



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK ENDOKRİNOLOJİ BİLİM DALI**

**LEVAMİZOL VE FOSFONOFORMİK ASİTİN FARELERDE KEMİK
MİNERAL YOĞUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Dr. Durmuş DOĞAN

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Bursa-2015



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ÇOCUK ENDOKRİNOLOJİ BİLİM DALI

**LEVAMİZOL VE FOSFONOFORMİK ASİTİN FARELERDE KEMİK
MİNERAL YOĞUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Uzm. Dr. Durmuş DOĞAN

YANDAL UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Halil SAĞLAM

Bursa-2015

İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
İngilizce Özet	iii
Giriş	1
Kemik ve Mikro Yapısı	1
Fosfor Metabolizması	6
Kemiğin Mineralizasyonu	9
Levamizolün Mineralizasyon Üzerine Etkileri	18
Fosfonofomik Asitin Mineralizasyon Üzerine Etkileri	20
Mikrotomografi	22
Gereç ve Yöntem	25
Bulgular	32
Tartışma ve Sonuç	40
Kaynaklar	47
Teşekkür	57
Özgeçmiş	58

ÖZET

Mineralizasyonun lokal kontrolünde iki inorganik fosfordan (Pi) oluşmuş pirofosfat (PPi) ve Pi/PPi oranı esansiyel rol alır. Lokal Pi ve Pi/PPi oranına etki eden iki önemli basamak alkali fosfataz (TNSALP) ve sodyum-fosfor (NaPi) ko-transport aktivitesidir. Hücre kültür çalışmalarında bu basamakların ayrı ayrı ya da birlikte inhibisyonu, mineralizasyon sürecinin daha iyi anlaşılmasında yol gösterici olmuştur. Bu çalışmada bir nonselektif NaPi kotransport blokeri olan foscarnet (150 mg/kg) ve bir TNSALP inhibitörü olan levamizolün (25 mg/kg) kemik mineral yoğunluğu ve kemiğin mikroyapısı üzerine etkisi Balb/c türü farelerde araştırılmıştır. Bulgular levamizolün toksik doza yakın uygulanmasının serum TNSALP, fosfor, kalsiyum ve kemik morfometresinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını in-vivo olarak ilk kez ortaya koymuştur. Ayrıca daha önceki az sayıdaki verilerin aksine foscarnet tedavisinin serum TNSALP ve fosfor değerlerinde belirgin artışa ve kortikal kemik parametrelerinde değişikliklere neden olduğu da in-vivo olarak ilk kez gösterilmiştir. Sonuç olarak yeni geliştirilecek daha spesifik NaPi kotransporter blokerlerinin, kemik mineralizasyonu ve mikroyapısına etkilerini in-vivo olarak inceleyen daha kapsamlı çalışmalar, kemik hastalıkları olan hastalarımızı daha iyi tedavi edebilmek için bir hedef olabilir.

Anahtar Kelimeler: Foscarnet, levamizol, inorganik fosfor, kemik mikroyapısı, mikrotomografi.

SUMMARY

Investigation of The Effects of Levamisole and Phosphonoformic Acid on Bone Mineral Density in Mice

Pyrophosphate (PPi), formed by two inorganic phosphate (Pi), and Pi/PPi ratio play main role in the local control of mineralization. Tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) activity and sodium-phosphate co-transporters are two main mechanisms affecting local Pi concentration and Pi/PPi ratio. Inhibition of one or both of these mechanisms in tissue cultures has led us to better understand the mineralization process. In this study, the effects of foscarnet (150 mg/kg/day), a non selective inhibitor of NaPi cotransporters, and levamisole (25 mg/kg/day), a TNSALP inhibitor, on bone mineral density and bone micro-structure in Balb/c mice were assessed. Study findings revealed in-vivo for the first time that near toxic dose of levamisole did not produce any significant changes in serum levels of TNSALP, inorganic phosphate and calcium as well as in bone micro-structure. In addition, it was also shown in-vivo for the first time that foscarnet treatment caused significant increases in serum TNSALP and inorganic phosphate levels and significant changes in cortical bone parameters, in contrast to very limited previous data. In conclusion, more extensive and detailed in-vivo studies evaluating the effects of newly developed, more specific NaPi cotransporter blockers on bone mineralization and microstructure may be targets for us to better treat our patients with bone diseases.

