

## Deneyel Osteoporoz Oluşturulan Ratlarda Beyin Natriüretik Peptid Düzeyinin Biyokimyasal Belirteçler, Kemik Mineral Yoğunluğu ve Progenitör Faktörlerle İlişkisi

### Investigation of the Relations Between the Brain Natriuretic Peptide Levels and Biochemical Markers, Bone Mineral Density and Progenitor Factors in Rats with Experimental Osteoporosis

✉ Mehmet Uçar<sup>1</sup>, ✉ Hüseyin Demir<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kayseri Şehir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği, Kayseri, Türkiye

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

#### ÖZ

**Amaç:** Deneyel osteoporoz oluşturulan ratlarda plazma beyin natriüretik peptid (BNP) düzeyinin kemik mineral yoğunluğu (KMY), kemik döngüsünün biyokimyasal belirleyicileri ve progenitör faktörler ile olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Bu çalışmada ağırlığı 240-280 gr arasında değişen 36 adet Wistar-Albino tipi rat (18 erkek ve 18 dişi) deneyel osteoporoz ve kontrol grupları oluşturmak üzere eşit olarak dört gruba ayrıldı. Osteoporoz için dişi ratlara ovariektomi [ovariektomize grup (OVX) (n=9)] ve erkek ratlara orşiektomi [orşiektomize grup (ORX) (n=9)] cerrahi işlemi uygulandı. Cerrahi işlemden dört ay sonra tüm ratların kemik yapım belirleyicilerinden plazma kalsiyum (Ca), fosfor (P), alkalen fosfataz (ALP) ve osteokalsin (OK) düzeyleri ve kemik yıkım belirleyicilerinden plazma ve idrar C-telopeptid (CTX) düzeyleri ve kemik üzerine progenitör etkili sitokinlerden insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I) ve transforming growth faktör-β1 (TGF-β1) düzeyleri ve BNP düzeylerini değerlendirmek için kan ve idrar örnekleri alındı. Ayrıca lumbal ve proksimal femur KMY'leri Dual enerji x-ray absorpsiyometri kullanılarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Osteoporoz oluşturulan OVX ve ORX gruplarında kontrol gruplarına göre lumbal ve femur bölgelerinde KMY değerleri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ( $p<0.05$ ). Ovariektomize ile dişi kontrol grubu (n=9) arasında ve orşiektomize ile erkek kontrol grubu (n=9) arasında plazma ALP, OK, CTX plazma ve CTX idrar değerleri osteoporoz oluşturulan gruplarda kontrol gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). Ca ve P değerlerinde ise bir farklılık gözlenmedi. BNP ve TGF-β1 değerleri osteoporoz oluşturulan gruplarda kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük bulundu ( $p<0.05$ ). IGF-I düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu. Osteoporotik gruplarda BNP değerleri ile KMY ve TGF-β1 değerleri arasında pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla,  $r=0,636$ ;  $p=0,01$  ve  $r= 0,653$ ;  $p=0,036$ ). BNP ile IGF-I ve biyokimyasal belirleyiciler arasında anlamlı korelasyon yoktu ( $p>0.05$ ).

**Sonuç:** Deneyel osteoporoz oluşturulan ratlarda plazma ve idrar BNP düzeyleri daha düşük bulundu. Ayrıca ratların KMY'leri ile plazma ve idrar BNP düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptandı. Bu bulgular osteoporoz etyopatogenezinde BNP'nin rolünün olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** beyin natriüretik peptid, osteoporoz, insülin benzeri büyüme faktörü-I, transforming growth faktör-β1.

#### ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to investigate the relations between the brain natriuretic peptide (BNP) levels and the bone mineral density (BMD), biochemical markers of bone turnover and the progenitor factors.

**Materials and Methods:** Thirty-six Wistar-Albino rats (18 males and 18 females), weighing between 240-280 g, were equally divided into four to form experimental osteoporosis and control groups. To create osteoporosis, female rats underwent ovariectomy [ovariectomized group (OVX) (n=9)] and male rats underwent orchietomy [orchietomized group (ORX) (n=9)]. Four months after surgery, blood and urine samples were obtained to assess the plasma levels of calcium (Ca), phosphorus (P), alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) for bone formation, and plasma and urinary levels of C-telopeptide (CTX) for bone resorption, and plasma levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) and BNP (plasma and urine) for progenitor effect on bone. Additionally, lumbar and proximal femoral BMDs were evaluated using Dual energy x-ray absorptiometry.

**Results:** BMD values in the lumbar and femoral regions were significantly lower in the OVX and ORX groups with osteoporosis compared to the control groups ( $p<0.05$ ). Between the ovariectomized and female control group (n=9) and between the orchietomized and male control group (n=9), plasma ALP, OK, CTX and urinary CTX levels were significantly higher in the osteoporotic groups compared to the control groups ( $p<0.05$ ). There was no difference in Ca and P levels. BNP and TGF-β1 values were found to be statistically significantly lower in the osteoporotic groups compared to the control groups ( $p<0.05$ ). There was no significant difference between the groups in IGF-I levels. There was a positive correlation between BNP levels and BMD and TGF-β1 values in the osteoporotic groups ( $r=0.636$ ;  $p=0.01$  and  $r= 0.653$ ;  $p=0.036$ , respectively). There was no significant correlation between BNP, IGF-I and other biochemical markers ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Plasma and urinary BNP levels were lower in rats with experimental osteoporosis. In addition, there was a positive correlation between BMD and plasma and urine levels of BNP. These findings suggest that BNP may have a role in the etiopathogenesis of osteoporosis.

