



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**YENİ NESİL KEMİK DÖNGÜSÜ
BİYOBELİRTEÇLERİNDEN OLAN SFİNGOZİN-1
FOSFAT'IN FARKLI HASTALIK GRUPLARINDA
ÖNERİLEN GELENEKSEL BİYOBELİRTEÇLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASININ DENEYSEL OLARAK
GÖSTERİLMESİ**

BURCU ESER

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2023



**YENİ NESİL KEMİK DÖNGÜSÜ BİYOBELİRTEÇLERİNDEN OLAN
SFİNGOZİN-1 FOSFAT'IN FARKLI HASTALIK GRUPLARINDA
ÖNERİLEN GELENEKSEL BİYOBELİRTEÇLERİ İLE
KARŞILAŞTIRILMASININ DENEYSEL OLARAK GÖSTERİLMESİ**

Burcu ESER

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Burcu ESER

**YENİ NESİL KEMİK DÖNGÜSÜ BİYOBELİRTEÇLERİNDEN OLAN SFİNGOZİN-1
FOSFAT'IN FARKLI HASTALIK GRUPLARINDA ÖNERİLEN GELENEKSEL
BİYOBELİRTEÇLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASININ DENEYSEL OLARAK
GÖSTERİLMESİ
(Doktora Tezi)**

Burcu ESER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2023

ÖZET

Kemik döngüsü belirteçleri(BTM) günümüzde yaygın olarak görülen Osteoporoz(OP) ve Romatoid Artrit(RA)'in tanı, tedavi ve takibi için kritik öneme sahiptir. Noninvaziv olması sebebiyle ayrıca önemi giderek dahada artmaktadır. Membran lipitleri olan sfingolipit metabolitlerinden Sfingozin-1-fosfat (S1P) osteoklast öncüllerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik bozulmasını azaltır, böylece kemik yıkımını önler. Ayrıca S1P, osteoblastlarda RANKL'ı (Reseptör aktivatör NF-κB ligandı) artırarak osteoblastların proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve göçünü ve osteoklast farklılaşmasını etkiler. Deney hayvan çalışması şeklinde planlanan bu çalışmada, tavşanlarda önce OP ve RA hastalık modelleri oluşturulmuş ardından bu hastalıkların yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri uygulanarak takipleri yapılmıştır. Tüm bu hastalık oluşum ve tedavi süresince hayvanlardan numuneler toplanarak kullanılan geleneksel biyobelirteçlere karşılık RANKL ve S1P ölçümleri yapılmıştır. Ovariectomi ve kortikosteroid tedavisinin kombinasyonu ile OP geliştikten sonra tavşanlar denosumab ile tedavi edilmiştir. RA oluşumu için OVA/FCA diz içine enjekte edilmiş sonrasında ise tedavi için NSAID ve kortikosteroid kullanılmıştır. Serum 25(OH)D, PTH, Kalsitonin, Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL, CTX ve P1NP düzeyleri klinik biyokimya analizörleri ile ölçülmüştür. RANKL düzeyleri analizi ise ELİSA metodu ile gerçekleştirilmiştir. Serum S1P düzeyleri LCMS/MS cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Çalışmada ACE-3-C18(50mmx2.1mmx5µm) kolonu kullanılmıştır. S1P için m/z 380,8→264,7 ve 81,7 iyon değerleri kullanılmıştır. S1P düzeyleri OP grubunda başlangıç, hastalık oluşum-1 ve 2 ve tedavi-1 ve 2 aşamasında sırasıyla ortalama 85,50ng/mL, 51,98ng/mL; 36,01ng/mL; 44,37ng/mL; 36,07ng/mL olarak ölçülmüştür. RA grubunda ise başlangıç, hastalık oluşum, tedavi-1 ve 2 aşamasında sırasıyla 55,32ng/mL; 35,42ng/mL; 25,14ng/mL; 31,70ng/mL olarak ölçülmüştür. RANKL ise sırasıyla OP grubu: 86,46pg/mL; 54,15pg/mL; 65,44pg/mL; 104,14pg/mL; 145,58pg/mL; RA grubu: 77,86pg/mL; 89,54pg/mL; 105,61pg/mL ve 104,91pg/mL idi. OP grubu sırasıyla CTX düzeyleri: 9,49pg/ml; 7,46 pg/ml; 3,09 pg/ml; 1,52pg/ml; 1,32pg/mL; P1NP ise sırasıyla: 2,07ug/L; 1,76ug/L; 1,79ug/L; 1,95ug/L; 1,98ug/L olarak ölçülmüştür. RA grubu CTX düzeyleri sırasıyla: 7,49pg/ml; 5,47pg/ml; 6,73pg/ml; ve 9,68pg/mL; P1NP ise sırasıyla: 1,96ug/L; 1,87ug/L; 1,65ug/L; ve 1,68ug/L olarak ölçülmüştür. OP grubunda S1P ve RANKL düzeyleri hastalık ile uyumlu iken tedavi için anlamlı değişiklikler izleyemedik. RA grubunda ise S1P ve RANKL düzeyleri hastalık ve tedavi süreçleri ile uyumlu idi. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler her ne kadar OP ve RA için anlamlı olsada kemik metabolizmasında biyobelirteç olarak kullanılması için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Bilim Kodu : 1090
Anahtar Kelimeler Osteoporoz, Romatoid Artrit, Kemik Döngüsü Biyobelirteçleri, RANKL, Sfingozin 1-Fosfat.
Sayfa Adedi : 210
Danışman : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

EXPERIMENTAL DEMONSTRATION OF A NEW GENERATION BONE
TURNOVER BIOMARKER, SPHINGOSINE-1 PHOSPHATE, IN DIFFERENT
DISEASE GROUPS IN COMPARISON WITH PROPOSED TRADITIONAL
BIOMARKERS
(Ph.D. Thesis)

Burcu ESER

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
July 2023

ABSTRACT

Bone turnover markers (BTM) are of critical importance for the diagnosis, treatment and follow-up of Osteoporosis (OP) and Rheumatoid Arthritis (RA), which are common today. Due to its non-invasiveness, its importance is increasing day by day. Sphingosine-1-phosphate (S1P), one of the sphingolipid metabolites that are membrane lipids, controls the migration of osteoclast precursors between blood and bone and reduces bone degradation by keeping osteoclast precursors away from bone surfaces, thus preventing bone destruction. In addition, S1P affects the proliferation, survival and migration of osteoblasts and osteoclast differentiation by increasing RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) in osteoblasts. In this study, which was planned as an experimental animal study, first OP and RA disease models were created in rabbits, and then these diseases were followed up by applying commonly used treatment methods. During all this disease formation and treatment, samples were collected from animals and RANKL and S1P measurements were made for against the traditional biomarkers used. Rabbits were treated with denosumab after development of OP with a combination of ovariectomy and corticosteroid therapy. OVA/FCA was injected into the knee for RA formation, and then NSAID and Corticosteroid were used for treatment. Serum 25(OH)D, PTH, Calcitonin, Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL, CTX and P1NP levels were measured by biochemistry auto-analyzers, RANKL levels were measured by ELISA. Serum S1P levels were measured with an LCMS/MS device. The analysis was carried out on an ACE-3 C18 (2.1mm $\times$ 50mm $\times$ 5 μ m) reversed-phase analytical column. Detection was performed using at m/z 380,8 $\rightarrow$ 264,7 and 81,7 for S1P. S1P levels were measured as mean 85,50ng/mL, 51,98ng/mL; 36,01ng/mL; 44,37ng/mL; 36,07ng/mL at the initial, disease formation-1 and 2 and treatment stages-1 and 2, respectively, in the OP group. In the RA group, 55,32ng/mL; 35,42ng/mL; 25,14ng/mL; 31,70ng/mL were measured at the initial, disease formation and treatment-1 and 2 stages, respectively. RANKL of the OP group was 86,46pg/mL; 54,15pg/mL; 65,44pg/mL; 104,14pg/mL; 145,58pg/mL; respectively. RA group was: 77,86pg/mL; 89,54pg/mL; 105,61pg/mL ve 104,91pg/mL. The mean CTX levels were measured as 9,49pg/ml; 7,46 pg/ml; 3,09 pg/ml; 1,52pg/ml; 1,32pg/mL and P1NP as 2,07ug/L; 1,76ug/L; 1,79ug/L; 1,95ug/L; 1,98ug/L in the OP group, respectively. The mean CTX levels were measured as 7,49pg/ml; 5,47pg/ml; 6,73pg/ml; ve 9,68pg/mL and P1NP as 1,96ug/L; 1,87ug/L; 1,65ug/L; ve 1,68ug/L in the RA group, respectively. In the OP group; While S1P and RANKL levels were consistent with the disease, we could not observe significant changes for treatment. In the RA group, S1P and RANKL levels were consistent with the disease and treatment processes. Although the data we obtained in our study are significant for OP and RA, more data is needed for its use as a biomarker in bone metabolism.

Science Code : 1090

KeyWords :Osteoporosis, Rheumatoid Arthritis, Bone Turnover Biomarkers, RANKL, Sphingosine 1-Phosphate.

Page Number : 210

Supervisor : Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başladığım günden bu zamana desteğini, değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Aylin Sepici Dinçel'e

Tez çalışmamı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Araştırma Destek Programları Müdürlüğü (ARDEB) (proje no: 221S131)'ne
proje kapsamında desteklenen Tubitak 2247-C STAR bursiyeri Dr. Abdullah Yağız Dağıstan'a

Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: THD-2022-7529)'ne

Eğitimim boyunca değerli bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, yardım ve desteklerini esirgemeyen tüm Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tezime ait USG görüntülerinin alınmasındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. Feride Nur Göğüş'e (Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı)

Micro-CT analizlerindeki desteği için Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Şimşek'e (Gazi Üniversitesi SHMYO)

Doktora eğitimimde ve tez çalışması boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen veteriner hekim Enes Arda Arslan'a ve SD Lab grup ailesine,

Doktora eğitimim boyunca, yolumun kesiştiği, beraber çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Burcu ESER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Doku.....	3
2.1.1. Kemik doku yapısı	3
2.1.2. Kemik metabolizması, döngüsü	10
2.1.3. Kemik metabolizması hastalıkları	14
2.2. Osteoporoz	14
2.2.1. Osteoporozda Tanı	15
2.2.2. Osteoporozda tedavi.....	17
2.3. Romatoid Artrit.....	19
2.4. Kemik Döngüsü Biyobelirteçleri	22
2.5. Sfingozin-1-Fosfat.....	36
2.5.1. Sfingozin-1-fosfat yapı ve meatbolizması.....	36
2.5.2. Sfingosin kinaz yoluyla S1P üretilmesi	39
2.5.3. S1P liyaz tarafından S1P bozulması.....	40
2.5.4. Sfingozin-1-fosfat reseptörleri	41
2.5.5. Sfingozin-1-fosfat reseptör sinyali	43

	Sayfa
2.5.6. Sfingozin-1-fosfat taşınımı.....	44
2.5.6. Farklı hastalık gruplarında sfingozin-1-fosfat.....	47
2.6. Deneysel Model.....	57
2.6.1. Osteoporoz hayvan modeli.....	58
2.6.2. Romatoid artrit hayvan modeli.....	62
2.6.3. Radyolojik görüntüleme.....	67
2.6.4. ELİSA.....	69
2.7. Kromatografi.....	70
2.7.1. LCMS/MS.....	70
2.7.2. Validasyon.....	72
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	75
3.1. Deney Hayvanları Aşaması.....	76
3.2. Laboratuvar Analizleri Aşaması.....	80
3.2.1. Numune alım, hazırlama ve saklanması.....	80
3.2.2. Kemik metabolizması biyobelirteçleri ölçümü.....	80
3.2.3. Serum RANKL düzeyleri ölçümü.....	81
3.2.4. Sfingozin 1-fosfat ölçümü.....	83
3.3. Radyolojik Analiz.....	87
3.4. İstatistiksel Analiz.....	92
4. BULGULAR.....	93
5. TARTIŞMA.....	151
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	171
KAYNAKLAR.....	173
EKLER.....	205
EK-1. Yerel Etik Kurul Onay Formu.....	206
EK-2. Yerel Etik Kurul Onay Formu-2.....	207

Sayfa

ÖZGEÇMİŞ	208
----------------	-----

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Glukokortikoidlerin kemik metabolizması üzerindeki etkilerinin gösterimi (Ernesto Canalis & Delany, 2002).	61
Çizelge 3.1. LCMS/MS cihaz koşulları.....	84
Çizelge 3.2. LCMS/MS ile S1P analizine ait validasyon sonuçları	87
Çizelge 4.1. Tavşanların zaman içerisinde ağırlık değişim grafiği	94
Çizelge 4.2. OP ve K grubundan hayvanların Total BMD değerleri	94
Çizelge 4.3. Tavşan femur micro-Ct görüntülerinden elde edilen kemik volüm değerleri. K3:Kontrol grubu, OP-7:OP hastalık aşaması, OP-6:OP tedavi aşamasına ait micro-CT görüntülerinden hesaplanan volüm değerleri.....	94
Çizelge 4.4. Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri.....	101
Çizelge 4.5. Kontrol grubuna ait verilerin tanımlayıcı istatistiksel bilgileri.....	114
Çizelge 4.6. Tavşanlara ait bazı biyokimyasal parametrelerin sayısal değerleri.....	115
Çizelge 4.7. OP grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri.....	115
Çizelge 4.8. OP grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri.....	129
Çizelge 4.9. OP grubuna ait analiz sonuçlarının Post Hoc testlerinden Tukey HSD değerleri.....	130
Çizelge 4.10. OP grubuna ait analiz sonuçlarının Pearson korelasyon katsayısı ve p değerleri.....	131
Çizelge 4.11. RA grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri.....	132
Çizelge 4.12. RA grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri.....	146
Çizelge 4.13. RA grubuna ait analiz sonuçlarının Post Hoc testlerinden Tukey HSD değerleri.....	147
Çizelge 4.14. RA grubuna ait analiz sonuçlarının Pearson korelasyon katsayısı ve p değerleri.....	148
Çizelge 4.15. OP, RA ve K gruplarına ait tüm sonuçların toplu bir şekilde gösterimi .	149

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Kemik dokuya ait genel görünüm (Mescher, 2021).	4
Şekil 2.2.	Kemik dokuya ait detaylı görünüm (Martini, Nath, & Bartholomew, 2017).	5
Şekil 2.3.	Kemik doku hücreleri (Betts et al., 2013).	6
Şekil 2.4.	Osteoblast ve Osteoklast hücrelerinin gelişimi (J.-M. Kim, Lin, Stavre, Greenblatt, & Shim, 2020).	9
Şekil 2.5.	Yeniden şekillenme döngüsü. Yeniden modelleme döngüsü beş aşamadan oluşur: (A) aktivasyon; (B) emilim; (C) tersine çevirme; (D) oluşumu; ve (E) sükunet. Herhangi bir zamanda, vücuttaki yeniden şekillenme döngüleri çeşitli aşamalardadır (Allen & Burr, 2019).	12
Şekil 2.6.	Osteoklastogenezi baskılamak için mevcut ve varsayımsal RANKL inhibitörleri	19
Şekil 2.7.	Osteoblast-osteoklast etkileşiminin anahtar araçları	24
Şekil 2.8.	Kemik döngüsünün biyokimyasal biyobelirteçleri	26
Şekil 2.9.	Tip 1 kollajenden CTX ve P1NP fragmentleri (Greenblatt et al., 2017).	33
Şekil 2.10.	Kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinin şematik gösterimi (Eastell et al., 2016). Osteoblastlar (Ob); osteoklastlar (Oc); nükleer faktör-κB reseptör aktivatörü (RANK); nükleer faktör-κB ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü; osteoprotegerin (OPG) (Molino et al., 2020).	34
Şekil 2.11.	Sfingolipidlerin genel yapıları. (a) Sfingolipidlerin kimyasal yapıları. Sfingoid taban gri gölgede gösterilmiştir. Fonksiyonel grupları temsil eden R1 ve R2 sırasıyla kırmızı ve yeşil olarak vurgulanmıştır. (b) Farklı sfingolipid tiplerindeki R1 ve R2 bileşimleri listelenmiştir (Ren et al., 2021).	37
Şekil 2.12.	S1P'nin metabolik yolları (Companiononi et al., 2021).	38
Şekil 2.13.	S1P-S1P reseptör sinyalizasyon sistemine genel bakış	42
Şekil 2.14.	S1P-S1P reseptör mekanizması	44
Şekil 2.15.	S1P taşıyımı	45
Şekil 2.16.	S1P'in kemik döngüsündeki rolü (L. Zhang et al., 2020).	55
Şekil 2.17.	S1P'nin RA'da inflamatuvar yaralanmaya ve eklem yıkımına katkısı (Burg et al., 2022).	57

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. OP grubu iş akış durumu	811
Şekil 3.2. RA grubu iş akış durumu.....	811
Şekil 3.3. RANKL ELİSA kalibrasyon eğrisi. (0-2000 pg/mL konsantrasyon aralığında standartlar kullanıldı.).....	822
Şekil 3.4. S1P Standartları kalibrasyon çizgisi	844
Şekil 3.5. S1P molekülü ana ve yavru iyon kromatogramı.....	855
Şekil 3.6. S1P standartlarına ait kromatogram. A: Standartlar ayrı ayrı gösterilmektedir. B: Toplu gösterim.....	866
Şekil 4.1. OP grubu tavşanlara ait DXA örnek görüntüleri	94
Şekil 4.2. OP grubundan hayvanların serum Ca düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	117
Şekil 4.3. OP grubundan hayvanların serum P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	118
Şekil 4.4. OP grubundan hayvanların serum ALP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	119
Şekil 4.5. OP grubundan hayvanların serum Alb düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	120
Şekil 4.6. OP grubundan hayvanların serum Kol düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	121
Şekil 4.7. OP grubundan hayvanların serum HDL-C düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	122
Şekil 4.8. OP grubundan hayvanların serum PTH düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	123
Şekil 4.9. OP grubundan hayvanların serum Vit D düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	124
Şekil 4.10. OP grubundan hayvanların serum CAL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	125
Şekil 4.11. OP grubundan hayvanların serum CTX düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	126
Şekil 4.12. OP grubundan hayvanların serum P1NP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	127
Şekil 4.13. OP grubundan hayvanların serum RANKL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	128

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. OP grubundan hayvanların serum S1P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)	129
Şekil 4.15. RA grubundan hayvanların serum Ca düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	134
Şekil 4.16. RA grubundan hayvanların serum P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	135
Şekil 4.17. RA grubundan hayvanların serum ALP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	136
Şekil 4.18. RA grubundan hayvanların serum Alb düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	137
Şekil 4.19. RA grubundan hayvanların serum Kol düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	138
Şekil 4.20. RA grubundan hayvanların serum HDL-C düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	139
Şekil 4.21. RA grubundan hayvanların serum PTH düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	140
Şekil 4.22. RA grubundan hayvanların serum Vit D düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	141
Şekil 4.23. RA grubundan hayvanların serum CAL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)	142
Şekil 4.24. RA grubundan hayvanların serum CTX düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)	143
Şekil 4.25. RA grubundan hayvanların serum P1NP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)	144
Şekil 4.26. RA grubundan hayvanların serum RANKL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)	145
Şekil 4.27. RA grubundan hayvanların serum S1P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)	146
Şekil 5.1. Osteoporoz tedavisinde kullanılan anti-resorptif ve anabolik ilaç tedavilerindeki PINP ve CTX düzey değişiklikleri (Zhong et al., 2021)..	164

RESİMLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Resim 3.1. Tavşan overektomi cerrahi operasyonları sırasında bir kaç örnek görüntü.....	77
Resim 3.2. RANkL analizinde kullanılan ELİSA plate yıkayıcı.....	81
Resim 3.3. RANkL analizinde kullanılan ELİSA plate okuyucu	81
Resim 3.4. RANkL analizinde kullanılan ELİSA Kit (MyBioSource).....	82
Resim 3.5. Hologic Horizon QDR Discovery A (S/N 82408) marka DXA cihazı	88
Resim 3.6. Tavşanların radyolojik analiz için femur ve vertebra çıkarımına ait görüntüler.....	88
Resim 3.7. ESAOTE MyLab 70-X-Vision ultrasound cihazı	89
Resim 3.8. Tavşanların diz USG analizi.	90
Resim 3.9. Micro-CT cihazı (Skyscan 1275, Bruker, Belçika. S/N=17E15028)..	91
Resim 4.1. Tavşan femur Micro-CT görüntüleri. A: Kontrol grubuna ait görüntü. B: OP grubuna ait görüntü.....	96
Resim 4.2. A:Tavşan femur Micro-CT görüntülerinin yapılandırılması ile elde edilen 3D görüntüsü. B: Tavşan femur Micro-CT 3D görüntünden alınan kesit bölgesi	97
Resim 4.3. Tavşan femur Micro-CT görüntülerinin yapılandırılmasının ardından alınan kesitlerin görüntüleri.....	98
Resim 4.4. Tavşan diz USG görüntüsü. (RA oluşturmada öncesine ait normal USG).	99
Resim 4.5. RA aşaması tavşan diz USG görüntüsü A: Sinovit, sinoviyal hipertrofi, kemik erozyonu ve power doppler sinyalleri B: Rice body görüntüsü	100
Resim 4.6. RA tedavisi sonrası tavşan diz USG görüntüsü (Normal USG).....	101

SİMGE VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış olan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
ALP	Alkalenfosfataz
BALP	kemiğe özgü alkalın fosfataz
BMD	Kemik mineral yoğunluğu
BTM	Kemik döngüsü belirteçleri
Ca⁺⁺	Kalsiyum
CAL	Kalsitonin
CRP	C reaktif protein
CTX	karboksi-terminal crosslinked telopeptide of tipe 1 kollajen
DMARD	Hastalık modifiye edici antiromatizmal ilaç
DXA	Dual Enerji X-ışını Absorpsiometrisi
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ELİZA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FTY720	Fingolimod
GPCR	G proteinine bağlı reseptör
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
İL	İnterlökin
KOL-1	Tip I kollajen
LCMS/MS	Sıvı kromatografisi-Kütle Dedektörü
M-CSF	Makrofaj-koloni stimülan faktör
MMP	Matrix Metalloproteinazlar
NF-KB	Nükleer faktör-kappa B
NSAİİ	Non-Steroid Anti-İnflamatuvar İlaçlar

Kısaltmalar	Açıklamalar
OA	Osteoartirit
OC	Osteokalsin
OP	Osteoporoz
PDA	Photo-diod Array dedektör
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PGE2	Prostaglandin E2
PTH	Paratiroid Hormon
P1NP	Prokollajen tip 1 C-terminal propeptid
RA	Romatoid artrit
RANKL	NF-κB ligandının reseptör aktivatörü
RF	Romatoid faktör
SGPP1-2	Sfingozin fosfataz1-2
SPHK1-2	Sfingozin Kinaz1-2
SPL	Sfingozin Liyaz
SPNS2	Protein spinster homologu-2
S1P	Sfingozin-1-fosfat
S1PR1-5	S1P reseptörü 1-5
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü- beta
TNF-α	Tümör nekroz faktörü-alfa
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Bu yazıda, yapılan tez projesinin temelini oluşturan konularla ilgili temel bilgiler üç temel kısım altında sunularak özetlenmiştir. İlk önce kısaca kemik dokusunun yapısı ve özelliklerine yer verilmiş, döngünün bozulduğu durumlarda meydana gelen hastalıklar ve bunların teşhis ve takibinde kullanılan biyobelirteçlerden bahsedilmiştir. Ardından Sfingozin-1-fosfat biyomolekülünün özellikleri ve kemik doku ile ilişkisi ile ilgili açıklamalar yapılmıştır. Sonrasında ise çalışmanın modellenmesi ve analizler ile ilgili temel bilgilere yer verilmiştir. Konu ile ilgili tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen bulgular ise devam eden bölümlerde sunulmuştur.

Kemik döngüsü belirteçleri (BTM'ler), osteoblastlar veya osteoklastlar tarafından kemik yeniden yapılanması sırasında salınan bir dizi protein veya protein türevi biyobelirteçtir. Günümüzde yaygın olarak görülmesi sebebiyle OP ve RA için tanı, tedavi ve tedavinin takibi kritik öneme sahiptir. Noninvaziv olması sebebiyle BTM'lerin tanı ve takipteki önemi giderek dahada artmaktadır.

Membran lipitleri olan sfingolipit metabolitlerinden olan Sfingozin-1-fosfat (S1P) osteoklast öncüllerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik yıkımını azaltır. Ayrıca S1P, osteoblastlarda RANKL'ı (Reseptör aktivatör NF- κ B ligandı) artırarak osteoblastların proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve göçünü ve ayrıca osteoklast farklılaşmasını etkiler.

Bu proje kapsamında kemik metabolizması hastalıklarına yeni bir biyobelirteç sunmak amaçlanmıştır.

Genel olarak FDA, klinik çalışmalardan önce hayvan türlerinde prelinik etkilerin gösterilmesini tercih eder. Çalışmamızda; altın standart olarak önerilen radyolojik analizler ile modellerimizin çalıştığını kanıtlayarak ve laboratuvar ölçümlerinden elde ettiğimiz geleneksel BTM verileri ile S1P ve RANKL düzeylerini karşılaştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Doku

2.1.1. Kemik doku yapısı

Kemik, iskelet sistemindeki birincil dokudur. İskelet vücut için yapısal destek sağlar, kaslar için kaldıraç görevi görür ve hareket etme de rol alır, iç organları ve yapıları korur, mineral homeostazının ve asit-baz dengesinin korunmasını sağlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve kemik iliği boşluklarında hematopoez için ortam sağlar ve depo olarak hizmet eder (Clarke, 2008; Taichman, 2005).

Kemikler; kemik ana dokusu, kemik iliği ve bunları çevreleyen kemik zarı ve damar ve sinir sistemlerini içeren kompleks bir yapıya sahiptir.

Anatomik olarak uzun, kısa, yassı kemikler ve düzensiz kemikler olmak üzere dört genel kemik kategorisi vardır.

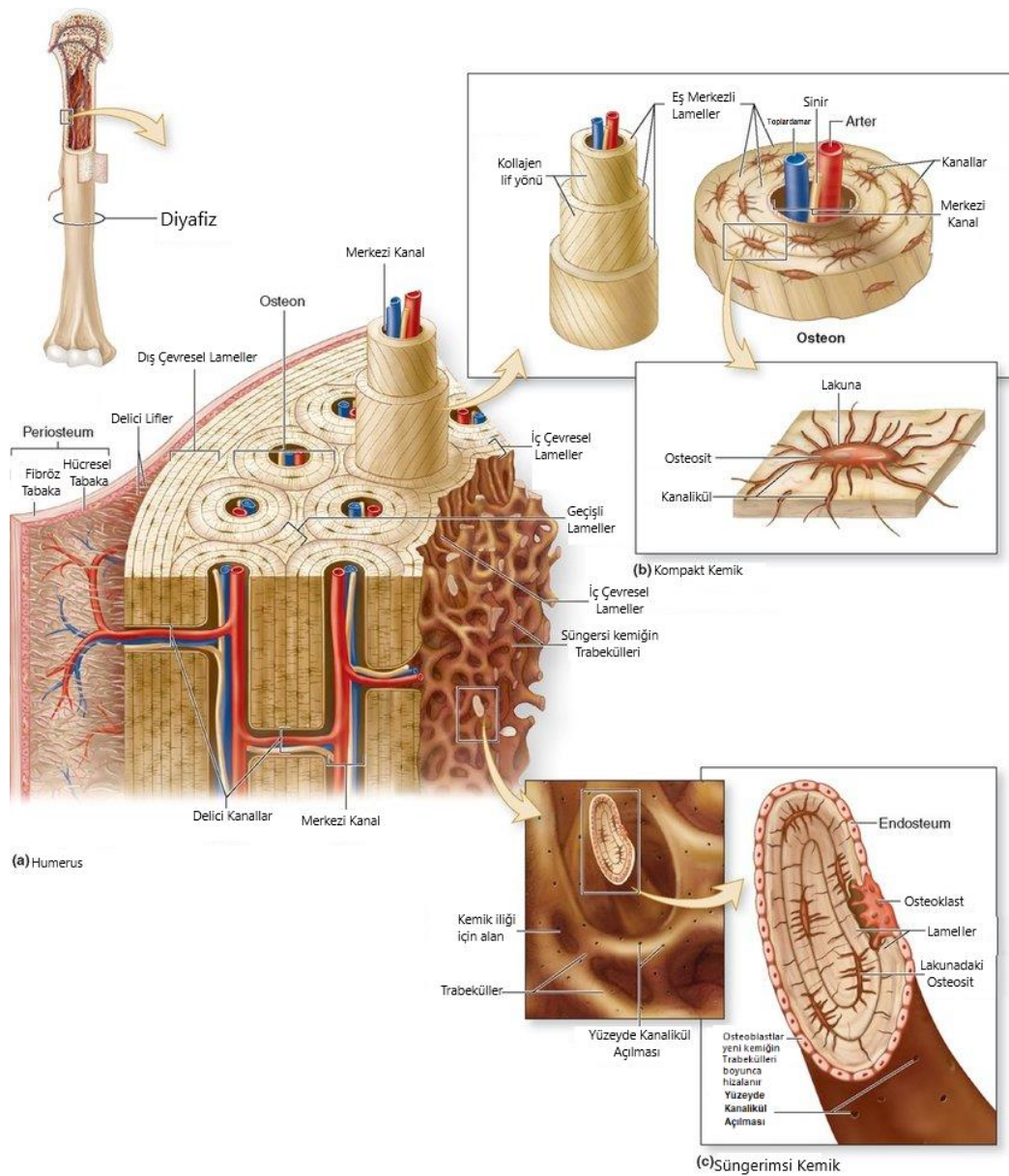
Histolojik gelişim açısından incelenmesi ile primer ve sekonder kemik oluşumu gözlenir. Primer kemik doku (immatür kemik doku), geçici bir doku olup, yetişkinlerde sekonder kemik doku ile değiştirilir.

Erişkin insan iskeleti genel olarak %20 trabeküler kemik, %80 kortikal kemik ihtiva eder (Melsen ve Steiniche, 1993). Farklı iskelet bölgeleri kemikleri farklı trabeküler ve kortikal kemik oranları içerir (Clarke, 2008).

Kemiği oluşturan bu kısımlar histomorfolojik olarak aynı elemanlardan oluşurlar ve bunların organizasyonları farklıdır. %80-90 arasında kompakt kemik kalsifikasyon oranı mevcut iken bu oran trabeküler kemikte sadece %15-25 düzeyindedir. Koruyucu ve mekanik özellikleri daha baskın olan kortikal kemikken, esas olarak metabolik fonksiyonların etkin olduğu kısım trabeküler kemiktir. Kemikteki yeniden düzenleme açısından daha aktif olan kısım trabeküler kemik yapısıdır.

Kemik dokusu, mineralize kollajen liflerinin doku içinde nasıl düzenlendiğine bağlı olarak süngerimsi (spongy) kemik ve kompakt kemik olarak bilinen iki türden biri olarak

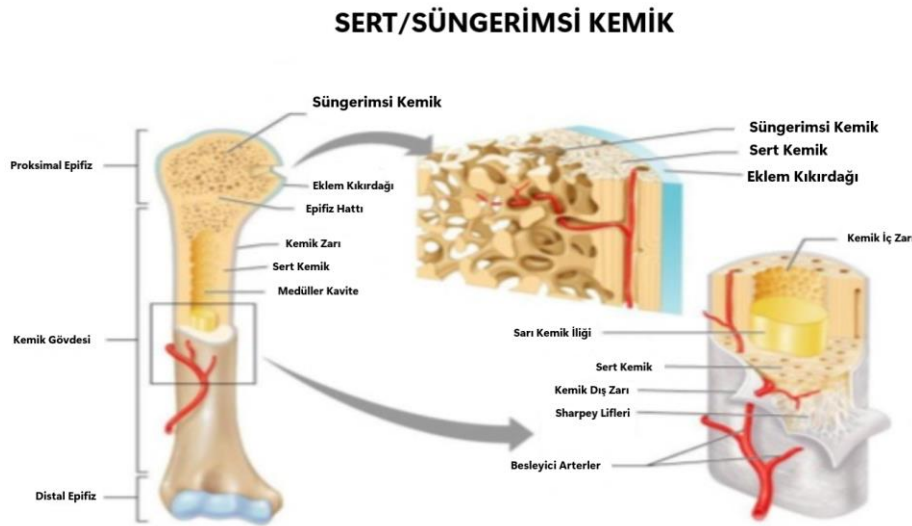
sınıflandırılabilir. Kemik dokusu, osteon olarak bilinen işlevsel birimler halinde düzenlenmiştir. Her bir osteonun içinde, merkezi bir Havers kanalı çevreleyen lamel adı verilen eşmerkezli halkalar halinde düzenlenmiş mineralize kollajen katmanları vardır. Her Havers kanalında da kemiğin içinde yaşayan hücrelere besin sağlayan kan damarları vardır. Lameller arasında lakuna adı verilen küçük delikler vardır ve her boşlukta osteositler bulunur. Osteositler diğer osteositlere kanalikül adı verilen çok küçük kanallarla bağlanır. Bu onların birbirleriyle iletişim kurmalarını sağlar. Şekil 2.1’de kemik doku anatomisi gösterilmektedir.



Source: Mescher AL: *Junqueira's Basic Histology*, 13th Edition: www.accessmedicine.com
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Şekil 2.1. Kemik dokuya ait genel görünüm (Mescher, 2021).

Kemik zarı; kemiğin iç-dış yüzeylerini saran, bağ doku lifleri ve hücrelerinden oluşan kısımdır (Erdost, 2011). Periosteum (Periost) kemik yapıyı dış kısımdan örten kalın bir tabaka olup, fibroblastları ve kollajen fibrillerini barındırır, burada kan-lenf damarları ve sinir lifkerinden oluşan bir ağ yapı bulunur. Osteojenik bir özelliktedir (Erdost, 2011; Eşrefoğlu, 2016; Topaloğlu, Ketani ve Saruhan, 2017). Endosteum (Endost) tabakası ise daha incedir ve kemiğin iç kısmındaki boşlukları sarar. Tek katlı yassı, kübik osteoprojenitör hücreler ve retiküler bağ dokusundan oluşur ve osteoprojenitör hücre ve osteoblast kaynağıdır. Bu zarlar kemik dokusunun beslenme, büyüme ve onarım için gereklidir (Erdost, 2011; Topaloğlu ve diğerleri, 2017). Periosteal yüzey aktivitesi, apozisyonel büyüme ve kırık onarımı için önemlidir (Clarke, 2008). Aşağıda şekil 2.2’de kemiğin Periosteum, Endosteum ve kan-lenf damarları gösterilmektedir.

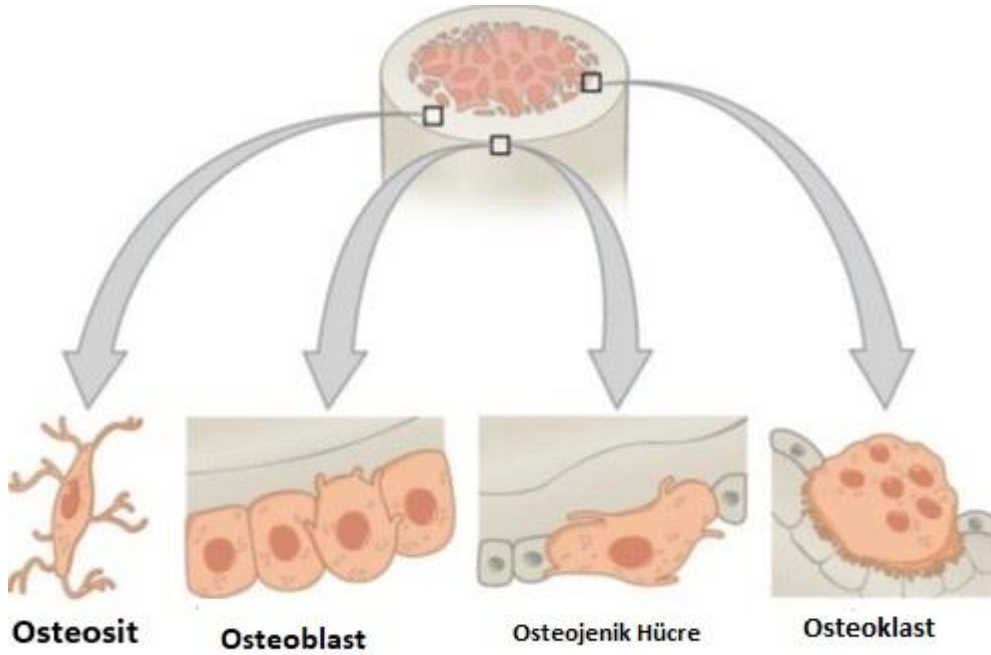


Şekil 2.2. Kemik dokuya ait detaylı görünüm (Martini, Nath ve Bartholomew, 2017).

Kemik doku yapısı genel olarak kemik dokusu hücreleri ve salgılanan molekülleri ile matrix organik-inorganik maddeler olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır.

Kemik dokusu hücreleri

Histolojik olarak incelendiğinde Osteoprojenitor, Osteoblastlar, Osteositler ve Osteoklastlar olmak üzere dört tip hücre gözlenmektedir. Şekil 2.3’te hücrelerin genel görünümü verilmektedir.



Şekil 2.3. Kemik doku hücreleri (Betts ve diğerleri, 2013).

Osteoprogenitor hücreler (osteojenik hücre)

Osteojenik hücreler olarak da bilinen osteoprogenitör hücreler, kemik onarımı ve büyümesinde önemli bir rol oynayan kemikteki kök hücrelerdir. Bu hücreler, daha özelleşmiş kemik hücrelerinin (osteositler ve osteoblastlar) öncüleridir ve kemik iliğinde bulunurlar. Osteoprogenitör hücreler, mezenkimal hücrelerinden kaynaklanır ve olgunlaşmış kemiklerin yüzeyinde iğsi hücrelere dönüşür. Osteoprogenitör hücrelerin işlev bozukluğu kemikleşmeyi geciktirebilir (Nahian ve Davis, 2023).

Osteoblastlar

Kemik oluşturma işlevleriyle tanınan toplam yerleşik kemik hücrelerinin yaklaşık %4-6'sını oluşturan ve kemik yüzeyi boyunca yer tutan kübik hücrelerdir (Capulli, Paone ve Rucci, 2014; Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões ve Cerri, 2015). Bu hücreler, kemik yüzeyleri boyunca, çoğunlukla periosteum veya endosteumda toplanır ve bol miktarda protein sentezleyen hücrelerin morfolojik özelliklerini gösterir; buna kapsamlı bir granüllü endoplazmik retikulum (RER), Golgi aygıtı, çok sayıda salgı vezikülleri ve mitokondri dahildir (Henry ve Bordoni, 2023). Daha sonra morfolojik yapılarında değişikliklere uğrayarak büyük ve kübik hücreler haline gelirler. Preosteoblastların olgun

osteoblastlara dönüşümü, osteokalsin (OCN), osteriks (Osx) ekspresyonunda artma, kemik sialoproteini (BSP), kollajen tip I gibi kemik matriks proteinlerinin salgılanmasındaki artışla karakterize edilir (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015; Glass ve diğerleri, 2005). Fibroblast büyüme faktörü (FGF), MikroRNA'lar ve Connexin 43 gibi diğer faktörlerin osteoblast farklılaşmasında önemli roller oynadığına dair kanıtlar vardır (Kapinas, Kessler, Ricks, Gronowicz ve Delany, 2010; Montero ve diğerleri, 2000).

Osteoblast hücre zarı karakteristik olarak paratiroid hormon (PTH) reseptörleri ve alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi yüksek oranda bulunurlar. Bu aktivite özellikle kemik matriks sentezi sırasında tepe noktaya çıkar. Bu sebeple serum ALP düzeyi kemik formasyonunun bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bu hücre zarında kalsitonin reseptörü yoktur. Osteoblastlarda Vitamin D ve östrojen reseptörleri ise hücre çekirdeğinde yer alır.

Sitoplazma ise ALP enzimi yönünden zengindir. Bu enzim, kalsiyumun (Ca) kalsiyum fosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) şeklinde matrikste çökmesini sağlayarak kemik matriksin kalsifikasyonunda görev alır. Osteoblastlar tarafından yeni sentezlenen ve henüz kalsifiye olmamış kemik matriksine Osteoid denir. Osteoblastlar, salgıladıkları bu osteoid yapı içerisinde gömülü kalırlar ve matriks kalsifiye olduğunda faaliyetlerini azaltarak Osteosit haline dönüşürler. Osteoblast ve osteositler, bölünme yeteneği olmayan hücrelerdir (Eşrefoğlu, 2016; Florencio-Silva ve diğerleri, 2015). Şekil 2.4'te osteoblastların oluşum süreçlerini tanımlayan Osteoblastogenezis gösterilmektedir.

Osteositler

Osteositler, dendritik bir morfoloji gösterdikleri mineralize kemik matriksi ile çevrili lakünler içinde bulunur (Dallas, Prideaux ve Bonewald, 2013; Palumbo, Palazzini, Zaffe ve Marotti, 1990; Rochefort, Pallu ve Benhamou, 2010). Gömülü halde bulunan osteositlerin morfolojisi kemik tipine göre değişir (Currey, 2003). Osteoblast/osteosit dönüşümü sırasında, osteositler kemik matriksi içine alınmadan önce sitoplazmik süreç başlar (Capulli ve diğerleri, 2014). Granüllü endoplazmik retikulum ve golgi gibi organellerin sayısı azalır ve çekirdek-sitoplazma oranı artış gösterir, bu durum protein sentezi ve salgılanmasında bir azalmaya sebep olur (Schaffler, Cheung, Majeska ve Kennedy, 2014). Tamamen mineralize kemik matriksi içinde hapsolmuş olgun osteosit aşaması tamamlandığında, OCN, BSP, kollajen tip I ve ALP gibi önceden ifade edilen

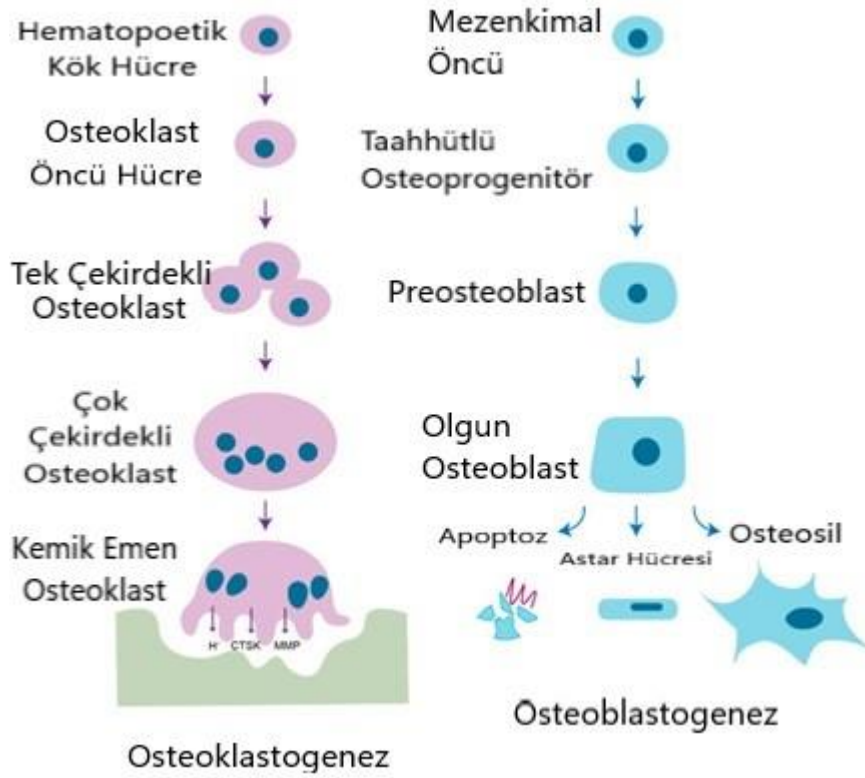
osteoblast belirteçlerinin birçoğu aşağı doğru düzenlenir. Öte yandan dentin matriks proteini 1 (DMP1) ve sklerostini içeren osteosit belirteçleri yüksek oranda eksprese edilir (Bonewald, 2011; Florencio-Silva ve diğerleri, 2015; Mikuni-Takagaki ve diğerleri, 1995). Lakünokanaliküler sistemle osteositler, birbirine bağlı ağları mekanik basınçları ve yükleri tespit etme kapasitesine sahiptir ve bu sayede kemiğin mekanik kuvvetlere adaptasyonuna yardımcı olarak bir tür mekanosensörler olarak hareket ederler (Rochefort ve diğerleri, 2010). Bu sebeple osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin düzenlenmesi yoluyla, kemiğin yeniden şekillenmesinde orkestratörler gibi hareket ediyor gibi görünmektedirler (Dallas ve diğerleri, 2013). Kemik dokunun canlılığını devam ettirebilmesi osteositlerin varlığı ile olmaktadır. Yaşlanarak ölen osteositlerin bulundukları yerdeki matriks bozunmaya başlar ve osteoklastlar tarafından eritilerek rezorbe edilir. Kemik matriksi kalsifiye şeklinde olduğu için madde taşınımı osteositler üzerinden gerçekleşir (Topaloğlu ve diğerleri, 2017). Ayrıca, osteositlerin apoptozu osteoklastik kemik rezorpsiyonu için kemotaktik bir sinyal olarak kabul edilmektedir (Plotkin, 2014). Benzer şekilde, kemik rezorpsiyonu esnasında apoptotik osteositlerin osteoklastlar tarafından yutulduğu gösterilmiştir (Faloni, Sasso-Cerri, Katchburian ve Cerri, 2007).

Osteoklastlar

Osteoklastlar, osteoblastlar (B F Boyce, Hughes, Wright, Xing ve Dai, 1999) tarafından salgılanan makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve osteositler ile stromal hücreler tarafından salgılanan RANK ligandı gibi birkaç faktörün etkisi altında hematopoietik kök hücre soyunun mononükleer hücrelerinden kaynaklanır (B F Boyce ve diğerleri, 1999). Osteoklastlar kemik rezorpsiyondan sorumlu olup kandan gelen monositler ile kaynaşarak oluşurlar. Kemik yapımı aşamasında ortaya çıkar ve kemikler son şeklini aldığı zaman kaybolurlar. Osteoklastlar çok çekirdekli, mitokondri ve vakuoller yönünden zengin büyük hücrelerdir (100 µm) (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, Alobera-Gracia, del-Canto-Pingarrón ve Blanco-Jerez, 2006). Osteoklast progenitörleri, kemik yüzeylerinde birleşir, ancak esas olarak kemik iliğinde bulunurlar; burada, nihai olarak hematopoietik kök hücrelerden kaynaklanan miyeloid progenitör hücrelerden kaynaklanan makrofaj/dendritik hücre öncülerinden türerler (Khan ve Bordoni, 2023).

Makrofaj-koloni stimulan faktör (M-CSF) yüksek düzeylerde ise osteoklast gelişimini inhibe ederken, fizyolojik konsantrasyonlarda osteoklastların oluşum ve devamlılığına etki

etmektedirler. Fakat M-CSF tek başına osteoklast oluşumu için yeterli değildir ve RANKL osteoklast oluşumu için kritik olan diğer sitokinlerdir. Şekil 2.4'te osteoklastların oluşum süreçlerini tanımlayan Osteoklastogenezis gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Osteoblast ve Osteoklast hücrelerinin gelişimi (J.-M. Kim, Lin, Stavre, Greenblatt ve Shim, 2020).

Matrix

Kemik dokusu, Tip I kollajen (KOL-I) ve kemik hücre dışı matriksi (ECM) gibi mineralize olmayan organik yapıları ve mineralize olan inorganik karbonatlı apatit yapılarını içermektedir. Kemik proteini, %85-90 oranında kollajen proteinlerden oluşur. Kemik matriksi çoğunlukla tip I kollajenden oluşur (Brodsky ve Persikov, 2005; Clarke, 2008). Kollajen olmayan proteinler, toplam kemik proteininin %10 ile 15'ini oluşturur. ECM içeriğinde glikoproteinler, proteoglikanlar, sialoproteinler gibi çok çeşitli matriks proteinleri vardır. Kemiğin inorganik bileşenleri içerisinde hidroksiapatit kristalleri şeklinde bulunan Ca ve fosfat, magnezyum, sitrat gibi bileşenler bulunur. Kemiğe dayanıklılık veren kollojen iplikleri, sertlik veren hidroksiapatit kristal yapılarıdır. Bu kristaller, kollojen fibril ağı içinde depo edilerek çevreleri su ve iyonlardan oluşan bir

tabaka ile sarmalanmıştır. Bu tabaka vücudun kalsiyum ve fosfor ihtiyacı durumlarında kemik yapıdan kana Ca ve P verilmesine yardım eder (Junqueira LC, 2013).

Kemik, inorganik tuzlar ve organik bir matriks içerir. Organik matriks kollajen proteinler (%90), çoğunlukla tip-I kollajen ve osteonektin, osteokalsin, fibronektin, osteopontin ve kemik sialoprotein-II, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) ve büyüme faktörleri dahil kollajen olmayan proteinler içerir. Ayrıca biglikan, dekorin, lumikan, osteoaderin ve serik proteinleri içeren lösinden zengin küçük proteoglikanlar da vardır (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015). Kemik inorganik materyali çoğunlukla kalsiyum, fosfat iyonlarından oluşur, ayrıca önemli miktarlarda sodyum, magnezyum, karbonat, bikarbonat, potasyum, çinko, baryum, sitrat, florit, stronsiyum da mevcuttur (Downey ve Siegel, 2006). Kemik matriksi, mekanik destek veren ve kemik homeostazında önemli rol oynayan karmaşık ve organize bir çerçeve oluşturur. Kemik matriksi, kemik hücrelerinin aktivitesine müdahale eden molekülleri serbest bırakabilir ve sonuç olarak kemiğin yeniden şekillenmesinde rol oynar. Kemik kütlesi kaybı tek başına kemik kırıklarını açıklamada yeterli olmadığında (Sornay-Rendu, Boutroy, Munoz ve Delmas, 2007), kemik matriks proteinlerindeki değişiklikler ve bunların modifikasyonları dahil olmak üzere diğer faktörlerin çok önemli olduğu ileri sürülmektedir. Aslında, kolajenin kemik dokusunun yapısında ve işlevinde kritik bir rol oynadığı da bilinmektedir (Viguet-Carrin, Garnero ve Delmas, 2006).

2.1.2. Kemik metabolizması, döngüsü

İnsan hayatı boyunca sürekli eski kemik dokusu ortamdan uzaklaştırılır (rezorpsiyon, emilim, erime) ve yerine yeni kemik dokusu (oluşum) gelerek yeni ve sağlıklı bir kemik yapı sağlanır.

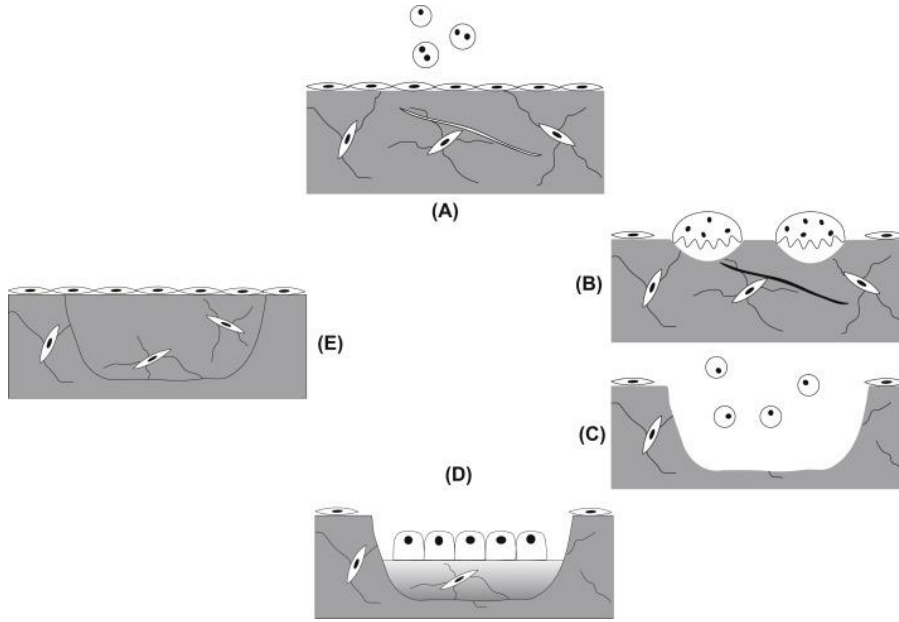
Kemik rezorpsiyonu esnasında osteoklast küçük miktarlarda kemik dokuyu, enzimler ise protein ağını çözündürür. Ardından osteoblast kemik oluşumunu başlatarak yeni protein ağının oluşmasına yardımcı olacak çeşitli bileşikler salgırlar. Oluşan protein ağı daha sonra kalsiyum ve fosfatla mineralize olarak ve yeni kemik dokusunu oluşturur. Kemik dokuyu sağlam ve canlı tutmak için vücut içerisinde sürekli yeniden biçimlendirme süreci devam eder.

Modelleme, iskeletin karşılaştığı fizyolojik etkilere veya mekanik kuvvetlere yanıt olarak kemiklerin genel şeklini kademeli olarak değiştirme sürecidir (Clarke, 2008).

Kemiklerin biyomekanik kuvvetlere yanıt oluşturarak osteoblast ve osteoklastların bağımsız hareketi ile uygun olarak yüzeylerde kemiğin çıkarılması veya eklenmesiyle eksenleri genişleyebilir veya değişebilir. Kemikler normalde yeni kemiğin periosteal yerleşimine ve eski kemiğin endosteal rezorpsiyonuna yanıt olarak yaşlanma ile genişler. Kemik yeniden şekillenmesi, kemiğin gücünü ve mineral homeostazını korumak için kemiğin yenilendiği süreçtir. Yeniden şekillenme süreci, eski kemiği rezorbe eder ve kemik mikro hasarının birikmesini önlemek için yeni kemik oluşturur. Yeniden yapılanma (remodeling) süreci doğumdan önce başlar ve ölüme kadar devam eder.

Kemik yeniden yapılanması, osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve kemiği döşeyen hücrelerin uyumlu eylemleriyle elde edilen oldukça karmaşık bir döngüdür (Robling, Castillo ve Turner, 2006). Bu hücrelerin oluşum, proliferasyon, farklılaşma ve aktivitesi lokal ve sistemik faktörler tarafından kontrol edilir (Phan, Xu ve Zheng, 2004). Lokal faktörler, kemik rezorpsiyonu esnasında salınan kemik matriks faktörlerinin yanı sıra, kemik hücreleri tarafından üretilen büyüme faktörleri, prostaglandinler ve sitokinler gibi otokrin ve parakrin molekülleri içerir. Kemik homeostazının korunması için önemli olan sistemik faktörler arasında paratiroid hormon (PTH), 1,25-dihidroksivitamin-D3 (Vitamin D), kalsitonin (CAL), glukokortikoidler, östrojenler, androjenler bulunur. Östrojen, kemik doku homeostazı için çok önemli roller oynar. Menopozda görülen östrojen seviyesindeki düşme kemik kaybı ve osteoporozun ana nedenidir (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015).

Yeniden modelleme döngüsü beş ardışık aşamadan oluşur. Aktivasyon, osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonu, kemik rezorpsiyonundan kemik oluşumuna geçildiği reversal faz ve kemik oluşumunun tamamlandığı formasyon ve sükunet fazlarıdır. Şekil 2.5'te modellemenin aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Yeniden şekillenme döngüsü. Yeniden modelleme döngüsü beş aşamadan oluşur: (A) aktivasyon; (B) rezorpsiyon(erime); (C) tersine çevirme; (D) oluşum; ve (E) sükunet. Herhangi bir zamanda, vücuttaki yeniden şekillenme döngüleri çeşitli aşamalardadır (Allen ve Burr, 2019).

Aktivasyon: Aktivasyon aşaması, osteoklast öncüllerinin kemik yüzeyine alınmasını, ardından tamamen işlevsel osteoklastlar haline gelmek için farklılaşmalarını ve füzyonlarını temsil eder.

Aktivasyon, mononükleer monosit-makrofaj osteoklast öncülerinin dolaşımdan alınmasını ve aktivasyonunu, astar hücrelerini içeren endosteumun kemik yüzeyinden kaldırılmasını ve çok çekirdekli preosteoklastlar oluşturmak için çok sayıda mononükleer hücrenin kaynaşmasını içerir. Preosteoklastlar, hücre zarlarındaki integrin reseptörleri ve matriks proteinlerinde RGD (arginin, glisin ve asparagin) içeren peptitler arasındaki etkileşimler yoluyla kemik matriksine bağlanır ve çok çekirdekli osteoklastların altında kemik emen bölmelerin çevresinde halka şeklinde sızdırmazlık bölgeleri oluşturur (Clarke, 2008).

Osteoklast oluşumu, aktivasyonu ve emilmesi, NF- κ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatör, osteoprotegerin (OPG), IL-1 ve IL-6, koloni uyarıcı faktör, paratiroid hormonu, 1,25-dihidroksivitamin D ve kalsitonin tarafından düzenlenir (Boyle, Simonet ve Lacey, 2003). Emici osteoklastlar, H⁺ -ATPase proton pompaları ve hücre zarlarındaki klorür kanalları aracılığıyla kemik emen bölme içindeki pH'ı 4,5'e düşürmek için, emici bölmeye doğru kemik mineralini harekete geçirmeye yardımcı olan hidrojen iyonları salgılar. Emici

osteoklastlar, organik matriksi sindirmek için sitoplazmik lizozomlardan tartarat dirençli asit fosfataz, katepsin K, matriks metalloproteinaz 9 ve jelatinaz salgılar, bu da kortikal kemikte Havers kanalları ve trabeküler kemiğin yüzeyinde daire şeklinde Howship boşluklarının oluşmasına neden olur. Rezorpsiyon fazı, çok çekirdekli osteoklastlar apoptoza girdikten sonra mononükleer hücreler tarafından tamamlanır (Clarke, 2008).

Rezorpsiyon (Kemik Erimesi): Olgun osteoklastlar mevcut olduğunda, kemik kaplama hücreleri, mineralize matriksi osteoklastlara maruz bırakmak için yüzeyden geri çekilir. Bu aktif bir süreç gibi görünmektedir ve yüzeye yaklaştıkça osteoklastların kendileri tarafından veya yeniden şekillenmeyi başlatan aynı sinyaller tarafından uyarılır. Kemik astarı hücrelerinin geri çekilmesi olmadan, osteoklastlar kemiğe bağlanamaz ve rezorpsiyona başlayamaz. Bağlanma sırasında, osteoklastlar aktif olarak minerali çözer ve kollajen parçalarını serbest bırakır. Bu fragmanlar kanda ve idrarda ölçülebilir, böylece kemiğin yeniden şekillenmesinin değerlendirilmesi için faydalı biyobelirteçler sağlar (Allen ve Burr, 2019).

Tersine çevirme: Geri dönüş fazı, osteoklast rezorpsiyonunun kesilmesi ve kemik oluşumunun başlaması ile karakterize edilir.

Oluşum ve Sessizlik (Dinlenme) fazları: Bir kemik yeniden modelleme döngüsünün tamamlanmasında ortaya çıkan kemik yüzeyi, kemik kaplama hücreleri ile kaplanır. Yeniden modelleme ünitesindeki matriks zamanla mineralleşmeye devam eder. Herhangi bir zamanda, kemik içindeki kemik yüzeylerinin çoğu hareketsiz durumdadır.

Kemiğin yeniden şekillenme hızı, kırık için bağımsız bir risk faktörüdür. Kemik mineral yoğunlukları için eşleştirildiğinde, yüksek kemik yeniden şekillenme oranlarına sahip bireyler, düşük yeniden şekillenme oranlarına sahip olanlara göre daha fazla kırılma riski altındadır. Yüksek yeniden şekillenmeye sahip bireyler, yüksek kemik mineral yoğunluğuna (BMD) sahip olsalar bile, daha düşük BMD'ye sahip bireylerinkine önemli ölçüde eşdeğer bir kırık oranlarına sahiptir. Bu ilişkinin bir sonucu olarak, kemiğin yeniden şekillenmesinin değerlendirilmesi yararlı bir teşhis aracıdır. Kadınlarda, osteoklastlar üzerindeki doğrudan etkileri ve osteoklast apoptozunun baskılanması yoluyla yeniden şekillenmeyi baskılayan dolaşımdaki östrojen kaybı nedeniyle menopozda yeniden şekillenme artar.

2.1.3. Kemik metabolizması hastalıkları

Kemik vücutta hareket, yumuşak doku ve organların desteklenmesi, korunması, Ca ve P depolanması ve kemik iliğinin barınması gibi önemli işlevleri yerine getirir. Kemiğin yeniden şekillenme süreci kırık iyileşmesi, iskeletin mekanik kullanıma adaptasyonu ve Ca homeostazisi için gereklidir (Dallas ve diğerleri, 2013). Kemik homeostazı, bağışıklık da dahil olmak üzere organizmanın diğer fonksiyonlarıyla yakından bağlantılı çok dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Bu süreçlerde yaşanan bozukluklar, yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen ve hatta yaşamı tehdit eden kronik veya akut çok sayıda hastalıkla ilişkilidir (Fan, Jahed ve Klavins, 2021). Öte yandan, kemik rezorpsiyon ve oluşumundaki dengesizlik, çeşitli kemik hastalıklarına neden olur. Bu nedenle, kemik oluşumu ve rezorpsiyon arasındaki denge gereklidir ve bu denge kemokinler, hormonlar, sitokinler, biyomekanik stimülasyon gibi lokal ve sistemik faktörlerin etkisine bağlıdır (Crockett, Mellis, Scott ve Helfrich, 2011; Florencio-Silva ve diğerleri, 2015; Phan ve diğerleri, 2004).

Fizyolojik koşullar altında, osteoklast aracılı kemik yıkım yoluyla kemik kaybı, ardından kemik yapısının korunmasını sağlayan osteoblast aracılı kemik oluşumu yoluyla kemik replasmanı şeklinde döngü halindedir. Osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki devam eden bu etkileşimdeki dengesizlikler osteoporoz, romatoid artrit, periodontitis, osteolitik kemik metastazları, Paget'in kemik hastalığı gibi patolojik durumlara yol açabilir (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022; Sepici-Dincel, 2020). Bunlar arasında en iyi bilineni bir kemik hastalığı olan osteoporozdur (Cosman ve diğerleri, 2014).

Kemik metabolizmasındaki düzensizlikler sebebiyle sadece kemiğin kendi dokusunda patolojiler görünmeyip başka sistemsel hastalıklar da görülmektedir. Romatizmal hastalıklar kas iskelet sistemine etki eder. Bu grupta en yaygın görülen hastalık Romatoid Artrit (RA)'tir. Romatoid artrit gibi bozukluklar lokal, özellikle periartiküler kemik erozyonları özelliği gösterir.

2.2. Osteoporoz

Kemik homeostazı, birçok organizma fonksiyonlarıyla yakından bağlantılı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçlerdeki bozukluklar, yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen ve hatta

yaşamı tehdit eden kronik veya akut çok sayıda hastalıkla ilişkilidir. Bunlar arasında en iyi bilineni bir kemik hastalığı olan osteoporozdur.

Osteoporoz (OP), birim hacime düşen kemik kütlesinde azalma, kemik doku mikromimarisinin ve kemik kalitesinin bozulması sonucu kırılabilirliğinin artması ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığı olarak tanımlanır (Kışlak ve Genç, 2019).

Bu dinamik dokuda gözlenen değişiklikler, osteoporoz, buna bağlı kırık riski ve artmış mortalite ile ilişkili komplikasyonlara neden olur. Osteoporoz yüksek bir prevalans oranına sahiptir (Cosman ve diğerleri, 2014). İlerleyici, sistemik bir iskelet bozukluğu ve metabolik kemik hastalıklarının en yaygın tiplerinden biridir ve bunun sonucunda kemik kırılabilirliği ve kırılma duyarlılığı artar. Osteoporotik kırıkların çoğunluğu osteoporozlu bireylerde değil, osteopenik, kemik mineral yoğunluğu (BMD) düşük olan bireylerde görülür. Bu nedenle Osteoporoz teşhisi yanında kırık riskini tahmin etmek de önemli ve gereklidir (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022; Sepici-Dincel, 2020).

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre OP teşhisi hastanın kemik mineral yoğunluğunun aynı cins ve ırktaki genç erişkin popülasyonun ortalaması ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

Nihayetinde, osteoporozun patogenezi, osteoklastların kemiği rezorbe etme yeteneği ile osteoblastların kemik oluşturma kabiliyeti arasındaki dengesizlikten kaynaklanır ve bu dengesizliğin etiyolojisi, belirli bir hastada mevcut olan osteoporoz için klinik risk faktörlerine bağlıdır. Bu risk faktörleri arasında menopoza sonrası hormonal değişiklikler, ileri yaş, glukokortikoidlerle tedavi, hipertiroidizm veya hiperparatiroidizm gibi diğer endokrinopatiler veya kronik sistemik inflamasyon yer alabilir. (Greenblatt, Tsai ve Wein, 2017).

2.2.1. Osteoporozda tanı

Osteoporozda tanı, kemik kütlesinin ölçülmesi veya histomorfometrik analizlerle konabilir. OP araştırmalarında önerilen rutin klinik prosedür hastanın öyküsü, fizik muayene, laboratuvar testleri, lomber ve torasik omurganın konvansiyonel radyografisi ve Dual

Enerji X-ışını Absorpsiometrisi (DXA) kullanarak kalça veya lomber vertebraların kemik mineral yoğunluğunun ölçülmesidir (Kışlak ve Genç, 2019).

Dünya Sağlık Örgütü osteoporoz tanısında altın standart olarak görüntüleme yöntemlerinden “dual enerji X-ışını absorpsiometrisi (DXA)’ni önermektedir (Kanis, 2008). DXA ile kemik mineral yoğunluğu (Bone Mineral Density, BMD) ölçümü sadece tanıda değil, kırık riskini belirlemede, farmakolojik tedaviye başlama sürecinde, tedavi takibinde de faydalıdır.

İskelet sistemindeki herhangi bir bölgenin kırık riski o bölgenin BMD ölçümü ile belirlenir. Elli yaş ve üzeri postmenopozal kadın ve erkekte WHO’nün tanısal kriterleri, ölçümlerin lomber vertebra ve femurun boyun bölgesinden yapılmasını tavsiye etmektedir. Herhangi bir bölgede düşük kemik yoğunluğunun saptanması osteoporotik kırık gelişebileceğinin bir göstergesidir (Watts ve diğerleri, 2010). Kalça ölçümleri ise osteoporotik kalça ve tüm vücutta gelişebilecek kırık riskini belirlemede vertebra ölçümlerine göre daha üstündür. Taramalarda ise kalça ve vertebranın beraber ölçümü önerilir (Black ve diğerleri, 1992; Siris ve diğerleri, 2001). Gerçekten de, kemik kırığı riskinin değerlendirilmesi için yeni bir güvenilir tahmin ediciyi belirlemek amacıyla, kemik mimarisinin analizi ve OP ile ilgili varyasyonların değerlendirilmesi için yıllar içinde farklı araçlar benimsenmiştir. BMD ile, osteoporoz ve osteomalazi ayırımı yapılamamaktadır. Ayrıca kalça ve vertebrada yaş ile birlikte gelişen osteofit, osteoartroz, kırık, kifoz, skolyoz, safra kesesi taşları, aortadaki kalsifikasyonlar, protez varlığında BMD ölçümleri olduğundan daha yüksek çıkabilir. Bu gibi vakalarda kantitatif komputerize tomografi ile değerlendirme önerilmektedir (Baim ve diğerleri, 2008; Kuo ve Chen, 2017; Molino, Montalbano, Pontremoli, Fiorilli ve Vitale-Brovarone, 2020).

Osteoporoz, kırık oluşuncaya kadar belirgin semptom ve kanıt olmayan sessiz bir hastalıktır. Osteoporozun erken teşhisi, etkin tedavi ve yüksek kırık riski olan hastaların belirlenmesi için kilit noktadır. Şu anda, osteoporoz tanısı ve kırık riskinin değerlendirilmesi, DXA tarafından BMD’nin nicel analizine dayanmaktadır. Bununla birlikte, DXA ile kemik kütlesinin BMD değerlendirmesinin altın standart yöntemi olmasına rağmen, kemik gücü hakkında sadece kısmen bilgi sağlar. Osteoporoz, kemik kırılabilirliği ile karakterizedir. Kemik kırılabilirliği, mikromimari, mikro hasar ve kemiğin dirençli kırılma yeteneğinin etkisiyle yeniden şekillenme oranları gibi tüm kemik

özellikleri ile tanımlanan mikromimari kalitesi ile değerlendirilir. DXA'nın iki boyutlu tekniği, kortikali süngerimsi kemikten ayırt etmek ve kemik geometrisinden kaynaklanan değişiklikleri karakterize etmek için içsel sınırlamaları ortaya çıkarır (Baofeng ve diğerleri, 2010; Permuy, López-Peña, Muñoz ve González-Cantalapiedra, 2019; Sommer, Hahn, Okutan, Marek ve Weinberg, 2019; Wanderman ve diğerleri, 2018).

Son zamanlarda, BMD dışında kırık risklerinin değerlendirilmesi ve ek bilgi sağlamak için çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Örneğin, kemik kaybını değerlendirmek için kantitatif bilgisayarlı tomografi (QCT) geliştirilmiştir (Adams, 2010; Kuo ve Chen, 2017; Lang ve diğerleri, 2002). QCT'de, trabeküler kemik için gerçek mineral yoğunluğu değeri, kemiğin kortikal kısmından elde edilmiştir (Felsenberg ve Boonen, 2005; Kuo ve Chen, 2017; Molino ve diğerleri, 2020). Bu görüntüleme teknikleri, yaygın kullanımları ve birinci basamak muayenesi için büyük hacimli cihaz, yüksek maliyet ve sınırlı erişilebilirlik gibi bazı sınırlamalara sahiptir. Görüntüleme tekniklerinin yanı sıra, osteoporozun erken ve doğru teşhisi için alternatif yöntemin geliştirilmesi hala önemlidir, çünkü osteoporozun erken evrede doğru teşhisi, önleme ve tedavi için daha iyi bir yönetime yol açar (Molino ve diğerleri, 2020).

2.2.2. Osteoporozda tedavi

Osteoporoz tedavisindeki ana amaç, kemik gücünü artırılmasıyla kırıkları önlemek, fiziksel kapasiteyi maksimumda tutmak, kırık ve iskelet deformitesine bağlı semptomları ayrıca ağrıyı ve yeni kırık insidansını, mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır (Kışlak ve Genç, 2019).

OP'un farmakolojik tedavisinde kemik yıkımını azaltan ve kemik yapımını artıran ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavide kalsiyum, D vitamini, bifosfonatlar (alendronat, risedronat, ibandronat, zoledronik asid), selektif östrojen reseptör modölatörleri, hormon replasman ilaçları, kalsitonin, parathormon, stronsiyum ranelat, denosumab, katepsin K inhibitörleri gibi geniş bir yelpazedeki ilaç grupları yer almaktadır (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022).

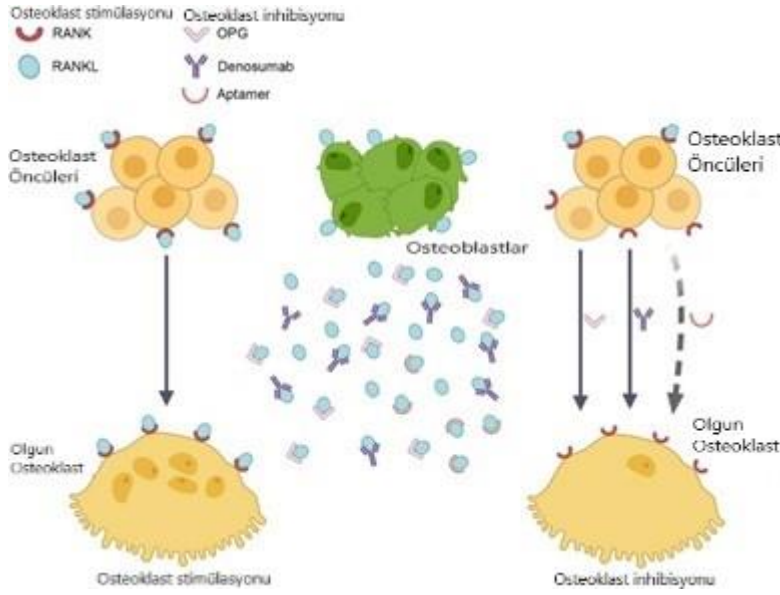
Tüm bu tedavi ajanları içinde geleneksel ve yaygın olarak bifosfanat grubu ilaçlar daha öne çıkmaktadır. Ancak bifosfonatların kullanımı ile maksilla ve mandibulada osteonekroz,

ateş ve grip belirtileri, gastrointestinal sorunlar, elektrolit bozukluğu, kas ve kemik ağrıları gibi yan etkilere rastlanabilmektedir (McClung, 2019; Sağlam ve Alisar, 2021). İntolerans ve kontrendikasyonlar nedeniyle oral bifosfonat kullanamayan veya kırık riski yüksek olan hastalarda intravenöz zoledronik asit veya denosumab kullanımı yaygındır.

Denosumab; RANKL'yi hedefleyen, ona yüksek afinite ve spesifikle bağlanarak osteoklast öncülleri ve osteoklastların yüzeyindeki reseptörü olan RANK aktivasyonunu engelleyen bir insan monoklonal antikorudur (IgG2). RANKL/RANK etkileşiminin bloke edilmesi osteoklast oluşumunu, fonksiyonunu ve sağkalımını inhibe eder ve böylece kortikal ve trabeküler kemikteki rezorpsiyonu azaltır. Oldukça etkili bir kemik yıkım inhibitörüdür. Tedavi sonrası birkaç gün içinde çok hızlı bir şekilde CTX düzeyleri tespit edilemez sınırlara düşer. Serum PINP düzeyleri de bu tedavi ile 3-6 ay arası bir sürede baskılanmaktadır (Lorentzon ve diğerleri, 2019; Sepici-Dincel, 2020). Yüksek fraktür riskine sahip postmenopozal kadınlarda FDA onayı bulunmaktadır (Kışlak ve Genç, 2019; Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022).

RANKL osteoklastların gelişimi, fonksiyonu, hayatta kalması için esansiyel olan bir moleküldür (Boyle ve diğerleri, 2003; Takayanagi ve diğerleri, 2002). Osteoklast farklılaşmasının tamamlanabilmesi için osteoblastik stromal hücrelerinden RANKL ekspresyonu, osteoklast prekürsörlerinden ise RANK ekspresyonu gerekmektedir (Theoleyre ve diğerleri, 2004; Tomruk Sütbeyaz, 2020; Wada, Nakashima, Hiroshi ve Penninger, 2006).

Hastalarda yılda iki kez Denosumab uygulaması kemik yoğunluğunu artırır ve vertebral, vertebral olmayan ve kalça kırıkları riskini azaltır (Cummings ve diğerleri, 2009; J.-M. Kim ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, beklendiği gibi, RANKL-RANK sinyal yolunun bloke edilmesiyle osteoklast oluşumunun inhibe edilmesi, osteoblast aracılı kemik oluşumunu indükleyen osteoklast türevi birleştirme faktörlerinin azalmasıyla sonuçlanır. Denosumab, üriner N-telopeptid (NTX) gibi kemik rezorpsiyon belirteçlerinde ani ve sürekli bir azalmaya ve serum kemiğine özgü alkalen fosfataz (BSAP) gibi kemik oluşumu belirteçlerinde gecikmeli bir azalmaya yol açar (Bekker ve diğerleri, 2004; McClung ve diğerleri, 2006). Şekil 2.6'da RANKL ve osteoklast arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Osteoklastogenezi baskılamak için mevcut ve varsayımsal RANKL inhibitörleri

Osteoblastlar, osteoklastların ve öncülerinin yüzeyinde bulunan reseptörü RANK'a bağlanan RANKL üretir. Bu bağlanma, preosteoklastların çok çekirdekli ve olgun osteoklastlara farklılaşmasını uyarır. İşlem doğal olarak OPG tarafından ve farmakolojik olarak denosumab tarafından önlenir, böylece osteoklast oluşumu, aktivitesi ve sağkalımı inhibe edilir. Spesifik olarak RANKL'ı hedefleyebilen ve osteoklastogenezi inhibe edebilen bir RANKL inhibitörü olan aptamer olduğunu varsayılır (N. Zhang ve diğerleri, 2020).

