



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

OSTEOPOROTİK SIÇAN FEMURUNDA ANJİOTENSİN II
TİP 1 RESEPTÖR BLOKAJININ KEMİK KOMPOZİSYONU
VE MİMARİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN RAMAN
SPEKTROSKOPİSİ VE MİKRO-BT YÖNTEMLERİYLE
GÖSTERİLMESİ

Elif Beyza YILMAZ YİĞİT

Ağustos 2021
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOPOROTİK SIÇAN FEMURUNDA ANJİOTENSİN II TİP 1
RESEPTÖR BLOKAJININ KEMİK KOMPOZİSYONU VE MİMARİSİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN RAMAN SPEKTROSKOPİSİ VE MİKRO-
BT YÖNTEMLERİYLE GÖSTERİLMESİ**

**ANATOMİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Elif Beyza YILMAZ YİĞİT

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ

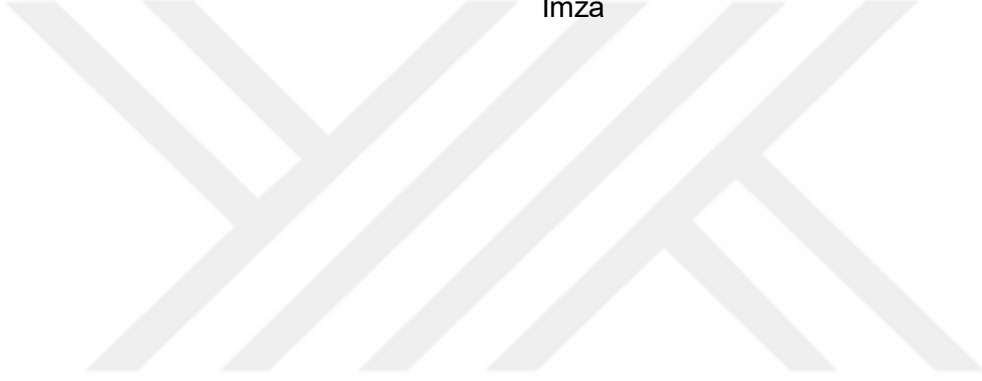
Denizli, 2021

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğinin ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı

Elif Beyza YILMAZ YIĞIT

İmza



ÖZET

OSTEOPOROTİK SIÇAN FEMURUNDA ANJİOTENSİN II TİP 1 RESEPTÖR BLOKAJININ KEMİK KOMPOZİSYONU VE MİMARİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN RAMAN SPEKTROSKOPİSİ VE MİKRO-BT YÖNTEMLERİYLE GÖSTERİLMESİ

Elif Beyza YILMAZ YİĞİT
Yüksek Lisans Tezi, Anatomi AD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ

Ağustos 2021, 53 sayfa

Kan basıncının kontrolünde önemli rol oynayan Renin- anjiotensin sisteminin (RAS) son yıllarda kemik dokuda osteoblastlar ve osteoklastlar üzerinde etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın amacı Anjiotensin II tip I reseptör blokajının (AT1) osteoporotik kemikte yarattığı mekaniksel ve fizikokimyasal parametreler üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızda 75 adet Wistar cinsi dişi sıçan (n=15) (KONT), SHAM (n=15) (SHAM), Kontrol Losartan (n=15) (KONT- LOS), Overektomize (n=15) (OVX), Losartan tedavili overiektomize (n= 15) (OVX- LOS) olmak üzere beş gruba ayrılmıştır. AT1 reseptör blokörü olarak Losartan, gavaj yoluyla 8 hafta süreyle verilmiştir. Bu etkilerin kemik dokusu üzerindeki makro yansımalarını göstermek için biyomekanik test, kemik dokusundaki mikro-mimari değişiklikleri göstermek için mikro-BT görüntüleme ve fizikokimyasal değişiklikleri göstermek için Raman spektroskopisi analizleri yapılmıştır. Ayrıca Losartan'ın kemik kolajenindeki etkilerini göstermek için PCR testi yapılmıştır.

Eğme testi bulgularımıza göre, OVX grubunun eğilme mukavemeti, KONT grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük belirlenmiştir. Losartan ile tedavi edilen OVX- LOS grubundaki dayanıklılık mukavemetinin ise, tedavi edilmeyen OVX grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. BV/TV, Conn.D, Tb.Th., Tb.Sp. değerleri Mikro-CT ölçümü sonucu elde edilmiştir. OVX grubunda BV/ TV ve Tb/ Th ölçümleri KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. Tb.Sp değeri KONT grubuna göre OVX grubunda artmıştır. Ancak BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Overektomiden 12 hafta sonra, 8 haftalık Losartan tedavisi sonucunda, Yapı Modeli İndeksi (SMI) değerleri OVX grubunda KONT grubuna oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. 8 haftalık Losartan tedavisi alan OVX- LOS grubu ile diğer grupların SMI değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Organik matriks özellikleri Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri ile incelenmiş, her bir değer için gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. COL1A1 ve COL1A2 alel genlerinin ekspresyonu, OVX grubunda KONT grubuna göre ve OVX- LOS grubunda OVX grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızın sonunda 8 haftalık Losartan tedavisinin osteoporotik kemikte kemiğin biyomekanik özelliklerini geliştirirken kolajen seviyelerini artırdığı ortaya konulmuştur. Ancak elde edilen sonuçlara göre kemiğin organik materyaline ve mikromimarisine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, Losartan, Anjiotensin, Kemik Kolajeni, Raman

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2019SABE017).

ABSTRACT

THE EFFECTS OF ANGIOTENSIN II TYPE I RECEPTOR BLOCKAGE ON BONE COMPOSITION AND ARCHITECTURE OF OSTEOPOROTIC RAT FEMURS INDICATING BY USING OF RAMAN SPECTROSCOPY AND MICRO-CT

YILMAZ YIĞİT, Elif Beyza

M.Sc. Thesis in Anatomy

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ

August 2021, 53 pages

The renin- angiotensin system (RAS) is a complex enzymatic structure that plays an important role in the control of blood pressure, it also plays an important role in antihypertensive therapy. The local presence of RAS released by osteoblasts and osteoclasts in the bone indicates that it is effective in bone metabolism. The aim of our study is investigate effects of Angiotensin II type I receptor blokage (AT1) on biomechanical and histochemical parameters of osteoporotic bone.

In this study we used 78 female Wistar rats and divide into 5 groups. We have Control (n=15) (CONT), Sham (n=15) (SHAM), Control Losartan (n=15) (CONT- LOS), Ovariectomized (n=15) (OVX), Losartan treated ovariectomized (n=15) (OVX- LOS). As an AT1 receptor blockage, Losartan was administered oral gavage for 8 weeks. In order to show the macro reflections of these effects on the bone tissue, biomechanical tests, micro-CT imaging to show the micro-architectural changes in the bone tissue, and Raman spectroscopy analyzes to show the physico-chemical changes were performed at the same time. Also PCR test was performed to investigate effects of Losartan in bone collagen. According to our bending test findings, the bending strength of the OVX group was statistically lower than that of the CONT group. The endurance strength in the OVX- LOS group treated with Losartan was statistically higher than the untreated OVX group. BV/TV, Conn.D, Tb.Th., Tb.Sp. values were obtained as a result of Micro-CT measurement. BV/TV and Tb/Th measurements in the OVX group were statistically significantly decreased compared to the CONT group. Tb.Sp value increased in the OVX group compared to the CONT group. However, there was no statistically significant difference between other groups in BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp values. 12 weeks after ovariectomy following 8 weeks Losartan treatment, Structural Model Index (SMI) values were found to be lower in the OVX group than in the CONT group. No statistically significant difference was found between the SMI values of the OVX- LOS group, which received 8 weeks of Losartan treatment, and the other groups. Organic matrix properties were examined with Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 values and no significant difference was found between the groups for each value. The expression of COL1A1 and COL1A2 allele genes was found to be statistically higher in the OVX group than in the CONT group and in the OVX- LOS group compared to the OVX group.

In conclusion, after 8 week of Losartan treatment. Losartan improved biomechanical properties and bone collagen levels. But our data show that there are no significant improvement in organic materials after 8 weeks of Losartan treatment. Therefore our study suggest that AT1 receptor blockage has no significant effect in acute threatment of osteoporosis.

Key words: Osteoporosis, Losartan, Angiotensin, Bone collagen, Raman

This study was supported by PAU Scientific Research Project Coordination Unit through (Project No: 2019SABE017).

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkıları olan
“Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi olan
ve tez danışmanım Doç. Dr. Barış Özgür DÖNMEZ’e”,
“Karamanoğlu Mehmet Bey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Makine
Mühendisliği Bölümü” Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÜNAL’a”,

“Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi” Dr. Öğr. Üyesi Mert OCAK’a”,

“Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Makine Mühendisliği Bölümü öğretim
üyesi Doç. Dr. Mehmet SARIKANAT’a”,

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve
araştırma görevlilerine,

Hayatım boyunca hep arkamda duran, sevgilerini ve desteklerini her zaman
hissettiğim canım aileme,

Ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana her zaman koşulsuz destek veren ve
yanımda duran sevgili eşim Murat’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif Beyza YILMAZ YİĞİT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç.....	3
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Kemik Dokunun Makro ve Mikromimarisi.....	4
2.2. Kemik Matriksi ve Mineralizasyonu.....	6
2.3. Kemik Doku ve Tip I Kolajen.....	8
2.4. Kemik Hücreleri.....	10
2.5. Kemik Yeniden Yapılanması.....	11
2.6. Osteoporoz.....	12
2.7. Renin Anjiotensin Sistemi ve Kemik Doku İlişkisi.....	14
2.8. Raman Spektroskopisi ve Kemik Doku.....	15
2.9. Deneysel Osteoporoz Modeli.....	17
2.10. Hipotez.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Deney Grupları, Overektomi ve İlaç Uygulanması.....	19
3. 2. Eğme Testi (Three Point Bending).....	21
3. 2. 1. Femurun Kesit Yüzey Alanının Hesaplanması.....	22
3. 2. 2. Eğme Testi Verilerinin Hesaplanması.....	22
3. 3. Raman Spektroskopisi Analizleri ve Hesaplanması.....	22
3. 4. Mikro- BT Görüntülemeleri ve İşlenmesi.....	23
3. 5. PCR Deneyleri.....	24

3. 5. 1. RNA İzolasyonu.....	24
3 .5. 2. cDNA Sentezi.....	25
3. 6. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR.....	27
4.1. Eğme Testi Bulguları.....	27
4.2. Mikro-BT Bulguları.....	28
4.3. Raman Spektroskopisi Bulguları.....	31
4.4. PCR Bulguları.....	33
5. TARTIŞMA.....	36
6. SONUÇLAR.....	42
7. KAYNAKLAR.....	43
8. ÖZGEÇMİŞ.....	53



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1.1. Kortikal Kemik ve Trabeküler Kemik.....	5
Şekil 2.3.1. Tip I kolajen sentezinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.4.1. Kemik hücrelerinin histolojik görüntüsü; osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler.....	11
Şekil 2.7.1. Renin anjiyotensin sisteminin şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.8.1. Raman spektroskopide kemik içeriğinin intensite değerleri	16
Şekil 3.1.1. Overektomi cerrahisi aşamaları.....	21
Şekil 3.4.1. Bir femurun üç boyutlu Mikro-BT görüntüsü.	23
Şekil 4.1.1. Overektomi yapıldıktan sonra 8 haftalık Losartan tedavisinin sonucunda eğme (bending) stres değerlerine etkisi.....	28
Şekil 4.2.1. Overektominin ilk gününden itibaren 12 hafta süren Losartan tedavisinin Mikro- BT ölçümleri sonunda elde edilen BV/TV, Conn.D, Tb.Th. , Tb.Sp. değerlerine etkisi.....	29
Şekil 4.2.2. Deney gruplarının Mikro BT görüntüleri.....	30
Şekil 4.2.3. Overektomi yapıldıktan 12 hafta sonra 8 haftalık Losartan tedavisinin sonucunda Yapısal Model İndeks'e (SMI) etkisi.....	30
Şekil 4.3.1. Raman spektroskopisinde mineral matriks oranını belirlemek için bakılan değerler.....	31
Şekil 4.3.2. Kemığın mineral özelliklerini gösteren CO ₃ / v ₁ PO ₄ ile 1/FWHM (v ₁ PO ₄) değerleri.....	32
Şekil 4.3.3. Organik matriksin özelliklerini gösteren Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri incelenmiştir.....	33
Şekil 4.4.1. Overektomi yapıldıktan 12 hafta sonra kolajen miktarını belirlemek için bakılan COL1A1 ve COL1A2'nin ekspresyonlarını gösteren bantların görüntüsü.	34
Şekil 4.4.2. Tip1 kolajenin sentezlenmesinden sorumlu olan COL1A1'in mRNA ekspresyonunun gruplar arasındaki değişimi.....	34
Şekil 4.4.3. Tip1 kolajenin sentezlenmesinden sorumlu diğer alel gen olan COL1A2'nin mRNA ekspresyonunun gruplar arası değişimi.....	35

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3. 1. 1. Deney Grupları.....	20



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ang I.....	Anjiotensin I
ACE.....	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
BMP.....	Kemik Morfojenik Protein
BMU.....	Kemik Çoklu-Hücreli Ünite
BV/TV.....	Bone Volume /Total Volume
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroksiapatit
COL1A1.....	Kolajen 1A1
COL1A2.....	Kolajen 1A2
Conn.D.....	Connectivity Density
cDNA.....	Komplementar Deoksiribonükleik Asit
F.....	Kuvvet
GAPDH.....	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
Hyp/ Pro.....	Hidroksiprolin/ Prolin
IGF.....	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
KONT.....	Kontrol
KONT- LOS.....	Kontrol Losartan
MCS-F.....	Koloni Uyarıcı Faktör
MgCl.....	Magnezyum Klorür
mRNA.....	Mesajcı Reoksiribonükleik Asit
NCP.....	Kolajen Olmayan Protein
OCN.....	Osteokalsin
OPN.....	Osteopontin
OVX.....	Overektomi
OVX- LOS.....	Overektomi Losartan
PBS.....	Fosfat Buffer Solüsyonu
Pro a1.....	Prokolajen a1
Pro a2.....	Prokolajen a2
RAS.....	Renin anjiotensin sistemi
RANKL.....	Reseptör aktivatör nuklear kaba ligand
RGD.....	Arjinin-glisin-aspartik asit
SMI.....	Yapısal Model İndeks
TGF-B.....	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
v1PO4.....	Fosfat
v1PO4/ CH2.....	Fosfat / Metilen
v1PO4/ Pro.....	Fosfat/ Prolin
v1PO4/ Amid I.....	Fosfat/ Amide I
v1PO4/ Amid/III.....	Fosfat/Amide III
1/FWHM.....	1/ Full-Width Half-Height,
Tb.Th.....	Trabecular thickness
Tb.Sp.....	Trabecular seperation
Tb.Th.SD.....	Trabecular thickness standart deviation
Tb.Sp.SD.....	Trabecular seperation standart deviation

1. GİRİŞ

Osteoporoz, kemik kırılabilirliğinde artışla beraber görülen düşük kemik kitlesi ve kemik dokunun mikro-mimarisinde bozulma ile karakterize metabolik bir iskelet sistemi hastalığıdır (Kurosaki 1979, Armas ve Recker 2012, Adams 2015). Özellikle kırık ile sonuçlanan durumlarda, önemli fiziksel ve psiko-sosyal sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Urdahl, Manca vd 2006, Parkinson, Forbes vd 2010). Tipik olarak osteoporoz, trabeküler bağlantıların incilmesi ve trabekül sayısının azalması sonucunda, kemik hacminde artış ile karakterizedir. Kemiğin mikro-mimarisinde görülen bu değişiklikler kemiğin kuvvet karşısındaki dayanımını azaltır (Parkinson, Forbes vd 2010).

Kemik matriksi iki farklı bileşene sahiptir. Kemiğin mineral fazı katılık sağlarken, kolajen fibriller ise gerilme kuvveti, elastikiyet (geri esneme özelliği) özelliklerini sağlar (Saito ve Marumo 2010). Kemik kuvvetini meydana getiren yapılar, kemiğin mineralizasyon derecesi, kemikteki mikro-hasar miktarı ve kolajen çapraz bağlantıların oluşumudur (Saito ve Marumo 2010, Smith, Gardiner vd 2012). Bunlar kemikteki hücrel aktivite ve doku yıkım hızını etkiler. Bu konuda yapılan çalışmalar kemikteki enzimatik ve enzimatik olmayan kolajen çapraz bağlantıların, kemiğin sadece mineralizasyonunu değil, aynı zamanda kemikte meydana gelen mikro-hasar oluşumunu da etkilediğini göstermiştir (Tye, Rattray vd 2003, Huilaja, Hurskainen vd 2009, Saito ve Marumo 2010).

Trabeküler kemik, birbirine paralel olan lamellerinin içerisinde kolajen fibrillerin organize olmasıyla meydana gelen, trabeküllerin ileti ağını oluşturan hiyerarşik düzene sahip bir yapıdır (Brennan, Gleeson vd 2011). Osteoporozda meydana gelen kırıkların nedeni sadece kemik kütlelerinin azalması değil, organizasyon yeteneğini kaybetmiş trabeküllerin geometrisinin bozulmasına da bağlıdır (Feng ve McDonald 2011, Amizuka 2016). Birçok çalışmada bu trabeküler yapıların osteoporozla bozulduğu ve bunda kemiğin hacmini etkileyerek kırık riskini artırdığı gösterilmiştir (McNamara ve Prendergast 2005, Mulvihill, McNamara vd 2008, Brennan, Gleeson vd 2011, Donmez, Ozdemir vd 2012).

Kolajen, kemik dokuya çekme kuvveti ve mineral depolamak için bir matriks sağlar. Kırığa yatkınlık düşük kemik kitlesi, yapısal içerik ve yaşlılık sırasında kolajen içeriğinin

yavaş dönüşümüne bağlı olabilir. Buna rağmen kemik matriksinin kalitesi hakkında yeterli miktarda araştırma bulunmamaktadır (Bailey, Sims vd 1999, Huilaja, Hurskainen vd 2009). Kolajen çapraz bağlantılar, kemiğin biyolojik ve biyomekanik özelliklerini meydana getirir. Dokuların mekanik özelliklerinin, kolajen monomerleri arasındaki lisil-aldehit tepkimesine dayanan moleküller arası çapraz bağlantılarla meydana geldiği gösterilmiştir. Osteoporotik hastalardaki kolajen yapısında herhangi bir değişim, çapraz bağlantıların stabilizasyonu ve kemiğin mekanik özelliklerinde değişikliklerle sonuçlanabilir (Bailey, Wotton vd 1992). Osteoporoz, kemik dokuda tip 1 kolajen miktarında genel bir azalma ile ilişkilidir (Brennan, Kuliwaba vd 2012). Kırık eğilimi, aynı zamanda genetik faktörler tarafından da meydana gelir. Kırık riskini düzenleyen genlerin içerisinde Kolajen I Alfa I (COL1A1) geni özellikle kırık riski ile ilişkilidir. COL1A1'in kırık riski üzerindeki etkisi klinik risk faktörlerinden bağımsız ise, COL1A1 kırığın prognozunda etkili role sahiptir (Tran, Nguyen vd 2009).

Osteoblastlar kemik yapım hücreleri olup, osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) gibi kolajen olmayan proteinlerin (NCP) yapımından sorumludur. Mineralizasyon sırasında kalsiyum fosfata olan yüksek afiniteleri nedeniyle, NCP'ler bağlayıcı proteinler olarak hareket ederek kemik matriks organizasyonunda rol oynarlar ve böylece organik matriks üzerinde mineral kristal çekirdeklenme bölgeleri olarak hareket ederler (Brennan, Kuliwaba vd 2012). Aslında kolajen olmayan proteinlerin osteoporoz üzerine etkisini gösteren çok az veri bulunmaktadır.

Renin anjiyotensin sistemi (RAS) kan basıncının kontrolünde önemli bir rol oynayan kompleks enzimatik bir yapılanma olmakla beraber, antihipertansif tedavide de önemli rol oynar (Ghosh ve Majumdar 2014). Bu sistemin esas etkisi Anjiyotensin II (Ang II) yoluyla gerçekleşmektedir. Renin ise bu sistemin temeli olup, böbreklerde bulunan jukstaglomeruler hücrelerde üretilir ve buradan kana salınır. Bu yapı daha sonra anjiyotensin I (Ang I)'in anjiyotensinojen'den ayrılmasını sağlar. İleri aşamalarda ise Ang I, Ang II yi oluşturur. Bu değişim ise anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından yapılmaktadır (Donmez, Ozdemir vd 2012, Gebru, Diao vd 2013, Ghosh ve Majumdar 2014). Temel olarak RAS ile kemik metabolizması arasındaki ilişki Ang II tarafından yürütülmektedir (Gebru, Diao vd 2013). Daha önce yapılan çalışmalarda ise Ang II'nin TRAP pozitif multinükleer osteoklastlarda, osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Bailey, Sims vd 1999, Shimizu, Nakagami vd 2008, Gebru, Diao vd 2013). Söz konusu bu etkilerin, özellikle overektomi modeli çalışmalarda, ACE inhibitörü ve Ang II tip 1 reseptör blokörü ilaçlar kullanılarak ortadan kaldırıldığı yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (Donmez, Ozdemir vd 2012, Rajkumar, Faitelson vd 2013). Bu açıdan elde edilen bulgular özellikle osteoporoz gibi kemik metabolizması ile ilgili önemli hastalıkların tedavisinde RAS'ın önemli bir stratejik hedef olmasını

sağlamaktadır. Renin anjiotensin sistemi (RAS) kan basıncının homeostazisinde, aynı şekilde su ve sodyumun düzenlenmesinde önemli rol oynar (Unger 2002, Verdecchia, Angeli vd 2008). RAS aktivasyonu hipertansiyon, renal hasar ve metabolik sendrom ile sonuçlanır (Parkinson, Forbes vd 2010, Putnam, Shoemaker vd 2012). Yakın zamanda, RAS'ın ana etkilerinin sistemik olarak düşünülürdü; ancak, hayvan ve hücre çalışmalarında bulunan kanıtlar, kemik dokudaki RAS aktivasyonunu ve sonucunda osteoporoz geliştiği gösterildi (Paul, Poyan Mehr vd 2006, Shimizu, Nakagami vd 2008).