**Keywords:** brain natriuretic peptide, osteoporosis, insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-β1.



**Sorumlu Yazar/Corresponding Author:** Mehmet Uçar, M.D.  
Kayseri Şehir Hastanesi Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kliniği



**e.mail:** m038ucar@gmail.com



**Tel:** +90 506 513 05 23

**Geliş tarihi/Received:** 04.03.2022

**Kabul tarihi/Accepted:** 30.03.2022

## GİRİŞ

Osteoporoz (OP), düşük kemik kitlesi ve kemiğin mikromari yapısında bozulma sonucunda kemik kırılabilirliğinin artışı ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığı olarak tanımlanmaktadır (1). Osteoporoz, kemiğin dayanıklılığını azaltarak kırılabilirliğini arttırmakta ve günlük yaşam aktiviteleri sırasında minimal travmalarla bile kırığa neden olabilmektedir. Dual enerji X-ray absorpsiyometri (DEXA), kemik mineral yoğunluğu ölçümünde en çok tercih edilen yöntemlerin başında gelir (2).

Biyokimyasal belirleyiciler, metabolik kemik hastalıklarının değerlendirilmesinde tarama ya da tanısal amaçlı kullanılabilirler gibi, tedavi rejimlerinin sonuçlarını değerlendirmek için de kullanılmaktadır. Bunlar idrar ve serum belirleyicileri olup, osteoblast ya da osteoklastlar tarafından salgılanan enzimler veya kemik yapımı ya da yıkımı sırasında kemik bağ dokusundan salgılanan enzimatik olmayan peptidlerdir (3-4).

Kemik; osteoklastlar ve osteoblastlar gibi çeşitli tip hücreleri içeren kompleks bir dokudur. Bu hücreler kemiğin yeniden yapılanması (remodeling) olarak adlandırılan ve sürekli devam eden bir yenilenme ve tamir kaskadının birincil aktörleridir. Bu kaskad sırasında her iki tip hücrenin aktiviteleri arasında bir denge vardır ve bu denge çeşitli hormonlar, lokal sitokinler ve progenitör faktörler tarafından koordine edilir. Kemiğin yeniden yapılanmasında paratiroid hormon (PTH), growth hormon (GH), insülin, 1,25-dihidroksivitamin D3, östrojen ve testosteron gibi cinsiyet hormonları, tiroid hormonları ve lokal büyüme faktörlerinden insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), transforming growth faktör- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fibroblast büyüme faktörü, osteoprotegerin ve prostoglandinler gibi bir çok faktör rol alır (5-6).

Beyin natriüretik peptid (BNP) esas olarak kardiyak ventriküllerden salınan natriüretik peptidler ailesinin üyesidir. Üç tip natriüretik peptid reseptörü (NPR-A, NPR-B ve NPR-C) bu peptidlerin fizyolojik etkilerine aracılık eder. Kardiyorenal etkileri sebebiyle kalp yetmezliği, sol ventrikül yetmezliği, pulmoner yetmezlik, renal yetmezlik ve elektrolit imbalansı gibi birçok hastalığın takibinde kullanılmaktadırlar.

BNP'nin fizyolojik etkilerinden kemik metabolizması üzerine olanlar tibia hücre kültüründe NPR-B ve NPR-C reseptörlerinin üretilmesi ile ilk olarak gösterilmiştir (7). Yüksek BNP düzeyine sahip transgenik farelerde endokondral ossifikasyonun yüksek turnover'ından kaynaklanan kemik anormallikleri, büyüme plağının aşırı büyümesiyle artmış kifo, uzamış ekstremiteler, pençeler ve kuyrukla karakteri-

ze bir dizi fenotipik değişikliklerin gösterilmesi ile BNP'nin iskelet ve kemik metabolizması üzerine etkili olduğu belirlenmiştir (8).

1950'li yıllardan itibaren hayvan modellerinde osteoporozla ilgili kemik değişiklikleri gösterilmiştir (9). Günümüze değin çalışmalarda; düşük kalsiyum diyeti, ovariektomi, orşiektomi, immobilizasyon, kullanmama ve glukokortikoid ile indüklenen osteoporoz gibi birçok modelle deneysel osteoporoz oluşturulmuştur (10-11).

Bu çalışmada; dişi ratlarda ovariektomi (OVX) ile ve erkek ratlarda orşiektomi (ORX) ile deneysel osteoporoz modeli oluşturularak, beyin natriüretik peptid düzeyinin kemik-mineral yoğunluğu, kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri ve progenitör faktörler ile olan ilişkisini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) Eylül 2008-Ocak 2009 tarihleri arasında yapıldı. Çalışma öncesinde EÜTF Deney Hayvanları Etik Kurulundan onay alındı (08/40).

Çalışmada ağırlığı 240-280 gr (ortalama 255 gr) arasında değişen 11 aylık erişkin 18 adet Wistar-Albino tipi dişi rat ve 13 aylık erişkin ağırlığı 300-332 gr (ortalama 320 gr) arasında değişen 18 adet Wistar-Albino tipi erkek rat kullanıldı. Erkek ve dişi ratlar kendi içlerinde randomize olarak osteoporoz ve kontrol (sham) grubu şeklinde ayrıldı ve her biri 9'ar rat içeren 4 grup oluşturuldu.

