayrıca azalmış KMY’nin artmış osteoklast aktivitesinin ve artmış kemik rezorpsiyonundan kaynaklandığı yıkım belirteçlerinin artışıyla gösterilmiştir. Benzer şekilde ratlarda MTX tedavisinden sonra osteoklastlar artmıştır (Fan vd., 2009). MTX’in sürekli olarak uzun süreli uygulanması düşük doz osteopeni oluşturur. Bu muhtemelen

artmış osteoklast yapımına bağlıdır. Bu çalışmalar MTX kemoterapisinden sonra rezorpsiyon, osteoklast farklılaşması ile olabilir (May vd., 1994).

1.5. Mango Ginger (MG)

Çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla, fitokimyasalların insan vücudunda fayda sağlayan biyolojik aktiviteler ile arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir. Bilimsel araştırmalar, daha çok fitokimyasalın doğal bitkisel formlarının biyolojik etkinliğini desteklemektedir. Bunlar geleneksel tıpta uzun süre kullanılmıştır. Fitokimyasallar, birkaç grup polifenol (antosiyenin, proantosiyanidin, flavanon, izoflavon, resveratrol ve elagik asit), besleyici olmayan kimyasal ve diyet bileşenleri ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır. Baharatlar, aktif fitokimyasal maddelerin deposudur. Curcuma cinsine ait çeşitli baharatlar, ilaçlarda, kozmetik ürünlerinde, boyalarda, tatlandırıcılarda ve nötrasötiklerde farklı kullanımları bulunmaktadır. *Curcuma longa* (zerdeçal) ve *Zingiber officinale* (zencefil) üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılmış, ancak *Curcuma amada* (MG), zencefil ailesinin çok kullanılmamış bir şifalı bitkisidir (Şekil 1.7) (Gupta vd., 2010; Moon vd., 2010; Policegoudra vd., 2011). MG'nin taksonomik hiyerarşisi aşağıdaki gibidir (Policegoudra vd., 2011) (Tablo 1.1):

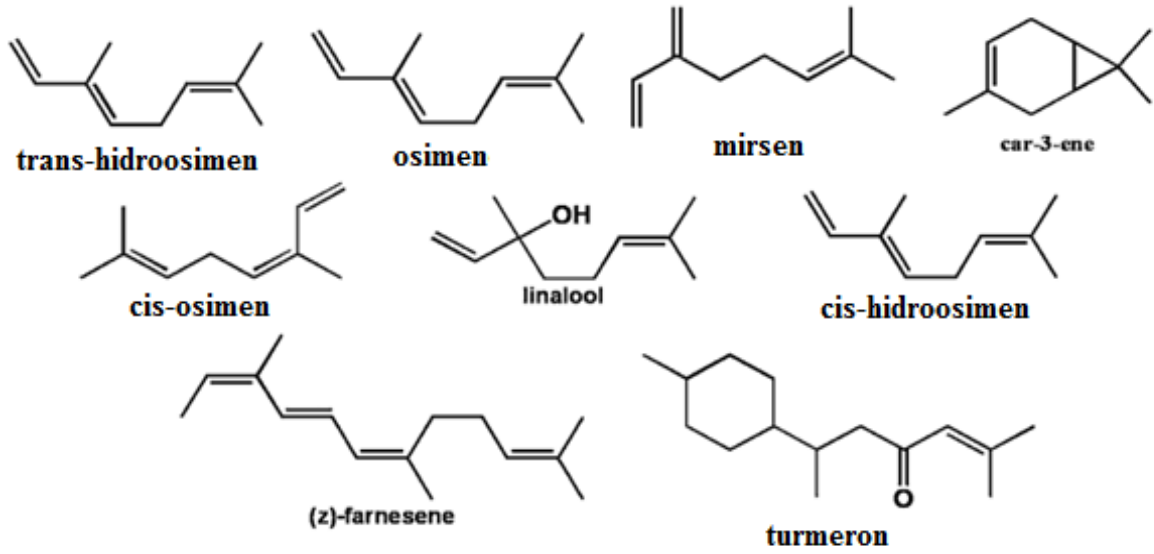
Tablo 1.1. MG'nin taksonomik hiyerarşisi

Kingdom	Plantae
Super division	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Class	Monocotyledonae
Order	Zingiberales
Family	Zingiberaceae
Genus	Curcuma
Species	<i>C. amada</i> Roxb.



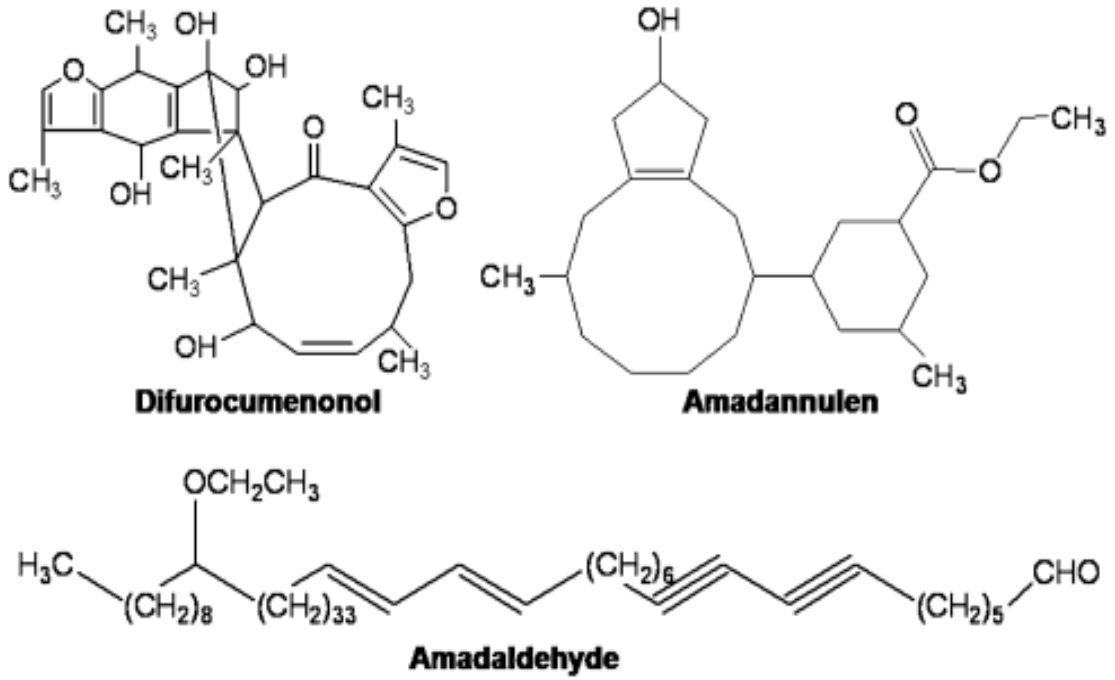
Şekil 1.7. MG bitkisi (A), rizomlar (B) ve TS rizomu (C) (Policegoudra vd., 2011)

Curcuma ailesi 80 den fazla türü içermekte bu türler içerisinde ilaç yapımında ve baharat olarak kullanılan önemli türleri vardır (Islam, 2004). *Curcuma amada* Roxb., daha çok bilinen ismiyle MG bu grubun önemli bir üyesidir. Bunun zencefil (*Zingiber officinale*) ile morfolojik ve filogenetik benzerlik vardır; ancak buna mango (*Mangifera indica*) önemli bir tat verir. Mangonun aroması kesiminde yer alan 68 uçucu aroma arasındaki cis-osimen atfedilir. Ayrıca MG'nin kök sapında esansiyel yağ bileşenleri bulunur (Şekil 1.8) (Policegoudra vd., 2007a; Singh vd., 2003).



Şekil 1.8. MG'nin uçucu bileşenleri (Policegoudra vd., 2011)

MG, karın ağrısı, kaşıntı, cilt hastalıkları, bronşit, astım ve inflamasyon ilişkili hastalıklarda kullanılan bir ilaçtır (Warrier vd., 1994). İnflamatuar hastalıklar içerisinde ağızda bulunan inflamasyon lezyonları, erkek genital sisteminin ülserasyonları, uyuz ve bel ağrısı gelmektedir (Policegoudra vd., 2011). *Curcuma amada*'nın etanol ekstraktı, antifungal aktivite ve geniş çaplı anti-bakteriyal aktivite göstermektedir (Policegoudra vd., 2011). Bunlara ilave olarak, seskiterpen dimeri olan “Difurocumenonol” ve bir ikameli seskiterpen “amadannulen”, "6 diterpinoidler MG'nin rizomlarından şimdiye kadar izole edilmiş olan (E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial en önemli bileşendir (Şekil 1.9) (Policegoudra vd., 2007a; Policegoudra vd., 2007b; Sheeja ve Nair, 2012; Singh vd., 2010).



Şekil 1.9. MG'nin Terpenoidleri (Policegoudra vd., 2007a; Policegoudra vd., 2007b; Policegoudra vd., 2010)

(E)-labda-8(17),12-diene-15,16-dial, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv suşu BACTEC-460 analizde karşısında *Curcuma amada* olarak antitüberküloz aktivitesi rizomlarının kloroform ekstraktından izole edilen yeni bir dialdehittir (Singh vd., 2010). Bu bileşik, servikal karsinom hücrelerine karşı antifungal birçok *Candida* türlerine karşı aktivitesi, *Aedes aegypti* larvalarına karşı mosquitocidal aktivitesi ve sitotoksikite etkisi olduğu bildirilmiştir (Sheeja ve Nair, 2012; Sheeja ve Nair, 2014). Beyin kanseri için, özellikle de yüksek değerde gliomlar için kan-beyin bariyeri nedeniyle ve de kanser hücrelerinin ilaca düşük penetrasyonu nedeniyle kemoterapi seçenekleri sınırlıdır (Greenlee, 2000; Regina vd., 2001). Kan-beyin bariyerinde olan curcumin, *Curcuma longa* (zerdeçal) rizomlarından elde edilen doğal bir polifenol olduğu bildirilmiştir (Perry vd., 2010). Ancak MG'nin antikanser özellikleri üzerindeki çalışmalar sınırlıdır. Daha önceki çalışmalarda MG'den üretilen süper kritik CO₂ ekstraktının diğer türlere nazaran kanser hücrelerine daha etkili olduğu bulunmuştur (Ramachandran vd., 2015). *Curcuma* ailesinden MG üyesi anti-kanser ilaçlar içerisinde az araştırılan bir gruptur. Ancak hint tıbbında özellikleri araştırılmış bir türdür (Policegoudra vd., 2011). Son zamanlarda, MG bir siklofosamid ile birlikte etkili olarak bir sitotoksikite sinerjik anti-kanser etkisi yapar.

Bazı çalışmalarda MG, U-87MG glioblastoma tümör hücreleri üstüne olan sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Ramachandran vd., 2015).

Farmakolojik olarak MG insanlar üzerinde bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Geleneksel olarak deri alerjileri, karın ağrıları, hiperkolesterolemide kullanılmaktadır (Mujumdar vd., 2000; Policegoudra vd., 2011; Pachauri ve Mukherjee, 1970). Ayrıca antibakteriyel ve antioksidan aktiviteleride bilinmektedir (Chandana vd., 2005).

MG'nin biyolojik aktiviteleri; Biyoaktif bileşiklerin bir deposu olan rizomlar yaygın bir kullanıma sahiptir. MG, aromatik ve kanamayı durdurucu özelliğinden dolayı tıbbi olarak kullanılır ve ayrıca sindirimi kolaylaştırır. Rizomlarla oluşturulan macunlar, geleneksel olarak yaralar, kesikler ve kaşıntı iyileşmesi için kullanılmıştır. Rizomlar, mide için faydalı olduğu gibi karminatif özelliklere de sahiptir (Policegoudra vd., 2011; Srivastava vd., 2006).

Antioksidan aktivite; MG'nin yaprak ve rizomlarının sulu metanol ekstraktının β -karoten ağartma yöntemiyle antioksidan etkinliği rapor edilmiştir (Prakash vd., 2007). Yaprak ekstresi rizom özünden daha aktiftir. Policegoudra ve arkadaşları tarafından MG'nin ardışık ekstraktların çözücülerin polaritesinin artması ile antioksidan aktivitesi rapor edilmiştir (Policegoudra vd., 2007b). DPPH radikal temizleme aktivitesi, süperoksit radikali temizleme aktivitesi, metal şelatlama aktivitesi ve lipid peroksidasyon aktivitesi gibi farklı antioksidan aktivite analizleri rapor etmiştir. Polar olmayan ekstreler iyi derecede lipid peroksidasyon inhibitör aktivitesi göstermiştir (Tarwadi ve Agte, 2005).

Antibakteriyel aktivite; MG'nin sulu ve organik solvent ekstraktları *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyeldir. Isıtılmış sulu ekstrakt, ısıtılmamış sulu ekstrakt ile karşılaştırıldığında yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Ayrıca Chandarana ve arkadaşları çözücü ekstraktların (1,4-dioksan ve DMF) bakterilere karşı daha az etkili olduğunu belirtmişlerdir (Chandarana vd., 2005). Siddaraju ve Dharmesh (2007) tarafından MG'nin rizomlarından serbest ve bağlı fenoliklerin antibakteriyel aktivitesi olduğunu bildirilmiştir (Siddaraju ve Dharmesh, 2007). MG'nin hem serbest hem de bağlı fenolik fraksiyonları, H^+ , K^+ -ATPaz aktivitesi ve *Helicobacter pylori* büyümesinin inhibe edilmesinde etkilidir. MG'nin fenolik fraksiyonlarında bulunan sinamik ve ferulik asitler, H^+ , K^+ -ATPaz ve ayrıca *H. pylori* büyüme inhibisyonuna önemli ölçüde katkıda bulunur. Hekzan, kloroform, etasetat, aseton ve metanol ekstreleri gibi farklı özler, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Micrococcus luteus*,

Staphylococcus aureus, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus fecalis* ve *Salmonella typhi*'ye karşı yüksek oranda antibakteriyeldir (Policegoudra vd., 2007b). Bu ekstreler, geniş yelpazedeki bakterilere karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. Kloroform özü, diğer ekstraktlara kıyasla daha etkili olmuştur. Ancak, *E. coli*, *Enterobacter aerogenleri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* ve *Yersinia enterocolitica*, MG ekstraktlarından herhangi biri tarafından inhibe edilmemiştir (Policegoudra vd., 2011).

Antifungal aktivite; MG'nin rizomlarından gelen uçucu yağ, doğada antifungaldir (Singh vd., 2002). Myrcene (% 4,6) ve pinene (% 80.5), geniş yelpazedeki mantarlara (yani *Curvularia palliscens*, *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Fusarium moniliforme* ve *F. falcatum*.) karşı antifungal aktiviteden sorumlu uçucu yağların ana bileşenleridir (Policegoudra vd., 2011).

Anti-inflamatuar aktivite; MG rizomlarının etil alkol ekstraktı, albino ratlarda akut ve kronik uygulamada anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir. Aynı zamanda Mujumdar ve arkadaşları, etil alkol ekstraktında hidroksil, ester, karbonil ve olefini fonksiyonel gruplarında kimyasal bileşiklerin varlığını da bildirmişlerdir (Mujumdar vd., 2000). Akut karragenan ile indüklenen rat pençesi ödem modelinde daha yüksek konsantrasyonlarda anlamlı olduğu bulunmuştur (Policegoudra vd., 2011).

Trombosit agregasyonu inhibitör aktivitesi; Etil asetat ve aseton ekstraktının trombosit agregasyonu inhibitör aktivitesinin metanol ekstraktına kıyasla çok yüksek olduğu rapor edilmiştir (Policegoudra vd., 2011). Etil asetat, aseton ve metanol ekstratların yüksek trombosit agregasyonu inhibe edici aktivitesi, yüksek fenolik içerik ile korele ve konsantrasyona bağlı olarak görünmektedir (Policegoudra vd., 2011).

Sitotoksosite; MG'nin hem normal hem de kanser hücresi kültürlerine yönelik heksan, kloroform, etil asetat, aseton ve metanol ekstratların sitotoksitesite rapor edilmiştir. Ekstratların antikanser özelliklerinin iyi bir göstergesi olan tüm ekstratlar, normal hücrelerle karşılaştırıldığında kanser hücrelerine karşı nispeten daha yüksek toksisite göstermiştir. Test edilen beş ekstrakt arasında etil asetat ekstresi daha fazla toksisiteye, ardından kloroform, heksan, aseton ve metanol ekstratlarının sahip olduğu gösterilmiştir. Farklı MG ekstratlarının sitotoksosite sonuçları, ekstratların normal hücre hatlarına karşı daha az toksik olduğunu göstermektedir (Policegoudra vd., 2011).

Antialerjik aktivite; MG'nin antialerjik formülasyonlar dahil olmak üzere çeşitli bitkisel preparatlarda kullanıldığı rapor edilmiştir (Pushpangadan vd., 2006; Policegoudra vd., 2011).

Hipotrigliseridemik aktivite; MG ekstraktlarının hem karaciğer sentezi hem de kan temizlemesinde hipotrigliseridemik aktivitesinin etkili olduğunu göstermiştir. Triton kaynaklı hiperlipidemik ratlarda hipotrigliseridemik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Srinivasan vd., 2008; Policegoudra vd., 2011).

Enterokinaz inhibitör aktivitesi ve antitüberküler aktivite; MG ayrıca enterokinaz inhibitör aktivitesi ve antitüberküloz aktiviteye sahiptir. Labdane-tipi diterpenoid, labda-8 (17), 12-diene-15,16-dial ve modifiye analogları antitüberküler özelliklere sahiptir (Singh vd., 2010).

Araştırmanın Amacı

Yetişkin ve büyüme çağındaki insanlarda kemoterapinin, kemiğin büyümesini durdurucu ve KMY'nu azaltıcı yan etkileri vardır (Arikoski vd., 1999). Çocukluk çağı kanser kemoterapilerinden sonra akut değişikliklerinin yanı sıra uzun dönemde KMY'nda azalma görülmektedir (Pfeilschifter ve Diel, 2000). MTX, pürin ve timidin sentezinde kullanılan folatı inhibe eden, bundan dolayı DNA/RNA sentezi ve hücre çoğalmasını bozulmasına yol açan anti-metabolit bir kemoterapötiktir (Xian vd., 2008). Çocukluk çağı kanserlerinde özellikle akut lenfoblastik lösemide sıkça kullanılan MTX kemik gelişiminde durmaya ve kemik dansitesinde azalmaya neden olur. Son yıllarda, kemoterapötik ajanların fitokimyasallar ile kombine kullanımının, kemoterapötik tedavinin neden olduğu yan etkileri en aza indirmede ve kanser hücrelerinin tedavisinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (Liao vd., 2013; Tacyildiz vd., 2010). Bu nedenle, bu çalışmada, antiinflamatuvar ve antioksidan etkiye sahip, MG'nin MTX ile kombine kullanımın, kemik hasarı ve kemik doku RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 kollajen proteinlerinin düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Bu tez çalışmasındaki tüm deneyler Laboratuvar Hayvanları Bakım ve Kullanım Sağlık Rehberi Ulusal Enstitüleri kapsamında ve Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (FÜHADEK) onayı alındıktan sonra (Tarih: 12.10.2016, Toplantı: 2016/18, Karar No:169), etik kurallara uygun bir şekilde hayvan refahı ve hayvan haklarına riayet edilerek yürütüldü.