Denosumab, üç yıl kullanımında kalça kırık riskini %40, vertebra kırık riskini %68, nonvertebral kırıklarını ise %20 oranında azalttığı ileri sürülmektedir. Denosumab ayrıca yüksek kırık risk olan erkek bireylerde kemik kütlelerini artırmak için ve yine yüksek kırık riski olan prostat kanserli erkek hastalarda gonodotropin azaltıcı tedavisine bağlı ortaya çıkan kemik kaybında da kullanılabilmektedir (Kışlak ve Genç, 2019).

2.3. Romatoid Artrit

Romatizmal hastalıklar, hasta bakım masrafının artmasına, iş gücü kaybına, sakatlığa ve hatta erken ölümlere sebebiyet verebilmektedir. Bu sebeple, bu hastalıklar için yapılan teşhis ve tedaviye yönelik çalışmalar halk sağlığı alanında önemli gelişmelere yardım etmektedir.

Kemik metabolizmasındaki düzensizlikler sebebiyle sadece kemiğin kendi dokusunda patolojiler görünmeyip başka sistemsel hastalıklar da görülmektedir. Romatizmal hastalıklar kas iskelet sistemine etki eder. Bu grupta en yaygın görülen hastalık Romatoid Artrit (RA)'tir. Romatoid artrit gibi bozukluklar lokal, özellikle periartiküler kemik erozyonları özelliği gösterir. Ek olarak, bozukluğun enflamatuvar ortamı, artmış kemik rezorpsiyonu ve baskılanmış kemik oluşumu nedeniyle sistemik osteopeniyi de teşvik eder. Bununla birlikte, romatoid artrit oluşumu hemen hemen tüm kemik yıkım belirteçlerinde bir artış ve kemik oluşum belirteçlerinin baskılanması ile ilişkilidir. RA'li hastalarda OP ve osteoporoza bağlı kırık riskinde gözlenen artış sebebiyle erken yaşlarda osteoporotik kırıklara neden olmakta ve bu sebeple hastalığın morbidite ve mortalite oranını arttırmaktadır (Sindel, Esmailzadeh ve Şen, 2012).

Son yıllarda romatizmal hastalıkları olan hastaların yaşam süreleri belirgin şekilde artmış ve romatizmal hastalıklar ile osteoporoz arasındaki ilişki daha belirgin hale gelmiştir. OP ve buna bağlı fragilite kırıkları romatizmal hastalıkların morbidite ve mortalitesini artırmaktadır (L.-X. Gao, Jin, Xue, Wang ve Liu, 2015).

Romatizmal hastalıklar eklem tendonlarını, bağları, kemikleri ve kasları etkiler. Eklem enflamasyonu ile seyreden romatizmal hastalıklar başta OP olmak üzere kas iskelet sistemi ile ilgili komplikasyonlara neden olmaktadır. Kemik doku sürekli yapım ve yıkım gösteren dinamik bir dokudur, kronik enflamasyon bu sürece etkiyerek kemik kaybına yol açmaktadır. Bu hastalıklarda enflamasyonun kontrolü, yapısal kemik hasarını ve kemik kaybını azaltabilmektedir. RA'de sistemik kemik kaybının yanı sıra peri-artiküler osteopeni ve fokal kemik erozyonları ile karakterize olan lokal kemik kaybı görülebilmektedir (Deal, 2012; Sindel ve diğerleri, 2012).

RA'in tanısı klinik olarak konur. Direkt radyografiler en yoğun kullanılan görüntüleme yöntemidir (Tatar, 2022). Eklem çevresinde görülen osteopeni ilk gözlenen radyolojik bulgudur (van der Heijde ve diğerleri, 1990). Sinovit, teno-sinovit ve effüzyonlar gibi yumuşak doku değişikliklerinin saptanmasında ise özellikle fizik muayene bulguları belirsiz olduğunda, USG ve MRG kullanılır ve geleneksel radyografiye göre duyarlılıkları daha iyidir (Krabben ve diğerleri, 2013; Peluso ve diğerleri, 2011).

RA, serum ve eklemlerde romatoid faktör (RF), IgM ve IgG ve anti-CCP antikorlarının bulunduğu sinoviyal sıvının iltihaplanması olarak başlar. Komplemant, bulunan en önemli bileşenler olan C3a ve C5a ile sinovyal sıvı içinde aktive edilir (Castañeda-Lopez ve diğerleri, 2018). Hastalık, sitokinlerin üretimi ve hücre dışı matriks metaloproteinazların (MMP) etkisiyle devam eder (Rengel, Ospelt ve Gay, 2007). Sitokinler, otoimmüniteyi tetikleyen ve sürdüren, kronik inflamatuvar sinoviti koruyan ve bağ dokusunun yıkımını yönlendiren RA'nın patogenezinde rol oynar. Bu nedenle, RA'nın klinik ilerlemesinde gözlenen düzenleyici immün olayları ve dokuların yıkımını entegre ederler. Artritte önemli bir proinflamatuvar rol oynayan sitokinler, TNFa, IL-1 β , IL-6 ve IL-17'dir (McInnes ve Schett, 2007).

İmmünolojik faktörler arasında, yaygın olarak kabul edilen biyobelirteçler sitokinler, kemokinler, immün yanıt hücreleri ve adezyon molekülleridir. Sitokinler sıklıkla RA'de gelişen çözünür faktörlerin rolü dahilinde değerli bilgiler sağlar. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-15 ve IL-18, RA'da immün yanıt veya inflamatuvar süreçlere bağlı olarak düzenleyici bir rol oynayan en çok belgelenmiş sitokinlerdir (Castañeda-Lopez ve diğerleri, 2018).

RA'de farmakolojik tedavide kullanılan ajanlar; Narkotik olmayan analjezikler, Narkotik analjezikler, Steroid olmayan antienflamatuvar ajanlar (NSAID'ler), Kortikosteroidler, Hastalığı Değiştiren Anti Romatizmal İlaçlar (DMARD'lar: Sülfasalazin, Hidroksiklorokin, D-penisilamin Altın tuzları, İmmünosupresifler (Metotreksat, Azatiopürin, Leflunomid, Siklofosfamid), Biyolojik Tepki Değiştiricileri (Etanercept, infliksimab ve adalimumab) Tümör nekrozis faktör- α blokerleri (Abatasept, Anakinra, Rituksimab)'dir.

Asetilsalisilik asit, anti-enflamatuvar, analjezik ve antipiretik etkiler gösterir ve osteoartritin klinik tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardan biridir. Steroid olmayan bir anti-enflamatuvar ilaç olan diklofenak, eklem sertliğini ve ağrısını azaltır ve osteoartrit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu iki ilacın, potansiyel olarak kırık riskini azaltan kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı gösterilmiştir (J. Liu, Wu, Wang, Wang ve Sun, 2016).

Prednizolon (PSL), metilprednizolon (MPSL) ve triamsinolon (TR), çeşitli romatizmal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan orta etkili kortikosteroidlerdir.

Glukokortikoid aktivitesi genellikle anti-enflamatuar, anti-alerjik ve immünosupresif etkileri içerir. (Miyanishi ve diğerleri, 2005)

2.4. Kemik Döngüsü Biyobelirteçleri

Kemik doku ve ilgili hastalıkların tanı, tedavi ve takip yaklaşımlarını geliştirmek için çok daha derin araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır. Buna olan ihtiyaç en azından sadece yaşlanan nüfus nedeniyle artmaktadır.

Geleneksel olarak, kemiğin yeniden şekillenmesi, başlangıçta osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu takiben osteoblast aracılı kemik oluşumu ile sıralı, aşamalı bir süreç olarak tanımlanmıştır (Sims ve Martin, 2020). Bununla birlikte, osteoklast aktivitesi her zaman özelleşmiş yeniden şekillenme bölgeleriyle sınırlı değildir ve inflammatuar kemik kaybı gibi patolojik iskelet bozuklukları durumunda kemik rezorpsiyonunu her zaman osteoblast repopülasyonu takip etmez. Ayrıca, osteoklast kaynaklı eşleşme, kemik rezorpsiyon aktivitesinden bağımsız olarak gerçekleşebilir. Bu nedenle, kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinin mekansal ve zamansal düzenlemesi, fizyolojik ve patolojik bağlamlarda osteoklast/osteoblast iletişimini düzenleyen iletişim faktörlerinin daha fazla tanımlanması dahil olmak üzere daha fazla açıklama gerektirir (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020).

Bu bağlamda, kemik dokusu (pato)fizyolojisi hakkındaki bilgimizi ilerletmek için biyokimyasal aktiviteye doğrudan dahil olan metabolitlerin geniş ölçekli bir çalışması gereklidir. Bir hastalıkta yer alan metabolit yollarının tanımlanması, hastalığın gelişimi, teşhisi ve prognozunun anlaşılmasını büyük ölçüde destekleyebilir (Guijas, Montenegro-Burke, Warth, Spilker ve Siuzdak, 2018). Ayrıca, belirgin biyobelirteç tanımlaması, tanı doğruluğunu artırmak için geleneksel tanı yöntemleriyle birleştirilebilir.

Biyobelirteç “normal biyolojik ve patolojik süreçler veya terapötik bir işleme karşı farmakolojik cevabın göstergesi olabilen, objektif olarak ölçülerek değerlendirilmesi yapılabilen özellik” şeklinde tanımlanmaktadır.

Kemik döngüsü belirteçleri (BTM), osteoblastlar veya osteoklastlar tarafından kemik yeniden yapılanması sırasında salınan bir dizi protein veya protein türevi biyobelirteçtir. Osteoklastlar tarafından yıkım, osteoblastlar tarafından ise kemik yapımı yapılır. Kemik

yapım esnasında kolajen sentezi artmakta ve osteoblastik aktivite ile oluşan kemik matriks proteinleri açığa çıkmaktadır. Kemik yıkımında ise osteoklastlar kemik tip-1 kollajenini parçalarlar. Kollajenin parçalanması ile açığa çıkan peptid dizilerinin kan ve idrarda analizleri yapılarak kemik yapım-yıkım hızı tespit edilmeye çalışılmaktadır (Burch ve diğerleri, 2014; Greenblatt ve diğerleri, 2017; Konukoglu, 2019; Kuo ve Chen, 2017; Sepici-Dincel, 2020; Smolen ve diğerleri, 2020).

BTM'ler, kemik kütlelerinin radyografik ölçümlerini tamamlayan kemik kaybı ve kırık riski hakkında etkin tahmini bilgiler sunabilir. Radyolojik ölçümlerin maddi yük, ölçüme ulaşım güçlüğü gibi zorlukları vardır. BTM'ler, kemik metabolik bozukluklarının tanısı ve terapötik izlenmesi için yararlı biyobelirteçlerdir, ancak kullanımları, klinik yararları ve yorumlamayı zorlaştıran preanalitik değişkenler uygulamaları sınırlamaktadır. BTM'ler sadece kemik yoğunluğu ve hücre sayısı değil ayrıca kemiği etkileyen onkolojik ve romatolojik durumlarda da hastalık aktivitesi hakkında bilgi sağlayabilir. Kemik döngüsü belirteçleri ayrıca kemik döngüsünü incelemek için bize noninvaziv bir yaklaşım sağlar.

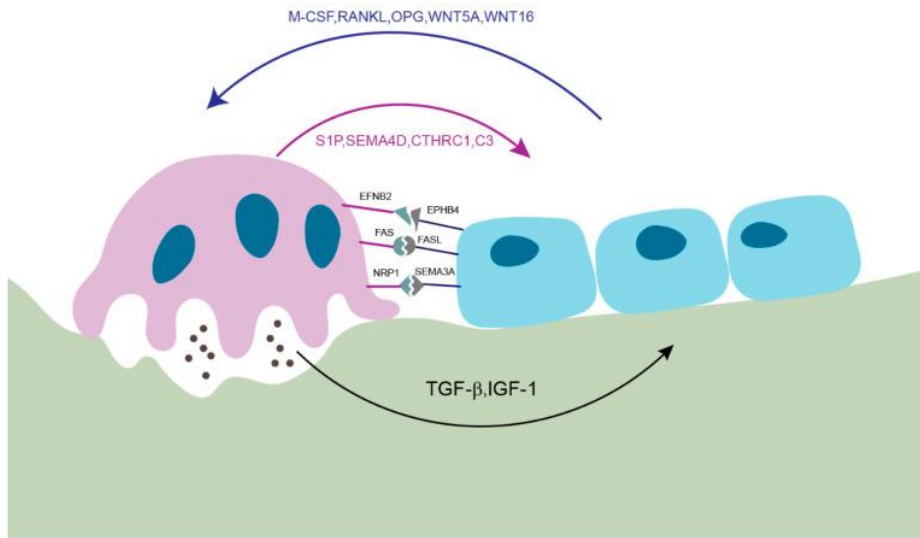
Osteoporoz gelişimi endokrin, metabolik, mekanik, immün, genetik ve inflamatuvar faktörler ile ilişkilidir. Hücresele seviyede kemiğin yeniden yapılanmasını değerlendirebilen geçerli BTM'nin kullanılması osteoporoz tedavisinin takibine bilimsel ve maddi katkı sağlamaktadır. BTM'nin ölçülmesi; kemik döngüsünün değerlendirilmesi, kırık riskinin saptanması ve tedaviye cevabın değerlendirilmesinde önemlidir.

BTM'lerin OP tanısında yeri yoktur (Burch ve diğerleri, 2014; Chesnut ve diğerleri, 1997; Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022). Biyokimyasal kemik döngüsü biyobelirteçleri BMD'den bağımsız olarak tedavi edilmemiş hastalar için kırık ve kemik kayıp hızını, tedavinin 3-6 aylarında tekrar edilerek, hastanın tedaviye uyumu ve ilacı doğru kullanıp kullanmadığını saptamada, tedavi öncesi ve sonrası BMD değişikliklerini, ilaca ara verilme ve tekrar başlama zamanını tayin etmede kullanılabilir (S Vasikaran ve diğerleri, 2011; Samuel Vasikaran ve diğerleri, 2011).

Kemik döngüsünün biyobelirteçleri ile ilgili çalışmalar son yıllarda artmıştır. Kemiğin yeniden şekillenmesinin mekanizması, kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumundan oluşur. Kemik biyobelirteçleri, kemik oluşumu biyobelirteçleri, kemik emilimi biyobelirteçleri ve

kemik döngüsünün düzenleyicilerini içeren kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinden üretilir. Kemik metabolizmasının tespitleri, kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde enzimlerin, proteinlerin ve yan ürünlerin biyobelirteçleri ile çalışılmıştır (Eastell ve Hannon, 2008; Ferreira, Alho, Casimiro ve Costa, 2015; He ve diğerleri, 2016; Kuo ve Chen, 2017; L. Liu ve Webster, 2016; Shi, Li, Liang, He ve Li, 2015).

Osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki doğrudan etkileşim, aktivasyon sinyallerinin EFNB2-EPHB4, FASL-FAS veya SEMA3A-NRP1 yoluyla çift yönlü iletilmesine izin vererek osteoblastların veya osteoklastların farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenler. Alternatif olarak, osteoblastlar, osteoklast farklılaşmasını ve gelişimini destekleyen veya baskılayan M-CSF, RANKL / OPG, WNT5A ve WNT16 dahil olmak üzere bir dizi farklı salgı molekülü üretir. Osteoklastlar ayrıca S1P, SEMA4D, CTHRC1 ve C3 dahil olmak üzere çözünür faktörlerin salgılanması yoluyla osteoblast oluşumunu ve farklılaşmasını da etkiler (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020). Şekil 2.7’de osteoblast ve osteoklastlar arasındaki aracı biyomoleküller gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Osteoblast-osteoklast etkileşiminin anahtar aracıları

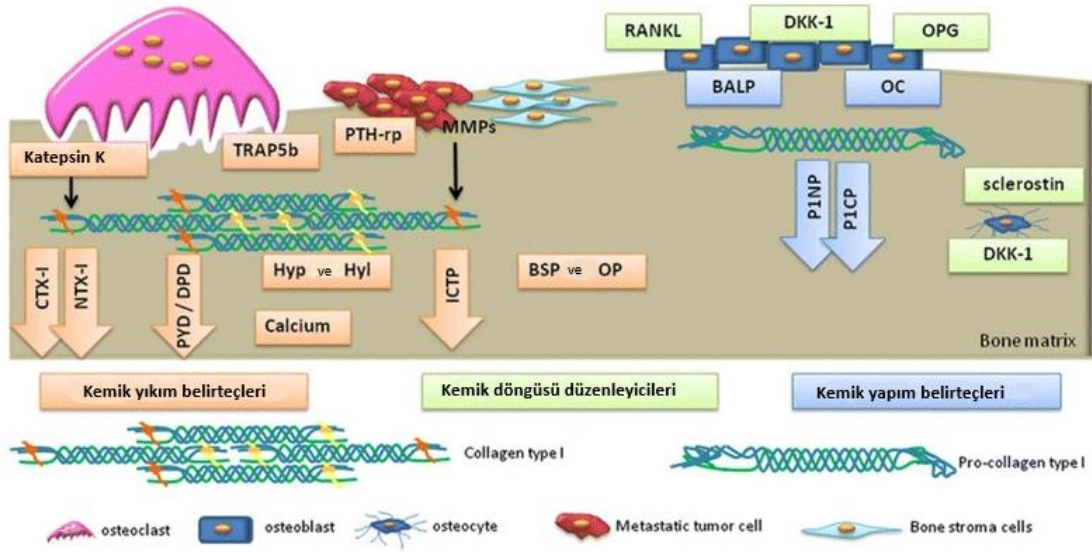
Osteoblast-osteoklast iletişimi, kemik homeostazı sırasında kemiğin yeniden şekillenmesinin ince ayarı için esastır. Osteoblastlar ve osteoklastlar, hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenlemek için EFNB2-EPHB4, FAS-FASL ve NRP1-SEMA3A arasındaki etkileşimler yoluyla doğrudan temasa sahiptir (Feng ve McDonald, 2011). Osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonu, osteoblast aracılı kemik

oluşumunu indüklemek için kemik matriksinden TGF- β ve IGF-1'i serbest bırakır (Clarke, 2008). Osteoblastlar, osteoklast oluşumunu ve gelişimini destekleyen M-CSF, RANKL, WNT5A'yı ve osteoklast aktivitesini inhibe eden OPG ve WNT16'yı salgılar. Tersine, osteoklastlar, osteoblast farklılaşmasını destekleyen S1P, CTHRC1 ve C3'ü ve osteoblast farklılaşmasını baskılayan SEMA4D'yi salgılar (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020).

Ayrıca olgun osteoklastlar, salgılanan sinyal molekülleri Wnt10b, BMP6 ve sinyal sfingolipid, sfingosin-1-fosfat (Pederson, Ruan, Westendorf, Khosla ve Oursler, 2008) gibi osteoblast farklılaşmasını uyaran bir dizi faktör salgılar.

Kanda ve idrarda çeşitli kemik oluşumu ve yıkım belirteçleri mevcuttur. Kemik rezorpsiyon belirteçleri, osteoklastik rezorpsiyon sırasında kemik matriksinden salınan olgun kollajen fragmanlarını (N-telopeptid veya C-telopeptid) veya çapraz bağları (piridinolin ve deoksipiridinolin) içerir. Oluşum belirteçleri, aktif matriks salgılanması sırasında osteoblastlardan salgılanan ürünleri (alkalin fosfataz ve osteokalsin) veya kollajen sentezi sırasında parçalanan kollajen fragmanları (örn., prokollajen N-terminal uzatma peptidi) (Allen ve Burr, 2019).

Kemiğin yeniden şekillenmesinin mekanizması, kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumunu içerir (Ferreira ve diğerleri, 2015). Kemik biyobelirteçleri, Şekil 2.8'de gösterildiği gibi kemik oluşumu biyobelirteçleri, kemik emilimi biyobelirteçleri ve kemik döngüsünün düzenleyicilerini içeren kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde üretilen enzimler, proteinler ve yan ürünlerden oluşur (Eastell ve Hannon, 2008; Kuo ve Chen, 2017; L. Liu ve Webster, 2016).



Şekil 2.8. Kemik döngüsünün biyokimyasal biyobelirteçleri

Şekil 2.8’de mavi kutular/oklar, kemik oluşumu belirteçlerini temsil eder: kemiğe özgü alkalın fosfataz (BALP); osteokalsin (OC); tip I prokollajen propeptidleri (P1NP ve P1CP). Turuncu kutular/oklar, kemik rezorpsiyon belirteçlerini temsil eder: piridinolin (PYD); deoksipiridinolin (DPD); tip 1 kolajenin (CTX-1) karboksi terminali çapraz bağlı telopeptidi; tip 1 kolajenin (NTX-1) amino-terminal çapraz bağlı telopeptidi; hidroksiprolin (HYP); hidroksilislin (HYL); kemik sialoproteini (BSP); osteopontin (OP); tartarata dirençli asit fosfataz 5b (TRAP 5b); katepsin K (CTSK). Yeşil kutular, kemik döngüsünün düzenleyicilerini temsil eder: NF- κ B ligandının (RANKL), osteoprotegerin (OPG), dickkopf-1 (DDK-1) ve sklerostinin reseptör aktivatörü (Ferreira ve diğerleri, 2015).

DXA ile BMD ölçümü ve kemik biyobelirteç tespitlerinin kombinasyonu, yüksek osteoporoz riski olan kişilerin erken değerlendirmesini iyileştirmek için büyük bir potansiyel göstermektedir.

Uluslararası Osteoporoz Vakfı (IOF)/ Enternasyonal Klinik Kimyagerler Federasyonu (IFCC) OP için tedavi etkinliğini değerlendirme ve kırık riskini saptamada standardize edilmiş yöntemler ile ölçülmesi şartı ile kemik yapım belirteci olarak serum PINP, yıkım belirteci olarak da serum CTX ölçülmesini önermektedir (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022; S Vasikaran ve diğerleri, 2011; Samuel Vasikaran ve diğerleri, 2011).

Biyobelirteçler için farklı analitik yöntemler oto-analizörlere uyarlanarak laboratuvarlarda hızlı ve düşük maliyetle çalışılır hale gelmiştir. Fakat kullanılan BTM'lerin hâlen klinik kullanılabilirliği yönünden faydası ve birinin diğerine olan üstünlüğü tartışılmaktadır. Biyokimyasal belirteçlerin klinik değeri, nispeten ucuz olmaları ve değerlendirmelerinin kolay olması, böylece bireysel hastaların zaman içinde izlenmesine izin vermeleridir. Popülasyon bazında, biyobelirteçler kemik kaybı ve kırık riskini ilişkilendirir. Bununla birlikte, biyokimyasal belirteçler, bir birey içinde ve tahliller arasındaki büyük değişkenlikleri nedeniyle sınırlıdır (Allen ve Burr, 2019).

Kemik oluşumu biyobelirteçleri; bone-specific alkaline phosphatase (BALP), total alkaline fosfat (ALP), osteokalcin (OC), ve Prokollajen tip 1 C-terminal propeptid (P1CP), prokollajen tip 1 N-terminal propeptid (P1NP)

Kemik rezorpsiyon biyobelirteçleri; hydroxylysine (HYL), hydroxyproline (HYP), pyridinoline (PYD), deoxypyridinoline (DPD), osteopontin (OP), bone sialoprotein (BSP), tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b), amino-terminal crosslinked telopeptide of type 1 collagen (NTX-1) and cathepsin K (CTSK), karboksi-terminal crosslinked telopeptide of tipe 1 kollajen (CTX-1)

Kemik döngüsünün düzenleyicileri; receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), dickkopf-1 (DDK-1) ve sclerostin örnek olarak sayabiliriz.

Toplam alkalin fosfataz (ALP)

Alkalin fosfataz, kan dolaşımında bulunan bir enzimdir. ALP'lerin farklı biçimleri insan vücudundaki proteinleri parçalayabilir. ALP'lerin çoğu karaciğerde olmak üzere kemiklerde, bağırsaklarda ve böbreklerde üretilir. İnsanlarda normal ALP seviyeleri yaşa, kan grubuna, cinsiyete ve hamileliğe göre değişir. Kandaki olağandışı ALP konsantrasyonları genellikle karaciğer, safra kesesi veya kemiklerle ilgili bir sorunu gösterir.

Serum total ALP aktivitesi duyarlılık ve özgüllük yönünden yetersiz olmakla birlikte, kemik oluşumunu gösteren belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu enzim kemik (osteoblastlar), karaciğer, barsak epitel, böbrek tübülleri ve plasenta gibi farklı dokularda

bulunur. ALP düzeyleri yeni antirezorptif tedavilerin etkinliğinin belirlenmesinde, hasta uyumunun ve tedaviye cevabın takibinde destek sağlar (Gurdol, 2019; Sepici-Dincel, 2020) .

Ca, P

Kalsiyum vücutta önemli bir mineraldir, kemiklerin ve dişlerin oluşumunu ve bakımını, kas kasılmasını, sinirsel sinyal iletimini, hücre apoptozunu ve kanın pıhtılaşmasını kontrol eder (Boskey, 2007; Eisenhauer ve diğerleri, 2019). Kalsiyum, insan vücudunun düzgün çalışması için gerekli bir besindir. Birçok hücre dışı ve hücre içi süreci etkileyen bu makro element, kemiğin gelişimi, büyümesi ve bakımı ve hücresel hücre iskeletinin stabilitesi için gereklidir (Beto, 2015). Kalsiyum, hücre içi enzimlerin aktivitesini düzenler ve iyon kanalları yoluyla nöronal iletimde yer alır. Vücut Ca'unun yaklaşık %99'u kemiklerde ve dişlerde bulunur ve dokuların mineralizasyonundan sorumlu olan hidroksiapatit olarak depolanır (Ciosek, Kot, Kosik-Bogacka, Łanocha-Arendarczyk ve Rotter, 2021).

Kalsiyum homeostazı, kan Ca düzeylerini dar bir terapötik aralıkta tutmak için hormonal geri besleme döngüleri aracılığıyla dikkatle düzenlenir (Gussone ve diğerleri, 2016). Temel olarak, Ca^{2+} homeostazını üç organ kontrol eder; Ca'nın diyetten emildiği gastrointestinal sistem (GI), ana Ca rezervuarı olan iskelet ve Ca'nın idrardan kana geri emildiği ve miktarları kontrol edilen böbrekler. Fizyolojik yaşlanma süreçleri ile bağırsak, kemik, böbrek ve endokrin bozuklukları Ca homeostazını etkiler. Osteoporoz, osteomalazi ve raşitizm ile renal osteodistrofi, bozulmuş Ca metabolizmasına bağlı kemik bozukluklarının örnekleridir (Eisenhauer ve diğerleri, 2019; Vautour ve Goltzman, 2018). Ca eksikliği osteoporoz için ana risk faktörüdür. Düşük serum Ca düzeyleri kemik rezorpsiyonunda artışa neden olur.

Fosfor (P), birçok biyolojik süreçte yer alan bir makro elementtir. Hareket kabiliyeti nedeniyle, vücutta asit-baz dengesinin korunmasına katılan, kan ve idrarda tampon sistemleri oluşturan kilit bir hücre içi anyonudur (Ciosek ve diğerleri, 2021; Soetan, Olaiya ve Oyewole, 2009). Fosfor, kemik dokusunun temel bileşeni olan Ca'dan sonra ikincidir. Uygun inorganik P seviyesi, matriks mineralizasyonu sürecinde osteoblastların ve osteositlerin aktivitesi için çok önemlidir (Magne ve diğerleri, 2003).

BMD'deki değişiklikler, kemikten net bir Ca kaybı ile ilişkilidir ve kalsiyum-fosfor dengesinin korunması sırasında iskelet sisteminin düzgün çalışması için çok önemlidir.

Kan Ca, P seviyelerini sabit tutan sabit seviyelerde tutan ana faktörler 1,25-dihidroksivitamin D3 (1,25(OH)₂ D₃), paratiroid hormonu (PTH)'dur. Serumda Ca düzeyleri ile PTH düzeyleri arasında zıt bir korelasyon vardır.

Paratiroid hormonu (PTH)

Vücutta Ca dengesini sağlayan temel hormon PTH'dir. Kemik yıkımı, böbrekten Ca geri emilimi ve böbrekte kalsitriol [(1,25 OH)₂ vit D=aktif vit D] yapımını artırarak kan Ca seviyelerini düzenler. PTH, kemikte osteoblast ve osteoklastları uyarır. Osteoklastlar üzerindeki etkisi dolaylıdır, çünkü bu osteoklastlarda PTH reseptörleri bulunmamaktadır (Gurdol, 2019). PTH, osteoklastta bir takım genlerin ekspresyonunu artırarak IGF-I, IL-6, IGF-bağlayıcı protein ve prostaglandinler gibi lokal faktörlerin yapımını uyarır (Cohen, 2006; Guyton AC, 2006; Peavy DE., 2003).

Paratiroid hormonu kemik yapının rezorpsiyonuna neden olur, Ca ve P salınımını sağlar, osteoblastlarda kolajen sentezini kısıtlar, olgun osteositlerde ise kemik rezorpsiyonunu uyarır, osteoklastlarda çözünürlüğe neden olur, hücrelerin osteoklastlara ve osteoblastlara erken dönüşümünü sağlar, kemiğin Ca bağlama kapasitesini azaltır.

Osteoblastlarda PTH aktivitesi için reseptör bulunurken, osteoklastlarda PTH reseptörü bulunmamaktadır.

Kalsitonin (CAL)

Esas fonksiyonu, kemik dokudan Ca rezorpsiyonunu inhibe etmek ve kemik yıkımını baskılamaktır. Kan Ca seviyesini düşürücü etkiye sahiptir. Kalsitonin etkisini doğrudan osteoklastlar üzerinde yer alan reseptörleri ile göstermektedir. Cal kemik oluşumu üzerine herhangi bir modüle edici etkisi yoktur. Genellikle etkilerini yüksek konsantrasyonlarda göstermektedir. Bu özelliği sebebiyle fizyolojik değil fakat farmakolojik etkilerinin daha önemli olduğu düşünülmektedir (Gardella, Nissenson ve Jüppner, 2018). Kalsitonin, paratiroid hormonunun tersi yönde etki eder. Cal salınımı Ca ve bazı intestinal peptitler

(glukagon, gastrin) tarafından uyarılır. Yüksek konsantrasyonda Cal osteoklast işlevini doğrudan inhibe edebilir (Peavy DE., 2003).

Vitamin D

Bir steroid hormon olan D vitamini, iskelet sağlığı ve mineral metabolizması için çok önemlidir.

Bitkisel gıda kaynaklı Ergosterol ve hayvansal gıda kaynaklı 7-dehidrokolesterol ve provitamin D3 (7-dehidrokolesterol) olarak organizmada kolesterolden sentezlenen Vitamin D formları metabolizmaları benzer bir yol izler. Vitamin-D3 karaciğerde 25-hidroksivitamin-D (25(OH)D, Kalsidiol) formuna dönüşür. Oluşan 25(OH)D böbreklerde aktif formu olan 1,25 dihidroksikolekalsiferol (1,25(OH)2D, Kalsitriol) veya inaktif metaboliti olan 24,25 dihidroksivitamin D'ye [24,25(OH)2D] dönüşür (Börekçi, 2019; Gurdol, 2019). D vitamini aktif formu 1,25(OH)2D neredeyse tüm çekirdekli hücrelerde bulunan nükleer-vitamin-D reseptörü aracılığı ile etki etmekte ve hücre farklılaşması ve proliferasyon ile ilgili birçok geni düzenlemektedir. Vitamin D hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptoz, immün ve hormonal regülasyon ve vücudumuzla ilgili başka diğer süreçlerde rol almaktadır (Kulie, Groff, Redmer, Hounshell ve Schrage, 2009). Vitamin D iskelet gelişiminde, kemik canlılığını sürdürmede ve nöromusküler fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadır (Bordelon, Ghetu ve Langan, 2009). Erişkinlerde vitamin D eksikliği, osteopeni ve osteoporozu kolaylaştırır ve kırık riskini artırır (Holick, 2004; Holick ve Chen, 2008; Yavuzer ve diğerleri, 2018). Bağırsaklardan Ca ve P emilimini arttırmaktır. 1,25 dihidroksikolekalsiferol 24-hidroksilaz aktivitesini uyararak, 1-hidroksilaz aktivitesini baskılayarak kendi sentezini kontrol eder (Akkoyun, Bayramoğlu, Ekin ve Çelebi, 2014; Börekçi, 2019; Gurdol, 2019).

Kemikte Vit D ve PTH sinerjik etki gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda kemik iliğinde kök hücrelerin osteoklasta farklılaşmasını uyararak, osteoklastik aktiviteyi etkileyen sitokinlerin ve diğer uyarıların osteoblastlarda sentezlenmesini sağlayarak kemiğin organik ve inorganik fazının çözülmesine yol açar.

D vitamini osteoblastların, osteoklastların ve osteositlerin aktivitesini etkiler, bu da kemik oluşumunu, kemik emilimini ve kemik kalitesini etkilediğini düşündürür. Fizyolojik

konsantrasyonlarda aktif D vitamini, RANKL/OPG sinyali yoluyla normal bir kemik emilim ve oluşum hızını korur (Hou ve diğerleri, 2018).

Osteokalsin (OC)

Kemik gama-karboksiglutamik asit içeren protein olarak da bilinen osteokalsin, 49 amino asitten oluşan küçük bir proteindir. OC olgun osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositler tarafından sentezlenir. Ayrıca OC, insan vücudundaki toplam proteinin yaklaşık %2'sini oluşturan, kemikte en bol bulunan kolajen olmayan proteindir. Osteoblastlar tarafından üretilen OC, metabolik regülasyon, kemik mineralizasyonu ve Ca iyon homeostazı için önemli bir rol oynar (Kuo ve Chen, 2017; N. K. Lee ve diğerleri, 2007).

Osteokalsin iki farklı formda bulunabilir: karboksillenmiş ve az karboksilatlanmış. Pankreasta osteokalsin, pankreatik β -hücrelerinin çoğalmasının yanı sıra pankreatik insülin sekresyonunun ve duyarlılığının pozitif düzenleyicisi olarak görev yapar (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015). Yağ dokusunda, osteokalsin adiponektin gen ekspresyonunu uyarır ve bu da insülin duyarlılığını artırır (Ferron, Hinoi, Karsenty ve Ducy, 2008). Testiste, osteokalsin Leydig hücrelerinde spesifik bir reseptöre bağlanabilir ve testosteron sentezini artırır ve sonuç olarak doğurganlığı artırır (Oury ve diğerleri, 2011). Osteokalsin ayrıca hipokampusta monoamin nörotransmitterlerin sentezini uyarır ve gama-aminobütirik asit (GABA) sentezini inhibe ederek öğrenme ve hafıza becerilerini geliştirir (Oury ve diğerleri, 2013). Sadece osteosit değil, aynı zamanda osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin de bağışıklık sistemini, esas olarak kemik enflamatuar yıkımı üzerine etkilediği bilinmektedir. Tüm bunlar, iskelet ve bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşiminin keşfi, osteoimmünoloji adı verilen yeni bir çalışma alanına yol açmıştır (Walsh ve diğerleri, 2006).

Tip 1 kollajenin (CTX-1) karboksi-terminali çapraz bağlı telopeptidi

Kemik tip I kollajen, öncül prokollajen şeklinde sentez edilerek osteoblastlar ve fibroblastlar tarafından salgınır. Tip I kollajen, kemiğin en bol protein bileşenidir ve tip I kollajenin (CTX ve NTX) C- ve N-terminal telopeptitlerinin her ikisi de telopeptid bölgesi tip I kollajenin fragmanlarıdır. Telopeptidler, kemiğin osteoklastik rezorpsiyonu sırasında klivaj edilir, bu da kemik rezorpsiyon aktivitesi ile orantılı bir oranda dolaşımda serbest kalmasına neden olur (Garnero, 2015; Konukoglu, 2019). CTX-1 ve NTX-1'in ikisi de kolajen yıkımı sırasında

salınır (Daneault, Prawitt, Fabien Soulé, Coxam ve Wittrant, 2017). Kemikten salınım oranı osteoklastların yıkım aktivitesini yansıtır (Greenblatt ve diğerleri, 2017).

Kemik organik matriksinin yaklaşık % 90'ını Tip-1 kollajen oluşturur. Yıkım sırasında çapraz bağların % 40'ı serbest piridinyum çapraz bağları şeklinde salınırken %60'ı peptite bağlı çapraz bağlar halindedir. Tip-1 kolajenin biri amino diğeri karboksi terminalinde olan iki çapraz bağ sentez bölgesi vardır. Şekil 2.8'de CTX fragmentleri gösterilmektedir.

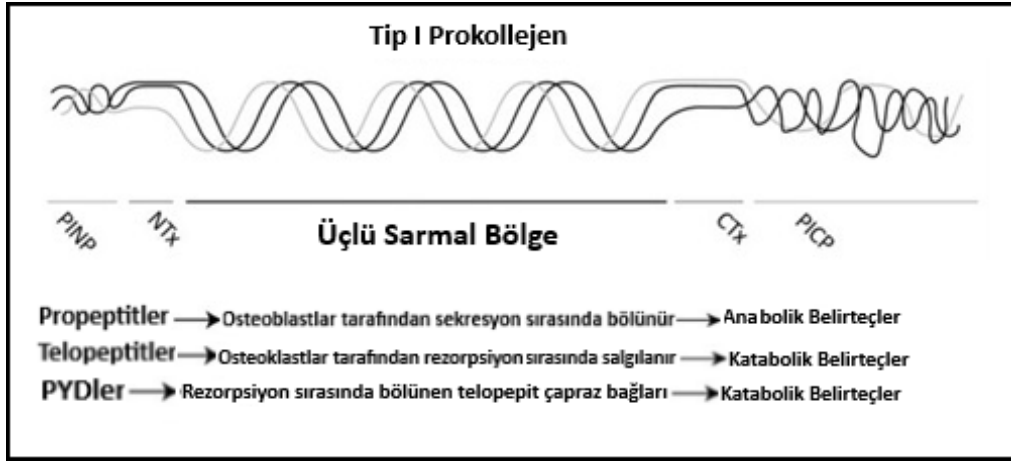
CTX tip I kollajenin iki $\alpha 1$ zincirinin C terminali peptidlerinin diğeri kollajen molekülünün gerek $\alpha 1$ gerek $\alpha 2$ zincirinin helikal bölgesine çapraz bağlanmasıyla meydana gelirler. Geliştirilen immün tekniklerle α -CTX (non-izomerize form) ve β CTX (izomerize form) ölçülebilir. Her iki formun eş zamanlı ölçümü ile α -CTX/ β -CTX oranı kemik metabolizmasının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Szulc, 2018).

Prokollajen tip 1 N-terminal propeptid (P1NP)

Kemik tip I kollajen, öncül prokollajen şeklinde sentez edilerek osteoblastlar ve fibroblastlar tarafından salınır. C-terminal (PICP) ve N-terminal (PINP) prokollajen tip I propeptitler, yeni sentezlenen prokollajenin kollajene dönüşümü sürecinde özgül proteazlar ile ayrılır ve molekülün orta kısmı kemik matriks içinde kalırken ayrılan bu yapılar kana salınır (Sepici-Dincel, 2020).

Tip 1 kollajen, prokollajen tip 1'den kemikte geliştirilen organik kemik matriksinde (> %90) bulunabilir. Kemik tip I kollajen, öncül prokollajen şeklinde sentez edilerek osteoblastlar ve fibroblastlar tarafından salınır (Kuo ve Chen, 2017). Prokollajen tip-1, prokollajenin kolajene dönüşümü sırasında spesifik proteazlar tarafından uzaklaştırılan N-terminal ve C-terminal uzantılarına sahiptir. PICP ve PINP'yi içeren prokollajen tip 1 daha sonra kemik matriksi üzerine konjuge edilir. Şekil 2.9'da PINP fragmentleri gösterilmektedir. PINP'nin kemik oluşumu biyobelirteci, tip 1 kollajen birikiminin spesifik bir göstergesidir. PINP, tip 1 kollajen oluşumu sırasında hücre içi boşluğa salınır ve sonunda PINP kan dolaşımında bulunur (Szulc, 2018).

Telopeptidler, kemiğin osteoklastik rezorpsiyonu sırasında klivaj edilir, bu da kemik rezorpsiyon aktivitesi ile orantılı bir oranda dolaşımda serbest kalmasına neden olur.



Şekil 2.9. Tip 1 kollajenden CTX ve P1NP fragmentleri (Greenblatt ve diğerleri, 2017).

NF-κB ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü

Kemğin yeniden şekillenmesi sürecinde, osteoblastlar, osteoklastların farklılaşmasını ve olgunlaşmasını düzenlemek için RANKL (Receptor activator factor kappa B (NF-κB) ligandı) üretir. RANKL, TNF reseptör süper ailesinin bir üyesidir ve endotel hücrelerinin yanı sıra osteoid ve preosteoblastlar tarafından üretilir. RANKL, RANK reseptörüne bağlanır ve osteoklast oluşumunu ve aktivitesini artırır. Osteoklast öncüleri ise RANK'ı ifade eder. Bu sistemler ve kemik bozuklukları arasındaki ilişki hakkında çelişkili veriler vardır (Doventas ve diğerleri, 2015; Konukoglu, 2019; Kubota, Michigami ve Ozono, 2009; Oelzner ve diğerleri, 2007). Sonuçlardaki tutarsızlıklar, test yöntemlerinin daha da geliştirilmesine ve preanalitik değişkenliğin daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

RANKL, osteoklastogenez için önemli bir rol oynar ve osteositler, osteoblastlar, stromal hücreler tarafından eksprese edilir. Osteoklast öncüllerindeki reseptörü RANK'a bağlandığı zaman osteoklast oluşumu indüklenir. Ayrıca, osteoblastlar, stromal hücreler ve gingival ve periodontal fibroblast (Brendan F Boyce ve Xing, 2008; Longhini, Aparecida de Oliveira, Sasso-Cerri ve Cerri, 2014) dahil olmak üzere çok çeşitli hücreler tarafından üretilen osteoprotegerin (OPG) adı verilen başka bir faktör RANKL'a bağlanarak RANK/RANKL etkileşimini önler ve sonuç olarak, osteoklastogenezini inhibe eder (Brendan F Boyce ve Xing, 2008). Bu nedenle, RANKL/RANK/OPG sistemi, osteoklastogenezin ana aracısıdır (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015).

Osteoklastlardan salgılanan veziküler RANK, osteoblastik RANKL'a bağlanır ve RANKL ters sinyali ile osteoblast farklılaşmasını ve kemik oluşumunu destekler. RANKL başlangıçta

BTM'ler sadece osteoporoz ve kırık riski takibinde değil başka hastalıklarda da kullanılabilir. BTM'ler, kemiği etkileyen endokrin, onkolojik ve romatolojik bozuklukların tanı ve tedavisinde faydalıdır.

BTM'lerin böbrek hastalığında kullanımı

Kronik böbrek hastalığı olan hastalarda osteoporoz ve/veya renal kemik hastalığı gelişebilir. Dinamik olmayan kemik hastalığı, osteomalazi ve hiperparatiroid renal kemik hastalığının dışlanması, uygun tedavi kararlarının verilmesi için kritik öneme sahiptir (Greenblatt ve diğerleri, 2017; Miller, 2018).

BTM'lerin onkolojideki rolü

Bir dizi katı tümör, özellikle göğüs ve prostat karsinomu, karakteristik olarak kemiğe metastaz yapar ve kemiğin birincil tutulumu da, özellikle multipl miyelom olmak üzere birçok hematopoietik malignitenin karakteristiğidir. Neredeyse tüm vakalarda, bu kemik tutulumu, kemik metabolizmasındaki değişikliklerle karakterize edilir ve kemik metabolizmasındaki bu bozulmalar genellikle patolojik kırıklara zemin hazırlar ve bu iskelet metastazlarına katkıda bulunabilir. BTM'lerin ölçümü bu durumlarda prognostik bilgi sağlayabilir (Greenblatt ve diğerleri, 2017; Sterling ve Johnson, 2018).

Romatolojik hastalıklarda BTM'ler

Romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklarda görülen resorptif belirteçlerdeki artışlar için birkaç farklı neden söylenebilir. Birincisi, romatoid artrit gibi hastalıklar lokal, özellikle periartiküler kemik erozyonları gösterir. Ek olarak, hastalığın enflamatuvar ortamı, gelişmiş kemik rezorpsiyonu ve baskılanmış kemik oluşumu nedeniyle sistemik osteopeniyi teşvik eder. Bu durum sadece romatoid artrite özgü değildir ve çok çeşitli kronik inflamatuvar, otoimmün veya enfeksiyöz durumlarda, özellikle inflamatuvar barsak hastalığında görülür (Ellen M Gravalles ve Goldring, 2018; Greenblatt ve diğerleri, 2017).

Paget kemik hastalığında BTM'ler

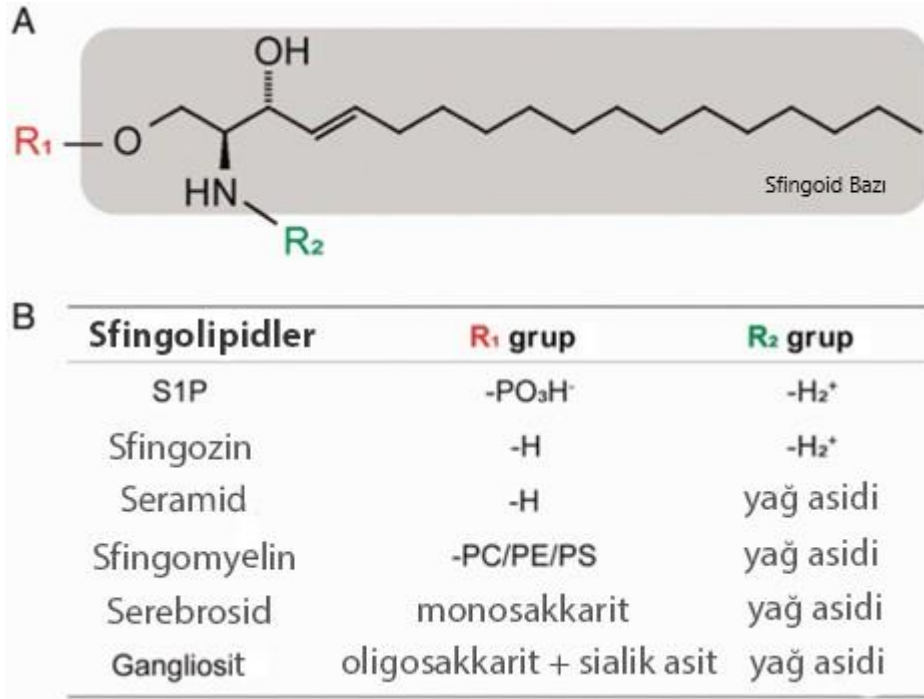
Paget kemiği hastalığı, osteoporozdan sonra en sık görülen ikinci kemik metabolik hastalığıdır. Etkilenen kemiklerin genişlemesine ve deformasyonuna yol açan aşırı yüksek kemik döngüsü ile karakterize edilir (Charles, Siris ve Roodman, 2018; Greenblatt ve diğerleri, 2017).

2.5. Sfingozin-1-Fosfat

2.5.1. Sfingozin-1-fosfat yapı ve meatbolizması

Sfingolipitler membran lipitleri sınıfında yer alan, yaygın olarak bulunan ve lipit çift tabakasının mekanik olarak stabil ve kimyasal olarak dirençli bir dış sınır oluşturmaya katılarak hücre yüzeyini koruyan moleküllerdir. Membran bütünlüğünü sağlama, enzim aktivitelerini ve sinyal iletim yollarını düzenleme gibi fonksiyonlarına sahiptirler (Companioni, Mir, Garcia-Mayea ve LLeonart, 2021; R. H. Kim, Takabe, Milstien ve Spiegel, 2009; King, 2014; Ogretmen, 2018).

Sfingolipidlerin genel yapısını uzun zincirli bir alifatik amino alkol olan sfingoid baz oluşturur ve buna bağlı, bir polar baş grubuna O-bağlıdır ve omurgayı oluşturan bir yağ asidine ise bir amid molekülü bağlıdır. Omurgaya bağlı fonksiyonel grupların varyasyonları (sfingomiyelin ve glikosfingolipitler, serebrozitler, sülfatitler, globozitler ve gangliozitler) sfingolipidlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirler. Örneğin, seramitin deasilasyonundan türetilen sfingozinin üzerindeki fosforilasyonu hidroksil grubu, lizofosfolipid S1P'yi oluşturur (Ren, Pang, Han ve Li, 2021). Şekil 2.11'de Sfingozin-1-fosfatın genel yapısı gösterilmektedir.

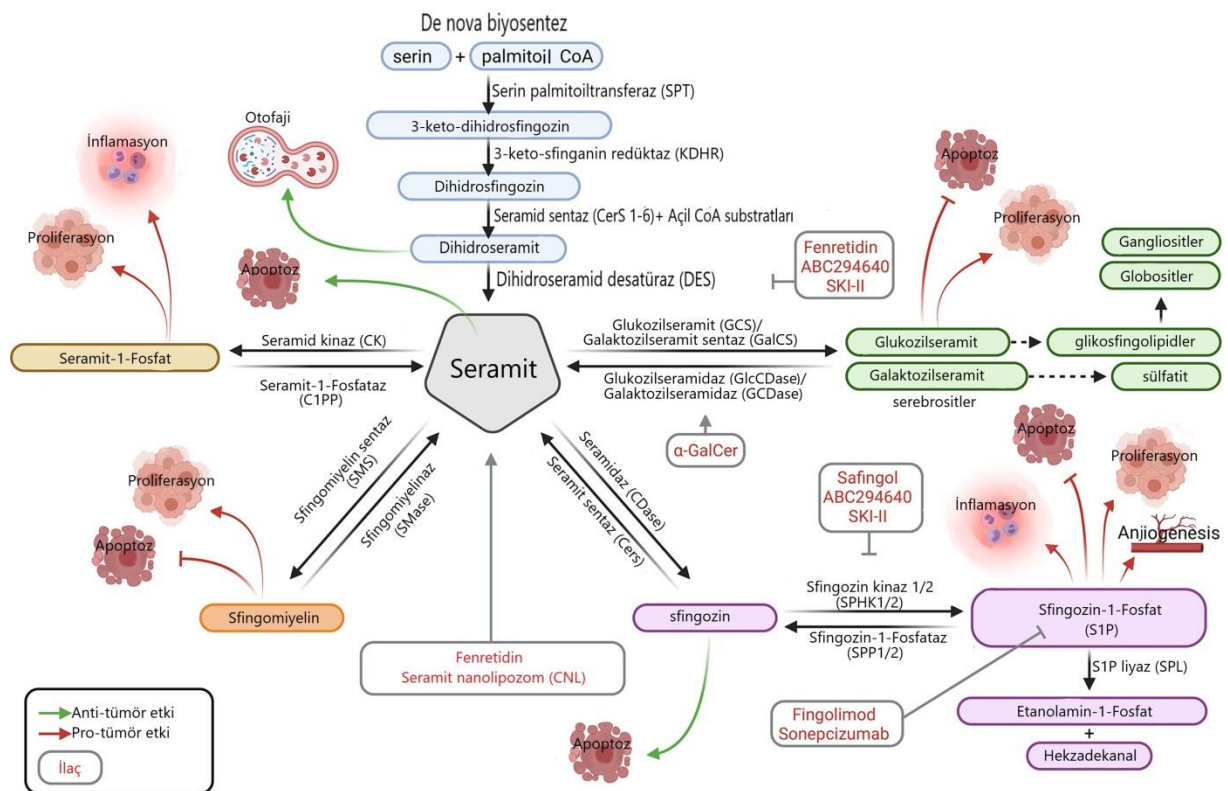


Şekil 2.11. Sfingolipidlerin genel yapıları. (a) Sfingolipidlerin kimyasal yapıları. Sfingoid taban gri gölgede gösterilmiştir. Fonksiyonel grupları temsil eden R1 ve R2 sırasıyla kırmızı ve yeşil olarak vurgulanmıştır. (b) Farklı sfingolipid tiplerindeki R1 ve R2 bileşimleri listelenmiştir (Ren ve diğerleri, 2021).

Sfingolipidlerin hücrelerdeki metabolizması karmaşık ve dinamiktir. Gliserolipidler gibi, seramid (N-asil sfingosin), sfingosin ve sfingosin-1-fosfat (S1P) dahil olmak üzere çok sayıda agonist, sinyal molekülleri oluşturmak için sfingolipid metabolizmasını düzenler (Ogretmen ve Hannun, 2004; Strub, Maceyka, Hait, Milstien ve Spiegel, 2010).

Sfingolipit bazlarının (sfingozin, dihidrosfingozin ve seramid) de novo sentezi, *Endoplazmik retikulumda (ER)*, serin palmitoiltransferaz (SPT) tarafından katalize edilen palmitoil-KoA ve serin kondensasyonu ile başlar. SPT, sfingolipit biyosentez yolağının hız kısıtlayıcı enzimidir. Aktif SPT, 2 ana alt birim ve enzim kompleksinin aktivitesini artıran, aynı zamanda açıl-KoA'nın tercih edilmesini sağlayan 3. bir alt birimden oluşan heterotrimerik bir enzimdir. Oluşan 3-ketosfinganin (3-keto-dihidrosfingozin) hızla dihidrosfingozine indirgenir (Futerman, Stieger, Hubbard ve Pagano, 1990; King, 2014; Ren ve diğerleri, 2021; Satsu ve diğerleri, 2013) ve bu daha sonra dihidro-seramidleri üretmek için seramid sentazları (CerS) tarafından N-asile edilir (Galadari ve diğerleri, 2006; Linn ve diğerleri, 2001; R. Xu ve diğerleri, 2006). Son olarak, seramid üretmek için sfingoid bazında 4-5 trans çift bağ eklenir. Seramid daha sonra ER'den Golgi'ye taşınır ve burada çeşitli baş gruplarının eklenmesiyle sfingolipidler oluşturulur (Funato, Vallée ve Riezman, 2002; Ren ve diğerleri, 2021; Strub ve diğerleri, 2010).

Katabolizma sırasında bu baş gruplarının uzaklaştırılmasından sonra, seramitin seramidazlar tarafından deasile edilmesi, memelilerde en yaygın sfingoid baz olan sfingozini verir. Sfingozin ve dihidrosfingozinin (sfinganin) yeniden üretilmediğini ve yalnızca sfingolipidlerin katabolizmasıyla oluştuğunu not etmek önemlidir. Bu sfingoid bazlar, karmaşık sfingolipid biyosentezi için yeniden kullanılabilir (kurtarma –salvage yolu). S1P, iki sfingozin kinazın (sırasıyla SFK1 ve SFK2 veya sadece SK1 ve SK2) fosforilasyonu yoluyla çeşitli hücrelerde sitozol ve çekirdekte üretilir. S1P, lizozomal fosfatazlar, S1P'ye özgü fosfatazlar olan SPP1 ve SPP2 tarafından geri dönüşümlü defosforilasyon yoluyla sfingozine indirgenebilir veya S1P liyaz enzimi (SPL) ile etanolamin-fosfata ve heksadekenal'e S1P'yi geri dönüşümsüz olarak parçalayabilir (Bandhuvula ve Saba, 2007; Czubowicz, Jęsko, Wencel, Lukiw ve Strosznajder, 2019; Maceyka, Milstien ve Spiegel, 2007; Meshcheryakova, Mechtcheriakova ve Pietschmann, 2017; Strub ve diğerleri, 2010; Tian ve diğerleri, 2021; Xia ve Wadham, 2011). Şekil 2.12'de S1P sentez ve metabolik yolu gösterilmektedir.



Şekil 2.12. S1P'nin metabolik yolları (Companiononi ve diğerleri, 2021).

S1P, sfingozinin sfingozin kinazlar (SPHK1 ve -2) tarafından fosforilasyonu ile üretilir ve sfingozin fosfatazlar (SGPP1 ve -2) tarafından sfingozine dönüştürülür. Sfingozin, seramidaz tarafından seramitten deasilasyon ile üretilir ve seramid sentaz tarafından geri

dönüştürülür. Seramit ayrıca de novo sentez yoluyla veya diğer sfingolipidlerden geri dönüşüm yoluyla da üretilir. FTY720 (fingolimod), SPHK2 tarafından FTY720-fosfata fosforilasyondan sonra S1P1'in fonksiyonel bir antagonisti olarak hizmet eden bir ön ilaçtır. (Ren ve diğerleri, 2021)

2.5.2. Sfingozin kinaz yoluyla S1P üretilmesi

S1P, hücre içinde iki sfingosin kinaz (SphK1 ve SphK2) tarafından sfingozinden meydana gelir. Sfingozin sentezinde ara madde olan dihidrosfingozin de sfingozin kinazlar için bir substrattır (Strub ve diğerleri, 2010). SphK, sfingozinin ATP'ye bağımlı fosforilasyonunu S1P'ye katalize eden bir lipit kinazdır (Cannavo ve diğerleri, 2017; Gupta ve diğerleri, 2021). İnsanlar SPHK1 ve SPHK2 genleri tarafından kodlanan 2 ilişkili sfingozin kinaz ifadeler. SphK'nin iki izoformu -SphK1 ve SphK2- insanlarda karakterize edilmiştir (King, 2014; S. Pyne, Lee, Long ve Pyne, 2009). Aynı biyokimyasal reaksiyonu katalize ederler ancak substrat afiniteleri, doku dağılımı ve hücre altı yerleşimleri bakımından farklılık gösterirler. SphK1, normal fizyolojik koşullar altında sitoplazmada bulunur, ancak aktive edildiğinde plazma zarına yer değiştirir. Buna karşılık, çekirdekte SphK2 bulunur (N. J. Pyne ve Pyne, 2020). İki izoenzim oldukça homolog olmasına rağmen, farklı işlevleri yerine getirdikleri gözlemlenmiştir. SphK1 hayatta kalma yanlısı etkiler gösterirken, çalışmalar SphK2'nin pro-apoptotik rolüne işaret etmektedir (P. Gao ve Smith, 2011; Gustin ve diğerleri, 2013; Murakami ve diğerleri, 2010; Ren ve diğerleri, 2021).

SphK1'in fosforilasyonunu indükleyen bir dizi harici uyaran, dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β), tümör nekroz faktörü α (TNF-a), proinflamatuvar sitokin ve reseptör tirozin kinazların, G- aktivasyonu yoluyla çeşitli büyüme faktörlerini, protein bağlı reseptörler ve toll benzeri reseptörler içerir (Bao, Guo, Zhang, Fan ve Yang, 2017; Gupta ve diğerleri, 2021). TGF- β 'nın, gen ekspresyon seviyelerini yukarı doğru düzenleyerek SphK1 aktivitesini indüklediği gözlemlenmiştir (X. Zhang, Cai, Zhang ve Chen, 2018). Ayrıca, TGF- β 'ya maruz kalma, S1P fosfataz aktivitesini azaltır ve sonuç olarak S1P hücre içi düzeylerinde geçici ve hızlı bir artışa yol açar. SphK1'in başka bir aktivatörü, insan göbek damarı endotel hücresinde (HUVEC) SphK1 aktivitesini arttıran TNFa'dır (W. Zhang ve diğerleri, 2013). Diğer endojen agonistler, her ikisi de SphK1'in ekspresyonunu ve aktivitesini yukarı regüle eden prolaktin ve 17 β -estradiol içerir (Maczis ve diğerleri, 2018). Çekirdekte, SphK2, histon deasetilazların (HDAC1/2) aktivitesini inhibe eden ve gen

ekspresyonunu düzenleyen S1P'yi oluşturmak için sfingozinin fosforilasyonunu katalize eder. S1P ayrıca insan ve fare fibroblastlarında insan telomeraz ters transkriptazına (hTERT) bağlanır ve bu, makorin halka parmak proteini 1 (MKRN1) ile etkileşimini engeller ve telomeraz stabilitesini destekler. S1P ayrıca mitokondride SphK2'nin etkisiyle üretilir. SphK2'nin aşırı ekspresyonu genellikle apoptozu ve hücre döngüsü durmasını artırır. Bu izoformun proapoptotik etkilerine, hayatta kalma yanlısı Bcl-2 aile üyesi Bcl-xL ile etkileşime giren varsayılan bir BH3 motifi aracılığıyla aracılık edilmiştir (X. Ding ve diğerleri, 2019). Ayrıca, sonraki S1P sentezi ile SphK2'nin mitokondriyal lokalizasyonunun, sonuç olarak salınan sitokrom C (Cannavo ve diğerleri, 2017; Neubauer ve Pitson, 2013) ile membran potansiyelini modüle eden BAK'ın BID aracılı aktivasyonunu sağladığı gösterilmiştir (Gupta ve diğerleri, 2021).

2.5.3. S1P liyaz tarafından S1P bozulması

S1P'nin bozunması, esas olarak sfingozin ile karşılıklı dönüşüm veya fosfoetanolamin (PE) ve trans-2-heksadesenal'e geri dönüşümsüz bozunma yoluyla, metabolik talebe göre sinerjik olarak S1P senteziyle eşleşir (Lucaciu, Brunkhorst, Pfeilschifter, Pfeilschifter ve Subburayalu, 2020). Esas olarak iki S1P fosfataz ((S1P fosfataz-1 ve -2) tarafından S1P'nin fosforilasyonu ile, sfingolipit metabolik yoluna yeniden girebilen sfingozin meydana gelir (Ren ve diğerleri, 2021).

S1P liyaz (SPL) ve lipid fosfat fosfohidrolazlar (lizofosfolipid hidrolaz) (Tukijan, Chandrakanthan ve Nguyen, 2018) (LPP'ler), hücre içi ve hücre dışı boşluklarda S1P bozulması için çok önemli enzimler olarak işlev görür. Fosfolipit sentezi için bir substrat olarak kullanıldığında, S1P, heksadekenal ve fosfoetanolamin oluşturacak şekilde S1P liyaz ile yıkılır. Fosfoetanolamin, fosfolipit olan fosfatidiletanolamin (PE) sentezinin doğrudan öncüsüdür. Heksadekenal, ise heksadekenal dehidrogenaz ile heksadekenoik aside ve sonra palmitoil-KoA'ya dönüştürülür. S1P'nin S1P liyaz yolu ile yıkılması, sfingolipitlerin gliserolipitlere dönüştürülmesinde önemli bir yol oluşturmaktadır (King, 2014).

SPL'nin inhibisyonu, T hücresi sekestrasyonuna ve immünosupresyona neden olduğundan, SPL, multipl skleroz ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde önemli bir terapötik hedef olarak kabul edilir (Bagdanoff ve diğerleri, 2009; Ren ve diğerleri, 2021).

Sphingolipidlerin sentezleri endoplazmik retikulumda başlar ve golgi aygıtında tamamlanır. Bu lipidler plazma membranı ve endozomlarda zenginleştirilir. Sitozolde veziküllerle ve monomerik transportla taşınır (Mendelson, Evans ve Hla, 2014; Obinata ve Hla, 2019). Birçok hücre, daha sonra otokrin veya parakrin bir şekilde hareket edebilen S1P salgılar (Maceyka, Harikumar, Milstien ve Spiegel, 2012; Mendelson ve diğerleri, 2014). S1P, belirli taşıyıcılar tarafından hücrelerden hücre dışı ortama salgılanır, plazma zarı üzerindeki reseptörüne bağlanır ve G proteini ile eşleşmiş reseptörler aracılığıyla sinyaller ileterek çoklu hücresel süreçleri düzenler (Blaho ve Hla, 2011; Meshcheryakova ve diğerleri, 2017; Rosen ve Goetzl, 2005; Saba ve Hla, 2004).

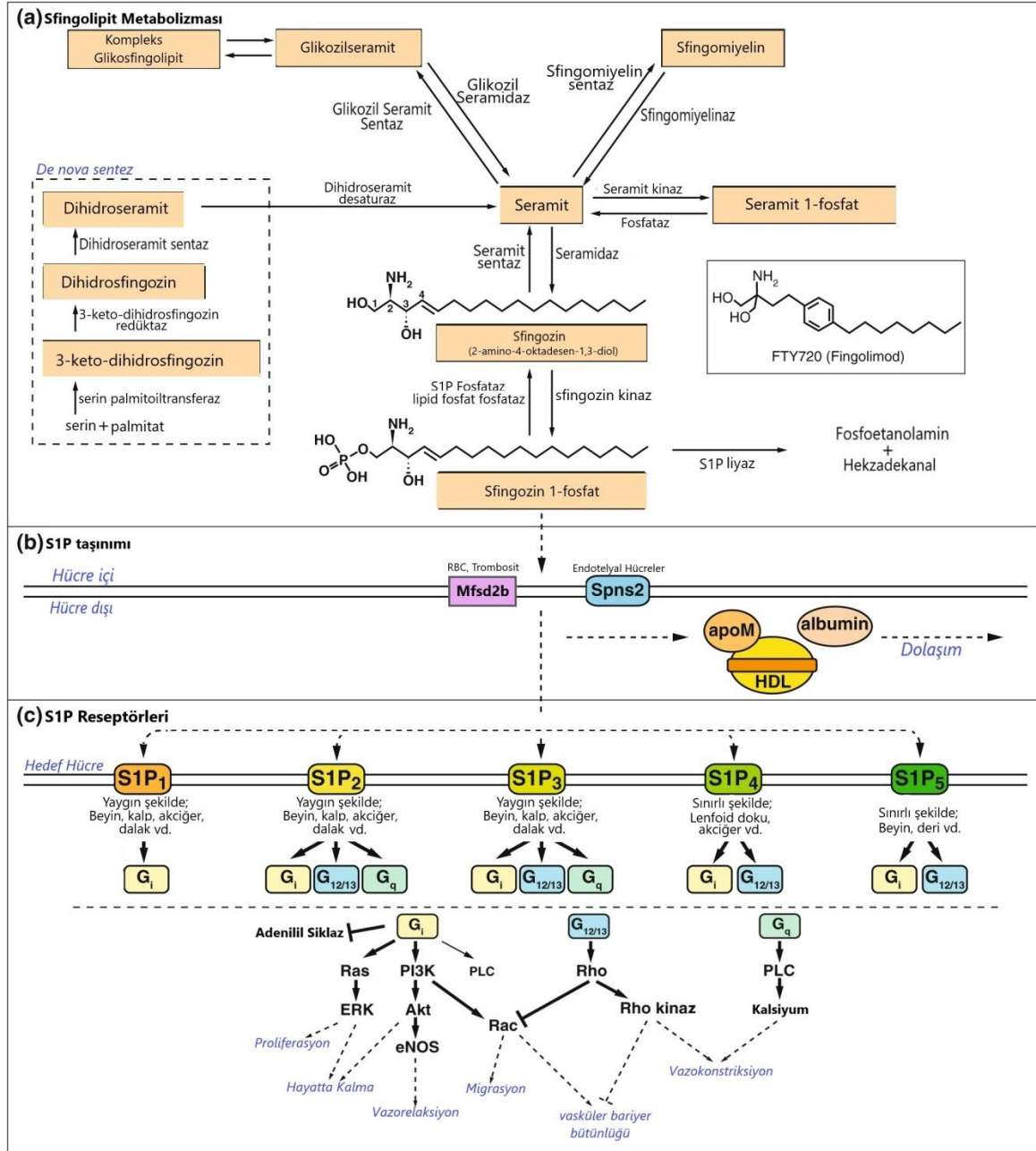
2.5.4. Sfingozin-1-fosfat reseptörleri

S1P, ikinci bir lipid habercisi olarak görev yapar ve hücre proliferasyonu, migrasyonu, enflamasyon ve anjiyogenez gibi hem normal hem de patolojik hücresel koşullar için çok önemli olan çeşitli fizyolojik süreçleri düzenler (Gupta ve diğerleri, 2021).

S1P reseptörleri, lizofosfatidik asit ve kannabinoid reseptörleri ile yakından ilişkili olan G proteinine bağlı reseptörlerdir (GPCR'ler). S1P 1-5 olarak adlandırılan beş S1P reseptörü açıklanmıştır. S1P etkilerini, beş G-protein eşli reseptör (GPCR), yani S1P reseptörü 1-5 S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 ve S1P5 ailesine bağlanarak gösterir ve çoğu hücre, S1P reseptörünün bir veya daha fazla alt tipini eksprese edebilir (Gupta ve diğerleri, 2021; Hannun ve Obeid, 2018; Mendelson ve diğerleri, 2014). Hepsi S1P'ye yüksek afinite ile bağlanır ve hücresel yanıtları indükler. S1P'nin S1P 1-5'e otokrin veya parakrin bağlanması, kanser ve inflamasyon vasküler sistem ve merkezi sinir sistemi gelişimine, canlılığa ve çoğalmaya, immün hücre trafiğine, hücre adezyonuna, hücre yaşamasına ve mitojeneze, stres cevaplarına, doku homeostazına, anjiyogeneze ve metabolik düzenlemeye katılımı dahil olmak üzere birçok patofizyolojik durumdaki rolünden sorumlu olan aşağı akış sinyal yollarının çeşitlerini aktive eder (Takabe, Paugh, Milstien ve Spiegel, 2008).

S1P reseptörleri lenfositler, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, kalp miyositleri beyin ve sinir hücreleri dahil pek çok hücre tarafından eksprese edilebilir. Lökosit hareketleri, nöral hücre işlevleri, hücre göçü, vasküler homeostaz, endotel hücre işlevleri gibi çeşitli biyolojik işlevlerin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. S1P1, S1P2 ve S1P3 çoğunlukla bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem ve beyinde dağılmıştır. S1P1 T ve B

lenfositlerinde yüksek oranda eksprese edilir (Mendelson ve diğerleri, 2014; Obinata ve Hla, 2019). Şekil 2.13'te S1P reseptör ve sinyalleri gösterilmektedir.



Şekil 2.13. S1P-S1P reseptör sinyalizasyon sistemine genel bakış

Şekil 2.13'te belirtildiği gibi (B) Hücre içinde üretilen S1P, Mfsd2b [kırmızı kan hücresi (RBC) ve trombosit] ve Spns2 (endotel hücreleri) gibi spesifik taşıyıcılar tarafından taşınır ve albümin ve HDL ile ilişkili spesifik S1P şaperon proteini, ApoM tarafından taşınır. (C) S1P, heterotrimerik G proteininin birleştirilmiş Gα alt birimlerine ve belirli bir hücre

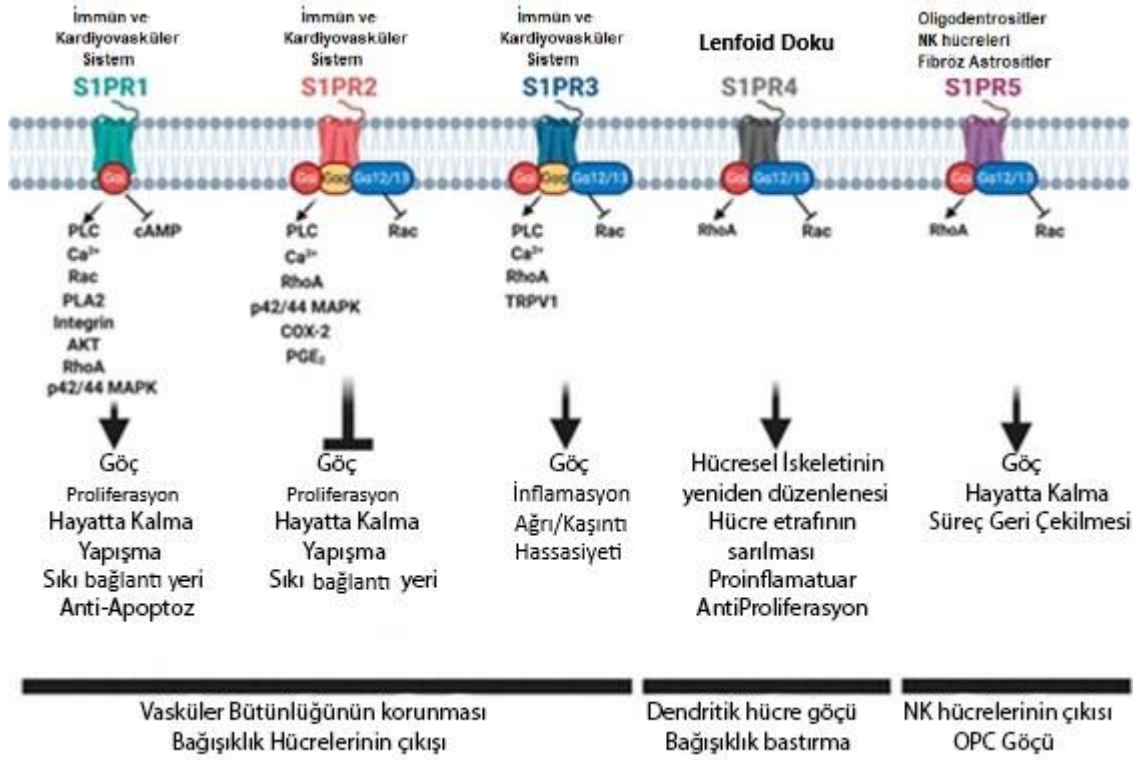
tipindeki her reseptörün ekspresyon modeline bağlı olarak çeşitli hücre içi sinyalleri ileten S1P reseptörlerini, S1P1-5'i aktive eder (Obinata ve Hla, 2019).

2.5.5. Sfingozin-1-fosfat reseptör sinyali

S1P tüm reseptörlerine yüksek afinite ile bağlanır ve vasküler bütünlük, bağışıklık hücrelerinin çıkışı ve hücre göçü için önemli olan aşağı akış sinyal yollarını indükler. Bu birleşme Rho, Rac ve Ras gibi küçük GTPazların aktivasyonu ile sonuçlanır (Mendelson ve diğerleri, 2014). S1P reseptörlerinin diğer akış aşağı efektörleri arasında adenilat siklaz, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI-3-kinaz), Ras-MAPK, fosfolipaz C, protein kinaz C, serin/treonin protein kinaz AKT, Ras-ERK, tirozin protein kinaz JAK-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT), Akt/PKB (protein kinaz B), c-Src tirozin kinaz, fosfolipaz D ve fokal adezyon kinaz p125 ve hücre içi kalsiyum bulunur (Drexler, Molina, Mitrofanova, Fornoni ve Merscher, 2021; Hannun ve Obeid, 2018).

S1P tarafından düzenlenen transkripsiyonel tepkiler iyi anlaşılmamıştır; bununla birlikte, son çalışmalar Rho GTPase-bağlı S1P reseptörlerinin Hippo sinyal yolunu ve bununla ilişkili transkripsiyonel efektörleri aktive edebildiğini göstermektedir. S1P'nin ayrıca histon deasetilazlar, TRAF2 ve prohibitin 2 gibi alternatif GPCR'den bağımsız yollar aracılığıyla işlev gördüğü de öne sürülmüştür (Alvarez ve diğerleri, 2010; Hait ve diğerleri, 2009; Mendelson ve diğerleri, 2014; Strub ve diğerleri, 2011; Yu ve diğerleri, 2012).

S1PR1, yalnızca inhibitör Gai ile eşleşir; S1PR2 ve S1PR3, G α i , G α q ve G α 12/13'e bağlanır; oysa S1PR4 ve S1PR5, G α i ve G α 12/13 alt birimleriyle birleşir. Bu G proteinlerine S1PR bağlanmasını, vasküler bütünlüğün korunmasında, bağışıklık hücrelerinin çıkışında ve hücre göçünde önemli olan birçok aşağı akış sinyal yolunun aktivasyonuna yol açan reseptör aktivasyonu ve sinyal transdüksiyonu takip eder (Drexler ve diğerleri, 2021). Şekil 2.14're S1P ve reseptörlerinin sinyal mekanizmaları gösterilmektedir.



