

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**AMİODARONUN SIÇAN KEMİK DOKUSU ÜZERİNE OLAN MORFOLOJİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Salih KUYUMCUOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Yusuf GEDİK

Trabzon - 2014

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**AMİODARONUN SIÇAN KEMİK DOKUSU ÜZERİNE OLAN MORFOLOJİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Salih KUYUMCUOĞLU

Trabzon - 2014

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	II
TABLOLAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
RESİMLER LİSTESİ	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Amiodaron	2
2.1.1. Amiodaronun Yapısı	2
2.1.2. Farmakoloji	3
2.1.3. Endikasyonları	5
2.1.4. Etkinlik.....	6
2.1.5. İlaç Etkileşimleri	7
2.1.6. Hemodinamik ve Yan Etkileri	9
2.2. Kemik	15
2.2.1. Kemik Doku ve Histolojisi	15
2.2.2. Kemik Hücreleri.....	16
2.2.3. Kemik Matriksi	19
2.2.4. Periosteum ve Endosteum.....	19
2.2.5. Kemik Tipleri.....	20
2.2.6. Kemikğin Oluşumu:.....	20
2.2.6.1. İntramembranöz Kemikleşme	21
2.2.6.2. Enkondral Kemikleşme.....	22
2.2.6.3. Appozisyonel Kemikleşme	23

2.2.7.	İlaçların Kemik Dokusu Üzerine Etkileri	23
2.3.	Apoptozis	23
2.3.1.	Osteoklastların Apoptozisi	25
2.3.2.	Kemik Remodeling Ünitelerinde Osteoklast Apoptozu.....	26
2.3.3.	Osteoklast Apoptozunun Düzenlenmesi	26
2.3.4.	Osteoblast ve Osteositlerin Apoptozu	28
2.3.5.	Osteoblast ve Osteositlerin Apoptozunun Regülasyonu	29
3.	MATERYAL VE METOD.....	30
4.	BULGULAR	34
5.	TARTIŞMA	44
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
7.	ÖZET	54
8.	SUMMARY	55
9.	KAYNAKLAR	56

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo1:	Oral ve İntrevenöz Amiodaronun Elektrofizyolojik Farklılıkları	5
Tablo 3.	Gruplarda İmmunohistokimyasal Boyanma Bulguları-1	43
Tablo 4.	Gruplarda İmmunohistokimyasal Boyanma Bulguları-2	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Amiodaronun Kimyasal Yapısı	2
Şekil 2:	Kemik Hücrelerinin Görünümü.....	18
Şekil 3:	Kemik Hücrelerinin Oluşumunu Gösteren Şematik Görünüm.....	22
Şekil 4.	Apopitotik Olayların Şematik Sunumu	25

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1:** Femur Epifiz Plağı Proliferasyon Kıkırdak Bölgesi (1) ve Femur Diafiz Kompakt Kemik Bölgesi (2) Kaspaz-3 İmmunohistokimya Boyaması 36
- Resim 2:** Femur Epifiz Plağı Proliferasyon Kıkırdak Bölgesi (1) ve Femur Diafiz Kompakt Kemik Bölgesi (2) Kaspaz-9 İmmunohistokimya Boyaması 37
- Resim 3:** Femur Epifiz Plağı Proliferasyon Kıkırdak Bölgesi (1) ve Femur Diafiz Kompakt Kemik Bölgesi (2) P 53 İmmunohistokimya Boyaması 38
- Resim 4:** Femur Epifiz Plağı Proliferasyon Kıkırdak Bölgesi (1) ve Femur Diafiz Kompakt Kemik Bölgesi (2) Bax İmmunohistokimya Boyaması..... 39
- Resim 5:** Kontrol Grubu Osteoblastlar (A), Osteoklastlar (B1,B2) Hematoksilen&Eozin Boyası..... 40
- Resim 6:** Düşük Doz Grubu Osteoblastlar (A), Osteoklastlar (B1,B2) Hematoksilen&Eozin Boyası..... 41
- Resim 7:** Yüksek Doz Grubu Osteoblastlar (A), Osteoklastlar (B1,B2) Hematoksilen&Eozin Boyası..... 42

KISALTMALAR LİSTESİ

AF	: Atriyal fibrilasyon
AİT	: Amiodaron ilişkili tirotoksikoz
ALP	: Alkalen fosfotaz
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
ERK	: Ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz
FGF	: Fibroblast growth faktör
IGF	: İnsülin growth faktör
M-CSF	: Maktofaj koloni uyarıcı faktör
OPG	: Osteoprotegrin
PTH	: Paratiroid hormon
RANKL	: Reseptör aktivator nükleer kappa B ligandı
SVT	: Supraventriküler taşikardi
T4	: Tiroksin
T3	: Triiodotironin
TNF	: Tümör nekroz faktör
TRAP	: Tartarat rezistant asit fosfotaz
TSH	: Tirotropin
VT	: Ventriküler taşikardi
VF	: Ventriküler fibrilasyon

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amiodaron güçlü bir antiaritmik ilaç olup genellikle diğer antiaritmik ilaçlarla kontrol altına alınamayan ventriküler ve supraventriküler taşikardilerin tedavisinde kullanılır (1). Kontrolü zor olan aritmilerin tedavisinde kullanılması nedeniyle tedaviye genellikle uzun süre devam edilir (2). Yan etki spektrumunun geniş olması, klinikte kullanımını sınırlayan en önemli etkindir. Yüksek iyot içeriği ve yapısal olarak tiroid hormonlarına benzerliği sebebiyle başta tiroid olmak üzere birçok organ ve sistem üzerine istenmeyen etkiler oluşturur (2). Amiodaron kullanan hastalarda ve hayvan çalışmalarında, özellikle tiroit, periferik sinir dokusu, kalp, karaciğer, akciğer ve göz üzerine olan histopatolojik etkileri kapsamlı olarak araştırılmıştır (3). Amiodaronun kemik dokusu gelişimi üzerine histopatolojik olarak veriler çok az bulunmaktadır.

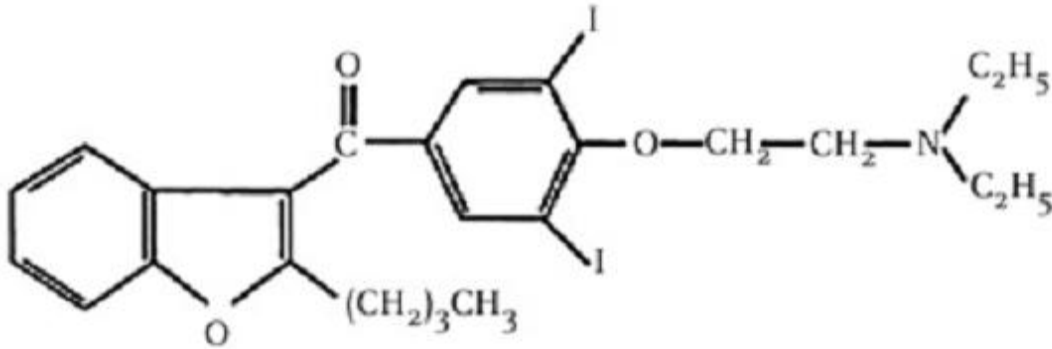
Bu çalışmada amiodaronun kemik dokusu gelişimi üzerine morfolojik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu sayede amiodaron kullanırken yan etkileri izleminde kemik dokusu gelişiminin üzerine etkilerinin de dikkate alınmasına olanak sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Amiodaron

2.1.1. Amiodaronun Yapısı

Amiodaron (2-butyl-3-benzofuranyl 4-[2-(diethyl amino)-ethoxy]-3,5-diiodophenyl ketone) diiyodinize benzofuran türevi, güçlü antiaritmik bir ilaçtır (Şekil 1). 1967 yılında vazodilatasyon özelliği nedeniyle antianginal olarak anjina pectoris tedavisi için üretilmiştir. Antiaritmik etkisi daha sonra keşfedilmesi üzerine günümüzde sıklıkla diğer antiaritmiklerle kontrol altına alınamayan supraventriküler ve ventriküler taşikardilerin tedavisinde kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devleti'nde supraventriküler ve ventriküler taşikardilerin tedavisinde yüksek etkinliği nedeniyle en sık reçete edilen antiaritmik ilaç grubudur (4). Diğer birçok antiaritmik ilaçlar ile karşılaştırıldığında, amiodaron kalp yetmezliği olan hastalarda çok az negatif inotropik aktiviteye sahip olması ve ventriküler proaritmik potansiyeli düşük olması nedeniyle kullanımını avantajlı hale getirmektedir (4). Ancak yüksek yan etki potansiyeli nedeniyle amiodaron kullanan hastalar dikkatli izlenmelidir.



Şekil 1. Amiodaronun Kimyasal Yapısı

2.1.2. Farmakoloji

Farmakokinetik

Amiodaron, benzofuran türevi bir ajan olup yapıca tiroksine (T₄) benzerlik gösterir (3). Molekül ağırlığının yaklaşık %37'si iyodinden oluşmaktadır. Amiodaron ve metabolitlerinin farmakokinetiği karmaşıktır. Oral ve intravenöz kullanımı olan amiodaronun oral biyoyararlanımı değişkenlik (%20 -80) göstermektedir (5). Emildikten sonra, büyük ölçüde enterohepatik sirkülasyona girer. Amiodaron, karaciğerde p450 sitokrom oksidaz bağımlı oksidatif de-etilasyon ile etkileşerek mono-N-desetil amiodaron (desethylamiodarone) oluşur. Bu metabolit, amiodaron gibi aktif ve benzer elektrofizyolojik etkiye sahiptir (6). Oral uygulamadan sonra en yüksek amiodaron serum seviyeleri, 3-7 saat içinde elde edilir. Böbrek atılımı oldukça düşük olması nedeniyle böbrek yetmezliğinde doz azaltılması gerektirmez. Diyaliz ile vücuttan atılımı gerçekleştirilemez.

Oral tedavilerde, istenilen tedavi edici etkinin başlaması iki-üç haftaya kadar uzayabilmektedir. İstenilen tedavi edici etkiye ulaşmak için de tedaviye yüksek doz ile başlanmalıdır. Tedavi başlangıcından üç ile on gün sonrasında ilaç dozu %50 azaltılır. Bu şekilde uzun süreli tedavi halinde 13 ile 142 gün arasında değişen bir plazma yarılanma ömrüne sahiptir. İnfüzyon ile tedavilerde başta albümin olmak üzere, beta-lipoprotein ve alfa-1 asit glikoprotein gibi serum proteinlerine yüksek oranda bağlanır. İnfüzyon süresi uzadıkça amiodarone ve ana metabolitin dokulardaki depolanması da artar. Dokulardaki depolanma, özellikle düşük dozlarda infüzyon ile tedaviye başlandığında, tedavi edici etkinliğin geç başlamasından sorumludur.

Amiodaron ve desetilamiodaron son derece lipofilik ajanlardır (7). Dağılım volümünün geniş olması nedeniyle farklı dokulara alımında değişkenlik göstermektedir. Emildikten sonra, plazma bölmesinde serum seviyeleri başlangıçta hızlı bir şekilde artar. İlk dağılım aşamasından sonra, en yüksek amiodaron ve desetilamiodaron seviyeleri yağ dokusu, akciğer, karaciğer ve lenf düğümleri dokusunda bulunur. Geniş dağılım hacmi, dokularda bekleme süresinin uzamasına yol açmaktadır. Periferik ve derin bölmelerden eliminasyonu çok daha yavaş olmakta, uygulanan ilaç miktarı ve kararlı durum plazma düzeyi ile de arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır. Kronik oral amiodaron tedavisinin kesilmesinden sonra, terminal eliminasyon yarı ömrü 60 güne kadar uzayabilmektedir.

Elektrofizyolojik Etkiler

Amiodaron elektrofizyolojik özellikleri karmaşıktır ve tam olarak anlaşılammıştır. Vaughan-Williams sınıflandırılmasına göre grup III antiaritmik ilaç olmasına karşın aynı zamanda grup I, II, IV antiaritmik etkileride bulunmaktadır. Oral ve intravenöz formlarının klinik kullanımı üzerinde etkisi elektrofizyolojik farklılıklar açısından önemlidir (Tablo 1). Sodyum kanallarındaki blokaj etkisiyle (grup I antiaritmik etki) intraventriküler iletiyi ve kalp hızını yavaşlatır. Beta blokör (grup II antiaritmik etki) ve kalsiyum kanal blokör (grup IV antiaritmik etki) etkisiyle atriyoventriküler düğümde iletiyi geciktirir. Seçici olmayan hem alfa hemde beta blokör etki gösterir. Potasyum kanal blokör etkisiyle miyokardiyal repolarizasyonu uzatarak hücrelerin uyarılmaya karşı refrakter olmasını sağlar. Uzun süreli amiodaron tedavisinde potasyum kanal blokör etkileri daha belirgin hale gelir. Ayrıca kardiyak dokuların çoğunluğunda uyarılmaya karşı direnci artırır.

Tiroksinin (T4) triiodotironine (T3) deiodinasyonunu inhibe edici etkisi de antiaritmik etkisine katkıda bulunur (10). Tedavi sırasında tiroit fonksiyonlarında beklenen değişim; tirotropin (TSH) seviyesinde normal veya hafif artış, T3 seviyesinde azalma, T4 ve reverse T3 seviyesinde artmadır (8).

Oral Amiodaron: Aksiyon potansiyeli süresini ve atriyal ve ventriküler doku refrakter süresini uzatır. Bunda iç potasyum kanal düzelticilerin blokajı primer olarak sorumludur. QT aralığını uzatan amiodaron, diğer sınıf III maddelerin aksine çok az proaritmik aktiviteye sahiptir.

İntravenöz Amiodaron: Kronik oral amiodaron tedavisi gören hastalara göre elektrofizyolojik farklılıklar arz etmektedir. Atriyal ve ventriküler refrakter periyotta minimal bir artış, atriyal ve ventriküler miyokardiyumda aksiyon potansiyeli süresinde ise çok az bir artış sağlar. QRS süresinde veya QT aralığında değişiklik yapmaz ya da az bir artış yapabilir. Sinüs döngü uzunluğu üzerinde çok az etkisi vardır. Sempatik aktivitesinde artış vazodilatör aktiviteyi tetikler ve bunun sonucunda, sinüs hızında hafif bir yavaşlama yapabilir. Daha güçlü ve daha hızlı antiadrenerjik etkinliğe sahip olabilir (9).

İntravenöz amiodaron, oral tedaviye göre daha az derecede olsa da, inaktif sodyum kanallarını inhibe eder (9). Bu özellik ventriküler taşiaritmilerin bastırılmasında ajanın

etkinliği açıklayabilir. İntravenöz amiodaron tedavisi ayrıca AV nodal iletimi ve refrakterliliği uzatır ve atrial taşiaritmili hastalarda ventriküler hızı azaltmada etkilidir.

Tablo1: Oral ve intravenöz amiodaronun elektrofizyolojik farklılıkları:

Değişkenler	Oral Amiodaron	İV Amiodaron
Atriyal ve ventriküler miyokard eylem potansiyeli süresi uzaması	+++	+
Sodyum kanallarını blöke etme	+++	++
Sinüs düğümü faz 4 depolarizasyon yavaşlaması	+++	+
Kalsiyum kanal blokajı	+++	+++
Alfa ve beta reseptörlerin nonkompetitif blokajı	+	+(daha hızlı)
AV düğüm efektif refrakter dönem	↑↑↑	↑↑↑
Ventriküler efektif refrakter dönem	↑↑↑	↑
Kalp hızı	↓↓	-/↓
QRS aralığı	↑↑↑	-/↑
Triiyodotroninin troksine dönüşmesini bloke etme	+++	-

2.1.3. Endikasyonları

Amiodaron, diğer tedavilerin etkili olmadığı veya tolere edilemediği aritmilerin tedavisinde endikedir. Atriyal aritmilerin birçoğunun tedavisi için kullanılabilir, ancak primer olarak atriyal fibrilasyon (AF) olan hastalarda normal sinüs ritmi muhafaza etmek için kullanılır. Tekrarlayan paroksizmal atriyal fibrilasyon önlemek için oral amiodaron kullanılır. Diğer antiaritmik ilaçlardan farklı olarak, ventriküler proaritmik riski düşük olması nedeniyle koroner arter hastalığı, sol ventrikül hipertrofisi, sol ventrikül disfonksiyonu veya konjestif kalp yetmezliği olan hastalara uygulandığında mortaliteyi artırmaz.

Atriyal fibrilasyon farmakolojik kardiyoversiyon için oral amiodaron tedavisi, etkinin uzun başlangıçlı olması ve sınırlı etkinliği nedeniyle birinci seçenek ilaç değildir. AV düğümü ve AV girişi, kavşak taşikardisi, atriyal flutter ve fibrilasyon, koroner arter hastalığı ile ilişkili VT ve VF, hipertrofik kardiyomiyopati dahil olmak üzere geniş spektrumlu olarak in utero, yetişkinlerde ve çocuklarda supraventriküler ve ventriküler taşiaritmileri bastırmak için kullanılır. Çocuklarda, geleneksel tedavilere dirençli seyreden veya hayatı tehdit eden taşiaritmilerin tedavisinde amiodaron etkin bir şekilde kullanılmaktadır (1-3,10).

ICD'si (İmplantable cardioverter defibrillator) olan hastalar, konvansiyonel ilaç alan hastalara kıyasla, amiodaron ile tedavi oldukları zaman daha az şok geçirirler (11). ICD yapılmış hastaların izleminde ikincil koruma olarak amiodaron kullanan hastaların yüzdesi %55-70 kadar yüksek olduğu bildirilmiştir (1, 10). Amiodaron, uyarılma (pacing) eşiği üzerine çok az etkilidir, ancak genellikle elektriksel defibrilasyon eşiğini az miktarda artırır.

Amiodaronun gebelikteki etkileri üzerine yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ancak plasental bariyeri geçerek maternal serum seviyesinin %10-25'ini oluşturacak şekilde fetal serum seviyesine ulaştığı bilinmektedir. Yan etki profili nedeniyle amiodaronun gebelerde kullanımı yaşamı tehdit eder ve diğer ajanlarla başarısız olunması haricinde kullanılmaz. Masif hidropslu komplike fetal supraventriküler taşikardi tedavisinde amiodaron tedavisi göbek ven ponksiyonu yoluyla başarıyla verildiğine dair yayınlar mevcuttur (12).

2.1.4. Etkinlik

Amiodaron, tekrarlayan veya dirençli VF/nabızsız VT tedavisinde diğer oral ilaçların cevapsız kaldığı durumlarda %60-80 hastada etkin bulunmuştur (13). VF'a bağlı kalp durması hastalarında amiodaronun plasebo ve lidokain ile karşılaştırıldığı çalışmalarda, amiodaron resüsitasyonun kısa dönem başarısını iyileştirmede plasebo ve lidokaine göre daha üstün bir ajan olarak bulunmuştur (14). İntravenöz amiodaron ayrıca resusitasyon sırasında lidokainin yerini almıştır. Kanada'da yapılan bir çalışmada, atriyal fibrilasyonlu hastalarda sinüs ritminin devam ettirilmesinde amiodaron, sotalol ve diğer antiaritmik ilaçlara göre daha başarılı bulunmuştur (15).

Amiodaronun survey üzerine etkisini araştıran birçok çalışma mevcuttur. Conventional Versus Amiodarone Drug Evaluation (CASCADE) çalışmasında, standart antiaritmik tedavi ile karşılaştırıldığında amiodaron hastane dışı VF nedeniyle resüsite edilen hasta gruplarında kardiyak mortalite, kardiyak arrest ve senkopu anlamlı olarak azaltmaktadır (16). Congestive Heart Failure Survival Trical of Antiarrhythmic Therapy (CHF-Stat), European Myocardial Infarct Amiodarone Trial (EMIAT) ve Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial (CAMIAT) çalışmalarında ise antiaritmik etkinliğin yanısıra yaşam süresi üzerine olan faydalı etkileri de gösterilmiştir (15,17).

Hem oral hem de İV kullanılabilen ilaç esas olarak miyokardiyumda birikmekte aynı zamanda yağ dokuları, karaciğer ve akciğer dokularında da tutulmaktadır. Ağırıklı olarak karaciğerde yıkılır ve desetilamiodarona çevrilir ki bu molekül de yüksek konsantrasyonlarda elektrofizyolojik olarak etkili olabilmektedir. Hem amiodaronun hem de metabolitlerinin böbreklerden atılımı, ihmal edilebilir düzeylerde düşük olduğundan böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlanması gerekmemektedir. Çocuklarda çok daha hızlı metabolize olmaktadır. İlacın etkisi dakikalar içinde ortaya çıkmakla birlikte, çocuklarda ilk haftada görülmektedir (18). Etkisinin çabuk ortaya çıkması nedeni ile amiodaron akut disritimlerde oldukça iyi sonuç vermektedir.

İntravenöz amiodaron tedavisi, konjenital kalp hastalığını düzeltici cerrahilerden sonra ortaya çıkan ventriküler taşikardilerde yüksek etkinliğe sahiptir (19). Bu tür cerrahi girişimler sırasında ortaya çıkabilen ve ani ölüm için önemli risk faktörü olan atriyal flutter de amiodaron ile % 97 baskılanabilmektedir (20). Postoperatif gelişen atriyal ektopik taşikardi ve junctional ektopik taşikardilerde amiodaron tedavisi etkili bulunmuştur (21).

Plasentadan geçebildiği için maternal kullanım sayesinde tedaviye dirençli olgular dahil fetal disritimlerin tedavisinde de oldukça etkili bir ilaçtır. Ek olarak anne sütüne de geçebilmektedir (22). Uzun yıllar erişkinlerde yaygın olarak kullanılmakta olan amiodaronun çocuklardaki kullanımını da giderek artmaktadır. Bebeklik dönemi dahil çok küçük yaşlarda kullanılabilmesi önemli bir özelliğidir.

