

T. C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**PULSLU ELEKTROMANYETİK ALANIN DENEYSEL
OSTEOPOROZ MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
KEMİK DOKU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BİYOMEKANİK,
BİYOKİMYASAL, DANSİTOMETRİK VE HİSTOMORFOLOJİK
ÖZELLİKLER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

Serkan GÜRGÜL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ERDAL

MERSİN – 2012

T. C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI

**PULSLU ELEKTROMANYETİK ALANIN DENEYSEL
OSTEOPOROZ MODELİ OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA
KEMİK DOKU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN BİYOMEKANİK,
BİYOKİMYASAL, DENSİTOMETRİK VE HİSTOMORFOLOJİK
ÖZELLİKLER YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

Serkan GÜRGÜL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ERDAL

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP SBE BF (SG) 2009-4 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

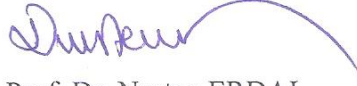
Tez No:146

MERSİN-2012

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyofizik Anabilim Dalı Doktora Tezi Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Pulsu Elektromanyetik Alanın Deneysel Osteoporoz Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Kemik Doku Üzerindeki Etkilerinin Biyomekanik, Biyokimyasal, Dansitometrik ve Histomorfolojik Özellikler Yönünden İncelenmesi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 21/05/2012



Prof. Dr. Nurten ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri Başkanı



Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Prof. Dr. Cemil SERT

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ebru BALLI

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 31.05.2012 tarih ve 2012/146 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Akademik eğitimim boyunca ve tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım başta danışman hocam Prof. Dr. Nurten ERDAL'a, Prof. Dr. Belgin BÜYÜKAKILLI'ya, Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na, Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a ve Yrd. Doç. Dr. M. Ertan AY'a yardımları için sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmam sırasında katkılarından dolayı, Radyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Altan YILDIZ'a, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Lülüfer Tamer GÜMÜŞ'e, Histoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Ebru BALLI'ya, İstatistik Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN'e ve Gaziantep Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim üyelerinden sayın Yrd. Doç. Dr. Can DEMİREL'e teşekkür ederim.

Bu çalışma sırasında fikirleri ve her türlü destekleri ile katkıda bulunan başta Arş. Gör. Coşar UZUN'a, deney hayvanları laboratuvarı müstahdemi Muhsin YAŞAR'a, Arş. Gör. Derya YETKİN'e ve Biyofizik Anabilim Dalında görev yapan diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin istatistikleri konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Arş. Gör. Mehmet Ali SUNGUR'a ayrıca teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni sürekli olarak manevi açıdan destekleyen annem Müzeyyen GÜRGÜL'e, eşim Sennur GÜRGÜL'e, bir gülüşü ile bütün yorgunluğumu alan sevgili oğlum Adnan Efe'ye ve sevgili babam Adnan GÜRGÜL'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
EŞİTLİKLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İskelet Sisteminin Yapısal Özellikleri	4
2.1.1. Kemik Kompozisyonu	4
2.1.2. Kemik Histolojisi	5
2.1.3. Kemik Hücreleri	8
2.1.4. Kemik Regülasyonu: Endokrin ve Parakrin Faktörler	11
2.2. Kemik Biyomekaniği	12
2.2.1. Biyomekanik Terminoloji ve Kemiğin Biyomekanik Özellikleri	17
2.2.2. Kemik Biyomekaniğine Etki Eden Faktörler	21
2.2.3. Kemik Biyomekaniğinde Kullanılan Test Yöntemleri	23
2.2.4. Biyomekanik Testlerde Güvenilirliğe Etki Eden Faktörler	27
2.3. Osteoporoz	28
2.3.1. Osteoporoz Sınıflandırması	29
2.3.2. Osteoporozda Kullanılan Tanı ve Takip Yöntemleri	31
2.3.2.1. Radyolojik Görüntüleme Yöntemleri	33
2.3.2.2. Biyokimyasal Tanı Yöntemleri	35
2.4. Manyetik Alan	37
2.4.1. Manyetik Alan ve Biyolojik Etkileri	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	41

3.1.1. Anestezikler ve Solüsyonlar	41
3.1.2. Kitler	41
3.1.3. Alet ve Gereçler	42
3.2. Deney Hayvanları	43
3.3. Deney Protokolü	44
3.3.1. Cerrahi İşlemler	44
3.3.1.1. Ovariectomi (OVX) Prosedürü	45
3.3.1.2. Siyatik Sinir Nörektomi (sNX) Prosedürü	45
3.3.2. Pulsu Manyetik Alan (PMA) Uygulama Prosedürü	47
3.3.3. Sinir Nörektomi (sNX) İşleminin Kontrol ve Takibi	50
3.4. Kemiklerin Dansitometrik, Geometrik ve Biyomekanik Ölçümler için Hazırlanması	50
3.5. Dansitometrik Ölçüm ve Analizler	52
3.6. Geometrik Ölçüm ve Analizler	52
3.7. Kemik Biyomekaniği Ölçüm ve Analizleri	53
3.8. Histolojik Ölçüm ve Analizler	55
3.8.1. Işık Mikroskopik Ölçüm ve Analizler	55
3.9. Biyokimyasal Ölçüm ve Analizler	55
3.9.1. Kan Örneklerinin Ölçümler için Hazırlanış Prosedürü	55
3.9.2. Serum Osteokalsin (sOCN) Düzeylerinin Belirlenmesi	56
3.9.3. Serum β -CrossLaps (s β -CTX) Düzeylerinin Belirlenmesi	57
3.10. İstatistiksel Yöntemler	58
4. BULGULAR	61
4.1. Genel Bulgular	61
4.1.1. Vücut Ağırlığı Bulguları	61
4.1.2. Pençe Geri Çekme Latansı Bulguları	61
4.1.3. Gastrocnemius Kası Ağırlık Bulguları	62
4.2. Kemik Mineral Yoğunluğu Bulguları	63
4.3. Geometrik Bulgular	67
4.4. Kemik Biyomekaniği Bulguları	70
4.5. Histolojik Bulgular	78
4.6. Biyokimyasal Bulgular	80

5. TARTIŞMA	82
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR	93
EKLER	108
EK-1	108
EK-2	109
EK-3	110
ÖZGEÇMİŞ	111

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kemik dokunun histolojik yapısı	7
Şekil 2.2. A) Yük-deformasyon eğrisi ve eğriden saptanan yapısal biyomekanik parametreler B) Yük-deformasyon eğrisi ve eğrinin bölümleri	18
Şekil 2.3. A) Saf kuvvetler B) Sıkıştırma kuvveti etkisi altındaki bir cisimde gözlenen boyca kısalma deformasyonu (ΔL) ve makaslama kuvveti etkisi altındaki bir cisimde gözlenen açısal deformasyon (γ)	19
Şekil 2.4. Eğme testinde uygulanan yükleme çeşitleri A) Üç nokta eğme testi B) Dört nokta eğme testi	25
Şekil 2.5. Kemik kütesinin nötral eksene uzaklığı (c)	26
Şekil 3.1. Sıçanlardan ovarium izolasyonu	46
Şekil 3.2. Sıçanlardan siyatik sinir izolasyonu	46
Şekil 3.3. Pulsu manyetik alan (PMA) sisteminin genel görünüşü	48
Şekil 3.4. PMA sistemi tarafından üretilen kuasi-triangular dalga formu	49
Şekil 3.5. Analjezik hot plate test cihazının genel görünüşü	51
Şekil 3.6. Sıçanlardan alınan dansitometrik ölçüm örneği	51
Şekil 3.7. Femur kemiklerine ait radyolojik görüntü örneği A) Kırılma hattı B) Geometrik parametreler	52
Şekil 3.8. Üç nokta eğme sisteminin genel görünüşü	54
Şekil 3.9. Üç nokta eğme testi ile kaydedilen yük-deformasyon eğri örneği	54
Şekil 4.1. Grupların pençe geri çekme latans değişimleri ve sıçanların ölçüm günlerine ait ortalamaları \pm SD değerleri	62
Şekil 4.2. Grupların gastrocnemius kas ağırlığı ortalamaları \pm SD değerleri	63
Şekil 4.3. Grupların tüm femur kemik mineral yoğunluğu ortalamaları \pm SD değerleri	64
Şekil 4.4. Grupların diyafizial femur kemik mineral yoğunluğu ortalamaları \pm SD değerleri	66
Şekil 4.5. Grupların kırılma hattı boyunca kemik mineral yoğunluğu ortalamaları \pm SD değerleri	66
Şekil 4.6. Grupların femur uzunluğu ve mesnet noktaları arasındaki mesafe	

ortalamaları \pm SD değerleri	67
Şekil 4.7. Grupların periosteal çap ortalamaları \pm SD değerleri	69
Şekil 4.8. Grupların endosteal çap ortalamaları \pm SD değerleri	69
Şekil 4.9. Grupların kortikal kesit alan ortalamaları \pm SD değerleri	70
Şekil 4.10. Grupların maksimum kırılma kuvveti ortalamaları \pm SD değerleri	73
Şekil 4.11. Grupların maksimum deformasyon ortalamaları \pm SD değerleri	74
Şekil 4.12. Grupların sertlik ortalamaları \pm SD değerleri	74
Şekil 4.13. Grupların depolanan enerji ortalamaları \pm SD değerleri	75
Şekil 4.14. Grupların I_{AP} ve I_{ML} ortalamaları \pm SD değerleri	75
Şekil 4.15. Grupların maksimum dayanım ortalamaları \pm SD değerleri	76
Şekil 4.16. Grupların maksimum strain ortalamaları \pm SD değerleri	76
Şekil 4.17. Grupların esneklik katsayısı ortalamaları \pm SD değerleri	77
Şekil 4.18. Grupların dayanıklılık ortalamaları \pm SD değerleri	77
Şekil 4.19. Grupların kortikal kemik kalınlığı ortalamaları \pm SD değerleri	78
Şekil 4.20. Femur kemiklerinin kortikal kemik kalınlıklarının belirlenmesinde kullanılan ölçüm örnekleri x120 büyütme	80
Şekil 4.21. Grupların serum osteokalsin ortalamaları \pm SD değerleri	81
Şekil 4.22. Grupların serum β -crosslaps ortalamaları \pm SD değerleri	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kemik metabolizmasında görev alan başlıca sistemik ve lokal faktörler	13
Çizelge 2.2. Değişik açılardan yapılan osteoporoz sınıflandırması	30
Çizelge 2.3. Sekonder osteoporoz nedenleri	32
Çizelge 2.4. Osteoporoz tanı ve takibinde kullanılan radyolojik görüntüleme yöntemleri	34
Çizelge 2.5. Kemik mineral yoğunluğu ölçüm tekniklerinin özellikleri	34
Çizelge 2.6. Kemik yapım-yıkım döngüsünün biyokimyasal belirteçleri	36
Çizelge 2.7. Kemik yapım-yıkım döngüsüne ait biyokimyasal belirteçlerin genel özellikleri	38
Çizelge 2.8. Manyetik alanın terapötik etkileriyle ilgili çalışmalar	40
Çizelge 3.1. Pulslu manyetik alan oluşturmak için kullanılan Helmholtz bobin çiftinin genel özellikleri	48
Çizelge 4.1. Grupların gastrocnemius kas ağırlığı ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri	63
Çizelge 4.2. Grupların ölçülen bölgelere göre kemik mineral yoğunluğu, mineral içeriği ve kemik alanı ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri	65
Çizelge 4.3. Grupların geometrik parametrelere ait ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri	68
Çizelge 4.4. Grupların kemik biyomekaniği parametrelerine ait ortalamalar \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri	71
Çizelge 4.5. Grupların kortikal kemik kalınlığı ortalamaları \pm SD ve anlamlılık düzeyleri	79
Çizelge 4.6. Grupların serum osteokalsin ve β -crosslaps ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri	79

EŞİTLİKLER DİZİNİ

Denklem 2.1. Üç nokta eğme testlerine ait stres ve strain denklemleri	26
Denklem 2.2. Dört nokta eğme testlerine ait stres ve strain denklemleri	26
Denklem 3.1. İntrensik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler	53
Denklem 3.2. Medio-lateral (ML) ve anterior-posterior (AP) yönde oluşan kesitsel atalet momenti denklemi	54
Denklem 3.3. Yüzde değişim miktarı denklemi	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a	Yük Kolunun Destek Noktasına Uzaklığı
A	Amper
ACGIH	Amerikan Endüstri Hijyenistleri Derneği (American Conference of Governmental Industrial Hygienists)
ALP	Alkalen Fosfataz
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Anterior-Posterior Doğrultu
BMC	Kemik Mineral İçeriği (Bone Mineral Content)
BMD	Kemik Mineral Yoğunluğu (Bone Mineral Density)
BMP	Kemik Morfogenetik Protein (Bone Morphogenetic Protein)
BP	Kırılma Noktası (Kırılma Hattı)
BPBMD	Kırılma Noktası Kemik Mineral Yoğunluğu
BSAP	Kemiğe Spesifik Alkalen Fosfataz
BSP	Kemik Sialoprotein
c	Kemik Kütlesinin Nötral Eksenden Uzaklığı
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat (3'-5'-Siklik Adenozin Monofosfat)
cm	Santimetre
CSA	Kortikal Kesit Alan
CTGF	Bağ Doku Büyüme Faktörü
C_{TH}	Kortikal Kemik Kalınlığı
CTX	Tip 1 Kollajen Çapraz Bağlı C Telopektid
d	Deformasyon
°C	Derece Celsius
DF	Diyafizial Femur
DFBMD	Diyafizial Femur Kemik Mineral Yoğunluğu
DPA	Çift Foton Absorbsiyometri
DXA, DEXA	Çift Enerji X-ışını Absorbsiyometri
E	Esneklik Katsayısı

ECLIA	Elektrokemiluminesans Yöntemi (Electrochemiluminescence Immunoassay)
ELF	Oldukça Düşük Frekans (Extremely Low Frequency)
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Yöntemi (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EMA	Elektromanyetik Alan
END	Endosteal Çap
END_{AP}	Anterior-Posterior Doğrultudaki Endosteal Çap
END_{ML}	Medio-Lateral Doğrultudaki Endosteal Çap
ϵ_U	Maksimum Strain
ϵ_b	Strain
EU	Avrupa Birliği
eV	Elektronvolt
F	Uygulanan Kuvvet
FDA	United States Food and Drug Administration
fDPD, DPD	Serbest ve Peptid Bağlı Deoksipiridinolin
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
fPYD, PYD	Serbest ve Peptid Bağlı Piridinolin
G	Gauss
G-CSF	Granülosit Koloni Stimülan Faktör
GH	Büyüme Hormonu
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Stimülan Faktör
GPa	Gigapaskal
gr	Gram
HPLC	Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (High-performance liquid chromatography)
Hz	Hertz
I	Atalet Momenti
I_{AP}	Anterior-Posterior Doğrultudaki Atalet Momenti
ICNIRP	Uluslararası Non-iyonize Radyasyondan Korunma Komisyonu (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection)

IFN	İnterferon
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu
IJO	Juvenil İdiyopatik Osteoporoz
IL	İnterlökin
I_{ML}	Medio-Lateral Doğrultudaki Atalet Momenti
IRMA	Immunoradyometrik assay
J	Joule
Kat. No	Katalog No
L	Mesnet Noktaları Arasındaki Mesafe
LIF	Lenfosit İnhibitör Faktör
L_o	Femur Uzunluğu
m	Metre
MA	Manyetik Alan
M-CSF	Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
µm	Mikrometre
mG	Miligauss
mH	Milihenry
mJ	Milijoule
mm	Milimetre
mrem	Milirem
mT	Militesla
ML	Medio-Lateral Doğrultu
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MPa	Megapaskal
N	Newton
NASA	Ulusal Havacılık ve Uzay Dairesi (National Aeronautics and Space Administration)
NO	Nitrik oksit
NTX	Tip 1 Kollajen Çapraz Bağlı N Telopeptid
OCN	Osteokalsin (Kemik Gla Protein)
Ω	Ohm
ON	Osteonektin

ONX	Ovariectomi ve Siyatik Sinir Nörektomi Cerrahi İşlemlerinin Birlikte Uygulanması
OP	Osteoporoz
OPG	Osteoprotogerin
OPN	Osteopontin
OVX	Ovariectomi
Pa	Paskal
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PER	Periosteal Çap
PER_{AP}	Anterior-Posterior Doğrultudaki Periosteal Çap
PER_{ML}	Medio-Lateral Doğrultudaki Periosteal Çap
PG	Prostaglandin
PGE₂	Prostaglandin E ₂
PGI₂	Prostaglandin I ₂ (Prostasiklin)
PICP	Prokollajen Tip 1 C Terminal Propeptid
PINP	Prokollajen Tip 1 N Terminal Propeptid
PMA	Pulslu Manyetik Alan
PO₄	Fosfat
PTH	Paratiroid Hormon
PWL	Pençe Geri Çekme Latansı
QCT	Kantitatif Kompüterize Tomografi
QUS	Kantitatif Ultrason
RANK	NF-Kappa B Aktive Edici Reseptör
RANKL	NF-Kappa B Aktive Edici Reseptör Ligand
RIA	Radyoimmun Yöntemi (Radioimmunassay)
s	Saniye
SD	Standart Sapma (Standart Deviation)
S	Sertlik
σ_b	Stres
σ_u	Maksimum Stres (Maksimum Eğme Dayanımı)
sNX	Siyatik Sinir Nörektomi
sOCN	Serum Osteokalsin

SPA	Tek Foton Absorbsiyometri
sβ-CTX	Serum Tip 1 Kollajen Çapraz Bağlı C-Telopeptid $\beta\beta$ Formu
T	Tesla
T1C	Tip 1 Kollajen
T₃	Triiyodotronin
T₄	Tiroksin
TGF-β	Transform Edici Büyüme Faktörü- β
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TPBT	Üç Nokta Eğme Testi (Three Point Bending Test)
TRAP-5b	Osteoklastlara Spesifik 5b İzofom Tartarat Dirençli Asit Fosfataz
U	Depolanan Enerji
u	Dayanıklılık
USP	The United States Pharmacopeial Convention
Vitamin D	1,25-dihidroksivitamin D ₃ (Kalsitriol)
WF	Tüm Femur
WFBMD	Tüm Femur Kemik Mineral Yoğunluğu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
β-CTX	Tip 1 Kollajen Çapraz Bağlı C-Telopeptid $\beta\beta$ Formu

ÖZET

Pulslu Elektromanyetik Alanın Deneysel Osteoporoz Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Kemik Doku Üzerindeki Etkilerinin Biyomekanik, Biyokimyasal, Dansitometrik ve Histomorfolojik Özellikler Yönünden İncelenmesi

Kemikte piezoelektrik ve biyoelektrik potansiyellerin keşfi ile birlikte, eksternal elektromanyetik alanların (EMA) kemik hücrelerinin davranışlarını etkileyebileceği iddia edilmiştir. Bazı araştırmacılar, oldukça düşük frekanslı EMA'nin osteoklastik aktiviteyi baskılayarak veya bazı hormonal değişiklikler gerçekleştirerek, osteoblastik aktiviteyi arttırdığını ileri sürmektedir. Buna karşılık, bazı araştırmacılar bu sonuçları göstermekte başarısız olmuşlardır.

Bu çalışmada, uzun dönem (26 hafta (182 gün) pulslu elektromanyetik alanın (PMA; 15 Hz, 1 mT, 2 saat/gün) sağlıklı ve deneysel osteoporoz modeli oluşturulmuş sıçanların kemik doku üzerindeki etkileri biyomekanik özellikler yönünden araştırıldı. Bu amaçla, 56 adet, 12-haftalık, Wistar-Albino dişi sıçanlar; kontrol (C), sham (SH), ovariektomi+siyatik-sinir-nörektomi (ONX), ONX+pulslu elektromanyetik alan (ONXP) ve PMA grupları olmak üzere rastgele ayrıldı. ONX yöntemi ile kemik kaybı oluşturuldu. Biyomekanik analizler üç nokta eğme testi ile femur kemiklerinde yapıldı. Kemik dokuya ait yapısal (maksimum kırılma kuvveti, maksimum deformasyon, sertlik ve enerji) parametreler ölçüldü. Materyal (maksimum eğme dayanımı, maksimum strain, esneklik katsayısı ve dayanıklılık) parametreler; yapısal parametrelerden hesaplandı. Kemiklerin geometrik özellikleri, kortikal kemik kalınlığı, kemik mineral yoğunluğu (BMD), serum osteokalsin ve β -crosslaps düzeyleri ölçüldü.

Biyomekanik, dansitometrik, histolojik ve biyokimyasal bulgular incelendiğinde; kemik kütlesindeki azalmayla birlikte kollajen degradasyonu sonucu ONX grubuna ait kemiklerde kırılma dayanımının arttığı, kemik gücü ve uygulanan yüke karşı kemiğin gösterdiği direncin azaldığı, ONXP grubuna ait kemiklerde PMA'nın kemik kütle kaybı ve kollajen degradasyonunu önleyerek kemiğin kalitesi ve dayanıklılığını arttırdığı; ayrıca, sağlıklı sıçanlara ait kemiklerde deterioratif bir etki göstermediği belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, PMA'nın sağlıklı sıçanlara ait kemik dokularında olumsuz bir etki göstermediği, ONX uygulanan sıçanlarda ise osteoporotik hasarı önlediği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Elektromanyetik Alan, Kemik Mineral Yoğunluğu, Kemik Biyomekaniği, Osteokalsin, β -Crosslaps.

ABSTRACT

The Effects of Pulsed Electromagnetic Field on Biomechanical, Biochemical, Densitometric and Histomorphological Properties of Bone in Osteoporosis-induced Rats

The discovery of piezoelectricity and bioelectric potentials in bone raised the possibility that external applied electromagnetic fields (EMFs) could modify the behavior of bone cells. According to some authors, extremely low frequency EMF's could stimulate osteoblastic activity by inhibition of osteoclasts or by some hormonal changes on bone. However, some studies failed to point out the same outcomes which reported by those authors.

The aim of the present study was to investigate the effects of long term [26 weeks (182 days)] pulsed electromagnetic fields (PMF; 15 Hz, 1 mT, 2h/day) on bone biomechanical properties of healthy and osteoporotic rats. For this purpose, fifty-six, 12-week-old, Wistar-Albino female rats were assigned randomly into control (C), sham (SH), ovariectomy+sciatic-nerve-neurectomy (ONX), ONX+pulsed-electromagnetic-field exposed (ONXP) and PMF-exposed rats. ONX was chosen in this study to create bone loss. Biomechanical measurements were performed on femurs with three point bending test. For the biomechanical evaluation, structural properties of the femurs were measured, such as maximum load, maximum deformation, stiffness and energy, while material properties were calculated, such as ultimate strength, ultimate strain, elastic modulus and toughness. Geometric features, cortical bone thickness, bone mineral density (BMD), serum osteocalcin and β -crosslaps levels were also evaluated.

The results that were obtained from biomechanics, densitometry, histologic, and biochemistry parameters indicate that the fragility of the bones in ONX rats was increased and also the bone strength and the resistance of bone against the applied load in rats was reduced by depending on the bone loss and collagen degradation. The results also demonstrate that the bone quality and strength in ONXP rats was increased by PMF exposure via the inhibition of the bone loss and collagen degradation. It can be also speculated that PMF exposure did not show any deteriorative effect on bone tissue in healthy rats.

In conclusion, the results indicate that the bone quality is reduced by the ONX-induced bone loss in osteoporotic rats and ELF PMF application can inhibit the deteriorative effects of it. It can be also suggested that the PMF exposure can be used safely in the prevention of osteoporotic damage in bone, because of the results that were obtained from healthy rats.

Keywords: Electromagnetic Fields, Rat, Bone Mineral Densitometry, Bone Biomechanics, Cortical Bone Thickness, Osteocalcin, β -Crosslaps.

1. GİRİŞ

Kemik, kalsiyum ve fosforun hidroksiapatit kristalleri şeklinde kollajen yapı üzerine depolanmasıyla yapısal ve metabolik fonksiyonları için kendi kitlesini ve mimari yapısını düzenleyen oldukça karmaşık bir dokudur (1,2). Kemik dokunun regülasyonunda birçok hücre, protein, enzim, sitokin ve hormon görev alır (2,3). Bu kaskatta gerçekleşebilecek herhangi bir defekt, aralarında osteoporoz (OP), osteomalazi ve osteopeni gibi çeşitli iskelet sistemi hastalıklarının fizyopatolojik temelini oluşturur (4,5).

OP, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunda gelişen mikro-yapısal bozukluklara bağlı olarak kemik dayanıklılığında azalma ile karakterize yaygın bir iskelet sistemi hastalığıdır. Her iki cinste görülmesine karşın sıklığı kadınlarda erkeklere oranla 5 kat fazladır. OP tedavisinde, kalsiyum, vitamin D ve aktif metabolitleri, biyofosfanatlar, kalsitonin, floridler ve anabolik steroidler gibi çeşitli farmakolojik ajanlar kullanılır. Tedavide temel amaç; i) kemik rezorpsiyonunun azaltılması diğer bir ifadeyle kemik formasyonunun arttırılması, ii) kemik kütlesinin korunması, kaybın yerine konması ve kırıkların önlenmesidir. Ancak tedavide kullanılan ajanların, doz ve uygulama sürelerine bağlı olarak bazı yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Araştırılan alternatif tedavi yöntemleri arasında pulslu elektromanyetik alan (PMA) uygulamaları kemik dokuda sahip olduğu olumlu etkiler nedeniyle öne çıkmaktadır (4-6).

PMA'nın kemik regülasyonu üzerindeki etkileri ilk kez 1982 yılında gösterilmiş ve osteogenezi arttırdığı ileri sürülmüştür. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, kemik hücreleri üzerine direkt etkileri (osteoblastogenez ve osteoklastonezin çeşitli basamakları) olduğu gibi çeşitli regülasyon sistemleri üzerine etkileri de saptanmıştır. Bu çalışmalarda, PMA'nın osteoblastik proliferasyonu, ekstrasellüler matriks ve çeşitli hormon (kalsitonin, paratiroid hormon; PTH), enzim (alkalen fosfataz; ALP) ve sitokinlerin (insülin benzeri büyüme hormonu-2; IGF-2, transforme edici büyüme faktörü- β ; TGF- β , kemik morfojenetik protein-2; BMP-2) sekresyonunu arttırdığı ileri sürülmüştür. Ancak, bu sonuçların yanında çelişkili bulgular ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (7-11).

PMA'nın OP, osteomalazi ve osteopeni gibi kemik kaybı ile karakterize iskelet sistemi hastalıkları üzerindeki terapötik etkileri, gerek klinik gerekse deneysel çalışmalarla, yaklaşık 30 yıldır araştırılmaktadır. PMA ilk olarak kemik kaybı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla NASA tarafından değerlendirilmiş ve sıçanlarda kemik kaybını engellediği saptanmıştır (6). Mishima (12), PMA'nın sıçanlarda bilateral overektomi ve sinir nörektomi ile oluşturulan OP'da kemik formasyonunu arttırdığı ve kemik kaybını önlediğini ileri sürmüştür. Zati ve ark.'ları (13) bilateral overektomi ile oluşturulan OP'da benzer sonuçlara ulaşmıştır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise sinir nörektomi ile oluşturulan OP'da PMA'nın kemik rezorpsiyonunu azaltarak kemik mineral yoğunluğunu (BMD) arttırdığı ileri sürülmüştür (14). PMA'nın hayvan çalışmalarında sergilediği başarılar temel alınarak klinik araştırmalar da yapılmıştır. Bu doğrultuda OP'yi konu alan bu çalışmalarda farklı şiddet, süre ve frekanstaki PMA'nın radius, tibia, femur ve omurilik gibi çeşitli vücut kompartmanlarına ait BMD düzeylerini arttırdığı saptanmıştır. Ancak, çelişkili bulgular ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (15,16). PMA'nın kemik kaybı üzerindeki etkileri histomorfolojik olarak da değerlendirilmiş kortikal ve trabeküler kemik kalınlığı ve trabeküler kemik kütlesini arttırdığı, trabeküler seperasyonu ise azalttığı saptanmıştır (6).

Farklı prosedürlere sahip araştırmaların sonuçları değerlendirildiğinde, PMA'nın biyolojik doku ve hücrelerdeki etkilerinin, alanın dalga karakteristiğine (sinüzoidal veya pulslu), frekansına, şiddetine, uygulanma yönü (vertikal veya horizontal), biçimi ve süresine bağlı olarak değiştiği saptanmıştır. Bununla birlikte, PMA'nın özellikle kemik dokuda olmakla birlikte, doku ve hücrelerdeki etkilerinden sorumlu mekanizma veya mekanizmalar hala aydınlatılamamıştır. Ayrıca, PMA'nın kemiğin kalitesi, esnekliği ve dayanıklılığı üzerine etkileri de bilinmemektedir.

Kemik biyomekaniği, kemiğin kalitesi [kemiğin mineral (ekstrinsik) ve kollajen (intrinsik) özellikleriyle belirlenir], esnekliği ve dayanıklılığı hakkında bilgi verir. Kemik mekaniğinde temel amaç; kemik üzerine düşen yük ve buna bağlı olarak ortaya çıkan deformitenin saptanmasıdır. Çeşitli analiz yöntemleriyle kırılma kuvveti, sertlik ve kırılıncaya kadar depolanan enerji, stres, strain, esneklik katsayısı ve dayanıklılık parametreleriyle kemiğin ekstrinsik ve intrinsik özellikleri hakkında bilgi edinilebilir (17-19).

PMA'nın kemik kaybı üzerine etkilerini konu alan çalışmalar, kemik kaybını önleyici (protektif) veya var olan kaybın geri kazanımı (recovery etkisi) yönündedir. PMA'nın OP gibi çeşitli iskelet sistemi hastalıklarının prognozunu etkileyebildiği dansitometrik, histolojik, genetik ve biyokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir. Bu yöntemler kemiğin kalitesi, esnekliği ve dayanıklılığı hakkında yeterli bilgi vermemektedir. Bu nedenle kemiğin kalitesi, esnekliği ve dayanıklılığı biyomekanik yöntemle belirlenmiştir. Ayrıca literatürlerde PMA'nın kemik kaybı üzerine etkileri ile ilişkili biyomekanik çalışmalara da az rastlanmaktadır. Bu çalışmada, PMA'nın sağlıklı ve bilateral ovariektomi+siyatik sinir nörektomi ile kemik kaybı oluşturulmuş sıçanlarda biyomekanik (üç nokta eğme testi) yöntemle kemiğin kalitesi, esnekliği ve dayanıklılığı üzerindeki etkilerini belirlemek; bu sonuçları, dansitometrik (BMD), biyokimyasal kemik döngüsü belirteçleri (Osteokalsin ve β -crosslaps) ve histolojik (kortikal kemik kalınlığı) analizlerle desteklemek amaçlanmıştır. Çalışmada PMA'nın etkileri protektif açıdan değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskelet Sisteminin Yapısal Özellikleri

2.1.1. Kemik Kompozisyonu

İskelet sistemi tüm omurgalı canlılar için internal bir destek sistemi olmasının yanında sahip olduğu yapısal özellikler nedeniyle mekanik kuvvetlere karşı direnç gösterebilen ve çeşitli stres faktörlerine uyum sağlayabilen bir sistemdir. Ayrıca inorganik iyonların majör kaynağı olmakla birlikte, kalsiyum (Ca) ve fosfor homeostazı gibi temel metabolik aktivitelerde görev alır. Fizyolojik olarak oldukça aktif olan kemik, çeşitli sistemik ve lokal faktörlerin etkisi ile yaşam boyu devam eden bir yenilenme içindedir (20-24).

İskelet sisteminin en önemli yapıtaşı kemiktir. Kemik özelleşmiş bir bağ dokusudur. Tüm bağ dokuları gibi hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten oluşur. Özelleşmiş hücreleri yanında kemiği diğer bağ dokularından ayıran en önemli özelliği ekstrasellüler matriksin mineralize olmasıdır. Kemiğin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin anlaşılmasında en önemli basamak, kemik matrikse ait bileşenlerin kavranmasıdır. Kemik matriks, organik ve inorganik olmak üzere iki bileşenden oluşur. İnorganik matriks, kemiğin mineral fazını temsil ederken, dokunun kuru ağırlığının %60-70'ni oluşturur. Mineral faz ağırlıklı olarak Ca ve fosfat (PO_4) tuzlarının özelleşmiş bir formu olan kalsiyum hidroksiapatit ($Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$) kristallerinden oluşur. Bu oluşum kemik matrikse mekanik rijidite ve yük taşıma kapasitesi sağlar. Mineral faz, Ca ve PO_4 'ün yanında eser miktarlarda da olsa; potasyum, magnezyum, stronsiyum, sitrat, sodyum, klor ve flor iyonlarını da yapısında bulundurur. Bu mineraller hidroksiapatit kristalleri ile etkileşime girerek apatitin kristalleşme derecesini (crystallinity) azaltır. Böylece jeolojik apatitlerden farklılaşarak daha çözünebilir bir yapıya bürünür. İnorganik matriksinin bu özelliği mineral homeostazı ve kemik adaptasyonu için oldukça önemli bir faktördür (17,20-25).

Organik matriks kemiğin yapısal özelliklerinin belirlenmesinde aktif bir rol üstlenirken, dokunun mekanik ve biyokimyasal özelliklerini etkileyen majör bileşendir. Kemik kuru ağırlığının %30-40'nı oluşturur. Organik matriks ağırlıklı olarak tip I kollajenden (T1C) oluşur. T1C molekülleri, iki $\alpha 1$ zincir ve bir $\alpha 2$ zincir olmak üzere

toplam üç polipeptid zincirden oluşur. Üçlü helikal yapı intra- ve intermoleküler çapraz köprülerle fibrilleri, fibriller de gruplaşarak kollajen liflerini oluşturur. Bu yapı, T1C liflerine dayanıklılık ve kısmi esneklik kazandırırken, liflerin gerilmeye karşı gösterdiği direnci artırır. Bunun yanında, fibrillerin yapısal dizilişi sırasında gapler (açıklıklar) ve porlar (gözenekler) oluşur. Gap ve porlara hidroksiapatit kristalleri birikerek, T1C liflerinin mineralize olması sağlanır. Bu uyum kollajen liflerinin gerilme kuvvetlerine, hidroksiapatit kristallerinin de sıkıştırma kuvvetlerine karşı gösterdiği direnci maksimum seviyeye çıkarır (17,20,21,23,25).

Organik matriks, eser miktarlarda da olsa tip III, tip V ve tip X kollajen liflerini yapısında barındırır. Tip III kollajen, kollajen liflerinin yapışkanlık özelliklerinin regülasyonundan sorumludur. Matrikste tip V kollajen liflerinin varlığı kollajen lif çapının artmasını sağlarken, tip X kollajen; T1C lifleri için kalıp görevi görür (21,25). Fazın %90'ı T1C liflerinden oluşurken geri kalan kısmı non-kollajenize matriks proteinleri olarak adlandırabileceğimiz;

- ✓ Kalsiyum bağlayıcı proteinlerden [osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP), osteonektin (ON)],
- ✓ Mineralizasyon proteinlerinden [osteokalsin (OCN), matriks Gla protein, protein S],
- ✓ Yapısal proteinlerden (dekorin, biglikan, versikan, hiyaluronan, fibromodulin),
- ✓ Enzimatik proteinlerden [alkalen fosfataz (ALP), matriks metalloproteinaz, lizil oksidaz, stromelizin],
- ✓ Adezyon proteinlerinden (fibronektin, trombospondin),
- ✓ Kemik morfojenlerinden [transforme edici büyüme faktörü- β süper ailesi (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler), fibroblast büyüme faktörü (FGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF'leri), bağ doku büyüme faktörü (CTGF), kemik morfojenetik proteinleri (BMP'leri)],

oluşur (20,22,25).

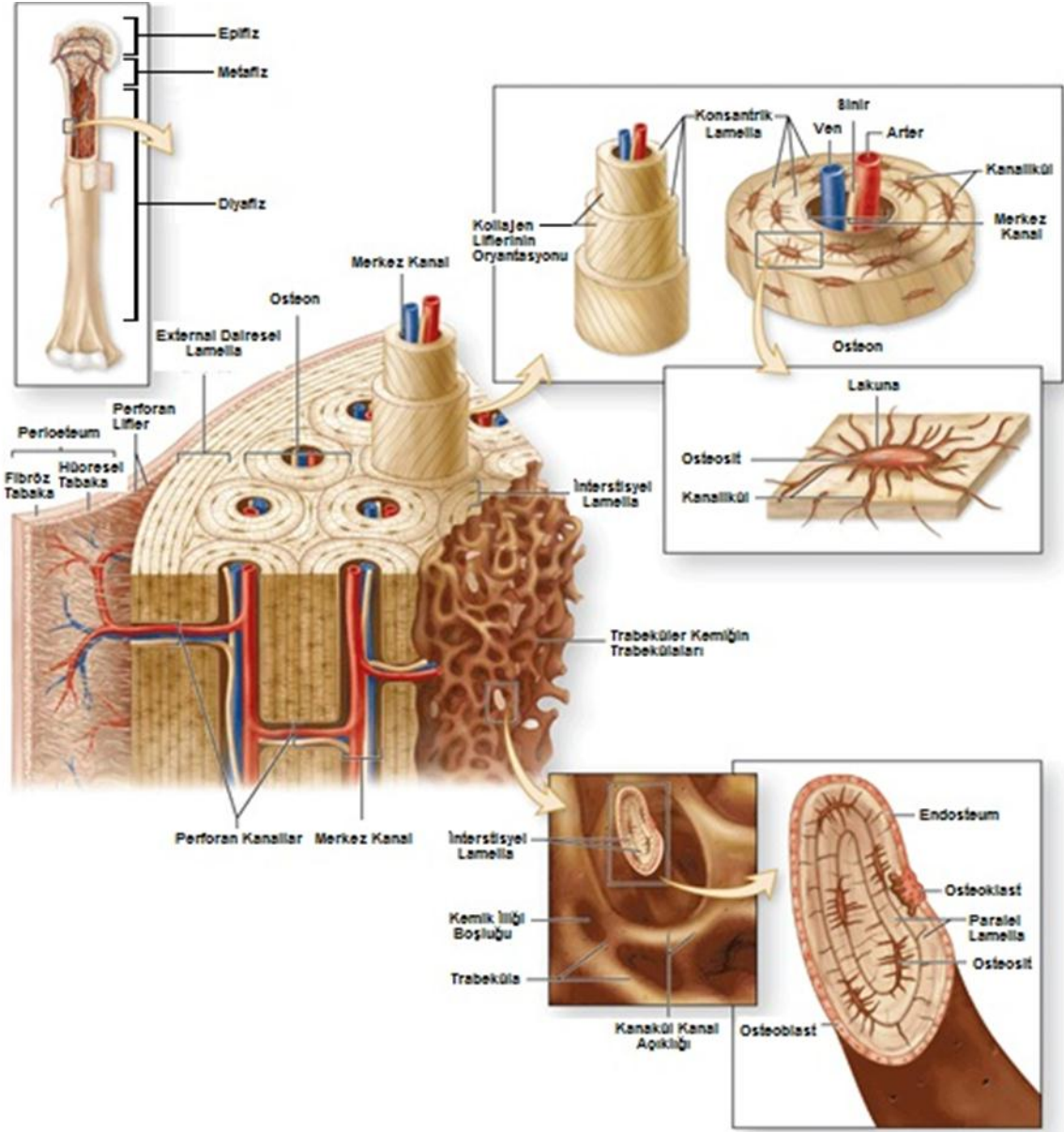
2.1.2. Kemik Histolojisi

Makroskopik olarak tüm kemikler kortikal (kompakt) ve trabeküler (kansellöz veya süngerimsi) olmak üzere iki tip kemikten oluşur. Kortikal kemik kemiğin dış

kabuğunu oluştururken, iç ağ trabeküler kemikten oluşur. Dışta kortikal kabuk içte trabeküler ağın oluşturduğu bu yapı, en az ağırlıkla en fazla mekanik işin yapılmasını sağlar. Kemiğin kortikal kısmı, çok az boşluk içeren sıkı düzenlenmiş bir yapıdır. Trabeküler kemik ise birbiri ile bağlantılı, örgü biçimindeki ince trabeküllerden ve kemik iliği tarafından doldurulan boşluklardan oluşur. Kortikal kemiğin %80-90'ı mineralize olurken, trabeküler kemikte bu oran %15-25'tir. Kortikal kemik koruyucu bir kabuk işlevi görürken, trabeküler kemik ağırlıklı olarak metabolik işlevlerden sorumludur. Trabeküler kemiğin yüzey alanı, kortikal kemiğe oranla daha büyüktür, bu nedenle, trabeküler kemiğin metabolik döngü hızı kortikal kemiğe göre daha yüksektir. Trabeküler kemiğin üç boyutlu örgüsel yapısı, özellikle sıkıştırma kuvvetlerine karşı, kemiğin dayanma gücünü artırır. Kortikal kemik sıkıştırma kuvvetlerinin yanında ağırlıklı olarak gerilme, eğme ve torsiyonel kuvvetlere karşı bu görevi üstlenir (17,21,26,27).