Yapılan klinik çalışmalarda tiyazid grubu diüretikler gibi antihipertansif ilaçlar renal kalsiyum atılımını azaltarak kalça kırık riskini azalttığı gösterilmiştir (Reid, Ames vd 2000, Xiao, Xu vd 2018). Diğer antihipertansif ilaçlar (B-blockerlar ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri) da düşük kırık riski ile ilişkilidir (Schlienger, Kraenzlin vd 2004). Yakın zamanda yapılan klinik çalışmalarda ACE inhibitörlerinin, kırık riskini azalttığı ya da kemik metabolizmasını geliştirmesine yararı olduğunu da gösterilmiştir (Shimizu, Nakagami vd 2008, Butt, Mamdani vd 2014).

1.1. Amaç

Son yıllarda anjiotensin reseptör blokajın kemik doku üzerindeki etkilerini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bu sonuçlar ışığında AT1 blokajının osteoporozun kemik dokuda yarattığı olumsuz etkileri azalttığı yönündedir. Fakat kemik dokuda meydana gelen bu deformasyonun ortadan kaldırılması esnasında kemik dokudaki kolajen yapılar üzerindeki etkisi hala tartışmalıdır. Çalışmamızda anjiotensin reseptör blokajının osteoporotik sıçan femurunda yarattığı olası tedavi edici etkilerinin ortaya koyulması amaçlanmıştır. Bu etkilerin kemik dokudaki makro yansımalarını göstermek amacıyla biyomekanik testler, kemik dokudaki mikro-mimari değişimleri göstermek amacıyla mikro-BT görüntülemeleri aynı zamanda fiziko-kimyasal değişimleri göstermek için Raman spektroskopisi analizleri yapılmıştır.

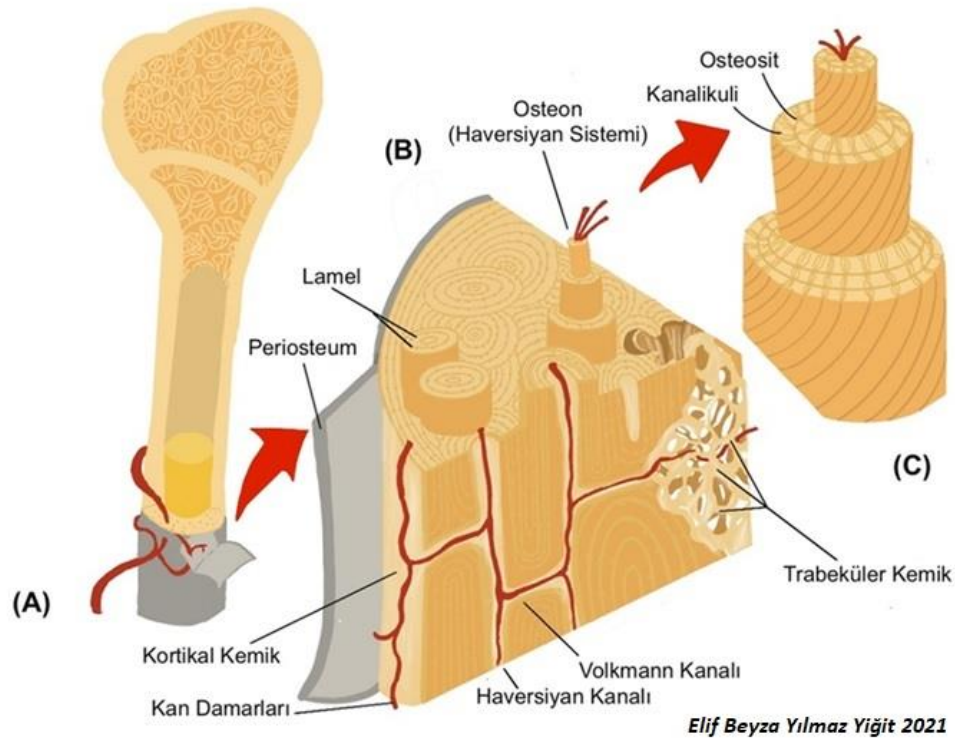
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kemik Dokunun Makro ve Mikro mimarisi

Vücudun destekleyici yapısı olan kemik, bir mineral rezervuarı ve aynı zamanda hayati organların koruyucusu olarak görev yapar. Kemik, kuvvet ve sertlik gibi mekanik özelliklere sahiptir ve aynı zamanda kan hücrelerinin yapım yeridir. Vücuttaki asit-baz dengesinin korunmasına da yardım eder (Yamada, Nagaoka vd 2013, De Witte, Fratila-Apachitei vd 2018). Kemik iliğiyle hematopoezis için gerekli ortamı hazırlar (Taichman 2005, Clarke 2008, Huilaja, Hurskainen vd 2009, Yamauchi ve Sricholpech 2012). Bunlara ek olarak kemik, total vücut kalsiyumunu ve fosfatın %99'unu depolar. Biyomekanik değişikliklere uyum sağlayabilen dinamik bir doku olan kemik, zaman içinde yeniden şekillenir ve yaşlanır. Bu değişimler esnasında mikro-hasara uğradığı durumlarda ise mekanik olarak daha güçlü, yeni bir yapıya dönüşür. Bu da kemiğin maruz kaldığı kuvvetler karşısında korunmasını sağlar (Robling, Castillo vd 2006, Clarke 2008).

Makroskopik olarak kemik doku, kortikal (kompakt) kemik ve trabeküler (spongöz veya kanselöz) kemik olmak üzere ikiye ayrılır. Kortikal kemik, sıkı ve kalın bir formdadır. Kemiklerin yüzeyinde ince bir tabaka halinde uzanır ve çoğunlukla uzun kemiklerin diafizlerinde bulunur (Rho, Kuhn-Spearing vd 1998, Downey ve Siegel 2006). İskeletin %80'ini oluşturan kortikal kemik, kemik dokuya mekanik destek kazandırmada önemli bir role sahiptir (Rosenthal 1959, Weatherholt, Fuchs vd 2012). Kortikal kemiğin kompozisyonu ve şekli bulunduğu kemik türüne göre değişiklik gösterir. Uzun kemiklerde dışta periosteum ve içte endosteum olmak üzere iki tabaka halindedir. Dıştaki periosteum fibröz bir zar olup, düz fibroblast benzeri hücrelerden oluşur (Albrektsson 1980, Allen, Hock vd 2004, Clarke 2008). Periosteumun iç tarafı uyarıldığında osteoblastlara farklılaşır. Buna ek olarak, en içte cavitas medullaris'i çevreleyen endosteum ise sirküler ince bir tabaka halindedir. Her iki tabaka da osteoblast, osteoklast ve osteositleri içerir (Allen, Hock vd 2004). Kemik metafiz ve epifizlerinde, kortikal kemik daha ince yapılıdır. Dolayısıyla uzun kemiklere kıyasla, yassı kemikler (pelvis kemiği ve kafatası kemikleri gibi) ile kısa kemikler (tarsal ve karpal kemikler gibi) daha büyük

oranda trabeküler kemik içerir. Kortikal kemiğin esas fonksiyonel ünitesi olan osteon ya da haversiyan sistemi, kemiğin longitudinal aksına paralel olarak uzanır (Boudin ve Van Hul 2017). Bir osteon, merkezde bir haversiyan kanalını çevreleyen vasküler ve sinir dokunun oluşturduğu silindirik bir sütun halindedir. Haversiyan kanalları arasında uzanan ve buradaki besleyici damarların anastomozunu sağlayan perpendiküler seyirli kanallar ise Volkmann kanalları olarak adlandırılır (Buckwalter, Glimcher vd 1996, Ascenzi ve Roe 2012). Silindirik osteonlar, haversiyan kanalları, aracılığıyla mikroskobik seviyede kemiğin porlu bir yapı kazanmasını sağlar (McKee ve Cole 2012) (Şekil 2.1.1.). Ancak bu mikroskobik porlar, tüm kortikal kemiğin yalnızca %10'unu oluşturur (Weatherholt, Fuchs vd 2012). Kortikal kemikteki porlar ile kemik matriks organizasyonu kemiğin mekanik özelliklerini belirler (Rho, Kuhn-Spearing vd 1998).



Şekil 2.1.1. Kortikal Kemik ve Trabeküler Kemik. (A) Bir uzun kemiğin sagittal kesiti (B) Osteon (Haversiyan Sistemi), (C) Kemik kanalikuli gösterimi.

Trabeküler kemik ise kemik trabekülleri arasında bir iletim ağı oluşturur. Kortikal kemik ile çevrilidir ve kemik iliğinin devamlılığını sağlar (Carter ve Hayes 1976). Kemiğin ağırlık taşıyan bölgelerinde yoğunlaşmış olan trabeküler kemik, vertebra gövdelerinde, el bilek kemiklerinde, ayak bileği kemiklerinde, uzun kemiklerin epifiz ve metafizlerinde bulunur (Hart, Newton vd 2020). İskeletin %20'sini oluşturan trabeküler kemik, kortikal kemiğe oranla daha boşluklu yapıdadır (van der Linden, Homminga vd 2001). Boşluklu yapısı sayesinde esneme (yielding) için enerji depolar. Buna ek olarak strese bağlı

kuvvet aktarımlarında, kemik trabeküllerinin hizalanması sayesinde kuvvet aktarımını gerçekleştirir (Bala, Zebaze vd 2015).

Trabeküler ve kortikal kemik doku anatomik olarak ayrılmalarına ve kemik dokuda farklı bölgelerde bulunmalarına rağmen, aynı ekstrasellüler matriks bileşenlerine sahiptir (Clarke 2008, Yamauchi ve Sricholpech 2012). Her iki kemik doku da çoğunlukla hidroksiapatitten, kolajen ve sudan oluşur. Aralarındaki temel farklar ise trabeküler kemiğin kortikal kemiğe oranla daha az kalsiyum ve doku yoğunluğuna sahip olmasıdır (Gong, Arnold vd 1964). Trabeküler kemikte mineralizasyon daha düşüktür. Bu nedenle, kemik yeniden yapılanması sırasında trabeküler kemik metabolik olarak daha aktiftir. Daha hızlı yeniden yapılanabilen trabeküler kemik, postmenoposal osteoporoz başta olmak üzere, artmış kemik yıkımına bağlı patolojilerden kortikal kemiğe oranla daha fazla etkilenir. Ek olarak, yüzey alanının fazla olması ve yük taşıyan kemiklerde daha fazla bulunması da trabeküler kemikteki kaybın fazlalığı ile ilişkilidir (Parfitt 1984, Croucher, Garrahan vd 1994). Ancak kemik yüzeyi/ matriks hacim oranı düşünüldüğünde, rölatif olarak bu oranın daha yüksek olduğu kortikal kemikte, kemik kaybı daha hızlı meydana gelmektedir. Dolayısıyla, vertebra gibi yük taşıyan kemikler dışında, apendiküler iskeletteki kemik kaybının %70'i, iskeletin %80'ini oluşturan kortikal kemikteki kayıpla ilişkilidir (Zebaze, Ghasem-Zadeh vd 2010). Yine de kortikal kemik, trabeküler kemikten daha yavaş kaybolduğu için özellikle yaşa bağlı gelişen postmenoposal osteoporozdaki kemik kaybı trabekülosentriktir (Bala, Zebaze vd 2015).

2.2. Kemik Matriksi ve Mineralizasyonu

Kemik, organik ve inorganik materyalden meydana gelen ve ağırlığının %70'ini minerallerin, %5-8'ini suyun, geri kalanını da organik ya da ekstrasellüler kolajen matriksin oluşturduğu birleşik bir yapıdır. Mineral kısmının %95'i spesifik bir kristal olan hidroksiapatitten ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) meydana gelirken, organik fazın %90'ı tip I kolajen, geri kalanı da proteoglikanlar ve osteokalsin, osteopontin, trombospondin gibi non-kolajen proteinlerden oluşur (Gökçe-Kutsal 2004, Yamauchi ve Sricholpech 2012, Boskey 2013, Yamada, Nagaoka vd 2013, Burr 2019). Bunlara ek olarak kemik formasyonun düzenlenmesinden sorumlu büyüme faktörleri de (TGF-B, ILGF, EGF, BMP gibi) kemik matriksinde yer alır (Young 2003).

Kemik matriksinin büyük çoğunluğu tip I ve daha az miktarda tip V kolajendir. Bu kolajen tiplerinin dışındaki tip III, XI ve XIII kolajenler kemik matriksinde az miktarda bulunur. Geri kalan, kemiğin %10 -15'ini oluşturan, kolajen olmayan proteinlerin (non-kolajen proteinlerin) kemiğin ara maddesini meydana getirirler. Kemiğin büyüüp

gelişmesi, yeniden şekillenmesi ve onarımı için kolajen olmayan proteinler oldukça önemlidir. Kolajen olmayan proteinler içerisinde en çok bulunan protein, osteoblastlar tarafından üretilen osteokalsindir (Morgan ve Gerstenfeld 2021).

Osteokalsin dışındaki kolajen olmayan proteinler, mineralizasyon sırasında kalsiyum fosfata yüksek afinite gösterirler (Morgan ve Gerstenfeld 2021). Kolajen olmayan proteinler, bağlayıcı işlevi görerek kemik matriks organizasyonunda rol oynarlar. Böylece organik matriks üzerinde mineral kristal gelişimi ve çekirdeklenme (nükleasyon) sahaları olarak hareket ederler (Brennan, Kuliwaba vd 2012). Kemik matriksi proteinlerinden olan osteopontin, trombosponin, fibronektin, kemik siyaloproteinleri gibi proteinler, arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) dizisine sahiptir. İlk olarak, fibronektin üzerinde yapılan bir çalışmada keşfedilen bu dizilim sayesinde, hücre bağlayıcı protein olma özelliği kazanırlar (Pierschbacher ve Ruoslahti 1984). Bu diziyi içeren proteinler, hücre adhezyon reseptörlerinden olan integrinler tarafından tanınırlar (Ruoslahti 1996). İntegrinler hücre zarını kaplarlar ve hücrenin sito-iskeleti ile ekstrasellüler matriksi arasında bir bağlantı kurarlar. Böylece integrinler ile RGD dizilimini içeren proteinler, birlikte bir hücre tanıma sistemi oluştururlar. Osteoblast, osteoklast ve fibroblastlar üzerindeki integrinler, bu hücrelerin ekstrasellüler matrikse bağlanması için bir ortam sağlarlar. Böylece bağlanma gerçekleştiğinde, hücreler kendilerine özgün fonksiyonları gerçekleştirmekte serbest hale gelirler (Ruoslahti 1991, Takada, Ye vd 2007). Ancak kolajen olmayan proteinlerin genel özellikleri bilinse de osteoporoz üzerine etkisini gösteren çok az veri bulunmaktadır.

Kolajen ve ara madde mineralize olarak kemik dokuyu oluştururlar (Huilaja, Hurskainen vd 2009). Kemik mineralizasyonunda ise, kemik formasyon ve rezorbsiyon hücreleri önemli rol oynar (Midura, Midura vd 2011). İnorganik materyalin çoğunluğunu oluşturan hidroksiapatit kristalleri ise, her zaman saf halde olmayıp, içerisindeki fosfat grubu yerine karbonat içerebilir (Morgan ve Gerstenfeld 2021).

Kemik matriksinin mineralizasyonu, hızlı olan primer mineralizasyon ve daha yavaş olan sekonder mineralizasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleşir. Primer mineralizasyon evresinde mineral içeriğin %75- %80'i birkaç gün ile bir hafta arasında depolanır. Daha yavaş gerçekleşen sekonder mineralizasyon evresinde, mineral içeriği aylar süren bir evrenin sonunda %90- %95'lere çıkar. Kalan kemik matriksi, yeni oluşmuş ama henüz mineralizasyonu tamamlanmamış kemik matriksini meydana getirir. Bu nedenle, bir osteid yüzeyi, kemik yüzeyinin yaklaşık %15 daha geniş olması durumu olan hiperosteidiste, postmenoposal kadınlarda olduğu gibi kemik yıkımının fazla olduğu durumlarda ortaya çıkar (Buckwalter, Glimcher vd 1996, Boivin, Bala vd 2008).

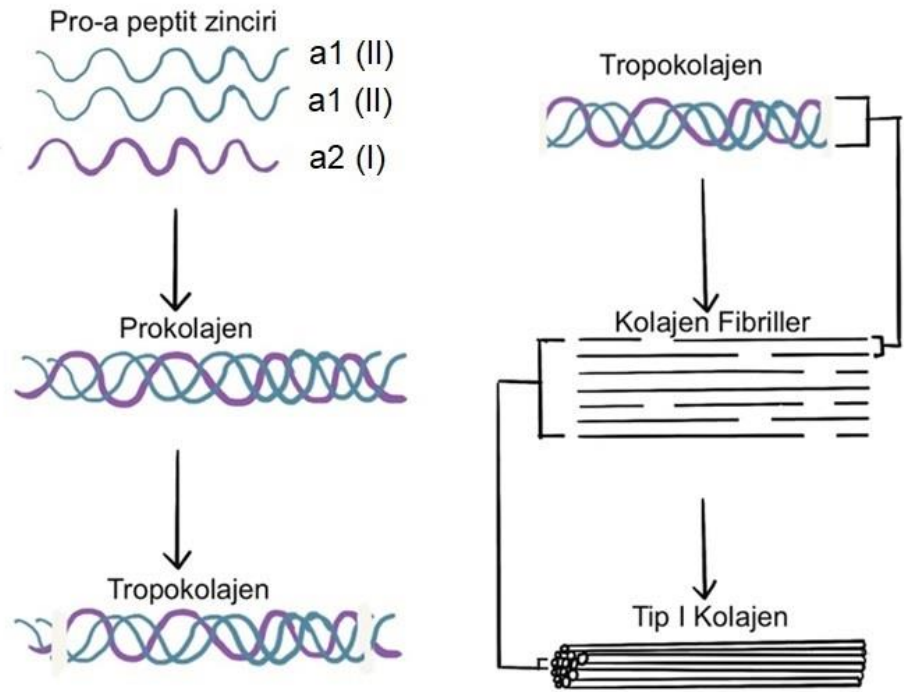
2.3. Kemik Doku ve Tip 1 Kolajen

Kemikteki ekstrasellüler organik matriksin %90'ını kolajen oluşturur (van der Rest ve Garrone 1991, Buckwalter, Glimcher vd 1996, Rossert ve de Crombrughe 2002, Bonucci 2012, Buck ve Dumanian 2012). Kolajen kemik dokuya, çekme kuvveti ve esneklik kazandırır. Bunun yanında mineral depolamak için bir matriks sağlar (Viguet-Carrin, Garnero vd 2006, Boudin ve Van Hul 2017). Kırığa yatkınlık, düşük kemik kitlesi, kemiğin mikro-mimarisi ve yaşlılıkla ortaya çıkan kolajen dönüşümünün yavaşlamasına bağlı olabilir. (Bailey, Sims vd 1999, Mann, Hobson vd 2001, Huilaja, Hurskainen vd 2009).

Kemik dokuda yer alan kolajenin çoğu tip 1 kolajendir (Ricard-Blum 2011). Tip 1 kolajen, 2 adet $\alpha 1$ zinciri ile 1 adet $\alpha 2$ zincirinin birleşerek üçlü helikal bir form alması ile oluşur (Viguet-Carrin, Garnero vd 2006, Ricard-Blum 2011). Fibroblastlar içerisinde, bu iki zincirin öncüleri olan prokolajen $\alpha 1$ ve prokolajen $\alpha 2$ polipeptit zincirleri granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenir (van der Rest ve Garrone 1991, Rossert ve de Crombrughe 2002, Bonucci 2012, Boskey 2013). Bu iki prokolajen polipeptit zinciri iki önemli alel gel tarafından şifrelenir. Bunlar COL1A1 ve COL1A2 alel genleridir (Boskey ve Posner 1984, Bonucci 2012, Szulc 2018). COL1A1, 17. kromozomun uzun kolunda bulunur ve prokolajen $\alpha 1$ 'i sentezler. COL1A2 ise, 7. Kromozomun uzun kolu üzerindedir ve prokolajen $\alpha 2$ 'yi şifreler. Bu iki öncü zincirin üçlü helikal bir form alması, kolajen molekülünün uçları olan, bir karboksil terminal ucundan (C- Telopeptit) ve amino-terminal ucuna (N-Telopeptit) doğru olur (Bonucci 2012, Szulc 2018). Üçlü helikal formu alma sürecinde, granüllü endoplazmik retikulumdaki GRP78, Serpin H1 ve prolil 3-hidroksilaz kompleksi tarafından desteklenmesi ile gerçekleşir. Bu üçlü helikal yapının sıkı bir form almasında, a zincirlerinin tekrar eden Glisin-X-Y üçlü aminoasit dizisine sahip olması rol oynar (Kuznetsova ve Leikin 1999, Myllyharju ve Kivirikko 2004, Dominguez, Barbagallo vd 2005, Bonucci 2012). İçlerindeki en küçük olan glisinden sonra genellikle prolin ve hidroksiprolin gelir (Gökçe-Kutsal 2004, Bonucci 2012). Her üç aminoasitten sonra glisinin tekrar gelmesi, en küçük aminoasit olması ve buna bağlı olarak helikal dizinin merkezinde sınırlı yer tutması nedeniyle gereklidir. Bu işlemin sonucunda oluşan üçlü helikal yapı prokolajen olarak adlandırılır. Prokolajen golgi cisimciği içerisine gelir. Burada N terminal ucunda yer alan aminoasitler tarafından uzaklaştırma işlemi gerçekleşir (Bonucci 2012).