Key words: Foscarnet, levamisole, inorganic phosphate, bone microstructure.

GİRİŞ

I. Kemik ve Mikroyapısı

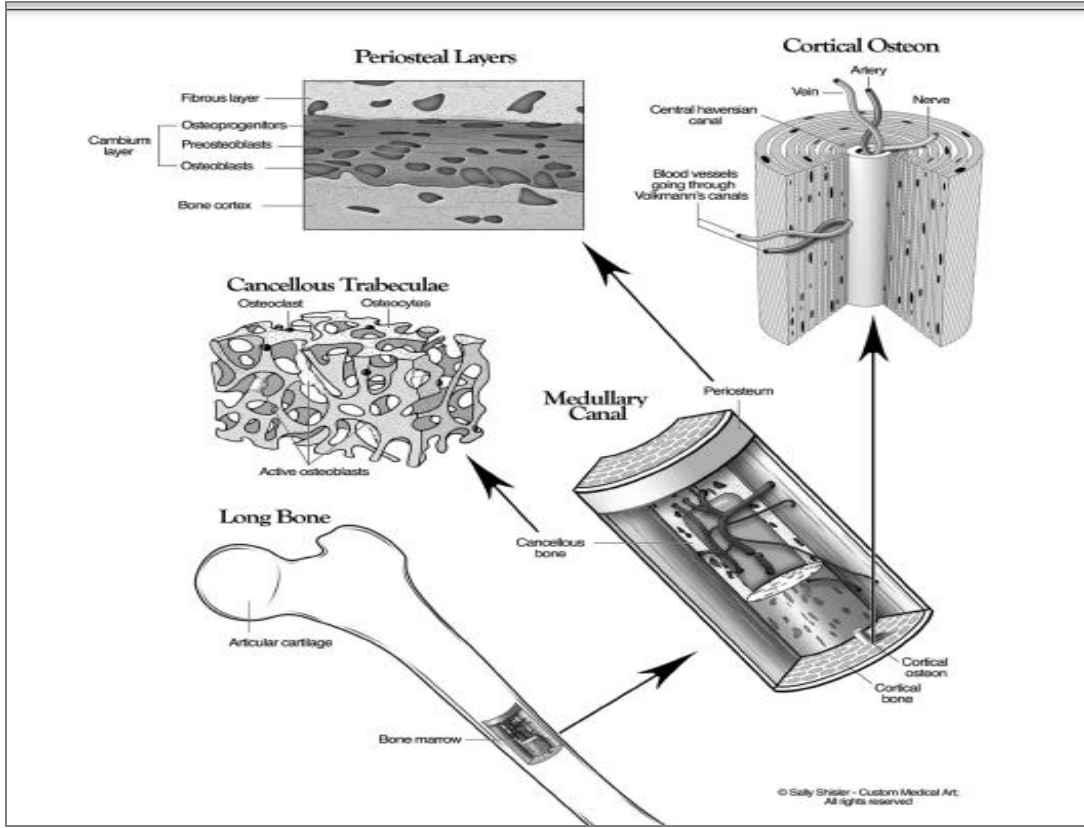
Erişkin bir insan sesamoid kemikler hariç toplam 213 kemik içerir. Uzun kemik, yassı kemik ve düzensiz kenarlı kemikler olarak üç grupta incelenebilir. Yassı kemikler membranöz kemikleşme ve uzun kemikler hem endokondral hem de membranöz kemikleşme ile oluşur ya da büyürler (1).

İskelet sistemi vücut için destek, iskele, hareketler için kasların tutunma yerleri olarak, iç organları çevreleyerek koruma, mineral homeostazisi, asit-baz dengesini sağlama, büyüme faktörleri ve sitokinler için depo olmak, hematopoezin gerçekleştiği boşlukları oluşturmak gibi çok sayıda görevi vardır (1,2).