Kemiğin makro ölçekteki yapısıyla ilgili tartışmalarda en sık kullanılan örnek, femur veya tibia gibi uzun kemiklerdir. Bu kemiklerin genişleyen uç kısmına epifiz, silindire benzer orta kısmına diyafiz, iki yapı arasında kalan geçiş bölgesine metafiz adı verilir (Şekil 2.1). Büyüme döneminde epifiz ve metafiz arasında gözlenen epifizyal plak yetişkinlikte kaybolur. Merkez şaft olarak da adlandırılan diyafiz, kemiğin mekanik strese karşı en dayanıklı bölümünü oluşturur. Diyafiz, kortikal kemiğin en kalın bölümüdür ve kemik iliği ve buna ait boşluğu (medulla) çevreler. Kortikal kemik metafiz ve epifizde giderek incilir. Metafiz ve epifizin iç kısmı trabeküler kemikle doludur (23,24,25,28,29).

Kemikte dış (periosteum katmanı) ve iç (endosteum katmanı) olmak üzere iki katman bulunur (Şekil 2.1). Periosteum kemiğin dış yüzeyini sarar. Dış bölümü fibröz, iç bölümü kambium olarak adlandırılan hücresel tabakadan oluşur. Fibröz tabaka fibroblastları, sinir ve kan damarlarını içerirken, kambium tabakası osteoprogenitör hücrelerden oluşur. Bu yapı sayesinde periosteum yeni kemik sentezleme yeteneğine sahiptir. Periosteumda prekürsör hücrelerin varlığı kemiğin gelişim döneminde apozisyonel kemik yapımında görev almasını sağlayarak, yaşla birlikte kemik çapının artışında rol oynar. Endosteum ise uzun kemiklerin iç yüzeyi boyunca uzanır. Kemik yüzey hücreleri ve osteoblast hücrelerinden oluşur (20,21,23-25) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kemik dokunun histolojik yapısı (29)

Mikroskopik olarak kemikte, woven (immatür) ve lamellar (matür) olmak üzere iki tip kemik yapısına rastlanır ve lamellar tip kemik yapısı yetişkin döneme özgüdür. Kollajen lifleri birbirine paralel dizilim göstererek düzenli katmanlar (lamella) oluşturur. Bir sonraki katmana ait kollajen lifler bir önceki katmana dik olacak şekilde yerleşir. Böylece sıkı, düzenli bir yapıya bürünür. Eğer bu yapılaşma sinir ve damarların etrafında olursa merkez kanal etrafında kümelenir ve içten dışa doğru katmanlar halinde büyür. Bu yapı, konsantrik lamellar düzen olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Liflerin bu düzenli yapısı birim doku hacmindeki kollajen yoğunluğunu artırır. Bu

yoğun dizilim beraberinde yüksek oranda kalsifikasyon getirir. Mekanik kuvvetlere karşı gösterdiği direnç, sahip olduğu yapısal özellikler nedeniyle, son derece güçlüdür. Lamellar yapı hem kortikal hem de trabeküler kemikte gözlenir (17,21,25).

Kortikal kemikte lamellar yapı; i) osteon veya Havers sistemi, ii) eksternal dairesel lamella, iii) internal dairesel lamella ve iv) interstisyel lamella olmak üzere 4 tiptir. Kortikal kemiğin temel yapısal birimi osteondur (Şekil 2.1). Osteonlar, içinde sinir lifleri ve kan damarları bulunan merkezi bir kanal (Havers kanalları), kanal etrafına konsantrik yerleşim gösteren kollajen katmanlar (lamella) ve katmanlar arasında bir adet osteosit hücresi içeren lakünalar şeklinde düzenlenir. Osteositler, kanalikül adı verilen ince silindirik kanallarla merkez kanal içindeki damarlara ulaşarak besin ihtiyaçlarını karşılarlar. Bununla birlikte, osteonlar merkezi kanala oblik veya yatay yerleşimli Volkman kanalları ile hem kemik iliği hem de kendi aralarında iletişim kurarlar ve birbirlerinden “*cement*” çizgileriyle ayrılırlar (17,20,21,29,30).

Trabeküler kemiğin alt birimi yine cement çizgileriyle ayrılan trabeküla paketleridir (Şekil 2.1). Trabekülalar çoğunlukla damar içermezler ve yüzeyden difüzyonla beslenirler. Bu nedenle kalınlıkları 200-300 µm’yi geçmez. Osteonlarda olduğu gibi osteosit, laküna ve kanalikülleri içerirler. Ayrıca, kemik iliği boşlukları ile birlikte diğer kemik hücrelerini de yapısında bulundurur (17,20,21,26,27,30) (Şekil 2.1).

2.1.3. Kemik Hücreleri

Kemik metabolizması; aralarında kimyasal, mekanik, elektriksel ve manyetik olmak üzere çeşitli çevresel uyarımlarla düzenlenen bir sistemdir. Kemik dokuda yapım ve yıkım bir denge içindedir. Kemik hücreleri, çevresel uyarımlara kemik yapım-yıkım döngüsünü modüle ederek cevap verirler. Bu homeostaz; osteoblast, kemik yüzey hücreleri, osteosit ve osteoklast olmak üzere dört tip hücre ile ilişkilidir. Temelde, osteoblastlar kemik yapımından; osteoklastlar kemik yıkımından sorumludur. Osteositler, dokuda mekanik sinyalleri algılama görevini üstlenirken, yüzey hücreleri kemik yüzeyini korumakla görevlidir (25-27).

A) Osteoblastlar: Osteoblastlar, mezenkimal kök hücrelerinden köken alır. 15-30 µm çapında, büyük çekirdekli, çok sayıda endoplazmik retikulum içeren, büyük Golgi cisimciği ile karakterize, kübik hücrelerdir. Kemik yapımının gerçekleştiği yüzey

boyunca yan yana dizilerek hücrel bir tabaka oluşturur. Birbirlerine adherent tip kavşak yapısı ile bağlıdırlar. Bu yapı sayesinde hücreler arası haberleşme gerçekleşir. Böylece, hücrel aktiviteyi başlatan uyarı [mekanik uyarı veya prostaglandin E₂ (PGE₂) ve I₂ (PGI₂), değışen siklik adenosin monofosfat veya Ca düzeyleri] algılanır ve gerekli osteoblastik cevabın verilmesi sağlanır. Bu oryantasyon, kemiğin yeniden yapılanmasında (bone remodelling) oldukça önemlidir (20-22,26,27).

Osteoblastların temel işlevi, organik matriks (T1C ve non-kollajenize matriks proteinleri) sentezi ve mineralizasyonudur. Matriks sekresyonu daha önce yapılmış kemik matriksi ile temas halindeki osteoblast yüzeylerinde oluşur. Böylece, osteoblastlar ile daha önce meydana gelmiş kemik matriksi arasında mineralize olmamış bir matriks; osteoid oluşur. Osteoid, bir anlamda, mineralizasyon basamağı için kalıp matriks görevi görür. Matriks proteinlerinin ortak eylemi sonucu hidroksiapatit kristalleri T1C liflerinin mikroyapısında bulunan por ve gaplere yerleşerek sıkıca bağlanır. Böylece, osteoid kalsifiye olarak yeni kemik yapımı tamamlanır (20-22,30).

Osteoblastik aktivitenin temel belirteçleri organik matriks bileşenleridir. Kemik yapımı sırasında ALP aktivitesindeki artış en erken saptanan değışimdir. OCN ve BSP, osteoblastik sekresyon açısından önemli proteinlerdir. Bu proteinler, osteoblastik fonksiyonların değerlendirilmesinde en çok kullanılan ürünlerdir. Bir diğere önemli sekresyonu da osteoprotegerin (OPG) ve NF-kappa B aktive edici reseptör ligand (RANKL)'dır. OPG ve RANKL arasındaki ilişki osteoklastların diferansiyasyonunda önemli bir rol üstlenir. Matür osteoblastlar paratiroid hormon (PTH) ve vitamin D (1,25-dihidroksivitamin D₃) ile ilişkili reseptörlere sahiptir. Bu iki hormon kemik metabolizması ve mineral homeostazını düzenleyen anahtar moleküllerdir (20,21).

B) Kemik Yüzey Hücreleri: Kemik yüzey hücreleri, kemik yapımında görevlerini tamamlayan ve dinlenim durumuna geçen osteoblast hücreleridir. 1 µm kalınlığında, 12 µm çapında, yassı, küçük çekirdekli, az sayıda sitoplazmik organel içeren ve yoğunluğu yaşla birlikte azalan hücrelerdir. Kemiğin inaktif yüzeylerinde bulunur. Aktif bölgelerde ise, osteoid tabakasının 1 µm altına yerleşir. Böylece, osteoklastik yıkıma veya diğere inflamatuvar hücrelerin saldırısına karşı koruyucu bir bariyer oluşturur (20-22).

Kemik yüzey hücreleri, kemiğin yapılanma (modeling) ve yeniden yapılanma süreçlerinin başlatılmasında önemli rol oynar. Aktivasyon sinyalinin ulaşmasının ardından, yüzey hücreleri nötral proteazlar sekrete ederek osteoid yüzeyini sindirir.

Koruyucu bariyer uzaklaştırılır ve mineralize matriks osteoklastik yıkıma uğrar. Böylece, kemik yüzeyi yeniden yapılanma sürecinde başlangıç evresine girer (21).

C) Osteositler: Kemik dokunun %90-95'i osteosit hücrelerinden oluşur. Mekanosensör işlevi ile dokunun işlevsel adaptasyonunda görev alır. Kemik yapımı sırasında bazı osteoblastlar sentezlenen osteoid içinde kalarak lakünelara yerleşir. Bu süreçte, gömülen osteoblastlar çok sayıda organelini kaybederek osteositlere dönüşür. Osteoblastlar, kemik matrikse gömüldükçe ve osteositlere dönüştükçe aralarında kanaliküller oluşur. Yeni kemik sentezi devam ettikçe bu kanaliküller birleşir ve osteositik laküno-kanaliküler ağ oluşur. Bu ağ yüzey hücrelerine (osteoblastlar ve kemik yüzey hücreleri) kadar ulaşır ve oluk tip kavşak ile bağlanır. Böylece üç boyutlu ağ yapısı tamamlanır (20,21).

Kanaliküller; 0,5 µm çapında, boruya benzer kanallardır ve içinde osteositik uzantılar ile onu çevreleyen interstisyel sıvı bulunur. Periosteositik boşluk, osteositik sitoplazmik membran ile laküno-kanaliküler ağın kemik duvarı arasında kalan boşluktur. Periosteositik boşluk, toplam hacmi 1000-1500 ml olan interstisyel sıvı ile doludur. Eksternal mekanik sinyallerin sensör hücreler tarafından algılanabilen internal mekanik sinyallere dönüşümü laküno-kanaliküler ağ yoluyla gerçekleşir. Osteositlerin görev aldığı düşünülen diğer bir fizyolojik olay da kemik yüzey hücreleriyle birlikte oluşturduğu iyon bariyeridir. Bu hücresel bariyer ile Ca ve PO₄ iyon akımlarını modifiye ederek, TIC üzerinde yer alan por ve gaplere hidroksiapatit kristallerinin yerleşmesinde aktif rol oynar (21).

D) Osteoklastlar: Osteoklastlar, hematopoietik progenitör hücrelerden meydana gelen monosit-makrofaj soyundan köken alırlar. Osteoklastların gelişim sürecinde OPG ve RANKL önemli sitokinlerdir. Bu iki sitokinin sekresyonu, pre-osteoklastlardan fonksiyonel üst birime geçişi düzenleyen en önemli basamaktır. RANKL bu geçişi stimüle ederken, etkisini osteoklast membranında bulunan RANK (NF-kappa B aktive edici reseptör) reseptörüne bağlanarak gösterir. Böylece, osteoblast ve osteoklast arasında hücre-hücre etkileşimi gerçekleşir. Tümör nekroz faktör (TNF) α üyesi olan OPG, bu süreçte, inhibitör sitokin olarak görev alır. Etkisini RANKL'ye bağlanarak gösterir. Böylece, hücre-hücre etkileşimi önlenerek, osteoklastik diferansiyasyon durdurulur. Osteoblastlar, M-CSF sekresyonu ile de benzer bir kontrol gerçekleştirir. M-CSF varlığı osteoklastik prekürsör hücreleri için yaşamsal öneme sahiptir. Aksi takdirde

fonksiyonel osteoklastlara doğru gerçekleşen dönüşüm pre-osteoklastlara farklılaşma aşamasında durdurulur (20,21,25).

Osteoklastlar, kemik yıkımından sorumlu hücrelerdir. Kemik yıkımının gerçekleştiği alanlarda veya daha önce kemik yıkımının olduğu kaviteelerde gözlenir. Çapı 20 µm ile 100 µm arasında değişen büyük hücrelerdir ve hücre başına 3-25 çekirdek içerir. Dokuda işlevsel açıdan aktif veya inaktif evrelerde bulunabilir. Aktif evredeyken, fırça görünümlü plazmik uzantılar gelişir. Fırçamsı kenar, mühürleme bölgesi olarak adlandırılan ve organel içermeyen bir alanla sarılır. Bu alan, kontraktil yeteneğe sahip çok sayıda mikrofilament ve vitronektin reseptörü içerir. Böylece, kemik yüzeyi ile hücrenin apikal yüzeyi arasında sirkülasyona olanak tanıyan geçirgen bir duvar görevi görerek, hücrenin kemik matrikse tutunması sağlanır. Bu kavite içine yerleşen fırçamsı kenar sekrete ettiği proteolitik enzim ve asitlerle kemik degradasyonunu ve demineralizasyonunu gerçekleştirir. Mineral matriks, hidrojen-adenozin trifosfataz aracılı asit sekresyonu ile iyonlarına ayrıştırılırken, organik matriks proteolitik enzim (katepsin K ve matriksmetalloproteinaz-9) sekresyonu ile sindirilir (20-22).

Osteoklastlar, kalsitonin, PTH ve vitamin D gibi çeşitli sistemik hormonların etkisi altındadır. Osteoklastlarda kalsitonin reseptörleri bulunurken, PTH ve vitamin D ile ilişkili reseptörler bulunmaz; bu nedenle, osteoklastların hormonal regülasyonları çoğunlukla osteoblastlar tarafından düzenlenir. Böylece, gerek hormonal gerekse lokal faktörlerin (Çizelge 2.1) yoğun denetimiyle osteoklastik yıkım kontrol altında tutulur (20,21).

2.1.4. Kemik Regülasyonu: Endokrin ve Parakrin Faktörler

Başta osteoblastlar ve osteoklastlar olmak üzere kemik hücrelerinin diferansiyasyon, proliferasyon ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde pek çok endokrin (sistemik) ve parakrin (lokal) faktör görev alır. Kemik metabolizması olarak adlandırılan bu süreçlerde üstlendikleri kritik görevlerle Ca-PO₄ homeostazının sürdürülmesi ve normal kemik yapım-yıkım döngüsünün korunumu sağlanır. Sistemik faktörler arasında en önemlileri PTH, vitamin D ve kalsitonin hormonlarıdır. Sistemik etki gösteren diğer hormonlar ise, glukokortikoidler, büyüme hormonu (GH), tiroid ve

seks hormonlarıdır. IGF'ler hem sistemik hem de lokal etki gösterir. Prostaglandinler (PG'ler), TGF- β , BMP'ler ve sitokinler çoğunlukla lokal etki gösteren faktörlerdir.

Kemik metabolizmasında görev alan başlıca sistemik ve lokal faktörler ve bu faktörlerin görevleri çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

2.2. Kemik Biyomekaniği

Biyomekanik, mühendislik yöntemleri kullanılarak internal veya eksternal kuvvetlerin canlı sistemlerde gerçekleştirdiği etkileri inceleyen bir bilim dalıdır. Kemik dokunun mekanik özellikleri kemiğin yapısal ve fonksiyonel karakterini yansıtan temel parametreler olarak kabul edilir. Bu parametreler tüm anatomik ünitelerden ölçülebildiği gibi yapısal komponentlerden izole edilerek hazırlanan örneklerden de ölçülebilir (20,23).

Kemik biyomekaniğinde asıl incelenen nokta kemiğin kırılabilirliği. Kırılabilirlik genel anlamda kemiğin kırılma yatkınlığını ifade eden bir terimdir. Kırılabilirlik, BMD, geometrisi, gücü, kalitesi ve esnekliği ile doğrudan ilişkilidir. Kırılabilirlik (brittleness) ise kırılabilirliğin bir ölçüsüdür ve normal kemiğe göre daha kolay kırılan bir kemiği ifade eder (31). Kemik bilindiği gibi mineral ve kollajen olmak üzere iki komponentli kompozit bir materyaldir. Mekanik özellikleri birbirinden farklıdır. Mineral faz kemiğe güç (yük taşıma kapasitesi) ve mekanik rijidite (sertlik) kazandırırken, kollajen mekanik kuvvetlere karşı direnç, dayanıklılık ve kısmen esneklik kazandırır (23,25,32).

Çizelge 2.1. Kemik metabolizmasında görev alan başlıca sistemik ve lokal faktörler (21,22,25)

Sistemik Faktörler	
PTH	Kemik yapım ve yıkımında iki yönlü etki gösterir. Anabolik etkisiyle kemik yapım hızını artırır. İkincil mesajcılarla osteoklastik aktivite ve buna bağlı olarak kemik yıkımını artırır. Yüksek seviyelerde T1C sentezini baskılar, RANKL sentezini uyarır. Osteoklastları uyararak IL-6 ve IGF-I gibi lokal faktörlerin sentezini artırır. Serum Ca seviyesini düzenler.
Kalsitonin	Osteoklastik aktiviteyi baskılayarak kemik yıkımını azaltır. Osteoklastik diferansiyasyonu ve proliferasyonu baskılar. Plazma Ca seviyesini düzenler.
Vitamin D (Kalsitriol)	Kemik yapım ve yıkımında iki yönlü etki gösterir. Osteoblastları uyararak OCN ve IGF-I sentezini artırır. Barsaktan Ca ve P emilimini artırarak kemik mineralizasyonunu düzenler. Yüksek seviyelerde T1C sentezini baskılar. Osteoklastogenezi uyarır. IL-1 ve RANKL sentezini artırır.
İnsulin	Kemik yapım ve yıkımında iki yönlü etki gösterir. Fizyolojik konsantrasyonlarda matriks sentezini uyarır, osteoblastik proliferasyonu ve aktiviteyi artırır. Kemik yıkımını düzenler.
Seks Hormonları Östrojen	T1C ve matriks sentezini uyarır, kemik yıkımını baskılar. Matriks proteinlerinin sentezini düzenler. Kemik gelişimi ve maturasyonu için önemlidir. Osteoblastik proliferasyonu düzenler. Osteoblastik apoptozu baskılayarak, osteoklastik apoptozu uyarır. PG ve bazı sitokinlerin (TGF- β , IGF-I, OPG) sentezini artırırken, bazı sitokinleri (IL-1, IL-6, TNF- α , β , M-CSF) baskılar. Yaşlanma sırasında kemik yıkımını engeller.
Androjen GH ve GH/IGF-1 Sistemi Glukokortikoidler	Doza bağlı etki gösterir. Bazı matriks proteinlerinin (ALP, OCN, ON) sentezini ve osteoblastik diferansiyasyonu uyarır. Kemik gelişiminde önemlidir. Hücre replikasyonunu artırır. Kemik matriks, IGF-I ve -II sentezini uyarır. Matriks proteinlerinin sentezini azaltır, böylece, kemik yapımını baskılayarak kemik kütlelerini azaltır. Osteoblastik proliferasyonu düzenler. Osteoblastların PTH duyarlılığını artırarak kemik yıkımını uyarır. Ayrıca, PG, TGF- β ve IGF-I sentezini baskılar.
Tiroid Hormonları	Büyüme ve gelişim için gereklidir. Yetişkinlerde kemik yapımının düzenlenmesinde görev alır. Fizyolojik konsantrasyonlarda IGF-I, ALP, OCN ve T1C sekresyonunu uyarır. Osteoblastik diferansiyasyonu ve proliferasyonu uyarır. Yüksek T ₃ ve T ₄ seviyeleri kemik yıkımını artırır.
Lokal Faktörler	
Büyüme Faktörleri IGF-I	Kemik dokunun en önemli büyüme faktörüdür. Otokrin ve parakrin etki gösterir. Çeşitli sistemik (östrojen, vitamin D, tiroid hormonları, glukokortikoidler, PTH), lokal faktörler (TGF- β , FGF, PDGF, BMP, PGE ₂) ve mekanik uyarıya cevaben salgılanır. T1C ve matriks sentezini uyarır.
IGF-II	Mekanik uyarının algılanmasında sinyal molekülü olarak görev aldığı düşünülmektedir. Kontrolünde birçok sitokin (TGF- β , BMP, PGI ₂) ve büyüme faktörü (FGF, PDGF) görev alır.

Çizelge 2.1. Devam Kemik metabolizmasında görev alan başlıca sistemik ve lokal faktörler (21,22,25)

Lokal Faktörler

Büyüme Faktörleri

TGF- β	Kemikte anabolik etkiye sahip olmakla birlikte, uyarıcı ve baskılayıcı özelliklere sahip bir sitokindir. Osteoklastik diferansiyasyon ve proliferasyonu baskılayarak, osteoblastogenezi uyarır. Osteoblastların yıkım kavitelere migrasyonunu sağlar. Matriks proteinlerinin (TIC, ON, OPN, dekorin, integrin, PGE ₂ ve PGI ₂) sentezini uyarırken, OCN sentezini baskılar. Osteoblastik IGF-II sentezini azaltırken, IGF-I sentezini düzenler.
FGF	Kemik yapım ve yıkımında iki yönlü etki gösterir. Kemik yapımında osteoblastik proliferasyonu ve apoptozu uyarır. TIC ve ALP sentezini baskılar. OPN, ON ve OCN sentezini düzenler. Osteoblastik IGF-I ve -II sentezini azaltır. Yıkımda osteoklastogenezi uyarır. Kollajenaz sentezini düzenler.
PDGF	Kemik hücrelerinin replikasyonunu artırır. TIC ve ON sekresyonunu baskılayarak, OPN sentezini uyarır. Osteoblastik IGF-I ve -II sentezini azaltır. TIC degradasyonunu ve kollajenaz sekresyonunu uyararak, kemik yıkımını artırır. Osteoblastik IL-6 sentezini uyarır.
CTGF	Osteoblastogeneze görev alır. Etkisini TGF- β ve BMP üzerinden gösterir.

Sitokinler

IL-1	PG ve RANKL sentezini uyararak kemik yıkımını artırır. TIC ve matriks sentezini baskılar. Aktivitesi için NO sentaz enzimine ihtiyaç duyar. Osteoklastların hematopoietik progenitör hücrelerden farklılaşmasında görev alır.
IL-4,-10,-13, -18	İnhibitör özellikli sitokinlerdir. IL-4: IL-1, TNF- α , - β , vitamin D ve PGE ₂ antagonistidir. Osteoblastik PG ve M-CSF sentezini uyarır. Osteoklastogenezi ve bu hücrelerin aktivitesini baskılar. IL-10: TIC, ALP ve OCN gibi matriks proteinlerinin sentezini baskılar. Mineralizasyonu korur. IL-13: Osteoblastik PG sentezini uyararak kemik yıkımını baskılar. IL-18: Osteoklastik diferansiyasyonu baskılar. Osteoblastik GM-CSF sekresyonu uyarır.
IL-3,-6,-11	IL-3: Osteoblastlar tarafından salgılanır. Osteoklast diferansiyasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. IL-6: Osteoblastlar tarafından PTH, vitamin D ve IL-1'e cevaben salgılanır. IL-11 ve LIF ile benzer görevleri vardır. Osteoklastik diferansiyasyonu uyarır. Etkisi, TNF- α , - β ve IL-1'e göre zayıftır. Osteoblastik IGF-I sentezini uyarır. IL-11: Osteoklastik diferansiyasyonu uyarır. Osteoblastik aktiviteyi ve RANKL sentezini artırır.
TNF- α , - β	PG sentezini uyararak kemik yıkımını artırır. Osteoklastik ve osteoblastik proliferasyonda görev alır. Osteoblastogenezi baskılar. Osteoblast apoptozunu uyarır. TIC sentezini baskılar. Osteoblastlarda PGE ₂ ve IL-1 sentezini uyarır. Kalsitonin etkisiyle baskılanır.

Çizelge 2.1. Devam Kemik metabolizmasında görev alan başlıca sistemik ve lokal faktörler (21,22,25)

Lokal Faktörler	
Sitokinler	
IFN- γ , β	Kemik yıkımını baskılar. IL-1 ve TNF- α , β sekresyonuna cevaben salgılanır. Etkisi son derece kuvvetlidir. Osteoblastik aktiviteyi artırır. TIC ve organik matris proteinlerinin sentezini düzenler.
LIF	Kemik hücrelerinin diferansiyasyonunda görev alır. Ayrıca, TIC, ALP ve RANKL sentezini uyardığı düşünülmektedir.
BMP	Osteoblastik diferansiyasyon ve proliferasyonu uyarır. Osteoblastik IGF-I ve -II sentezini uyarır.
Diğerleri	
Koloni Stimulan Faktörler	
M-CSF	Osteoblastik ve osteoklastik diferansiyasyonda görev alır. Osteoklastik aktivasyonda RANKL ile birlikte görev alır.
GM-CSF	Kemikte osteoblastlar tarafından salgılanır. Osteoklastik diferansiyasyonda iki yönlü aktivite gösterir ve bu aktivite doza bağlı olarak gerçekleşir. Gerekliğinde uyarır, gerekliğinde baskılar.
G-CSF	Kemikte osteoblastlar tarafından salgılanır. Osteoklastik diferansiyasyonda görev aldığı düşünülmektedir.
PGE ₂	Kemikte uyarıcı ve baskılayıcı özelliklere sahip sitokindir. Yüksek konsantrasyonlarda TIC ve matris sentezini baskılayarak, düşük konsantrasyonlarda uyarır. Böylece kemik yıkımını uyarır veya baskılar. Ayrıca, IGF-I sentezini uyarır. Mekanik uyarımın algılanmasında görev alır.
PGI ₂	Osteositik IGF-II sentezini uyarır. Mekanik uyarımın algılanmasında görev alır.
OPG/RANKL	Osteoklastik diferansiyasyon ve aktivasyonda görev alır. Bu iki süreçte de anahtar moleküllerdir. Osteoblastlar tarafından salgılanırlar. OPG baskılayıcı bir sitokinken, RANKL membran ligandıdır. RANKL, osteoblast-osteoklast arasında gerçekleşen hücre-hücre etkileşiminden sorumludur. Etkisini osteoklast membranında bulunan RANK reseptörüne bağlanarak gerçekleştirir. Bu etkileşimi OPG, RANK reseptörüne bağlanarak, engeller.
RANK	Osteoklastik diferansiyasyon ve aktivasyonda görev alır. Bu iki süreçte de anahtar moleküldür. Osteoklast tarafından sentezlenen bir membran reseptörüdür. Osteoblast-osteoklast arasında gerçekleşen hücre-hücre etkileşiminden sorumludur. Bu etkileşimi osteoblastlar tarafından sentezlenen RANKL membran ligandına bağlanarak gerçekleştirir.
NO	Düşük konsantrasyonlarda kemik yıkımını, yüksek konsantrasyonlarda kemik yapımını uyarır. IFN- γ , β + IL-1 veya + TNF- α , β etkisiyle sentezi artırır. Osteoklastik aktiviteyi baskılar. Osteoklastik progenitör hücrelerinin apoptozunu uyarır.

PTH: Paratiroid hormon; TIC: Tip 1 kollajen; RANKL: NF-kappa B aktive edici reseptör ligandı; IL: İnterlökin; IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü; OCN: Osteokalsin; PG: Prostaglandin; TGF- β : Transform edici büyüme faktörü- β süper ailesi; OPG: Osteoprotegerin; TNF: Tümör nekroz faktör; M-CSF: Makrofaj koloni stimulan faktör; ALP: Alkalen fosfataz; ON: Osteonektin; GH: Büyüme hormonu; T₃: Triiyodotronin; T₄: Tiroksin; FGF: Fibroblast büyüme faktörü; PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü; BMP: Kemik morfogenetik protein; OPN: Osteopontin; CTGF: Bağ doku büyüme faktörü; NO: Nitrik oksit; GM-CSF: Granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör; LIF: Lenfosit inhibitör faktör; IFN: İnterferon; G-CSF: Granülosit koloni stimulan faktör; RANK: NF-kappa B aktive edici reseptör.

Kemik biyomekaniğinde kırılmalık, yapısal (ekstrinsik, organ boyutu) ve materyal (intrinsik, doku boyutu) olmak üzere iki bölümde incelenir. Yapısal özellikler daha çok kemiğin mineral fazı ile ilişkilirken, materyal özellikler kemiğin her iki fazı ile de ilişkilidir. Kemiğin yapısal özellikleri maksimum kırılma kuvveti (ultimate load veya ultimate force), maksimum deformasyon (ultimate displacement), sertlik (stiffness) ve kırılmaya kadar depolanan enerji (work to failure) parametreleri ile değerlendirilir. Materyal özellikleri ise maksimum dayanım (ultimate strength), maksimum strain (ultimate strain), esneklik katsayısı (elastik modulus veya Young modulusu) ve dayanıklılık (toughness) parametreleri ile incelenir. Kemiğin yapısal ve materyal parametreleri birlikte değerlendirilerek, kemiğin kırılabilirliği ve kalitesi hakkında bilgi edinilir. Bu yöntemle, kemik kalitesini etkileyen (azaltan veya bozan) bazı iskelet sistemi hastalıklarının, mekanik anlamda kemikte ne tür değişikliklere neden olarak kırılmalığı arttırdıkları saptanabilir ve gerekli tedavi prosedürleri geliştirilebilir (19,23,31,32).

Bazı iskelet sistemi hastalıkları kemik yapısını farklı yollarla etkileyerek kırıklara neden olabilir. Örneğin, osteopetroz ve osteomalazi önemli iskelet sistemi hastalıklarıdır ve her ikisinde de kırık oluşma insidansı oldukça yüksektir. Ancak, biyomekanik açıdan kabaca incelendiğinde aralarında bazı farklılıklar olduğu saptanabilir. Osteopetrotik kemikler oldukça sert (yüksek düzeyde mineralize) ve kırılmal kemiklerdir. Kırılmadan önce çok az enerji absorbe ederler. Bu nedenle böyle bir kemiğin bir travma karşısında kırılma yatkınlığı oldukça yüksektir. Osteomalazi, güçsüz ve sünek (ductile) kemikler ile karakterizedir. Osteopetrozda olduğu gibi kırılmaya kadar depolanan enerji genellikle düşüktür. Ancak, bu kemikler kırılmadan önce önemli derecede deforme olabilmektedirler. Osteomalazik kemikler genellikle yük altında eğilir ve deforme olurlar. Aynı durum osteopetrotik kemik için söz konusu değildir. Bu kemiklerde deformasyon ya çok küçüktür ya da yok denecek kadar azdır (31).

Sonuç olarak, kemiğin kırılmalığı ve kırılabilirliği başta olmak üzere kemik biyomekaniği ile; i) bir kemiğin yapısal ve/veya materyal özellikleri, ii) patolojik durumlarda yapısal ve/veya materyal boyutta ne tür değişikliklere neden olarak kırılmayı kolaylaştırdığı ve iii) patoloji ile ilişkili tedavi prosedürleri hakkında bilgi edinilebilir. Bu nedenle, kemik dokunun biyomekanik özelliklerine ilişkin bölümlerin

daha iyi anlaşılabilmesi için bu özelliklerin açıklanmasında kullanılan mühendislik terminolojisinin iyi bilinmesi gerekir.

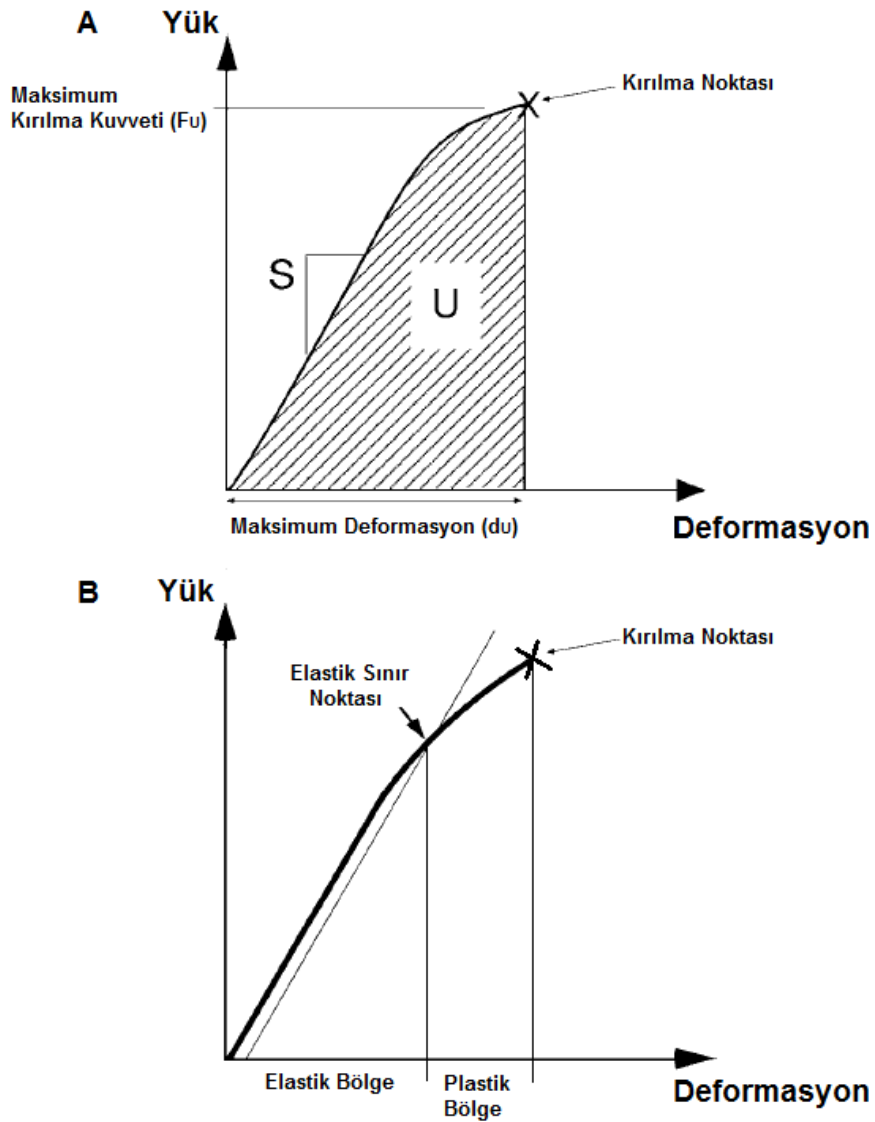
2.2.1. Biyomekanik Terminoloji ve Kemiğin Biyomekanik Özellikleri

Kemiğin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde temel unsur dokuya uygulanan yük (load) ve dokuda bu yük nedeniyle oluşan deformasyon (displacement) arasındaki ilişkinin saptanmasıdır (33). Bu ilişki çeşitli test yöntemleri ile saptanarak kemik materyaline ait yük-deformasyon eğrisi (load-displacement curve) çizdirilebilir (Şekil 2.2 A ve B). Temelde yük-deformasyon eğrisi, herhangi bir yönde uygulanan kuvvet nedeniyle dokuda gerçekleşen toplam harabiyeti gösterir (23).

Yük-deformasyon eğrisi, elastik ve plastik olmak üzere iki bölgede incelenir (Şekil 2.2 B). Elastik bölge eğrinin başlangıç bölümünde yer alan lineer bölgedir. Kemik bu bölgede yay gibi davranır. Uygulanan yük arttıkça oluşan deformasyon artar. Kuvvetin ortadan kaldırılmasıyla kemik orijinal formuna döner. Kemikte, yük nedeniyle oluşan deformasyon bu bölgede kalıcı değildir. Ancak uygulanan kuvvet, elastik sınır noktası (yield point) olarak adlandırılan bölgenin dışına çıktığında kemikte oluşan deformasyon geri dönüşümsüzdür. Plastik bölge olarak adlandırılan bu bölgede kemikte oluşan hasar, trabeküler mikrokırıklar, lamellar kaymalar ve sonuçta oluşan kırık nedeni ile kalıcıdır. Plastik bölgenin büyüklüğü kemiğin sünekliğinin ölçüsüdür. Bu bölge ne kadar küçük olursa kemik o derece kırılımandır. Elastik sınır noktası bu iki bölge arasında yer alır ve elastik bölge ile birlikte kemiğin esnekliğini kaybetmeden ne kadar deforme olabileceğini gösterir (17,19,34).

Yük-deformasyon eğrisi ile kemiğin yapısal (ekstrinsik) özellikleri, diğer bir ifadeyle organ boyutundaki özellikleri saptanabilir (Şekil 2.2 A). Sertlik (stiffness; S) veya yapısal rijidite (structural stiffness) önemli bir ekstrinsik parametre olmakla birlikte, kemiğin mineral fazı ile yakından ilişkilidir. Sertlik, uygulanan kuvvete karşı kemiğin gösterdiği direnci yansıtır ve elastik bölgenin eğiminden saptanır. Yük-deformasyon eğrisinin altında kalan alan kemiğin kırılıncaya kadar depoladığı enerji (work to failure; U) olarak tanımlanır ve kemiğin kırılabilirliği hakkında bilgi verir. Maksimum deformasyon (ultimate displacement) kemiğin kırılma anına kadar dokuda oluşan deformasyon miktarıdır ve kemiğin kırılabilirliği (brittleness) ile ilişkilidir.

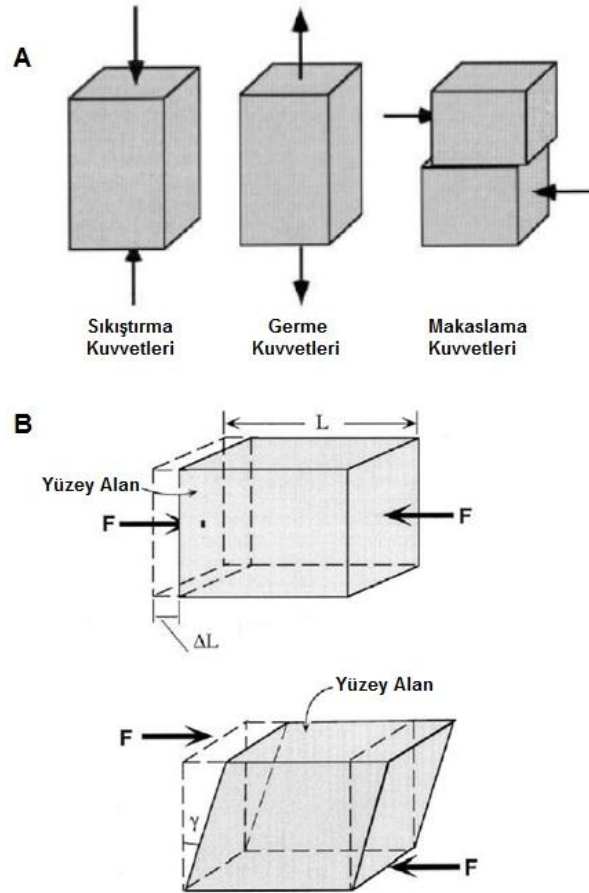
Maksimum kırılma kuvveti (ultimate load veya ultimate force) kemiğin kırılma anında gözlenen kuvvet değeridir ve dokunun yapısal açıdan genel bütünlüğünü yansıtır. Sonuç olarak yük-deformasyon eğrisinden elastik sınır bölgesi, maksimum kırılma kuvveti ve maksimum deformasyon direkt olarak ölçülebilir. Sertlik ve depolanan enerji ise yük-deformasyon eğrisinden hesaplanır (17,19,23,31-34).



S: Sertlik, U: Depolanan enerji

Şekil 2.2. A) Yük-deformasyon eğrisi ve bu eğriden saptanan yapısal biyomekanik parametreler. B) Yük-deformasyon eğrisi ve bu eğrinin bölümleri (33)

Kemiğin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde yapısal özelliklerinin yanında materyal özelliklerinin de göz önüne alınması gerekir (18,19). Dokunun organ boyutunda elde edilen en önemli veri sertlik ve maksimum kırılma kuvvetidir (34). Diğer ekstrinsik parametrelerde olduğu gibi sertlik ve maksimum kırılma kuvveti de kemiğin şekline ve büyüklüğüne bağlıdır. Ancak deneysel çalışmalarda, örneğin büyüklüğü veya preparasyonu (tırışlanarak veya kesilerek doku şeklinin değiştirilmesi) arasındaki farklılıklar nedeni ile mekanik sonuçlar üzerinde olumsuz etkileri görülebilir. Bu olumsuzlukları gidermek için uygulanan yük ve deformasyon, kesit alan (cross-sectional area) veya atalet momenti (moment of inertia) ile normalize edilerek, stres ve strain cinsinden ifade edilir (25,32). Böylece, kemiğin mekanik analizi organ boyutundan doku boyutuna geçerken, farklı geometrik özelliklere sahip materyalin sağlıklı bir şekilde karşılaştırılması sağlanır.



Şekil 2.3. A) Saf kuvvetler B) Sıkıştırma kuvveti etkisi altındaki bir cisimde gözlenen boyca kısalma deformasyonu (ΔL) ve makaslama kuvveti etkisi altındaki bir cisimde gözlenen açısall deformasyonu (γ) (23)

Stres, mühendislik alanında birim alan başına uygulanan kuvvet olarak tanımlanır ve kuvvetin alan başına yoğunluğunu yansıtır. Strain birim uzunluk başına deformasyondur. Stres, metrekare başına kuvvet (N/m^2), diğer bir ifade ile paskal (Pa) olarak standardize edilir. Strain birimsizdir ve çoğunlukla μ strain ($\times 10^{-6}$ mm/mm) veya yüzde ($\times 10^{-2}$ mm/mm) olarak ifade edilir. Mekanik fizikte üç tip saf (tek-yönlü) kuvvet bulunur. Bu kuvvetler; germe (tensile), sıkıştırma (compression) ve makaslama (shear) kuvvetleridir. Anılan kuvvetlerin dokuda oluşturduğu stres ve strain tanımları kuvvetin uygulanma doğrultusuna göre yapılır. Eğer kemik dikey kuvvetlerin etkisi altında ise germe veya sıkıştırma stresine, paralel kuvvetlerin etkisi altında ise makaslama stresine maruz kalır (Şekil 2.3 A) (21-23,25,34).