### Deney ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Grup 1 (OVX Grubu) (n=9): Ovariektomize edilerek osteoporoz oluşturulan grup

Grup 2 (Dişi Kontrol Grubu) (n=9): Cerrahi olarak cilt ve ciltaltı fasyası açılıp kapatılan dişi kontrol grubu

Grup 3 (ORX Grubu) (n=9): Orşiektomize edilerek osteoporoz oluşturulan grup

Grup 4 (Erkek kontrol Grubu) (n=9): Cerrahi olarak skrotum ve ciltaltı fasyası açılıp kapatılan erkek kontrol grubu

### Cerrahi işlem ve Deneysel Osteoporoz Oluşturma Ovariektomize (OVX) Model Deneysel Osteoporoz

Cerrahi olarak dişilerde bilateral overlerin çıkarılması sonucu oluşturulan osteoporoz modeli ovariektomize (OVX) model osteoporoz olarak adlandırılır. OVX model deneysel osteoporoz, Danielsen ve arkadaşlarının yaptığı deneysel hayvan modeli histolojik, biyokimyasal ve radyolojik incelemeler sonucunda postmenopozal osteoporozun de-

neysel modeli olarak kabul edilmiştir. Yaşı 9-11 ay arasında olan dişi ratlarda ovariektomize (OVX) edildikten 8-15 haftalık bir dönem sonrasında postmenopozal osteoporoz oluştuğu bildirilmiştir (10).

### **Orşiektomize (ORX) Model Deneysel Osteoporoz**

Cerrahi olarak erkeklerde tek taraflı ya da bilateral testislerin çıkarılması (cerrahi kastrasyon) ile hipogonadizm sonrası oluşturulan osteoporoz modeli orşiektomize (ORX) model osteoporoz olarak isimlendirilir. Verhas ve arkadaşlarının yapmış olduğu deneysel modelde; 13 aylık erkek ratlarda orşiektomi sonrası 4, 8, 12 ve 16. haftalardaki biyokimyasal parametreler, DEXA ve patolojik bulguları incelenmiş ve 4 ile 8 haftalık dönemlerde osteopeni, 12 haftalık dönemde ise osteoporoz oluştuğu bildirilmiştir (11).

### **Cerrahi İşlem**

Ameliyat öncesi sıçanlar 12 saat aç bırakıldı. Anestezik ajan olarak intraperitoneal Ketamin-HCL (10 mg/kg) uygulandı. Anestezik madde sonrası dişi sıçanların karnı ve erkek sıçanların skrotal bölgesi traş makinası ile traş edildi ve povidon iodin ile boyandı. Dişi OVX grubu için steril şartlarda 3 cm'lik orta hat insizyon ile laparotomi ile bilateral ovariektomi yapılarak, erkek ORX grubu için ise skrotal 2 cm insizyon ile bilateral orşiektomi yapılarak deneysel osteoporoz grupları oluşturuldu. Kontrol gruplarında ise dişilere sadece orta hat insizyonu ve erkeklere skrotal insizyon yapıldı ve cerrahi olarak kapatıldı.

### **Deneysel Osteoporoz Gelişen Ratlarda Yapılan İşlemler ve Ölçümler**

Deney hayvanları her kafeste 3 adet olacak şekilde düzenlendi, standart laboratuvar diyeti ve su ile beslendi. Cerrahi işlemler gerçekleştirildikten sonra 4 ay yaşatılan sıçanların kan ve idrar toplama işlemleri gerçekleştirildi. Kanları kuyruk veninden alındı ve idrar toplama işlemi metabolik kafeslerde sağlandı. 1 gün sonra genel anestezi altında DEXA çekimi yapıldı. Son olarak deney hayvanları yüksek doz pentotal verilerek sakrifiye edildi.

### **DEXA Ölçümü**

DEXA çekimi intraperitoneal verilen ketaminle anestezi oluşturularak supin pozisyonunda yapıldı. Tüm grupların KMY ölçümü için Hologic QDR 4500 A DEXA (Hologic INC 02154-USA) cihazı kullanıldı ve L1- L4 vertebralar ortalama ve sağ femur total yoğunluğu gr/cm2 olarak ölçüldü.

### **Biyokimyasal belirleyiciler, progenitör sitokinler, BNP ve biyokimyasal parametrelerin ölçülmesi**

Tüm grupların kemik yapım belirleyicilerinden serum Ca, P,

ALP, OK ve kemik yıkım belirleyicilerinden serum ve idrarda CTX, BNP ve kemik üzerine progenitör etkili sitokinlerden IGF-I ve TGF- $\beta$ 1 düzeylerine bakıldı.

EÜTF Araştırma Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında aşağıdaki yöntemlerle değerlendirildi. Kalsiyum, fosfor ve alkalin fosfat düzeyi ölçümleri; Symex XT 2000i -Roche Diagnostik-İsviçre marka otoanalizör ile ECL (elektrokemilüminesans) yöntemi ile RATLAPS marka (Germany) rat kitleriyle çalışıldı. (Katalog no; sırasıyla kCArt1211, kPr1751, kAPrt1261)

ELISA metodu ile Rat BNP ELISA kit USCNLIFE marka (Nippon/Japane) ürün kodu=E0485R, CTX-I rat and Mouse ELISA kit RATLAPS marka (Germany) ürün kodu=1RTL4000, OK Rat Osteocalcin ELISA kit DRG marka (Germany) ürün kodu= EIA-2095-R, rat IGF-I ELISA kit BIOSOURCE marka (Belgium) ürün kodu= KAP158, TGF- $\beta$ rat and Mouse ELISA kit İNVİTROGEN marka (U.S.A) ürün kodu=KAC1688/KAC1689 kullanıldı.

### **İstatistiksel Analiz**

Ölçülen verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılığı tespit etmek için Student-t testi uygulandı. Değişkenler arasındaki korelasyon analizleri Pearson veya Spearman korelasyon katsayısı hesaplanarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (15.0 version) programı ile yapıldı. Veriler ortalama  $\pm$  SD olarak gösterildi. Anlamlılık seviyesi  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

### **BULGULAR**

#### **Deney ve kontrol gruplarının lumbal L1-L4 ortalama ve femur total KMY değerlerinin karşılaştırılması**

OVX ve ORX grupları, kendi kontrol grupları DK ve EK arasında femur total KMY ve Lumbal L1 - L4 ortalama KMY değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ( $p < 0.05$ ) (Tablo 1).