Şekil 2.14. S1P-S1P reseptör mekanizması

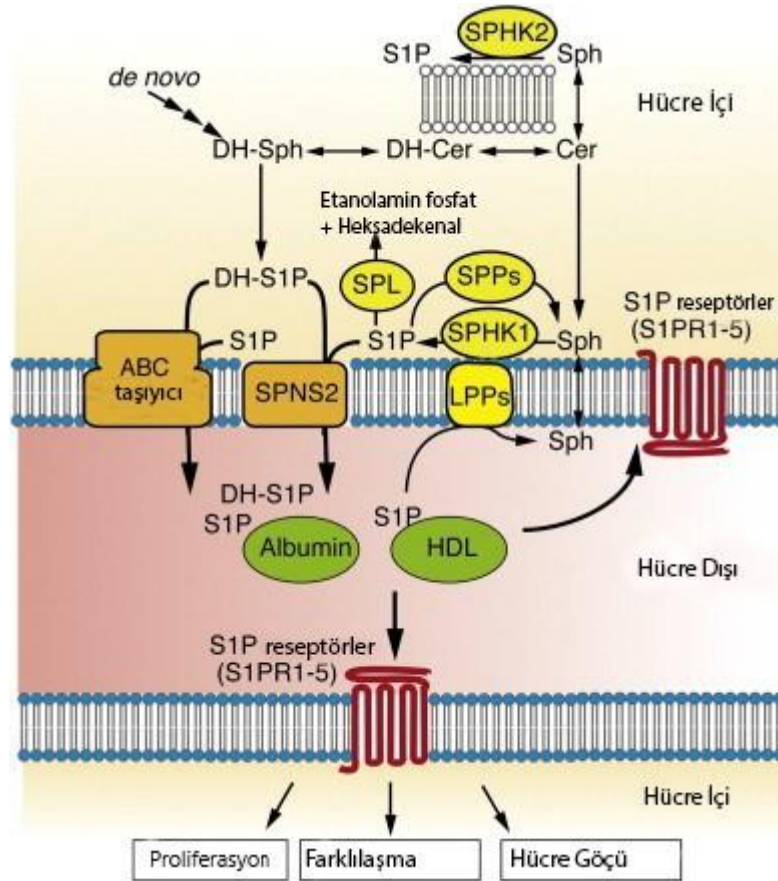
S1P'nin bilinen S1PR'lerden bağımsız görünen bazı başka eylemleri de vardır. S1P eylemi, metabolize edici enzimlerinin aktivasyonuna ve mekansal dağılımına ve ayrıca substrat olan sfingosinin mevcudiyetine bağlı olabilir (Strub ve diğerleri, 2010). S1P, hücre tipine, sentez ve bozunma bölgesine ve hastalığın patofizyolojisine bağlı olarak hem pro-hem de anti-inflamatuvar özellikler sergileyen iki ucu keskin bir kılıçtır. S1P'nin hücrel etkilerinin çoğu, hücre yüzeyindeki G-proteinine bağlı S1P1-5 reseptörlerine bağlanmasına atfedilmiş olsa da, S1P ayrıca E3 ubiquitin ligaz TRAF-2, Rac1, β -bölgesi amiloid öncü protein parçalayıcı enzim-1, telomeraz ve Ca²⁺ + homeostazı gibi hücre içi hedefler üzerinde doğrudan etki ile hücre içi sinyal verebilir. Ayrıca son çalışmalar, S1P'nin insan telomerazına bağlandığını göstermektedir (Ebenezer, Fu, Suryadevara, Zhao ve Natarajan, 2017).

2.5.6. Sfingozin-1-fosfat taşınımı

Seramidler, sfingomyelinler ve sfingolipidlerin hidrofobik yapısı göz önüne alındığında, bu moleküllerin özel olarak taşınmadıkları sürece (hidrolitik veya sentetik olarak) üretildikleri bölmelerde kalacakları açıktır. S1P'nin zayıf sulu çözünürlüğü, kan ve lenf dolaşımında taşınması ve S1PR'lere erişim için protein molekülleri ile ilişkisini gerektirir. Bu tür

etkileşimler aynı zamanda biyolojik kompartımanlar boyunca uzamsal konsantrasyon farklılıkları olan S1P gradyanlarının oluşumunu kolaylaştırır, böylece çeşitli yerlerde seçici reseptör aktivasyonuna izin verir (Cartier ve Hla, 2019). Bu özellikler, S1P'nin birden fazla fizyolojik sürece dahil olmasını sağlar. Omurgalılarda, hücre içinde üretilen S1P, özgül taşıyıcılar ile hücre dışı alana salınır. Bu taşıyıcılardan biri, endotel hücrelerinde SPNS2 geni tarafından kodlanan (protein spinster homologu-2 (SPNS2) ve kırmızı kan hücresi (RBC) ve trombositlerde Mfsd2b veya ABC taşıyıcılarıdır (Hannun ve Obeid, 2018; King, 2014; Ren ve diğerleri, 2021).

Plasma S1P, albümin (%30) ve HDL (%65) ile ilişkili spesifik S1P şaperon proteini, apolipoprotein M (ApoM) tarafından taşınır (King, 2014; Mendelson ve diğerleri, 2014; Obinata ve Hla, 2019).



Şekil 2.15. S1P taşınımı

Plazma S1P düzeyleri (1 μ M) yüksekken, doku ve interstisyel sıvılar ise çok düşük düzeyler içerir (Olivera, Allende ve Proia, 2013). Plazma S1P'nin kaynakları net olmamakla birlikte, son araştırmalar trombositlerin, kırmızı hücrelerin ve karaciğer

sinüzoidal endotel hücreleri (EC'ler) gibi hematopoietik olmayan kaynakların olduğunu gösterdiğinden, kandaki S1P'nin hücre kaynakları belirsizdir (Ebenezer ve diğerleri, 2017; Ito ve diğerleri, 2007; Książek, Chacińska, Chabowski ve Baranowski, 2015; Yatomi ve diğerleri, 2004). Lenfatik endotel hücrelerinin de lenfatik dolaşıma S1P salgıladığı düşünülmektedir (King, 2014).

Mast hücreleri, SphK aktivasyonu yoluyla hücre içi ve salgılanan S1P'nin güçlü üreticileridir. Mast hücreleri, hücre yüzeylerinde S1P1 ve S1P2 reseptörlerini eksprese eder (Olivera ve diğerleri, 2007).

Sfingolipid metabolizması, birkaç yolun birbirine bağlı olduğu, oldukça koordineli geniş spektrumlu bir hücresel yoldur. S1P sentezi ve bozunmasının metabolik yolları, fosfolipid sentezi, sterol metabolizması ve transkripsiyonel tepkiler gibi temel hücresel yollarla kesiştiğinden, S1P seviyelerinin modülasyonu, hücre sağkalımı, ölümü ve farklılaşması, hücre hareketliliği ve göçü gibi kritik hücresel kararları büyük ölçüde etkileyebilir (Saba ve Hla, 2004).

S1P'nin etkisi, metabolize edici enzimlerinin aktivasyonuna ve uzamsal dağılımına ve ayrıca substrat olan sfingosinin mevcudiyetine bağlı olabilir. S1P, fizyolojik rollerini, hücre içi hedeflerine bağlanma veya hücre dışı salgılama yoluyla iki mekanizma yoluyla harekete geçirir (Cartier ve Hla, 2019). S1P metabolizmasındaki seramidaz ve sfingosin kinaz (SPHK), hücre içi sfingolipid metabolizmasında ve ayrıca hücre dışı sinyalleşmede çift görev yapar.

S1P'nin hücre içi miktarı sfingozin kinaz (SK) ve sfingozin-1-fosfat liyaz (SPL) enzimleri tarafından kontrol edilir. Genellikle, hücre içi S1P konsantrasyonları, S1P fosfataz veya S1P liyazın etkisiyle düşük tutulur. Buna karşılık S1P, belirli taşıyıcılar aracılığıyla hücre dışına çıkabilir. Bunlar, S1P molekülünü plazma zarının içinden hücre dışı yaprakçığına çevirir, böylece S1P'nin hücre dışı etkisine izin verir. Dışa aktarıldıktan sonra S1P, aynı hücrede eksprese edilen S1PR'leri otokrin bir şekilde aktive edebilir. Bununla birlikte, S1P'ye bağlanan ve sulu çözünürlüğü mümkün kılan şaperon proteinleri ile ekstraksiyon, hücre dışı ortamda dağılabilir S1P'ye yol açar, böylece S1PR'leri parakrin ve/veya endokrin bir şekilde aktive eden uzamsal gradyanlar yaratır (Cartier ve Hla, 2019; Obinata ve Hla, 2019).

Seromit ve S1P, özel biyolojik işlevlere sahip anahtar sfingolipidler arasındadır. S1P, hücre büyümesini teşvik eder, hayatta kalma yanlısı bir molekül olarak işlev görür ve hücre proliferasyonunu, hayatta kalmayı, anjiyogenezi ve hücre kaçakçılığını düzenler ve apoptozu inhibe ederken, öncülleri seramid ve sfingosin tipik olarak hücre büyümesini inhibe eder ve otofajiyi kontrol eden proapoptotik bir molekül olarak hareket eder (Gupta ve diğerleri, 2021; Hannun ve Obeid, 2008). Bu nedenle, zıt hareket eden bu üç sfingolipid metabolitinin hücresel dengesi, "sfingolipid reosta", hücre kaderinin düzenlenmesinde çok önemlidir (Gupta ve diğerleri, 2021; Zaibaq, Dowdy ve Larion, 2022). Normal fizyolojik koşullar altında, sfingolipid reostasının dengesi, anahtar bir enzim olan SphK'nin fonksiyonel aktivitesi ile iyi bir şekilde korunur. Bu karmaşık dengenin sfingozine doğru bükülmesi, hücre döngüsü durmasını ve apoptozu indükler. Buna karşılık, S1P'nin içeride birikmesi, hücre büyümesini ve çoğalma yollarını aktive ederek, genellikle kanser ve diğer enflamatuvar hastalıklar gibi patolojik durumlara yol açar. "Sfingolipid-reosta"ın seromit ve S1P seviyelerini kontrol ederek hücre kaderini tanımladığı fikri, SphK'nin inhibisyonunun S1P'nin azalmasına ve seramitin artmasıyla hücre ölümünün sağlanması gerçeğiyle daha da güçlendirilir (Gupta ve diğerleri, 2021; Lewis, Wallington-Beddoe, Powell ve Pitson, 2018).

2.5.6. Farklı hastalık gruplarında sfingozin-1-fosfat

S1P, günümüzde kanser, ateroskleroz, diyabet, inflamasyon, otoimmün hastalıklar ve osteoporoz dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patofizyolojik sürecin kritik bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir.

Kanser

Yapılan çalışmalarda, SphK1 ve S1P üretiminin tümör büyümesi, apoptoz direnci, tümörün anjiyogenezini ve metastazını desteklediğini göstermiştir (N. J. Pyne ve Pyne, 2020). SphK1 mesajı ve protein seviyeleri, kanserli dokuda sıklıkla yukarı regüle edilir ve ekspresyon, kemo- ve radyo-direnç ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Tümör hücrelerinden salgılanan S1P, büyümeyi, hayatta kalmayı, hareketliliği ve metastazı teşvik etmek için otokrin bir şekilde veya endotel adezyon moleküllerini, anjiyogenezi indüklemek ve tümör-stromal etkileşimleri ve ayrıca bağışıklık hücrelerini düzenlemek için parakrin bir şekilde S1PR'ler aracılığıyla hareket edebilir (Maceyka ve diğerleri, 2012). S1P hücre

ölümünü ve hayatta kalmayı uyarma mekanizmalarında rol aldığı için kanser hücrelerinin büyüme hızını değiştirmek için manipülasyona uygun moleküller arasında yer alır (Ishii ve diğerleri, 2009; Ségui, Andrieu-Abadie, Jaffrézou, Benoist ve Levade, 2006). MCF-7 meme kanseri hücrelerinin meme kanserine karşı yaygın kullanılan ve oldukça güçlü bir kemoterapötik ajan olan doksorubisin ile tedavisi seramit ve sfingozin düzeylerini artırır ve apoptozu indükler. Bunun aksine, MCF-7 hücrelerinde SphK1'in aşırı ekspresyonu, S1P seviyelerini artırır, hücre proliferasyonunu artırır, hücre döngüsünün G1/S geçişini hızlandırır ve DNA sentezini artırır. Ayrıca, SphK1 aşırı ekspresyonu meme kanseri hücre büyümesini ve farelerde tümör oluşumunu artırır (R. H. Kim ve diğerleri, 2009).

Ateroskleroz

Ateroskleroz kronik bir enflamatuvar durumdur ve ayırt edici özelliği plaklar olarak adlandırılan lipidlerin ve bağışıklık hücrelerinin subendotelial bölgelerde yoğun bir şekilde birikmesi ve plağın yırtılmasından sonra arter lümeninin daralmasına ve tromboza neden olmasıdır. Ateroskleroz patogeneğinde S1P'ye olan ilgi, S1P'nin büyük ölçüde yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve albümine bağlı olduğu dolaşımda yüksek konsantrasyonlarda olduğu gözlemlerinden kaynaklanmaktadır. S1P'nin, monosit bağlanması ve göçü, düz kas hücrelerinin proliferasyonu, vasküler tonus ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açan NF- κ B yolunun uyarılması dahil olmak üzere ateroskleroz gelişiminde merkezi olan çeşitli hücre tipleri üzerinde çeşitli etkileri vardır (Cartier ve Hla, 2019; Daum, Grabski ve Reidy, 2009; Maceyka ve diğerleri, 2012). HDL'nin vazodilatasyon ve endotel hücrelerinin göçünü uyarması ve vasküler yapıda kardiyoprotektif bir role sahip olması S1P'ye bağlıdır (King, 2014). Endotelial S1PR'ler inflamasyonu etkiler ve seramidlerin aracılık ettiği etkilere karşı koyarak eNOS aktivasyonu yoluyla damar genişlemesini artırır (Ganbaatar ve diğerleri, 2021; Green, Maceyka, Cowart ve Spiegel, 2021). S1P'nin taşıyıcısı olan ApoM-S1P'nin, sürekli S1PR1-PI3K-AKT-eNOS'a bağlı geliştirilmiş bariyer fonksiyonuna yol açan S1PR1 sinyalini uzatan taraflı bir agonist gibi davrandığı, albumin-S1P ise S1PR1'in hızlı içselleştirilmesine ve duyarsızlaşmasına yol açtığı gösterilmiştir. Makrofajlarda hücre içi S1P, depolanan lipidlerin bozulmasını artırırken, S1P/S1PR sinyalleri apoptozu bloke eder ve ABCA1 aracılı kolesterol ihracatını artırır (Vaidya ve diğerleri, 2019). Ayrıca, S1PR1'in ApoM-S1P tarafından aktivasyonu, endotel hücrelerinde ICAM-1 ve VCAM-1'i artıran sitokin kaynaklı NF- κ B yolunu antagonize ettiği gösterilmiştir (Galvani ve

diğerleri, 2015). Bu, endotelial S1PR1'in damar duvarını iltihaplanma ve aterosklerozdan koruduğunu gösterir.

Diyabet ve obezite

Diyabet, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen kronik bir hastalıktır. İnsülin duyarlılaştırıcı, anti-enflamatuar ve anti-apoptotik fonksiyonlara sahip bir hormon olan adiposit kaynaklı adiponektin ile insülin duyarlılığına sahip seramit ve metabolitleri arasında yakın zamanda başka bir ilgi çekici bağlantı ortaya çıkarıldı. Adiponektinin iki reseptörü olan AdipoR1 ve AdipoR2'ye bağlanması, seramidaz aktivitesini (sfingozine deasilasyon) ve bunun anti-apoptotik metaboliti S1P'nin oluşumunu uyarır. S1P daha sonra reseptörlerine bağlanarak AMPK'nin aktivasyonuna yol açabilir. Adiponektinin S1P yoluyla bu etkileri, pankreatik beta hücrelerinin hayatta kalmasını, besin alımını, besin kullanımını ve mitokondriyal proliferasyonu teşvik edebilir (Holland ve diğerleri, 2011; Maceyka ve diğerleri, 2012).

İnsanlarda dolaşımda en bol bulunan doymuş yağ asidi olan palmitat, hem serin palmitoil transferaz (SPT) hem de seramid sentaz (CerS) için bir substrat olduğu için seramit üretimini artırır ve dihidroseramid desaturaz (DES1) ve SphK1 dahil olmak üzere önemli sfingolipid biyosentetik enzimlerin transkripsiyonunu düzenler (Ross ve diğerleri, 2013).

S1P/S1PR sinyalinin düzenlenmesi, dokuya özgü metabolik sonuçlar sergiler. Karaciğer hepatositlerinde üretilen S1P, sterol, lipid ve enflamatuar gen ekspresyonunu düzenlemenin yanı sıra insülin sinyallemesini ve trigliserit depolamasını geliştirmek için AKT'yi aktive edebilir (Aji ve diğerleri, 2020). S1P ve S1P/S1PR sinyali, adiposit iltihabını, farklılaşmasını ve lipolizi, glikoz alımını ve mitokondriyal biyogenezi etkileyen yolları modüle eder. Kaslarda, S1P/S1PR, AKT aktivitesini bloke etmek için kısmen IL6 üretimi ve reseptör aktivasyonu yoluyla insülin sinyalini etkiler (Ross ve diğerleri, 2013). Pankreas β hücrelerinde, S1P insülin sekresyonunu artırır ve S1PR'lerin aktivasyonu apoptozu baskılar ve mitokondriyal biyogenezi düzenler (Green ve diğerleri, 2021).

Pnömoni

Endotel bariyer bütünlüğü bağlamında S1P, akciğerleri pulmoner sızıntı ve akciğer hasarından korumada çok önemli bir rol oynar. Akciğer hasarı ve endotelyal bariyer fonksiyonuna dahil olması nedeniyle S1P, pnömoninin potansiyel bir biyobelirteci olabilir. Ayrıca yakın tarihli bir çalışma, akciğerdeki S1P/S1P reseptörü 2-sinyal yolunun hedeflenmesinin, akut akciğer hasarının önlenmesi için pnömonide yeni bir terapötik perspektif sağlayabileceğini öne sürmüştür (Gutbier ve diğerleri, 2018; Hsu ve diğerleri, 2019). Kortikosteroid tedavisinin mantığı, sistemik kortikosteroidin lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtı azaltabilmesi ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe edebilmesidir (Montón ve diğerleri, 1999). Sfingozin kinaz 1'in glukokortikoidler tarafından indüklenmesinden kaynaklanan artan dolaşımdaki S1P seviyelerinin, pulmoner inflamasyonun inhibisyonu için gerekli olduğu öne sürülmüştür (Vettorazzi ve diğerleri, 2015). Deksametazon, yalnızca sitozolik izoenzim sfingozin kinaz 1'in ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirmekle kalmaz, aynı zamanda sfingolipid-S1P gelişmiş bir hücre içi oluşumunu da başlatır (Nieuwenhuis ve diğerleri, 2009).

Kemik metabolizması

S1P osteoklast öncüllerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik bozulmasını azaltır, böylece kemik yıkımını önler (Tian ve diğerleri, 2021). S1P normal dokularda düşük konsantrasyonlarda bulunabilir. Bu doğal lipit gradyanı, belirli hücre tipleri için en güçlü kemo-çekici sisteme aittir; artan hücre içi S1P, hücrel durumu bir pro-survival/anti-apoptotik fenotipe kaydırır; azalmış S1P, diğer arabulucularla birlikte hücre farklılaşma süreçlerini güçlendirebileceği gibi, proliferasyonun azalmasına yol açar; S1P, kemik rezorpsiyonu ile etkileşime giren bir lipit aracıdır (Alvarez, Milstien ve Spiegel, 2007; Meshcheryakova ve diğerleri, 2017).

Preosteoklastlarla karşılaştırıldığında olgun çok çekirdekli osteoklastlarda S1P oluşturmak için sfingozinin fosforilasyonunu katalize eden sfingozin kinaz 1'in (SPHK1) önemli indüksiyonu gözlenmiştir. S1P, osteoblast öncü alımını indükler ve olgun hücre sağkalımını destekler. Osteoklastların farklılaşma sırasında SPHK1 enzimini ve dolayısıyla reaksiyon ürünü S1P'yi ürettiği gösterilmiştir (Ryu ve diğerleri, 2006). S1P osteoblast göçünü uyarır

ve hayatta kalmalarını destekler. Bu nedenle osteoklastlar, kemik rezorpsiyon bölgelerine osteoprojenitörler alabilir ve S1P salgılayarak olgun osteoblast sağkalımını teşvik edebilir (Pederson ve diğerleri, 2008).

Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar S1P'in kritik bir osteoanabolik faktör olarak potansiyeli vurgulanmıştır (Keller ve diğerleri, 2014). S1P, osteoblastların kemik oluşturma kapasitesini lokal olarak destekleyen anahtar osteoklast türevi birleştirme habercisi olarak tanımlanmıştır (Meshcheryakova ve diğerleri, 2017). Fizyolojik gözlemlere paralel olarak, fare osteoklastlarında kalsitonin reseptörünün hücre tipine özgü silinmesi trabeküler kemik hacminde bir artışla sonuçlanmış; ayrıca, osteoklastlar tarafından S1P salınımı arttırıldığı gözlenmiştir (Keller ve diğerleri, 2014). Bu veriler S1PR3'ün S1P'ye yanıt olarak kemik oluşumunu teşvik etmek için gerekli olduğunu göstermektedir.

Osteoklastlarda eksprese edilen sfingozin kinaz (SPHK), sfingozini fosforile ederek sfingozin 1 fosfat (S1P) üretir ve osteoblastogenezi destekler (Pederson ve diğerleri, 2008). RANKL stimülasyonu(uyarma) üzerine osteoklast öncüllerinde S1P üretimi artar ve S1P, osteoblastların yüzeyindeki S1P reseptörüne bağlanır, bu da osteoblast göçünün ve hayatta kalmanın artmasına neden olur. Daha sonra, S1P ile aktive olan osteoblastlar RANKL ekspresyonunu yukarı düzenleyerek osteoklastogenezi (osteoklastların monositler ve makrofajlardan farklılaşması) arttırır (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020; Ryu ve diğerleri, 2006).

S1P, osteoblastlarda RANKL'ı artırarak osteoblastların proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve göçünü ve ayrıca osteoklast farklılaşmasını etkiler. Kan ve kemik iliği boşlukları arasındaki osteoklast öncülerinin trafiğini kontrol eder. S1P konsantrasyonu dolaşımda yüksektir, kemikte düşüktür; bu nedenle, osteoklast öncülleri kandan kemiğe göç eder (Chapurlat ve Confavreux, 2016; Ishii ve Kikuta, 2013; J.-N. Zhang ve diğerleri, 2015). S1P ayrıca osteoklast öncüllerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik bozulmasını azaltır, böylece kemik yıkımını önler (Tian ve diğerleri, 2021).

S1PR1 ve S1PR2 zıt etkilere sahiptir. Monosit hücrelerinde düşük bir S1PR1 seviyesi, osteoklast öncüllerinin birikmesine ve kemik rezorpsiyonunun artmasına neden olurken,

azalmış bir S1PR2 seviyesi, osteoklastik kemik rezorpsiyonundaki bir azalma ile ilişkilidir (Konukoglu, 2019; Quint ve diğerleri, 2013). Yüksek serum S1P düzeylerinin, menopozdan sonra kadınlarda artmış kemik rezorpsiyonu ve artan vertebral kırık prevalansı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Bae ve diğerleri, 2016).

S1P üretimi, aktive trombositler, eritrositler ve vasküler ve lenfatik endotelial hücreler gibi diğer hematopoietik olmayan hücrelerde gösterilmiştir; Mast hücreleri, nötrofiller ve farklı orijinli epitel hücreler için de sentez ve sekresyon bildirilmiştir. Yerel S1P konsantrasyonlarını etkileyen bir diğer önemli husus, S1P üreten/salgılayan hücrelerin yerel mevcudiyetidir. Bu, belirli bir doku veya doku bölmesi içindeki mikro ortamın S1P seviyelerini ve S1P etkilerinin spektrumunu etkileyeceğini ve hatta tanımlayacağını düşündürür. Kemik ve kemik iliği ile ilgili olarak, S1P üreten ana hücresel fabrikalardan biri olan eritrositlerin kemik iliğinde üretildiğini ve kemik homeostazının altında yatan S1P/S1PR'ye atfedilen mekanizmalarda çok özel ancak henüz tam bilinmeyen bir rol oynayabileceğine dikkate almak önemlidir. Ayrıca erken faz yanıtı sırasında, kemik hasarına yerel bir trombosit aktivasyonu ve trombosit kaynaklı bir büyüme faktörünün (PDGF) ve muhtemelen S1P'nin trombosit aracılı salgılanması eşlik eder. Osteoklastlar ve osteoblastik hücreler ayrıca kemik mikroçevresinde önemli miktarlarda S1P salgırlar (Meshcheryakova ve diğerleri, 2017).

İn vitro çalışmalarda özellikle, ekzojen olarak eklenen S1P'nin osteoklast farklılaşması üzerinde olumsuz bir etkisi olmamıştır, bu da gözlenen etkilerden hücre dışı S1P yerine hücre içi sorumlu olabileceğini gösterebilir (Ryu ve diğerleri, 2006).

Kemik homeostazındaki S1P etkilerini daha ayrıntılı analiz etmek için Ishii ve ark. özellikle osteoklastlar/monositlerde (cS1PR 1 -/-) S1PR1 eksik fareler üretmiş. Bu hayvanlarda, toplam kemik dokusu yoğunluğu önemli ölçüde bozulmuş ve hem trabeküler kalınlıkta hem de trabeküler yoğunlukta bir azalma eşlik etmiş ve bunu osteoporotik bir durum olarak yorumlamışlar (Ishii ve diğerleri, 2009).

Şaşırtıcı bir şekilde, hücre göçünde katkıda bulunan rolünün yanı sıra, S1PR1 ekspresyonunun, kemik morfogenetik protein-2 (BMP2) kaynaklı mezenkimal progenitörlerden olgun osteoblastlara geçişi sırasında yukarı regüle olduğu bulunmuştur ve

bu nedenle yeni bir osteoblastogenez belirteci olarak aday gösterilebilir (Meshcheryakova ve diğ erleri, 2017).

Lee ve ark. postmenopozal kadınların premenopozal kadın ve erkeklere göre daha yüksek S1P plazma düzeylerine sahip olduğu göstermişler. Ayrıca, S1P düzeyleri kemik rezorpsiyon belirteçleri ile pozitif korelasyon göstermiş ve kemik mineral yoğunluk değerleri ile negatif korelasyon göstermiş, bu da dolaşımdaki S1P'nin kemik homeostazını etkileyebileceği hipotezini güçlü bir şekilde desteklemektedir (S. H. Lee ve diğ erleri, 2012).

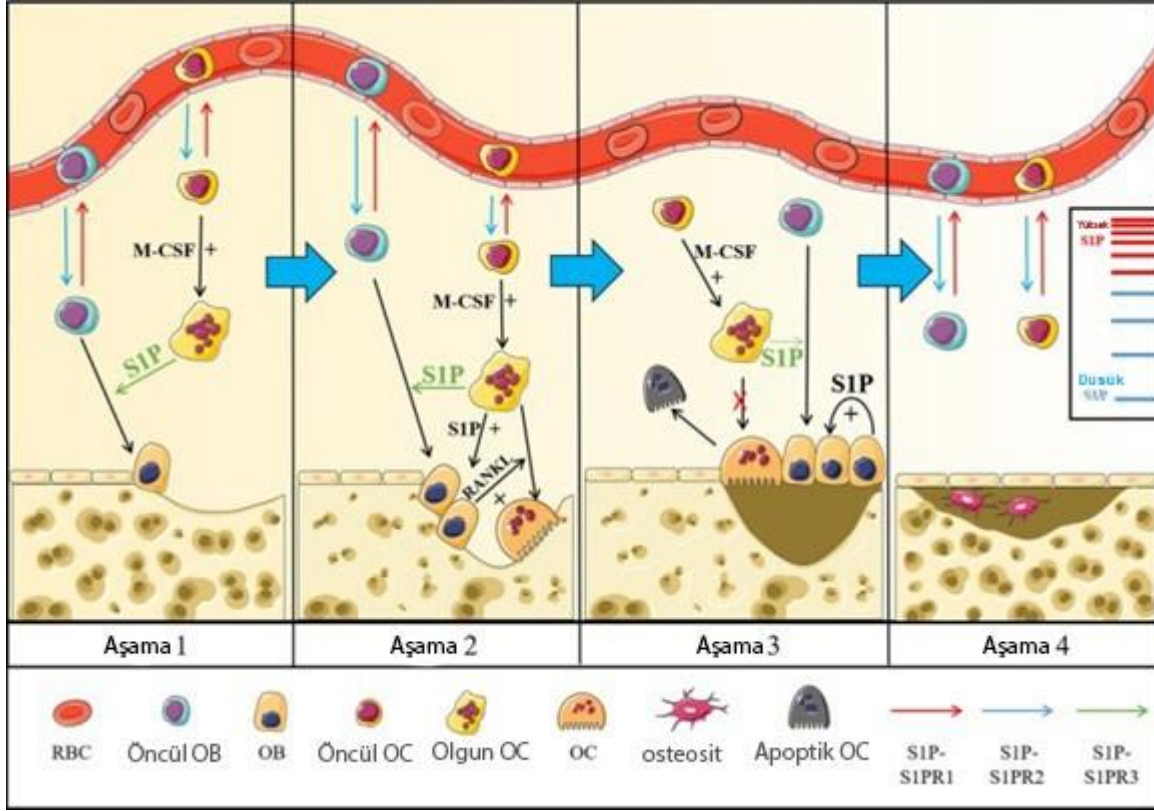
Kim ve ark. plazma S1P düzeyleri ile vertebral kırık riski arasındaki ilişkileri araştırdıkları çalışmalarında, vertebral kırık olmayan postmenopozal kadın grubunda vertebral kırık olan gruba göre S1P düzeylerinin anlamlı derecede düşük olduğunu göstermişler; ikinci grupta plazma S1P seviyeleri, vertebral kırık sayısı ile pozitif korelasyon göstermiş. Bununla birlikte, yazarlar kan S1P'yi osteoporotik vertebral kırığın risk değerlendirmesi için yeni bir biyobelirteç olarak önermişlerdir (Kanis, Cooper, Rizzoli ve Reginster, 2019; B.-J. Kim ve diğ erleri, 2012).

Son zamanlarda, bağışıklık sistemi hücreleri ile kemik arasındaki sinyalleşmeye odaklanan "osteoimm noloji" terimi geliştirilmiştir. Enfeksiyonun erken evrelerinde spesifik olmayan bağışıklık sistemi aktive olur, daha sonra T ve B lenfositleri resme girer çünkü makrofajları aktive eden T hücreleri, dolaylı olarak osteoklastları ve bunların öncüllerini ve doğrudan nükleer faktör Kappa Beta'nın (RANK) reseptör-ligand aktivatörünün ekspresyonunu aktive edebilir. S1P, kemiğin yeniden şekillenmesi süreçlerinde gösterilmiştir; osteoblastların ve osteoklastların oluşumunu indükler (Xiao, Zhou, Friis, Beagley ve Xiao, 2019).  alışmalar, S1P'nin romatoid artrit ve kemik homeostazı gibi inflamatuvar hastalıklara katılımlarını göstermiştir (Ishii ve Kikuta, 2013).  n vitro ve in vivo modeller, S1P'nin kemotaksiyi indüklediğini ve kemik dokusu homeostazında osteoklast öncüllerinin göçünü düzenlediğini bildirmiştir (Ishii ve diğ erleri, 2009). S1P seviyelerine gelince, artan S1P konsantrasyonu kanser, romatoid artrit ve aterosklerozda lokalize edilmiştir. Kanda dolaşan S1P seviyeleri kırmızı kan hücreleri tarafından üretilir, bu nedenle hematokrit değeri konsantrasyonlarını etkileyebilir (Garc a-Parra ve diğ erleri, 2021).

Kemik dokusunun yıkımı, S1P sayesinde yıkım bölgesine çekilen osteoklast öncüllerinden türetilen osteoklastların aktivitesinde bir artış ile karakterize edilir. S1P, osteoblastlar ve T lenfositler yoluyla RANKL üretimini indükler ve bunlar RANK ile birleştiğinde osteoklast oluşumunu başlatırlar. Osteoklastlar farklılaştıktan sonra S1P üreterek osteoklastogenez için çift yönlü bir besleme devresi oluşturabilirler (Keller ve diğerleri, 2014; Xiao ve diğerleri, 2019). S1P sinyali, monositlerin ve makrofajların kan dolaşımından etkilenen kemik ve kemik dokularına göçünü modüle etmek için kritik öneme sahiptir. Bu monositler ve makrofajlar, kemik kaybına yol açan osteoklastik öncüler olarak bilinirler (García-Parra ve diğerleri, 2021).

İnsan vücudundaki sayısız işlemi düzenleyen fonksiyonel bir molekül olan S1P, kan damarlarında artarken diğer dokularda azalır ve böylece kan ile interstisyel sıvı arasında bir S1P gradyanı oluşturur. Osteoporozun nedenlerinden biri, osteoklastların kemokin aracılı olarak kemik rezorpsiyon bölgelerine alınmasıdır ve enflamatuvar, osteoliz ve kemik metastazı, enflamatuvar hücrelerin veya tümör hücrelerinin kemokin gradyanları yoluyla göç etmesinden kaynaklanır. S1P, osteoklast-osteoblast karışmasında bir bağlantı faktörü olarak katılmak için RANKL ile işbirliği yapar.

S1P, osteoklast farklılaşmasını destekleyen ve osteolizi kontrol eden osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu artırır (Şekil 2.16.). Böylece S1P, osteoklastlar ve osteoblastlar arasında bir bağlantı faktörü olarak osteoliz ve osteogenezin karşılıklı ilerlemesini ve dengesini uyarır (L. Zhang ve diğerleri, 2020). Şekil 2.16'da kemik döngüsünde S1P ve RANKL ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.16. S1P'nin kemik döngüsündeki rolü (L. Zhang ve diğerleri, 2020).

S1P, kemik döngüsü ve osteoporozda önemli bir rol oynar. Osteoporozun erken belirtilerinden biri, kemik döngüsünün önündeki engellerdir ve tüm kemik döngüsü süreci dört aşamaya ayrılabilir. İlk aşamada, OCP'ler ve OBP'ler, S1PR2 sinyal yolu aracılığıyla kemik iliğine alınır (bu hücreler, S1PR1 sinyali yoluyla kana taşınır). Ve osteoklastik hücre tarafından salgılanan S1P, osteoblastların farklılaşmasını uyarabilir. İkinci aşamada, S1P ile işbirliği yapan RANKL, kemik döngüsünü kolaylaştıran ve kemik hemostazını koruyan osteoklast-osteoblast karışması için bir bağlantı faktörü görevi görür. Osteoblastların farklılaşması ve RANKL ekspresyonu, S1P (osteoklastik hücrelerden salınan) tarafından indüklenirken, kemik matriksinin çözünmesi TGF- β 'yı serbest bırakır. Üçüncü aşamada, osteoblastların hızlı proliferasyonu (S1P tarafından otokrin bir şekilde indüklenir) ve osteoklastların apoptozu, sonunda çözünmüş kemik matriksini yeniden dolduran OB/OC oranının artmasına yol açar. Son aşamada ise yeni kemik oluşumu tamamlanır ve kemik döngüsü ilk aşamadan itibaren devam eder (L. Zhang ve diğerleri, 2020).

Romatoid artrit (RA), sinovyal astar hücrelerinin hiperplazisi, mononükleer hücrelerin, özellikle sinovyal T hücrelerinin ve makrofajların infiltrasyonu, anjiyogenez ve

osteoklastik kemik yıkımı gibi histolojik işaretlerle karakterize kronik, yıkıcı, otoimmün bir eklem hastalığıdır.

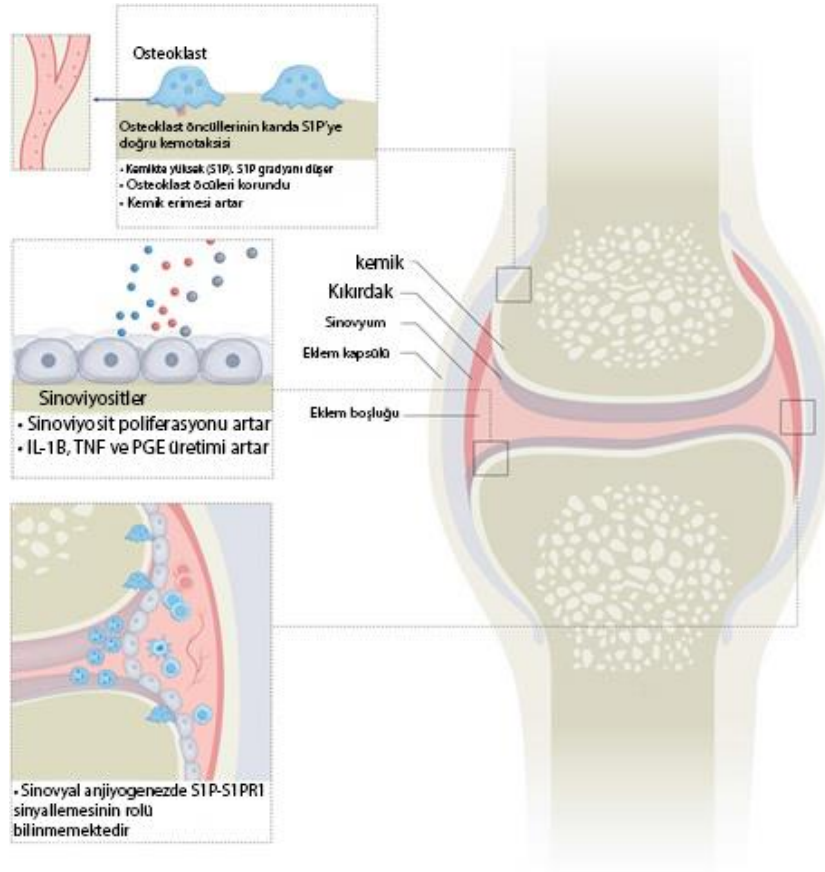
Bir tümör nekroz faktörü (TNF) aile üyesi olan RANKL, osteoklast öncüllerinin osteoklast farklılaşmasına bağlanmasında önemli bir rol oynar. RANKL, farklılaşmış osteoklastların aktivasyonu ve hayatta kalması için de önemlidir. Osteoklast farklılaşması için hücre yüzeyi moleküllerinin, osteoklast öncüllerinde bulunan RANK ile RA'da sinoviyal hücreler, CD4 + T hücreleri ve osteoblastlar gibi diğer hücrelerde eksprese edilen RANKL arasındaki etkileşime bağlı olduğu bulunmuştur (Takeshita ve diğerleri, 2012).

Kemik ve diğer dokularda kabul edilen bir ilke sfingozin reostasıdır: burada seramitin ve S1P'nin hücre içi seviyeleri hücre sağkalımını ve proliferasyonunu etkiler, seramit pro-apoptotik olarak kabul edilir ve S1P anti-apoptotik bir tarzda hareket eder (Maceyka ve diğerleri, 2012). Ek olarak, hücre içi S1P'nin kemik hücreleri içindeki rolünü doğrudan araştıran az sayıda çalışma vardır (Ryu ve diğerleri, 2006); bu nedenle, konuyla ilgili incelemeler, diğer hücre türlerinde gerçekleştirilen diğer çalışmalara dayalı olarak işlevler çıkarma eğilimindedir (Frost, Naylor ve McGettrick, 2023).

S1PR1 modülatörlerinin RA'yı iyileştirebileceği mekanizmalar, sinoviyal dokularda oto-agresif T hücrelerinin bloke edilmesini, Treg-TH17 hücre dengesizliğinin restorasyonunu ve hem mikrovasküler hem de aterosklerotik hastalığı hafifletmek için vasküler bariyerin güçlendirilmesini içerir (Burg, Salmon ve Hla, 2022; Sluiter, van Buul, Huveneers, Quax ve de Vries, 2021).

S1P'nin RA'da birçok proinflamatuvar etkisi vardır; bunlara in vitro-inflamatuvar sitokinlere yanıt olarak sinoviyosit proliferasyonunu ve prostaglandin E2 (PGE2) ve siklooksijenaz 2'nin (COX2, prostaglandin G/H sentaz 2 olarak da bilinir) sinoviyosit üretimini indüklemeye yeteneği dahildir. S1P, S1PR1 aracılığıyla fibroblast benzeri sinoviyositlerin apoptozunu engeller ve sinoviyositler ve CD4+ T hücreleri üzerinde RANKL'ı artırır, böylece osteoklastogenezi teşvik eder, kemik erozyonlarına katkıda bulunabilir (Zhao ve diğerleri, 2008). RANKL sinyali, S1PR1'in osteoklast öncülleri üzerindeki ekspresyonunu aşağı doğru düzenler, dolaşıma yeniden çıkışlarını engeller ve osteoklast olgunlaşmasını ve kemik erimesini artırır (Ishii ve diğerleri, 2009). Lenfosit S1PR1 ekspresyonu ve lokal S1P seviyesi ters ilişkili olduğu için, sinovyal dokulardaki yüksek S1P seviyeleri S1PR1'in

T hücresi ekspresyonunu azaltır, böylece dokularda T hücresi alıkonma süresini arttırır, potansiyel olarak hastalığı şiddetlendirir (Burg ve diğerleri, 2022). Şekil 2.17’de S1P’nin RA’de görülen eklem hasarındaki etkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.17. S1P'nin RA'da inflamatuvar yaralanmaya ve eklem yıkımına katkısı (Burg ve diğerleri, 2022).

RA’li hastaların sinovyumunda (trombositler dahil birçok kaynaktan) yükselmiş S1P seviyeleri, osteoklast prekürsör retansiyonunu ve kemik rezorpsiyonunu artırarak, sinoviyosit proliferasyonunu, prostaglandin E2 (PGE2), tümör nekroz faktörü (TNF) ve IL-1 β üretimini artırarak hastalık patogenezine katkıda bulunabileceği gösterilmiş (Burg ve diğerleri, 2022).

2.6. Deneyisel Model

Kemik doku ve ilgili hastalıkların tanı, tedavi ve takip yaklaşımlarını geliştirmek için çok daha derin araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

Günümüzde yaygın olarak görülmesi sebebiyle osteoporoz için tanı, tedavi ve tedavinin izlenmesi kritik öneme sahiptir. Bu konuda büyük bir zorluk, osteoporozun bir kırık ile ortaya çıkana kadar asemptomatik olmasıdır. Sürece dahil olan çok sayıda faktör, belirsiz patogenezi, yaşam kalitesindeki dramatik düşüş, bozukluğun yüksek insidansı (özellikle menopoz sonrası kadınlarda), finansal maliyet ve yüksek ölüm oranı, bu hastalıkta biyobelirteç ve terapötik ajan çalışmaları için laboratuvar deneysel modellerine ihtiyacını zorunlu kılmaktadır.

Genel olarak FDA, klinik çalışmalardan önce hayvan türlerinde prelinik etkilerin gösterilmesini tercih eder.

2.6.1. Osteoporoz hayvan modeli

Osteoporoz çalışmalarında sıkça deneysel hayvan modeli olarak overektomi yapılmış sıçan kullanılmaktadır. Postmenopozal OP çalışmalarında ovariektomi uygulanmış sıçan “altın standardı” temsil etse de, birkaç dezavantajı vardır. Sıçan, gerçek iskelet olgunluğuna ulaşmada başarısız olur, Havers sisteminden yoksundur ve sınırlı kemik yeniden şekillenmesi gösterir, özellikle kortikal kemikte düşük yeniden şekillenme oranları vardır (Castañeda ve diğerleri, 2008; Lelovas, Xanthos, Thoma, Lyritis ve Dontas, 2008). Ayrıca bu modelin küçük boyutlu olması, epifiz plağının tam olarak kapanmaması ve insanlarla kemik farklılıkları gibi birçok sorunu da beraberinde getirir.

Diğer bir model ise tavşan kullanımındır. Deneysel bir model olarak tavşanlar, nispeten ekonomiktir, uysaldır, çalışması kolaydır, taşınması ve barındırılması kolaydır, büyük genetik olarak homojen gruplar halinde mevcuttur ve geleneksel diş implantlarını ve bazı protetik cihazları değerlendirmek için uygun boyuttadırlar (Permuy ve diğerleri, 2019). Tavşan kemiklerinin, insanlarda gözlemlenene benzer şekilde aktif bir Haversian yeniden şekillenmesinin olması, 6-8 ayda epifiz plağının tamamen kapanması, kemirgen ve primatlardan daha hızlı kemik döngüsüne sahip olmalarından dolayı osteoporoz araştırması modeli olarak uygun olduğu ve sıçan modellerinde karşılaşılan bu problemlere çözüm sunduğu görülmektedir (Baofeng ve diğerleri, 2010; Bottagisio, Coman ve Lovati, 2019; Burch ve diğerleri, 2014; Castañeda ve diğerleri, 2008; Permuy ve diğerleri, 2019).

Osteoporotik hayvan modellerinin oluşturulmasında genellikle

- Ovariectomi (OVX) tarafından indüklenen östrojen yoksunluğu;
- OVX'in diyet kalsiyum alımında bir azalma ile kombinasyonu;
- glukokortikoidlerin uygulanması;
- OVX ve glukokortikoid enjeksiyonunun kombinasyonu.
- lokal iskelet bölgesinin denervasyonu,
- yer çekimsiz ortam uygulamaları
- kemiğin değişik yöntemlerle hareketsizleştirilmesi gibi metodlar kullanılabilmektedir.

Ovariectomi

Seks steroidlerinin kemik metabolizmasında ve kemik gücünün korunmasında rol oynadığı bilinmektedir. Östrojenler ve androjenler, osteoblastların osteoklastogenezi teşvik eden lokal uyarıcı faktörleri salmasını engeller (Kobza, Herman, Papaioannou, Lau ve Adachi, 2021). Östrojenin osteoklastlar üzerindeki doğrudan etkileri, apoptozlarının indüksiyonunu ve oluşumlarının inhibisyonunu, ayrıca RANKL ve OPG'ye bağlı dolaylı etkileri içerir. OVX tarafından indüklenen östrojen seviyelerindeki düşüş, osteoklast farklılaşmasını ve hayatta kalmayı artırır. Sonuç olarak, kemik rezorpsiyonu kemik oluşumunu aşar (Permuy ve diğerleri, 2019). Dolaşımdaki seks steroidlerinin daha düşük seviyeleri bu nedenle osteoklast üretimini artırarak kemik erimesini artırır. Ortaya çıkan kemik kaybı kadınlarda menopoz sonrası, erkeklerde orşiektomi sonrası görülür (Kobza ve diğerleri, 2021).

Östrojen, osteoklast oluşumunu ve aktivitesini baskıladığı gibi osteoklast apoptozisini de indükler (Florescio-Silva ve diğerleri, 2015). Östrojenin, osteoblastlar ve osteositler tarafından salınan osteoklastojenik sitokin olan RANKL sentezini inhibe ederek osteoklast oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür. Ayrıca östrojen, bu kemik hücrelerini, osteoklastta RANK'ın bir tuzağı reseptörü olan osteoprotegerini (OPG) üretmesi için uyarır, böylece osteoklastogenezi inhibe eder (Eghbali-Fatourehchi ve diğerleri, 2003). Ek olarak östrojen, IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , TNF- β ve M-CSF gibi diğer osteoklastojenik sitokinlerin seviyelerini azaltarak osteoklast oluşumunu inhibe eder (Florescio-Silva ve diğerleri, 2015).

Bu hormon OC öncüllerinin (OCP'ler) osteoklastojenik sitokin RANKL'a yanıtını azaltarak OC oluşumunu inhibe (önleme, baskılama) eder. Ayrıca östrojen, östrojen reseptör-a'nın (ERa) bir yapı iskelesi proteini olan BCAR1'e bağlanmasını indükleyerek insan

monositlerinin RANKL ile uyarılan osteoklastik farklılaşmasını inhibe eder; ER α /CAR1 kompleksi daha sonra TNF reseptörü ile ilişkili faktör 6'yı (TRAF6) sekestre ederek NF-B aktivasyonunun azalmasına ve RANKL kaynaklı osteoklastogenezin bozulmasına yol açar. Östrojenin OB'ler ve T ve B hücreleri tarafından RANKL üretimini baskıladığını ve ayrıca RANKL, OPG için tuzak reseptör üretimini arttırdığını göstermiştir (Eghbali-Fatourehchi ve diğerleri, 2003; Faienza, Ventura, Marzano ve Cavallo, 2013).

OVX'in diyet kalsiyum alımında bir azalma ile kombinasyonu

Kalsiyum, insan ve hayvan vücudunda en bol bulunan mineraldir ve her yaşta optimal kemik kütlesini elde etmek veya kemik kaybını önlemek için gerekli bir besin maddesidir. Tavşanlarda, insanlara benzer şekilde, yetersiz kalsiyum alımının kemik kütlesini etkilediği bilinmektedir (Martin-Monge ve diğerleri, 2011; Mu ve diğerleri, 2021; Permuy ve diğerleri, 2019).

Ovariektomi ve glukokortikoid uygulamasının kombinasyonu

OVX'e eklenen glukokortikoid uygulamasının bir osteoporoz modeli olarak kullanılmasının iki ana amacı vardır: kemik kaybını hızlandırmak ve glukokortikoid kaynaklı postmenopozal osteoporozu taklit etmek. Bu tip osteoporoz, postmenopozal hastalığı ağırlaştırır, morbiditeyi ve kırık riskini artırır. Aslında, menopoz sonrası kadınların %4,6'ya kadarı oral glukokortikoid almaktadır (Z. Zhang ve diğerleri, 2016).

Glukokortikoid ile indüklenen osteoporozun (GİOP) altında yatan mekanizmalar östrojen yoksunluğundan farklıdır ve temel olarak kemik oluşumunun bozulmasıyla osteoblastların sayısı ve işlevinin azalması ve osteoblast ve osteosit apoptozunun artmasından oluşur (Almagro ve diğerleri, 2013; E Canalis, Mazziotti, Giustina ve Bilezikian, 2007). Osteoblastların sayısındaki azalma temel olarak üç mekanizmaya bağlıdır: mezenkimal hücrelerin osteoblastik soya doğru farklılaşmasında bir bozulma, olgun osteoblastların terminal farklılaşmasının azalması ve olgun osteoblastların artan apoptozu. Bu mekanizmalar, kaspaz3'ün aktivasyonunun aracılık ettiği osteositlerin apoptozu nedeniyle güçlenir. Osteoblastların işleviyle ilgili olarak, glukokortikoid uygulaması, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla kollajen tip I sentezini değiştirir, mineralizasyon için mevcut kemik matriksi miktarında bir azalmaya yol açar (Permuy ve diğerleri, 2019).

Glukokortikoidler, seks steroidlerinin sentezini ve salgılanmasını inhibe ederek benzer bir etkiye neden olur ve sonuç olarak GİOP'a katkıda bulunur (Kobza ve diğerleri, 2021).

Glukokortikoidler, RANK ligandının ekspresyonunu artırarak ve tuzak reseptörü olan osteoprotegerinin ekspresyonunu azaltarak osteoklastogenezi uyararak kemik rezorpsiyonunu artırır. Kemik rezorpsiyonundaki artışa uygun olarak, glukokortikoidler post-transkripsiyonel mekanizmalarla kollajenaz 3'ün ekspresyonunu uyarır (Ernesto Canalis ve Delany, 2002).

GİOP'ta bulunan artmış kemik rezorpsiyonu, RANKL'ı ve osteoprotegerini içeriyor gibi görünmektedir. RANKL, bir osteoklast reseptörüne bağlanan ve koloni uyarıcı faktör (CSF)-1 ile birlikte osteoklastogenezi indükleyen bir osteoblastik sinyaldir. Osteoprotegerin, RANKL'yi bağlayan ve RANKL'nin osteoklast reseptörüne bağlanmasını ve ardından osteoklastogenezi önleyen bir tuzak reseptörüdür (Ernesto Canalis ve Delany, 2002). Glukokortikoidler, RANKL'nin ifadesini artırır ve RANKL tuzak reseptörü OPG'nin ifadesini azaltır. Birlikte, bu eylemler osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu ve ayrıca kemik rezorpsiyonunu teşvik eder (Kobza ve diğerleri, 2021). TNF- α ve interlökin-6 gibi kemik rezorpsiyonunu indükleyen birçok ajan, RANKL ekspresyonunu indükleyerek etki eder. Bu etkiler, artmış osteoklastogenez ve artmış kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanır, ve glukokortikoidlere maruz kalan hastalarda sonunda kemik yeniden şekillenmesinde azalma durumu gelişir (Ernesto Canalis ve Delany, 2002). Çizelge 2.1'de glukokortikoid kullanımının kemik döğüsü üzerine olan etkileri verilmiştir.

Çizelge 2.1. Glukokortikoidlerin kemik metabolizması üzerindeki etkilerinin gösterimi (Ernesto Canalis ve Delany, 2002).

Glukokortikoidlerin kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkileri	Glukokortikoidlerin kemik oluşumu üzerindeki etkileri
Artan osteoklastogenez	Azalmış osteoblast sayısı
Artan RANK-L ve CSF-1 düzeyleri	Azalmış osteoblastogenez
Azalmış osteoprotegerin	Bozulmuş farklılaşma
Artan kollajenaz	Olgun osteoblastların apoptozu
Nihai azalmış osteoklast sayısı	Azalmış osteoblast fonksiyonu
Azalmış osteoblastik sinyaller	Azalan kollajen sentezi
Osteoklastik apoptoz	Azalan Cbfa-1 ifadesi
	Azalan IGF-I sentezi
	TGF- β bağlanmasının değiştirilmesi

Glukokortikoidlere maruz kalan hastalarda serum paratiroid hormonu (PTH) seviyeleri yükselir fakat hiperparatiroid aralığında değildir. Daha da önemlisi, glukokortikoidlere maruz kalan hastalar, temel olarak azalmış kemik yeniden şekillenmesi ile karakterize edilen bir kemik hastalığı geliştirirken, hiperparatiroidizmde yeniden şekillenme artışı bulunur (Ernesto Canalis ve Delany, 2002; Dalle Carbonare ve diğerleri, 2001).

Glukokortikoidler ayrıca doza bağlı bir şekilde osteoblast döngüsünde yer alır. Fizyolojik dozlarda, glukokortikoidler, osteoblast canlılığını sürdürmek için gerekli olan hücresel içeriklerin lizozomal dönüşüm süreci olan osteoblast otofajisini destekler. Supra-fizyolojik dozlarda, glukokortikoidler apoptozu veya hücre ölümünü indükleyerek kemik gücü ve yoğunluğunun kaybına katkıda bulunur (Wang, Heckmann, Yang ve Long, 2019).

Glukokortikoidler, kalsiyumun renal atılımını artırarak ve bağırsaktan kalsiyum geri emilimini azaltarak vücutta negatif bir kalsiyum dengesi oluşturur. Bu, glukokortikoid ile tedavi edilen hastalarda görülen sekonder hiperparatiroidizme katkıda bulunur (Kobza ve diğerleri, 2021).

2.6.2. Romatoid artrit hayvan modeli

Tavşanlar, eklem içi eklem manipülasyonlar gerektiğinde makul eklem boyutu ile kolayca bulunabilen ve uygulanabilen RA modeli sistemleri arasındadır. Deney sırasında uygulanan formülasyonların, tavşanların deneysel olarak artritlik diz eklemlerinde çok daha uzun süre kaldığını ve daha iyi sonuç verdiği yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir. Bir başka deneysel RA modeli olarak fare ve sıçan modelleri de olsa da fare diz ekleminin önemli bir sızıntı olmaksızın kısıtlı miktarda sıvı tutacağı bilinmektedir. Bununla birlikte, eklem ödemi sırasında sinoviyal sıvının birikmesi muhtemelen enjekte edilen artritlik eklemden sıvı kaybı oranını artırır. Bu nedenlerden ötürü çalışmalarda tavşan kullanımını tercih edilmektedir.

Romatoid artrit en iyi hayvan modeli sorusu onlarca yıldır devam etmektedir. Bunun net bir cevabı yoktur. İlk olarak, insan hastalığının tam patolojisi, immünolojisi ve hücresel biyolojisi açısından hiçbir model gerçekten RA'ya benzemez. İkincisi, romatoid artrit monolitik bir hastalık antitesi değil, hastadan hastaya geniş ölçüde değişen ve hastalık etiyolojisine dair güvenilir endikasyonları olmayan bir sendromdur. Klinik RA'da görülen

birçok varyasyon, aslında tek bir hastalık varlığını mı yoksa bilinmeyen kökenleri olan enflamatuvar, eroziv bir eklem hastalığı olarak geniş bir şekilde gruplandırılabilir bir belirti ve semptom yelpazesini mi araştırdığımız konusu önemlidir. Bu nedenle, RA için klinik öncesi girişim veya yeni bir terapötik strateji düşünüldüğünde metod önemlidir. Terapötik manipülasyon için hedeflenen patolojik yol romatoid hastalıkla ilgili mi ve hangi hayvan modeli bu patolojik yola en uygundur dikkatlice araştırılmalıdır (P. Wooley, 2008).

RA hastalık takibi sırasında peri-artiküler veya sistemik osteoporoz gözlenebilmektedir. RA patogeneğinde rol oynayan çeşitli pro-inflamatuvar sitokinlerin osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki dengeyi bozarak kemik kaybına yol açtığı düşünülmektedir. Glukokortikoid kullanılması, hareketsizlik gibi faktörler de kemik kaybını artırmaktadır. RA'da kemik kaybına bağlı olarak kırık riskinin de arttığı bilinmektedir.

RA için farklı uygulama modelleri vardır:

- Cerrahi yöntemler
- Enfeksiyöz ve Reaktif Artrit
- Spesifik Olmayan Enflamatuvar Uyarıcılar ve Bağışıklık Reaksiyonları:
 - Kollajen İle İndüklenen Artrit (CIA) Modeli
 - Adjuvan kaynaklı artrit: Freund adjuvanı (CFA)
 - Antijen kaynaklı artrit: Ovalbumin
 - Diğer indüklenmiş artrit modelleri : pristin (PIA), Mono-İyodo-Asetat (MIA)
- Genetiği değiştirilmiş spontan artrit modelleri vb.

Enfeksiyöz artrit ve reaktif artrit

Hayvan artritine neden olan ajanlar olarak tanımlanan bazı virüsler, bakteriler ve mikoplazma vardır. Farelerde, sıçanlarda ve tavşanlarda deneysel *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) artrit, eklem hastalığında bir dizi ilgili yolu göstermektedir (Choudhary, Bhatt ve Prabhavalkar, 2018; P. Wooley, 2008).

Spesifik olmayan enflamatuvar uyarıcılar ve bağışıklık reaksiyonları

Kollajen kaynaklı artrit (CIA)

Kolajenle indüklenen artrit (Collagen-induced arthritis; CIA), insan RA'i ile birçok benzer patolojik ve immünolojik özelliği paylaştığı için hayvan modeli olarak oldukça sık kullanılır. CIA'de, bir eklem antijenine (kollajen tip II) karşı bir bağışıklık tepkisi yönlendirilmektedir (Moudgil, Kim ve Brahn, 2011). CIA modelinin iki önemli özelliği, tolerans ihlali ve kendine ve kollajene karşı oto antikorların üretilmesidir. Bu, CIA'yı RA çalışmaları için altın standart in vivo model yapar. Bu model, hem T yardımcı (Th1) hem de (Th17) yanıtlarının CIA'de indüklendiği, ancak Th17 hücrelerinin baskın patolojik rol oynadığı gibi görünen T yardımcı hücre aracılıdır (Choudhary ve diğerleri, 2018).

Hastalığın klinik belirtileri tipik olarak ilk aşılama 21-25 gün sonra gelişir ve en çok uzuvlarda belirgin olan ve insan RA'sına benzer sinovyal inflamatuvar infiltrasyon, kıkırdak ve kemik erozyonu ve sinovyal hiperplazi ile karakterize edilen bir poliartrit olarak ortaya çıkar. CIA'nın gelişimi, anti-kollajen tip II antikorların ve kollajene özgü T hücrelerinin üretimi ile hem B- hem de T-lenfosit tepkileri ile ilişkilidir. CIA'deki oto-antikor yanıtı, artrit zirvesinde hem IgG2a hem de IgG2b'nin yüksek seviyeleri ile IgG2 alt sınıfı tarafından baskındır. Çoğu hastalık modelinde olduğu gibi, sonuçların netliğini ve doğrudan karşılaştırılabilirliğini sağlamak için hastalık şiddetinin değerlendirildiği ve sunulduğu bir örneklik gerekliliği vardır. Genel olarak, değişken insidans, şiddet ve gruplar arası tutarsızlığın, kısmen modelin çevreye, bakım koşullarına ve hayvanlardaki genel strese karşı mükemmel duyarlılığını yansıtan, CIA modelinin bir özelliği olduğu kabul edilmektedir. Bu nedenle, verilerin geçerli bir şekilde yorumlanması için dikkatli, bağımsız, dahili kontroller zorunludur (Asquith, Miller, McInnes ve Liew, 2009).

CIA, NSAID'lere veya metotreksata yalnızca zayıf yanıt verir ve esas olarak altın tuzları, klorokin, kolşisin veya levamisolden etkilenmez. CIA'de zayıf NSAID aktivitesinin gözlemlenmesi, birçok kişi tarafından adjuvan artrit modeline göre belirgin bir avantaj olarak görülmektedir (P. H. Wooley, 2004).

Adjuvan kaynaklı artrit

Otoimmün hastalık modellerinin indüklenmesi için tam Freund adjuvanı (Complete Freund's Adjuvant; CFA) kullanımı bilimsel olarak kanıtlanmış bir modeldir (NIH, 2022).

Complete Freund's Adjuvant; yağda su emülsiyonu oluşturmak üzere ilgilenilen antijenin bir çözeltisi ile birlikte emülsifiye edilen, tamamen veya toz haline getirilmiş ısıyla öldürülmüş mikobakterilerin bir süspansiyonunu içeren bir mineral yağdır. Adjuvan aktivite, antijenlerin yağlı tortudan sürekli salınmasının ve lokal doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisinin uyarılmasının bir sonucudur ve bu da adaptif bağışıklığın artmasına neden olur. Bu yanıtın önemli bir bileşeni, lökosit akışından ve antijenlerle etkileşimlerinden kaynaklanan antijen biriktirme bölgesinde yoğun bir enflamatuvar reaksiyondur (NIH, 2022). Bu karışımın, emülsifiye edildiği antijenlere karşı hem hücre aracılı hem de humoral bağışıklık tepkilerinin etkili bir arttırıcı olduğu bilinmektedir. Adjuvan ve oto-antijenlerin karışımları, özellikle sıçanlarda ve farelerde çok çeşitli deneysel otoimmün hastalıkları tetiklemek için rutin olarak kullanılmıştır (Choudhary ve diğerleri, 2018).

Adjuvan artrit, 1960'ların başlarında steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların (NSAID'ler, özellikle COX-1 inhibitörleri) değerlendirilmesi için bir kriter haline geldi. Adjuvan artrit bir diğer olumlu özelliği, eklem hastalığına neden olan bağışıklık uyarımının "spesifik olmayan" doğası olabilir. Bununla birlikte, RA modellemesinde adjuvan artrit bir başka sınırı, romatoid hastalığın sinsi başlangıcını ve kronik doğasını pek temsil etmeyen hızlı hastalık başlangıcı (16-19 gün) olabilir (P. H. Wooley, 2004).

Antijen kaynaklı artrit

Antijen kaynaklı artrit (AIA), eklem içi bir model antijenle (sığır serum albümini veya ovalbumin gibi) bağışıklaştırma ve ardından aynı antijenle yükleme ile indüklenir. Bu, antijenle indüklenen eklemle sınırlı bir bağışıklık tepkisi ve müteakip artrit oluşturur (Choudhary ve diğerleri, 2018). Bu tür modeller, adaptif immün aracılı eklem hasarında belirli faktörler için hiyerarşik bir rol oluşturmak üzere araştırılabilirliği açısından faydalıdır. Müteakip patoloji, bağışıklık kompleksi aracılı enflamasyonu ve bunu takiben eklem T hücresi aracılı tepkileri içerir. Bu model artiküler antijenler, kendi kendine

tolerans ihlalini teşvik eden patojenik T hücrelerinin görüntülenmesini kolaylaştırma avantajına sahiptir (Asquith ve diğerleri, 2009). AIA'nın çok sayıda fare, sıçan, kobay ve tavşan suşuna uygulanabilme gibi büyük bir avantajı vardır. Hücresel temel, CIA'ya benzer, ancak daha sıkı tanımlanmış duyarlılaştırma ile CD4+ T-hücrelerine bağımlıdır. Histopatolojik bulgular, sinoviyal hiperplazi, perivasküler infiltrasyon, lenfoid foliküller ve pannus ve kıkırdak erozyonları dahil olmak üzere insan RA'sına benzerlikler taşır (Choudhary ve diğerleri, 2018).

Ovalbumin kaynaklı tavşan artrit modelinin (AIA) tüm patolojik süreci, insan RA'sınıninkine benzer. Ayrıca, bu hayvan modelinin anatomisi ve anti-romatizma ve anti-enflamatuvar ilaçlara tepkisi de insanıninkine benzemektedir ve iyi bir RA hayvan modelini hak etmektedir (Okura ve diğerleri, 2008). AIA modelinde, 1. haftada akut sinovit, 1-4. haftalarda sinoviyal hiperplazi ve pannus oluşumaktadır (Qiu, Jiang, Luo, Zhang ve Xu, 2012).

AIA, sinoviyal hiperplazi, pannus oluşumu ve kıkırdak ve kemik yıkımı gibi patolojik değişiklikler gösterir. İlk aşamada, antijenin intraartiküler enjeksiyonu, 24 saat sonra akut sinovitin patolojik belirtileri ve 1. haftada büyük miktarda eksüda ile eklem şişmesine neden olabilir. İkinci aşamada (1-4 hafta), belirtiler şunları içerir: belirgin sinovyal hiperplazi, pannus oluşumu ve sinovyal hücre katmanlarının 1-3 ile 5-10 katman arasında proliferasyonu, birincil olarak inflamatuvar hücre tarafından infiltre. Ayrıca bu aşamada bazı hayvanlarda kıkırdak yıkımı meydana gelebilir. Üçüncü aşamada (4 hafta sonra) değişiklikler arasında kıkırdak ve kemiğin geri dönüşümsüz yıkımı, kıkırdak hücrelerinin nekrozu, kıkırdak fibrozu, kıkırdak altında yeni kemik oluşumu ve hatta kemik deformasyonu yer alır (Asquith ve diğerleri, 2009; Qiu ve diğerleri, 2012).

Diğer indüklenmiş artrit modelleri

Küçük miktarlarda pristanın (doğal doymuş bir terpenoid alkan) tek bir deri altı enjeksiyonu, sıçanlarda ve farelerde kronik bir nüksetme fazının ardından akut ciddi bir enflamasyonun gelişmesine yol açar. Model büyük ölçüde T-hücrelerine bağımlıdır ve ana patolojik özellikler, akut faz yanıtının eşlik ettiği ödem, mononükleer ve polimorfonükleer hücrelerin eklem içine sızması, pannus oluşumu ve kıkırdak ve kemik erozyonunu içerir (Asquith ve diğerleri, 2009).

Proteoglikanın neden olduğu artrit modeli, insan kıkırdagından türetilen proteoglikanlar ile BALB/c gibi genetik olarak duyarlı fare suşlarının bağışıklanmasını içerir. Bu fareler şiddetli poliartrit ve spondilit geliştirir (Asquith ve diğerleri, 2009; P. H. Wooley, 2004).

Mono-İyodo-Asetat (Mıa)'nın enjekte edilmesi, glikolizde kilit bir enzim olan gliseraldehit-3 fosfat dehidrojenazı inhibe ederek kıkırdak metabolizmasına müdahale eder. Kondrositler anaerobik bir metabolizmaya bağlı olduğundan (kıkırdak avaskülerdir), bu enzimin inhibisyonu, hücre için ana enerji kaynağı olan hücre içi ATP'de bir azalmaya yol açar. Bu metabolik bozukluk ilerleyici hücresel apoptoza, glikozaminoglikanlarda azalmaya ve kıkırdagın taşıyıcı bölgelerinde subkondral kemiğin sklerozuna yol açar (Rebai ve diğerleri, 2020).

2.6.3. Radyolojik görüntüleme

Osteoporozun erken teşhisi, etkin tedavi ve yüksek kırık riski olan osteoporozlu hastaların belirlenmesi için kilit noktadır. Şu anda, osteoporoz tanısı ve kırık riskinin değerlendirilmesi, DXA tarafından kemik mineral yoğunluğu (Bone Mineral Density; BMD) nicel analizine dayanmaktadır.

Uzun bir süredir kullanımda olan DXA ile BMD ölçülmesi osteoporoz tanımlanma ve değerlendirilmesinde altın standart olarak kabul edilmektedir, klinik uygulamada en yaygın kullanılan tekniktir. Çalışma sistemi, çift enerjili X-ışınlarının kemiği geçerken bir kısmının kemik tarafından absorbe edilmesi sonucu kalan radyasyon miktarının hassas olarak ölçülmesi ve birim alanda absorbsiyona neden olan kemiğin mineral içeriğinin tahmin edilmesi prensibine dayanır (Harris, Zagar ve Lawrence, 2023; LeBoff ve diğerleri, 2022; Sindel ve Gula, 2015). DXA'da, hidroksiapatit (kemik dokusunu temsil eden) ve yumuşak dokular olmak üzere iki tip dokunun katkısını ayırt etmek için kemik, farklı enerjilere sahip iki X-ışını ile ışınlanır. Kemik numunesi tarafından iletilen ve dedektör tarafından ortaya çıkarılan radyasyonun daha fazla detaylandırılması, tüm ışınlanmış alan üzerinde BMD'nin bir haritasını temsil eden 2 boyutlu gri tonlamalı bir görüntü sağlar. Daha sonra kemik kenarlarını bulmak için bir kenar algılama algoritması kullanılır. Yumuşak dokuların katkısını çıkardıktan sonra, ortalama alan BMD (g/cm²), kenar konturuna dahil edilen tüm piksellerin BMD değerlerinin ortalaması alınarak hesaplanır ve görünür kemiğin yoğunluğunun bir ölçüsü elde edilir (Molino ve diğerleri, 2020).

Duyarlılık oranı yüksektir. Tüm vücut, femur, ön-arka ve lateral lumbal omurga ölçümü yapılabilir. BMD analizinde iki terim üzerinde durulmaktadır. Bunlar T ve Z skorlarıdır. Kemik mineral yoğunluğunu genç yetişkinlere göre değerlendirmede T skor, yaş ile cinsiyete göre değerlendirmede ise Z skor kullanılmaktadır. Tanı koymada T skor daha sıklıkla kullanılan bir parametredir, genç yetişkin popülasyonun BMD ortalaması ve standart sapması (SD) ile tetkiki yapılan kişinin kemik mineral yoğunluğunun karşılaştırılmasını verir (Akpolat, 2008; LeBoff ve diğerleri, 2022).

Bununla birlikte, DXA ile kemik kütlesinin BMD değerlendirmesi yöntemi, kemik gücü hakkında sadece kısmen bilgi sağlar. DXA'nın iki boyutlu tekniği, kortikali süngerimsi kemikten ayırt etmek ve kemik geometrisinden kaynaklanan değişiklikleri karakterize etmek için içsel sınırlamaları ortaya çıkarır (Kuo ve Chen, 2017). Kemik kütlesinde radyografik olarak tespit edilebilen değişiklikler, kemik kütlesini etkileyen belirli hasarların veya tedavilerin gerisinde aylar hatta bir yıldan fazla geride kalabilir; bu nedenle kemik fizyolojisindeki değişikliklere daha hızlı yanıt veren yöntemlere ihtiyaç vardır (Greenblatt ve diğerleri, 2017). Son zamanlarda, BMD dışında kırık risklerinin değerlendirilmesi için ek bilgi sağlamak amacıyla çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Örneğin, kemik kaybını değerlendirmek için kantitatif bilgisayarlı tomografi (QCT) geliştirilmiştir. QCT'de, trabeküler kemik için gerçek mineral yoğunluğu değeri, kemiğin kortikal kısmından elde edilmektedir (Kuo ve Chen, 2017; Molino ve diğerleri, 2020).

Bir diğer yöntem olan Mikrobilgisayarlı tomografi (μ CT) yüksek çözünürlüklü görüntüler sağlar. Yöntem 3 boyutlu çalışma yeteneğine sahiptir ve tek bir trabekülüm kadar küçük bir kemik alanından veri elde edilebilir. Ek olarak, μ CT, kemik bağlantısı ve esnekliği ile ilişkili parametreleri değerlendirebilir. Trabeküler kemiğin 3 boyutlu bir dijital modeli geliştirilmiş ve trabeküler kalınlık ve ayrılma dahil olmak üzere histomorfometrik parametreler buradan hesaplanabilmektedir. 2 boyutlu histomorfometri ve 3 boyutlu μ CT'nin karşılaştırılması, kemik yapısındaki erken değişiklikleri ortaya çıkarmada μ CT'nin üstünlüğünü göstermektedir (Lelovas ve diğerleri, 2008; Molino ve diğerleri, 2020).

Ayrıca, DXA kortikal ve trabeküler kemik katkılarını ayırt edemediğinden, BMD varyasyonunun altında yatan morfolojik değişiklikler hakkında bilgi sağlayamaz ve diğer hastalıklardan (örn. osteomalazi) kaynaklanan kemik yoğunluğu değişiklikleri durumunda yanlış OP teşhisine neden olur (Molino ve diğerleri, 2020).

Micro-CT, laboratuvar ölçeğinde kemik özellik değerlendirilmesi için en güçlü araçtır ve 1 µm'ye kadar yüksek izotropik çözünürlüklerin elde edilmesini ve 3 boyutlu yapısal bilgi sağlar. Bu yüksek çözünürlükler sayesinde, mikro-CT ekipmanı kortikal ve trabeküler kemiği çok güvenilir bir şekilde ayırt edebilir. Bu detaylı çekim DXA, 1 mm'ye kadardır. Uzun tarama süresi ve yüksek radyasyon dozu, pahalı ekipman, karmaşık görüntüyü sonradan işleme gibi de dezavantajları vardır.

Yapılan literatür taramalarında hayvan BMD görüntüleme olarak çoğunlukla DXA ile vertebra ve femur, tibia gibi farklı vücut bölgelerinin incelemesi yapıldığı görülmektedir. Yine yapılan taramalarda görüntüleme için özellikle diş hekimliği alanında kullanılan micro-CT'nin de yaygınlaştığı bilinmektedir (Baofeng ve diğerleri, 2010; Molino ve diğerleri, 2020; Permuy ve diğerleri, 2019; Wanderman ve diğerleri, 2018) (Baofeng vd., 2010; Mu vd., 2021; Permuy vd., 2019; Wanderman vd., 2018).

Kemik metabolizması ile ilgili oldukça sık görülen hastalıkların oluşum ve tedavi aşamalarındaki kemik döngüsünü yakından izleyebileceğimiz bir deneysel model oluşturulmuştur. Bu sayede teşhis ve takipte kullandığımız yöntemlerin tam analizi yapabilmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar genel olarak ya hastalığın sadece oluşum aşaması ya da tedavi için bir ajan kullanılması şeklinde planmıştır. Burada farklı ve ilk olarak hastalığın tüm aşamalarını ele alarak tam bir değerlendirme sunulması amaçlanmıştır.

2.6.4. ELİSA

ELİSA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) antijen-antikor etkileşimine dayanan bir analiz yöntemidir. Bu yöntemle bilinen bir antijen varlığında numune içerisinde bulunan özgül antikor veya bilinen bir antikor varlığında numune içindeki özgül antijen ölçülebilir. Ayrıca numune içerisinde bulunan özgül antijen veya antikorların miktarları kantitatif olarak analiz edilebilir.

Test için genel olarak 96 kuyucuk içeren plateler kullanılmaktadır. Bu kuyucuklara numune eklenir ve inkübasyona bırakılır. Bu aşamada numunemizde aradığımız antijen ya da antikoru kuyucukların yüzeyine sabitlenmiş olan bilinen antijen yada antikora bağlanması sağlanır. İnkübasyonun ardından kuyucuklar yıkama işlemine alınır. Bu

istenmeyen veya bağlanmamış olan bütün molekülleri ortamdaki uzaklaştırır. Bu aşamada kuyucuklara çalışılan ELİSA çeşidine göre Biotin ile işaretlenmiş antikorlar eklenir. Daha sonra işaretli konjugat kuyucuklara eklenir ve inkübasyona bırakılır. Biotin ile işaretleme yapılmışsa konjugata Streptavidin protein tutturulur. Konjugatın işaretlenmesi için çoğunlukla horseradishperoksidaz (HRP), alkalenfosfataz (ALP) kullanılır. İnkübasyon ve yıkama işlemlerinden sonra substrat eklenir. Substratın işaretlemede kullanılmış olan enzim ile uyumlu olması gerekir. İnkübasyonun adımından sonra reaksiyonu durdurmak amacıyla stop solüsyonu eklenir. Kuyucuklarda oluşan renk değişimleri spektrofotometrede belirli dalga boylarında okutulur.