Kemikte görülen stres paternlerinin çoğu anılan kuvvetlerin kompleks kombinasyonları şeklinde gerçekleşir. Eğme (bending) ve burma (torsion) stresi bu duruma verilebilecek en iyi örnektir. Eğme geriliminde kemiğin konveks yüzünde germe kuvvetleri, konkav yüzünde sıkıştırma kuvvetleri oluşur. Burma stresinde ise kemik boyunca oluşan makaslama stresi nedeniyle germe kuvvetleri kemiği uzatırken, sıkıştırma kuvvetleri kısaltır. Strainde adlandırma streste olduğu gibi uygulanan kuvvetin doğrultusuna göre yapılır. Germe ve sıkıştırma kuvvetleri altında materyalde gözlenen deformasyon boyca uzama veya kısalma şeklindeyken, makaslama kuvveti altında açılmal deformasyon gözlenir. (Şekil 2.3 B) (21-23,25,34).

Stres-strain eğrisi ile kemiğin materyal özellikleri, diğer bir ifadeyle doku boyutundaki özellikleri saptanabilir. Yük-deformasyon eğrisinde kemiğin kırıldığı andaki maksimum kırılma kuvveti stres-strain eğrisinde maksimum dayanım olarak karşımıza çıkar. Her iki parametrede benzer yöntemle saptanmasına karşın, özellikle kemiğin geometrik özelliklerini etkileyen patoloji ve ilaçlı tedavi prosedürlerinde farklı eğilim gösterirler. Maksimum dayanım kemiğin geometrik özelliklerinden etkilenmezken, maksimum kırılma kuvveti kemiğin büyüklüğü ile yakın ilişkidir. Maksimum strain (ultimate strain veya süneklik (ductility)) kemiğin kırıldığı anda gözlenen strain değeridir ve kırılmalık ile ters ilişkilidir. Kırılmalık kemiklerde maksimum strain küçüktür. Stres-strain eğrisinde maksimum dayanım noktasına kadar eğri altında kalan alan dayanıklılık (toughness) veya strain enerjisi olarak tanımlanır ve kemiği kırmak için gereken enerji miktarını ifade eder. Dayanıklılık kemik biyomekaniği açısından önemli bir parametredir. Dayanıklılığı yüksek bir kemik

kırılmaya karşı daha çok direnç gösterir ve deformasyon yeteneği daha yüksektir (19-22,33).

Yük-deformasyon eğrisinde olduğu gibi stres-strain eğrisi de elastik ve plastik olmak üzere iki bölümden oluşur. Elastik sınır noktasıyla birbirinden ayrılır. Elastik sınır kademeli bir geçişi ifade ederken, kemik yapısında kalıcı hasar oluşturmaya başlayan stresi yansıtır. Eğride nadiren tespit edilir. Elastik bölgenin eğiminden esneklik katsayısı (elastik modulus) saptanır. Esneklik katsayısı dokunun intrinsik sertliğini (intrinsic stiffness) ifade eder ve kemiğin uygulanan gerilmeye karşı kalıcı bir hasar oluşmadan ne kadar deforme olabileceğini gösterir. Esneklik katsayısı, eğer dokuya germe veya sıkıştırma kuvvetleri uygulanıyorsa Young modulusu, makaslama kuvveti uygulanıyorsa makaslama katsayısı veya kesme katsayısı olarak adlandırılır (21,22,25,33).

2.2.2. Kemik Biyomekaniğine Etki Eden Faktörler

Kemiğin morfolojik yapısı dikkate alındığında kortikal ve trabeküler kemik aynı materyalden oluşmalarına rağmen, yapısal özellikleri birbirinden farklıdır. Bu farklılık mekanik özelliklerine de yansır. Kortikal kemiğin kompakt yapısı trabeküler kemiğe göre daha güçlü ve sert olmasını sağlar. Kortikal kemiğin temel unsuru osteonlardır. Osteonlar, kemiğin uzun eksenini boyunca maksimum dayanıklılık sağlar. Trabeküler kemik için dayanımı tanımlamak oldukça zordur. Her trabekülanın bireysel dayanımı söz konusudur. Bu nedenle bireysel katkıların toplamıyla oluşan bir dayanıma sahiptir. Kortikal kemik; eğme, burma ve sıkıştırma kuvvetlerine karşı dayanıklıyken, trabeküler kemik germe ve makaslama kuvvetlerine karşı dirençlidir. Trabeküler kemik, kortikal kemiğin % 10'u kadar sert ve 500 katı kadar sünektir (20-22,35).

Kemik anizotropik bir materyaldir; yani kemiğin mekanik özellikleri kuvvetin uygulama yönüne bağlı olarak değişir. Örneğin, plastik deformasyon transvers yükleme ile azalır ve kemik bu yönde daha kırılabilir bir yapıya bürünür. Kemiğin anizotropik davranışı her iki tip kemikte de gösterilmiştir. Kortikal kemik, germe yüküne nazaran sıkıştırma yüküne karşı daha dayanıklıdır. Lomber vertebralara ait trabeküler kemiğin sıkıştırma dayanımı, horizontal eksene göre vertikal eksende daha büyüktür. Yapılan bir çalışmada, insan femur kemiğine germe kuvveti longitudinal ve transvers olmak üzere

iki ekseninde uygulanmış ve dayanımın 133 MPa'dan 51 MPa'a, elastikiyet katsayısının da 17×10^6 MPa'dan 11.5×10^6 MPa'a azaldığı gösterilmiştir (21,22).

Porozite (gözeneklilik) kemik biyomekaniğini etkileyen diğer bir faktördür. Sağlıklı bireylerde trabeküler kemiğin porozitesi %70–80 aralığında yer alır. Kortikal kemikte ise bu oran %2–4 kadardır. Osteoporoz gibi kemik hastalıklarında kortikal kemiğin porozite oranı %10–12'lere kadar çıkabilir. Porozite kemiğin dayanımı ve esneklik katsayısı ile yakından ilişkilidir. Genel kabul, porozitede gözlenen küçük bir artışın mekanik dayanım ve intrinsik sertlikte büyük azalışlara neden olduğu yönündedir (33).

Kemiğin biyomekanik özelliklerini belirleyen faktörlerden biri de kemik kütesidir (bone mass). Trabeküler kemiğin yapısal davranışını başlıca; kemik kütesi, mikromimarisi (trabeküla geometrisi, uzaysal dağılımı ve birbirleriyle olan bağlantısı) ve materyal özellikleri belirler. Bu etkenlerden herhangi birinde gözlenen değişiklik kemiğin yüke karşı dayanma yeteneğini azaltarak, kemik bütünlüğünü bozar. Günlük hayatta karşılaştığımız yük çoğunlukla eğme ve sıkıştırma kuvvetlerinin etkisiyle oluşur. Trabeküler BMD kortikal kemiğin ancak %25'i kadardır. Bu nedenle, anılan kuvvetlere karşı kortikal kemiğin dayanımı oldukça yüksektir. Örneğin, trabeküler BMD'deki %20'lik bir azalışın, trabeküler sertlikte (intrinsik sertlik) ve dayanımda %36'lık bir azalışa neden olduğu söylenmektedir (34).

Kemiğin geometrik özellikleri de kemik biyomekaniğini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Özellikle kortikal kemiğin geometrik özellikleri kemiğin kırılmaya karşı gösterdiği direnci yansıtır. Kesit alanı büyük olan kemik daha güçlü ve dayanıklıdır. Kortikal kesit alanında gözlenen %25'lik bir azalış, kesme katsayısında %6'lık bir azalışa neden olur. Bu azalış aynı oranda kırılma kuvvetine de yansır (34).

Kemik biyomekaniğine etki eden diğer faktörler, yaş, cinsiyet ve kemik metabolizmasını etkileyen bazı iskelet sistemi hastalıklarıdır. Kemik kütesi, geometrisi ve kemiğin materyal özellikleri yaşla birlikte değişir. Kemik kütesi ve mimarisinde yaşa-bağımlı degradasyon kemik bütünlüğünü önemli derecede bozar. Kemik kütesi, pik değerine ulaştıktan sonra hem erkekte hem de kadında, özellikle kadında premenopozal kemik kaybına bağlı olarak, yaşla birlikte azalır. Örneğin, omurilik, kalça ve ön kol olmak üzere kırıkların yoğun olarak gözlemlendiği bölgelere ait BMD değerlerindeki azalış, 80 yaşındaki bir erkekte %13–18, kadında %15–54 kadardır.

Gözlenen bu bozulma kemiğin hem mimarisini hem de kütesini etkileyerek, dayanımı bu değerlerle orantılı olacak şekilde azaltır (34,36–43).

Cinsiyet ilk bakışta mekanik özellikler üzerinde etkisiz gibi görünse de yaşla birlikte önemi ortaya çıkar. Bu farklılık OP’de daha belirgindir. Yaşla birlikte her iki cinsiyette de trabeküler kemiğin hacim fraksiyonu (trabeküler kemik hacmi/toplam kemik hacmi) dengeli bir şekilde azalır. Erkeklerde hacim fraksiyonunda gözlenen azalışın nedeni trabekülalarda gerçekleşen incelmedir. Bu incelmeye, dengeli ve kademeli olarak gerçekleşir; trabeküler ağ ve kemik bütünlüğü korunur. Ancak, kadınlarda azalış trabeküle kaybı, yani trabeküler seperasyondaki artıştır. Bu durumda trabeküler ağ ve kemik bütünlüğü bozulurken, geriye kalan trabekülalar orijinal çaplarını korur. Mimari yapıda karşımıza yaşla birlikte çıkan cinsiyet farklılığı kemiğin kırılma kuvvetinde önemli farklılıklara yol açar. Örneğin, vertebral trabeküler kemiğe ait BMD değerinde gözlenen incelmeye-nedenli BMD’de %10’luk bir azalış, kemiğin kırılma kuvvetini %20 azaltır. Ancak, kadınlarda olduğu gibi trabeküle kaybı söz konusu ise kuvvette gözlenen azalma %70 kadardır (34,44–47).

2.2.3. Kemik Biyomekaniğinde Kullanılan Test Yöntemleri

Kemiğe uygulanan kuvvet, uygulama yönüne bağlı olarak; germe, sıkıştırma, makaslama veya anılan kuvvetlerin belirli derecede kombinasyonları şeklinde olabilir. Bu kuvvetlerin dokuda oluşturduğu stres nedeniyle kırıklar oluşur. Kemiğin mekanik davranışı ekstrinsik ve intrinsik özelliklerinin saptanması ile ortaya çıkarılabilir. Bunun için birbirinden farklı mekanik özelliklere sahip çeşitli test yöntemleri geliştirilerek kemiğin uygulanan kuvvete karşı verdiği cevaplar saptanabilir. Germe, sıkıştırma, burma ve eğme testleri kemik biyomekaniğinde konvansiyonel olarak kullanılan test yöntemleridir (21,23).

A) Germe Testi (Tensile Testing): Germe testi, kemiğin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan en etkin yöntemlerden biridir. Bu yöntem ile hem kortikal hem de trabeküler kemik test edilebilir. Germe testinde kullanılacak kemik örnekleri, genellikle 15–25 mm uzunluğunda ve en az 4–8 mm genişliğinde (özellikle trabeküler kemik örnekleri için) hazırlanmalıdır. Bu değerlerden büyük örneklerin hazırlanması germe testinin yararlılığını kısıtlar. Bu kısıtlama özellikle trabeküler kemiğin mekanik

özelliklerinin belirlenmesinde sıkıntı yaratır. Yöntemde uygulanan germe kuvveti, kemiğin uzun eksenini boyunca uzamasına neden olur. Oluşan gerilme transvers kesit alanında makaslama bileşeni içermez, uygulanan kuvvet eşleştiğinde eğme momenti oluşturmaz ise germe testi en etkin ölçüm standardına ulaşır (19,33,35).

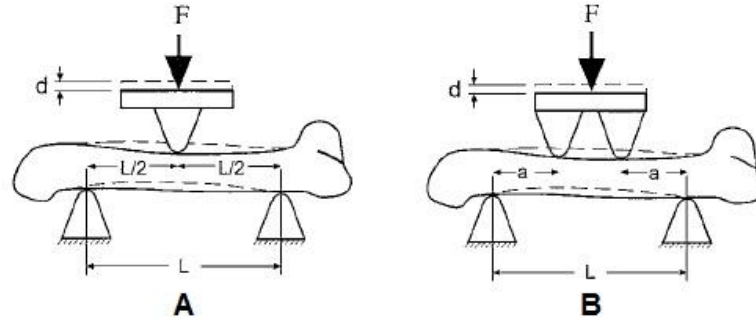
B) Sıkıştırma Testi (Compressive Testing): Sıkıştırma testi, göreceli olarak daha küçük kemik örneklerinin çalışmasına izin veren bir test olmasına rağmen, doğruluğu germe testine göre düşüktür. Trabeküler kemiğin mekanik özelliklerinin saptanmasında tercih edilen bir yöntemdir. Germe testi ile karşılaştırıldığında gözlenen önemli doğruluk hatalarına rağmen, sıkıştırma testi birçok avantaja sahiptir. En önemli avantajı, hazırlanan örneklerin germe testine göre daha küçük olmasıdır. İkinci olarak, örnek hazırlama prosedürü germe testi kadar kompleks değildir ve vertebra gibi bazı anatomik yapıların mekanik özelliklerinin belirlenmesinde son derece yararlıdır. Trabeküler kemik örneklerinde sıkıştırma stresinin hesaplanması, trabeküler mikroyapı nedeni ile oldukça karışıktır. Normalde stres, uygulanan kuvvetin örneğin kesit alanına oranı ile elde edilir. Fakat bu eşitlik trabeküler kemik örnekleri için uygulandığında hesaplanan stres gerçek değerinin ancak %30'u kadardır (19,33,47-49).

C) Burma Testi (Torsion Testing): Kemiğin eğme testinden sonra bir bütün olarak kullanıldığı diğer bir test yöntemidir. Daha çok büyük kemiklerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılır. Kırık iyileşmesi, kemik defektleri veya kemik doku nakillerinin (bone graft) mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde tercih edilir. Kemiğin uç bölgeleri genellikle defektlerden veya greftlerden uzak bölgelerde yer alır. Burma testi kemiğin uç kısımlarına yük uygulama imkânı tanır. Burma testinde kemik paralel kuvvetlerin etkisi altında kalır. Bu nedenle, burma testi ile kemiğin makaslama stresine karşı verdiği mekanik cevap kaydedilir (19,33).

D) Eğme Testi (Bending Testing, Flexural Loading): Eğme testi, fare, sıçan ve kobay gibi deney hayvanlarına ait uzun kemiklerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir testtir. Eğme testinde kemik bir bütün olarak kullanılır. Doku iki mesnet (destek) noktası üzerine sabitlenir ve yük, doku yüzeyine dik gelecek şekilde uygulanır (Şekil 2.4 A ve B). Yükün bu pozisyonu nedeniyle kemik eğilir ve belirli bir süre sonunda kırılır. Eğme nedeni ile kemiğin bir yüzünde germe, diğer yüzünde sıkıştırma stresi gözlenir. Kemik sıkıştırma stresine germeye nazaran daha dayanıklıdır.

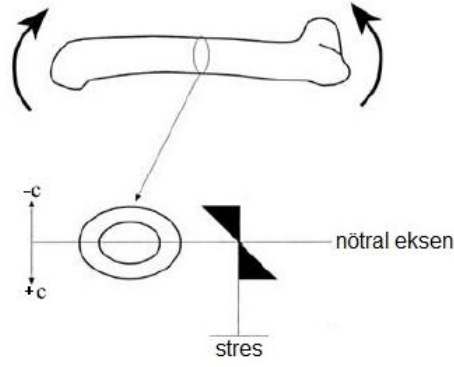
Bu nedenle, eğme testinde kırık genellikle germe stresinin olduğu yüzeyde gözlenir (19,33).

Eğme testinde stresin oluşmadığı tek bölge nötral eksendir ve eksen boyunca stres sıfırdır. Nötral eksenden kemik yüzeyine çıkıldıkça stres artar ve yüzeyde maksimum değerine ulaşır (Şekil 2.5). Eğme testinde yük, üç nokta veya dört nokta olmak üzere iki şekilde uygulanır (Şekil 2.4 A ve B). Üç nokta eğme testi (TPBT) kemiğin orta kısmında yüksek makaslama stresi oluşturabilir. Bu durum gözlenen eğilmenin makaslama ve eğme streslerinin belirli oranlarda katılımla oluştuğunu gösterir. İdeal koşullarda böyle bir etkileşim istenmez. Makaslama stresini ihmal edilebilecek seviyelere çekmek için materyalin uzunluk/kalınlık oranının en az 20:1 olması gerekir. Ancak kemirgenlerde bu değer, istenen oranın yarısı (10:1) kadardır. Bu nedenle, TPBT ile kemirgenlerden elde edilen strain gerçek değerinden yüksek, esneklik katsayısı ise düşüktür (19,33).



Şekil 2.4. Eğme testinde uygulanan yüklemeler A) Üç nokta eğme testi B) Dört nokta eğme testi (33)

Başarılı ve doğruluğu yüksek bir TPBT uygulaması için, mesnet noktaları arasındaki mesafe (L ; uzunluk/kalınlık oranını yansıtır) önemli bir değişkendir. Kemirgenlerde mesnet noktaları arasındaki mesafenin kemiğin orjinine ve geometrik özelliklerine göre belirlenmesi, makaslama stresini azaltmanın ön şartıdır. Kemirgenlerden alınan TPBT kayıtlarında L mesafesi yaklaşık 15 mm alındığında gözlenen bükülmenin büyük oranda (%85–90) eğme stresi nedeniyle oluştuğu gösterilmiştir (19).



Şekil 2.5. Kemik kütlesinin nötral eksene uzaklığı (c) (33)

Dört nokta eğme testi yük uygulama paterni nedeniyle makaslama stresi oluşturmaz. Bu durum; ancak, her noktaya eşit yük uygulandığında sağlanabilir. Düzenli geometriye sahip örneklerde bu eşitlik korunurken, kemiğin bir bütün olarak test edildiği durumlarda korunamaz. Bu nedenle, femur ve tibia gibi asimmetrik kemiklerin mekanik özelliklerinin saptanmasında TPBT daha çok tercih edilen bir yöntemdir (19,33).

Şekil 2.4 A ve B’de verildiği gibi üç ve dört nokta eğme testlerine maruz bırakılan bir kemiğe ait stres (σ_b) ve strain (ϵ_b) sırasıyla denklem 2.1 ve denklem 2.2’te verildiği gibi hesaplanabilir. Denklemde, F uygulanan kuvveti, L mesnet noktaları arasındaki mesafeyi, a yük kolunun destek noktasına uzaklığını, c kemik kütlesinin nötral ekseninden uzaklığını (Şekil 2.5), I nötral eksen etrafındaki atalet momentini ve d deformasyonu ifade etmektedir.

Denklem 2.1. Üç nokta eğme testlerine ait stres ve strain denklemleri (33)

$$\text{Stres } (\sigma_b) = F \cdot \left(\frac{L \cdot c}{4 \cdot I} \right); \text{Strain } (\epsilon_b) = d \cdot \left(\frac{12 \cdot c}{L^2} \right)$$

Denklem 2.2. Dört nokta eğme testlerine ait stres ve strain denklemleri (33)

$$\text{Stres } (\sigma_b) = F \cdot \left(\frac{a \cdot c}{2 \cdot I} \right); \text{Strain } (\epsilon_b) = d \cdot \left(\frac{6 \cdot c}{a(3 \cdot L - 4 \cdot a)} \right)$$

E) Diğer Test Metotları: Konvansiyonel mekanik testlerin dışında; indentasyon testi, saf makaslama testi, yorgunluk testi, akustik testler, mikro- ve nanotestler olmak üzere çeşitli test metotları da kullanılmaktadır. Bu testler konvansiyonel testlere göre daha az kullanılan ve daha özelleşmiş testlerdir (19,33).

2.2.4. Biyomekanik Testlerde Güvenilirliğe Etki Eden Faktörler

Donörün yaşı ve genel sağlık durumu ile kemiğin mekanik özellikleri arasında yakın bir ilişki bulunur. Bununla birlikte, kemik örneklerinin preperasyonu ve saklama koşulları da kemiğin biyomekanik özelliklerini doğrudan etkiler. Dokuda izolasyonu takip eden saatler içinde otoliz başlar. Bu durum kemiğin biyomekanik parametrelerini olumsuz yönde etkiler. Kemik preperasyonunda dokunun hidrasyonu ve testin yapılacağı ortamın sıcaklığı ayrıca değerlendirilmesi gereken diğer önemli faktörlerdir. Bunun birlikte, dokunun mekanik karakteri yükün (kuvvetin) uygulanma hızı (strain rate) ile de yakından ilişkilidir (19,33).

A) Hidrasyon: Kemiğin dehidrasyon ile birlikte esneklik katsayısı ve maksimum dayanımı genellikle artarken, dayanıklılığı azalır. İnsan femur kemiğinin bir bütün olarak test edildiği bir çalışmada, dehidrasyon nedeniyle esneklik katsayısında %17, maksimum germe dayanımında ise %31'lik bir artış göstermiştir. Ancak, bu iki parametrenin aksine dayanıklılığın %55 azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle, biyomekanik testlerde doğruluğu yüksek sonuçlar elde etmek için, dokunun sıvı dengesinin korunması önemli bir faktör olarak karşımıza çıkar. Bunun için kemiğin deney süresince fizyolojik saline yerleştirilmesi veya fizyolojik salin ile ıslatılmış gazlı bezlere sarılması gerekir (19,33).

B) Sıcaklık: Doğada bulunan birçok biyolojik materyalde olduğu gibi kemiğin mekanik özellikleri de ortam sıcaklığından etkilenir. Mekanik özelliklerin ölçümünde elde edilen sonuçların yüksek güvenilirlikte olması isteniyorsa, kemik örnekleri 37°C'de test edilmelidir. Ancak bu durum, testin uygulanma kolaylığı açısından uygun olmayabilir. Deneylerin oda sıcaklığında (23°C) yapılması esneklik katsayısında yaklaşık %2-4'lük bir artışa neden olur. Bu ölçüm hatası 37°C ile karşılaştırıldığında, yorgunluk testi haricindeki diğer tüm mekanik testlerde, ihmal edilebilecek kadar küçüktür. Oda

sıcaklığı oldukça değişkendir. Oda sıcaklığının test esnasında sıklıkla kontrol edilmesi olası ölçüm hatalarını en aza indirger (19,33).

C) Yükleme Hızı (Strain Rate, Loading Rate): Kemik farklı yükleme hızlarında farklı mekanik özellikler gösterir. Kemik hem katı hem de sıvı özelliğe sahip viskoelastik bir materyaldir. Viskoelastisite kemiğin zamana bağlı mekanik özelliklerini yansıtır. Aslında kemik doku sahip olduğu sıvı karakter nedeniyle sabit bir yük altında akma eğilimi (burada ifade edilen eğilim suda gözlenen akma eğilimine benzetilebilir) gösterir. Yükleme hızı arttırıldığında, akış için gereken zaman azalarak materyalin esneklik katsayısını arttırırken, maksimum straini azaltır. Düşük hızlarda kemikte gözlenen elastik deformasyon fark edilebilecek miktarda değildir, ancak, kemik visköz bir sıvı gibi akar. Yüksek hızlarda ise aynı kemik kırılğan elastik bir katı gibi davranır. Kuru kemik, visköz doğasını kaybederek, ideal bir yay gibi davranır. Hidrate kemik ise uygulanan kuvvete, yükleme hızına bağlı olarak, direnç gösterir. Oluşan enerjiyi absorbe edebilir. Biyomekanik testlerde dokunun fizyolojik doğasına uygun bir yükleme gerçekleştirebilmek için yükleme hızının 0,01/s ve 0,08/s aralığında olması gerekir. Bu değer skalası farklı bedensel hareketler nedeniyle donöre ait kemiğin doğal yaşam sürecinde karşılaştığı yükleme hızlarıdır (19,22,33).

2.3. Osteoporoz

Osteoporoz (OP), düşük kemik kütlesi (kemik kaybı) ve kemik gücündeki azalma ile birlikte kemik mikromimarisinin bozulması sonucu kemik kırılğanlığının ve kırık riskinin arttığı sistemik bir hastalıktır. OP kemiğin dayanıklılığını azaltarak, kırılğanlığı arttırmakta ve günlük aktiviteler sırasında karşılaşılan minimal travmalar kırıkların oluşmasına yol açmaktadır. Pik kemik kütlesi ve OP-nedenli kırıklar arasında güçlü bir ilişki bulunur. Kemik kütlesi intrauterin hayattan 20'li yaşlara kadar devam eden süreçte pik noktasına ulaşır. 30'lu yaşların sonlarından itibaren her iki cinsiyette de kemik kaybı başlar. Özellikle kadınlarda menopoz sırasında östrojen eksikliği nedeniyle gözlenen kemik kaybı ilk 5–10 yıl oldukça hızlıdır. Daha sonraki süreçte yavaşlayan bir kaybı söz konusudur. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation, WHO) verilerine göre, ortalama yaşam süresinin artışıyla birlikte kırıklarla ilişkili mortalite (ölüm oranı), morbidite (hastalık hali veya hastalığa yakalanan kişi sayısı) ve tedavi

maliyetleri açısından değerlendirildiğinde OP önemli bir halk sağlığı problemi olarak kabul edilir. Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) yapılan epidemiyolojik çalışmalarda 50 yaş ve üzeri 10 milyon kişinin (8 milyon kadın, 2 milyon erkek) OP'den etkilendiği ve bu sayının 2020 itibariyle 14 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, tüm dünyada 200 milyon OP'li kadın olduğu ileri sürülmektedir. (22,25,50–58).

2.3.1. Osteoporoz Sınıflandırması

WHO 1996 yılında OP'da kemik mineral yoğunluğu (BMD) ve kırık varlığını temel alan bir dizi kriteri “osteoporozda tanı kriteri” olarak açıkladı. Günümüzde halen OP tanısında kullanılan bu kriterlerde;

- Genç erişkine göre BMD'nin 1 standart sapmanın (SD) altında olması, **Normal**
- BMD'nin genç erişkine göre -1 SD ile -2,5 SD arasında olması, **Osteopeni (Düşük Kemik Kütlesi)**
- BMD'nin genç erişkine göre -2,5 SD'den fazla olması, **Osteoporoz**
- BMD'nin genç erişkine göre -2,5 SD'nin üzerinde olması ve ek olarak bir veya daha fazla kırık saptanması, **Yerleşik Osteoporoz**

olarak tanımlandı (51).

OP, yaş, lokalizasyon, tutulan kemik doku, etiyolojik köken ve histolojik görünümüne göre değişik açılardan sınıflandırılabilir (Çizelge 2.2). Her sınıflandırma diğerinden farklı avantajlara sahiptir. Ancak bu sınıflandırmalardan en yaygın olanı etiyolojiye göre yapılan sınıflandırmadır.

A) Birincil (Primer) Osteoporoz: Primer OP'nin kökeninde hastalığa neden olabilecek bilinen bir hastalık veya faktör yoktur. Primer OP kendi içinde “Postmenopozal OP (Tip I OP)”, “Senil OP (Tip II OP)” ve “İdiyopatik OP” olmak üzere üç alt gruba ayrılır. Ayrıca idiyopatik OP, juvenil ve erişkin OP olmak üzere iki alt grupta incelenir (Çizelge 2.2).

1. Postmenopozal OP (Tip I OP): Postmenopozal OP'de gözlenen kemik kaybında temel neden kadınlarda menopozla gelişen östrojen eksikliğidir. Postmenopozal OP'de PTH salınımı azalırken, kalsitonin salınımı artar. Vitamin D yapımı ve barsaktan emilen Ca miktarı azalır. Çoğunlukla 55–75 yaş aralığındaki kadınlarda görülür. Kadın-erkek

oranı 6:1'dir. Kayıp özellikle trabeküler kemikte gözlenir. Artan yaşla birlikte normal kemik kaybı yıllık ortalama %0,25–1 civarındadır. Ancak bu oran premenopozda %2–3'tür. Kadınlarda kemik kaybının %75'i ilk 15 yıl içinde gerçekleşir (26,52,59,60).

Çizelge 2.2. Değişik açılardan yapılan osteoporoz sınıflandırması (51)

Yaşa göre	<ul style="list-style-type: none">✓ Juvenil OP✓ Erişkin OP✓ Senil OP
Lokalizasyona göre	<ul style="list-style-type: none">✓ Genel OP✓ Bölgesel OP
Tutulan kemik dokuya göre	<ul style="list-style-type: none">✓ Trabeküler OP✓ Kortikal OP
Etiyolojiye (neden) göre	<ul style="list-style-type: none">✓ Primer OP<ul style="list-style-type: none">➢ Postmenopozal OP (Tip I OP)➢ Senil OP (Tip II OP)➢ İdiyopatik OP<ul style="list-style-type: none">• Juvenil İdiyopatik OP (IJO)• Erişkin İdiyopatik OP✓ Sekonder OP (bakınız çizelge 2.3)
Histolojik görünümüne göre	<ul style="list-style-type: none">✓ Hızlı kemik döngülü OP✓ Yavaş kemik döngülü OP

OP: Osteoporoz

2. Senil OP (Tip II OP): Yaşlanmaya bağlı olarak gelişen OP çeşididir. Yaşlılıkla birlikte kemik yenilenmesi ile deride vitamin D yapımı azalır ve barsaklardan kalsiyum emilimi bozulur. Buna bağlı olarak PTH ve ALP kısmen yüksektir. Çoğunlukla 70–85 yaş aralığındaki kadın ve erkeklerde görülür. Kadınlarda prevalans 2 kat fazladır. Yavaş kemik kaybı ile karakterizedir. Kayıp, kortikal ve trabeküler kemikte gözlenir. Ancak, kortikal kemikte kayıp daha ön plandadır (26,61–69).

3. İdiyopatik OP: İdiyopatik OP diğer OP çeşitlerinden farklı özellikler taşır. Juvenil ve erişkin olmak üzere iki tipi vardır. Juvenil idiyopatik OP (IJO), oldukça nadir görülen ve genellikle 8–14 yaş aralığındaki çocuklar etkilenir. Kalıtsal olup olmadığı

bilinmemekle birlikte her iki cinsiyette de görülebilir. Hastalık akut seyirlidir ve puberte ile birlikte düzelir. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte yüksek kemik döngüsü ile karakterizedir. Kalsitonin ve vitamin D yetersizliğinin IJO patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Erişkin İdiyopatik OP de IJO gibi nadir görülür. Kadınlarda doğumu takiben görülebildiği gibi premenopozda da gelişebilir. 23–86 (ortalama yaş 60) yaş aralığındaki erkeklerde kadınlara oranla daha sık karşılaşılr. Senil OP ile iç içedir. Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, düşük kemik yapım hızı ve osteoblastik fonksiyonlar rapor edilmiştir (70–76).

B) İkincil (Sekonder) Osteoporoz: OP’da gözlenen kemik kaybı doğal menopozal süreç (östrojen eksikliği) veya yaşlanmanın bir parçası olduğunda primer OP, bunların dışında yaşam biçimi, endokrin, hipogonadal, gastrointestinal, hematolojik, romatolojik ve bazı kronik hastalıklarla medikal ilaçlar gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğunda sekonder OP olarak adlandırılır (Çizelge 2.3). Kadınlarda gözlenen kemik kaybının %80’i primer OP kaynaklıdır ve bu oranın % 30’unda kemik kaybını hızlandıran ikincil bir neden bulunur. Her iki cinsiyette de gözlenmesine rağmen erkeklerde prevalans %64’tür. Ancak son verilere göre, yaş ve cinsiyetle ilişkilendirilen primer OP’nin aksine sekonder OP’de gözlenen prevalansların sırasıyla erkeklerde %21, kadınlarda ise %17,5 olduğu saptanmıştır (77–82).

2.3.2. Osteoporozda Kullanılan Tanı ve Takip Yöntemleri

OP’un tanı ve tedavisinde temel amaç kemik kırıklarının önlenmesidir. Bir kırığın oluşup/oluşmamasını belirleyen faktörler uygulanan kuvvetin büyüklüğü ve kemiğin bu kuvvete gösterdiği dirençtir. Kırık oluşumu OP’nin kesin tanısıdır ve bunun dışında kalan tüm yöntemler kemik direncinin sekonder belirteçleridir. Birçok hastalıkta olduğu gibi OP’nin tanı ve değerlendirilmesinde de öykü, fizik muayene ve klinik bulguların yanı sıra radyolojik görüntüleme ve biyokimyasal tanı yöntemlerinin önemli bir yeri vardır (83,84).

Çizelge 2.3. Sekonder osteoporoz nedenleri (79–81)

<p>Yaşam Biçimi ve/veya Beslenme</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Aşırı protein tüketimi✓ Alkolizm✓ Sigara kullanımı✓ A vitamini fazlalığı✓ Vitamin D eksikliği✓ Kalsiyum eksikliği✓ Magnezyum eksikliği✓ Fiziksel aktivite eksikliği✓ Aşırı egzersiz✓ Uzun süre immobilizasyon <p>Endokrin Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Akromegali✓ Adrenal yetersizlik✓ Cushing sendromu✓ Addison hastalığı✓ Tip I diyabetes mellitus✓ Hipertiroidizm✓ Hiperparatiroidizm✓ Hipopitüitarizm✓ Gebelik ve laktasyon <p>Hipogonadal Durumlar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Androjen duyarsızlığı✓ Anoreksia nervosa/bulimia✓ Amenore✓ Hiperprolaktemi✓ Panhipopitüitarizm✓ Prematür menopoz✓ Turner sendromu✓ Klinefelter sendromu <p>Sistemik ve Metabolik Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Kronik obstruktif akciğer hastalığı✓ Psöriyazis (Sedef hastalığı)✓ Kronik metabolik asidoz <p>Gastrointestinal Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Gastrektomi✓ İnflamatuvar barsak hastalıkları✓ Malabsorbsiyon✓ Çölyak hastalığı✓ Primer biliyer siroz <p>Romatolojik Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Ankilozan spondilit✓ Romatoid artrit	<p>Hematolojik Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Orak hücreli anemi✓ Talasemi✓ Hemofili✓ Multiple miyeloma✓ Lösemi ve lenfomalar✓ Sistemik mastositosis <p>Genetik Hastalıklar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Ehlers-Danlos sendromu✓ Glikojen depo hastalıkları✓ Gaucher hastalığı✓ Hemokromatozis✓ Homosistinüri✓ Hipofosfatazya✓ Marfan sendromu✓ Osteogenezis imperfekta <p>Medikal İlaçlar</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Antikoagülanlar (Heparin ve varfarin)✓ Antikonvülzanlar✓ Glukokortikoidler✓ Sitotoksik ilaçlar✓ Diüretikler✓ Antiepileptikler✓ Metotreksat✓ Siklosporin A✓ Aşırı tiroid replasmanı✓ Alkilleyici kemoterapötik ajanlar✓ Gonadotropin-serbestleyici hormon agonisti✓ Selektif serotonin geri alım inhibitörleri <p>Diğer</p> <ul style="list-style-type: none">✓ Baryatrik operasyon✓ Organ transplantasyonu✓ Son dönem böbrek yetmezliği✓ Konjestif kalp yetmezliği✓ Amiloidozis✓ Sarkoidozis✓ Amfizem✓ Parenteral nutrisyon
---	--

2.3.2.1. Radyolojik Görüntüleme Yöntemleri

OP'nin tanı ve takibinde kullanılan radyolojik görüntüleme yöntemleri (Çizelge 2.4) ile kemik kaybının hızı, derecesi, kırık riski, kırıkların yeri ve tipi belirlenebilir, kemik kaybı takip edilebilir ve uygulanan tedavinin etkinliği izlenebilir. OP'nin tanı ve takibinde BMD önemli bir parametredir, kemik gücü ile güçlü bir korelasyon gösterir ve kırık riskinin önemli bir belirteçidir. Ancak, kemik gücü sadece BMD ile değil, bunun yanında kemiğin mikromimarisi (kemik kalitesi) ile de yakından ilişkilidir. Bu nedenle tanı ve takipte günümüz görüntüleme yöntemleri ile kemiğin kantitatif (BMD ölçümleri) ve kalitatif (kemiğin makro- ve mikromimarisi) özellikleri belirlenmeye çalışılır (83–86).

Kemiğin kantitatif ve kalitatif özelliklerinin belirlenmesinde çizelge 2.4'te verilen yöntemlerden bazılarının (çizelge 2.4'te "*" ile işaretlenmiştir);

- ✓ Klinik açıdan uygulama kolaylığı,
- ✓ Kullanım amacı (deneysel veya klinik uygulama),
- ✓ Sahip olduğu radyasyon cinsi ve uygulama dozu,
- ✓ Duyarlılık ve doğruluk yüzdeleri,
- ✓ Uygulama maliyetleri,
- ✓ Ölçülen kemik tipi,
- ✓ Ölçümü alınan anatomik yer,
- ✓ Ölçüm süresi

gibi çeşitli nedenlerle diğer görüntüleme yöntemlerine göre kullanım alanı daha geniştir. Bununla birlikte bu görüntüleme tekniklerinden bazıları klinik açıdan son derece önemlidir (Çizelge 2.4). Ancak, bu yöntemlerden Çift Enerji X-ışını Absorpsiyometri'nin (DXA) ayrı bir yeri vardır. Kantitatif ölçümlerde yaygın olarak kullanılan görüntüleme teknikleri ve bu tekniklerin genel özellikleri çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

A) Çift Enerji X-ışını Absorpsiyometri (DXA, DEXA): Diğer yöntemlere göre BMD ölçümlerinde en sık kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdir. Temelde, kemik dokunun yapısal özelliğinden faydalanır. Hatırlanacağı üzere kemik matriks T1C ve hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Kristal yapısında bulunan kalsiyum diğer matriks elemanlarına (T1C ve matriks proteinleri) göre daha fazla radyasyon absorbe

Çizelge 2.4. Osteoporoz tanı ve takibinde kullanılan radyolojik görüntüleme yöntemleri (83–86)

Konvansiyonel Radyografi*
Radyogrametri
Fotodansitometri (Radyografik Absorbsiyometri)
Kompüterize Dijital Absorbsiyometri
Tek Foton Absorbsiyometri*
Çift Foton Absorbsiyometri*
Tek Enerji X-ışını Absorbsiyometri
Çift Enerji X-ışını Absorbsiyometri (DXA, DEXA)*
Kantitatif Ultrason*
Kantitatif Kompüterize Tomografi*
Periferik Kantitatif Kompüterize Tomografi
Manyetik Rezonans Görüntüleme*
Nötron Aktivasyon Analizi
Proton Aktivasyon Analizi
Scanning Slit Fluografi
Compton Scattering
Kemik Sintigrafisi

* Diğer görüntüleme yöntemlerine göre kullanım alanı daha fazla olan teknikler

Çizelge 2.5. Kemik mineral yoğunluğu ölçüm tekniklerinin genel özellikler (83)

Teknik	Ölçüm yeri	Ölçülen kemik tipi	Duyarlılık hatası (%)	Doğruluk hatası (%)	Radyasyon		Maliyet (\$)
					Ölçüm süresi (dakika)	Absorbe edilen doz (mrem)	
SPA	Radius	İntegral	1–2	4–6	10	5–10	50–75
	Kalkaneus		1–2	4–6	10		5–10
DPA	Vertebra	İntegral	2–4	5–10	20–30	5–10	150–200
	Femur		3–5	5–10	20–30		
DXA	AP-Vertebra	İntegral	1–2	4–8	5–10	2–4	150–200
	Lat-Vertebra		5–10	15–20	5–10	6–10	
	Femur		1–2	4–8	5–10	2–4	
	Tüm Vücut		< 1	1–2	20	6–10	
QCT	Vertebra	Trabeküler Kortikal	4–6	3–6	15	100–1000	300–400
QUS	Kalkaneus	İntegral	2–4	2–4	3–5	–	50–75

SPA: Tek Foton Absorbsiyometri, DPA: Çift Foton Absorbsiyometri, DXA: Çift Enerji X-ışını Absorbsiyometri, QCT: Kantitatif Kompüterize Tomografi, QUS: Kantitatif Ultrason, \$: Amerikan Doları

eder. Kemiğin bu özelliği DXA kullanılarak alınan BMD ölçümlerinde önemli bir faktördür. Yöntemde radyasyon kaynağı olarak çift enerjili, yüksek (>70 eV) ve düşük (30–50 eV) X-ışını üreten röntgen tüpü kullanılır. Çift enerjili X-ışınları önce absorpsiyon materyalinden, sonra hasta veya örneğe ait dokudan geçer. Alınan sonuçlar absorpsiyon materyalinden alınan değerlerle oranlanarak BMD sonuçları elde edilir. BMD, kortikal ve trabeküler kemik ayrımı yapılmadan bir bütün olarak ölçülür. Ölçüm tüm vücut yapılabildiği gibi lumbar vertebra, kalça ve ön koldan da yapılabilir. Kalçadan alınan ölçümlerde DXA'nın güvenilirliği %90'ın üzerindedir. OP'nin en belirgin komplikasyonu kalça kırığı olması ve bu bölgenin diğer bölgeler için kırık riskini de ortaya koyması nedeniyle DXA, femur BMD ölçümlerinde altın standarttır.