Deneylerde kullanılan ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (FÜDAM) temin edildi. Bu çalışmada 28 Sprague-Dawley erkek rat (yaş: 8 haftalık, ağırlık 200 ± 20 g) ırkı kullanıldı. Ratlara günlük 12 saat aydınlık; 12 saat karanlık olacak şekilde bir aydınlatma periyodu uygulandı. Ratlar, 22 ± 2 °C sıcaklıkta, 55 ± 5 nispi nem bulunan havalandırma sistemine sahip bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Çalışma süresince ratlara standart pelet yem ve su *ad libitum* olarak verildi. Hayvanlara verilen standart yemin bileşimi Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Laboratuvar koşullarına uyum sağladıktan sonra her grupta 7 rat olacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Gruplar ile ilgili detaylı bilgiler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tüm ratlar MTX veya serum fizyolojik enjeksiyonları günlük deri altından eş zamanlı ve sürekli oral gavajlar ile bir arada verildi. MTX enjeksiyonları 0.75 mg/kg dozunda 8-12. günler arasında 5. gün boyunca uygulandı (King vd., 2015). MG (OmniActive Health Technologies, Inc., Morristown, NJ, ABD) 50 mg/kg dozunda deney boyunca oral gavaj yoluyla günde bir kez uygulandı (Sahin vd., 2017). Kontrol grubu ratlara, serum fizyolojik (s.f.) oral gavajla ve subkutan (s.c.) enjeksiyon yoluyla verildi (Tablo 2.1). Oral gavajla verilen maddelerin miktarı ratların beden ağırlıklarına bağlı olarak verildi.

Tablo 2.1. Deneysel çalışma grupları

GÜN GRUP	1.-7. GÜN ARASI	8.-12. GÜN ARASI	13.-15. GÜN ARASI
KONTROL	SF (1 cc / Oral gavaj)	(1 cc / Oral gavaj) SF (s.c.)	SF (1 cc / Oral gavaj)
MG	MG (50 mg/kg / 1 cc / Oral gavaj)	MG (50 mg/kg / 1 cc /Oral gavaj) SF (s.c.)	MG (50 mg/kg / 1 cc / Oral gavaj)
MTX	SF (1 cc / Oral gavaj)	MTX (0.75 mg/kg / s.c.) SF (1 cc / Oral gavaj)	SF (1 cc / Oral gavaj)
MTX+MG	MG (50 mg/kg / 1 cc / Oral gavaj)	MTX (0.75 mg/kg / s.c.) MG (50 mg/kg / 1 cc / Oral gavaj)	MG (50 mg/kg / 1 cc / Oral gavaj)

Deneysel uygulama 15 gün boyunca sürdürüldü. Deneysel uygulamanın bittiği gün, etik yönergelerle uygun biçimde dekapite edilerek hedef dokular elde edildi. Kan örnekleri alındıktan hemen sonra +4°C sıcaklık 5000 rpm devirde 10 dk süreyle santrifüj edilerek, serum örnekleri elde edildi. Doku örnekleri analiz edilinceye kadar -80°C’de, derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Ayrıca histopatolojik analizler için doku örnekleri de alınmıştır.

Tablo 2.2. Deney hayvanlarına verilen standart yemin bileşimi

Yem hammaddeleri	(%)
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır. **Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

2.2. Laboratuvar Analizleri

2.2.1. Serum Parametreleri Analizi

Deneysel uygulamanın sonuçlandığı gün alınan kan örnekleri +4°C sıcaklık 5000 rpm devirde 10 dk. süreyle santrifüj edilerek, serum örnekleri elde edildi. Kan serumundaki glikoz, kolesterol, aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), üre ve kreatin konsantrasyonları Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Moleküler Analiz Laboratuvarında bulunan otoanalizör cihazı (Samsung Labgeo PT10, Samsung Electronics Co., Güney Kore) kullanılarak belirlendi (Orhan vd., 2017).

2.2.2. Osteokalsin Düzeylerinin Analizi

2.2.2.1. Enzim Bağlı İmmün Test Yöntemi (ELISA)

Enzim bağlı immün assay [Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)] metodu; serum, plazma, idrar, tükürük, perikard, periton sıvısı gibi mayiler ve doku homojenatlarından elde edilen süpernatantlardan araştırılan maddelerin spesifik antikor molekülü ile kompleks oluşturmaları prensibine dayalıdır. Analiz aşaması antijenin tepsi yüzeyine absorbe edilmesiyle başlamaktadır. Daha sonra antijenin spesifik antikor ile reaksiyona girmesi ile immün kompleks oluşturulmaktadır. Bu kompleks antikor (primer antikor) kısmından enzim bağlanmış ikinci bir antikor (sekonder antikor) ile reaksiyona gindirilmektedir. Alkalen fosfataz ve horseradish peroksidaz (HRP) enzimleri bu amaç için yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Renkli ürün oluşturacak şekilde, substrat mevcut kompleks içerisindeki enzim ile reaksiyona girmektedir. Bu işlem sonucunda elde edilen bu renkli ürün kompleksi ELISA sayacında okutularak konsantrasyon hesaplanır. Kompetitif ve non-kompetitif (sandviç) olmak üzere ELISA yöntemi iki sınıfa ayrılmaktadır. Kompetitif yöntemde antijen-enzim konjugatları ile analitler yarışmaktadır. Analit konsantrasyonu ile oluşan rengin yoğunluğu arasındaki ilişki ters orantılıdır. Non-kompetitif yöntemde ise rengin yoğunluğu ile örneklerdeki antijen miktarları arasında doğru orantı mevcuttur (Erten, 2016).

2.2.2.2. Osteokalsin Düzeyi Ölçümü

Kemik dokusu örneklerine ait osteokalsin analizi için, dondurulmuş doku örnekleri (sağ tibia), sıvı azot içinde havan ile ince bir toz haline getirildi. Daha sonra örnekler proteaz inhibitörleri içeren RIPA tamponu içinde sonikasyon ile ekstre edildi (İntra ve inter-assay katsayıları sırasıyla %3.8 ve %5.5'dir). Elde edilen homojenatlar analizler yapılncaya kadar -80°C'de saklandı. Kemik dokusu örneklerine ait osteokalsin düzeyleri, Rat Osteokalsin/Kemik gla protein (OT/BGP) ELISA Kiti (YL Biotech Co., Ltd., Shanghai, China; Katalog No: YLA0302RA) kullanılarak tespit edildi. Absorbanslar, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Moleküler Analiz Laboratuvarında bulunan ELISA sistemi (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT, USA) kullanılarak okundu. Kullanılan reaktifler ve malzemeler Tablo 2.3'de gösterilmiştir:

Tablo 2.3. Kullanılan reaktifler ve malzemeler

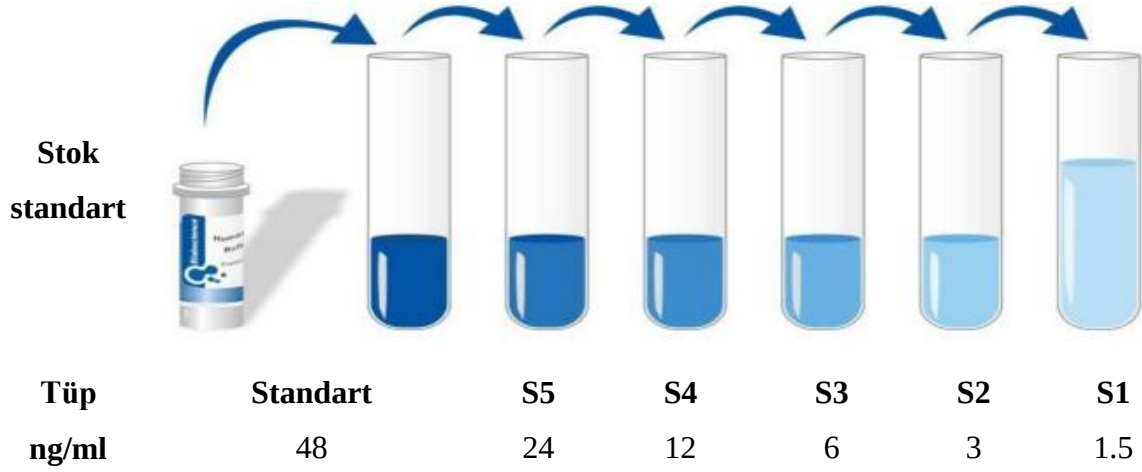
Reaktifler	Miktar	Reaktifler	Miktar
Kaplanmış ELISA plakası	12-Kuyu Tüpleri	Yıkama konsantresi (30X)	20 ml
Standart dilüsyon	3 ml	Talimat	1
Kromojen solüsyon A	6 ml	Mühür plakası zar	2
Kromojen solüsyon B	6 ml	Hermetik çanta	1
Streptavidin-HRP	6 ml	Stop solüsyonu	6 ml
Standart solüsyon (48ng/ml)	0.5 ml	Biyotinle etiketlenmiş anti OT / BGP antikorları	1 ml

Testin yapılışı:

- Standart çözeltilerin seyreltilmesi Tablo 2.4 ve Şekil 2.1’de gösterildiği gibidir:

Tablo 2.4. Tablo ELISA standartlarının hazırlanması

24ng/ml	Standard No.5	120µl Orijinal Standard + 120µl Standard dilüsyonlar
12ng/ml	Standard No.4	120µl Standard No.5 + 120µl Standard dilüsyonlar
6ng/ml	Standard No.3	120µl Standard No.4 + 120µl Standard dilüsyon
3ng/ml	Standard No.2	120µl Standard No.3 + 120µl Standard dilüsyon
1.5ng/ml	Standard No.1	120µl Standard No.2 + 120µl Standard dilüsyon



Şekil 2.1. Standart solusyonun dilüsyonu.

- Gerekli şerit sayısı, standartların eklenmesiyle test edilecek numunelerin sayısına göre belirlenir.
- Numune enjeksiyonu:
 - 1) Boş kuyulara: Sadece A ve B kloroform çözeltisi ilave edildi.
 - 2) Standart çözelti kuyusuna: 50 µl standart ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi.
 - 3) Test edilecek örneklerin kuyusuna: 40 µl örnek ve sonra üzerine 10 µl OT/BGP antikorları, 50µl streptavidin-HRP eklendi.

Tepsinin üstü kapatıldı. 1 saat 37 °C’de inkübasyona bırakıldı.

- Yıkama çözeltisinin hazırlanması: Daha sonraki kullanım için yıkama konsantrasyonunu (30X) saf su ile seyreltilti.
- Yıkama işlemi: Her kuyucuk yıkama solüsyonu kullanılarak 5 defa yıkandı.
- Renk gelişimi: Her kuyucuğa önce 50µl kromojen çözeltisi A ilave edildi ve daha sonra her kuyucuğa 50µl kromojen çözüm B eklendi. Renk gelişimi için ışık görmeyen bir alanda 37 ° C de 10 dakika inkübe edildi.
- Durdurma: Reaksiyonu durdurmak için her oyuğa 50µl durdurma çözeltisi eklendi.
- Stop solüsyonu eklendikten sonra yaklaşık 10 dakika içerisinde ELISA okuyucusu (Elx-800; Bio-Tek Instruments Inc, Winooski, VT, USA) ile 450 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi. Her kuyucuğun absorbans değeri saptandı ve ng/mL cinsinden hesaplandı. Bulunan değerler arasındaki farklar kaydedilerek değerlendirildi.

2.2.3. Kemik Mineral Yoğunluğu Analizi

Osteoporoz tanısında KMY ölçümü çok önemli bir araçtır. Kullanılan teknolojiye bağlı olarak, KMY testi, kalça, omurga veya el bileğinden kemik yoğunluğunu ölçen, ağrısız ve non-invaziv bir yöntemdir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 1994 yılındaki osteoporoz tanısını ortaya koyan yayını halen geçerli olup, dual x-ışını enerji absorpsiyometri (DEXA) cihazı kullanılarak ölçülen KMY değerleri tüm dünyada altın standart olarak kabul edilmektedir. KMY ölçümlerinin dayandığı T skoru, kişinin ölçümlerinin aynı cinsten sağlıklı genç yetişkinlerin maksimum kemik kitlesinin altında veya üstünde olduğunu belirten standart sapmayı ifade eder (Who Study Group, 1994).

Çalışmamızda, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı laboratuvarında, akut MTX kemoterapisi alan ratların tibia ve femur doku örneklerinin KMY'sı çift enerjili X-ışını absorpsiyometrisi (Lunar Corp., Madison, WI, USA) ile ölçüldü.

2.2.4. RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 Kollajen Proteinlerinin Western Blot ile Analizi

Kemik dokusuna ait örnekler homojenize edilerek homojenatların içerdiği toplam protein miktarları hesaplandı. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western blot analizi ile RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 kollajen proteinlerinin düzeyleri belirlendi.

2.2.4.1. Kemik Dokusuna Ait Örneklerinin Homojenizasyonu

Derin dondurucuda -80°C'de muhafaza edilen dondurulmuş kemik dokuları soğuk zincire bağlı kalacak şekilde kas dokusundan arındırılmış olarak kullanıldı. Herhangi bir işlem yapılmadan önce dokuyu temizlemek için soğuk PBS ile 2 kez yıkandı. Daha sonra kemik dokusu sıvı azot (77 K, -196°C veya -320°F) içinde anında donduruldu ve laboratuvar havanı yardımıyla ince bir toz haline gelinceye kadar ezildi. Bu işlemten sonra tüm grup üyelerini temsil edecek şekilde toz haline getirilmiş kemik örnekleri tartıldı. Daha sonra ağırlığı 1/6 (w/v) olacak şekilde radyoimmünopresipitasyon assay buffer (RIPA buffer) (10 mM Tris-HCl (pH=7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, %0.1

SDS, %0.5 sodyum deoksikolat, %1 Triton-X 100 yada %1 NP-40, 1 mM fenil metil sülfonil florid (PMSF), 1 µg / mL aprotinin, 1 µg / mL leupeptin, 1 µg / mL pepstatin (alternatif olarak proteaz inhibitör kokteyli kullanılabilir)) (Ngoka, 2008; Bao vd., 2015) 1.5 ml'lik ependorf tüpler içerisine ilave edilerek vortex'lendi. Bu işlemi takiben tüm örnekler 120 sn (30sn sonikasyon-15sn dinlenme-30sn sonikasyon-15sn dinlenme-30sn sonikasyon) olacak şekilde sonikasyon işlemi yapıldı. Proteinlerin, proteaz aktivitesi ile bozulmalarını engellemek amacıyla homojenizasyon işlemleri esnasında tüm işlemler buz içerisinde yapılmıştır. Ayrıca vizkositeyi azaltmak için lizis solüsyonuna nükleaz (5 U/ml) eklendi. Homojenatlar soğutmalı santrifüjde +4°C'de 60 dakika süreyle 15.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra protein içeren kısım olan süpernatant başka bir tüpe aktarılır. Katı olan pellet kısmı saklandı. Alınan kemik dokusuna ait süpernatant örneklerin içerisine eşit hacimde sample buffer (%10 SDS, 5 ml 0.5 M Tris (pH 6.8), %5'lik Gliserol, %25 β-Merkoptoetanol, %0.05 Bromophenol blue, 3.245 ml dH₂O) ilavesi yapıldıktan sonra vortekslendi. Daha sonra önceden ısıtılmış 100°C su banyosunda 5 dakika bekletilerek örneklerdeki proteinler denatüre edildi. Elde edilen örnekler mikrosantrifüj tüplere alınarak SDS-PAGE ve Western blot analizleri için -80°C'de saklandı.

2.2.4.2. Total Protein Miktarının Spektrofotometrik Analizi

Örneklere ait homojenatların içerdiği toplam protein miktarı Lowry (1951) metodu ile belirlenmiştir. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu⁺²) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur. Ayrıca Cu⁺¹'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna sebep olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülürler. Her bir tüpe bu amaçla; 0, 20, 40, 60, 80, 100 µl BSA, 2 ml alkali bakır ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemden sonra her tüpe 0.2 ml Folin eklendi ve vortex edildi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi ve 600 nm dalga boyunda her numunenin absorbansı belirlenerek standart olarak kullanılan bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Hata payını minimuma indirmek için standartların ve örneklerin spektrofotometrik analizleri iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Spektrofotometrik analiz için her bir kemik homojenatından 75 µl alındı ve 975 µl dH₂O seyreltilerek üzerlerine alkali bakır çözeltisi ilave edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika

inkübasyonu takiben her bir örneğe Folin belirteci eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve bu sürenin sonunda 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede (OPTIMA, SP 3000, Tokyo, JAPAN) okundu. Spektrofotometre sonuçları regresyon yöntemi aracılığıyla değerlendirilerek, her bir kemik homojenatındaki toplam protein miktarı hesaplandı.

2.2.4.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektrophorezi (SDS-PAGE) yöntemi proteinlerin saflığının kontrolü ve moleköl ağırlıklarının saptanması amacıyla kullanılmaktadır. Yüklü molekülleri elektrik alan varlığında moleköl kütlelerine göre ayıran analitik bir metottur. Bu teknikte moleküllerin hareketi; moleküllerin yüküne, boyutuna, biçimine, kimyasal içeriğe ve uygulanan elektriksel alana bağlıdır. Jel elektrophorezi en yaygın olarak kullanılan protein elektrophorez yöntemidir. SDS-PAGE sisteminde akrilamid monomerlerinden yararlanılır ve amonyum persülfat (APS) gibi bir serbest radikal ile tetrametildiamin (TEMED) gibi stabilizatörü sağlayıcı ortamda akrilamid monomerleri uzun zincirler oluşturacak şekilde polimerleşmektedir. Daha sonra oluşan bu uzun zincirler arasında yanal bağlantılar oluşarak jel meydana gelmektedir. SDS-PAGE analizinde jelin yapısında yer alan sodyum dodesilsülfat (SDS) deterjanın bulunması ile proteinler kendilerini oluşturan monomer alt birimlerine ayrılmaktadır ve böylece protein agregasyonu önlenmektedir. SDS moleküllerine bağlanan denatüre polipeptidler negatif yük kazanırlar. Ayrıca SDS bağlantılı polipeptid kompleksleri, moleköl ağırlıklarına bağlı olarak jel içerisinde hareket ederler. Hareket eden moleküllerin ağırlıkları; aynı jel üzerinde bulunan bir standartla karşılaştırılarak tespit edilir. Mutasyon geçirmiş veya çeşitli olumsuz çevre faktörleri sonucunda canlı organizmanın bir kısım proteinlerinden normale göre parça kopması veya parça ilavesi ya da bazı proteinlerin yeterince sentezlenmemesi gibi özellikler bu jel sistemi aracılığıyla tespit edilirler. Protein moleküllerinin hareketi kendi net yüklerine zıt yük taşıyan güç kaynağından gelen elektrik akımına göre negatif (-) kutuptan pozitif (+) kutuba doğru olur. İncelenecek protein molekülleri şayet 15–45 kDa aralığına karşılık ediyorsa akrilamidin konsantrasyonu %15, 45 kDa'dan yukarı ise akrilamidin konsantrasyonu %10 veya daha aşağı düşürülür. Diğer bir ifade ile molekölün ağırlığı arttıkça akrilamidin konsantrasyonu düşürülür. Akrilamid konsantrasyonunun artışı, jel içerisindeki ara boşlukların daha sık olmasına sebep

olmaktadır. Dolayısıyla protein moleküllerinin hareket hızı da azalmaktadır (Bao vd., 2015; Laemmli, 1970, Sahin vd., 2018).