Üçlü helikal form olmasını sağlayan buradaki -Gly-X-Y- dizisinde, Y genelde lizin olduğundan, lizil hidroksilaz enzimiyle hidroksilizine dönüşür. Hidroksilizinde galaktoz veya galaktoz/glikoz ile glikolizasyonu gerçekleşir (Burr 2019). Her bir a zincirindeki C-telopeptit'e ise mannoz içerikli oligosakkaritler entegre edilir. Böylece iki pro a1 ve bir pro

a2 zincirleri arasında disülfid bağları kurularak, C terminalinden N terminaline doğru tüm moleküller bir fermuarın çekilmesine benzer şekilde birbirleriyle kenetlenir (Henriksen ve Karsdal 2019). Oluşan prokolajen egzozitozla hücre dışına atılır. Hücrenin dışında prokolajenin, kolajen peptidaz enzimleri ile terminallerindeki fazla aminoasitleri kesilir (Bonucci 2012). Böylece prokolajen, tropokolajene dönüşür. Tropokolajenler, kolajen fibrilleri oluşturmak için bir araya gelirler. Bir araya getiren bağlar ise hidroksilizin ve lizini bağlayan lizil oksidaz tarafından oluşturulan kovalent çapraz bağlantılardır (Burr 2019). Çapraz kovalent bağlarla birbirine bağlanan tropokolajenler, bir kolajen fibrilini oluşturur (Ricard-Blum 2011, Bonucci 2012, Henriksen ve Karsdal 2019) (şekil 2.3.1.). Kolajen bu aşamadan sonra artık fibronektin ve integrinler aracılığıyla hücre zarına tutunabilir (Gökçe-Kutsal 2004, Feng ve McDonald 2011).



Elif Beyza Yılmaz Yiğit 2021

Şekil 2.3.1. Tip I kolajen sentezinin şematik gösterimi.

Tip 1 kolajen kemiğin kemiğin esas protein yapılı komponenti olup, osteoblastlar tarafından en fazla sentezlenen proteindir (Calvo, Eyre vd 1996, Gunson, Gropp vd 2013, Burr 2019). Fibrillerin kendisine özgü üçlü helikal yapısı sayesinde, yüksek düzeyde organizasyona sahiptir. Fibriller, kemik ve diğer dokular için oldukça önemli olan, yüksek tensil kuvvetini bu dizilim sayesinde kazanırlar. Böylece kemik, mekanik yüklenmelere karşı optimal dayanıklılığa sahip olur (Burr 2002, Bouxsein 2005).

Kemikteki kolajen kompozisyonu, aynı zamanda kalsiyum fosfat içeren tabak şekilli hidroksiapatit kristallerinin depolanmasını da sağlar. Böylece kemik matriksinin kalsifikasyonu sağlanır (Bonucci 2012).

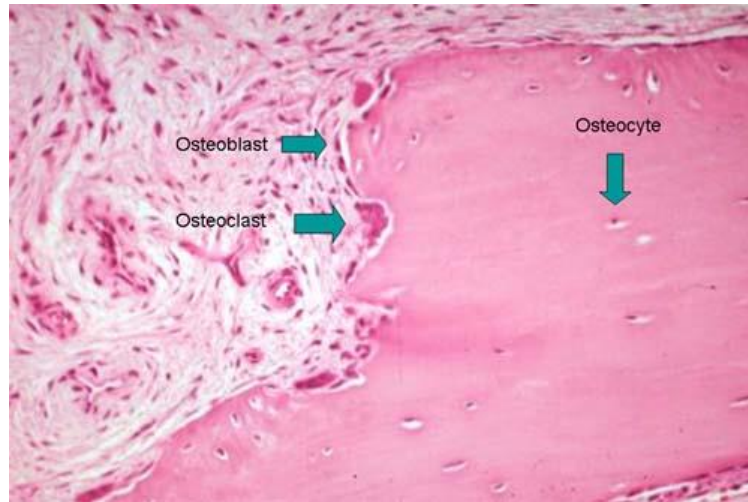
Tip I kolajendeki kovalent çapraz bağlantılar, kemiğin biyolojik ve mekanik özelliklerini belirler (Burr 2002, Feng 2009, Morgan, Unnikrisnan vd 2018). Kolajen çapraz bağlantılar, lisil-hidroksilaz ve lisil-oksidaz bağlantılı gelişmemiş ikili çapraz bağlantılar, gelişmiş üçlü (pridinolin ve pirolin) çapraz bağlantılar ile glisinasyon veya oksidasyona bağlı enzimatik olmayan çapraz bağlar olmak üzere kendi içinde ayrılır (Saito ve Marumo 2010, Burr 2019).

2.4. Kemik Hücreleri

Bütün kemik yüzeyleri farklı morfolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip hücreler tarafından kaplanmıştır. Bunlar osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositlerdir (Boskey 1990, Buckwalter, Glimcher vd 1996) (Şekil 2.4.1.). Bu hücreler, kemiğin gelişimi ve adaptasyonu sonucunda mekanik ihtiyaçlara ve hormonal değişikliklere göre kemiğin doğru zamanda yapım- yıkımını sağlarlar (Hill 1998, Turner 2002). Kemik formasyonu bu süreçler arasındaki ilişki ile sağlanır. Osteoblastlar kemiğin yapımını sağlarken, osteoklastlar kemiğin yıkımını gerçekleştirir. Kemiğin azaltılması gerektiği zamanlarda fonksiyon gösteren osteositler ise, osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki aktivitenin koordinasyonunu sağlar (Burr 2002, Gökçe-Kutsal 2004).

Osteoblastlar kemik iliğinin mezenşimal kök hücrelerinden köken alan, kolajen ve diğer kemik proteinlerinin sentezlenmesinden sorumlu kemik yapım hücreleridir. Ayrıca osteoblastlar, kuboidal şekilli hücreler olup, kemik yüzeyini kaplarlar. Kemik matriksinin mineralizasyonunda da önemli bir role sahiptir (Kanis 1997, Downey ve Siegel 2006). Osteoblastlar, osteokalsin (OCN) ve osteopontin (OPN) gibi kolajen olmayan proteinlerin (NCP) yapımından sorumludur (Allen ve Burr 2014).

Osteositler, kemik yapımı sürecinde kemik matriksine gömülü osteoblastlardır. Kemikte en fazla bulunan hücrelerdir. Osteositler, osteoblastları ve diğer osteositleri kemik kanalları arasından ilerleyerek güçlü hücrelerarası bağlantılarla (kanalikuli) birbirine bağlar (Kanis 1997, Huilaja, Hurskainen vd 2009).



Şekil 2.4.1. Kemik hücrelerinin histolojik görüntüsü; osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler (UAB and the UAB Research Foundation 2013).

Kemikte bulunan diğer ana hücre grubu ise osteoklastlardır. Hematopoetik progenitörlerden köken olan osteoklastlar, kemik rezorpsiyonundan sorumlu çok çekirdekli hücrelerdir. RANKL (Reseptör aktivatör nuklear kaba ligand) ve MCS-F (Koloni Uyarıcı Faktör) aracılığı ile hematopoetik progenitörlerden, çok çekirdekli hücelere farklılaşırlar. Kemik yüzeyine tutunup, kemiğin apikal yüzeyi ve mineralize kemik yüzeyi arasındaki boşluğa asit ve lizozomal enzimler salgılayarak mineralize kemiği indirger (Kanis 1997, Huilaja, Hurskainen vd 2009, Tran, Nguyen vd 2009).

2.5. Kemik Yeniden Yapılanması

Kemik doku, hayat boyu devam eden bir yapım ve yıkım döngüsü içerisindedir (Hill 1998, Eriksen 2010, Allen ve Burr 2014). Hem kortikal hem kanselöz kemikte meydana gelen bu yapım yıkım süreçleri kemiğin yeniden yapılanması (remodeling) olarak adlandırılır (Parfitt 1984). Kemik yeniden yapılanmasına etki eden faktörler tam olarak belirlenememiştir. Ama yetişkin bireylerde yapım ve yıkım süreçleri eşleşme (coupling) adı verilen bir süreç ile birbirine eşit olması sağlanır (Eriksen 2010).

Kemik yeniden yapılanması, aktivasyon, rezorpsiyon, reversal, formasyon ve mineralizasyon olarak adlandırılan fazlar ile gerçekleşir. Kemiğin yeniden şekillenmesi osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki eşleşme ile yer değiştirmesi sonucunda meydana gelir. Bu eşleşme BMU (Kemik Çoklu-Hücreli Ünite) olarak adlandırılan ve on osteoklast ile birkaç yüz arasında değişen osteoblasttan oluşan bir hücre topluluğudur (Frost 1994, Martin ve Seeman 2008). Her bir BMU hem kronolojik olarak hem de yerleşim yeri olarak birbirinden ayrılır. Dolayısıyla kemik yeniden şekillenmesinin aktivasyonu, kimyasal ya da mekanik sinyaller ile başlar ve kontrol edilir (Hill 1998).

Mekanik stres osteositler tarafından algılanır ve IGF-I gibi büyüme faktörlerinin bu strese cevap olarak salınmasına neden olur (Frost 2003). Bu aşamadan sonra bir dizi aşamayı içeren kemik yeniden şekillenme sürecini başlatır (Hill 1998). Bu süreç prekürsor hücrelerin birleşmesini, farklılaşmasını, proliferasyonunu ve ilgili bölgeye göç etmesini (migrasyonu) içerir. Bu göç insan vücudunda yaklaşık 5-10 gün arasında değişir (Eriksen 2010). Kemik yüzeyinin rezorpsiyonunu başlatan sinyallerin iletilmesi sonucunda, osteoklastlar bu bölgeye taşınmaya başlar. Yaklaşık 3 hafta süren bu faz, olgunlaşmış osteoklastların ilgili kemiğin longitudinal hattı boyunca ilerlemesi ile devam eder. Bu süreçlere ek olarak, kemiğin yapım ve yıkım fazlarına dahil olmayan bir reversal faz olarak adlandırılan başka bir faz bulunur. Bu faz osteoblastlar farklılaşmaya ve osteoblastların prekürsörlerinden proliferasyonu sırasında meydana gelen bir aktivasyon fazı olarak düşünülebilir. Bu fazdan sonra kemik formasyonu başlar. Yaklaşık 3 ay süren bu fazdan sonra, osteoid olarak adlandırılan mineralize olmamış kemiğin, mineralizasyonu sağlanır (Allen ve Burr 2014).

Kemik yeniden yapılanması, sürekli olarak eski kemiğin rezorbe olarak yerini yeni kemiğe bırakmasını içeren bir süreçtir (Martin ve Seeman 2008, Prideaux, Findlay vd 2016, Kenkre ve Bassett 2018). Kemik kitlesinde kayıp veya artış olduğunu, yapım ve yıkım arasındaki denge belirler. Bu süreci osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ile BMU'yu oluşturan aksesuar hücreler ile belirlenir. Kemik formasyonu ve rezorpsiyonu sürecinde kemik doku hayat boyu bir yenilenme sürecindedir. Trabeküler kemik, kompakt kemikten daha fazla yüzey/hacim oranına sahip olduğundan, 8 kat daha fazla metabolik olarak aktiftir. Normal koşullarda bu iki süreç birbirleriyle eşleşmiş durumdadır. Bu eşleşme sürecinde, BMU'yu oluşturan osteoklastik ve osteoblastik aktivite bir denge halindedir (Allen ve Burr 2014, Bala, Zebaze vd 2015).

2.6. Osteoporoz

Osteoporoz, kemik kırılabilirliği ve kırığa yatkınlıkta artışla beraber düşük kemik kitlesi ve kemik dokunun mikro-mimarisinde bozulmayla karakterize sistemik bir iskelet sistemi hastalığıdır (Kurosaki 1979, Sambrook 1996, Glaser ve Kaplan 1997, Cymet, Wood vd 2000, Lane, Russell vd 2000, Takata ve Yasui 2001, Armas ve Recker 2012, Adams 2015, Chapurlat ve Genant 2016, Ensrud ve Crandall 2017, Rizzoli 2018). Osteoporoz, özellikle kırık ile sonuçlanan durumlarda, önemli fiziksel ve psikososyal sonuçlara sahiptir (Urdahl, Manca vd 2006, Parkinson, Forbes vd 2010). Tipik olarak osteoporoz, trabeküler bağlantıların incilmesi ve buna bağlı olarak, kemik hacminin artması ve trabekül sayısının azalmasıyla sonuçlanır. Osteoporozda kemiğin mikro-

mimarisinde görülen bu değişiklikler kemiğin kuvvet karşısındaki dayanımını azaltır (Parkinson, Forbes vd 2010).

Osteoporoz primer olarak gelişebildiği gibi, kemik kaybını arttıran hastalıklara sekonder de gelişebilir (Kanis 1997, Ensrud ve Crandall 2017, Rizzoli 2018). Primer osteoporoz, erkeklere oranla kadınlarda daha fazla görülür (Glaser ve Kaplan 1997, Kanis 1997). Genel olarak postmenopozal kadınlarda ve yaşlı erkeklerde gelişir. Osteoporozun yaş, lokalizasyon, etiyoloji ve tutulan kemik dokuya göre sınıflandırılır. Yaygın olarak kullanılan sınıflama etyolojiye ve lokalizasyona göre yapılan sınıflamadır. Etiyolojisine göre primer veya sekonder olarak sınıflandırılabilir (Glaser ve Kaplan 1997, Kanis 1997). Primer osteoporoz da sebep tam olarak bilinmemektedir. Kendi içinde, bulguların başlangıç yaşına göre juvenil, idiopatik ve involusyonel osteoporoz olmak üzere üç grupta incelenir. İnvolusyonel osteoporoz türü olan postmenopozal osteoporoz ise oldukça yaygın bir hastalıktır ve 50 yaşından sonraki kadınlarda görülür. Osteoporozun en sık görünen formu postmenopozal osteoporozdur. Yaşam boyu kırık görülme oranı %40' dan daha fazladır. Vertebra, el bileği ve kalça osteoporotik kırıkların en sık görüldüğü bölgelerdir. Kadınlar menopoz sonrası yaklaşık 10 yıl sonra el bileğinde kırıklar, 15-20 yıl içerisinde vertebral kırıklar ve 75 yaş sonrası kalça kırıkları gelişebilmektedir. Kalça ve vertebra kırıkları sonrasında hastaneye yatış, immobilizasyon, pnömoni ve tromboembolik olaylar buna bağlı olarak da bir yıllık mortalite oranları %20'lere kadar çıkmaktadır (Srivastava ve Deal 2002).

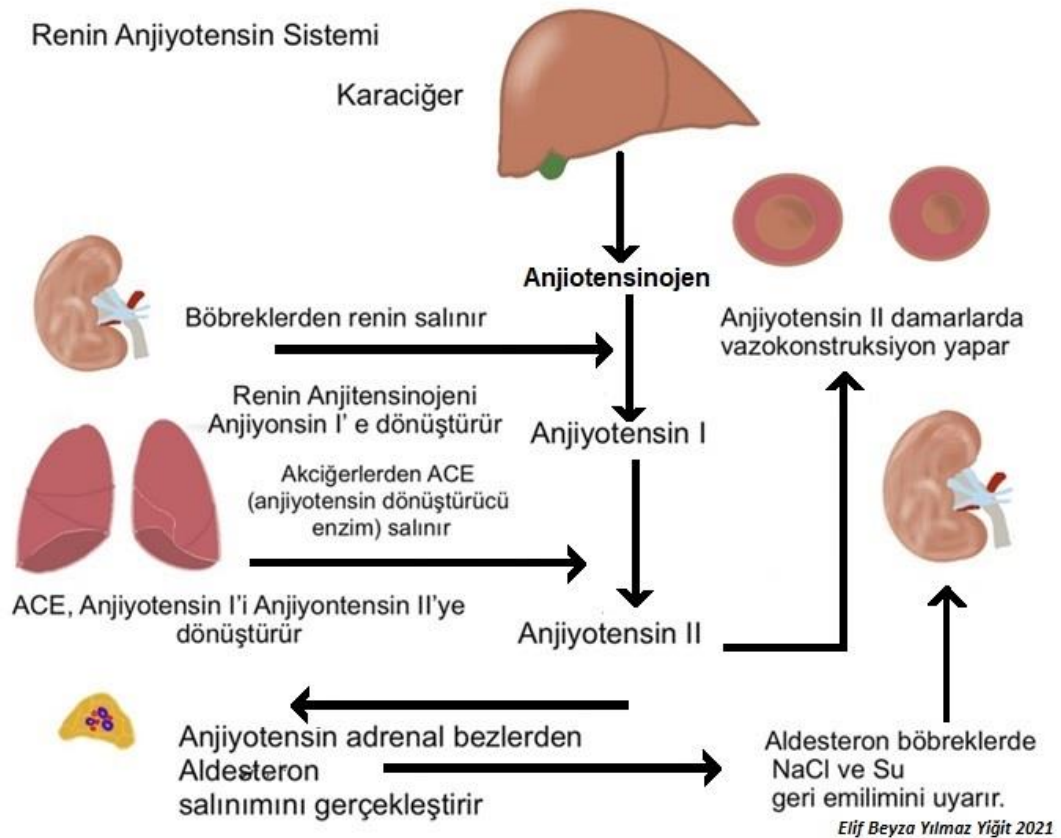
Osteoporotik kırıklar içerisinde, özellikle kalça ve vertebral kırıklar aşırı ölüm tehlikesi içerir (Coughlan ve Dockery 2014). Tüm dünyada kalça kırığına bağlı olarak ölüm oranı yılda 740,000'dir. Avrupa Birliği verilerine göre bunların sadece 21,000'i kırığın ilk yılında gerçekleşir (Hernlund, Svedbom vd 2013). Her iki cinsiyette de kalça ve vertebral kırıklarına bağlı mortalite oranı yüksektir. Kalça kırıklarına bağlı ölümlerde, kırığa bağlı gelişebildiği gibi, cerrahi sonrası enfeksiyon, tromboembolizm gibi komplikasyonların sonucunda da gelişebilir (Kanis 1997). 50 yaşından büyük erkeklerin %8'i, kadınların ise %3'ü kalça kırığına bağlı olarak hayatını kaybetmektedir (Hernlund, Svedbom vd 2013, Kanis, Cooper vd 2019). Cinsiyet, yaş, ek hastalıklar kırık sonrası mortalite oranlarını yükselten ana faktörlerdir. Osteoporozdaki diğer önemli risk faktörleri ise vücut ağırlığı, travma, genetik, beslenme, alkol kullanımı, fiziksel inaktivite, menopoz, östrojen eksikliği, hormonal nedenler, yaşam tarzı, çeşitli ilaçlar, kadınlarda sigara kullanımı ve düşük kemik kitlesidir (Kanis 1994, Gass ve Dawson-Hughes 2006, Rizzoli 2018, Kanis, Cooper vd 2019).

Kadınlarda 50 yaşından sonra, kemik kaybı hızlanmaya başlar (Delaney 2006). Özellikle 65 yaşından sonra kemik mineral yoğunluğu ölçümlerinde, kırık riskinin en yüksek seviyede olduğu gösterilmiştir (Delaney 2006, Armas ve Recker 2012).

Bireylerde osteoporozla bağlı olarak, kortikal porlarda artma ve trabeküllerde incelmeye meydana gelir (Rizzoli 2018). Östrojen eksikliği, kemik yapım ve yıkım mekanizmasını bozar (Garnero, Sornay-Rendu vd 1996, Riggs, Khosla vd 1998). Kemik iliğinden salınan çeşitli sitokinlerin yapımında artma meydana gelir. Bu da osteoklast sayısını veya osteoklast aktivitesini artırarak kemik yıkımını uyarır (Meema ve Meema 1976, Heaney, Recker vd 1978, Richelson, Wahner vd 1984).

2.7. Renin Anjiyotensin Sistemi ve Kemik Doku İlişki

Renin anjiyotensin sistemi (RAS) kan basıncının kontrolünde önemli bir rol oynayan kompleks enzimatik bir yapıdır. Renin ise bu sistemin temelini oluşturan, böbreklerde bulunan jukstaklomeruler hücrelerde üretilir ve buradan kana salınır. Bu yapı daha sonra anjiyotensin I (Ang I)'in anjiyotensinojen'den ayrılmasını sağlar. İleri aşamalarda ise Ang I, Ang II'yi oluşturur. Bu değişim ise anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) tarafından yapılmaktadır (Donmez, Ozdemir vd 2012, Gebru, Diao vd 2013, Ghosh ve Majumdar 2014) (Şekil 2.3.1.).



Şekil 2.7.1. Renin anjiyotensin sisteminin şematik gösterimi.

Temel olarak RAS ile kemik metabolizması arasındaki ilişki Ang II tarafından yürütülmektedir (Gebru, Diao vd 2013). Daha önce yapılan çalışmalarda ise Ang II'nin TRAP pozitif multinükleer osteoklastlarda, osteoblastlarda RANKL ekspresyonunun upregülasyonu yoluyla artmış olduğu gösterilmiştir (Bailey, Sims vd 1999, Shimizu, Nakagami vd 2008, Gebru, Diao vd 2013). Söz konusu bu etkilerin özellikle overektomi modellenen çalışmalarda ACE inhibitörleri ve Ang II tip 1 reseptör blokörleri ilaçlar kullanılarak ortadan kaldırıldığı literatürde gösterilmiştir (Donmez, Ozdemir vd 2012, Rajkumar, Fingleton vd 2013). Bu açıdan elde edilen bulgular özellikle osteoporoz gibi kemik metabolizması ile ilgili önemli hastalıkların tedavisinde RAS'ın önemli bir stratejik hedef olmasını sağlamıştır.