BMD, kemik mineral içeriğinin (BMC) tarama alanına bölünmesi ile bulunur ve gr/cm^2 olarak ifade edilir. BMC taranan alandaki kemik mineral miktarını, BMD ise bu alandaki kemik yoğunluğunu ifade eder. Bu nedenle, ölçüm sonuçlarını BMD cinsinden vermek BMC'ne göre doğruluğu daha yüksek sonuçlar verir. Klinik uygulamalarda DXA sonuçları T skoru ([Ölçülen BMD değeri – genç erişkin ortalama BMD] / genç erişkin standart sapması) ve Z skoru ([Ölçülen BMD değeri – aynı yaş grubunun ortalama BMD değeri] / popülasyonun standart sapması) olarak adlandırılan iki parametre ile yapılır. DXA yöntemi kullanılarak alınan BMD ölçümleri sadece klinik kullanımda değil hayvan modellerine dayanan deneysel araştırmalarda da en çok tercih edilen yöntemdir. Gerek anestezi altındaki hayvanlarda gerekse diseksiyon edilmiş kemik örneklerinde ölçüm alınabilir (18,22,35,83–99).

Avantajları: Duyarlılığı, doğruluğu ve çözünürlüğü yüksektir. Ölçüm süresi 3–7 dakikadır (83–86,100).

Dezavantajları: Kortikal ve trabeküler kemiği ayırt edemez. 65 yaş üstü hastalarda oluşan dejeneratif kemik lezyonları nedeniyle lumbar vertebra ölçümleri zordur. Obezlerde yöntemin doğruluğu azalır. Referans değerler ülkeden ülkeye farklılık gösterir (83,101–103).

2.3.2.2. Biyokimyasal Tanı Yöntemleri

Son yirmi yılda teknolojik yeniliklerle birlikte geliştirilen biyokimyasal analiz yöntemleri kemik metabolizmasında kullanılan biyokimyasal belirteçlerin klinik

uygulamalarda önemli bir yer edinmesini sağlamıştır. İskelet sistemi hastalıklarının tanı ve takibinde kemiğin yapım-yıkım döngüsüne ait biyokimyasal belirteçler kullanılır. Sağlıklı bir kemikte yapım ve yıkım bir denge içindedir. Aralarında OP'nin de bulunduğu birçok iskelet sistemi hastalığında kemik yıkımı yapımın önüne geçerek döngü hızını arttırır. Bu artış kemik kaybına neden olarak kırık oluşma riskini yükseltir. OP'nin tanı ve takibinde genellikle DXA ile elde edilen BMD sonuçları kullanılır. Klinik uygulamalarda kullanılan biyokimyasal belirteçlerle BMD'den bağımsız olarak kırık oluşma riski belirlenmeye çalışılır. Gerek biyokimyasal belirteçler gerekse BMD kemik gücünü yansıtmakta yetersiz kalır. Ancak, kemik yapım-yıkım döngüsünün belirteçleri kemiğin yapım ve yıkım yönündeki dinamik yapısını ortaya çıkartması nedeniyle çoğunlukla uygulanan tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılır (34,104-108). Çizelge 2.6'da kemik yapım-yıkım döngüsünde kullanılan biyokimyasal belirteçler ve bu belirteçlerin belirlenmesinde kullanılan ölçüm yöntemleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. Kemik yapım-yıkım döngüsünün biyokimyasal belirteçleri (34,104,106)

Belirteçler	Örnek	Yöntem*
Kemik Yapımı Belirteçleri		
Osteokalsin (OCN)	Serum	RIA,ELISA,ECLIA
Prokollajen tip 1 C-terminal propeptid (PICP)	Serum	ELISA
Prokollajen tip 1 N-terminal propeptid (PINP)	Serum	RIA
Kemiğe spesifik alkalin fosfat (BSAP)	Serum	ELISA,IRMA, Elektroforez
Kemik Yıkımı Belirteçleri		
Tip 1 kollajen çapraz bağlı N-telopeptid (NTX)	İdrar, serum	ELISA
Tip 1 kollajen çapraz bağlı C-telopeptid (CTX)	İdrar ($\alpha\beta$ & $\alpha\alpha$ formu) Serum ($\beta\beta$ formu)	RIA,ELISA,ECLIA RIA,ELISA,ECLIA
Serbest ve peptid bağlı deoksipiridinolin (fDPD,DPD)	İdrar, serum	ELISA,HPLC
Serbest ve peptid bağlı piridinolin (fPYD,PYD)	İdrar, serum	ELISA,HPLC
Osteoklastlara spesifik 5b izoform tartarat dirençli asit fosfat (TRAP-5b)	Serum, plazma	Kinetik, ELISA

*ELISA: Enzim bağlı immunosorbent yöntemi, RIA: Radyoimmün yöntemi, HPLC: Yüksek performanslı likit kromatografi, ECLIA: Elektrokemiluminesans yöntemi, IRMA: Immunoradyometrik assay

Kemik yapımını gösteren biyokimyasal belirteçler çoğunlukla T1C sentezi sırasında oluşan ürünlerdir (Prokollajen Tip 1 C ve N propeptidler). Bir kısmı da

osteoblastogenezis sırasında aktif osteoblastlar tarafından salgılanan matriks proteinleridir (OCN, ALP). Kemik yıkım belirteçlerinin büyük bir kısmı T1C degradasyonu sonucu açığa çıkan ürünlerdir (hidroksiprolin, piridinolin, deoksipiridinolin, T1C çapraz bağlı C ve N telopeptidler). Bir kısmı da nonkollajenize kemik matriks proteinlerinden (BSP, OCN parçaları) ve osteoklastik enzimlerden (tartarat dirençli asit fosfataz, katepsin K) oluşur. Kemik yapımını gösteren biyokimyasal belirteçler serum ya da plasmadan alınan örneklerde ölçülebilirken, kemik yıkımı belirteçleri hem serum hem de idrar örneklerinde değerlendirilebilir. Çizelge 2.7’de klinikte yaygın olarak kullanılan kemik yapım-yıkım döngüsü belirteçlerinin genel özellikleri özetlenmiştir.

2.4. Manyetik Alan

Uzayda iki nokta arasında bir potansiyel fark oluşturulduğunda serbest yükler elektriksel kuvvetlerin etkisiyle hareket ederler. Serbest yüklerin bu hareketine “elektrik akımı” adı verilir. Bir iletken üzerinden elektrik akımı geçirildiğinde, iletkenin çevresinde elektrik alan ve manyetik alan (MA) oluşur. Bu alanların bileşimi elektromanyetik alan (EMA) olarak adlandırılır. Güneş, yıldızlar ve yıldırım doğal MA kaynaklarıyken, elektrikli ev aletleri, kablolar ve telekomikasyon cihazları vb. insan yapımı MA kaynaklarıdır.

MA’nın şiddet, frekans ve dalga formu olmak üzere üç temel bileşeni bulunur. MA şiddeti Gauss (G) ya da Tesla (T) birimleriyle ölçülür ($1 T = 10^4 G$) ve eğer zamanla değişim gösteriyorsa AC, göstermiyorsa sabit (statik) MA olarak adlandırılır. Çevresel MA, $0-10^{20}$ Hz frekans aralığındaki AC MA’dan oluşur. Bu frekans aralığı elektromanyetik spektrum olarak da bilinir. Elektromanyetik spektrumun $0-300$ Hz aralığı oldukça düşük frekanslı (ELF) alanlar olarak tanımlanır. Bunun yanında, spektrumun 10^6-10^{10} Hz aralığında radyo dalgaları, $10^{10}-10^{12}$ Hz aralığında mikrodalgalar, $10^{12}-10^{15}$ Hz aralığında kızılötesi, 10^{15} Hz’de görünür ışık, $10^{15}-10^{16}$ Hz aralığında ultraviyole ışınları, 10^{16} ve üzerindeki frekanslarda ise X-ışınları ve gamma ışınları bulunur (109,110).

Çizelge 2.7. Kemik yapım-yıkım döngüsüne ait biyokimyasal belirteçlerin genel özellikleri

Belirteçler	Açıklama
Kemik Yapımı Belirteçleri	
Osteokalsin (OCN)	OCN, matür osteblastlar tarafından sentezlenen en önemli nonkollajenize proteindir. Kemik yapımı sırasında sahip olduğu γ -karboksiglutamik asit (Gla) rezidüsü ile kalsiyum bağlayıcı protein olarak işlev görür. Anılan rezidü ile hidroksiapatit kristallerine bağlandığı ve böylece kristallere temas ettiği düşünülmektedir. Primer olarak kemik matrikste birikirken, çok küçük bir miktarı dolaşıma katılır. Serum OCN, osteoblastik aktivitenin ve kemik yapım hızının hassas ve spesifik bir belirteçtir (111).
Prokollajen tip 1 C-terminal propeptid (PICP)	PICP ve PINP, osteoblastlar tarafından sentezlenen prokollajen moleküllerinin C ve N terminallerinin posttranslasyonel segmentasyonu sonucu oluşurlar. Bu modifikasyon sonrası TIC oluşur. Primer olarak TIC sentez hızını yansıtır. Ağırlıklı olarak kemik dokudan orijin alırlar. PICP'nin serum yarı ömrü oldukça kısadır (6–8 dakika). Yarı ömür ve klerens mekanizmalarının farklılığından dolayı PINP klinik kullanıma daha uygundur (değişkenlik < 3) (104,105,111,112).
Prokollajen tip 1 N-terminal propeptid (PINP)	
Kemiğe spesifik alkalin fosfataz (BSAP)	Osteoblast kökenlidir ve osteoblastik aktiviteyi gösterir. Alkalin fosfataz enziminin kemiğe spesifik izoformudur. Kemik yapımı sırasında sekresyonu oldukça fazladır. TIC sentezi sırasında açığa çıkar. Kalsiyum bağlayıcı protein görevi görür. Bu nedenle, kemik mineralizasyonunda görev aldığı düşünülmektedir. Yarı ömrü 1–2 gündür. (104,105,112)
Kemik Yıkımı Belirteçleri	
Tip 1 kollajen çapraz bağlı N-telopeptid (NTX)	NTX ve CTX, kemik yıkımı sırasında osteoklastik TIC degradasyonu sonucu oluşan fragmentlerdir. Osteoklastik TIC degradasyonu sadece kemikte gerçekleştiği için NTX ve CTX hassas ve kemiğe spesifik yıkım belirteçleri olarak kabul edilir. Ölçüm yöntemlerinin başarısına bağlı olarak NTX çoğunlukla idrar örneklerinden ölçülürken, CTX ($\beta\beta$ formu) serum örneklerinde daha iyi sonuçlar verir. Son yıllarda, serum CTX'den idrar NTX'e göre daha doğru ve güvenilirliği yüksek sonuçlar elde edildiği için, serum CTX kemik yıkım belirteci olarak daha ön planda yer almaktadır (104,106).
Tip 1 kollajen çapraz bağlı C-telopeptid (CTX)	
Serbest ve peptid bağlı deokspiridinolin (fDPD, DPD)	DPD ve PYD, kollajen molekülleri arasında yer alan kovalent çapraz bağlardır. TIC yıkımı sonucunda açığa çıkar ve dolaşıma salınır. DPD ve PYD idrarda hem serbest (fDPD, fPYD) hem de peptide bağlı olarak (%60) bulunur.
Serbest ve peptid bağlı piridinolin (fPYD, PYD)	PYD kemik haricinde birçok dokuda bulunur. DPY ise kemiğe daha spesifiktir. Son yıllarda BSAP ve TRAP-5b nedeniyle, kullanımı azalan ancak günümüzde yıkım belirteci olarak kullanılan belirteçlerdir (105–107).
Osteoklastlara spesifik 5b izoform tartarat dirençli asit fosfataz (TRAP-5b)	Osteoklastlara spesifik bir enzimdir. Fırçamsı kenar membranında bulunur. Son yıllarda, özellikle BMD ile gösterdiği anlamlı korelasyon nedeniyle yüksek kemik döngüsünü gösteren önemli bir parametre olarak kabul edilmiştir (104).

MA'nın, en az şiddet ve frekans bileşenleri kadar önemli bir unsuru da dalga şeklidir. MA dalga formu, kare ve üçgen gibi temel dalga şekilleri olabildiği gibi puls katarları (belirli aralıklarla kesilen MA yayılımı) şeklinde de olabilir. Bu dalga formu pulslu elektromanyetik alan (PMA) olarak adlandırılır. ELF alanlar noniyonize ve dokuda anlamlı ısı artışına neden olmayan radyo dalgalarıdır. ELF PMA'nın terapötik etkileriyle ilgili çalışmalarda asimetrik, bifazik, kuasi-rektengular veya kuasi-triangular dalga formları tercih edilir. FDA (United States Food and Drug Administration) kırıkla ilişkili hastalıkların tedavisinde etkin ve güvenli dalga şekli olarak kuasi-rektengular ve kuasi-triangular dalga formlarını önermektedir (110,113).

2.4.1. Manyetik Alan ve Biyolojik Etkileri

Canlı doku iyonik yapısı nedeniyle elektrik potansiyelleri üretmektedir. Bu potansiyeller dokuda elektrik alan ve MA oluşmasına neden olur. Canlılar sadece MA üretmekle kalmayıp çevredeki MA değişimlerini de algılayabilmektedir.

MA, etkilediği bölgelerde şiddetiyle orantılı olarak elektrik alan oluşturur. İndüklenen elektriksel potansiyel ve akım şiddetleri sırasıyla Volt/metre (V/m) ve Amper/metrekare (A/m^2) olarak ifade edilir. MA'nın dokular üzerindeki etkileri frekans, şiddet ve dalga biçimine bağlı olarak değişir. DC elektrik alan ve MA dokuda sadece polarizasyona neden olurken, AC elektrik alan ve MA iyonlarda titreşime neden olur (113–115).

Gelişen modern teknolojiyle birlikte, elektrikli ev aletlerinin ve endüstriyel cihazların yaygın kullanımı, toplumun EMA'lara her geçen gün daha fazla maruz kalmasına neden olmaktadır. İn vivo ve in vitro araştırmalar, biyolojik süreçlerin PMA'dan etkilendiğini göstermektedir. Bazı epidemiyolojik araştırmalar ELF EMA'nın sağlık açısından zararlı etkilerinin olduğunu iddia ederken, bazı araştırmacılar da doku rejenerasyonu gibi alanlarda MA'nın olumlu etkilerinin olduğunu ileri sürmektedir (116–121). Çizelge 2.8'de PMA'nın terapötik etkilerinin araştırıldığı bazı çalışmalar ve bu çalışmaların sonuçları özetlenmiştir.

Çizelge 2.8. Manyetik alanın terapötik etkileriyle ilgili çalışmalar (113)

Hastalık	Araştırmacı	Etki
Kemik		
Osteotomi	Bassett ve ark.'ları	Fibula onarım hızında artış
	Bassett ve ark.'ları	Osteogenez artışı, Fibula onarım hızında artış
	De Haas ve ark.'ları	Kemik onarım hızında artış
Kemik İyileşme Bozuklukları	Darendeliler ve ark.'ları	Yeni kemik büyümesinde artış
	Bassett ve ark.'ları	Osteogenez
	Heckmann ve ark.'ları	Kemik iyileşmesinde artış
	Frykman ve ark.'ları	Skafoid kırıklarında iyileşme
Konjenital Psödoartroz	Bassett ve ark.'ları	Konjenital psödoartroz iyileşmesi
Kemik Formasyonu	Matsumoto ve ark.'ları	İmplant çevresinde artan kemik alanı
Osteoporoz	Tabrah ve ark.'ları	Kısa süreli BMD artışı
Kalça Artroplasti	Kondrad ve ark.'ları	Ağrı derecelendirme ve kalça hareketlerinde düzelme
Eklem		
Eklem Bozukluğu	Sanseverino ve ark.'ları	Ağrı derecelendirmede azalma ve eklem hareketlerinde düzelme
Romatooid Artrit	Ganguly ve ark.'ları	Ağrı, hassaslık, şişlik ve eklem hareketlerinde düzelme
Osteoartrit	Pipitone ve ark.'ları	Ağrı, sertlik ve fiziksel hareketsizlikte düzelme
	Jacobson ve ark.'ları	Ağrıda önemli derecede azalış
Rotator Cuff Tendiniti	Binder ve ark.'ları	Ağrı derecelendirmede azalma ve aktif alanda artış
Lateral Epikondilit	Devereaux ve ark.'ları	Anlamlı fark yok
Pelvik Ağrı	Jorgensen ve ark.'ları	Normal aktiviteye hızlı dönüş ve cerrahi yaklaşımı önleme

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Anestezikler ve Solüsyonlar

- ✓ Ketamin HCl (Ketalar®, Eczacıbaşı Sağlık Ürünleri San. Tic. A.Ş., Tekirdağ, Türkiye)
- ✓ Xylazin HCl (Rompun®, Bayer AG, Leverkusen, Almanya)
- ✓ Nötral formalin
 - Potasyum di-hidrojen fosfat (6.5 g; KH₂PO₄, Kat. No: 104873, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
 - di-Sodyum hidrojen fosfat (4 g; Na₂HPO₄, Kat. No: 106585, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
 - % 37'lik Formaldehit (100 cc; Kat. No: 103999.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
 - Distile su: 900 cc
- ✓ Serum fizyolojik (500 ml; NaCl izotonik solüsyon, Barkod: 8699556690494, Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye)
- ✓ Poviiodoks Antiseptik (1000 ml, %10 Povidon-iyodin poli iyot kompleksi, Kimpa İlaç Lab. ve Tic. Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye)
- ✓ Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA; Titriplex® III, Kat. No: 64271, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- ✓ Etil alkol (Alkomed Kimya Koz.San.ve Dış Tic.Ltd.Şti, İstanbul, Türkiye)
- ✓ Ksilol (Kat. No: GPS10041, Biostain Ready Reagents Ltd, Preston, İngiltere)
- ✓ Hemotoksilen (Kat. No: 105174.0500, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- ✓ Eosin (Kat. No: 1.09844.1000, Merck KGaA, Darmstadt, Almanya)
- ✓ Distile su

3.1.2. Kitler

- ✓ Elecsys N-MID Osteokalsin kit (Kat. No: 11972111122, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya)

- ✓ ELISA β -CrossLaps kit (Kat. No: E0892Ra, Usn Life Science Inc., Wuhan, Çin)

3.1.3. Alet ve Gereçler

- ✓ Cerrahi Aletler
 - Makas
 - Vasküler Makas (Kat. No: 55.13.75, Medicon eG, Tuttlingen, Almanya)
 - Diseksiyon Makası (Kat. No: 04.32.14, Medicon eG, Tuttlingen, Almanya)
 - Holder (Kat. No: 10.00.11, Medicon eG, Tuttlingen, Almanya)
 - Forceps
 - Dressing Forceps (Kat. No: 06.00.16, Medicon eG, Tuttlingen, Almanya)
 - Doku Forcepsi (Kat. No: 06.05.11, Medicon eG, Tuttlingen, Almanya)
 - Diseksiyon Forcepsi (Kat. No: 06.01.86, Medicon eG, Tuttlingen, Almanya)
 - Laborde Trakeal Dilatör Forceps (Kat. No: TK29950-14, Tekno-Medical Optik-Chirurgie GmbH, Tuttlingen, Almanya)
 - Bistüri (Plusmed No: 20, Trimpeks A.Ş., İstanbul, Türkiye)
- ✓ Katküt (USP 4.0 Catgut, Atramat, Ayşen Medikal, Ankara, Türkiye)
- ✓ Polipropilen iplik (USP 3.0, Atramat, Ayşen Medikal, Ankara, Türkiye)
- ✓ Standart Terazı (Tefal Ovelys,
- ✓ Helmholtz bobin çifti (İlfa Elektronik San.Tic.Ltd.Şti., Adana, Türkiye)
- ✓ Güç kaynağı (İlfa Elektronik San.Tic.Ltd.Şti., Adana, Türkiye)
- ✓ Faraday kafesi (90x90x55 cm)
- ✓ Plastik kutu (27x12x19 cm; 2 Adet)
- ✓ Teslametre ve Hall-effect prob (Sypris Model 6010, F.W. Bell, Orlando, FL, USA)

- ✓ Hassas terazi (Sartorius TE214S, Data Weighing Systems Inc., Elk Grove, IL, USA)
- ✓ Analjezik hot plate test cihazı (MAY AHP 0603, Commat Ltd., Ankara, Türkiye)
- ✓ Dual Enerji X-ışını Absorbsiyometri cihazı (DXA; Norland XR-46, Norland Scientific Instruments, Fort Atkinson, WI, USA)
- ✓ Bilgisayarlı tomografi cihazı (Toshiba Aquilion 64 Slice CT, Toshiba American Medical Systems, Tustin, CA, USA)
- ✓ Üç nokta eğme test cihazı (MAY TPBM 2113, Commat Ltd., Ankara, Türkiye)
- ✓ Mikroskop (Olympus® BX50, Olympus GmbH, Hamburg, Almanya)
- ✓ Distile su cihazı (Millipore Elix, Kat. No: Prog00002, Millipore SAS, Molsheim, Fransa)
- ✓ Santrifüj (Sigma k-15-1, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Göttingen, Almanya)
- ✓ 10 ml'lik içeriksiz biyokimya tüpü (Kat. No: 367820, Becton Dickinson (BD) Int., Erembodegem, Belçika)
- ✓ 1.5 ml'lik kapaklı ependorf tüp (Kat. No: 078.03.002, Isolab Laborgeräte GmbH, Wertheim, Almanya)
- ✓ -20°C Derin dondurucu (UCF 400 S, Uğur Derin Dondurucu, Aydın, Türkiye)
- ✓ -80°C Derin dondurucu (Jouan VXE PowerFREEZE™, Thermo Scientific, Soeborg, Danimarka)
- ✓ Otomatik ayarlanabilir pipet (Kat. No: R31115, Eppendorf AG, Hamburg, Almanya)
- ✓ Elecsys 2010 otoanalizör (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya)
- ✓ Elisa okuyucu (Reader 210, Organon Teknika GmbH, Viyana, Avusturya)
- ✓ Elisa yıkayıcı (Washer 200, Organon Teknika GmbH, Viyana, Avusturya)

3.2. Deney Hayvanları

Çalışmada, Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi tarafından üretilen ve ağırlıkları 150-210 g arasında değişen 56 adet yetişkin (12 haftalık) Wistar Albino türü dişi sıçan kullanıldı. Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi Laboratuvarı'nda bakımı gerçekleştirilen sıçanlar standart plastik kafeslerde ve her

kafese en fazla 5-6 sıçan gelecek şekilde yerleştirildi. Sıçanlar serbestçe ulaşabildikleri standart yem ile beslendi. Sıçanlara yem ve sular sınırsız olarak verildi. Sıçanlar, 22-24°C'lik oda sıcaklığında ve %45-60 nem oranında barındırıldı. Deney süresince gece-gündüz ritmi, ortam 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde düzenlendi.

3.3. Deney Protokolü

Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı alınarak (10.04.2009 tarih ve 2009/9 nolu karar) başlandı. Sıçanlar başlangıçta, deney standardizasyonunun sağlanması amacıyla rastgele kafeslere ayrıldı. Bu dağıtımda sıçanların hangi grup ve kafese dâhil olacakları kura yöntemi ile belirlendi. Bu doğrultuda 56 adet yetişkin dişi sıçandan aşağıda detayları verilen 5 grup oluşturuldu:

- ✓ **K Grubu (Kontrol grubu; n=10):** Hiçbir işleme tabi tutulmadan normal yaşam döngüsüne bırakılan sıçanlar,
- ✓ **SH Grubu (Sham grubu; n=10):** Manyetik alan sistemi kapalıyken bu sistem içine yerleştirilen sıçanlar,
- ✓ **ONX Grubu (n=12):** Bilateral ovariektomi (OVX) ve sinir nörektomi (sNX) işlemlerinin birlikte uygulandığı (ONX; OVX+sNX) sıçanlar,
- ✓ **ONXP Grubu (n=12):** ONX yapılarak pulslu manyetik alana (PMA) maruz bırakılan sıçanlar,
- ✓ **PMA Grubu (n=12):** Herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadan sadece PMA'a maruz bırakılan sıçanlar.

Literatür değerlendirmesi ve istatistiksel yaklaşımlar (Güç Analizi) kullanılarak gruplara ait denek sayıları belirlendi (122). Operatif gruplarda (ONX, ONXP) ve PMA'da sıçan kaybı da göz önüne alınarak her bir grup için gerekli minimum örnek genişliği 0,05 hata payı ve %95'lik güç değeriyle saptandı.

3.3.1. Cerrahi İşlemler

Çalışma kapsamında yer alan cerrahi işlemler, Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. İşlemler, steril şartlarda ve derin anestezi altında yürütüldü. Anestezi, intraperitoneal olarak 50 mg/kg Ketamin HCl

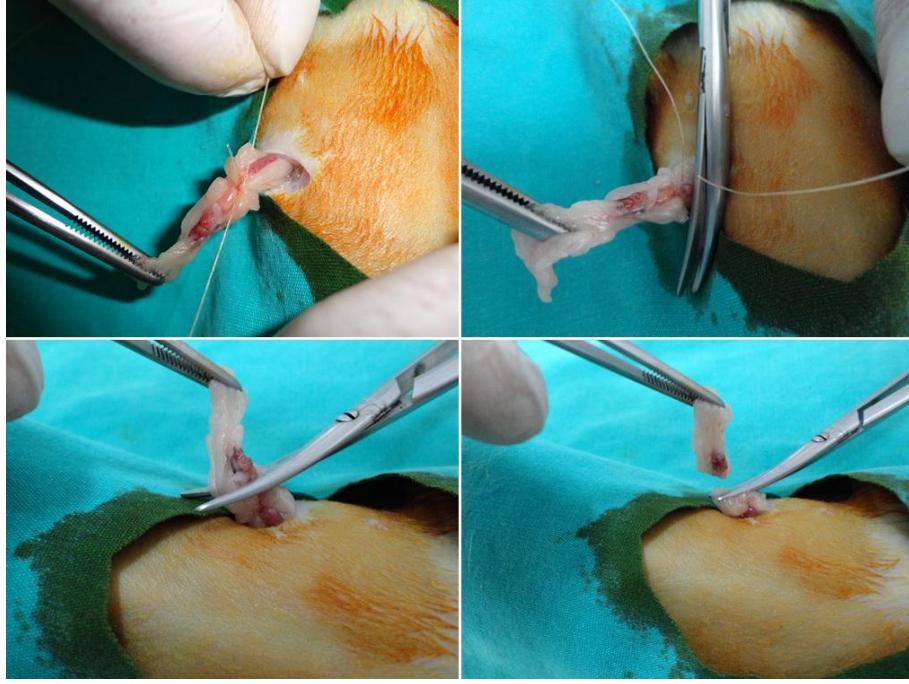
(Ketalar®) ve 10 mg/kg Xylazin HCl (Rompun®) karışımı kullanılarak uygulandı. Anestezi derinliği, işlem boyunca, cilt ve parmak kısırtma yanıtları ile her 3-5 dakikada bir izlendi. Cerrahi işlemlerde, fallop tüpünün ligasyonu ve kas dokusunun suturenda katkı (USP 4.0 Catgut); deri dokusunun suturenda ise polipropilen iplik (USP 3.0) kullanıldı.

3.3.1.1. Ovariectomi (OVX) Prosedürü

Genel anestezi altına alınan sıçanların karın bölgesi tıraşlanarak, antiseptik sürüldü. Daha sonra, dorsal orta hatta yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda bir kesi atıldı. Bu kesinin kranial terminali 13. kostanın kaudal ucuna yaklaşık 2 cm uzaklıkta idi. İnsizyon bölgesine ait deri parçası kesik üzerinden uzaklaştırılarak kas kütlelerinde omurganın lateraline doğru yaklaşık 1,5-2 cm uzunluğunda bir kesi yapıldı. Over, dorsal kas kütlelerinin altında tespit edildi. Kas kütleleri uzaklaştırıldı. Fallop tüpü forsepsle klemplenecek katkıle düğümlendi; böylece overleri besleyen kan dolaşımı kesilerek over eksize edildi (Şekil 3.1). Uterin kord, katkıle düğümlenmiş şekilde vücut içine bırakıldı. Diğer over de bu şekilde eksize edildikten sonra oluşabilecek herhangi bir enfeksiyonu engellemek için sıçanların vücut içi serum fizyolojik solüsyonuyla yıkandı. Bu işlemlerin ardından kas dokusu katkıle, deri dokusu ise propilen iplik ile dikilerek cerrahi işlem sonlandırıldı. Sıçanlar, OVX işleminin hemen ardından sNX işlemine tabi tutuldu.

3.3.1.2. Siyatik Sinir Nörektomi (sNX) Prosedürü

Bu işlemde, genel anestezi altındaki sıçanların kalça bölgesi (kesi büyüklüğünce) tıraşlanarak, antiseptik sürüldü. Daha sonra, kalçanın dorsolateral hattı içinde yaklaşık 1,5 cm uzunluğunda bir kesi yapıldı. Siyatik sinir açığa çıkarılarak orta kısımdan 1 cm uzunluğundaki sinir parçası eksize edildi (Şekil 3.2). Diğer siyatik sinir de bu şekilde eksize edildikten sonra oluşabilecek herhangi bir enfeksiyonu engellemek için yara içi serum fizyolojik solüsyonuyla yıkandı. Bu işlemlerin ardından kas dokusu katkıle, deri dokusu ise propilen iplik ile dikilerek cerrahi işlem sonlandırıldı.



Şekil 3.1. Sıçanlardan ovaryum izolasyonu



Şekil 3.2. Sıçanlardan siyatik sinir rezeksiyonu

3.3.2. Pulsu Manyetik Alan (PMA) Uygulama Prosedürü

Çalışmada, PMA uygulaması Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Homojen üniform PMA, Helmholtz bobin çiftinden elde edildi. Bobinler, yapısında bulundurduğu PIC16F877A mikroişlemci ile programlanabilen bir güç kaynağıyla beslendi. Bu güç kaynağı, değişik frekans (0–100 Hz), genlik (0–10 mT) ve dalga sürelerine (0–2500 μ s) sahip PMA üretebilecek şekilde tasarlandı. Helmholtz bobin çifti, 90x90x55 cm ölçülerindeki topraklanmış Faraday kafesi içine yerleştirilerek; DC, 50 Hz veya çevreden gelebilecek manyetik alan parazitleri engellendi. PMA üretmek için kullanılan Helmholtz bobin çiftinin genel özellikleri çizelge 3.1'de; deneylerimizde kullandığımız PMA uygulama sistemi (İlfa Elektronik San.Tic.Ltd.Şti.) ise Şekil 3.3 de gösterilmiştir.

Sıçanlar, Helmholtz bobin çifti merkezine 27x12x19 cm ölçülerindeki plastik kafesler ile yerleştirildi. Böylece, sıçanlar homojen üniform manyetik alana (MA) maruz bırakıldı. PMA sistemine bir uygulama süresince aynı anda en fazla 5–6 adet sıçan yerleştirildi. Herhangi bir kimyasal etkileşimi engellemek için sisteme konulan kafesler her uygulama öncesi temizlendi. Sistem ve laboratuvar koşullarından doğabilecek stresi azaltmak için ONXP ve PMA gruplarına ait sıçanların 1 hafta süreyle bu koşullara adaptasyonları sağlandı. PMA'nın zamansal uygulama farklılıklarından doğabilecek fizyolojik etkileri azaltmak için sıçanlar deney süresince aynı saat ve aynı süreyle PMA'a maruz bırakıldı. Güç kaynağında frekans, genlik ve puls süresi programlanarak, manyetik alan (MA) uygulaması otomatik olarak yapıldı. Her uygulama öncesi Hall-effect prob bağlı Teslametre (Sypris Model 6010) ile bobinler arasındaki MA şiddeti kontrol edildi. Ortamın sıcaklığı klima ile 21–24°C aralığında tutuldu.

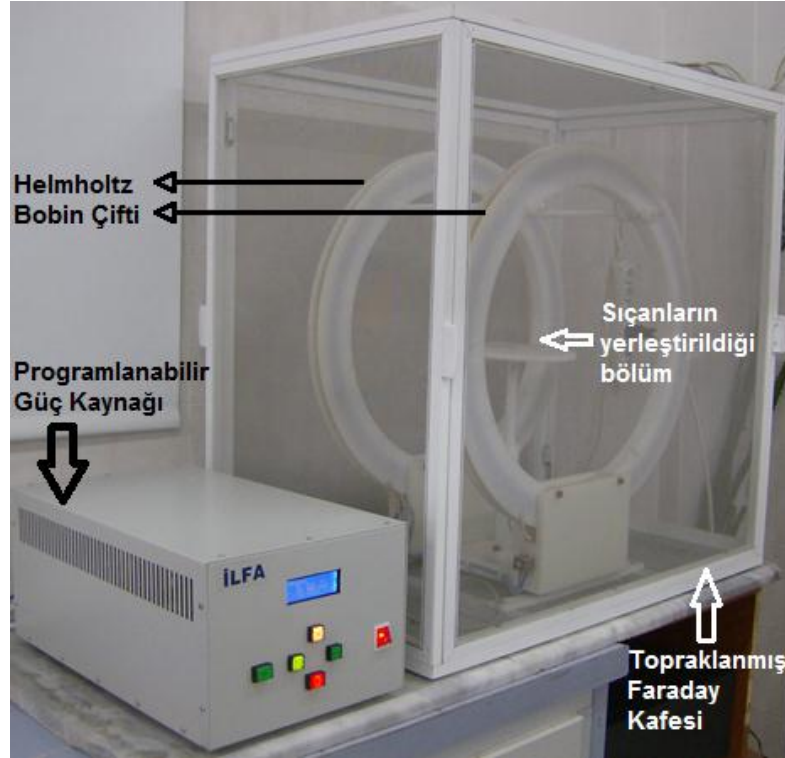
Çalışma kapsamında, güç kaynağı ve bobin çifti ile horizontal yönde yayılan ve maksimum genliği 1 mT olan kuasi-triangular MA üretildi. İndüklenen MA'nın dalga formu ve maksimum genliği Hall-effect prob bağlı Teslametre ile belirlendi. Zamanla değişim gösteren kuasi-triangular dalga formuna sahip MA'nın çıkış süresi 0,3 ms, iniş süresi 9,7 ms idi (Şekil 3.4). Oluşan elektrik alan; 50 sarımlı, 0,25 mm bakır telden imal edilen ve 50 mm çapa sahip bir tarayıcı proba belirlendi. Bunun için tarayıcı prob ile güç kaynağı arasına değeri 0,1 Ω olan bir direnç yerleştirildi ve düzenek osiloskoba bağlandı. Böylece, MA'nın maksimum genliğinde gözlenen akım değeri 6,9 A olarak

saptandı. Bobin çiftinin merkezinde oluşan maksimum elektrik alan 0,25 V/m (2,5 mV/cm) olarak ölçüldü.

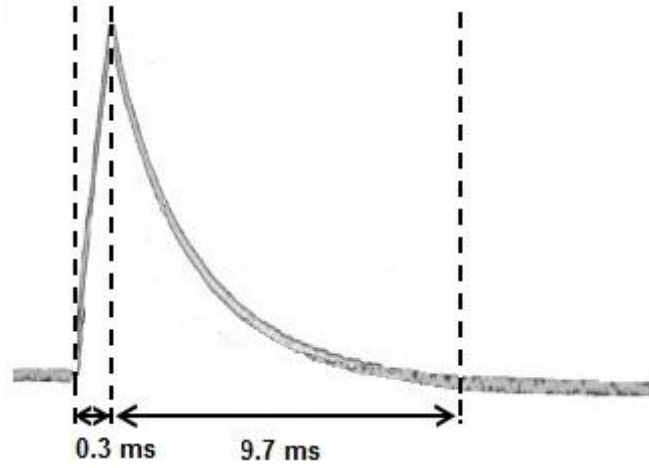
Çizelge 3.1. Pulslu manyetik alan oluşturmak için kullanılan Helmholtz bobin çiftinin genel özellikleri

Özdirenç* (ρ ; $\Omega \cdot m$)	1.72×10^{-8}
İletken çapı (mm)	2.5
Sarım sayısı	50
Bobin çapı (cm)	60
Bobinler arası mesafe (cm)	30
R (Ω)/Bobin	0.78
R _T (Ω)/Bobin çifti	1.56
Endüktans (mH)	8.8

* Helmholtz bobin çiftinin iletken unsurları bakır telden imal edilmiştir. Ω : Ohm, H: Henry



Şekil 3.3. Pulslu manyetik alan (PMA) sisteminin genel görünüşü



Şekil 3.4. PMA sistemi tarafından üretilen kuasi-triangular MA

Literatürlerde OVX ve sNX gibi cerrahi işlemler nedeniyle oluşan kemik kaybının OVX’te 10. gün, sNX’te ise 30. saatten itibaren başladığı rapor edilmiştir (123–127). Bu nedenle ONXP ve PMA gruplarına ait sıçanlar, ONX işlemini takip eden 30. saatten itibaren 26 hafta (182 gün) süreyle 15 Hz frekanslı, 0,3 ms puls süreli, 1 mT şiddetindeki PMA’ya günde 2 saat maruz bırakıldı (128–131). 26 haftalık (182 gün) deney süresi kortikal kalınlık ve kemiklerde biyomekanik açıdan beklenen en erken anlamlı değişim süreleri dikkate alınarak belirlendi (124,125). Ortamın geomanyetik alanı yaklaşık 0,04–0,05 mT olarak ölçüldü. K grubuna ait sıçanlar herhangi bir işlem yapılmadan normal yaşam döngüsüne bırakılırken, SH grubuna ait sıçanlar, PMA sistemi kapalıyken, ONXP ve PMA gruplarıyla benzer koşullara bırakıldı. ONX grubuna ait sıçanlar ise OVX ve sNX işlemini takiben doğal yaşam döngüsüne bırakıldı. Çalışma süresince sıçanların vücut ağırlıkları 7 gün ve pençe geri çekme cevapları (ısı uyarısına karşı sıçanların verdiği pençe geri çekme latansları) ise 30 günlük periyotlarla düzenli olarak ölçüldü.

Çalışma, 26 hafta (182 gün) sonunda Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi Laboratuvarı’nda sonlandırıldı. Sonlandırma işleminde sıçanlara, genel anestezi altında (50 mg/kg Ketamin HCl ve 10 mg/kg Xylazin HCl, ip.) eksanguinasyon yöntemi ile ötenazi yapıldı. Bu yöntem ile alınan kan örnekleri biyokimyasal ölçüm ve analizlerde kullanıldı. Ayrıca, sıçanların sağ ve sol femur kemikleri ile sol gastrocnemius kasları diseke edildi. Kas kümesiyle izole edilen sol femurlar, serum fizyolojik solüsyonu ile ıslatılmış gazlı bezlerle bohçalandı ve dansitometrik, geometrik

ve biyomekanik analizlerin yapılacağı zamana kadar -20°C 'de saklandı. Sağ femurlar, histomorfolojik analizlerde kullanılmak üzere %10'luk formalin içine alınırken, sol gastrocnemius kasları sNX'in cerrahi başarısının kontrolünde kullanıldı.

3.3.3. Sinir Nörektominin (sNX) Kontrol ve Takibi

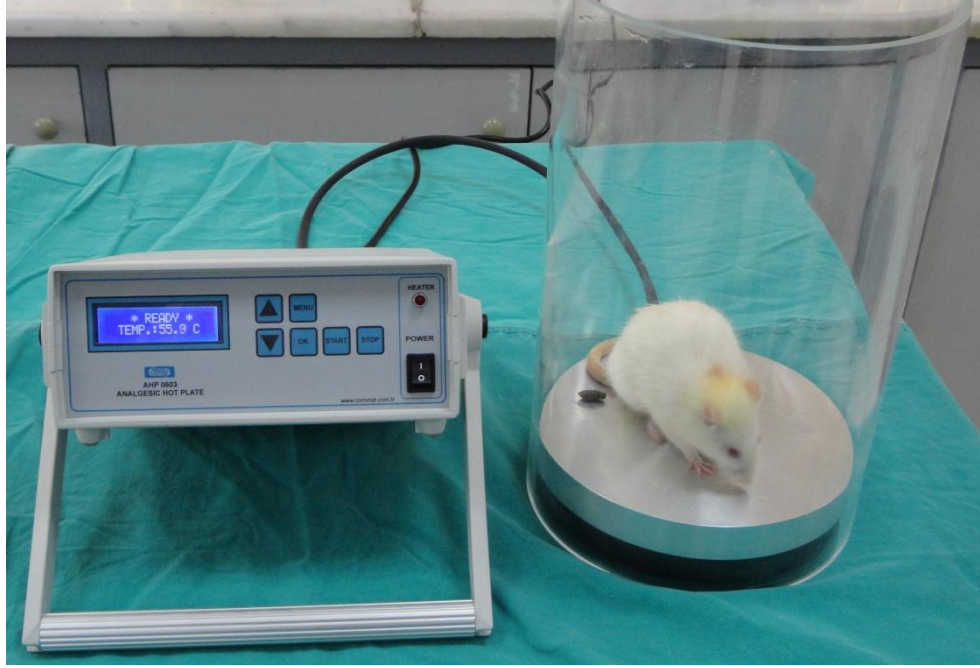
A. Pençe Geri Çekme Cevaplarının Saptanması: Pençe geri çekme cevapları, Mersin Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi Laboratuvarı'nda analjezik hot plate test cihazı (MAY AHP 0603) ile ölçüldü (Şekil 3.5). Ölçümlerde $55 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmış sıcak metal zemine sıçanlar bırakılarak; i) pençe yalama ii) kaçma veya iii) ses çıkartma eylemlerinden herhangi birini göstermesi beklendi ve bu süre kaydedildi. Böylece, ağrının algılanmasında gözlenen bu ilk yanıt çalışmamızda pençe geri çekme cevabı bir başka ifadeyle pençe geri çekme latansı [Paw withdrawal latency (PWL); s] olarak değerlendirildi. Ölçüm sırasında sıçanlarda herhangi bir doku hasarı oluşturmamak amacıyla maksimum latans 30 s olarak belirlendi. Her ölçümde sadece 1 adet sıçan sisteme yerleştirildi. Ölçümler 5 dakika ara ile 3 kez tekrarlanarak PWL ortalama olarak saptandı (132–134). Ölçümlere 0. gün (başlangıç; sNX öncesi) ve 2. gün (sNX sonrası) PWL değerleri saptanarak başlandı. PWL, deney süresince, 30'ar günlük periyotlarla ölçüldü. Çalışmada uygulanan bu yöntemle, sNX işleminin cerrahi başarısının deney süresince takibi sağlandı.