Çalışmak istediğimiz molekülün özelliklerine ve ortamdaki miktarlarına göre uygulama alanı bulan çeşitli ELİSA türleri vardır. Direk, indirek, kompetatif, ve sandwich gibi ELİSA türleri vardır (Crowther, 2009; Laboratories, 2019).

2.7. Kromatografi

Kromatografi bir karışım içerisindeki bileşikleri birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için kullanılan bir tekniktir. Kromatografi; çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanmaktadır ve ana amacı hedeflenmiş numunenin ayrımı ve miktarlarının ölçümüdür.

Kromatografide moleküllerin adsorpsiyon, dağılma ve değiştirme kuvvetleri rol oynar. Bu özelliklere göre sınıflandırılan farklı kromatografik yöntemler farklı gruplarda toplanırlar. Kromatografinin Ayrılma Mekanizmalarına, Uygulama Biçimine, Faz Tiplerine Göre gibi farklı sınıflandırma şekilleri mevcuttur.

Tıbbi Laboratuvar uygulamaları, ilaç sanayisi, gıda, veterinerlik, ziraat, kimya gibi çeşitli sanayi dallarına kadar çok geniş bir yelpazede kullanım alanı bulan kromatografi; ölçüm, ayırıştırma ve saflaştırma gibi değişik amaçlar için kullanılmaktadır.

2.7.1. LCMS/MS

HPLC; Kimyasal ayırma, saflaştırma ve nicel-nitel olarak tayin etme amacıyla en çok kullanımı olan bir cihazdır. Karışımdaki bileşenlerin ayrılması amacıyla sıvı hareketli bir

faz kullanılır. Bileşenler ilk olarak çözgünde çözünürleştirilir ve ardından yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanır (Aguilar, 2004; Eser ve Sepici Dınçel, 2018; Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, 2012).

LCMS/MS sıvı kromatografi esasına dayanan bir yöntem olup cihazda aynı ismi alır. Kullanılan kütle dedektörünün sağlamış olduğu çalışma kolaylığı, keskinlik gibi etmenler sebebiyle ekstra önem kazanmıştır. Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek ölçme esasına göre çalışan cihazlardır.

Cihaz iyon kaynağı, kütle analizörü ve iyon dedektör kısmı olmak üzere 3 kısımdan oluşur.

İyon Kaynağı: Numunelerin iyonlaştırılarak cihaza gönderildiği kısımdır. Analizi yapılacak olan numunenin özelliklerine göre ESI (Electrospray Ionization) veya APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) iyonizasyon teknikleri kullanılabilir. ESI tekniği ile çoğunlukla peptidler, aminler, proteinler gibi polar bileşikler, APCI tekniği ile ise steroidler gibi apolar bileşikler analiz edilmektedir (Eser ve Sepici Dınçel, 2018; McMaster, 2005).

Kütle Analizörü: İyon kaynağından gelen iyonları, kuadropoller aracılığı ile değişen elektromanyetik bir alana tabi tutularak m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayrılırlar.

MS İyon Dedektör Sistemi: MS dedektörü yüksek bir duyarlılığa sahip, pozitif/negatif iyon modlarında çalışabilen, iyonları kütle ve yüklerine göre analiz edebilen bir sistemdir.

Kütle Spektrometresi, bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması, organik veya inorganik moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenebilmesi gibi her türlü bilinen bileşiğin kantitatif analizinin “yüksek duyarlılık ve özgüllükte” ölçebildiği bir tekniktir. Molekülleri kütle/yük oranına (m/z) göre ayırtabilir ve ölçerler. Bunun için önce moleküller iyonlara (elektriksel olarak + ya da – yüklü hale) dönüştürülür ve sonra gaz fazına geçirilerek cihaza gönderilir. LC-MS de her molekül için bir retansiyon zamanı ve bir m/z değeri vardır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekül mevcut olmasına karşın parçalanma sonrası yavru

iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000'dir (Eser ve Sepici Dınçel, 2018; McMaster, 2005).

LC-MS/MS çok düşük konsantrasyonlarda bile moleküllerin miktar tayininin yapılmasını mümkün kılmaktadır. Sonuçların doğrulanmasına ihtiyaç duyulmaz. MS/MS, kantitatif uygulamalar için yüksek bir duyarlılık ve kesinlik sağlamaktadır.

2.7.2. Validasyon

Analitik yöntem doğrulaması ICHQ2 ve FDA tarafından yayınlanan metod validasyon rehberi temel alınarak yapılmıştır. Analitik yöntem validasyon parametreleri olarak özgünlük, doğrusalılık ve aralığı, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve orta kesinlik), teşhis sınırları (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) incelenmiştir.

Özgünlük (specificity)

Yöntemin seçiciliği, analizi yapılacak olan numunedeki var olan ve analizi yapılacak maddeyi girişim yapabilecek diğer bileşenlerden ayrı olarak ölçme kabiliyetidir. Specificity veya selectivity olarak bilinir. Seçicilik yöntem geliştirmenin başında ve analiz ile matriks ortamından tayin edilmelidir. Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan, girişim yapma ihtimali olan diğer maddelerin (safsızlıklar, parçalanma ürünlerin benzer kimyasal maddeler veya plasebo bileşenler) tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Yani diğer bileşenler varlığında hedef maddeye ait alıkonma zamanında sadece analite ait pikler gözlenmelidir (Chan, Lee, Lam ve Zhang, 2004; Konieczka ve Namieśnik, 2018; Y. Özkan ve diğerleri, 2011).

Doğrusallık ve aralığı (Linearity and Range)

Metodun doğrusallığı (linearity) belirli bir konsantrasyon aralığında analitten alınan cevabın analit konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte cevap noktalarının düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Metodun uygulama aralığı ile ölçüm aralığı ile uyumlu olmalıdır. Bu parametre kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasıyla analiz edilir. Etken maddenin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak analizleri yapılır. Etken maddenin bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alan (y) değerleri ile grafik oluşturulur ve regresyon formülü (Doğrunun Eğim Formülü) ($y=ax+b$) ve

korelasyon katsayısı (R^2) hesaplanır. Bu değerin 0.99'a eşit ya da 1'e yakın olması beklenir (Bayrac ve Camizci, 2020; Y. Özkan ve diğerleri, 2011).

Kesinlik (Precision)

Metodun çalışılan koşullar altında tekrarlanabilirliğinin ölçüsüdür. Başka bir ifade ile bir numuneye aynı yöntem birden fazla sayıda uygulandığı zaman analit için elde edilen sonuçların birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar %BSS olarak ifade edilirler. Ölçüm yapılan her bir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır.

Bunlardan en az 5 deney sonucunun %BSS'ı teorik değerin %15'inden daha fazla sapma göstermemelidir (Bayrac ve Camizci, 2020; Moosavi ve Ghassabian, 2018; Y. Özkan ve diğerleri, 2011).

Kesinliğini tayin etmek amacıyla Tekrarlanabilirlik (repeatability), Orta kesinlik (intermediate precision) parametereleri kullanılabilir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Kısa zaman aralığı içerisindeki aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analitin en az 10 ölçümü yapılır. Bu tip tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak adlandırılır. Sonuçta, kesinlik elde edilen değerlerin %BSS'ı verilerek ifade edilir. %BSS değeri ≤ 1.0 olmalıdır (Konieczka ve Namieśnik, 2018; Y. Özkan ve diğerleri, 2011).

Orta kesinlik (intermediate precision)

Farklı günlerin yöntem kesinliğine etkisi incelenir. Laboratuvar içi deneysel farklılıkları belirten bir kesinlik derecesidir. Analizi yapılacak maddenin yüksek, orta ve düşük konsantrasyon olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm farklı günlerde analizi yapılır. Sonuçta orta kesinlik elde edilen değerlerin %BSS kullanılarak ifade edilir. $\%BSS \leq 2$ olmalıdır (Konieczka ve Namieśnik, 2018; Y. Özkan ve diğerleri, 2011).

Biyolojik numunelerle çalışılırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

Teşhis sınırı (Limit of Detection; LOD)

Analizi yapılan örneğin tespit edildiği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir.

Sinyal/Gürültü oranından yararlanılarak da hesaplanabilir. Sinyalin gürültüye oranının 3 olduğu derişim LOD olarak kabul edilir (Bayrac ve Camizci, 2020; Chan ve diğerleri, 2004; Konieczka ve Namieśnik, 2018).

Tayin sınırı (Limit of Quantification; LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, kalibrasyon doğrusunun en alt derişimini oluşturan veya onun da altında olabilen derişim düzeyidir. Sinyal/Gürültü oranından yararlanılarak da hesaplanabilir. Sinyalin gürültüye oranının 10 olduğu derişim LOQ olarak kabul edilir (Bayrac ve Camizci, 2020; Chan ve diğerleri, 2004; Konieczka ve Namieśnik, 2018).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma deney hayvan çalışması şeklinde planlanmıştır. Hayvanlarda önce Osteoporoz ve Romatoid Artrit modelleri oluşturulmuş ardından bu hastalıkların yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemleri uygulanarak takipleri yapılmıştır. Tüm bu hastalık oluşum ve tedavi süresince hayvanlardan kan alınarak kullanılan geleneksel biyobelirteçler ile S1P ölçümleri yapılmıştır.

Deneylerde tavşan kullanımına ilişkin protokol (Gazi Üniversitesi G.Ü.ET-21.001) Gazi Üniversitesi (Ankara, Türkiye) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve onaylanmıştır. Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Konseyi ve Dünya Tabipler Birliği'nin Helsinki Bildirgesi'nde hayvan deneyleri ile ilgili deneysel prosedürler için yol gösterici ilkeler izlenmiştir. Statik biyo-tahliller için standartlaştırılmış OECD ve Türkiye Ulusal yönetmeliği uygulanmıştır.

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (Ankara, Türkiye) temin edilen iskelet olarak olgun, ortalama $2,0 \pm 0,5$ kg ağırlığında, yaklaşık 3 aylık, toplam 25 adet sağlıklı yetişkin dişi Yeni Zelanda beyaz tavşanı bu çalışmada kullanılmıştır.

Hayvanlar, Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde paslanmaz çelik tavşan raflarında ayrı ayrı barındırılmıştır. Oda sıcaklığı ve nemi düzenli olarak kontrol edilerek 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olacak şekilde bir döngüde tutulmuştur. Standart tavşan yemi kullanılmıştır. Hayvanlar, herhangi bir deneysel prosedür başlamadan önce en az 7 gün boyunca iklime alıştırlarak sonrasında deney başlatılmıştır.

Tez çalışması iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

- Deney hayvanları aşaması
- Laboratuvar analizleri aşaması

3.1. Deney Hayvanları Aşaması

Deney hayvanları laboratuvarında bekleme süreleri tamamlanan tavşanlar rastgele gruplara ayrılmıştır. Tüm deney hayvanlarının başlangıç kiloları ölçülerek not edilmiştir. Deney hayvanlarının gruplarına göre hastalık oluşumu ve bunun tedavi süreci haftalara göre (zamana göre) takip edilerek değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çalışma Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde uzman veterinerler gözetiminde gerçekleştirilmiştir. Ortalama $2,0 \pm 0,5$ kg ağırlığında ve yetişkin 25 adet dişi Yeni Zelanda beyaz tavşanı bu çalışmada kullanılmıştır. Tavşanlar uygun kafeslerindedir, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 12 saat aydınlık/karanlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırılmıştır. Optimum sağlık koşullarının sağlanması, enfeksiyonlardan korunma, yeni ortamlarına uyum sağlama ve genel sağlık durumlarının kontrolü için cerrahi operasyondan 1 hafta önce deneylerin gerçekleştirileceği laboratuvar ortamına alınmışlardır. Tavşanlar standart laboratuvar yemi ve su verilerek beslenmiştir.

Çalışma başlangıcında veteriner hekim tarafından sağlık kontrolü yapılan hayvanlar rastgele Osteoporoz (OP), Kontrol (K) ve Romatoid Artrit (RA) şeklinde üç gruba ayrılmıştır.

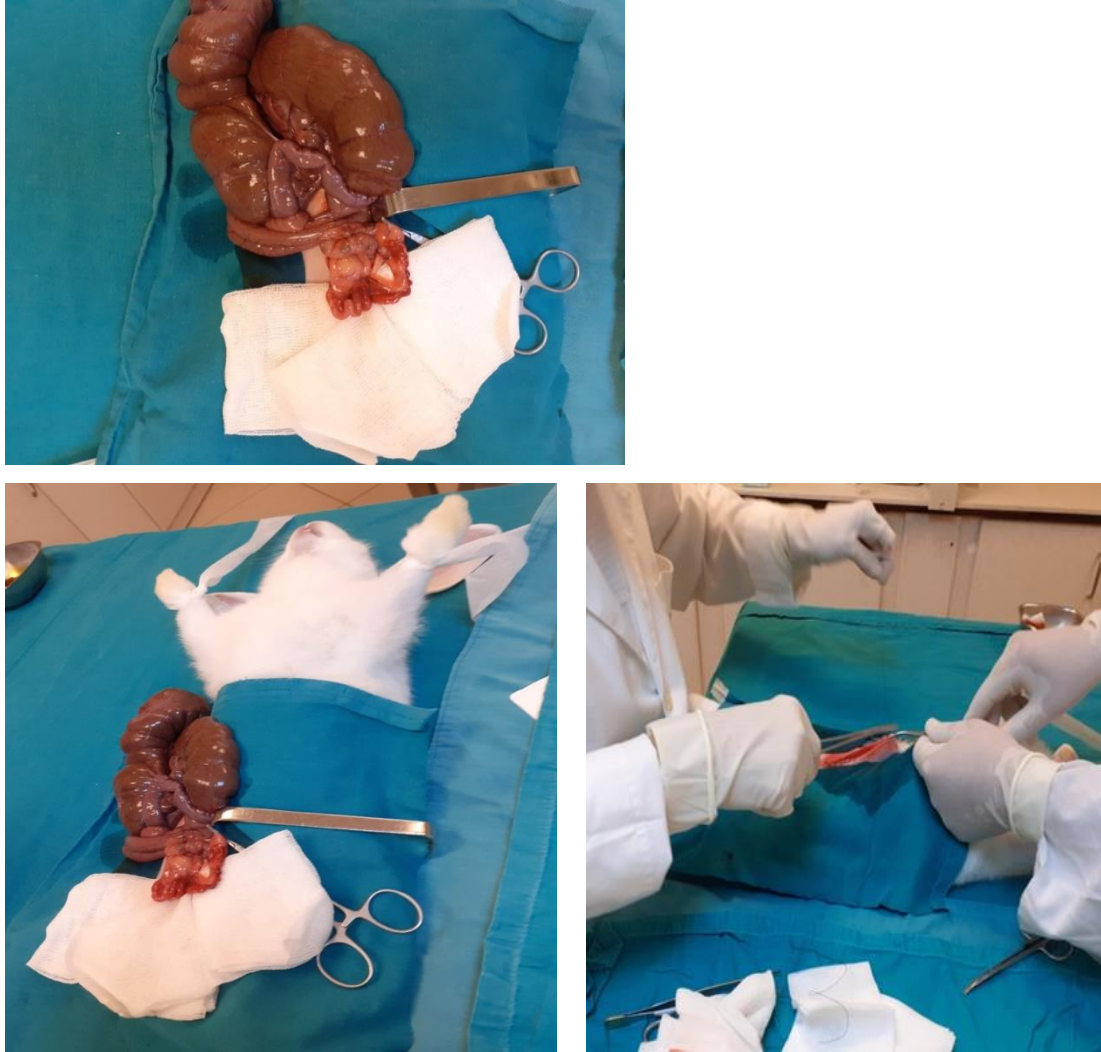
Kontrol grubundaki hayvanlar yalancı overektomi işlemine tabi tutulmuştur. (Sham cerrahisi)

Osteoporoz grubundaki (Ovx) hayvanlar overektomize edilmiştir.

Operasyona alınacak hayvanlar bir gün öncesinden aç bırakılmıştır. Genel anestezi amacıyla tüm hayvanlara kas içi enjeksiyon ile 5 mg/kg Ksilazin HCl (CONTROL %10, Doğa İlaç, Türkiye) ve 40 mg/kg Ketamin HCl (KETA CONTROL, Doğa İlaç, Türkiye) uygulanmıştır. Anestezisi uygulanan hayvanların karın bölgesi tıraşlandıktan sonra cerrahi prosedüre başlanmıştır. Overektomi uygulanacak deney gruplarında, karın orta hattı üzerinde karın boşluğu açılarak ovaryumlara ulaşıldıktan sonra mezovaryum ve tuba uterina ligatüre edilmiş ve over dokuları çift taraflı olarak çıkarılmıştır. Kontrol grubundaki hayvanlarda ise karın duvarı benzer şekilde açıldıktan sonra ovaryum dokuları bulunmuş

ancak çıkarılmadan yerinde bırakılmıştır. Resim 3.1’de cerrahi operasyona ait görüntüler verilmiştir.

Deney hayvanlarının operasyon sonrasında günlük rutin bakımları yapılarak kafes temizlikleri kontrol edilmiştir. Yara bölgelerinin iyileşmesi düzenli olarak kontrol edilerek yeterli miktarda yem ve su sağlanmıştır.



Resim 3.1. Tavşan overektomi cerrahi operasyonları sırasında bir kaç örnek görüntü

Deney hayvanları grupları:

Grup 1 (Sham) (n=5): Bu grupta cerrahi girişimin basamakları bire bir uygulanmış ancak ovariektomi yapılmamıştır. Hastalık gruplarıyla karşılaştırmak amacıyla kan numuneleri toplanmıştır. Elde edilen veriler hastalık grupları ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

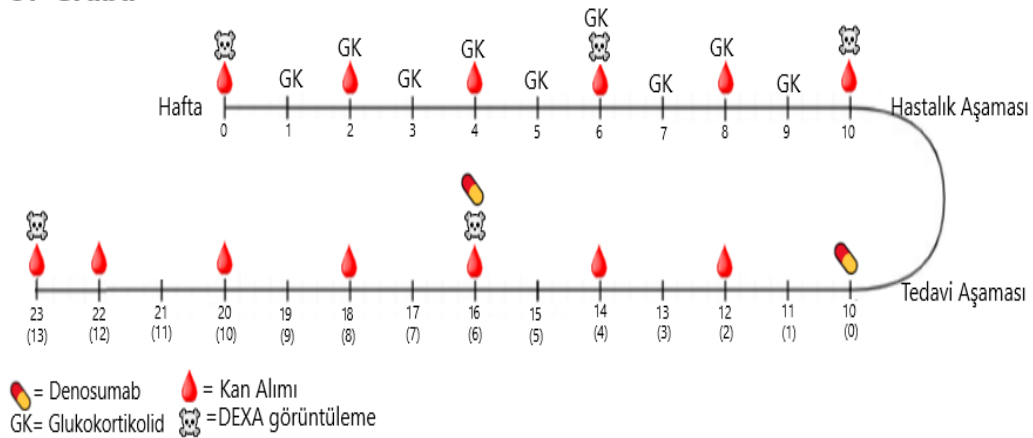
Grup 2 (Osteoporoz) (n=9): Osteoporotik hayvan modelinin oluşturulmasında ovariektomi ve kortikosteroid tedavisinin kombinasyonu uygulanmıştır. Öncelikle tavşanlara genel anestezi altında bilateral ovariektomi işlemi yapılmıştır. Ameliyattan 1 hafta sonra 9 hafta boyunca 1 mg/kg/gün dozunda Metilprednizolon Sodyum Suksinat enjekte edilerek osteoporoz oluşumu takip edilmiştir.

Hayvanda osteoporoz gelişimin belirlenmesinin ardından tedavi aşamasına geçilmiştir. Osteoporoz grubunda tedavi için geleneksel ve yaygın kullanımı olan bifosfanat grubu ilaçlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada yeni jenerasyon bir tedavi ajanı olan denasumab kullanılmıştır. Tedavide Denosumab 1 mL 6mg/mL dozunda subkutan olarak uygulanmıştır. Tedavi için 13 haftalık bir süreç belirlenmiş ve uygulamayı takiben 6 ve 13. haftalarda radyolojik görüntüleme yapılmıştır.

Tüm bu hastalık oluşum ve tedavi süresince her 2 haftada bir kan numuneleri toplanmıştır.

Osteoporoz oluşumunu takipte BMD görüntüleme için hastalık oluşturma aşamasında 6. ve 10. haftalarda 1'er hayvan, tedavi aşaması 6. haftada 1 hayvan feda edilmiştir. Tedavinin 13. haftasında çalışma sonlandırılmış, hayvanlar etik kurallara uygun şekilde feda edilmiş ve radyolojik görüntülemeleri yapılmıştır. OP grubuna ait iş akış durumu şekil 3.1'de gösterilmiştir.

OP Grubu



Şekil 3.1. OP grubu iş akış durumu

Çalışmada planlandığı gibi 9 tavşan kullanılmış ve arada gerekli sakrifiyeler yapılarak toplamda 23 haftalık bir süreç izlenmiştir.

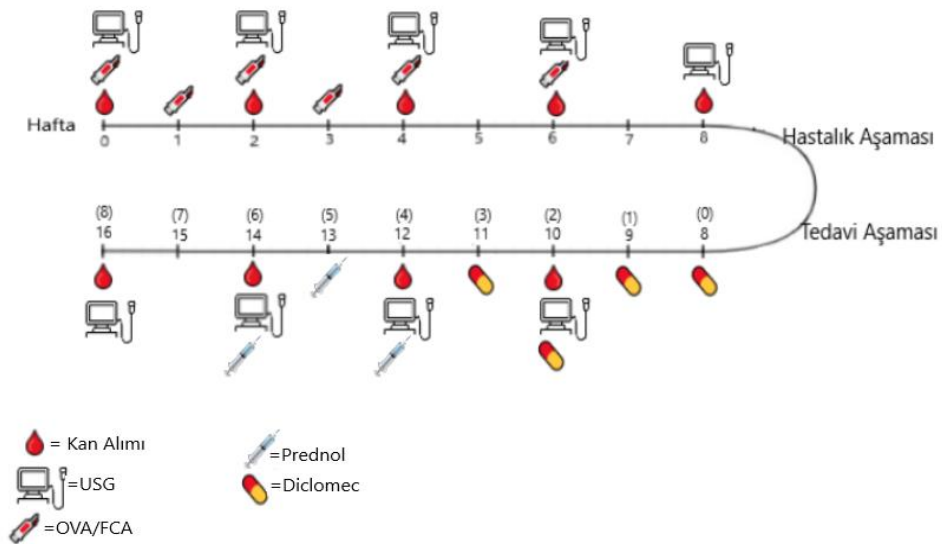
Grup 3 (Romatoid Artrit) (n=11): Romatoid Artrit modelinin oluşturulmasında tavşanlarında diz eklem içi ovalbümin/ Freund's complete adjuvant uygulaması yapılmıştır. Bunun için 1 mL 2 mg/mL OVA/FCA diz içine enjekte edilmiştir.

2 haftada bir kan örnekleri toplanmış ve artrit takibi için ultrasonografi yapılmıştır.

Hayvanda romatoid artrit gelişimin belirlenmesinin ardından tedavi aşamasına geçilmiştir. Hastalığın tedavisinde steroid olmayan antienflamatuar ajan (NSAID) Diklofenak Sodyum 40 mg/kg/gün dozunda kas içi uygulanmış, yeterli iyileşme sağlanmadığı için 4 hafta sonunda kortikosteroid (metilprednizolon sodyum 60 mg/mL) ile tedaviye devam edilmiştir.

Tüm bu hastalık oluşum ve tedavi süresince her 2 haftada bir kan numuneleri toplanmıştır. RA grubuna ait iş akış durumu şekil 3.2'de gösterilmiştir.

RA Grubu



Şekil 3.2. RA grubu iş akış durumu

Çalışmada planlamada belirtildiği gibi 9 tavşan üzerinde çalışma başlatılmış fakat süreçler esnasında hayvan kayıpları yaşanmıştır. Toplamda 11 hayvan kullanılmıştır.

3.2. Laboratuvar Analizleri Aşaması

3.2.1. Numune alım, hazırlama ve saklanması

Toplanan kan örnekleri serum ayrımı için 3200xg'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Serum örnekleri eppendorf tüplerine bölünerek analizler yapılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Kemik metabolizması biyobelirteçleri ölçümü

Kemik metabolizması biyobelirteçleri analizleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarında yapılmıştır.

Serum 25(OH)D ve PTH düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter DXI 800 ve kullanıma hazır kitler kullanılarak kemilüminesan yöntemle çalışılmıştır.

Serum CTX ve P1NP düzeyleri klinik kimya analizörü Roche Hitachi Cobas 6000 Sistemi ve kullanıma hazır kitler kullanılarak ECL (Electro Chemi Luminescence) yöntemle çalışılmıştır.

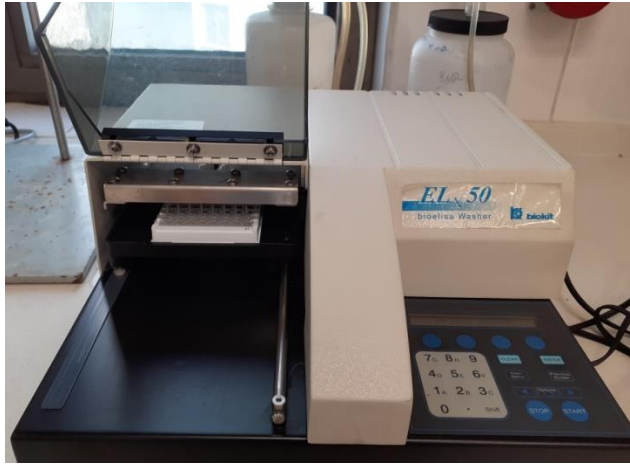
Serum Kalsitonin düzeyleri klinik kimya analizörü IMMULITE® 2000 XPi Immunoassay System, Siemens Healthineers ve kullanıma hazır kitler kullanılarak immunoassay yöntemle çalışılmıştır.

Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL düzeyleri ise klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır.

3.2.3. Serum RANKL düzeyleri ölçümü

Çift Antikorlu Sandviç ELISA tekniği ile ticari kit Tavşan Nükleer Faktör Kappa B Ligandının Reseptör Aktivatörü (RANKL) (MyBioSource, San Diego (USA). (Lot No. 38418406) (Resim 3.4) kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

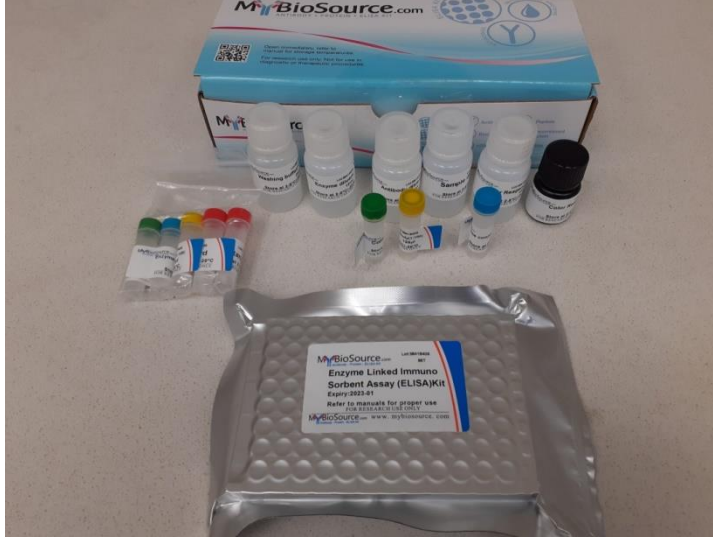
Tavşan serum RANKL seviyelerini çalışılması için BioTek ELx50 MicroplateWasher (Resim 3.2) ve BioTek ELx800 Microplate Reader (Resim 3.3) (BioTek Instruments, Inc. USA) cihazları kullanıldı ve BioTek KC- Junior software programı yardımı ile 450 nm’de okuma yapılmıştır.



Resim 3.2. RANKL analizinde kullanılan ELISA plate yıkayıcı



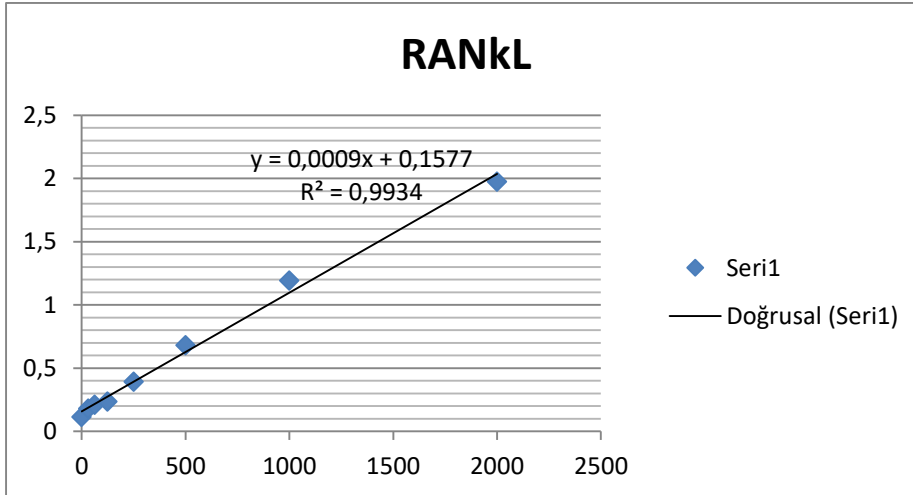
Resim 3.3. RANKL analizinde kullanılan ELISA plate okuyucu



Resim 3.4. RANKL analizinde kullanılan ELİSA Kit (MyBioSourcece)

Test kiti için Duyarlılık 12 pg/mL ve saptama aralığı 31,2 pg/mL -2000 pg/mL idi. Test içi CV <%8 ve testler arası CV <%12 idi. Sonuçlar pg/mL olarak verilmiştir.

Çalışmada 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 0 pg/mL konsantrasyon aralığında standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. R2 değeri 0,993 olarak bulunmuştur. (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. RANKL ELİSA kalibrasyon eğrisi. (0-2000 pg/mL konsantrasyon aralığında standartlar kullanılmıştır.)

3.2.4. Sfingozin 1-fosfat ölçümü

Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ar&Ge Merkezi Kromatografi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Sfingozin-1-Fosfat standartı Cayman Chemical (62570) (MI, USA)’dan temin edilmiştir. Amonyum asetat, metanol, formik asit ve diğer çözücüler veya reaktifler HPLC grade idi.

S1P analizi Agilent 6420 LC-MS/MS cihazı kullanılarak elektrospray iyonizasyon (ESI) ve pozitif iyon modu ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ACE-3 C18 (50 mm x 2,1 mm x 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Kolon fırın sıcaklığı 30°C’ ye ayarlanmıştır.

Mobil faz olarak solvent A distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat+ % 0,01 Formik Asit çözeltisi, solvent B olarak metanol içinde % 0,01 Formik Asit çözeltisi kullanılmıştır.

Çalışmada gradient metod kullanılmış ve akış 0,4 mL/dk olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ölçümü yapılacak S1P standartı öncelikle metanol içerisinde çözülerek stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözeltilerden yine metanol içinde uygun seyreltmeler yapılarak 3 - 200 ng/ml (3,12- 6,21-12,5- 25- 50- 100- 200) konsantrasyon aralığında seri dilüsyonlarla çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerin LCMS/MS cihazında analizleri yapılarak bilinen konsantrasyonlara (x) karşı elde edilen alan (y) değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

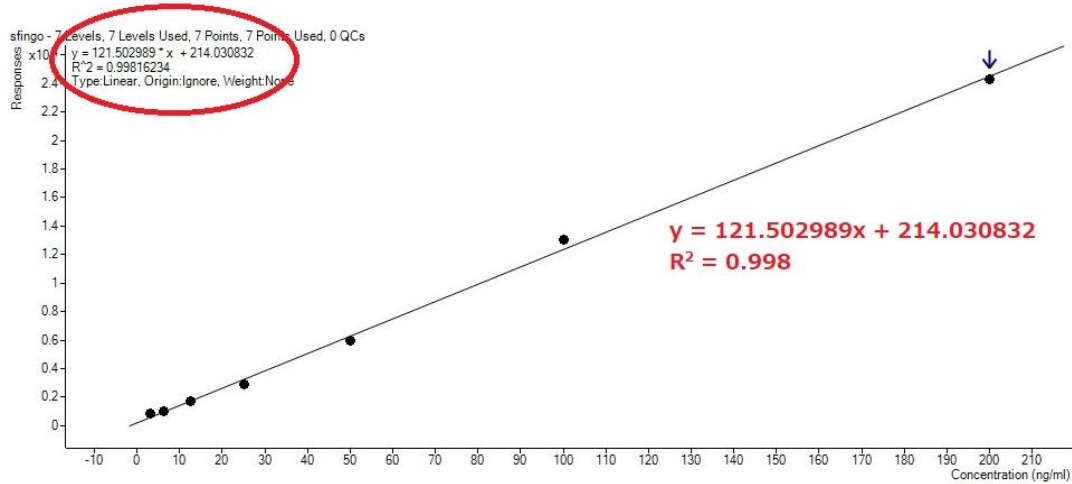
Numune ön hazırlık işlemi için 100 mikrolitre örnek üzerine 500 mikrolitre metanol eklenerek vortexlenmiş ve ardından 10000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 30 mikrolitre cihaza enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar çizilen standart kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

LCMS/MS cihaz koşulları çizelge 3.1.’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. LCMS/MS cihaz koşulları

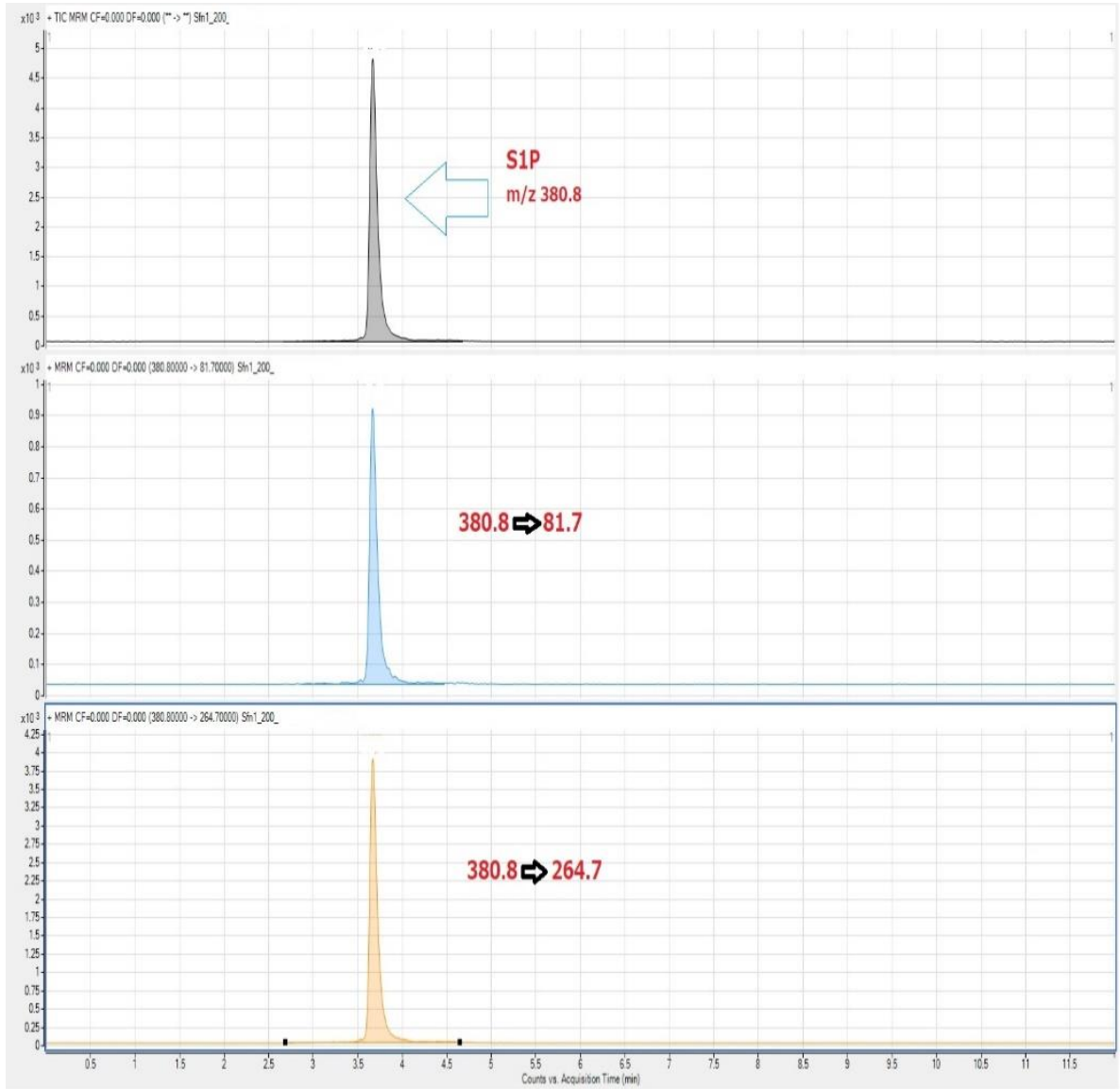
LC sistem koşulları							
Cihaz		Agilent 6420 LCMS/MS					
Kolon		ACE C18 (50mm x 2,1 mm x 5µm)					
Kolon sıcaklığı		30°C					
Mobil faz		solvent A (distile su içinde 10 mM Amonyum Asetat+ % 0,01 Formik Asit çözeltisi) solvent B (metanol içinde % 0,01 Formik Asit çözeltisi)					
Gradient Tablosu		Zaman dk	Solvent A	Solvent B			
		0	% 68	% 32			
		0,5	% 68	% 32			
		0,51	% 5	% 95			
		2,5	% 5	% 95			
		2,51	% 30	% 70			
		4	% 68	% 32			
		10	% 68	% 32			
Akış hızı		0,4 ml/dk					
Enjeksiyon hacmi		30 µl					
Süre		10 dk					
MS/MS sistem koşulları							
Parameter		Value (+)					
Gas Temperature (°C)		350					
Gas Flow (l/min)		12					
Nebulizer (psi)		15					
Capillary (V)		3500					
Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor voltage	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage	Polarity
S1P	380,8	264,7	100	90	14	7	Positive
S1P	380,8	81,7	100	90	40	7	Positive

S1P analizinde 3 -200 ng/ml (3,12- 6,21-12,5- 25- 50- 100- 200) konsantrasyon aralığında hazırlanan standartlar ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. (Şekil 3.4)

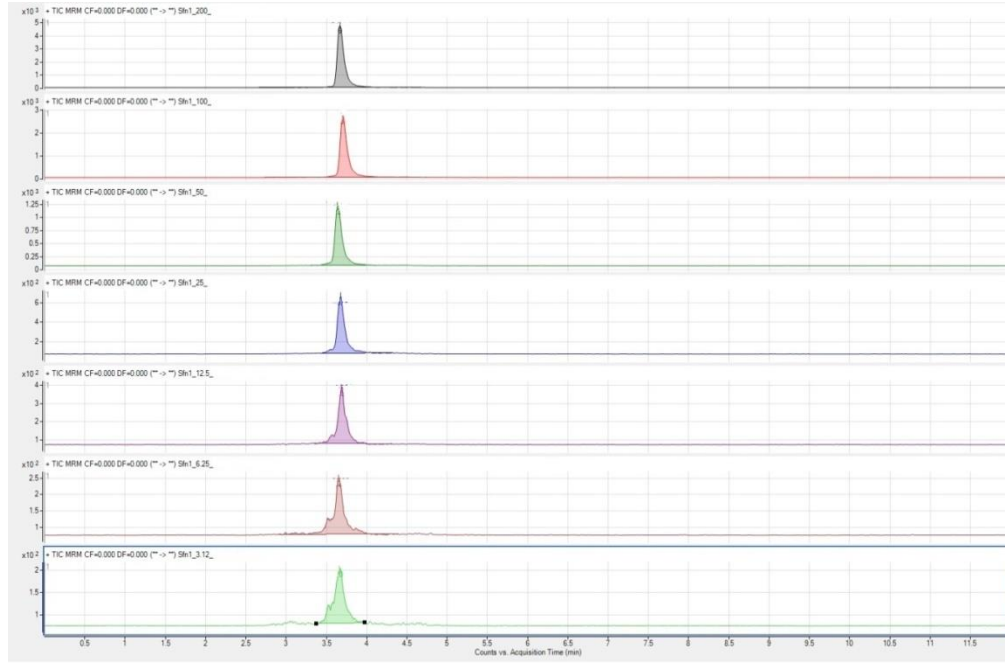


Şekil 3.4. S1P Standartları kalibrasyon çizgisi

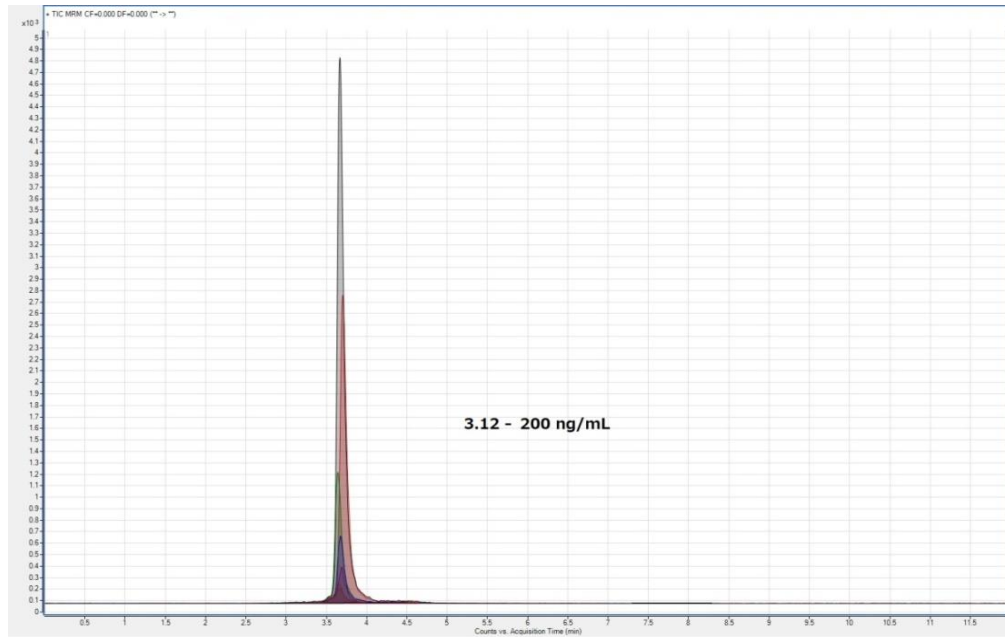
Şekil 3.5 ve 3.6’da S1P ve standartlarına ait kromatogramlar verilmiştir.



Şekil 3.5. S1P molekülü ana ve yavru iyon kromatogramı



A



B

Şekil 3.6. S1P standartlarına ait kromatogram. A: Standartlar ayrı ayrı gösterilmektedir. B: Toplu gösterim

S1P'nin LCMS/MS ile analizinde MS optimizasyonun ardından yöntemin validasyonu çalışılmıştır. Validasyon için doğrusallık, doğruluk, kesinlik, ara kesinlik, LOD, LOQ ve geri kazanım parametreleri çalışılmış ve sonucunda elde edilen veriler çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. LCMS/MS ile S1P analizine ait validasyon sonuçları

Metod validasyon değerleri (S1P)			
Doğrunun Eğim Formülü	$Y=aX+b$ ($Y=121,502989 \cdot x + 214,030832$)		
Doğrunun Eğimi	121,502989		
Kesişim	214,030832		
R ²	0,998		
LOD	0,125 ng/ml		
LOQ	0,4199 ng/ml		
Geri Kazanım (%) (Recovery)	99.6%		
	Düşük konsantrasyon (3,12 ng/ml)	Orta konsantrasyon (50 ng/ml)	Yüksek konsantrasyon (200 ng/ml)
Doğruluk*(accuracy)	4,902	1,729	0,739
Keskinlik (Precision) (gün içi değerler)*	6,418	1,508	0,399
Ara Keskinlik (İntermedia Precision) (Günler arası değerler)*	9,655	1,804	0,314
*: % BSS değerleri (% bağıl standart sapma değerlerine göre hesaplanmıştır.)			

3.3. Radyolojik Analiz

Osteoporoz tanısında yaygın olarak dual enerji X-ışını absorptiometrisi (DEXA) kullanılmaktadır. Tavşanların femur ve vertebra kemik mineral yoğunluk ölçümleri için Hologic Horizon QDR Discovery A (S/N 82408) (Resim 3.5) marka cihazı (Düzen Sağlık Grubu, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Elde edilen Total BMD değerleri (g/cm²) gruplar arası ve grup içi şeklinde karşılaştırılmıştır. DXA ölçümü için tavşanların femur ve lomber vertebraları çıkarılarak analizi yapılmıştır (Resim 3.6).



Resim 3.5. Hologic Horizon QDR Discovery A (S/N 82408) marka DXA cihazı



resim 3.6. Tavşanların radyolojik analiz için femur ve vertebra çıkarımına ait görüntüler.

Tavşanların RA takibinde yapılan diz eklem görüntülemeleri ESAOTE MyLab 70-X-Vision ultrasound cihazı (Resim 3.7) ile gerçekleştirilmiştir. (Gazi Üniversitesi Tıp

Fakóltesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye) USG çekimi tavşanlar anestezi altında iken ve diz bölgeleri traşlanarak yapılmıştır (Resim 3.8).



Resim 3.7. ESAOTE MyLab 70-X-Vision ultrasound cihazı



Resim 3.8. Tavşanların diz USG analizi.

Mikro CT taraması ve analizi

Numuneleri radyografik olarak taramak için yüksek çözünürlüklü, masaüstü bir mikro CT sistemi Skyscan 1275 (Bruker, Kontich, Belçika. S/N=17E15028) (Resim 3.9) kullanılmıştır. Alınan örnekler, cihazının içerisindeki döner platforma tek tek sabitlenmiş ve tarama parametreleri; 40 kV, 250 uA olacak şekilde ve 26,7 um/piksel boyutlarında ve alan düzeltmesi ayarlanıp kaydedildikten sonra, her bir örnek aynı alan düzeltme ayarları ile taranmıştır. Mikro-ct'nin rotasyon basamağı $0,2^\circ$ ayarlanıp, her biri 49 ms (milisaniye) maruz kalma süresiyle olacak şekilde 3 frame ve her bir örnek 360° rotasyonlu tarama yapılacak şekilde belirlenmiştir. Çekimler sırasında oluşacak artefaktları engellemek için 1mm kalınlığında alüminyum filtre kullanılmıştır. Her bir numunenin görüntülenmesi yaklaşık olarak 30 dk sürmüştür.



Resim 3.9. Micro-CT cihazı (Skyscan 1275, Bruker, Kontich, Belçika. S/N=17E15028)

Örneklerin mikro-CT taraması sırasında elde edilen veriler, NRecon v.1.7.4.6 yazılımı (Bruker Skyscan1275 CT, Kontich, Belçika) ile görüntülere dönüştürülmüştür. Ham verilerin rekonstrüksiyonu (yeniden yapılandırma) işlemi sonucu 16 bit BMP çıktı formatına dönüştürülmüş ve her bir örneğe ait yaklaşık 1900 görüntü elde edilmiştir.

Hem hacimsel hem de boyutsal olarak değerlendirmek için ParaWiew yazılımı kullanılmış ve program ile kemiğe ait 3D boyutlandırma ve ardından volüm hesaplama yapılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerin değerlendirilmesi ve çizelgelerin oluşturulması amacıyla SPSS version 25 programı kullanılmıştır. Çalışma grupları ve ölçülen parametre sonuçları analize tabii tutulmuştur.

Çalışma gruplarındaki parametrelerin tanımlayıcı istatistikleri, ortalama değer, değer aralıkları ve standart sapmaları hesaplanmış ve standart sapmalar $\pm$ şeklinde ifade edilmiştir. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uygun olan sayısal verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında One-way ANOVA testi kullanılmıştır. Post-Hoc Test için ise Tukey testi kullanılmıştır.

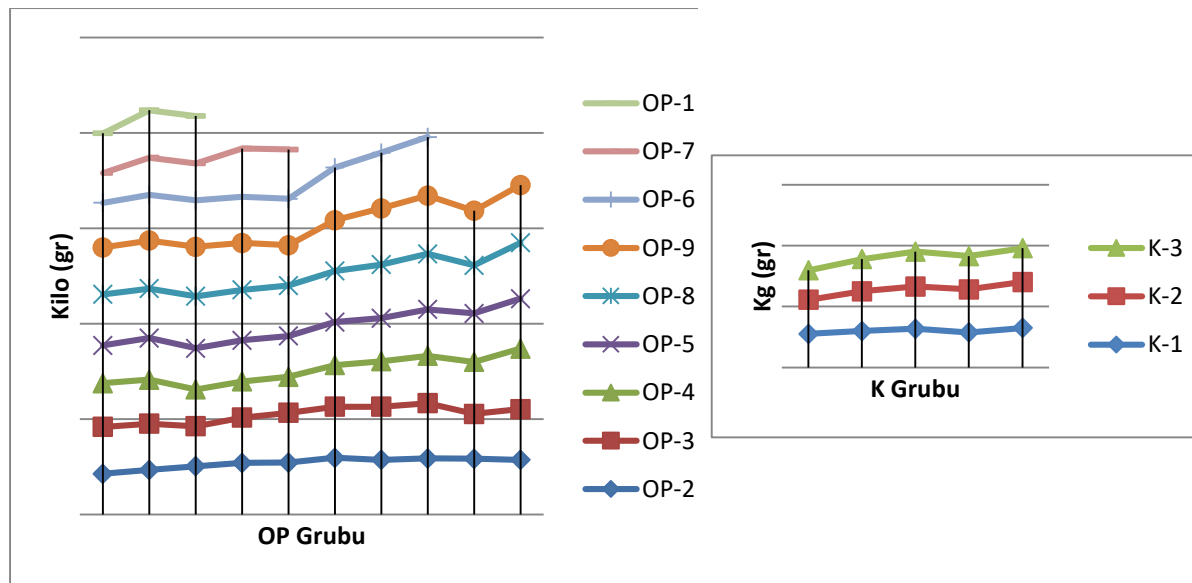
Değişkenler arasında ilişki olup olmadığı Spearman Korelasyon analizi ile incelenmiş ve sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

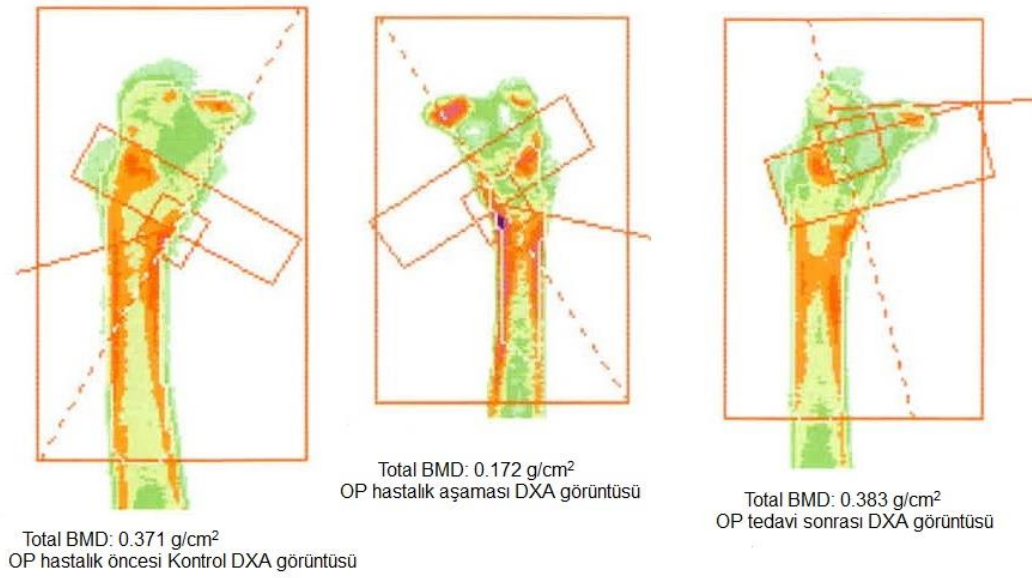
Deney hayvanları ağırlıkları çalışma başından itibaren düzenli olarak ölçülüp not edilmiştir.

Aşağıda çizelge 4.1.'de OP ve K grubundan hayvanların zaman içerisindeki kilo değişimi gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Tavşanların zaman içerisinde ağırlık değişim grafiği



Osteoporoz tanısında yaygın olarak dual enerji X-ışını absorptiometrisi (DEXA) kullanılmaktadır. Tavşanların femur ve vertebra kemik mineral yoğunluk ölçümleri için Hologic Horizon QDR Discovery A (S/N 82408) marka cihazı (Düzen Sağlık Grubu, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır. Elde edilen Total BMD değerleri (gr/cm^2) gruplar arası ve grup içi şeklinde karşılaştırılmıştır. (Şekil 4.1, Çizelge 4.2)



Şekil 4.1. OP grubu tavşanlara ait DXA görüntüleri

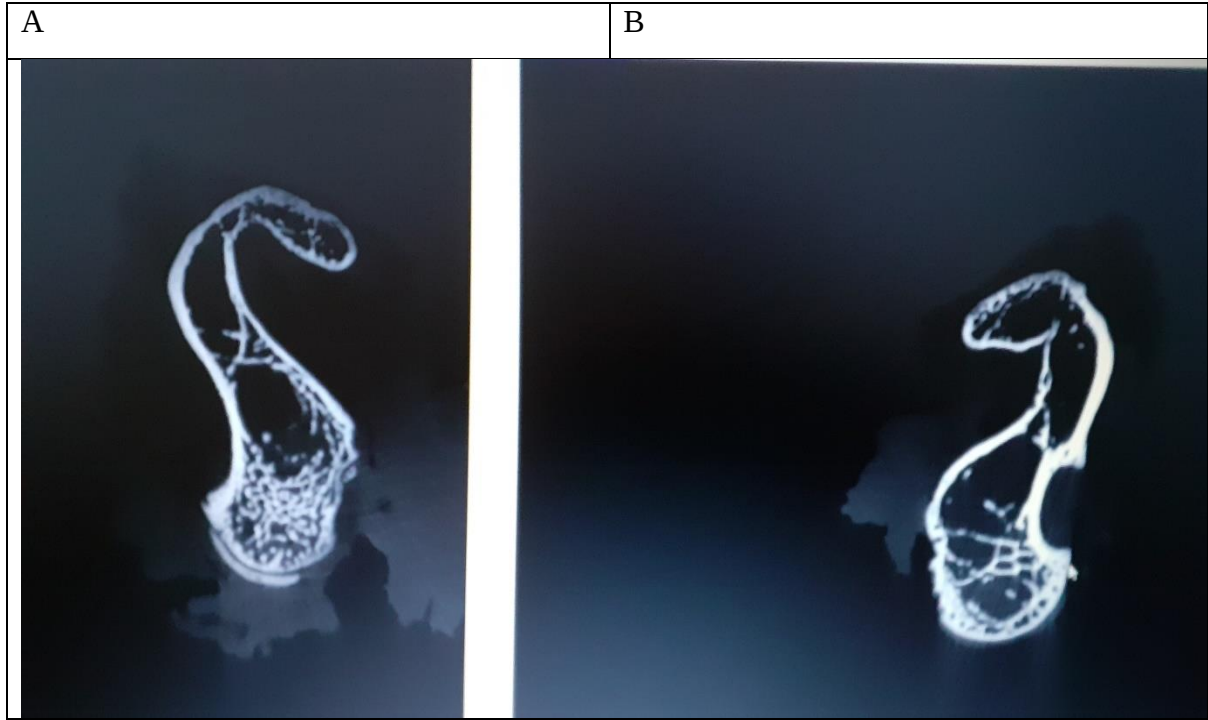
Aşağıda çizelge 4.2.'de OP ve K grubundan hayvanların Total BMD değerleri gösterilmiştir. BMD çizelgesinden de görüleceği gibi tavşanların BMD değerleri hastalık ile beraber azalmış, ardından tedavi süreci ile birlikte değerler tekrar yükselmeye başlamıştır. Bu durum aynı zamanda uyguladığımız deneysel metodun da iyi bir şekilde çalıştığını göstermiştir.

Çizelge 4.2. OP ve K grubundan hayvanların Total BMD değerleri

	Total BMD gr/cm ²			
	Femur		Vertebra	
	Sağ	Sol		
K-1	0,371	0,352	0,214	
K-2	0,290	0,383	0,261	
K-3	0,371	0,403	0,373	
K-4	0,390	0,402	0,317	
K-5	0,379	0,345	0,334	
OP-1	0,260	0,287	0,247	Hastalık oluşum 6. hafta
OP-7	0,207	0,172	0,189	Hastalık oluşum 10. hafta
OP-6	0,321	0,378	0,189	Tedavi 8. hafta
OP-9	0,383	0,356	0,253	Diğerleri tedavi 13. hafta
OP-8	0,346	0,339	0,268	
OP-5	0,381	0,339	0,288	
OP-4	0,347	0,322	0,253	
OP-3	0,391	0,457	0,284	
OP-2	0,366	0,333	0,267	

DXA ölçümünden sonra numuneleri radyografik olarak taramak için yüksek çözünürlüklü, masaüstü bir mikro CT sistemi Skyscan 1275 kullanılmıştır. Hem hacimsel hem de boyutsal olarak değerlendirme yapabilmek için ParaWiew yazılımı kullanılmıştır.

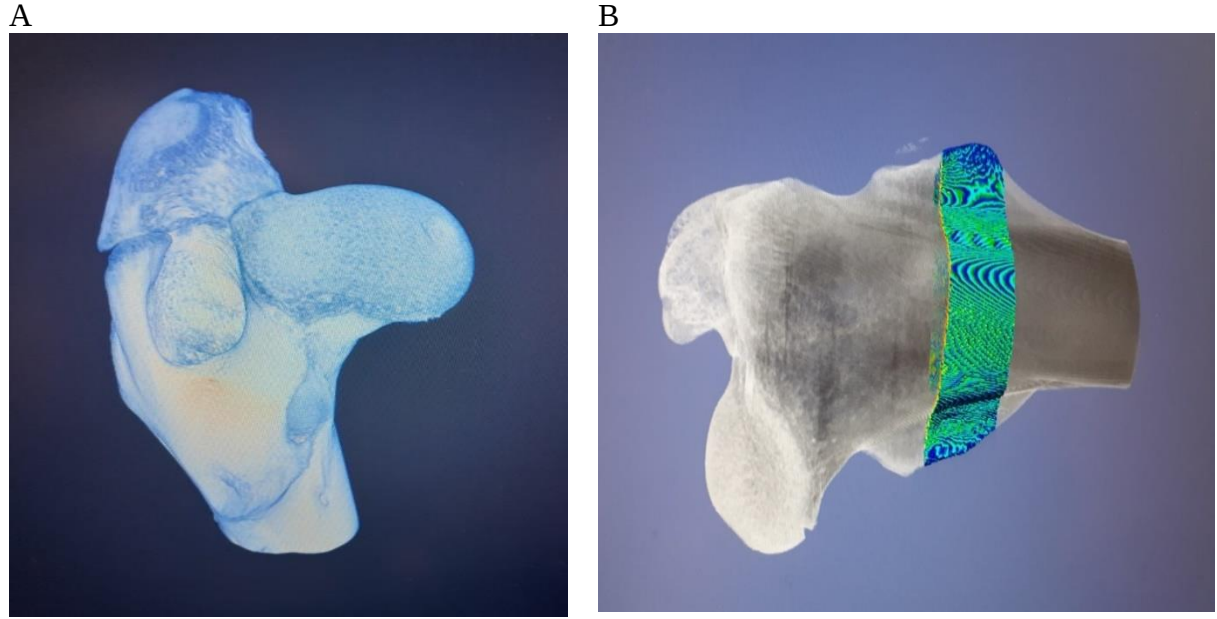
Resim 4.1’de OP ve K grubuna ait Tavşanların micro-CT görüntüleri verilmiştir.



Resim 4.1. Tavşan femur Micro-CT görüntüleri. A: Kontrol grubuna ait görüntü. B: OP grubuna ait görüntü

Tavşanlarda OP gelişimi sonrası yapılan Micro-CT çekiminde femurda trabeküler kemikteki erozyon kontrol ile karşılaştırıldığında net bir şekilde gözlenmiştir.

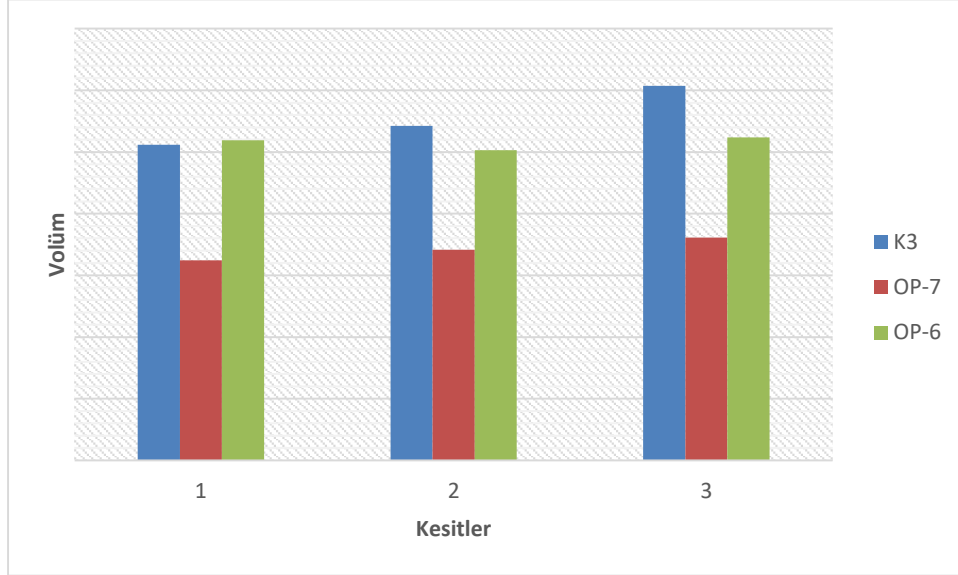
Aşağıda resim 4.2’de femur Micro-CT görüntülerinin yapılandırılması ile elde edilen 3D görüntüsü ve kemik volüm hesaplamada kullanılan kesit bölgesi gösterilmiştir.



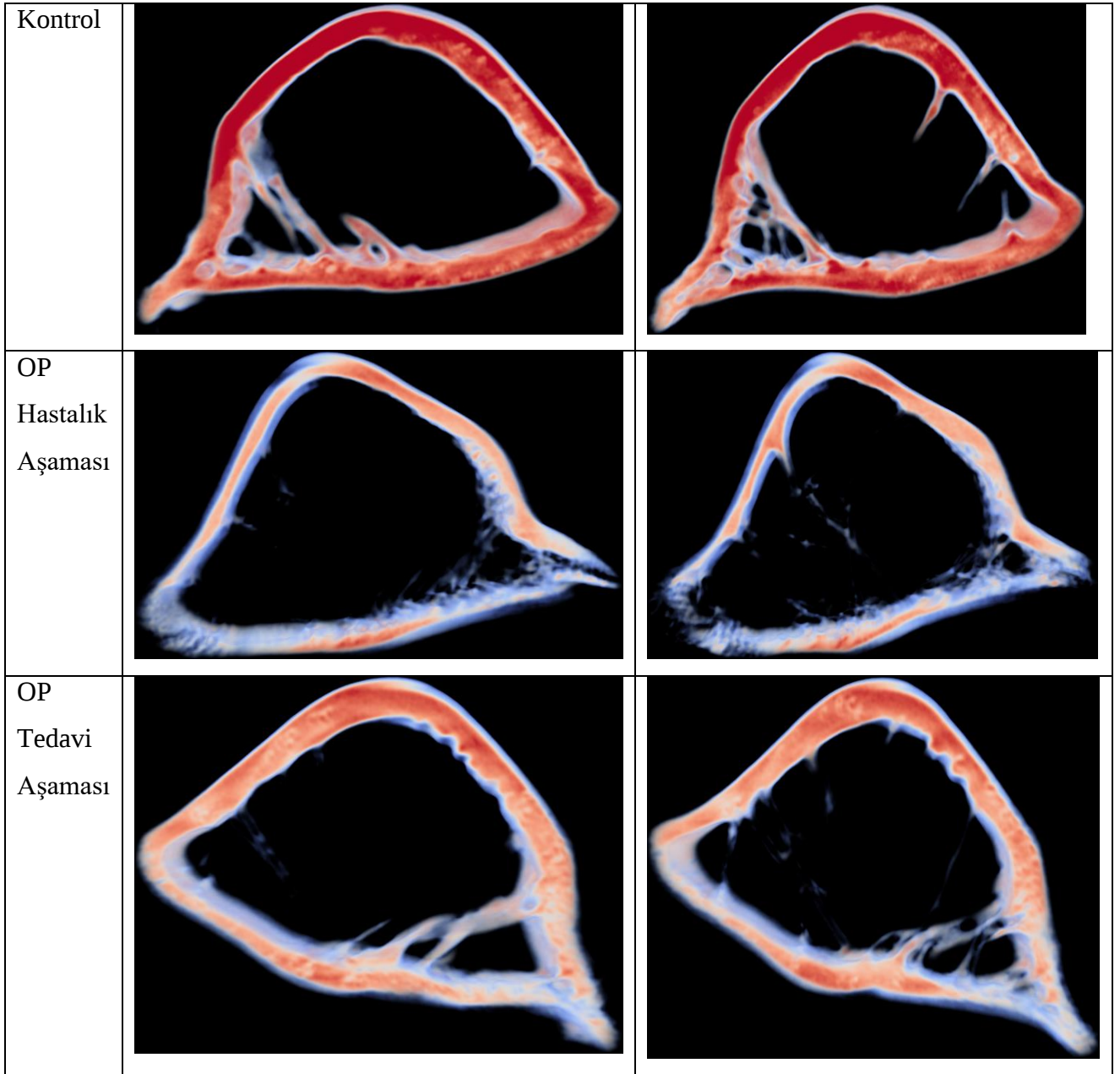
Resim 4.2. A:Tavşan femur Micro-CT görüntülerininin yapılandırılması ile elde edilen 3D görüntüsü. B: Tavşan femur Micro-CT 3D görüntünden alınan kesit bölgesi

Femur micro-CT görüntüleri yeniden yapılandırıldıktan sonra ParaWiew programı ile analizi gerçekleştirilmiştir. 3D yapılandırmadan kesit alınmış ve bu kesitlerin volümleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Kontrol grubu, OP hastalık aşaması ve OP tedavi aşamasına ait micro-CT görüntüleri (Resim 4.3) ve bu görüntülerden hesaplanan volüm değerleri (çizelge 4.3) aşağıda verilmiştir. Her tavşandan, program ile eşleştirilen aynı bölgeden eşit kesitler alınmış ve bu kesitlerden program yardımı ile kemik volüm hesaplaması yapılmıştır. Elde edilen verilerin başta yüksek olan değerlerin hastalık ile beraber azaldığı ardından tedavi ile tekrar yükselişe geçtiği gösterilmiştir. Benzer şekilde görüntülerde de görüldüğü gibi hastalık ile beraber kompakt kemik ve trabeküler alanlarda erozyon gösterilmiş ve ardından tedavi ile birlikte bu erozyonda iyileşme gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: Tavşan femur micro-Ct görüntülerinden elde edilen kemik volüm değerleri. K3:Kontrol grubu, OP-7:OP hastalık aşaması, OP-6:OP tedavi aşamasına ait micro-CT görüntülerinden hesaplanan volüm değerleri.

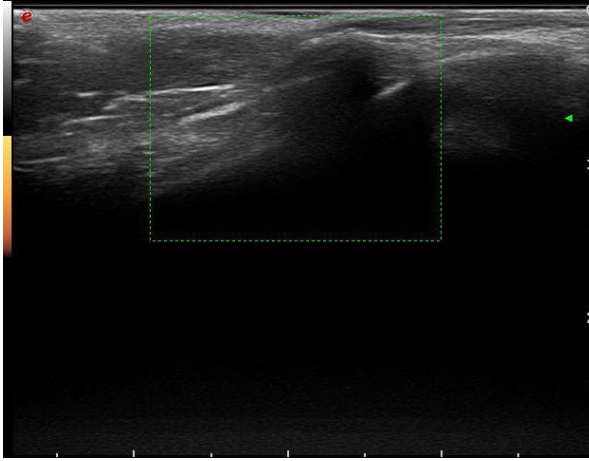


Aşağıda resim 4.3’de Kontrol grubu, OP hastalık aşaması ve OP tedavi aşaması femur Micro-CT görüntülerinin yapılandırılmasının ardından alınan kesitlerin görüntüleri verilmiştir.

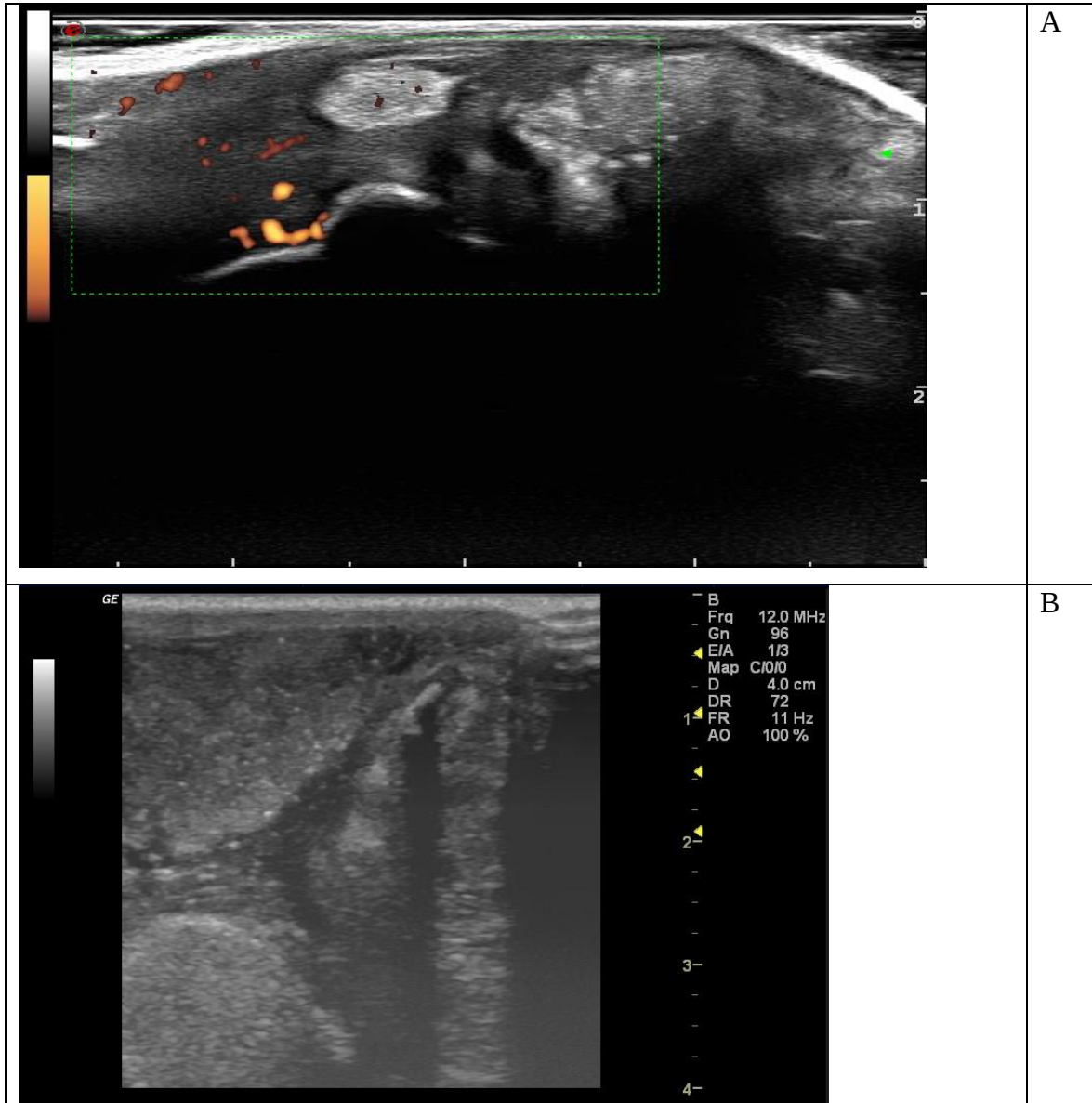


Resim 4.3. Tavşan femur Micro-CT görüntülerinin yapılandırılmasının ardından alınan kesitlerin görüntüleri.

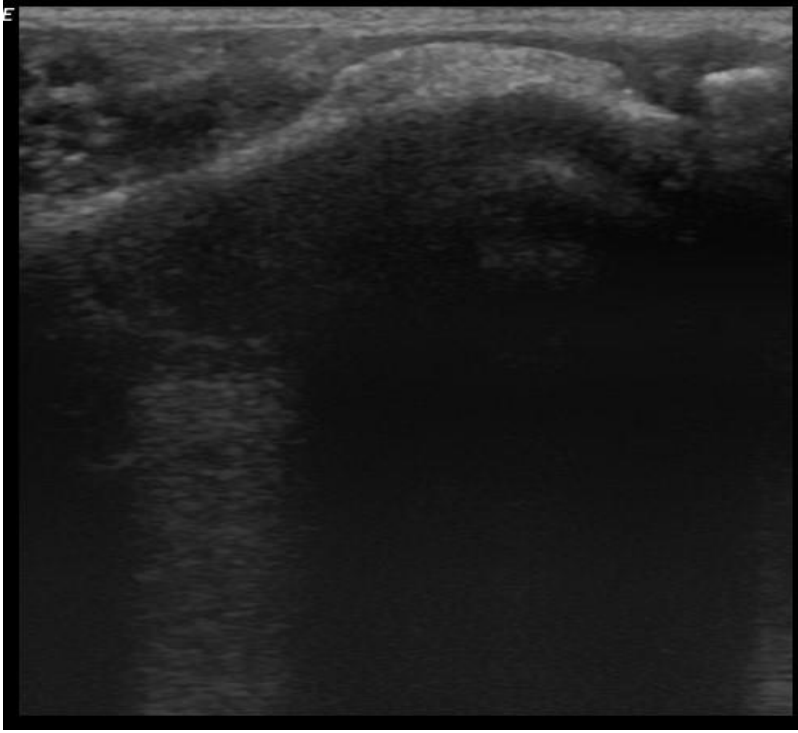
RA klinik tanı ve takibinde yaygın olarak ultrasoun görüntüleme kullanılmaktadır. RA grubu tavşanların başlangıçtan itibaren tüm hastalık ve tedavi sırasında yapılan diz eklem görüntülemeleri ESAOTE MyLab 70-X-Vision ultrasound cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Resim 4.4; 4.5 ve 4.6’da USG görüntüleri verilmiştir.