#### **Deney ve kontrol gruplarının kemik yapım ve yıkım belirleyicileri düzeylerinin karşılaştırılması**

OVX ve DK grupları arasında ve ORX ve EK grupları arasında Ca, P değerleri açısından istatistiksel bir farklılık tespit edilemezken, ALP, OK, CTXserum, CTXidrara değerleri osteoporoz oluşturulan gruplarda kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksekti ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2).

**Tablo 1.** Grupların lumbal L1-L4 ortalama ve femur total KMY değerlerinin karşılaştırılması.

Parametreler	Gruplar			
	Dişi Denekler		Erkek Denekler	
	OVX (n=9)	DK (n=9)	ORX (n=9)	EK (n=9)
Lumbal L1-L4 ortalama KMY (g/cm <sup>2</sup> )	0,117±0,002*	0,150±0,002	0,137±0,002*	0,161±0,003
Femur Total KMY (g/cm <sup>2</sup> )	0,126±0,002*	0,157±0,001	0,132±0,003*	0,157±0,003

**OVX:** Ovariectomize grup **DK:** Dişi kontrol, **ORX:** Orşiektomize grup **EK:** Erkek kontrol. **KMY:** Kemik mineral yoğunluğu \* p<0.05. Sonuçlar Ortalama ±SD şeklinde sunulmuştur.

**Tablo 2.** Tüm deneklerin biyokimyasal kemik yapım ve yıkım belirteçleri düzeylerinin karşılaştırması

	OVX (n=9)	DK (n=9)	ORX (n=9)	EK (n=9)
Ca (mg/dl)	10,68±0,11	10,67±0,09	10,9±0,2	10,7±0,05
P (mg/dl)	4,34±0,10	4,46±0,17	4,48±0,18	4,76±0,13
ALP (U/l)	285±18*	209±17	263±16*	236±21
OK (ng/mL)	1,29±0,04*	1,09±0,02	1,23±0,02*	1,11±0,03
CTX serum (ng/mL)	0,78±0,04*	0,66±0,03	0,91±0,11*	0,58±0,02
CTX idrar (ng/mL)	0,94±0,04*	0,67±0,03	0,77±0,03*	0,49±0,04

**OVX:** Ovariectomize grup **DK:** Dişi kontrol **ORX:** Orşiektomize grup **EK:** Erkek kontrol, **Ca:** Kalsiyum **P:** Fosfor **ALP:** Alkalen fosfataz **OK:** Osteokalsin **CTX:** C-telopeptid. \* p<0.05. Sonuçlar (Ortalama ±SD) şeklinde sunulmuştur.

### Deney ve kontrol gruplarının BNP, IGF-I ve TGF-β1 değerlerinin karşılaştırması

OVX ve DK grupları arasında ve ORX ve EK grupları arasında IGF-I değerleri açısından osteoporoz oluşturulan OVX ve ORX gruplarında sayısal olarak daha düşük değerlerde iken istatistiksel anlamlılık yoktu (p>0.05). BNP ve TGF-β değerleri osteoporoz oluşturulan gruplarda kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşüktü (p<0.05) (Tablo 3).

### Deney ve kontrol gruplarında BNP'nin ve KMY değerleri ile korelasyonu

OVX ve DK gruplarının lumbal L1-L4 ortalama KMY ve BNP değerleri arasında (r=0,636 ; p=0,01), OVX ve DK gruplarının femur total KMY ve BNP değerleri arasında (r=0,531 ; p=0,02) pozitif yönde kuvvetli bir ilişki bulundu. ORX ve EK gruplarının lumbal L1-L4 ortalama KMY ve BNP değerleri arasında (r=0,603 ; p=0,008), ORX ve EK gruplarının femur total KMY ve BNP değerleri arasında (r=0,735 ; p=0,01) pozitif yönde kuvvetli bir ilişki bulundu.

**Tablo 3.** Tüm deneklerin BNP, IGF-I ve TGF-β1 düzeylerinin karşılaştırılması.

	OVX (n=9)	DK (n=9)	ORX (n=9)	EK (n=9)
BNP(ng/mL)	5,95±0,7*	14,3±3,2	2,75±0,45*	9,86±1,55
IGF-I(ng/mL)	0,47±0,14	0,52±0,043	0,48±0,18	0,76±0,13
TGF-β1 (ng/mL)	0,60±0,02*	0,69±0,01	0,59±0,03*	0,87±0,02

**OVX:** Ovariectomize grup, **DK:** Dişi kontrol, **ORX:** Orşiektomize grup, **EK:** Erkek kontrol, **BNP:** Beyin natriüretik peptid, **IGF-I:** İnsülin benzeri büyüme faktörü-I, **TGF-β1:** Transforming growth faktör-β1. Sonuçlar (Ortalama ±SD) şeklinde sunulmuştur.

**Deney ve kontrol gruplarında BNP'nin kemik yapım ve yıkım belirleyicileri düzeyleri ile korelasyonu:**

BNP ile kemik yapım belirleyicileri Ca, P, ALP, OK ve kemik yıkım belirteçleri CTX serum, CTX idrar değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

**Deney ve kontrol gruplarında BNP'nin progenitör faktörler IGF-I ve TGF- $\beta$ 1 ile korelasyonu**

BNP ile TGF- $\beta$  arasında OVX grupta ( $r = 0,653$ ;  $p = 0,036$ ), ORX grupta ( $r = 0,552$ ;  $p = 0,038$ ) pozitif yönde kuvvetli bir ilişki, DK grupta ( $r = -0,450$ ;  $p = 0,04$ ), EK grupta ( $r = -0,375$ ;  $p = 0,04$ ) negatif yönde zayıf bir ilişki tesbit edildi. BNP ile IGF-I arasında OVX, ORX, DK, EK grupları arasında anlamlı bir ilişki tesbit edilmedi ( $p > 0.05$ ).