Renin anjiyotensin sistemi (RAS) kan basıncının homeostazisinde, aynı şekilde su ve sodyumun düzenlenmesinde önemli rol oynar (Unger 2002, Verdecchia, Angeli vd 2008). RAS aktivasyonu hipertansiyon, renal hasar ve metabolik sendrom ile sonuçlanır (Parkinson, Forbes vd 2010, Putnam, Shoemaker vd 2012). Yakın zamanda, RAS'ın ana etkilerinin sistemik olduğu düşünülmüştü; ancak, hayvan ve hücre çalışmalarında bulunan kanıtlar, kemik dokudaki RAS aktivasyonunu ve sonucunda osteoporoz geliştiği gösterilmiştir (Paul, Poyan Mehr vd 2006, Shimizu, Nakagami vd 2008).

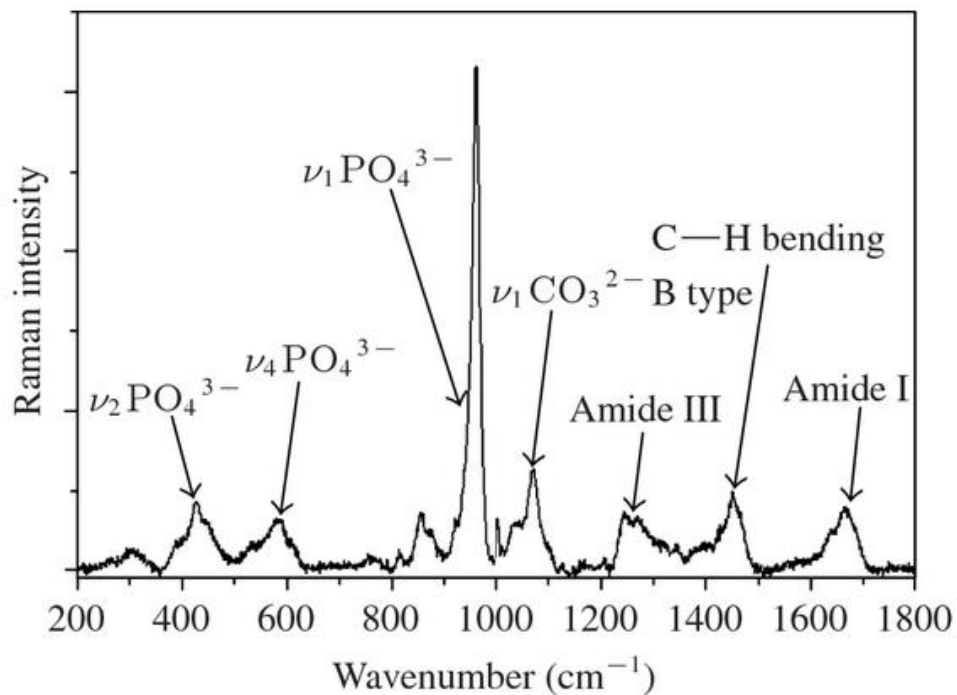
2.8. Raman Spektroskopisi ve Kemik Doku

Raman spektroskopisi, biyolojik dokuların biyofiziksel ve kimyasal özelliklerini doku içerisine girmeden belirleyen lazer tabanlı bir analiz tekniğidir (Mandair ve Morris 2015, Paschalis, Gamsjaeger vd 2017). Raman spektroskopisinde, lazer etkileşimi ile saçılan fotonlar bir dedektörde toplanır. Dedektörler molekülün kendine özgü titreşimlerine göre, saçılan ışığın dalga boylarını ifade eden bir spektrum gösterir. Bu spektrumda dokunun içeriğine ait bantlar ve tepe (pik) noktaları bulunur. Her bir tepe noktası dokunun kendine özgü bileşenlerini gösterir.

Raman spektroskopisi herhangi bir örnek hazırlığına ihtiyaç duyulmaksızın, dokunun biyolojik bileşenlerini çok hızlı bir şekilde belirler (Butler, Ashton vd 2016). Taze veya fikse olması farketmeksizin, dokularda ve non-invaziv olarak canlı hayvanlarda kullanılabilir. Bu yüzden kemik kalitesi ile ilgili yapılan araştırmalarda önemli bir değerlendirme ölçütü haline gelmiştir (Mandair ve Morris 2015).

Kemik kalitesi terimi çoğunlukla kemik dokunun kompozisyonunu ve mimarisini ifade eder (Boskey, Marino vd 2015, Burr 2019). Bu iki özellik kemik dokunun mekanik fonksiyonlarını gerçekleştirme yeteneğini ve içerisindeki materyalin özelliklerini

belirler (Burr 2002, Bergholt, Serio vd 2019). Raman spektroskopisi sayesinde bu özellikler dört önemli kompozisyon komponenti ve kemik kalite komponentleri ile belirlenir (Donnelly, Chen vd 2010, Morris ve Mandair 2011, Butler, Ashton vd 2016). Bunlar Mineral- Matriks Oranı, Karbonat-Fosfat oranı, Mineral-Kristalinitie ve kolajen kalite parametreleridir. Mineral-Matriks oranı için $\nu_1\text{PO}_4$ / Amid I (Fosfat/ Amide I), $\nu_1\text{PO}_4$ / Amid/III (Fosfat/Amide III), $\nu_1\text{PO}_4$ / Pro (Fosfat/ Prolin), $\nu_1\text{PO}_4$ / CH2 değerleri; mineral özellikleri için $1/\text{FWHM}$ (Full-width half-height, $\nu_1\text{PO}_4$), $\text{CO}_3/\nu_1\text{PO}_4$ değerleri; organik matriksin özellikleri için Hyp/ Pro (Hidroksiprolin/ Prolin), 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri kullanılır (Morris ve Mandair 2011, Unal, Uppuganti vd 2019, Unal 2021). Bu oranları oluşturan her bir değer bant olarak adlandırılır ve belirli değerlerde yer alırlar. 959 cm^{-1} 'de bulunan fosfat bandı karbon içeren apatitler hakkında bilgi sağlar. Fosfatın FWHM bandı ise mineral kristinalite değerini belirlemek için kullanılır. 1070 cm^{-1} 'deki karbon bandı kemik mineralizasyonu ile ilgili bilgi sağlar. Ona yakın bulunan 1076 cm^{-1} 'deki bant ise diğer fosfat bandından biridir (Boskey 2006).



Şekil 2.8.1. Raman spektroskopide kemik içeriğinin intensiti değerleri (Buchwald, Niciejewski vd 2012).

Kolajen için en sık kullanılan bant Amide I bandıdır. Bu bandın en önemli değerleri 1660 cm^{-1} ve 1690 cm^{-1} dir. Bu bantların oranı, üçlü çapraz pridinol ve olgunlaşmamış dihidroksilizinörolizin çapraz bağlantılarının birbirine oranı kemikteki çapraz bağların kopup kopmadığı hakkında bilgi verir (Boskey 2006, Unal, Uppuganti vd 2019). Amide I'in alt peak değerleri olan $I_{1670/1640}$ ve $I_{1670/1690}$ oranları kolajen hakkında önemli ipuçları verir. $I_{1670/1690}$ oranı çapraz bağlardaki hasar hakkında bilgi verir ve matriks maturitesini

gösterir (Mandair ve Morris 2015). $I_{1670/1640}$ değeri kolajenin helikal şekli, dolayısıyla kolajen kalitesi hakkında bilgi verir (Unal, Uppuganti vd 2019). Bu iki değer insan kortikal kemiğinde kırık ve katılık hakkında önemli ipuçları sağlar.

Genel olarak kemikte, fosfat bandının 959 cm^{-1} deki değeri, kemik mineral içeriğini ifade eder. 1660 cm^{-1} deki Amide I değeri, 1446 cm^{-1} deki CH_2 deformasyonu değeri, 853 cm^{-1} deki Prolin ve 876 cm^{-1} deki Hidroksiprolin değerleri Raman spektroskopisinde sıklıkla kullanılır (Boskey 2006, Mandair ve Morris 2015) (Şekil 2.8.1.).

2.9. Deneysel Osteoporoz Modeli

Postmenopozal osteoporoz üzerine yapılan araştırmalarda en çok kullanılan model overektomize sıçan modelidir (Wronski, Dann vd 1989, Wronski, Dann vd 1993, Chen, Yao vd 2001, Wu, Zhao vd 2019, Xu, Liu vd 2019, Kim, Kim vd 2020, Dempster, Marcus vd 2021). Postmenopozal kadınlarda over hormonları eksikliğine bağlı gelişen kemik kaybının incelenmesi amacıyla bu hayvan modeli geliştirilmiştir (Wronski, Dann vd 1989, Yang, Zheng vd 2020).

Overektomi sonrası, kemik yıkımının kemik yapımını geçmesiyle iskelette kemik kaybı başlar (Erben, Bromm vd 1998). Erken dönem postmenopozal kemik kaybına benzer şekilde overektomili sıçanlarda kemik yapım ve yıkım döngüsünün arttığı gözlemlenir. Sıçanlarda overektomi sonrası 2 ay içerisinde kemik yapım-yıkımı en yüksek değerine ulaştıktan sonra, aşamalı olarak azalmaya başlar (Wronski, Cintrón vd 1988, Wronski, Dann vd 1989). Femur boynunda belirgin kemik kaybı ilk 30 gün sonra meydana gelir (Wronski, Dann vd 1993). Fakat istatistiksel olarak anlamlı ilk kayıp sekiz hafta sonra ortaya çıkar (Erben, Bromm vd 1998). Overektomi sonrası kanselöz kemikteki kemik kaybı vertebra ve tibia'da gösterilmiştir (Wronski, Dann vd 1989). İlk 6 ayda vertebral kemik kaybı orta düzeyde seyrederken, tibia'nın proksimal ucunda kemik kaybı çok daha hızlıdır (Wronski, Cintrón vd 1988).

Postmenopozal osteoporozun etkilerini incelemek için kullanılan overektomili sıçan modeli oldukça sık tercih edilmektedir Bunun nedeni ise postmenopozal osteoporozda görülen östrojen eksikliğine bağlı kemik kompozisyonundaki değişikliklerin, bu deneysel model ile benzerlik göstermesidir. Bununla birlikte, overektomili sıçan modelinde dayanıklılık, kuvvet dayanımı, elastik modül ile ilişkili mekanik özelliklerde azalmanın meydana gelmesi, postmenopozal osteoporoz ile ilişkili çalışmalarda önemini arttırmaktadır (Peng, Tuukkanen vd 1994, Flieger, Karachalios vd 1998, Han, Szarzanowicz vd 1999).

2.10. Hipotez

Osteoporoz tüm dünyada yaygın olarak görülen önemli bir hastalıktır ve kemik dokunun mekanik özelliklerini zayıflatarak kemik dokuda kırıklara yol açar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda AT1 reseptör blokörü içeren ilaçların osteoporozun yarattığı komplikasyonları azalttığı gösterilmiştir. Çalışmamızın hipotezleri şunlardır:

1. Overektomi modeli kemik dokuda osteoporoza neden olur, kemik doku mekanik olarak zayıflar, fiziko-kimyasal değişimler meydana gelir ve kemik kolajen miktarı azalır.
2. Osteoporotik sıçanlara verilen Losartan tedavisi kemik dokunun mekanik özelliklerini geliştirir, kemik dokudaki kolajen miktarını artırır ve kemik dokunun fiziko-kimyasal özelliklerini geliştirir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Grupları, Overektomi ve İlaç Uygulanması

Bütün gruplarda 200-250 gram ağırlığında 12 haftalık *Rattus norvegicus* türü Wistar cinsi yetişkin dişi sıçanlar kullanılmıştır. Her bir grupta 15 adet dişi sıçan olmak üzere toplam 75 adet hayvan yer almıştır. Tüm denekler 12 saat gece, 12 saat siklusunda ve her bir kafeste üç sıçan olacak şekilde 5 gruba ayrılmıştır. Denekler sınırsız yem ve su ile beslenmiştir. Yapılan bütün uygulamalar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından değerlendirilmiş ve PAUHDEK-2018/23 no ile onaylanmıştır.

Çalışmamızda toplam 5 grup bulunmaktadır:

Grup 1 (Kontrol grubu = KONT): Bu grupta sağlıklı sıçanlar bulunmaktadır (n=15).

Grup 2 (Kontrol + Losartan grubu = KONT- LOS): Bu grupta bulunan sıçanlar 12. Haftadan itibaren 8 hafta boyunca AT1 inhibitörü olarak (5mg/kg/gün) Losartan verilmiştir (n=15).

Grup 3 (SHAM grubu = SHAM): Bu gruptaki hayvanlara cerrahi operasyon için gerekli bütün aşamalar yapıp overler alınmadan, operasyon bölgesi kapatılıp dikilmiştir. Bu grupta bulunan sıçanlara 12. haftadan sonra 8 hafta boyunca (5 mg/kg/gün) su verilmiştir (n=15).

Grup 4 (Overektomi grubu = OVX): Bu grupta bulunan sıçanlara overektomi yapılmıştır, bunu takiben 12. haftanın sonunda 8 hafta boyunca (5mg/kg/gün) su verilmiştir (n=15).

Grup 5 (Overektomi + Losartan grubu = OVX- LOS): Bu grupta bulunan sıçanlara overektomi yapılmıştır, bunu takiben 12. haftanın sonunda 8 hafta boyunca (5mg/kg/gün) Losartan verilmiştir (n=15) (Tablo 3. 1. 1.).

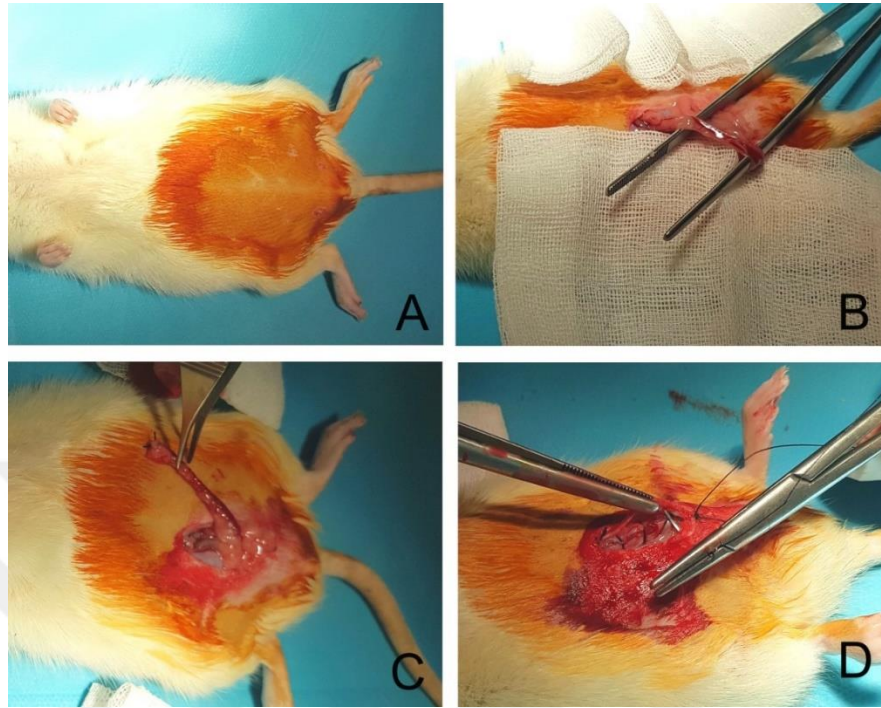
Tablo 3. 1. 1. Deney Grupları

Grup No (n=15)	Ad	Kısaltma	İşlem	Madde	Bekleme Süresi (Hafta)	Tedavi Süresi (Hafta)
1	Kontrol	KONT	(-)	Su	12	8
2	Kontrol Losartan	KONT- LOS	(-)	Losartan	12	8
3	Sham	SHAM	Sham	Su	12	8
4	Overektomi	OVX	Overektomi	Su	12	8
5	Overektomi Losartan	OVX- LOS	Overektomi	Losartan	12	8

Overektomi için 30 adet Wistar cinsi yetişkin dişi sıçan kullanılmıştır (OVX ve OVX- LOS grupları). Hayvanlar her kafeste üç adet olacak şekilde kafeslenmiştir. Deney süresince normal yem ve musluk suyu verilmiştir. Anestezik madde olarak Ketamin (90 mg/kg) ve Xylazine (10 mg/kg) intraperitoneal olarak verilmiştir. Anesteziden sonra hayvanların karın bölgeleri traşlandıktan sonra, ventral insizyon yapılarak uterus bağlanmıştır. Ovaryumlar bilateral olarak koterle alınmış ve insizyon bölgesi dikilerek kapatılmıştır. (OVX ve OVX- LOS grupları). Aynı cerrahi işlemler SHAM grubu için de yapılmıştır. Fakat SHAM grubuna ait bu hayvanların ovaryumları alınmadan girişim yapılan bölgedeki kesi dikilerek kapatılmıştır (Şekil 3.1.1.). 12 haftalık sürenin sonunda OVX- LOS ve KONT- LOS gruplarına 8 hafta boyunca gavaj yoluyla 5 mg/kg/gün AT1 inhibitörü olarak Losartan, diğer üç gruba ise (KONT, OVX ve SHAM) 5 mg/kg/gün musluk suyu verilmiştir.

Deney, 20 haftalık sürenin sonunda hayvanlardan, anestezi altında, kalpten kan alınarak (kansızlaştırma yöntemiyle) sonlandırılmıştır. Deney ve kontrol gruplarına ait sıçanlardan bilateral olarak çıkarılan femurlar ile tibia'lar hiçbir kas ve bağ dokusu kalmayacak şekilde diseke edilmiştir. Daha sonra çıkarılan femur ve tibia'lar serum fizyolojik (SF) çözeltisi ile yıkanmıştır. Gruplara göre gazlı beze sarılarak, deneye alınana

kadar -20°C ' de bekletilmiştir. Bütün femurlar ve tibia'lar çıkarıldıktan sonra, mekanik test, PCR deneyleri, Mikro-BT ve Raman analizleri için kullanılmıştır.



Şekil 3.1.1. Overektomi cerrahisi aşamaları. A'da sıçanın karın bölgesi tıraşlanıp, batikon sürülmüş hali, (B) Karın bölgesinde ventral insizyon sonrası sabitlenen uterus, (C) Tuba uterina ucundaki overlerin bağlanıp ve koterize edildikten sonraki hali. (D) Bilateral overektomi sonrası kesinin kapatılmış hali.

3.2. Eğme Testi (Three Point Bending Test)

Osteoporoz'da kemik mikro-mimarisindeki bozulmalarla beraber, kemik kırılabilirliğinde artış meydana getirir. Kemik kırılabilirliğindeki bu artış, kemiğin yapısal ve fizyolojik özelliklerinde de değiştirir. Bu yüzden üç nokta eğme testi, kemiğin biyomekanik özelliklerini test etmek ve mikro-mimarisindeki değişiklikleri tanımlamak açısından oldukça önemlidir.

Kemiğe yapılan biyomekanik testlerin başında çekme testi ve eğme testi gelir. Eğme testi, üç nokta eğme testi olarak da bilinir. Materyalin, bu durumda kemiğin, eğmeye karşı elastik modülünü ve fleksural kuvvet (strength) değerlerini ortaya koyar. Test edilecek kemik, üç nokta eğme testi cihazına iki ucu sıkıştırılacak şekilde yerleştirilir ve burada kemiğe uygulanan kuvvet miktarı artırılarak, ortasında meydana gelen çökme değeri (deflection) belirlenir. Bu sonuçlar bir grafik haline getirilerek kemik dokunun mekanik davranışı incelenir.

Femurlar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurucudan çıkarıldıktan sonra biyomekanik testlerin uygulanabilmesi için çözünmesi beklenmiştir. Hazırlanan örnekler için uygulanacak biyomekanik testler Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Makine Mühendisliği Bölümü Biyomekanik Laboratuvarında yapılmıştır. Üç noktalı eğme testi için bilgisayar kontrollü bir germe-kopartma cihazı (Shimadzu Autograph AG-G series, ShimadzuCo, Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Femurlar eğme aparatı altına yatay olarak iki mesnet arasındaki mesafe 2,6 cm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Eğme hızı 2 mm/ dk olarak ayarlandıktan sonra, kemik kırılana kadar kuvvet uygulanmıştır.

3.2.1. Femurun Kesit Yüzey Alanının Hesaplanması

Eğme testi yapıldıktan sonra kırılan femurların gövdelerinin en ince olduğu bölge elektrikli bir rotor yardımıyla transvers olarak kesildikten sonra her bir femur için elde edilen fotoğraflar yüzey alanı hesaplanması için kullanılmıştır. Elde edilen görüntülerden bilgisayar ortamında Image J programıyla kemik dokunun çapı, iç çapı (mm cinsinden) ve toplam yüzey alanı (mm^2 cinsinden) hesaplanmıştır. Her bir femur için elde edilen bu değerler diğer biyomekaniksel verilerin hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.2.2. Eğme Testi Verilerinin Hesaplanması

Eğme deneyi boyunca, kuvvet (F) artırılırken, kemiğin tam ortasında oluşan çökme değeri (deflection) ölçülmüştür. Ölçülen değerler sonucu kuvvete karşılık gelen çökme grafiği elde edilmiştir. Mukavemet bilgileri kullanarak, üç noktalı eğme testi için maksimum eğme dayanımı ve maksimum kuvvet değeri hesaplanmıştır.