2.2.4.4. SDS-PAGE Analizleri

Laemmli (1970) tarafından geliştirilen prosedüre göre hazırlanan SDS-PAGE ile kemik dokularına ait protein örnekleri incelenmiştir.

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml’lik ayırma (Resolving (%12’lik; 3.35ml dH₂O, 2.5ml 1.5 M Tris (pH 6.8), 100µl %10 SDS, 4ml Akrilamid (bis %30), 75µl APS, 15µl TEMED)) jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına (0.75 mm kalınlığında jel cam aparatlar) jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar (≈1cm) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Bu işlem sona iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi. Tarak dişlerinin ara dolgu maddesi olarak ifade edilen yükleme jeli (Stacking (%4; 6.1ml dH₂O, 2.5ml 0.5 M Tris (pH 6.8), 100µl %10 SDS, 1.3ml Akrilamid (bis %30), 60µl APS, 12µl TEMED)) 10 ml’ye kadar hazırlandı. Daha sonra hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı ve yükleme jeli çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 10–15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı ve tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin bırakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi.

Protein çözücü solusyonu; (%10 SDS, 5 ml 0.5 M Tris (pH 6.8), %5’lik Gliserol, %25 β-Merkoptoetonol, %0.05 Bromophenol blue, 3.245 ml dH₂O şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 300 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırlanan karışımdan 20 µl kadar transfer edildi ve tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi. Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) 20 mA’lik akım

elektroforeze verildi. 30 dakika sonra voltaj değeri 40 mA yükseltildi (180–200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak, aradaki jel çıkarıldı. Elde edilen jelin stacking kısmı kesilip atıldı ve bantlaşmanın gerçekleştiği resolving jel kısmı, çalışmanın blotlama aşamasını yapmak üzere hazırlandı.

2.2.4.5. Western Blot Analizleri

Western blot prosedürü; elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin (elektrik yük farkı prensibiyle), horizontal olarak nitroselüloz membrana transferi ve membrandaki proteinlerin immünolojik metotlarla (antijen-antikor) gösterilmesidir. Sahin ve arkadaşlarına (2018) göre western blot işlemi yapıldı:

Çalışılan örneklerdeki proteinler blotlama yapılmadan önce elektriksel ortamda poliakrilamid jel üzerinde göç ettirilmektedir. SDS-PAGE’de proteinlerin elektroforezleri gerçekleştirilmektedir. Western blot tekniği, elektroforez işlemi takip eden 4 aşamada gerçekleştirilir. Bu aşamalardan ilki jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama), ikincisi spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), üçüncüsü özgül antikorlarla tepkime ve en son aşamada ise proteinlerin görüntülenme aşamalarıdır.

Nitroselüloz membrana transferi sırasında jel ile nitroselüloz membran karşı karşıya getirilmekte ve bunlar filtre kâğıtları arasına yerleştirilmektedir. Jelin büyüklüğü ile orantılı olarak belirli bir süre elektrik akımı uygulanıp proteinlerin transferi sağlanmaktadır. Nitroselüloz membranın özgül olmayan proteinlerle bloklanmasında albumin tercih edilmektedir. Spesifik antikorlar olarak monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorların kullanımı, yalnızca tek bir epitopa özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından dolayı avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanma gösterir. Ancak, çalışılan proteinler arasında benzer epitop bölgeleri bulunmakta ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler ortaya çıkabilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı nedenden dolayı şekillenen yalancı pozitiflik ihtimalinin daha fazla olduğu bilinmektedir. Monoklonal antikorların western blotta kullanımının en önemli dezavantajı, SDS-PAGE ve blotlama esnasında polipeptid yapılarıdaki epitopların

ortadan kaldırılmasıdır. Belirlenmeye çalışılan epitopun ortadan kaldırılması durumunda ise monoklonal antikor-epitop bağlanması şekillenemez. Bu nedenden dolayı monoklonal antikor kullanıldığında, poliklonal antikorla çalışılmasına kıyasla, yalancı negatiflik ihtimali artmaktadır.

Özgül antikorlarda genellikle radyoaktif izotoplar veya enzimler raportör madde olarak kullanılmaktadır. Alkalen fosfataz ve peroksidaz enzimleri enzim olarak tercih edilmektedir. Bu enzimlerin substratları ve kromojen maddeleri birbirinden farklıdır. Son yıllarda enzimle işaretlemeye, testin duyarlılığını arttırmak amacıyla peroksidazla işaretli avidin biyotin sisteminin kullanımı yaygınlaşmıştır. Kullanılan kromojenlerin en önemli özelliği çözünmeyen renkli ürünler oluşturmalarıdır. Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana (Schleicher and Schuell, Inc., USA), aktarımı (blotlama) için, SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kâğıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek içerisine buz aküleri ve manyetik karıştırıcılar eklenerek işlem boyunca ortamın soğuk olması sağlandı ve bu işlemden sonra düzeneğe 90 dakika boyunca, 250 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama) için, blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.025 M), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.075 M), NaCl (1.45 M)], çalkalayıcı üzerinde 5 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 (pH: 7.2) tamponunda %1'lik, BSA (taze sığır serum albumini) ile 37°C'de 90 dakika bloklandı (Bowling serum albümini hazırlanması: 5 gr Albumin fraction, PBS ile 100 ml ye tamamlandı ve manyetik karıştırıcıda çözülmesi gerçekleştikten sonra + 4°C'de bekletildi). Daha sonra yıkama yapılmadan primer antikor ile muamele işlemine geçildi. Özgül antikorlarla tepkime işleminde primer antikorlar olarak; RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 kollajen antikorları kullanıldı. Primer antikorlar 1:1000 oranında %0.05 oranında Tween-20 bulunan tamponda hazırlanarak kullanıldı. Primer antikorları ile +4°C'de, nitroselüloz membranlar gece boyunca inkübasyona bırakıldı.

Daha sonraki aşamada, nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar %0.05 oranında Tween-20 bulunan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37°C’de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solüsyonuyla yıkandı. Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda %0.03–0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin (DAB) solüsyonu kullanıldı. DAB solüsyonunun içerisine eklenen 80 µl H₂O₂ reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5–10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda DAB’la renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice dH₂O ile yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Image Analyses System (Image J; National Institute of Health, Bethesda, USA) yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

2.2.5. Kemik Histopatolojisi

Her bir deney hayvanından alınan kemik örneklerinin metafiz [uzun kemiğin bir bölgesi (tibia ve femur)] içinde meydana gelen yapısal ve hücrel değişiklikleri araştırmak için), tibia ve femur örnekleri 24 saat süreyle %10 formalinde fikse edilmiştir. Ardından immünokal çözeltide kalsifikasyona orta hat boyunca uzunlamasına yarıya bölünmeden önce iki hafta boyunca işleme tabi tutuldu ve parafin gömme işlemi için işlendi. Bu işlemten sonra 4 µm kalınlığa sahip kesitler elde edildi, Superfrost™ slaytlara (Thermo Fisher Scientific Australia, Scoresby, VIC, Avustralya) monte edildi ve tartrat dayanıklı alkalın fosfataz (TRAP) (osteoklastlar için bir markör) ve hematoksilin ile boyanarak bir ışık mikroskopu yardımıyla incelendi. Kemik yapısı üzerindeki tedavi etkilerini incelemek için, trabeküler kalınlık, damar sayısı (intratrabeküler alan) ve osteoklast sayısı tanımlandığı gibi ölçüldü (King vd., 2015).

2.3. İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizinde GraphPad Prism yazılımı kullanıldı (PRISM 6, GraphPad Software Inc., LaJolla, CA). Veriler, ortalama standart hata ($\pm$ SEM) belirlenerek verildi. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. Post hoc analizinde Tukey testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak kabul edildi.



3. BULGULAR

3.1. SERUM PARAMETRELERİ

Kontrol, MG, MTX ve MTX+MG gruplarında serum glikoz, kolesterol, ALT, AST, üre ve kreatin düzeyleri Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Tablodan da görüleceği üzere, glikoz ve kolesterol değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($P > 0.05$). MTX uygulaması ile AST ($P < 0.0001$) ve ALT ($P < 0.0001$) aktiviteleri ile üre ($P < 0.005$) ve kreatin ($P < 0.001$) düzeylerinde artış tespit edilmiştir. AST düzeyleri incelendiğinde, MTX grubunun (316.80 ± 7.49 U/L), kontrol grubuna (104.00 ± 8.54 U/L) göre yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu (209.00 ± 5.15 U/L) AST aktivitesi yaklaşık 1.5 katlık bir düşüş göstermiştir ($P < 0.001$). Kontrol grubu ile MG (98.20 ± 6.18 U/L) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0.05$). MTX+MG grubunda AST değerleri MTX göre daha düşük olmakla birlikte, kontrol ve MG grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($P < 0.001$). ALT aktiviteleri ise MTX grubunun (227.80 ± 6.73 U/L), kontrol grubuna (56.40 ± 4.85 U/L) göre 4 katlık bir artış olduğu gösterilmiştir ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu (176.60 ± 4.23 U/L) ALT aktiviteleri yaklaşık 1.3 katlık bir düşüş göstermiştir ($P < 0.001$). Kontrol grubu ile MG (58.20 ± 3.89 U/L) arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($P > 0.05$). MTX+MG grubunda AST aktiviteleri MTX’e göre daha düşük, kontrol ve MG grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeyde olduğu görülmüştür ($P < 0.001$).

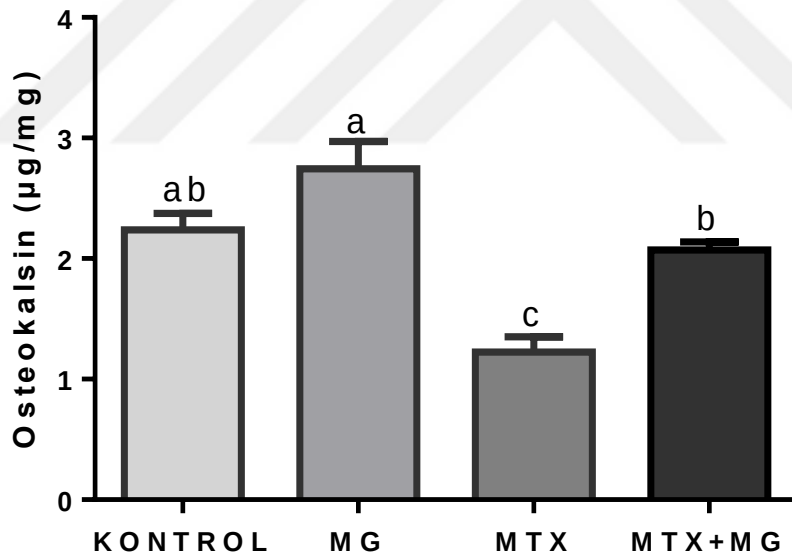
Tablo 3.1. Serum parametre ölçümlerinin sonuçları

	Kontrol	MG	MTX	MTX + MG	--P--
Glikoz, mg/dL	119.20 ± 6.13	109.25 ± 6.64	113.00 ± 4.20	97.00 ± 10.57	0.210
Kolesterol, mg/dL	84.80 ± 5.70	79.00 ± 6.12	93.80 ± 4.83	83.20 ± 5.43	0.324
AST, U/L	104.00 ± 8.54^c	98.20 ± 6.18^c	316.80 ± 7.49^a	209.00 ± 5.15^b	0.0001
ALT, U/L	56.40 ± 4.85^c	58.20 ± 3.89^c	227.80 ± 6.73^a	176.60 ± 4.23^b	0.0001
Üre, mg/dL	25.54 ± 1.08^b	24.05 ± 8.47^b	44.96 ± 1.77^a	32.74 ± 1.84^{ab}	0.005
Kreatin, mg/dL	1.59 ± 0.07^b	1.58 ± 0.07^b	1.87 ± 0.01^a	1.64 ± 0.02^b	0.001

Aynı satırda farklı harfi taşıyan gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0.05$)

3.2. Osteokalsin ve Kemik Mineral Yoğunluğu Düzeyleri

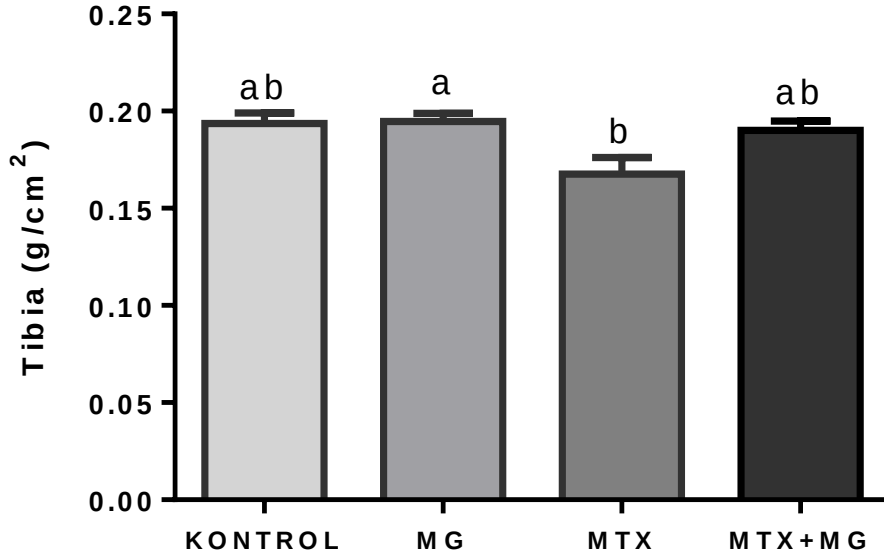
Kemik dokusu osteokalsin düzeyleri Şekil 3.1’de verilmiştir. Osteokalsin düzeylerine göre gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($P < 0.0001$). Kontrol grubu ile MTX grubu karşılaştırıldığında, MTX grubunda osteokalsin düzeyinde %50 oranında bir azalma görülmüştür ($P < 0.001$). Ancak, MTX+MG grubu arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ($P > 0.05$). MG verilen grup ile MTX+MG verilen grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuş ($P < 0.05$) ve MTX+MG grubunun osteokalsin seviyesi %15 oranında bir azalma göstermiştir. MG grubu ile MTX grubunun karşılaştırmasında ise anlamlı bir fark saptanmış ($P < 0.001$) ve osteokalsin düzeyleri yaklaşık %55 oranında bir azalma göstermiştir. MTX ile MTX+MG gruplarının istatistiksel değerlendirmesinde ise anlamlı bir fark bulunmuş ($P < 0.01$), bu farkın MTX+MG grubu lehine bir değişim görülmüştür ve %60 oranında artış göstermiştir.



Şekil 3.1. Osteokalsin düzeyleri. a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)

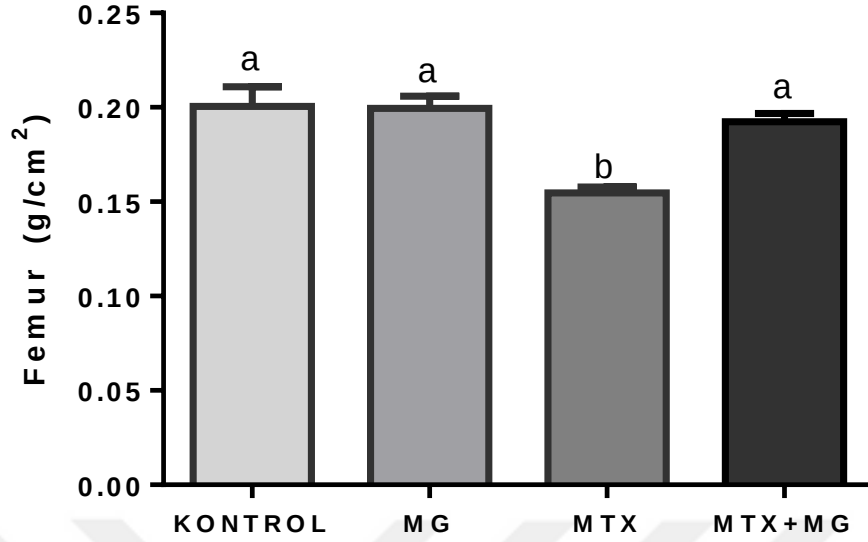
Akut MTX kemoterapisi alan ratlarda tibia’nın KMY düzeyleri Şekil 3.2’de sunulmuştur. MTX enjekte edilen ratlarda tibia KMY düzeyleri incelendiğinde (Şekil 3.2) kontrol grubu ile MTX grubu arasında anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($P < 0.05$). MTX grubunda KMY düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlenmiştir. MTX grubu

ile MTX+MG grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P > 0.05$). MTX grubu tibia KMY, MG grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalış gözlenmiştir ($P < 0.05$).



Şekil 3.2. Tibia KMY düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

MTX ile indüklenen ratlarda; MG katkısının femur KMY'sine yönelik değişim grafiği Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Femur KMY düzeyleri arasındaki değişimin yer aldığı Şekil 3.3'e göre bütün gruplar arasında önemli düzeyde bir fark olduğu görülmüştür ($P < 0.0001$). MTX grubu ile kontrol grubu kıyaslandığında MTX grubunda anlamlı bir azalış olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$). MTX grubu ile MTX+MG grubu karşılaştırıldığında MTX+MG grubunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($P < 0.01$). Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim gözlemlenmezken ($P > 0.05$), MTX grubunda anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($P < 0.001$).