B. Gastrocnemius Kas Ağırlıklarının Saptanması: Tüm deney gruplarına ait sıçanlardan izole edilen sol gastrocnemius kasları hassas terazi (Sartorius TE214S) ile tartıldı. Tartım kaslar izole edilir edilmez gerçekleştirildi. Bu yöntem ile sNX işleminin cerrahi başarısı deney sonu itibariyle kontrol edildi (135,136).

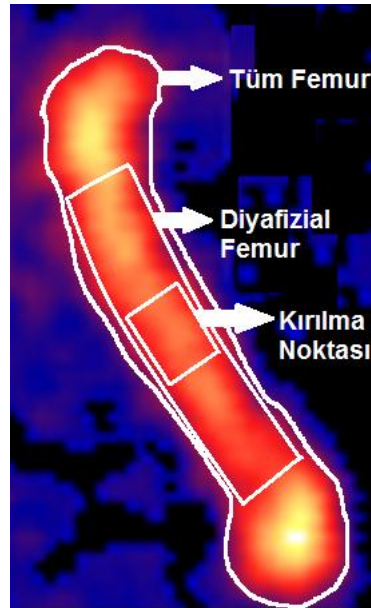
3.4. Kemiklerin Dansitometrik, Geometrik ve Biyomekanik Ölçümler için Hazırlanması

Ötenazi sonrası -20°C de saklanan sol femurlar; dansitometrik, geometrik ve biyomekanik ölçüm ve analizler için kullanıldı. Dansitometrik ve geometrik ölçümler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı'nda yapılırken, biyomekanik ölçüm ve analizler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim

Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Dokuların birimler arası nakil işlemleri soğuk zincir kurallarına uygun olarak yapıldı. Kemikler bir kez çözdürüldü ve tüm ölçümlerin tamamlanması yaklaşık 4 saat sürdü.



Şekil 3.5. Analjezik hot plate test cihazının genel görünüşü



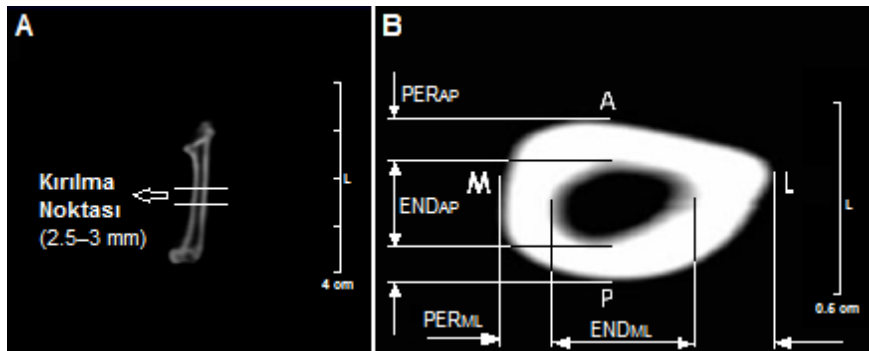
Şekil 3.6. Sıçanlardan alınan densitometrik ölçüm örneği

3.5. Dansitometrik Ölçüm ve Analizler

Ölçümler, Dual Enerji X-ışını Absorbsiyometri cihazı (DXA; Norland XR-46) ile yapıldı. Tüm ölçümler, küçük hayvanlar için düzenlenmiş deneysel ölçüm protokolü (Tarama hızı: 10 mm/s, Rezolüsyon: 0,5x0,5mm, Anot voltajı: 100 kV, Akım: 1,3 mA) uygulanarak gerçekleştirildi (18,137,138). Kemikler testin yapıldığı birimde ve oda sıcaklığında (21–24°C) 10 dakika bekletilerek çözdürüldü. Ölçümlerde, femurlar kas kümesiyle birlikte diseke edildiği için, doku sınırlarının belirlenmesinde ilave bir yöntem kullanılmadı. Ölçüm ve analizler, tüm femur (WF), diyafizial femur (DF) ve kırılma noktası (kırılma hattı; BP) olmak üzere üç bölgede gerçekleştirildi (Şekil 3.6). Seçilen bu bölgelerde kemik mineral yoğunluğu (BMD; g/cm²) saptandı. Sonuçlar, Illuminatus DXA™ yazılımı (V 4.2.0, CooperSurgical Inc., Trumbull, CT, USA) ile değerlendirildi.

3.6. Geometrik Ölçüm ve Analizler

Dansitometrik ölçümleri tamamlanan kemikler geometrik ölçümlerin yapıldığı odaya alındı. Ölçümler, bilgisayarlı tomografi cihazı (Toshiba Aquilion 64 Slice CT) ile yapıldı. Geometrik analizlerde kemiklerin kırılma hattı (2,5–3 mm) boyunca medio-lateral (ML) ve anterior-posterior (AP) yönde endosteal (END; mm) ve periosteal (PER; mm) çapları ile kortikal kesit alanları (CSA; mm²) ölçüldü (139,140) (Şekil 3.7A ve B). Sonuçlar, Vitrea yazılımı (V 2.0, Minnetonka, MN, USA) ile değerlendirildi. Okuma 6 kez tekrarlanarak, anılan parametrelere ait değerler ortalama alınarak saptandı.



PER_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki periosteal çap, END_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki endosteal çap, PER_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki periosteal çap, END_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki endosteal çap.

Şekil 3.7. Femur kemiklerine ait radyolojik görüntü örneği A) Kırılma hattı B) Geometrik parametreler

3.7. Kemik Biyomekaniği Ölçüm ve Analizleri

Geometrik ve dansitometrik ölçümleri tamamlanan sol femurların biyomekanik ölçüm ve analizleri Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Kemikler, oda sıcaklığındaki serum fizyolojik solüsyonunda yaklaşık 30 dakika tutulduktan sonra mekanik testlere geçildi. Bu süre içerisinde kemikler kas dokusundan temizlenerek, femur uzunlukları dijital kumpas ile ölçüldü. Kemikler, mesnet noktaları arasındaki mesafe (L ; mm) dijital kumpas ile belirlenerek, test cihazına (ML doğrultuda) yerleştirildi (140). Femoral orta hat basma noktası olarak belirlendi. Kemiklere MAY TPBM 2113 test cihazı (Commat Ltd.) ile üç nokta eğme testi uygulandı (Şekil 3.8). Eğme yükü 1 mm/s hızla verildi (141). Uygulanan eğme kuvveti sonucunda oluşan sinyaller 12 bit'lik A/D çevireç kullanılarak 1000 örnek/s duyarlılıkla kayıt edildi. Diğer tüm mekanik testlerde olduğu gibi, üç nokta eğme testinin yapıldığı ortam sıcaklığı ölçülen ve hesaplanan parametreleri etkilediğinden, ortam sıcaklığı 22-24°C'ye sabitlendi. Üç nokta eğme sisteminde yük 0,064 s⁻¹ hızla (strain rate) uygulandı. Çalışmaya sadece femoral orta hattan kırılan kemikler dâhil edilirken, diğerleri çalışma dışı bırakıldı (19,33).

Çalışmada, kemiğin mekanik özelliklerini belirlemek amacıyla femoral diyafize üç nokta bükme testi uygulandı. Test sonunda yük-deformasyon eğrisi çizdirilerek; maksimum kuvvet (F_U ; N), maksimum deformasyon (d_U ; mm), kırılıncaya kadar depolanan enerji (U ; mJ) ve sertlik (S ; N/mm) direkt olarak elde edildi (Şekil 3.9). Bu parametreler LoggerPro yazılımı (V 3.8.3, Vernier Software & Technology, Orlando, FL, USA) kullanılarak değerlendirildi. Ayrıca, maksimum eğme dayanımı (σ_U ; MPa), maksimum strain (ε_U ; mm/mm), esneklik katsayısı (E ; GPa) ve dayanıklılık (u ; MPa) değerleri denklem 3.1'de verilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı (33). Bu değerler hesaplanırken ML yöndeki periostal çap ($c = PER_{ML}/2$; mm) kullanıldı; ayrıca, AP yönündeki atalet momenti (I_{AP} ; mm⁴) denklem 3.2'de verilen eşitlikler kullanılarak hesaplandı.

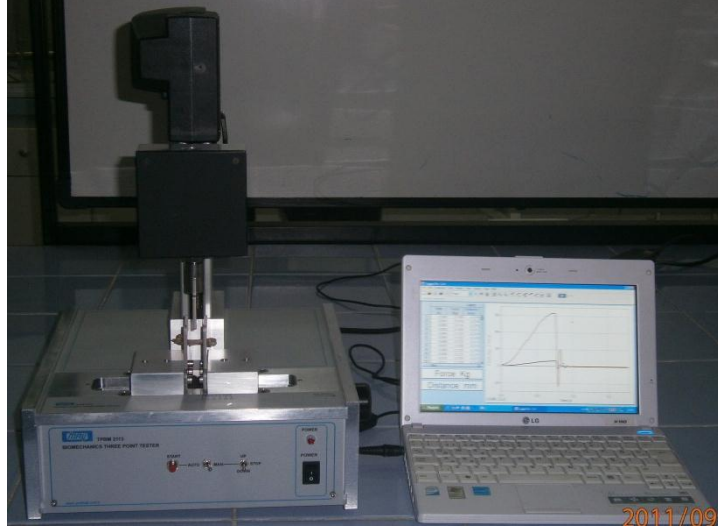
Denklem 3.1. İntrensik parametrelerin hesaplanmasında kullanılan denklemler (33)

$$\sigma_U = F_U \cdot \left(\frac{L \cdot c}{4 \cdot I_{AP}} \right); \varepsilon_U = d_U \cdot \left(\frac{12 \cdot c}{L^2} \right); E = S \cdot \left(\frac{L^3}{48 \cdot I_{AP}} \right); u = U \cdot \left(\frac{3 \cdot c^2}{I_{AP} \cdot L} \right)$$

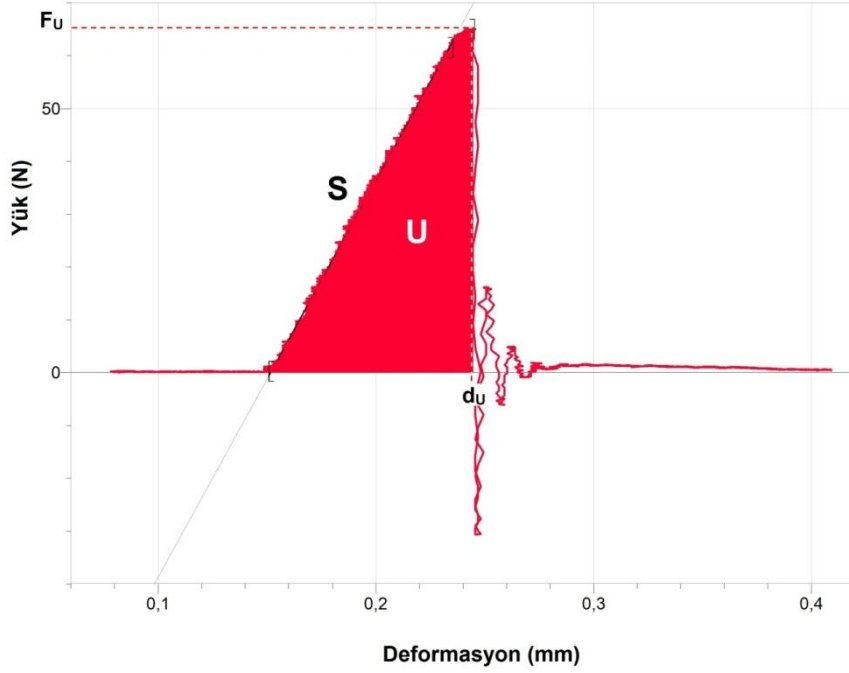
Denklem 3.2. Medio-lateral (ML) ve anterior-posterior (AP) yönde oluşan kesitsel atalet momenti denklemi (139)

$$I_{AP} = \frac{\pi}{64} \cdot [(PER_{AP}^3 \cdot PER_{ML}) - (END_{AP}^3 \cdot END_{ML})]$$

$$I_{ML} = \frac{\pi}{64} \cdot [(PER_{ML}^3 \cdot PER_{AP}) - (END_{ML}^3 \cdot END_{AP})]$$



Şekil 3.8. Üç nokta eğme sisteminin genel görünümü



F_U : Maksimum kırılma kuvveti, d_U : Maksimum deformasyon, S: Sertlik, U: Depolanan enerji

Şekil 3.9. Üç nokta eğme testi ile kaydedilen bir yük-deformasyon eğrisi örneği

3.8. Histolojik Ölçüm ve Analizler

PMA uygulamasının sonlandırılmasıyla izole edilen sağ femurlar histolojik ölçüm ve analizler için kullanıldı. Histolojik değerlendirme ışık mikroskobik olarak yapıldı. Tüm histolojik ölçüm ve analizler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.8.1. Işık Mikroskobik Ölçüm ve Analizler

Diseke edilen sağ femurlar orta noktadan transvers ekseninde 2 parçaya ayrıldı. Bu parçalar mikroskobik inceleme için % 10'luk nötral formalin solüsyonunda 72 saat fikse edildi. Daha sonra dekalsifikasyon işlemi için EDTA (5,5 g EDTA, 90 cc distile su, pH: 7,4) solüsyonuna alındı. Kemik sertliği enjektör ucu ile kontrol edilerek, EDTA solüsyonu düzenli aralıklarla (her gün) değiştirildi. Dekalsifikasyon işlemi yaklaşık 30 gün sürdü. Tüm femur doku örnekleri dekalsifikasyon işleminin ardından akar suda 2 saat yıkandıktan sonra rutin doku takip işlemine alındı. Doku örnekleri derecesi giderek artan (%70, %80, %90, %96) etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra ksilolden geçirilen proksimal femur dokusu örnekleri kortikal kemik kalınlığını ölçmek için, dik olarak parafine gömüldü. Ultramikrotom (Leica Ultracut UCT125) ile parafin bloklardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kortikal kemik kalınlığı ölçümü için parafin bloklardan 100 µm ara ile 10 adet kesit alındı. Ardından kesitler hematoksilin-eosin ile boyandı. İncelemeler Olympus® BX50 (Olympus GmbH) ışık mikroskobu ile yapıldı ve aynı mikroskoba eklenmiş Nikon® Coolpix5000 (Nikon GmbH) dijital kamera ile resimler çekildi. 120 kez büyütülmüş resimlerde ITEM 1100 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (OSIS®), Münster, Almanya) yazılımı kullanılarak kortikal kemik kalınlıkları (µm) ölçüldü. Kortikal kemik kalınlığı kemiğin diyafor bölümünü içeren 10 adet kemik dokusu kesitinde, her bir kesitte 4 kadrandan olacak şekilde elde edilen ölçümlerin ortalaması alınarak yapıldı.

3.9. Biyokimyasal Ölçüm ve Analizler

3.9.1. Kan Örneklerinin Ölçümler için Hazırlanış Prosedürü

PMA uygulamasının sonlandırılması ile sıçanlardan alınan kan örnekleri (6–8 ml) içeriksiz biyokimya tüplerine alındı. Tüpler, 4000 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi.

Örneklerin sıvı üst fazı (serum), 1,5 ml'lik ependorflara alındı ve OCN ve β -CTX düzeylerinin ölçüldüğü zamana kadar -20°C de (yedek serumlar -80°C de) saklandı. Çalışmada tüm biyokimyasal ölçüm ve analizler, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı.

3.9.2. Serum Osteokalsin (sOCN) Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada, sOCN düzeyleri elektrokemilüminesans immünoloji (ECLIA) yöntemi ile ölçüldü. Ölçümler Elecsys N-MID Osteokalsin kiti (Roche Diagnostics) kullanılarak, Elecsys 2100 cihazı (Roche Diagnostics GmbH) ile otomatik olarak yapıldı. Çalışmada, sOCN düzeyleri ng/ml olarak verildi.

A) Elektrokemilüminesans İmmünoloji (ECLIA) Yöntemi: ECLIA yöntemi temelde sandviç prensibine dayanır. Bu prensibe göre;

- ✓ 1. İnkübasyon: 20 μl serum örneği N-MID OCN'e spesifik biyotinli monoklonal antikor ve rutenyum kompleksi (Tris (2,2'-bipiridil) rutenyum (II)-kompleks ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$) ile işaretlenmiş N-MID OCN'e spesifik monoklonal antikor bir sandviç kompleksi oluşturmak için reaksiyona girer.
- ✓ 2. İnkübasyon: Ortama streptavidin-kaplı mikropartiküllerin katılmasıyla, kompleks, biyotin ile streptavidin etkileşimi yoluyla solid faza bağlanır.
- ✓ Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandığı ölçüm hücrelerine aspire edilir. Bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılmasından sonra elektrod üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonu indükler.
- ✓ Bu emisyon ölçülerek ve kalibrasyon grafiği değerlendirilerek sOCN düzeyleri ölçülür.

B) Elecsys N-MID OCN kit içeriği*:

- ✓ M: Streptavidin-kaplı mikropartiküller (0,72 mg/ml); koruyucu madde
- ✓ R1: Anti-N-MID OCN Ab-biyotin; Biyotinli monoklonal anti-N-MID OCN antikor (1,5 mg/ml); fosfat tamponu (100 mmol/l, pH: 6,0); koruyucu madde
- ✓ R2: Anti-N-MID OCN- $(\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+})$; Rutenyum kompleksi ile işaretli monoklonal anti-N-MID OCN antikor (1,3 mg/ml); fosfat tamponu (100 mmol/l, pH: 6,0); koruyucu madde

(*Kit içindeki reaktifler (M, R1 ve R2) kullanıma hazır şekilde bir araya getirilmiştir. Reaktifler herhangi bir işleme tabi tutulmadan Elecsys 2010 cihazına yerleştirilerek ölçümler alınmıştır.)

3.9.3. Serum β -CrossLaps ($s\beta$ -CTX) Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmada, $s\beta$ -CTX düzeyleri kompetitif inhibisyon ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ölçümler ELISA β -CTX kiti (Uscn Life Science Inc.) kullanılarak, ELISA Reader 2010 (Organon Teknika GmbH) cihazı ile yapıldı. Sonuçlar pg/ml olarak verildi.

A) Kompetitif İnhibisyon ELISA Yöntemi: ELISA plak kuyucukları rat β -CTX'e spesifik monoklonal antikor ile kaplanmıştır. Kompetitif inhibisyon reaksiyonu ELISA kuyucuklarının spesifik antikor ile kaplanmış sıçan β -CTX için biotin ile işaretlenmiş-sıçan β -CTX ile işaretlenmiş-sıçan β -CTX (örnek ve standartlar) arasındaki yarışma ile başlatılır. İnkübasyon sonrası bağlanmamış konjugat yıkanarak uzaklaştırılır. Daha sonra avidin ile işaretli peroksidaz enzimi eklenir ve inkübe edilir. Bağlı peroksidaz konjugat miktarı örnekteki β -CTX konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Ortama peroksidazın substratı olan TMB'nin eklenmesiyle oluşan reaksiyon sonucunda, kuyucuklarda örnek içindeki β -CTX konsantrasyonu ile ters orantılı yoğunlukta mavi renk oluşur. Son basamakta kuyucuklara eklenen stop çözeltisi ortam pH'sını düşürerek peroksidazın katalizlediği reaksiyonu durdurur. Aynı zamanda, kuyucuk içindeki çözeltinin rengini de maviden sarıya dönüştürür. Oluşan bu rengin yoğunluğu 450 nm'de ölçülür. Daha sonra logaritmatik standart eğri kullanılarak konsantrasyon hesaplanır.

B) ELISA β -CTX kit içeriği:

- ✓ β -CTX antikorları ile kaplanmış plak (8x12=96 kuyucuk)
- ✓ Standart (liyofilize)
- ✓ Standart dilüsyon tamponu
- ✓ Deteksiyon reaktifi A
- ✓ Deteksiyon reaktifi B
- ✓ Assay Diluent A (2 kat konsantre)
- ✓ Assay Diluent B (2 kat konsantre)
- ✓ TMB substrat

- ✓ Stop solüsyon
 - ✓ Yıkama çözeltisi (30 kat konsantre)
- C) Standart çözeltilerinin hazırlanması: Liyofilize halde olan standart, standart dilüsyon tamponundan 2 ml eklenerek 8000 pg/ml'lik stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltisinden seri dilüsyonlar yapılarak 6 farklı derişimde standart çözeltiler hazırlandı. Bunlar; 2666,67, 888,89, 286,3, 98,77 ve 32,92 pg/ml'lik derişimde standart çözeltilerdir. Son tüpe sadece standart dilüsyon tamponu koyuldu ve 0 pg/mL olarak işaretlendi.
- D) Assay dilüent A ve B'nin hazırlanması: 2 kat konsantre olarak verilen assay dilüentlerden 6 ml alınıp üzerine 6 ml distile tamponu ile seyreltildi.
- E) Deteksiyon reaktifi A ve B'nin hazırlanması: Deteksiyon reaktifi A ve B, assay dilüent A ve B ile 1/100 dilüe edilerek hazırlandı.
- F) Yıkama çözeltisi ve yıkama prosedürü: 30 kat konsantre yıkama çözeltisinden 20 ml alınıp üzerine 580 ml distile su eklenerek hazırlandı. Her bir yıkama basamağında otomatik yıkayıcı (ELISA Washer 2010) kuyucuğa 400 µl yıkama çözeltisi pipetleyecek şekilde ayarlandı ve kuyucuklar her yıkama basamağında 3 kez yıkandı.
- G) Çalışma prosedürü:
- a. Her bir kuyucuğa, 50 µl standart, kör ve örnekler eklendi.
 - b. 50 µl deteksiyon reaktifi A eklendi 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve yıkandı.
 - c. 100 µl deteksiyon reaktifi B çözeltisinden pipetlenip 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve yıkandı.
 - d. 90 µl substrat kuyucuklara pipetlenip 37 °C'de 25 dakika inkübe edildi.
 - e. 50 µl stop çözeltisi kuyucuklara pipetlendi.
 - f. 450 nm'de absorbanlar ELISA plak okuyucusunda okundu. Konsantrasyonlar standart eğriden hesaplandı.

3.10. İstatistiksel Analizler

Çalışmada toplam 2 adet [ONX (1 adet) ve ONXP (1 adet)] sıçan PMA uygulaması tamamlanmadan öldü. Ayrıca, kemik biyomekaniği ölçümleri sırasında K (2 adet), SH (2 adet) ve ONX (3 adet) gruplarına ait toplam 7 adet femur, femoral midshaft

dışında kırıldı, bu nedenle, bu femurlara ve sıçanlara ait tüm parametreler çalışma dışında bırakıldı.

Çalışmada, sıçanlarda kemik kaybının oluşup oluşmadığı K ve ONX grupları, PMA'nın kemik kaybı üzerindeki protektif etkileri SH, ONX ve ONXP grupları, sağlıklı sıçanlar üzerindeki etkileri ise SH ve PMA grupları karşılaştırılarak belirlendi. Bununla birlikte, sNX'in cerrahi başarısı K, SH, ONX ve ONXP grupları arasında değerlendirildi.

Çalışmada elde edilen tüm sonuçlar ortalama \pm SD olarak verildi. Her gruptaki veri dağılımının normal dağılıma uyup uymadığı Shapiro-Wilks testi ile belirlendi. Grupların vücut ağırlığı ve pençe geri çekme latanslarının değerlendirilmesinde tekrarlanan ölçümlü varyans analizi kullanılırken, gruplar arasındaki farklar Tukey HSD post-hoc testi ile belirlendi. Ayrıca, grup-hafta ve grup-gün etkileşimi yine aynı yöntemle değerlendirilirken, gruplar arasındaki farklılıklar Bonferroni post-hoc testi ile belirlendi. Grupların gastrocnemius kas ağırlıklarının istatistiksel değerlendirmesinde tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) kullanılırken, gruplar arasındaki farklar Tukey HSD post-hoc testi ile belirlendi.

Grupların kemik mineral yoğunluğu analizlerinde tek-yönlü ANOVA kullanılırken, gruplar arasındaki farklar Tukey HSD testi ile belirlendi. Geometrik parametrelerin ve kemik biyomekaniği parametrelerinin istatistiksel değerlendirmesinde normal dağılıma uygun ölçümler tek-yönlü ANOVA ile test edilirken, normal dağılıma uymayan ölçümler de Kruskal Wallis testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren parametrelerde gruplar arasındaki farklar Tukey HSD post-hoc testi ile belirlendi. Kemik biyomekaniğine ilişkin istatistiksel değerlendirmelerde, mesnet noktaları arasındaki mesafe modele kovaryat alınarak, bu parametre ile ilişkili ölçümlerde modeldeki etkisi giderildi. Grupların kortikal kalınlıklar açısından değerlendirmesinde Kruskal Wallis testi uygulandı. Serum osteokalsin ve β -crosslaps analizlerinde ANOVA'yı takiben Tukey HSD post-hoc testi uygulandı. Çalışmada, anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel değerlendirme ve grafiklerin çizilmesinde SPSS (V 11.5.1, Lead Technologies, Inc., Chicago, IL, USA) ve Statistica (V 8.0, Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA) programları kullanıldı.

Çalışmada parametrelere ait ortalamaların karşılaştırılmasında yüzde değişim miktarı kullanıldı (Denklem 3.3).

Denklem 3.3. Yüzde değişim miktarı denkleml

$$\% \text{ Değişim Miktarı} = \frac{\text{Deney grubuna ait ortalama} - \text{Kontrol grubuna ait ortalama}}{\text{Kontrol grubuna ait ortalama}} \times 100$$

4. BULGULAR

4.1. Genel Bulgular

4.1.1. Vücut Ağırlığı Bulguları

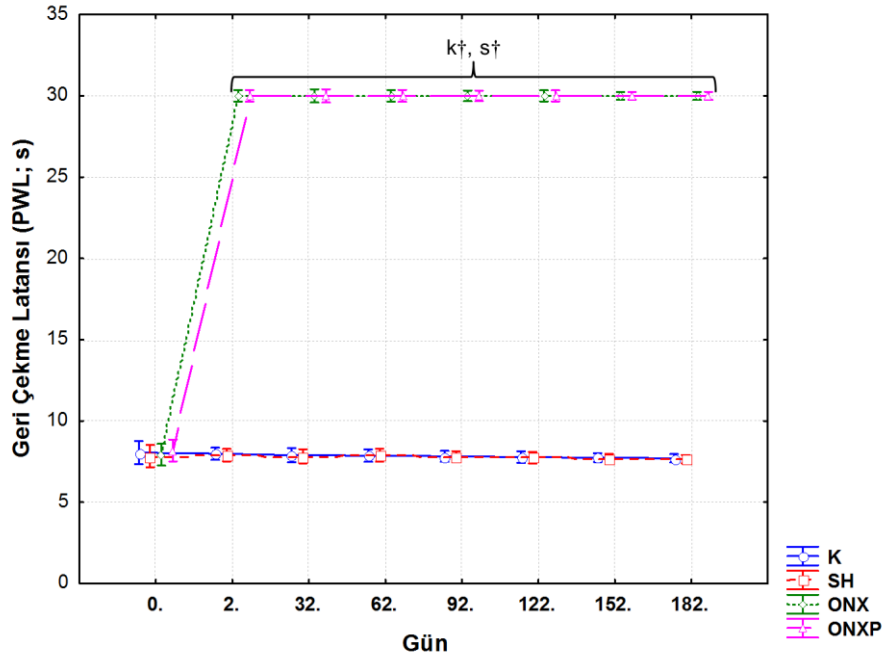
Çalışma kapsamında sıçanların vücut ağırlıkları (g), 26 hafta (182 gün) boyunca 7'şer günlük periyotlarla ölçülmüştür. Bu süreçte sıçanların vücut ağırlıklarındaki değişimler EK-1 ve ağırlık ortalamaları EK-2'de gösterilmiştir.

Sıçanların başlangıç ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ayrıca gruplar arasında başlangıç ağırlıklarında gözlenen bu ilişkinin ($P>0,05$), deney süresince tüm periyotlarda korunduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, grupların periyotlar arasındaki ağırlık değişimleri (gözlenen artış veya azalışlar) incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

4.1.2. Pençe Geri Çekme Latansı Bulguları

Çalışma kapsamında sıçanların pençe geri çekme latansı (PWL; s), sNX'in cerrahi başarısının kontrol ve takibinde kullanılmış, K, SH, ONX ve ONXP gruplarına ait ortalamalar karşılaştırılmıştır. Başlangıç (0. gün) değerlerinin saptanmasının ardından ölçümlere sNX'i takip eden 2. gün başlanmış ve deney süresince (182 gün) 30'ar günlük periyotlarla ölçülmüştür. Sıçanların PWL değerlerinde gözlenen değişimler şekil 4.1'de, PWL ortalamaları ise EK-3'te gösterilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, grupların başlangıç PWL değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. ONX ve ONXP gruplarına ait PWL değerlerinin 2. gün ölçümlerinden başlayarak tüm deney süresince sırasıyla K ve SH gruplarına göre arttığı ve bu artışın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0,001$).



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11). ^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma. † $P < 0.001$.

Şekil 4.1. Grupların pençe geri çekme latans değişimleri ve sıçanların ölçüm günlerine ait ortalamaları \pm SD değerleri

4.1.3. Gastrocnemius Kası Ağırlık Bulguları

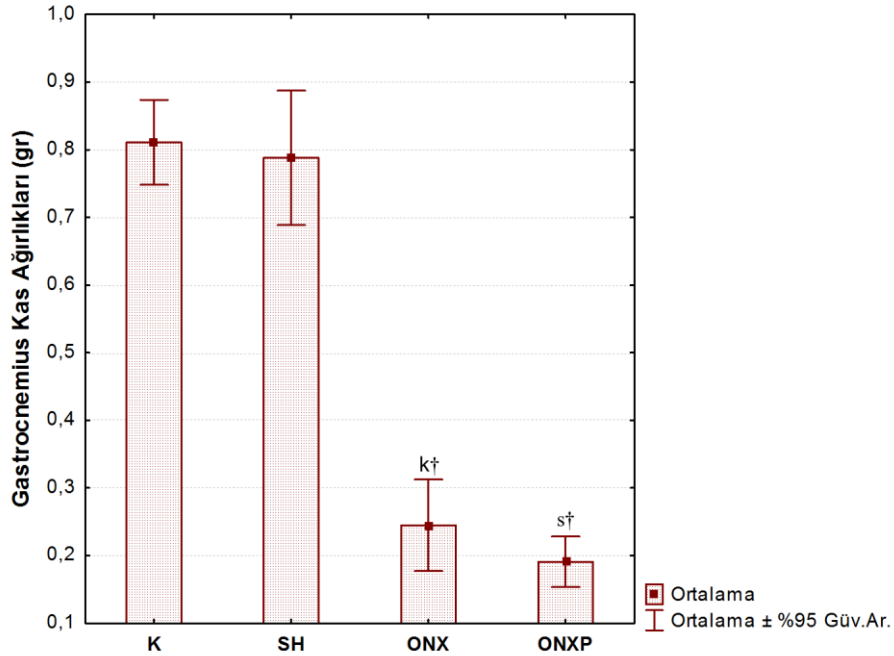
Çalışmada, gastrocnemius kas ağırlıkları sNX'e ait cerrahi başarının kontrolünde kullanılmış, K, SH, ONX ve ONXP gruplarına ait ortalamalar karşılaştırılmıştır. İzole edilen sol gastrocnemius kasları hassas terazi ile tartılmış ve sonuçlar g cinsinden ifade edilmiştir. Sıçanların gastrocnemius ağırlık ortalamaları çizelge 4.1'de ve ortalamalardaki değişimler şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX ve ONXP gruplarına ait gastrocnemius ağırlıklarının sırasıyla K ve SH gruplarına göre önemli derecede azaldığı ve bu azalışların da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P < 0,001$).

Çizelge 4.1. Grupların gastrocnemius kas ağırlığı ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri

Gruplar	N	Gastrocnemius Kas Ağırlıkları (gr)
K	8	0,8108 \pm 0,088
SH	8	0,7880 \pm 0,139
ONX	8	0,2447 \pm 0,101 ^{k†}
ONXP	11	0,1907 \pm 0,056 ^{s†}

^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma. [†] $P < 0,001$.
Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.



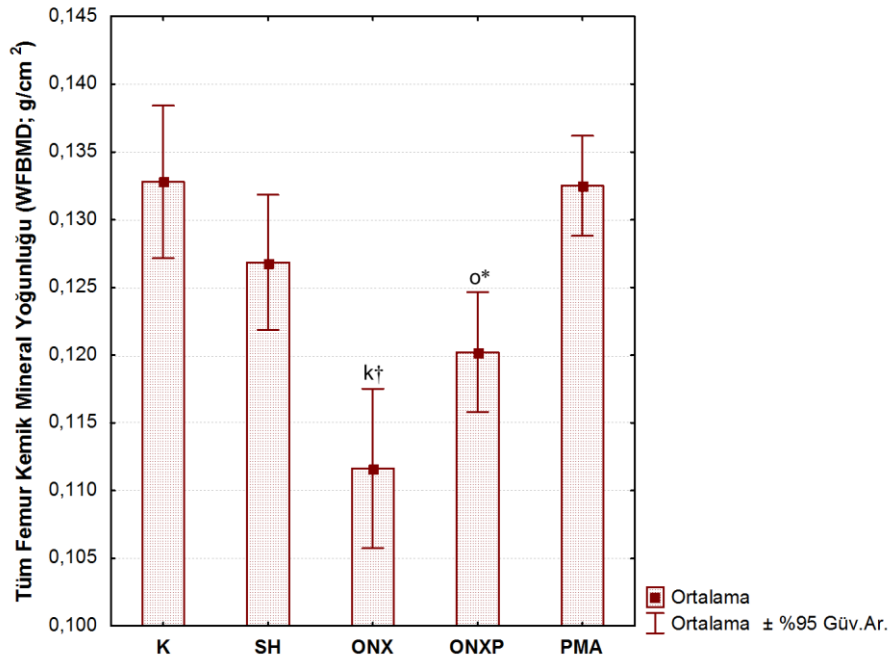
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11). ^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma. [†] $P < 0,001$.

Şekil 4.2. Grupların gastrocnemius kas ağırlığı ortalamaları \pm SD değerleri

4.2. Kemik Mineral Yoğunluğu Bulguları

Çalışmada sıçanların sol femur kemiklerine ait tüm (WF), diyafizial (DF) ve kırılma hattı (BP) BMD'leri ölçülerek, sonuçlar g/cm^2 olarak verilmiştir. Femur kemiklerine ait BMD ortalamaları çizelge 4.2'de ve grupların ölçülen bölgelere ait BMD ortalamalarında gözlenen değişimler şekil 4.3, 4.4 ve 4.5'te gösterilmiştir.

ONX grubuna ait WFBMD, DFBMD ve BPBMD ortalamalarının K grubuna göre önemli derecede azaldığı saptanmıştır ($P<0,001$). PMA ve ONXP gruplarına ait WFBMD, DFBMD ve BPBMD ortalamalarının SH grubu ile benzer değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, ONXP grubuna ait WFBMD ve DFBMD ortalamalarının ONX'e göre anlamlı derecede arttığı saptanırken ($P<0,05$), BPBMD'de gözlenen artış anlamlı bulunmamıştır.



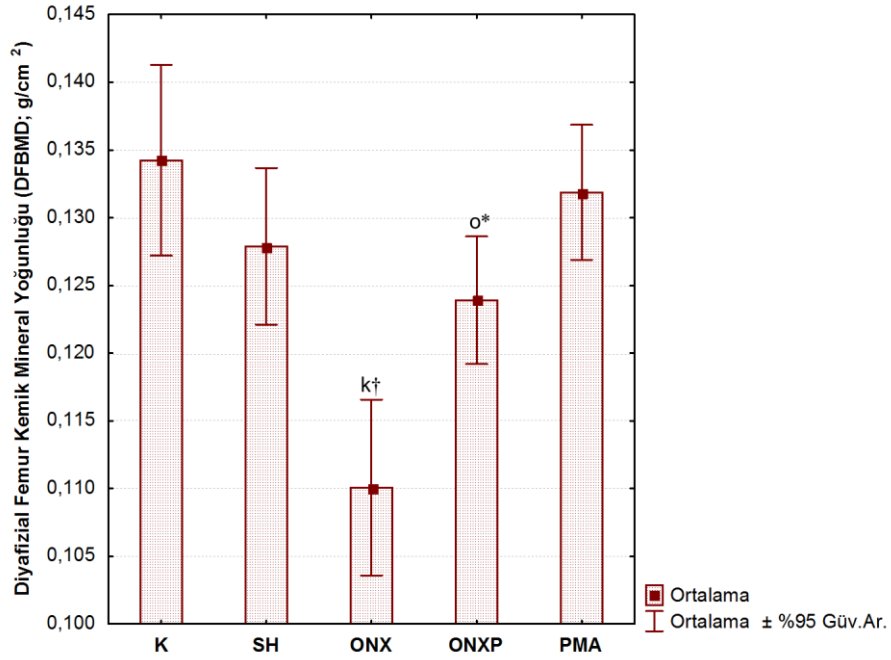
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma, ^o ONX grubu ile karşılaştırma. * $P<0,05$, † $P<0,001$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.3. Grupların tüm femur kemik mineral yoğunluğu ortalamaları ± SD değerleri

Çizelge 4.2. Grupların ölçülen bölgelere göre kemik mineral yoğunluğu ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri

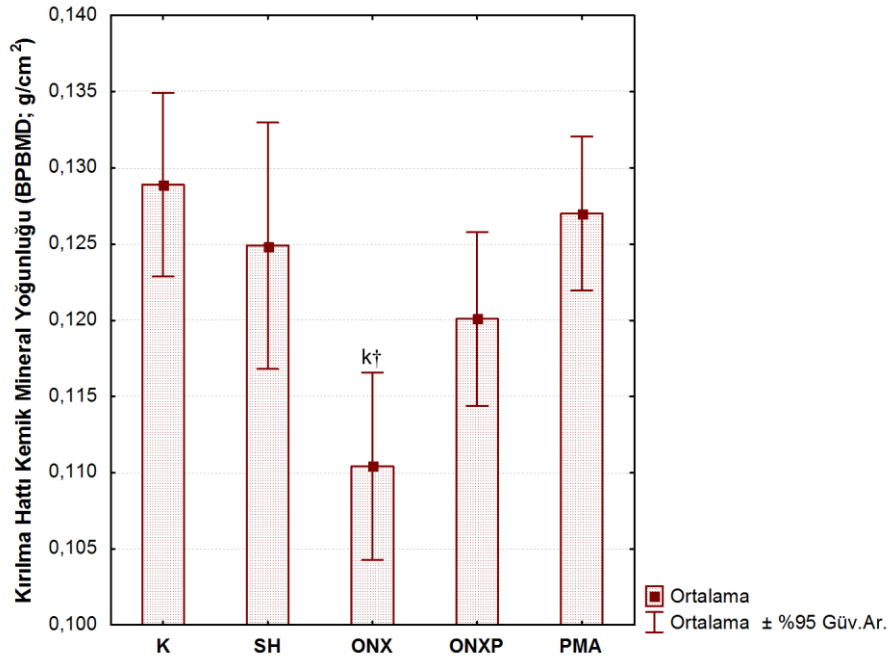
	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=8)	ONXP (N=11)	PMA (N=12)
BMD Parametreleri (g/cm²)					
WFBMD	0,1328 \pm 0,007	0,1269 \pm 0,006	0,1116 \pm 0,007 ^{k†}	0,1202 \pm 0,007 ^{o*}	0,1325 \pm 0,006
DFBMD	0,1342 \pm 0,008	0,1279 \pm 0,007	0,1109 \pm 0,008 ^{k†}	0,1239 \pm 0,007 ^{o*}	0,1319 \pm 0,008
BPBMD	0,1289 \pm 0,007	0,1249 \pm 0,010	0,1104 \pm 0,007 ^{k†}	0,1201 \pm 0,009	0,1270 \pm 0,008

WFBMD: Tüm femur kemik mineral yoğunluğu, DFBMD: Diyafizial femur kemik mineral yoğunluğu, BPBMD: Kırılma hattı boyunca kemik mineral yoğunluğu. ^k K grubu ile karşılaştırma, ^o ONX grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$, † $P < 0,001$. Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma, ^o ONX grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$, † $P < 0,001$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.4. Grupların diyafizial femur kemik mineral yoğunluğu ortalamaları ± SD değerleri



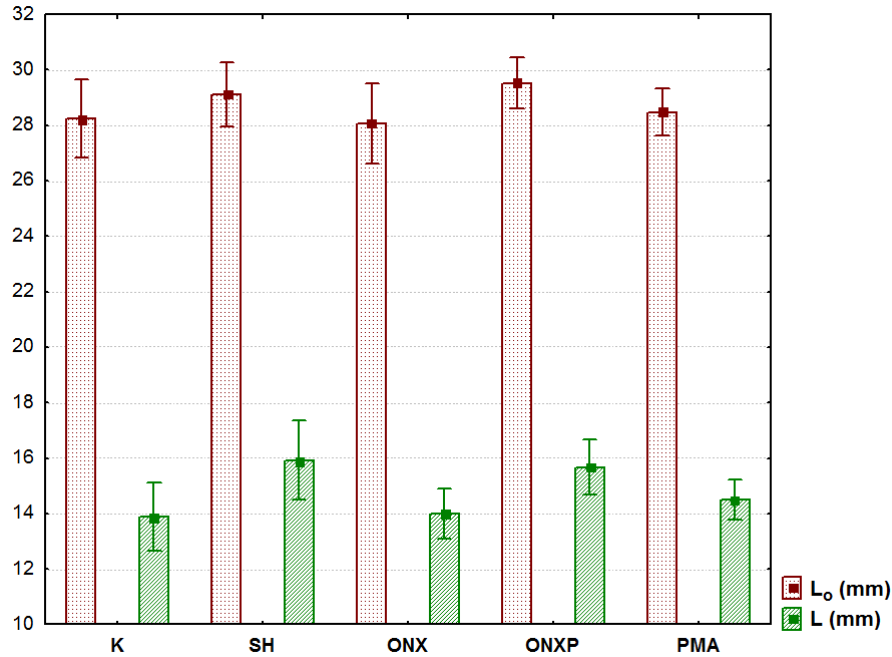
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma. † $P < 0,001$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.5. Grupların kırılma hattı boyunca kemik mineral yoğunluğu ortalamaları ± SD değerleri

4.3. Geometrik Bulgular

Çalışmada sıçanların sol femur kemiklerine ait femur uzunluğu (L_o ; mm), L (mm), ML ve AP doğrultusundaki PER ve END çapları (mm) ile CSA (mm^2) geometrik parametreler olarak değerlendirilmiştir. Femur kemiklerine ait geometrik parametrelerin ortalamaları çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Ayrıca grupların L_o , L, CSA, PER_{ML} , PER_{AP} , END_{ML} ve END_{AP} ortalamalarında gözlenen değişimler şekil 4.6–4.9'da verilmiştir.