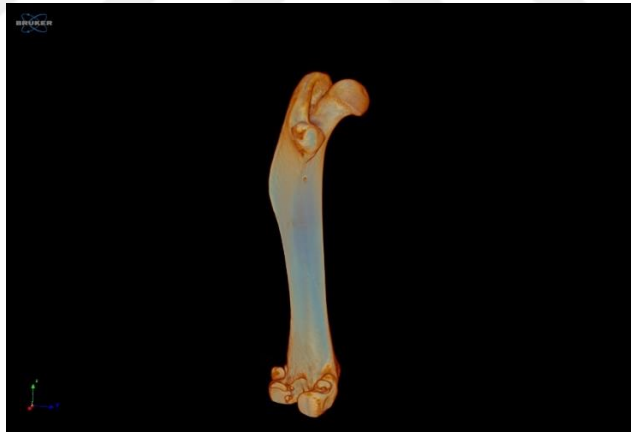
3.3. Raman Spektroskopisi Analizleri ve Hesaplanması

Raman spektroskopisi ölçümleri Pamukkale Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü laboratuvarında yapılmıştır. Raman analizi için taşınabilir bir Raman cihazı (i Raman plus Portable Raman System, BWTEK, CDRH-Radiological Health Program, 2014, Newark, ABD) kullanılmıştır. Her bir femur $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarıldıktan sonra, 10x PBS içerisinde 6 saat bekletilmiştir. Analizler için cihaz içerisine yerleştirilerek, lazer probun örneklerden uzaklığı 5.9 mm olacak şekilde ayarlanmıştır. Cihaz yazılımı (BWSpecTM) üzerinden yapılmıştır. Her bir tibianın şaftı içerisinde proksimalinden distale doğru üç noktadan ölçüm yapılmıştır. Her kemikte üç noktadan toplanan verilerin ortalaması alınıp, spektrumdaki karşılığına kaydedilmiştir.

Bunlar 875 nm'de Hidroksiprolin, 853 nm'de Prolin, 959 nm'deki $\nu_1\text{PO}_4$, 1072 nm'deki CO_3 , 1270 nm'deki Amide III, 1450 nm'deki CH_2 , 1670'deki Amid I ile 1670 ve 1690 bantlarındaki değerlerdir. Bu değerler belirlendikten sonra Mineral- Matriks Oranı, Karbonat-Fosfat oranı, Mineral-Kristalinite ve kolajen kalite parametreleri için belirli oranlar hesaplanmıştır. Bunlar; mineral-matriks oranı için $\nu_1\text{PO}_4$ / Amid I, $\nu_1\text{PO}_4$ / Amid/III, $\nu_1\text{PO}_4$ / Pro, $\nu_1\text{PO}_4$ / CH_2 değerleri; mineral özellikleri için $1/\text{FWHM}(\nu_1\text{PO}_4)$, $\text{CO}_3/\nu_1\text{PO}_4$ değerleri; organik matriksin özellikleri için Hyp/ Pro, $I_{1670/1640}$ ve $I_{1670/1690}$ değerleridir. Aynı gruptaki her bir oran ayrı ayrı ortalamaları alınarak çalışma gruplarımıza ait 7 değer için ortalamalar belirlendi.

3.4. Mikro- BT Görüntülemeleri ve İşlenmesi

Çalışmamızda Mikro-BT tarama ve ölçümler Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda bulunan Mikro- BT cihazı (SkyScan 1174, SkyScan, Aartselaar, Belgium) ile yapılmıştır. Daha sonra CTan (SkyScan, Aartselaar, Belgium) ve CTvox (SkyScan, Aartselaar, Belgium) isimli programlar ile üç boyutlu modellemeler yapılmıştır (Şekil 3.4.1.).



Şekil 3.4.1. Bir femurun üç boyutlu Mikro-BT görüntüsü.

Üç boyutlu ve iki boyutlu analizler bu programlar ile değerlendirilmiştir. Numuneler taranırken $33 \mu\text{m}$ çözünürlükte şu parametreler ile taranmıştır: 800 mA, 50 kVp, 0,7 rotation değerinde toplam 180° rotasyonda ve her görüntü için 2700 milisaniye süre ile taranmıştır. CTan programı ile doku hacmi, kemik hacmi ve yüzdelik kemik hacmi değerleri gösterilmiştir.

Çalışmamızda Mikro-BT ölçümleri ile kemiğin BV/TV (Bone volume /Total bone volume), Conn.D (Connectivity Density), Tb.Th (Trabecular thickness), Tb.Sp

(Trabecular separation), Tb.Th.SD (Trabecular thickness standart deviation), Tb.Sp.SD (Trabecular separation standart deviation) ve SMI değerleri hesaplanmıştır.

3.5. PCR Deneyleri

PCR deneyleri Süleyman Demirel niversitesi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuarında gerçekleştirilmiştir. Deney ve kontrol gruplarından alınan örnekler 1 ml RNA koruyucu solüsyon içerisine alınarak + 4 °C' de bir gün bekletilmiştir. Daha sonra rnekler RNA izolasyon aşamasına kadar -20 °C de saklanmıştır.

3.5.1. RNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol bireylere ait dokulardan RNA izolasyonu için RNeasy® Mini Kit, PureLink® marka ticari kit kullanılmıştır. RNA izolasyonu için uygulanan basamaklar aşağıdaki gibidir:

Dokular pipet yardımı ile 1,5 ml' lik tüplere yerleştirilip, üzerine 1 ml lizis zltisi, 10 µl Beta-merkaptetanol eklenerek 1-2 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homojenat 12.000 g' de iki dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Lizat 1,5 ml' lik temiz tüpe alınmış ve 45 saniye homojenize edilmiştir. Homojenat 20.000 g' de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süper natant 1,5 ml' lik RNaz tüpe alınmıştır. zerine eşit hacimde %70'lik etil alkol eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. 700 µl örnek pipet yardımıyla spin kolona alınmıştır ve 12.000 g' da 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırdıktan sonra örneğin tamamı spin kolondan geçene kadar, son üç adım tekrar edilmiştir. Spin kolona 700 µl yıkama tamponu I eklenmiş ve 12.000 g' de 15 sn oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Spin kolon temiz toplama tüpüne alındıktan sonra 500 µl yıkama tamponu II eklenmiştir. 12.000 g' de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırılmıştır. 500 µl yıkama tamponu II eklenmiştir ve 12.000 g' de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Tüpün altında toplanan sıvı uzaklaştırdıktan sonra 12.000 g' de 1-2 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon yeni toplama tüpüne alınmıştır ve üzerine 100 µl RNaz, arındırılmış su eklenerek bir dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 12.000 g' de 2 dakika santrifüj edildikten sonra RNA temiz tüpe alınarak -80 °C' de muhafaza edilmiştir.

Elde edilen RNA rneklerinin miktar tayini Nanodrop cihazı kullanılarak yapılmıştır. Stok RNA örneklerinden birer µl alınarak ölümler yapılmıştır. Örneğin, 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbsiyon değerlerine bağlı olarak, RNA

konsantrasyonları ve A260nm/ A280nm oranları belirlenmiştir. Saflık oranı 1.8- 2.0 arasında olan RNA örnekleri PCR analizlerinde kullanılmıştır.

3.5.2. cDNA Sentezi

PCR, doku veya hücrelerden izole edilen RNA' ların ters transkriptaz enzimi ile komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülmesine dayanan ve gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde, çok az miktarda RNA örneği ile çalışılabilmekte ve dokudaki gen ekspresyon miktarı tespit edilebilmektedir. Saflığından emin olunan RNA örnekleri, cDNA sentezi için her bir örnekte 0,5-1µg/ ml olacak şekilde DNaz ve RNaz'dan yoksun steril su ile dilue edilmiştir. cDNA sentezi için, cDNA sentez kiti (ThermoScientific) kullanılmıştır.

İnkübasyon sonucunda elde edilen cDNA'lar PCR analizinde kullanılmıştır. PCR analizi için, NCBI veri tabanında tanımlanan COL1A1 ve COLA2 mRNA gen dizilimleri baz alınarak gene özgü primerler dizayn edilmiştir. Ayrıca, tüm bantlarda eşit miktarda RNA miktarının bulunduğunu kanıtlamak amacıyla GAPDH (Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz) mRNA ekspresyonu düzeylerine bakılmıştır. PCR reaksiyonu, cDNA, sense ve anti-sense gene spesifik primerler, PCR tamponu, MgCl, dNTP karışımı ve Taq polimerazın (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA) varlığında her bir gene özgü olarak hazırlanan PCR programında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, %1,2'lik agoroz jel üzerinde 1x Tris-Borik asit-EDTA tamponu içerisinde yürütülerek elde edilen bantlar, kontrol bantlara kıyaslanarak değerlendirilmiştir. RT-PCR tekniği, kalitatif bir analizdir; ancak analiz sonrasında elde edilen ilgili mRNA ekspresyon bantlarının yoğunluğu Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile belirlenmiştir ve kontrol olarak kullanılmıştır. GAPDH gen ekspresyonuna ait bantların yoğunluğu ile oranlarak sonuçlar verilmiştir. Böylece sonuçta yarı-kantitatif olarak ilgili mRNA bantlarının yoğunlukları ifade edilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

Biyomekaniksel bulgular, Mikro- BT ve Raman spektroskopisi bulguların istatistiksel analizi için ANOVA test ve posthoc test olarak Bonferroni test kullanılmıştır. PCR tekniği, kalitatif bir analizdir; ancak analiz sonrasında elde edilen ilgili mRNA ekspresyon bantlarının yoğunluğu Image J (NIH, Maryland, USA) dansitometre programı ile belirlenmiştir ve kontrol olarak kullanılan GAPDH gen ekspresyonuna ait bantların

yoğunluğu ile oranlanarak sonuçlar verildiğinden sonuçlar yarı-kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen yarı-kantitatif verilerin normal dağılıma uygunlukları test edildikten sonra normal dağılıma uyan verilerde ANOVA testi kullanılarak gruplar arası farkın anlamlılığına bakılmıştır, normal dağılıma uymayan verilerde ise Kruskal Wallis testi yapılmıştır ayrıca gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu durumlarda farkı yaratan grubun saptanması için Post-hoc analizi yapılmıştır. PCR ve diğer tüm kantitatif testlerin istatistiksel analizleri için $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



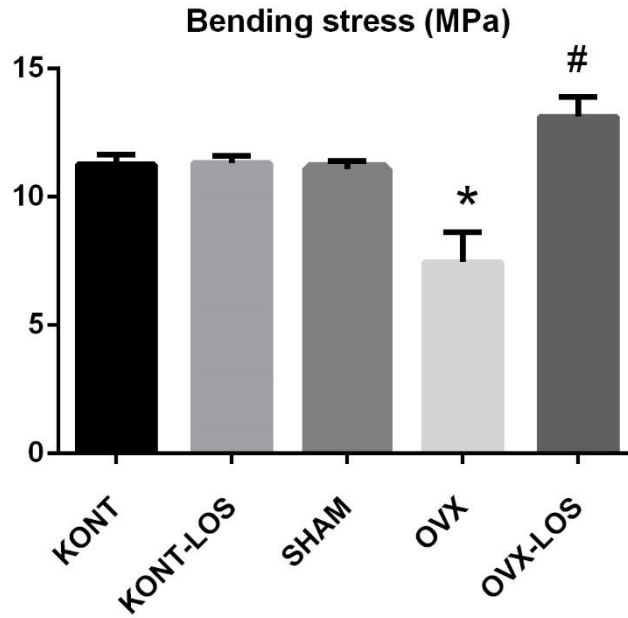
4. BULGULAR

Çalışmamızda overektomili sıçan modeli kullanılarak, anjiotensin AT1 reseptör blokörü olan Losartan'ın postmenopozal osteoporozu etkisi araştırılmıştır. Yaptığımız eğme testi bulgularına göre OVX grubunun eğme dayanımı, KONT grubundan istatistiksel olarak daha düşüktür ($p < 0.05$). Losartan ile tedavi alan OVX- LOS grubunda dayanım gücü, tedavi almayan OVX grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olarak saptanmıştır ($p < 0.05$). Overektominin ilk gününden itibaren 12 hafta süren Losartan tedavisinin Mikro- BT ölçümü sonunda elde edilen BV/TV, Conn.D, Tb.Th., Tb.Sp. değerlerine etkisi incelendiğinde OVX grubunda BV/TV ve Tb/Th ölçümlerinde KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). OVX grubunda KONT grubuna göre Tb.Sp değeri artmıştır ($p < 0.05$). Fakat BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Overektomi yapıldıktan sonra 8 haftalık Losartan tedavisinin sonucunda Yapısal Model İndeks (SMI)' te OVX grubunun SMI değerleri KONT grubundan daha düşüktür ($p < 0.05$). 8 hafta boyunca Losartan tedavisinin Losartan alan OVX- LOS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Kemikte kemik matriks kalitesi ve kolajen yapısı için v1PO4/ Amid I, v1PO4/ Amid III, v1PO4/ Pro, v1PO4/ CH2 değerleri; mineral özellikleri için 1/FWHM(v1PO4), CO3/v1PO4 değerleri; organik matriksin özellikleri için Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri ile incelendiğinde her bir değer için gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. COL1A1 ve COL1A2 genlerinin mRNA ekspresyonlarını gösteren PCR sonuçlarına göre, her iki parametre de OVX grubunda, KONT grubuna oranla azalmıştır. OVX- LOS grubunda, OVX grubuna göre iyileşme göstermiştir.

4.1. Eğme Testi Bulguları

Bütün grupların dayanım gücü (flexural strength) değerleri Şekil 4.1.1.' de verilmiştir. Eğme testinden elde edilen bulgulara göre OVX grubunun eğme dayanımı KONT grubundan istatistiksel olarak daha düşüktür ($p < 0.05$). Losartan ile tedavi alan

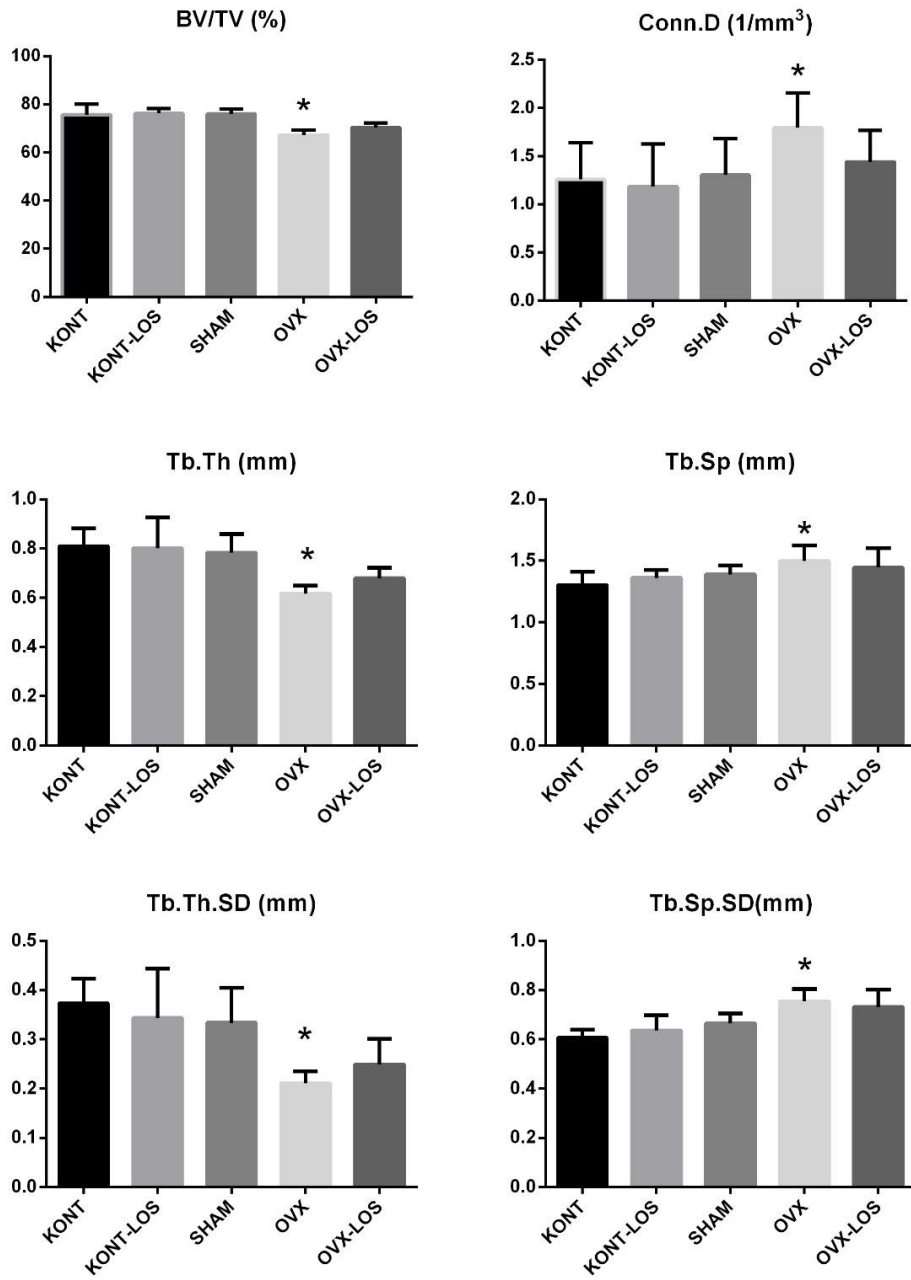
OVX- LOS grubunda dayanım gücü, tedavi almayan OVX grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlar Losartan tedavisi alan OVX- LOS grubunun kuvvet karşısında dayanımının arttığını ve kemiğin mekanik olarak güçlendiğini göstermektedir.



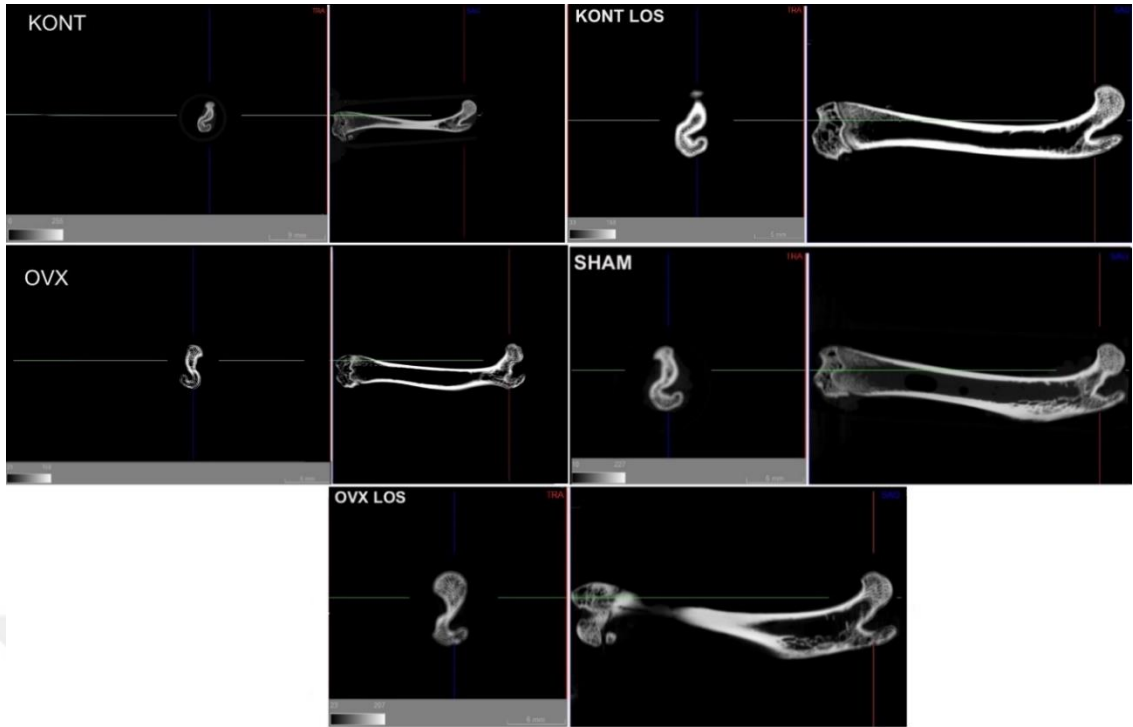
Şekil 4.1.1. Overektomi yapıldıktan sonra 8 haftalık Losartan tedavisinin sonucunda eğme (bending) stres değerlerine etkisi. OVX grubunun eğme stres değerleri KONT grubundan daha düşüktür. 8 hafta boyunca Losartan tedavisi OVX- LOS grubunun eğme stres değerlerini KONT grubu seviyesine taşımıştır. * $p<0.05$ KONT grubuna karşı ve # $p<0.05$ OVX grubuna karşı.

4.2. Mikro- BT Bulguları

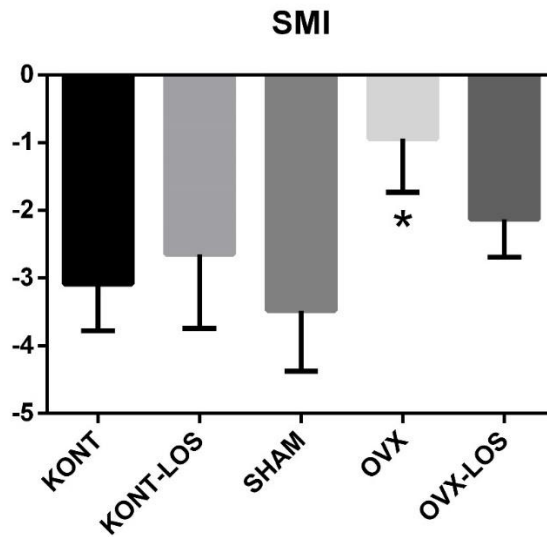
Çalışmamızda elde edilen Mikro-BT ölçümleri ile kemiğin BV/TV (Bone volume / Total bone volume), Conn.D (Connectivity density), Tb.Th (Trabecular thickness), Tb.Sp (Trabecular separation), Tb.Th.SD (Trabecular thickness standart deviation), Tb.Sp.SD (Trabecular separation standart deviation) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre osteoporozdan dolayı BV/TV ve Tb/Th ölçümlerinde KONT grubuna göre istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0.05$). Tb.Sp değeri bu grupta artmıştır ($p<0.05$). Fakat BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. Overektominin ilk gününden itibaren 12 hafta süren Losartan tedavisinin Mikro- BT ölçümleri sonunda elde edilen BV/TV, Conn.D, Tb.Th., Tb.Sp. değerlerine etkisi. OVX grubunda BV/TV ve Tb/Th ölçümlerinde KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$). OVX grubunda KONT grubuna göre Tb.Sp değeri artmıştır ($p < 0.05$) fakat BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.