2.1.5. İlaç Etkileşimleri

Amiodaron tüm antiaritmik ilaç grublarının etki mekanizmalarına sahip olması nedeniyle geniş spektrumlu antiaritmik bir ilaçtır. Önemli ilaç etkileşimleri bulunan amiodaron, sitokrom p450 izoenzimi olan CYP3A4 tarafından kendisiyle aynı farmakolojik özelliklere sahip desetilamiodarona metabolize olur. CYP1A2, 2C9,3A4 ün ise inhibitörüdür. Aynı zamanda p-glikoprotein sisteminin de inhibitörüdür (23).

Beta blokörler: Metoprolol (β -bloker) amiodaron ile birlikte uygulandığında sinüs bradikardisine neden olabilir. Etkileşim mekanizması açık olmamakla birlikte β -adrenoseptör bloke edici etkisinin katkı yaptığı düşünülmektedir. Metoprolol negatif kronotropik etki ile de bradikardiye neden olmaktadır.

Sisaprid: Sisaprid kullanımına bağlı ciddi kardiyak aritmi, VT, VF, torsades pointes, QT uzaması rapor edilmiştir. hayatı tehdit eden kardiyak aritmiler ve ölüme yol açması nedeniyle ABD 'de kullanımdan kaldırıldı. Amiodaronun, QT uzaması ve kardiyak aritmileri uarması nedeniyle sisaprid ile eşzamanlı kullanımı kontrendikedir (24).

Siklosporin: Amiodaron siklosporin tedavileri eş zamanlı olarak kullanıldığında, siklosporin konsantrasyonunun artmasına neden olabilir. Gastrointestinal sistemde CYP (ekstrahepatik CYP3A4) ya da mide boşalmasında azalma siklosporinin metabolizmasının azalmasına neden olur. Bu da siklosporinin toksisitesini artırır.

Kalsiyum kanal antagonistleri: Kalsiyum kanal antagonistleri ile amiodaronun birlikte kullanılması ağır bradikardilere ve atriyoventriküler bloklara sebep olabilir. Amiodaron ve diltiazemin kombine kullanıldığı konjestif kalp yetmezlikli 61 yaşındaki kadın hastada sinus arresti rapor edilmiştir (25). Bu etkileşimin olası mekanizması ek kalsiyum kanal bloke edici etkisi nedeniyle olduğu düşünülmektedir.

Digoxin: Eş zamanlı digoksin ve amiodaron alan hastalar serum digoksin konsantrasyonlarında önemli bir artış bildirilmiştir (26). Digoxinin böbrek ve böbrek dışı klirensinin azalması durumunda ilaç etkileşiminden şüphenilmelidir. Gastrointestinal yolda p-glikoprotein sistem inhibisyonu sonucu digoxin biyoyararlılığı artmaktadır (23). Serum digoksin düzeylerindeki arttırıcı etkisi nedeniyle bu iki ilacın birlikte kullanıldığı durumlarda digoksin dozunun %50 kadar azaltılması ve digoksin düzeyinin yakın takibi gerekir (12).

Fenitoin: Fosfenitoin, fenitoin öncülü ön ilaçtır. Amiodaron ve fosfenitoinin eşzamanlı olarak kullanılması, fenitoinin serum konsantrasyonlarında önemli bir artışa (2-3 misli) neden olabilir (27). Etkileşimin olumsuz etkileri olarak nistagmus, tremor, ataksi, uyuklama ve hiperrefleksi gibi fenitoin toksisite belirtilerini içerebilir. Buna ek olarak, amiodaronun antiaritmik etkilerinde azalma oluşabilir.

Warfarin: Amiodaron eş zamanlı olarak tatbik edildiği zaman, warfarin metabolizmasında bir azalma bildirilmiştir. Amiodaronun hepatik CYP3A4 inhibisyonu warfarin metabolizmasında azalmaya neden olur. Plazma warfarin konsantrasyonunun artması sonucu hipoprotrombinemik etki ile kanama komplikasyonlarında artışa neden olur. Birlikte kullanımın olumsuz etkileri 1-2 hafta içinde görülmeye başlar ve amiodaron

kesildikten 1-3 ay sonrasına kadar sürebilir (28). Warfarin artan etkisi, muhtemelen çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin metabolizmasında bir artış nedeniyle olmaktadır.

Diğer antiaritmik ilaçlar: Dofetilidinde ve amiodarona birlikte kullanımı tavsiye edilmez çünkü dofetilidinde düzeltilmiş QT aralığını uzattığı gösterilmiştir (29). Amiodaron ve flekainidin birlikte uygulanması, flekainidin metabolizmasını azaltarak plazma konsantrasyonlarında 2 kat artışa neden olmaktadır (30). Bu da kardiyak aritmi potansiyelini artırmaktadır. İzlemede kardiyak aritmi açısından hastalar moniterize edilerek takip edilmeli ve plazma flekainid konsantrasyonu ölçülmelidir. Gerekirse %50 oranında doz azaltılmalıdır. Lidokain, amiodaron ile beraber verildiğinde lidokain klirensinde azalma yapabilir. Sotalol monoterapinin QT aralığının uzamasına neden olduğu gösterilmiştir, bu nedenle amiodaron ve sotalol eşzamanlı kullanılması tavsiye edilmez (31). Sotalol, amiodaron ile beraber kullanıldığında kardiyak arrest, QT uzaması ve torsade de pointes riskinde artma oluşturabilir.

Diğerleri: Barbitüratlar serum amiodaron düzeyinde azalma, simetidin ise artışa neden olur. Antibiyotikler, antifungal ilaçlar, antiepileptikler ve antihistaminikler gibi çocukluk döneminde sık olarak kullanılan ilaçlar da amiodaron ile etkileşim gösterir. Ayrıca teofilinin aritmi oluşturucu etkileri nedeniyle özellikle QT mesafesini artıracak diğer ilaçlarla birlikte kullanılmamasına dikkat edilmelidir. Amiodaron kullanmakta olan çocuklara başka bir ilaç başlanması planlanıyor ise tedavi öncesinde bu ilaçların amiodaron ile etkileşimlerinin değerlendirilmesi gerekmektedir (2, 12).

2.1.6. Hemodinamik ve Yan Etkileri

Hemodinamik Etkiler

Amiodaronun intravenöz yolla kullanımında en belirgin hemodinamik etkisi arteriyel vazodilatasyon ve negatif inotropiye ikincil gelişen sistemik hipotansiyondur. Arteriyel vazodilatasyon etkiden esas olarak, ilacın damar yolu ile verilen ticari formlarının hazırlanmasında kullanılan solvent polisorbata-80 sorumludur (10, 12). Çocuklarda, damar yolu ile tedaviler sırasında % 40'a varan sıklıklarda hipotansiyon rapor edilmiştir (12).

Koroner sinüs kan akımında artma, kardiyak indekste artma ve sistemik damar direncinde azalma amiodaronun akut İV kullanımının sonucu görülmektedir. Ayrıca akut

dönemde intrinsik negatif inotropik etki sergilemektedir. Amiodaronun kardiyak aritmileri kontrol etmeye yeten oral dozları, düşük ejeksiyon fraksiyonu olan hastalarda dahi sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu baskılamaz hatta kalp debisini biraz arttırabilir. Ancak amiodaronun antiadrenerjik etkilerinden dolayı ve negatif inotropik etkiler sergilediği için, marjinal kardiyak kompensasyonu olan hastalara, özellikle de intravenöz olarak dikkatli bir şekilde verilmelidir.

Uzun dönem amiodaron kullanımı QT intervalini uzatarak nadir de olsa ventriküler aritmilere neden olabilir. Amiodaron tedavisi sırasında hastaların %1.6'sında tedavi kesilmesini gerektirecek düzeyde bradikardi ve % 0.5'inde torsade de pointes (TdP) gelişir (32). Hipopotasemi, hipomagnezemi ve hipokalsemi gibi elektrolit bozuklukları, polimorfik ventriküler taşikardiye neden olabildikleri gibi diğer antiaritmik ajan kullanan hastalarda tetikleyici rol de oynayabilirler (33).

Amiodaronun hemodinamik yan etkileri, ilacın klinik yararlılığını sınırlayan major komplikasyon olarak kabul edilmektedir. Doz azaltılması veya kristalloid solüsyonları ile hipotansiyon kontrol altına alınabilir. Tedavinin kesilmesini gerektirecek hipotansiyon nadiren gelişir. İnfüzyon hızı azaltılarak hipotansiyon kontrol altına alınabilir. Negatif inotropi etkisi zayıf olmakla birlikte genellikle geçicidir ve kardiyak debide azalma pek oluşturmaz. Sol ventrikül sistolik fonksiyonlarında bozukluk olan hastalara amiodaron damar yolu ile verilecekse yakın takipleri gerekir (12).

Yan Etkiler

Amiodaron, yan etki profili geniş olan bir ilaçtır. En sık yan etkiler ciltte pigmentasyon değişikliği, fotosensitivite, hepatit, tiroit fonksiyonlarında bozulma, korneal depolanma, pulmoner fibrozis, kemik iliği baskılanmasıdır (12). İstenmeyen etkilerin çoğu, dozun azaltılması yada tedavinin kesilmesi ile geriye dönmektedir. İlacın kesilmesini gerektirecek en sık yan etkiler pulmoner ve gastrointestinal sisteme ait şikayetlerdir. Amiodarona bağlı yan etkiler daha çok uzun dönemli ve yüksek dozlarda yapılan tedavilerde ortaya çıkar (10).

Amiodaron kullanan anne bebeklerinde prematürite, düşük doğum ağırlığı, fetal hipotroidi veya hipertroidi, uzun QT sendromu, bradikardi gibi yan etkiler görülebilir (34). B-bloker ile amiodaron birlikte kullanımı ise bradikardi ve intrauterin gelişme geriliğine

neden olabilir. Embriyonik dönemde amiodarona maruz kalan hastalarda doğumsal anomaliler görülebilir.

Tiroit

Amiodaron benzofuranik türevi bir ilaç olup, yapısal olarak tiroksine çok benzemektedir. Ağırlığının %37'sini iyot oluşturmaktadır. Her gün molekülün %10'u deiodinize olmakta ve günlük doz 200-600 mg arasında değiştiğinden günde 7-21 gr iyot dolaşımında serbest kalmaktadır. Günlük önerilen iyot alımının 150-200 µg arasında olduğu göz önünde tutulursa, amiodaron tedavisi 50-100 kat daha fazla iyot salınmasına neden olmaktadır. Amiodaronun yarı ömrü 52.6 ± 23.7 gün, metaboliti olan desetilamiodaronun yarı ömrü ise 61.2 ± 31.2 gündür. Bu nedenle amiodaron tedavisi kesildikten sonra da etkileri devam etmektedir .

Periferik dokularda özellikle karaciğerde tip 1-5' deiodinazı inhibe etmekte ve bu şekilde T4'ün T3'e ve T3'ün 3-3' diiodotironine dönüşümünü engellemektedir (35). Amiodaron periferik dokularda tiroid hormon girişini inhibe ederek T4 seviyesini arttırmakta ve serbest T3 seviyesinde düşmeye neden olmaktadır. Hipofiz bezi seviyesinde ise amiodaron, TSH sentezini ve sekresyonunu etkilemekte ve tip 2-5'deiodinaz enzimini inhibe ederek TSH konsantrasyonunu arttırmaktadır (36).

Amiodaron tiroid follikül hücreleri üzerinde direkt sitotoksik etkiye sahiptir. İyot ilaca ait bu toksik etkiye katkıda bulunmaktadır. Tiroiddeki miktarı amiodarondan daha fazla olan desetilamiodaronun tiroid hücreleri üzerindeki toksik etkisi ilacın kendisinden daha yüksektir (37).

Amiodaron tedavisi alan hastaların büyük çoğunluğu ötiroid kalmakla birlikte, tirotoksikoz ve hipotiroidi gibi tiroid disfonksiyonları görülebilmektedir (38). Amiodaron ilişkili tirotoksikoz (AİT) daha çok iyot alımının az olduğu bölgelerde görülürken, amiodaron ilişkili hipotiroidi (AİH) daha çok yeterli iyot alımının olduğu bölgelerde görülmektedir (39).

Amiodaron İlişkili Tirotoksikoz (AİT): Aniden gelişebileceği gibi daha çok amiodaron tedavisinin erken döneminde ya da yıllar sonra gelişebilmektedir. Erkeklerde kadınlardan üç kat daha sık görülmektedir (40). Patogeneizde düşünülen muhtemel

mekanizmalar, amiodaron tedavisi ile alınan yüksek iyodin miktarına bağlı artmış hormon sentezi ve ilacın tiroit dokusunda oluşturduğu hasara bağlı artmış hormon salınımıdır (41). İki tip AİT tanımlanmıştır: Tip 1 AİT ve Tip 2 AİT.

Tip 1 AİT: Genellikle tiroid anormalliği olan hastalarda ve özellikle difüz ya da nodüler guatrı olan ya da latent Graves hastalığı olan hastalarda görülmektedir. İyotun neden olduğu fazla tiroid hormon sentezinden ve salınımından kaynaklanmaktadır. İyot organifikasyonunda bozukluğa rastlanmamıştır. İnterlökin (IL)-6, tip 1 AİT olan hastalarda normal ya da hafif yüksek seviyede bulunmaktadır. Radyoaktif iyot “uptake” (RAIU) ise tip 1 AİT’de normal, düşük ya da yüksek bulunabilir (42).

Tip 2 AİT: Önceden sentezlenmiş tiroid hormonlarının zarar görmüş tiroid folliküler hücrelerinden salınmasından kaynaklanan destrüktif tiroidittir. Tirotoksik faz hipotiroidi ile sonlanabilmektedir. IL-6 seviyeleri belirgin olarak yüksek ve renkli akım doppler USG’de vaskülarite belirgin azalmış olarak bulunur (42).

Tip 1 AİT Tedavisi: AİT tedavisi güç bir durumdur. Tip 1 AİT tedavisinin amacı iyotun organifikasyonunun ve tiroid hormon sentezinin engellenmesidir. Yüksek intratiroid iyot miktarı konvansiyonel tionamid tedavisinin etkinliğini azaltmaktadır (39). Düşük ya da baskılanmış RAIU radyoaktif iyot tedavisini engeller. Medikal tedaviye cevapsız AİT’de tiroidektomi denenebilir. Plazmaferezin etkili olduğu gösterilmiştir, ancak etkisi kısa süreli ve geçicidir (43). İyottan zengin tiroid bezi tionamidlerin etkisine daha dirençli olduğundan tedavide daha yüksek dozlarda metimazol veya propiltiyourasil kullanılmalıdır. Ayrıca, iyodun tiroid bezine girişini engelleyen potasyum perklorat ile tionamidlerin tedavi etkinliği arttırılabilir. Ötiroidi sağlandıktan sonra genellikle altı haftada potasyum perklorat kesilmelidir (44).

Tip 2 AİT Tedavisi: Tionamidler ve potasyum perklorat tip 2 AİT’nin patogenezinde destrüktif bir olay olduğundan tedavide uygun değildir (45). Tedavide steroidler membran stabilize edici ve antiinflamatuvar etkileri ve aynı zamanda 5’ deiodinazı inhibe edici etkileri nedeniyle kullanılmaktadır. Steroid tedavisi kesildiğinde tirotoksikoz tekrarlayabilmektedir. Böyle bir durumda steroid tedavisi tekrar başlanmalıdır. Mikst form AİT’de metimazol, propiltiyourasil ve steroid tedavisi en etkin tedavi rejimidir.

Amiodaron İlişkili Hipotiroidizm (AİH): İyotun yeterli olduğu bölgelerde daha sık rastlanmaktadır. Kadınlarda 1.5 kat daha sık görülmekte ve kadın cinsiyet ile antitiroid peroksidaz antikor (anti-TPO) pozitifliği önemli risk faktörleri kabul edilmektedir. Her iki özelliğin bulunması halinde risk 13.5 kat artmaktadır (46). Bu yüzden amiodaron kullanılacak hastalarda Hashimoto hastalığının olması önemli bir risk faktörüdür.

Levotiroksin (LT4) tedavisi alan hastada amiodaron tedavisi T4'ün T3'e dönüşümünü engelleyeceğinden, ilaç daha yüksek dozlarda verilmelidir. Eğer kardiyak sorun için amiodaron tedavisi gerekli ise levotiroksin tedavisiyle devam edilir, amiodaron tedavisi kesildiğinde hipotiroidizm kendiliğinden düzelecektir ve bu nedenle hastanın sık aralıklarla kontrolleri yapılmalıdır. Amiodaron tedavisi kesildikten sonra ötiroidi periyodunu kısaltmak için kısa dönem (10-30 gün arası) potasyum perklorat verilebilir. Potasyum perklorat tiroid "uptake"ini inhibe eder, böylece intratiroid iyotun inhibitör etkisini engeller (47).

Akciğer:

Lipofilik özelliğinden dolayı, hedef hücre ve dokularda fosfolipid birikimine neden olur. Amiodarona bağlı akciğer toksisite insidansı %1-17 olarak bildirilmektedir (48). Toksikite oluşum mekanizması tam olarak açıklanamasa da, direkt toksik etki ve/veya indirekt immünolojik mekanizmalara bağlı olduğu düşünülmektedir. Nonproduktif öksürük, nefes darlığı, kilo kaybı ve göğüs ağrısı gibi semptomlar akciğer toksisitenin belirtisidir. Pulmoner ödem veya emboliyi taklit eden ani nefes darlığı ve alveoler infiltrasyonlar ile karakterize akut bir klinik tabloya neden olabilir.

Plevral reaksiyonlar; üst lob infiltrasyonları, difüz interstisyel infiltrasyon, akut solunum sıkıntısı sendromu veya pnömoniye benzer konsolidasyon alanları, soliter ya da multipl nodül veya kitle lezyonları, atelektazi, bronşiektazi ve fibrozis gibi pek çok görünümde ortaya çıkabilir (49).

Cilt :

Amiodaronun alopesi, ürtiker, Stevens-Johnson sendromu, fotosensitivite, mavi-gri renk değişikliği gibi dermatolojik yan etkileri bulunmaktadır. Fotosensitivite, amiodaron kullanan hastaların %30-57'sinde görülürken, kütanöz hiperpigmentasyon %1-10'unda ortaya çıkmaktadır (50).

Fototoksitenin klinik önemi deri katlantı yerlerinin korunduğu gün ışığına yüksek maruziyet olan yerlerdeki (malar bölgeler, burun gibi) hiperpigmentasyonun yoğun oluşu ile ortaya çıkmaktadır. Amiodarona bağlı hiperpigmentasyonda, hem sarımsı-kahverengi taneciklerin bulunduğu çok sayıda hücre tipleri hem de lenfositik dermatit birarada bulunmaktadır. Kütanöz hiperpigmentasyon, amiodaron kullanım süresine, dozuna ve ilacın metabolizmasına bağlıdır (51). Amiodaron yan etkileri sık ortaya çıkmasına rağmen, çoğu tedavinin kesilmesini gerektirecek şiddette değildir. Tedavi başlanan hastaların yan etkiler açısından uyarılması ve yakından izlenmesinin gerekli olduğu hastaya vurgulanmalıdır.

Göz:

Hastaların büyük çoğunluğunda korneada mikrodepozitler birikir ve çoğunlukla ilacın kesilmesini gerektirmez. Lakrimal sıvıya salınabileceği gibi özellikle korneal bölgenin alt kısmında birikerek mikrodepozitler oluşur (52). Bu tablo dozdan bağımsız olmakla birlikte ilaç kesildikten sonra düzelir. Hastaların en sık şikayeti geceleri ışıkların etrafında mavi–gri halkalar ve haleler görmesidir. Ayrıca bulanık görme, gözde kuruluk ve göz kapağında tahriş şikayetin yol açabilir.

Amiodarona bağlı optik nöropati ile serum ilaç konsantrasyonu arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır. Ancak kullanım süresi ve toplam doz arttıkça riskin arttığı da gözlenmiştir. Optik disk ödemi ile başvuran tüm olgularda sistemik hastalık ve ilaç kullanım öyküsü mutlaka alınmalıdır. Görme alanında ve optik diskte patolojik değişiklikler saptandığında olası komplikasyonlardan korunmak için bir kardiyoloğa danışılarak amiodaron tedavisi kesilmeli, kesilemiyorsa ilacın dozu azaltılarak hasta takip edilmelidir.

Diğer Yan Etkiler:

Amiodaronu yüksek doz alan yaşlı hastalarda, %30' lara kadar varan oranlarda nörolojik yan etkiler görülebilmektedir. En sık olarak gözlemlenen durumlar tremor, ataksi, periferik nöropati, yorgunluk, uyku bozuklukları, baş dönmesi ve baş ağrısıdır (52). Bu durumlarda genellikle ilacın dozunun azaltılması yeterli olmaktadır, nadiren ilacın kesilmesi gerekmektedir.

Gastrointestinal yan etkiler genellikle tedavinin başlangıcında oluşur. Amiodaron alan hastalarda bulantı, kusma, karın ağrısı ve sekresyonlarda artma gibi belirtiler genelde doza bağımlı olarak görülmektedir. Amiodaronun yemeklerle alınması veya dozunun azaltılması yan etkilerinin kaybolmasına neden olabilir. Özellikle artmış aminotransferazlar ve alkalin fosfatase konsantrasyonları, karaciğer fonksiyon testlerindeki anormallikler, hastaların % 4-25'inde oluşmaktadır. Hepatik toksisite genelde doza bağımlı ve geri dönüşümlüdür. Sarılık, hepatomegali, asit, kollajen depolanması gibi hepatotoksisite belirtileri ve semptomları görülebilir (53).

Epididimit ve erektil disfonksiyon son derece nadir olarak görülmektedir. Amiodarona bağlı epididimit gelişen hastalarda ilacın dozunun azaltılması veya kesilmesi ile düzelme sağlanabilmektedir (54). Yetişkinlerde uzun süreli amiodaron kullanımına bağlı olarak serum Folikül Uyarıcı Hormon, serum Luteinizan Hormon düzeylerinde artış, hastalarda libidoda ve seksüel fonksiyonlarda azalma gibi etkilerin olduğu görülmüştür.

Kardiak aritmi için kullanılan amiodaronun kemikler üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada osteoporoz için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Atrial fibrilasyonlu hastalarda kırık riskini artırmaktadır (55). Ancak literatürde amiodaronun kemik üzerine etkilerini morfolojik düzeyde inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır.