ONX ait PER_{ML} ortalamalarında gözlenen azalış K grubuna göre anlamlı bulunurken ($P<0,05$), diğer parametrelere ait ortalamaların benzer değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, ONXP grubuna ait END_{ML} ortalamasının ONX grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanırken ($P<0,01$), diğer parametrelere ait arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. ONXP ve PMA gruplarına ait L_o , L, CSA, PER_{ML} , PER_{AP} , END_{ML} ve END_{AP} ortalamalarının SH ile benzer olduğu saptanmıştır.



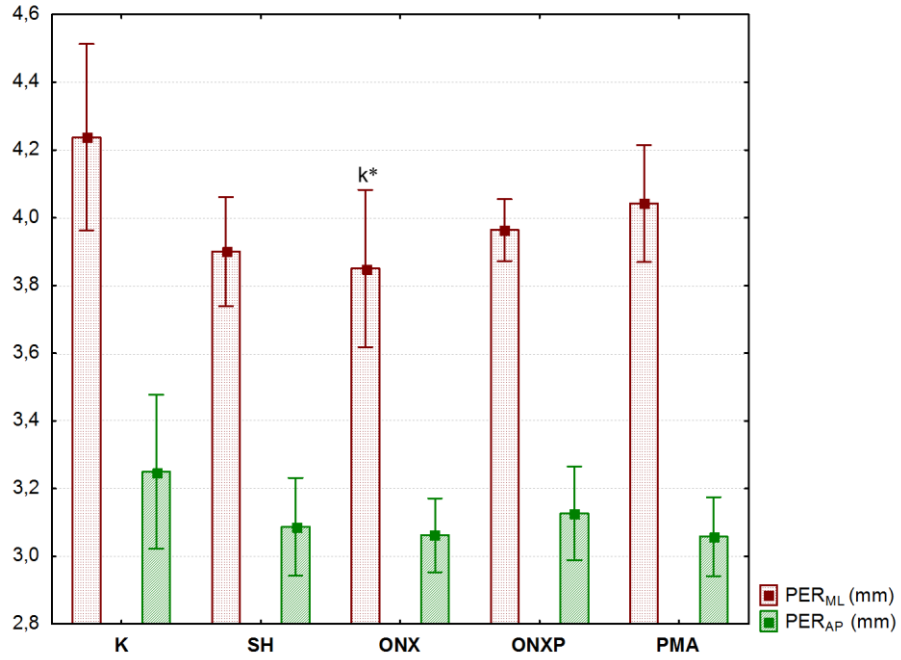
L_o : Femur uzunluğu, L: Mesnet noktaları arasındaki mesafe. K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.6. Grupların femur uzunluğu ve mesnet noktaları arasındaki mesafe ortalamaları \pm SD değerleri

Çizelge 4.3. Grupların geometrik parametrelere ait ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri

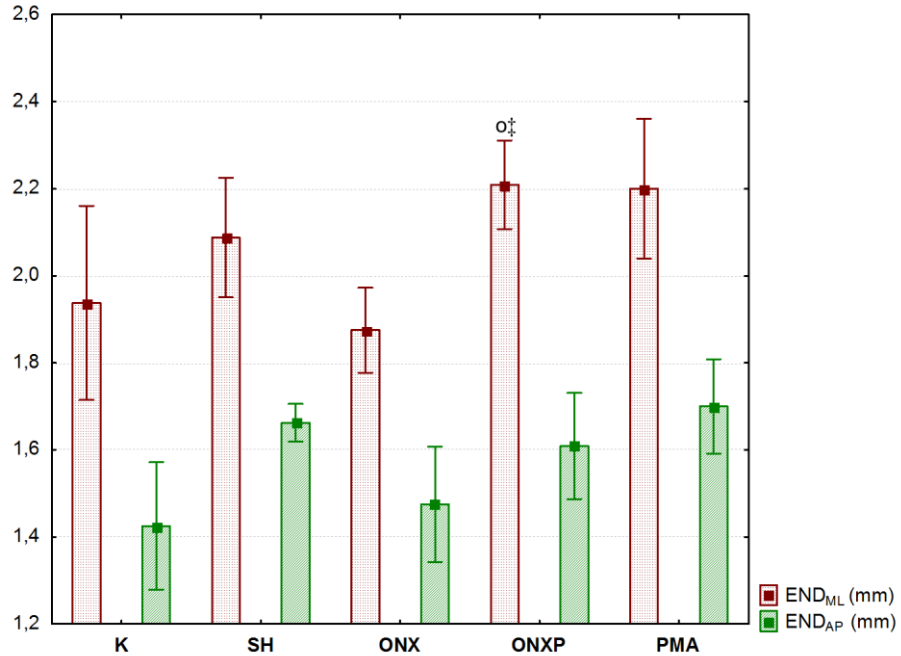
	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=8)	ONXP (N=11)	PMA (N=12)
Geometrik Parametreleri					
L _o (mm)	28,25 \pm 1,69	29,12 \pm 1,39	28,06 \pm 1,72	29,52 \pm 1,37	28,48 \pm 1,32
L (mm)	13,90 \pm 1,47	15,92 \pm 1,71	14,01 \pm 1,08	15,68 \pm 1,48	14,51 \pm 1,15
PER _{ML} (mm)	4,24 \pm 0,33	3,90 \pm 0,19	3,85 \pm 0,28 ^{k*}	3,96 \pm 0,14	4,04 \pm 0,27
PER _{AP} (mm)	3,25 \pm 0,27	3,09 \pm 0,17	3,06 \pm 0,13	3,13 \pm 0,21	3,06 \pm 0,18
END _{ML} (mm)	1,94 \pm 0,27	2,09 \pm 0,16	1,88 \pm 0,12	2,21 \pm 0,15 ^{o‡}	2,20 \pm 0,25
END _{AP} (mm)	1,43 \pm 0,18	1,66 \pm 0,05	1,48 \pm 0,16	1,61 \pm 0,18	1,70 \pm 0,17
CSA (mm ²)	10,88 \pm 0,83	9,75 \pm 1,16	9,50 \pm 1,07	9,55 \pm 1,04	10,17 \pm 0,84

L_o: Femur uzunluğu, L: Mesnet noktaları arasındaki mesafe, PER_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki periosteal çap, END_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki endosteal çap, PER_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki periosteal çap, END_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki endosteal çap, CSA: Kortikal kesit alan. ^k K grubu ile karşılaştırma, ^o ONX grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$, ‡ $P < 0,01$. Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.



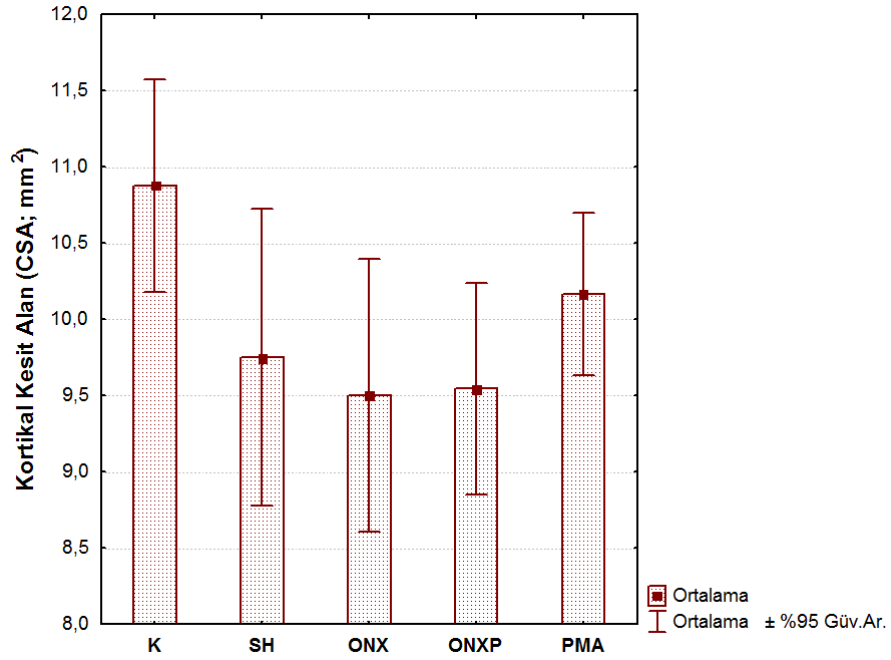
PER_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki periosteal çap, PER_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki periosteal çap. K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.7. Grupların periosteal çap ortalamaları \pm SD değerleri



END_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki endosteal çap, END_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki endosteal çap K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^o ONX grubu ile karşılaştırma. ‡ $P < 0,01$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.8. Grupların endosteal çap ortalamaları \pm SD değerleri



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.9. Grupların kortikal kesit alan ortalamaları ± SD değerleri

4.4. Kemik Biyomekaniği Bulguları

Çalışmada sıçanların sol femur kemikleri biyomekanik ölçüm ve analizler için kullanılmıştır. Biyomekanik analizlerde kemiğin yapısal karakterini yansıtan; maksimum kırılma kuvveti, maksimum deformasyon, sertlik ve depolanan enerji değerleri yük-deformasyon eğrisinden direkt olarak ölçülürken, materyal özelliklerini yansıtan; maksimum eğme dayanımı, maksimum strain, esneklik katsayısı ve dayanıklılık değerleri denklem 3.1’de verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır. Benzer bir hesaplama femur kemiklerine ait AP ve ML doğrultusundaki atalet momentleri için de uygulanmıştır (Denklem 3.2). Biyomekanik parametrelere ait ortalamalar çizelge 4.4’te ve biyomekanik parametrelerde gözlenen değişimler şekil 4.10–4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Grupların kemik biyomekaniği parametrelerine ait ortalamalar \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri

	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=8)	ONXP (N=11)	PMA (N=12)
Kemik Biyomekaniği Parametreleri					
F _U (N)	60,85 \pm 6,72	54,49 \pm 7,78	47,65 \pm 6,47 ^{k*}	54,02 \pm 7,51	59,95 \pm 8,70
d _U (mm)	0,0978 \pm 0,014	0,1221 \pm 0,021	0,0806 \pm 0,013	0,1030 \pm 0,010 ^{s*,o*}	0,1103 \pm 0,014
S (N/mm)	669,60 \pm 109,73	499,57 \pm 75,30	599,72 \pm 62,70	564,97 \pm 97,77	582,22 \pm 86,68
U (mJ)	28,34 \pm 6,89	28,95 \pm 8,25	17,19 \pm 4,77 ^{k‡}	24,58 \pm 5,08	30,37 \pm 6,47
I _{AP} (mm ⁴)	7,03 \pm 2,07	5,23 \pm 1,09	5,11 \pm 1,09 ^{k*}	5,55 \pm 1,12	5,22 \pm 1,25
I _{ML} (mm ⁴)	11,86 \pm 3,28	8,33 \pm 1,62	8,23 \pm 2,36 ^{k*}	8,72 \pm 1,09	9,18 \pm 2,29
σ_U (MPa)	67,08 \pm 17,37	83,58 \pm 21,63	65,40 \pm 18,95	78,31 \pm 20,58	85,11 \pm 7,57
ϵ_U (mm/mm)	0,1059 \pm 0,019	0,1876 \pm 0,050	0,1111 \pm 0,036	0,1484 \pm 0,031	0,1578 \pm 0,021
E (GPa)	5,61 \pm 1,63	8,19 \pm 2,03	7,12 \pm 2,50	8,40 \pm 2,17	7,29 \pm 1,57
u (MPa)	4,18 \pm 1,60	4,22 \pm 1,83	2,74 \pm 0,86	3,59 \pm 1,49	4,98 \pm 1,00

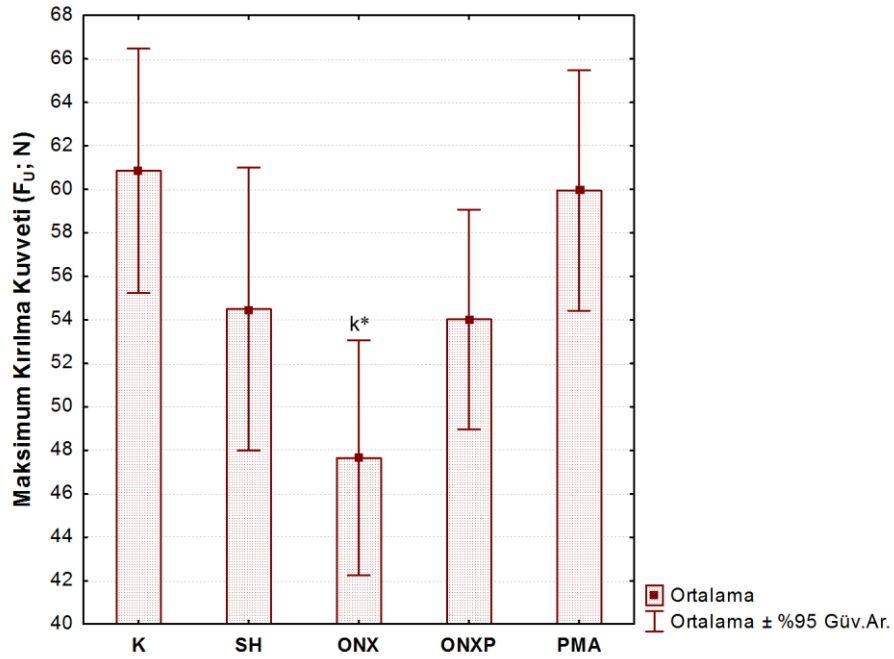
F_U: Maksimum kırılma kuvveti, d_U: Maksimum deformasyon, S: Sertlik, U: Depolanan enerji, I_{AP}: Anterior-posterior doğrultudaki atalet momenti, I_{ML}: Medio-lateral doğrultudaki atalet momenti, σ_U : Maksimum eğme dayanımı, ϵ_U : Maksimum strain, E: Esneklik katsayısı, u: Dayanıklılık. ^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma, ^o ONX grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$, ‡ $P < 0,01$, † $P < 0,001$. Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

- A) Maksimum Kırılma Kuvveti (F_U ; N): Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX grubu F_U ortalamalarında gözlenen azalış K grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). ONXP gruplarına ait F_U ortalamasının ONX'e göre arttığı; ancak bu artışın anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, ONXP ve PMA gruplarına ait F_U ortalamalarının SH ile benzer değere sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.10).
- B) Maksimum Deformasyon (d_U ; mm): K ve ONX gruplarına ait d_U ortalamaları karşılaştırıldığında, ONX grubunda gözlenen azalış anlamlı bulunmamıştır. ONXP gruplarına ait d_U ortalamasında gözlenen artışın ONX'e göre anlamlı bulunurken ($P<0,05$), ONX'e göre ONXP'de gözlenen artış SH grubuna göre yetersiz kalmıştır ($P<0,05$). SH ve PMA grupların ait ortalamaların birbirleriyle benzer oldukları saptanmıştır (Şekil 4.11).
- C) Sertlik (S ; N/mm): S ortalamaları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.12).
- D) Depolanan Enerji (U ; mJ): Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX grubuna ait U ortalamasında gözlenen azalış K grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,01$). Bununla birlikte, ONXP grubuna ait U ortalamasının ONX'e göre arttığı; ancak bu artışın anlamlı olmadığı saptanmıştır. ONXP ve PMA gruplarına ait U ortalamalarının SH grubuyla benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.13).
- E) Kesitsel Atalet Momentleri (I_{AP} , I_{ML} ; mm⁴): ONX grubuna ait I_{AP} ve I_{ML} ortalamalarında gözlenen azalış K grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). ONXP grubuna ait I_{AP} ve I_{ML} ortalamalarının ONX ve SH gruplarıyla benzer değerlere sahip olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, PMA ve SH grupları arasında da anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (Şekil 4.14).
- F) Maksimum Eğme Dayanımı (σ_U ; MPa): Yapılan istatistiksel analizlerde K ve ONX grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ONXP grubuna ait σ_U ortalamasının ONX grubuna göre arttığı; ancak bu artışın anlamlı olmadığı saptanmıştır. SH, ONXP ve PMA grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda gruplarının benzer ortalamalara sahip oldukları saptanmıştır (Şekil 4.15).
- G) Maksimum Strain (ϵ_U ; mm/mm): SH, ONXP ve PMA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte ONXP grubuna ait ϵ_U ortalaması ONX grubuna göre arttığı; ancak bu artışın anlamlı olmadığı gözlenmiştir.

K ve ONX grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.16).

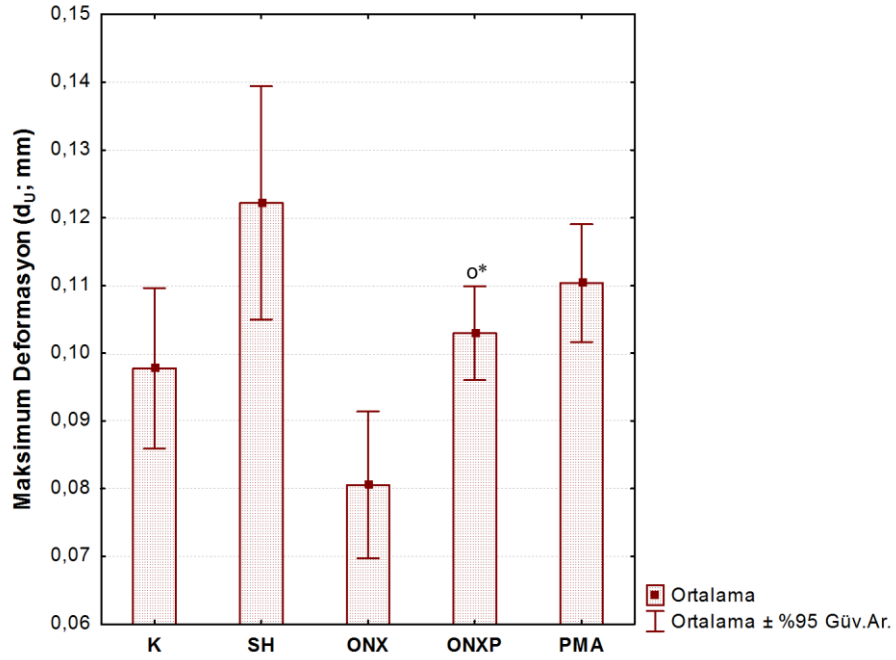
H) Esneklik Katsayısı (E; GPa): Grupların E ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.17).

İ) Dayanıklılık (u ; MPa): Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX grubuna ait u ortalamasının K grubuna göre azaldığı; ancak bu azalışın anlamlı olmadığı saptanmıştır. ONXP grubuna ait ortalamasının ONX'e göre arttığı saptanmıştır ($P>0,05$). Bununla birlikte SH, ONXP ve PMA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir (Şekil 4.18).



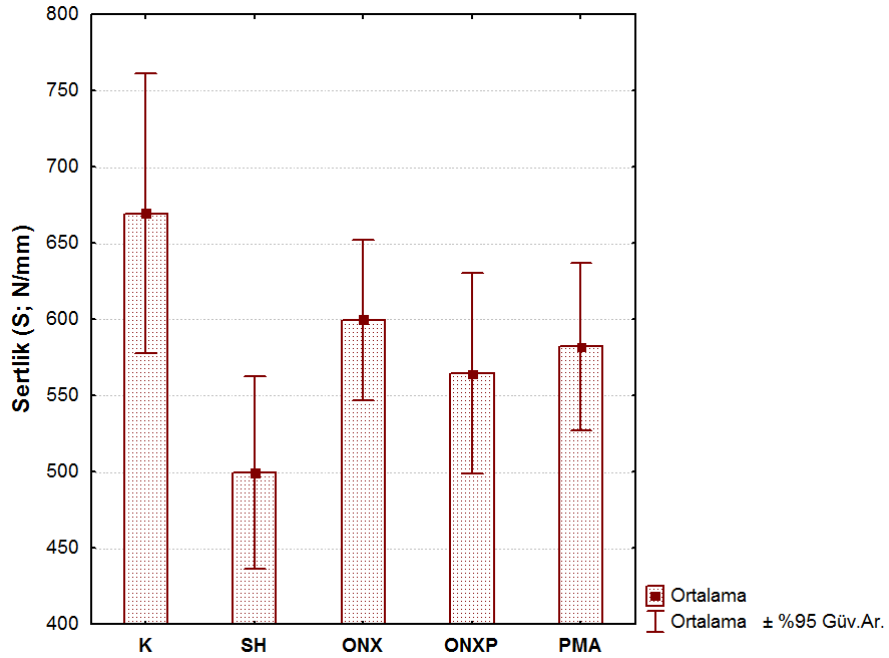
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma. * $P<0,05$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.10. Grupların maksimum kırılma kuvveti ortalamaları ± SD değerleri



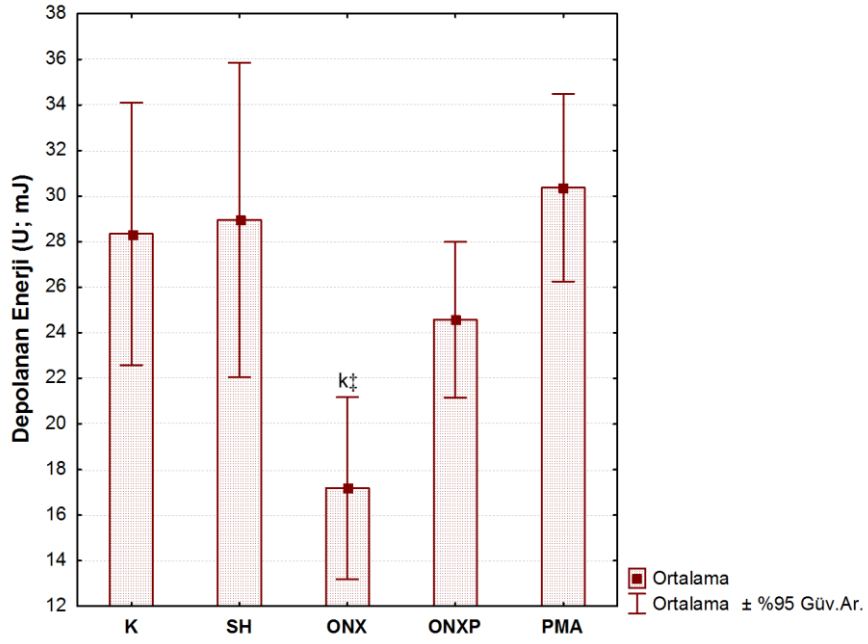
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ° ONX grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.11. Grupların maksimum deformasyon ortalamaları ± SD değerleri



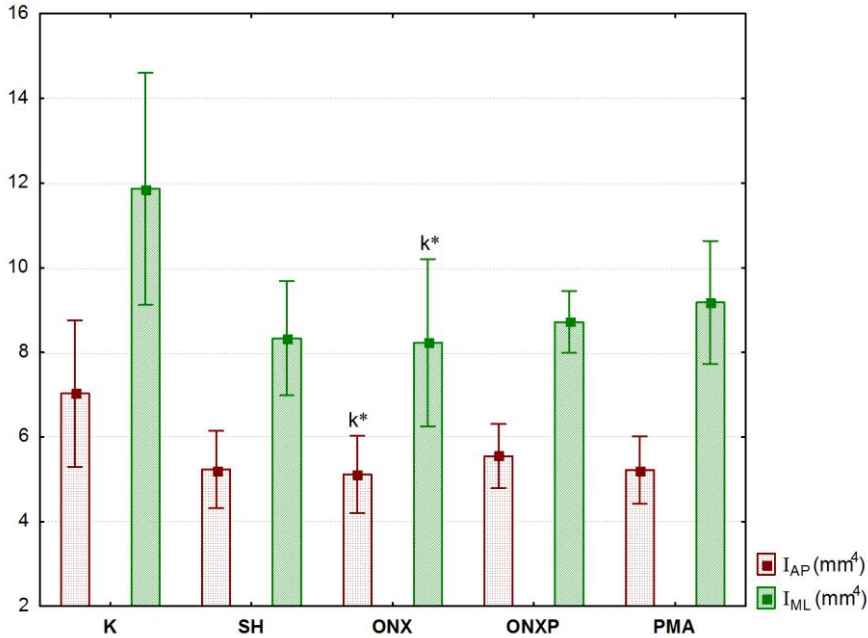
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.12. Grupların sertlik ortalamaları ± SD değerleri



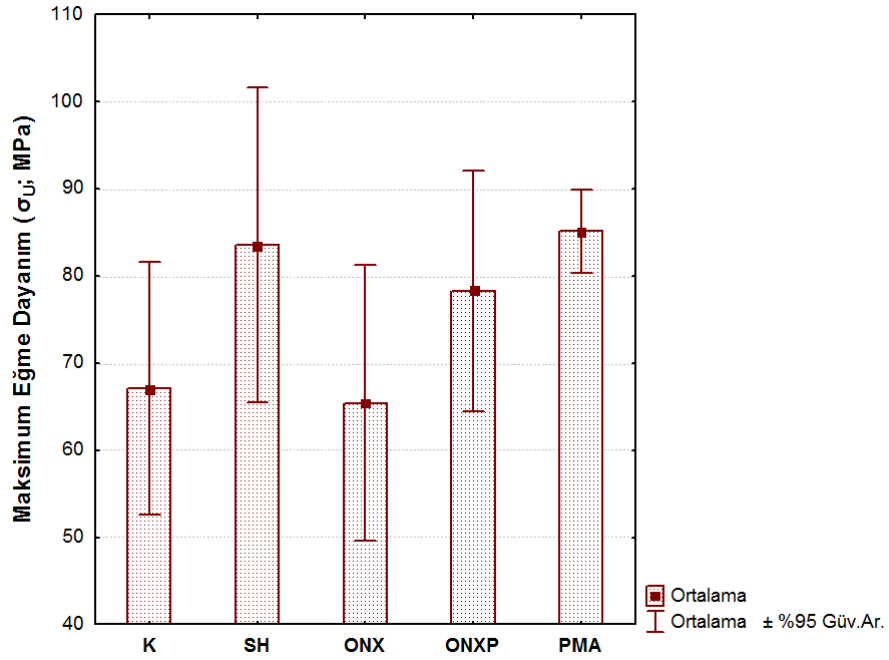
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma. ‡ $P<0,01$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.13. Grupların depolanan enerji ortalamaları ± SD değerleri



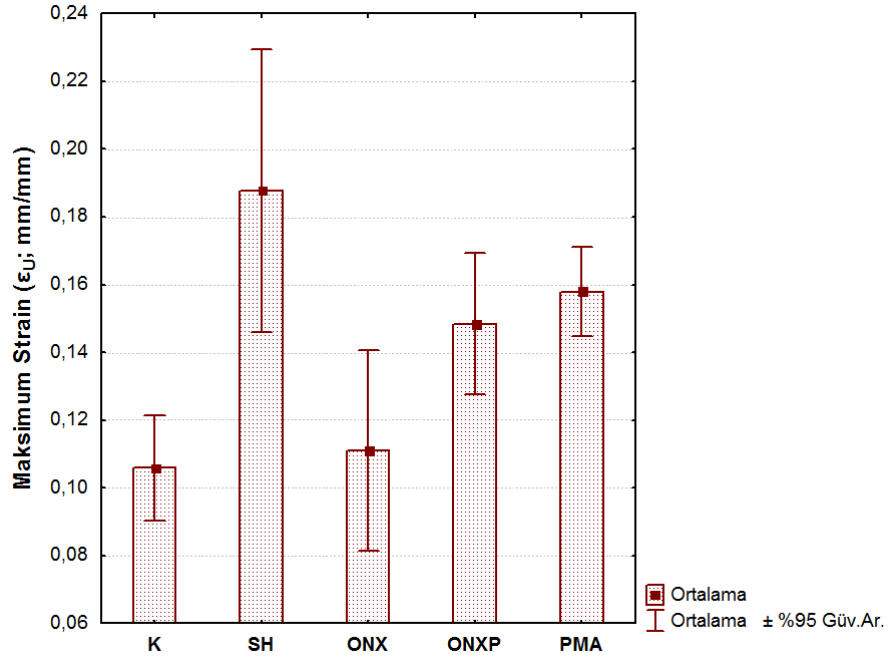
I_{AP} : Anterior-posterior doğrultudaki atalet momenti, I_{ML} : Medio-lateral doğrultudaki atalet momenti. K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma. * $P<0,05$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.14. Grupların I_{AP} ve I_{ML} ortalamaları ± SD değerleri



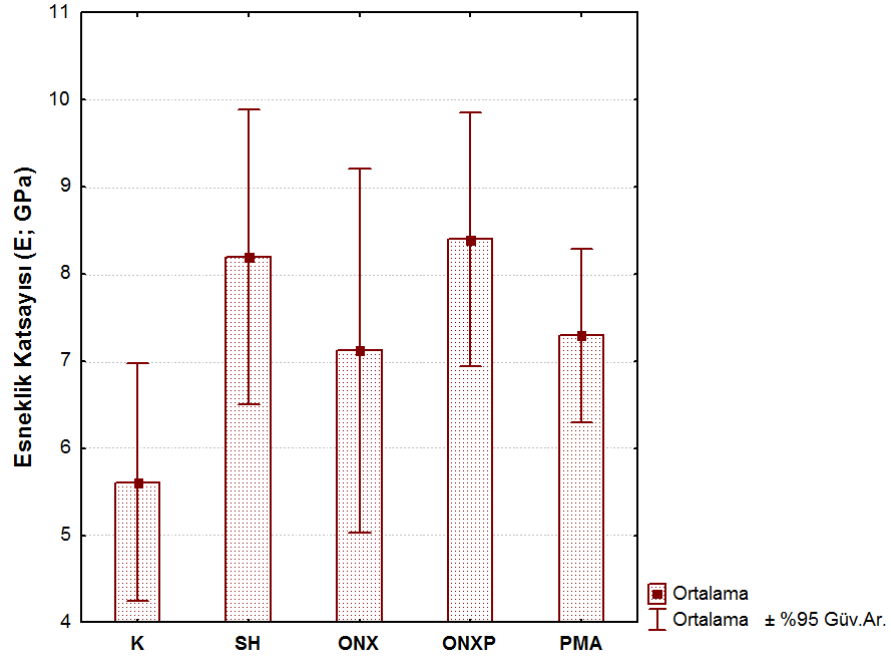
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.15. Grupların maksimum dayanım ortalamaları ± SD değerleri



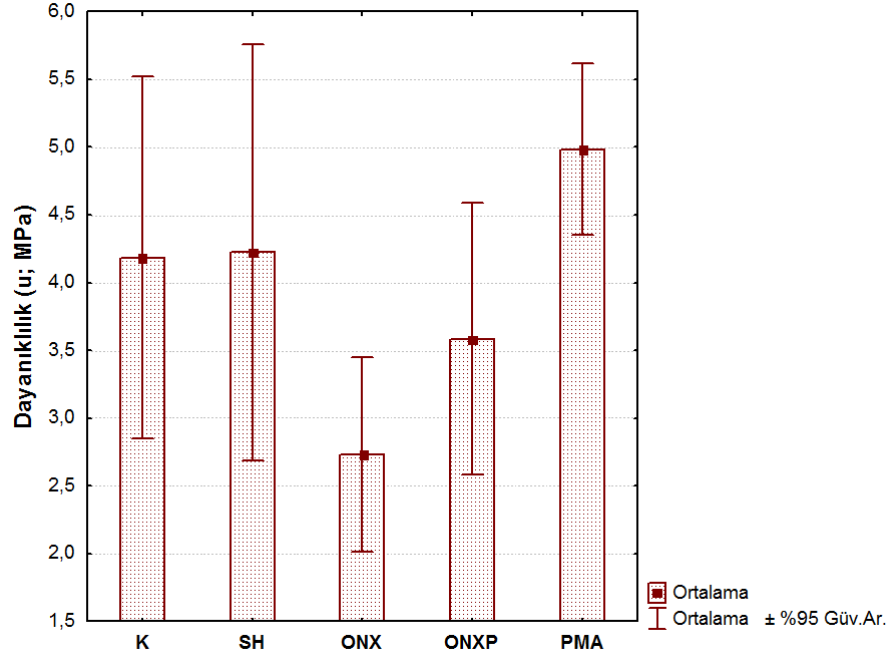
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.16. Grupların maksimum strain ortalamaları ± SD değerleri



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.17. Grupların esneklik katsayısı ortalamaları \pm SD değerleri



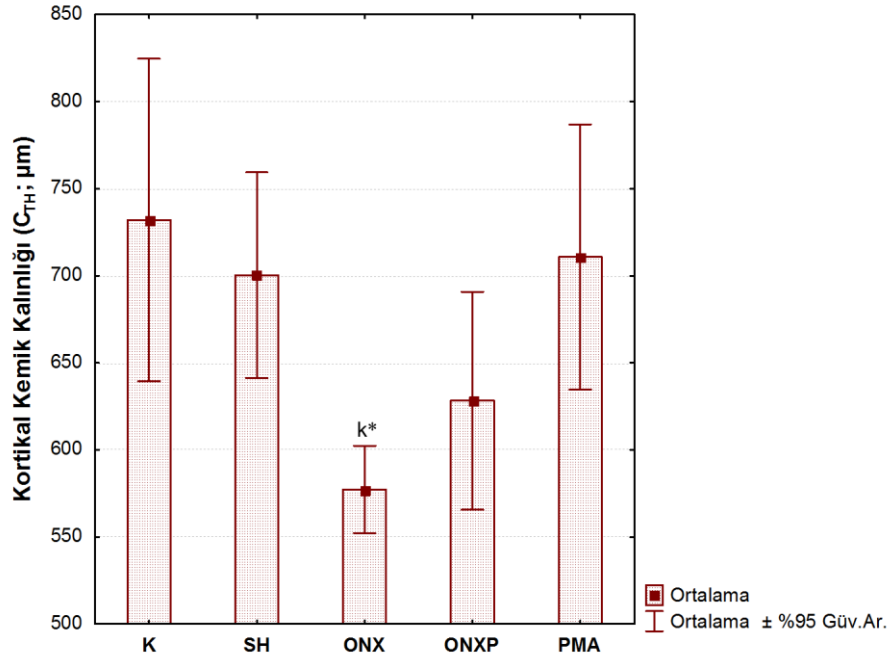
K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12).