Resim 4.4. Tavşan diz USG görüntüsü. (RA oluşturmada öncesine ait normal USG)



Resim 4.5. RA aşaması tavşan diz USG görüntüsü A: Sinovit, sinoviyal hipertrofi, kemik erozyonu ve power doppler sinyalleri B: Rice body görüntüsü

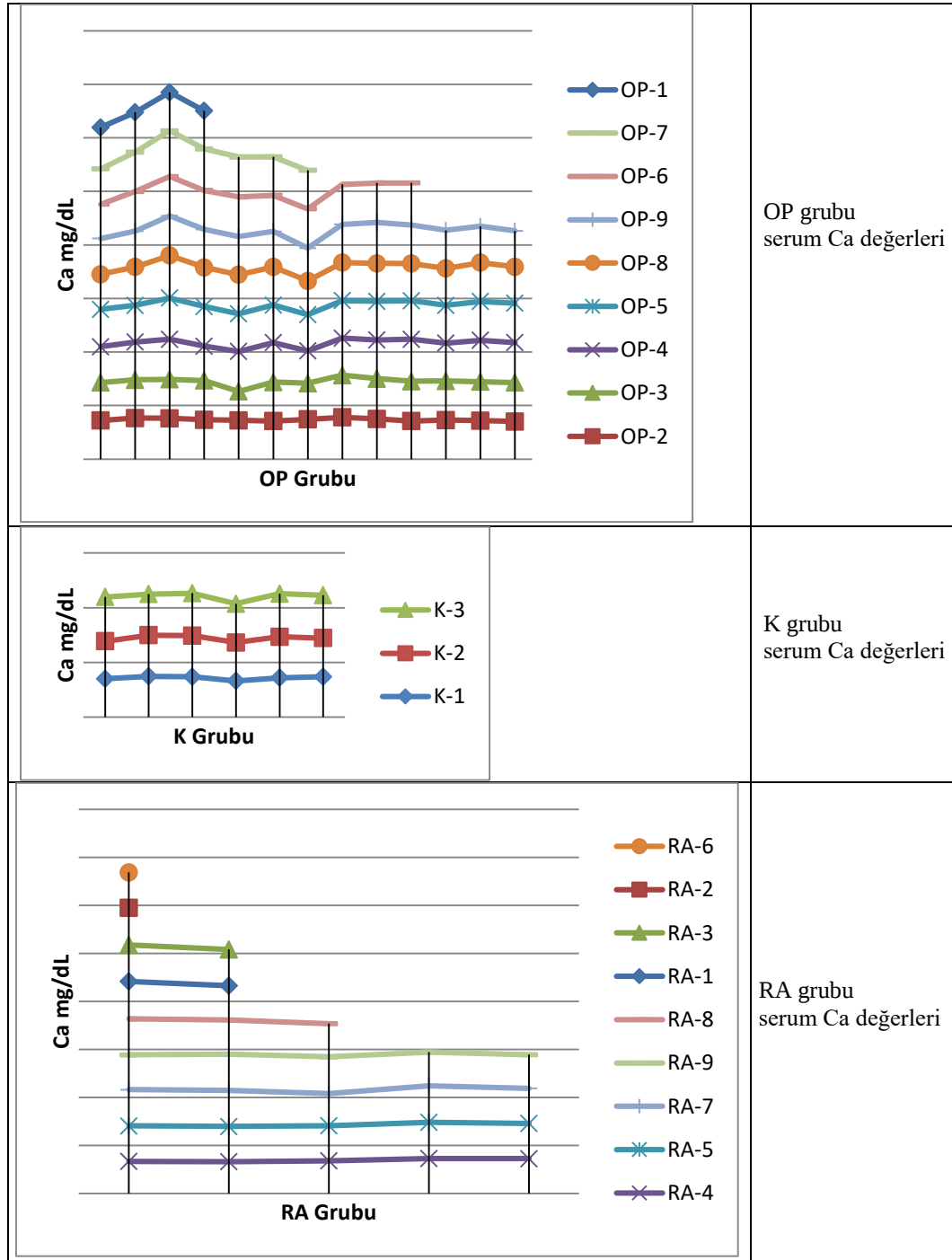


Resim 4.6. RA tedavisi sonrası tavşan diz USG görüntüsü (Normal USG)

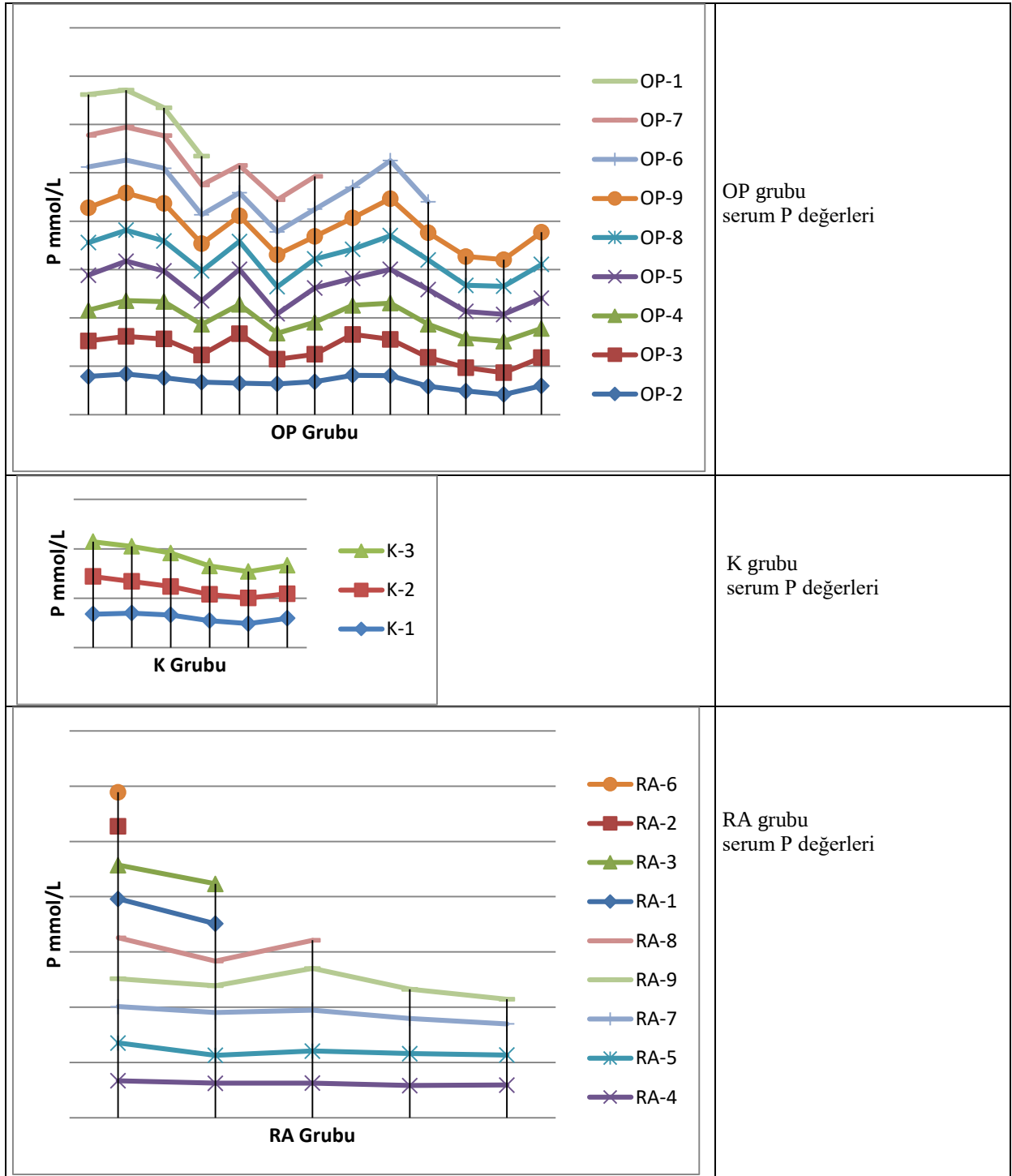
USG görüntülerinden de anlaşılacağı üzere hastalık öncesi normal olan diz USG görüntüleri ve ardından, uyguladığımız diz içi enjeksiyonlardan sonra tavşanlarda RA gelişimi gözlenmiştir. RA hastaları diz eklemlerinde görülen Sinovit, sinoviyal hipertrofi, kemik erozyonu ve power doppler sinyalleri gibi durumlar USG ile gösterilmiştir. Ayrıca ilerlemiş RA durumlarında görülebilen Rice body durumuda gözlenmiştir. Hastalığın ardından tedavi edilen tavşanlarda iyileşme gösterilmiştir.

Tüm gruplara ait serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri analiz edilmiştir. Tavşanlar çalışma başlangıcından itibaren tüm hastalık ve tedavi sürelerince sürekli izlenmiş ve her iki haftada bir kan numuneleri alınmıştır. Tüm bu süreçler boyunca toplanan serumların analizi ile elde edilen tüm veriler toplu olarak çizelge 4.4.'de gösterilmiştir. Çizelgede gruplar ayrı ayrı verilmiş ve gruplara ait tavşanların başlangıç, hastalık ve tedavi süreci boyunca ölçülen tüm serum değerlerindeki gözlenen değişimler tek tek gösterilmiştir.

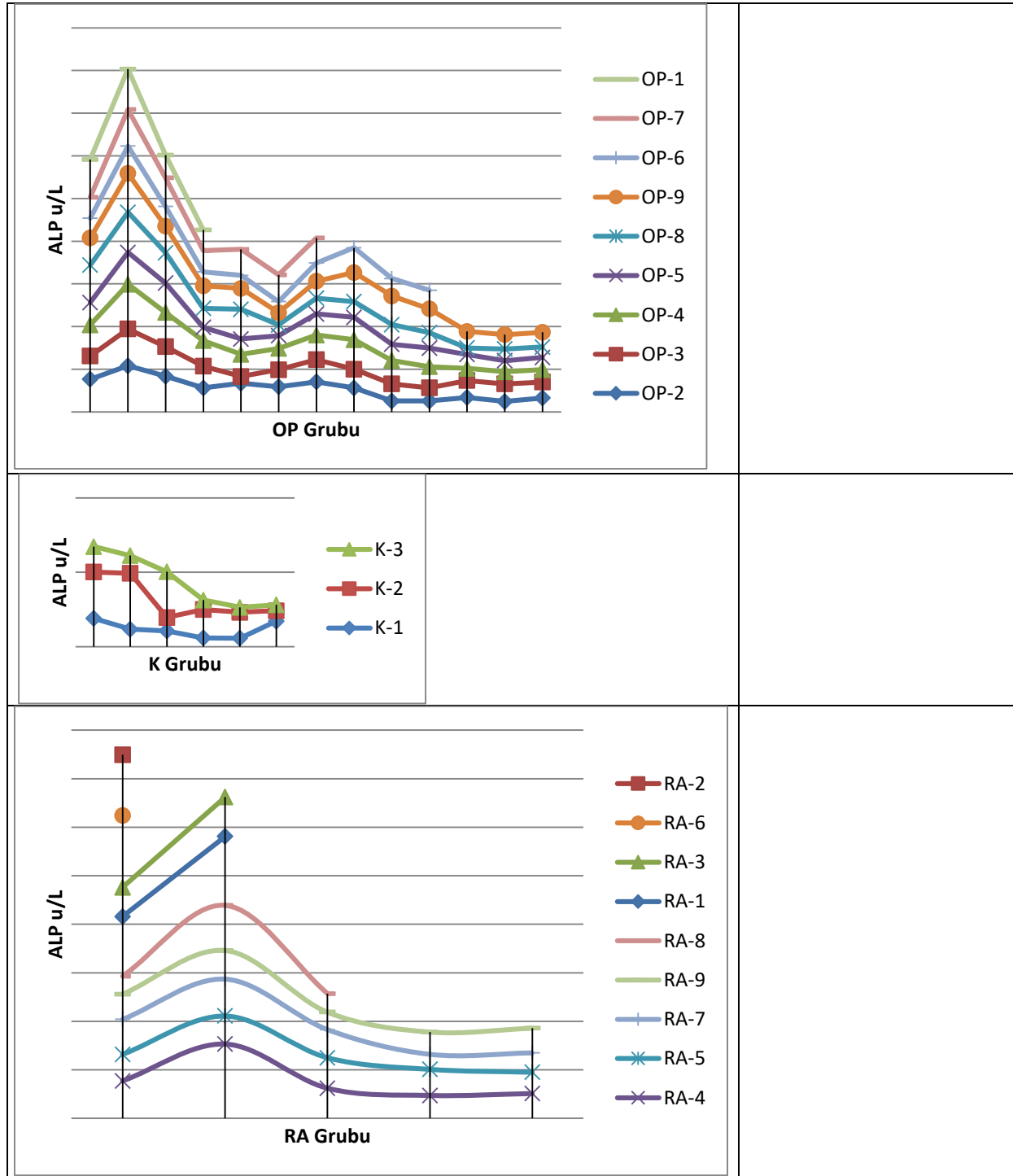
Çizelge 4.4. Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



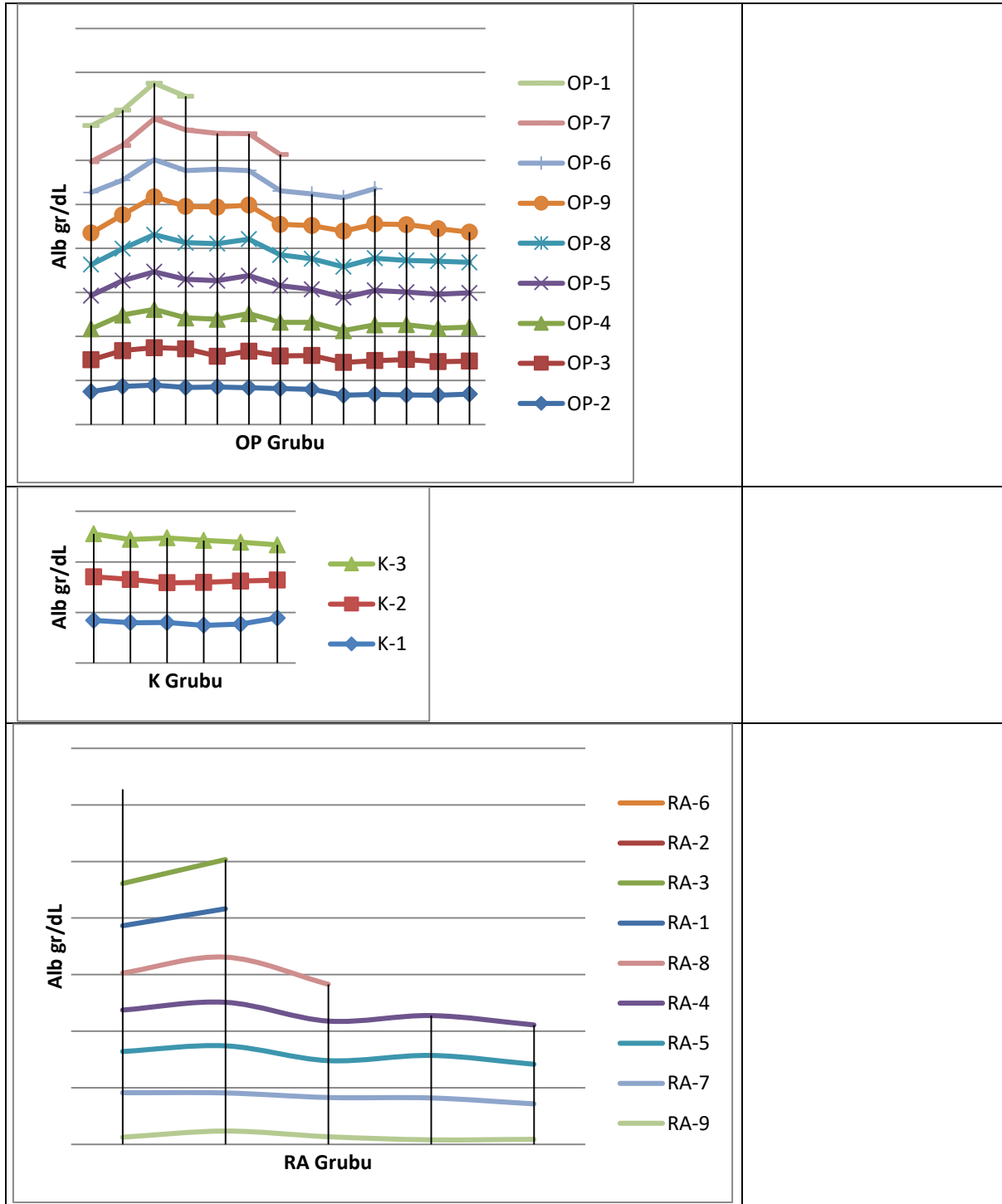
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



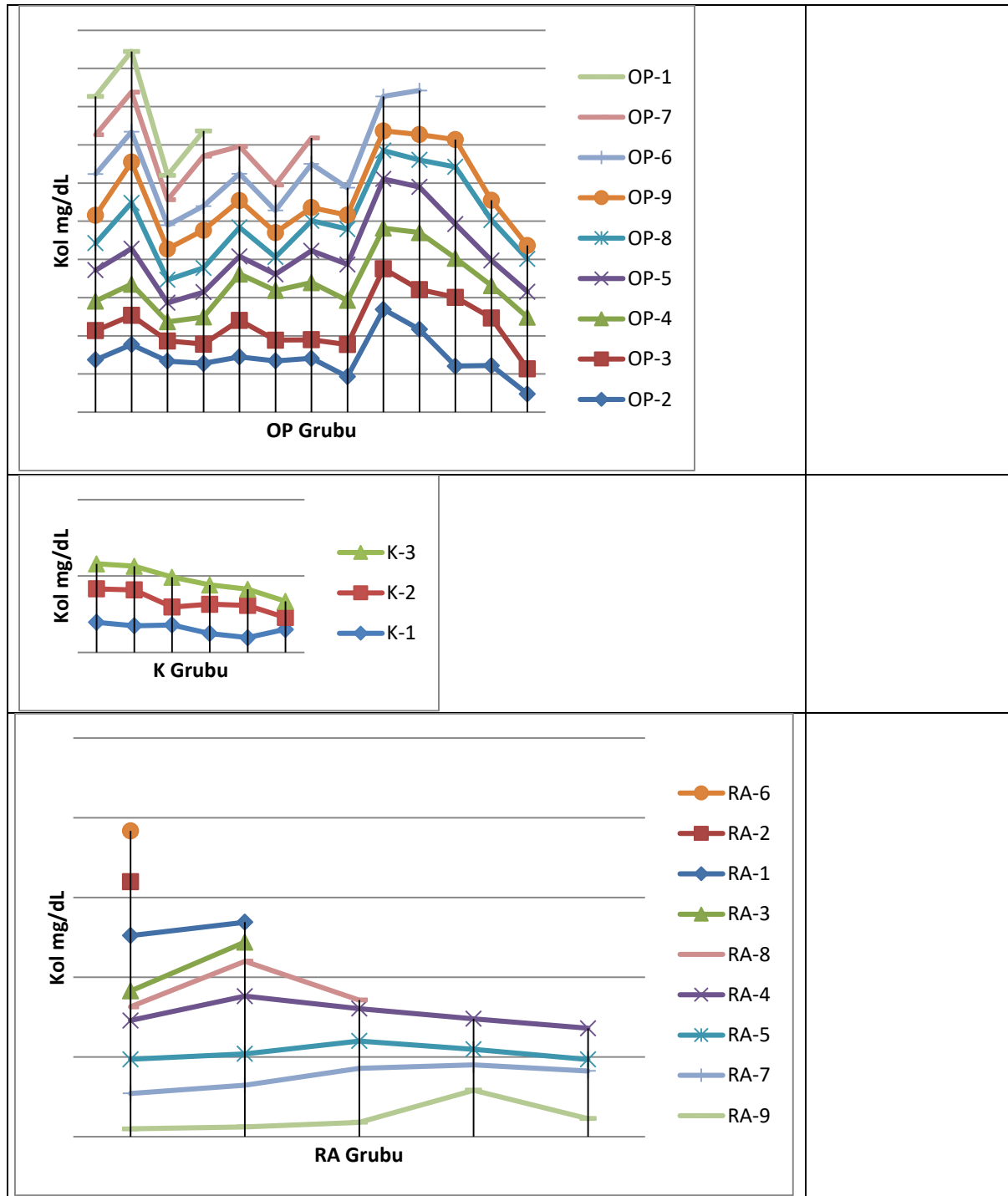
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



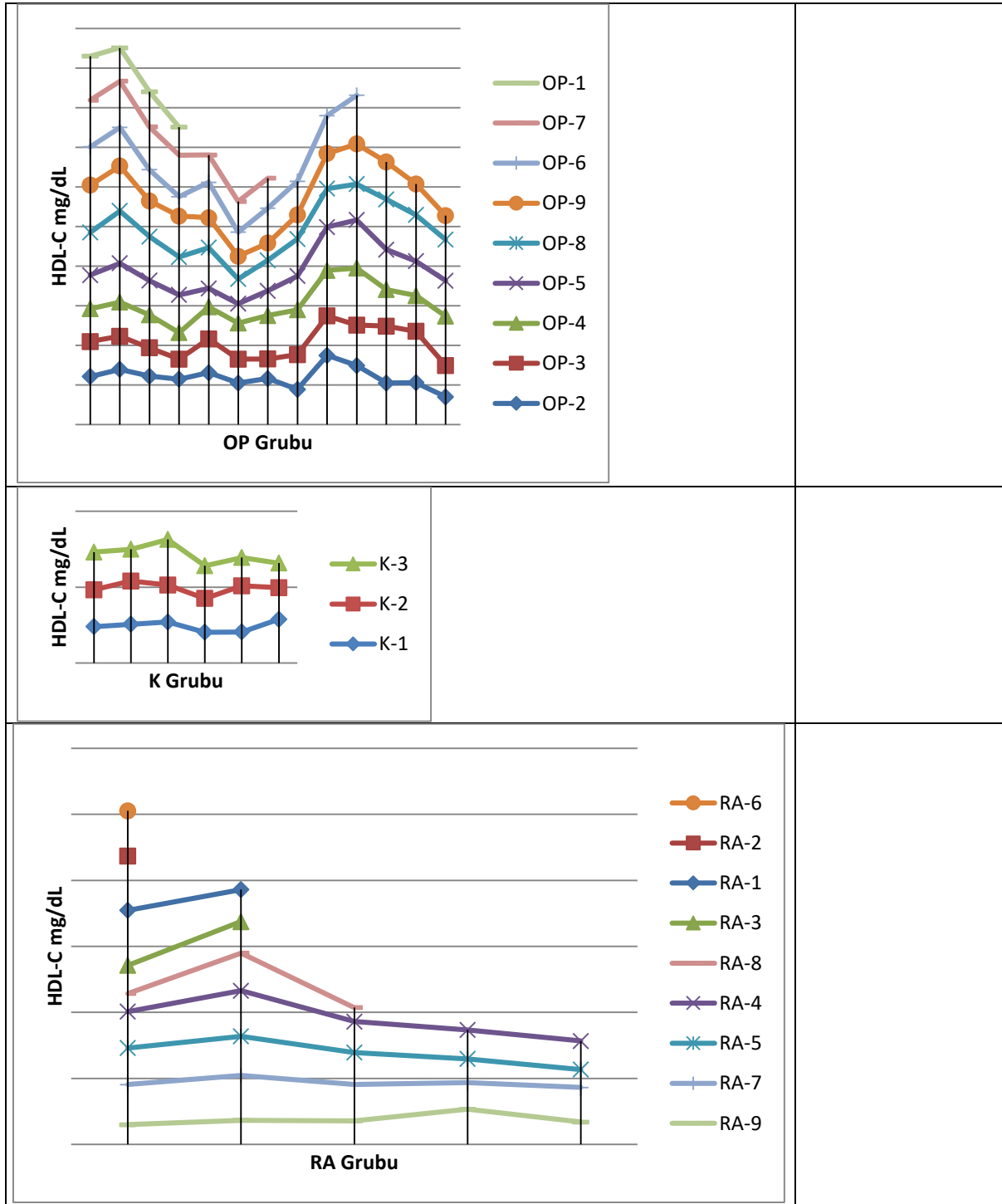
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



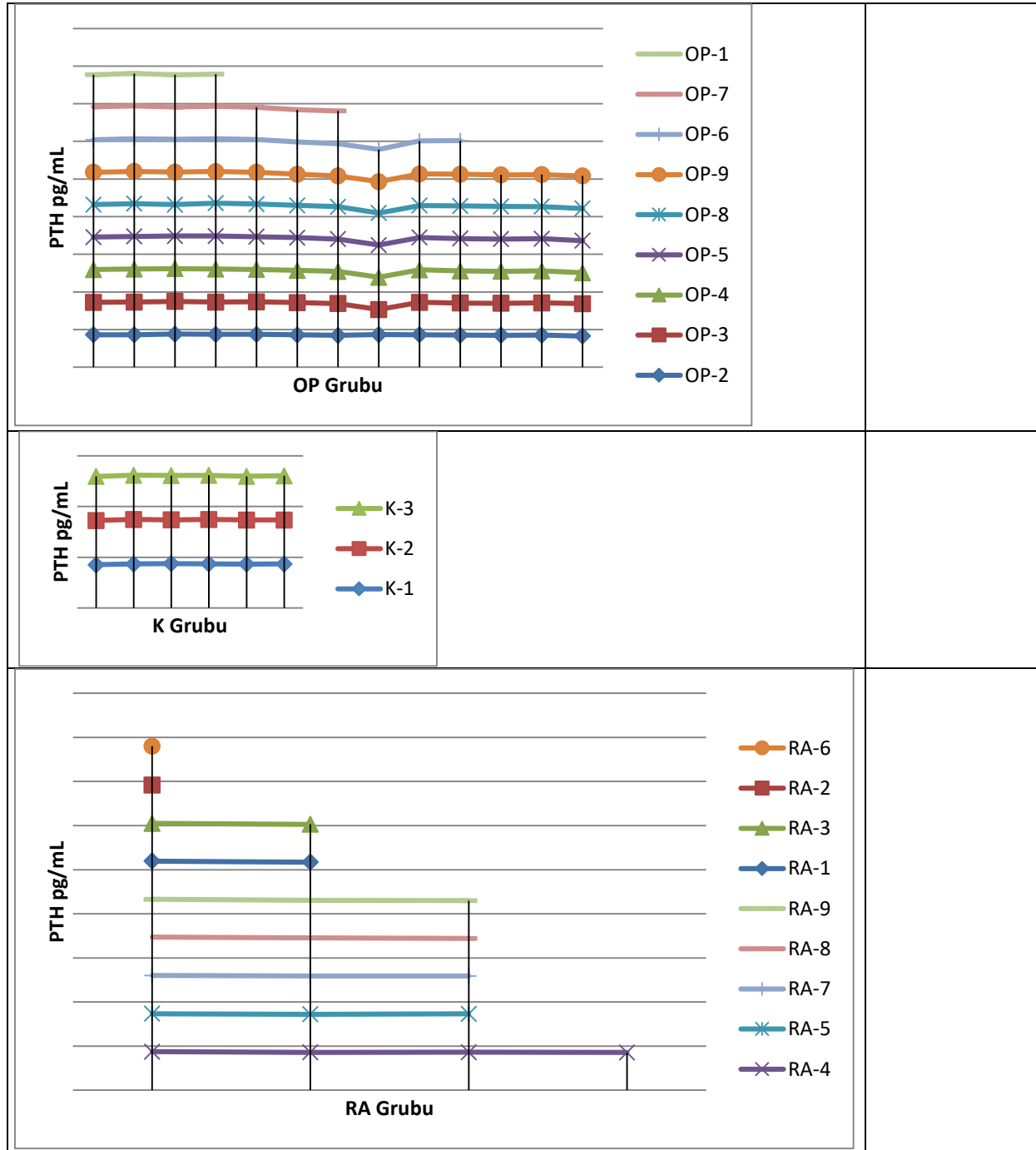
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



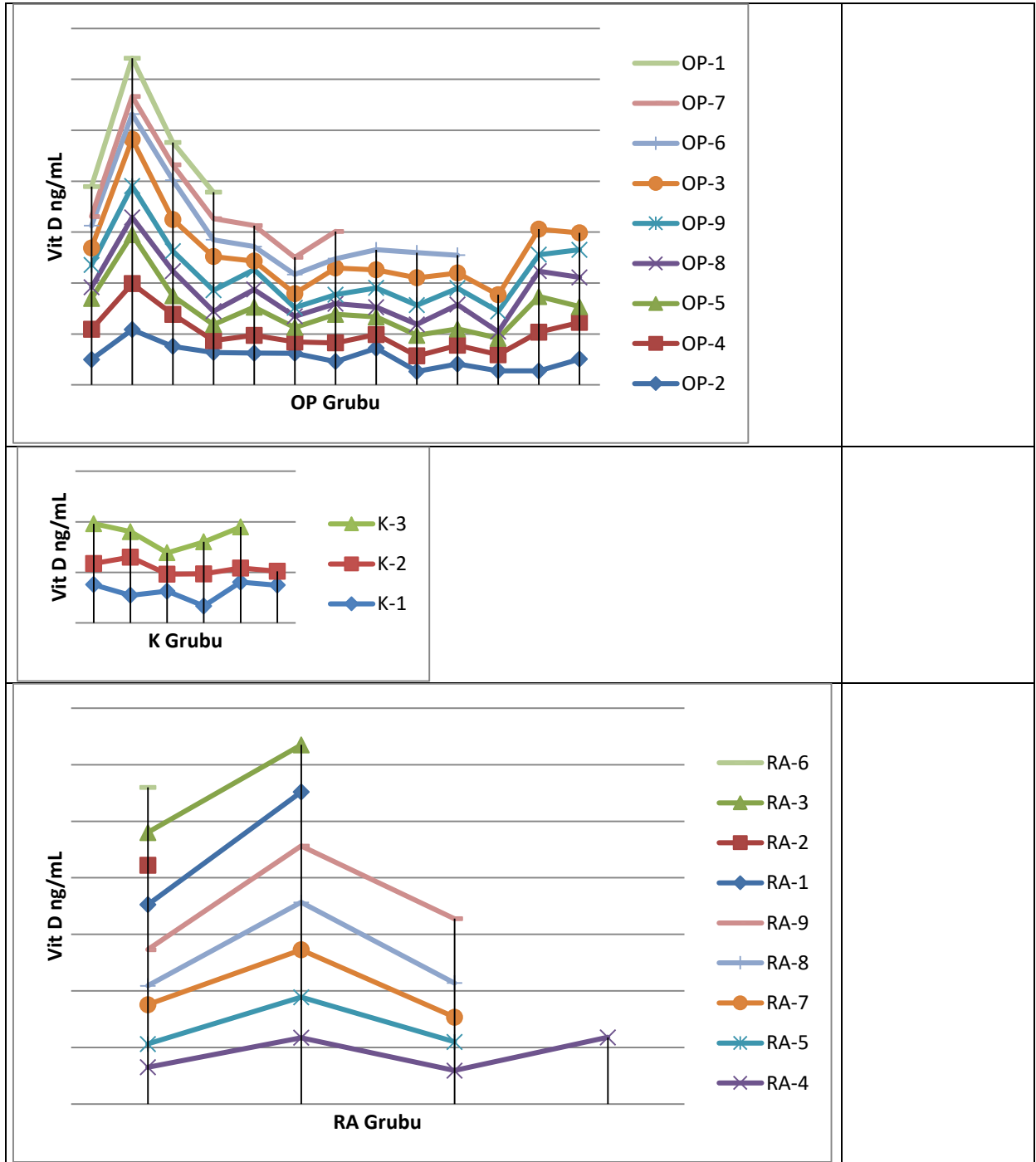
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



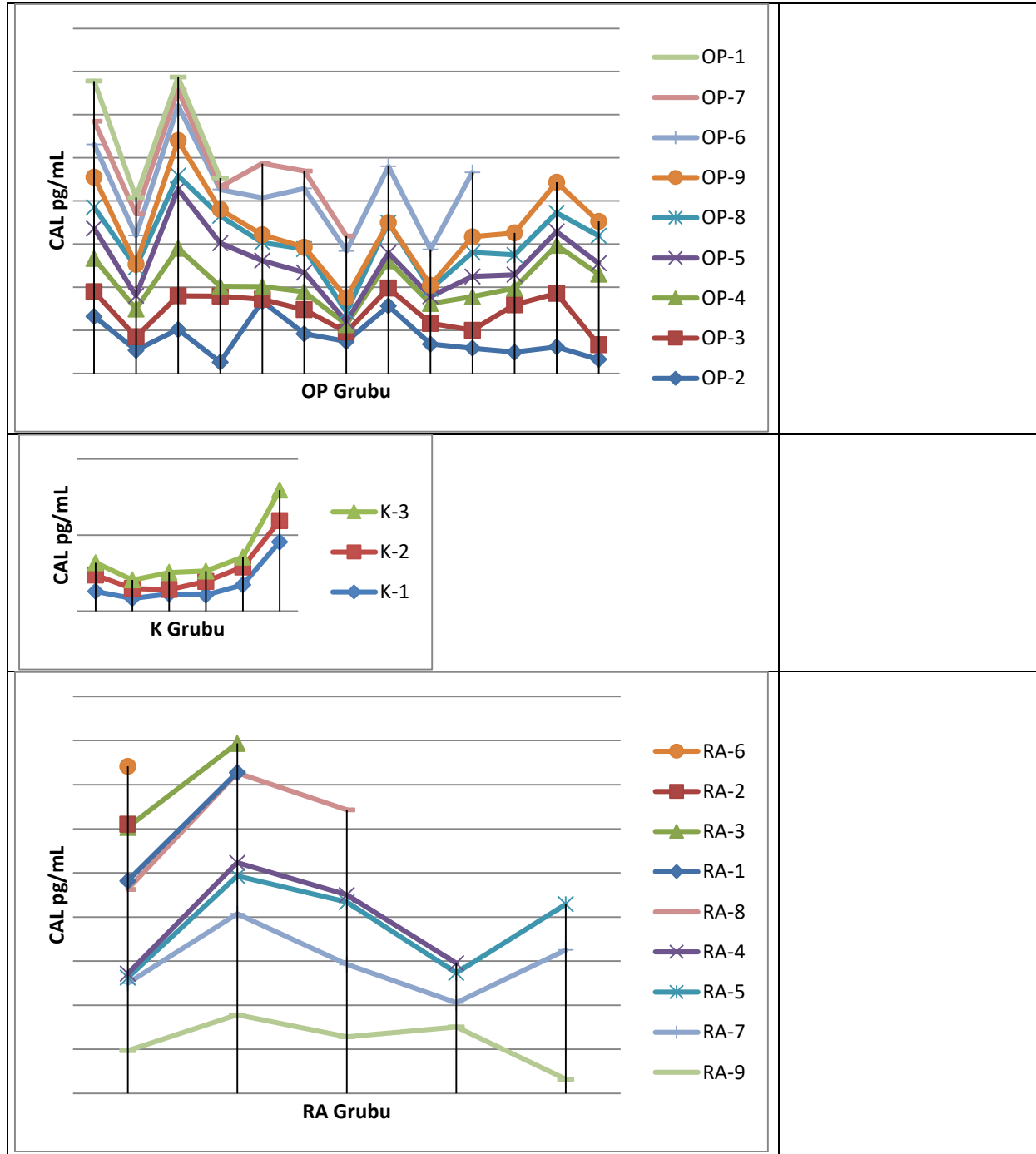
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



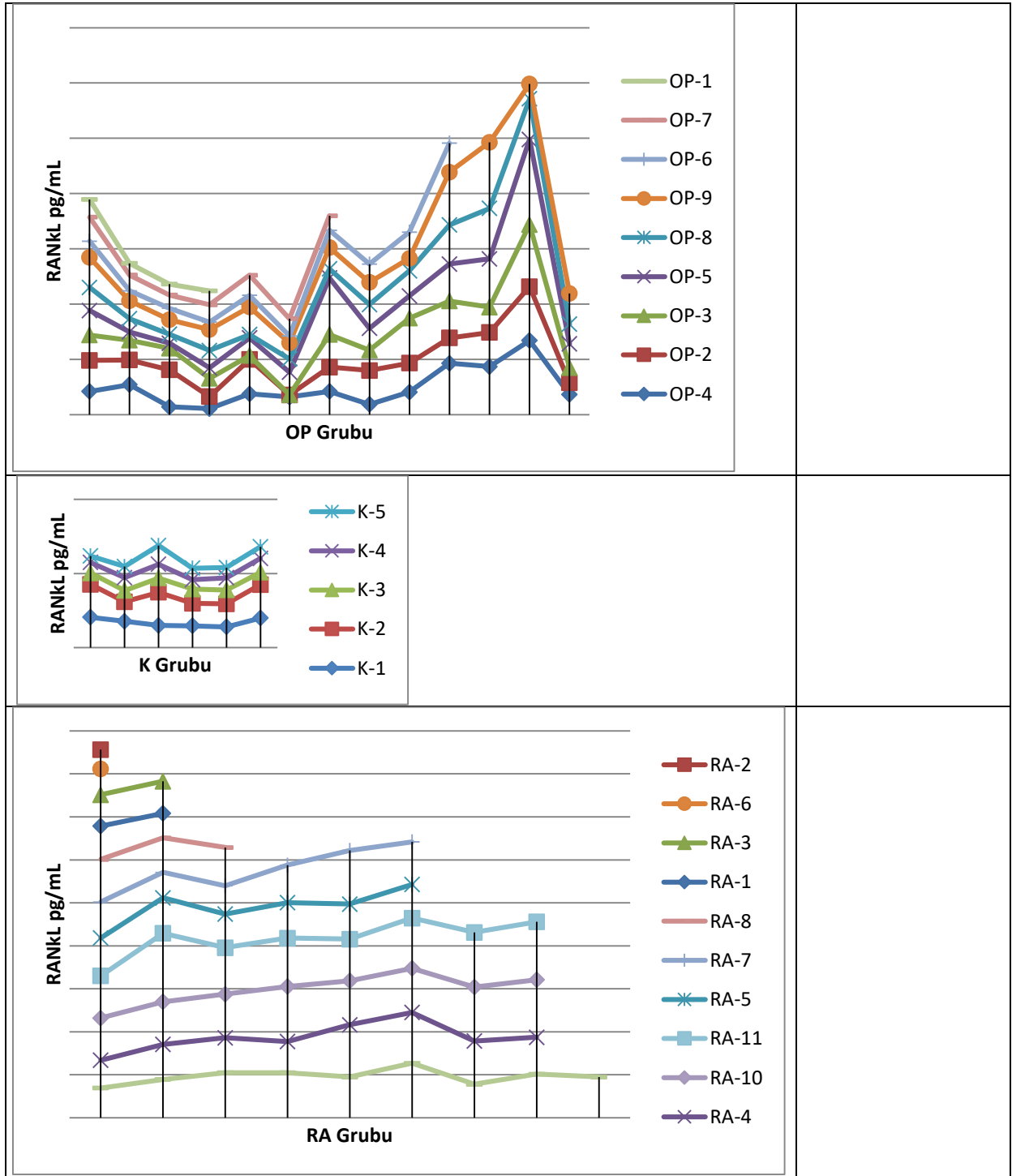
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



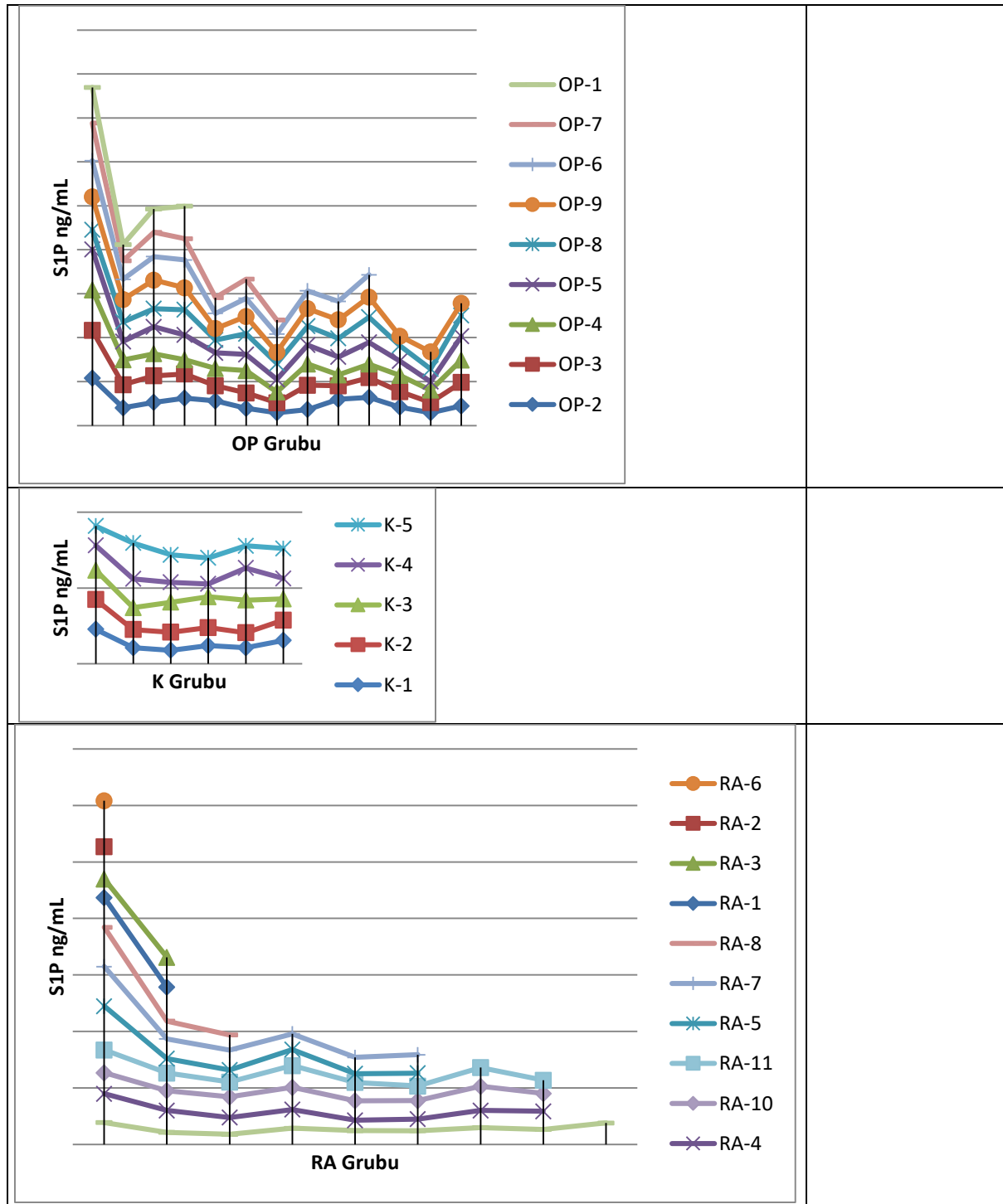
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



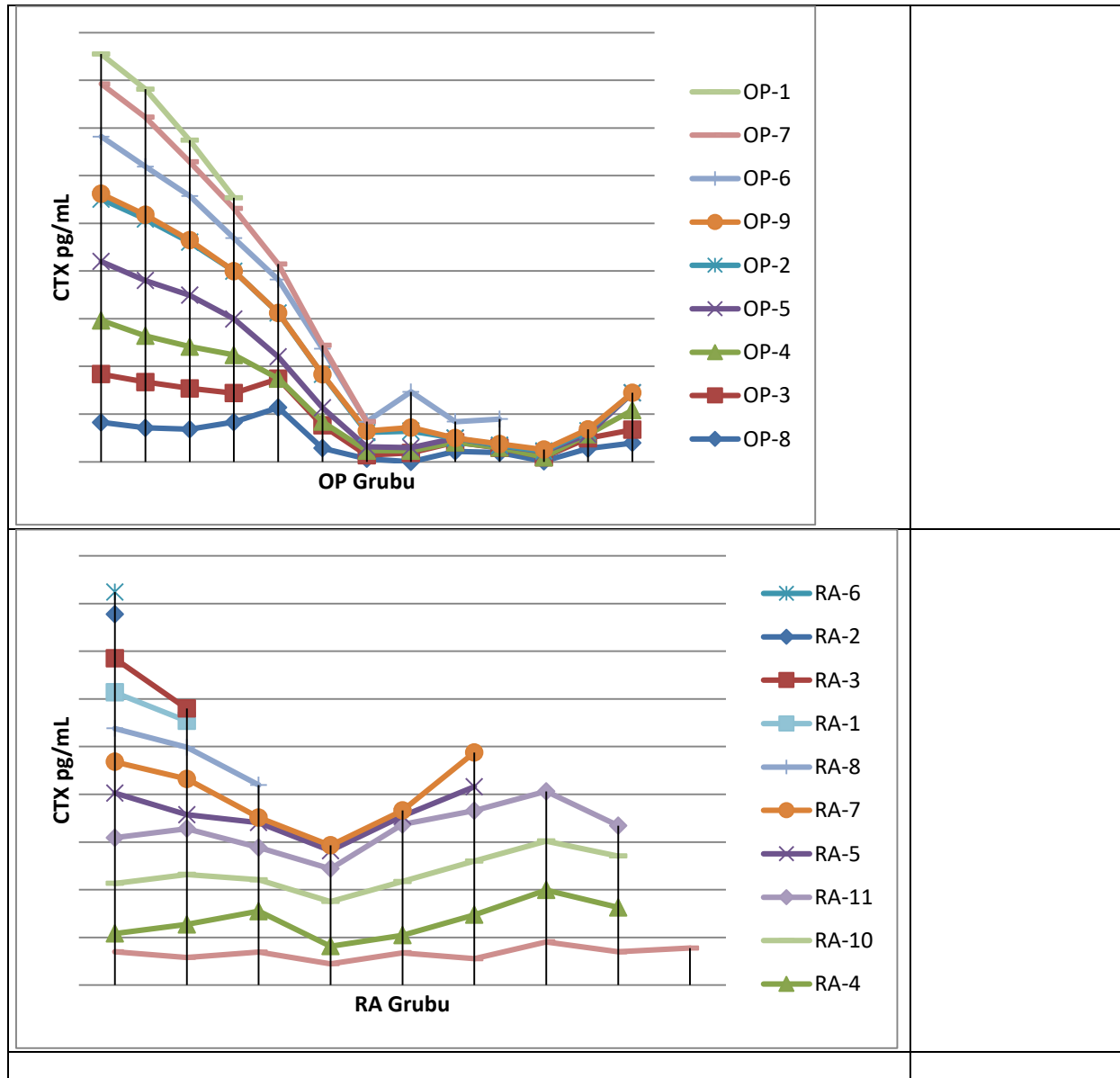
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



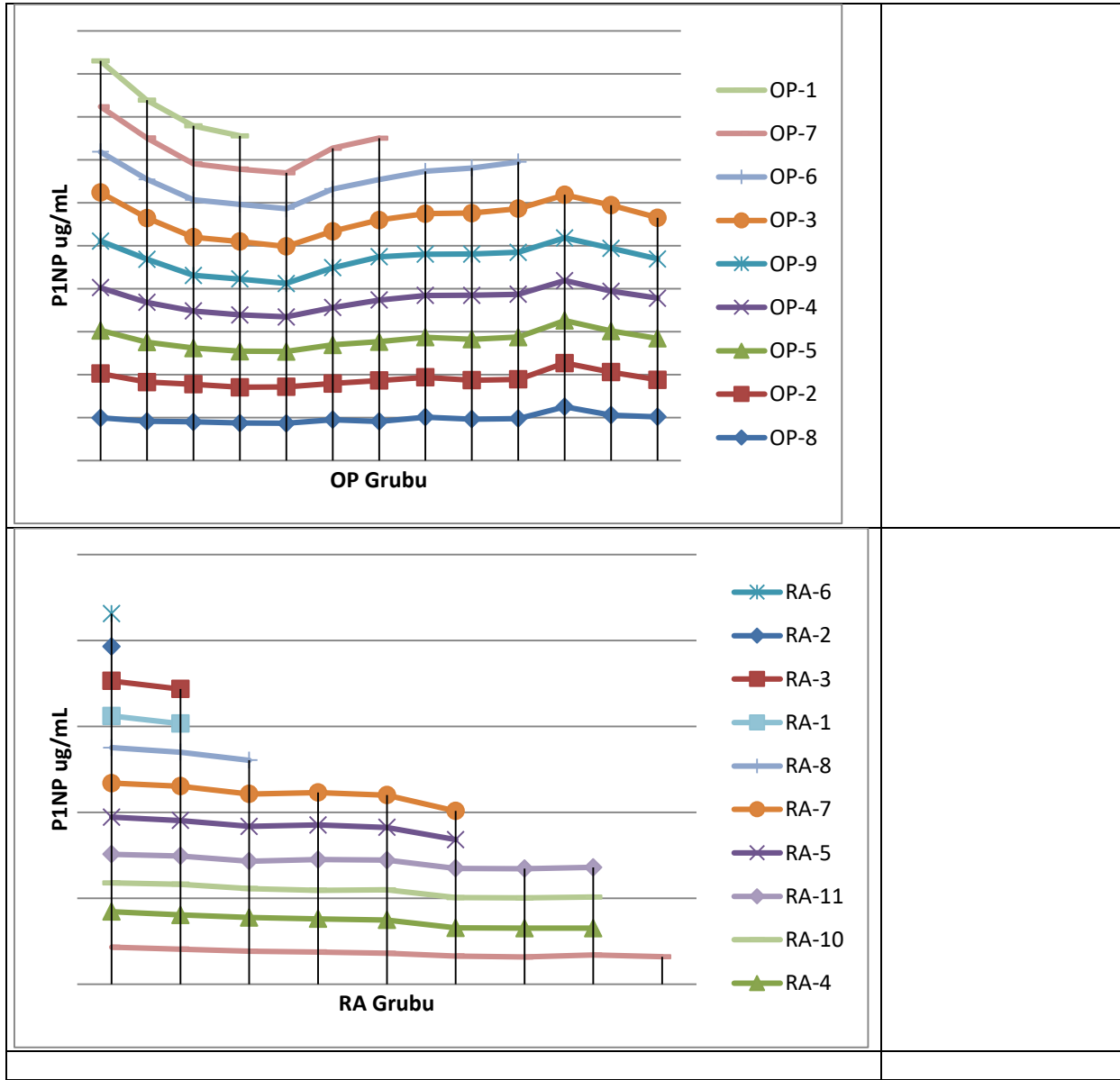
Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



Çizelge 4.4. (devam) Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P düzeyleri



Laboratuvar analizleri sonucu elde ettiğimiz sonuçlar istatistiksel analize tabi tutulmuştur.

Laboratuvar analizleri sonucunda Kontrol grubuna ait elde ettiğimiz verilerin tanımlayıcı istatistiksel bilgileri çizelge 4.5’de toplu olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Kontrol grubuna ait verilerin tanımlayıcı istatistiksel bilgileri

Kontrol Grubu						
	Minimum	Maximum	Mean	Std. Error	Skewness	Kurtosis
Ca (mg/dL)	13,24	16,16	14,74	0,178	-0,076	-0,325
P (mg/dL)	4,88	7,62	6,09	0,196	0,191	-1,237
ALP (u/L)	34	375	147,17	23,604	1,002	0,251
Alb (gr/dL)	3,48	4,45	4,06	0,0625	-0,472	-0,371
Kol (mg/dL)	78,3	235,3	157,02	10,973	-0,034	-1,155
HDL_C (mg/dL)	32,4	60,8	47,66	1,9053	0,050	-0,742
PTH (pg/mL)	8,520	8,76	8,68	0,0142	-1,165	1,993
VitD (ng/mL)	27,69	81,13	56,93	4,715	-0,238	-1,497
CAL (pg/mL)	0,579	9,09	2,43	0,438	2,940	10,325
RANKL (pg/mL)	32,56	261,44	134,32	11,0237	0,315	-1,086
S1P (ng/mL)	16,91	59,37	31,23	1,669	0,802	0,482
KiloGr	2410	3770	3019,53	97,463	0,501	-0,431

Yeni Zeland Tavşanlarının bazı biokimyasal parametreleri için referans aralık çalışması yapılmış. Çalışmalar oldukça sınırlı olmakla beraber çalışmalarda kulak veninden alınan kan kullanılmış ve genel olarak biyokimya oto-analizörlerinde ölçüm yapılmış (MediRabbit, 2023; C. Özkan, Kaya ve Akgul, 2012; Ö. Özkan ve Pekkaya, 2019; Shousha, Mahmoud ve Hameed, 2017). Çalışmalarda kullanılan kitlerin tavşana uygunluğundan bahsedilmemiştir. Bu araştırmalardan elde edilen değerler çizelge 4.6’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Tavşanlara ait bazı biyokimyasal parametrelerin sayısal değerleri.

	Minimum	Maximum
Ca (mg/dL)	5,5	14,1
P (mg/dL)	4,03	5,96
ALP (u/L)	10	96
Alb (gr/dL)	2,1	4,3
Kol (mg/dL)	10	80

Bizim çalışmamız da insan serum biyokimya parametreleri için kullanılan kit ve otoalizörlerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda her grubun başlangıç değerlerini aynı zamanda kontrol olarak da değerlendirilmiştir. Böylece her tavşana ait değişimlerin kendi içinde karşılaştırılması sağlanmıştır.

OP grubuna ait analizler sonunda elde edile veriler istatistiksel analiz ve yorum yapılabilmesi için Başlangıç, Hastalık-1, Hastalık-2, Tedavi-1 ve Tedavi-2 şeklinde sınıflandırılmıştır. Serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P sonuçlarının gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Shapiro-Wilk testi yapılmıştır. $p>0.05$ değeri elde edilmişse normal dağılım olarak kabul edilmiştir. OP grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri çizelge 4.7’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. OP grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri

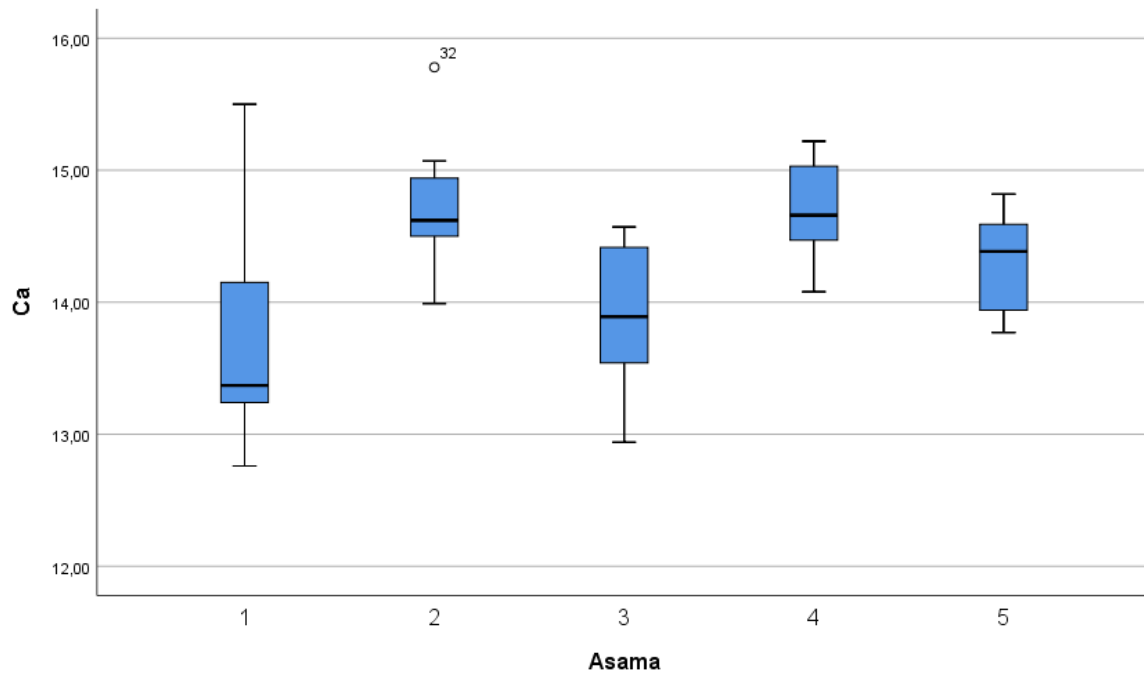
OP Grubu		Mean±Std.D	Std. Error	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk
Ca (mg/dL)	1: Başlangıç	13,77±0,84	0,281	12,76	15,50	0,358
	2: Hastalık-1	14,69±0,53	0,178	13,99	15,78	0,591
	3: Hastalık-2	13,90±0,58	0,205	12,94	14,57	0,466
	4: Tedavi-1	14,71±0,42	0,159	14,08	15,22	0,710
	5: Tedavi-2	14,32±0,39	0,162	13,77	14,82	0,825
	Total	14,26±0,69	0,112	12,76	15,78	
P (mg/dL)	1: Başlangıç	7,35±0,76	0,255	6,34	8,44	0,463
	2: Hastalık-1	6,81±0,43	0,142	6,27	7,56	0,527
	3: Hastalık-2	6,05±0,61	0,215	5,05	7,00	1,000
	4: Tedavi-1	6,84±0,37	0,140	6,38	7,33	0,276
	5: Tedavi-2	5,69±0,54	0,218	4,98	6,20	0,114
	Total	6,61±0,79	0,128	4,98	8,44	
ALP (u/L)	1: Başlangıç	131±32,54	10,845	93,00	177,00	0,270
	2: Hastalık-1	136±21,38	7,126	95,30	165,00	0,422
	3: Hastalık-2	92±24,12	8,527	66,30	131,00	0,264
	4: Tedavi-1	93±20,82	7,869	71,30	127,00	0,406
	5: Tedavi-2	62±11,74	4,790	45,00	78,70	0,845
	Total	107±35,36	5,662	45,00	177,00	
Alb (gr/dL)	1: Başlangıç	3,77±0,36	0,121	3,50	4,60	0,010
	2: Hastalık-1	4,14±0,16	0,053	3,96	4,40	0,429
	3: Hastalık-2	4,03±0,18	0,062	3,78	4,29	0,935
	4: Tedavi-1	3,75±0,14	0,051	3,54	3,91	0,064
	5: Tedavi-2	3,71±0,19	0,078	3,38	3,87	0,193
	Total	3,90±0,28	0,045	3,38	4,60	
Kol (mg/dL)	1: Başlangıç	184±44,36	14,786	141,00	275,00	0,112
	2: Hastalık-1	170±52,87	17,623	120,00	292,00	0,038
	3: Hastalık-2	167±67,24	23,772	113,00	280,00	0,009
	4: Tedavi-1	214±88,98	33,631	103,00	385,97	0,500
	5: Tedavi-2	189±53,11	21,682	106,00	247,00	0,625
	Total	184±61,15	9,792	103,00	385,97	
HDL_C (mg/dL)	1: Başlangıç	51,66±7,66	2,554	41,40	60,50	0,181
	2: Hastalık-1	47,06±9,77	3,258	34,20	62,60	0,678
	3: Hastalık-2	38,85±10,31	3,644	26,40	58,50	0,663
	4: Tedavi-1	52,96±9,3	3,519	41,70	68,60	0,549
	5: Tedavi-2	49,98±7,62	3,111	38,80	58,80	0,634
	Total	47,93±9,97	1,597	26,40	68,60	

Çizelge 4.7. (devam) OP grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri

OP Grubu		Mean±Std.D	Std. Error	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk
PTH (pg/mL)	1: Başlangıç	8,64±0,06	0,020	8,54	8,73	0,830
	2: Hastalık-1	8,65±0,08	0,026	8,52	8,73	0,248
	3: Hastalık-2	8,23±1,07	0,377	5,59	8,68	0,000
	4: Tedavi-1	8,48±0,27	0,101	7,93	8,75	0,033
	5: Tedavi-2	8,51±0,08	0,031	8,40	8,59	0,431
	Total	8,51±0,49	0,080	5,59	8,75	
VitD (ng/mL)	1: Başlangıç	43,28±15,97	5,324	17,92	60,52	0,248
	2: Hastalık-1	55,40±15,50	5,168	35,41	82,65	0,596
	3: Hastalık-2	36,03±11,48	4,058	24,43	56,80	0,263
	4: Tedavi-1	37,11±5,80	2,189	29,47	46,33	0,930
	5: Tedavi-2	43,38±8,73	3,564	35,14	59,99	0,114
	Total	43,49±14,03	2,246	17,92	82,65	
CAL (pg/mL)	1: Başlangıç	3,77±1,26	0,419	2,46	6,60	0,097
	2: Hastalık-1	2,87±1,13	0,377	1,48	4,47	0,285
	3: Hastalık-2	2,66±1,84	0,649	0,92	5,55	0,021
	4: Tedavi-1	2,94±1,87	0,706	0,75	6,05	0,660
	5: Tedavi-2	3,11±1,42	0,581	1,48	5,23	0,317
	Total	3,08±1,46	0,238	0,75	6,60	
RANKL (pg/mL)	1: Başlangıç	86,46±17,65	5,883	58,95	112,37	0,500
	2: Hastalık-1	54,15±18,77	6,255	28,11	88,67	0,943
	3: Hastalık-2	65,44±26,84	9,491	31,07	116,63	0,542
	4: Tedavi-1	104,14±10,58	3,998	88,48	123,30	0,531
	5: Tedavi-2	145,58±28,22	11,521	120,33	189,59	0,146
	Total	86,96±36,67	5,871	28,11	189,59	
S1P (ng/mL)	1: Başlangıç	85,50±19,09	6,362	44,86	108,91	0,286
	2: Hastalık-1	51,98±3,56	1,187	46,39	55,85	0,168
	3: Hastalık-2	36,01±4,00	1,415	30,28	41,47	0,382
	4: Tedavi-1	44,37±5,66	2,140	34,63	53,51	0,582
	5: Tedavi-2	36,07±3,44	1,405	29,45	38,66	0,039
	Total	52,63±21,42	3,430	29,45	108,91	
CTX (pg/mL)	1: Başlangıç	9,49±3,79	1,264	1,13	13,08	0,064
	2: Hastalık-1	7,46±3,26	1,088	0,44	11,34	0,121
	3: Hastalık-2	3,10±2,27	0,802	0,12	6,39	0,668
	4: Tedavi-1	1,52±1,78	0,673	0,17	5,38	0,008
	5: Tedavi-2	1,32±0,87	0,354	0,20	2,28	0,185
	Total	5,03±4,26	0,683	0,12	13,08	
P1NP Ug/L)	1: Başlangıç	2,07±0,11	0,036	1,90	2,26	0,970
	2: Hastalık-1	1,76±0,03	0,011	1,69	1,82	0,808
	3: Hastalık-2	1,79±0,05	0,018	1,71	1,87	0,931
	4: Tedavi-1	1,95±0,08	0,029	1,83	2,08	0,893
	5: Tedavi-2	1,98±0,12	0,051	1,86	2,22	0,048
	Total	1,90±0,15	0,023	1,69	2,26	

OP grubu Serum Ca düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum Ca düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 13,77 mg/dL, hastalık 1. aşamasında ortalama 14,69 mg/dL, hastalık 2. aşamasında 13,9 mg/dL, tedavi 1. aşamasında 14,7 mg/dL ve tedavi 2. Aşamasında ise 14,32 mg/dL olarak ölçülmüştür.

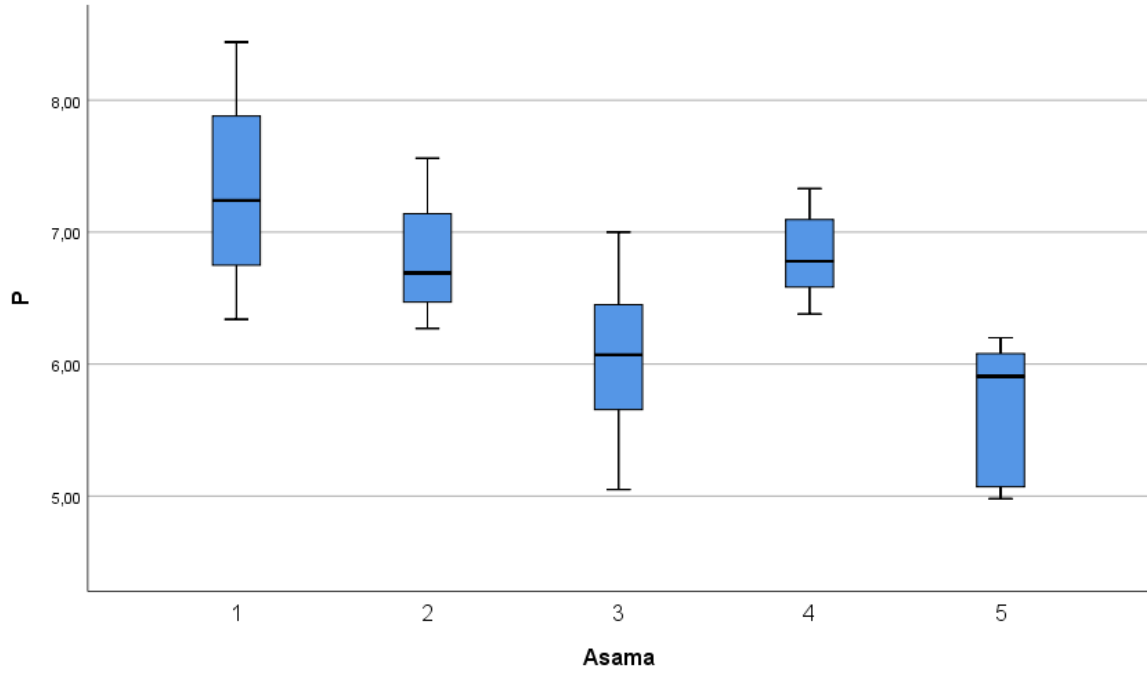
Aşağıda şekil 4.2’de OP grubundan hayvanların serum Ca düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.2. OP grubundan hayvanların serum Ca düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum P düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum P düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 7,35 mg/dL, hastalık 1. aşamasında ortalama 6,81 mg/dL, hastalık 2. aşamasında 6,05 mg/dL, tedavi 1. aşamasında 6,84 mg/dL ve tedavi 2. aşamasında 5,69 mg/dL olarak ölçülmüştür.

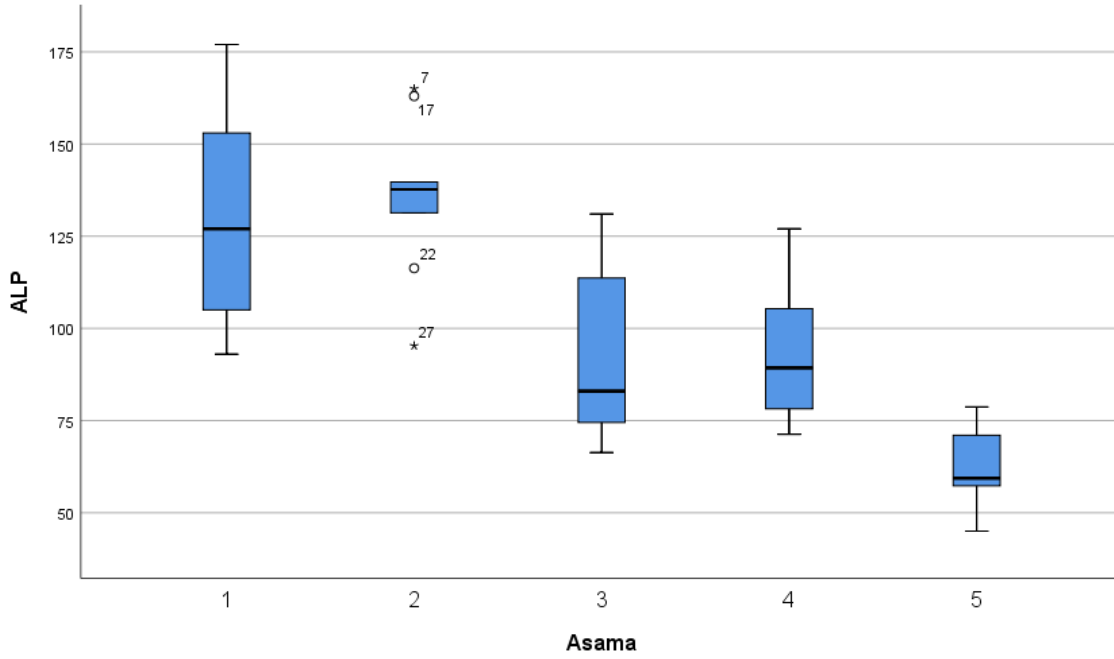
Aşağıda şekil 4.3’de OP grubundan hayvanların serum P düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.3. OP grubundan hayvanların serum P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum ALP düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum ALP düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 131,44 u/L, hastalık 1. aşamasında ortalama 135,71 u/L, hastalık 2. aşamasında 92,45 u/L, tedavi 1. aşamasında 93,53 u/L ve tedavi 2. aşamasında 61,78 u/L olarak ölçülmüştür.

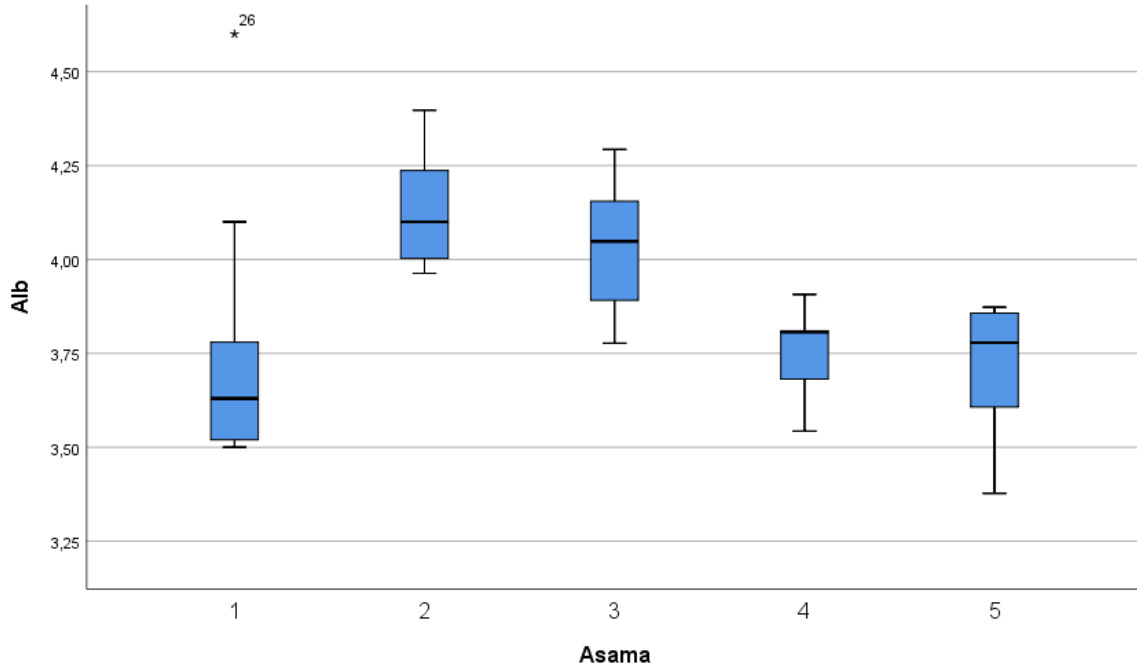
Aşağıda şekil 4.4’de OP grubundan hayvanların serum ALP düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.4. OP grubundan hayvanların serum ALP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum Alb düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum Alb düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 3,77 gr/dL, hastalık 1. aşamasında ortalama 4,14 gr/dL, hastalık 2. aşamasında 4,03 gr/dL, tedavi 1. aşamasında 3,75 gr/dL ve tedavi 2. aşamasında 3,71 gr/dL olarak ölçülmüştür.

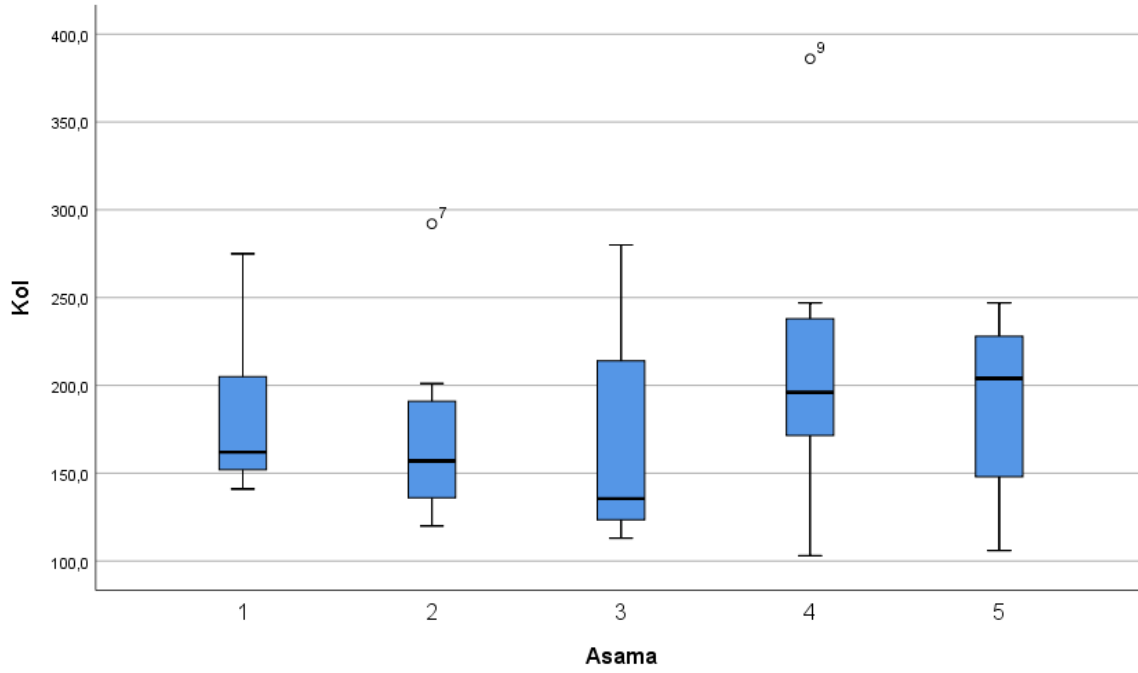
Aşağıda şekil 4.5’de OP grubundan hayvanların serum Alb düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. OP grubundan hayvanların serum Alb düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum Kol düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum Kol düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 183,78 mg/dL, hastalık 1. aşamasında ortalama 170,33 mg/dL, hastalık 2. aşamasında 167,36 mg/dL, tedavi 1. aşamasında 214,85 mg/dL ve tedavi 2. aşamasında 189,5 mg/dL olarak ölçülmüştür.

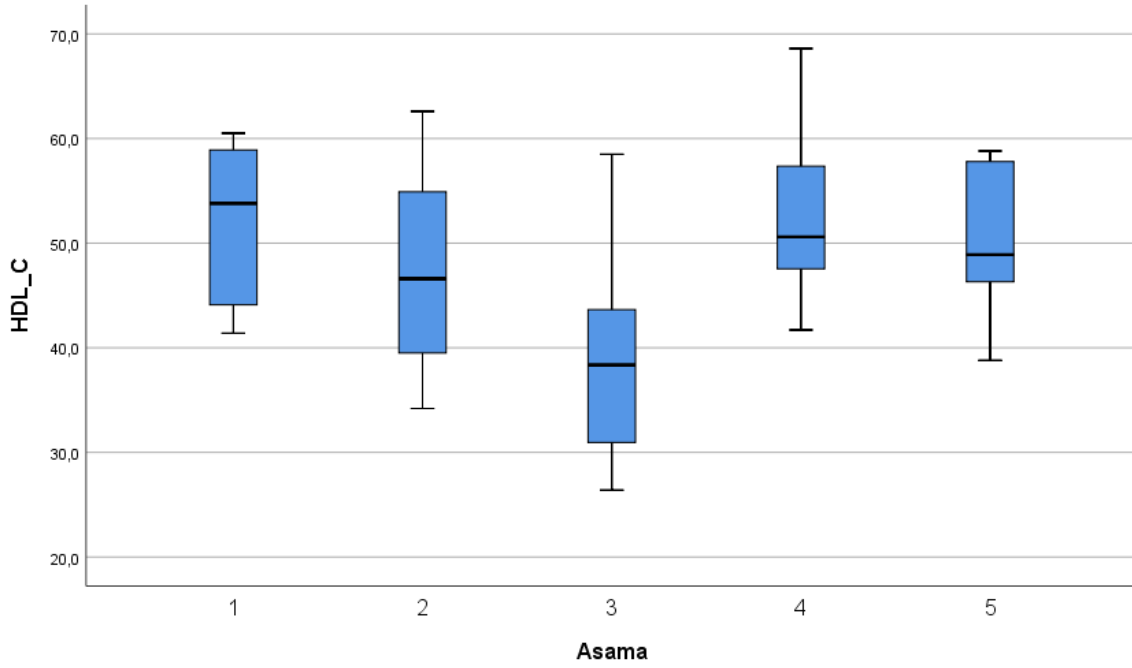
Aşağıda şekil 4.6’de OP grubundan hayvanların serum Kol düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.6. OP grubundan hayvanların serum Kol düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum HDL-C düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum HDL-C düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 51,66 mg/dL, hastalık 1. aşamasında ortalama 47,06 mg/dL, hastalık 2. aşamasında 38,85 mg/dL, tedavi 1. aşamasında 52,96 mg/dL ve tedavi 2. aşamasında 49,92 mg/dL olarak ölçülmüştür.