**TARTIŞMA**

Araştırmacılar insan ve ratlarda normal büyüme, erişkin yaşam ve osteoporozda görülen ve temelde yatan biyolojik mekanizmaların benzer olduğunu; bu nedenle rat iskeletinin insandaki osteoporozla yönelik çalışmalarda iyi bir model oluşturması gerektiğini savunmaktadır (9).

Cerrahi olarak bilateral overlerin çıkarılması sonucu oluşturulan postmenopozal osteoporozun deneysel modeli ovariektomize (OVX) tip, testislerin çıkarılması (cerrahi kastrasyon) sonucu oluşturulan hipogonadizme bağlı osteoporozun deneysel modeli orşiektomize (ORX) tip deneysel osteoporoz olarak isimlendirilir (10,11).

Osteoporoz tanısına yönelik yapılan kemik mineral yoğunluğu ölçümleri ile OVX ve ORX gruplarında beklendiği gibi osteoporoz geliştiği ve her iki deneysel metodun dişi ve erkek deneklerde deneysel osteoporoz gelişmesinde başarılı yöntemler olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada osteoporoz oluşturmayı planlayarak ovariektomize edilen dişi ratlar ile orşiektomize edilen erkek ratların KMY ölçümleri DEXA ile değerlendirildi. Ovariektomize dişi ve orşiektomize erkek gruplarında kontrol gruplarına göre belirgin düşük KMY değerleri tesbit edildi. Osteoporotik dişi grupta lomber ve femur KMY değerleri lomber bölgede daha belirgin olmak üzere hem lomber hem femur bölgesinde osteoporotik değerlerdeydi. Erkeklerde ise femur bölgesinde lomber bölgeye göre KMY değerleri daha düşük ve her iki bölgede de osteoporotik değerlerdeydi.

Bizim bulgularımız Audran ve arkadaşlarının yapmış olduğu orşiektomize erkek sıçanların KMY değerleri ve kemik kırılabilirlik testlerinin incelendiği çalışmayla benzer sonuçları içermektedir. Audran ve arkadaşları; hipogonadal os-

teoporoz modelini erkek ratlarda oluşturmuş ve hipogonadizmi olan erkek hastaların KMY düzeyleri, femur kırık yüzdesi ve kırılabilirlik testleri arasındaki benzerlikleri göstermiştir. Orşiektomize erkek ratlarda her iki bölgede de osteoporoz gelişmekte ancak femur bölgesindeki osteoporoz daha belirgin ve kırık görülme insidansında belirgin bir ilişki tesbit edilmiştir (12,13).

Melhus ve arkadaşlarının yapmış olduğu ovariektomize tip deneysel postmenopozal osteoporoz modelinde; lomber bölgede daha belirgin olmak üzere her iki bölgede osteoporoz gelişmiş ve kırık oluşturma testleri açısından her iki bölge de zayıf iken vertebralarda bu durumun daha belirgin olduğu sonucunu bildirmişlerdir (14).

Kemik turnover kemik dokusunun canlılığını sağlayan ve birbirini takip eden kemik formasyonu, kemik rezorpsiyonu ve mineralizasyon dönemlerinden oluşan bir döngüdür. Kemik turnoverinde kemik yapım (formasyon) markırı olarak, sıklıkla ALP, kemiğe spesifik ALP ve OK düzeylerine bakılmaktadır. Kemik yıkımı (rezorpsiyon) göstergesi olarak ise CTX, NTX, PICP, DPD değerlerine bakılmaktadır (13). Total ALP kemik yapımının en sık kullanılan ürünü olmasına rağmen, kemik dışı kaynaklarının da olması dolayısıyla osteoporozdaki duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür. Serum osteokalsin seviyesi kemik yapımının sensitif bir göstergesi olup, histomorfometrik göstergelerle korelasyon gösterir (14,16). Tip I kollajenin osteoklastlarca yıkılması neticesinde dolaşıma N-telopeptid (NTX) ve C-telopeptid (CTX) salınır. Tip I kollajen telopeptidlerinin (NTX ve CTX) kemik yıkımı için sensitif ve spesifik bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (17).

Tip I kollajen telopeptidlerinin serum ve idrar değerleri arasında, idrar değerlerinin osteoporozda KMY ile korelasyonunun daha spesifik olduğu gösterilmiştir (18).

Ohta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; postmenopozal kadınlarda üriner hidroksiprolin/kreatinin oranı ile ALP ve osteokalsin serum seviyelerinin premenopozal kadınlara göre önemli derecede artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu da kemik rezorpsiyonunun ve formasyonunun uyarıldığını akla getirmiştir (19).

Minura ve arkadaşları, premenopozal kadınlarda KMY ile hiçbir biyokimyasal gösterge arasında korelasyon saptamazken; postmenopozal kadınlarda prokollajen karboksiterminal propeptid (PICP), deokspiridinolin (DPD) ve ALP değerleri ile KMY arasında negatif korelasyon ve PICP miktarı ile kemik kaybı arasında pozitif korelasyon saptamışlardır (20).