Şekil 4.18. Grupların dayanıklılık ortalamaları \pm SD değerleri

4.5. Histolojik Bulgular

Çalışmada, sıçanlardan izole edilen sağ femur kemikleri histolojik ölçüm ve analizlerde kullanılmıştır. Femur kemiklerine ait C_{TH} ortalamaları çizelge 4.5'te, ortalamalarda gözlenen değişimler şekil 4.19'da gösterilmiştir. Femur kemiklerine ait kortikal kemik kalınlığı (C_{TH} ; μm) her örnekten (Şekil 4.20) aralarında 100 μm bulunan 10 kesit alınarak 4 kadranda ölçülmüş ve sonuçlar elde edilen ölçümlerin ortalaması olarak verilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX grubuna ait C_{TH} ortalamalarında gözlenen azalış K gruplarına göre anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). ONXP grubu C_{TH} ortalamasının ONX'e göre arttığı; ancak bu artışın anlamlı olmadığı gözlenmiştir. SH, ONXP ve PMA grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=5), ONXP (N=9), PMA (N=11). ^k K grubu ile karşılaştırma. * $P<0,05$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.19. Grupların kortikal kemik kalınlığı ortalamaları \pm SD değerleri

Çizelge 4.5. Grupların kortikal kemik kalınlığı ortalamaları \pm SD ve anlamlılık düzeyleri

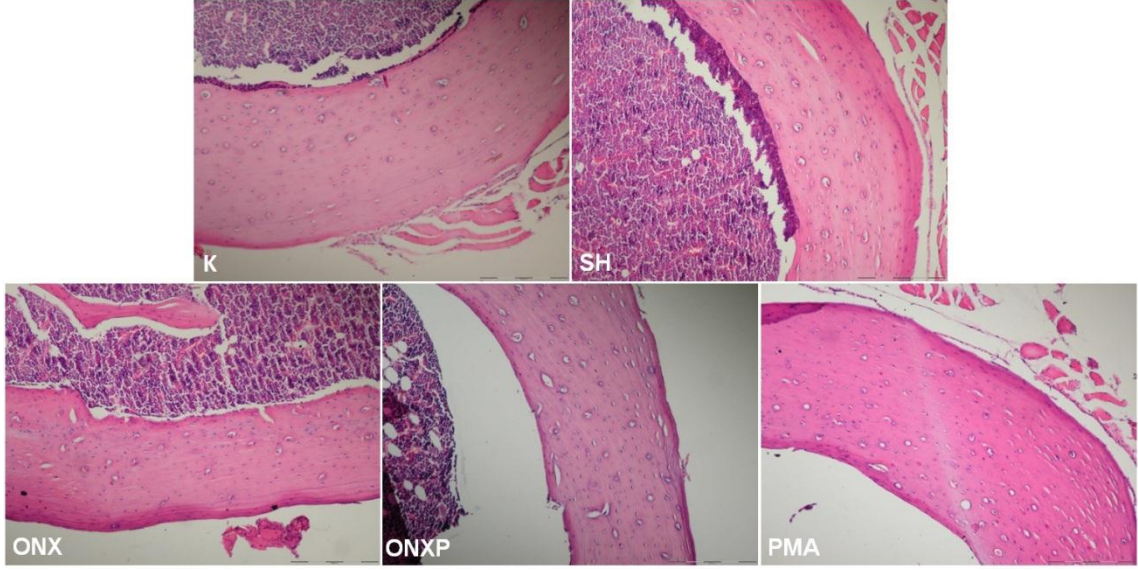
	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=5)	ONXP (N=9)	PMA (N=11)
C _{TH} (μ m)	732,05 \pm 110,76	700,26 \pm 70,65	577,29 \pm 30,03 ^{k*}	628,20 \pm 81,37	710,78 \pm 113,33

C_{TH}: Kortikal kemik kalınlığı. ^k K grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$. Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Çizelge 4.6. Grupların serum osteokalsin ve β -crosslaps ortalamaları \pm SD değerleri ve anlamlılık düzeyleri

	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=8)	ONXP (N=11)	PMA (N=12)
sOCN (ng/ml)	8,27 \pm 1,58	7,54 \pm 0,97	10,88 \pm 1,63 ^{k*}	11,43 \pm 1,66 ^{s†}	9,60 \pm 1,72
s β -CTX (pg/ml)	158,35 \pm 78,07	137,32 \pm 70,01	270,69 \pm 55,80 ^{k*}	178,17 \pm 84,26	163,01 \pm 77,32

sOCN: Serum osteokalsin, s β -CTX: Serum β -crosslaps. ^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$, [†] $P < 0,001$. Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

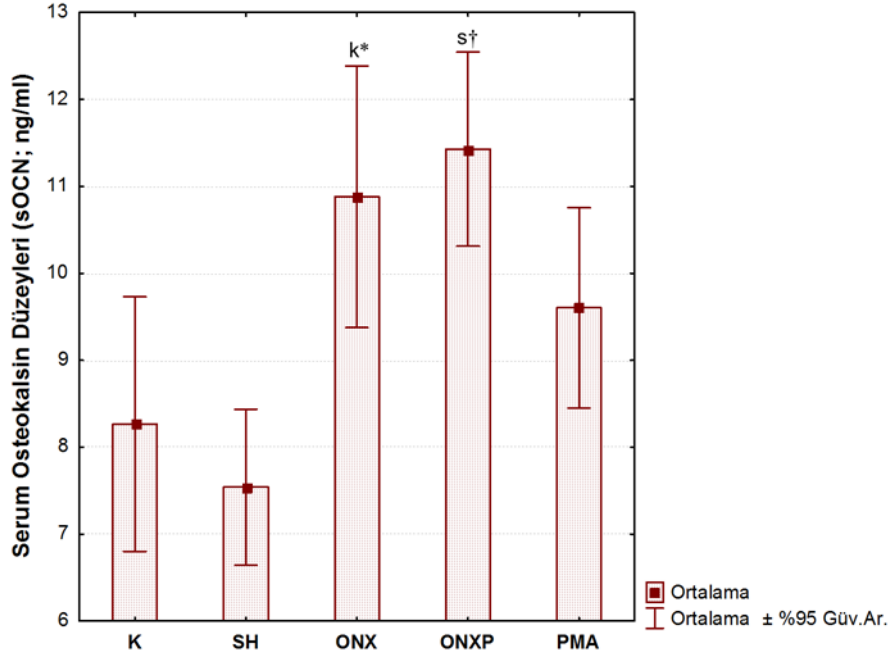


Şekil 4.20. Femur kemiklerinin kortikal kemik kalınlıklarının belirlenmesinde kullanılan kesit örnekleri x 120 büyütme

4.6. Biyokimyasal Bulgular

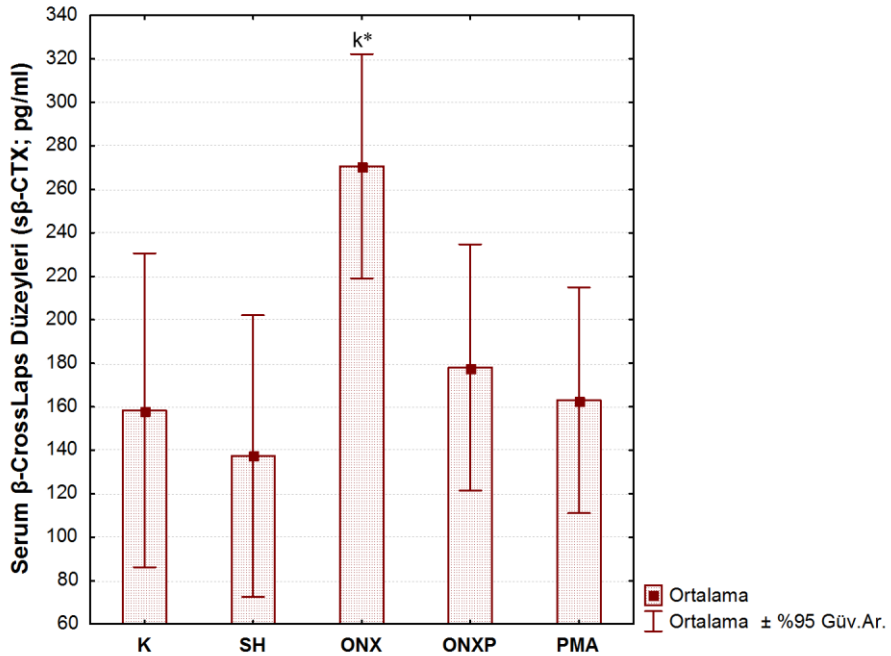
Sıçanlardan eksanguinasyon yöntemi ile alınan kan örnekleri, sOCN ve β -CTX düzeylerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Çalışma kapsamında ölçülen sOCN (ng/ml) ve β -CTX (pg/ml) düzeylerine ait ortalamalar çizelge 4.6’da ve sOCN ve β -CTX düzeylerinde gözlenen değişimler sırasıyla şekil 4.21 ve 4.22’de gösterilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX grubuna ait sOCN ve β -CTX düzeylerinde gözlenen artışlar K grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$). Ayrıca, ONXP ve ONX gruplarına ait sOCN ortalamalarının benzer olduğu gözlenirken, ONXP grubuna ait β -CTX ortalamasının ONX’e göre azaldığı; ancak bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. ONXP grubuna ait sOCN ortalamasının SH grubuna göre anlamlı derecede arttığı saptanırken ($P<0.05$), β -CTX düzeylerinin benzer olduğu gözlenmiştir. SH ve PMA grupları arasında yapılan karşılaştırmada sOCN ve β -CTX düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$, † $P < 0,001$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.21. Grupların serum osteokalsin ortalamaları ± SD değerleri



K (N=8), SH (N=8), ONX (N=8), ONXP (N=11), PMA (N=12). ^k K grubu ile karşılaştırma. * $P < 0,05$. Şekilde yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

Şekil 4.22. Grupların serum β-crosslaps ortalamaları ± SD değerleri

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sağlıklı ve deneysel OP modeli oluşturulmuş sıçanlarda 15 Hz, 0,3 ms puls süreli, 1 mT şiddetindeki PMA'ya, 182 gün (26 hafta), günde 2 saat maruziyetin kemik doku üzerindeki etkileri biyomekanik, biyokimyasal, dansitometrik ve histolojik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada, sıçanlarda kemik kaybının oluşup oluşmadığı K ve ONX grupları karşılaştırılarak, PMA'nın kemik kaybı üzerindeki protektif etkileri SH, ONX ve ONXP grupları, sağlıklı sıçanlar üzerindeki etkileri ise SH ve PMA grupları karşılaştırılarak belirlenmiştir.

Sıçanlarda deneysel OP (kemik kaybı) modeli oluşturmak amacıyla, en çok tercih edilen yöntem OVX yöntemidir. Yöntem kabaca, overlerin bilateral izolasyonu olarak tanımlanabilir. Over izolasyonu, kemik metabolizmasında (kemik yapım-yıkım) regülatör olarak görev alan östrojen üretimini önemli ölçüde azaltır ve postmenopozal OP oluşmasına neden olur. Sıçanlarda OVX yöntemi ile östrojen eksikliği oluşturularak, insanlarda gözlenen postmenopozal kemik kaybı taklit edilebilir (22,125,126,142). OVX sonrası kemiğin kütlesi ve biyomekanik özelliklerinde beklenen en erken anlamlı değişim süresi, kemiğin anatomik konumu ve histolojik yapısına bağlı olarak değişir. Lomber vertebralara ait trabeküler kemikte bu süre yaklaşık 3 ay (90 gün) iken, femoral diyafize ait kortikal kemikte 9 ay (270 gün) kadardır. OVX-nedenli kemik kaybı, trabeküler kemikte nispeten hızlı ve efektif olmasına karşın, kortikal kemikte oldukça yavaştır (125,127). Tibia ve femur gibi uzun kemiklerde dansitometrik yöntemlerle saptanan kemik kaybının, mekanik davranışlara yansımadağı gözlenmiştir (109). Bu nedenle, bu çalışmada OVX yöntemi ile kullanılacak ve bu yöntemle kemik kaybının etkinliğini ve hızını artırabilecek ek yöntem gereksinim duyulmuştur. Yapılan literatür taramasında, OVX yöntemine ilaveten sNX (siyatik sinir nörektomi) veya kalkaneal tenotomi yöntemlerinden herhangi birinin kullanılması ile trabeküler ve kortikal kemikte oluşan kemik kaybının çok daha hızlı ve etkin oluşturulabileceği rapor edilmiştir (125,143). Siyatik sinir (N. ischiadicus), vücudun en büyük ve en uzun siniridir. Bacak ve ayak kaslarının innervasyonunun yanında yine bu bölgelere ait duyuşal sinyallerin üst merkezlere iletiminden sorumludur. Tibial (N. tibialis), peroneal (N. peroneus communis) ve sural (N. suralis) olmak üzere üç dalı bulunur. sNX yönteminde siyatik sinirin bir bölümü kesilerek alınır, sinir fonksiyonel özelliğini

kaybeder, innerve ettiği kas grupları ile bağlantının kesilmesi, ilgili kaslarda atrofi gelişmesine neden olur. sNX nedeniyle, ayakta durma ve yürüme zorlaşır, bunun sonucunda kullanılmayan uzuvlarda kemik kaybı gelişir. Deri duyusunun büyük bir çoğunluğu sinirin tibial dalı üzerinden alındığı için duyuşal iletim de kesilerek plantar duyu kaybı gelişir (143–146). Sıçanlara, OVX ve sNX'in birlikte uygulanması (ONX) sonucu kemik kaybı hızının 2 kat artabileceği bildirilmiştir. ONX ile oluşturulan modellerde, femoral kortikal şaftta gözlenen kemik kaybının 84 günde %11 (yalnız OVX: %5; yalnız sNX: 0); 168 günde %28 (yalnız OVX: %10; yalnız sNX: %10) olduğu gösterilmiştir (125). Deneysel OP modeli oluşturmak amacıyla, birçok araştırmacı ONX yönteminde sNX'in cerrahi başarısının düşük olması nedeniyle OVX'i tercih etmektedir. Bu çalışmada, etkin ve hızlı kemik kaybı oluşturmak amacıyla sıçanlara ONX yöntemi uygulanmıştır. sNX'in cerrahi başarısı çalışma süresince ve sonunda mükümler atrofi (gastrocnemius kas ağırlıkları) ve plantar duyu kaybı (PWL süreleri) saptanarak kontrol edilmiştir.

PMA'nın kemik kaybı üzerindeki etkileri çeşitli deneysel çalışmalarla incelenmiş ve bu çalışmalarda farklı uygulama prosedürleri gözlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, özellikle hücreşel düzeyde gösterdiği başarılı sonuçlar nedeniyle, 15 Hz kemik ile ilişkili PMA uygulamalarında etkin frekans değeri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte uygulanan PMA'nın şiddeti, puls ve uygulama süresi de en az frekans kadar önemli faktörler olmasına rağmen, frekansta olduğu gibi bu faktörler için etkin bir değer söz konusu değildir. PMA uygulamaları ile ilişkilendirilen terapötik dozlar genellikle 3 mT'dan küçük alan şiddetlerini içermekle birlikte, yapılan çalışmalar 2 mT altında yoğunlaşmaktadır. Bu doğrultuda, 1 mT alan şiddetinin kemik doku üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, Uluslararası Non-iyonize Radyasyondan Korunma Komisyonu (ICNIRP) ve Amerikan Endüstri Hijyenistleri Derneği (ACGIH) işşel maruziyet için 1 mT alan şiddetini üst limit değeri olarak belirlemiştir. ACGIH bu limit değeri 2 saatle sınırlandırmaktadır. Avrupa Birliği (EU) 1 mT alan şiddetini insan sağlığı açısından güvenli üst sınır olarak tanımlamıştır (6,8,126,128–131,147–153). Bu nedenlerle, çalışmamızda PMA frekansı 15 Hz, alan şiddeti ise 1 mT olarak belirlenmiştir. Çalışmada, puls süresi (puls genişliği) ve PMA uygulama süresi yapılan literatür değerlendirmesi sonucunda sırasıyla 0,3 ms ve 2 saat olarak belirlenmiştir. Bu değerlendirmede son birkaç yıl dikkate alınmış ve

osteoblastik aktiviteyi arttırdığı ileri sürülen değerler ile çalışma kapsamında yer alan gruplardaki sıçan sayıları ve laboratuvar koşulları da göz önüne alınmıştır (6,8,128–131,147–153).

Sıçanlarda femur ve tibia gibi uzun kemiklerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntemler germe, sıkıştırma ve TPBT'dir. Germe, uzun kemiklere uygun ve uniaksial bir yöntemdir. Sıkıştırma ise vertebra gibi küçük kemiklere uygun, uniaksial (vertikal veya horizontal) ve doğruluğu germe testine göre daha düşük bir yöntemdir. Biyomekanik testlerde dokunun fizyolojik doğasına ve farklı bedensel hareketlerde uzun kemiklerin doğal yaşam sürecinde karşılaştığı yüklemeye en uygun yöntem olması nedeniyle, bu çalışmada TPBT yöntemi tercih edilmiştir (19,33,35).

Bu çalışmada, ONX ve ONXP gruplarında sNX'in cerrahi başarısı iki yöntemle değerlendirilmiştir. Bu yöntemlerden biri N. tibialis tarafından innerve edilen gastrocnemius kas ağırlığının ölçülmesidir. Bu gruplarda yer alan sıçanların sol bacaklarına ait gastrocnemius kasları izole edilerek, hassas terazide tartılmıştır. Yapılan istatistiksel analizlerde, gastrocnemius kas ağırlıklarının ONX (K: % 69,8) ve ONXP (SH: % 75,8) gruplarında önemli derecede azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.1; Şekil 4.2). Bu sonuçlara göre, ONX ve ONXP gruplarına ait sıçanlarda, sinirsel denervasyona bağlı olarak müsküler atrofinin geliştiği söylenebilir. Kuwamoto ve ark.'larının (136) yapmış olduğu bir çalışmada, nöral paralizin artrit ve OP üzerindeki etkileri araştırılmış ve deneysel kemik kaybı modeli oluşturmak amacıyla sNX yöntemi kullanılmıştır. Deney sonunda gastrocnemius kas ağırlıklarının kontrol grubuna göre önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (136). Bir başka çalışmada, sinir hasarı, ezme (crush injury), kısmi rezeksiyon ve tibial nörektomi yöntemleriyle oluşturulmuş ve uygulanan cerrahi protokolün başarısı gastrocnemius kas ağırlıkları ölçülerek değerlendirilmiş, benzer sonuçlara ulaşılmıştır (154). Sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumludur.

sNX yönteminin kontrol ve takibinde kullanılan ikinci yöntem, sıçanların pençe geri çekme cevaplarının ölçülmesidir. Bu yöntemin temel amacı, siyatik sinir rezeksiyonu sebebiyle sıçanlarda oluşan duyu kaybını belirlemek ve deney süresince bu standardın korunup korunmadığını saptamaktır. Yapılan istatistiksel analizlerde, ONX (K'ya göre) ve ONXP (SH'ya göre) gruplarına ait PWL ortalamalarındaki artış anlamlı bulunmuş, bu artışın sNX'i takiben başladığı ve çalışma süresince devam ettiği

saptanmıştır ($P<0,001$) (Şekil 4.1, EK-3). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, sNX uygulamasına tabi tutulan sıçanlarda, duyu kaybına bağlı olarak termoanestezinin (sıcak ve/veya soğuk gibi termal duyuların alınamayışı) geliştiği söylenebilir. Sıçanlarda müsküler atrofi ile birlikte termoanestezinin görülmesi, sNX'in cerrahi olarak başarıyla uygulandığı sonucuna varılmıştır. Bu yöntemde, siyatik sinire ait akson, miyelin tabakası ve konnektif doku bir bütün olarak kesilmiş ve sinir gövdesinin bütününde hasar oluşturulmuştur. Ortaya çıkan bu tablo “nörotmezis” olarak adlandırılan en şiddetli periferik sinir hasarı ile eşdeğer düzeydedir. Bu hasarın iyileşme olasılığı son derece düşüktür. Nitekim çalışmamızda PWL değerlerinin tüm deney süresince yüksek olması, sinirde rejeneratif bir sürecin yaşanmadığını göstermektedir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada; sinir hasarı siyatik sinirde kesi şeklinde oluşturulmuş, cerrahi girişimle sinir greftleri yerleştirilmiş, PWL sürelerinde 16. haftaya kadar bir düzelme olmadığı gösterilmiştir (155). Luis ve ark.'larının yaptığı benzer bir çalışmada, PWL sürelerinde gözlenen artışın 20 hafta boyunca değişmediği saptanmıştır (156). Sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumludur.

Çalışma kapsamında, tüm gruplara ait sıçanların vücut ağırlıkları 182 (26 hafta) gün boyunca her hafta ölçülmüştür. Grupların başlangıç, haftalık ve çalışma süresince ölçülen ağırlık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (EK-1 ve 2). Bu sonuca göre, PMA'nın PMA ve ONXP gruplarına ait sıçanların ağırlık değişimleri üzerine herhangi bir etkisinin bulunmadığı söylenebilir. NTP'nin (U.S. National Toxicology Program) yayınladığı bir raporda (157), Shen ve Zhao (130) Gonzalez-Riola ve ark.'ları (158), Sert ve ark.'ları, (126), Chang ve Chang (6) ve van der Jagt ve ark.'larının (159) yapmış olduğu çalışmalarda; dalga formu, frekansı, şiddeti ve uygulama süreleri farklı MA'ların sağlıklı ve deneysel OP modeli oluşturulan fare ve sıçanların ağırlıkları üzerine bir etkisi olmadığını göstermişlerdir. Sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumludur. ONX grubuna ait sıçanların ağırlıkları K grubu ile benzer bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda OVX'te ağırlık artışı sNX'te ise azaldığı bildirilmektedir (130,160,161). ONX gruplarında bu iki durumun birbirini dengelediği düşünülmektedir.

OP'nin tanı ve takibinde BMD önemli bir parametredir, kemik gücü ile güçlü bir korelasyon gösterir ve kırık riskinin önemli bir belirteçidir. Ancak, kemik gücü sadece BMD ile değil, bunun yanında kemiğin mikromimarisi (kemik kalitesi) ile de yakından

ilişkilidir (86-89,162). Bu çalışmada, K ve ONX gruplarına ait femur kemiklerinin BMD ölçümleri tüm, diyafizial ve kırılma noktası olmak üzere üç bölgede ölçülmüş ve ONX grubunda gözlenen azalışlar her üç bölgede de anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$) (Çizelge 4.2; Şekil 4.3–4.5). Gerek OVX gerekse sNX yöntemleriyle oluşturulan kemik kaybı modellerinde, BMD düzeylerinin azaldığı bilinen bir sonuçtur (162–169).

Dokunun yapısal bütünlüğünü en iyi yansıtan maksimum kırılma kuvveti ile dokunun yapısal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan maksimum deformasyon miktarı, sertlik ve depolanan enerji biyomekanik analizlerde sıklıkla kullanılan önemli parametrelerdir (170,171). Yapısal parametreler kemiğin kalitesi ve dayanıklılığı (kemik gücü) ile yakından ilişkilidir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, ONX grubuna ait maksimum kırılma kuvveti, maksimum deformasyon ve depolanan enerji ortalamalarının K grubuna göre sırasıyla %21,7 ($P<0,05$), %17,6 ($P>0,05$) ve %39,3 ($P<0,01$) oranlarında azaldığı, saptanmıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.10, 4.11 ve 4.13). Bununla birlikte, sertlikte kısmi değişimler olmasına rağmen, %10,5 oranındaki azalış anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.12). Bu sonuçlara göre, ONX grubuna ait kemiklerin güçsüz ve kırılğan olduğu, uygulanan yüke karşı gösterdiği direncin önemli derecede azaldığı ve kemik bütünlüğünün mekanik açıdan bozulduğu söylenebilir. Ayrıca yapısal parametrelerdeki azalış, kemik mineralizasyonunun olumsuz etkilendiğinin göstergesidir. Bu sonuç BMD ölçümleriyle de gösterilmiştir.

Maksimum eğme dayanımı, maksimum strain, esneklik katsayısı ve dayanıklılık kemiğin materyal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılan parametrelerdir. Bu parametreler, kemiğin yapısal bütünlüğünü yansıttığı gibi, düşük kemik mineralizasyonu ve kollajen degradasyonu ile karakterize postmenopozal OP gibi çeşitli kemik patolojilerini biyomekanik açıdan değerlendirme imkânı da tanımaktadır. Bu değerlendirmelerde, anılan parametrelerin farklı kombinasyonları kullanılır. Maksimum eğme dayanımı ve dayanıklılık kemik mineralizasyonu ile ilişkilendirilmiştir (170,171). Dayanıklılık, kemiğin organik fazı ile yakından ilişkilidir ve mineral yoğunluğundan bağımsız olarak dokunun kollajen bütünlüğünü yansıtır. Bu çalışmada, ONX gruplarına ait maksimum eğme dayanımı, esneklik katsayısı ve dayanıklılık parametreleri K grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.15, 4.17 ve 4.18). Ancak, ONX grubuna ait dayanıklılık parametresinde gözlenen %34,4 (K'ya göre) oranındaki azalma kemiğin mineral yoğunluğundan

bağımsız olarak kollajen yapının etkilendiğini gösterir ($P>0,05$) (Çizelge 4.4; Şekil 4.18). Ayrıca, postmenopozal OP'de, kollajen bütünlüğünün bozulduğu çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir (104,105,172). Materyal özelliklerle ilgili bulgular, ONX grubunda gözlenen değişimlerin düşük kemik kütlesi yanında bozulan kollajen bütünlüğü ile gerçekleştiği söylenebilir. Bu sonuçları desteklemek amacıyla çalışmada bu gruba ait serum osteokalsin ve β -crosslaps düzeyleri incelenmiştir.

Kemik döngüsü, osteoblast (yapım) ve osteoklast (yıkım) hücreleri tarafından regüle edilen, birbirine zıt bir süreçtir. Sağlıklı bireylerde bu süreç denge halinde olup, kemik kütlesi korunur. Postmenopozal OP, kemik döngü hızında artma ve kemik yapım-yıkım süreçlerinde oluşan dengesizliğe bağlı olarak ortaya çıkar (107). Osteokalsin, osteoblast hücreleri tarafından sekrete edilen ve mineralizasyonda görev alan önemli bir proteindir. sOCN düzeyleri osteoblastik aktivite ile kemik yapım hızının hassas ve spesifik bir belirteçidir, BMD ile de ters ve yüksek korelasyon gösterir (111). β -CTX, kemik yıkımı sırasında osteoklastik tip 1 kollajen degradasyonu sonucu oluşan bir fragmenttir. Osteoklastik kollajen degradasyonu sadece kemikte gerçekleştiği için β -CTX hassas ve kemiğe spesifik bir yıkım belirteçidir. sOCN düzeyleriyle korelasyonu yüksektir (104,106,173). sOCN ve β -CTX düzeyleri incelendiğinde, ONX grubuna ait ortalamaların K grubuna göre, sırasıyla, %31,6 ($P<0,05$) ve %70,9 ($P<0,05$) oranında önemli derecede arttığı saptanmıştır (Çizelge 4.6; Şekil 4.21 ve 4.22). Bu sonuçlara göre, kemik yapım-yıkım döngüsünün arttığı ve bu artışa bağlı olarak kemik kütlesinin azaldığı söylenebilir. Çeşitli insan ve hayvan çalışmalarında kemik kaybı nedeniyle sOCN ve β -CTX düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (174–178). Sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumludur ve bu çalışmalar biyomekanik bulgularımızı desteklemektedir.

Kemik biyomekaniğinde incelenen parametreler, dokunun materyal [kalsifikasyon, doku kompozisyonu, hidroksiapatit kristallerinin uzaysal dağılımı, kollajen lifleri ve lamellar yapısı] ve geometrik özelliklerine [trabeküler ağ, kortikal kesit alan ve kortikal kemik kalınlığı] bağlı olarak değişir. Bu nedenle femur kemiklerine ait CSA, L_o , L, kemiklerin eğme kuvvetine ve kuvvet nedeniyle oluşan deformasyona karşı kemiğin gösterdiği direnci yansıtan (34) atalet momentini hesaplamak amacıyla PER_{ML} , PER_{AP} , END_{ML} ve END_{AP} ölçülmüştür. Kemiğin gücü ve kalitesini yansıtan kortikal kemik kalınlığı histolojik yöntemle değerlendirilmiştir. ONX ve K grubuna ait geometrik parametreler karşılaştırıldığında, L_o , PER_{AP} ve END_{AP} 'de

anlamli bir fark saptanmamıştır (Çizelge 4.3; Şekil 4.6–4.8). PER_{ML} %9,2 ($P<0,05$), C_{TH} %21,1 ($P<0,05$), ve CSA %12,7 ($P>0,05$) oranında azalmıştır (Çizelge 4.3 ve 4.6; Şekil 4.6–4.9, Şekil 4.19). I_{AP} ve I_{ML} ortalamaları sırasıyla % 30,6 ($P<0,05$) ve % 27,3 ($P<0,05$) oranında azalmıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.14). Dolayısıyla kemiklerin uygulanan yüke karşı gösterdiği direncin azaldığı ve kemik bütünlüğünün bozulduğu söylenebilir. Bu sonuç da yapısal parametrelerden elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

ONX grubuna ait biyomekanik, dansitometrik, histolojik ve biyokimyasal sonuçlar; kemik kütledeki azalmayla birlikte kollajen degradasyonu sonucu femur kemiklerinde kırılabilirliğin arttığı, kemik gücü ve uygulanan yüke karşı kemiğin gösterdiği direncin azaldığı; ayrıca, deneysel OP modeli oluşturmak amacıyla kullanılan ONX yönteminin başarıyla uygulandığı söylenebilir.

PMA'nın kemik doku üzerindeki protektif etkilerini değerlendirmek amacıyla ONXP, ONX ve SH grupları karşılaştırılmıştır. ONXP grubuna ait maksimum kırılma kuvveti ve depolanan enerji ortalamaları ONX'e göre sırasıyla %13,4 ve %43 oranında artmasına rağmen anlamlı bulunmamıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.10 ve 4.13). Sertlik açısından benzer değerlere sahipken, maksimum deformasyon miktarındaki %27,8'lik artış anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$) (Çizelge 4.4; Şekil 4.11 ve 4.12). Tüm, diyafizial ve kırılma noktasına ait BMD ortalamaları sırasıyla %7,7 ($P<0,05$), %11,7 ($P<0,05$) ve %8,8 ($P>0,05$) oranında artmıştır (Şekil 4.3–4.5). PMA'nın kemik mineralizasyonu üzerindeki olumlu etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (15,130,160). Bu sonuçlara göre, PMA'nın kemik kütle kaybını ve bu kayıp nedeniyle gözlenen dejenerasyonu (kırılabilirlik artışı, bozulan kemik bütünlüğü, azalan direnç) önlediği söylenebilir.

ONXP ve ONX gruplarına ait kemiğin materyal özellikleri karşılaştırıldığında, maksimum eğme dayanımı, maksimum strain, esneklik katsayısı ve dayanıklılık parametreleri sırasıyla %19,7 ($P>0,05$), %33,6 ($P<0,05$), %18 ($P>0,05$) ve %31 ($P>0,05$) oranında artmıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.15–4.18). ONXP ve ONX gruplarında sOCN düzeylerinin benzer olduğu, s β -CTX düzeylerinin ise ONXP grubunda %34,2 ($P>0,05$) oranında azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.21 ve 4.22). Bu sonuçlar, PMA'nın kollajen degradasyonunu kısmen önlediği, osteoblastik aktiviteyi stimüle ederken, osteoklastik aktiviteyi baskıladığı ve bunun sonucu olarak ONX grubunda gözlenen yüksek kemik döngü hızını regüle ettiği söylenebilir.

END_{ML} ve C_{TH} ortalamalarının ONX'e göre sırasıyla %17,6 ($P<0,01$) ve %8,8 ($P<0,05$) oranlarında arttığı saptanırken, L_o, L, PER_{ML}, PER_{AP}, END_{AP}, CSA, I_{AP} ve I_{ML}'de anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5; Şekil 4.6–4.9, Şekil 4.14 ve 4.19). Bu sonuçlar, özellikle C_{TH}, kemiğe ait yapısal bulguları desteklemektedir.

ONXP ve SH grubu karşılaştırıldığında maksimum deformasyon ve sOCN haricindeki tüm parametrelere ait ortalamaların benzer olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2–4.6; Şekil 4.3–4.19). Ayrıca, ONXP grubuna ait sOCN düzeylerinde gözlenen artış SH grubuyla anlamlı bulunurken ($P<0,05$), β -CTX ortalamalarının benzer olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6; Şekil 4.21 ve 4.22). ONXP grubuna ait maksimum deformasyon miktarı ortalamasında gözlenen pozitif etkilere rağmen, ortalaması SH grubuna göre düşük kalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 4.4; Şekil 4.11). Bu sonuçlar, PMA'nın protektif etkisinin göstergeleridir.

Biyomekanik, dansitometrik, histolojik ve biyokimyasal sonuçlara göre, PMA'nın kemik kırılabilirliğini azalttığını, kemik bütünlüğünü koruduğunu, kırılmaya karşı kemiğin gösterdiği direnci arttırdığını; bu etkilerini kemik kütle kaybını ve kollajen degradasyonunu önleyerek osteoblastlar üzerinden gerçekleştirdiğini söyleyebiliriz.

PMA'nın kemik doku üzerindeki etkilerinin, biyomekanik özellikler yönünden incelendiği çalışma sayısı oldukça azdır. Luo ve ark.'ları (179); OVX yöntemiyle kemik kaybı oluşturulan tavşanlara uygulanan PMA'nın (5 ms puls süreli, 15 Hz frekanslı, 1 mT, 6 hafta, 6 saat/gün) maksimum kırılma kuvveti ve sertlikte gözlenen azalışları önlediğini ileri sürmüşlerdir. Xiao ve ark.'ları (180) 8 Hz frekanslı, 3,8 mT şiddetindeki PMA'nın Sprague Dawley sıçanlarına 30 gün, günde 20, 40 ve 60 dakika uygulamış, kemik dokuya ait biyomekanik parametrelerde OVX'e bağlı gelişen dejenerasyonu önlediğini göstermişlerdir. Biyomekanik sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumludur.

Jing ve ark.'ları (160), PMA'ya (15 Hz, 0,2 ms puls süresi, 9,6 G) 12 hafta boyunca günde 6 saat maruziyetin kemik kaybı üzerindeki etkileri dansitometrik (tüm femur BMD), biyokimyasal (kemik döngü hızı belirteçleri) ve histomorfometrik (trabeküler kemiğin statik ve dinamik karakterleri) yöntemlerle değerlendirilmiştir. 12 hafta sonunda OVX grubuna ait BMD düzeylerinin önemli derecede azaldığı, trabeküler kemik bütünlüğünün bozulduğu saptanmış ve PMA'nın OVX'teki bu değişimleri önlediğini ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte, OVX grubunda sOCN, ALP, üriner

deokspiridinolin, üriner Ca ve P düzeyleri ile kemik döngü hızının anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir. PMA'ya maruz bırakılan sıçanlarda kemik döngü hızının anlamlı derecede azaldığı gösterilmiş, kemik döngü hızının PMA'yla regüle edilebileceğini ileri sürülmüştür (160). Bu sonuçlar, PMA'nın kemik döngü hızını regüle ettiği, kollajen degradasyonunu önlediği yönündeki düşüncemizi desteklemektedir.

Shen ve Zhao (130), sağ bacakları 0,8 mm çapında Kirschner telleri ile immobilize edilerek, deneysel OP modeli oluşturmuş 4 aylık yetişkin Sprague Dawley türü dişi sıçanları 1, 2, 4 ve 8 hafta boyunca günde 2 saat PMA'ya (15 Hz, 8 ms puls süreli, 0,8 mT şiddetindeki) maruz bırakmışlar ve PMA'nın kemik doku üzerindeki etkilerini dansitometrik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirmişlerdir. Immobilize edilen sıçanlara ait proksimal femur BMD düzeylerinin 2. haftadan itibaren anlamlı derecede azaldığını ve bu azalışın 8 hafta boyunca devam ettiğini, PMA uygulanan sıçanlara ait ortalamaların kontrol grubuyla benzer olduğunu göstermişlerdir (130). Çalışmada proksimal femur kemiklerinden serum IL-6 ve TGF- β konsantrasyonları belirlenmiş, 8 hafta PMA uygulanan grupta TGF- β düzeylerinin önemli derecede arttığını, 4 hafta uygulanan grupta ise IL-6 düzeylerinin anlamlı derecede azaldığını gözlemişlerdir (130). Yazarlar, PMA'nın immobilizasyon nedeniyle oluşan kemik kaybını etkin bir şekilde önlediği, kemik yapım-yıkım döngüsü üzerine etkili olabileceği ve bu etkisini TGF- β (stimülasyon) ve IL-6 (inhibisyon) ekspresyonu üzerinden gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (130).

Mishima (12) PMA'nın (12 Hz, pozitif genliği 25 mV, puls süresi 240 μ s, burst süresi 4,2 ms, 0,3–1 mT) ONX yöntemiyle oluşturulan kemik kaybını önlediğini ileri sürmüştür. Ayrıca, Tabrah ve ark.'ları (15), Basset ve ark.'ları (181), Cruess ve ark.'ları (182), Skerry ve ark.'ları (183) ve Diniz ve ark.'ları (184) farklı PMA protokolleriyle benzer sonuçlara ulaşırken, Takayama ve ark.'ları (185) bu protektif etkiyi göstermede başarısız olmuşlardır. Etki mekanizması halen aydınlatılamamakla birlikte, araştırmacılar PMA'nın kemik kaybı üzerindeki protektif etkilerini osteoblastik aktivite üzerinden osteoklastik fonksiyonları regüle ederek gösterdiklerini rapor etmişlerdir (6,8,130,186,187). OPG ve RANKL, osteoblastlar tarafından sentezlenen ve bu hücre-hücre etkileşimde önemli sitokinlerdir. RANK ise osteoklastlar tarafından sentezlenen bir yüzey reseptörüdür. Bu sitokinler, osteoklastik diferansiyasyon ve aktivasyon için son derece önemlidir. OPG ve RANKL, RANK reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir.

OPG inhibe ederken, RANKL stimüle eder. PMA, bu etkileşimler üzerindeki etkisini direkt (OPG sekresyonunu arttırarak) veya indirekt (lokal regülatör faktörlerin sekresyonunu arttırarak) gerçekleştirebilir (6,8,9,130,186–188). Mekanizmanın tam olarak aydınlatılabilmesi için PMA'nın bu yolağa ait lokal regülasyonda görev alan regülatör (IL-6,13) ve sistemik (PTH, kalsitonin) faktörler üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir.

Çalışmada, sağlıklı sıçanlara uygulanan PMA'nın etkilerini gözlenmek amacıyla SH ve PMA grupları karşılaştırılmıştır. Kemiklerine ait yapısal [maksimum kırılma kuvveti, maksimum deformasyon miktarı, sertlik ve depolanan enerji] ve materyal [maksimum eğme dayanımı, esneklik katsayısı ve dayanıklılık] parametreler incelendiğinde, SH ve PMA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Çizelge 4.4; Şekil 4.10–4.13, Şekil 4.15–4.18). Bu gruplara ait BMD, sOCN ve s β -CTX ortalamalarında da benzer sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.2 ve 4.6; Şekil 4.3–4.5, Şekil 4.21 ve 4.22). Geometrik ve histolojik parametrelere ait ortalamalar incelendiğinde, SH ve PMA grupları arasında L_O , L , PER_{ML} , PER_{AP} , END_{ML} , END_{AP} , CSA , C_{TH} , I_{ML} ve I_{AP} parametrelerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır (Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5; Şekil 4.6–4.9, Şekil 4.14, Şekil 4.19).

Sağlıklı sıçanlara ait biyomekanik, dansitometrik, histolojik ve biyokimyasal parametrelerden elde edilen tüm sonuçlar incelendiğinde; PMA'nın sağlıklı sıçanlara ait kemiklerde herhangi bir olumsuz etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.

PMA'ların canlı sisteme uygulamalarında; MA'nın şiddeti, frekansı ve uygulama süresi son derece önemlidir. PMA'nın sağlıklı kemik doku üzerindeki etkileri ile ilgili çalışmalar az olmakla birlikte, bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar benzerdir. Bu çalışmalarda, PMA'nın Ca miktarını, kollajen ve ekstrasellüler matriks sentezini, osteoblast proliferasyonunu, ALP, OCN ve OPG sekresyonunu arttırdığı, RANKL sekresyonu ve serum Ca miktarını azalttığı, hidroksiapatit osteointegrasyonunu hızlandırdığı, osteoklastik maturasyonu belirli aşamalarda inhibe ettiği, yeni kemik sentezi ve kırık iyileşmesi üzerindeki stimülan etkileri çeşitli yöntemlerle gösterilmiştir (6,8,9,130,184,186–191).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmada, sağlıklı ve kemik kaybı oluşturulmuş sıçanlarda 15 Hz, 0.3 ms puls süreli 1 mT şiddetindeki PMA'nın kemiğin kalitesi, esnekliği ve dayanıklılığı üzerindeki etkileri biyomekanik açıdan değerlendirilmiştir. Ayrıca sonuçlar, biyokimyasal kemik döngüsü belirteçleri, dansitometrik ve histomorfolojik analizlerle desteklenmiştir. kemik kaybı sıçanlarda bilateral ovariektomi ve siyatik nörektomi ile oluşturularak PMA'nın olası etkileri protektif açıdan değerlendirilmiştir.

Deneysel çalışmamızdan elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde;

1. PMA'nın sağlıklı sıçanlarında kemiğin biyomekanik özellikleri (yapısal ve materyal özellikler) üzerine kemik dokuda, dokuyu tahrip edici herhangi bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır. Bu nedenle, 15 Hz frekanslı 1 mT şiddetindeki PMA'nın kemik kaybı ile karakterize iskelet sistemi hastalıklarının önlenmesinde güvenle kullanılabilmesi söylenebilir.
2. PMA'nın kemik kaybı açısından protektif etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. Dokuda, kemik kaybı nedeniyle kemiğin kalitesinde gözlenen azalış PMA uygulaması ile önemli derecede engellenmiştir. Bu etkisini kemik yapım-yıkım döngüsünü regüle eden osteoblast ve osteoklastların fonksiyonları üzerinden gerçekleştirdiği söylenebilir. PMA'nın etki mekanizmasının tam olarak aydınlatılması için gelecekte yapılacak çalışmalarda osteoblast ve osteoklast hücreleri arasında gerçekleşen hücreler arası etkileşimlerde görev alan yollara ait anahtar moleküllerin veya RANK, RANKL, OPG, IL'ler gibi çeşitli sitokinlerin moleküler (gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi) ve biyokimyasal analizlerinin yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Canbazoğlu M.** Kalsiyum eaksikliğinin kemik metabolizması üzerine etkilerinin radyoizotopik, biyomekanik, densitometrik, ve histolojik yöntemlerle incelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **1992**.
2. **Gücük Tezel C.** Postmenopozal kadınlarda osteoporozu belirlemede distal radius SPA, spinal ve femur DEXA, tibial ultrason yöntemlerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Sosyal Sigortalar Kurumu Göztepe Eğitim Hastanesi, İstanbul, **1996**.
3. **Meram İ.** The effects of estrogen treatment on the trace elements and vitamins in menopausal women. *Mersin Üni. Tıp Fak. Dergisi*, **2001**;4:472–478.
4. **Downey PA, Siegel MI.** Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*, **2006**;86(1):77–91.
5. **Shoback D.** Update in osteoporosis and metabolic bone disorders. *J Clin Endoc & Metabol*, **2007**;92(3):747–753.
6. **Chang K, Chang WHS.** Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: A Prostaglandin E₂-associated process. *Bioelectromagnetics*, **2003**;24(3):189–198.
7. **Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov, Jefcoat SC, Partridge.** Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *J Orthop Res*, **2007**;25(9):1213–1220.
8. **Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH.** Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*, **2004**;25(6):457–465.
9. **Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Guerkov H, Dean DD, Simon B, Boyan BD.** Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. *J Orthop Res*, **2000**;18(4):637–646.
10. **McLeod KJ, Collazo L.** Suppression of a differentiation response in MC-3T3-E1 osteoblast-like cells by sustained, low-level, 30 Hz magnetic-field exposure. *Radiat Res*, **2000**;153(5Pt2):706–714.
11. **Schnoke M, Midura RJ.** Pulsed electromagnetic fields rapidly modulate intracellular signaling events in osteoblastic cells: comparison to parathyroid hormone and insulin. *J Orthop Res*, **2007**;25(7):933–940.
12. **Mishima S.** The effect of long-term pulsing electromagnetic field stimulation on experimental osteoporosis of rats. *J UOEH*, **1988** Mar 1;10(1):31–45.

13. **Zati A, Gnudi S, Mongiorgi R, Giardino R, Fini M, Valdre G, Galliani I, Montagnani AM.** Effects of pulsed magnetic fields in the therapy of osteoporosis induced by ovariectomy in the rat. *Boll Soc Ital Biol Sper*, **1993**;69(7-8):469–475.
14. **Jayanand, Behari J, Lochan R.** Effects of low level pulsed radio frequency fields on induced osteoporosis in rat bone. *Indian J Exp Biol*, **2003**;41(6):581–586.
15. **Tabrah F, Hoffmeier M, Gilbert F Jr, Batkin S, Bassett CA.** Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *J Bone Miner Res*, **1990**;5(5): 437–442.
16. **Huang L, He HC, He CQ, Chen J, Yang L.** Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *Chin Med J*, **2008**;121(20):2095–2099.
17. **Nordin M, Frankel VH.** Basic biomechanics of the musculoskeletal system. 3rd Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**:27–55.
18. **Gürgül S, Erdal N, Yılmaz SN, Yıldız A, Ankaralı H.** Deterioration of bone quality by long-term magnetic field with extremely low frequency in rats. *Bone*, **2008**;42(1): 74–80.
19. **Turner CH, Burr DB.** Basic biomechanical measurements of bone: A Tutorial. *Bone*, **1993**;14(4):595–608.
20. **Khurana J.** Bone Pathology. 2nd Ed., New York: Humana Press, **2009**.
21. **Deng HW, Liu YZ.** Current Topics in Bone Biology, 1st Ed., London: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., **2005**.
22. **Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA.** Principles of Bone Biology, 2nd Ed., London: Academic Press, Volume 1-2, **2002**.
23. **An YH, Draughn RA.** Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface, 1st Ed., New York: CRC Press LLC., **2000**.
24. **Bolkent Ş.** Bağ Dokusu. In: Demir R. Eds., *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2006**:95–130.
25. **Marcus R, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ.** Fundamentals of Osteoporosis, 1st Ed., London: Academic Press, **2010**.
26. **Akpolat V.** Kemik mineral yoğunluğunun yapay sinir ağlarıyla saptanması. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, **2007**.
27. **Biberoğlu S.** Osteoporoz patogenezi. *T Klin J PM & R*, **2002**; 2 (1):11-16.