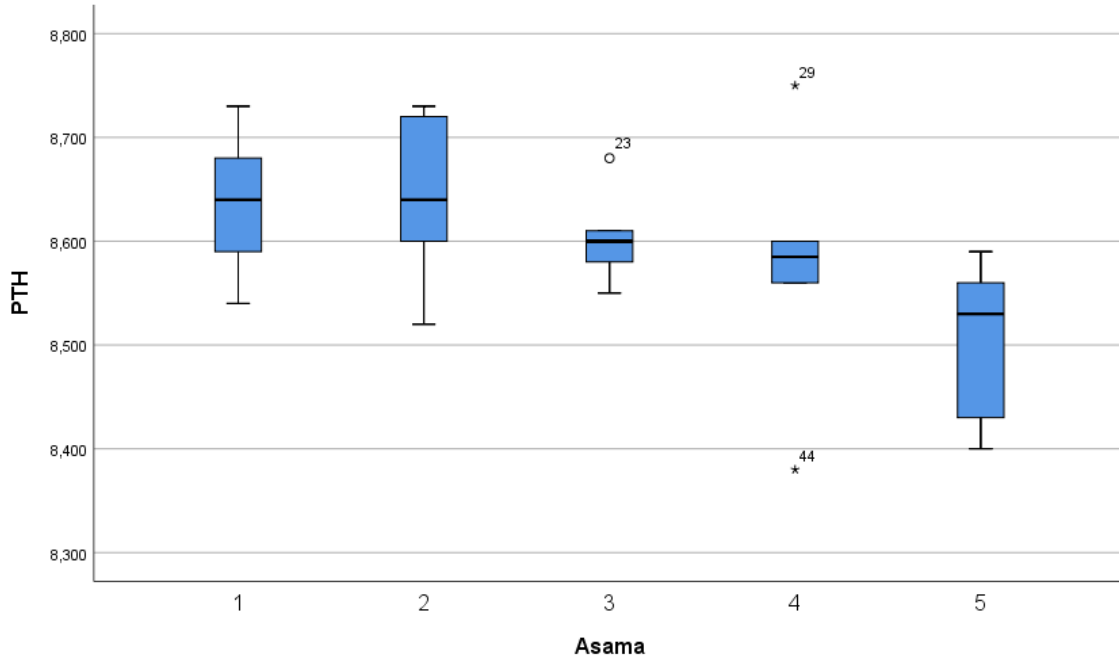
Aşağıda şekil 4.7’de OP grubundan hayvanların serum HDL-C düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.7. OP grubundan hayvanların serum HDL-C düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum PTH düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter DXI 800 ve kullanıma hazır kitler kullanılarak kemilüminesan yöntemle çalışılmıştır. Serum PTH düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 8,64 pg/mL, hastalık 1. aşamasında ortalama 8,65 pg/mL, hastalık 2. aşamasında 8,23 pg/mL, tedavi 1. aşamasında 8,48 pg/mL ve tedavi 2. aşamasında 8,51 pg/mL olarak ölçülmüştür.

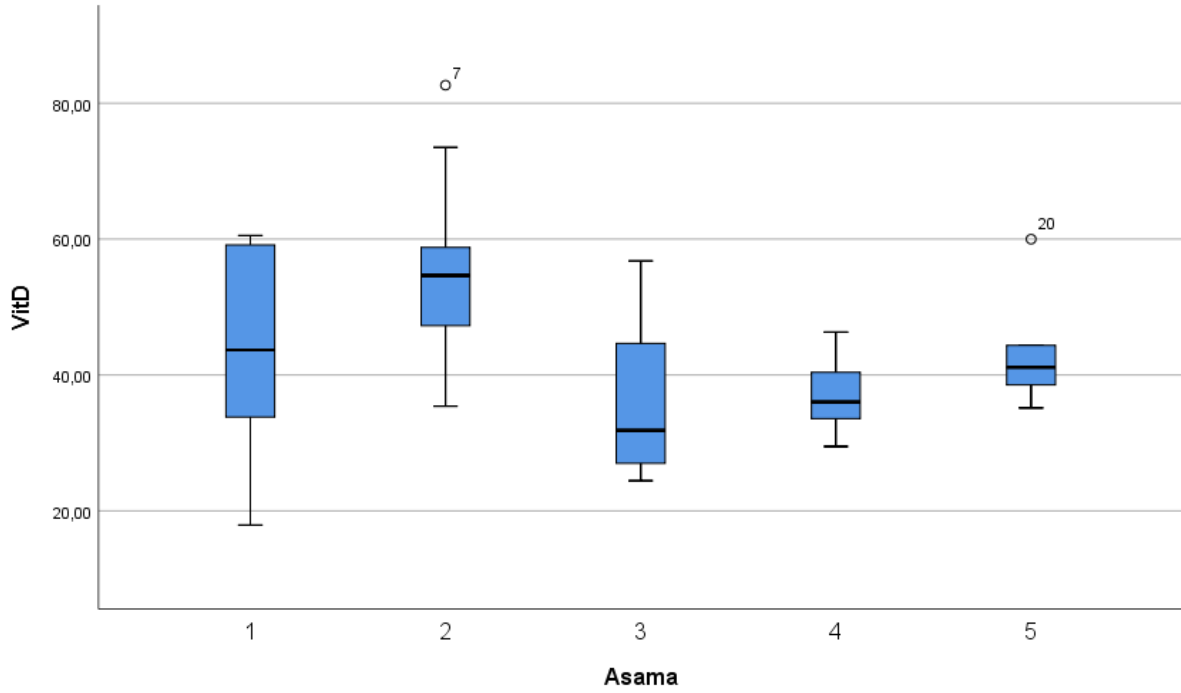
Aşağıda şekil 4.8’de OP grubundan hayvanların serum PTH düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.8. OP grubundan hayvanların serum PTH düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum Vit D düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter DXI 800 ve kullanıma hazır kitler kullanılarak kemilüminesan yöntemle çalışılmıştır. Serum Vit D düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 43,25 ng/mL, hastalık 1. aşamasında ortalama 55,4 ng/mL, hastalık 2. aşamasında 36,02 ng/mL, tedavi 1. aşamasında 35,42 ng/mL ve tedavi 2. aşamasında 43,37 ng/mL olarak ölçülmüştür.

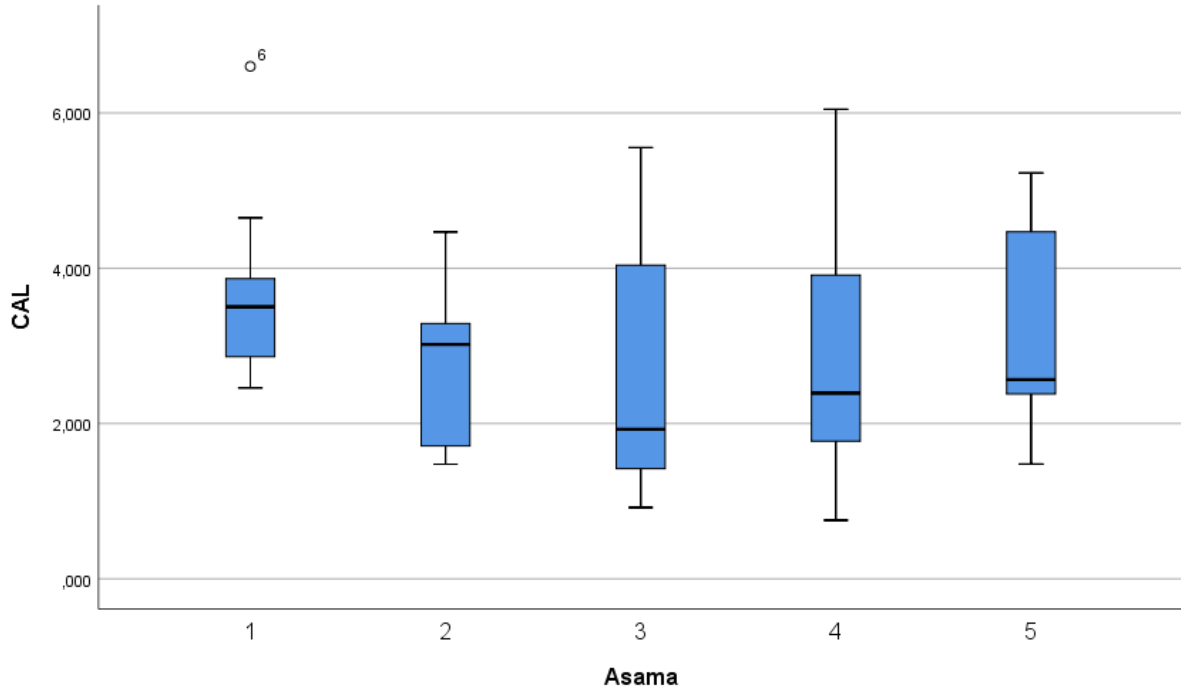
Aşağıda şekil 4.9’de OP grubundan hayvanların serum Vit D düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.9. OP grubundan hayvanların serum Vit D düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum CAL düzeyleri klinik kimya analizörü IMMULITE® 2000 XPi Immunoassay System, Siemens Healthineers ve kullanıma hazır kitler kullanılarak immunoassay yöntemle çalışılmıştır. Serum CAL düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 3,77 pg/mL, hastalık 1. aşamasında ortalama 2,87 pg/mL, hastalık 2. aşamasında 2,65 pg/mL, tedavi 1. aşamasında 2,94 pg/mL ve tedavi 2. aşamasında 3,11 pg/mL olarak ölçülmüştür.

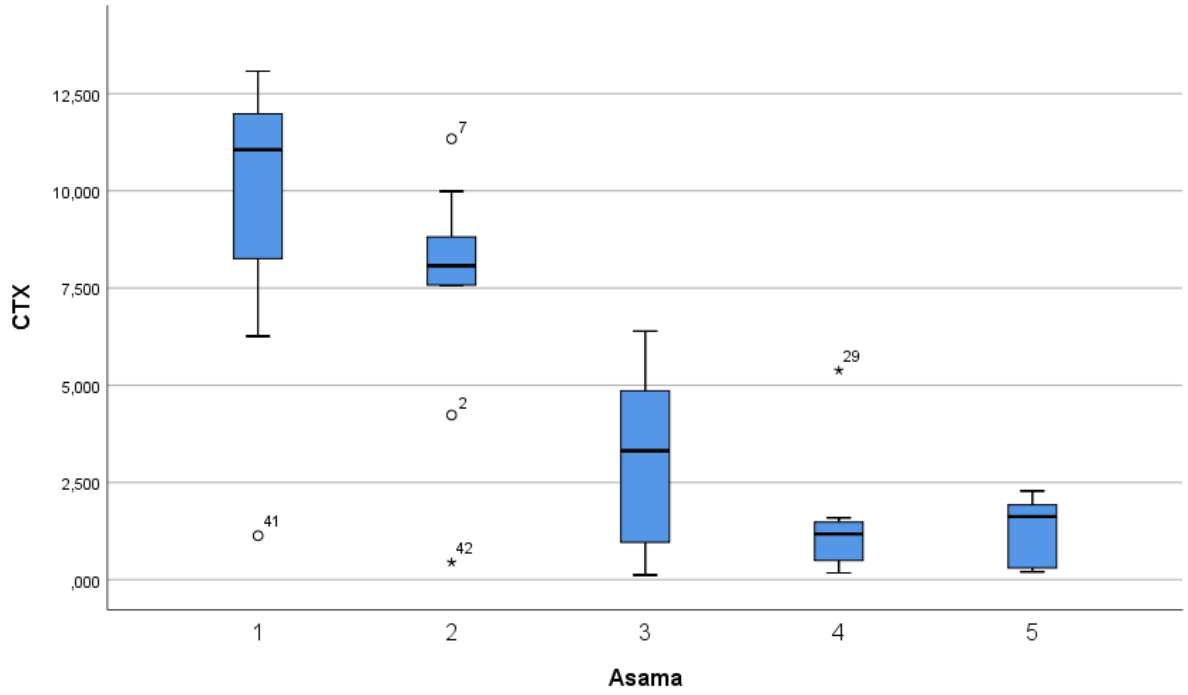
Aşağıda şekil 4.10’de OP grubundan hayvanların serum CAL düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.10. OP grubundan hayvanların serum CAL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum CTX düzeyleri klinik kimya analizörü Roche Hitachi Cobas 6000 Sistemi ve kullanıma hazır kitler kullanılarak ECL (Electro Chemi Luminescence) yöntemle çalışılmıştır. Serum CTX düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 9,49 pg/mL hastalık 1. aşamasında 7,46 pg/mL, hastalık 2. aşamasında 3,09 pg/mL, tedavi 1. aşamasında 1,52 pg/mL ve tedavi 2. aşamasında 1,32 pg/mL olarak ölçülmüştür.

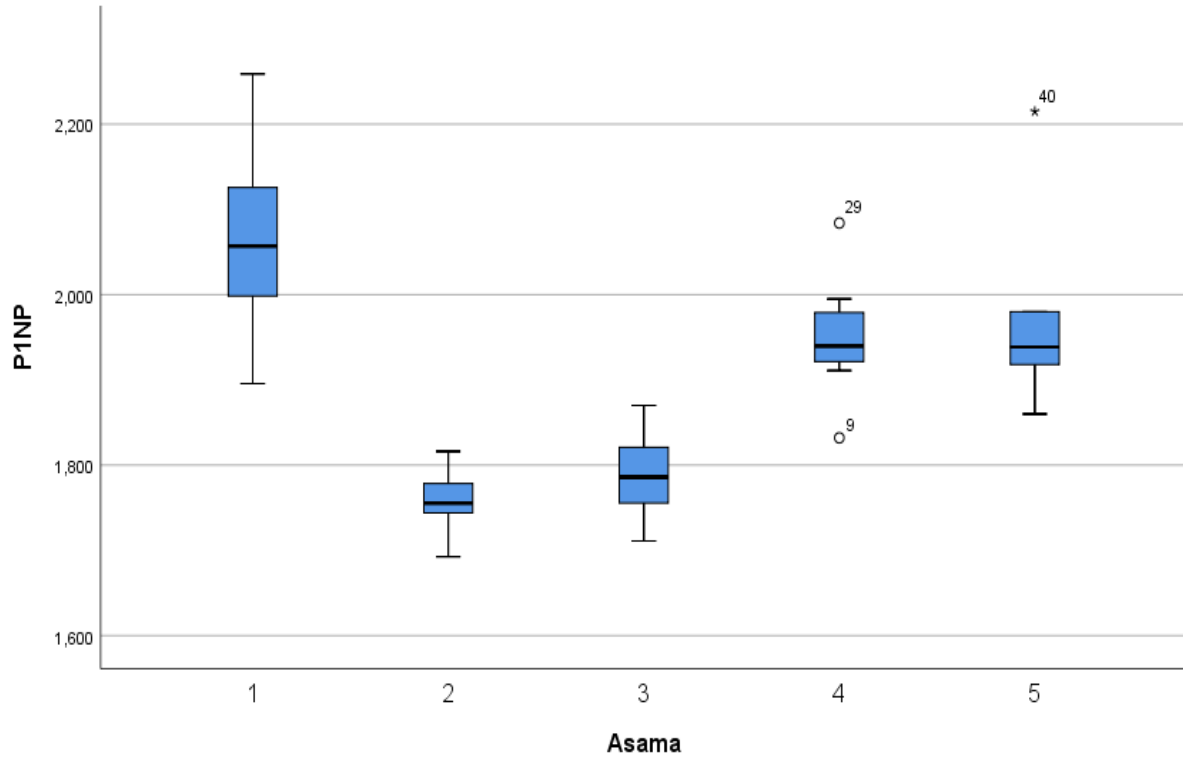
Aşağıda şekil 4.11’de OP grubundan hayvanların serum CTX düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.11. OP grubundan hayvanların serum CTX düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum P1NP düzeyleri klinik kimya analizörü Roche Hitachi Cobas 6000 Sistemi ve kullanıma hazır kitler kullanılarak ECL (Electro Chemi Luminescence) yöntemle çalışılmıştır. Serum P1NP düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 2,07 u/L hastalık 1. aşamasında 1,76 u/L, hastalık 2. aşamasında 1,79 u/L, tedavi 1. aşamasında 1,95 u/L ve tedavi 2. aşamasında 1,98 u/L olarak ölçülmüştür.

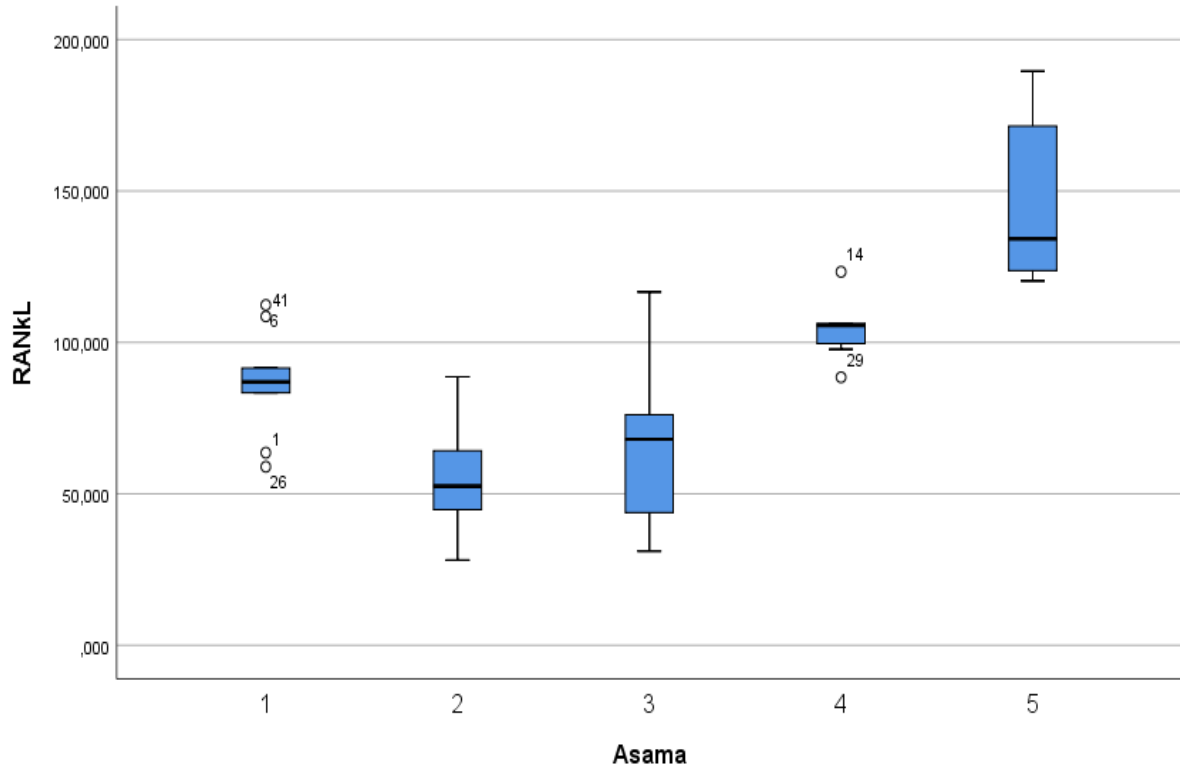
Aşağıda şekil 4.12’de OP grubundan hayvanların serum P1NP düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.12. OP grubundan hayvanların serum P1NP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum RANKL düzeyleri ELISA tekniği ile kullanıma hazır kitler kullanılarak çalışılmıştır. Serum RANKL düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 86,46 pg/mL, hastalık 1. aşamasında ortalama 54,15 pg/mL, hastalık 2. aşamasında 65,44 pg/mL, tedavi 1. aşamasında 104,14 pg/mL ve tedavi 2. aşamasında 145,58 pg/mL olarak ölçülmüştür.

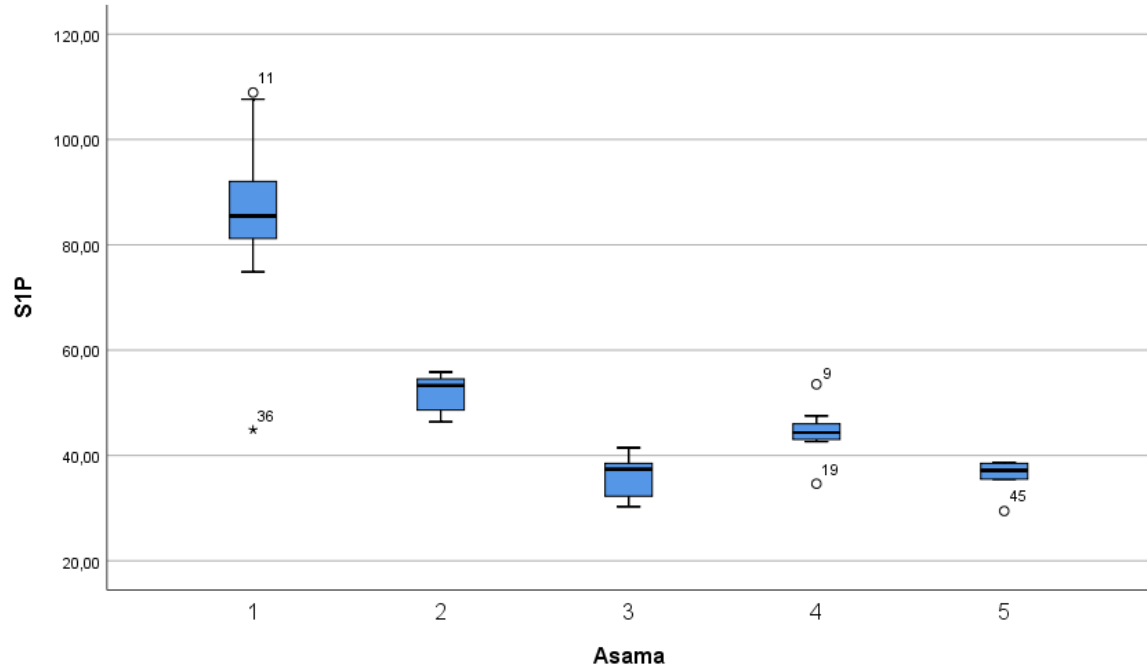
Aşağıda şekil 4.13’de OP grubundan hayvanların serum RANKL düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.13. OP grubundan hayvanların serum RANKL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

OP grubu Serum S1P düzeyleri LCMSMS yöntemi ile çalışılmıştır. Serum S1P düzeyleri OP grubu başlangıç aşamasında ortalama 85,50 ng/mL, hastalık 1. aşamasında ortalama 51,98 ng/mL, hastalık 2. aşamasında 36,01 ng/mL, tedavi 1. aşamasında 44,37 ng/mL ve tedavi 2. aşamasında 36,07 ng/mL olarak ölçülmüştür.

Aşağıda şekil 4.14’de OP grubundan hayvanların serum S1P düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.12. OP grubundan hayvanların serum S1P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1, 3: Hastalık-2, 4: Tedavi-1, 5: Tedavi-2)

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uygun olan sayısal verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında One-way ANOVA testi kullanılmıştır.

Varyansların homojenliği tablosunda p (anlamlılık) değeri 0,05'ten büyük olduğu için varyansların homojen olduğu kabul edilmiştir. Çizelge 4.8'da OP grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.8. OP grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri

OP Grubu		
	Anova p	Homojenite Varyans levene p
Ca	0,005	0,248
P	0,000	0,339
ALP	0,000	0,051
Alb	0,001	0,213
Kol	0,601	0,611
HDL_C	0,031	0,920
PTH	0,434	0,009
VitD	0,027	0,192
CAL	0,608	0,473
RANKL	0,000	0,129
S1P	0,000	0,013
CTX	0,000	0,131
P1NP	0,000	0,094

Anova; $p < 0,05$ olduğu için karşılaştırılan grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüş ve bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için çoklu karşılaştırma (Post-Hoc test) yapılmıştır. Varyanslar homojen dağıldığı için Post Hoc testlerinden Tukey HSD testi kullanılmıştır.

Tukey HSD Testi'ne göre OP grubu RANkL, S1P, CTX, P1NP sonuçları için Başlangıç, Hastalık ve Tedavi aşamaları arasında yapılan analiz sonuçları çizelge 4.9'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.9. OP grubuna ait analiz sonuçlarının Post Hoc testlerinden Tukey HSD değerleri

OP Grubu						
			RANkL	S1P	CTX	P1NP
Tukey HSD	1: Başlangıç	2: Hastalık-1	0,020	0,000	0,528	0,000
		3: Hastalık-2	0,261	0,000	0,000	0,000
		4: Tedavi-1	0,465	0,000	0,000	0,069
		5: Tedavi-2	0,000	0,000	0,000	0,258
	2: Hastalık-1	1: Başlangıç	0,020	0,000	0,528	0,000
		3: Hastalık-2	0,802	0,018	0,020	0,940
		4: Tedavi-1	0,000	0,561	0,001	0,001
		5: Tedavi-2	0,000	0,035	0,002	0,000
	3: Hastalık-2	1: Başlangıç	0,261	0,000	0,000	0,000
		2: Hastalık-1	0,802	0,018	0,020	0,940
		4: Tedavi-1	0,009	0,495	0,805	0,005
		5: Tedavi-2	0,000	1,000	0,758	0,002
	4: Tedavi-1	1: Başlangıç	0,465	0,000	0,000	0,069
		2: Hastalık-1	0,000	0,561	0,001	0,001
		3: Hastalık-2	0,009	0,495	0,805	0,005
		5: Tedavi-2	0,010	0,572	1,000	0,985
	5: Tedavi-2	1: Başlangıç	0,000	0,000	0,000	0,258
		2: Hastalık-1	0,000	0,035	0,002	0,000
		3: Hastalık-2	0,000	1,000	0,758	0,002
		4: Tedavi-1	0,010	0,572	1,000	0,985

OP grubu Başlangıç, Hastalık ve Tedavi aşamaları bazında sonuçlar arasında ilişki olup olmadığı değerlendirmesi için Pearson Korelasyon Testi kullanılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

Analizler sonucu elde edilen Pearson korelasyon katsayısı ve p değerleri Çizelge 4.10' de verilmiştir.

Çizelge 4.10. OP grubuna ait analiz sonuçlarının Pearson korelasyon katsayısı ve p değerleri

OP Grubu Pearson korelasyon analizi							
Asama			RANkL	S1P	CTX	P1NP	
1: Başlangıç	RANkL	Pearson's r değeri	1				
		P değeri					
	S1P	Pearson's r değeri	0,284	1			
		P değeri	0,459				
	CTX	Pearson's r değeri	-0,141	0,466	1		
		P değeri	0,717	0,206			
	P1NP	Pearson's r değeri	0,426	0,353	-0,457	1	
		P değeri	0,253	0,352	0,216		
			RANkL	S1P	CTX	P1NP	
2: Hastalık-1	RANkL	Pearson's r değeri	1				
		P değeri					
	S1P	Pearson's r değeri	0,048	1			
		P değeri	0,903				
	CTX	Pearson's r değeri	0,021	-0,352	1		
		P değeri	0,958	0,353			
	P1NP	Pearson's r değeri	0,359	0,025	0,015	1	
		P değeri	0,342	0,949	0,969		
			RANkL	S1P	CTX	P1NP	
3: Hastalık-2	RANkL	Pearson's r değeri	1				
		P değeri					
	S1P	Pearson's r değeri	-0,168	1			
		P değeri	0,690				
	CTX	Pearson's r değeri	-0,378	0,499	1		
		P değeri	0,355	0,208			
	P1NP	Pearson's r değeri	-0,355	0,368	-0,016	1	
		P değeri	0,388	0,370	0,970		
			RANkL	S1P	CTX	P1NP	
4: Tedavi-1	RANkL	Pearson's r değeri	1				
		P değeri					
	S1P	Pearson's r değeri	0,089	1			
		P değeri	0,850				
	CTX	Pearson's r değeri	-0,464	0,186	1		
		P değeri	0,294	0,689			
	P1NP	Pearson's r değeri	-0,491	-0,548	0,665	1	
		P değeri	0,263	0,203	0,103		
			RANkL	S1P	CTX	P1NP	
5: Tadavi-2	RANkL	Pearson's r değeri	1				
		P değeri					
	S1P	Pearson's r değeri	0,026	1			
		P değeri	0,961				
	CTX	Pearson's r değeri	0,276	0,489	1		
		P değeri	0,597	0,325			
	P1NP	Pearson's r değeri	-0,316	0,032	0,538	1	
		P değeri	0,542	0,951	0,271		

RA grubuna ait analizler sonunda elde edile veriler istatistiksel analiz ve yorum yapılabilmesi için Başlangıç, Hastalık, Tedavi-1 ve Tedavi-2 aşamaları şeklinde sınıflandırılmıştır. RA grubu serum Ca, P, ALP, Alb, Kol, HDL-C, Kalsitonin, PTH, Vit D, CTX, P1NP, RANKL ve S1P sonuçlarının gruplar arası dağılımını göstermek için normallik testi Shapiro-Wilk testi yapılmıştır. $p>0.05$ değeri elde edilmişse normal dağılım olarak kabul edilmiştir. RA grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri çizelge 4.11’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. RA grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri

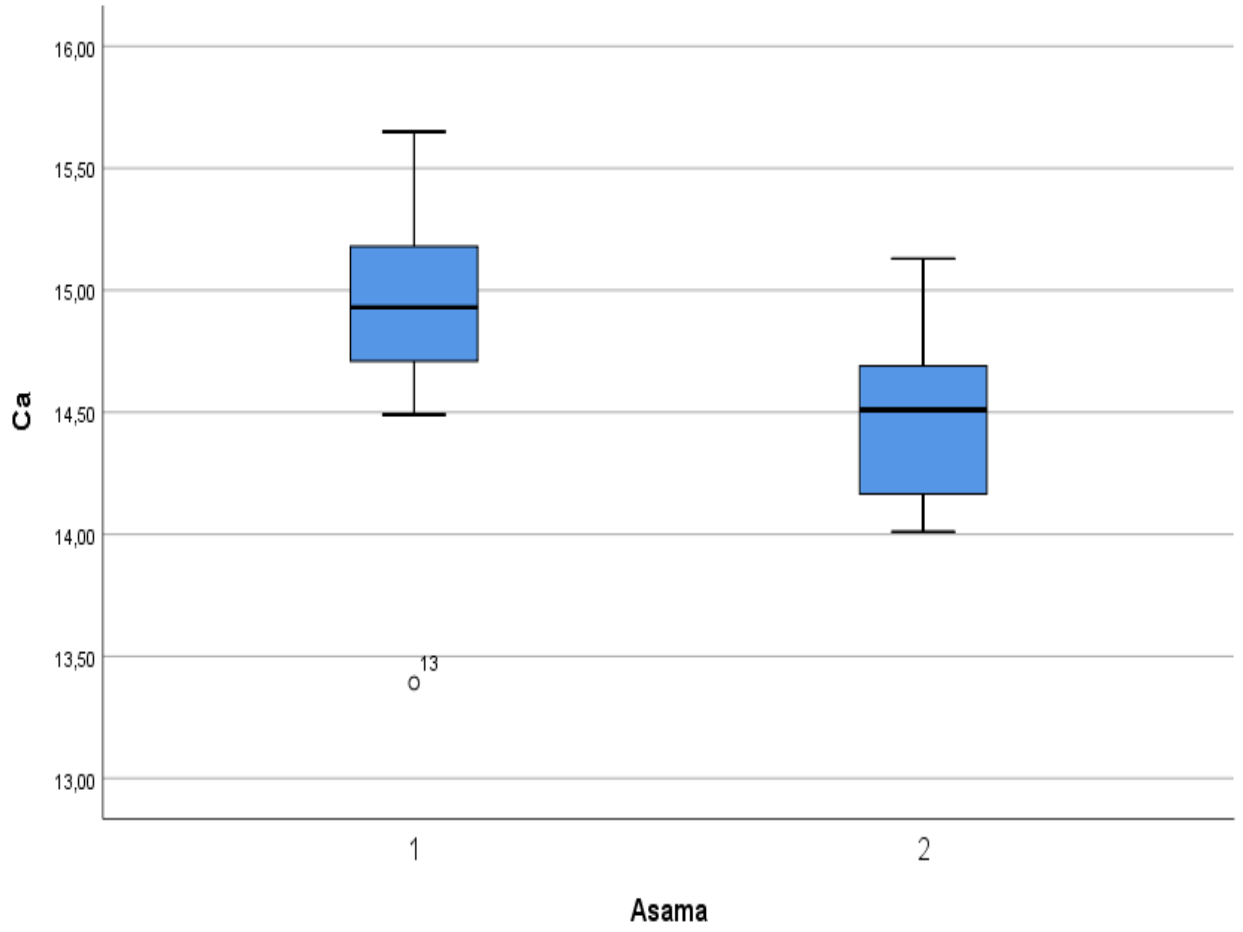
RA Grubu		Mean±Std.D	Std. Error	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk
Ca (mg/dL)	1: Başlangıç	14,86±0,66	0,221	13,39	15,65	0,252
	2: Hastalık-1	14,48±0,40	0,153	14,01	15,13	0,743
	Total	14,69±0,58	0,145	13,39	15,65	
P (mg/dL)	1: Başlangıç	6,55±0,70	0,235	5,04	7,4	0,319
	2: Hastalık-1	6,09±0,87	0,327	4,78	7,2	0,676
	Total	6,35±0,79	0,196	4,78	7,4	
ALP (u/L)	1: Başlangıç	83,22±38,95	12,983	37	148	0,215
	2: Hastalık-1	74,39±32,58	12,315	48	142	0,035
	Total	79,29±35,42	8,856	37	148	
Alb (gr/dL)	1: Başlangıç	3,82±0,32	0,106	3,26	4,19	0,276
	2: Hastalık-1	3,80±0,36	0,135	3,45	4,33	0,026
	Total	3,81±0,32	0,081	3,26	4,33	
Kol (mg/dL)	1: Başlangıç	213,17±112,78	37,593	49,5	347,4	0,285
	2: Hastalık-1	165,44±59,38	22,445	120	264,4	0,009
	Total	192,29±93,77	23,441	49,5	347,4	
HDL_C (mg/dL)	1: Başlangıç	56,16±20,29	6,763	27,5	83,3	0,547
	2: Hastalık-1	46,09±5,75	2,172	39	54,1	0,586
	Total	51,76±16,10	4,026	27,5	83,3	
PTH (pg/mL)	1: Başlangıç	8,67±0,09	0,031	8,53	8,842	0,985
	2: Hastalık-1	8,61±0,04	0,016	8,541	8,659	0,804
	Total	8,64±0,08	0,020	8,53	8,842	
VitD (ng/mL)	1: Başlangıç	31,12±7,96	2,652	16,74	39,95	0,254
	2: Hastalık-1	41,48±8,92	3,372	30,59	53,3	0,511
	Total	35,65±9,69	2,421	16,74	53,3	
CAL (pg/mL)	1: Başlangıç	0,82±0,71	0,238	0,071	1,911	0,116
	2: Hastalık-1	0,99±0,76	0,286	0,008	1,984	0,682
	Total	0,89±0,71	0,178	0,008	1,98	
RANKL (pg/mL)	1: Başlangıç	77,86±17,58	5,301	44,778	99,22	0,574
	2: Hastalık-1	89,54±20,20	6,734	57	126,63	0,889
	3: Tedavi-1	105,61±21,69	10,843	78,111	127	0,759
	4: Tedavi-2	104,91±14,65	7,327	91,444	118,94	0,106
	Total	89,41±20,99	3,966	44,778	127	

Çizelge 4.11. (devam) RA grubu analiz sonuçlarına göre genel tanımlayıcı istatistikleri ve p değerleri

RA Grubu						
		Mean±Std.D	Std. Error	Minimum	Maximum	Shapiro-Wilk
P1NP (Ug/L)	1: Başlangıç	1,96±0,17	0,051	1,667	2,156	0,136
	2: Hastalık-1	1,87±0,15	0,048	1,658	2,016	0,034
	3: Tedavi-1	1,65±0,02	0,010	1,636	1,671	0,068
	4: Tedavi-2	1,68±0,07	0,036	1,622	1,771	0,332
	Total	1,85±0,18	0,034	1,622	2,156	
S1P (ng/mL)	1: Başlangıç	55,32±17,15	5,173	32,94	81,30	0,351
	2: Hastalık-1	35,42±12,89	4,297	22,68	60,17	0,059
	3: Tedavi-1	25,14±5,25	2,627	20,78	32,73	0,268
	4: Tedavi-2	31,70±2,73	1,365	28,71	35,33	0,713
	Total	41,24±17,49	3,306	20,78	81,30	
CTX (pg/mL)	1: Başlangıç	7,49±2,07	0,624	3,863	10,50	0,546
	2: Hastalık-1	5,47±2,19	0,730	2,598	8,819	0,540
	3: Tedavi-1	6,73±1,90	0,948	4,995	9,201	0,605
	4: Tedavi-2	9,68±1,26	0,629	7,927	10,903	0,516
	Total	7,05±2,35	0,445	2,598	10,90	

RA grubu Serum Ca düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum Ca düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 14,86 mg/dL, hastalık aşamasında ortalama 14,48 mg/dL olarak ölçülmüştür.

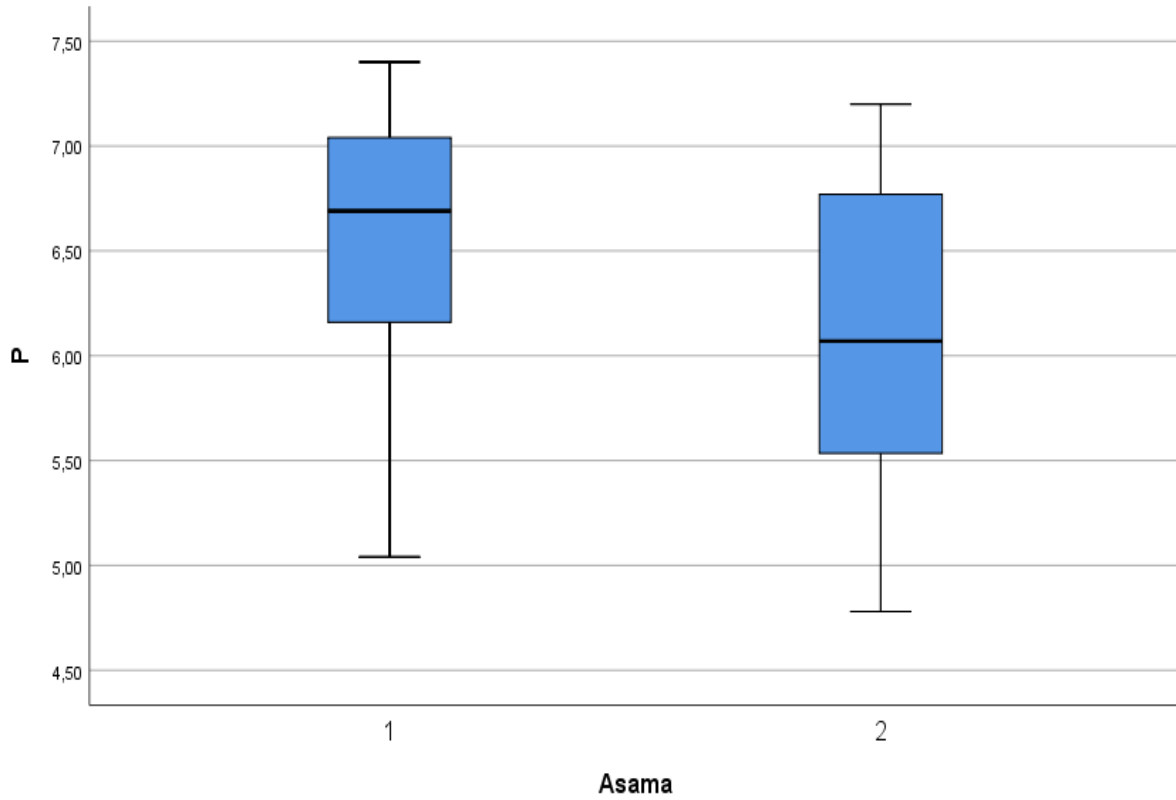
Aşağıda şekil 4.15’de RA grubundan hayvanların serum Ca düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.15. RA grubundan hayvanların serum Ca düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum P düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum P düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 6,55 mg/dL, hastalık aşamasında ortalama 6,09 mg/dL olarak ölçülmüştür.

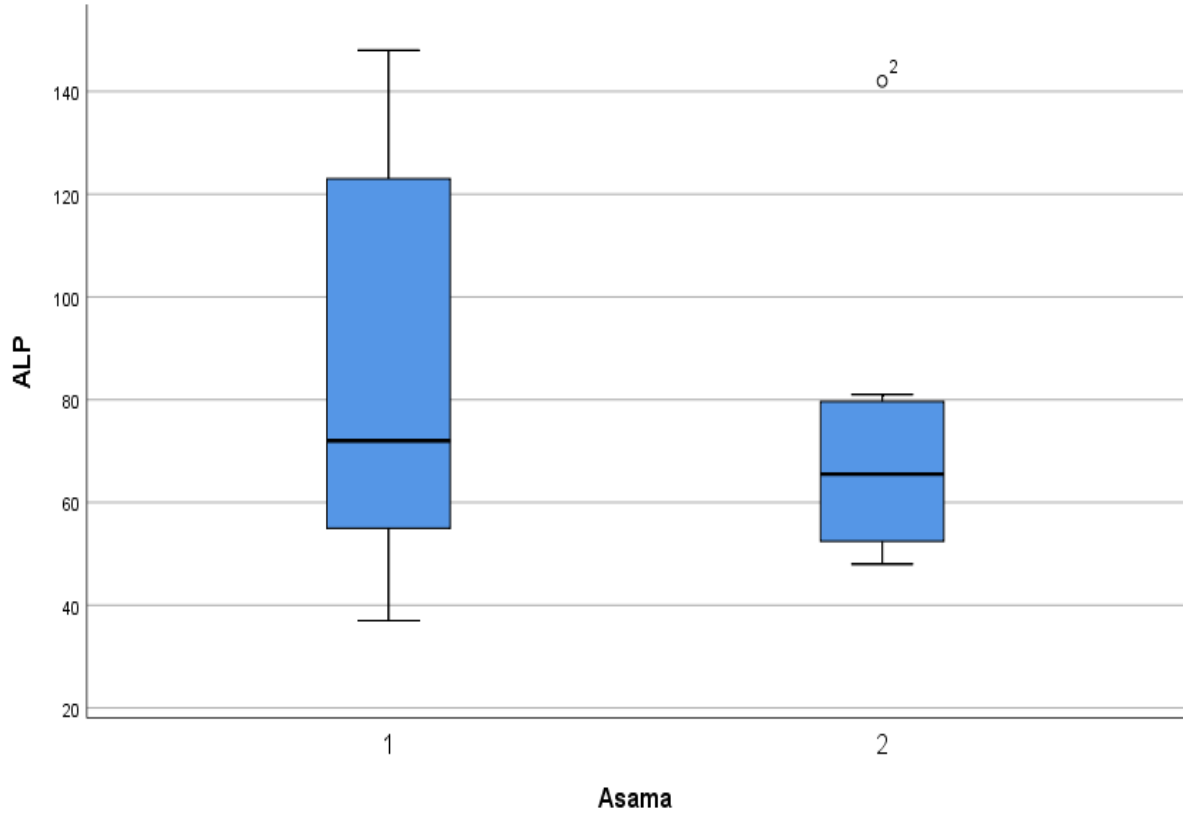
Aşağıda şekil 4.16’de RA grubundan hayvanların serum P düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.16. RA grubundan hayvanların serum P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum ALP düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum ALP düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 83,22 U/L, hastalık aşamasında ortalama 74,39 U/L olarak ölçülmüştür.

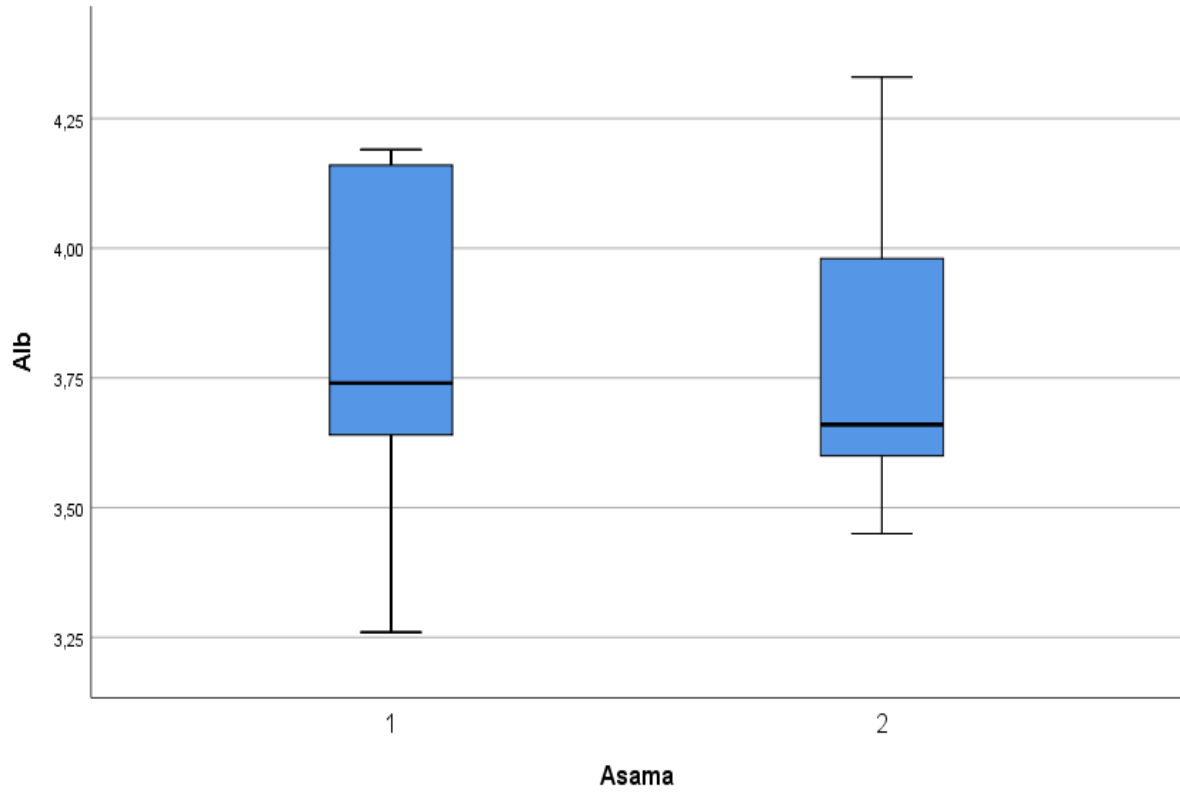
Aşağıda şekil 4.17’de RA grubundan hayvanların serum ALP düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.17. RA grubundan hayvanların serum ALP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum Alb düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum Alb düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 3,82 gr/dL, hastalık aşamasında ortalama 3,80 gr/dL olarak ölçülmüştür.

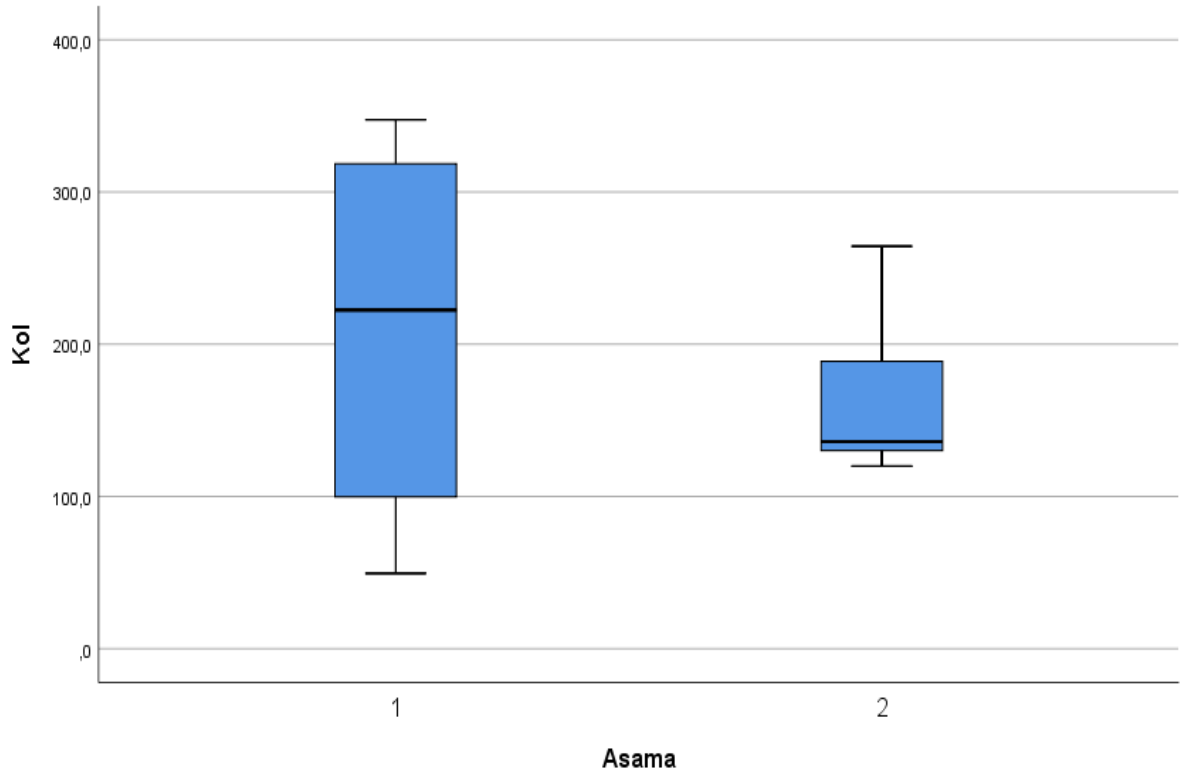
Aşağıda şekil 4.18’de RA grubundan hayvanların serum Alb düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.18. RA grubundan hayvanların serum Alb düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum Kol düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum Kol düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 231,17 mg/dL, hastalık aşamasında ortalama 165,44 mg/dL olarak ölçülmüştür.

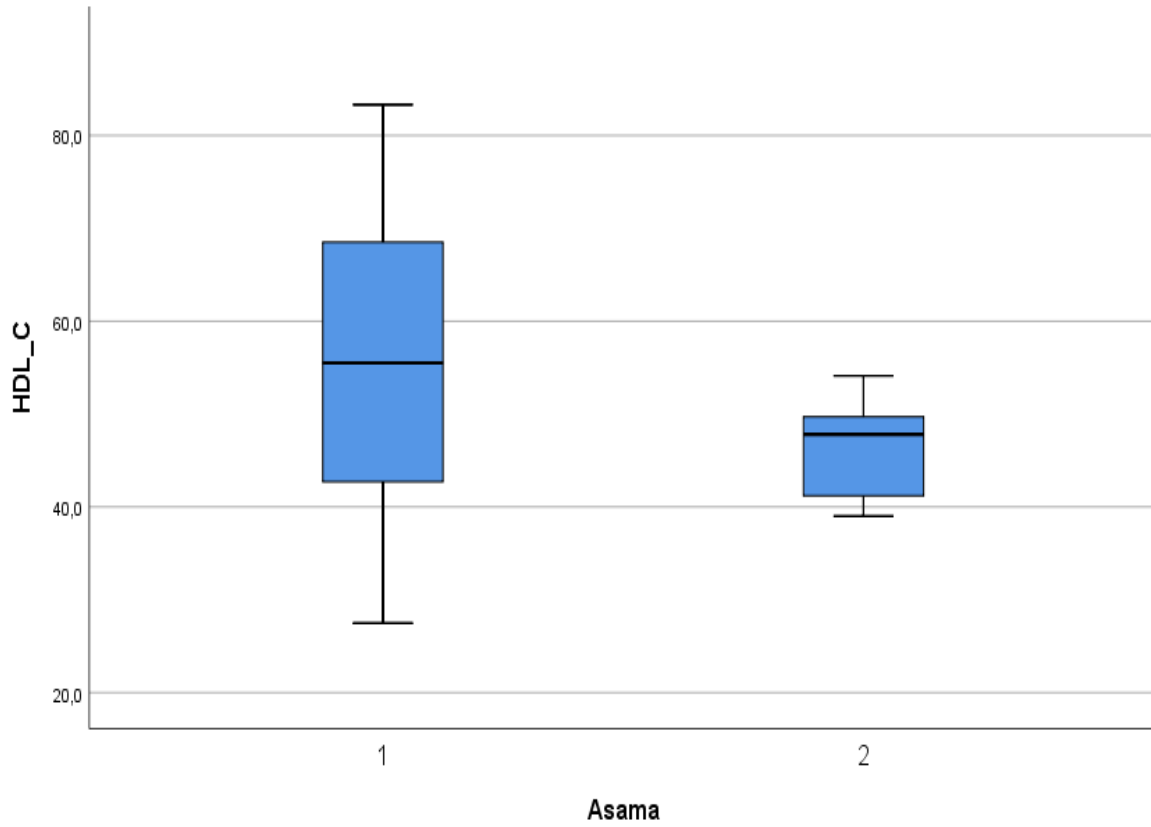
Aşağıda şekil 4.19’de RA grubundan hayvanların serum Kol düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.19. RA grubundan hayvanların serum Kol düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum HDL-C düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter AU5800 Biyokimya Analizörü ve kullanıma hazır kitler kullanılarak fotometrik yöntemle çalışılmıştır. Serum HDL-C düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 56,16 mg/dL, hastalık aşamasında ortalama 46,09 mg/dL olarak ölçülmüştür.

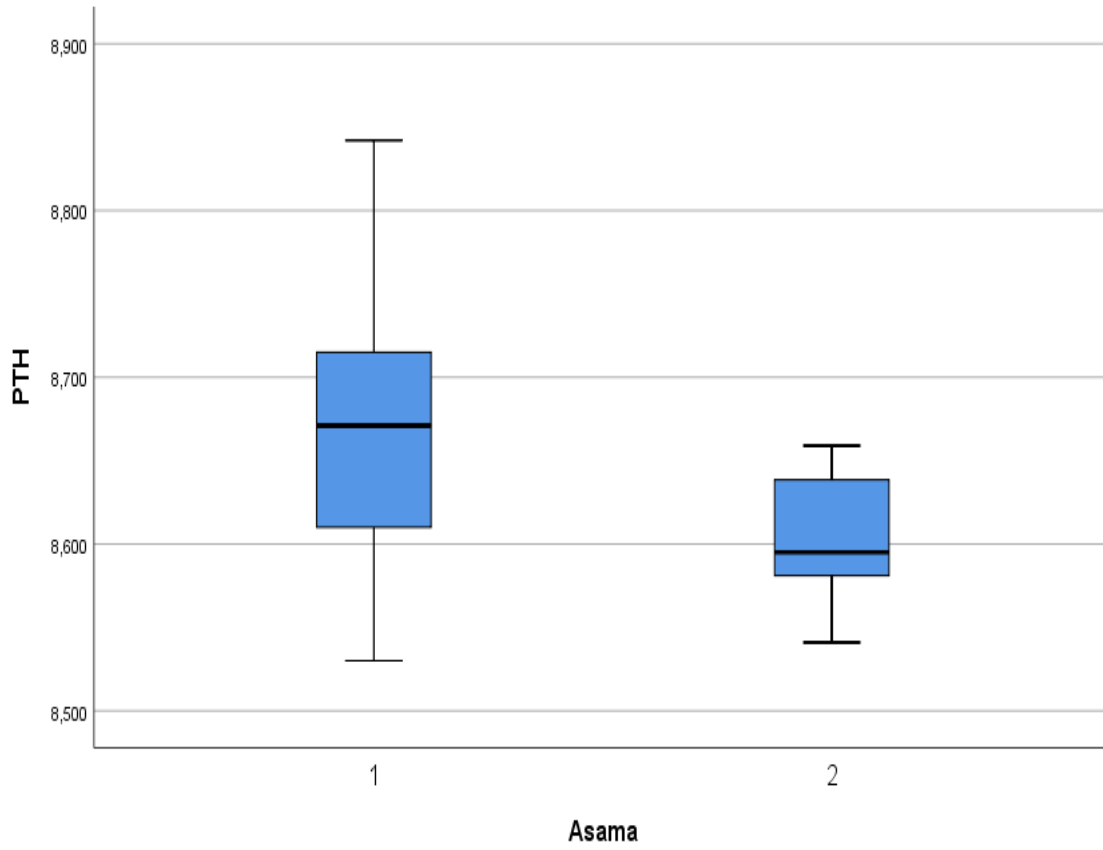
Aşağıda şekil 4.20’de RA grubundan hayvanların serum HDL-C düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.20. RA grubundan hayvanların serum HDL-C düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum PTH düzeyleri düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter DXI 800 ve kullanıma hazır kitler kullanılarak kemilüminesan yöntemle çalışılmıştır. Serum PTH düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 8,67 pg/mL, hastalık aşamasında ortalama 8,61 pg/mL olarak ölçülmüştür.

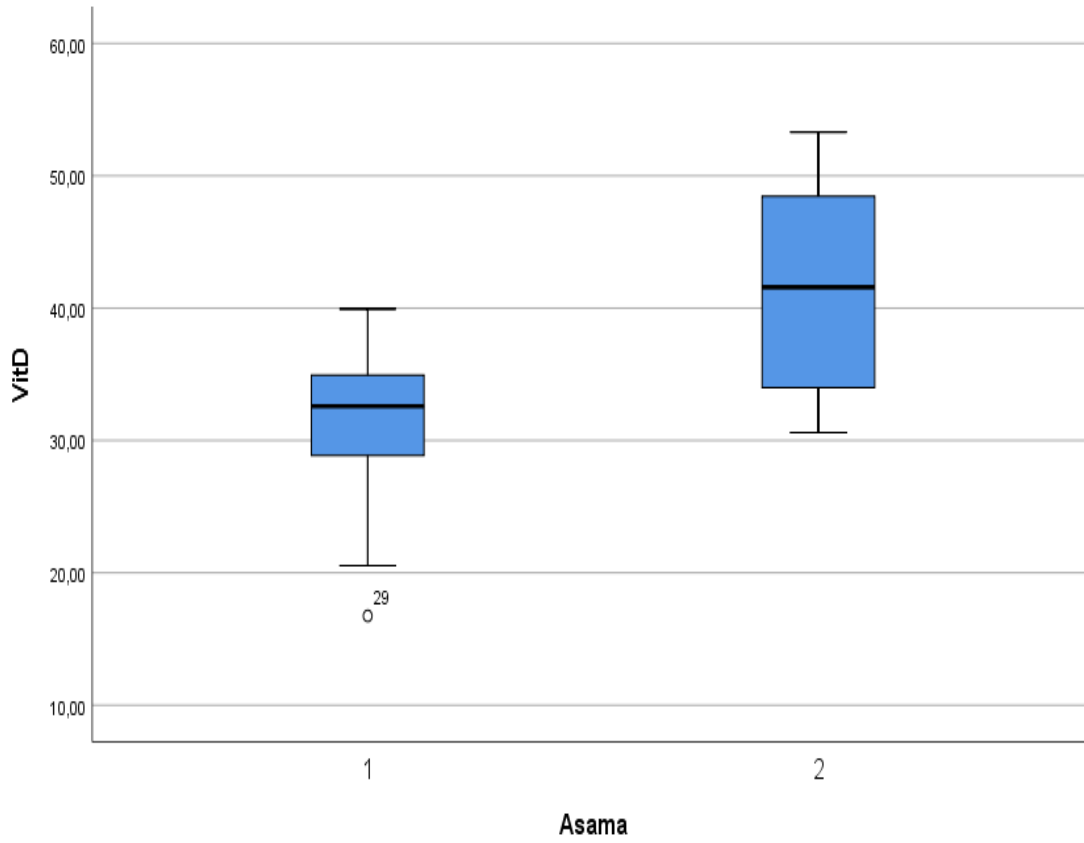
Aşağıda şekil 4.21’de RA grubundan hayvanların serum PTH düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.21. RA grubundan hayvanların serum PTH düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum Vit D düzeyleri düzeyleri klinik kimya analizörü Beckman Coulter DXI 800 ve kullanıma hazır kitler kullanılarak kemilüminesan yöntemle çalışılmıştır. Serum Vit D düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 31,12 ng/mL, hastalık aşamasında ortalama 41,48 ng/mL olarak ölçülmüştür.

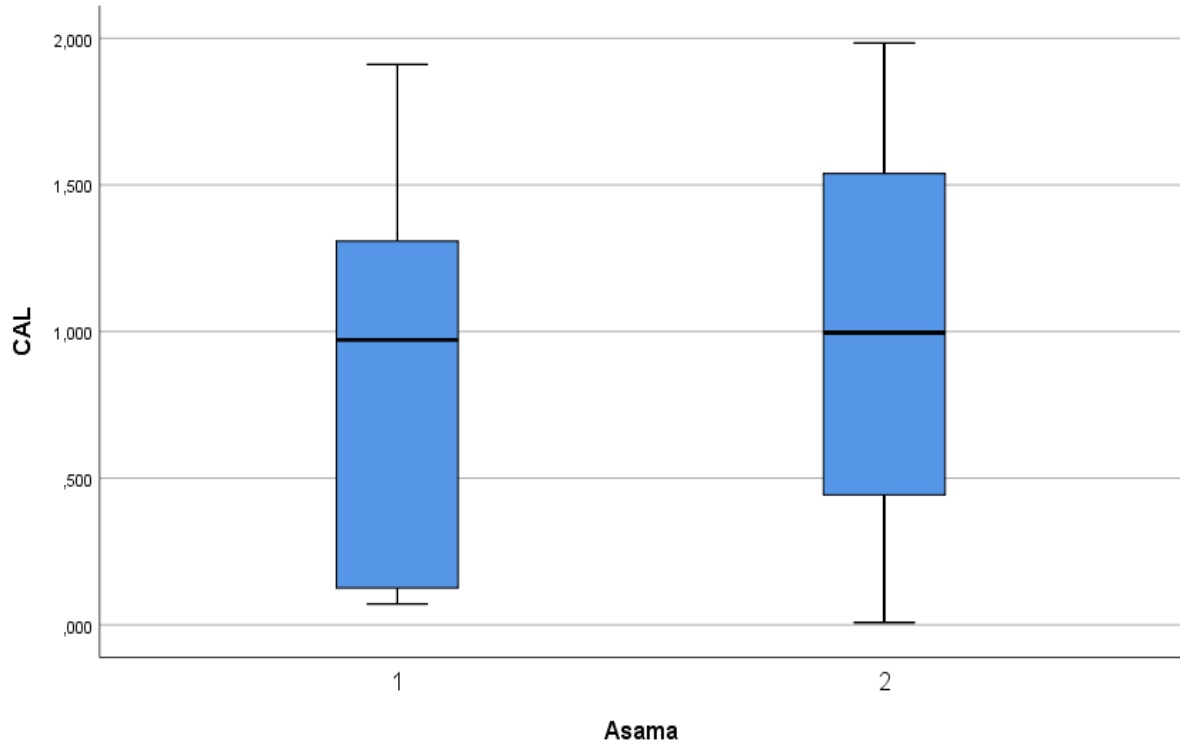
Aşağıda şekil 4.22’da RA grubundan hayvanların serum Vit D düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.22. RA grubundan hayvanların serum Vit D düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum CAL düzeyleri düzeyleri klinik kimya analizörü IMMULITE® 2000 XPi Immunoassay System, Siemens Healthineers ve kullanıma hazır kitler kullanılarak immunoassay yöntemle çalışılmıştır. Serum CAL düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 0,82 pg/mL, hastalık aşamasında ortalama 0,99 pg/mL olarak ölçülmüştür.

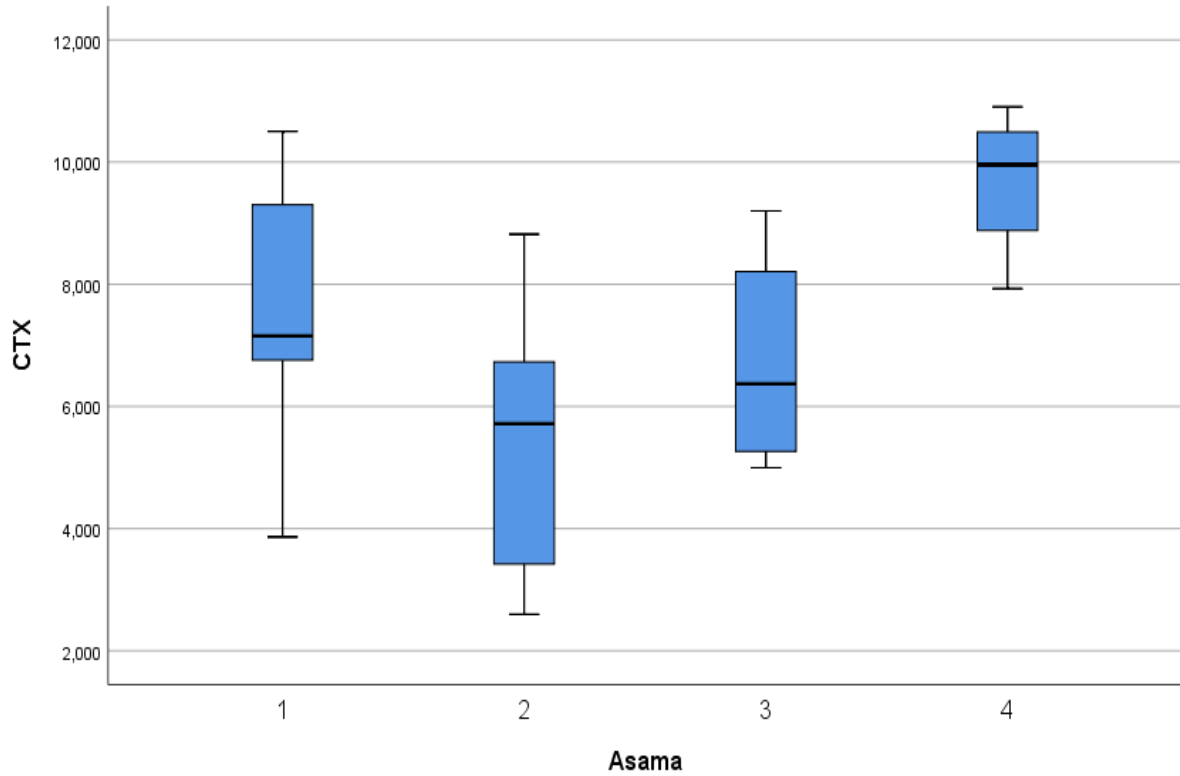
Aşağıda şekil 4.23’de RA grubundan hayvanların serum CAL düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.23. RA grubundan hayvanların serum CAL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık-1)

RA grubu Serum CTX düzeyleri klinik kimya analizörü Roche Hitachi Cobas 6000 Sistemi ve kullanıma hazır kitler kullanılarak ECL (Electro Chemi Luminescence) yöntemle çalışılmıştır. Serum CTX RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 7,49 pg/mL, hastalık aşamasında ortalama 5,47 pg/mL, tedavi 1. aşamasında 6,73 pg/mL ve tedavi 2. aşamasında 9,68 pg/mL olarak ölçülmüştür.

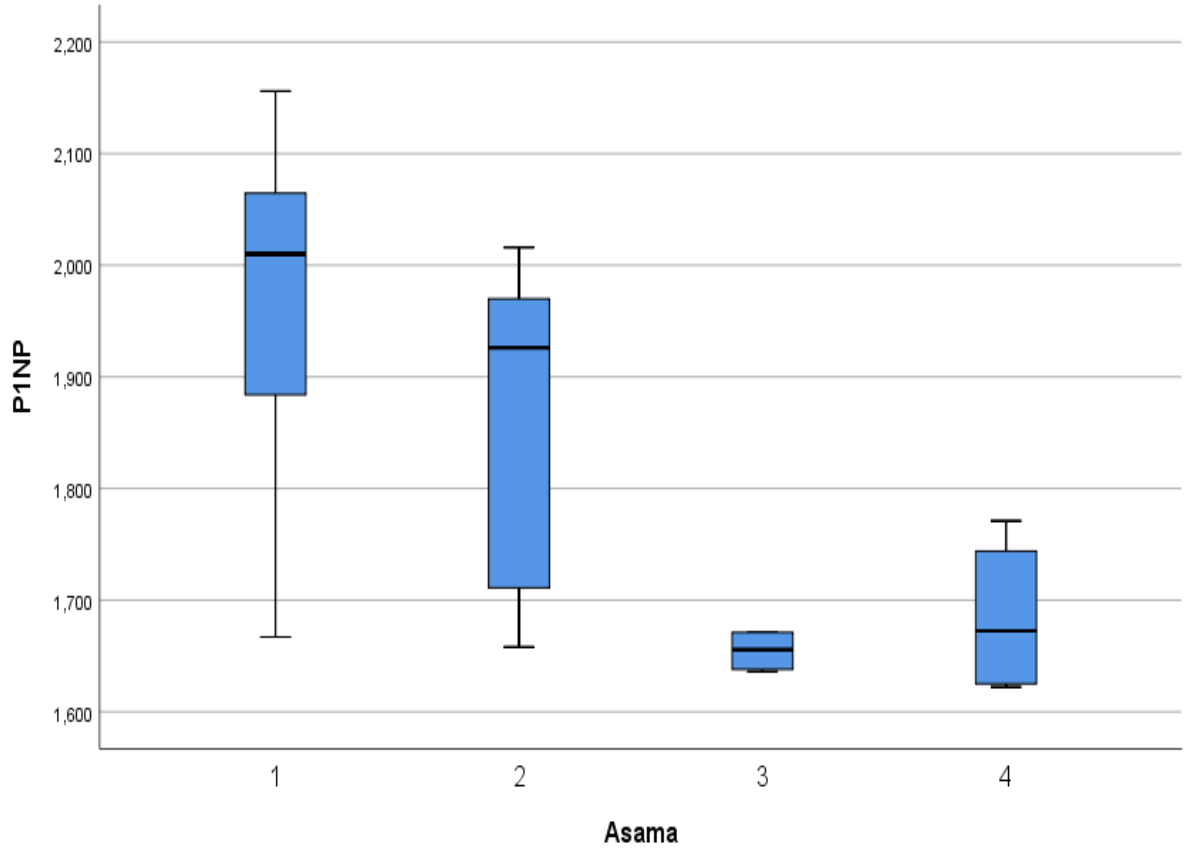
Aşağıda şekil 4.24’de RA grubundan hayvanların serum CTX düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.24. RA grubundan hayvanların serum CTX düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)

RA grubu Serum P1NP düzeyleri klinik kimya analizörü Roche Hitachi Cobas 6000 Sistemi ve kullanıma hazır kitler kullanılarak ECL (Electro Chemi Luminescence) yöntemle çalışılmıştır. Serum P1NP düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 1,96 u/L, hastalık aşamasında 1,87 u/L, tedavi 1. aşamasında 1,65 u/L ve tedavi 2. aşamasında 1,68 u/L olarak ölçülmüştür.

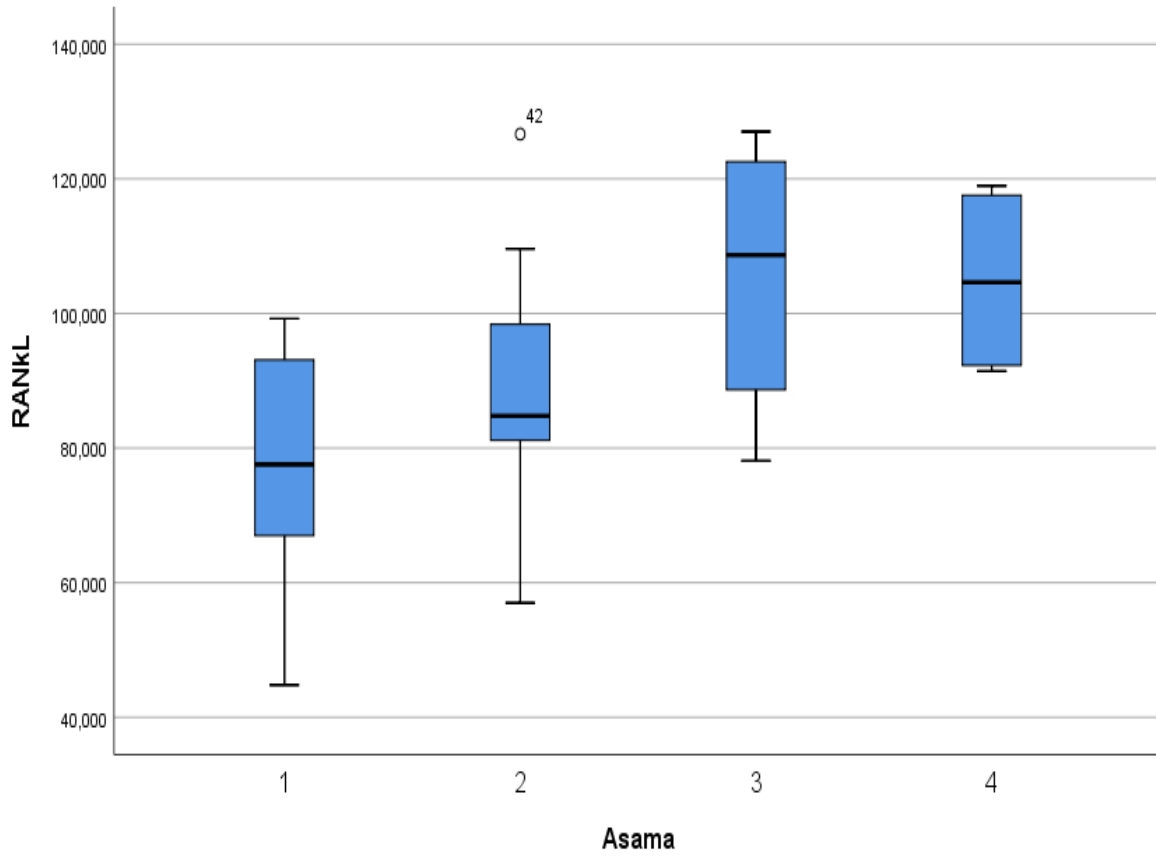
Aşağıda şekil 4.25’de RA grubundan hayvanların serum P1NP düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.25. RA grubundan hayvanların serum P1NP düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)

RA grubu Serum RANkL düzeyleri ELISA tekniği ile kullanıma hazır kitler kullanılarak çalışılmıştır. Serum RANkL düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 77,86 pg/mL, hastalık aşamasında ortalama 89,54 pg/mL, tedavi 1. aşamasında 105,61 pg/mL ve tedavi 2. aşamasında 104,91 pg/mL olarak ölçülmüştür.

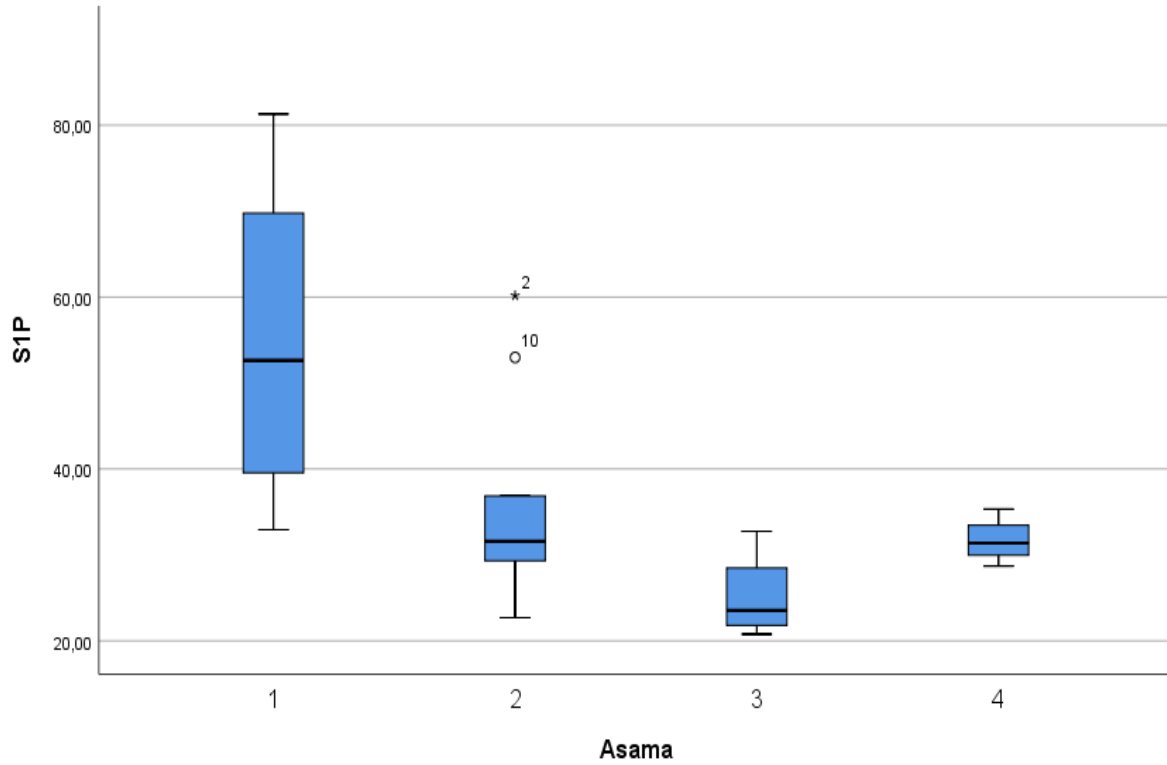
Aşağıda şekil 4.26’de RA grubundan hayvanların serum RANkL düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.26. RA grubundan hayvanların serum RANKL düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)

RA grubu Serum S1P düzeyleri LCMSMS yöntemi ile çalışılmıştır. Serum S1P düzeyleri RA grubu başlangıç aşamasında ortalama 55,32 ng/mL, hastalık aşamasında ortalama 35,42 ng/mL, tedavi 1. aşamasında 25,14 ng/mL ve tedavi 2. aşamasında 31,70 ng/mL olarak ölçülmüştür.