2.2. Kemik

2.2.1. Kemik Doku ve Histolojisi

Kemik; hidroksiapatit kristallerinden, osteoblastlardan, osteositlerden, osteoklastlardan, hematopoetik hücrelerden, kollajen liflerden, kan damarlarından ve sinirlerden oluşmuş insan vücudunun en sert dokularından birisidir. Organik ve inorganik bölümlerden oluşan kemiğin %30-35'ini organik, %60-65'ini inorganik kısım oluşturur (56). Organik bölüm; %98 matriksden ve %2 hücrelerden oluşur. Matriks, mineralizasyon için gerekli ortamı hazırlar.

Kemiğin %25'den fazlası, matriksin ise %90'ı kollajendir. Kemikte en fazla bulunan kollajen, %85-90 tip 1 kollajendir. Matrikste, kemik hücreleri, lipitler, proteoglikanlar ve diğer kollajen dışı proteinler bulunmaktadır (56). Kollajen lifler,

mineralizasyonun gerçekteştiği yapısal çatı ve iskeleti oluşturur. Osteokalsin, matriks dışı organik proteinler arasındadır ve düzeyi kemik yapım ve yıkım olaylarının bir göstergesidir. Osteokalsin, paratiroid hormon (PTH) tarafından inhibe ve 1-25 dihidroksivitamin D tarafından aktive edilir. İnorganik bileşenler arasında kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfat sayılabilir.

Mekanik ve biyolojik özelliklerine göre iki tip kemik dokusu mevcuttur. Primer kemik (immatür, kaba lifli), embriyonik iskeleti oluşturur ve gelişme süreci içerisinde lameller kemik ile yer değiştirir. Öncü kırık tamir dokusunu oluşturur ve remodelizasyon sırasında lamellar kemik ile yer değiştirir. Lamellar kemiğe göre çökme ve rezorpsiyonun daha hızlı olduğu ve matriks mineralizasyonunun düzensiz bir şekilde olduğu görülür. Kollajen liflerinin diziliminin zayıf olması, yüksek hücre ve su içeriğinden dolayı lamellar kemiğe göre daha az sert ve daha kolay deforme olabilmektedir.

Lamellar kemik, doğumdan sonra görölmeye başlar. Gelişme sürecinde immatür kemiğin yerini alır. Kollajen lifler tabakalar halinde paralel olarak sıralanması nedeniyle sıkı bağlantı yaparlar ve kemik dayanıklılığını artırırılar. Yapısal olarak spongiöz (kansellöz, trabeküler) kemik ve kortikal (kompakt) kemik olmak üzere iki tip lamellar kemik bulunur. Kortikal ve spongiöz kemik matriks içeriği ve yapısı aynı olmakla birlikte birim hacme düşen kemik matriks miktarı kortikal kemikte daha fazladır. Elastisite ve kompresif dayanıklılık açısından kortikal kemik spongiöz kemiğe göre on kat daha üstündür. Matür kemiğin %80'ini kortikal kemik oluşturur. Uzun kemiklerin diafizinde kalın, kısa kemiklerdeki yoğun spongiöz kemik çevresinde ise ince bir kortikal tabaka bulunur (57).

2.2.2. Kemik Hücreleri

Osteoprogenitör Hücreler:

Osteoprogenitör hücreler, mezenşimden köken alan kök hücrelerdir. Yeni kemik oluşumu olayı olan osteogenezde, bir grup yenilenebilen osteoprogenitör hücre (osteoblast prekürsör hücreleri), kendilerini kemik oluşturacak hücrelere dönüştüren moleküler uyarıya cevap verebilecek niteliktedir.

Bu hücreler; mitoz kapasitesine sahip olup daha sonra olgun kemik hücrelerine dönüştürler. Oval veya uzamış çekirdek ve belirgin olmayan sitoplazma içeren asidofilik iğ

şekilli hücrelerdir. Periosteum ve endosteumun iç yüzeyleri ile kompakt kemiğin vasküler kanalları içerisinde yerleşmişlerdir. Bu hücreler normal histolojik kesitlerle gösterilemezler.

Kemik Döşeyici Hücreler:

Kemiğin yeniden şekillenmesi olmayan yerlerde, kemik yüzeyi bir yassı hücre tabakası ile kaplanmıştır. Bu hücrelerin ince bir sitoplazması ve perinükleer bölgede az miktarda organelleri vardır. Kemiğin dış yüzeyini döşeyen bu hücrelere periosteal hücreler; iç yüzeyini döşeyenlere ise endosteal hücreler adı verilmektedir. Bu hücrelerin sitoplazmik uzantılarının birbirleri ile ilişkili olduğu yerlerde oluklu bağlantılar (neksus) mevcuttur. Döşeyici hücreler osteoblastlardan köken almaktadırlar (58). Kemik matriksindeki osteositlerin devamlılığını sağlar ayrıca kemikteki kalsiyum ve fosfatın regülasyonunda rol aldıkları düşünülmektedir.

Osteoblastlar:

Osteoblastlar, 20-30 mikrometre çapında, kübik, büyük oval çekirdekli ve çok sayıda çekirdekçik içeren hücrelerdir. Tip 1 kollajen, proteoglikan ve glikoprotein sentezi yaparak kemik matriksinin organik kısımlarının üretimini sağlarlar. Matriksin kollajen dışı proteinlerinin (osteonektin, osteokalsin, osteopontin, sialoproteinler, prostaglandinler, kollajen inhibitörleri, plazminojen aktivatörleri gibi) üretiminden sorumludur. Osteoblastlar sitoplazmalarında alkalen fosfataz (ALP), yüzeylerinde parathormon reseptörleri, çekirdeklerinde östrojen reseptörleri içerirler. Ancak kalsitonin reseptörleri içermezler. Osteoblastlar, osteoklast birikimi ve aktivitesi için gerekli olan sistemik uyarıları düzenler (59). İnorganik kısımların yapılabilmesi de osteoblastların varlığı sayesinde olur.

Osteositler:

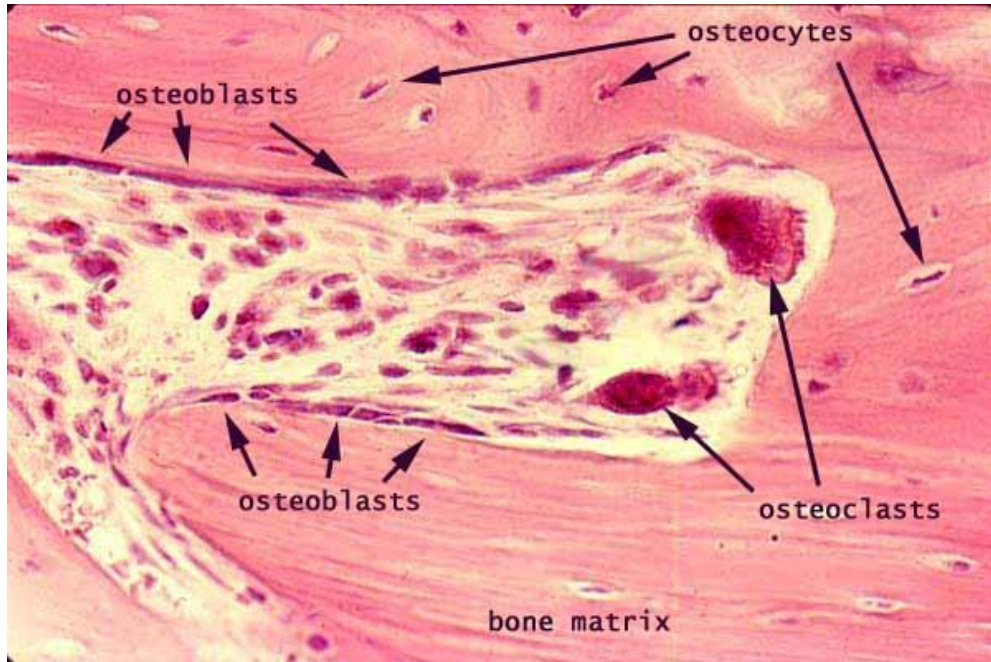
Osteositler, kemik hücreleri içerisinde sayıları en çok olan hücre grubudur. Osteoblastlardan kaynaklanırlar ve matriks lamelleri arasında bulunan lakunalar içine yerleşmişlerdir. Her lakunada sadece bir osteosit yer alır. Fiziksel strese maruz kalan kemikte ilk etkilenen hücre osteositlerdir. Osteositler osteoblastları, osteoblastlar da osteoklastları aktive ederek kemik rezorpsiyonu başlatılır (60).

Osteositlerin sitoplazmik uzantıları ince silindirik kanalcıklarla sarılmıştır. Komşu osteositler sitoplazmik uzantılarının birbirleri arasında yaptıkları hücre bağlantıları ile iletişimi oluşturup, besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlarlar. Osteositler aynı zamanda kemik matriksin yapım ve yıkımında rol alan hücrelerdir.

Osteoklastlar:

Osteoklastlar çok büyük, ileri derecede dallanmış ve hareketli hücrelerdir. Bu hücreler, kan kaynaklı monositlerin birleşmesi ile meydana geldikleri için "mononükleer fagositoz sisteme" dahildirler (60). Osteoklast prekürsör hücreleri kemik iliği, dalak ve az sayıda dolaşımda bulunur. Hücrelerde pek çok lizozomla birlikte, bol miktarda serbest polizom, bir parça granüler endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondriya ve gelişmiş golgi kompleksi de vardır.

Osteoklastlar kemik matriksine hücum eden, asid, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgırlar. Ayrıca tartarata dirençli asit fosfotazı da sentezler (60). Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest hale getirirler ve kemik rezorpsiyonu sırasında meydana gelen artıkların da ortadan kaldırılmasında aktif rol alırlar.



Şekil 2: Kemik Hücrelerinin Görünümü

2.2.3 Kemik Matrisi:

Lameller kemik incelendiğinde, kemik dokusunun hacimsel olarak %90'ından fazlasını kemik matrisi oluşturur (61). Kemik matrisi organik ve inorganik içeriğe sahiptir. İnorganik kısım yaş kemik ağırlığının yaklaşık olarak % 65'ni oluşturur (61). Temel olarak kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonattan oluşur. Ayrıca az miktarda kalsiyum florid ve magnezyum florid içerir. İnorganik matris iyon rezervuarı olarak görev yapar ve kemiğin dayanıklılık ve sertliğini sağlar (61).

Organik kısım temel olarak kollajenden meydana gelir. Organik matrisin yaklaşık % 90'ını oluşturan kollajen osteoblastlar tarafından üretilir. Organizmada en fazla bulunan kollajen tip-I'dir ve bağ dokusunda geniş bir alan teşkil etmektedir. Organik matrisde kollajen tip-I'in dışında III-V-XI ve XIII'de bulunmaktadır. Kemiğe şeklini verir ve elastisite sağlar. Organik matrisde kollajen dışında osteokalsin, osteonektin, proteoglikan, sialoprotein ve fosfoprotein gibi proteinler de bulunur (61). Organik matris aynı zamanda büyüme faktörleri de içerir.

2.2.4 Periosteum ve Endosteum

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokusundan oluşan zarlarla örtülüdür. Bu zarlardan dıştakine periosteum, içtekine endosteum denir. Periosteum, kemik dokusunu dıştan saran bağ dokusu kılıfıdır. Hem gelişim dönemindeki kemik oluşumu aşamasında hem de kırık iyileşmesi aşamalarında da görev yapar. Periosteal hücreler, sistemik ve lokal uyaranlar ile kemik dokusunda yapım ve yıkım mekanizmalarında önemli rol oynarlar (62).

Periosteumun kemikle olan sıkı ilişkisi Sharpey liflerinin olmasına bağlıdır. İç ve dış tabakadan meydana gelmiştir. Dış tabaka dens fibröz bağ dokusudur, kan damarları ağı burada yer alır. Buradan gelen damarlar Volkman kanalları yolu ile Havers kanallarına geçer. İç tabaka ise daha gevşekçe düzenlenmiş bir bağ dokusudur. Kemik hasar gördüğü zaman, iç tabakadaki iğ şekilli hücreler osteoblast haline geçerler ve hasarlı kemiği onarırlar. Bu nedenle bazen bu tabaka osteojenik tabaka olarak da adlandırılır (62). Normal durumlarda bu tabakanın hücreleri yetişkinde inaktif haldedir (osteoprogenitor hücre) ve iğ şekilli bağ dokusu hücreleri olarak görülür.

Endosteum kemik iliği kavitelerine örten ve kompakt kemik kanallar sistemine uzanarak, bu kanalların da iç yüzeyini kaplayan, osteoprogenitör hücrelerden oluşmuş ince bir tabakadır. Osteojenik ve hemopoietik potansiyellere sahiptir. Endosteum periosteumdan oldukça incedir. Periosteum ve endosteumun temel işlevleri, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları kesintisiz olarak sağlamaktır. Bu nedenlerle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilir.

2.2.5. Kemik Tipleri

Primer Kemik Dokusu:

İlk ortaya çıkan kemik dokusu primer kemiktir. Geçicidir ve yetişkinlerde, kafadaki yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe girdiği yerler gibi birkaç yer dışında, yerini sekonder kemiğe bırakır. Primer kemik dokusu, sekonder kemik dokusuna nazaran, rasgele dizilmiş kollajen liflerin yanı sıra daha az mineral ve sekonder kemik dokusundan daha fazla osteosit içerir.

Sekonder Kemik Dokusu:

Sekonder kemik dokusu genellikle yetişkinlerde bulunur. Kollajen lifler 3-7 mikron kalınlığında olup, birbirlerine paralel veya bir vasküler kanal etrafında dairesel olarak yerleşmiş lameller halinde düzenlenmiştir. Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe havers sistemi veya osteon denir. Osteositleri içeren lakunalar lameller arasında ve nadiren de içinde bulunur. Bir lamelin kollajen lifleri birbirlerine paraleldir. Havers sisteminin ana fonksiyonu besin maddelerini kompakt kemiğe getirmek olduğuna göre, bu sistemin ince spiküllerden oluşan süngerimsi kemikte görülmemesi doğaldır. Burada besin maddeleri kemiksi yapının içine, civarındaki kan kapillerinden rahatlıkla geçebilir.

2.2.6. Kemiğin Oluşumu:

Kemik üç yolla şekillenir;

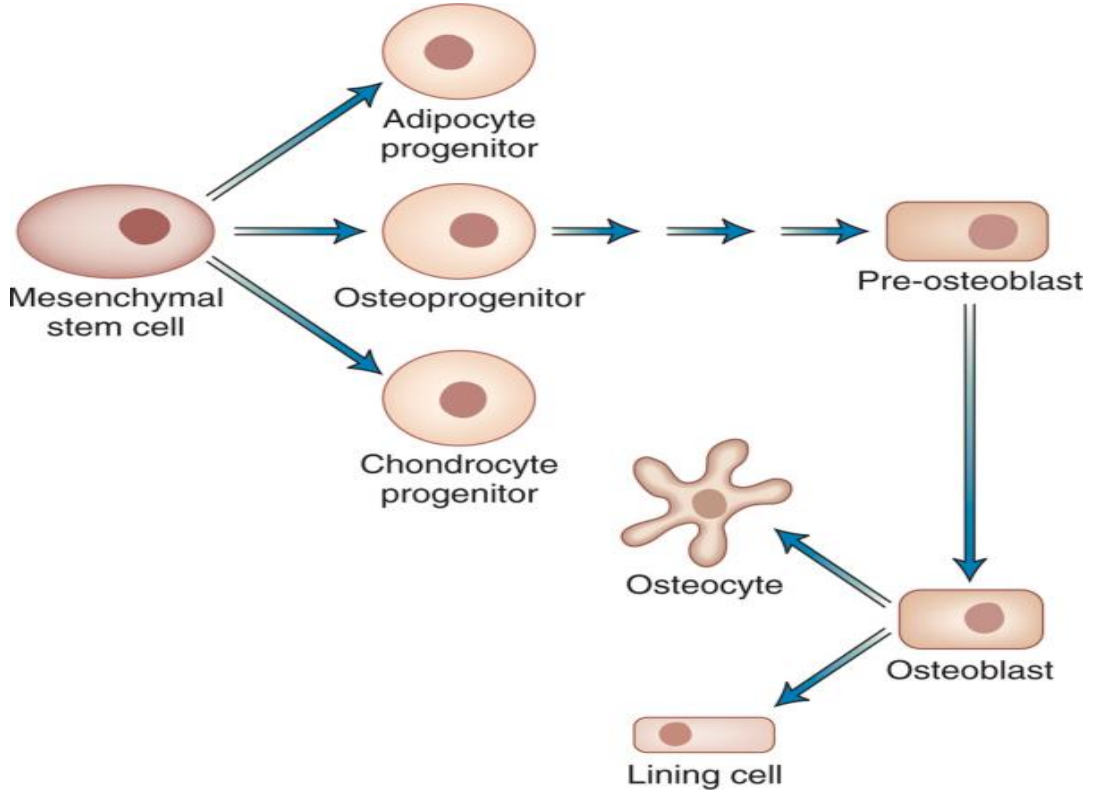
1. Osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile (intramembranöz kemikleşme)

2. Daha önce var olan kırıkta matris üzerine kemik matrisin çöküşü ile (endondral kemikleşme).
3. Mevcut kemiğin üzerine yeni kemiğin birikmesi (appozisyonel kemikleşme)

2.2.6.1. İntramembranöz Kemikleşme:

Bu tip kemikleşmenin olduğu sahalarda kırıkta yapı oluşmaksızın kemik yapımı olur. Yassı kemiklerin (kraniyal kemikler, skapula, sternum) oluş mekanizması, mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde olduğu için bu ad verilmiştir. Farklılaşmamış mezenşimal hücreler kemik yapım sahasına tabakalar halinde birikir (61). İntramembranöz kemikleşme kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında rol oynar. Bu hücreler kan damarları, fibroblastlar ve osteoprogenitör hücreleri içeren bir gevşek organik matris oluşumunu sağlarlar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşürler ve organik matris üzerinde mineralizasyonu sağlarlar (62). İntramembranöz kemikleşme subperiosteal kemikleşmenin prototipidir ve kırık iyileşmesi bu mekanizma ile gerçekleşir (61).

Mezenkimal doku yoğunlaşma alanlarında hücreler bölünerek, kemikleşme merkezinin devamlı olarak büyümesinden sorumlu olan hücreleri, yani osteoblastları meydana getirirler. Çeşitli ossifikasyon merkezleri radial olarak büyüyüp birleşerek, başlangıçtaki orijinal bağ dokusunun yerini alırlar. Bebeklerdeki bağ dokusundan oluşan, kafatasının henüz kemikleşmemiş yumuşak bölgeleri olan bingıldaklar bunlara tipik bir örnektir.



Şekil 3: Kemik Hücrelerinin Oluşumunu Gösteren Şematik Görünüm.

Doğumdan sonra kafatasının yassı kemiklerinin iç ve dış yüzelerindeki intramembranöz kemik yapımı, kemik yıkımına göre belirgin olarak artmıştır. Böylece iki tabaka kompakt kemik (iç ve dış tabakalar) oluşur. Bu iki tabaka arasındaki kısım (diploe mesafesi) süngerimsi yapısını korur. Bağ dokusunun kemikleşmeye katılmayan bölümleri ise, intramembranöz kemiğin periosteum ve endosteumunu oluşturur.

2.2.6.2. Enkondral Kemikleşme:

Enkondral kemikleşme, kıkırdağımsı matriks salınımı yapan ve ileride kondrositlere dönüşecek olan differansiye olmamış mezenşimal hücrelerin kemik yapım sahasında birikmesi ile başlar (63). Hiyalin ve hiyaline benzer yapıdaki kıkırdağın oluşmasından sonra, kıkırdağın bazı bölgeleri kalsifiye olur, kondrositler büyür, damarsal yapılar kıkırdak dokunun içerisine ilerler, kartilaj dokunun içerisine yerleşen hücreler dokuda rezorpsiyon yaratarak kemik iliği boşluklarını oluştururlar (63). Damarsal yapılar ile beraber osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşürler ve olgunlaşmamış kemik üzerinde kemik matriksinin oluşmasını sağlarlar (61,63). Olgunlaşmamış kemik ya da örgü

kemik diye adlandırılan bu kemik farklılaşarak lameller kemiğe dönüşür (61,63). Bu kemikleşme türü kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesinden sorumludur.

2.2.6.3. Appozisyonel Kemikleşme:

Appozisyonel kemikleşme, kemiklerin periosteal kalınlaşması ve ortopedik kemik yapım şekillenmesi esnasında oluşur. Endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin aksine burada halihazırda oluşmuş olan kemik yüzeyinde osteoblastların birikmesi ile başlar (61). Bu hücreler ileride kemik dokusuna dönüşecek olan bağ dokusu niteliğinde olan “osteoid” dokuyu sentezlerler ve tabakalar halinde lameller kemik oluşur (61).

2.2.7. İlaçların Kemik Dokusu Üzerine Etkileri:

Kortikosteroid (KS) ilaç kullanımına bağlı olarak oluşan osteoporoz sekonder osteoporoz nedenleri arasında en sık görülenidir. Kortikosteroidler, osteoblastların sayısını azaltarak, yaşam süresini kısaltarak ve fonksiyonlarını bozarak kemik yapımını azaltmaktadır (64). Kortikosteroid ilaç tedavisi osteoblastların apoptozunu da artırmaktadır. Ayrıca KS'ler osteoblastların kollajen sentezini inhibe eder ve diğer yandan osteoklast aktivitesini de artırırlar (65).