Garnero ve arkadaşlarının menopoz sonrası 20 yıldan fazla geçmiş olan 653 Avrupalı kadında yaptıkları çalışmada, en düşük KMY değerlerine sahip kadınlarda osteokalsin, NTX, CTX ve kemik ALP seviyeleri en yüksek düzeyde bulunmuştur. Aynı çalışmada düşük kemik yoğunluğu olan yaşlı kadınlarda kemik döngüsü oranları, normal KMY olanlarla karşılaştırıldığında %85 daha yüksek bulunmuştur (21). Worsfold ve arkadaşları idrarda özellikle NTX'in osteoporoz tedavisini izlemede daha hassas olduğunu tespit etmişlerdir (22).

Chaki ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise biyokimyasal göstergeler arasında gelecekteki kemik kaybını öngörmeye en duyarlı olanın başlangıç NTX seviyesi olduğunu tespit etmişlerdir (23).

Bizim çalışmamızda; osteoporotik gruplarda kontrol gruplarına göre daha yüksek OK ve ALP düzeyleri tesbit ettik. CTXserum ve idrar düzeyleri ise yine osteoporotik gruplarda kontrol gruplarına göre daha yüksekti. KMY ile OK, ALP ve CTXserum ve idrar değerleri arasında zıt yönde kuvvetli bir ilişki tesbit ettik.

Kemik yıkım göstergelerinin osteoporotik hastalarda artması beklenen bir bulgu olmakla beraber kemik yapım göstergelerinin de osteoporotik hastalarda artmış bulunması paradoks gibi algılanabilir. KMY düşük olan olgularda kemik yıkım ürünlerine ek olarak yapım göstergelerinin kan seviyelerinin yüksek olması hızlı kemik döngüsüne işaret etmektedir. Esas olarak artmış olan yıkımı karşılamak için yapım süreci de hızlanmıştır.

Beyin natriüretik peptid (BNP) esas olarak kardiyak ventriküllerden salınan natriüretik peptidler ailesinin üyesidir. BNP'nin natriürezis, diürezis ve vazodilatasyon olmak üzere bilinen biyolojik etkilerinin yanında bugün itibarı ile kemik gelişimi ve metabolizması üzerine olan etkisinden bahsedilmektedir. Suda ve arkadaşları yüksek BNP düzeyine sahip transgenik farelerde endokondral ossifikasyonun artmış turnoverinden kaynaklanan kemik anormallikleri, büyüme plağının aşırı büyümesiyle artmış kifoz, uzamış ekstremite, pençeler ve kuyrukla karakterize bir dizi fenotipik değişiklikleri göstermişlerdir. Bu bulgular sonucunda iskelet ve kemik metabolizması üzerine BNP'nin etkili olduğunu rapor etmişlerdir (8). Matsukawa ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada NPR-C geni knockout edilerek (kromozomal bir oynama ile genin yapımını uyardığı hormon veya reseptörün azaltılması ya da tamamen ortadan kaldırılması hedeflenir) BNP'nin plazmadan temizlenmesinin azaltıldığı tibia kültürleri ve fareler fenotipik olarak incelenmiştir. Hücre kültürlerinde osteoblastlarda sayı ve

yapıca artma, osteoid dokuda artma, endokondral ossifikasyonda artma, hiperosteozis, osteoid dokuda artış ve etrafında aşırı üretilmiş kollajen tip1 tesbit ettiler. NPR-C nin tamamen eksik olduğu farelerde fenotip olarak sırtlarında kamburlaşma, kuyrukta uzama, uzamış femur, uzun ve S harfi şeklinde gelişmiş vertebra yapısı ile karşılaştıklarını bildirmişlerdir (24).

Kajita ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; postmenopozal osteoporozu olan 381 Japon kadın kemik rezorpsiyonunun en yoğun olduğu postmenopozal dönemde 5 yıllık süre ile longitudinal bir çalışmada izlenmiş, BNP genindeki varyasyonlar ile radial KMY değişiklikleri arasındaki korelasyon tesbit edilmiş. BNP geni promotör bölgesindeki 381T/C varyasyonu varlığında T alleli homozigot taşıyıcılarının radial KMY değerleri en düşük, C alleli homozigot taşıyıcılarında en yüksek KMY değerlerine sahip olduğunu tesbit ettiler. SNP olarak adlandırılan tek nükleotid polimorfizminin tesbit edilmesi osteoporoz ile BNP arasında doğrudan ya da dolaylı ilişkilerin olabileceğini belirtmişlerdir (25).

Bizim çalışmamızda osteoporotik OVX ve ORX gruplarında BNP düzeyleri kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu. Ovariectomi yapılan postmenopozal osteoporoz oluşturduğumuz dişi grupta BNP değerlerinin azlığı, kajita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla benzerlik göstermektedir. Ancak Kajita ve arkadaşları radial KMY değerlerini çalışmışlar biz ise yapmış olduğumuz deneysel çalışmada lumbal L1-L4 ortalama BMD ve femur total KMY düzeylerini ve BNP düzeyleri ile olan ilişkisini göstermek istedik. OVX ve DK gruplarının lumbal L1-L4 ortalama KMY ve BNP değerleri arasında ( $r=0,636$  ;  $p=0,01$ ), OVX ve DK gruplarının femur total KMY ve BNP değerleri arasında ( $r=0,531$  ;  $p=0,02$ ) pozitif yönde kuvvetli bir ilişki bulundu. Ovariectomi ile deneysel osteoporoz oluşturulan dişi grupta BNP düzeyindeki düşüklük, BNP'nin direkt ya da dolaylı olarak osteoporoz etyopatogenezinde yer alabileceğini düşündürmüştür. Lomber bölgede daha düşük olan KMY değerleri ile BNP değerleri arasındaki korelasyonun daha belirgin olması osteoporoz ile olan kuvvetli ilişkisine de işaret ettiğini düşünmekteyiz.