Uzun kemikler diyafiz, metafiz, epifizden oluşur. Diyafiz yoğun kortikal kemik, metafiz ve epifiz ise yoğun olarak trabeküler yani süngerimsi kemikten oluşmakta ve bu oluşumların dış çeperi ince bir kortikal tabaka ile çevrilimektedir. Vücudumuzdaki kemiklerin %80'i kortikal, %20'si trabeküler kemik yapısındadır (1). Kortikal kemikler yoğun, sert yapıda olup ilik alanını çevrelerler. Trabeküler kemikler daha çok boşluklardan ve bu boşlukların içerisinde bal peteği ya da örümcek ağı şeklinde yerleşmiş trabekulalardan oluşmuştur. Kortikal kemik trabeküler kemiğe göre daha az aktiftir (3).

Kortikal kemik osteonlardan oluşur. Osteonlar, haversiyan sistemler olarak adlandırılır. Haversiyan sistemler silindirik yapıda olup dairesel lamellerden oluşur. Haversiyan kanalları kortikal yapıdaki porositeleri oluşturur. Kortikal porosite normal bir kemikte %5'den azdır. Sağlıklı bir yaşlanmada kortikal porositi artar ve kortikal kemik incelir. Kortikal kemiğin dış yüzüne periosteal yüzey, iç yüzüne endosteal yüzey adı verilir. Periosteal yüzeydeki osteogenez kemiğin enine büyüme, genişleme ve şekillenmesinde ve kırık iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Kemik yapımı (kemik formasyonu) tipik olarak periosteal yüzeyde daha fazladır. Bu nedenle kemik yaşlandıkça

enine büyüme devam edecektir. Endosteal yüzeyde ise yeniden şekillenme daha çok aktiftir. Bu yüzeyde kemik rezorpsiyonu daha fazladır (1,3).



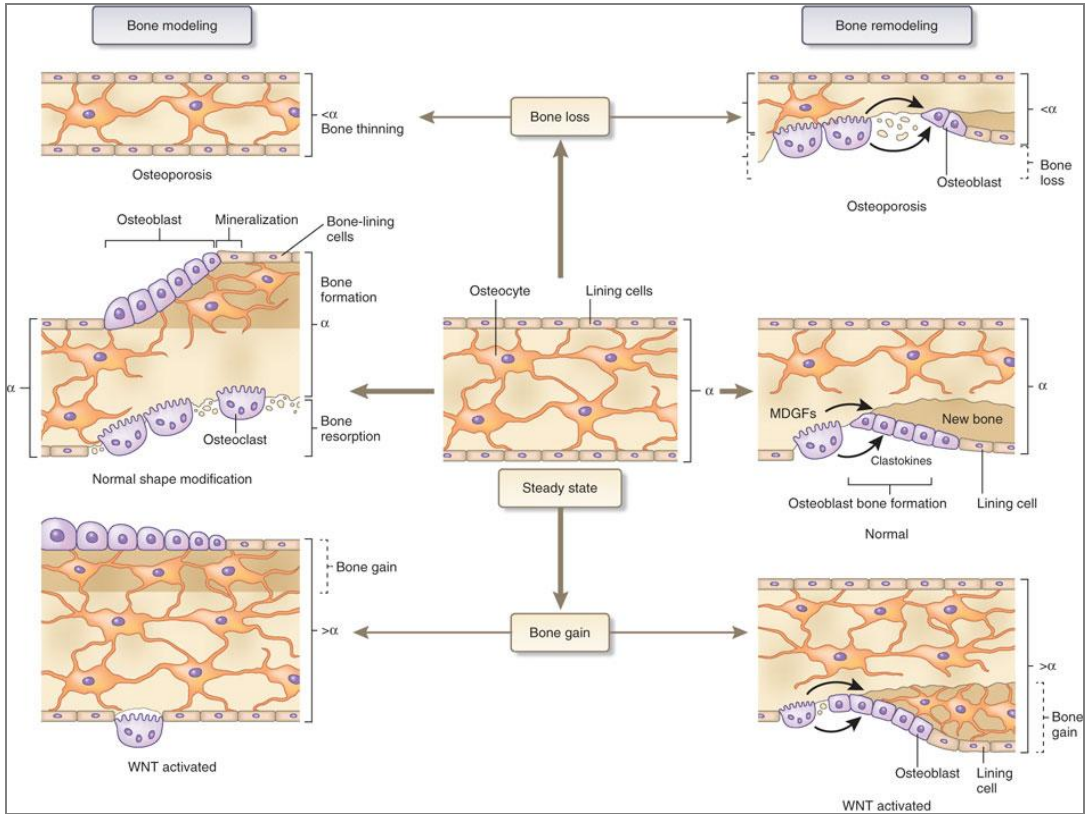
Şekil-1: Kemiğin mikroyapısı (1).