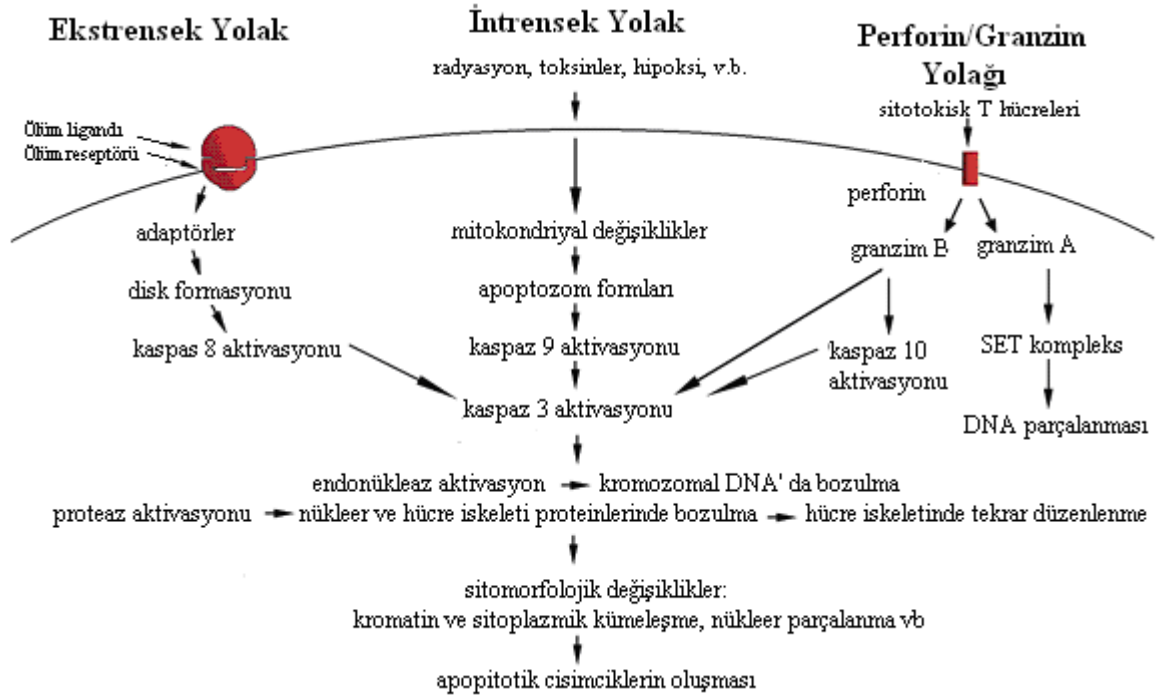
Antikonvülzan ilaçlar karaciğer mikrozomal enzimlerini indükleyerek, D vitamini ve östradiol katabolizmasını hızlandırırlar. Sonuçta barsaklardan kalsiyum Emilimi azalır, buna bağlı sekonder hiperparatiroidi gelişir ve osteoporoz riski artar (66). Heparin en az 10-15.000 ünite/gün dozunda ve üç ay süre ile kullanıldığında kırık riskini artırmaktadır. Osteoklastik aktiviteyi artırarak ve renal 1.25 (OH)₂ vit D sentezini azaltarak kemik yıkımını artırır (66).

2.3. Apoptozis:

Hücre strese karşı, çevresel faktörler ve etki eden uyarıya göre çeşitli şekillerde adaptasyon, proliferasyon, diferansiasyon, dejenerasyon veya ölüm şeklinde cevap verebilir. Temel olarak hücre ölümü nekroz ve apoptozis şeklinde gerçekleşir. Apoptozis birçok fizyolojik ve patolojik olayda yer alan, hücre ve dokunun kararlı durumunun sağlanması için gerekli programlanmış hücre ölümüdür (67).

Apoptozisin mekanizması oldukça karışıktır ve bir takım moleküler olayların enerji bağımlı kaskadını içerir. Araştırmalar iki ana apoptotik yolağın olduğunu ortaya koymuştur. Bu iki ana yolak aynı zamanda birbiri ile ilişkilidir ve burada yer alan moleküller bir yolağı etkilerken diğer yolağı da etkileyebilmektedir. Yolaklardan biri ekstrinsek veya ölüm reseptörleri yolu, diğeri intrinsek veya mitokondriyal yolaktır (Şekil 5). Ayrıca T hücre aracılı sitotoksite ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren başka bir yolak da bulunmaktadır. Ekstrinsek, intrinsek ve perforin-granzim yolağı aynı noktada birleşirler ve kaspaz-3' ün aktivasyonu başlatılır. Bunu DNA fragmentasyonu, nükleer proteinler ve hücre iskeletinin bozulması, fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması, proteinlerin çapraz yer değiştirmesi, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücrelerin reseptörleri için ligandların eksprese edilmesi ve son olarak da fagositik hücrelerce ortadan kaldırılması izler. Kaspazlar, tüm vertebralıların hücrelerinde apoptozisin hem başlangıç hem de final aşamalarında yer alan hücre içi sistein proteazları kapsar. Bu süreçte yer alan 11 kaspaz molekülü bulunmaktadır ve kaspazlar kaskad şeklinde aktive olmaktadır. Kaspaz-8 ekstrinsek, kaspaz-9 intrinsek yolakda aktive olup kaskadda yer almaktadır. Kaspaz-3 gibi efektör kaspazlar da başlatıcı kaspazların etkisiyle etkin hale geçmektedir. T hücre aracılı sitotoksite ve perforin-granzim bağımlı yolak da hem kaspazlardan bağımsız olarak hem de kaspazlara bağımlı bir yolla hücre ölümüne neden olmaktadır (67).

Bcl-2 ailesine ait proteinler apoptozisde düzenleyici anahtar rol oynamaktadır ve ana görevi, mitokondriyal geçirgenliği, organellerden apoptotik proteinlerin mitokondriye geçişini kontrol etmektir. Bax, pro-apoptotik proteinlerden birisidir ve Bcl-2 ile beraber, p53 tümör supresör geni ile ekspresyonu düzenlenmektedir. p53 tümör supresör geni hücre siklusunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. İnsan kanser olgularının yarısından fazlasında p53 geninde mutasyon saptanmıştır ve bu nedenden dolayı p53, tümör oluşumunda kritik role sahiptir. p53, DNA hasarı olduğunda, DNA onarım proteinlerini aktive edebilir, hücre siklusunu G₁/S aşamasında durdurabilir ve eğer DNA hasarı onarılamayacak ise apoptozis başlatılmasına aracılık eder (67,68).



Şekil 4. Apoptotik Olayların Şematik Sunumu

2.3.1. Osteoklastların Apoptozisi:

Osteoklastların apoptozu ilk olarak transgenik farede TRAP (Tartarat Resistan Asit Fosfataz) kullanılarak simian virus 40 large T antijeninin osteoklastları hedef alması sağlandıktan sonra kültürden M-CSF'in (makrofaj koloni uyarıcı faktör) çekilmesi sonrasında gözlenmiştir. Apoptozise uğrayan osteoklastların iki özelliği göze çarpmaktadır:

- 1-Yaşayan osteoklastlardan daha güçlü TRAP boyanma
- 2-Bütün nükleuslarının aynı anda apoptoza uğraması

Apoptoza uğrayan hücreler için sitoplazmik organel ve enzim fonksiyonunun korunması tipiktir. Bu güçlü TRAP boyanması, sitoplazmik kontraksiyonla sitoplazma içerisinde artan TRAP konsantrasyonu veya hücre içine giren TRAP'ın dışarı sekresyonunun sekteye uğraması veya her iki seçeneğin bir kombinasyonunu yansıtır olabilir. Bu durum, doku kesitlerinde intakt apoptotik osteoklastların ve ölü hücrelerin yıkılmasından sonra osteoklast fragmanlarının tanınmasını kolaylaştırmaktadır.

2.3.2. Kemik Remodeling Ünitelerinde Osteoklast Apoptozu:

2-3 haftalık farelerin kalvaryel kemiklerine günlük yüksek doz IL-1 enjeksiyonları sonrasında osteoklast hücre sayılarının belirgin olarak arttığı gözlenmiştir. Bu rezorpsiyon sonrasında normal kemik remodelingine benzer şekilde bol miktarda yeni matriks depolanması gözlenmiştir. Osteoklastların %13'ü apoptotiktir. Bunların çoğu ilerleyen rezorpsiyon hattında ve bunun peşine devam eden yeni kemik formasyonu reversal bölgesinde tespit edilmiştir. Diğer hayvan modellerinde ve artmış kemik yapım-yıkımı olan hastalardaki kemik remodeling ünitelerinde reversal alanlarında osteoklast apoptozu olduğu doğrulanmıştır (69).

IL-1 enjeksiyonlarını durdurduktan 4-6 gün sonra fare kalvaryasında görülen apoptotik osteoklastların oranındaki yüksek artış, prostaglandin ve diğer antiapoptotik faktörlerin lokal konsantrasyonlarındaki ani düşüş sebebiyle olduğu düşünülmektedir. Daha yaşlı osteoklastlar lateral ve aşağıya doğru olan ilerlemeyi tamamlamak için geride bırakılmakta ve sonunda apoptozise uğramaktadır. Rezorbe etme derinlikleri ve bununla bağlantılı olarak trabekülün ortadan kaldırılması veya hayatta kalması, bu osteoklastların apoptoz zamanlamalarına bağlıdır ve bu süreç farmakolojik olarak hızlandırılabilir. Gecikmiş apoptoz, tipik olarak Paget Hastalığında görülen derin rezorpsiyon lakunalarını ve artmış Bcl-2 ekspresyonuna bağlı olabilecek osteoklast nükleuslarının fazla sayısını açıklayabilir (70).

2.3.3. Osteoklast Apoptozunun Düzenlenmesi:

Kemik rezorpsiyonunu uyaran birçok faktör gibi, PTH ve 1,25(OH)₂ vit D₃ de osteoklast apoptozunu muhtemelen RANKL ekspresyonunu artırarak ve stromal hücrelerden osteoprotegrin (OPG) ekspresyonunu azaltarak osteoklast apoptozunu engellemektedir. Osteoklast fonksiyonunu düzenleyen regülatörlerin konsantrasyonları (RANKL ve M-CSF) osteoklastların akibetinde önemli rol almaktadır.

RANKL ve M-CSF:

Osteoklast apoptozunun ilk gözlemlenmesinden beri osteoklast yaşam süresinin pozitif ve negatif regülatörleri belirlenmiştir. Bunların arasında osteoklast formasyonu için de gerekli M-CSF, RANKL ve şimdiye kadar bulunmuş en güçlü negatif osteoklast regülatörü OPG bulunmaktadır.

RANKL'in osteoklast yüzeyindeki RANK'a bağlanmasını takiben TNF reseptör aktivator familyasının bir üyesi olan TRAF 6 (TNF reseptör ilişkili faktör) RANK'ın sitoplazmik bölgesine bağlanır, c-src ekspresyonu artar ve Src, TRAF 6'ya bağlanır. PI3-kinaz Src'ye, ve Akt PI3-kinaz'a bağlanır. Bunu takiben Akt-Bad ve kaspaz-9'ı fosforile eder ve böylelikle apoptoz kaskadının aktivasyonunu engeller. Benzer bir sinyal kaskadı IL-1 osteoklastlardaki reseptörüne bağlanınca aktive olmaktadır. M-CSF'in aksine RANKL, XIAP veya Bcl-xL'in ekspresyonunu indüklememektedir. PI3-kinaz yolağını aktive etmenin yanında RANKL aynı zamanda osteoklast sağkalımını arttırmak için NF-kB'i de aktive eder. Bu durum NF-kB inhibitörlerinin osteoklast apoptozunu tetiklediğini gösteren bulgular ile uyumludur (71).

Src, RANKL'in antiapoptotik etkisinde önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü src'siz farelerden üretilen osteoklastlar, doğadaki farelerdekinden daha şiddetli bir osteoklast apoptozunu tetiklemektedir. Src'nin RANKL ilişkili osteoklast sağ kalımındaki rolü vazgeçilmez değildir çünkü src mutant farelerde osteoklast apoptozunda in vivo artış gözlenmemiş hatta osteoklast sayıları artmıştır. Ancak kinaz alanı olmayan kısaltılmış src transgenik farelerde osteoklast apoptozunun ve osteopetrozun şiddetinin arttığı gözlenmiştir.

RANKL'in antiapoptotik etkilerine RANKL-RANK etkileşimini engelleyen stromal/osteoblastik hücrelerin bir ürünü olan OPG tarafından karşı çıkılmaktadır. Bu yüzden OPG çoğunlukta olduğunda osteoklastlar antiapoptotik RANKL sinyali ortadan kalktığı için ölürlür. Çalışmalar stromal/osteoblastik hücreler osteoblastlara diferansiye oldukça OPG/RANKL oranı yükselmekte ve bu durum yetişkin osteoblastların osteoklast sağkalımında negatif düzenleyici bir rol oynadığını düşündürmektedir (72).

İntegrin Bağlanması:

PI3-kinaz antiapoptotik yolak aynı zamanda osteoklastlar kemik matrikse bağlandıklarında ortaya çıkan integrin aracılıklı sinyallerle de etkinleştirilmektedir. Bu yolak ayrıca osteoklast sitoskeletonini reorganize edilmesini sürdüren sinyalleri de başlatır. İntegrin bağlanmasından sonra aktive olan Src'nin, antiapoptotik mekanizmaya katılıp katılmadığı bilinmemektedir. Ancak, apoptozda akut inflamatuvar reaksiyonun oluşumunu engellemesi önemli bir özelliğidir.

Vitronektin reseptörü olan integrin, kemik matrikste osteoklast adhezyonuna aracılık etmektedir. Osteoklastların etkin bir şekilde rezorpsiyon yapabilmesi için matrikse sıkı bir şekilde bağlanmaları gerekmektedir. Bu adhezyonun bozulması diğer hücre tiplerinde olduğu gibi ölüm sinyali yollarının aktivasyonuna sebep olabilir (73).

Sitokinler ve Diğer İnflamatuvar Ajanlar:

Sitokinler, nitrik oksit ve prostaglandinler gibi proinflamatuvar ajanların yapımı, östrojen eksikliği ve kronik inflamatuvar kemik hastalıkları gibi artmış kemik rezorpsiyonu ile ilişkilendirilmiş durumlarda artmaktadır. Bu ajanların çoğunluğu stromal hücre RANKL ekspresyonunu uyarır ve osteoklast apoptozunun engellenmesi gibi çoklu mekanizmalar ile kemik rezorpsiyonunu artırır. IL-1, osteoklastların apoptozunu engellemek için direkt etkilere sahip gibi görünmektedir ancak bunun NF-kB (nükleer faktör kapa hafif zincir aktive edici B hücre) mi yoksa ERK (ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz) aktivasyonu aracılı olduğu bilinmemektedir.

Osteoklastlarda IL-1 ve TNF reseptörlerinin hücre içi alanlarına TRAF 6 bağlanır ve bu da NF-kB'nin aktivasyonuna ve osteoklast apoptozunun engellenmesine sebep olur. IL-6, gp130 (glikoprotein) sayesinde antiapoptotik sinyallerine aracılık eder ancak bu etkinin osteoklastlardaki mekanizması hala netlik kazanmamıştır. Nitrik oksit her ne kadar kemik rezorpsiyonunu uyarsa da osteoklastların ve prekürsörlerinin apoptozunu da tetiklemektedir (74).

2.3.4.Osteoblast ve Osteositlerin Apoptozu:

Kalsinöz kemikte apoptotik osteoblastları sayarken spesifik kriterler kullanılmalıdır. Osteoid ve diğer osteoblastlardan ayrımları yapılmalıdır. Zira kemik oluşumu osteoblast takımları tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu hücreler küboidal morfolojileri ile yakınlarındaki kemik iliği ve sınır hücrelerden ayrılabilir. TUNEL metodu ile analiz edildiğinde erişkin farelerin vertebral kalsinöz kemiklerindeki osteoblastların % 0.5-1.0' inde DNA strand kırıkları gözlenmektedir. Etiketlenen osteoblastların çoğunun çekirdeği yuvarlaktır ve sadece bazılarında kromatin gruplaşmaları bulunmaktadır. Bu, hücrelerin apoptozun erken safhalarında olduğunun göstergesidir. Osteoblastların çok az apoptozis belirtileri göstermesi bu sürecin oldukça çabuk gerçekleşmesiyle açıklanabilir.

Osteoblastlar gibi seks steroidlerinin kaybı veya glukokortikoid fazlası ile apoptoza giren osteosit sayısı artmaktadır. Osteoblastlardan farklı olarak osteosit apoptozu birikici türden bir hücre ölümünü temsil etmektedir.

2.3.5.Osteoblast ve Osteositlerin Apoptozunun Regülasyonu:

Ölüm sinyali reseptörlerinin TNF (tümör nekroz faktör) veya CD95 ligand ile in vitro aktivasyonu osteoblast apoptozunu uyarmaktadır. Her ne kadar CD95 ve ligandı in vivo osteoblast ve osteositler tarafından eksprese edilse de bu hücrelerin fizyolojik apoptozundaki rolü hala bilinmemektedir.

İntegrinler:

Osteoblastlarda, in vitro şartlarda fibronektin veya kollajene bağlanma engellendiğinde apoptoz tetiklenmiş olur. İntrasellüler antiapoptoz sinyalleri de integrinin ekstrasellüler matrikse bağlanmasını takiben oluşur. İn vivo osteoblastlar artarsa integrin sinyallenmesi periyodik olarak kaybolur. İntegrinin adhezyon göçünde ve matriks oluşumunda dinamik değişikliklere neden olur (75).

Büyüme Faktörleri ve Sitokinler:

IGF'ler (insülin like growth factor) , TGF beta (transforming growth factor) ve IL-6 tipi sitokinler dahil olmak üzere kemik mikroçevresinde oluşturulan çoğu büyüme faktörü ve sitokin osteoblast apoptozunu inhibe etmektedir. FGF (fibroblast growth factor), bölünen preosteoblastik hücrelerin primer kültürlerinde apoptozu baskılamak, matür osteoblastların apoptozunu stimüle etmektedir. CD40'ın ligandı CD154 tarafından aktive edilmesi de osteoblastlar ve osteositlerin apoptozunu engellemektedir (76).

IL-6 tipi sitokinlerin osteoblastik hücrelerdeki antiapoptotik etkisi STAT (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü) fosforilasyonu ile uyarılan siklin kinaz inhibitörü p21'in varlığını gerektirmektedir. Osteoblastik hücrelerde gösterilmemiş olsa da IGF ve FGF'lerin diğer hücreler üzerindeki antiapoptotik etkileri Bad'ın PI3-kinaz ve Akt aracılıklı fosforilasyonunu içermektedir. IGF'ler aynı zamanda p21 ve Bcl-2'nin sentezini de uyarmaktadır. Son olarak IGF ve FGF'ler, kaspaz-3'e bağlanıp onu inhibe eden ve osteoblastik hücrelerde TNF tetikli apoptozu engelleyen calbindin-D28k'nın sentezini arttırabilir (77).

3. MATERYAL VE METOD

Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları :

Çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, İmmunohistokimya Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmanın materyalini 2.5 aylık, puberte dönemindeki 350±50 gram, 21 adet Spraque Dawney albino soyu erkek sıçanlar oluşturdu. Bu hayvanlar, Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nden aynı doğum tarihli farelerin doğumlarından cinsiyet ayrımı yapılarak elde edilmiştir. Hayvanlar ad libitum, pelet şeklindeki standart sıçan yemi ile beslendiler. İçme suyunu serbest olarak tükettiler. On iki saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodunda tutuldular. Klima ile buldukları oda sıcaklığı 21–23° C, nem ise %50–70 oranında sabitlendi. Sıçanların canlı ağırlıkları deneyin başında, bir haftanın ve deneyin sonunda tartıldı.

Çalışmadaki tüm deneysel işlemler Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından onaylandı (Karar No: 28.11.2012/42).

Deney Planı :

Sıçanlar kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz amiodaron alan grup olmak üzere yedişer fareden oluşan üç gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara amiodaron yerine içme suyu, günde iki defa olmak üzere, ikinci gruba, oral gavaj ile düşük doz amiodaron (20 mg/kg/g), üçüncü gruba ise yüksek doz amiodaron (200 mg/kg/g) 14 gün boyunca verildi. Amiodaron (Cordarone®) distile su içerisinde çözdürülüp, oral gavaj ile uygulandı.

Hayvanların Canlı Ağırlıkların Ölçümü, Kemik Dokusunun Alınması, Tespit ve Takip :

Deneyin başlangıcında, üç gruptaki deney hayvanlarının ağırlıkları tartıldı ve amiodaron alacak sıçanların ilaç dozları ayarlandı. Bir haftanın sonunda ağırlık değişimi olabileceğinden tüm sıçanlar tekrar tartıldı ve ilaç dozları tekrar ayarlandı. Çalışmanın sonunda sıçanların anestezi (ketamin 0.1 mg/kg intraperitoneal) altında karın boşluğu açıldı, her iki testis ingiunal kanaldan alınıp çekildikten sonra intrakardiyak kansızlaştırma

ile ötenazi sağlandı. Testis dokusu başka bir çalışma için ayrıldıktan sonra, sol femurları kalça ve diz eklemlerinden dezartiküle edildi. Femur üzerindeki yumuşak dokular kallus dokusuna zarar verilmeden nazikçe kemikten sıyrıldı. Tüm sol femurlar alındıktan sonra %10'luk formol solüsyonuna konularak histopatolojik olarak incelenmek üzere Celal Bayar Üniversitesi'ne gönderildi.

Materyal Metod:

Çıkarılan dokular nötral formalinde 24 saat fikse edildi. Daha sonra kemik dokuların dekalsifikasyonu için Edta solüsyonunda bekletildi. Ardından dokular 1 gec akar suda yıkanıp artan alkol serilerinde dehidrate edildi ve ksilende şeffaflaştırıldı. 5 mikron kalınlığında seri kesitler poli lizin kaplı lam'lara alındı.