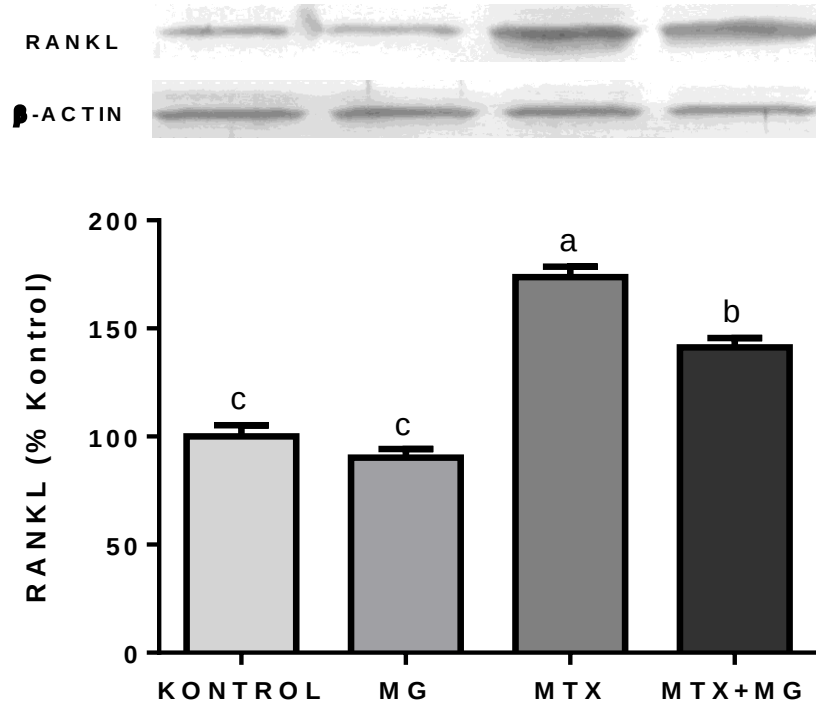
Şekil 3.3. Femur KMY düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

3.3. Kemik Dokusunda RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 Kollajen Proteinlerinin Düzeyleri

Bu çalışmada, akut MTX kemoterapisi alan ratlarda MG'nin osteoklastogenez ve kemik hasarı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kemik dokusunda RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 kollajen proteinlerinin düzeyleri Western blot metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

3.3.1. RANKL Düzeyleri

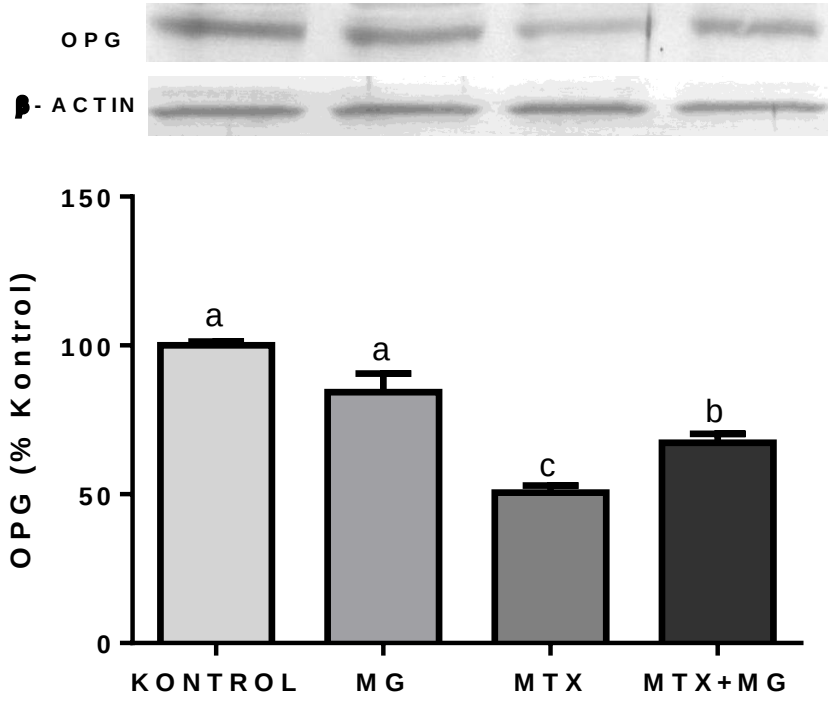
Kemik dokusu RANKL proteini düzeyleri Şekil 3.4'de gösterilmiştir. RANKL proteini düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). MTX grubu RANKL protein düzeyi, kontrol grubuna göre %58'lik bir artış göstermiştir ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu RANKL protein düzeylerinde %19 oranında bir azalma görülmüştür ($P < 0.01$). Kontrol grubu ile MG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0.05$).



Şekil 3.4. Kemik dokusu RANKL düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

3.3.2. OPG düzeyleri

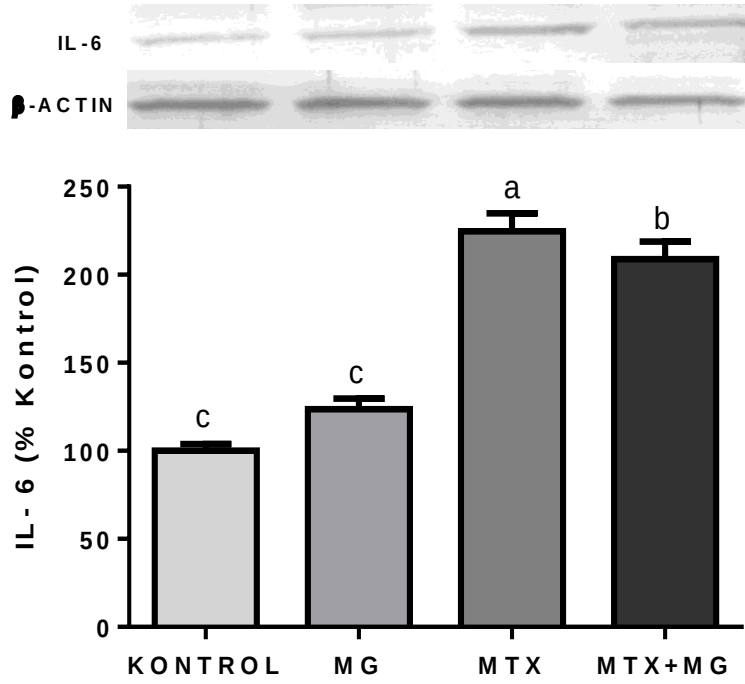
Kemik dokusu OPG düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir (Şekil 3.5) ($P < 0.0001$). MTX grubu OPG protein düzeyi, kontrol grubuna göre %50 oranında bir azalma görülmüştür ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu OPG proteini düzeyinde anlamlı bir artış göstermiştir ($P < 0.05$). Kontrol grubu ile MG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($P > 0.05$).



Şekil 3.5. Kemik dokusu OPG düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

3.3.3. IL-6 Düzeyleri

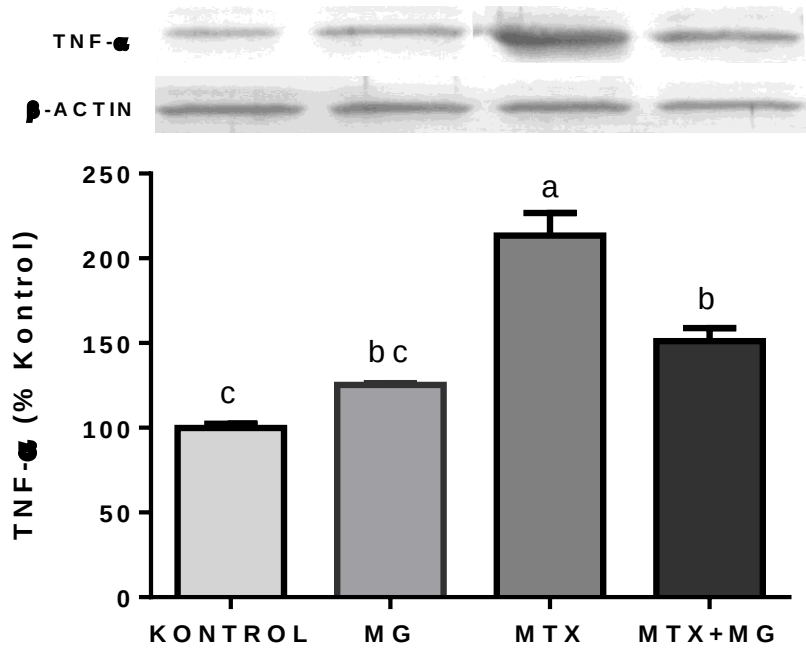
Kemik dokusu IL-6 protein düzeyleri Şekil 3.6’da gösterilmiştir. IL-6 düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir ($P < 0.0001$). MTX grubu IL-6 protein düzeyi, kontrol grubuna göre %55 oranında bir artış göstermiştir ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MG grubu IL-6 protein düzeyinde %55’lik bir azalış olduğu görülmüştür ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu IL-6 protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Kontrol grubu ile MG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Kontrol grubu ile MTX+MG grubu IL-6 protein düzeyi arasında yapılan karşılaştırmada yaklaşık olarak %52 oranında bir artış göstermiştir ($P < 0.001$).



Şekil 3.6. Kemik dokusu IL-6 düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

3.3.4. TNF- α Düzeyleri

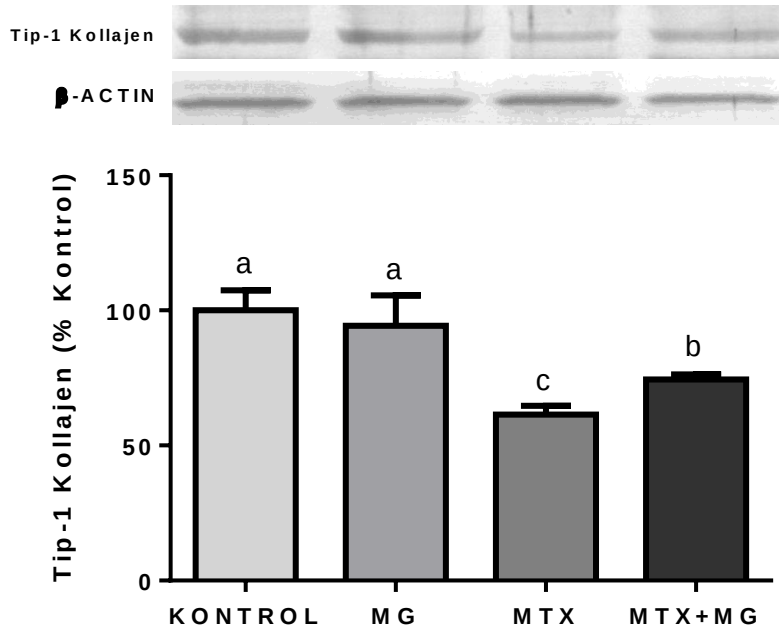
Kemik dokusu TNF- α protein düzeyleri incelendiğinde; MTX grubu TNF- α protein düzeyi, kontrol grubuna göre %54 oranında bir artış göstermiştir (Şekil 3.7) ($P < 0.001$). MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu TNF- α proteini düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiş ($P < 0.01$) ve TNF- α proteini düzeyinde %30 oranında bir azalma göstermiştir. Kontrol grubu ile MG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($P > 0.05$).



Şekil 3.7. Kemik dokusu TNF- α düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

3.3.5. Tip 1 Kollajen Düzeyleri

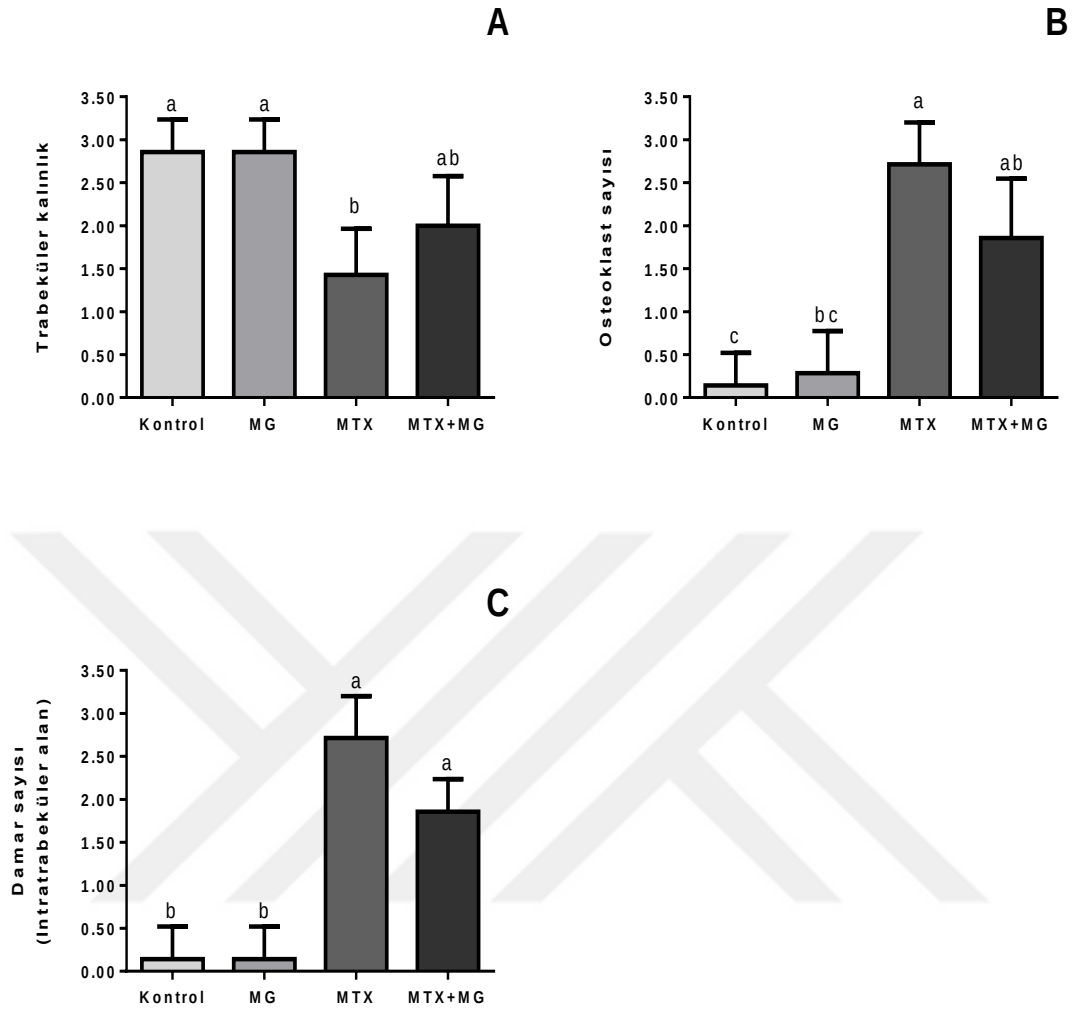
Kemik dokusu Tip 1 kollajen proteini düzeyleri incelendiğinde; MTX grubu Tip 1 kollajen protein düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık göstermiştir (Şekil 3.8) ($P < 0.05$) ve Tip 1 kollajen protein düzeyi yaklaşık olarak %40 oranında bir azalma göstermiştir. MTX grubu ile karşılaştırıldığında MTX+MG grubu Tip 1 kollajen protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($P < 0.05$). Kontrol grubu ile MG grubu arasında yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($P > 0.05$).



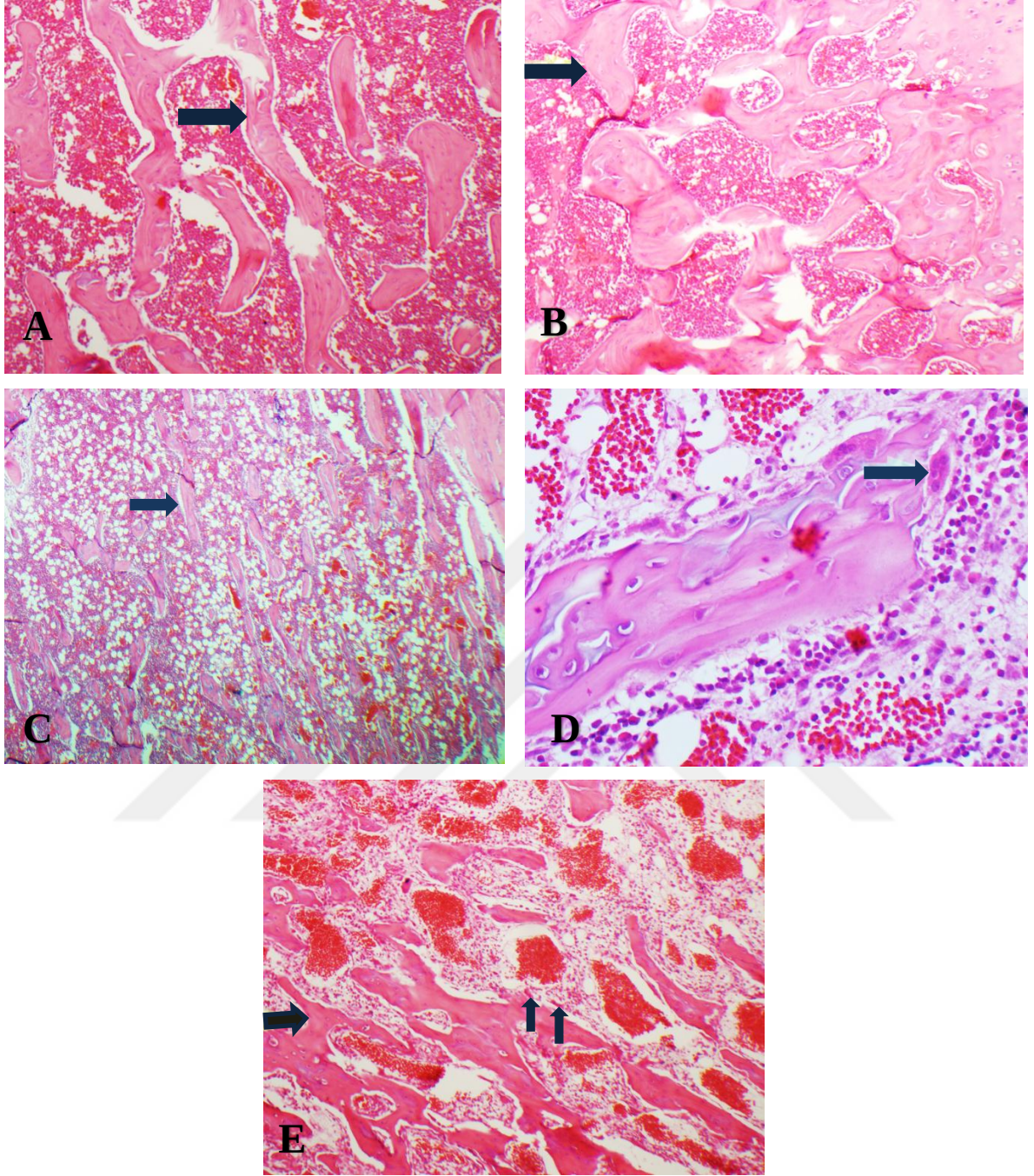
Şekil 3.8. Kemik dokusu Tip 1 Kollajen düzeyleri [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]

3.4. Histopatolojik Bulgular

MTX grubundaki ratların kemik dokularında kontrol grubundakilere göre, kemik trabeküllerinde belirgin bir incelme, intratrabeküler alandaki damar sayısında ve osteoklast sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10). MTX+MG verilen grupta ise kontrol grubuna göre, kemik trabeküllerinde orta derecede incelme, damar ve osteoklast sayısında orta derecede bir artış olmuştur (Şekil 3.9, Şekil 3.10). MTX+MG verilen grup ile MTX grubu kıyaslandığında, kemik trabeküllerindeki kalınlık belirgin bir artış görülmüşken, intratrabeküler alandaki damar sayısında ve osteoklast sayısında azaldığı görülmüştür (Şekil 3.9, Şekil 3.10).