Şekil 4.2.2. Deney gruplarının Mikro BT görüntüleri. Trabeküllerin değişimini sagittal kesitlerde görülmektedir. OVX grubundaki trabeküler inceltme, KONT grubuna oranla azalmıştır.

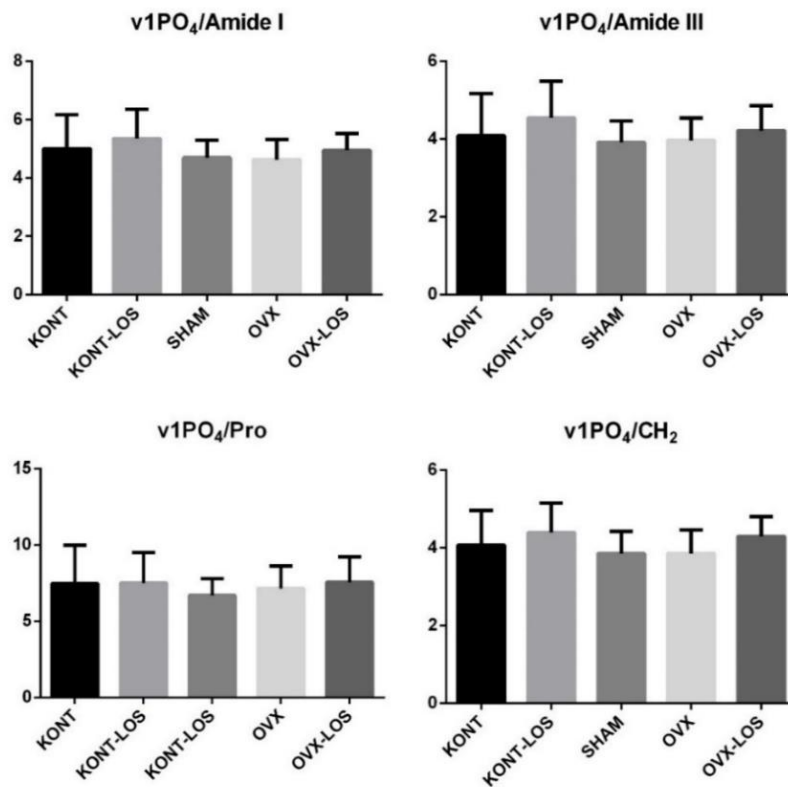


Şekil 4.2.3. Overektomi yapıldıktan 12 hafta sonra 8 haftalık Losartan tedavisinin sonunda Yapısal Model İndeks'e (SMI) etkisi. OVX grubunun SMI değerleri, KONT grubundan daha düşüktür ($p < 0.05$). Osteoporozun etkisiyle kemik dokudaki harabiyet açıkça görülmektedir. 8 hafta boyunca Losartan tedavisinin Losartan alan OVX- LOS grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastalanmamıştır. * $p < 0.05$ KONT grubuna karşı.

4.3. Raman Spektroskopisi Bulguları

Raman spektroskopisi ile dört önemli kompozisyon komponenti ve kemik kalite komponentleri ile belirlenmiştir. Bunlar Mineral- Matriks Oranı, Karbonat-Fosfat oranı, Mineral-Kristaliniti ve kolajen kalite parametreleridir. Çalışmamızda Mineral-Matriks oranı için $v1PO_4/Amid\ I$, $v1PO_4/Amid/III$, $v1PO_4/Pro$, $v1PO_4/CH_2$ değerleri; mineral özellikleri için $1/FWHM(v1PO_4)$, $CO_3/v1PO_4$ değerleri; Organik matriksin özellikleri için Hyp/Pro , $1670/1640$, $1670/1690$ değerleri kullanılmıştır.

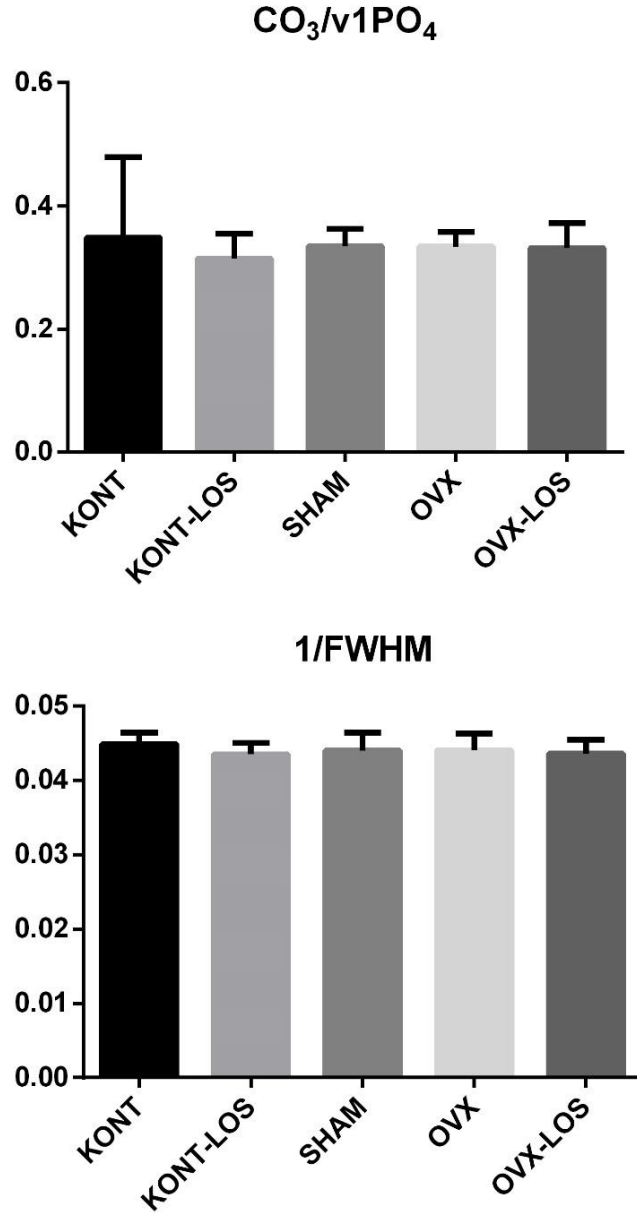
Raman analiz sonuçlarına göre $v1PO_4/Amide\ I$, $v1/PO_4/Amide\ III$, $v1PO_4/Pro$, $v1PO_4/CH_2$, $1/FWHM$, $CO_3/v1PO_4$, Hyp/Pro , $I1670/I1690$, $I1670/I1640$, $I1670/I1690$, $I1670/I1640$ değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonucun örnek sayısının az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sonuçların grafikleri şekil 4.3.1’de verilmiştir.



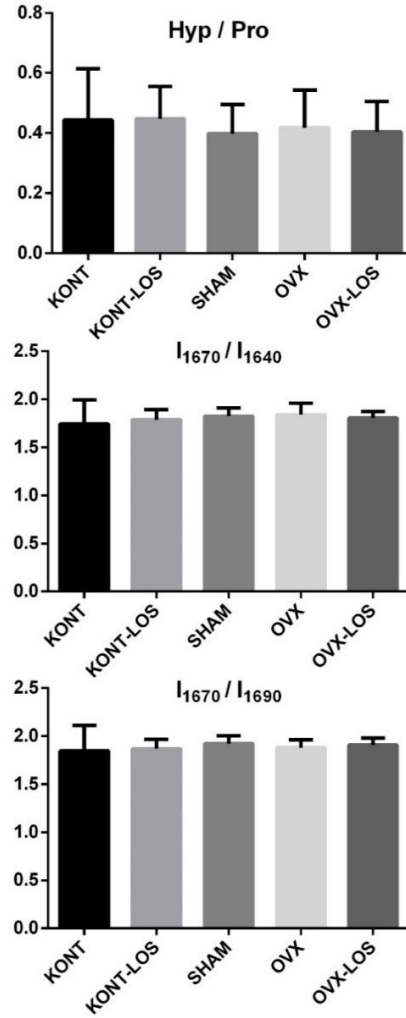
Şekil 4.3.1. Raman spektroskopisinde mineral matriks oranını belirlemek için bakılan değerler. $v1PO_4/Amid\ I$, $v1PO_4/Amid/III$, $v1PO_4/Pro$, $v1PO_4/CH_2$ değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Kemiğin mineral özellikleri için CO_3/vPO_4 ile $1/FWHM(v1PO_4)$ değerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Raman analizlerinde $CO_3/v1PO_4$ ile $1/FWHM(v1PO_4)$

değerleri incelendiğinde OVX grubunda belli bir azalma eğilimi görülmesine rağmen istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir (Şekil 4.3.2). Benzer olarak organik matrisin özellikleri için Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri ile kolajen kalitesini gösteren Amide I sub bantlarından biri olan 1670/ 1640 değeri içinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemektedir (Şekil 4.3.3).



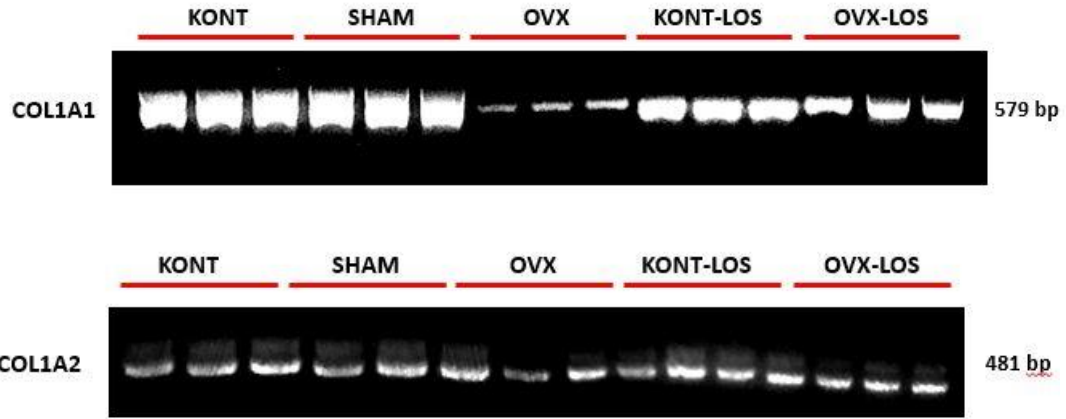
Şekil 4.3.2. Kemiğin mineral özelliklerini gösteren CO_3/ vPO_4 ile $1/FWHM$ ($v1PO_4$) değerleri. $CO_3/ v1PO_4$ değerinde ve $1/FWHM$ ($v1PO_4$) değerlerinde gruplar arası anlamlı bir fark görülmemiştir.



Şekil 4.3.3. Organik matriksin özelliklerini gösteren Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri incelenmiştir. Hyp/ Pro değeri ve 1670/ 1640 değerleri için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

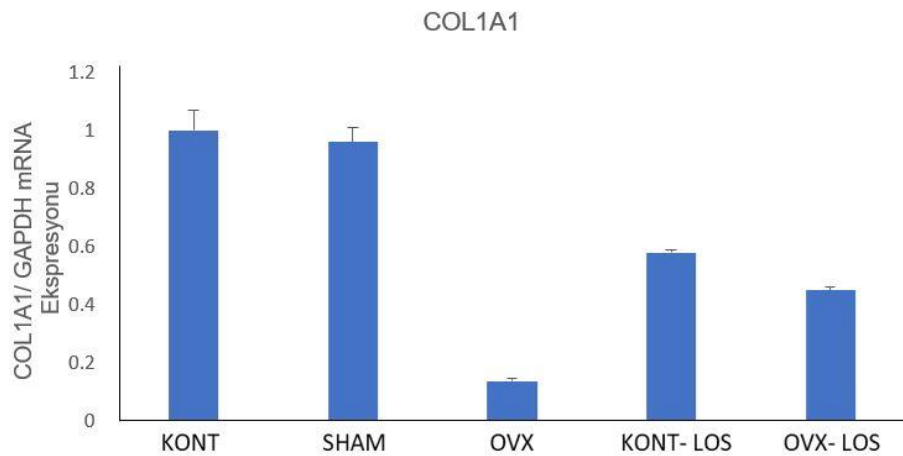
4.4. PCR Bulguları

PCR deneyleri ile kemikte tip I kolajenin sentezlenmesinden sorumlu olan COL1A1 ve COL1A2 alel genlerinin mRNA ekspresyonlarını bant görüntüsü Şekil 4.4.1.'de verilmiştir. COL1A1 ve COL1A2 nin mRNA ekspresyonu gösteren sonuçlar GAPDH'a oranlanmıştır ve KONT grubu 1 alınarak, diğer grupların değerleri KONT grubunun katı olarak hesaplanmıştır. Bu değerlendirme sonucundaki değerlerin grafikleri ise COL1A1 için Şekil 4.4.2.'de ve COL1A2 için Şekil 4.4.3.'te verilmiştir.



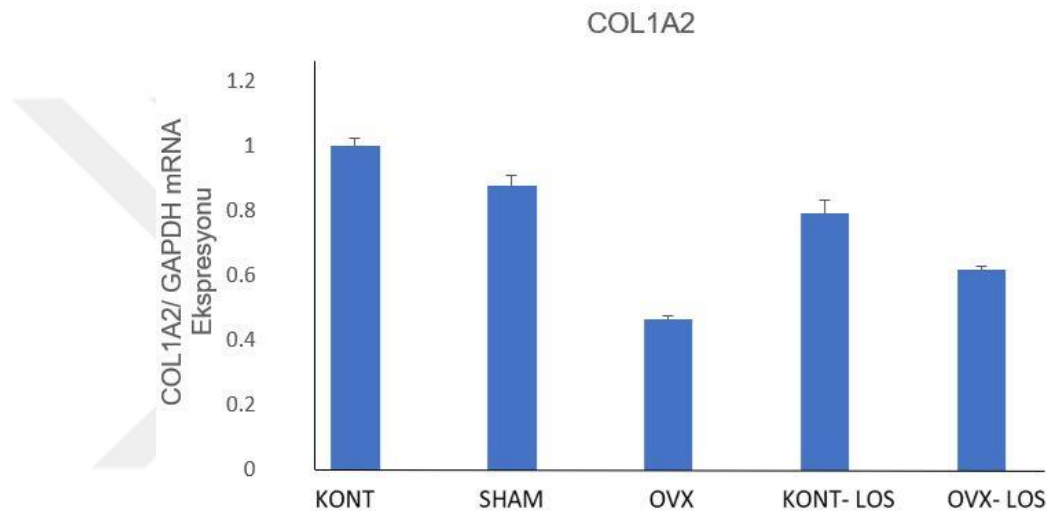
Şekil 4.4.1. Overektomi yapıldıktan 12 hafta sonra kolajen miktarını belirlemek için bakılan COL1A1 ve COL1A2'nin ekspresyonlarını gösteren bantların görüntüsü. OVX grubunun ekspresyonlarını gösteren bantlarda, KONT grubuna göre azalma görülmektedir. OVX grubunun COL1A1 ekspresyonu KONT grubundan daha düşüktür. 8 hafta boyunca Losartan tedavisi alan OVX- LOS grubunda, OVX grubuna kıyasla COL1A1 ekspresyonu artmıştır. COL1A2 geninin mRNA ekspresyonuna ait bantlar incelendiğinde, OVX grubunun bantları, KONT grubuna göre azalmıştır. OVX ve OVX- LOS grubu arasındaki bantlarda belirgin bir fark görülmemektedir.

Tip1 kolajenin sentezlenmesinden sorumlu diğer alel gen olan COL1A1'in mRNA ekspresyonunun gruplar arası değişimi Şekil 4.4.2' de verilmiştir. Bu yarı kantitatif değerlendirmede OVX grubunda COL1A1'in mRNA ekspresyonu KONT grubuna göre azalmıştır. OVX grubundaki kolajen harabiyeti ise açıkça görülmektedir. Tedavi alan OVX- LOS grubunda OVX grubuna göre tip I kolajen miktarında artış olduğu ve COL1A1 geninin mRNA ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Uygulanan Losartan tedavisinin osteoporozun etkisiyle kolajen kalitesinde meydana gelen bozulmalarda bir iyileşme sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.4.2. Tip 1 kolajenin sentezlenmesinden sorumlu olan COL1A1'in mRNA ekspresyonunun gruplar arasındaki değişimi.

Tip1 kolajenin sentezlenmesinden sorumlu diğer alel gen olan COL1A2'nin mRNA ekspresyonunun gruplar arası değişimi Şekil 4.4.3'te gösterilmiştir. COL1A2'in mRNA ekspresyon sonuçlarının, GAPDH'a oranlanmış ve KONT grubunun değeri 1 olacak şekilde, diğer gruplar KONT grubunun katı olarak verilmiştir. Bu yarı kantitatif değerlendirmede OVX grubunda COL1A2'nin mRNA ekspresyonu KONT grubuna göre azalmıştır. OVX grubundaki kolajen harabiyeti açıkça görülmektedir. Tedavi alan OVX-LOS grubunda, tip I kolajen dokunun içeriğindeki azalmanın belirgin şekilde görüldüğü OVX grubuna göre COL1A2 geninin mRNA ekspresyonu artmıştır. Bu da uygulanan Losartan tedavisinin osteoporozun etkisiyle kolajen kalitesinde meydana gelen bozulmalarda iyileşme görülmüştür.



Şekil 4.4.3. Tip 1 kolajenin sentezlenmesinden sorumlu diğer alel gen olan COL1A2'nin mRNA ekspresyonunun gruplar arası değişimi.

5. TARTIŞMA

Literatürde overektomili sıçan modeli, insanda postmenopozal osteoporozun kliniğini göstermek için geçerli olduğu kanıtlanmıştır (Kharode, Sharp vd 2008, Johnston ve Ward 2015). Çalışmamızda overektomili sıçan modeli kullanılarak, Anjiotensin AT1 reseptör blokörü olan Losartan'ın postmenopozal osteoporozu etkisi araştırılmıştır. Yaptığımız eğme testi bulgularına göre OVX grubunun eğme dayanımı, KONT grubundan istatistiksel olarak daha düşüktür ($p<0.05$). Losartan ile tedavi alan OVX- LOS grubunda dayanım gücü, tedavi almayan OVX grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek olarak saptanmıştır ($p<0.05$). Overektominin ilk gününden itibaren sekiz hafta süren Losartan tedavisinin Mikro- BT ölçümü sonunda elde edilen BV/TV, Conn.D, Tb.Th., Tb.Sp. değerlerine etkisi incelendiğinde OVX grubunda BV/TV ve Tb.Th ölçümlerinde KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). OVX grubunda KONT grubuna göre Tb.Sp değeri artmıştır ($p<0.05$). Fakat BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Overektominin ilk gününden itibaren sekiz hafta süren Losartan tedavisinin Mikro- BT ölçümü sonunda elde edilen BV/TV, Conn.D, Tb.Th., Tb.Sp. değerlerine etkisi incelendiğinde OVX grubunda BV/TV ve Tb.Th ölçümlerinde KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$). OVX grubunda KONT grubuna göre Tb.Sp değeri artmıştır ($p<0.05$). Fakat BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Overektomi yapıldıktan 12 hafta sonra 8 haftalık Losartan tedavisinin sonucunda Yapısal Model Index' de (SMI) grubunun SMI değerleri KONT grubundan daha düşüktür ($p<0.05$). Kemikte kemik matriks kalitesi ve kollajen yapısı v1PO4/ Amid I, v1PO4/ Amid/III, v1PO4/ Pro, v1PO4/ CH2 değerleri; mineral özellikleri için 1/FWHM(v1PO4), CO3/v1PO4 değerleri, organik matriksin özellikleri için Hyp/ Pro, 1670/ 1640, 1670/ 1690 değerleri incelendiğinde her bir değer için gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Kemiğin mekanik özellikleri, kemiğin fonksiyon ve yapısını yansıtan temel parametreler olarak kabul edilir (An ve Friedman, 1999). Biyomekanik testler bir kemiğin kuvvet karşısındaki dayanım gücünü, çeşitli patolojik durumlarda kemikte ne tür yapısal değişiklikler olduğunu, hangi tedavilerin ne tarzda ve kombinasyonda uygulanması gerektiği konularında bilgi verir (Gökçe-Kutsal 2004). Kemik biyomekaniği kapsamında

esas olarak kemik kırılabilirliği veya kırılabilirliği değerlendirilir. Kemiğin kırılması için birim alana düşen kuvvet hesaplanarak kemiğin gerçek dayanıklılığı ortaya konulur. Sonuç olarak, kemiğin geometrisi (organ düzeyinde) değerlendirilirken kuvvet-yük (force), şekil değiştirme (deformation), katılık (stiffness), enerji absorblaması (work to failure) hesaplanırken, doku düzeyinde dayanım (strenght), gerilme (stress), gerinme (strain), elastik modül (elastic modulus), tokluk (toughness) değerleri belirlenir (Turner 2002). Normalde uzun kemikler in-vivo şartlarda mekanik eksenlerindeki eğim nedeniyle genellikle eğme kuvvetlerine maruz kalırlar. Bu nedenle uzun kemiklere ilişkin biyomekanik çalışmalarda üç noktalı eğme testi çok sık kullanılır (An vd 2000). Çalışmamızda overektomili sıçanlara verilen Losartan tedavisinin kemik dokuda yarattığı değişimleri ortaya koymak için üç noktalı eğme testi yapılmıştır.