İmmunohistokimyasal Yöntem:

Seri kesitlerin diğer kısmı immunohistokimya boyaması için ayrıldı. 60 C de 1 gece inkübe edilen kesitler ksilende deparafinize edildikten sonra azalan alkol serilerinde dehidrate edildi. Antijen retrieval için kesitler citrat bufferda (10 mM, pH 6.0) mikrodalgada 15 dk kaynatıldı. Endojenaz peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksidazda 15 dk bekletildi. Ardından kesitler bloking serumda (Ultra V Block, TP-060-HL; NeoMarker, Fremont, CA, USA) 10 dk inkübe edildi. Kesitler primer antibadiler Kaspaz-3 (Labvision, CA, USA), Kaspaz-9 (Labvision, CA, USA) ve P53 (Santacruz, CA, USA) ve Bax (Santacruz, CA, USA) ile 60 dakika oda ısısında ve nemli ortamda inkübe edildi. Antijen antibadi kompleksi biotinylated sekonder antibadi ve streptavidin-peroksidaz kompleksi (20 dk) ile tespit edildi. İşaretleme DAB (Labvision, CA, USA) ile gerçekleştirildi. Kesitler mayers hematoksilen ile zemin boyandı ve mounting medium ile kapatıldı. Fotoğraf makinesi ataçmanlı Olympus mikroskopta (CX31 Germany) fotoğrafları çekildi.

Quantitatif Histomorfometri:

Kemik dokulardan longitudinal olarak 10 seri kesit alındı ve bu seri kesilerde Işık mikroskobun dijital fotoğraf makinesi kullanılarak 10 adet rastgele epifiz, diafiz bölgelerinin 400X büyütmede fotoğrafları çekilerek bilgisayara kaydedildi. Leica Q win image analyse software programında, her fotoğrafta osteoblast ve osteoklastlar 2 ayrı bağımsız araştırmacı tarafından sayılarak her sıçan için ortalaması alındı.

Epifiz, diafiz ve uzunluk ölçümleri için; her sıçanın femur kemiklerinin seri kesitlerinde epifizlerinin en kalın olduğu merkezden geçmiş kesitler seçilerek Işık mikroskobun dijital fotoğraf makinesi kullanılarak 40X'lük büyütmelelerinin fotoğrafları çekilerek bilgisayara kaydedildi. Leica Q win image analyse software programında uzunluk ölçümleri yapılarak kaydedildi.

İmmunohistokimya için;

Boyamalarda her bir preparatta X400 büyütmede gelişigüzel on alan seçilerek immunoreaktivitelerin yoğunluğuna ve ekspresyon miktar yüzdesine göre H skoru hesaplandı. İmmünreaktivite yoğunluğu semikantitatif olarak 0 (0, reaktivite yok), 1 (+, zayıf immünreaktivite), 2 (++ , orta düzeyde immünreaktivite), 3 (+++, kuvvetli düzeyde immünreaktivite) olarak skorlandırıldı. Tutulum miktar yüzdesi immünreaktivitenin bulunduğu hücre/yapıların toplam hücre/yapılara oranlanması ile; 1 (%0 – 10 arası, fokal), 2 (%11 – 50 arası, bölgesel) ve 3 (%51-100 arası, diffüz) olarak skorlandı. Her bir alan için bulunan yoğunluk ve miktar skorları $\sum P_i.(i+1)$ (P_i = tutulum miktar yüzdesi, i = tutulum yoğunluğu) formülü ile hesaplandı. Sonuçlar toplanarak o lam için tek bir değere ulaşıldı.

Hematoksilen Eozin için;

Hematoksilen Eozin boyalı her bir preparatta X40 büyütmede gelişigüzel on alan seçilerek epifiz çapı, diyafiz çapı ve longitudinal femur fotoğrafları çekildi. Bu fotoğrafların her birinde, bilgisayarda image-analizi software (Leica Q Win V3 Plus Image) sistemi ile çap ve uzunluk olarak 10 ayrı ölçüm yapıldı ve çıkan sonuçların aritmetik ortalaması alındı. Yine her bir preparatta X400 büyütmede 10 ayrı alan seçilerek fotoğrafları çekildi. Bu fotoğrafların her birinde, bilgisayarda image-analizi software (Leica Q Win V3 Plus Image) sistemi ile osteoblast ve osteoklastlar ayrı ayrı işaretlenerek sayıldı ve çıkan sonuçların aritmetik ortalaması alındı.

İstatistiksel Analizler :

Çalışmanın analizlerinde SPSS (Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi) 13.0 paket programı kullanılmıştır. Ölçüm değişkenleri ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleriyle verilmiştir. Ölçüm değişkenlerinin 3 ve daha fazla grup karşılaştırmalarında one-way anova testi (tek yönlü karşılaştırma testi) kullanılmıştır. One-

way anova testinden sonra gruplar arasındaki farklılığı saptamak için çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. Post hoc seçeneği içerisindeki bonferroni çoklu karşılaştırma testi ile gruplar arasında karşılaştırma yapıldı. Çalışmanın tüm istatistiksel analizlerinde p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

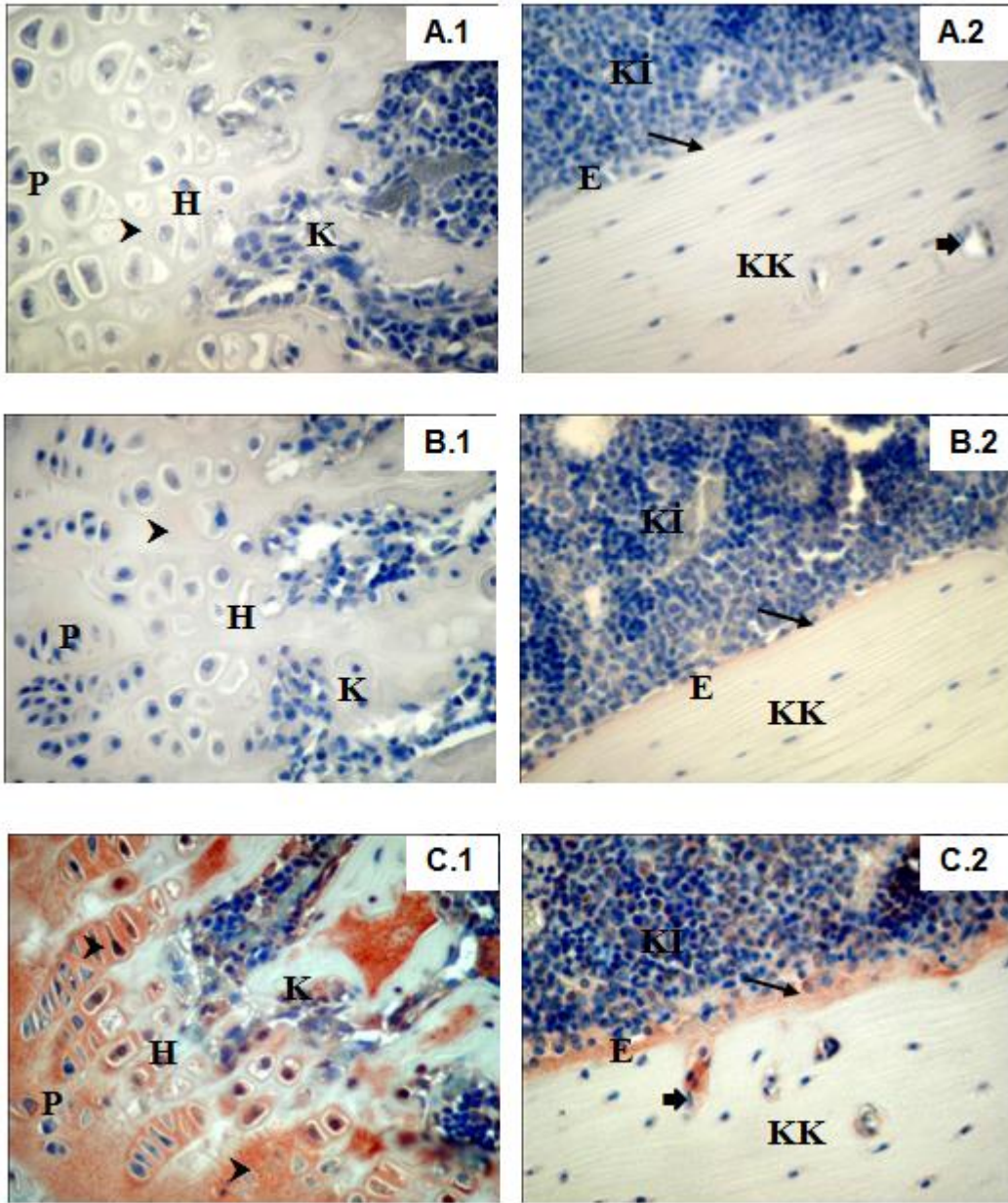
Kaspaz-3 immunoboyamasında kontrol grubunun femur epifiz ve diyafiz bölgelerindeki kemik dokusunda zayıf immunoreaksiyon gözlemlendi (Resim 1). Düşük doz grubunda epifiz bölgesinde yine zayıf kaspaz-3 ekspresyonu izlenirken diyafiz bölgesinde kemik dokusunu içten saran ve genç kemik hücreleri osteoblastların bulunduğu endosteum tabakasında zayıftan ortaya değişen reaksiyon belirlendi (Resim B1, B2). Yüksek doz grubunda epifiz bölgesindeki proliferasyon kıkırdağının proliferatif ve hipertrofik zonlarındaki kıkırdağın matrisinde ve kemik zondaki yeni oluşmuş kemik matrisinde kuvvetli kaspaz-3 ekspresyonu dikkat çekiciydi (Resim C1). Diyafiz bölgesinde ise endosteumda ve kompakt kemiğin içinden geçen Walkman kanallarında kuvvetli immunoreaksiyon gözlemlendi (Resim C2).

Kaspaz-9 immunoboyamasında kontrol grubuna benzer şekilde epifiz ve diyafiz bölgelerindeki kemik dokusunda zayıf reaksiyon hakimdi (Resim 2). Ancak düşük doz grubunda epifiz bölgesinde her üç zonda da ortadan kuvvetliye değişen kaspaz-9 immunoreaksiyonu gözlemlendi (Resim B1). Diyafiz bölgesinde ise endosteum tabakasında boyanma az iken kompakt kemiğin bazı bölgelerindeki kemik matrisinde ortadan şiddetliye değişen reaksiyon tespit edildi (Resim B2). Yüksek doz grubunda epifiz bölgesindeki proliferasyon kıkırdağında her 3 zondaki kıkırdağın ve kemik matrisinde kuvvetli kaspaz-3 ekspresyonu gözlemlendi (Resim C1). Diyafiz bölgesinde endosteumda ve kompakt kemikte yaygın olarak kemik matrisinde kuvvetli kaspaz-9 reaksiyonu belirlendi (Resim C2).

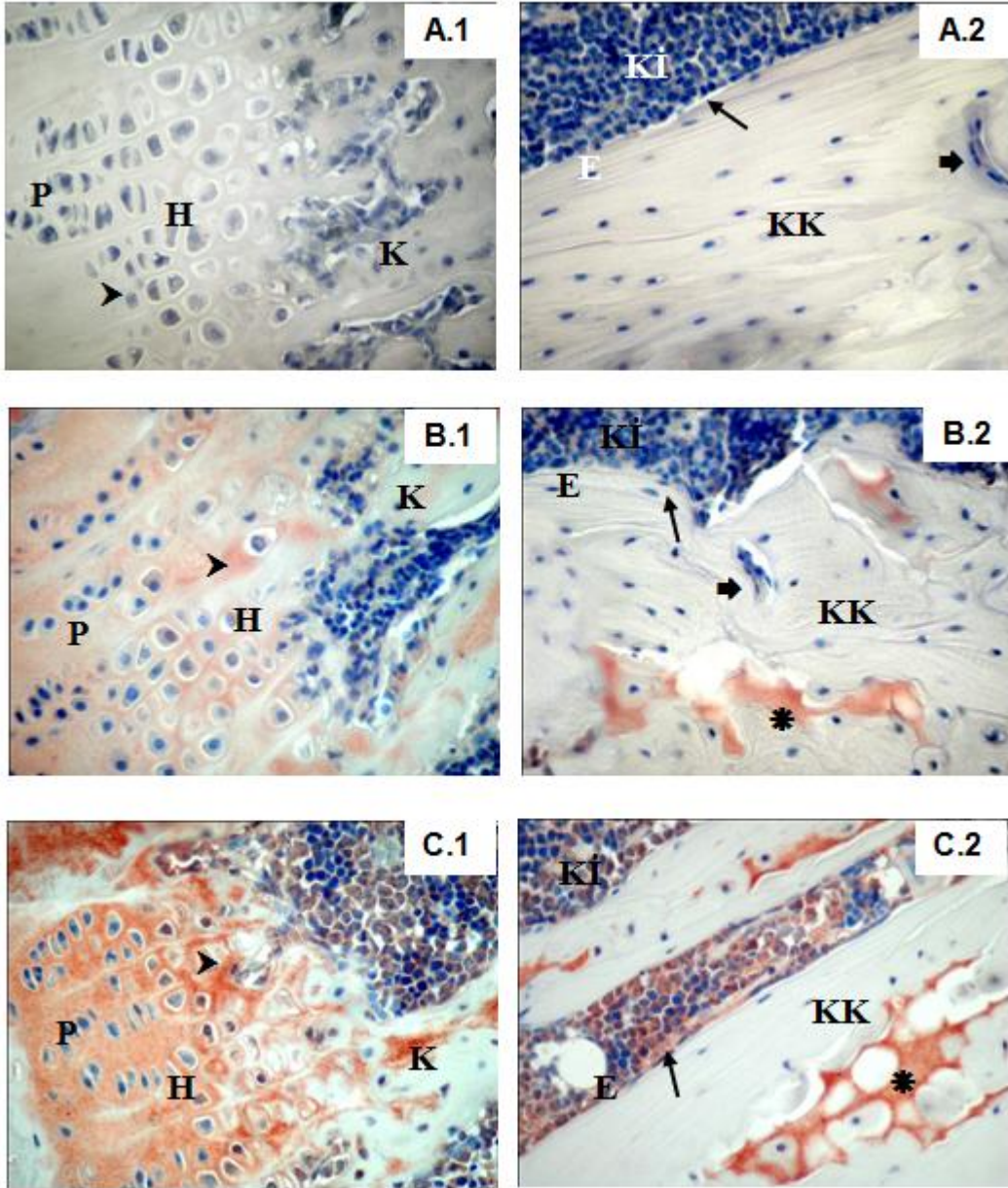
P53 immunoboyamasında kontrol grubunda kemiğin epifiz ve diyafiz bölgelerinde zayıf immunoreaksiyon izlendi (Resim 3). Düşük doz grubunda epifiz bölgesinde yer yer bazı kıkırdağın matrisinde zayıftan ortaya değişen reaksiyon gözlenirken, diyafiz bölgesindeki endosteum tabakasında orta şiddetli P53 ekspresyonu belirlendi (Resim B1, B2). Yüksek doz grubunda epifiz bölgesinde özellikle proliferasyon kıkırdağının kemikleşme zonunun başladığı kemik matrisinde kuvvetli p53 immunoreaksiyonu tespit edildi (Resim C1). Diyafiz bölgesinde de endosteum tabakasında ve kompakt kemiğin içindeki Walkman kanalında kuvvetli P53 reaksiyonu belirgindi (Resim C2).

Bax immunoboyaması da diğer üç boyamada olduğu gibi kontrol grubunda kemiğin epifiz ve diyafiz bölgelerinde zayıftı (Resim 4). Düşük doz grubunda epifiz bölgesindeki proliferasyon kırırdağında zayıftan ortaya değişen Bax reaksiyonu özellikle hipertrofik zondaki kırırdağ hücrelerinde belirgindi (Resim B1). Kemiğin diyafiz bölgesindeki endosteum tabakasında ve kompakt kemik bölgesinde Bax ekspresyonu zayıftı (Resim B2). Yüksek doz grubunda, epifiz bölgesinde üç zonda da ortadan kuvvetliye değişen reaksiyon hakimdi (Resim C1). Diyafiz bölgesinde ise endosteum tabakasında ve kompakt kemiğin içindeki Walkman kanallarında kuvvetli Bax ekspresyonu tespit edildi (Resim C2).

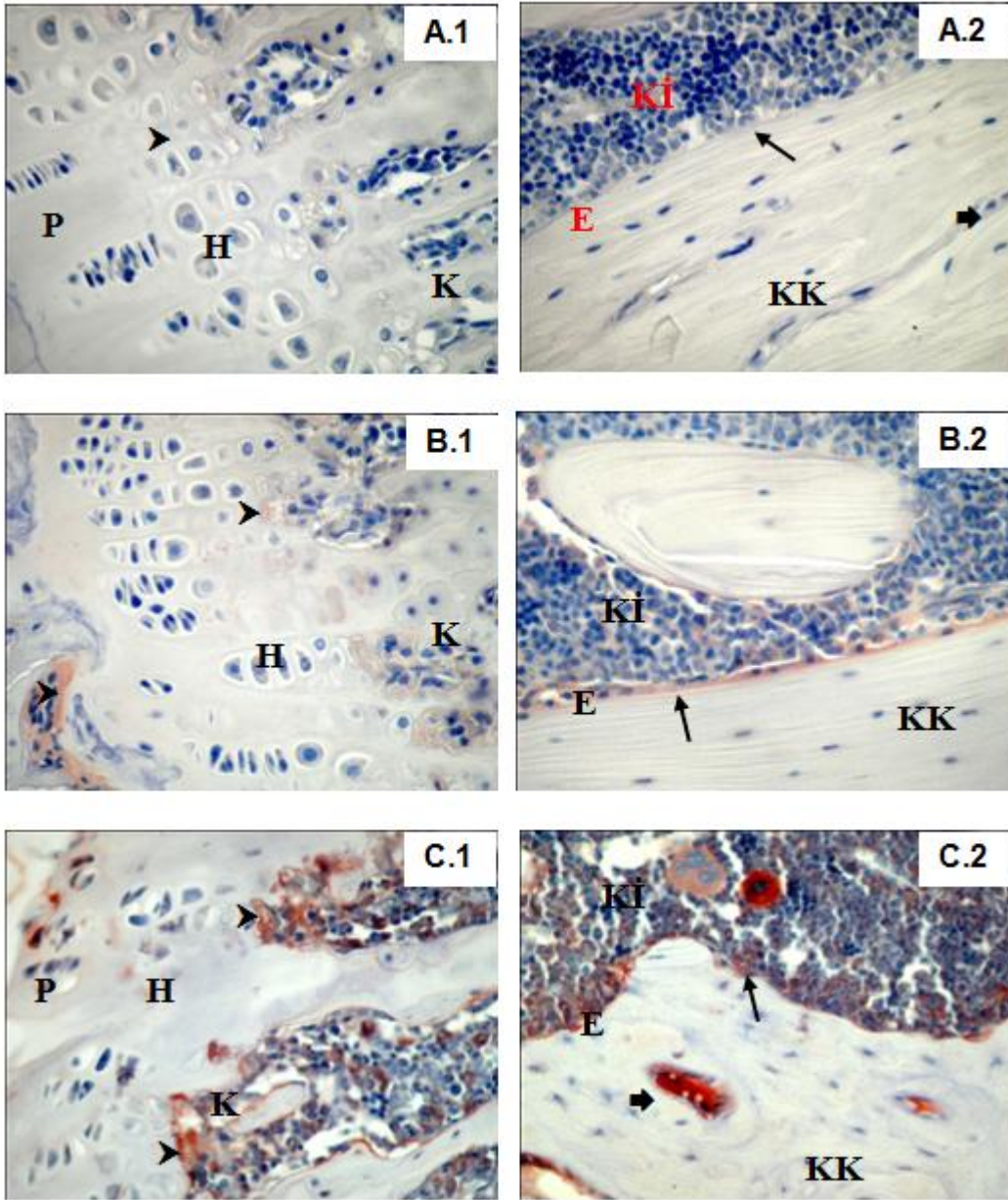
Işık mikroskopisi yardımıyla kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz amiodaron verilerin farelerin epifiz ve diafiz çapları, femur boyları, osteoblast ve osteoklast sayıları hesaplandı. Epifiz ve diafiz çaplarında, kontrol grubuna göre düşük doz ve yüksek doz amiodaron uygulanan gruplarda azalma saptandı. Bu azalma yüksek doz amiodaron grubunda daha fazla idi. İstatistiksel olarak her grubun kendi aralarındaki karşılaştırılmarında p değeri anlamlı bulundu. Osteoklast sayılarında, kontrol grubuna düşük doz ve yüksek doz amiodaron uygulanan gruplarda daha yüksek idi. Bu artış yüksek doz uygulanan grupta daha belirgindi. İstatistiksel olarak her grubun kendi aralarındaki karşılaştırılmarında p değeri anlamlı bulundu. Osteoblast sayıları ve femur boyları ölçümleri açısından her üç grup arasında önemli fark bulunmamakta idi. İstatistiksel olarak her grubun kendi aralarındaki karşılaştırılmasında p değeri anlamlı bulunmadı.