Şekil 3.9. MTX ile tedavi edilen ratlarda MG'nin histopatolojik parametreler üzerindeki etkileri. A: Trabeküler kalınlık; B: Osteoklast sayısı; C: Damar sayısı (Intratrabeküler alan) [a-c: farklı harf taşıyan gruplar arasındaki farklılık istatistiksel bakımdan önemlidir ($P < 0.05$)]



Şekil 3.10. Grupların kemik histopatolojik görünüşleri: A. Kontrol grubu: Kemik trabeküllerinde (↑) ve intratrabeküler alanların normal histolojik görünümü (H&E, x200); B. MG grubu: Kemik trabekülleri (↑) ve intratrabeküler alanda normal histolojik görünümü (H&E, x200); C. MTX grubu: Kemik trabeküllerinde belirgin incelme ve osteoklast sayısında artış (↑) (H&E, x200); D. MTX grubunun osteoklast oluşumu: Kemik trabekülleri (⬆) etrafında osteoklast artışı (↑) (H&E, x400); E. MTX+MG grubu: MTX grubuna göre Kemik trabeküllerinde kalınlaşma ve osteoklast sayısında azalma (H&E, x200).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, MTX kemoterapisi alan ratlarda MG'nin serum glikoz, kolesterol, AST, ALT, üre ve kreatin düzeyleri, kemik osteokalsin, KMY, RANKL, OPG, IL-6, TNF- α ve Tip 1 kollajen proteinlerinin düzeyleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. MTX verilen hayvanların serum AST ve ALT aktiviteleri ile üre ve kreatinin düzeyleri diğer gruplara göre belirgin bir şekilde artmış, MTX+MG grubunda ise bu değerler azalmıştır. Kemik osteokalsin ve KMY (tibia ve femur) düzeylerine bakıldığında kontrol grubu ile MTX grubu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. MTX grupları ile kontrol grupları kıyaslandığında, RANKL, IL-6 ile TNF- α protein düzeylerinin arttığı, OPG ve Tip 1 kollajen protein düzeylerinin azaldığı belirlenmiştir. MTX grupları ile MTX+MG grupları karşılaştırıldığında ise, RANKL, IL-6 ve TNF- α protein düzeylerinde anlamlı bir azalış gözlemlenirken, OPG ve Tip 1 kollajen protein düzeylerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. MTX alan grupta osteoklast hücrelerinin arttığı, MTX+MG grubunda ise belirgin bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. MG'nin MTX'in oluşturduğu olumsuz etkileri azalttığı ve tedavi sürecini destekleyici yönde etkileri olduğu bu çalışma sonucunda elde edilmiştir.

Kemoterapi, lösemi ve solid tümörlerde ilk etapta düşünülen tedavi seçeneğidir (Corrie, 2008; Verweij ve de Jonge, 2000). Ancak, deneysel araştırmalar, MTX kullanımının kemik büyümesini engellediği (Pfeilschifter ve Diel, 2000; Cavalcanti vd., 2014; King vd., 2015), metafiz kütesini azalttığı, kemik iliğinde yağ dokusu oluşumunu artırdığı (Fan vd., 2009), osteoklast aktivitesini artırdığı (Fan vd., 2009; King vd., 2012) ve kondrosit profilerasyonunu bozup apoptozisi uyardığı bilinmektedir (Georgiou vd., 2012c; Xian vd., 2007). MTX kemiğe olan toksik etkisini hem kemik iliği hücrelerine hem de kemiğin yapısal hücrelerinde direkt olarak gösterebilmektedir (Georgiou vd., 2015; Lee vd., 2017; Xian vd., 2007; Xian vd., 2008). Ayrıca, MTX serbest oksijen radikalleri üreterek lipid peroksidasyonun yükselmesine neden olur ve bu serbest radikaller mitokondrinin fonksiyonunun bozulmasına ve apoptozis oluşmasına yol açar (Barbier vd., 2010; Fan vd., 2014; Jahovic vd., 2003; Jahovic vd., 2004; Miyazono vd., 2004). Bazı çalışmalar da yaşlanma ve kemoterapi ilişkili kemik kaybında oksidatif stresin potansiyel olarak rol oynadığı ifade edilmiştir. Oksidatif stresin NF-kB aktivasyonu ile osteoblast farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Tiligada vd., 2006; Zhang vd., 2011; Fan vd., 2014).

Son yıllarda, kemoterapinin yan etkilerini azaltmak için fitokimyasallar üzerinde çok sayıda araştırma yapılmıştır (Georgiou vd., 2012a; Tacyildiz vd., 2010; King vd., 2015; Liao, Apaya ve Shyur, 2013; Lee vd., 2017). Bazı çalışmalar, fitokimyasalların, kemik mineralizasyonunu artırarak kemik kütlesinin stimülasyonunu desteklediğini göstermiştir (Georgiou vd., 2012a; Holzer vd., 2003; King vd., 2015; Lee vd., 2017). Zingiberaceae ailesinin bir üyesi olan Curcuma amada Roxb., rizomunda ham mango benzeri aroması nedeniyle genellikle MG olarak bilinen bir fitokimyasal içerir. MG çeşitli rahatsızlıklar için farmakolojik öneme sahiptir (Jatoi vd.,2007). MG, diüretik ve antipiretik aktivitelerinin yanında antioksidan, antihiperglisemik, antihiperkolesterolemik, antibakteriyel, anti-ülser, anti-fungal, antikanser, inflamasyon ile ilgili genlerin downregülasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozis stimülasyonu gibi çok sayıda biyolojik aktiviteye sahiptir (Jatoi vd.,2007; Mujumdar vd., 2000; Policegoudra, Aradhya ve Singh, 2011; Ramachandran vd., 2017; Srinivasan vd., 2008; Singh vd., 2012).

MTX'in kemoterapötik etkilerinin yanı sıra, karaciğer, böbrek ve kemik iliği üzerine ciddi yan etkileri vardır (Armagan vd.,2015). Yapılan çalışmalar, MTX'in serbest oksijen radikallerinin artışıyla hepatotoksisiteye neden olduğunu göstermektedir (Ali vd., 2014; Armagan vd., 2015). Reaktif oksijen radikallerinin aşırı üretimi sonucunda serum AST, ALT ve ALP düzeylerinde artış meydana gelmiştir (Ali vd., 2017). Mehrzadi ve arkadaşlarının (2018) çalışmalarında ise 20 mg/kg dozluk MTX verilmesinin serum AST, ALT ve ALP aktivitelerini artırdığı görülmüştür. Dahası ratlara tedaviden önce 10 gün boyunca 100 mg/kg berberin verilmesi MTX hepatotoksitesini hafifletebilmektedir. Ayrıca, MTX+berberin ve berberin (100 mg/kg) verilen ratlarda AST, ALT ve ALP aktivitelerinin azaldığı görülmektedir (Mehrzadi vd., 2018). Tarafımızdan yürütülen bu çalışmada, akut MTX kemoterapisi verilen ratların serum örneklerindeki ALT ve AST aktivitelerinde kontrol grubuna göre artış olduğu görülmüştür. MTX+MG grubunda ise ALT ve AST aktivitelerinde azalma görülmüştür (Tablo 3.1). Bazı çalışmalar, MTX aracılı nefrotoksisiteyi, antioksidan tedavinin azalttığını göstermiştir (Lin vd., 2017). Bu çalışmada da MTX verilen ratlarda üre ve kreatin seviyelerinin kontrol grubuna göre arttığı ve MG grubunda ise azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 3.1).

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kalsiyum varlığında hidroksiapatite bağlanarak kemik matriksine dahil olur ve plazma içindeki konsantrasyonu, kemik oluşum hızı ile koreledir (Sahin vd., 2007). Yapılan çalışmalarda, metafizdeki osteoblastojenik transkripsiyon faktörleri Runx2 ve Osx (Osterix)'in yanı sıra spesifik

kemik oluşum markerı olan osteokalsinin, MTX ile tedavi edilen ratlarda kontrol grubuna kıyasla arttığı görülmüştür (Georgiou vd., 2012c; Lee vd., 2017; Xian vd., 2007). Lee ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmalarında, resveratrol tedavisi alan grubun osteogenetik faktör (Runx2, Osx ve osteokalsin) düzeylerinin kontrol grubuyla aynı olduğunu ve bir overekspresyon olmadığını saptamışlardır. Aynı araştırıcılar, MTX+Resveratrol ile tedavi edilen ratlarda osteogenezis faktörlerinde aşırı yüksek bir ekspresyon tespit etmemişlerdir. Nadhanan ve arkadaşları (2014), balık yağının (FO) osteokalsin düzeylerinde kısmi bir artışa neden olduğunu belirlemekle beraber MTX+FO grubunda MTX grubuna kıyasla istatistiksel acıdan bir fark tespit edilmemişlerdir. Öte yandan folinik asit (FA) kontrol grupla karşılaştırıldığında osteokalsin düzeylerinde herhangi bir değişiklik yapmadığı halde MTX+FA grubunda MTX grubuna kıyasla osteokalsin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğu görülmüştür (Nadhanan vd., 2014). Bu araştırmada ise osteokalsin düzeyinin kontrol grubuna göre MTX grubunda bir düşüş gösterdiği, ancak MTX+MG grubunda MTX grubuna göre ise artış gösterdiği belirlenmiştir (şekil 3.1).

Tarafımızdan yürütülen bu çalışmada, MTX ile birlikte MG kullanılmasının KMY yoğunluğunu arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir deyişle, MG tedavisinin ratlarda MTX'in neden olduğu kemik kaybına karşı koruyucu özellikte olduğunu göstermiştir (şekil 3.2 ve şekil 3.3). Bu durum, osteoklastların sitokin salınımı ile farklılaşmasını ve proliferasyonuna neden olan oksidatif stresi indükleyen MTX'e bağlı kemik kaybının önlenebilmesi için pozitif bir sonuç olarak ifade edilebilir. Ancak, MTX ile birlikte MG kullanımının KMY  zerine etkileri ile daha önce yapılmış çalışmalara rastlanılmamıştır. MG, anti-inflamatuar etkisini NF- B, TNF-  ve Nrf2 üzerinden oksidatif stres inflamasyon düzeyini azaltarak gösterebilir (Policegoudra vd., 2007a; Sahin vd., 2017). Ayrıca, Lean ve arkadaşları, oksidatif stresin de TNF-  ekspresyonunu indükleyerek KMY'yi azaltabileceğini bildirmişlerdir (Lean vd., 2005). Kanserli hastalarda kemoterapinin KMY'yi azalttığı bilinmektedir. Hayvan model çalışmalarında bu yan etkinin başlıca nedeni değişmiş kemik remodellingidir (Georgiou vd., 2012c; King vd., 2012). Fan ve arkadaşları (2009), düşük dozda MTX uygulamasının kemik deformasyonuna neden olmadığını rapor etmişlerdir (Fan vd., 2009). Liu ve arkadaşları (2015b) ise düşük doz MTX tedavisinin sağlıklı ratlarda kemik yıkımı ile birlikte kemik yapımını da arttırdığını, sonuç olarak da KMY'de bir azalma yaptığını ortaya koymuşlardır. Ancak femur analizlerinde kontrol grubuna göre kemik niteliklerinde önemli değişiklikler olmadığı ortaya çıkmıştır (Liu, vd., 2015b). Çalışmamızda da benzer sonuçlar

gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna göre MTX alan ratlarda KMY'nin hem tibia hem de femur da azaldığı saptanmıştır. MTX+MG alan ratlarda ise femur KMY düzeylerinin kontrole yaklaştığı görülmüştür. Ancak tibiada önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).

Daha önce yapılan çalışmalarda, MG'nin DPPH radikal süpürücü, süperoksit radikali temizleme ve lipid peroksidasyon inhibitörü faaliyeti gösterdiğini bildirilmiştir (Singh vd., 2003; King vd., 2015; Lee vd., 2017). Ayrıca, MG'nin, kas laktatını, oksidatif stresi azalttığı ve ratlarda kas antioksidan aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Sahin vd., 2017). Bunun yanında, MG benzeri etki gösteren bazı fitokimyasalların pozitif etki gösterdiği belirlenmiştir (King vd., 2015; Lee vd., 2017). Örneğin, MTX'in kemik hücreleri üzerine etkilerini inceleyen bazı çalışmalarda MG gibi antioksidan ve antiinflamatuvar etkili olan genisteinin, MTX nedenli kemik hasarlarında kemik yapımını hızlandırıcı ve kemik yıkımını azaltıcı etkileri gösterilmiştir (Marini vd., 2007; Marini vd., 2008a; Marini vd., 2008b; Morabito vd., 2002; King vd., 2012; King vd., 2015). Önceki çalışmalar, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri gibi çoklu mekanizmaların kemik rezorpsiyonu ve yoğunluğu üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Raisz, 2005). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, egzersiz yapan ratlarda MG desteğinin Nrf2, HO-1 ve NF- κ B sinyalizasyonunu engellediğini ve egzersiz kapasitesini geliştirdiği bildirilmiştir (Sahin vd., 2017). Buna ek olarak, NF- κ B ligandının bir reseptör aktivatörü olan RANKL, kemik rezorbsiyondan sorumludur (Boyle vd., 2003). Nükleer faktör kappa-B ligandı (RANKL) osteoblastlar ve osteositler tarafından salgılanır ve osteoklastlar ve osteoklast öncüleri üzerinde eksprese edilen nükleer faktör kappa-B'nin (RANK) reseptör aktivatörüne bağlanarak osteoklastların farklılaşmasını ve aktivitesini düzenler. Osteoprotegerin (OPG) RANKL'ın RANK ile etkileşimini bağlayıp inhibe edebilen çözünebilir bir reseptördür (Bayliss vd., 2012; Rachner vd., 2018). Daha önceki çalışmalar, MTX'in kanda ve kemikte osteoklast yoğunluğunu artırdığını göstermiştir (King vd., 2012; Xian vd., 2007). Yapılan bir çalışmada, ratlara resveratrol verilmesi ile RANKL/OPG oranı ve IL-1'in ekspresyon seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular osteoklastojenik faktörlerin osteoklast oluşumunu arttırmada önemli rolü olduğunu ve MTX kemoterapisinin alınmasının ardından aşırı kemik rezorpsiyonuna neden olduğunu düşündürmektedir. Öte yandan, MTX kemoterapisi sırasında resveratrol uygulanmasıyla, hem RANKL hem de OPG transkripsiyon aktivitelerinde dengeli bir artış ortaya çıkmış ve böylece MTX kemoterapisinin yan etkilerini azaltarak RANKL/OPG

oranını kontrol seviyelerine döndürmüştür (He vd., 2010; Lee vd., 2017). Mevcut çalışmamızda da, MTX verilen rat gruplarında kontrol gruplarına göre, RANKL, IL-6 ile TNF- α 'nın protein düzeyleri açısından bir artış görülürken (Şekil 3.4, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7), OPG protein düzeylerinde ise azalma belirlenmiştir (Şekil 3.5). MTX ile birlikte MG verilen grupların yalnız MTX verilen gruplara göre, RANKL, IL-6 ve TNF- α protein düzeylerinde bir azalış tespit edilmiş (Şekil 3.4, Şekil 3.6 ve Şekil 3.7), ancak OPG protein düzeylerinde ise bir artış tespit edilmiştir (Şekil 3.5). Yapılan bir çalışmada MTX uygulanan ratlarda muhtemel kemik oluşum mekanizmasının, yüksek hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonu ve azaltılmış antioksidan enzim aktiviteleri ile üretilen oksidatif strese bağlı olarak etkilendiğini göstermiştir (Hussan vd., 2012).

Tip 1 kollajen, kemik ekstraselüler matriksinin en önemli bileşenlerinden biridir ve kemik kollajenin yaklaşık %95'ini ve toplam kemik proteinlerinin yaklaşık %80'ini temsil eder (Russo vd., 2017). Yapılan bir çalışmada, MTX'in ardışık dozlarının, tedavi edilen ratların büyüme plakasındaki kollajen-II mRNA ekspresyonunu azalttığı gösterilse de, uzun vadeli MTX alan ratlarda önemli ölçüde baskılanmadığını ortaya koymuştur (Fan vd., 2012). Nabai ve arkadaşlarının (2015) yaptıkları bir çalışmada, MTX tedavisinin Tip 1 kollajeni önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (Nabai vd., 2015). Bu çalışmaların sonuçlarıyla mevcut çalışmamızın sonuçları benzerlik göstermektedir. MTX verilen gruplarda kontrol grubuna göre Tip 1 kollajen de azalma meydana gelmiştir. MTX+MG grubunda ise Tip 1 kollajen düzeyinde artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.8).

MTX kemik matriksinin, osteoblastların ve tibial metafizyal trabeküler kemik hacminin azalmasına neden olarak kemik gelişimini etkileyebilir ve trabeküler kemik yüzeyinde osteoklast yoğunluğunu arttırabilir (Cavalcanti vd., 2014; Fan vd., 2009; May vd., 1996; Xian vd., 2007). Yapılan çalışmalarda, MTX'in ilk dozunun verilmesini takip eden günlerde kemik kütlesinde belirgin bir azalma ve trabeküler yapıda hasar olduğu ve ardından tedavi ile kontrol seviyelerine geldiği belirlenmiştir (Xian vd., 2007; Xian vd., 2008). Holzer ve arkadaşları (2003), yüksek doz MTX tedavisinin, kemik rezorpsiyonunda artış ve osteopeniye neden olabileceğini ve bunun da kırık olasılığını arttırabileceğini bildirmişlerdir (Holzer vd., 2003). Lee ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmalarında 1 mg/kg resveratrol vererek MTX nedenli kemik patolojilerinin azaldığını belirlemişlerdir (Lee vd., 2017). Lee ve arkadaşlarının (2017) çalışmaları sonucunda resveratrol molekülünün MTX nedenli kemik bulgularını geriletmediği ve normal kemik gelişimine katkıda bulunduğunu belirlemişlerdir (Lee vd., 2017). Bir başka çalışmada da MTX,

kemik hacminde bir azalma meydana getirmiş; fakat trabekül yapısı ve kemik mimarisinde bir değişiklik oluşturmamıştır. Bazı çalışmalarda genistein vermenin kemik kütlesini ve mimarisini etkilediği gösterilse de (Bitto vd., 2008; Bitto vd., 2009; Fanti vd., 1998) King arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmalarında, genistein verilen grupta, kontrol ratlarına göre kemik hacminde ve trabekül yapısına etki etmediği belirlenmiştir. Çalışmamızda histopatolojik açıdan MG'nin olumlu etkileri olduğu görülmüştür. MTX alan grupta osteoklast hücrelerinin arttığı, MTX+MG grubunda ise belirgin bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10). King ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmalarında MTX'in kemik hücrelerinin toplam yoğunluğunu değiştirmedeğini, ancak kemik yüzeyinde osteoklast yoğunluğunu arttırdığını belirlemişler. Genisteini (kontrol grubuna göre) tek ve birlikte vermek, hücre yoğunluğunu etkilemediği; fakat osteoklast yoğunluğu sadece MTX verilen gruba göre belirgin olarak azalmış olduğu bulunmuştur (King vd., 2015). Bu histolojik sonuçlar benzer şekilde mevcut çalışmamızda diğer sonuçları ile tutarlıdır. MTX trabeküler kalınlıkta azalmaya sebep olup kemikteki osteoklast ve intratrabeküler alan sayısını artırmıştır (Şekil 3.9, Şekil 3.10). Bununla birlikte, mevcut bulgular MG'nin muhtemelen inflamasyonu azaltarak ve oksidatif stresi artırarak MTX toksisitesine karşı koruyucu etkisini doğrulamaktadır (Sahin vd., 2017).