Aşağıda şekil 4.27’de RA grubundan hayvanların serum S1P düzeyleri gösterilmiştir.



Şekil 4.27. RA grubundan hayvanların serum S1P düzeyleri (1: Başlangıç, 2: Hastalık, 3: Tedavi-1, 4: Tedavi-2)

Gruplara ait verilerin normal dağılıma uyup uymadıkları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılıma uygun olan sayısal verilerin gruplar arası karşılaştırmalarında One-way ANOVA testi kullanılmıştır.

Varyansların homojenliği tablosunda p (anlamlılık) değeri 0,05'ten büyük olduğu için varyansların homojen olduğu kabul edilmiştir. Çizelge 4.12'da RA grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.12. RA grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri.

RA Grubu		
	Anova p	Homojenite Varyans levene p
Ca	0,205	0,447
P	0,267	0,414
ALP	0,631	0,329
Alb	0,902	0,713
Kol	0,329	0,117
HDL_C	0,227	0,032
PTH	0,113	0,133
VitD	0,028	0,553

Çizelge 4.12. (devam) RA grubuna ait analiz sonuçlarının Homojenite Varyans ve Anova değerleri.

RA Grubu		
	Anova p	Homojenite Varyans levene p
CAL	0,654	0,861
RANkL	0,037	0,942
S1P	0,001	0,015
CTX	0,014	0,668
P1NP	0,002	0,031

Anova analizinde $p < 0,05$ olduğu, karşılaştırılan grupların ortalamaları arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüş ve bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için çoklu karşılaştırma (Post-Hoc test) yapılmıştır. Varyanslar homojen dağıldığı için Post Hoc testlerinden Tukey HSD testi kullanılmıştır.

Tukey HSD Testi'ne göre RA grubu RANkL, S1P, CTX, P1NP sonuçları için Başlangıç, Hastalık ve Tedavi aşamaları arasında yapılan analiz sonuçları çizelge 4.13.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. RA grubuna ait analiz sonuçlarının Post Hoc testlerinden Tukey HSD değerleri

RA Grubu						
			RANkL	S1P	CTX	P1NP
Tukey HSD	1: Başlangıç	2: Hastalık	0,527	0,016	0,142	0,482
		3: Tedavi-1	0,079	0,004	0,917	0,005
		4: Tedavi-2	0,090	0,030	0,266	0,013
	2: Hastalık	1: Başlangıç	0,527	0,016	0,142	0,482
		3: Tedavi-1	0,489	0,593	0,725	0,078
		4: Tedavi-2	0,525	0,967	0,010	0,155
	3: Tedavi-1	1: Başlangıç	0,079	0,004	0,917	0,005
		2: Hastalık	0,489	0,593	0,725	0,078
		4: Tedavi-2	1,000	0,901	0,189	0,990
	4: Tedavi-2	1: Başlangıç	0,090	0,030	0,266	0,013
		2: Hastalık	0,525	0,967	0,010	0,155
		3: Tedavi-1	1,000	0,901	0,189	0,990

RA grubu Başlangıç, Hastalık ve Tedavi aşamaları bazında sonuçlar arasında ilişki olup olmadığı değerlendirmesi için Pearson Korelasyon Testi kullanılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

Analizler sonucu elde edilen Pearson korelasyon katsayısı ve p değerleri Çizelge 4.14’ de verilmiştir.

Çizelge 4.14. RA grubuna ait analiz sonuçlarının Pearson korelasyon katsayısı ve p değerleri

RA Grubu Pearson korelasyon analizi						
Aşama			RANKL	S1P	CTX	P1NP
1: Başlangıç	RANKL	Pearson’s r değeri	1			
		P değeri				
	S1P	Pearson’s r değeri	-0,085	1		
		P değeri	0,803			
	CTX	Pearson’s r değeri	0,419	-0,294	1	
		P değeri	0,200	0,380		
	P1NP	Pearson’s r değeri	-0,396	0,331	-0,426	1
		P değeri	0,228	0,321	0,191	
			RANKL	S1P	CTX	P1NP
2: Hastalık	RANKL	Pearson’s r değeri	1			
		P değeri				
	S1P	Pearson’s r değeri	-0,532	1		
		P değeri	0,140			
	CTX	Pearson’s r değeri	0,635	-0,134	1	
		P değeri	0,066	0,730		
	P1NP	Pearson’s r değeri	-0,308	-0,381	-0,653	1
		P değeri	0,420	0,311	0,057	
			RANKL	S1P	CTX	P1NP
3: Tedavi-1	RANKL	Pearson’s r değeri	1			
		P değeri				
	S1P	Pearson’s r değeri	-0,174	1		
		P değeri	0,826			
	CTX	Pearson’s r değeri	0,404	-0,068	1	
		P değeri	0,596	0,932		
	P1NP	Pearson’s r değeri	-0,885	0,601	-0,450	1
		P değeri	0,115	0,399	0,550	
			RANKL	S1P	CTX	P1NP
4: Tadavi-2	RANKL	Pearson’s r değeri	1			
		P değeri				
	S1P	Pearson’s r değeri	0,055	1		
		P değeri	0,945			
	CTX	Pearson’s r değeri	0,628	0,390	1	
		P değeri	0,372	0,610		
	P1NP	Pearson’s r değeri	0,923	0,432	0,678	1
		P değeri	0,077	0,568	0,322	

Çalışmamızda elde ettiğimiz tüm veriler toplu bir şekilde çizelge 4.15’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.15. OP, RA ve K gruplarına ait tüm sonuçların toplu bir şekilde gösterimi

		Ca	P	ALP	Alb	Kol	HDL-C	PTH (pg/ml)	Kal (pg/ml)	Vit D (ng/ml)	RANKL pg/mL	S1P ng/mL	P1NP ug/L	CTX pg/mL
OP	Başlangıç	13,77	7,35	131,44	3,77	183,78	51,66	8,64	3,77	43,28	86,46	85,50	2,07	9,49
	Hastalık-1	14,69	6,81	135,71	4,14	170,33	47,06	8,65	2,87	55,40	54,15	51,98	1,76	7,46
	Hastalık-2	13,90	6,05	92,45	4,03	167,36	38,85	8,23	2,65	36,03	65,44	36,01	1,79	3,09
	Tedavi-1	14,71	6,84	93,53	3,75	214,85	52,96	8,48	2,94	37,11	104,14	44,37	1,95	1,52
	Tedavi-2	14,32	5,69	61,78	3,71	189,50	49,92	8,51	3,11	43,38	145,58	36,07	1,98	1,32
K	Ortalama	14,74	6,09	147,17	4,06	157,02	47,66	8,69	2,43	56,93	134,32	31,23	-	-
RA	Başlangıç	14,86	6,55	83,22	3,82	213,17	56,16	8,67	0,82	31,12	77,86	55,32	1,96	7,49
	Hastalık	14,48	6,09	74,39	3,80	165,44	46,09	8,61	0,99	41,48	89,54	35,42	1,87	5,47
	Tedavi-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	105,61	25,14	1,65	6,73
	Tedavi-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	104,91	31,70	1,68	9,68

5. TARTIŞMA

Kemik, yaşam boyu metabolik aktivitesini devam ettiren ve yıkım/yapım şeklinde dinamik özelliğe sahip bir endokrin doku olarak kabul edilmektedir. Kemik homeostazı, birçok organizma fonksiyonlarıyla yakından bağlantılı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçlerdeki bozukluklar, yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen ve hatta yaşamı tehdit eden kronik veya akut çok sayıda hastalıkla ilişkilidir.

Kemik doku ve ilgili hastalıkların tanı, prognoz ve tedavi yaklaşımlarını geliştirmek için yeni ve çok daha derin bir anlayışına ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır. Buna olan ihtiyaç sadece bu patolojilerin prevalansı ile değil, en azından sadece yaşlanan nüfus nedeniyle artmaktadır.

Şu anda, osteoporoz tanısı ve kırık riskinin değerlendirilmesi, çift enerjili X-ışını absorpsiyometrisi (DXA) ile kemik mineral yoğunluğunun (BMD) kantitatif analizine dayanmaktadır. Bununla birlikte, DXA ile kemik kütlesinin BMD değerlendirmesinin altın standart yöntemi, kemik gücü hakkında kısmen bilgi sağlar.

Osteoporoz (OP) tanı ve takibinde altın standart olarak DXA yöntemi kullanılmaktadır. Uyguladığımız deneysel modelimizde tavşanların hem femur hem vertebra DXA ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz veriler sonunda başlangıç BMD değerleri ile hastalık oluşum sonundaki BMD değerleri anlamlı bir şekilde azalma gösterirken tedavi sonrası BMD değerleri de yine anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Bu değerler aynı zamanda uyguladığımız deneysel modelin çalıştığının da bir göstergesi olmuştur.

Kemik metabolizmasının tespitleri için kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde enzimlerin, proteinlerin ve yan ürünlerin biyobelirteçleri incelenmiştir. Kemik oluşumu ve kemik rezorpsiyonu hızının spesifik ve hassas bir şekilde değerlendirilmesi için artık çeşitli biyobelirteçler mevcuttur. Bu biyobelirteçler, DXA'nın BMD ölçümü tanı koymak için yeterli bilgi sunmadığında osteoporozun erken değerlendirmesini sağlamak için faydalıdır.

Kemik döngüsü belirteçleri (BTM), kemik döngüsünü incelemek için bize noninvaziv bir yaklaşım sağlar.

Osteoporozda hastalığın oluşum ve tedavi süresinin çok uzun olması insan çalışmalarını zorlaştırmakta ve araştırmacıları deneysel çalışmalara itmektedir. Sessiz hastalık olarak tanımlanan bu hastalıkta biyobelirteç ve terapötik ajan çalışmaları için laboratuvar deneysel modellerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kurguladığımız deneysel model ile hastalığı ilk oluşumundan başlayarak ve ardından tüm tedavi süreci aralığındaki zaman boyunca takip ederek gerek radyolojik görüntülemeye gerekse biyokimyasal belirteç düzeylerindeki değişimlerini izlemek amaçlanmıştır.

Menopoz sonrası osteoporoz çalışmaları için akla gelen ilk yöntem yumurtalıkları alınmış sıçandır. Yine de, bu model bazı ciddi dezavantajlara sahiptir: sıçan iskeletindeki kemikler yaşam boyu büyüme sergiler ve cinsel olgunlaşma sırasında epifizyal plaka füzyonu meydana gelmez; bu nedenle, kemirgenlerde gerçek iskelet olgunluğuna pek ulaşılmaz (Jee ve Yao, 2001; Lani, Kourkouvelis, Baliouskas ve Tzaphlidou, 2014).

Diğer bir deneysel model ise tavşandır. Yetişkin tavşanların insanlarınkine benzer kemik Havers sistemi vardır ve iskelet olgunluğuna ulaşırlar. Kemik yeniden şekillenmesi yüksek bir devir hızına sahiptirler. Ek olarak, tavşanlar 6-8 aylıkken cinsel olarak olgunlaşır ve büyüme epifizlerinin kapanmasını gösterir (Permuy ve diğerleri, 2019; Xavier, Toumi ve Lespessailles, 2021). Bununla birlikte, tavşanlarda önemli kemik kaybının sağlanması eş zamanlı ovariectomiye gerektirir (Harrison ve diğerleri, 2020).

Yapılan literatür taramaları sonunda planlanan çalışma için en uygun deneysel modelin tavşan modeli olduğu görülmüştür. Osteoporotik hayvan modelinin oluşturulmasında ovariectomi ve kortikosteroid tedavisinin kombinasyonu beraber uygulanmıştır.

Östrojen, kemik doku homeostazı için çok önemli roller oynar; menopozda östrojen seviyesindeki azalma, kemik kaybının ve osteoporozun ana nedenidir. Östrojen, osteoklast oluşum ve aktivitesini baskıladığı gibi osteoklast apoptozisini de indükler. Östrojenin, osteoblastlar ve osteositler tarafından salınan osteoklastojenik sitokin olan RANKL sentezini inhibe ederek osteoklast oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür. Ayrıca östrojen, bu kemik hücrelerini, osteoklastta (OC) RANK'ın bir tuzak reseptörü olan osteoprotegerini (OPG) üretmesi için uyarır, böylece osteoklastogenezi inhibe eder (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015). Bu hormon OC öncüllerinin (OCP'ler) osteoklastojenik sitokin RANKL'a

yanıtını azaltarak OC oluşumunu inhibe eder ve RANKL kaynaklı osteoklastogenezin bozulmasına yol açar (Faenza ve diğerleri, 2013). OVX tarafından indüklenen östrojen seviyelerindeki düşüş, osteoklast farklılaşmasını ve hayatta kalmayı artırır; sonuç olarak, kemik rezorpsiyonu kemik oluşumunu aşar. Dolaşımdaki seks steroidlerinin daha düşük seviyeleri bu nedenle osteoklast üretimini artırarak kemik erimesini artırır (Kobza ve diğerleri, 2021; Permuy ve diğerleri, 2019).

Glukokortikoidler ayrıca seks steroidlerinin sentezini ve salgılanmasını inhibe ederek yine benzer bir etkiye de neden olur ve sonuç olarak glukokortikoid ile indüklenen osteoporoza (GİOP) katkıda bulunur. Ayrıca glukokortikoid ile indüklenen osteoporoz temel olarak kemik oluşumunun bozulmasıyla osteoblastların sayı ve işlevinin azalması ve osteoblast ve osteosit apoptozunun artmasından oluşur (Almagro ve diğerleri, 2013; Kobza ve diğerleri, 2021; Permuy ve diğerleri, 2019).

Glukokortikoidler, RANK ligandının ekspresyonunu artırarak ve tuzak reseptörü olan osteoprotegerinin ekspresyonunu azaltır ve osteoklastogenez uyararak kemik rezorpsiyonunu artırır (Ernesto Canalis ve Delany, 2002).

Glukokortikoidler ayrıca doza bağlı bir şekilde osteoblast döngüsünde yer alır. Fizyolojik dozlarda, glukokortikoidler, osteoblast canlılığını sürdürmek için gerekli olan hücresel içeriklerin lizozomal dönüşüm süreci olan osteoblast otofajisini destekler. Supra-fizyolojik dozlarda, glukokortikoidler apoptozu veya hücre ölümünü indükleyerek kemik gücü ve yoğunluğunun kaybına katkıda bulunur (Wang ve diğerleri, 2019).

Bu bilgiler ışığında yaptığımız çalışmada OVX ile GK tedavisini bir arada kullanarak tavşanlarda OP oluşumu gerçekleştirilmiştir.

Romatoid artrit (RA) deneysel modellerinde; Kollajen kaynaklı artrit (CIA) kazanılmış bağışıklık sisteminin hücresel yanıtında kullanılırken, Adjuvan kaynaklı artrit (CFA) lokal bir bağışıklık indükler ve bu da adaptif bağışıklığın artmasına neden olur (Asquith ve diğerleri, 2009; Choudhary ve diğerleri, 2018). CFA'nın emülsifiye edildiği antijenlere karşı hem hücre aracılı hem de humoral bağışıklık tepkilerinin etkili bir arttırıcı olduğu bilinmektedir. Adjuvan ve oto-antijenlerin karışımları, özellikle sıçanlarda ve farelerde çok çeşitli deneysel otoimmün hastalıkları tetiklemek için rutin olarak kullanılmıştır (NIH,

2022). Antijen kaynaklı artrit (AIA) ise bu tür modeller, adaptif immün aracılı eklem hasarında belirli faktörler için hiyerarşik bir rol oluşturmak üzere araştırılabilmesi açısından faydalıdır (Asquith ve diğerleri, 2009). Bu verilerden yola çıkarak çalışmamızda etyolojisi tam açıklanamayan RA için etkili bir model olan CFA ile AIA kombinasyonunu uygulanmıştır.

Son yıllarda romatizmal hastalıkları olan hastaların yaşam süreleri belirgin şekilde artmış ve romatizmal hastalıklar ile osteoporoz arasındaki ilişki daha belirgin hale gelmiştir. OP ve buna bağlı fragilite kırıkları romatizmal hastalıkların morbidite ve mortalitesini artırmaktadır. Aktif olmayan RA'e kıyasla aktif hastalarda kemik rezorpsiyonu artarken, kemik oluşumu azaldığı gösterilmiştir (L.-X. Gao ve diğerleri, 2015; Maeda, Takahashi ve Kobayashi, 2013). Bir meta-analiz çalışmasında, RA ve genel popülasyonda fragilite kırıkları karşılaştırıldığında kırık insidansı 1000 kişi/yıl başına sırasıyla 33.00 ve 15.31 bulunmuş (Jin ve diğerleri, 2018). Omurga genellikle en sık etkilenen bölgedir ve RA'da vertebra kırıklarının insidansı sağlıklı kontrollere oranının 5 katına kadar çıkabildiği bulunmuş (Jin ve diğerleri, 2018; Tong ve diğerleri, 2020). İlginç bir şekilde, Vertebral Fracture Assessment (VFA) tekniğini kullanan RA'lı hastalardan oluşan geniş bir kohortta osteopeni ve osteoporoz prevalansı yaklaşık %40-60 iken, aynı kohortta VFA görüntüleri aracılığıyla vertebral kırıkların prevalansı %13 bulunmuş (Llorente, García-Castañeda, Valero, González-Álvaro ve Castañeda, 2020; Mohammad ve diğerleri, 2014). Bu durum kemik metabolizmasını sadece OP ve kırık riski ile değil diğer sistemik, metabolik hastalıklarda da dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Bu durum ayrıca radyolojik görüntülemenin yanında biyokimyasal belirteçlere olan ihtiyacın arttığını da göstermektedir. Sonuç olarak, kemik gücünü kapsamlı bir şekilde değerlendirmek için BMD'nin tek araç olarak yetersiz olduğu kabul edilmektedir (Kanis ve diğerleri, 2019; Williams C, 2022).

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği kılavuzunda kemik döngü belirteçlerinin osteoporoz tanısında yeri yoktur denir. Fakat biyokimyasal kemik döngüsü biyobelirteçleri BMD'den bağımsız olarak tedavi edilmemiş hastalarda kırıkları, kemik kayıp hızını, tedavinin 3-6 ayında tekrarlanarak, hastanın tedaviye uyumunu ve uygun kullanım kullanmadığını saptamada, tedavi öncesi ve sonrasında BMD değişikliklerini, ilaca ara

verilme ve tekrar başlama zamanını tayin etmede kullanılabilir (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022).

Uluslararası Osteoporoz Vakfı (IOF)/ Enternasyonal Klinik Kimyagerler Federasyonu (IFCC) tedavi etkinliğini değerlendirmede ve kırık riskini saptamada standardize edilmiş yöntemlerle ölçülmesi kaydı ile kemik yapım biyobelirteci olarak serum PINP, kemik yıkım biyobelirteci olarak ise serum CTX ölçülmesini önermektedir (Kanis ve diğerleri, 2019; Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022).

Kemik dokusunun biyokimyasal tepkisini yansıtan bir indeks olarak BTM, kemik metabolizmasını zamanında izleyebilir ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek için büyük bir potansiyele sahip olabilir. BTM'ler, kalıcı ilaç uygulamasını sürdürmek ve prognozu iyileştirmek için hastaların uyumunu izlemek için de kullanılabilir.

Günümüzde rutin çalışmalarda genel olarak Ca, P, ALP, Vit D, Kalsitonin gibi parametrelerin yanında CTX ve P1NP analizleri de yapılmaktadır. Çalışmamızda hem OP hem de RA grubu için CTX ve P1NP düzeyleri ölçülmüştür.

Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonundan sorumlu multinükleer hücrelerdir. PTH ve 1,25 (OH)₂ vitamin D₃ osteoklastik aktiviteyi stimüle eder (Tomruk Sütbeyaz, 2020).

Kemikte Vit D ve PTH sinerjik etki gösterir. Yüksek düzeylerde kemik iliğinde kök hücrelerin osteoklast şeklinde farklılaşmasını uyararak ayrıca osteoklastik aktiviteyi etkileyen sitokinlerin ve diğer uyanırların osteoblastlarda sentezlenmesini sağlayarak kemiğin organik ve inorganik fazının çözünmesine yol açar (Gurdol, 2019).

Erişkinlerde vitamin D eksikliği, osteopeni ve osteoporozu kolaylaştırır ve de kırık riskini artırır (Holick, 2004; Holick ve Chen, 2008). Bununla birlikte, D vitamini takviyesinin doğrudan osteoporoz tedavisi ile ilişkili olup olmadığı açık değildir, çünkü D vitaminine genellikle herhangi bir olası net etkiyi gizleyebilecek farmakolojik tedavi (steroidler, bifosfonatlar, vb.) eşlik eder (Barone ve diğerleri, 2007; Lani ve diğerleri, 2014; Ringe, Farahmand, Schacht ve Rozehnal, 2007).

D vitamini osteoblastların, osteoklastların ve osteositlerin aktivitesini etkiler, bu da kemik oluşumunu, kemik emilimini ve kemik kalitesini etkilediğini düşündürür. Fizyolojik

konsantrasyonlarda aktif D vitamini, RANKL/OPG sinyali yoluyla normal bir kemik emilim ve oluşum hızını korur (Allen ve Burr, 2019). Yüksek kemik yeniden şekillenme oranlarına sahip bireyler, düşük yeniden şekillenme oranlarına sahip olanlara göre daha fazla kırılma riski altındadır.

Glukokortikoidler, kalsiyumun renal atılımını artırarak ve bağırsaktan kalsiyum geri emilimini azaltarak vücutta negatif bir kalsiyum dengesi oluşturur (Kobza ve diğerleri, 2021). OP tedavisinde kullanılan Denosumab hipokalsemiye neden olabilir. Denosumab tedavisi öncesi hipokalsemi varsa düzeltilmelidir (Kışlak ve Genç, 2019; Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022).

Bizim çalışmamızda da Denosumab ile tedavi sırasında Ca değerlerinde hafif bir düşme gözlenmiş fakat bu hipokalsemi düzeylerinde değildi. Bizde tedavi esnasında Ca düzeyleri ortalama Tedavi-1 aşamasında 14,71 iken Tedavi-2 aşamasında ise 14,32 şeklinde ölçülmüştür.

Serum total ALP aktivitesi duyarlılık ve özgüllük yönünden yetersiz olmakla birlikte, kemik oluşumunu gösteren belirteç olarak kullanılmaktadır (Gurdol, 2019; Sepici-Dincel, 2020). Kandaki olağandışı ALP konsantrasyonları genellikle karaciğer, safra kesesi veya kemiklerle ilgili bir sorunu gösterir. ALP testi raşitizm, osteomalazi ve Paget hastalığı gibi kemik problemlerinin teşhis ve tedavi verimliliğini kontrol etmek için kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada serum total ALP >129 U/L aktivitesinin erkeklerde osteoporoz için bir gösterge olarak kullanıldığını göstermiştir (Fink ve diğerleri, 2016). Ayrıca, başka bir çalışmada alendronat tedavisi ile toplam ALP'nin 79.7 U/L'den 64,8 U/L'ye düştüğü gösterilmiştir (Kyd, Vooght, Kerkhoff, Thomas ve Fairney, 1998). Sonuçlar, toplam ALP'nin osteoporoz için ilaç tedavisinin etkinliğini yansıtmak için bir gösterge olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak, küçük bir değişiklik ve geniş kapsamlı toplam ALP aralığı, postmenopozal kadınlarda yanlış osteoporoz tanısına yol açabilir (Kuo ve Chen, 2017).

Bizim çalışmamızda ALP düzeyleri, OP ve RA gruplarında hastalık ile beraber düşme eğilinde idi. Bu durum kemik yapımında azalma olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Glukokortikoidlere maruz kalan hastalarda serum paratiroid hormonu (PTH) seviyeleri yükselir fakat hiperparatiroid aralığında değildir (Ernesto Canalis ve Delany, 2002). Bizim çalışmamızda PTH sonuçlarında anlamlı değişimler gözlenmemiştir.

Kalsitonin genellikle etkilerini yüksek konsantrasyonlarda göstermektedir. Bu özellik kalsitonin için fizyolojik değil fakat farmakolojik etkilerinin daha önemli olduğunu düşündürmektedir. Yüksek konsantrasyondaki kalsitonin osteoklast işlevini doğrudan inhibe edebilir (Peavy DE., 2003; Tomruk Sütbeyaz, 2020). Bu özelliği ile OP tedavisinde kullanılmaktadır.

OP ile ilgili bir çalışmada osteoporotik grupta Ca değerleri sağlıklı gruba göre daha düşük bulunmuş (Shahida ve diğerleri, 2021). Yapılan bir çalışmada, Ca/P oranı, insanlarda romatoid artrit gelişimi ve sürdürülmesi için önemli bir faktör olan reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (Kourkoumelis, Balatsoukas ve Tzaphlidou, 2012; Oelzner ve diğerleri, 1998).

Yapılan başka bir çalışmada OP, osteopeni ve sağlıklı gruplar ile yapılan çalışmada Ca, P, albümin, CRP, sedimentasyon, beyaz kan hücreleri, trombosit sayılarının her üç grupta da anlamlı bir fark olmadığı saptanmamış ($p>0,05$) (Durmaz ve Özdemir, 2022).

Yapılan başka bir çalışmada ise serum Ca, P, Vitamin D biyokimyasal ortalama değerleri, başlangıçta tedavi grupları arasında önemli farklılıklar göstermemiştir (Rupp ve diğerleri, 2022).

Çalışmamızda OP grubunda Ca, ALP, Vit D, Alb düzeylerinde hastalık ilk aşamasında önce yükselme sonra düşüş gözlenmiştir. P, CAL değerleri ise hastalık ile beraber düşme eğilimi göstermiştir. Tedavi sırasında ise değerler genel olarak yükselme eğilimi gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlara göre bu parametrelerin hastalık takibinde etkin olarak kullanılabileceğini söyleyemeyiz.

Günümüzde RA tanı ve tedavi stratejileri hastalığın erken teşhis ve tedavisini hedeflemektedir (Smolen ve diğerleri, 2020). PEARL (Princesa Early Arthritis Register Longitudinal) çalışmasında, erken DMARD tedavisinin sıkı kontrol ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinde uygulanması, hem hastalığın daha iyi kontrol edilmesi hem de uzun

sürekli osteopenize edici ilaçların kullanımının azalması nedeniyle eroziv hastalığın önlenmesine ve radyolojik ilerlemenin durdurulmasına yardımcı olmuştur denmektedir (Smolen ve diğerleri, 2020; Toledano ve diğerleri, 2018). Ayrıca, hastalık sırasında gelişen otoantikör titrelerinin azaltılması muhtemelen hem sistemik hem de lokal BMD kaybının azalmasına da katkıda bulunmuştur. Bu nedenle, uzun süreli komorbiditelerden kaçınmak için hastalığın evrimini daha iyi anlamamıza ve bu hastaları erken ve doğru bir şekilde tespit etmemize ve tedavi etmemize yardımcı olan prognostik biyobelirteçlere sahip olmak önemlidir (Llorente ve diğerleri, 2020).

RA'da uygulanan tedavilerden biri olan TNF- α inhibitörleri (TNFi) ile tedavinin yalnızca iltihaplanma üzerinde değil, aynı zamanda hem sistemik kemik kütlesi seviyesinde hem de radyografik ilerlemenin önlenmesinde kemik dengesi üzerinde de etkili olduğu kanıtlanmıştır (Llorente ve diğerleri, 2020; Marotte ve diğerleri, 2007). RA tedavisi alan hastalarda yapılan çalışmalarda kemik döngüsü biyobelirteçleri ile ilgili olarak, genellikle kemik oluşum belirteçlerinde bir artış ve kemik rezorpsiyonunda bir azalma olduğunu gösteren oldukça tutarlı sonuçlar gösterilmiş (Fassio ve diğerleri, 2019; Lange, Teichmann, Müller-Ladner ve Strunk, 2005; Llorente ve diğerleri, 2020; Orsolini ve diğerleri, 2019; Serio, Paolino, Sulli, Ferretti ve Cutolo, 2006).

Osteoklastlar, RA hastalarında kemik kaybindan sorumlu ana hücre popülasyonudur. Bu çok çekirdekli büyük hücreler, asidik ve katalitik enzimler tarafından kemik matriksinin bozunması yoluyla kemik rezorpsiyonunda yer alır ve bu durum RA'da kemik erozyonlarına yol açar (E M Gravalles ve diğerleri, 1998; Llorente ve diğerleri, 2020). Ayrıca tedavide kullanılan glukokortikoid uygulaması, osteoblastların işleviyle ilgili olarak, transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalarla kollajen tip I sentezini değiştirir (Permuy ve diğerleri, 2019).

Bir meta-analiz çalışmasında, RA ve genel popülasyonda fragilite kırıklarının insidansı 1000 kişi-yılı başına sırasıyla 33.00 ve 15.31 şeklinde bulunmuş (Jin ve diğerleri, 2018). Omurga genellikle en sık etkilenen bölgedir ve RA'da vertebra kırıklarının insidansı sağlıklı kontrollerin oranının 5 katına kadar çıkabilir (Jin ve diğerleri, 2018; Tong ve diğerleri, 2020). İlginç bir şekilde, Vertebral Fracture Assessment (VFA) tekniğini kullanan RA'lı hastalardan oluşan geniş bir kohortta osteopeni ve osteoporoz prevalansı

yaklaşık %40-60 iken, aynı kohortta VFA görüntüleri aracılığıyla vertebral kırıkların prevalansı %13 olduğu belirtilmiş (Llorente ve diğerleri, 2020).

Bu durum radyolojik görüntülemelerin yetersiz kalabileceği ve başka biyokimyasal yöntemlere vb ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamızda da RA'de hastalık ile beraber Ca, P, ALP, PTH, Kal ve Vit D değerlerinde düşme eğilimi gözlenmiştir. Bunların yanı sıra USG' görülen hastalık aktivite ve kemik hasarı ile uyumlu olarak CTX ve P1NP değerleri de düşme eğilimi görülmüştür.

P1NP, tip I prokollajenden bölünür ve üretilir. P1NP, tip 1 kollajen oluşumu sırasında hücre içi boşluğa salınır ve sonunda P1NP kan dolaşımına katılır. Kemik oluşumunu yansıtan proliferatif faz (iyileşme) sırasında osteoblastlar tarafından en fazla eksprese edilen kolajendir. Menopoz sonrasında P1NP intakt trimerik formunda artış gözleyen ve ayrıca bu belirtecin antirezorptif tedavinin etkinliğinin belirlenmesinde kullanıldığını bildiren makaleler mevcuttur (Sepici-Dincel, 2020)..

CTX, osteoklastlar tarafından üretilen, kemik rezorpsiyonuyla ilgili bir indeks olan ve osteoblastların aktivitesini yansıtan katepsin K tarafından tip I kollajenden katabolize edilir ve salınır (Qu ve diğerleri, 2020; Zhong, Li, Luo ve Chen, 2021). CTX tip I kollajenin fragmanlarıdır, kemiğin osteoklastik rezorpsiyonu sırasında klivaj edilir, bu da kemik rezorpsiyon aktivitesi ile orantılı bir oranda dolaşımda serbest kalmasına neden olur. Kemikten salınım oranı osteoklastların yıkım aktivitesini yansıtır (Greenblatt ve diğerleri, 2017).

P1NP, kronik böbrek ve kemik bozukluklarını değerlendirmek için uygulanırken, CTX glukokortikoid kaynaklı osteoporozu değerlendirmek için uygundur (Eastell ve Szulc, 2017). Yapılan bir çalışma, CTX-1'in postmenopozal osteoporoz için bifosfonat tedavisine yanıtı hızla gösterebilen, kemik rezorpsiyonunun spesifik ve hassas bir biyobelirteç olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, serum CTX-1 gıda alımından etkilendiği ve gıda alımı CTX-1 düzeylerini önemli ölçüde azalttığı için kan alımı sırasında açlık durumunda gerçekleşmesi gerektiği belirtilmiş (Kuo ve Chen, 2017).

Romatoid artrit oluşumunda kemik yıkım belirteçlerinde bir artış ve kemik oluşum belirteçlerinde ise baskılanması söz konusudur (Llorente ve diğerleri, 2020; Sindel ve diğerleri, 2012).

Bizim çalışmamızda OP grubunda CTX sonuçları beklenenin aksine hastalık aşamasında düşme eğilimi görülmüştür. OP oluşumu gerçekleştirmek için kullandığımız GK uygulaması ve OVX östrojen seviyelerinde azalmaya sebep olur. Bu azalma da RANKL kaynaklı osteoklastogenezisi baskılar. Bu CTX seviyelerinde gözlenen düşüşü açıklayabilir. P1NP düzeylerinde ise hastalık aşamasında beklendiği gibi azalma görülmüş ve ardından tedavi ile beraber tekrar yükselme gözlenmiştir. CTX seviyeleri tedavi sırasında azalma göstermiştir. Bu durum ise tedavi amaçlı kullandığımız Denosumab kaynaklı baskılanma sonucudur.

RA grubunda ise CTX sonuçları beklenenin aksine hastalık aşamasında düşme eğilimi görülmüştür. P1NP düzeylerinde ise beklendiği gibi azalma görülmüştür. Tedavi aşamasında ise önce azalma devam etmiş sonrasında ise yükselme gözlenmiştir. Bu durum geç cevap şeklinde yorumlanabilir. CTX seviyelerinde tedavi ile birlikte yükselme eğilimi görülmüştür. Bu atış aktif kemik döngüsü şeklinde yorumlanabilir.

Başta RA olmak üzere pek çok hastalıkta kullanılan Glukokortikoidler, prokollajen tip 1 N-terminal pro-peptidin (PINP) hızlı bir şekilde baskılanmasıyla ilişkili olan osteoblast kemik oluşumunu baskılar ve trabeküler kemikte erken bir azalmaya yol açar (Sutton, 1992).

Biz çalışmamızda osteoporoz oluşumu için kortikosteroid tedavisi uygulanmıştır ve bu durum, gruptaki başlangıç ve hastalık oluşumu arasındaki P1NP düzeyleri arasındaki azalmayı açıklamaktadır. RA da ise GK tedavi sırasında P1NP de anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu süreçlerinde çok sayıda molekül ve sinyal yolu yer almaktadır. Bunlar arasında nükleer faktörün reseptör aktivatörü (NF) -kB (RANK) ve ligandı (RANKL) en önemlilerindendir. RANKL, farklı kemik hücrelerinde (osteoblastlar ve osteoklastlar) ve ayrıca bağışıklık sisteminin farklı hücre alt kümelerinde hem çözünür hem de membrana bağlı formlarda eksprese edilir (Arboleya ve Castañeda, 2013; Guder,

Gravius, Burger, Wirtz ve Schildberg, 2020; Takayanagi, 2020). Buna karşılık, RANK esas olarak osteoklastlarda ifade edilir. RANKL osteoklastların gelişimi, fonksiyonu ve hayatta kalması için esansiyel olan bir moleküldür (Boyle ve diğerleri, 2003; Takayanagi ve diğerleri, 2002). Osteoklast farklılaşmasının tamamlanması için osteoblastik stromal hücrelerinden RANKL ekspresyonu, osteoklast prekürsörlerinden ise RANK ekspresyonu gerekir (Yoshida ve diğerleri, 1990). RANKL; öncül ve olgun osteoklastlar, uyarılmış T ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan kendine ait reseptörü RANK'a bağlanarak bu hücreleri uyarır (Florencio-Silva ve diğerleri, 2015; Theoleyre ve diğerleri, 2004; Wada ve diğerleri, 2006).

RA'de sinovyal sıvının ve periferik kanın aktive B hücrelerinin yüksek RANKL seviyeleri salgıladığı, dolayısıyla osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonuna katıldığı bulunmuştur (Llorente ve diğerleri, 2020; Meednu ve diğerleri, 2016).

RANKL blokajı yapılması ile sinovyal enflamasyon etkilenmeksizin erozyonların ve periartiküler kemik kaybının iyileştiği gösterilmiş (Geusens, 2012). Yapılan bir çalışmada RA'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre osteoporoz prevalansında artış, RANKL seviyesinde yükselme, OPG seviyesinde ise azalma olduğu gösterilmiştir (S. Xu, Wang, Lu ve Xu, 2012). Kemik kaybında görülen artışın yanı sıra kemik yapımında görülen azalmanın da enflamatuvar romatizmal hastalıklarda görülen osteoporozun patogeneğinde etkili olduğu bilinmektedir (Sindel ve diğerleri, 2012).

Bizim çalışmamızda OP grubunda RANKL seviyeleri hastalık ile düşerken tedavi ile tekrar yükselmiştir. RA grubunda ise hastalık ile birlikte artan RANKL seviyeleri tedavi süresince başta artmış sonra durağan hale gelmiştir.

OP'un farmakolojik tedavisinde kemik yıkımı azaltan ve yapımı artıran ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavide oral bifosfonatlar sıklıkla kullanılırken kalsiyum, D vitamini, selektif östrojen reseptör modulatorleri, kalsitonin, parathormon, stronsiyum ranelat, denosumab gibi geniş bir aralıktaki ilaç grupları yer almaktadır (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022). Bu ilaçların doz uygulamaları ve yan etkileri ilaca uyumu azaltabilmektedir. İlaç uyumunun azlığı da ilaç etkinliğinde azalmaya sebep olmaktadır (Saag ve diğerleri, 2019). OP'un kronik bir süreç olduğu ve

uzun süreli ilaç kullanımı söz konusu olduğu göz önüne alınırsa hasta uyumu ve memnuniyetinin tedaviye devam bakımından önemi anlaşılabacaktır.

Denosumab; RANKL'ı hedefleyen ve ona yüksek afinite ve spesifiklik ile bağlanarak, osteoklast öncüllerinin ve osteoklastların yüzeyinde, kendi reseptörü olan RANK aktivasyonunu engelleyen bir insan monoklonal antikordur (IgG2). Denosumab, osteoblast tarafından üretilen RANK-L'ye bağlanır ve böylece RANK-L'nin osteoklast reseptörü RANK'a bağlanmasını önler. RANK-L'nin RANK'a bağlanmasını önleyerek, daha az osteoklast farklılaşması ve aktivitesi olur, böylece kemik rezorpsiyonu azalır (Miller, 2011).

RANKL-RANK etkileşiminin önlenmesi osteoklast oluşum, fonksiyon ve sağkalımını inhibe eder ve böylece kortikal ve trabeküler kemik rezorpsiyonu azaltır. Oldukça etkili bir kemik yıkım inhibitörüdür. Tedavi sonrası birkaç gün içinde çok hızlı bir şekilde CTX düzeyleri tespit edilemez sınırlara düşer. Serum PINP düzeyleri de bu tedavi ile 3-6 ay arası bir sürede baskılanmaktadır (Lorentzon ve diğerleri, 2019; Sepici-Dincel, 2020). Yüksek fraktür riskine sahip postmenopozal kadınlarda FDA onayı bulunmaktadır (Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, 2022). Yapılan klinik çalışmalarda, denosumab zoledronik asit ve oral bifosfonatlar ile karşılaştırıldığında, kemik yoğunluğunu artırma bakımından denosumab biraz daha etkili bulunmuştur (Sağlam ve Alisar, 2021). RA'li hastalarda Denosumab ile yapılan küçük bir çalışma sonuçlarına göre; denosumab ile tedavi edilen RA'li hastalar plasebo ile tedavi edilen hastalar ile karşılaştırıldığında radyolojik ilerleme olmadığı saptanmıştır (Deodhar ve diğerleri, 2010).

RANKL-RANK sinyal yolunun bloke edilmesiyle osteoklast oluşumunun inhibe edilmesi, osteoblast aracılı kemik oluşumunu indükleyen osteoklast türevi birleştirme faktörlerinin azalmasıyla sonuçlanır. Denosumab, üriner N-telopeptid (NTX) gibi kemik rezorpsiyon belirteçlerinde ani ve sürekli bir azalmaya yol açar (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020).

Bizde denosumab ile tedavi sırasında CTX seviyeleri bununla uygun olarak çok düşük ölçülmüştür. PINP düzeyleri ise yine bununla uygun olarak başta çok az bir yükselme olsada sabit kalma eğilimi göstermiştir.

Denosumab tedavisi ile birlikte Ca ve D vitamin tedavisi alan hastaların tedavi öncesi ve sonrası Vitamin D düzeyleri incelenmiş. Çalışmadaki hastaların tümüne denosumab yanında D vitamini ve Ca verilmiş. Tedavi sonundaki ortalamanın daha yüksek olduğu tespit edilmiş (Lyu ve diğerleri, 2019; Sağlam ve Alisar, 2021; Sheedy, Camara ve Camacho, 2015). Bununla birlikte, D vitamini takviyesinin doğrudan osteoporoz tedavisi ile ilişkili olup olmadığı açık değildir, çünkü D vitaminine genellikle herhangi bir olası net etkiyi gizleyebilecek olan farmakolojik tedavi (steroidler, bifosfonatlar, vb.) eşlik eder (Lani ve diğerleri, 2014).

Kurguladığımız deneysel model ile hastalığı ilk oluşumundan başlayarak ardından tüm tedavi süreci aralığındaki zaman boyunca takip ederek osteoporozun önemli bir bileşeni olduğu düşünülen serum Vitamin D düzeylerindeki değişimleri gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda OP grubunda D vitamin seviyeleri Denosumab tedavisi ile birlikte herhangi bir D vitamin takviyesi olmadan tekrar yükselme göstermiştir.

Romatoid artrit (RA), enflamatuvar süreçlerin iskelet sistemini içerdiği ve kemiklerde ve çevredeki yapılarda belirgin yıkımın olduğu otoimmün bir hastalıktır. RA'de, çalışmalar sürekli olarak kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerinin hastalık aktivitesi ile önemli bir pozitif korelasyona sahip olduğuna işaret etmiştir (Sakthiswary, Uma Veshaliini, Chin, Das ve Sirasanagandla, 2022). Çalışmamızda RA hastalık aşamasında CTX ve P1NP'de düşüş gözlenmiştir.

Epidemiyolojik çalışmalar, RANKL düzeyinin RA'li hastalarda normal kontrollere göre daha yüksek olduğunu ve Larsen skoru ve radyolojik progresyon ile korele olduğunu bildirmiştir (Boman, Kokkonen, Ärlestig, Berglin ve Rantapää-Dahlqvist, 2017). Bizde de RA'da RANKL seviyeleri hastalıkla beraber yükseldi. RANKL'nin RA'daki önemli rolü göz önüne alındığında, RANKL'a karşı bir antikor olan denosumab, RANKL'nin kemik hasarı üzerindeki etkilerini iyileştirebilir. Bireysel randomize kontrollü çalışmalar, denosumabın RA'lı hastalarda yeni kemik erozyonunu azaltmada ve kemik erozyonu iyileşmesini desteklemedeki etkinliğini göstermiştir (Sakthiswary ve diğerleri, 2022; Takeuchi ve diğerleri, 2019).

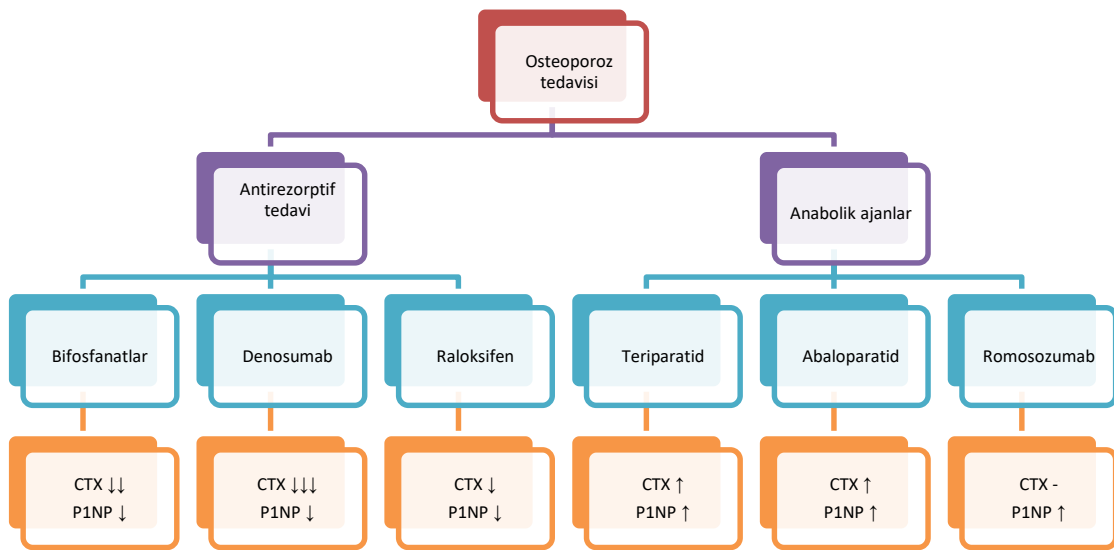
RANKL osteoklastogenezi teşvik eder. Glukokortikoid kullanımı osteoblast üzerindeki RANKL salınımını artırır (Ernesto Canalis ve Delany, 2002). Bizim çalışmamızda da OP

hastalık oluşum aşamasında RANKL önce düşmüş sonra ise artma eğilimi göstermiştir. Bu durum OVX sebebiyle gelişen düşük seviyeler azalma ardından GK kullanımı sebebiyle arttırılan RANKL seviyeleri olarak yorumlanmıştır.

Temel çalışmalar, inflamatuvar sitokinlerin, RA'de kemik kaybında anahtar rol oynayan osteoklastogenezin aktivasyonu ile RANKL'ın yukarı regülasyonu yoluyla osteoklastogenezini indüklediğini göstermiştir (Vis, Güler-Yüksel ve Lems, 2013).

Bizim çalışmamızda RA grubunda serum RANKL seviyeleri bununla uyumlu olarak hastalık ile birlikte yükselme eğilimi göstermiştir. Tedavi sırasında da yükselme eğilimde olan seviyelerde GK tedavi sırasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Osteoporoz başlangıç tedavisinde tedavinin etkinliğini değerlendirmek için BMD önerilir; ancak BMD'deki önemli değişiklik 1-2 yıl içinde ortaya çıkabilir. Buna karşılık, BTM'ler, uygulamadan sonraki 2 hafta içinde önemli bir değişiklik gösterir ve BTM'lerin ölçümüne, etkinliği izlemek için ilk tedaviden 3-6 ay sonra başlanabilir (Civitelli, Armamento-Villareal ve Napoli, 2009). OP tedavisinde kullanılan anti-resorptif ajanlar, kemik yıkım belirteçlerinde hızlı bir azalmaya neden olabilirken, anabolik ilaçlar kemik oluşum belirteçlerinin serum seviyesini arttırır (Zhong ve diğerleri, 2021). Şekil 5.1'de detaylı gösterilmiştir.



Şekil 5.1. Osteoporoz tedavisinde kullanılan anti-resorptif ve anabolik ilaç tedavilerindeki PINP ve CTX düzeyi değişiklikleri (Zhong ve diğerleri, 2021).

BTM'nin kısa süreli azalmasının, anti-resorpsiyon tedavisinde BMD'nin artmasıyla önemli ölçüde ilişkili olduğu bulunmuş (Kanis ve diğerleri, 2019). Ayrıca BTM, klinik deneylerde ilaçlarla ilgili etki mekanizmalarını anlamak için bilgi sağlayabilir.

Denosumab kemik yıkımını inhibe eder ve kemik yıkım belirteçlerinde büyük bir azalmaya neden olur. CTX, denosumab tedavisinden sadece birkaç gün sonra düşük bir seviyeye düşer; Buna karşılık, PINP, 3-6 ay içinde önemli bir düşüş elde ederek yavaş bir yanıt sergiler (Eastell ve diğerleri, 2018). Bizim çalışmamızda OP tedavisi için kullanılan denosumab ile benzer şekilde CTX seviyelerinde azalma gözlenmiştir. Tedavi sırasındaki PINP düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik gösterilememiştir.

Kemik döngüsü belirteçleri, kemiğin yeniden şekillenme aktivitesini yansıtır ve yeniden şekillenmenin fizyolojik koşullardan, hastalıklardan ve ilaçlardan nasıl etkilendiğine dair fikir verir (Borgen ve diğerleri, 2022). Antirezortif ilaçların kullanan hastalarda, ortalama 4-6 yıllık gözlem süresi boyunca daha yüksek PINP seviyeleri kırıklarla ilişkilendirilmiştir (Borgen ve diğerleri, 2022). Ayrıca menopoza sonrasında PINP intakt trimerik formunda artış gözleyen ve bu belirtecin antirezortif tedavinin etkinliğinin belirlenmesinde kullanıldığını bildiren çalışmalar mevcuttur (Bergmann ve diğerleri, 2009; Melkko ve diğerleri, 1996; Sepici-Dincel, 2020).

Sfingozin-1-fosfat (S1P), osteoartrit, osteoporoz, romatoid artrit, spondiloartrit ve kemik kanseri ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli kemik hastalıklarında kritik bir rol oynayabilir (Tian ve diğerleri, 2021).

S1P, osteoblastlarda RANKL'ı artırarak osteoblastların proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve göçünü ve ayrıca osteoklast farklılaşmasını etkiler. Kan ve kemik iliği boşlukları arasındaki osteoklast öncülerinin trafiğini kontrol eder (Konukoglu, 2019). Osteoklastlarda eksprese edilen sfingosin kinaz (SPHK), sfingosini fosforile ederek sfingosin 1 fosfat (S1P) üretir ve osteoblastogenezi destekler (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020). RANKL stimülasyonu üzerine osteoklast öncülerinde S1P üretimi artar ve S1P, osteoblastların yüzeyindeki S1P reseptörüne bağlanır, bu da osteoblast göçünün ve hayatta kalmanın artmasına neden olur. Daha sonra, S1P ile aktive olan osteoblastlar RANKL ekspresyonunu yukarı düzenleyerek osteoklastogenezi (osteoklastların monositler ve

makrofajlardan farklılaşması) arttırır (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020; Ryu ve diğerleri, 2006).

S1P konsantrasyonu dolaşımında yüksektir, kemikte düşüktür; bu nedenle, osteoklast öncülleri kandan kemiğe göç eder (Konukoglu, 2019). Yüksek serum S1P düzeylerinin, menopozdan sonra kadınlarda artmış kemik rezorpsiyonu ve artan vertebral kırık prevalansı ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Chapurlat ve Confavreux, 2016; Ishii ve Kikuta, 2013; J.-N. Zhang ve diğerleri, 2015).

Bizim çalışmamızda OP grubunda S1P seviyeleri hem hastalık hemde tedavi aşamalarında düşme eğilimi göstermiştir. Aynı zamanda OP grubu hastalık-1 aşamasında S1P ile RANKL değerleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür ($r:0.048$; $p:0.903$). Hastalık-2 ileri aşamasında ise durum tersine negatif korelasyon olmuştur ($r:-0.168$; $p:0.690$).

S1P homeostazda önemli bir rol oynar ve osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki dengenin bozulması osteoporozu indükleyebilir. S1P ayrıca osteoklast öncüllerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik bozulmasını azaltır, böylece kemik yıkımını önler (Ardawi ve diğerleri, 2018; Grewe ve diğerleri, 2022; Tian ve diğerleri, 2021). Yüksek bir S1P seviyesi ile yaygın kırık oranı ile anlamlı bir ilişki bulunmuş (Bae ve diğerleri, 2016; S. H. Lee ve diğerleri, 2020; Song ve diğerleri, 2020). Ancak, S1P'nin bilinen S1PR'lerden bağımsız görünen bazı eylemleri de vardır. S1P eylemi, metabolize edici enzimlerinin aktivasyonuna ve mekansal dağılımına ve ayrıca substrat olan sfingosinin mevcudiyetine bağlı olabilir (Strub ve diğerleri, 2010). S1P, hücre tipine, sentez ve bozunma bölgesine ve hastalığın patofizyolojisine bağlı olarak hem pro-hem de anti-inflamatuar özellikler sergileyen iki ucu keskin bir kılıçtır (Ebenezer ve diğerleri, 2017).

Kortikosteroid ile tedavinin mantığı, sistemik kortikosteroidin lokal ve sistemik inflamatuvar yanıtı azaltabilmesi ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe edebilmesidir. Sfingozin kinaz-1'in glukokortikoidler tarafından indüklenmesinden kaynaklanan artan dolaşımdaki S1P seviyelerinin, pulmoner inflamasyonun inhibisyonu için gerekli olduğunu öne sürülmüş (Hsu ve diğerleri, 2019; Vettorazzi ve diğerleri, 2015).

Biz çalışmamızda RA grubunda hastalık ile birlikte azalma eğilimi gösteren S1P seviyeleri GK ile tedavi sırasında artma göstermiştir.

S1P birçok farklı dokuda tespit edilir; bununla birlikte, homeostatik koşullar altında, kırmızı kan hücrelerinden, trombositlerden, endotel hücrelerinden ve trombositlerden salgılanması nedeniyle kanda en yüksek S1P konsantrasyonda bulunur (Thuy, Reimann, Hemdan ve Gräler, 2014). Kanda S1P, albümin ve lipoproteinlere, özellikle HDL'ye bağlı olarak bulunur. Çalışmalar, albümine veya HDL'ye bağlı S1P'nin S1PR'leri aktive etme yeteneğini etkilemediğini, bunun yerine S1P'yi dolaşımda tutarak bir S1P rezervuarı oluşturduğunu göstermiştir (Frost ve diğerleri, 2023; Thuy ve diğerleri, 2014).

Çalışmamızda OP grubunda Alb, Kol, ve HDL ile S1P düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur.

Toplam S1P kanda daha yüksek konsantrasyonlarda ve kemikte daha düşük konsantrasyonlarda tespit edildiğinden, osteoblast ve osteoklast öncülerinin göç ettiği bir konsantrasyon gradyanı yaratılır. Öncü migrasyondaki bu gradyanın önemi, S1P parçalanmasının in vivo olarak S1P liyazının inhibisyonu veya silinmesiyle inhibe edilmesiyle, gradyanın dağılmasına neden olarak, artan kemik kütlesi ve kuvvetiyle birlikte azalmış osteoklast sayısı ile sonuçlandığında gösterilmiştir (Frost ve diğerleri, 2023; Konukoglu, 2019).

S1P normal dokularda düşük konsantrasyonlarda bulunabilir. Bu doğal lipit gradyanı, belirli hücre tipleri için en güçlü kemo-çekici sisteme aittir; artan hücre içi S1P, hücresel durumu bir pro-survival/anti-apoptotik fenotipe kaydırır; azalmış S1P, diğer arabulucularla birlikte hücre farklılaşma süreçlerini güçlendirebileceği, proliferasyonun azalmasına yol açar (Meshcheryakova ve diğerleri, 2017).

S1P, kemik rezorpsiyonu ile etkileşime giren bir lipit aracıdır. S1P osteoklast öncülerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik bozulmasını azaltır, böylece kemik yıkımını önler (Alvarez ve diğerleri, 2007; Tian ve diğerleri, 2021).

Glukokortikoid kullanımı düşünüldüğünde, osteoblast sağkalımı üzerindeki olumsuz etki önemli bir endişe kaynağıdır. MC3T3-E1 osteoblastik hücrelerde SPHK1'in bir aktivatörü olan K6PC-5'in kullanıldığı yakın tarihli bir deney, Dexametazinin neden olduğu apoptozu başarıyla tersine çevirmiş bu, S1P'nin glukokortikoidlerin kemik üzerindeki yan etkilerini büyük ölçüde azalttığını göstermektedir (L. Zhang ve diğerleri, 2020).

S1P1'in osteoartrit (OA) ve RA'lı hasta sinovyumlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada RA sinovyumunda daha güçlü ifade edildiğini ve RA hastalarında sinoviyal sıvıdaki mutlak S1P düzeylerinin OA hastalarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiş (Kitano ve diğerleri, 2006). RA hastalarının diz eklemlerinin eklem içi yumuşak dokularından izole edilen MH7A sinoviyal hücreleri ile yapılan bir çalışmada S1P/S1P1 sinyalinin RA sinoviyositlerinin ve CD4⁺ T hücrelerinin RANKL ekspresyonunu arttırdığını gösterilmiş. Ek olarak S1P, RA sinoviyositleri ve CD4⁺ T hücreleri tarafından TNF-a ile indüklenen RANKL ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı görülmüş (Takeshita ve diğerleri, 2012).

RANKL tarafından osteoklastlarda uyarılan hücre içi S1P, osteoklastogenezi inhibe ettiği (Park-Min ve Lorenzo, 2022; Ryu ve diğerleri, 2006), buna karşılık, ekzojen S1P, siklooksijenaz-2 ve PGE(2) düzenlemesi yoluyla osteoblastlar tarafından RANKL üretimini arttırdığı ve bu şekilde osteoklastogenezi uyardığı gösterilmiş (Park-Min ve Lorenzo, 2022).

S1P, S1PR1 aracılığıyla fibroblast benzeri sinoviyositlerin apoptozunu engeller ve sinoviyositler ve CD4⁺ T hücreleri üzerinde RANKL reseptör aktivatörünü artırır, böylece osteoklastogenezi teşvik eder, kemik erozyonlarına katkıda bulunabilir (Zhao ve diğerleri, 2008). RANKL sinyali, S1PR1'in osteoklast öncülleri üzerindeki ekspresyonunu aşağı doğru düzenler, dolaşıma yeniden çıkışlarını engeller ve osteoklast olgunlaşmasını ve kemik erimesini artırır (Ishii ve diğerleri, 2009).

S1P ayrıca osteoklast prekürsörlerinin kemik yüzeyinden ve kemik iliğinden kana çıkışını uyardığı ve bu şekilde kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiş (Park-Min ve Lorenzo, 2022). Benzer şekilde, kemik mikroçevresindeki S1P düzeylerini yükseltmek, kemik kütlesini artırmış (Weske ve diğerleri, 2018).

Yapılan bir çalışmada S1P, BMD, P1NP, CTX ve 25(OH)D ile korelasyon göstermemiş. P1NP ve CTX, ölçülen tüm bölgelerde BMD ile negatif korelasyon göstermiş, ancak yine 25(OH)D ile korele olmadığı gözlenmiş. CTX ve P1NP, BMD ile negatif korelasyon gösterirken S1P ile korele olmadığı gözlenmiş. Ayrıca OP grubunda CTX ve P1NP değerleri yüksek bulunmuştur (Shahifar ve diğerleri, 2020).

Yapılan bir başka çalışmada postmenopozal kadınların premenopozal kadın ve erkeklere göre daha yüksek S1P plazma düzeylerine sahip olduğu gösterilmiş. Ayrıca, S1P düzeyleri kemik rezorpsiyon belirteçleri ile pozitif korelasyon göstermiş ve kemik mineral yoğunluk değerleri ile negatif korelasyon göstermiş (S. H. Lee ve diğerleri, 2012), bu da dolaşımdaki S1P'nin kemik homeostazını etkileyebileceği hipotezini güçlü bir şekilde desteklemektedir (Meshcheryakova ve diğerleri, 2017).

Bizde ise bu durumun tersi olarak S1P düzeyleri hastalık ile birlikte düşme eğilimi göstermiştir. OP tedavisi sırasında ki düşüş ise denosumab tedavisinde oc'ların baskılanması sebebiyle S1P düşmesine sebep olmuş gibi görünmektedir.

Dolaşımdaki S1P'ye hücrel ve enzimatik katkıda bulunanlar tanımlanmış olsa da, homeostaz ve iltihaplanma sırasında fizyolojik S1P seviyelerini koruyan kesin mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Enflamatuvar koşullar ve yaşlanma, plazma S1P seviyelerinin düşmesine yol açarak, stabil bir plazma S1P havuzunun genel sağlığa katkıda bulunduğunu düşündürür (Burg ve diğerleri, 2022; B.-S. Ding ve diğerleri, 2020; Winkler ve diğerleri, 2015). Bu literatür bilgisi diğerlerinin aksine S1P seviyelerinin düşmesini hastalıkla ilişkilendirmiş. Bu bilgi ile bizim sonuçlarımız daha uyumlu bulunmuştur. RA ve OP'da hastalık ile birlikte S1P seviyeleri düşmüş tedavi ile birlikte yükselmiştir.

Farelerde RANKL silinmesi, osteoklastların yokluğundan dolayı ciddi osteopetroz ile sonuçlanırken, çözünür RANKL'ın aşırı ekspresyonu ciddi osteoporoza yol açar (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020; Mizuno ve diğerleri, 2002). Buna göre, RANKL sinyallemesinin bloke edilmesi, osteoporotik kemik kaybı ve buna bağlı iskelet bozuklukları için umut verici bir terapötik hedef olarak önerilmiştir. Osteoklastlarda eksprese edilen sfingozin kinaz (SPHK), sfingozini fosforile ederek sfingozin-1-fosfat (S1P) üretir ve osteoblastogenezi destekler (Ishii ve diğerleri, 2009; Pederson ve diğerleri, 2008). RANKL stimülasyonu

üzerine osteoklast öncüllerinde S1P üretimi artar ve S1P, osteoblastların yüzeyindeki S1P reseptörüne bağlanır, bu da osteoblast göçünün ve hayatta kalmanın artmasına neden olur. Daha sonra, S1P ile aktive olan osteoblastlar RANKL ekspresyonunu yukarı düzenleyerek osteoklastogenezi artırır (J.-M. Kim ve diğerleri, 2020; Ryu ve diğerleri, 2006).

Şu anda, osteoporoz için mevcut klinik tedaviler çoğunlukla kemiğin yeniden şekillenmesini etkileyen faktörlere odaklanmıştır; ancak kendi sınırlamaları ve yan etkileri vardır. Son zamanlarda, sitokin immünoterapisi, gen tedavisi ve kök hücre tedavisi, çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni yaklaşımlar haline gelmiştir.

S1P, osteoartrit, osteoporoz, romatoid artrit, spondiloartrit ve kemik kanseri ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli kemik hastalıklarında tanı, takip ve tedavide kritik bir rol oynayabilir.

OP grubunda S1P ve RANKL düzeyleri hastalık ile uyumlu iken tedavi için anlamlı değişiklikler izlenememiştir. RA grubunda ise S1P ve RANKL düzeyleri hastalık ve tedavi süreçleri ile uyumlu bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemik homeostazı, birçok organizma fonksiyonlarıyla yakından bağlantılı karmaşık bir süreçtir. Bu süreçlerin bozulduğu durumlar, yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyen ve hatta yaşamı tehdit eden kronik veya akut çok sayıda hastalıkla ilişkilidir. Osteoporoz (OP) sistemik bir iskelet bozukluğu ve metabolik kemik hastalıklarının en yaygın tiplerinden biridir. Kemik metabolizmasındaki düzensizlikler sebebiyle sadece kemiğin kendi dokusunda patolojiler görülmeyip başka sistemsel hastalıklar da görülmektedir. Bu grupta en yaygın görülen hastalıkta Romatoid Artrit (RA)'tir.

Kemik döngüsü belirteçleri (BTM'ler), osteoblastlar veya osteoklastlar tarafından kemik yeniden yapılanması sırasında salınan bir dizi protein veya protein türevi biyobelirteçtir. Günümüzde yaygın olarak görülmesi sebebiyle OP ve RA için tanı, tedavi ve tedavinin takibi kritik öneme sahiptir. Noninvaziv olması sebebiyle BTM'lerin tanı ve takipteki önemi giderek dahada artmaktadır.

Membran lipitleri olan sfingolipit metabolitlerinden olan Sfingozin-1-fosfat (S1P) osteoklast öncülerinin kan ve kemik arasındaki göçünü kontrol eder ve osteoklast öncülerini kemik yüzeylerinden uzak tutarak kemik bozunmasını azaltır, böylece kemik yıkımını önler. Ayrıca S1P, osteoblastlarda RANKL'ı artırarak osteoblastların proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve göçünü ve ayrıca osteoklast farklılaşmasını etkiler.

Bu çalışma kapsamında kemik metabolizması hastalıklarına yeni bir biyobelirteç sunmak amaçlanmıştır.

Kurguladığımız deneysel model ile başlangıç, tüm hastalık ve ardından tüm tedavi süreci aralığındaki zaman boyunca takip ederek geleneksel BTM'lerin yanı sıra RANKL ve S1P düzeylerindeki değişimleri gösterilmiştir.

Çalışmamız neticesinde

- OP için S1P ve RANKL biyobelirteç olarak kullanılabileceğini önermekteyiz.
- OP için S1P metabolizması olası terapötik hedef için değerlendirilmelidir.
- RA için S1P ve RANKL biyobelirteç olarak kullanılabileceğini önermekteyiz.

- RA için S1P metabolizması ve Anti-RANkL inhibitörlerinin tedavide kullanılması için değerlendirilmelidir.

Elde ettiğimiz sonuçlar anlamlı olsada rutin kullanımlar için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Adams, J. E. (2010). Radiogrammetry and radiographic absorptiometry. *Radiologic clinics of North America*, 48(3), 531–540. doi:10.1016/j.rcl.2010.03.006
- Aguilar, M.-I. (2004). HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 251, 3–8. doi:10.1385/1-59259-742-4:3
- Aji, G., Huang, Y., Ng, M. L., Wang, W., Lan, T., Li, M., Li, Y., Chen, Q., Li, R., Yan, S., Tran, C., Burchfield, J. G., Couttas, T. A., Chen, J., Chung, L. H., Liu, D., Wadham, C., Hogg, P. J., Gao, X., Vadas, M. A., Gamble, J. R., Don, A. S., Xia, P., Qi, Y. (2020). Regulation of hepatic insulin signaling and glucose homeostasis by sphingosine kinase 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(39), 24434–24442. doi:10.1073/pnas.2007856117
- Akkoyun, H., Bayramoğlu, M., Ekin, S. ve Çelebi, F. (2014). D Vitamini Ve Metabolizma İçin Önemi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*. Atatürk Üniversitesi. doi:10.17094/avbd.05043
- Akpolat, V. (2008). Osteoporoz Tanısında Kullanılan Kemik Mineral Yoğunluğu Ölçüm Yöntemleri. *Dicle Tıp Dergisi*. Dicle Üniversitesi.
- Allen, M. R. and Burr, D. B. (2019). Chapter 5 - Bone Growth, Modeling, and Remodeling. D. B. Burr and M. R. Allen (Ed.), *Basic and Applied Bone Biology (Second Edition)* içinde (Second Edi., ss. 85–100). Academic Press. doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00005-1
- Almagro, M. I., Roman-Blas, J. A., Bellido, M., Castañeda, S., Cortez, R. and Herrero-Beaumont, G. (2013). PTH [1-34] enhances bone response around titanium implants in a rabbit model of osteoporosis. *Clinical oral implants research*, 24(9), 1027–1034. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02495.x
- Alvarez, S. E., Harikumar, K. B., Hait, N. C., Allegood, J., Strub, G. M., Kim, E. Y., ... Spiegel, S. (2010). Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*, 465(7301), 1084–1088. doi:10.1038/nature09128
- Alvarez, S. E., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007). Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 18(8), 300–307. doi:10.1016/j.tem.2007.07.005
- Arbolea, L. and Castañeda, S. (2013). Osteoimmunology: the study of the relationship between the immune system and bone tissue. *Reumatologia clinica*, 9(5), 303–315. doi:10.1016/j.reuma.2013.02.008
- Ardawi, M.-S. M., Rouzi, A. A., Al-Senani, N. S., Qari, M. H., Elsamanoudy, A. Z. and Mousa, S. A. (2018). High Plasma Sphingosine 1-phosphate Levels Predict Osteoporotic Fractures in Postmenopausal Women: The Center of Excellence for Osteoporosis Research Study. *Journal of bone metabolism*, 25(2), 87–98. doi:10.11005/jbm.2018.25.2.87

- Asquith, D. L., Miller, A. M., McInnes, I. B. and Liew, F. Y. (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2040–2044. doi:<https://doi.org/10.1002/eji.200939578>
- Bae, S. J., Lee, S. H., Ahn, S. H., Kim, H.-M., Kim, B.-J. and Koh, J.-M. (2016). The circulating sphingosine-1-phosphate level predicts incident fracture in postmenopausal women: a 3.5-year follow-up observation study. *Osteoporosis International*, 27(8), 2533–2541. doi:10.1007/s00198-016-3565-z
- Bagdanoff, J. T., Donoviel, M. S., Nouraldeem, A., Tarver, J., Fu, Q., Carlsen, M., Jessop, T. C., Zhang, H., Hazelwood, J., Nguyen, H., Baugh, S. D., Gardyan, M., Terranova, K. M., Barbosa, J., Yan, J., Bednarz, M., Layek, S., Courtney, L. F., Taylor, J., Digeorge-Foushee, A. M., Gopinathan, S., Bruce, D., Smith, T., Moran, L., O'Neill, E., Kramer, J., Lai, Z., Kimball, S. D., Liu, Q., Sun, W., Yu, S., Swaffield, J., Wilson, A., Main, A., Carson, K. G., Oravec, T., Augeri, D. J. (2009). Inhibition of sphingosine-1-phosphate lyase for the treatment of autoimmune disorders. *Journal of medicinal chemistry*, 52(13), 3941–3953. doi:10.1021/jm900278w
- Baim, S., Binkley, N., Bilezikian, J. P., Kendler, D. L., Hans, D. B., Lewiecki, E. M. and Silverman, S. (2008). Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and executive summary of the 2007 ISCD Position Development Conference. *Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry*, 11(1), 75–91. doi:10.1016/j.jocd.2007.12.007
- Bandhuvula, P. and Saba, J. D. (2007). Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends in molecular medicine*, 13(5), 210–217. doi:10.1016/j.molmed.2007.03.005
- Bao, Y., Guo, Y., Zhang, C., Fan, F. and Yang, W. (2017). Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Signaling in Colorectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(10). doi:10.3390/ijms18102109
- Baofeng, L., Zhi, Y., Bei, C., Guolin, M., Qingshui, Y. and Jian, L. (2010). Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta orthopaedica*, 81(3), 396–401. doi:10.3109/17453674.2010.483986
- Barone, A., Giusti, A., Pioli, G., Girasole, G., Razzano, M., Pizzonia, M., Palummeri, E. and Bianchi, G. (2007). Secondary Hyperparathyroidism Due to Hypovitaminosis D Affects Bone Mineral Density Response to Alendronate in Elderly Women with Osteoporosis: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, 55(5), 752–757. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2007.01161.x>
- Bayrac, C. ve Camizci, G. (2020). İlaçların Analiz ve Kalite Kontrollerinde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyon). *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. doi:10.28948/ngumuh.547635

- Bekker, P. J., Holloway, D. L., Rasmussen, A. S., Murphy, R., Martin, S. W., Leese, P. T., Holmes, G.B., Dunstan, C.R. and DePaoli, A. M. (2004). A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19(7), 1059–1066. doi:10.1359/JBMR.040305
- Bergmann, P., Body, J. J., Boonen, S., Boutsen, Y., Devogelaer, J. P., Goemaere, S., Kaufman, J. M., Reginster, J., Gangji, V. (2009). Evidence-based guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in the selection and monitoring of bisphosphonate treatment in osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *International journal of clinical practice*, 63(1), 19–26. doi:10.1111/j.1742-1241.2008.01911.x
- Beto, J. A. (2015). The role of calcium in human aging. *Clinical nutrition research*, 4(1), 1–8. doi:10.7762/cnr.2015.4.1.1
- Betts, J. G., Young, K. A., Wise, J. A., Johnson, E., Poe, B., Kruse, D. H., DeSaix, P. (2013). *Anatomy and Physiology*. Houston, Texas: OpenStax.
- Black, D. M., Cummings, S. R., Genant, H. K., Nevitt, M. C., Palermo, L. and Browner, W. (1992). Axial and appendicular bone density predict fractures in older women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(6), 633–638. doi:10.1002/jbmr.5650070607
- Blaho, V. A. and Hla, T. (2011). Regulation of mammalian physiology, development, and disease by the sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid receptors. *Chemical reviews*, 111(10), 6299–6320. doi:10.1021/cr200273u
- Boman, A., Kokkonen, H., Ärlestig, L., Berglin, E. and Rantapää-Dahlqvist, S. (2017). Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) but not sclerostin or gene polymorphisms is related to joint destruction in early rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 36(5), 1005–1012. doi:10.1007/s10067-017-3570-4
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238. doi:10.1002/jbmr.320
- Bordelon, P., Ghetu, M. V and Langan, R. C. (2009). Recognition and management of vitamin D deficiency. *American family physician*, 80(8), 841–846.
- Börekçi, N. (2019). Current information on Vitamin D deficiency. *The Journal of Turkish Family Physician*, 10, 35–42. doi:10.15511/jtftp.19.00135
- Borgen, T. T., Solberg, L. B., Lauritzen, T., Apalset, E. M., Bjørnerem, Å. and Eriksen, E. F. (2022). Target Values and Daytime Variation of Bone Turnover Markers in Monitoring Osteoporosis Treatment After Fractures. *JBMR plus*, 6(6), e10633. doi:10.1002/jbm4.10633
- Boskey, A. L. (2007). Mineralization of bones and teeth. *Elements*, 3(6), 385–391.