I.A. Kemik Modeling ve Remodeling Süreçleri

Kemik uzunlamasına ve enine büyür. Longitudinal ve enine büyüme özellikle çocukluk ve puberte döneminde daha belirgindir. Longitudinal büyüme, büyüme plağında kıkırdak birikimi ve bu kıkırdığın mineralize olacak kemik doku ile yer değiştirmesi ile gerçekleşir (1,4).

Osteoblast, osteosit ve osteoklastların koordineli ve birbirleri ile uyumlu çalışmalarıyla gerçekleşen süreçler kemiğin modeling ve remodeling süreçleridir (1,3,5). Kemiğin modelingi (şekillenme) büyüme sürecinde uygun kemik şekli ve kemik kitlesinin artmasını sağlar. Bu süreç özellikle periosteal kemik yapımı ile gerçekleşir. Burada önemli bir süreçte endosteal yüzeyde yer alan rezorpsiyondur. Sonuçta ilik mesafesi genişler. Buradaki süreç periosteal kemik yapımı lehine olduğu için kemik enine genişleyerek toplam kemik kütlelerinde artış meydana gelir (1). *Kemik modeling sürecinde yapım*

(anabolik modeling) ve yıkım (katabolik modeling) kortikal kemiğin farklı yüzlerinde aynı anda gerçekleşir (6,7) (Şekil-2). Özellikle doğumdan büyümenin duraksadığı döneme kadar aktif olarak devam eder. Ancak kemiklerde oluşacak kırıkların tamirinde ve mekanik yüklenmeye uyum sağlamak açısından düşük bir hızda erişkin hayatta da sürmektedir (5,7). Ayrıca modeling süreci hiperparatiroidi, renal osteodistrofi gibi durumlarda erişkin hayatta da aktif hale gelebilir (1,8–10). Modeling sürecini etkileyen en önemli faktör mekanik yüküdür.



Şekil-2: Kemik modeling ve remodeling süreçleri (7).

Diğer önemli bir süreç olan remodelling (yeniden şekillenme) doğumla başlar ve ölüme kadar devam eder (1). Kemik remodelingi “kemik yapım-yıkım” (turnover) döngüsünü sağlayan böylece kemik kitlesinin sağlıklı devam etmesini, mekanik yüklenmelere uyumu, mikokırıkların düzeltilmesi ve kalsiyum/fosfor metabolizmasının devam etmesini sağlayan önemli bir süreçtir (7). Kemik yapım-yıkım dengesi olarak da bilinen bu süreç erişkin kemik metabolizmasının tamamına yakını oluşturur. Kemiğin rastgele bir

yüzeyinde küçük bir alanda (paket) rezorbsiyon osteoklastlarca gerçekleştirilir. Kısa bir dinlenme süreci sonrası osteoblastlar yeni kemik matriksini ve mineralizasyonu gerçekleştirirler. Bu süreç modelingden farklı olarak genelde kemiğin aynı yüzeyinde yer alan birbirini takip eden yıkım-yapım dengesindedir (1,7) (Şekil-2). Remodeling süreci perimenopozal ve erken postmenopozal dönemde artar ve ilerleyen yaşlarda azalır. Ancak bu azalma dahi premenopozal dönemdeki remodeling sürecinden daha hızlıdır. Erkeklerde ise orta yaşlardan sonra artış gösterdiği düşünülmektedir (1).