Sonuç olarak; MTX'e maruz kalan deney hayvanlarına uygulanan MG'nin; serum AST, ALT, üre ve kreatinin düzeylerini diğer gruplara göre belirgin bir şekilde azalttığı, buna karşılık kemik dokusunda osteokalsin ve KMY'nu (tibia ve femur) ise arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, MG tedavisi ile RANKL, IL-6 ve TNF- α düzeylerinin azaldığı; OPG ve Tip 1 kollajen seviyelerinin arttığı, MTX kaynaklı kemik dokusu hasarı üzerindeki negatif etkilerinin azaldığı ortaya konmuştur. MG'nin kemik hasarları üzerinde olumlu etkileri tespit edildiğinden MTX kemoterapisi kaynaklı kemik kaybı üzerine iyileştirici etkileri olduğu, bilimsel birikime katkı sağlayacağı ve sonraki akademik çalışmalara ışık tutacağı düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Al Maruf, A., O'Brien, P.J., Naserzadeh, P., Fathian, R., Salimi, A. and Pourahmad, J.,** 2017. Methotrexate induced mitochondrial injury and cytochrome c release in rat liver hepatocytes, *Drug and Chem. Toxicol.*, **1**, 1–11.
- Ali, N., Rashid, S., Nafees, S., Hasan, S.K., Shahid, A., Majed, F. and Sultana, S.,** 2017. Protective effect of chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: an experimental approach, *Chem. Biol. Interact.*, **272**, 80–91.
- Ali, N., Rashid, S., Nafees, S., Hasan, S.K. and Sultana, S.,** 2014. Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis, *Mol. Cell. Biochem.*, **385**, 215–223.
- Anderson, D.M., Maraskovsky, E., Billingsley, W.L., Dougall, W.C., Tometsko, M.E., Roux, E.R., Teepe, M.C., DuBose, R.F., Cosman, D. and Galibert, L.,** 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function, *Nature*, **390**, 175–179.
- Anderton, J.A., Lindsey, J.C., Lusher, M.E., Gilbertson, R.J., Bailey, S., Ellison, D.W. and Clifford, S.C.,** 2008. Global analysis of the medulloblastoma epigenome identifies disease-subgroup-specific inactivation of COL1A2, *Neuro. Oncol.*, **10**, 981-994.
- Arikoski, P., Komulainen, J., Riikonen, P., Parviainen, M., Jurvelin, J. S., Voutilainen, R. and Kroger, H.,** 1999. Impaired development of bone mineral density during chemotherapy: A prospective analysis of 46 children newly diagnosed with cancer, *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 2002–2009.
- Armagan, I., Bayram, D., Candan, I.A., Yigit, A., Celik, E., Armagan, H.H. and Uguz, A.C.,** 2015. Effects of pentoxifylline and alpha lipoic acid on methotrexate-induced damage in liver and kidney of rats, *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **39**, 1122–1131.

- Athanassiadou, F., Tragiannidis, A., Rousso, I., Katsos, G., Sidi, V., Papageorgiou, T., Papastergiou, C., Tsitouridis, I. and Koliousskas, D.,** 2006. Bone mineral density in survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia, *Turk. J. Pediatr.*, **48**, 101–104.
- Axmann, R., Böhm, C., Krönke, G., Zwerina, J., Smolen, J. and Schett, G.,** 2009. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation *in vitro* and *in vivo*, *Arthritis Rheum.*, **60**, 2747–56.
- Babiak, R. M., Campello, A. P., Carnieri, E. G. and Oliveira, M. B.,** 1998. Methotrexate: Pentose cycle and oxidative stress, *Cell Biochem. Funct.*, **16**, 283-293.
- Bahcecioglu, I.H., Koca, S.S., Poyrazoglu, O.K., Yalniz, M., Ozercan, I.H., Ustundag, B., Sahin, K., Dagli, A.F. and Isik, A.,** 2008. Hepatoprotective effect of infliximab, an anti-TNF- α agent, on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis, *Inflammation*, **31**, 215-221.
- Bao, Y., Gao, Y., Du, M., Hou, W., Yang, L., Kong, X., Zheng, H., Li, W., Hua, B.,** 2015. Topical treatment with xiaozheng zhitong paste (xzp) alleviates bone destruction and bone cancer pain in a rat model of prostate cancer-induced bone pain by modulating the rankl/rank/opg signaling, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2015**, 1-14.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. and Del Razo, L.M.,** 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity, *Chem. Biol. Interact.*, **188**, 319–333.
- Bayliss, L., Mahoney, D.J. and Monk, P.,** 2012. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation, *Surgery (Oxford)*, **30**, 47-53.
- Bitto, A., Burnett, B.P., Polito, F., Levy, R.M., Marini, H., di Stefano, V., Irrera, N., Armbruster, M.A., Minutoli, L., Altavilla, D. and Squadrito, F.,** 2009. Genistein aglycone reverses glucocorticoid-induced osteoporosis and increases bone breaking strength in rats: A comparative study with alendronate, *Br. J. Pharmacol.*, **156**, 1287–1295.

- Bitto, A., Burnett, B.P., Polito, F., Marini, H., Levy, R.M., Armbruster, M.A., Minutoli, L., di Stefano, V., Irrera, N., Antoci, S., Granese, R., Squadrito, F. and Altavilla, D.,** 2008. Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: A comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol, *Br. J. Pharmacol.*, **155**, 896 -905.
- Blair, H.C., Robinson, L.J. and Zaidi, M.,** 2005. Osteoclast signalling pathways, *Biochem. Biophys Res. Commun.*, **328**, 728–738.
- Boquete-Castro, A., Gomez-Moreno, G., Calvo-Guirado, J.L., Aguilar-Salvatierra, A. and Delgado-Ruiz, R.A.,** 2015. Denosumab and osteonecrosis of the jaw. A systematic analysis of events reported in clinical trials, *Clin. Oral Implants Res.*, **27**, 367-375.
- Bord, S., Frith, E., Ireland, D.C., Scott, M.A., Craig, J.I.O. and Compston, J.E.,** 2004. Synthesis of osteoprotegerin and RANKL by megakaryocytes is modulated by oestrogen, *Br. J. Haematol.*, **126**, 244–251.
- Boskey, A.L., Gadaleta, S., Gundberg, C., Doty, S.B., Ducky, P. and Karsenty, G.,** 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin, *Bone*, **23**, 187–96.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L.,** 2003. Osteoclast differentiation and activation, *Nature*, **423**, 337–342.
- Bronckers, A.L., Price, P.A., Schrijvers, A., Bervoets, T.J. and Karsenty, G.,** 1998. Studies of osteocalcin function in dentin formation in rodent teeth, *Eur. J. Oral Sci.*, **106**, 795–807.
- Brufsky, A. M.,** 2008. Cancer treatment-induced bone loss: Pathophysiology and clinical perspectives, *The Oncologist*, **13**, 187–195.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S. and Parker, K.L.,** 2009. Goodman&Gilman tedavinin farmakolojik temeli, (Ö. Süzer, Çev. Ed.), Nobel Yayınları, İstanbul.
- Caetano, N.N., Campello, A.P., Carnieri, E.G., Kluppel, M.L. and Oliveira, M.B.,** 1997. Effects of methotrexate (MTX) on NAD (p) dehydrogenase of hela

cells: malic enzymes, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases, *Cell Biochem Funct.*, **15**, 259-264.

Carneiro-Filho, B.A., Lima, I.P., Araujo, D.H., Cavalcante, M.C., Carvalho, G.H., Brito, G.A., Lima, V., Monteiro, S.M., Santos, F.N., Ribeiro, R.A. and Lima, A.A., 2004. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis, *Dig. Dis. Sci.*, **49**, 65–72.

Cavalcanti, S.C., Corrêa, L., Mello, S.B. and Luz, J.G., 2014. The effect of methotrexate on the bone healing of mandibular condylar process fracture: an experimental study in rats, *J. Craniomaxillofac. Surg.*, **42**, 1133–1139.

Cegiela, U., Sliwinski, L., Kaczmarczyk-Sedlak, I. and Folwarczna, J., 2005. In vivo effects of high-dose methotrexate on bone remodeling in rats, *Pharmacol. Rep.*, **57**, 504–514.

Chandarana, H., Baluja, S. and Chanda, S.V., 2005. Comparison of antibacterial activities of selected species of Zingiberaceae family and some synthetic compounds, *Turk J. Biol.*, **29**, 83-97.

Chang, H., Jin, T.Y., Jin, W.F., Gu, S.Z. and Zhou, Y.F., 2003. Modulation of isoflavones on bone-nodule formation in rat calvaria osteoblasts in vitro, *Biomed. Environ. Sci.*, **16**, 83–89.

Chen, J., Chen, X., Yang, Z., Tan, X., Wang, J. and Chen, Y., 2018. Preparation and characterization of folic acid functionalized bioactive glass for targeted delivery and sustained release of methotrexate, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **1**, 1-11.

Chladek, J., Martinkova, J. and Sispara, L., 1997. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver, *Physiol Res.*, **46**, 371-9.

Choy, E., 2008. Inhibiting interleukin-6 in rheumatoid arthritis, *Curr. Rheumatol. Rep.*, **10**, 413–417.

Corrie, P. G., 2008. Cytotoxic chemotherapy: Clinical aspects, *Medicine*, **36**, 24–28.

- Crofton, P.M., Ahmed, S.F., Wade, J.C., Elmlinger, M.W., Ranke, M.B., Kelnar, C.J. and Wallace, W.H.,** 2000. Bone turnover and growth during and after continuing chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia, *Pediatr. Res.*, **48**, 490–496.
- Crofton, P.M., Ahmed, S.F., Wade, J.C., Stephen, R., Elmlinger, M.W., Ranke, M.B., Kelnar, C.J. and Wallace, W.H.,** 1998. Effects of intensive chemotherapy on bone and collagen turnover and the growth hormone axis in children with acute lymphoblastic leukemia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 3121–3129.
- Çay, H.F. ve Sezer, N.,** 2002. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme, *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Bilimleri Dergisi*, **5**, 177-84.
- Çetinkaya, A., Bulbuloglu, E., Kurutas, E.B. and Kantarceken, B.,** 2006. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats, *Med. Sci. Monit*, **12**, 274-278.
- Datta, H.K., Ng, W.F., Walker, J.A., Tuck, S.P. and Varanasi, S.S.,** 2008. The cell biology of bone metabolism, *J. Clin. Pathol.*, **61**, 577–587.
- David, J.P. and Schett, G.,** 2010. TNF and bone, *Curr. Dir. Autoimmun*, **11**, 135-44.
- Davies, J. H., Evans, B. A. and Gregory, J. W.,** 2005. Bone mass acquisition in healthy children, *Arch. Dis. Child.*, **90**, 373–378.
- Davies, R. and Choy, E.,** 2014. Review Clinical experience of IL-6 blockade in rheumatic diseases-Implications on IL-6 biology and disease pathogenesis, *Seminars in Immunology*, **26**, 97–104.
- Demiryilmaz, I., Sener, E., Cetin, N., Altuner, D., Suleyman, B., Albayrak, F., Akcay, F. and Suleyman, H.,** 2012. Biochemically and histopathologically comparative review of thia-mine's and thiamine pyrophosphate's oxidative stress effects generated with meth-otrexate in rat liver, *Med. Sci. Monit.*, **18**, 475–481.
- Domschke, C. and Schuetz, F.,** 2014. Side effects of bone-targeted therapies in advanced breast cancer, *Breast Care*, **9**, 332–336.

- Dougall, W.C. and Chaisson, M.,** 2006. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases, *Cancer Metastasis Rev.*, **25**, 541–549.
- Drugarin, D., Drugarin, M., Negru, S. and Cioaca, R.,** 2003. RANKL-RANK/OPG molecular complex-control factors in bone remodeling, *Timisora Med. J.*, **53**, 297–302.
- Eghbali-Fatourehchi, G., Khosla, S., Sanyal, A., Boyle, W.J., Lacey D.L. and Riggs, B.L.,** 2003. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women, *J. Clin. Invest.*, **111**, 1221–1230.
- Elliot, K.J., Millward-Sadler, S.J., Wright, M.O., Robb, J.E., Wallace, W.H. and Salter, D.M.,** 2004. Effects of methotrexate on human bone cell responses to mechanical stimulation, *Rheumatology (Oxford)*, **43**, 1226–1231.
- Emery, J.G., McDonnell, P., Burke, M.B., Deen, K.C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E.R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R.A., James, I.E., Rosenberg, M., Lee, J.C. and Young, P.R.,** 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.*, **273**, 14363–7.
- Erten, M.,** 2016. Deneysel miyokard infarktüsü oluşturulmuş ratlarda visfatinin kardiyak belirteçlerle ilişkisi, *Uzmanlık Tezi*, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.
- Fan, C., Cool, J.C., Scherer, M.A., Foster, B.K., Shandala, T., Tapp, H. and Xian, C.J.,** 2009. Damaging effects of chronic low-dose methotrexate usage on primary bone formation in young rats and potential protective effects of folinic acid supplementary treatment, *Bone*, **44**, 61–70.
- Fan, C.-M., Foster, B.K., Hui, S.K. and Xian, C.J.,** 2012. Prevention of bone growth defects, increased bone resorption and marrow adiposity with folinic acid in rats receiving long-term methotrexate, *PLoS One.*, **7**, e46915.
- Fanti, P., Monier-Faugere, M.C., Geng, Z., Schmidt, J., Morris, P.E., Cohen, D. and Malluche, H.H.,** 1998. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats, *Osteoporos. Int.*, **8**, 274–281.

- Fan, C., Garcia, M., Scherer, M., Tran, C. and Xian, C.J.,** 2014. Potential roles of metallothioneins I and II in protecting bone growth following acute methotrexate chemotherapy, *J. Chemotherapy*, **26**, 37-48.
- Fauci, A.S., Kasper, D.L., Longo, D.L., Braunwald, E., Hauser, S.L., Jameson, J.L. and Loscalzo, J.** 2013. Harrison's principles of internal medicine seventeenth edition, (Prof.Dr. K. Biberoğlu, Çev. Ed.), Nobel Tıp Yayınları, İstanbul.
- Ferraro, V., Anton, M. and Santé-Lhoutellier, V.,** 2016. The « sisters » α -helices of collagen, elastin and keratin recovered from animal by-products: Functionality, bioactivity and trends of applications, *Trends Food Sci. Technol.*, **51**, 65-75.
- Ferraro, V., Gaillard-Martinie, B., Sayd , T., Chambon, C., Anton , M. and Santé-Lhoutellier, V.,** 2017. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential, *Int. J. Biol. Macromol.*, **97**, 55-66.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J. and Cerri, P.S.,** 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells, *BioMed Research International*, **1**, 17.
- Franch, A., Castellote, C. and Castell, M.,** 1994. Anti-type I collagen antibodies in advanced phases of adjuvant arthritis, *Path. Res. Pract.*, **190**, 155-158.
- Ganesan, R. and Rasool, M.,** 2017. Research paper Interleukin 17 regulates SHP-2 and IL-17RA/STAT-3 dependent Cyr61, IL-23 and GM-CSF expression and RANKL mediated osteoclastogenesis by fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis, *Molecular Immunology*, **91**, 134–144.
- Gao, Q., Zhou, G., Lin, S.J., Paus, R. and Yue, Z.,** 2018. How chemotherapy and radiotherapy damage the tissue: comparative biology lessons from feather and hair models, *Exp. Dermatol.*, **1**, 1-18.

- Garg, A., Leitzel, K., Ali, S. and Lipton, A.,** 2015. Antiresorptive therapy in the management of cancer treatment-induced bone loss, *Curr. Osteoporos. Rep.*, **13**, 73–77.
- Georgiou, K.R., Hui, S.K. and Xian, C.J.,** 2012a. Regulatory pathways associated with bone loss and bone marrow adiposity caused by aging, chemotherapy, glucocorticoid therapy and radiotherapy, *Am. J. Stem Cells*, **1**, 205–224.
- Georgiou, K.R., King, T.J., Scherer, M.A., Zhou, H., Foster, B.K. and Xian, C.J.,** 2012b. Attenuated Wnt/ β -catenin signalling mediates methotrexate chemotherapy-induced bone loss and marrow adiposity in rats, *Bone*, **50**, 1223–1233.
- Georgiou, K.R., Nadhanan, R.R., Fan, C.M. and Xian, C.J.,** 2015. Methotrexate-induced bone marrow adiposity is mitigated by folinic acid supplementation through the regulation of WNT/ β -catenin signalling, *J. Cell. Physiol.*, **230**, 648–656.
- Georgiou, K.R., Scherer, M.A., Fan, C.M., Cool, J.C., King, T.J., Foster, B.K. and Xian, C.J.,** 2012c. Methotrexate chemotherapy reduces osteogenesis but increases adipogenesis potential in the bone marrow, *J. Cell. Physiol.*, **227**, 909–918.
- Glass, D.A., Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A. and Karsenty, G.,** 2005. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation, *Dev. Cell.*, **8**, 751–64.
- Gochuico, B.R., Zhang, J., Ma, B.Y., Marshak-Rothstein, A. and Fine, A.,** 2000. TRAIL expression in vascular smooth muscle, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **278**, 1045–51.
- Goldring, S.R.,** 2003. Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling, *Calcif. Tissue Int.*, **73**, 97–100.
- Goudarzi, M., Khodayar, M.J., Hosseini Tabatabaei, S.M.T., Ghaznavi, H., Fatemi, I. and Mehrzadi, S.,** 2017. Pre-treatment with melatonin protects against

cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in mice, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **31**, 674–685.

Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S. and Wingo, P.A., 2000. Cancer statistics, 2000, *CA Cancer J Clin.*, **50**, 7-33.

Gupta, M., Shaw, B.O. and Mukherjee, A., 2010. A new glycosidic flavonoid from J warharmahakashay (antipyretic) Ayurvedic preparation, *Int. J. Ayur. Res.*, **1**, 106–111.