- Bottagisio, M., Coman, C. and Lovati, A. B. (2019). Animal models of orthopaedic infections. A review of rabbit models used to induce long bone bacterial infections. *Journal of medical microbiology*, 68(4), 506–537. doi:10.1099/jmm.0.000952
- Boyce, B F, Hughes, D. E., Wright, K. R., Xing, L. and Dai, A. (1999). Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 79(2), 83–94.
- Boyce, Brendan F and Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), 139–146. doi:10.1016/j.abb.2008.03.018
- Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337–342. doi:10.1038/nature01658
- Brodsky, B. and Persikov, A. V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*, 70, 301–339. doi:10.1016/S0065-3233(05)70009-7
- Burch, J., Rice, S., Yang, H., Neilson, A., Stirk, L., Francis, R. and Craig, D. (2014). Systematic review of the use of bone turnover markers for monitoring the response to osteoporosis treatment: the secondary prevention of fractures, and primary prevention of fractures in high-risk groups. *Health technology assessment (Winchester, England)*, 18(11), 1–180. doi:10.3310/hta18110
- Burg, N., Salmon, J. E. and Hla, T. (2022). Sphingosine 1-phosphate receptor-targeted therapeutics in rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology*, 18(6), 335–351. doi:10.1038/s41584-022-00784-6
- Canalis, E, Mazziotti, G., Giustina, A. and Bilezikian, J. P. (2007). Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 18(10), 1319–1328. doi:10.1007/s00198-007-0394-0
- Canalis, Ernesto and Delany, A. M. (2002). Mechanisms of glucocorticoid action in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966, 73–81. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04204.x
- Cannavo, A., Liccardo, D., Komici, K., Corbi, G., de Lucia, C., Femminella, G. D. and Rengo, G. (2017). Sphingosine Kinases and Sphingosine 1-Phosphate Receptors: Signaling and Actions in the Cardiovascular System. *Frontiers in pharmacology*, 8, 556. doi:10.3389/fphar.2017.00556
- Capulli, M., Paone, R. and Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 561, 3–12. doi:10.1016/j.abb.2014.05.003
- Cartier, A. and Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. *Science*, 366(6463). doi:10.1126/science.aar5551

- Castañeda-Lopez, M., Garza-Veloz, I., Ortiz-Rodriguez, J. M., Castañeda-Miranda, R., Solis-Sánchez, L., Vega-Carrillo, H., Martinez-Fierro, M. L. (2018). Animal Models of Rheumatoid Arthritis. *Experimental Animal Models of Human Diseases - An Effective Therapeutic Strategy*. doi:10.5772/intechopen.72554
- Castañeda, S., Calvo, E., Largo, R., González-González, R., de la Piedra, C., Díaz-Curiel, M. and Herrero-Beaumont, G. (2008). Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *Journal of bone and mineral metabolism*, 26(1), 53–59. doi:10.1007/s00774-007-0797-1
- Chan, C. C., Lee, Y. C., Lam, H. and Zhang, X.-M. (2004). *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*. New York: Wiley-Interscience.
- Chapurlat, R. D. and Confavreux, C. B. (2016). Novel biological markers of bone: from bone metabolism to bone physiology. *Rheumatology*, 55(10), 1714–1725. doi:10.1093/rheumatology/kev410
- Charles, J. F., Siris, E. S. and Roodman, G. D. (2018). Paget Disease of Bone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* içinde (ss. 713–720). John Wiley & Sons, Ltd. doi:https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch92
- Chesnut, C. H. 3rd, Bell, N. H., Clark, G. S., Drinkwater, B. L., English, S. C., Johnson, C. C. J., Mallinak, N. J. (1997). Hormone replacement therapy in postmenopausal women: urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *The American journal of medicine*, 102(1), 29–37. doi:10.1016/s0002-9343(96)00387-7
- Choudhary, N., Bhatt, L. K. and Prabhavalkar, K. S. (2018). Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 40(3), 193–200. doi:10.1080/08923973.2018.1434793
- Ciosek, Ż., Kot, K., Kosik-Bogacka, D., Łanocha-Arendarczyk, N. and Rotter, I. (2021). The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules*, 11(4). doi:10.3390/biom11040506
- Civitelli, R., Armamento-Villareal, R. and Napoli, N. (2009). Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 20(6), 843–851. doi:10.1007/s00198-009-0838-9
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3 Suppl 3(Suppl 3), S131–9. doi:10.2215/CJN.04151206
- Cohen, M. M. J. (2006). The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *American journal of medical genetics. Part A*, 140(23), 2646–2706. doi:10.1002/ajmg.a.31368
- Companiononi, O., Mir, C., Garcia-Mayea, Y. and LLeonart, M. E. (2021). Targeting Sphingolipids for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 11. doi:10.3389/fonc.2021.745092

- Cosman, F., de Beur, S. J., LeBoff, M. S., Lewiecki, E. M., Tanner, B., Randall, S. and Lindsay, R. (2014). Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 25(10), 2359–2381. doi:10.1007/s00198-014-2794-2
- Crockett, J. C., Mellis, D. J., Scott, D. I. and Helfrich, M. H. (2011). New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 22(1), 1–20. doi:10.1007/s00198-010-1272-8
- Crowther, J. (2009). *The ELISA Guidebook* (Second Edi., C. 516). Vienna: Humana Press. doi:10.1007/978-1-60327-254-4
- Cummings, S. R., San Martin, J., McClung, M. R., Siris, E. S., Eastell, R., Reid, I. R., ... Christiansen, C. (2009). Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 361(8), 756–765. doi:10.1056/NEJMoa0809493
- Currey, J. D. (2003). The many adaptations of bone. *Journal of biomechanics*, 36(10), 1487–1495. doi:10.1016/s0021-9290(03)00124-6
- Czubowicz, K., Jęsko, H., Wencel, P., Lukiw, W. J. and Strosznajder, R. P. (2019). The Role of Ceramide and Sphingosine-1-Phosphate in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Molecular neurobiology*, 56(8), 5436–5455. doi:10.1007/s12035-018-1448-3
- Dallas, S. L., Prideaux, M. and Bonewald, L. F. (2013). The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocrine reviews*, 34(5), 658–690. doi:10.1210/er.2012-1026
- Dalle Carbonare, L., Arlot, M. E., Chavassieux, P. M., Roux, J. P., Portero, N. R. and Meunier, P. J. (2001). Comparison of trabecular bone microarchitecture and remodeling in glucocorticoid-induced and postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(1), 97–103. doi:10.1359/jbmr.2001.16.1.97
- Daneault, A., Prawitt, J., Fabien Soulé, V., Coxam, V. and Wittrant, Y. (2017). Biological effect of hydrolyzed collagen on bone metabolism. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(9), 1922–1937. doi:10.1080/10408398.2015.1038377
- Daum, G., Grabski, A. and Reidy, M. A. (2009). Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(10), 1439–1443. doi:10.1161/ATVBAHA.108.175240
- Deal, C. (2012). Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. *Current rheumatology reports*, 14(3), 231–237. doi:10.1007/s11926-012-0253-7

- Deodhar, A., Dore, R. K., Mandel, D., Schechtman, J., Shergy, W., Trapp, R., Ory, P. A., Peterfy, C. G., Fuerst, T., Wang, H., Zhou, L., Tsuji, W., & Newmark, R. (2010). Denosumab-mediated increase in hand bone mineral density associated with decreased progression of bone erosion in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis care & research*, 62(4), 569–574. doi:10.1002/acr.20004
- Ding, B. S., Yang, D., Swendeman, S. L., Christoffersen, C., Nielsen, L. B., Friedman, S. L., Powell, C. A., Hla, T., and Cao, Z. (2020) Aging Suppresses Sphingosine-1-Phosphate Chaperone ApoM in Circulation Resulting in Maladaptive Organ Repair. *Developmental cell*, 53(6), 677-690.e4. doi:10.1016/j.devcel.2020.05.024
- Ding, X., Zhang, Y., Huang, T., Xu, G., Peng, C., Chen, G., Kong, B., Friess, H., Shen, S., Lv, Y., Roberts, L. R., Wang, L., & Zou, X. (2019). Targeting sphingosine kinase 2 suppresses cell growth and synergizes with BCL2/BCL-XL inhibitors through NOXA-mediated MCL1 degradation in cholangiocarcinoma. *American journal of cancer research*, 9(3), 546–561.
- Doventas, A., Bolayirli, I. M., Incir, S., Yavuzer, H., Civelek, S., Erdinciler, D. S., Seven, A. (2015). Interrelationships between obesity and bone markers in post-menopausal women with either obesity or osteoporosis. *European Geriatric Medicine*, 6(1), 15–20. doi:https://doi.org/10.1016/j.eurger.2014.06.033
- Downey, P. A. and Siegel, M. I. (2006). Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical therapy*, 86(1), 77–91. doi:10.1093/ptj/86.1.77
- Drexler, Y., Molina, J., Mitrofanova, A., Fornoni, A. and Merscher, S. (2021). Sphingosine-1-Phosphate Metabolism and Signaling in Kidney Diseases. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 32(1), 9–31. doi:10.1681/ASN.2020050697
- Durmaz, A. ve Özdemir, Ç. (2022). Kemik Mineral Dansitesi ile Biyokimyasal Parametreler Arasındaki İlişki. *Osmangazi Journal of Medicine*, 44(4), 517–524.
- Eastell, R. and Hannon, R. A. (2008). Biomarkers of bone health and osteoporosis risk. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), 157–162. doi:10.1017/S002966510800699X
- Eastell, R., O'Neill, T. W., Hofbauer, L. C., Langdahl, B., Reid, I. R., Gold, D. T. and Cummings, S. R. (2016). Postmenopausal osteoporosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(1), 16069. doi:10.1038/nrdp.2016.69
- Eastell, R., Pigott, T., Gossiel, F., Naylor, K. E., Walsh, J. S. and Peel, N. F. A. (2018). DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Bone turnover markers: are they clinically useful? *European journal of endocrinology*, 178(1), R19–R31. doi:10.1530/EJE-17-0585
- Eastell, R. and Szulc, P. (2017). Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 5(11), 908–923. doi:10.1016/S2213-8587(17)30184-5

- Ebenezer, D. L., Fu, P., Suryadevara, V., Zhao, Y. and Natarajan, V. (2017). Epigenetic regulation of pro-inflammatory cytokine secretion by sphingosine 1-phosphate (S1P) in acute lung injury: Role of S1P lyase. *Advances in biological regulation*, 63, 156–166. doi:10.1016/j.jbior.2016.09.007
- Eghbali-Fatourehchi, G., Khosla, S., Sanyal, A., Boyle, W. J., Lacey, D. L. and Riggs, B. L. (2003). Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *The Journal of clinical investigation*, 111(8), 1221–1230. doi:10.1172/JCI17215
- Eisenhauer, A., Müller, M., Heuser, A., Kolevica, A., Glüer, C. C., Both, M., Laue, C., Hehn, U. V., Kloth, S., Shroff, R., & Schrezenmeir, J. (2019). Calcium isotope ratios in blood and urine: A new biomarker for the diagnosis of osteoporosis. *Bone Reports*, 10, 100200. doi:https://doi.org/10.1016/j.bonr.2019.100200
- Erdost, H. (2011). *Temel Histoloji*. (Aytekin ÖZER, Ed.) (2. bs.). Nobel Yayınevi.
- Eser, B. ve Sepici Dınçel, A. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*. shmyo.dergi@marmara.edu.tr: Marmara Üniversitesi. doi:10.26567/JOHSE.2018250150
- Eşrefoğlu, M. (2016). *Genel Histoloji* (2.). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- Faienza, M. F., Ventura, A., Marzano, F. and Cavallo, L. (2013). Postmenopausal osteoporosis: the role of immune system cells. *Clinical & developmental immunology*, 2013, 575936. doi:10.1155/2013/575936
- Faloni, A. P. S., Sasso-Cerri, E., Katchburian, E. and Cerri, P. S. (2007). Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *Journal of periodontal research*, 42(3), 193–201. doi:10.1111/j.1600-0765.2006.00932.x
- Fan, J., Jahed, V. and Klavins, K. (2021). Metabolomics in Bone Research. *Metabolites*, 11(7). doi:10.3390/metabo11070434
- Fassio, A., Adami, G., Gatti, D., Orsolini, G., Giollo, A., Idolazzi, L., Benini, C., Vantaggiato, E., Rossini, M., & Viapiana, O. (2019). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in patients with early rheumatoid arthritis results in acute changes of bone modulators. *International immunopharmacology*, 67, 487–489. doi:10.1016/j.intimp.2018.12.050
- Felsenberg, D. and Boonen, S. (2005). The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clinical therapeutics*, 27(1), 1–11. doi:10.1016/j.clinthera.2004.12.020
- Feng, X. and McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology*, 6, 121–145. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130203
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarrón, M. and Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 11(1), E47-51.

- Ferreira, A., Alho, I., Casimiro, S. and Costa, L. (2015). Bone remodeling markers and bone metastases: From cancer research to clinical implications. *BoneKEy reports*, 4, 668. doi:10.1038/bonekey.2015.35
- Ferron, M., Hinoi, E., Karsenty, G. and Ducy, P. (2008). Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5266–5270. doi:10.1073/pnas.0711119105
- Fink, H. A., Litwack-Harrison, S., Taylor, B. C., Bauer, D. C., Orwoll, E. S., Lee, C. G., Barrett-Connor, E., Schousboe, J. T., Kado, D. M., Garimella, P. S., Ensrud, K. E., and Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study Group (2016). Clinical utility of routine laboratory testing to identify possible secondary causes in older men with osteoporosis: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 27(1), 331–338. doi:10.1007/s00198-015-3356-y
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J. and Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed research international*, 2015, 421746. doi:10.1155/2015/421746
- Frost, K., Naylor, A. J. and McGettrick, H. M. (2023). The Ying and Yang of Sphingosine-1-Phosphate Signalling within the Bone. *International journal of molecular sciences*, 24(8). doi:10.3390/ijms24086935
- Funato, K., Vallée, B. and Riezman, H. (2002). Biosynthesis and trafficking of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 41(51), 15105–15114. doi:10.1021/bi026616d
- Futerman, A. H., Stieger, B., Hubbard, A. L. and Pagano, R. E. (1990). Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *The Journal of biological chemistry*, 265(15), 8650–8657.
- Galadari, S., Wu, B. X., Mao, C., Roddy, P., El Bawab, S. and Hannun, Y. A. (2006). Identification of a novel amidase motif in neutral ceramidase. *The Biochemical journal*, 393(Pt 3), 687–695. doi:10.1042/BJ20050682
- Galvani, S., Sanson, M., Blaho, V. A., Swendeman, S. L., Obinata, H., Conger, H., Dahlbäck, B., Kono, M., Proia, R. L., Smith, J. D., & Hla, T. (2015). HDL-bound sphingosine 1-phosphate acts as a biased agonist for the endothelial cell receptor S1P1 to limit vascular inflammation. *Science signaling*, 8(389), ra79. doi:10.1126/scisignal.aaa2581
- Ganbaatar, B., Fukuda, D., Shinohara, M., Yagi, S., Kusunose, K., Yamada, H., Soeki, T., Hirata, K. I., & Sata, M. (2021). Inhibition of S1P Receptor 2 Attenuates Endothelial Dysfunction and Inhibits Atherogenesis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 28(6), 630–642. doi:10.5551/jat.54916
- Gao, L.-X., Jin, H.-T., Xue, X.-M., Wang, J. and Liu, D.-G. (2015). Osteoporosis in rheumatic diseases. *World J Rheumatol*, 5(1), 23–35.

- Gao, P. and Smith, C. D. (2011). Ablation of sphingosine kinase-2 inhibits tumor cell proliferation and migration. *Molecular cancer research : MCR*, 9(11), 1509–1519. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0336
- García-Parra, M. I., Jiménez-Coello, M., Carrillo-Ávila, B. A., Esquivel, E. A. S., Martínez-Aguilar, V. M. and Chávez-Cortez, E. G. (2021). Quantification of Sphingosine-1-Phosphate (S1P) in Patients with Periodontitis Stage II Grade B. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*.
- Gardella, T. J., Nissenson, R. A. and Jüppner, H. (2018). Parathyroid Hormone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* içinde (ss. 205–211). John Wiley & Sons, Ltd. doi:https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch27
- Garnero, P. (2015). Erratum to: The Role of Collagen Organization on the Properties of Bone. *Calcified Tissue International*, 97(3), 241. doi:10.1007/s00223-015-0011-8
- Geusens, P. (2012). The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 4(4), 225–233. doi:10.1177/1759720X12438080
- Glass, D. A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J. D., Starbuck, M., Patel, M. S., Clevers, H., Taketo, M. M., Long, F., McMahon, A. P., Lang, R. A., & Karsenty, G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental cell*, 8(5), 751–764. doi:10.1016/j.devcel.2005.02.017
- Gravallese, E M, Harada, Y., Wang, J. T., Gorn, A. H., Thornhill, T. S. and Goldring, S. R. (1998). Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology*, 152(4), 943–951.
- Gravallese, Ellen M and Goldring, S. R. (2018). Inflammation-Induced Bone Loss in the Rheumatic Diseases. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* içinde (ss. 459–466). John Wiley & Sons, Ltd. doi:https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch58
- Green, C. D., Maceyka, M., Cowart, L. A. and Spiegel, S. (2021). Sphingolipids in metabolic disease: The good, the bad, and the unknown. *Cell metabolism*, 33(7), 1293–1306. doi:10.1016/j.cmet.2021.06.006
- Greenblatt, M. B., Tsai, J. N. and Wein, M. N. (2017). Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease. *Clinical chemistry*, 63(2), 464–474. doi:10.1373/clinchem.2016.259085
- Grewe, J. M., Knapstein, P.-R., Donat, A., Jiang, S., Smit, D. J., Xie, W. and Keller, J. (2022). The role of sphingosine-1-phosphate in bone remodeling and osteoporosis. *Bone research*, 10(1), 34. doi:10.1038/s41413-022-00205-0
- Guder, C., Gravius, S., Burger, C., Wirtz, D. C. and Schildberg, F. A. (2020). Osteoimmunology: A Current Update of the Interplay Between Bone and the Immune System. *Frontiers in immunology*, 11, 58. doi:10.3389/fimmu.2020.00058

- Guijas, C., Montenegro-Burke, J. R., Warth, B., Spilker, M. E. and Siuzdak, G. (2018). Metabolomics activity screening for identifying metabolites that modulate phenotype. *Nature biotechnology*, 36(4), 316–320. doi:10.1038/nbt.4101
- Gupta, P., Taiyab, A., Hussain, A., Alajmi, M. F., Islam, A. and Hassan, M. I. (2021). Targeting the Sphingosine Kinase/Sphingosine-1-Phosphate Signaling Axis in Drug Discovery for Cancer Therapy. *Cancers*, 13(8). doi:10.3390/cancers13081898
- Gurdol, F. (2019). *Biyokimya 4. Baskı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Gussone, N., Schmitt, A.-D., Heuser, A., Wombacher, F., Dietzel, M., Tipper, E., ... Bohm, F. (2016). *Calcium stable isotope geochemistry*. Springer.
- Gustin, D. J., Li, Y., Brown, M. L., Min, X., Schmitt, M. J., Wanska, M., Wang, X., Connors, R., Johnstone, S., Cardozo, M., Cheng, A. C., Jeffries, S., Franks, B., Li, S., Shen, S., Wong, M., Wesche, H., Xu, G., Carlson, T. J., Plant, M., Wang, Z. (2013). Structure guided design of a series of sphingosine kinase (SphK) inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(16), 4608–4616. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.030
- Gutbier, B., Schönrock, S. M., Ehrler, C., Haberberger, R., Dietert, K., Gruber, A. D., ... Witzernath, M. (2018). Sphingosine Kinase 1 Regulates Inflammation and Contributes to Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia via the Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2. *Critical care medicine*, 46(3), e258–e267. doi:10.1097/CCM.0000000000002916
- Guyton AC, H. J. (2006). *Textbook of Medical Physiology* (11. bs.). Philadelphia: Elsevier.
- Hait, N. C., Allegood, J., Maceyka, M., Strub, G. M., Harikumar, K. B., Singh, S. K., Luo, C., Marmorstein, R., Kordula, T., Milstien, S., and Spiegel, S. (2009). Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5945), 1254–1257. doi:10.1126/science.1176709
- Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(2), 139–150. doi:10.1038/nrm2329
- Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(3), 175–191. doi:10.1038/nrm.2017.107
- Harris, K., Zagar, C. A. and Lawrence, K. V. (2023). Osteoporosis: Common Questions and Answers. *American family physician*, 107(3), 238–246.
- Harrison, K. D., Hiebert, B. D., Panahifar, A., Andronowski, J. M., Ashique, A. M., King, G. A., Arnason, T., Swekla, K. J., Pivonka, P., & Cooper, D. M. (2020). Cortical Bone Porosity in Rabbit Models of Osteoporosis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 35(11), 2211–2228. doi:10.1002/jbmr.4124

- He, W.-T., Wang, B., Li, M., Liang, B.-C., Shi, Y.-Z., Li, X.-Y., Shi, X.-L. (2016). Weak cation exchange magnetic beads coupled with MALDI-TOF-MS in screening serum markers in perimenopausal women with osteopenia. *Int J Clin Exp Med*, 9(5), 8136–8144.
- Henry, J. P. and Bordoni, B. (2023). Histology, Osteoblasts. Treasure Island (FL).
- Holick, M. F. (2004). Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*, 79(3), 362–371. doi:10.1093/ajcn/79.3.362
- Holick, M. F. and Chen, T. C. (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *The American journal of clinical nutrition*, 87(4), 1080S–6S. doi:10.1093/ajcn/87.4.1080S
- Holland, W. L., Miller, R. A., Wang, Z. V., Sun, K., Barth, B. M., Bui, H. H., Davis, K. E., Bikman, B. T., Halberg, N., Rutkowski, J. M., Wade, M. R., Tenorio, V. M., Kuo, M. S., Brozinick, J. T., Zhang, B. B., Birnbaum, M. J., Summers, S. A., & Scherer, P. E. (2011). Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nature medicine*, 17(1), 55–63. doi:10.1038/nm.2277
- Hou, Y. C., Wu, C. C., Liao, M. T., Shyu, J. F., Hung, C. F., Yen, T. H., Lu, C. L., & Lu, K. C. (2018). Role of nutritional vitamin D in osteoporosis treatment. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 484, 179–191. doi:10.1016/j.cca.2018.05.035
- Hsu, S.-C., Huang, W.-C., Liu, C.-T., Hsu, Y.-P., Chang, J.-H., Huang, S.-K. and Hsu, C.-W. (2019). Sphingosine-1-phosphate as an indicator for deciding the use of adjuvant corticosteroids therapy in community-acquired pneumonia (sphingosine-1-phosphate and pneumonia trial): Study protocol for a randomized, placebo-controlled trial. *Medicine*, 98(38), e17278. doi:10.1097/MD.00000000000017278
- Ishii, M., Egen, J. G., Klauschen, F., Meier-Schellersheim, M., Saeki, Y., Vacher, J., Proia, R. L., & Germain, R. N. (2009). Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature*, 458(7237), 524–528. doi:10.1038/nature07713
- Ishii, M. and Kikuta, J. (2013). Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(1), 223–227. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.06.002
- Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A. and Igarashi, Y. (2007). Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 357(1), 212–217. doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.123
- Jee, W. S. and Yao, W. (2001). Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 1(3), 193–207.

- Jin, S., Hsieh, E., Peng, L., Yu, C., Wang, Y., Wu, C., Wang, Q., Li, M., & Zeng, X. (2018). Incidence of fractures among patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 29(6), 1263–1275. doi:10.1007/s00198-018-4473-1
- Junqueira LC, C. J. (2013). *Basic Histology text&atlas* (10. bs.). USA: International Yayıncılık.
- Kanis, J. A. (2008). *Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level*. WHO Scientific Group Technical Report. WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield Medical School. <https://books.google.com.tr/books?id=kffAYgEACAAJ> adresinden erişildi.
- Kanis, J. A., Cooper, C., Rizzoli, R. and Reginster, J.-Y. (2019). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 30(1), 3–44. doi:10.1007/s00198-018-4704-5
- Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G. and Delany, A. M. (2010). miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), 25221–25231. doi:10.1074/jbc.M110.116137
- Keller, J., Catala-Lehnen, P., Huebner, A. K., Jeschke, A., Heckt, T., Lueth, A., Krause, M., Koehne, T., Albers, J., Schulze, J., Schilling, S., Haberland, M., Denninger, H., Neven, M., Hermans-Borgmeyer, I., Streichert, T., Breer, S., Barvencik, F., Levkau, B., Rathkolb, B., ... Amling, M. (2014). Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nature communications*, 5, 5215. doi:10.1038/ncomms6215
- Khan, I. A. and Bordoni, B. (2023). *Histology, Osteoclasts*. Treasure Island (FL).
- Kim, B. J., Koh, J. M., Lee, S. Y., Lee, Y. S., Lee, S. H., Lim, K. H., Cho, E. H., Kim, S. W., Kim, T. H., Kim, S. Y., & Kim, G. S. (2012). Plasma sphingosine 1-phosphate levels and the risk of vertebral fracture in postmenopausal women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(10), 3807–3814. doi:10.1210/jc.2012-2346
- Kim, J.-M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B. and Shim, J.-H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, 9(9). doi:10.3390/cells9092073
- Kim, R. H., Takabe, K., Milstien, S. and Spiegel, S. (2009). Export and functions of sphingosine-1-phosphate. *Biochimica et biophysica acta*, 1791(7), 692–696. doi:10.1016/j.bbailip.2009.02.011
- King, M. W. (2014). *Integrative medical biochemistry: examination and board review*. McGraw-Hill Education.

- Kitano, M., Hla, T., Sekiguchi, M., Kawahito, Y., Yoshimura, R., Miyazawa, K., Iwasaki, T. and Sano, H. (2006),. Sphingosine 1-phosphate/sphingosine 1-phosphate receptor 1 signaling in rheumatoid synovium: regulation of synovial proliferation and inflammatory gene expression. *Arthritis and rheumatism*, 54(3), 742–753. doi:10.1002/art.21668
- Kışlak, P. ve Genç, F. (2019). Osteoporoz ve Tedavisi. *Lectio Scientific*. Aziz Mahmut Hudayi Mh. Halk Cd. No 50/B Üsküdar/İstanbul TURKEY: Lectio Yayınevi.
- Kobza, A. O., Herman, D., Papaioannou, A., Lau, A. N. and Adachi, J. D. (2021). Understanding and Managing Corticosteroid-Induced Osteoporosis. *Open access rheumatology : research and reviews*, 13, 177–190. doi:10.2147/OARRR.S282606
- Konieczka, P. and Namieśnik, J. (2018). *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach*. doi:10.1201/9781315295015
- Konukoglu, D. (2019). Bone markers. *International Journal of Medical Biochemistry*. doi:10.14744/ijmb.2019.60362
- Kourkouvelis, N., Balatsoukas, I. and Tzaphlidou, M. (2012). Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. *Journal of biological physics*, 38(2), 279–291. doi:10.1007/s10867-011-9247-3
- Krabben, A., Stomp, W., van der Heijde, D. M., van Nies, J. A., Bloem, J. L., Huizinga, T. W., Reijnerse, M., & van der Helm-van Mil, A. H. (2013). MRI of hand and foot joints of patients with anticitrullinated peptide antibody positive arthralgia without clinical arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(9), 1540–1544. doi:10.1136/annrheumdis-2012-202628
- Książek, M., Chacińska, M., Chabowski, A. and Baranowski, M. (2015). Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *Journal of lipid research*, 56(7), 1271–1281. doi:10.1194/jlr.R059543
- Kubota, T., Michigami, T. and Ozono, K. (2009). Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 27(3), 265–271. doi:10.1007/s00774-009-0064-8
- Kulie, T., Groff, A., Redmer, J., Hounshell, J. and Schrager, S. (2009). Vitamin D: an evidence-based review. *Journal of the American Board of Family Medicine : JABFM*, 22(6), 698–706. doi:10.3122/jabfm.2009.06.090037
- Kuo, T.-R. and Chen, C.-H. (2017). Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. *Biomarker research*, 5, 18. doi:10.1186/s40364-017-0097-4
- Kyd, P. A., Vooght, K. D., Kerkhoff, F., Thomas, E. and Fairney, A. (1998). Clinical usefulness of bone alkaline phosphatase in osteoporosis. *Annals of clinical biochemistry*, 35 (Pt 6), 717–725. doi:10.1177/000456329803500603

- Laboratories, I. (2019). *ELISA technical guide*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.idexx.com/files/elisa-technical-guide.pdf adresinden erişildi.
- Lang, T. F., Guglielmi, G., van Kuijk, C., De Serio, A., Cammisa, M. and Genant, H. K. (2002). Measurement of bone mineral density at the spine and proximal femur by volumetric quantitative computed tomography and dual-energy X-ray absorptiometry in elderly women with and without vertebral fractures. *Bone*, 30(1), 247–250. doi:10.1016/s8756-3282(01)00647-0
- Lange, U., Teichmann, J., Müller-Ladner, U. and Strunk, J. (2005). Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha antibody: a prospective open-label pilot study. *Rheumatology (Oxford, England)*, 44(12), 1546–1548. doi:10.1093/rheumatology/kei082
- Lani, A., Kourkouvelis, N., Baliouskas, G. and Tzaphlidou, M. (2014). The effect of calcium and vitamin D supplementation on osteoporotic rabbit bones studied by vibrational spectroscopy. *Journal of biological physics*, 40(4), 401–412. doi:10.1007/s10867-014-9358-8
- LeBoff, M. S., Greenspan, S. L., Insogna, K. L., Lewiecki, E. M., Saag, K. G., Singer, A. J. and Siris, E. S. (2022). The clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. *Osteoporosis International*, 33(10), 2049–2102. doi:10.1007/s00198-021-05900-y
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., & Karsenty, G. (2007). Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130(3), 456–469. doi:10.1016/j.cell.2007.05.047
- Lee, S. H., Lee, J. Y., Lim, K.-H., Lee, Y.-S., Kim, S.-H., Choi, S., ... Koh, J.-M. (2020). High Circulating Sphingosine 1-Phosphate is a Risk Factor for Osteoporotic Fracture Independent of Fracture Risk Assessment Tool. *Calcified tissue international*, 107(4), 362–370. doi:10.1007/s00223-020-00731-1
- Lee, S. H., Lee, S. Y., Lee, Y. S., Kim, B. J., Lim, K. H., Cho, E. H., Kim, S. W., Koh, J. M., & Kim, G. S. (2012). Higher circulating sphingosine 1-phosphate levels are associated with lower bone mineral density and higher bone resorption marker in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(8), E1421–E1428. https://doi.org/10.1210/jc.2012-1044
- Lelovas, P. P., Xanthos, T. T., Thoma, S. E., Lyritis, G. P. and Dontas, I. A. (2008). The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative medicine*, 58(5), 424–430.
- Lewis, A. C., Wallington-Beddoe, C. T., Powell, J. A. and Pitson, S. M. (2018). Targeting sphingolipid metabolism as an approach for combination therapies in haematological malignancies. *Cell death discovery*, 4, 72. doi:10.1038/s41420-018-0075-0

- Linn, S. C., Kim, H. S., Keane, E. M., Andras, L. M., Wang, E. and Merrill, A. H. J. (2001). Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption. *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 6), 831–835. doi:10.1042/0300-5127:0290831
- Liu, J., Wu, C., Wang, D., Wang, L. and Sun, S. (2016). Acetylsalicylic acid combined with diclofenac inhibits cartilage degradation in rabbit models of osteoarthritis. *Experimental and therapeutic medicine*, 12(4), 2177–2182. doi:10.3892/etm.2016.3560
- Liu, L. and Webster, T. J. (2016). In Situ Sensor Advancements for Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Treatment. *Current osteoporosis reports*, 14(6), 386–395. doi:10.1007/s11914-016-0339-7
- Llorente, I., García-Castañeda, N., Valero, C., González-Álvaro, I. and Castañeda, S. (2020). Osteoporosis in Rheumatoid Arthritis: Dangerous Liaisons. *Frontiers in medicine*, 7, 601618. doi:10.3389/fmed.2020.601618
- Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, J. L. G. (2012). *Practical HPLC Method Development* (2nd Editio.). Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Longhini, R., Aparecida de Oliveira, P., Sasso-Cerri, E. and Cerri, P. S. (2014). Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *Journal of periodontology*, 85(8), 1115–1125. doi:10.1902/jop.2013.130453
- Lorentzon, M., Branco, J., Brandi, M. L., Bruyère, O., Chapurlat, R., Cooper, C., Cortet, B., Diez-Perez, A., Ferrari, S., Gasparik, A., Herrmann, M., Jorgensen, N. R., Kanis, J., Kaufman, J. M., Laslop, A., Locquet, M., Matijevic, R., McCloskey, E., Minisola, S., Pikner, R., ... Cavalier, E. (2019). Algorithm for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in the Diagnosis, Assessment and Follow-Up of Treatment for Osteoporosis. *Advances in therapy*, 36(10), 2811–2824. doi:10.1007/s12325-019-01063-9
- Lucaciu, A., Brunkhorst, R., Pfeilschifter, J. M., Pfeilschifter, W. and Subburayalu, J. (2020). The S1P–S1PR Axis in Neurological Disorders—Insights into Current and Future Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(6). doi:10.3390/cells9061515
- Lyu, H., Jundi, B., Xu, C., Tedeschi, S. K., Yoshida, K., Zhao, S., Solomon, D. H. (2019). Comparison of Denosumab and Bisphosphonates in Patients With Osteoporosis: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 104(5), 1753–1765. doi:10.1210/jc.2018-02236
- Maceyka, M., Harikumar, K. B., Milstien, S. and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in cell biology*, 22(1), 50–60. doi:10.1016/j.tcb.2011.09.003
- Maceyka, M., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007). Measurement of mammalian sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase activity in vitro and in vivo. *Methods in enzymology*, 434, 243–256. doi:10.1016/S0076-6879(07)34013-5

- Maczis, M. A., Maceyka, M., Waters, M. R., Newton, J., Singh, M., Rigsby, M. F., Turner, T. H., Alzubi, M. A., Harrell, J. C., Milstien, S., & Spiegel, S. (2018). Sphingosine kinase 1 activation by estrogen receptor α 36 contributes to tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of lipid research*, 59(12), 2297–2307. doi:10.1194/jlr.M085191
- Maeda, K., Takahashi, N. and Kobayashi, Y. (2013). Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 91(1), 15–23. doi:10.1007/s00109-012-0974-0
- Magne, D., Bluteau, G., Faucheu, C., Palmer, G., Vignes-Colombeix, C., Pilet, P., Rouillon, T., Caverzasio, J., Weiss, P., Daculsi, G., & Guicheux, J. (2003). Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(8), 1430–1442. doi:10.1359/jbmr.2003.18.8.1430
- Marco, F., Milena, F., Gianluca, G. and Vittoria, O. (2005). Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron (Oxford, England: 1993)*, 36(7–8), 630–644. doi:10.1016/j.micron.2005.07.008
- Marotte, H., Pallot-Prades, B., Grange, L., Gaudin, P., Alexandre, C. and Miossec, P. (2007). A 1-year case-control study in patients with rheumatoid arthritis indicates prevention of loss of bone mineral density in both responders and nonresponders to infliximab. *Arthritis research & therapy*, 9(3), R61. doi:10.1186/ar2219
- Martin-Monge, E., Tresguerres, I. F., Blanco, L., Khraisat, A., Rodríguez-Torres, R. and Tresguerres, J. A. F. (2011). Validation of an osteoporotic animal model for dental implant analyses: an in vivo densitometric study in rabbits. *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 26(4), 725–730.
- Martini, F. H., Nath, J. L. and Bartholomew, E. F. (2017). *Fundamentals of Anatomy & Physiology, Global Edition* (11. bs.). PEARSON EDUCATION, INC.
- McClung, M. R. (2019). Efficacy and Safety of Osteoporosis Treatment. S. L. Ferrari and C. Roux (Ed.), *Pocket Reference to Osteoporosis içinde* (ss. 43–57). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-26757-9_5
- McClung, M. R., Lewiecki, E. M., Cohen, S. B., Bolognese, M. A., Woodson, G. C., Moffett, A. H., Peacock, M., Miller, P. D., Lederman, S. N., Chesnut, C. H., Lain, D., Kivitz, A. J., Holloway, D. L., Zhang, C., Peterson, M. C., Bekker, P. J., and AMG 162 Bone Loss Study Group (2006). Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *The New England journal of medicine*, 354(8), 821–831. doi:10.1056/NEJMoa044459
- McInnes, I. B. and Schett, G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Immunology*, 7(6), 429–442. doi:10.1038/nri2094
- McMaster, M. C. (2005). *LC/MS: A Practical User's Guide*. Canada: Wiley-Interscience.

- MediRabbit. (2023). Complete blood count and biochemistry reference values in rabbits. *MediRabbit.com*. http://www.medirabbit.com/EN/Hematology/blood_chemistry.htm adresinden erişildi.
- Meednu, N., Zhang, H., Owen, T., Sun, W., Wang, V., Cistrone, C., Anolik, J. H. (2016). Production of RANKL by Memory B Cells: A Link Between B Cells and Bone Erosion in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 68(4), 805–816. doi:10.1002/art.39489
- Melkko, J., Kauppila, S., Niemi, S., Risteli, L., Haukipuro, K. A., Jukkola, A. and Risteli, J. P. (1996). Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clinical chemistry*, 42 6 Pt 1, 947–954.
- Melsen, F. and Steiniche, T. (1993). Bone histomorphometry. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 3 Suppl 1, 98–99. doi:10.1007/BF01621876
- Mendelson, K., Evans, T. and Hla, T. (2014). Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development (Cambridge, England)*, 141(1), 5–9. doi:10.1242/dev.094805
- Mescher, A. L. (2021). Bone. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, 16e içinde* . New York, NY: McGraw Hill. accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1184199904 adresinden erişildi.
- Meshcheryakova, A., Mechtcheriakova, D. and Pietschmann, P. (2017). Sphingosine 1-phosphate signaling in bone remodeling: multifaceted roles and therapeutic potential. *Expert opinion on therapeutic targets*, 21(7), 725–737. doi:10.1080/14728222.2017.1332180
- Mikuni-Takagaki, Y., Kakai, Y., Satoyoshi, M., Kawano, E., Suzuki, Y., Kawase, T. and Saito, S. (1995). Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10(2), 231–242. doi:10.1002/jbmr.5650100209
- Miller, P. D. (2011). A review of the efficacy and safety of denosumab in postmenopausal women with osteoporosis. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 3(6), 271–282. doi:10.1177/1759720X11424220
- Miller, P. D. (2018). Management of Osteoporosis in Patients with Chronic Kidney Disease. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism içinde* (ss. 505–509). John Wiley & Sons, Ltd. doi:https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch65
- Miyanishi, K., Yamamoto, T., Irisa, T., Motomura, G., Jingushi, S., Sueishi, K. and Iwamoto, Y. (2005). Effects of different corticosteroids on the development of osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology*, 44(3), 332–336. doi:10.1093/rheumatology/keh505

- Mizuno, A., Kanno, T., Hoshi, M., Shibata, O., Yano, K., Fujise, N., Kinoshita, M., Yamaguchi, K., Tsuda, E., Murakami, A., Yasuda, H., & Higashio, K. (2002). Transgenic mice overexpressing soluble osteoclast differentiation factor (sODF) exhibit severe osteoporosis. *Journal of bone and mineral metabolism*, 20(6), 337–344. doi:10.1007/s007740200049
- Mohammad, A., Lohan, D., Bergin, D., Mooney, S., Newell, J., O'Donnell, M., Coughlan, R. J., & Carey, J. J. (2014). The prevalence of vertebral fracture on vertebral fracture assessment imaging in a large cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, 53(5), 821–827. doi:10.1093/rheumatology/ket353
- Molino, G., Montalbano, G., Pontremoli, C., Fiorilli, S. and Vitale-Brovarone, C. (2020). Imaging Techniques for the Assessment of the Bone Osteoporosis-Induced Variations with Particular Focus on Micro-CT Potential. *Applied Sciences*, 10(24). doi:10.3390/app10248939
- Montero, A., Okada, Y., Tomita, M., Ito, M., Tsurukami, H., Nakamura, T., Hurley, M. M. (2000). Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *The Journal of clinical investigation*, 105(8), 1085–1093. doi:10.1172/JCI8641
- Montón, C., Ewig, S., Torres, A., El-Ebiary, M., Filella, X., Rañó, A. and Xaubet, A. (1999). Role of glucocorticoids on inflammatory response in nonimmunosuppressed patients with pneumonia: a pilot study. *The European respiratory journal*, 14(1), 218–220. doi:10.1034/j.1399-3003.1999.14a37.x
- Moosavi, M. and Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. doi:10.5772/intechopen.72932
- Moudgil, K. D., Kim, P. and Brahn, E. (2011). Advances in rheumatoid arthritis animal models. *Current rheumatology reports*, 13(5), 456–463. doi:10.1007/s11926-011-0200-z
- Mu, P., Qu, P., Li, Y., Feng, J., Ma, X., Xiong, F. and Hu, Y. (2021). *Preparation for Animal Models of Osteoporosis: a Systematic Review*. doi:10.21203/rs.3.rs-832368/v1
- Murakami, A., Takasugi, H., Ohnuma, S., Koide, Y., Sakurai, A., Takeda, S., Hasegawa, T., Sasamori, J., Konno, T., Hayashi, K., Watanabe, Y., Mori, K., Sato, Y., Takahashi, A., Mochizuki, N., & Takakura, N. (2010). Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist. *Molecular pharmacology*, 77(4), 704–713. doi:10.1124/mol.109.061481
- Nahian, A. and Davis, D. D. (2023). Histology, Osteoprogenitor Cells. Treasure Island (FL).
- Neubauer, H. A. and Pitson, S. M. (2013). Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *The FEBS journal*, 280(21), 5317–5336. doi:10.1111/febs.12314

- Nieuwenhuis, B., Lüth, A., Chun, J., Huwiler, A., Pfeilschifter, J., Schäfer-Korting, M. and Kleuser, B. (2009). Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype S1P(3) in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87(6), 645–657. doi:10.1007/s00109-009-0468-x
- NIH, A. R. A. C. (ARAC). (2022). *Guidelines for the use of adjuvants in research-special emphasis on Freund's adjuvant.* Maryland. https://oacu.oir.nih.gov/system/files/media/file/2022-04/b8_adjuvants.pdf adresinden erişildi.
- Nishi, T., Kobayashi, N., Hisano, Y., Kawahara, A. and Yamaguchi, A. (2014). Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(5), 759–765. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.07.012>
- Obinata, H. and Hla, T. (2019). Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *International immunology*, 31(9), 617–625. doi:10.1093/intimm/dxz037
- Oelzner, P., Franke, S., Lehmann, G., Eidner, T., Müller, A., Wolf, G. and Hein, G. (2007). Soluble receptor activator of NFkappa B-ligand and osteoprotegerin in rheumatoid arthritis - relationship with bone mineral density, disease activity and bone turnover. *Clinical Rheumatology*, 26(12), 2127–2135. doi:10.1007/s10067-007-0639-5
- Oelzner, P., Müller, A., Deschner, F., Hüller, M., Abendroth, K., Hein, G. and Stein, G. (1998). Relationship between disease activity and serum levels of vitamin D metabolites and PTH in rheumatoid arthritis. *Calcified tissue international*, 62(3), 193–198. doi:10.1007/s002239900416
- Ogretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 33–50. doi:10.1038/nrc.2017.96
- Ogretmen, B. and Hannun, Y. A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature reviews. Cancer*, 4(8), 604–616. doi:10.1038/nrc1411
- Okura, T., Marutsuka, K., Hamada, H., Sekimoto, T., Fukushima, T., Asada, Y., Chosa, E. (2008). Therapeutic efficacy of intra-articular adrenomedullin injection in antigen-induced arthritis in rabbits. *Arthritis research & therapy*, 10(6), R133. doi:10.1186/ar2550
- Olivera, A., Allende, M. L. and Proia, R. L. (2013). Shaping the landscape: metabolic regulation of S1P gradients. *Biochimica et biophysica acta*, 1831(1), 193–202. doi:10.1016/j.bbalip.2012.06.007
- Olivera, A., Mizugishi, K., Tikhonova, A., Ciaccia, L., Odom, S., Proia, R. L. and Rivera, J. (2007). The sphingosine kinase-sphingosine-1-phosphate axis is a determinant of mast cell function and anaphylaxis. *Immunity*, 26(3), 287–297. doi:10.1016/j.immuni.2007.02.008

- Orsolini, G., Fassio, A., Rossini, M., Adami, G., Giollo, A., Caimmi, C., Idolazzi, L., Viapiana, O., & Gatti, D. (2019). Effects of biological and targeted synthetic DMARDs on bone loss in rheumatoid arthritis. *Pharmacological research*, 147, 104354. doi:10.1016/j.phrs.2019.104354
- Osteoporoz ve Diğer Metabolik Kemik Hastalıkları Çalışma Grubu, T. E. ve M. D. (2022). *Osteoporoz Ve Metabolik Kemik Hastalıkları Tanı ve Tedavi Kılavuzu*. Ankara. https://file.temd.org.tr/Uploads/publications/guides/documents/OSTEOPOROZ_MK_H2022.pdf?a=1 adresinden erişildi.
- Oury, F., Khrimian, L., Denny, C. A., Gardin, A., Chamouni, A., Goeden, N., Huang, Y. Y., Lee, H., Srinivas, P., Gao, X. B., Suyama, S., Langer, T., Mann, J. J., Horvath, T. L., Bonnin, A., and Karsenty, G. (2013). Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell*, 155(1), 228–241. doi:10.1016/j.cell.2013.08.042
- Oury, F., Sumara, G., Sumara, O., Ferron, M., Chang, H., Smith, C. E., Hermo, L., Suarez, S., Roth, B. L., Ducy, P., and Karsenty, G. (2011). Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell*, 144(5), 796–809. doi:10.1016/j.cell.2011.02.004
- Özkan, C., Kaya, A. ve Akgul, Y. (2012). Normal Values of Hematological and Some Biochemical Parameters in Serum and Urine of New Zealand White Rabbits. *World Rabbit Science*, 20, 253–259. doi:10.4995/wrs.2012.1229
- Özkan, Ö. ve Pekkaya, S. (2019). Normal values of biochemical parameters in serum of New Zealand White Rabbits. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 76(2), 157–162. doi:10.5505/TurkHijyen.2018.53254
- Özkan, Y., Savaşer, A., Taş, Ç., K.Özkan, C., Bayrak, Z., Eşim, Ö. ve A.Özkan, S. (2011). *İlaçların Analiz ve Kalite Kontrollerinde Kullanılan Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyon)*. Ankara: GATA Basımevi.
- Palumbo, C., Palazzini, S., Zaffe, D. and Marotti, G. (1990). Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Acta anatomica*, 137(4), 350–358. doi:10.1159/000146907
- Park-Min, K.-H. and Lorenzo, J. (2022). Osteoclasts: Other functions. *Bone*, 165, 116576. doi:https://doi.org/10.1016/j.bone.2022.116576
- Peavy DE. (2003). Endocrine regulation of calcium, phosphate, and bone metabolism. *Medical Physiology*. içinde (s. 634 48.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Pederson, L., Ruan, M., Westendorf, J. J., Khosla, S. and Oursler, M. J. (2008). Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(52), 20764–20769. doi:10.1073/pnas.0805133106
- Peluso, G., Michelutti, A., Bosello, S., Gremese, E., Toluoso, B. and Ferraccioli, G. (2011). Clinical and ultrasonographic remission determines different chances of relapse in early and long standing rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 70(1), 172–175. doi:10.1136/ard.2010.129924

- Permuy, M., López-Peña, M., Muñoz, F. and González-Cantalapiedra, A. (2019). Rabbit as model for osteoporosis research. *Journal of bone and mineral metabolism*, 37(4), 573–583. doi:10.1007/s00774-019-01007-x
- Phan, T. C. A., Xu, J. and Zheng, M. H. (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and histopathology*, 19(4), 1325–1344. doi:10.14670/HH-19.1325
- Plotkin, L. I. (2014). Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Current osteoporosis reports*, 12(1), 121–126. doi:10.1007/s11914-014-0194-3
- Pyne, N. J. and Pyne, S. (2020). Recent advances in the role of sphingosine 1-phosphate in cancer. *FEBS letters*, 594(22), 3583–3601. doi:10.1002/1873-3468.13933
- Pyne, S., Lee, S. C., Long, J. and Pyne, N. J. (2009). Role of sphingosine kinases and lipid phosphate phosphatases in regulating spatial sphingosine 1-phosphate signalling in health and disease. *Cellular signalling*, 21(1), 14–21. doi:10.1016/j.cellsig.2008.08.008
- Qiu, L., Jiang, Y., Luo, Y., Zhang, L. and Xu, H. (2012). Antigen-induced arthritis in rabbits: a comparative study between high-resolution ultrasound and contrast-enhanced ultrasound and pathologic findings. *Rheumatology international*, 32(6), 1569–1580. doi:10.1007/s00296-011-1817-y
- Qu, X.-L., Zheng, B., Chen, T.-Y., Cao, Z.-R., Qu, B. and Jiang, T. (2020). Bone Turnover Markers and Bone Mineral Density to Predict Osteoporotic Fractures in Older Women: A Retrospective Comparative Study. *Orthopaedic surgery*, 12(1), 116–123. doi:10.1111/os.12596
- Quint, P., Ruan, M., Pederson, L., Kassem, M., Westendorf, J. J., Khosla, S. and Oursler, M. J. (2013). Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors 1 and 2 coordinately induce mesenchymal cell migration through S1P activation of complementary kinase pathways. *The Journal of biological chemistry*, 288(8), 5398–5406. doi:10.1074/jbc.M112.413583
- Rebai, M. A., Sahnoun, N., Abdelhedi, O., Keskes, K., Charfi, S., Slimi, F., Keskes, H. (2020). Animal models of osteoarthritis: characterization of a model induced by Mono-Iodo-Acetate injected in rabbits. *The Libyan journal of medicine*, 15(1), 1753943. doi:10.1080/19932820.2020.1753943
- Ren, R., Pang, B., Han, Y. and Li, Y. (2021). A Glimpse of the Structural Biology of the Metabolism of Sphingosine-1-Phosphate. *Contact*, 4, 2515256421995601. doi:10.1177/2515256421995601
- Rengel, Y., Ospelt, C. and Gay, S. (2007). Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis research & therapy*, 9(5), 221. doi:10.1186/ar2304

- Ringe, J. D., Farahmand, P., Schacht, E. and Rozehnal, A. (2007). Superiority of a combined treatment of Alendronate and Alfacalcidol compared to the combination of Alendronate and plain vitamin D or Alfacalcidol alone in established postmenopausal or male osteoporosis (AAC-Trial). *Rheumatology International*, 27(5), 425–434. doi:10.1007/s00296-006-0288-z
- Robling, A. G., Castillo, A. B. and Turner, C. H. (2006). Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual review of biomedical engineering*, 8, 455–498. doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721
- Rocheffort, G. Y., Pallu, S. and Benhamou, C. L. (2010). Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 21(9), 1457–1469. doi:10.1007/s00198-010-1194-5
- Rosen, H. and Goetzl, E. J. (2005). Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature reviews. Immunology*, 5(7), 560–570. doi:10.1038/nri1650
- Ross, J. S., Hu, W., Rosen, B., Snider, A. J., Obeid, L. M. and Cowart, L. A. (2013). Sphingosine kinase 1 is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α in response to free fatty acids and is essential for skeletal muscle interleukin-6 production and signaling in diet-induced obesity. *The Journal of biological chemistry*, 288(31), 22193–22206. doi:10.1074/jbc.M113.477786
- Rupp, T., von Vopelius, E., Strahl, A., Oheim, R., Barvencik, F., Amling, M. ve Rolvien, T. (2022). Beneficial effects of denosumab on muscle performance in patients with low BMD: a retrospective, propensity score-matched study. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. doi:10.1007/s00198-022-06470-3
- Ryu, J., Kim, H. J., Chang, E.-J., Huang, H., Banno, Y. and Kim, H.-H. (2006). Sphingosine 1-phosphate as a regulator of osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast coupling. *The EMBO journal*, 25(24), 5840–5851. doi:10.1038/sj.emboj.7601430
- Saag, K. G., Pannacciulli, N., Geusens, P., Adachi, J. D., Messina, O. D., Morales-Torres, J., ... Lems, W. F. (2019). Denosumab Versus Risedronate in Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Final Results of a Twenty-Four-Month Randomized, Double-Blind, Double-Dummy Trial. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 71(7), 1174–1184. doi:10.1002/art.40874
- Saba, J. D. and Hla, T. (2004). Point-counterpoint of sphingosine 1-phosphate metabolism. *Circulation research*, 94(6), 724–734. doi:10.1161/01.RES.0000122383.60368.24
- Sağlam, G. ve Alisar, D. (2021). Denosumab Tedavisi Alan Postmenopozal Osteoporozlu Hastalarda Hasta Memnuniyeti, Sırt Ağrısı ve Kemik Mineral Dansitometri T Skorlarının Değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Osteoporosis*. doi:10.4274/tod.galenos.2020.91249

- Sakthiswary, R., Uma Veshaliini, R., Chin, K.-Y., Das, S. and Sirasanagandla, S. R. (2022). Pathomechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis. *Frontiers in medicine*, 9, 962969. doi:10.3389/fmed.2022.962969
- Satsu, H., Schaeffer, M. T., Guerrero, M., Saldana, A., Eberhart, C., Hodder, P., Cayanan, C., Schürer, S., Bhatarai, B., Roberts, E., Rosen, H., and Brown, S. J. (2013). A sphingosine 1-phosphate receptor 2 selective allosteric agonist. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(17), 5373–5382. doi:10.1016/j.bmc.2013.06.012
- Schaffler, M. B., Cheung, W.-Y., Majeska, R. and Kennedy, O. (2014). Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified tissue international*, 94(1), 5–24. doi:10.1007/s00223-013-9790-y
- Ségui, B., Andrieu-Abadie, N., Jaffrézou, J.-P., Benoist, H. and Levade, T. (2006). Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(12), 2104–2120. doi:10.1016/j.bbamem.2006.05.024
- Sepici-Dincel, A. (2020). Dinçel, AS. 2020. “Osteoporozda Laboratuvar”. *Romatoloji e-kitap içinde*. Ankara: Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği.
- Seriolo, B., Paolino, S., Sulli, A., Ferretti, V. and Cutolo, M. (2006). Bone metabolism changes during anti-TNF-alpha therapy in patients with active rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1069, 420–427. doi:10.1196/annals.1351.040
- Shahida, S., Rehman, S., Ilyas, N., Khan, M. I., Hameed, U., Hafeez, M., Iqbal, S., Elboughdiri, N., Ghernaout, D., Salih, A. A., & Matouq, M. (2021). Determination of Blood Calcium and Lead Concentrations in Osteoporotic and Osteopenic Patients in Pakistan. *ACS Omega*, 6(42), 28373–28378. doi:10.1021/acsomega.1c04565
- Shahifar, N., Samsudin, I., Thambiah, S., Apannah, G., Said, S., Hew, F., Yeap, S. (2020). Bone Turnover Markers and Sphingosine-1-phosphate levels among the Chinese Community in Selangor, Malaysia and its Correlation with Bone Density. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*, 16, 46–51.
- Sheedy, K. C., Camara, M. I. and Camacho, P. M. (2015). Comparison of the efficacy, adverse effects, and cost of zoledronic acid and denosumab in the treatment of osteoporosis. *Endocrine practice: official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 21(3), 275–279. doi:10.4158/EP14106.OR
- Shi, X. L., Li, C. W., Liang, B. C., He, K. H. and Li, X. Y. (2015). Weak cation magnetic separation technology and MALDI-TOF-MS in screening serum protein markers in primary type I osteoporosis. *Genetics and molecular research: GMR*, 14(4), 15285–15294. doi:10.4238/2015.November.30.4
- Shousha, S., Mahmoud, M. and Hameed, K. (2017). Some Haemato-Biochemical Values in White New Zealand Rabbits. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 10, 40–44. doi:10.9790/2380-1007014044

- Sims, N. A. and Martin, T. J. (2020). Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annual review of physiology*, 82, 507–529. doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034425
- Sindel, D., Esmailzadeh, S. ve Şen, E. İ. (2012). Romatizmal hastalıklarda osteoporozun etiyopatogenezi. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*, 58(4). <http://search/yayin/detay/149338> adresinden erişildi.
- Sindel, D. ve Gula, G. (2015). Assessment of Bone Mineral Density in Osteoporosis. *Osteoporoz*, 21(1), 0. <https://dx.doi.org/> adresinden erişildi.
- Siris, E. S., Miller, P. D., Barrett-Connor, E., Faulkner, K. G., Wehren, L. E., Abbott, T. A., Berger, M. L., Santora, A. C., and Sherwood, L. M. (2001). Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. *JAMA*, 286(22), 2815–2822. doi:10.1001/jama.286.22.2815
- Sluiter, T. J., van Buul, J. D., Huveneers, S., Quax, P. H. A. and de Vries, M. R. (2021). Endothelial Barrier Function and Leukocyte Transmigration in Atherosclerosis. *Biomedicines*, 9(4). doi:10.3390/biomedicines9040328
- Smolen, J. S., Landewé, R. B. M., Bijlsma, J. W. J., Burmester, G. R., Dougados, M., Kerschbaumer, A., van der Heijde, D. (2020). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Annals of the rheumatic diseases*, 79(6), 685–699. doi:10.1136/annrheumdis-2019-216655
- Soetan, K., Olaiya, C. and Oyewole, O. (2009). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *Afr J Food Sci*, 4.
- Sommer, N. G., Hahn, D., Okutan, B., Marek, R. and Weinberg, A. M. (2019). Animal Models in Orthopedic Research: The Proper Animal Model to Answer Fundamental Questions on Bone Healing Depending on Pathology and Implant Material. *Animal Models in Medicine and Biology*.
- Song, H. E., Lee, S. H., Kim, S. J., Kim, B.-J., Yoo, H. J. and Koh, J.-M. (2020). Association of circulating levels of total and protein-bound sphingosine 1-phosphate with osteoporotic fracture. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 68(7), 1295–1299. doi:10.1136/jim-2020-001322
- Sornay-Rendu, E., Boutroy, S., Munoz, F. and Delmas, P. D. (2007). Alterations of cortical and trabecular architecture are associated with fractures in postmenopausal women, partially independent of decreased BMD measured by DXA: the OFELY study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22(3), 425–433. doi:10.1359/jbmr.061206
- Sterling, J. A. and Johnson, R. W. (2018). Metastatic Tumors and Bone. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* içinde (ss. 752–759). John Wiley & Sons, Ltd. doi:<https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch97>

- Strub, G. M., Maceyka, M., Hait, N. C., Milstien, S. and Spiegel, S. (2010). Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Advances in experimental medicine and biology*, 688, 141–155. doi:10.1007/978-1-4419-6741-1_10
- Strub, G. M., Paillard, M., Liang, J., Gomez, L., Allegood, J. C., Hait, N. C., Spiegel, S. (2011). Sphingosine-1-phosphate produced by sphingosine kinase 2 in mitochondria interacts with prohibitin 2 to regulate complex IV assembly and respiration. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(2), 600–612. doi:10.1096/fj.10-167502
- Sutton, J. R. (1992). Limitations to maximal oxygen uptake. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 13(2), 127–133. doi:10.2165/00007256-199213020-00008
- Szulc, P. (2018). Bone turnover: Biology and assessment tools. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(5), 725–738. doi:https://doi.org/10.1016/j.beem.2018.05.003
- 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. doi:10.1182/blood-2004-06-2480
- Takabe, K., Paugh, S. W., Milstien, S. and Spiegel, S. (2008). “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacological reviews*, 60(2), 181–195. doi:10.1124/pr.107.07113
- Takayanagi, H. (2020). Osteoimmunology - Bidirectional dialogue and inevitable union of the fields of bone and immunity. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 96(4), 159–169. doi:10.2183/pjab.96.013
- Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E. F., Mak, T. W., Kodama, T., and Taniguchi, T. (2002). Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Developmental cell*, 3(6), 889–901. doi:10.1016/s1534-5807(02)00369-6
- Takeshita, H., Kitano, M., Iwasaki, T., Kitano, S., Tsunemi, S., Sato, C., Sano, H. (2012). Sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P receptor 1 signaling regulates receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) expression in rheumatoid arthritis. *Biochemical and biophysical research communications*, 419(2), 154–159. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.103
- Takeuchi, T., Tanaka, Y., Soen, S., Yamanaka, H., Yoneda, T., Tanaka, S., van der Heijde, D. (2019). Effects of the anti-RANKL antibody denosumab on joint structural damage in patients with rheumatoid arthritis treated with conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs (DESIRABLE study): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase. *Annals of the rheumatic diseases*, 78(7), 899–907. doi:10.1136/annrheumdis-2018-214827
- Tatar, Ö. D. (2022). *Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesi Romatoloji Polikliniğinde Takip Edilip Biyolojik Tedavi Alan Romatoid Artrit Hastalarının Komorbid Hastalıklarının Değerlendirilmesi*. Hacettepe Üniversitesi.

- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S. K., Fortun, Y., Redini, F. ve Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(6), 457–475. doi:10.1016/j.cytogfr.2004.06.004
- Thuy, A. V, Reimann, C.-M., Hemdan, N. Y. A. and Gräler, M. H. (2014). Sphingosine 1-phosphate in blood: function, metabolism, and fate. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 34(1), 158–171. doi:10.1159/000362992
- Tian, J., Ma, S., Xie, W.-Q., Zhang, Y.-M., Tao, L., Li, Y.-S. and Xiao, W.-F. (2021). Sphingosine 1-phosphate and osteoporosis: pathophysiology and therapeutic aspects-a narrative review. *Annals of palliative medicine*, 10(4), 4799–4805. doi:10.21037/apm-20-1255
- Toledano, E., Ortiz, A. M., Ivorra-Cortes, J., Montes, N., Beltran, A., Rodríguez-Rodríguez, L., González-Álvaro, I. (2018). Are rheumatologists adhering to the concepts window of opportunity and treat-to-target? Earlier and more intense disease-modifying anti-rheumatic drug treatment over time in patients with early arthritis in the PEARL study. *Clinical and experimental rheumatology*, 36(3), 382–388.
- Tomruk Sütbeyaz, S. (2020). “Kemiğin Fizyolojisi”. *Romatoloji e-kitap* içinde . Ankara: Türkiye Romatizma Araştırma ve Savaş Derneği.
- Tong, J.-J., Xu, S.-Q., Zong, H.-X., Pan, M.-J., Teng, Y.-Z. and Xu, J.-H. (2020). Prevalence and risk factors associated with vertebral osteoporotic fractures in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 39(2), 357–364. doi:10.1007/s10067-019-04787-9
- Topaloğlu, U., Ketani, M. A. ve Saruhan, B. G. (2017). Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri. *Dicle Üniv Vet Fak Dergisi*, 10(1), 62–71.
- Tukijan, F., Chandrakanthan, M. and Nguyen, L. N. (2018). The signalling roles of sphingosine-1-phosphate derived from red blood cells and platelets. *British journal of pharmacology*, 175(19), 3741–3746. doi:10.1111/bph.14451
- Vaidya, M., Jentsch, J. A., Peters, S., Keul, P., Weske, S., Gräler, M. H., Mladenov, E., Iliakis, G., Heusch, G., and Levkau, B. (2019). Regulation of ABCA1-mediated cholesterol efflux by sphingosine-1-phosphate signaling in macrophages. *Journal of lipid research*, 60(3), 506–515. doi:10.1194/jlr.M088443
- van der Heijde, D. M., van 't Hof, M. A., van Riel, P. L., Theunisse, L. A., Lubberts, E. W., van Leeuwen, M. A., van de Putte, L. B. (1990). Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Annals of the rheumatic diseases*, 49(11), 916–920. doi:10.1136/ard.49.11.916

- Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A. J., Garnero, P., Griesmacher, A., Kanis, J. A. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 22(2), 391–420. doi:10.1007/s00198-010-1501-1
- Vasikaran, Samuel, Cooper, C., Eastell, R., Griesmacher, A., Morris, H. A., Trenti, T. and Kanis, J. A. (2011). International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 49(8), 1271–1274. doi:10.1515/CCLM.2011.602
- Vautour, L. and Goltzman, D. (2018). Regulation of Calcium Homeostasis. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism* içinde (ss. 163–172). John Wiley & Sons, Ltd. doi:https://doi.org/10.1002/9781119266594.ch22
- Vettorazzi, S., Bode, C., Dejager, L., Frappart, L., Shelest, E., Kläßen, C., Tasdogan, A., Reichardt, H. M., Libert, C., Schneider, M., Weih, F., Henriette Uhlenhaut, N., David, J. P., Gräler, M., Kleiman, A., and Tuckermann, J. P. (2015). Glucocorticoids limit acute lung inflammation in concert with inflammatory stimuli by induction of SphK1. *Nature communications*, 6, 7796. doi:10.1038/ncomms8796
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. and Delmas, P. D. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 17(3), 319–336. doi:10.1007/s00198-005-2035-9
- Vis, M., Güler-Yüksel, M. and Lems, W. F. (2013). Can bone loss in rheumatoid arthritis be prevented? *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 24(10), 2541–2553. doi:10.1007/s00198-013-2334-5
- Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N. and Penninger, J. M. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in molecular medicine*, 12(1), 17–25. doi:10.1016/j.molmed.2005.11.007
- Walsh, M. C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S. Y., Lorenzo, J. and Choi, Y. (2006). Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annual review of immunology*, 24, 33–63. doi:10.1146/annurev.immunol.24.021605.090646
- Wanderman, N. R., Mallet, C., Giambini, H., Bao, N., Zhao, C., An, K.-N., Nassr, A. (2018). An Ovariectomy-Induced Rabbit Osteoporotic Model: A New Perspective. *Asian spine journal*, 12(1), 12–17. doi:10.4184/asj.2018.12.1.12
- Wang, L., Heckmann, B. L., Yang, X. and Long, H. (2019). Osteoblast autophagy in glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of cellular physiology*, 234(4), 3207–3215. doi:10.1002/jcp.27335

- Watts, N. B., Bilezikian, J. P., Camacho, P. M., Greenspan, S. L., Harris, S. T., Hodgson, S. F., Petak, S. M. (2010). American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*, 16 Suppl 3(Suppl 3), 1–37. doi:10.4158/ep.16.s3.1
- Weske, S., Vaidya, M., Reese, A., von Wnuck Lipinski, K., Keul, P., Bayer, J. K., Fischer, J. W., Flögel, U., Nelsen, J., Epple, M., Scatena, M., Schwedhelm, E., Dörr, M., Völzke, H., Moritz, E., Hannemann, A., Rauch, B. H., Gräler, M. H., Heusch, G., and Levkau, B. (2018). Targeting sphingosine-1-phosphate lyase as an anabolic therapy for bone loss. *Nature Medicine*, 24(5), 667–678. doi:10.1038/s41591-018-0005-y
- Williams C, S. A. (2022). Osteoporosis Markers. *StatPearls [Internet]* içinde . tatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559306/> adresinden erişildi.
- Winkler, M. S., Nierhaus, A., Holzmann, M., Mudersbach, E., Bauer, A., Robbe, L., Zoellner, C. (2015). Decreased serum concentrations of sphingosine-1-phosphate in sepsis. *Critical care (London, England)*, 19, 372. doi:10.1186/s13054-015-1089-0
- Wooley, P. (2008). What Animal Models are Best to Test Novel Rheumatoid Arthritis Therapies? *Current Rheumatology Reviews - CURR RHEUMATOL REV*, 4. doi:10.2174/157339708786263898
- Wooley, P. H. (2004). The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 18(1), 47–58. doi:10.1016/j.berh.2003.09.007
- Xavier, A., Toumi, H. and Lespessailles, E. (2021). Animal Model for Glucocorticoid Induced Osteoporosis: A Systematic Review from 2011 to 2021. *International journal of molecular sciences*, 23(1). doi:10.3390/ijms23010377
- Xia, P. and Wadham, C. (2011). Sphingosine 1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: juxtacrine signaling. *Cytokine & growth factor reviews*, 22(1), 45–53. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.09.004
- Xiao, L., Zhou, Y., Friis, T., Beagley, K. and Xiao, Y. (2019). S1P-S1PR1 Signaling: the “Sphinx” in Osteoimmunology. *Frontiers in Immunology*, 10. doi:10.3389/fimmu.2019.01409
- Xiong, J., Cawley, K., Piemontese, M., Fujiwara, Y., Zhao, H., Goellner, J. J. and O’Brien, C. A. (2018). Soluble RANKL contributes to osteoclast formation in adult mice but not ovariectomy-induced bone loss. *Nature communications*, 9(1), 2909. doi:10.1038/s41467-018-05244-y
- Xu, R., Jin, J., Hu, W., Sun, W., Bielawski, J., Szulc, Z., Mao, C. (2006). Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(11), 1813–1825. doi:10.1096/fj.05-5689com

- Xu, S., Wang, Y., Lu, J. and Xu, J. (2012). Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis-induced osteoporosis. *Rheumatology international*, 32(11), 3397–3403. doi:10.1007/s00296-011-2175-5
- Yatomi, Y., Yamamura, S., Hisano, N., Nakahara, K., Igarashi, Y. and Ozaki, Y. (2004). Sphingosine 1-phosphate breakdown in platelets. *Journal of biochemistry*, 136(4), 495–502. doi:10.1093/jb/mvh143
- Yavuzer, H., Taşkın, A. Z., Demirdağ, F., Bolayırılı, İ. M., Döventaş, A. ve Erdinçler, D. S. (2018). Postmenopozal Osteoporoz Olmayan Kadınlarda Vitamin D ve Leptin İlişkisi. *Haseki Tıp Bülteni*.
- Yoshida, H., Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Nishikawa, S., Okamura, H., Nishikawa, S. (1990). The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345(6274), 442–444. doi:10.1038/345442a0
- Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Guan, K.-L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, 150(4), 780–791. doi:10.1016/j.cell.2012.06.037
- Zaibaq, F., Dowdy, T. and Larion, M. (2022). Targeting the Sphingolipid Rheostat in Gliomas. *International journal of molecular sciences*, 23(16). doi:10.3390/ijms23169255
- Zhang, J. N., Zhao, Y., Liu, C., Han, E. S., Yu, X., Lidington, D., Bolz, S. S., & You, L. (2015). The role of the sphingosine-1-phosphate signaling pathway in osteocyte mechanotransduction. *Bone*, 79, 71–78. https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.017
- Zhang, L., Dong, Y., Wang, Y., Hu, W., Dong, S. and Chen, Y. (2020). Sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors: Promising drug targets for treating bone-related diseases. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(8), 4389–4401. doi:10.1111/jcmm.15155
- Zhang, N., Zhang, Z.-K., Yu, Y., Zhuo, Z., Zhang, G. and Zhang, B.-T. (2020). Pros and Cons of Denosumab Treatment for Osteoporosis and Implication for RANKL Aptamer Therapy. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 325. doi:10.3389/fcell.2020.00325
- Zhang, W., An, J., Jawadi, H., Siow, D. L., Lee, J.-F., Zhao, J., Lee, M.-J. (2013). Sphingosine-1-phosphate receptor-2 mediated NFκB activation contributes to tumor necrosis factor-α induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 106, 62–71. doi:10.1016/j.prostaglandins.2013.06.001
- Zhang, X., Cai, Y., Zhang, W. and Chen, X. (2018). Quercetin ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting SphK1/S1P signaling. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 96(6), 742–751. doi:10.1139/bcb-2017-0302

- Zhang, Z., Ren, H., Shen, G., Qiu, T., Liang, D., Yang, Z., Wei, Q. (2016). Animal models for glucocorticoid-induced postmenopausal osteoporosis: An updated review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 84, 438–446. doi:10.1016/j.biopha.2016.09.045
- Zhao, C., Fernandes, M. J., Turgeon, M., Tancredi, S., Di Battista, J., Poubelle, P. E. and Bourgoin, S. G. (2008). Specific and overlapping sphingosine-1-phosphate receptor functions in human synoviocytes: impact of TNF-alpha. *Journal of lipid research*, 49(11), 2323–2337. doi:10.1194/jlr.M800143-JLR200
- Zhong, Y., Li, J., Luo, J. and Chen, F. (2021). Advances in Bone Turnover Markers (PINP and CTX) in Optimizing Anti-resorptive and Anabolic Therapies Against Osteoporosis. *Discovery medicine*, 32(167), 149–154.

EKLER

EK-1. Yerel Etik Kurul Onay Formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 19.01.2021-E.8689	
T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı	
Sayı : E-66332047-604.01.02-8689 Konu : Değerlendirme ve Onay	
Sayın Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi	
Araştırmacı grubu Aylin SEPİCİ DİNÇEL, Burcu ESER ve Şeyda DİKER'den oluşan, G.Ü.ET-21.001 kod numaralı ve "<i>Yeni Nesil Kemik Döngüsü Biyobelirteçlerinden Olan Sıfingozin-1 Fosfat'ın Farklı Hastalık Gruplarında Önerilen Geleneksel Biyobelirteçleri ile Karşılaştırılmasının Deneysel Olarak Gösterilmesi</i>" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.	
Bilgilerinizi rica ederim.	
It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-21.001 and entitled " <i>Experimental Comparison of Sphingosine-1 Phosphate as a New Bone Turnover Markers, to Traditional Ones in Different Disease Groups</i> " is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.	
With my best regards.	
Hayvan Türü : Tavşan Yeni Zelanda Hayvan Sayısı : 24	
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ Kurul Başkanı	
Ek: 1 Liste	

EK-2. Yerel Etik Kurul Onay Formu-2

Evrak Tarih ve Sayısı: 09.11.2021-E.208804



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-208804
Konu : Değerlendirme ve Onay

09.11.2021

Sayın Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNCEL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 19.01.2021 tarih ve E.8689 sayılı yazımız ile onay alan G.Ü.ET-21.001 kod numaralı *"Yeni Nesil Kemik Döngüsü Biyobelirteçlerinden Olan Sifingojin-1 Fosfat'ın Farklı Hastalık Gruplarında Önerilen Geleneksel Biyobelirteçleri ile Karşılaştırılmasının Deneyisel Olarak Gösterilmesi"* başlıklı çalışmanız ile ilgili vermiş olduğumuz 21.09.2021 tarihli dilekçeniz Kurulumuzun 15.10.2021 tarih ve 07 sayılı toplantısında görüşülmüş olup,

Çalışmanızda diğer uygulamalar aynı kalmak kaydıyla, tedavi açısından geleneksel ve yeni jenerasyon tedavi ajanını, hem de geleneksel biyobelirteçler ile yeni nesil biyobelirteçleri değerlendirebilmek amacıyla 9 adet tavşandan oluşan yeni bir grup eklemeniz ile toplam 33 adet tavşan kullanımı ile ilgili talebinizin uygun görülmesine oybirliği ile karar verilmiş olup, karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ESER, Burcu
Uyruğu : TC

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı	2017
Lisans	Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Sağlık Bakanlığı Adana Laboratuvar Sağlık Meslek Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017- Halen	Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ar-Ge Merkezi, UPKYK- Kromatografi Lab.	Biyolog
2001- 2017	Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biokimya Anabilim Dalı	Biyolog

Mezuniyet Sonrası Eğitim ve Sertifika

LCMS/MS Eğitim Sertifikası
HPLC Eğitim Sertifikası
GC-MS Çalıştay Sertifikası (3rd National HPLC and Mass Spectrometry Workshop and Symposium (with international attendance))
Temel Hücre Kültürü Kurs Sertifikası,
Temel Epidemiyoloji Kursu Sertifikası
Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası
Kan Bankacılığı Uygulamaları Eğitim Sertifikası
Western Blot Uygulamaları Eğitici Sertifikası

Yayınlar

- Tasli, H., Eser, B., Asik, M. B., & Birkent, H. (2019). Does pepsin play a role in etiology of laryngeal nodules?. *Journal of Voice*, 33(5), 704-707. doi: 10.1016/j.jvoice.2018.04.009
- Eser, B. & Sepici Dinçel A. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51-57. ISSN: 2636-8285. DOI: 10.26567/JOHSE.2018250150
- Tasli, H., Eser, B., Birkent, H., Asik, B., & Gerek, M. (2019). Investigation of Pepsin in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Specimens. *Dicle Tıp Dergisi*, 46(4), 657-665. /doi.org/10.5798/dicletip.661237
- Eser, B., Özkan, Y., & Sepici Dinçel, A. (2020). Determination of tryptophan and kynurenine by LC–MS/MS by using amlodipine as an internal standard. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 31(2), 379-385. doi:10.1021/jasms.9b00007.
- Aksu, N., Samadi, A., Yalçinkaya, A., Çetin, T., Eser, B., Lay, İ., ... & Sabuncuoğlu, S. (2020). Evaluation of oxysterol levels of patients with silicosis by LC–MS/MS method. *Molecular and cellular biochemistry*, 467, 117-125. doi.org/10.1007/s11010-020-03706-w
- İriz, A., Şemsi, R., Eser, B., Arslan, B., & Dinçel, A. S. (2021). The evaluation of serum tryptophan and kynurenine levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep and Breathing*, 25, 1389-1398. doi: 10.1007/s11325-020-02250-7.
- Duran, T. , Karakuş, O., Değim, İ.T. , Eser, B., Sezigen, S., Güney, Z. & Uluoğlu, C. (2021). Evaluating of Two Type of Cyclosporine-A Containing Nanosuspension for Ophthalmic Administration. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 5(3), 107-116. DOI: 10.30621/jbachs.926640
- Eser, B., Tural, R., Gunal, A. C., & Sepici Dincel, A. (2022). Does bisphenol A bioaccumulate on zebrafish? Determination of tissue bisphenol A level. *Biomedical Chromatography*, 36(3), e5285. https://doi.org/10.1002/bmc.5285
- Çetin, T., Samadi, A., Reçber, T., Dinçer, A. K., Eser, B., Yalcinkaya, A., ... & Sabuncuoğlu, S. (2022). Possible Effect of Chelation Treatment on Metabolomic and Lipidomic Analysis in Lead Exposure. *Journal of occupational and environmental medicine*, 64(5), e284-e290. https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000002503
- Eser, B., Tecer, D., & Dinçel, A. S. (2022). The differences of Matrix Metalloproteinases (MMP-9 and MMP-13) in chronic inflammatory rheumatic diseases. *Romanian Journal of Military Medicine*, 125(2), 325. doi:10.55453/rjmm.2022.125.2.23.
- Vitamin D levels in experimental osteoporosis model treated with denosumab. B Eser, A SDinçel. (2022). Future Biochemistry and Bioscience. FBB 2022;4(1):13-19. <http://doi.org/10.48086/ASD0036>.

- RANKL levels as a biomarker in Bone Metabolism, Experimental Model. Burcu Eser, Feride Nur Gogus, Aylin Sepici Dincel. (2022) International Biochemistry Congress – 33rd National Biochemistry Congress, 26-30 October 2022, İzmir, Turkey.
- Bisphenol A, Which Has Systemic Effects as an Endocrine Disruptor, Measurement Optimization Using Chromatographic Methods in the Biological Tissues and Fluids., B Eser, R. Tural, AS Dinçel, P20-015, The 44th FEBS Congress, 6-11 Temmuz, 2019, Krakow, Polonya.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