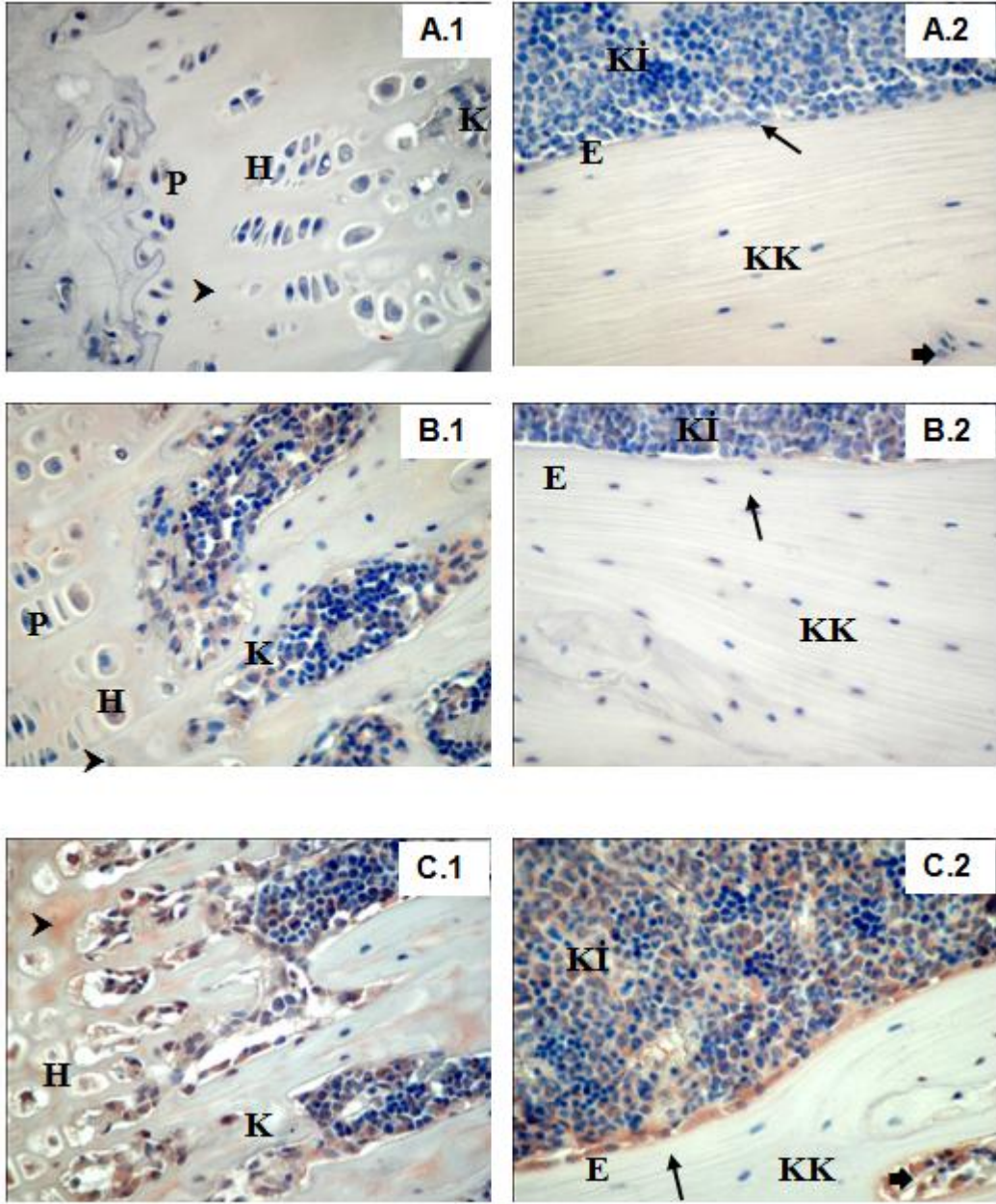
Resim 1: Femur epifiz plağı proliferasyon kıkırdak bölgesi (1) ve Femur diafiz kompakt kemik bölgesi (2) Kaspaz-3 immunohistokimya boyaması. **P:** Proliferasyon zonu, **H:** Hipertrofik zon, **K:** Kemikleşme zonu, **►:** Kıkırdak matriks, **Kİ:** Kemik iliği, **E:** Endosteum, **KK:** Kompakt kemik, **→:** Osteoblast, **➤:** Walkman kanalları, *****: İmmün pozitif bazı kemik matriks. Kontrol grubu (A), Düşük amiodaron grubu (B), Yüksek amiodaron grubu (C), (X400).



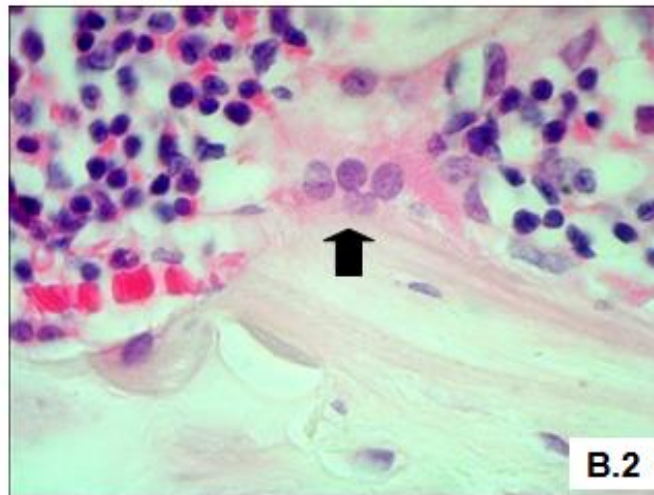
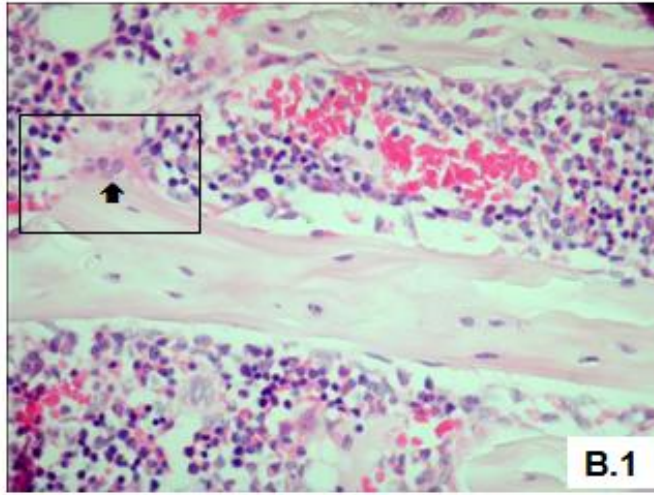
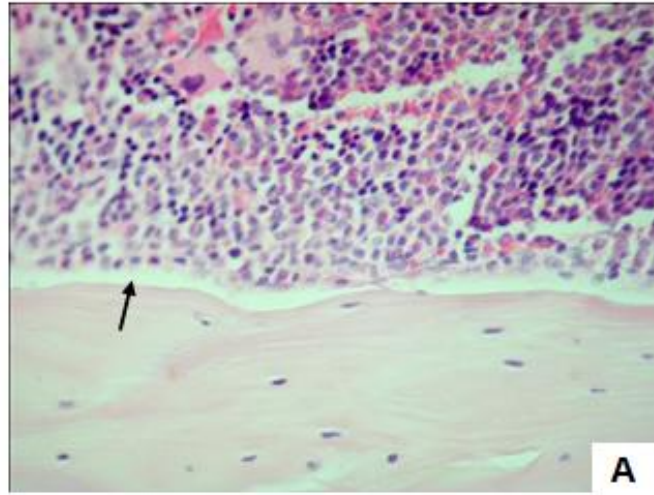
Resim 2: Femur epifiz plağı proliferasyon kıkırdak bölgesi (1) ve Femur diafiz kompakt kemik bölgesi (2) Kaspaz-9 immunohistokimya boyaması. **P:** Proliferasyon zonu, **H:** Hipertrofik zon, **K:** Kemikleşme zonu, **►:** Kıkırdak matriks, **Kİ:** Kemik iliğı, **E:** Endosteum, **KK:** Kompakt kemik, **→:** Osteoblast, **►:** Walkman kanalları, *****: İmmün pozitif kemik matriks bölge. Kontrol grubu (A), Düşük amiodaron grubu (B), Yüksek amiodaron grubu (C), (X400).



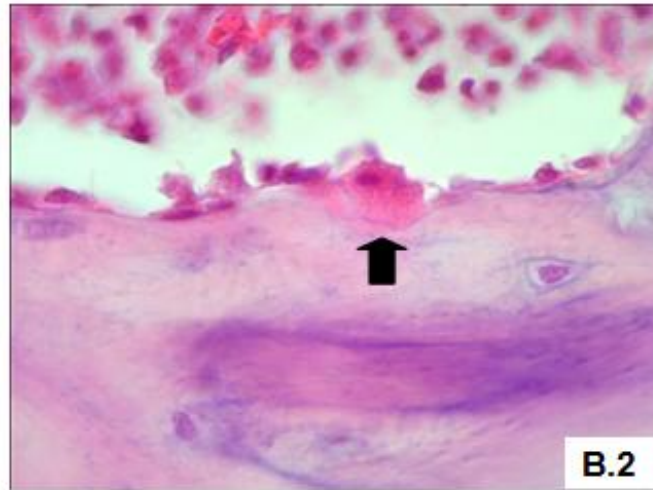
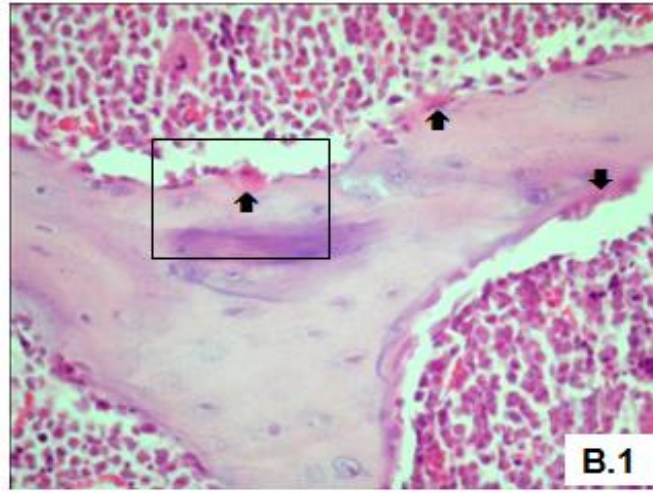
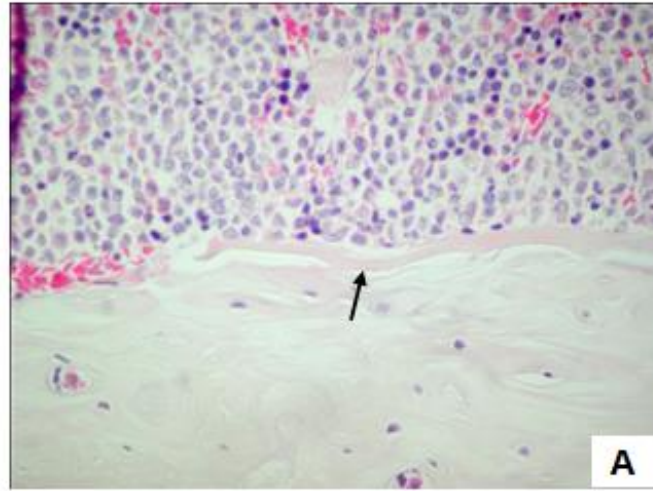
Resim 3: Femur epifiz plağı proliferasyon kıkırdak bölgesi (1) ve Femur diafiz kompakt kemik bölgesi (2) P53 immunohistokimya boyaması. **P:** Proliferasyon zonu, **H:** Hipertrofik zon, **K:** Kemikleşme zonu, **➤:** Kıkırdak matriks, **Kİ:** Kemik iliğı, **E:** Endosteum, **KK:** Kompakt kemik, **→:** Osteoblast, **➡:** Walkman kanalları, *****: İmmün pozitif bazı kemik matriks. Kontrol grubu (A), Düşük amiodaron grubu (B), Yüksek amiodaron grubu (C), (X400).



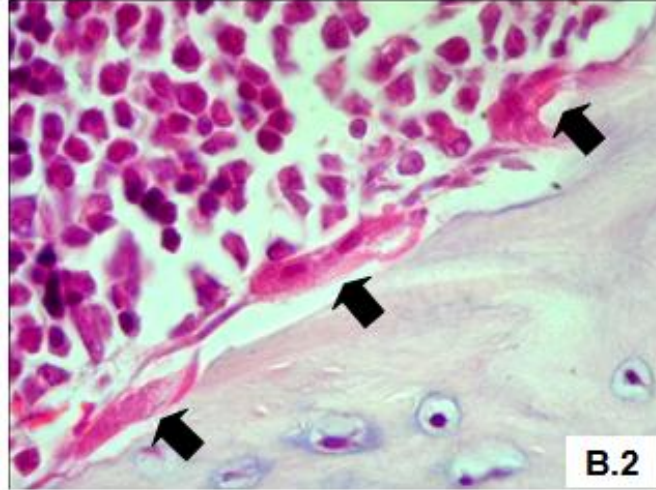
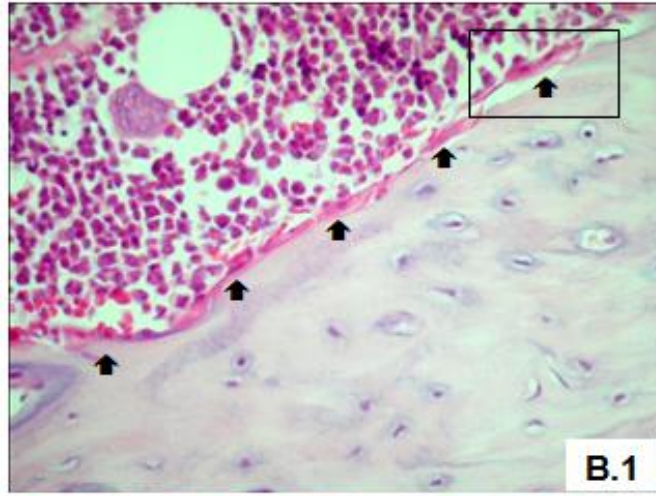
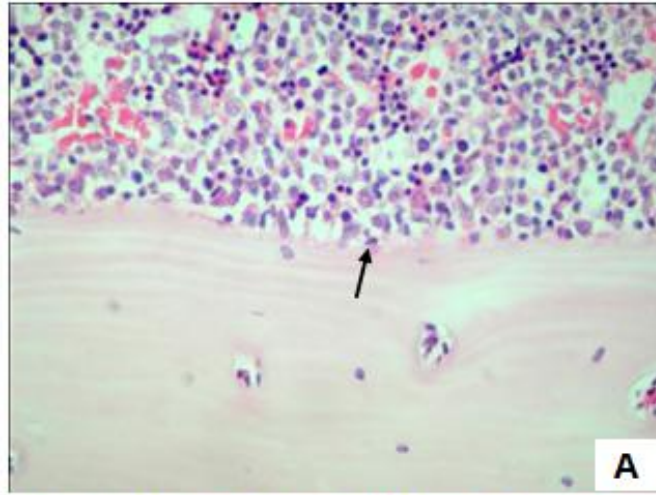
Resim 4: Femur epifiz plağı proliferasyon kıkırdak bölgesi (1) ve Femur diafiz kompakt kemik bölgesi (2) Bax immunohistokimya boyaması. **P:** Proliferasyon zonu, **H:** Hipertrofik zon, **K:** Kemikleşme zonu, **►:** Kıkırdak matriks, **Kİ:** Kemik iliği, **E:** Endosteum, **KK:** Kompakt kemik, **→:** Osteoblast, **➡:** Walkman kanalları, *****: İmmün pozitif bazı kemik matriks. Kontrol grubu (A), Düşük amiodaron grubu (B), Yüksek amiodaron grubu (C), (X400).



Resim 5: Kontrol grubu osteoblastlar (A), osteoklastlar (B1,B2), →: Osteoblast, ➔: Osteoklast. Hematoksilen&Eozin boyası. (A,B1) X400, (B2) X1000.



Resim 6: Düşük doz grubu osteoblastlar (A), osteoklastlar (B1,B2) →: Osteoblast, ➔: Osteoklast. Hematoksilen&Eozin boyası. (A,B1) X400, (B2) X1000



Resim 7: Yüksek doz grubu osteoblastlar (A), osteoklastlar (B1,B2)
→: Osteoblast, ➔: Osteoklast. Hematoksilen&Eozin boyası.
(A,B1) X400, (B2) X1000

Tablo 3. Gruplarda İmmunohistokimyasal Boyanma Bulguları-1

	Kontrol Grubu	Düşük Doz Grubu	Yüksek Doz Grubu	p
Kaspaz-3(epifiz)	58,43 ± 3,99	69,71 ± 4,23	284,00 ± 8,64	0,000
Kaspaz-3 (diafiz)	57,29 ± 4,57	122,57 ± 6,34	244,00 ± 8,64	0,000
Kaspaz-9 (epifiz)	58,86 ± 6,23	181,71 ± 13,94	305,71 ± 10,54	0,000
Kaspaz-9 (diafiz)	56,86 ± 4,14	152,14 ± 8,07	256,00 ± 8,64	0,000
p53 (epifiz)	64,00 ± 4,32	87,29 ± 8,97	218,29 ± 11,28	0,000
p53 (diafiz)	60,29 ± 4,82	102,00 ± 6,48	208,00 ± 8,64	0,000
Bax (epifiz)	60,00 ± 4,32	120,86 ± 7,49	166,29 ± 10,54	0,000
Bax (diafiz)	55,14 ± 5,27	81,71 ± 7,34	172,00 ± 8,64	0,000

Tablo 4. Gruplarda İmmunohistokimyasal Boyanma Bulguları-2

	Kontrol Grubu	Düşük Doz Grubu	Yüksek Doz Grubu	p
Epifiz çapı	45,09 ± 1,65	36,21 ± 1,61	30,55 ± 1,10	0,000
Diafiz çapı	21,16 ± 0,36	19,47 ± 0,38	15,80 ± 1,14	0,000
Femur boyu	118,78 ± 1,28	118,11 ± 1,50	118,42 ± 1,08	0,630
Osteoblast sayısı	29,43 ± 1,51	29,57 ± 3,95	27,71 ± 1,38	0,344
Osteoklast sayısı	1,43 ± 0,53	3,43 ± 0,97	7,71 ± 0,75	0,000

Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu, kontrol grubuna göre kaspaz-3, kaspaz-9, p53, Bax sayısı düzeyleri, diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı (p= 0,000). Yüksek doz grubu ile düşük doz grubu karşılaştırıldığında da yüksek doz grubunda bütün immunohistokimyasal boyama düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (p= 0,000).

5. TARTIŞMA

Amiodaron güçlü bir antiaritmik ajan olup, diğer antiaritmik ilaçlarla kontrol altına alınamayan ventriküler ve supraventriküler taşikardi tedavisinde kullanılır (1). Geniş yan etki profili, amiodaronun klinikte kullanımını sınırlandıran en önemli faktördür.

Yüksek iyot içeriği nedeniyle yapısal olarak tiroid hormonuna benzemektedir. Bu özelliği nedeniyle başta tiroid dokusu olmak üzere birçok organ ve sistem üzerine yan etkisi bulunmaktadır (2). Amiodaron kullanımı ile tiroid fonksiyon bozuklukları, ciltte pigmentasyon, fotosensitivite, periferik nöropati, optik nöropati, ataksi, hepatit, pulmoner fibrozis, pansitopeni gibi bir çok sistemi ilgilendiren geniş yan etkiler görülebilmektedir. Dokularda depolanma özelliği nedeniyle vücuttan atılımı uzamakta ve ilaç kesildikten uzun süre sonra da etkisi devam etmektedir. Uzun süre kullanımını gerektiren endikasyonlarda, dokularda yüksek konsantrasyonlarda depolanması nedeniyle yan etkilerin görülme olasılığı daha da artmaktadır.

Hayvan ve insan çalışmalarında, tiroid fonksiyonları, periferik sinir dokuları, kalp, karaciğer, akciğer ve göz fonksiyonları üzerine amiodaronun histopatolojik etkilerini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır (3). Ancak amiodaronun gelişmekte olan kemik dokusu üzerine etkilerini araştıran histopatolojik çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmamızda amiodaronun farelerde gelişmekte olan kemik dokusu üzerine olan histopatolojik ve apoptotik etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda amiodaronun gelişmekte olan kemik dokusu üzerine olan histopatolojik etkileri; femur boyu, epifiz ve diafiz çapları, osteoblast ve osteoklast sayıları ile değerlendirildi. Amiodaron verilen farelerde, kontrol grubuna göre femur epifiz ve diafiz çaplarında azalma saptandı. Osteoklast sayıları kontrol grubuna göre amiodaron alan farelerde daha yüksek bulundu. Bu artış yüksek doz ilaç verilen farelerde daha belirgin olup istatistiksel olarak da anlamlı idi. Osteoblast sayılarında ise yüksek doz ilaç verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı.

Çalışmamızda ayrıca kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax yöntemleri ile amiodaronun sıçan kemik dokusu üzerine olan apoptotik etkisi araştırıldı. İlaç alan farelerde kontrol grubuna göre kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax sayıları yüksek bulundu. Bu artış yüksek doz

amiodaron alan grupta daha belirgin olup istatistiksel olarak anlamlı idi. Kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax immun boyamasında, ilaç alan gruplarda kemiğin hem diafiz hem de epifiz bölgelerinde daha belirgin immun reaksiyon izlendi. İmmun reaksiyon, yüksek doz amiodaron alan gruplarda daha kuvvetli izlendi.

Amiodaronun çeşitli dokular üzerinde yapılan histopatolojik incelemelerinde, hücre sayılarında ve morfolojilerinde değişiklik yaptığı gösterilmiştir. Saber Abdelruhman ve arkadaşları (78) amiodaronun fare testis dokusu üzerine olan histopatolojik ve sitogenetik etkilerini incelemiştir. Çalışmalarında amiodaron kullanımı ile fare testis dokusunda hem yapısal hem de sayısal bozukluklar tespit edilmiştir. Amiodaron kullanımı ile fare testisinde oluşan başlıca yapısal bozukluklar; kromatid delesyonları, kromozomlarda sentromerik yapılarda azalma, kromozomal füzyonlar, kromatid *gap*leri ve kromatid kırıkları olarak rapor edilmiştir. Sayısal anormallikler olarak ise; monozomi, trizomi, tetrazomi ve poliploidi rapor edilmiştir. Amiodaron kullanan farelerde kontrol grubuna göre mitotik indekslerde azalma saptanmıştır. Aynı çalışmada, spermatogenik hücrelerde azalmanın yanı sıra interstisiyel dokuda da dejenerasyon saptanmıştır. Kontrol grubu fareler ile karşılaştırıldığında amiodaron kullanımı ile; seminifer tübüllerde atrofi ve tübül çaplarında azalma ve germ hücre sayısında azalma saptanmıştır. Amiodaron verilen grupta spermatogenik hücrelerde azalma, sperm baş anomalilerinde artma ve seminifer tübül çapında azalma saptanmıştır. Araştırmacılar tarafından; amiodarona bağlı oluşan toksisitenin muhtemel mekanizmasının direkt ve indirekt sitotoksikite olduğu ileri sürülmüştür. Amiodaron kullanımı ile mitokondriyal hidrojen peroksit sentezi artmakta ve buna bağlı olarak kardiyolipin peroksidasyonu indüklenmektedir. Yine ilaca bağlı mitokondriyal Kompleks-I aktivasyonu inhibe olmakta ve oksidatif fosforilasyon azalmakta, bu da hücrel AT içeriğinde azalmaya neden olmaktadır. Bizim çalışmamızda moleküler düzeyde incelemeler yapılmamakla birlikte hücrel düzeydeki bulgular bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmadaki spermatogenik hücre ve germ hücre sayılarında azalma, seminifer tübüllerde atrofi ve tübül çapında azalmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da; osteoblastlarda azalma, femur metafiz ve epifiz çaplarında azalma saptadık. Osteoblast sayısındaki azalmada amiodaronun direkt sitotoksik etkisinin önemli olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızdaki osteoklast sayısındaki artma da; ilaca bağlı sitotoksikite nedeniyle hasara uğramış hücrelerin aktive osteoklastlar tarafından ortadan kaldırılması amacıyla sayıca artmalarına bağlı olabilir. Aynı çalışmada araştırmacılar;

amiodaron kullanımı ile oluşacak oksidatif hasarın azaltılmasında antioksidanların kullanılabileceğini gündeme getirmişlerdir. Antioksidan kullanımı ile DNA hasarının azalacağı ve böylelikle amiodaron kullanımı ile oluşacak sitotoksik etkilerin azaltılabileceği ileri sürülmüştür.