Haddy, T.B., Mosher, R.B. and Reaman, G.H., 2001. Osteoporosis in survivors of acute lymphoblastic leukemia, *Oncologist*, **6**, 278–285.

Hadji, P., Ziller, M., Maskow, C., Albert, U. and Kalder, M., 2009. The influence of chemotherapy on bone mineral density, quantitative ultrasonometry and bone turnover in pre-menopausal women with breast cancer, *Eur. J. Cancer*, **45**, 3205–3212.

Halton, J.M., Atkinson, S.A., Fraher, L., Webber, C., Gill, G.J., Dawson, S. and Barr, R.D., 1996. Altered mineral metabolism and bone mass in children during treatment for acute lymphoblastic leukemia, *J. Bone Miner. Res.*, **11**, 1774–1783.

He, X., Andersson, G., Lindgren, U. and Li, Y., 2010. Resveratrol prevents rankl-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor raw 264.7 cells through inhibition of ros production, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**, 356–362.

Hemeida, R.A.M. and Mohafez, O.M., 2008. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats, *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.*, **20**, 141-148.

Hertrampf, T., Schleipen, B., Offermanns, C., Velders, M., Laudenbach, U. and Diel, P., 2009. Comparison of the bone protective effects of an isoflavone-rich diet with dietary and subcutaneous administrations of genistein in ovariectomized rats, *Toxicol. Lett.*, **184**, 198–203.

- Hikita, A., Kadono, Y., Chikuda, H., Fukuda, A., Wakeyama, H., Yasuda, H., Nakamura, K., Oda, H. Miyazaki, T. And Tanaka, S., 2005.** Identification of an alternatively spliced variant of Ca^{2+} promoted Ras inactivator as a possible regulator of RANKL shedding, *J. Biol. Chem.*, **280**, 41700–41706.
- Hofbauer, L.C. and Heufelder, A.E., 2001.** Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: new concepts of the pathogenesis and therapy of metabolic bone diseases, *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **126**, 145–150.
- Hofbauer, L.C. and Schoppet, M., 2004.** Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases, *JAMA*, **292**, 490–495.
- Holzer, G., Krepler, P., Koschat, M.A., Grampp, S., Dominkus, M. and Kotz, R., 2003.** Bone mineral density in long-term survivors of highly malignant osteosarcoma, *J. Bone Joint. Surg. Br.*, **85**, 231–237.
- Hopwood, B., Tsykin, A., Findlay, D.M. and Fazzalari N.L., 2007.** Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling, *Arthritis Res. Ther.*, **9**, R100.
- Howard, S.C., McCormick, J., Pui, C.H., Buddington, R.K. and Harvey, R.D., 2016.** Preventing and managing toxicities of high-dose methotrexate, *Oncologist*, **21**, 1471–1482.
- Hussan, F., Ibraheem, N.G., Kamarudin, T.A., Shuid, A.N., Soelaiman, I.N. and Othman, F., 2012.** Curcumin protects against ovariectomy-induced bone changes in rat model, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2012**, 1-7.
- Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., and Hirokawa, K., 2001.** Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus, *Endocrinology*, **142**, 1419–1426.

- Islam, MA.,** 2004. Genetic diversity of the genus *Curcuma* in Bangladesh and further biotechnological approaches for in vitro regeneration and long-term conservation of *Curcuma longa* germplasm, *PhD thesis*, University of Hanover, Hanover, Germany.
- Ito, S. and Hata, T.,** 2004. Crystal structure of RANK ligand involved in bone metabolism, *Vitam. Horm.*, **67**, 19–33.
- Jahovic, N., Cevik, H., Sehirli, A.O., Yegen, B.C. and Sener, G.,** 2003. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats, *J. Pineal Res.*, **34**, 282-287.
- Jahovic, N., Sener, G., Cevik, H., Ersoy, Y., Arbak, S. and Yegen, B.C.,** 2004. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats, *Cell Biochem. Funct.*, **22**, 169-178.
- Jatoi, S.A., Kikuchi, A., Gilani, S.A. and Watanabe, K.N.,** 2007. Phytochemical, pharmacological and ethnobotanical studies in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.; Zingiberaceae). *Phytother Res.*, **21**, 507-516.
- Jones, S.A., Scheller, J. and Rose-John, S.,** 2011. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling, *J. Clin. Invest.*, **121**, 3375–83.
- Junqueira, C.L., Carneiro, J. and Kelley, R.O.,** 1998. Temel Histoloji (8. Baskı), (Y. Aytakin, S. Solakoğlu ve B. Ahışalı, Çev. Ed.), Barış Kitabevi, İstanbul.
- Kamimura, D. and Hirano, T.,** 2003. Interleukin-6, In *Encyclopedia of Hormones*, pp. 430–439, Eds. Henry, H. L. & Norman, A. W., Academic Press, USA.
- Kanis, J.A., Oden, A., Johnell, O., De Laet, C., Jonsson, B. and Oglesby, A.K.,** 2003. The components of excess mortality after hip fracture, *Bone*, **32**, 468-473.
- Karsenty, G.,** 2008. Transcriptional control of skeletogenesis, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **9**, 183-96.
- Katzung, B.G., Masters, S.B. and Trevor A.J.,** 2012. Basic & Clinical Pharmacology (12. Edition), Mc Graw Hill Medical, San Francisco.

- Kayaalp, O.**, 2002. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji (10. Baskı), Hacettepe-Taş Yayıncılık, Ankara.
- Khalifa, M.M.A., Bakr, A.G. and Osman, A.T.**, 2017. Protective effects of phloridzin against methotrexate-induced liver toxicity in rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **95**, 529–535.
- Kim, Y.A., Tarahovsky, Y.S., Gaidin, S.G., Yagolnik, E.A. and Muzafarov, E.N.**, 2017. Flavonoids determine the rate of fibrillogenesis and structure of collagen type I fibrils in vitro, *Int. J. Biol. Macromol.*, **104**, 631-637.
- King, T.J., Georgiou, K.R., Cool, J.C., Scherer, M.A., Ang, E.S., Foster, B.K., Xu, J. and Xian, C.J.**, 2012. Methotrexate chemotherapy promotes osteoclast formation in the long bone of rats via increased pro-inflammatory cytokines and enhanced nf-kappaB activation, *Am. J. Pathol.*, **181**, 121–129.
- King, T.J. , Shandala, T., Lee, A.M. , Foster, B.K., Chen, K.M., Howe, P.R., and Xian, C.J.**, 2015. Potential effects of phytoestrogen genistein in modulating acute methotrexate chemotherapy-induced osteoclastogenesis and bone damage in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 18293-18311.
- Kishimoto, T.**, 2006. Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine, *Arthritis Res. Ther.*, **8**, S2.
- Koca, S.S., Bahcecioglu, I.H., Poyrazoglu, O.K., Ozercan, I.H., Sahin, K. and Ustundag, B.**, 2008. The Treatment with antibody of TNF- α reduces the inflammation, necrosis and fibrosis in the non-alcoholic steatohepatitis induced by methionine-and choline-deficient diet, *Inflammation*, **31**, 91-98.
- Kondo, T., Kitazawa, R., Maeda, S. and Kitazawa, S.**, 2004. 1 Alpha, 25 Dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways, *J. Bone Miner. Res.*, **19**, 1411–1419.
- Kong, Y.Y., Boyle, W.J. and Penninger, J.M.**, 2000. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology, *Immunol. Today.*, **21**, 495–502.
- Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A.,**

- Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J. and Penninger, J.M.,** 1999. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis, *Nature*, **397**, 315–323.
- Koyama, S., Sato, E., Takamizawa, A., Tsukadaira, A., Haniuda, M., Kurai, M., Numanami, H., Nagai, S. and Izumi, T.,** 2003. Methotrexate stimulates lung epithelial cells to release inflammatory cell chemotactic activities, *Exp. Lung Res.*, **29**, 91–111.
- Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685.
- Lam, J., Nelson, C.A., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. and Fremont, D.H.,** 2001. Crystal structure of the TRANCE/RANKL cytokine reveals determinants of receptor-ligand specificity, *J. Clin. Invest.*, **108**, 971–9.
- Lean, J.M., Jagger, C.J., Kirstein, B., Fuller, K. and Chambers, T.J.,** 2005. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation, *Endocrinol.*, **146**, 728-735.
- Lee, A.M.C., Shandala, T., Soo, P.P., Su, Y.-W., King, T.J., Chen, K.-M., Howe, P.R. and Xian, C.J.,** 2017. Effects of resveratrol supplementation on methotrexate chemotherapy-induced bone loss, *Nutrients*, **9**, 1-15.
- Lee, J.H., Choi, Y.J., Heo, S.H., Lee, J.M. and Cho, J.Y.,** 2011. Tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) increases RANKL expression in osteoblasts and serves as a potential biomarker of periodontitis, *BMB Rep. Jul.*, **44**, 437.
- Lequin, M.H., van der Shuis, I.M., van Rijn, R.R., Hop, W.C., van den Broek, P.J., Eibrink, M.M., Muinck-Keizer-Schrama, S.M. and van Kuijk, C.,** 2002. Bonemineral assessment with tibial ultrasonometry and dual-energy X-ray absorptiometry in long-term survivors of acute lymphoblastic leukemia in childhood, *J. Clin. Densitom.*, **5**, 167–173.
- Li, B. and Yu, S.,** 2003. Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation, *Biol. Pharma. Bull.*, **26**, 780–786.

- Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley, J., Martin, L., Christensen, K., McCabe, J., Kostenuik, P., Hsu, H., Fletcher, F., Dunstan, C. R., Lacey, D. L. and Boyle, W. J., 2000.** RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1566–1571.
- Li, Y.Q., Xing, X.H., Wang, H., Weng, X.L., Yu, S.B. and Dong, G.Y., 2012.** Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone, *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 66–74.
- Liang, Y., Diehn, M., Bollen, A.W., Israel, M.A. and Gupta, N., 2008.** Type I collagen is overexpressed in medulloblastoma as a component of tumor micro-environment, *J. Neurooncol.*, **86**, 133-141.
- Liao, G.-S., Apaya, M.K. and Shyur, L.-F., 2013.** Herbal medicine and acupuncture for breast cancer palliative care and adjuvant therapy, *Evid Based Complement Alternat Med.*, **2013**, 1-17.
- Liao, Q.C., Xiao, Z.S., Qin, Y.F. and Zhou, H.H., 2007.** Genistein stimulates osteoblastic differentiation via p38 MAPK-Cbfa1 pathway in bone marrow culture, *Acta Pharmacol. Sin.*, **28**, 1597–1602.
- Lin, Y., Sheng, M., Weng, Y., Xu, R., Lu, N., Du, H. and Yu, W., 2017.** Berberine protects against ischemia/reperfusion injury after orthotopic liver transplantation via activating Sirt1/FoxO3alpha induced autophagy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **483**, 885–891.
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P. and Regenstein, J.M., 2015a.** Collagen and Gelatin, *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **6**, 527-557.
- Liu, Y., Cui, Y., Chen, Y., Gao, X., Su, Y. and Cui, L., 2015b.** Effects of dexamethasone, celecoxib, and methotrexate on the histology and metabolism of bone tissue in healthy sprague Dawley rats, *Clin. Interv. Aging*, **10**, 1245–1253.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin-Phenol reagents, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Lynch, C.C., Hikosaka, A., Acuff, H. B., Martin, M. D., Kawai, N., Singh, R. K., Vargo-Gogola, T.C., Begtrup, J.L., Peterson, T.E., Fingleton, B., Shirai, T., Matrisian, L.M. and Futakuchi, M., 2005.** MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL, *Cancer Cell*, **7**, 485–496.
- MacEwan, D.J., 2002.** TNF ligands and receptors—a matter of life and death, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **135**, 55-75.
- Marina, M., Molins, B., Llorenç, V., Sáinz de la , M. and Adána, A., 2017.** Review Targeting interleukin-6 in autoimmune uveitis, *Autoimmunity Reviews*, **16**, 1079-1089.
- Marini, H., Bitto, A., Altavilla, D., Burnett, B.P., Polito, F., di Stefano, V., Minutoli, L., Atteritano, M., Levy, R.M., D'Anna, R., Frisina, N., Mazzaferro, S., Cancellieri, F., Cannata, M.L., Corrado, F., Frisina, A., Adamo, V., Lubrano, C., Sansotta, C., Marini, R., Adamo, E.B. and Squadrito, F., 2008a.** Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: A follow-up study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 4787–4796.
- Marini, H., Minutoli, L., Polito, F., Bitto, A., Altavilla, D., Atteritano, M., Gaudio, A., Mazzaferro, S., Frisina, A., Frisina, N., Lubrano, C., Bonaiuto, M., D'Anna, R., Cannata, M.L., Corrado, F., Adamo, E.B., Wilson, S. and Squadrito, F., 2007.** Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women: A randomized trial, *Ann. Intern. Med.*, **146**, 839–847.
- Marini, H., Minutoli, L., Polito, F., Bitto, A., Altavilla, D., Atteritano, M., Gaudio, A., Mazzaferro, S., Frisina, A., Frisina, N., Lubrano, C., Bonaiuto, M., D'Anna, R., Cannata, M.L., Corrado, F., Cancellieri, F., Faraci, M., Marini, R., Adamo, E.B., Wilson, S. and Squadrito, F., 2008b.** OPG and sRANKL serum concentrations in osteopenic, postmenopausal women after 2-year genistein administration, *J. Bone Miner. Res.*, **23**, 715–720.

- Martin, T.J.**, 2004. Paracrine regulation of osteoclast formation and activity: Milestones in discovery, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, **4**, 243–253.
- May, K.P., Mercill, D., McDermott, M.T. and West, S.G.**, 1996. The effect of methotrexate on mouse bone cells in culture, *Arthritis Rheum.*, **39**, 489–494.
- May, K.P., West, S.G., McDermott, M.T. and Huffer, W.E.**, 1994. The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats, *Arthritis Rheum.*, **37**, 201–206.
- McClain, R.M., Wolz, E., Davidovich, A., Pfannkuch, F., Edwards, J.A. and Bausch, J.**, 2006. Acute, subchronic and chronic safety studies with genistein in rats, *Food Chem. Toxicol.*, **44**, 56–80.
- Mehrzadi, S., Fatemi, I., Esmailizadeh, M., Ghaznavi, H., Kalantar, H. and Goudarzi, M.**, 2018. Hepatoprotective effect of berberine against methotrexate induced liver toxicity in rats, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **97**, 233–239.
- Miyazono, Y., Gao, F. and Horie, T.**, 2004. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats, *Scand J. Gastroenterol*, **39**, 1119–1127.
- Moon, K., Khadabadi, S.S., Deokate, U.A. and Deore, S.L.**, 2010. *Caesalpinia bonducellav* F–An overview, *Report. Opin.*, **2**, 83–90.
- Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M.A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R. and Squadrito, F.**, 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: A randomized double-blind placebo-controlled study, *J. Bone Miner. Res.*, **17**, 1904–1912.
- Mosheimer, B.A., Kaneider, N.C., Feistritzer, C., Djanani, A.M., Sturn, D.H., Patsch, J.R. and Wiedermann, C.J.**, 2005. Syndecan-1 is involved in osteoprotegerin-induced chemotaxis in human peripheral blood monocytes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **90**, 2964–71.

- Mujumdar, A. M., Naik, D. G., Dandge, C. N. and Puntambekar, H. M., 2000.** Antiinflammatory activity of Curcuma amada Roxb. in albino rats, *Ind. J. Pharmacol.*, **32**, 375–377.
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M.D. and Karsenty, G., 2004.** Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two Gla-containing proteins, *J. Cell. Biol.*, **165**, 625–30.
- Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C. and Howland, R.D., 2016.** Lippincott's illustrated review series: Farmakoloji (3. Baskı), (F. Onat, Z. Gören ve A. Karaalp Çev.), Nobel Yayınları, İstanbul.
- Nabai, L., Kilani, R.T., Aminuddin, F., Li, Y. and Ghahary, A., 2015.** Methotrexate modulates the expression of MMP-1 and type 1 collagen in dermal fibroblast, *Mol. Cell. Biochem.*, **409**, 213–224.
- Nadhanan, R.R., Fan, C.-M., Su, Y.-W., Howe, P.R.C. and Xian, C. J., 2014.** Fish oil in comparison to folic acid for protection against adverse effects of methotrexate chemotherapy on bone, *J. Orthop. Res.*, **32**, 587–596.
- Najafzadeh, H., Rezaie, A., Masoodi, A. and Mehrzadi, S., 2011.** Comparison of the effect of vanadium and deferoxamine on acetaminophen toxicity in rats, *Indian J. Pharmacol.*, **43**, 429–437.
- Ngoka, L.C.M., 2008.** Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers, *Proteome Sci.*, **6**, 30.
- Nikel, O., Laurencin, D., McCallum, S.A., Gundberg, C.M. and Vashishth, D., 2013.** NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic–inorganic interface in bone, *Langmuir*, **29**, 13873–82.
- O'Brien, E.A., Williams, J.H. and Marshall, M.J., 2001.** Osteoprotegerin is produced when prostaglandin synthesis is inhibited causing osteoclasts to detach from the surface of mouse parietal bone and attach to the endocranial membrane, *Bone*, **28**, 208–214.

- Orhan, C., Şahin, N., Tuzcu, Z., Komorowski, J.R. and Şahin, K., 2017.** Combined oral supplementation of chromium picolinate, docosahexaenoic acid, and boron enhances neuroprotection in rats fed a high-fat diet, *Turk J. Med. Sci.*, **47**, 1616-1625.
- Osta, B., Benedetti, G. and Miossec, P., 2014.** Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis, *Frontiers in Immunology*, **5**, 48.
- Pachauri, S.P. and Mukherjee, S.K., 1970.** Effect of *Curcuma longa* (Haridra) and *Curcuma amada* (Amragandhi) on the cholesterol level in experimental hypercholesterolemia of rabbits. *J. Res. Indian Med.*, **5**, 27-30.
- Perry, M.C., Demeule, M., Regina, A., Mouldjian, R. and Beliveau, R., 2010.** Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts, *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 1192-1201.
- Pfeilschifter, J. and Diel, I.J., 2000.** Osteoporosis due to cancer treatment: Pathogenesis and management, *J. Clin. Oncol.*, **18**, 1570–1593.
- Policegoudra, R. S., Abiraj, K., Channe Gowda, D. and Aradhya, S. M., 2007a.** Isolation and characterization of antioxidant and antibacterial compound from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome, *J. Chromatogr. B. Analyt Technol. Biomed. Life Sci.*, **852**, 40–48.
- Policegoudra, R.S., Aradhya, S.M. and Singh, L., 2011.** Mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.)-a promising spice for phytochemicals and biological activities, *J. Biosci.*, **36**, 739-748.
- Policegoudra, R. S., Divakar, S. and Aradhya, S. M., 2007b.** Identification of difurocumenonol, a novel antimicrobial compound from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome. *J. Appl. Microbiol.*, **102**, 1596–1602.
- Policegoudra, R.S., Rehna, K., Rao, L.J. and Aradhya, S.M., 2010.** Antimicrobial, antioxidant, cytotoxicity and platelet aggregation inhibitory activity of a novel molecule isolated and characterized from mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) rhizome, *J. Biosci.*, **35**, 231–240.