Kemiğin yapısal özellikleri ekstrinsik biyomekanik özellikler olarak tanımlanırken, kemiğin doku düzeyindeki özellikleri ise intrinsik özellikler olarak tanımlanır (Turner 2002). Kemik kırılabilirliğinin tedavisinde hedef sadece ekstrinsik biyomekanik özellikleri iyileştirmek değil, aynı zamanda aşamalı olarak intrinsik özellikleri de korumak olmalıdır (Burr 2002, Turner 2002, Robling, Castillo vd 2006). Çalışmamızda osteoporozun kemik dokuda meydana getirdiği hasarı ve Losartan tedavisinin bu hasar üzerindeki olumlu etkilerini koymak için üç noktalı eğme testi uygulanmıştır. Overektomi sonrası tedavi almayan OVX grubunda kuvvet dayanımı, KONT grubunun değerine oranla istatistiksel olarak daha düşük olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla osteoporozlu sıçan femurlarında sağlıklı KONT grubuna oranla kırığa daha yatkın ve mekanik olarak daha zayıf olduğu görülmektedir. Bu da bize osteoporozun yıkıcı etkilerini biyomekanik düzeyde göstermektedir. Buna ek olarak tedavi alan OVX- LOS grubunun kuvvet dayanımı değerinin de, OVX grubuna oranla istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmektedir. Eğme testinde Losartan tedavisi alan grubun kuvvet karşısındaki dayanımı artmıştır (Şekil 4.1.1.). Bu sonuçlar Losartan tedavisinin, kemiğin biyomekaniksel özelliklerinde iyileşme sağladığını ve kemiğin kuvvet karşısında dayanımını arttırdığını göstermektedir.

Kemik kaybına bağlı kırıklarda etkili olan temel faktörlerden bir diğeri de kemik mikromimarisindeki bozulmalardır. Dolayısıyla kemik kaybının önlenmesi için kemik matriks özelliklerinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Kemik matriksi iki farklı bileşene sahiptir. Mineral fazı kemiğe katılık kazandırırken, kolajen fibriller ise kemiğe esneklik sağlar (Saito ve Marumo 2010). Kemiğin strese karşı dirençli olmasını sağlayan unsurlar arasında, kemik matriksinin mineralizasyon derecesi ve kemikteki mikro-hasar miktarı önemli yer tutar (Saito ve Marumo 2010, Smith, Gardiner vd 2012). Bununla birlikte osteoporozda meydana gelen kırıkların nedeni, sadece kemik kütlesinin azalması değil, aynı zamanda organizasyon yeteneğini kaybetmiş trabeküllerin geometrisinin bozulmasıdır (Feng ve McDonald 2011, Amizuka 2016). Birçok çalışmada bu trabeküller

yapıların osteoporozla bozulduğu ve bunun da kemiğin hacmini etkileyerek kırık riskini arttırdığı gösterilmiştir (McNamara ve Prendergast 2005, Mulvihill, McNamara vd 2008, Brennan, Gleeson vd 2011, Donmez, Ozdemir vd 2012).

Çalışmamızdan elde edilen Mikro-BT sonuçlarına göre, OVX grubunun BV/TV ve Tb/Th değerleri, KONT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. Artmış BV/TV değeri osteoblastlar tarafından artmış kemik formasyonu, osteoklastlar tarafından kemik rezorbsiyonunu suprese etmesi ile ya da her iki mekanizmanın etkileşimi ile meydana gelmektedir. Buna ek olarak Tb. Sp değeri OVX grubunda artmıştır. Bu sonuçlar literatür ile uyumlu olup, osteoporozun kemik üzerindeki yıkıcı etkisini açıkça göstermektedir. Fakat BV/ TV, Tb. Th, Tb. Sp değerlerinde, diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır.

Kemiğin yapısal indeksi olan SMI değeri OVX grubunda KONT grubuna göre daha düşüktür. Sekiz hafta boyunca Losartan tedavisi alan OVX- LOS grubu ile OVX grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. OVX grubunda BV/TV ve Tb/Th ölçümlerinde KONT grubuna göre azalmıştır. OVX grubunda KONT grubuna göre Tb.Sp değeri artmıştır. Trabeküler ayrılmaların artması overektomi sonrası gelişen osteoporozun neden olduğu harabiyetin belirgin hale geldiğini göstermektedir.

AT1 reseptörünün bloke edildiği fareler üzerinde yapılan bir çalışmada BV/ TV değerinin yükseldiği ama apendiküler iskeletteki kortikal kemiği değiştirmediği gösterilmiştir (Kaneko, Ito vd 2011). Çalışmamızda OVX ve OVX- LOS grupları karşılaştırıldığında BV/ TV değerinde anlamlı bir fark olmaması bu veriyi doğrular niteliktedir. Fakat BV/ TV, Tb.Th, Tb.Sp değerlerinde OVX- LOS ve OVX grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Dolayısıyla sekiz haftalık Losartan tedavisinin, kemik üzerinde belirgin bir etkisi saptanmamıştır. Bu durumun overektomi sonrasındaki on iki hafta boyunca kemik mikro-mimarisinde meydana gelen bozulmanın tedavisi için, sekiz haftalık akut Losartan tedavisinin yeterli olmamasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Kemik kaybına bağlı kırıklarda diğer etkili faktör ise kemik matriksindeki kolajen fibrillerin yapısıdır. Kemik matriksinin büyük bir kısmını oluşturan tip 1 kolajen, COL1A1 geni tarafından sentezlenir (Bonucci 2012). Bu yüzden kolajen sentezini düzenleyen genlerin içerisinde, özellikle COL1A1 geni önemli rol oynar (Efstathiadou, Tsatsoulis vd 2001, Mann, Hobson vd 2001). COL1A1 geninin kemik matriksi ile ilişkisi gösteren pek çok çalışma mevcuttur (Mann, Hobson vd 2001, Garcia-Giralt, Nogués vd 2002, Tran, Nguyen vd 2009, Lindahl, Barnes vd 2011, Boskey, Verdelis vd 2013, Jacobsen, Schwartz vd 2016). Yapılan bir çalışmada kemik kolajenini etkileyen patolojilerin, kırık riski ile de ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Bouxsein 2005). Yine başka bir çalışmada COL1A1'in kırık riski üzerindeki etkisinin kırığın prognozunda etkili olduğu gösterilmiştir

(Tran, Nguyen vd 2009). Öte yandan COL1A1 geninin lumbal omurlar ve femur boynundaki BMD ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Garcia-Giralt, Nogués vd 2002). Osteoporoz, kemik dokuda tip I kollajen miktarında genel bir azalma ile ilişkilidir (Brennan, Kuliwaba vd 2012). Çalışmamızda OVX ve KONT grubu karşılaştırıldığında COL1A1 geninin ekspresyonunun OVX grubunda azalmıştır. Bununla beraber Losartan tedavisi alan OVX- LOS grubundaki COL1A1 geninin ekspresyonu, OVX grubuna göre daha yüksektir. Bu da osteoporozun etkisiyle azalmış kolajen miktarının, AT1 reseptör blokörü Losartan sayesinde arttığını göstermektedir.

Kemik kalitesi terimi çoğunlukla kemik dokunun kompozisyonunu ve mimarisini ifade eder. Bu iki özellik kemik dokunun mekanik fonksiyonlarını gerçekleştirebilme yeteneğini ve içerisindeki materyalin özelliklerini belirler. Dolayısıyla çalışmamızda Raman spektroskopisi ile, bu özellikler dört önemli kompozisyon komponenti ve kemik kalite komponentleri aracılığıyla belirlenmiştir. Mineral- Matriks Oranı, Karbonat-Fosfat oranı, Mineral-Kristalinite ve kollajen kalite parametrelerinin analizleri yapılmıştır. Çalışmamızda Mineral-Matriks oranı için $v1PO4/$ Amid I, $v1PO4/$ Amid/III, $v1PO4/$ Pro, $v1PO4/$ CH₂ değerleri, mineral özellikleri için $1/FWHM(v1PO4)$, $CO3/v1PO4$ değerleri, organik matriksin özellikleri için Hyp/ Pro, I_{1670}/I_{1640} , I_{1670}/I_{1690} değerleri kullanılmıştır. Her bir oran ayrı ayrı analiz edilmiş fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Kolajen miktarı kadar, kolajenin üç boyutlu helikal yapısı da osteoporozla bağlı kırık riski ile ilişkilidir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, kemikteki enzimatik ve enzimatik olmayan kollajen çapraz bağlantıların, kemiğin sadece mineralizasyonunu değil, aynı zamanda kemikte meydana gelen mikro-hasar oluşumunu da etkilediği gösterilmiştir (Tye, Rattray vd 2003, Huilaja, Hurskainen vd 2009, Saito ve Marumo 2010). Tip I kolajendeki kovalent çapraz bağlantılar, kemiğin biyolojik ve mekanik özelliklerini belirler (Burr 2002, Feng 2009, Morgan, Unnikrisnan vd 2018). Kolajen çapraz bağlantılar, lisil-hidroksilaz ve lisil-oksidad bağlantılı gelişmemiş ikili çapraz bağlantılar, gelişmiş üçlü (pridinolin ve pirolin) çapraz bağlantılar ile glisinasyon veya oksidasyona bağlı enzimatik olmayan çapraz bağlar olmak üzere kendi içinde ayrılır (Saito ve Marumo 2010, Burr 2019). Osteoporotik hastalardaki kollajen yapısında herhangi bir değişim, çapraz bağlantıların stabilizasyonu ve kemiğin mekanik özelliklerinde değişikliklerle sonuçlanabilir (Bailey, Wotton vd 1992). Çalışmamızda Raman spektroskopisi ile organik matrikste kollajen kalitesini göstermek için I_{1670}/I_{1640} ve I_{1670}/I_{1690} değerleri hesaplanmıştır. Kolajendeki kovalent çapraz bağların sağlamlığı ile ilişkili olan I_{1670}/I_{1640} değeri için OVX grubu ve KONT grubu arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Losartan tedavisi alan OVX- LOS ve OVX grubu karşılaştırıldığında, I_{1670}/I_{1640} değerinde anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 4.5.3). Bu bulgular osteoporozun, overektomi

sonrası 20 haftalık dönemde kolajen dokuda belirgin bir harabiyet meydana getirmediğini göstermektedir. 1670/ 1690 değeri ise kollajenin helikal şekli, dolayısıyla kollajen kalitesi hakkında bilgi verir. Çalışmamızdaki 1670/ 1690 değeri için ise gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.3.3).

Yapılan klinik çalışmalarda Tiyazid grubu diüretikler gibi antihipertansif ilaçlar renal kalsiyum atılımını azaltarak kalça kırık riskini azaltmaktadır (Reid, Ames vd 2000, Xiao, Xu vd 2018). Yine Tiyazid'in kemik kaybına etkisini inceleyen bir çalışmada, kemiğin daha uzun ömürlü hale geldiği kaydedilmiştir (Barzilay, Davis vd 2017). Diğer antihipertansif ilaçlar (B-blokörler ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) blokörleri) da düşük kırık riski ile ilişkilidir (Schlienger, Kraenzlin vd 2004). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada üç yıldan fazla olmak şartıyla, uzun süreli ACE inhibitörleri ile ARB kullanımının kemikte kırık riskini azalttığı gösterilmiştir (Carbone, Vasan vd 2019).

Daha önceki klinik çalışmalarda ACE inhibitörlerinin, kırık riskini azalttığı ya da kemik metabolizmasını geliştirmesine yararı olduğunu da gösterilmiştir (Shimizu, Nakagami vd 2008, Butt, Mamdani vd 2014). Ang (1-7) içerisinde yer alan Losartan'ın, Mas reseptörü aracılığıyla kemik kaybını önlediği bulunmuştur (Abuhashish, Ahmed vd 2017). Yapılan birçok hayvan temelli çalışmalarda Anjiotensin AT1 reseptör blokörü ile ilişkili Ang II sinyalinin kemik yapım ve yıkımını düzenlediğini gösterilmiştir (Shimizu, Nakagami vd 2008, Donmez, Ozdemir vd 2012, Chen, Grover vd 2015). AT1 reseptörünün fonksiyonel kaybı, yaşa bağlı ve overektomili (OVX) osteoporotik fare modelleri ile yapılan çalışmalarda kemik kaybını önlediği bildirilmiştir (Shimizu, Nakagami vd 2008, Asaba, Ito vd 2009). Birçok in-vivo çalışmada kemikteki Ang II sinyalinin, OVX kaynaklı kemik kaybına karşı koruduğu gösterilmiştir (Chen, Grover vd 2015). Çalışmamızda AT1 reseptör blokörünün kemikte belirgin bir değişiklik meydana getirmediği gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, AT1 reseptör blokörü olarak kullanılan Losartan üzerine yapılan çalışmalarda kemik kütlesini etkilemediği rapor edilmiştir (Broulík, Tesar vd 2001). Bu farklılıklar, Ang II (ligand) nin her kemik dokuda farklı konsantrasyonlarda bulunmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Bununla beraber Shimuzu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Ang II önemli derecede TRAP-pozitif multinuklear osteoklastları arttırdığı ve artmış osteoklast aktivasyonu sonucunda osteoporozu hızlandırdığı belirlenmiştir. Ang II tip 1 reseptör blokörlerinden olmesartanın bu aktivasyonu azaltabileceği öngörülmüştür (Shimizu, Nakagami vd 2008).

Ang 1-7 reseptör blokörü olarak kullanılan Losartan, valsartan ve telmisartan gibi ilaçlar hipertansiyon ve hipertansiyon ile ilişkili komorbiditelerde yardımcı olabilmektedir. Fakat doğrudan kemik iyileşmesine üzerine etkisi tartışmalıdır. Yapılan in-vivo çalışmalarda ise renin, ACE inhibitörleri ve ANG II gibi RAS komponentleri kemiğin lokal bir bölgesinden eksprese edildiği gösterilmiştir (Abuhashish, Ahmed vd

2017). Diğer bir in-vitro çalışmada ise yeni doğmuş fare kalvaryasından köken alan primer osteoblastlarda ANG II'nin ekspresyonunda artma gözlenmiştir. Kemikte bulunan lokal RAS, yaşlanmış farede yaşa-bağımlı osteoporozu meydana getirmiştir ve farenin kemik yapısında bozulmalar meydana gelmiştir (Kato, Boskey vd 2001). Bu bozulmalar angiotensin reseptör blokajı ile önlenebileceği düşünülmektedir. Ancak yapılan bazı çalışmalarda hipertansiyon tedavisinde kullanılan Losartan'ın, kemiğin mineral yoğunluğunda, mineral içeriğinde ve femurlarda değişiklikler görülmemiştir (Broulik, Tesar vd 2001). Telmisartan ve Losartan ile tedavi edilen tip 1 hipertansif hastalarda kemik belirteçlerinde iyileşme gözlemlenmemiştir (Aydogan, Erarslan vd 2019). Literatürde ortaya koyulan bu veriler ile sonuçlarımız uyumludur.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada Anjiotensin Tip I reseptör blokajının osteoporotik kemik doku üzerine etkileri araştırılmıştır. Osteoporoz etkisiyle kemik dokuda meydana gelen biyomekaniksel değişiklikler üç nokta eğme testi ile, histokimyasal değişiklikler PCR, Raman spektroskopisi ve Mikro-BT yöntemleri ile ölçülmüştür.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre overektomi yapıldıktan sonraki 8 haftalık Losartan tedavisi sürecinde, Losartan osteoporozu önlemese de mekanik parametrelerde iyileşme sağlamıştır. Raman spektroskopisi sonuçlarımıza göre, 8 haftalık Losartan tedavisinin osteoporozda mineralize kemik kalitesinde değişiklik meydana getirmediği görülmüştür. Buna karşın, PCR sonuçlarımızda tedavi alan osteoporozlu kemikteki tip I kollajenin miktarında artma meydana geldiği gözlemlenmiştir.

12 haftalık sürenin sonunda verilen 8 haftalık Losartan tedavisi, yani AT1 reseptör blokajının, osteoporozun zararlı etkilerini ortadan kaldırmada yeterli olmadığını göstermektedir. Deney gruplarında Losartan tedavisinin kuvvet dayanımını ve kolajen miktarını arttırsa da, kemik mineral ve kolajen kalitesinde değişiklik meydana getirmediği görülmüştür.

Sonuç olarak AT1 reseptör blokajının osteoporozun gelişmesini engellemediği ve kısa süreli tedavide osteoporoz bağlı gelişen kemik deformasyonunda iyileşme sağlamadığı gösterilmiştir. Osteoporoz ve buna bağlı olarak gelişen kırıkların tedavisinde AT1 reseptör blokörlerinin tedavide kullanımına yönelik uzun dönem tedavilerine yönelik ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

Abuhashish, H. M., M. M. Ahmed, D. Sabry, M. M. Khattab and S. S. Al-Rejaie (2017). "Angiotensin (1-7) ameliorates the structural and biochemical alterations of ovariectomy-induced osteoporosis in rats via activation of ACE-2/Mas receptor axis." **Sci Rep** 7(1): 2293.

Adams, J. E. (2015). *Musculoskeletal Imaging*. H. L. B. Thomas Pope, Javier Beltran, William B. Morrison, David John Wilson. John F. Kennedy Blvd., Ste 1800, Philadelphia, PA 19103-2899, **Elsevier Saunders**: 874.

Albrektsson, T. (1980). "Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit." **Scand J Plast Reconstr Surg** 14(1): 1-12.

Allen, M. R. and D. B. Burr (2014). *Bone Modeling and Remodeling. Basic and Applied Bone Biology*: 75-90.

Allen, M. R., J. M. Hock and D. B. Burr (2004). "Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies." **Bone** 35(5): 1003-1012.

Amizuka, N. (2016). "1. Morphological Implication on Cellular Response to Mechanical Stress in Bone." **J Orthop Trauma** 30(8): S2.

Armas, L. A. and R. R. Recker (2012). "Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights." **Endocrinol Metab Clin North Am** 41(3): 475-486.

Asaba, Y., M. Ito, T. Fumoto, K. Watanabe, R. Fukuhara, S. Takeshita, Y. Nimura, J. Ishida, A. Fukamizu and K. Ikeda (2009). "Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension." **J Bone Miner Res** 24(2): 241-250.

Ascenzi, M. G. and A. K. Roe (2012). "The osteon: the micromechanical unit of compact bone." **Front Biosci (Landmark Ed)** 17: 1551-1581.

Aydogan, B. I., E. Erarslan, U. Unluturk and S. Gullu (2019). "Effects of telmisartan and losartan treatments on bone turnover markers in patients with newly diagnosed stage I hypertension." **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst** 20(3): 1470320319862741.

Bailey, A. J., T. J. Sims, E. N. Ebbesen, J. P. Mansell, J. S. Thomsen and L. Mosekilde (1999). "Age-related changes in the biochemical properties of human cancellous bone collagen: relationship to bone strength." **Calcif Tissue Int** 65(3): 203-210.

Bailey, A. J., S. F. Wotton, T. J. Sims and P. W. Thompson (1992). "Post-translational modifications in the collagen of human osteoporotic femoral head." **Biochem Biophys Res Commun** 185(3): 801-805.

Bala, Y., R. Zebaze and E. Seeman (2015). "Role of cortical bone in bone fragility." **Curr Opin Rheumatol** 27(4): 406-413.

Barzilay, J. I., B. R. Davis, S. L. Pressel, A. Ghosh, R. Puttnam, K. L. Margolis and P. K. Whelton (2017). "The Impact of Antihypertensive Medications on Bone Mineral Density and Fracture Risk." ***Curr Cardiol Rep*** 19(9): 76.

Bergholt, M. S., A. Serio and M. B. Albro (2019). "Raman Spectroscopy: Guiding Light for the Extracellular Matrix." ***Front Bioeng Biotechnol*** 7: 303.

Boivin, G., Y. Bala, A. Doublier, D. Farlay, L. G. Ste-Marie, P. J. Meunier and P. D. Delmas (2008). "The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients." ***Bone*** 43(3): 532-538.

Bonucci, E. (2012). "Bone mineralization." ***Front Biosci (Landmark Ed)*** 17: 100-128.

Boskey, A. L. (1990). "Bone mineral and matrix. Are they altered in osteoporosis?" ***Orthop Clin North Am*** 21(1): 19-29.

Boskey, A. L. (2006). "Assessment of bone mineral and matrix using backscatter electron imaging and FTIR imaging." ***Curr Osteoporos Rep*** 4(2): 71-75.

Boskey, A. L. (2013). "Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects." ***Bonekey Rep*** 2: 447.

Boskey, A. L., J. Marino, L. Spevak, N. Pleshko, S. Doty, E. M. Carter and C. L. Raggio (2015). "Are Changes in Composition in Response to Treatment of a Mouse Model of Osteogenesis Imperfecta Sex-dependent?" ***Clin Orthop Relat Res*** 473(8): 2587-2598.

Boskey, A. L. and A. S. Posner (1984). "Bone structure, composition, and mineralization." ***Orthop Clin North Am*** 15(4): 597-612.

Boudin, E. and W. Van Hul (2017). "MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Genetics of human bone formation." ***Eur J Endocrinol*** 177(2): R69-R83.

Bouxsein, M. L. (2005). "Determinants of skeletal fragility." ***Best Pract Res Clin Rheumatol*** 19(6): 897-911.

Brennan, M. A., J. P. Gleeson, M. Browne, F. J. O'Brien, P. J. Thurner and L. M. McNamara (2011). "Site specific increase in heterogeneity of trabecular bone tissue mineral during oestrogen deficiency." ***Eur Cell Mater*** 21: 396-406.

Brennan, O., J. S. Kuliwaba, T. C. Lee, I. H. Parkinson, N. L. Fazzalari, L. M. McNamara and F. J. O'Brien (2012). "Temporal changes in bone composition, architecture, and strength following estrogen deficiency in osteoporosis." ***Calcif Tissue Int*** 91(6): 440-449.

Broulík, P. D., V. Tesar, T. Zima and M. Jirsa (2001). "Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats." ***Physiol Res*** 50(4): 353-358.

Buchwald, T., K. Niciejewski, M. Kozielski, M. Szybowicz, M. Siatkowski and H. Krauss (2012). "Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy." ***J Biomed Opt*** 17(1): 017007.

Buck, D. W., 2nd and G. A. Dumanian (2012). "Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals." ***Plast Reconstr Surg*** 129(6): 1314-1320.

Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper and R. Recker (1996). "Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization." *Instr Course Lect* 45: 371-386.

Buckwalter, J. A., M. J. Glimcher, R. R. Cooper and R. Recker (1996). "Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function." *Instr Course Lect* 45: 387-399.

Burr, D. B. (2002). "The contribution of the organic matrix to bone's material properties." *Bone* 31(1): 8-11.