Orşiektomi ile deneysel osteoporoz oluşturulan erkek grupta BNP düzeyleri kontrol gruplarına göre daha düşük düzeydedir. Bizim çalışmamız mevcut literatürde osteoporotik erkeklerdeki BNP düzeylerinin ve KMY ile ilişkisinin incelendiği ilk araştırmadır. ORX ve EK gruplarının lumbal L1-L4 ortalama KMY ve BNP değerleri arasında ( $r=0,603$  ;  $p=0,008$ ), ORX ve EK gruplarının gruplarının femur total KMY ve BNP değerleri arasında ( $r=0,735$  ;  $p=0,01$ ) pozi-

tif yönde kuvvetli bir ilişki bulundu. Yukardaki çalışmalarla benzer bir şekilde osteoporoz oluşturulan grupta BNP değerlerinin düşük olması ve femur total KMY değerlerinin daha düşük olduğu erkek osteoporotik grup ile BNP değerleri arasındaki kuvvetli ilişki osteoporoz etyopatogenzinde doğrudan ya da dolaylı olarak BNP'inde yer aldığı göstermiştir.

Kemik dokusu IGF-I, IGF-II, TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörlerinden zengindir (26,27). IGF-I'in serum miktarlarındaki yaşa bağımlı azalmalar IGF-1 ve IGF-II'nin iskelet miktarındaki yaşa bağlı azalma ile paralellik gösterir. Östrojenlerin IGF-I ve IGF-II üretimini uyararak kemik dokusu üzerine proliferatif etkilerinde rol oynadıkları bildirilmektedir (28). TGF- $\beta$  kemikte bol olarak bulunur, kemik yıkımını önler, kemik oluşumunu uyarır ve kemik üzerine çift etkili bir faktör olarak rol oynayabilir. TGF- $\beta$  kemik hücrelerinden salınır ve yıkım süresince aktive edilmesi bu hücrelerin apoptozisini hızlandırarak osteoporozu neden olabileceğini düşündürmektedir.(29)

TGF- $\beta$ 1'deki polimorfizmler osteoporozlu kadınlarda daha önemli olup, hem osteoporotik, hem de normal kadınlarda düşük kemik kitlesi ve azalmış kemik döngüsü ile ilişkilidir. IGF-1'in KMY ile ilişkili olduğunu gösteren yayınlar literatürde olmasına rağmen serum IGF-1 düzeylerinin kemik yapım markırı olarak kullanıldığını gösteren çalışma yoktur (30).

Literatürde her ne kadar osteoporozda progenitör sitokinlerden IGF-1ve TGF- $\beta$ 1düzeyleri çalışılmış olsada; BNP ve progenitör sitokinler ve bunların birbiriyle ilişkileri araştırılmamıştır. Ayrıca hem dişi hem erkek ratlarda deneysel osteoporoz oluşturulması ve hem lomber hem femur KMY değerleriyle korelasyonunun incelenmiş olması yönüyle bizim çalışmamız literatürdeki ilk çalışmadır.

Nicolas ve arkadaşları yaşları 50-59 arasında olan 46'sı erkek ve 20'si bayan 66 hastadan oluşan osteoporotik hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada, IGF-I, TGF- $\beta$ 1 ve femur boyun KMY değerlerini karşılaştırmışlar. Kontrol grupları olarak aynı yaş grubundaki sağlıklı kişilerin kan bankasındaki değerleri ve aynı hastaların KMY değerlerini kıyaslamışlar. Osteoporotik grupta TGF- $\beta$ 1 düzeyleri düşük iken, IGF-I düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını, femur boyun KMY değerleri ile TGF- $\beta$ 1 düzeyleri arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğunu bildirmişler (31).

Bu bulgular bizim çalışmamızdaki erkek ve dişi osteoporotik grupların TGF- $\beta$ 1 ve IGF-I bulguları ile benzerlik göstermektedir. Osteoporotik gruplar ile kontrol gruplarının TGF- $\beta$ 1 değerleri karşılaştırıldığında osteoporotik gruplarda TGF- $\beta$ 1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde

daha düşüktü. IGF-I değerleri açısından gruplar arasında fark bulunamadı. Bizim çalışmamızda osteoporotik gruplarda lumbal L1-L4 ortalama KMY ve femur total KMY düzeyleri ile TGF- $\beta$ 1 düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı ilişki tesbit edilirken IGF-I düzeyleri ile arasında anlamlı bir ilişki görülmedi.

## SONUÇ

Deneysel osteoporoz oluşturmak amacıyla dişi denekler için bilateral ovariektomi ve erkek denekler için bilateral orşiektomiden 4 ay sonra KMY değerleri deney gruplarında osteoporoz geliştiğini göstermektedir.

Osteoporotik gruplarda ALP, OK, CTXserum ve CTXidrar değerleri kontrol gruplarına göre yüksek, TGF- $\beta$ 1 ve BNP değerleri düşük fakat Ca, P, IGF-I değerlerinde fark yoktu. Korelasyon testlerinde BNP ile KMY ve TGF- $\beta$ 1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon tesbit edildi.

Bu çalışmada; osteoporoz oluşturulan dişi ve erkek ratlarda BNP düzeylerinin daha düşük saptanması ve KMY ile BNP düzeyleri arasında pozitif yöndeki kuvvetli ilişkinin varlığı osteoporoz ile BNP'nin ilişkili olduğu sonucunu ortaya koymaktadır.

**Çıkar çatışması:** Bu çalışmada yazarlar çıkar çatışması bildirmemektedir.

**Finansal Destek:** Bu gözlemsel çalışma için herhangi bir kurum ya da kuruluştan finansal destek alınmamıştır.

**Etik Komite Onayı:** Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 14.05.2008 tarih, 08/40 numaralı karar ile onay alınmıştır.