28. **Ross MH, Kaye GI, Pawlina W.** Bone. Histology: A Text and Atlas, 4th Ed., London: Lippincott Williams & Wilkins, **2002**:180–201.
29. **Mescher LA.** Junqueira's Basic Histology: A Text & Atlas, 12th Ed., USA: McGraw-Hill Companies Inc., **2010**: Bone.
30. **Aytekın Y.** Temel Histoloji, 1. Baskı, İstanbul: Barış Kitapçılık, **1998**:132–139.
31. **Turner CH.** Biomechanics of bone: Determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporosis Int*, **2002**;13(2):97–104.
32. **Burr DB.** The contribution of the organic matrix to bone's material properties. *Bone*, **2002**;31(1):8–11.
33. **Corwin SC.** Bone Mechanics Handbook. 2nd Ed., New York: CRC Press LLC., **2001**: 7-1–7-26.
34. **Adler RA.** Osteoporosis: Pathophysiology and Clinica Management. 2nd Ed., New York: Humana Press, **2010**.
35. **Sevil F.** Tavşan Femur'unun morfometrik ve biyomekanik özellikleri üzerine ovariektominin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, **2006**.
36. **Ahılborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, KarlssonMK.** Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med*, **2003**;349(4):327–334.
37. **Aloia JF, Vaswani A, Mikhail M, Badshah M, Flaster E.** Cancellous bone of the spine is greater in black women. *Calcif Tissue Int*, **1999**;65(1):29–33.
38. **Arlot ME, Sornay-Rendu E, Garnero P, Vey-Marty B, Delmas PD.** Apparent pre- and postmenopausal bone loss evaluated by DXA at different skeletal sites in women: the OFELY cohort. *J Bone Miner Res*, **1997**;12(4):683–690.
39. **Barden H.** Bone mineral density of the spine and femur in normal U.S. white females. *J Bone Miner Res*, **1997**;12(1):248.
40. **Currey JD.** Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int*, **2003**;14(Suppl 5):29-36.
41. **Kopperdahl DL, Keaveny TM.** Yield strain behavior of trabecular bone. *J Biomech*, **1998**;31(7):601–608.
42. **Schulmerich MV, Finney WF, Fredricks RA, Morris MD.** Subsurface Raman spectroscopy and mapping using a globally illuminated non-confocal fiber-optic array probe in the presence of Raman photon migration. *Appl Spectrosc*, **2006**;60(2):109–114.

43. Ulrich D, Hildebrand T, van Rietbergen B, Müller R, Rügsegger P. The quality of trabecular bone evaluated with micro-computed tomography, FEA and mechanical testing. *Stud Health Technol Inform*, **1997**;40:97–112.
44. Currey JD. What determines the bending strength of compact bone? *J Exp Biol*, **1999**;202(18):2495–2503.
45. Misof BM, Roschger P, Baldini T, Raggio CL, Zraick V, Root L, Boskey AL, Klaushofer K, Fratzl P, Camacho NP. Differential effects of alendronate treatment on bone from growing osteogenesis imperfecta and wild-type mouse. *Bone*, **2005**;36(1):150–158.
46. Schuit SC, van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, Hofman A, Uitterlinden AG, van Leeuwen JP, Pols HA. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone*, **2004**;34(1):195–202.
47. Silva MJ, Gibson LJ. Modeling the mechanical behavior of vertebral trabecular bone: effects of age related changes in microstructure. *Bone*, **1997**;21(2):191–199.
48. Keaveny TM, Guo XE, Wachtel EF, McMahon TA, Hayes WC. Trabecular bone exhibits fully linear elastic behavior and yields at low strains. *J Biomech*, **1994**;27(9):1127–1136.
49. Keaveny TM, Hayes WC. A 20-year perspective on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech Eng*, **1993**;115(4B):534–542.
50. NIH consensus statement. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*, **2001**;285(6):785–795.
51. Sarıdoğan ME. Osteoporozun tanımı, sınıflandırması ve epidemiyolojik çalışmalar. *T Klin J PM & R*, **2002**; 2(1):1–10.
52. Kocabaş H, Tuncer T. Osteoporoz epidemiyolojisi. *Türkiye Klinikleri J PM & R-Special Topics* **2009**;2(1):1–8.
53. Consus Development Conference: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Osteoporos Int*, **1991**;1(2):114–117.
54. Durmaz B, Çalış FA. Dünyada ve Türkiye’de osteoporozun epidemiyolojik boyutu. *Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics* **2008**;1(3):21–26.
55. World Health Organisation. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. *WHO technical report series*. Geneva, **1994**.
56. DeLaet CEDH, Pols HAP. Fractures in the elderly: epidemiology and demography. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab*, **2000**;14(2):171-179.

57. **Marshall D, Johnell O, Wedel H.** Meta-analysis of how well measures on bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ*, **1996**;312(7041): 1254-1259.
58. **Bayraktar M.** Osteoporoz: Epidemiyoloji ve patogenez. *Turkiye Klinikleri J Endocrin*, **2004**;2:90-98.
59. **Tüzün F.** Osteoporozun tanımı, sınıflaması ve epidemiyolojisi. Osteoporoz Sempozyumu. İstanbul, **1999**:9-15.
60. **Jamison JR.** Primary osteoporosis revisited. *J CCA*, **1987**;31(2):73-78.
61. **Duque G, Troen BR.** Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: New facts for a major geriatric syndrome. *JAGS*, **2008**;56(5):935-941.
62. **Chan GK, Duque G.** Age-related bone loss: Old bone, new facts. *Gerontology*, **2002**;48(2):62-71.
63. **Lips P.** Vitamin D status and nutrition in Europe and Asia. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **2007**;103(3-5):620-625.
64. **Kira M, Kobayashi T, Yoshikawa K.** Vitamin D and the skin. *J Dermatol*, **2003**;30(6):429-437.
65. **Lips P.** Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: Consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*, **2001**;22(4):477-501.
66. **Aydil S.** Osteoporozda egzersiz programının solunum fonksiyonlarına ve yaşam kalitesine etkisi. Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul 70.Yıl Fızık Tedavı ve Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2005**.
67. **Kanis JA, Johnell O.** Ten Year Risk of Osteoporotic Fracture and the Effect of Risk Factors on Screening Strategies. *Bone*, **2002**; 30(1): 251-258.
68. **Topcu Ö.** Menopozun ve Tibolon kullanımının kemik döngüsü belirteçleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2007**.
69. **Kurtay G, Şahincioğlu Ö.** Postmenopozal osteoporoz. *Turkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics*, **2008**;1(3):51-60.
70. **Krassas GE.** Idiopathic juvenile osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci*, **2000**;900: 409-412.
71. **Pludowski P, Lebedowski M, Olszaniecka M, Marowska J, Matusik H, Lorenc RS.** Idiopathic juvenile osteoporosis: An analysis of the muscle-bone relationship. *Osteoporos Int*, **2006**;17(11):1681-1690.

72. **Haspolat K, Boşnak M.** Çocuklarda osteoporoz. *T Klin FTR*, **2002**;2(1):40–50.
73. **Gökçe Kutsal Y.** Erkeklerde osteoporoz. *T Klin FTR*, **2002**;2(1):51–57.
74. **Hekimsoy Z.** Erkeklerde osteoporoz. *Turkiye Klinikleri J Endocrin*, **2004**;2(2):123–130.
75. **Orwoll ES.** Osteoporosis in men. *Endocrinol Metab Clin North Am*, **1998**;27(2):349–367.
76. **Bilezikian JP.** Osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab*, **1999**;84(10): 3431-3434.
77. **Tanakol R.** Sekonder osteoporoz. *T Klin FTR*, **2002**;2(1):30–39.
78. **Kelepouris N, Harper KD, Gannon F.** Severe osteoporosis in men. *Ann Intern Med*, **1995**;123(6):452–460.
79. **Çetinarslan B.** Sekonder osteoporoz. *Turkiye Klinikleri J Endocrin*, **2004**;2(2):114–122.
80. **Templeton K.** Secondary osteoporosis. *J Am Acad Orthop Surg*, **2005**;13(7):475–486.
81. **Miazgowski T, Kleerekoper M, Felsenberg D, Stepan JJ, Szulc P.** Secondary osteoporosis: Endocrine and metabolic causes of bone mass deterioration. *J Osteoporosis*, **2012**;doi:10.1155/2012/907214.
82. **Romagnoli E, Del Fiacco R, Russo S, Piemonte S, Fidanza F, Colapietro F, Diacinti D, Cipriani C, Minisola S.** Secondary osteoporosis in men and women: clinical challenge of an unresolved issue. *J Rheumatol*, **2011**;38(8):1671–1679.
83. **Sindel D.** Tanı yöntemleri. *T. Klin. J PM & R*, **2002**;2(1):17-29.
84. **Gezer A.** Kemik yapımının izlenmesi: Radyolojik yöntemler. *Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics*, **2009**;2(3):114–122.
85. **Kirazlı Y.** Osteoporoz tanısında görüntüleme yöntemleri. *Turkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics*, **2008**;1(3):41–50.
86. **Durusu Tanrıöver M, Gürlek A.** Osteoporozda tanı yöntemleri. *Turkiye Klinikleri J Endocrin*, **2004**;2(2):99–103.
87. **Sinaki M.** Prevention and treatment of osteoporosis. In: Braddom RL Eds. *Physical Medicine & Rehabilitation*. 2nd Ed, Philadelphia: Saunders, **2000**;894–912.
88. **Grier SJ, Turner AS, Alvis MR.** The use of dual-enerji x ray absorbtometry in animals. *Invest*

Radiol, 1996;31(1): 50-62.

89. **Escribano A, Revilla M, Hernandez ER, Seco C, Gonzalez-Riola J, Villa LF, Ricao H.** Effect of lead on bone development and bone mass: a morphometric, densitometric, and histomorphometric study in growing rats. *Calcif Tissue Int*, 1997;60(2):200–203.
90. **Syversen U, Nordletten L, Falch JA, Madesen JE, Nilsen OG, Waldum HL.** Effect of lifelong nicotine inhalation on bone mass and mechanical properties in female rat femurs. *Calcif Tissue Int*, 1999;60(2):246–249.
91. **Bennell KL, Khan KM, Warmington S, Forwood MR, Coleman BD, Bennett MB, Wark JD.** Age does not influence the bone response to treadmill exercise in female rats. *Med Sci Sports Exerc*, 2002;34(12):1958–1965.
92. **Bagi CM, Hanson N, Andresen C, Pero R, Lariviere R, Turner CH, Laib A.** The use of micro-CT to evaluate cortical bone geometry and strength in nude rats: correlation with mechanical testing, pQCT and DXA. *Bone*, 2006;38(1):136–144.
93. **Fink C, Cooper HJ, Huebner JL, Guilak F, Kraus VB.** Precision and accuracy of a transportable dual-energy X-ray absorptiometry unit for bone mineral measurements in guinea pigs. *Calcif Tissue Int*, 2002;70(3):164–169.
94. **Hirano T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM.** Anabolic effects of human biosynthetic parathyroid hormone fragment (1-34), LY333334, on remodeling and mechanical properties of cortical bone in rabbits. *J Bone Miner Res*, 1999;14(4):536–545.
95. **Mashiba T, Burr DB, Turner CH, Sato M, Cain RL, Hock JM.** Effects of human parathyroid hormone (1-34), LY333334, on bone mass, remodeling, and mechanical properties of cortical bone during the first remodeling cycle in rabbits. *Bone*, 2001;28(5):538–547.
96. **Shen V, Dempster DW, Birchman R, Mellish RW, Church E, Kohn D, Lindsay R.** Lack of changes in histomorphometric, bone mass, and biochemical parameters in ovariectomized dogs. *Bone*, 1992;13(4):311–316.
97. **Taşçı Bozbaş G, Gürer G.** Dual enerji X-ray absorpsiyometri ölçümü ve bu sonuçları etkileyen faktörler. *Türkiye Klinikleri J PM & R-Special Topics*, 2009;2(1):76–83.
98. **Formica CA.** Standardization of BMD measurements. *Osteoporos Int*, 1998;8(1):1–3.
99. **Lunt M, Felsenberg D, Adams J, Benevolenskaya L, Cannata J, Dequeker J, Dodenhof C, Falch JA, Johnell O, Khaw KT, Masaryk P, Pols H, Poor G, Reid D, Scheidt-Nave C, Weber K, Silman AJ, Reeve J.** Population-based geographic variations in DXA bone density in Europe. The EVOS study. *Osteoporos Int*, 1997;7(3):175–189.
100. **Lees B, Garland SW, Walton C, Stevenson JC.** Evaluation of the European spine phantom in multi-center clinical trial. *Osteoporos Int*, 1997;7(6):570–574.

- 101. Gregg EW, Kriska AM, Salamone LM, Roberts MM, Anderson SJ, Ferrell RE, Kuller LH, Cauley JA.** The epidemiology of quantitative ultrasound: a review of the relationships with bone mass, osteoporosis and fracture risk. *Osteoporos Int*, **1997**;7(2):89-99.
- 102. Barkmann R, Kantorovich E, Singal C, Hans D, Genant HK, Heller M, Glüer CC.** A new method for quantitative ultrasound measurements at multiple skeletal sites: first results of precision and fracture discrimination. *J Clin Densitom*, **2000**;3(1):1-7.
- 103. Pehlivan F.** *Biyofizik*. 2. Baskı, Ankara: Hacettepe-Taş Kitapevi, **1997**:377–380.
- 104. Dreyer P, Vieira JGH.** Bone turnover assessment: a good surrogate marker?. *Bras Endocrinol Metab*, **2010**;54(2):99-105.
- 105. Civitelli R, Armamento-Villareal R, Napoli N.** Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos Int*, **2009**;20(6):843–851.
- 106. Hannon RA, Eastell R.** Bone markers and current laboratory assays. *Cancer Treat Rev*, **2006**;32(1):7–14.
- 107. El Ö.** Osteoporoz tanı ve izleminde biyokimyasal belirleyiciler. *Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics*, **2008**;1(3):32–40.
- 108. Hepgüler S, Gökay DZ.** Kemik yapının takibi: Biyokimyasal yöntemler. *Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics*, **2009**;2(3):29–39.
- 109. Gürgül S.** Manyetik alanın kemik formasyonu üzerindeki etkilerinin biyomekanik özellikler yönünden incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2005**.
- 110. Güven M.** Pulsu elektromanyetik alanın rejenere olan sıçan sıyatik sinir demetinde sodyum kanallarına etkisinin incelenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2003**.
- 111. Cremers S, Garnero P, Seibel MJ.** Biochemical markers of bone metabolism. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA Eds. *Principles of Bone Biology*, 3rd Ed., London: Academic Press, **2008**:1857–1881.
- 112. Christenson RH.** Biochemical markers of bone metabolism: An overview. *Clinical Biochemistry*, **1997**;30(8):573–593.
- 113. Shupak N.** Therapeutic uses of pulsed magnetic fields exposure: Review. *Radio Science Bulletin*, 2003;307:9–32.
- 114. Malmivuo J, Plonsey R.** Bioelectromagnetism: Principles and Applications of Bioelectric and Biomagnetic Fields. 1st Ed., New York: Oxford University Press, **1995**:33–42.

- 115.Panagopoulos N, Messini N, Karabarbounis A, Margaritis LH.** Mechanism for action of oscillating electric fields on cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**;298(1):95–102.
- 116.Delgado JM, Leal J, Monteagudo JL, Gracia MG.** Embryological changes induced by weak, extremely low frequency electromagnetic fields. *J Anat*, **1982**;134(Pt 3):533–551.
- 117.Blackman CF, Benane SG, House DE, Pollock MM.** Action of 50 hz magnetics on neurite outgrowth in pheochromocytoma cells. *Bioelectromagnetics*, **1993**;14(3):273–286.
- 118.Blackman CF, Benane SG, House DE.** Evidence for direct effect of magnetic fields on neurite outgrowth. *FASEB J*, **1993**;7(9):801–806.
- 119.Aaron R.** Tissue Healing. EMF Science Review Symposium breakout group reports for clinical and in vivo laboratory findings. **1998**. http://tobaccodocuments.org/pm/2063594738-4926.html?zoom=750&ocr_position=above_foramatted&start_page=1&end_page=189 Erişim Tarihi: 10.05.2012
- 120.Bassett CA.** Beneficial effects of EMF's. *J Cell Biochem*, **1993**;51(4):387–393.
- 121.McLeod KJ, Rubin CT.** The effect of low frequency electrical fields on osteogenesis. *J Bone Joint Surg Am*, **1992**;74(6):920–929.
- 122.Taşdelen B, Kanık A.** Klasik hipotez kontrollerine ait örnek genişliklerinin belirlenmesi için gerekli formüller ve tablolar. *ME.Ü. Tıp Fak. Dergisi*, **2004**;4:438–446.
- 123.Narusawa K, Nakamura T, Suzuki K, Matsuoka Y, Lee LJ, Tanaka H, Seino Y.** The effects of recombinant human insulin-like growth factor (rhIGF)-1 and rhIGF-1/IGF binding protein-3 administration on rat osteopenia induced by ovariectomy with concomitant bilateral sciatic neurectomy. *J Bone Min Res*, **1995**;10(12):1853–1864.
- 124.Weinreb M, Rodan GA, Thompson DD.** Immobilization-related bone loss in the rat is increased by calcium deficiency. *Calcif Tissue Int*, 1991;48(2):93-100.
- 125.Jee WSS, Yao W.** Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact*, **2001**;1(3):193-207.
- 126.Sert C, Mustafa D, Düz MZ, Asken F, Kaya A.** The preventive effect on bone loss of 50 Hz, 1 mT electromagnetic field in ovariectomized rats. *J. Bone and Min. Metab*, **2002**; 20(6):345-349.
- 127.Kalu DN.** The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Mineral*, **1991**;15(3):175–192.
- 128.Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C.** Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res*, **2005**;23(6):1308-1314.

- 129.Chang WH, Li JK, Lin JCA, Liu HC, Sun JS.** Bone defect healing enhanced by pulsed electromagnetic fields stimulation: in vitro bone organ culture model. *Journal of Medical and Biological Engineering*, **2005**;25(1):27–32.
- 130.Shen WW, Zhao JH.** Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics*, **2010**;31(2):113–119.
- 131.Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, Chiu HT, Lu SF, Luo GH, Kuo TK, Lee OK, Chiou TW.** Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics*, **2009**;30(4):251–260.
- 132.South SM, Smith MT.** Apparent insensitivity of the hotplate latency test for detection of antinociception following intraperitoneal, intravenous or intracerebroventricular M6G administration to rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **1998**;286(3):1326–1332.
- 133.Oatway M, Reid A, Sawynok J.** Peripheral antihyperalgesic and analgesic actions of Ketamine and Amitriptyline in a model of mild thermal injury in the rat. *Anesth Analg*, **2003**;97(1):168–173.
- 134.Nagy JL, van Der Kooy D.** Effects of neonatal capsaicin treatment on nociceptive thresholds in the rat. *J Neuroscience*, **1983**;3(6):1145–1150.
- 135.Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Sato Y, Yeh JK.** Comparative effects of orchidectomy and sciatic neurectomy on cortical and cancellous bone in young growing rats. *J Bone Miner Metab*, **2003**;21(4):211–216.
- 136.Kuwamoto M, Okano T, Fukata S, Enokida M, Hagino H.** Effects of sciatic neurectomy on arthritis and bone loss in rats with collagen-induced arthritis. *Yonago Acta Medica*, **2007**;50:57–63.
- 137.Jarvinen TLN, Kannus P, Sievanen H, Jozsa L, Heinonen OJ, Vieno T, Jarvinen M.** Effects of remobilization on rat femur are dose-dependent. *Scand J Med Sci Sports*, **2001**;11(5): 292–298.
- 138.Tamaki H, Akamine T, Goshi N, Kurata H, Sakou T.** Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone*, **1998**;23(2):147–153.
- 139.Brzoska MM, Majewska K, Moniuszko-Jakoniuk J.** Mechanical properties of femoral diaphysis and femoral neck of female rats chronically exposed to various levels of cadmium. *Calcif Tissue Int*, **2005**;76(4):287–298.
- 140.Leppanen O, Sievanen H, Jokihaara J, Pajamaki I, Jarvinen TLN.** Three-point bending of rat femur in the mediolateral direction: introduction and validation of a novel biomechanical testing protocol. *J Bone Min Res*, **2006**;21(8):1231–1237.

141. Sato M, MA YL, Hock JM, Westmore WS, Vahle J, Villanueva A, Turner CH. Skeletal efficacy with parathyroid hormone in rats was not entirely beneficial with long-term treatment. *J Pharmacol Exp Ther*, **2002**;302(1):304–313.
142. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, Sibonga JD. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Dis*, **2001**;2(1):117–127
143. Józsa L, Kannus P, Thöring J, Reffy A, Järvinen M, Kvist M. The effect of tenotomy and immobilisation on intramuscular connective tissue. A morphometric and microscopic study in rat calf muscles. *J Bone Joint Surg Br*, **1990**;72(2):293-297.
144. Gross TS, Poliachik SL, Prasad J, Bain SD. The effect of muscle dysfunction on bone mass and morphology. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, **2010**;10(1):25-34.
145. McLean J, Batt J, Doering LC, Rotin D, Bain JR. Enhanced rate of nerve regeneration and directional errors after sciatic nerve injury in receptor protein tyrosine phosphatase sigma knock-out mice. *J Neurosci*, **2002**;22(13):5481-5491.
146. Doğan T. Fonksiyonel anatomi: Ekstremiteler ve sırt bölgesi. Ed. Doğan T, 2. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, **2000**:149–198.
147. American Industrial Hygiene Association (AIHA) Statement. Position Statement on Extremely Low Frequency (ELF) Fields, **2002**.
http://www.aiha.org/news-pubs/govtaffairs/Documents/position02_ELFFs.pdf, Erişim Tarihi: 10.05.2012.
148. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) Statement. EMF Levels & Safety Standarts, 2001.
https://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CEIOFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.aiha.org%2Fnews-pubs%2Fgovtaffairs%2FDocuments%2Fposition02_ELFFs.pdf&ei=quyNT6_7COX_4QTE2OCcDw&usq=AFQjCNFqZvhKvsDsPJbTW8Uj_9tbYc8Sjw&sig2=1TI7hSvLnRJGrpjjMuPPw, Erişim Tarihi: 10.05.2012.
149. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) and International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) Statement. EMF & RF Safety Levels: A Comparative Guide.
https://www.google.com.tr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&sqi=2&ved=0CDEQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.scantech7.com%2Fforms%2FRF%2520%26%2520EMF%2520Safety%2520Levels%2520Comparative%2520Guide%2520REV%2520A.pdf&ei=fCNT4_fBa_74QS1s_CeDw&usq=AFQjCNFeSraJzo8_9AFeAIP65LJH2gRMpQ&sig2=WVLChgl3b7Evk-WrEct5nQ, Erişim Tarihi: 10.05.2012.
150. Gordon GA. Designed electromagnetic pulsed therapy: Clinical applications. *J Cell Physiol*, **2007**;212(3):579–582.
151. Spadaro JA. Mechanical and electrical interactions in bone remodeling. *Bioelectromagnetics*, **1997**;18(3):193–202.

- 152. Bachl N, Ruoff G, Wessner B, Tschan H.** Electromagnetic interventions in musculoskeletal disorders. *Clin Sports Med*, **2008**;27(1):87–105.
- 153. Li J, Lin J, Liu H, Chang W.** Cytokine release from osteoblasts in response to different intensities of pulsed electromagnetic field stimulation. *Electromagn Biol Med*, **2007**;26(3):153–165.
- 154. Tejashree S, Malushte TS, Kerns JM, Huang CC, Shott S, Safanda J, Gonzalez M.** Assessment of recovery following a novel partial nerve lesion in a rat model. *Muscle Nerve*, **2004**;30(5):609-617.
- 155. Simões MJ, Amado S, Gärtner A, Armada-Da-Silva PA, Raimondo S, Vieira M, Luís AL, Shirosaki Y, Veloso AP, Santos JD, Varejão AS, Geuna S, Maurício AC.** Use of chitosan scaffolds for repairing rat sciatic nerve defects. *Ital J Anat Embryol*, **2010**;115(3):190-210.
- 156. Luis AL, Rodrigues JM, Amado S, Veloso AP, Armada-Da-Silva PA, Raimondo S, Fregnan F, Ferreira AJ, Lopes MA, Santos JD, Geuna S, Varejão AS, Maurício AC.** PLGA 90/10 and caprolactone biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. *Microsurgery*, **2007**;27(2):125-137.
- 157. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service.** National institutes of health technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of 60-Hz magnetic fields in F344/n rats and B6C3F1 mice (whole-body exposure studies), **1999**.
- 158. Gonzalez-Riola J, Pamies JA, Hernandez ER, Revilla M, Seco C, Villa LF, Rico H.** Influence of electromagnetic fields on bone mass and growth in developing rats: A morphometric, densitometric and histomorphometric study. *Calcif. Tissue Int*, **1997**; 60(6):533-537.
- 159. van der Jagt OP, van der Linden JC, Waarsing JH, Verhaar JA, Weinans H.** Systemic treatment with pulsed electromagnetic fields do not affect bone microarchitecture in osteoporotic rats. *Int Orthop*, 2012. DOI 10.1007/s00264-011-1471-8.
- 160. Jing D, Shen G, Huang J, Xie K, Cai J, Xu Q, Wu X, Luo E.** Circadian rhythm affects the preventive role of pulsed electromagnetic fields on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Bone*, **2010**;46(2):487-495.
- 161. Brouwers JE, Lambers FM, van Rietbergen B, Ito K, Huiskes R.** Comparison of bone loss induced by ovariectomy and neurectomy in rats analyzed by in vivo micro-CT. *J Orthop Res*, **2009**;27(11):1521-1527.
- 162. Comelekoglu U, Bagis S, Yalin S, Ogenler O, Yildiz A, Sahin NO, Oguz I, Hatungil R.** Biomechanical evaluation in osteoporosis: ovariectomized rat model. *Clin Rheumatol*, **2007**;26(3):380-384.
- 163. Nian H, Ma MH, Nian SS, Xu LL.** Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. *Phytomedicine*, **2009**;16(4):320-326.
- 164. Oxlund H, Andreassen TT.** Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone

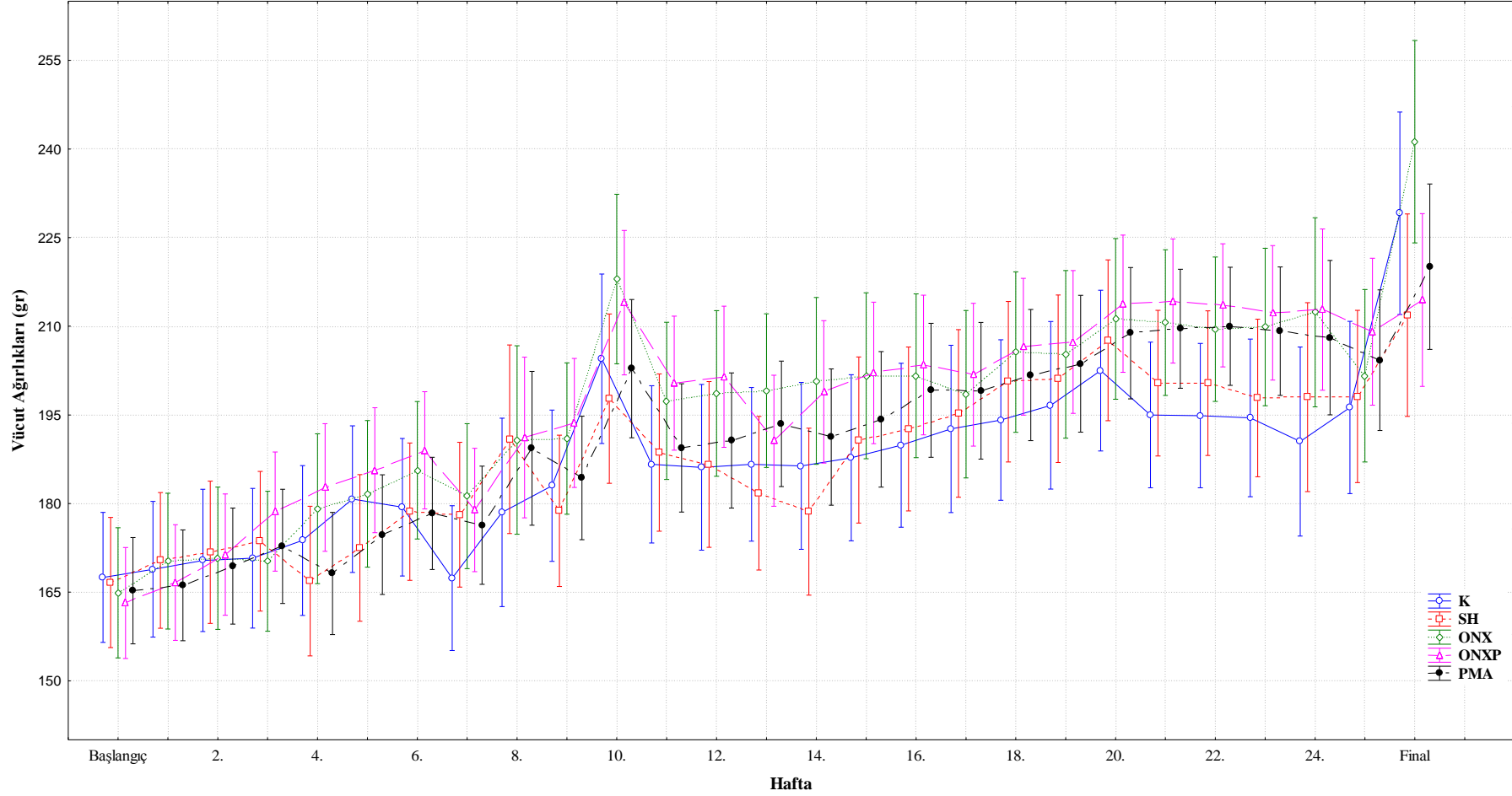
loss while increasing cortical bone formation. *Bone*, **2004**;34(4):609-618.

- 165. Ederveen AG, Spanjers CP, Quaijtaal JH, Kloosterboer HJ.** Effect of 16 months of treatment with tibolone on bone mass, turnover, and biomechanical quality in mature ovariectomized rats. *J Bone Miner Res*, **2001**;16(9):1674-1681.
- 166. Seo BI, Ku SK, Cha EM, Park JH, Kim JD, Choi HY, Lee HS.** Effect of Mornidae Radix extracts on experimental osteoporosis in sciatic neurectomized mice. *Phytother Res*, **2005**;19(3):231-238.
- 167. Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H.** Effects of risedronate on femoral bone mineral density and bone strength in sciatic neurectomized young rats. *J Bone Miner Metab*, **2005**;23(6):456-462.
- 168. Mosekilde L, Thomsen JS, Mackey MS, Phipps RJ.** Treatment with risedronate or alendronate prevents hind-limb immobilization-induced loss of bone density and strength in adult female rats. *Bone*, **2000**;27(5):639-645.
- 169. Jämsä T, Koivukangas A, Ryhänen J, Jalovaara P, Tuukkanen J.** Femoral neck is a sensitive indicator of bone loss in immobilized hind limb of mouse. *J Bone Miner Res*, **1999**;14(10):1708-1713.
- 170. Demirel C, Kilciksiz S, Gurgul S, Erdal N, Yildiz A.** N-acetylcysteine ameliorates γ -radiation-induced deterioration of bone quality in the rat femur. *J Int Med Res*, **2011**;39(6):2393-2401.
- 171. Erdal N, Gürgül S, Kavak S, Yildiz A, Emre M.** Deterioration of bone quality by streptozotocin (STZ)-induced type 2 diabetes mellitus in rats. *Biol Trace Elem Res*, **2011**;140(3):342-353.
- 172. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD.** The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*, **2006**;17(3):319-336.
- 173. Tekin Y, Bozdemir AE, Barutçuoğlu B.** Osteoporoz tanısında kullanılan biyokimyasal göstergeler. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, **2005**;3(2):73-83.
- 174. Mei L, Mochizuki M, Hasegawa N.** Protective effect of Pycnogenol® on ovariectomy-induced bone loss in rats. *Phytother Res*, **2012**;26(1):153-155.
- 175. Susanto LTM.** Serum osteocalcin and bone mineral density in postmenopausal women. *Univ Med*, **2011**;30(3):155-161.
- 176. Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Yeh JK.** Comparative effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and bone mechanical properties in ovariectomized rats. *Exp Anim*, **2006**;55(4):357-367.

- 177.Zhang Y, Lai WP, Leung PC, Wu CF, Yao XS, Wong MS.** Effects of Fructus Ligustri Lucidi extract on bone turnover and calcium balance in ovariectomized rats. *Biol Pharm Bull*, **2006**;29(2):291-296.
- 178.Shiraishi A, Takeda S, Masaki T, Higuchi Y, Uchiyama Y, Kubodera N, Sato K, Ikeda K, Nakamura T, Matsumoto T, Ogata E.** Alfacalcidol inhibits bone resorption and stimulates formation in an ovariectomized rat model of osteoporosis: distinct actions from estrogen. *J Bone Miner Res*, **2000**;15(4):770-779.
- 179.Luo E, Jiao L, Shen G, Wu XM, Xu Q, Lu L.** Effects of the PEMFs of different intensity on BMD and biomechanical properties of rabbits' femur. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **2005**;22(6):1168-1170. [Article in Chinese]
- 180.Xiao D, Yang L, Lei ZJ, Yang YH, Qiang G, He CQ.** Effect of pulsed electromagnetic fields on biomechanical properties of femur in ovariectomized rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, **2010**;41(2):296-8,311. [Article in Chinese]
- 181.Bassett LS, Tzitzikalakis G, Pawluk RJ, Bassett CAL.** Prevention of disuse osteoporosis in the rat by means of pulsing electromagnetic fields. In: Brighton CT, Black J, Pollack SR Eds. *Electrical properties of bone and cartilage: Experimental effects and clinical applications*, 1st Ed., New York: Grune and Stratton, **1979**:311–331.
- 182.Cruess RL, Kan K, Bassett CA.** The effect of pulsing electromagnetic fields on bone metabolism in experimental disuse osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*, **1983**;173:245–250.
- 183.Skerry TM, Pead MJ, Lanyon LE.** Modulation of bone loss during disuse by pulsed electromagnetic fields. *J Orthop Res*, **1991**;9(4):600–608.
- 184.Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G.** Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*, **2002**; 23:398-405.
- 185.Takayama K, Nomura H, Tanaka J, Zborowski M, Harasaki H, Jacobs GB, Malchesky PS, Licata AA, Nose Y.** Effect of a pulsing electromagnetic field on metabolically derived osteoporosis in rats: A pilot study. *ASAIO Trans* **1990**;36(3):M426–M428.
- 186.Zhang JB, Zhang XJ.** Communication between osteoblasts stimulated by electromagnetic fields. *Chin Sci Bull*, **2007**;52(1):98-100.
- 187.Kamolmatyakul S, Jinorose U, Prinyaroj P, Li Y.** Responses of human normal osteoblast cells and osteoblast-like cell line, MG-63 cells, to pulse electromagnetic field (PEMF). *Songklanakarinn J Sci Technol*, **2008**;30(1):25-29.
- 188.Schwartz Z, Fisher M, Lohmann CH, Simon BJ, Boyan BD.** Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Ann Biomed Eng*, **2009**;37(3):437-444.

- 189.Spadaro JA, Bergstrom WH.** In vivo and in vitro effects of a pulsed electromagnetic field on net calcium flux in rat calvarial bone. *Calcif Tissue Int*, **2002**;70(6):496-502.
- 190.Fini M, Cadossi R, Canè V, Cavani F, Giavaresi G, Krajewski A, Martini L, Aldini NN, Ravaglioli A, Rimondini L, Torricelli P, Giardino R.** The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. *J Orthop Res*, **2002**;20(4):756-763.
- 191.Aaron RK, Ciombor DM.** Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *J Orthop Res*, **1996**;14(4):582-589.

EK-1. Sıçanların haftalık vücut ağırlığı değişimleri ve haftalara ait ortalamaları \pm SD değerleri



K (N=8): Kontrol grubu, SH (N=8): Sham grubu, ONX (N=8): Ovariectomi (OVX) + Siyatik sinir nörektomi (sNX) yapılan grup, ONXP (N=11): Ovariectomi (OVX) + Siyatik sinir nörektomi (sNX) yapılarak pulsu manyetik alana maruz bırakılan grup, PMA (N=12): Manyetik alana maruz bırakılan grup.

EK-2. Sıçanların deney süresince vücut ağırlığı ortalamaları \pm SD

	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=8)	ONXP (N=11)	PMA (N=12)
Vücut Ağırlığı (gr)*					
Başlangıç	167,50 \pm 14,69	166,63 \pm 08,18	164,88 \pm 20,62	163,18 \pm 09,36	165,25 \pm 19,47
1. Ay	170,94 \pm 13,66	170,66 \pm 09,46	172,59 \pm 22,38	174,84 \pm 14,11	169,13 \pm 18,56
2. Ay	176,50 \pm 15,35	180,03 \pm 13,22	184,81 \pm 18,17	186,18 \pm 12,02	179,69 \pm 20,42
3. Ay	190,06 \pm 18,07	187,94 \pm 12,84	201,25 \pm 23,59	202,36 \pm 16,34	191,82 \pm 19,02
4. Ay	187,66 \pm 18,44	185,94 \pm 12,92	200,78 \pm 25,53	198,77 \pm 15,65	194,54 \pm 19,92
5. Ay	196,47 \pm 13,30	201,16 \pm 14,28	205,16 \pm 25,07	207,39 \pm 16,88	203,33 \pm 18,70
6. Ay	193,72 \pm 19,58	199,16 \pm 14,07	210,59 \pm 23,42	213,23 \pm 15,22	209,21 \pm 17,17
Final	229,13 \pm 22,33	211,88 \pm 25,35	241,25 \pm 33,54	214,45 \pm 12,30	220,08 \pm 24,97

K: Kontrol grubu, SH: Sham grubu, ONX: Ovariectomi (OVX) + Siyatik sinir nörektomi (sNX) yapılan grup, ONXP: Ovariectomi (OVX) + Siyatik sinir nörektomi (sNX) yapılarak pulslu manyetik alana maruz bırakılan grup, PMA: Manyetik alana maruz bırakılan grup

* Tabloda sıçanların ağırlık ortalamaları 7'şer günlük ölçümlerin aylık (28'er günlük) ortalamaları verilmiştir.

EK-3. Sıçanların pençe geri çekme latansı (PWL; s) ortalamaları \pm SD

	Gruplar				
	K (N=8)	SH (N=8)	ONX (N=8)	ONXP (N=11)	PMA (N=12)
Pençe geri çekme latansı (PWL; s)					
0. Gün	8,05 \pm 1,45	7,83 \pm 0,99	7,92 \pm 1,08	8,18 \pm 0,79	8,10 \pm 1,00
2. Gün	7,99 \pm 0,92	7,89 \pm 0,78	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	8,03 \pm 0,92
32. Gün	7,89 \pm 0,95	7,83 \pm 1,01	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	7,98 \pm 0,87
62. Gün	7,87 \pm 0,98	7,89 \pm 0,78	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	7,84 \pm 0,85
92. Gün	7,83 \pm 0,62	7,80 \pm 0,89	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	7,75 \pm 0,83
122. Gün	7,78 \pm 0,92	7,73 \pm 0,66	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	7,76 \pm 0,75
152. Gün	7,74 \pm 0,64	7,70 \pm 0,58	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	7,68 \pm 0,66
182. Gün	7,71 \pm 0,68	7,64 \pm 0,46	30,00 \pm 0,00 ^{k†}	30,00 \pm 0,00 ^{s†}	7,60 \pm 0,64

K: Kontrol grubu, SH: Sham grubu, ONX: Ovariectomi (OVX) + Siyatik sinir nörektomi (sNX) yapılan grup, ONXP: Ovariectomi (OVX) + Siyatik sinir nörektomi (sNX) yapılarak pulslu manyetik alana maruz bırakılan grup, PMA: Manyetik alana maruz bırakılan grup. ^k K grubu ile karşılaştırma, ^s SH grubu ile karşılaştırma. [†] $P < 0.001$. Tabloda yalnız istatistiksel olarak anlamlı karşılaştırmalar verilmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Serkan GÜRGÜL, 26 Eylül 1978 tarihinde Ankara Çankaya ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimi bitirdikten sonra 2002 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümünden mezun olarak Fizikçi ünvanını aldı. 2002 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. 2005 yılında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında “Manyetik Alanın Kemik Formasyonu Üzerindeki Etkilerinin Biyomekanik Özellikler Yönünden İncelenmesi” adlı yüksek lisans tezini tamamlayarak bu alanda bilim uzmanı ünvanını aldı. Aynı yıl araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Halen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.