Rejnmark L ve arkadaşları (55) ileriye dönük ve kontrollü bir klinik çalışmada, Danimarka'da atriyal fibrilasyon nedeniyle izlenen bütün erişkin hastalarda, amiodaron kullanımının kırık oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Ulusal düzeyde yapılan bu çalışmada, atriyal fibrilasyon bulunması ve tedavi amacıyla amiodaron kullanımının, 65 yaş üzeri hastalarda kemik kırığı riskini belirgin olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Buna karşın atriyal fibrilasyonlu hastalarda tedavi amacıyla digoksin kullanımının, amiodaron kullanımına göre kırık riskini azalttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda saptadığımız osteoblastlarda azalma, femur metafiz ve epifiz çaplarında azalma ile birlikte değerlendirildiğinde, amiodaron kullanımına bağlı oluşabilecek osteopeninin bahsedilen çalışmadaki kemik kırıklarında hazırlayıcı faktör olabileceği düşünülebilir. Ancak atriyal fibrilasyonlu ileri yaş hastalarında, kırık oluşumunda ilaç etkisine ek olarak birtakım diğer faktörler de etkili olabilir. Araştırmacılar; atriyal fibrilasyon nedeniyle artmış serebrovasküler olay, hemipleji ve bunlara bağlı düşmeler dışlandığında da amiodaron kullanımının kemik kırıklarının oluşmasında bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. Amiodaron kullanımı ile kırık sıklığının artmasında, ilacın kimyasal yapısının tiroid hormonları ile benzerlik göstermesi ve tiroid fonksiyonlarını etkilemesinin önemli olabileceği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, fotosensitivite yan etkisi nedeniyle amiodaron kullanan hastalara, güneş ışığına maruziyetin azaltılması önerisinin de, D vitamini düzeyinde azalmaya neden olarak kırık oluşumundaki artışa katkıda bulunabileceği tartışılmıştır.

Yaygın olarak kullanılan diğer bir kısım ilaçlarında kemik dokusu üzerine olan etkileri ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Heparin kullanımının hastalarda ve deneysel hayvan modellerinde kemik dansitesinde azalmaya neden olduğu bilinmekle birlikte, ilaca bağlı kemik dokusu kaybına neden olan mekanizmalar son yıllara kadar ortaya konulmamıştır. Bizim çalışmamıza benzer olarak, Jeffrey MM ve arkadaşları (79) standart doz heparinin kemik dokusu üzerine olan histomorfometrik etkilerini deneysel fare modellerinde ayrıntılı olarak incelemişlerdir. Çalışmalarında; ilaç dozu ve kullanım süresi ile orantılı olarak, femur epifiz büyüme plaklarında trabeküler kemik hacimlerinde azalma saptanmışlardır.

Histolojik incelemeler, heparin kullanımına bağı kemikteki hacim kaybının, bizim çalışmamızda olduğu gibi osteoblastik aktivitedeki azalmayla birlikte osteoklastik aktivitedeki artmaya da bağı olduğu gösterilmiştir. Çalışmada, amiodaron kullanan farelerde osteoblast yüzeylerinde kontrol grubuna göre %37, osteoid dokuda ise %75 azalma saptanırken, osteoklastik yüzeylerde %43 artış saptanmıştır. Araştırmacılar ayrıca, osteoblastik ve osteoklastik aktiviteleri; biyokimyasal olarak, kemik yapım belirteci olan alkalen fosfataz ve kemik yıkım belirteci olan piridinolin çapraz bağı tip I kolagenin idrar düzeyi ile seri olarak takip etmişlerdir. Bakılan kemik yapım ve yıkım belirteci düzeylerinde, ilaç dozu ile orantılı, osteoblastik ve osteoklastik aktivitedeki artışı destekleyecek şekilde artışlar saptamışlardır. Bu çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da, kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin çalışılması, çalışmanın değerini artıracaktı. Çalışmamızda, deneysel hayvan modellerinde amiodaron kullanımı ile kemik dokusu üzerinde heparine benzer histomorfometrik bulgular saptanmıştır. Tartışılan deneysel çalışmaya benzer olarak, amiodaron kullanan hastalarda, ilacın kemik üzerine olan etkilerini değerlendirmek amacıyla, kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin takip edilmesi yararlı olacaktır.

Amiodaronun çeşitli dokular üzerinde yapılan çalışmalarında apoptotik değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Kağan ve arkadaşları (80) amiodaronun sıçan testis dokusu üzerine etkilerini morfolojik açıdan incelemişlerdir. Çalışmalarında kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax yöntemleri ile amiodaronun sıçan testis dokusu üzerine olan apoptotik etkisini araştırmışlardır. İlaç alan farelerde kontrol grubuna göre kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax sayıları yüksek bulunmuştur. Bu artış yüksek doz amiodaron alan grupta daha belirgin olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kağan ve arkadaşları ayrıca amiodaronun testis dokusu üzerine olan histopatolojik etkilerini de incelemişlerdir. Çalışmalarında histolojik değerlendirmede saptanan en belirgin bulgu, amiodaron verilen sıçanlarda seminifer tubul lümenlerinde doz ile artan yoğunlukta inflamatuvar hücrelerin bulunmasıydı. Yine yüksek doz grubunda daha belirgin olmak üzere, amiodaron verilen sıçanlarda spermatogonyum hücrelerinde şişme ve hücre sitoplazmasında vakuolizasyon gözlemişlerdir. Çalışmamızda ise hem düşük dozda hem de yüksek dozda amiodaron alan sıçanların kemik dokularının, Bax, p53, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile immun histokimyasal olarak incelendiğinde yüksek oranlarda yoğun apoptotik hücre düzeyine sahip olduğunu saptadık. Ayrıca çalışmamızda Kağan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer şekilde

gelişmekte olan sıçan kemik dokusunda immün histokimyasal boyama sonucu elde edilen kaspaz-3, kaspaz-9, p53, Bax sayısı amiodaron grubunda daha yüksekti. Bu artış yüksek doz amiodaron alan grupta daha belirgindi. Her üç grubun kaspaz-3, kaspaz-9, p53, Bax düzeylerinin ikili karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Choi ve arkadaşlarının (81) çalışmasında, L-132 insan akciğer epitelyal hücre serilerinde, immün histokimyasal ölçüm ve enzim aktivitesi tespit yöntemleri kullanılarak, amiodaronun apoptotik etkileri ortaya konulmuştur. Bu çalışmada kaspaz-3 enzim aktivitesi, hücre içi DNA fragmanlarının tayini değerlendirmede yer alan parametre idi. Bu sonuçlara göre amiodaron, apoptozisi muhtemelen Bax bağımlı olarak intrinsek yolağın etkinleşmesi ve bu yolak üzerinden kaspaz-3 aktivasyonunu gerçekleştirerek uyarmaktadır. Çalışmamızda hem düşük dozda hem de yüksek dozda amiodaron alan sıçanların kemik dokularının, Bax, p53, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ile immün histokimyasal olarak incelendiğinde yüksek oranlarda yoğun apoptotik hücre düzeyine sahip olduğunu saptadık. Çalışmanın aritmi problemi ve kronik hastalık modeli oluşturulmadan sağlıklı sıçanlar üzerinde yapılmış olması, amiodaronun doğrudan kemikler üzerine etkilerini ortaya koyduğunu düşünüyoruz. Deneysel ve klinik çalışma sonuçlarının birlikte yorumlanması, mekanizmaların anlaşılmasına katkı sağlayacak, muhtemel yan etkilerin yakın takip edilmesi ve mümkün olanların önlenmesi için imkan sağlayacaktır.

Takahisa ve arkadaşları (82) sıçan akciğer epitelyal hücre A549 kültürlerinde amiodaronun histopatolojik ve apoptotik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında amiodaronun mitokondriyal membran depolarizasyonu, ATP'de azalma, geliştirilmiş propidyum iyodür alımında artma ve Annexin V-pozitif hücrelerin sayısında artma yaptığını saptamışlardır. Hücre hasarının tespit edildiği çalışmada apoptoza kaspaz - 2 , 3 ve 8 aktivasyonu eşlik ettiğini izlemişlerdir. Ancak kaspaz-9'da değişiklik saptamamışlardır. Bu aktivasyon kaspaz inhibitörleri ile tersine dönmüştür. Bununla birlikte, kaspaz inhibitörlerinin, A549 hücrelerinin amiodarona maruz kaldıktan sonra mitokondriyal membran potansiyeli ya da propidyum iyodür alımı üzerinde bir etkisi izlenmemiş. Aksine L-karnitin ve asetil-L-karnitin gibi mitokondriyal kofaktörler, mitokondriyal depolarizasyonu zayıflatmaktadır, ATP tüketimini ve Annexin-V pozitif hücreleri etkilemeden propidyum iyodür alımını engellemektedir. Bu bulgular amiodarona maruz kalan pulmoner epitel hücrelerinde apoptoz ve nekroz geliştiğini göstermektedir. Çalışmamızda da amiodaronun gelişmekte olan sıçan kemik dokusu üzerindeki apoptotik

etkileri incelendi. Kaspaz-3, kaspaz -9 immun boyamasında amiodaron verilen sıçanlarda kontrol grubuna göre zayıftan kuvvetliye doğru artan immun reaksiyon izlendi. Bu immun reaksiyon yüksek doz amiodaron alan grupta daha kuvvetli izlendi. Sonuç olarak, amiodaronun kemik dokusunda apoptozise yol açtığını düşünmekteyiz.

P53, apoptozu uyaran bir proteindir. Akinori ve arkadaşları (83) p53 sinyalizasyonunun hücre siklusunda önemli modulator olduğu ve kemik iliği hücrelerinde apoptozise yol açtığı düşüncesinden yola çıkarak trabeküler kemik volümünde azalmaya neden olduğu hipotezini irdelemişlerdir. Farelerin tibia kemik iliği alınarak histomorfometrik parametreler analiz edilmiş. Trabeküler yapı, oluşum ve resorpsiyonu açısından p53 +/+ ve p53 -/- grupları arasında anlamlı fark bulunmamış. Trabeküler kemik volümü ve kemik oluşum hızı p53 +/+ farelerde azalma saptanmış. Ancak p53-/- farelerde trabeküler kemik volümünde ve kemik oluşum hızında anlamlı değişiklik izlenmemiş. Trabeküler osteoklast sayısı ve yüzeyinde p53 +/+ farelerde anlamlı bir artış gözlenmiş ancak diğer gruplarla karşılaştırılmasında anlamlı bir değişiklik izlenmemiş. Çalışmamızda p53 immun boyamasında , artan ilaç dozuyla beraber hem epifiz de hem de diafiz bölgesinde immun reaksiyonda artış izlendi. Ayrıca immun histokimyasal boyama sonucu hesaplanan p53 sayısında, artan ilaç dozuyla birlikte artış görülmesi trabeküler kemik volümü ve kemik oluşum hızında azalmayı düşündürmektedir. Bu bulgular amiodaronun gelişmekte olan sıçan kemik dokusunda apoptozise neden olduğunu göstermektedir. Osteoklast sayısının artan ilaç dozuyla birlikte giderek artması ve gruplar arasındaki osteoklast sayısının istatistiksel olarak anlamlı bulunması amiodaronun osteopenik ve osteoporotik etkisini destekler niteliktedir.

Wang ve arkadaşları (88) p53' ün kemiğin remodelingi üzerine detaylı bir çalışma yapmışlardır. P53-/- fareler, osteosklerotik fenotipli kontrol grubuyla karşılaştırılmasında kemik mineral yoğunluğu ve kemik volümünde hafif bir artış izlemişlerdir. P53-/- farelerde trabeküler kemik sayısında % 29 ve trabeküler kemik volümünde % 40 artış izlenmiştir. Bu bulguları x-ray absorpsiometri ve histomorfometri ile desteklemişlerdir. Kortikal kemik volümünde ise hafif bir artış izlenmiştir. P53-/- farelerde osteoblast yüzeyinde artma ve osteoblast sayısının kemik yüzeyine oranında artma izlenmiştir. Bu bulgular ışığında p53'ün osteoblast farklılaşmasında ve osteoblast fonksiyonunda negatif etki gösterdiği sonucuna varmışlardır. P53-/- farelerde artmış kemik kütlesinin sebebi olan hücresel mekanizmalar araştırılmış. Kemik iliğinde, kontrol grubu farelerde benzer sayıda

osteoprogenitör hücre içerip içermediğine bakılmış. ALP, CFU(colony forming unit) ve total CFU sayısı p53-/- ve kontrol grubu ile benzerdi. Bu da mezenşimal hücrelerin osteoblastlara dönüşümünde rol almadığını düşündürmüştü. Osteoblastların farklılaşmasında p53'ün negatif regülasyonunu değerlendirmek için p53-/- farelerin kalvarialden primer osteoblastlar temin edilmiş. P53-/- farelerin osteoblastların daha çok ALP eksprese ettiği belirlenmiş. Bu, p53-/- farelerin kemik iliğinde artmış osteoblast diferansiyasyonunu göstermektedir. P53'ün kemiğin yenilenmesindeki düzenleyici mekanizmaları araştırılmıştır. P53 -/- farelerde osteoblast farklılaşmasında ve osteoblast sayısında artışın kemik oluşumunda artışa neden olduğu gösterilmiştir. P53, osteoblastogenezisin yanısıra osteoklastogenezisde de önemli rol oynamaktadır. P53 -/- farelerde osteoklast sayısında artma ve buna bağlı kemik yıkımında artma olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda amiodaron verilen grupta p53 sayısının artışının istatistiksel olarak anlamlı olması kemik dokusundaki apoptozisi destekler niteliktedir. Ayrıca p53'ün osteoklast ve osteoblast oluşumunda rol alması, amiodaronun kemik remodeling üzerine etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

Bax apoptozu uyaran, Bcl-2 ise apoptozu inhibe eden bir proteindir. Olivier ve arkadaşları (89) farelerde yaptığı bir çalışmada ulnanın diafiz bölgesinde mikro hasar yaparak Bax proteininin kemik dokusu üzerine etkisini araştırmışlardır. Kemikte mikro hasar yapılarak 6 saat sonra osteositlerde Bax ve Bcl-2 saptamışlardır. Mikrohasar yapılan bölgede yoğun TUNNEL (+) boyanan, total hücrelerin % 25'ini içeren osteositler tespit edilmiş. TUNNEL (+) osteositlerin sayısının, mikrohasar yapılan bölgeden uzaklaştıkça azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, Bax ekspresyonu mikrohasar yapılan bölgede yoğun olarak izlenmiş ve mikro hasar bölgesinden uzaklaştıkça Bax ekspresyonunun hızlıca azaldığı gözlemlenmiştir. Total hücrelerin % 41'inde Bax eksprese edildiği gösterilmiştir. Mikrohasar bölgesinde Bax proteini eksprese eden osteositlerin sayısı, TUNNEL (+) osteositlerin sayısından % 70 daha yüksek bulunmuş. Propaoptotik sinyaller mikro hasara yakın bölgelerde daha yoğun iken, antiapoptoik sinyaller mikro hasar bölgesine daha uzak bölgelerde artış göstermektedir. Bax piki ve TUNNEL boyamadaki osteositler, mikro hasar yapılan yerde yani kemik yıkımının olduğu bölgede gözlemlenmişlerdir. Çalışmamızda, Bax sayısının kontrol grubuna göre amiodaron verilen farelerde arttığı saptandı. Bu artış yüksek doz amiodaron alanlarda daha belirgin idi. Bax sayısındaki artış, amiodaronun osteositleri de etkileyerek kemik dokusunda histopatolojik değişiklikler yaptığını

düşündürmektedir. Ayrıca amiodaronun kemiklerde apoptozise yol açtığını göstermektedir.

Normal bir kemik dokuda yaşam boyunca kemik yıkımı ve yapımı bir denge halindedir ve yapım yıkımı karşılayamazsa veya denge yıkım lehine bozulursa kemik dokuda kayıp ortaya çıkmaktadır. Bu işlem sırasında osteoblastlar kemik yapımını, osteoklastlar ise kemik yıkımından sorumludurlar. Çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri de osteoklast ve osteoblastlara etki ederek bu dengeyi sağlamaya çalışır. Tümör nekrozis faktör (TNF) süper ailesi ve TNF üyelerine ait bazı peptidler de kemiğin yapılanmasında rol oynar. Bu peptidler osteoblastlar tarafından sentez edilirler ve osteoprotegerin (OPG)/osteoklastojenezis inhibitör faktör (OIF) ve osteoprotegerin-ligand (OPGL, RANKL)/osteoklast farklılaşma faktörleridir. Bu peptitler çeşitli hormon ve sitokinlerin etkisi altında osteoklast prekürsörleri üzerinde bulunan nükleer faktör kappa B aktivasyon (RANK) reseptörü üzerinden etki yaparak osteoklast farklılaşmasını etkilerler. Bu durum kemik formasyonu ve yıkımının bir denge halinde işlev görmesini sağlamaktadır. Bir başka deyişle OPG, osteoklastojenezisi inhibe ederken, OPGL (RANKL) stimüle etmektedir. Dengenin OPGL lehine bozulması osteoklastlar üzerinden kemik yıkımının artmasına neden olmaktadır (86). Çalışmamızda osteoblast sayısındaki azalma düşük doz ve yüksek doz amiodaron verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, osteoklast sayılarındaki artış düşük doz ve yüksek doz amiodaron verilen gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu. Bu artış yüksek doz doz amiodaron verilen grupta daha belirgin idi. Bu bulgular neticesinde kemik yapım ve yıkım arasındaki dengenin osteoklastlar lehine bozulduğu görülmektedir. Sonuçta amiodaron kemik yıkımında artışa neden olarak osteopenik veya osteoporotik etki göstermektedir.

Spadaro ve arkadaşlarının (87) üç haftalık ratların sol dizlerinin kontrol olarak kullanıldığı bir çalışmada, sağ diz bölgesine 3 ya da tek fraksiyonda toplam 25 Gy radyoterapi uygulaması ile 3 radyoprotektör ajanın etkisine bakılmıştır. Fraksiyone radyoterapi öncesi bir gruba sadece amifostin, bir gruba amifostin ile birlikte pentoksifilin, bir gruba amifostin ile birlikte misoprostol, bir gruba sadece pentoksifilin ve bir gruba da sadece misoprostol uygulanmıştır. Radyoprotektörsüz tek fraksiyon 25 Gy radyoterapi, ortalama %24.4 oranı ile en ileri tibia boy kısalığına neden olmuştur. Fraksiyonasyon ise bu kısalığı %18.8'e azaltmıştır. Tek fraksiyona nazaran aynı radyoterapi dozunun 3 fraksiyonda verilmesinin getirdiği avantajın ötesinde, radyoprotektörlerin tek ya da kombine kullanımı ile ortalama femur boy kısalma oranı anlamlı olarak azalmıştır.

Radyoterapi sonrası görülen en uzun femur boyu, normale göre %11 büyüme geriliği ile fraksiyone radyoterapi ve amifostin ile kombine edilen misoprostol kolunda bulunmuştur. Çalışmamızda, femur boyu açısından kontrol grubu, düşük doz amiodaron ve yüksek doz amiodaron grubu karşılaştırıldı. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Hak ve arkadaşları (88) dalteparin kullandıkları kırık iyileşmesi çalışmasında, ratlarda stabil femur kırıkları oluşturmuşlar ve iki hafta süreyle enjeksiyon yapılan hayvanların 2, 3 ve 6. haftalardaki radyolojik, histolojik ve mekanik incelemelerini karşılaştırmışlardır. Kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında deltaparin kullanılan grupta kırık iyileşmesi açısından anlamlı bir fark tespit edememişlerdir. Amiodaronun kemik üzerine olan etkilerinin araştırılmasında, kemikte kırık formasyonu oluşturarak kemik iyileşmesi sürecine etkilerinin incelenmesi konuya yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda TUNNEL yöntemi ile kemik hücrelerindeki histopatolojik değişikliklerin incelenmesi de hedeflenmişti. Ancak kemiklerden alınan kesitlerin boya tutmaması üzerine inceleme yapılamadı.