Burr, D. B. (2019). "Changes in bone matrix properties with aging." *Bone* 120: 85-93.

Butler, H. J., L. Ashton, B. Bird, G. Cinque, K. Curtis, J. Dorney, K. Esmonde-White, N. J. Fullwood, B. Gardner, P. L. Martin-Hirsch, M. J. Walsh, M. R. McAinsh, N. Stone and F. L. Martin (2016). "Using Raman spectroscopy to characterize biological materials." *Nat Protoc* 11(4): 664-687.

Butt, D. A., M. Mamdani, T. Gomes, L. Lix, H. Lu and K. Tu (2014). "Risk of Osteoporotic Fractures With Angiotensin II Receptor Blockers Versus Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors in Hypertensive Community-Dwelling Elderly." *J Bone Miner Res* 29(11): 2483-2488.

Calvo, M. S., D. R. Eyre and C. M. Gundberg (1996). "Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover." *Endocr Rev* 17(4): 333-368.

Carbone, L. D., S. Vasan, R. L. Prentice, G. Harshfield, B. Haring, J. A. Cauley and K. C. Johnson (2019). "The renin-angiotensin aldosterone system and osteoporosis: findings from the Women's Health Initiative." *Osteoporos Int* 30(10): 2039-2056.

Carter, D. R. and W. C. Hayes (1976). "Bone compressive strength: the influence of density and strain rate." *Science* 194(4270): 1174-1176.

Chapurlat, R. D. and H. K. Genant (2016). Osteoporosis. *Endocrinology: Adult and Pediatric*: 1184-1213.e1186.

Chen, J. L., W. Yao, H. M. Frost, C. Y. Li, R. B. Setterberg and W. S. Jee (2001). "Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effect on bone formation in sham and ovariectomized rats." *Bone* 29(2): 126-133.

Chen, S., M. Grover, T. Sibai, J. Black, N. Rianon, A. Rajagopal, E. Munivez, T. Bertin, B. Dawson, Y. Chen, M. M. Jiang, B. Lee, T. Yang and Y. Bae (2015). "Losartan increases bone mass and accelerates chondrocyte hypertrophy in developing skeleton." *Mol Genet Metab* 115(1): 53-60.

Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3: S131-139.

Coughlan, T. and F. Dockery (2014). "Osteoporosis and fracture risk in older people." *Clin Med (Lond)* 14(2): 187-191.

Croucher, P. I., N. J. Garrahan and J. E. Compston (1994). "Structural mechanisms of trabecular bone loss in primary osteoporosis: specific disease mechanism or early ageing?" *Bone Miner* 25(2): 111-121.

Cymet, T. C., B. Wood and N. Orbach (2000). "Osteoporosis." *J Am Osteopath Assoc* 100(10 Su Pt 1): S9-15.

De Witte, T. M., L. E. Fratila-Apachitei, A. A. Zadpoor and N. A. Peppas (2018). "Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices." *Regen Biomater* 5(4): 197-211.

Delaney, M. F. (2006). "Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause." *Am J Obstet Gynecol* 194(2 Suppl): S12-23.

Dempster, D. W., R. Marcus and M. L. Bouxsein (2021). The nature of osteoporosis. Marcus and Feldman's Osteoporosis: 3-13.

Dominguez, L. J., M. Barbagallo and L. Moro (2005). "Collagen overglycosylation: a biochemical feature that may contribute to bone quality." *Biochem Biophys Res Commun* 330(1): 1-4.

Donmez, B. O., S. Ozdemir, M. Sarikanat, N. Yaras, P. Koc, N. Demir, B. Karayalcin and N. Oguz (2012). "Effect of angiotensin II type 1 receptor blocker on osteoporotic rat femurs." *Pharmacol Rep* 64(4): 878-888.

Donnelly, E., D. X. Chen, A. L. Boskey, S. P. Baker and M. C. van der Meulen (2010). "Contribution of mineral to bone structural behavior and tissue mechanical properties." *Calcif Tissue Int* 87(5): 450-460.

Downey, P. A. and M. I. Siegel (2006). "Bone biology and the clinical implications for osteoporosis." *Phys Ther* 86(1): 77-91.

Ensrud, K. E. and C. J. Crandall (2017). "Osteoporosis." *Ann Intern Med* 167(3): Itc17-Itc32.

Erben, R. G., S. Bromm and M. Stangassinger (1998). "Short-term prophylaxis against estrogen depletion-induced bone loss with calcitriol does not provide long-term beneficial effects on cancellous bone mass or structure in ovariectomized rats." *Osteoporos Int* 8(1): 82-91.

Eriksen, E. F. (2010). "Cellular mechanisms of bone remodeling." *Rev Endocr Metab Disord* 11(4): 219-227.

Feng, X. (2009). "Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease." *Curr Chem Biol* 3(2): 189-196.

Feng, X. and J. M. McDonald (2011). "Disorders of bone remodeling." *Annu Rev Pathol* 6: 121-145.

Flieger, J., T. Karachalios, L. Khaldi, P. Raptou and G. Lyritis (1998). "Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 63(6): 510-514.

Frost, H. M. (1994). "Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: an overview for clinicians." *Angle Orthod* 64(3): 175-188.

Frost, H. M. (2003). "Bone's mechanostat: a 2003 update." *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275(2): 1081-1101.

Garcia-Giralt, N., X. Nogués, A. Enjuanes, J. Puig, L. Mellibovsky, A. Bay-Jensen, R. Carreras, S. Balcells, A. Díez-Pérez and D. Grinberg (2002). "Two new single-nucleotide polymorphisms in the COL1A1 upstream regulatory region and their relationship to bone mineral density." **J Bone Miner Res** 17(3): 384-393.

Garnero, P., E. Sornay-Rendu, M. C. Chapuy and P. D. Delmas (1996). "Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis." **J Bone Miner Res** 11(3): 337-349.

Gass, M. and B. Dawson-Hughes (2006). "Preventing osteoporosis-related fractures: an overview." **Am J Med** 119(4 Suppl 1): S3-s11.

Gebru, Y., T. Y. Diao, H. Pan, E. Mukwaya and Y. Zhang (2013). "Potential of RAS inhibition to improve metabolic bone disorders." **Biomed Res Int** 2013: 932691.

Ghosh, M. and S. R. Majumdar (2014). "Antihypertensive medications, bone mineral density, and fractures: a review of old cardiac drugs that provides new insights into osteoporosis." **Endocrine** 46(3): 397-405.

Glaser, D. L. and F. S. Kaplan (1997). "Osteoporosis. Definition and clinical presentation." **Spine (Phila Pa 1976)** 22(24 Suppl): 12s-16s.

Gökçe-Kutsal, P. D. Y. (2004). Osteoporozda Kemik Kalitesi. **Ankara**, Güneş Kitapevi Ltd. Şti., Ankara.

Gong, J. K., J. S. Arnold and S. H. Cohn (1964). "COMPOSITION OF TRABECULAR AND CORTICAL BONE." **Anat Rec** 149: 325-331.

Gunson, D., K. E. Gropp and A. Varela (2013). Bone and Joints. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology: 2761-2858.

Han, S. M., T. E. Szarzanowicz and I. Ziv (1999). "Effect of ovariectomy and calcium deficiency on the ultrasound velocity, mineral density and strength in the rat femur." **Clin Biomech (Bristol, Avon)** 14(3): 1.

Hart, N. H., R. U. Newton, J. Tan, T. Rantalainen, P. Chivers, A. Siafarikas and S. Nimphius (2020). "Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement." **J Musculoskelet Neuronal Interact** 20(3): 347-371.

Heaney, R. P., R. R. Recker and P. D. Saville (1978). "Menopausal changes in calcium balance performance." **J Lab Clin Med** 92(6): 953-963.

Henriksen, K. and M. A. Karsdal (2019). Type I collagen. Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin: 1-12.

Hernlund, E., A. Svedbom, M. Ivergård, J. Compston, C. Cooper, J. Stenmark, E. V. McCloskey, B. Jönsson and J. A. Kanis (2013). "Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)." **Arch Osteoporos** 8(1): 136.

Hill, P. A. (1998). "Bone remodelling." **Br J Orthod** 25(2): 101-107.

Huilaja, L., T. Hurskainen, H. Autio-Harmainen, R. Sormunen, H. Tu, S. C. Hofmann, T. Pihlajaniemi, L. Bruckner-Tuderman and K. Tasanen (2009). "Glycine substitution

mutations cause intracellular accumulation of collagen XVII and affect its post-translational modifications." *J Invest Dermatol* 129(9): 2302-2306.

Johnston, B. D. and W. E. Ward (2015). "The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women." *Biomed Res Int* 2015: 635023.

Kaneko, K., M. Ito, T. Fumoto, R. Fukuhara, J. Ishida, A. Fukamizu and K. Ikeda (2011). "Physiological function of the angiotensin AT1a receptor in bone remodeling." *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26: 2959-2966.

Kanis, J. A. (1994). "Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group." *Osteoporos Int* 4(6): 368-381.

Kanis, J. A. (1997). Osteoporosis. *54 The Broadway Ealing, London W5 5JN*, Blackwell Healthcare Communications Ltd.

Kanis, J. A., C. Cooper, R. Rizzoli and J. Y. Reginster (2019). "European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women." *Osteoporos Int* 30(1): 3-44.

Kato, Y., A. Boskey, L. Spevak, M. Dallas, M. Hori and L. F. Bonewald (2001). "Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture." *J Bone Miner Res* 16(9): 1622-1633.

Kenkre, J. S. and J. Bassett (2018). "The bone remodelling cycle." *Ann Clin Biochem* 55(3): 308-327.

Kharode, Y. P., M. C. Sharp and P. V. Bodine (2008). "Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery." *Methods Mol Biol* 455: 111-124.

Kim, E. Y., J. H. Kim, M. Kim, J. H. Park, Y. Sohn and H. S. Jung (2020). "Abeliophyllum distichum Nakai alleviates postmenopausal osteoporosis in ovariectomized rats and prevents RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro." *J Ethnopharmacol* 257: 112828.

Kurosu, H. (1979). "[Biochemical studies on collagen and connectin from human skeletal muscle: age-related changes in the properties of elasticity (author's transl)]." *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 53(11): 1641-1652.

Kuznetsova, N. and S. Leikin (1999). "Does the triple helical domain of type I collagen encode molecular recognition and fiber assembly while telopeptides serve as catalytic domains? Effect of proteolytic cleavage on fibrillogenesis and on collagen-collagen interaction in fibers." *J Biol Chem* 274(51): 36083-36088.

Lane, J. M., L. Russell and S. N. Khan (2000). "Osteoporosis." *Clin Orthop Relat Res*(372): 139-150.

Mandair, G. S. and M. D. Morris (2015). "Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength." *Bonekey Rep* 4: 620.

Mann, V., E. E. Hobson, B. Li, T. L. Stewart, S. F. Grant, S. P. Robins, R. M. Aspden and S. H. Ralston (2001). "A COL1A1 Sp1 binding site polymorphism predisposes to osteoporotic fracture by affecting bone density and quality." *J Clin Invest* 107(7): 899-907.

- Martin, T. J. and E. Seeman (2008). "Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility." **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 22(5): 701-722.
- McKee, M. D. and W. G. Cole (2012). Bone Matrix and Mineralization. *Pediatric Bone*: 9-37.
- McNamara, L. M. and P. J. Prendergast (2005). "Perforation of cancellous bone trabeculae by damage-stimulated remodelling at resorption pits: a computational analysis." **Eur J Morphol** 42(1-2): 99-109.
- Meema, S. and H. E. Meema (1976). "Menopausal bone loss and estrogen replacement." **Isr J Med Sci** 12(7): 601-606.
- Midura, R. J., S. B. Midura, X. Su and J. P. Gorski (2011). "Separation of newly formed bone from older compact bone reveals clear compositional differences in bone matrix." **Bone** 49(6): 1365-1374.
- Morgan, E. F. and L. C. Gerstenfeld (2021). The bone organ system: form and function. *Marcus and Feldman's Osteoporosis*: 15-35.
- Morgan, E. F., G. U. Unnikrisnan and A. I. Hussein (2018). "Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States." **Annu Rev Biomed Eng** 20: 119-143.
- Morris, M. D. and G. S. Mandair (2011). "Raman assessment of bone quality." **Clin Orthop Relat Res** 469(8): 2160-2169.
- Mulvihill, B. M., L. M. McNamara and P. J. Prendergast (2008). "Loss of trabeculae by mechano-biological means may explain rapid bone loss in osteoporosis." **J R Soc Interface** 5(27): 1243-1253.
- Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko (2004). "Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms." **Trends Genet** 20(1): 33-43.
- Parfitt, A. M. (1984). "The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone." **Calcif Tissue Int** 36 Suppl 1: S37-45.
- Parkinson, I. H., D. Forbes, P. Sutton-Smith and N. L. Fazzalari (2010). "Model-Independent 3D Descriptors of Vertebral Cancellous Bone Architecture." **J Osteoporos** 2010: 641578.
- Paschalis, E. P., S. Gamsjaeger and K. Klaushofer (2017). "Vibrational spectroscopic techniques to assess bone quality." **Osteoporos Int** 28(8): 2275-2291.
- Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." **Physiol Rev** 86(3): 747-803.
- Peng, Z., J. Tuukkanen, H. Zhang, T. Jämsä and H. K. Väänänen (1994). "The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis." **Bone** 15(5): 523-532.
- Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." **Nature** 309(5963): 30-33.
- Prideaux, M., D. M. Findlay and G. J. Atkins (2016). "Osteocytes: The master cells in bone remodelling." **Curr Opin Pharmacol** 28: 24-30.

Putnam, K., R. Shoemaker, F. Yiannikouris and L. A. Cassis (2012). "The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 302(6): H1219-1230.

Rajkumar, D. S., A. V. Faitelson, O. S. Gudyrev, G. M. Dubrovin, M. V. Pokrovski and A. V. Ivanov (2013). "Comparative evaluation of enalapril and losartan in pharmacological correction of experimental osteoporosis and fractures of its background." **J Osteoporos** 2013: 325693.

Reid, I. R., R. W. Ames, B. J. Orr-Walker, J. M. Clearwater, A. M. Horne, M. C. Evans, M. A. Murray, A. R. McNeil and G. D. Gamble (2000). "Hydrochlorothiazide reduces loss of cortical bone in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial." **Am J Med** 109(5): 362-370.

Rho, J. Y., L. Kuhn-Spearing and P. Zioupos (1998). "Mechanical properties and the hierarchical structure of bone." **Med Eng Phys** 20(2): 92-102.

Ricard-Blum, S. (2011). "The collagen family." **Cold Spring Harb Perspect Biol** 3(1): a004978.

Richelson, L. S., H. W. Wahner, L. J. Melton, 3rd and B. L. Riggs (1984). "Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss." **N Engl J Med** 311(20): 1273-1275.

Riggs, B. L., S. Khosla and L. J. Melton, 3rd (1998). "A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men." **J Bone Miner Res** 13(5): 763-773.

Rizzoli, R. (2018). "Postmenopausal osteoporosis: Assessment and management." **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 32(5): 739-757.

Robling, A. G., A. B. Castillo and C. H. Turner (2006). "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." **Annu Rev Biomed Eng** 8: 455-498.

Rosenthal, H. S. (1959). "Biopsy of bone and joints with the Vim-Silverman needle." **Bull Hosp Joint Dis** 20: 117-120.

Rosert, J. and B. de Crombrughe (2002). Chapter 12 - Type I Collagen: Structure, Synthesis, and Regulation. Principles of Bone Biology (Second Edition). J. P. Bilezikian, L. G. Raisz and G. A. Rodan. San Diego, **Academic Press**: 189-XVIII.

Ruoslahti, E. (1991). "Integrins." **J Clin Invest** 87(1): 1-5.

Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." **Annu Rev Cell Dev Biol** 12: 697-715.

Saito, M. and K. Marumo (2010). "Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus." **Osteoporos Int** 21(2): 195-214.

Sambrook, P. N. (1996). "Osteoporosis." **Med J Aust** 165(6): 332-336.

Schlienger, R. G., M. E. Kraenzlin, S. S. Jick and C. R. Meier (2004). "Use of beta-blockers and risk of fractures." **JAMA** 292(11): 1326-1332.

- Shimizu, H., H. Nakagami, M. K. Osako, R. Hanayama, Y. Kunugiza, T. Kizawa, T. Tomita, H. Yoshikawa, T. Ogihara and R. Morishita (2008). "Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts." **FASEB J** 22(7): 2465-2475.
- Smith, D. W., B. S. Gardiner and C. Dunstan (2012). "Bone balance within a cortical BMU: local controls of bone resorption and formation." **PLoS One** 7(7): e40268.
- Srivastava, M. and C. Deal (2002). "Osteoporosis in elderly: prevention and treatment." **Clin Geriatr Med** 18(3): 529-555.
- Szulc, P. (2018). "Bone turnover: Biology and assessment tools." **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 32(5): 725-738.
- Taichman, R. S. (2005). "Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche." **Blood** 105(7): 2631-2639.
- Takada, Y., X. Ye and S. Simon (2007). "The integrins." **Genome Biol** 8(5): 215.
- Takata, S. and N. Yasui (2001). "Disuse osteoporosis." **J Med Invest** 48(3-4): 147-156.
- Tran, B. N., N. D. Nguyen, J. R. Center, J. A. Eisman and T. V. Nguyen (2009). "Enhancement of absolute fracture risk prognosis with genetic marker: the collagen I alpha 1 gene." **Calcif Tissue Int** 85(5): 379-388.
- Turner, C. H. (2002). "Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality." **Osteoporos Int** 13(2): 97-104.
- Tye, C. E., K. R. Rattray, K. J. Warner, J. A. Gordon, J. Sodek, G. K. Hunter and H. A. Goldberg (2003). "Delineation of the hydroxyapatite-nucleating domains of bone sialoprotein." **J Biol Chem** 278(10): 7949-7955.
- UAB and the UAB Research Foundation. (2013). "PEIR pathology library " Retrieved August 1, 2013, from <https://peir.path.uab.edu/library/picture.php?/10737/tags/116-bones>.
- Unal, M. (2021). "Raman spectroscopic determination of bone matrix quantity and quality augments prediction of human cortical bone mechanical properties." **J Biomech** 119: 110342.
- Unal, M., S. Uppuganti, S. Timur, A. Mahadevan-Jansen, O. Akkus and J. S. Nyman (2019). "Assessing matrix quality by Raman spectroscopy helps predict fracture toughness of human cortical bone." **Sci Rep** 9(1): 7195.
- Unger, T. (2002). "The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease." **Am J Cardiol** 89(2A): 3A-9A; discussion 10A.
- Urdahl, H., A. Manca and M. J. Sculpher (2006). "Assessing generalisability in model-based economic evaluation studies: a structured review in osteoporosis." **Pharmacoeconomics** 24(12): 1181-1197.
- van der Linden, J. C., J. Homminga, J. A. Verhaar and H. Weinans (2001). "Mechanical consequences of bone loss in cancellous bone." **J Bone Miner Res** 16(3): 457-465.
- van der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." **Faseb j** 5(13): 2814-2823.

Verdecchia, P., F. Angeli, G. Mazzotta, G. Gentile and G. Reboldi (2008). "The renin angiotensin system in the development of cardiovascular disease: role of aliskiren in risk reduction." *Vasc Health Risk Manag* 4(5): 971-981.

Viguet-Carrin, S., P. Garnero and P. D. Delmas (2006). "The role of collagen in bone strength." *Osteoporos Int* 17(3): 319-336.

Weatherholt, A. M., R. K. Fuchs and S. J. Warden (2012). "Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity." *J Hand Ther* 25(2): 123-131; quiz 132.

Wronski, T. J., M. Cintrón and L. M. Dann (1988). "Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 43(3): 179-183.

Wronski, T. J., L. M. Dann and S. L. Horner (1989). "Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats." *Bone* 10(4): 295-301.

Wronski, T. J., L. M. Dann, H. Qi and C. F. Yen (1993). "Skeletal effects of withdrawal of estrogen and diphosphonate treatment in ovariectomized rats." *Calcif Tissue Int* 53(3): 210-216.

Wronski, T. J., L. M. Dann, K. S. Scott and M. Cintrón (1989). "Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton." *Calcif Tissue Int* 45(6): 360-366.

Wu, S., F. Zhao, J. Zhao, H. Li, J. Chen, Y. Xia, J. Wang, B. Zhao, S. Zhao and N. Li (2019). "Dioscin improves postmenopausal osteoporosis through inducing bone formation and inhibiting apoptosis in ovariectomized rats." *Biosci Trends* 13(5): 394-401.

Xiao, X., Y. Xu and Q. Wu (2018). "Thiazide diuretic usage and risk of fracture: a meta-analysis of cohort studies." *Osteoporos Int* 29(7): 1515-1524.

Xu, H., T. Liu, L. Hu, J. Li, C. Gan, J. Xu, F. Chen, Z. Xiang, X. Wang and J. Sheng (2019). "Effect of caffeine on ovariectomy-induced osteoporosis in rats." *Biomed Pharmacother* 112: 108650.

Yamada, S., H. Nagaoka, M. Terajima, N. Tsuda, Y. Hayashi and M. Yamauchi (2013). "Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system." *Dent Mater J* 32(1): 88-95.

Yamauchi, M. and M. Sricholpech (2012). "Lysine post-translational modifications of collagen." *Essays Biochem* 52: 113-133.

Yang, X., H. Zheng, Y. Liu, D. Hao, B. He and L. Kong (2020). "Puerarin for OVX-Induced Postmenopausal Osteoporosis in Murine Model: Systematic Review and Meta-Analysis." *Curr Stem Cell Res Ther* 15(1): 37-42.

Young, M. F. (2003). "Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis." *Osteoporos Int* 14 Suppl 3: S35-42.

Zebaze, R. M., A. Ghasem-Zadeh, A. Bohte, S. Iuliano-Burns, M. Mirams, R. I. Price, E. J. Mackie and E. Seeman (2010). "Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study." *Lancet* 375(9727): 1729-1736.