- Poundarik, A.A., Diab, T., Sroga, G.E., Ural, A., Boskey, A.L., Gundberg, C.M. and Vashishth, D.**, 2012. Dilatational band formation in bone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **109**, 19178–19183.
- Pushpangadan, P.R., Chandana, V.R., Ajay, K.S., Ojha, S.K. and Reddy, G.D.**, 2006. Anti-allergic herbal formulation(s), Patent No. WO 2006067802.
- Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G. and Singh, B.**, 2007. Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **58**, 18–28.
- Rachner, T.D., Kasimir-Bauer S., Göbel, A., Erdmann, K., Hoffmann, O., Browne, A.J., Wimberger, P., Rauner, M., Hofbauer, L.C., Kimmig, R. and Bittner, A.K.**, 2018. Prognostic value of RANKL/OPG serum levels and disseminated tumor cells in non-metastatic breast cancer, *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1-22.
- Raghu Nadhanan, R., Skinner, J., Chung, R., Su, Y.W., Howe, P.R. and Xian, C.J.**, 2013. Supplementation with fish oil and genistein, individually or in combination, protects bone against the adverse effects of methotrexate chemotherapy in rats, *PLoS ONE*, **8**, e71592.
- Raisz, L.G.**, 2005. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects, *J. Clin. Invest.*, **115**, 3318–3325.
- Ramachandran, C., Lollett, I.V., Escalon, E., Quirin, Karl-Werner., and Melnick, S. J.**, 2015. Anticancer potential and mechanism of action of Mango Ginger (*Curcuma amada* Roxb.) supercritical CO₂ extract in human glioblastoma cells, *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.*, **20**, 109-119.
- Ramachandran, C., Portalatin, G.M., Prado, A.M., Quirin, K.W., Escalon, E. and Melnick, S.J.**, 2017. In vivo antitumor effect of supercritical CO₂ extract of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) in u-87mg human glioblastoma nude mice xenografts, *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.*, **22**, 260–267.
- Reece, O.W.**, 2004. Dukes Veteriner Fizyoloji (12. Baskı), (S. Yıldız, Çev. Ed.), Medipres Yayınları, Malatya.

- Regina, A., Demeule, M., Laplante, A., Jodoin, J., Dagenais, C., Berthelet, F., Moghrabi, A. and Béliveau, R.,** 2001. Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood–brain barrier, *Cancer Metastasis Rev.*, **20**, 13-25.
- Rizzo, D.C.,** 2015. Fundamentals of anatomy and physiology, 4 ed., Boston: Cengage Learning, 138-176 p.
- Rose-John, S.,** 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the pro inflammatory activities of IL-6, *Int. J. Bio.l Sci.*, **8**, 1237–1247.
- Russo, C., Lazzaro, V., Gazzaruso, C., Maurotti, S., Ferro, Y., Pingitore, P., Fumo, F., Coppola, A., Gallotti, P., Zambianchi, V., Fodaro, M., Galliera, E., Marazzi, M.G., Romanelli, M.M.C., Giannini, S., Romeo, S., Pujia, A. and Montalcini, T.,** 2017. Proinsulin C-peptide modulates the expression of ERK1/2, type I collagen and RANKL in human Osteoblast-like cells (Saos-2), *Mol. Cell Endocrinol.*, **442**, 134-141.
- Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., Erten, F. and Juturu, V.,** 2018. Capsaicinoids improve consequences of physical activity, *Toxicol. Rep.*, **15**, 598-607.
- Sahin, K., Tuzcu, M., Basak, N., Caglayan, B., Kilic, U., Sahin, F. and Kucuk, O.,** 2012. Sensitization of Cervical Cancer Cells to Cisplatin by Genistein: The Role of NFκB and Akt/mTOR Signaling Pathways, *J. Oncol.*, **2012**, 461562, 1-6.
- Sahin, K., Tuzcu, M., Orhan, C., Sahin, N., Akdemir, F., Pala, R. and Juturu, V.,** 2017. Dietary mango ginger may enhance the exercise performance and reduces lipid profile when combined with treadmill running in a rat model, *FASEB J.*, **31** Mol. Supp.
- Sahin, N., Onderci, M., Balci, T.A., Cikim, G., Sahin, K. and Kucuk, O.,** 2007. The effect of soy isoflavones on egg quality and bone mineralisation during the late laying period of quail, *British Poultry Science*, **48**, 363-369.
- Saladin K.,** 2015. Anatomy & Physiology: The unity of form and function, (8 ed), McGraw-Hill, New York, NY.

- Samanani, N., Yeung, E.C. and Facchini, P.J.**, 2002. Cell type-specific protoberberine alkaloid accumulation in *Thalictrum flavum*, *J. Plant Physiol.*, **159**, 1189–1196.
- Sasikumar, B.**, 2005. Genetic resources of Curcuma: Diversity, characterization and utilization, *Plant Genetic Res.*, **3**, 230–251.
- Schett, G.**, 2017. Biology, Physiology, and Morphology of Bone, In *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology* (Tenth Edition), pp. 60-65, Eds. Firestein, G. S., Budd, R. C., Gabriel, S. E., McInnes, I. B., & O'Dell, J. R., Philadelphia, PA: Elsevier.
- Sheeja, A.D.B. and Nair, M.S.**, 2014. Facile isolation of (E)-labda-8(17)12-diene-15,16-dial from *Curcuma amada* and its conversion to other biologically active compounds, *Indian J. Chem.*, **53B**, 319-324.
- Sheeja, A.D.B. and Nair, M.S.**, 2012. Phytochemical constituents of *Curcuma amada*, *Biochem System Ecol.*, **44**, 264-266.
- Shoulders, M.D. and Raines, R.T.**, 2009. Collagen structure and stability, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 929-958.
- Siddaraju, M.N. and Dharmesh, S.M.**, 2007. Inhibition of Gastric H⁺, K⁺-ATPase and *Helicobacter pylori* Growth by Phenolic Antioxidants of *Curcuma amada*, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7377–7386.
- Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Lüthy R, Nguyen, H.Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H.L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T.M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Sander, S., Van, G., Tarpley, J., Derby, P., Lee, R. and Boyle, W.J.**, 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density, *Cell*, **89**, 309–19.
- Singh, S., Singh, R., Banerjee, S., Negi, A.S. and Shanker, K.**, 2012. Determination of anti-tubercular agent in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) by reverse phase HPLC-PDA-MS, *Food Chem.*, **131**, 375-379.

- Singh, G., Singh, O.P., de Lampasona, M.P. and Catalan, C., 2003.** *Curcuma amada* Roxb.: Chemical composition of rhizome oil, *Indian Perfumer.*, **47**, 143-146.
- Singh, G., Singh, O.P. and Maurya, S., 2002.** Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian *Curcuma* species, *Prog. Crystal Growth Charact.*, **45**, 75–81.
- Singh, S., Kumar, J.K., Saikia, D., Shanker, K., Thakur, J.P., Negi, A.S. and Banerjee, S., 2010.** A bioactive labdane diterpenoid from *Curcuma amada* and its semisynthetic analogues as antitubercular agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 4379-4382.
- Sommerfeldt, D.W. and Rubin, C.T., 2001.** Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton, *Eur. Spine J.* , **10**, S86–S95.
- Sordillo, E.M. and Pearce, R.N., 2003.** RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma, *Cancer*, **97**, 802–12.
- Sunnerhagen, M., Drakenberg, T., Forsen, S. and Stenflo, J., 1996.** Effect of Ca^{2+} on the structure of vitamin K-dependent coagulation factors, *Haemostasis*, **26**, 45–53.
- Sridhar, T. and Symonds, R.P., 2009.** Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.*, **19**, 61–67.
- Srinivasan, M.R., Chandrasekhara, N. and Srinivasan, K., 2008.** Cholesterol lowering activity of mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.) in induced hypercholesterolemic rats, *Eur. Food Res. Technol.*, **227**, 1159–1163.
- Srivastava, S., Srivastava, M., Rawat, A.K.S. and Mehrotra, S., 2006.** Pharmacognostic evaluation of *Curcuma amada* Roxb., *Proc. Nat. Acad. Sci. Ind.*, **76**, 153–160.
- Stafford, D.W., 2005.** The vitamin K cycle, *J. Thromb. Haemost.*, **3**, 1873–8.
- Stejskal, D., Bartek, J., Pastorkova, R., Ruzicka, V., Oral, I. and Horalik, D., 2001.** Osteoprotegerin, RANK, RANKL, *Biomed Papers*, **145**, 61–4.

- Sugimoto, E. and Yamaguchi, M.**, 2000. Anabolic effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Int. J. Mol. Med.*, **5**, 515–520.
- Tacyildiz, N., Ozyoruk, D., Yavuz, G., Unal, E., Dincaslan, H., Dogu, F., Sahin, K. and Kucuk, O.**, 2010. Soy isoflavones ameliorate the adverse effects of chemotherapy in children, *Nutr. Cancer*, **62**, 1001–1005.
- Tanaka, Y., Nakayamada, S. and Okada, Y.**, 2005. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, **4**, 325–328.
- Tarwadi, K. and Agte, V.**, 2005. Antioxidant and micronutrient quality of fruit and root vegetables from the Indian subcontinent and their comparative performance with green leafy vegetables and fruits, *J. Sci. Food Agric.*, **85**, 1469–1476.
- Tholl, D.**, 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **9**, 297–304.
- Tian, M., Yuan, Y.-C., Li, J.-Y., Gionfriddo, M.R. and Huang, R.-C.**, 2015. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review, *Chronic Diseases and Translational Medicine*, **1**, 18-26.
- Tiligada E.**, 2006. Chemotherapy: Induction of stress responses, *Endocrine-Related Cancer*, **13** (Suppl 1), S115–S124.
- Turesson, C. and Matteson, E.L.**, 2006. Genetics of rheumatoid arthritis, *Mayo Clin. Proc.*, **81**, 94–101.
- Turner, R.T., Iwaniec, U.T., Andrade, J.E., Brancum, A.J., Neese, S.L., Olson, D.A., Wagner, L., Wang, V.C., Schantz, S.L. and Helferich, W.G.**, 2013. Genistein administered as a once-daily oral supplement had no beneficial effect on the tibia in rat models for postmenopausal bone loss, *Menopause*, **20**, 677–686.
- Ulugöl, A., Karadağ, H., Dökmeci, D., Gündüz, Ö. ve Topuz, R.D.**, 2017. Farmakoloji. Nobel Yayınları, İstanbul.

URL-1, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. WHO, Cancer, 7 Ocak 2017.

Vardi, N., Parlakpınar, H., Cetin, A., Erdogan, A. and Ozturk, I. C., 2010. Protective effect of β -carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage, *Toxicol. Pathol.*, **38**, 592–597.

Verweij, J. and de Jonge, M.J.A., 2000. Achievements and future of chemotherapy, *Eur. J., Cancer*, **36**, 1479–1487.

Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N., and Penninger, J.M., 2006. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease, *Trends Mol. Med.*, **12**, 17–25.

Walters, B.D. and Stegemann, J.P., 2014. Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales, *Acta Biomater*, **10**, 1488–1501.

Warrier, P.K., Nambiar, V.P.K. and Ramankutty, C., 1994. Indian medicinal plants: A compendium of 500 species, Orient Longman, Chennai, India.

Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F.P., and Teitelbaum, S.L., 2005. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.*, **115**, 282–290.

Who Study Group, 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis, Report of a WHO Study Group, *World Health Organ Tech. Rep. Ser.*, **843**, 1-129.

Willems, B.A., Vermeer, C., Reutelingsperger, C.P. and Schurgers, L.J., 2014. The realm of vitamin K-dependent proteins: shifting from coagulation toward calcification, *Mol. Nutr. Food Res.*, **58**, 1620–1635.

Woo, K.M., Choi, Y., Ko, S-H., Ko, J.S., Oh, K.-O. and Kim, K.K., 2002. Osteoprotegerin is present on the membrane of osteoclasts isolated from mouse long bones, *Exp. Mol. Med.*, **34**, 347–352.

- Wright, H.L., McCarthy, H.S., Middleton, J. and Marshall, M.J.,** 2009. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease, *Curr. Rev. Musculoskelet Med.*, **2**, 56–64.
- Xian, C.J.,** 2003. Roles of growth factors in chemotherapy-induced intestinal mucosal damage repair, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **4**, 260–269.
- Xian, C.J., Cool, J.C., Scherer, M.A., Fan, C. and Foster, B.K.,** 2008. Folinic acid attenuates methotrexate chemotherapy-induced damages on bone growth mechanisms and pools of bone marrow stromal cells, *J. Cell. Physiol.*, **214**, 777–785.
- Xian, C. J., Cool, J. C., Scherer, M. A., Macsai, C. E., Fan, C., Covino, M. and Foster, B. K.,** 2007. Cellular mechanisms for methotrexate chemotherapy-induced bone growth defects, *Bone*, **41**, 842–850.
- Xing, L., Bushnell, T.P., Carlson, L., Tai, Z., Tondravi, M., Siebenlist, U., Young, F. and Boyce, B.F.,** 2002. NF-kappaB p50 and p52 expression is not required for RANK-expressing osteoclast progenitor formation but is essential for RANK- and cytokine-mediated osteoclastogenesis, *J. Bone Miner. Res.*, **17**, 1200–1210.
- Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T. and Higashio, K.,** 1998. Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor, *J. Biol. Chem.*, **273**, 5117–5123.
- Yamaguchi, M. and Gao, Y.H.,** 1998. Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture, *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 71–76.
- Yaman, F., Acikan, İ., Dundar, S., Simsek, S., Gul, M., Ozercan, İ.H. Komorowski, J. and Sahin, K.,** 2016. Dietary arginine silicate inositol complex increased bone healing: histologic and histomorphometric study, *Development and Therapy*, **10**, 2081–2086.
- Yoshitake, F., Itoh, S., Narita, H., Ishihara, K. and Ebisu, S.,** 2008. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, **283**, 11535–11540.

- Zahir-Jouzdani, F., Atyabi, F. and Mojtabavi, N.,** 2017. Interleukin-6 participation in pathology of ocular diseases. *Pathophysiology*, **24**, 123-131.
- Zanatta, L.C.B., Boguszewski, C.L., Borba1, V.Z.C. and Kulak, C.A.M.,** 2014. Osteocalcin, energy and glucose metabolism, *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, **58**, 444-451.
- Zhang, Y.-H., Heulsmann, A., Tondravi, M.M., Mukherjee, A. and Abu-Amer, Y.,** 2001. Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways, *J. Biol. Chem.*, **276**, 563-8.
- Zhang, Y.B., Zhong, Z.M., Hou, G., Jiang, H. and Chen, J.T.,** 2011. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss, *J. Surg. Res.*, **169**, e37–42.
- Zhou, X., Li, Z. and Zhou, J.,** 2017. Tumor necrosis factor in the onset and progression of leukemia, *Experimental Hematology*, **45**, 17–26.
- Zhu, Z., Jiang, Y., Chen, S., Jia, S., Gao, X., Dong, D. and Gao, Y.,** 2011. An insertion/deletion polymorphism in the untranslated region of type I collagen $\alpha 2$ (COL1A2) is associated with susceptibility for hepatocellular carcinoma in a Chinese population, *Cancer Genetics*, **204**, 265-269.
- Zocha, M.L., Clemens, T.L. and Riddle, R.C.,** 2016. Review New insights into the biology of osteocalcin, *Bone*, **82**, 42–49.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : Fusun ERTEN

İletişim Bilgileri :

Telefon

Mail : fusun_87@yahoo.com

2. Doğum Tarihi : 06.12.1987

3. Unvanı : Doktora Öğrencisi

4. Dil : İngilizce

5. Öğrenim Durumu :

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	2006-2010
Yüksek Lisans	Genel Biyoloji	Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2011-2013
Doktora	Moleküler Biyoloji	Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2014-...

6. Yüksek Lisans Tezi: Deneysel Diyabetik Ratlarda Taurinin Böbrek Dokusunda PAPR γ , ISR-1, HSP-27, HSP-72 Düzeyleri Üzerine Etkisi

7. Mesleki Deneyim ve Sertifikalar:

- * Pyromark Q24 Cihazının Eğitim Sertifikası.
- * Real-Time PCR System Sertifikası.
- * GO Microplate Spectrophotometer Sertifikası.
- * Deneysel Hayvan Kullanım Sertifikası.
- * Pedagojik Formasyon Belgesi.
- * SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniğinde bilgi sahibi olma.

8. Projeler: AR-GE çalışması- Kümes Hayvanları üzerinde yeni bir yem premiksi Krom-mix AR-GE çalışması, Bursiyer-2013.

9. Uluslararası Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

1. Caglayan, B., Kilic, E., Dalay, A., Altunay, S., Tuzcu, M., **Erten, F.**, Orhan, C., Gunal, M.Y., Yulug, B., Juturu, V., and Sahin, K., 2018. Allyl isothiocyanate attenuates oxidative stress and inflammation by modulating Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways in traumatic brain injury in mice. *Mol. Biol. Rep.*, **1**, 1-10.

2. Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., Sahin, N., **Erten, F.** and Juturu, V., 2018. Capsaicinoids improve consequences of physical activity, *Toxicol Rep.*, **15**, 598-607.
3. Erten, M., Çimenci, İ.G., Kuloğlu, T., Kalaycı, M., **Erten, F.** 2018. The relationship between visfatin and cardiac markers on induced myocardial infarction in rats. *Cytokine*. pii: S1043-4666(18)30432-0.

10. Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

1. Vijaya, J., Şahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., **Erten, F.**, Şahin, N., 2017. Salacia Chinensis and Metabolic Risk Factors: in vivo Model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, Vascular Biology*, 136(A18413).
2. Şahin, K., Orhan, C., Şahin, N., **Erten, F.**, Tuzcu, Z., Gencoglu, H., and Juturu, V., 2018. Protective Effects of Salacia chinensis Extract in High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Retina, *Current Developments In Nutrition, Aging and Chronic Disease*, Vol. 2, Is. 11, November 1, (P01-087).

11. Katıldığı Kongre ve Sempozyumlar:

- * 5. International Congress on Nutrition and Cancer, September 9-11, 2012-Elazığ/Turkey.
- * Ulusal Kümes Hayvanları Kongresi (Uluslararası Katılımlı) Ekim 9-11, 2014-Elazığ/Türkiye.
- * Tüba-Gıda, Beslenme ve Kanserin Önlenmesi Sempozyumu Mayıs 23, 2015-Elazığ/Türkiye.
- * Tüba-Gıda Güvenliği Sempozyumu Ekim 12-14, 2017- Malatya/Türkiye.

12. Stajlar:

- * F.Ü. Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesinde Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü 25 iş günü
- * F.Ü. Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesinde Tıbbi Biyokimya Bölümü 30 iş günü
- * F.Ü. Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesinde İmmünoloji Bölümü 10 iş günü