Çocukluk çağında birçok hormonun etkisi altında hızlı büyümenin, kilo alımının, iskelet sistemi, genital sistemin ve seksüel fonksiyonların gelişimi göz önüne alındığında ilaçlara bağlı oluşan istenmeyen etkiler daha da önem taşımaktadır. Amiodaron yenidoğan hastalarda dahil çocukluk çağı ve erişkin dönemde uzun süre kullanılabilen bir ilaçtır (2). Bu hastalarda amiodaronun kemik dokusu üzerine olan etkileri bilinmemektedir. Çocuklarda ve yetişkinlerde, amiodaronun kemik dokusu üzerine etkilerinin araştırılması, ilacın yan etki profilinin bilinmesine olanak sağlayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışmada amiodaron kullanımı ile gelişmekte olan sıçan kemik dokusundaki histopatolojik değişiklikler ve apoptotik etkiler saptanmıştır. İlacın kullanım süresinin ve dozunun artmasıyla kemik dokusu üzerindeki etkileri daha çok artmaktadır. Amiodaronun dokularda depolanması ve yarı ömrünün uzun olması nedeniyle uzun süre kullanımını gerektirecek endikasyonlarda diğer sistemlerin yanında kemik dokusunun da yakından izlenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda amiodaronun gelişmekte olan sıçan kemik dokusu üzerindeki histopatolojik ve apoptotik değişiklikler neticesinde ilacın osteopenik ve osteoporotik etkisi olduğu saptandı. Amiodaronun kemik dokusu üzerine olan etkilerinin incelenmesinde kemik yapım ve yıkım belirteçlerinin bakılması, DEXA gibi görüntüleme yöntemleri ile desteklenmesi ve kırık formasyonu oluşturularak kemik iyileşmesi sürecine etkisinin araştırılması konuya katkı sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda amiodaronun dozla ilişkili olarak, kemik dokusu gelişimi üzerine osteoporotik etkisi olduğu ve apoptotik değişikliklere yol açtığı histopatolojik yöntemlerle gösterilmiştir. Doza bağımlı olarak artan osteoporotik etkinin ileride yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyecek sonuçlar doğurabileceği göz önüne alınarak tedavilerin dikkatli planlanması gerekmektedir. Bu nedenle amiodaron kullanan hastalar kısa ve uzun dönemde hem klinik açıdan hem de laboratuvar testleri ile yakından izlenmeli ve klinisyenler muhtemel riskler açısından dikkatli olmalıdır. Aritmisi olan hastalarda hastalığın kendisinin ve kullanılan antiaritmik ilaçların kemik dokusu ve metabolizmasının üzerine etki mekanizmaların tam olarak anlaşılması için daha fazla sayıda araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Ayrıca, amiodaron kullanan hastalarda ilacın kemik dokusu ve metabolizması üzerine olan etkilerinin hormonal tetkikler, biyokimyasal parametreler ve DEXA gibi görüntüleme yöntemleri ile araştırılması konuya katkı sağlayacaktır.

7. ÖZET

AMİODARONUN SIÇAN KEMİK DOKUSU ÜZERİNE MORFOLOJİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Amiodaron, diğer antiaritmik ajanlara dirençli çeşitli taşiaritmilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan güçlü antiaritmik bir ilaçtır. Yan etkilerinin sık görülmesi tedavide kullanımını sınırlayan en önemli nedenlerden biridir. Amiodaronun, kemik dokusu üzerine kısıtlı sayıda çalışma olması nedeniyle, çalışmamızda, amiodaronun sıçanlarda gelişmekte olan kemik dokusu üzerine morfolojik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 21 erkek Sprague Dawney cinsi pubertal sıçan kullanıldı. Sıçanlar, her grupta yedi sıçan olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki sıçanlara içme suyu, düşük doz grubundakilere 20 mg/kg/g ve yüksek doz grubundaki sıçanlara ise 200 mg/kg/g amiodaron oral yolla iki dozda verildi. Sıçanlar 14 gün sonra sakrifiye edildi ve sol femur dokuları alındı. Kemik dokusunun immunohistokimyasal incelenmesinde femur boyu, epifiz ve diafiz çapı ayrıca osteoblast ve osteoklast sayıları hesaplanmıştır. İndirekt immunohistokimyasal boyama yöntemi apoptozisi belirlemek için kullanıldı.

Amiodaron verilen sıçanlarda, kontrol grubuna göre femur epifiz ve diafiz çaplarında azalma saptandı. Osteoklast sayıları kontrol grubuna göre amiodaron alan farelerde daha yüksek bulundu. Bu artış yüksek doz ilaç verilen sıçanlarda daha belirgin olup istatistiksel olarak da anlamlı idi. Osteoblast sayılarında ise yüksek doz ilaç verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma saptandı. Kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax yöntemleri ile amiodaronun sıçan kemik dokusu üzerine olan apoptotik etkisi araştırıldı. İlaç alan sıçanlarda kontrol grubuna göre kaspaz-3, kaspaz-9, p53 ve Bax sayıları yüksek bulundu. Bu artış yüksek doz amiodaron alan grupta daha belirgin olup istatistiksel olarak anlamlı idi.

Bu çalışmada, amiodaron kullanımı ile sıçan kemik dokusu gelişimi üzerinde histopatolojik değişiklikler ve apoptotik etkiler saptanmıştır. Amiodaronun kemik dokusu üzerine olan etkilerinin incelenmesinde kemik yapım ve yıkım parametrelerine bakılması ve DEXA gibi görüntüleme yöntemleri ile araştırılması konuya katkı sağlayacaktır.

8. SUMMARY

INVESTIGATION OF THE MORPHOLOGIC EFFECTS OF AMIODARON ON RAT BONE TISSUE

Amiodaron is a strong antiarrhythmic drug which is commonly used to treat various tachyarrhythmias that are resistant to other antiarrhythmic agents. Its frequent side effects are among the most important reasons limiting its use in treatment. Given the limited number of studies on the effects of amiodaron on bone tissue, we aimed to evaluate the morphological effects of amiodaron on the developing bone tissue in rats.

In the present study, 21 male Sprague Dawney pubertal rats were used. Rats were randomly divided into 3 groups (n=7). Control group received tap water, low dose amiodaron group received 20 mg/kg of amiodaron per day, and high-dose amiodaron group received 200 mg/kg of amiodaron per day. Amiodaron was administered orally. Rats were sacrificed 14 days later, and left femoral tissues were removed. During immunohistochemical examination of bone tissue, femoral length, diameter of epiphysis diaphysis, and osteoblast and osteoclast counts were calculated. Indirect immunohistochemical staining was used to detect apoptosis.

There was a reduction in femoral epiphysis and diaphysis diameters in the amiodaron-treated rats compared to the control group. The number of osteoclasts was higher in amiodaron-treated rats compared to the control group. This increase was more prominent and statistically significant in rats which received high dose amiodaron. Osteoblast count decreased in the high-dose amiodaron group, but this decrease was not significant. Caspase 3, caspase 9, p53 and Bax methods were used to investigate the apoptotic effect of amiodaron on the rat bone tissue. Caspase 3, caspase 9, p53 and Bax levels were higher in amiodaron-treated rats compared to the control group. This increase was more prominent and statistically significant in rats which received high dose amiodaron.

In the present study, histopathological changes and apoptotic effects were detected on rat bone tissue development. Analysis of bone formation and deformation parameters and those of imaging modalities such as DEXA will contribute to our understanding of amiodaron's effect on bone tissue.

9. KAYNAKLAR

1. Connolly SJ: Evidence-Based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation*,100: 2025-2034, 1999.
2. Evren L and Schalij MJ: Amiodarone: an effective antiarrhythmic drug with unusual side effects. *Heart*, 96: 1593-1600, 2010.
3. Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE: The effects of amiodarone on the thyroid. *Endocrine Reviews* 22(2): 240-254, 2001.
4. Goldschlager N, Epstein AE, Naccarelli GV, et al. A practical guide for clinicians who treat patients with amiodarone: 2007. *Heart Rhythm* 2007; 4:1250.
5. Holt DW, Tucker CT, Jackson PR, Storey CGA. Amiodarone pharmacokinetics. *Am Heart J*. 1983;106:840–847.
6. Freedman MD, Somberg JC. Pharmacology and pharmacokinetics of amiodarone. *J Clin. Pharmacol.* 1991;31:1061.
7. Anastasiou-Nana M, Lewis G, Moulopoulos S. Plasma levels of amiodarone after intravenous and oral administration. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1981;19:599–600.
8. Connolly SJ, Dorian P, Roberts RS, Gent M, Bailin S, Fain ES, Thorpe K, Champagne J, Mario T, Coutu B, Gronefeld GC, Hohnloser SH, for the Optimal Pharmacological Therapy in Cardioverter Defibrillator Patients (OPTIC) Investigators: Comparison of β -Blockers, amiodarone plus β -Blockers, or sotalol for prevention of shocks from implantable cardioverter defibrillators. *JAMA*, 295: 165-171, 2006.
9. Desai AD, Chun S, Sung RJ. The role of intravenous amiodarone in the management of cardiac arrhythmias. *Ann Intern Med* 1997; 127:294.
10. Vassallo P and Trohman RG: Prescribing amiodarone An evidence-based review of clinical indications. *JAMA*, 298(11): 1312-1322, 2007.
11. Dorian P, Mangat I: Role of amiodarone in the era of the implantable cardioverter defibrillator. *J Cardiovasc electrophysiol* 2003; 14: 78.
12. Lane RD, Nguyen KT, Niemann JT, Bolte RG, Etheridge SP, Gausche-Hill M: Amiodarone for emergency care of children. *Pediatr Emer Care* 26: 382-392, 2010.

13. Singh BN. Expanding indications for the use of class III antiarrhythmic agents in patients at high risk for sudden death. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1995;6:887-900.
14. Dorian P, Cass D, Schwartz B, et al. Amiodarone as compared with lidocaine for shock-resistant ventricular fibrillation. *N Engl J Med* 2002; 347: 955.
15. Cairns JA, Connolly SJ, Roberts R, Gent M, for the Canadian Amiodarone Myocardial Infarction Arrhythmia Trial Investigators: Randomised trial of outcome after myocardial infarction in patients with frequent or repetitive ventricular premature depolarisations: CAMIAT. *Lancet*, 349: 675-682, 1997.
16. Investigators TC. Randomized antiarrhythmic drug therapy in survivors of cardiac arrest (the CASCADE study). *Am J Cardiol* 1993;72:280-7.
17. Julian DG, Camm AJ, Frangin G, et al. Randomised trial of effect of amiodarone on mortality in patients with left ventricular dysfunction after recent myocardial infarction: EMIAT. *Lancet* 1997;349:667-74.
18. Paul T, Guccione P. New antiarrhythmic drugs in pediatric use: amiodarone. *Pediatr Cardiol* 1994;15:132-138.
19. Perry JC, Fenrich AL, Hulse JE, et al. Pediatric use of intravenous amiodarone: efficacy and safety in critically ill patients from a multicenter protocol. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:1246-1250.
20. Garson A, Bink-Boelkens M, Hesslein PS, et al. Atrial flutter in the young: a collaborative study of 380 cases. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:871-878.
21. Villain E, Vetter VL, Garcia JM, et al. Evolving concept in the management of congenital junctional ectopic tachycardia: a multicenter study. *Circulation* 1990;81:1544-1549.
22. Strasburger JF, Cureo BF, Michon MM, et al. Amiodarone therapy for drug-refractory fetal tachycardia. *Circulation* 2004;109:375-379.
23. Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KLR, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic implications of P-glycoprotein modulation. *Pharmacotherapy* 2001; 21: 778-96 .
24. Product Information. Propulsid (cisapride). Titusville (NJ): Janssen Pharmaceutica Inc., 2000.
25. Lee TH, Friedman PL, Goldman L, et al. Sinus arrest and hypotension with combined amiodarone-diltiazem therapy. *Am Heart J* 1985; 109: 163-4.
26. Klein HO, Beker B, DiSegni E, et al. Asystole produced by the combination of amiodarone and digoxin. *Am Heart J* 1987;113: 399-400.

27. Nolan Jr PE, Marcus FI, Hoyer GL, et al. Pharmacokinetic interaction between intravenous phenytoin and amiodarone in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 46: 43-50.
28. Kerin NZ, Blevins RD, Goldman L, et al. The incidence, magnitude, and time course of the amiodarone-warfarin interaction. *Arch Intern Med* 1988; 148: 1779-81.
29. Product Information. Tikosyn [(TM)] dofetilide. New York (NY): Pfizer Inc., 1999.
30. Product Information. Tambocor [(TM)] flecainide acetate. St Paul (MN): 3M Pharmaceuticals, 1997.
31. Product Information. Betapace AF[(TM)] sotalol hydrochloride. Wayne, (NJ): Berlex Laboratories, 2000 .
32. Connolly SJ: Evidence-based analysis of amiodarone efficacy and safety. *Circulation* 1999; 100: 2025-34
33. Topol EJ, Lerman BB: Hypomagnesemic torsade de pointes. *Am J Cardiol* 1983; 52: 1367
34. Widerhorn J, Bhandari AK, Bughi S, et al.: Fetal and neonatal adverse effects profile of amiodarone treatment during pregnancy. *Am Heart J* 1991, 122:1162–1166.
35. Wiersinga WM. Amiodarone and the thyroid. In: WeetmanAP, Grossman A (eds). *Pharmacotherapeutics of the thyroid gland*. Berlin: Springer Verlag, 1997; 225-87.
36. Safran M, Fan SL, Bambini G, Pinchera A, Martino E, Braverman LE. Effects of amiodarone and desethylamiodarone on pituitary deiodinase activity and thyrotropin secretion in the rat. *Am J Med Sci* 1986; 29:136-41.
37. Beddows SA, Page SR, Taylor AH, et al. Cytotoxic effects of amiodarone and desethylamiodarone on human thyrocytes. *Biochem Pharmacol* 1989; 38:4397-403.
38. Lombardi A, Martino E, Braverman LE. Amiodarone and the thyroid. *Thyroid Today* 1990; 13:1-7.
39. Martino E, Aghini-Lombardi F, Mariotti S, Bartalena L, Braverman LE, Pinchera A. Amiodarone: a common source of iodine induced thyrotoxicosis. *Horm Res* 1987; 26:158-71.
40. Albert SG, Alves LE, Rose EP. Thyroid dysfunction during chronic amiodarone therapy. *J Am Coll Cardiol* 1987; 9:175-83.
41. Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE: The effects of amiodarone on the thyroid. *Endocrine Reviews* 22(2): 240-254, 2001.

42. Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S, et al. Color flow doppler sonography rapidly differentiates type 1 and type 2 amiodarone induced thyrotoxicosis. *Thyroid* 1997; 7:541-5.
43. Aghini-Lombardi F, Mariotti S, Fosella PV, et al. Treatment of amiodarone iodine induced thyrotoxicosis with plasmapheresis and methimazol. *J Endocrinol Invest* 1993;16:823-6.
44. Wolff J. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev* 1998; 50:89-105.
45. Bartalena L, Brogioni S, Grasso L, Bogazzi F, Burelli A, Martino E. Treatment of amiodarone induced thyrotoxicosis, a difficult challenge: results of a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:2930-3.
46. Trip MD, Wiersinga WM, Plomp TA. Incidence, predictability and pathogenesis of amiodarone induced thyrotoxicosis and hypothyroidism. *Am J Med* 1991; 91:507-11.
47. Martino E, Mariotto S, Aghini-Lombardi F, et al. Short term administration of potasyum perchlorate restores euthyroidism in amiodarone iodine induced hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63:1233-6.
48. Dusman RE, Stanton MS, Miles WM et al. Clinical features of amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Circulation* 1980;82:51-9.
49. Kennedy JI, Myers JL, Plumb VJ et al. Amiodarone pulmonary toxicity, clinical, radiologic, and pathologic correlations. *Arch Intern Med* 1987;147:50-5.
50. Haris L, McKenna W), Rowland E, et al. Side effects of long term amiodarone therapy. *Circulation* 1983; 67: 45-51.
51. Reingardene DI, Zhilene VI. Dermatological adverse reactions of amiodarone. *Kardiologija* 2005; 45: 27-30.
52. Palakurthy PR, Iyer V, Meckler RJ: Unusual neurotoxicity associated with amiodarone therapy. *Arch Intern Med*, 147: 881-884, 1987.
53. Huang X, Yang Y, Zhu J, Gao X, Wang G, Tan H, Liang Y, Li J: Clinical applications and acute hepatotoxicity of intravenous amiodarone. *J Int Med Res*, 37: 1928-1936, 2009.
54. Haris L, Mckenna WJ, Rowland E, Holt DW, Storey GCA, Krikler DM: Side effects of long-term amiodarone therapy. *Circulation*, 67(1): 45-51, 1983.
55. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Fracture risk in patients treated with amiodarone or digoxin for cardiac arrhythmias: a nation-wide case-control study *Osteoporos Int* (2007) 18:409–417.
56. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR. Bone biology part I. *Bone Joint Surg* 1995;77:1256

57. Jungueria Carlos L, Carnerio J, Kelley O. Bone In: *Basic Histology*. Appleton and Lange, New Jersey, 132-151, 1995.
58. Jungueira LC, Carneiro J, Temel Histoloji, Kemik, Çev: Aytekin Y, Solakoglu S, 10. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2003: 141-156
59. Stevenson J A, Marsh M S. *Osteoporosis Atlases*. 2th Ed, New York: Parthenon Publishing Group, 2000.
60. Junqueira C L, Carneiro J, Kelley R O. Kemik. Çeviri: Aytekin Y, *Temel Histoloj*. 7. Baskı, İstanbul : Baris kitabevi, 1993 :170-195.
61. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop*, 2000;11:403-412.
62. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*, 1992;13:3-6.
63. Caplan AI. Cartilage begets bone versus endochondral myelopoiesis. *Clin Orthop*, 1990;261:257-267.
64. Van Staa TP, Leufkens HG, Abenhaim L, et al. Use of oral corticosteroids and risk of fractures. *J Bone Miner Res* 2000;15:993-1000.
65. Kaji H, Sugimoto T, Kanatoni M, et al. Dexamethasone stimulates osteoclast like celi formation by directly acting on hemopoietic blast cells anden hances osteoclast like celi formation stimulated by paratyroid hormone and prostoglandin E2. *J Bone Miner Res* 1997;40:734-741.
66. Nas K, Çevik R. Osteoporozda risk faktörleri. Göksoy T (ed):Osteoporozda Tanı ve Tedavi, Merajans, İstanbul, 2000:69-94.
67. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239-57, 1972.
68. Elmore S: Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495- 516, 2007.
69. Hughes, D. E., Wright, K. R., Uy, H. L., Sasaki, A., Yoneda, T., Roodman, G. D., Mundy, G. R., and Boyce, B. F. (1995b). Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 10, 1478-1487.
70. Mee, A. P., (1999). Paramyxoviruses and Paget's disease: The affirmative view. *Bone* 24(5 Suppl.), 19S-21S.
71. Franzoso, G., Carlson, L., Xing, L. P., Poljak, L., Shores, E. W., Brown, K. D., Leonardi, A., Tran, T., Boyce, B. F., and Siebenlist, U. (1997). Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev.*11, 3482-3496.

72. Gori, F., Hofbauer, L. C., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Khosla, S., and Riggs, B. L.(2000).The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 141, 4768-4776.
73. Villanova, I., Townsend, P.A., Uhlmann, E., Knolle, J., Peyman, A., Amling, M., Baron, R., Horton, M.A., and Teti, A. (1999). Oligodeoxynucleotide targeted to the αv gene integrin synthesis, impairs osteoclast function, and activates intracellular signals to apoptosis. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1867-1879.
74. Van't Hof, R.J., and Ralston, S.H. (1997). Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclasts progenitors and suppressing osteoclast activity. *J. Bone Miner. Res.* 12, 1797-1804.
75. Jilka, R.L., Parfitt, A.M., Manolagas, S.C., Bellido, T., and Smith, C.A. (1999a). Cleavage of collagen by osteoblasts in vitro generates anti-apoptotic signals: A mechanism for the regulation of their functional life span and fate during bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 14, S343.
76. Ahuja, S.S., Zhao, S., Bellido, T., Plotkin, L.I., Sato, N., and Bonewald, L. (1999). CD40 ligand (CD40L) is an antiapoptotic factor for bone cells. *J. Bone Miner. Res.* 14, S345.
77. Bellido, T., Huening, M., Raval-Pandya, M., Manolagas, S.C., and Christakos, S. (2000). Calbindin-D28k is expressed in osteoblastic cells and suppresses their apoptosis by inhibiting caspase-3 activity. *J. Biol. Chem.* 275, 26328-26332.
78. Saber Abdelruhman Sakr, Mohamed El-said Zoil,, Samraa Samy El-shafey.Ameliorative effect of grapefruit juice on amiodarone-induced cytogenetic and testicular damage in albino rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; 3(7): 573-579.
79. Muir JM, Andrew M, Hirsh J, Weitz JI, Young E, Deschamps P et al.Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. *Blood.* 15;88(4): 1314-20, 1996.
80. Kağan
81. Choi I, Kim B, Cho K, Park J, Jang M, Shin M, Jung S, Chung J, Kim C: Amiodarone induces apoptosis in L-132 human lung epithelial cell line. *Toxicology Letters* 132: 47-55, 2002.
82. Takahisa Yano, Yoshinori Itoh, Masahiro Yamada, Nobuaki Egashira, Ryozo Oishi. Combined treatment withL-carnitine and a pan-caspase inhibitor effectively reverses amiodarone-induced injury in cultured human lung epithelial cells. *Apoptosis* (2008) 13:543–552.

83. Akinori S., Takeshi S., Shinya T., Ryuji O., Naoki K., Toshiyuki N., Toshitaka N. Disruption of the p53 gene results in preserved trabekular bone mass and bone formation after mechanical unloading. *Journal of bone and mineral research* volume 17, number 1, 2002.
84. Wang X., Kua HY., Hu Y., Guo K., Zeng Q., Wu Q., Ng HH., Karsenty G., de Crombrughe B., Yeh J., Li B. 2006. P53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis , and bone remodeling. *J Cell Biol* 172:115-125.
85. Olivier V., Nadine A. Tatton, Robert J. Majeska, and Mitchell B. Schaffler. Spatial distribution of bax and bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: Complementary roles in bone remodeling regulation? *Journal of bone and mineral research*. 2002; volume 17, number 5.
86. Hartman C, Hochberg Z, Shamir R. Osteoporosis in Pediatrics. *IMAJ* 2003; 5;509-15.
87. Spadaro JA, Horton JA, Margulies BS, Luther J, Strauss JA, Farnum CE, et al. Radioprotectant combinations spare radiation-induced damage to the physis more than fractionation alone. *Int J Radiat Biol* 2005;81(10):759-65.
88. Hak DJ, Stewart RL, Hazelwood SJ. Effect of low molecular weight heparin on fracture healing in a stabilized rat femur fracture model. *J Orthop Res*. 24(4): 645-52, 2006.