**Yazar Katkıları:** Çalışma Konsepti/Tasarım- MU,HD; Veri Toplama- MU; Veri Analizi/Yorumlama- MU,HD; Yazı Taslağı- MU; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- HD; Son Onay ve Sorumluluk- MU,HD.

## KAYNAKLAR

1. Eryavuz M. Osteoporozun tanımı ve sınıflandırması; In: Kutsal Y.G. (Ed) Osteoporoz. Güneş yayınevi, İstanbul 2005; 1-7.
2. Kanis JA, Gluer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. Osteoporos Int 2000;11:192-202.
3. Nancy L, Dequeker J, Gregory R. Bone structure and function. In: Marc C Hochberg, Alan J Silman, Josef S Smolen et al. Rheumatology. WB Saunders Company, Philadelphia 2003:2029-41.
4. Guyton AC. Textbook of Medikal Physiology (11 th ed). Williams & Wilkins, Baltimore 2006; pp 979-95.
5. Kutlu M. Kemik doku ve fizyolojisi; In: Yılmaz C (ed),

Tüm Yönleriyle Osteoporoz. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 1997, 5-29.

**6.** Delmas PD. Markers of bone formation and resorption. In: Favus (ed), Primer On the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Lippincott Raven, New York 1993; pp 16-31.

**7.** Hagiwara H, Sakaguchi H, Itakura M, et al. Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 1994 Apr 8;269(14):10729-33.

**8.** Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, et al. Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad* 1998;95:2337-42.

**9.** Frost HM, Jee WS. On the rat model human osteopenias and osteoporosis. *Bone and Mineral* 1992;18:227-236.

**10.** Norimatsu H, Mori S, Kawanishi J, et al. Immobilization as the pathogenesis of osteoporosis; Experimental and clinical studies. *Osteoporosis Int* 1997;7:57-62.

**11.** Kimmel DB. Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research; Markus R, Feldman D, Kelsey J (ed), *Osteoporosis*. Academic Press, San Diego 1996, pp. 671-90.

**12.** Audran M, Chappard D, Legrand E et al. Bone microarchitecture and bone fragility in men: DEXA and histomorphometry in humans and in the orchidectomized rat model. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(4):214-7.

**13.** Wang X, Wang M, Cui X, et al. Antiosteoporosis effect of geraniin on ovariectomy-induced osteoporosis in experimental rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2021;35(6):1-8.

**14.** Melhus G, Solberg LB, Dimmen S et al. Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rats. *Acta Orthop*. 2007 Jun;78(3):393-403.

**15.** Jain S, Camacho P. Use of bone turnover markers in the management of osteoporosis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2018;25(6):366-72.

**16.** Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11(3):337-49.

**17.** Hlaing TT, Compston JE. Biochemical markers of bone turnover - uses and limitations. *Ann Clin Biochem*. 2014;51(Pt 2):189-202.

**18.** Sepici V. Osteoporoz tanı ve takibinde laboratuvar yöntemleri. In: Gökçe YK (ed). *Osteoporoz*. Güneş yayınevi, İstanbul 1998, pp. 104-18.

**19.** Ohta H, Ikeda T, Masuzawa T, et al. Differences in axial bone mineral density, serum levels of sex steroids and bone metabolism between postmenopausal age and body size at premenopausal subjects. *Bone* 1993;14(2):111-6.

**20.** Minura H, Yamamoto I, Yuu I, Ohta T. Estimation of bone mineral density and bone loss by means of bone metabolic markers in postmenopausal women. *Endoc J* 1995;42(6):797-802.

**21.** Garnero P, Delmas P. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998;27(2):303-23.

**22.** Worsfold M, Powell DE, Jones TJ, Davie MW. Assessment of urinary bone markers for monitoring treatment of osteoporosis. *Clin Chem* 2004;7:324-8.

**23.** Chaki O, Yoshikata I, Kikuchi R, Nakayama M, Uchiyama Y, Hirahara F, et al. The predictive value of biochemical markers of bone turnover for bone mineral density in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000;15(8):1537-44.

**24.** Matsukawa N, Grzesik W, Tagahashi N, et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide systems. *Proc Natl Acad* 1999;96:7403-8.

**25.** Kajita M, Ezura Y, Iwasaki H, et al. Association of the -381T/C promoter variation of the brain natriuretic peptide gene with low bone-mineral density and rapid postmenopausal bone loss. *J Hum Genet* 2003;48(2):77-81.

**26.** Nasu M, Sugimoto T, Chihara M, Hiraumi M, Kurimoto F, Chihara K. Effect of natural menopause on serum levels of IGF-I and IGF-binding proteins: relationship with bone mineral density and lipid metabolism in perimenopausal women. *Eur J Endocrinol* 1997;136(6):608-616.

**27.** López-Quiles J, Forteza-López A, Montiel M, Clemente C, Fernández-Tresguerres JA, Fernández-Tresguerres I. Effects of locally applied Insulin-like Growth Factor-I on osseointegration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019;24(5):652-8.

**28.** Ebeling PR, Jones JD, O'Fallon WM, et al. Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1384-87.

**29.** Reddi A. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:249-50.

**30.** Nasu M, Sugimoto T, Chihara M, Hiraumi M, Kurimoto F, Chihara K. Effect of natural menopause on serum levels of IGF-I and IGF-binding proteins: relationship with bone mineral density and lipid metabolism in perimenopausal women. *Eur J Endocrinol* 1997;136(6):608-16.

**31.** Nicolas V, Prewett A, Bettica P, et al. Age-related decreases in insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta in femoral cortical bone from both men and women: implications for bone loss with aging. *Clin Endocrinol Metab* 1994 May;78(5):1009-10.