I.B. Kemiğin Hücreleri

I.B.a. Osteoklast

Osteoklast kemiğin mineralize ekstraselüler matriksinin rezorpsiyonundan sorumlu hücredir. Osteoklastlar **hematopoetik kök hücrelerinden** köken alırlar (11). Bu öncüllerden olgun bir osteoklast oluşumunda bazı uyarıcı moleküllere ihtiyaç vardır. Bu moleküllerden en iyi bilineni osteoblast, osteosit ve stromal hücrelerden salınan RANKL (Receptor Activator for Nuclear factor κ B Ligand) ve M-CSF (macrophage colony-stimulating factor)'dir (12). Bu uyarıcı faktörlerin önemli bir kısmı osteoblastlardan salgılanmaktadır. Bu nedenle "osteoklast gelişimi osteoblastlara bağımlıdır" denilebilir. Olgun osteoklastlar integrin adı verilen hücre bağlayıcı reseptör ile kemik yüzeyine bağlanır. Kemik yüzeyine bağlandıktan sonra osteoklast polarizasyonu gerçekleşir. Böylece osteoklastın kemik yüzeyi ile temas eden plazma membranı bağlantı yüzeyini önemli derecede artırmak için girintili ve çıkıntılı bir hale gelir. Bu parmaklı çıkıntıların oluştuğu yüzeye "ruffled border" denilir (1). Osteoklastlar fırçamsı plazma membranından hidrojen iyonu ve Cl sekrete ederek asidifikasyonu ve mineral hidrolizini gerçekleştirirler. Yine aynı şekilde salgılanan Kathepsin-K ve matriks metalloprotein-9 (MMP-9) gibi enzimler de matriksde yer alan organik maddelerin parçalanmasında görev alırlar (13–15).

I.B.b. Osteoblast

Özellikle tip 1 kollojenden zengin ekstraselüler matriksin (ESM) yapımından sorumlu hücredir. Bu ESM daha sonra mineralize olacak ve kemiği meydana getirecektir. Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerden

farklılaşırlar. Osteoprogenitör hücrelerse **mezenkimal kök hücrelerden** farklılaşırlar (1,16,17). Bu farklılaşma süreci hematopoetik sistemdeki farklılaşma kadar net tanımlanmış değildir. Osteoprogenitör hücreler kemikte periost altında endosteum ve kemik iliğinde bulunurlar. Pre-osteoblasttan osteoblast dönüşümünde hücreler genişler kuboidal bir görünüm alırlar. Bu osteoblastlar kemik matriksinin sentezinden sorumlu olduğu için belirgin bir endoplazmik retikulum ve golgi yapısı dikkat çeker (1). Osteoblastlardan salgılanan en önemli portein tip 1 kollojendir. Bunun dışında birçok kollojen olmayan proteinde eksprese eder (1,18). Preosteoblastan sonra proliferasyon gerçekleşmez.

I.B.c. Osteosit

Osteoblast olgunlaşma safhasında, osteoblastın çevresi kemik matriksi ile çevrelendiğinde osteoblast olgunlaşmasının son safhası gerçekleşir. Bu safhada osteoblast morfolojik olarak değişir ve stoplazmik organellerini kaybeder, içsi uzantıları olan ince bir hücre haline gelir. Bu hücreye osteosit adı verilir (19,20). Osteositler kemikte lakuna adı verilen oyuklarda yerleşirler. Birbirleriyle ve osteoblastlar dentritik uzantıları ile bağlantı halindedirler. Bu dentritik uzantılar kanakuli adı verilen ince kanallardan geçer. Sonuçta osteositler lakunakanakuli adı verilen bir yapı içerisinde yer alırlar (1). Kemikte yer alan en fazla sayıdaki hücredir. Bu durum kemiğe etkisinin boyutunu doğru orantılı artırmaktadır. Osteositlerin kemiğin canlılığında ve diğer fonksiyonların gerçekleşmesinde görevleri olduğu ifade edilmektedir. Bir orkestra şefi gibi kemiği yönettiği söylenebilir (20). Birden çok görevi vardır. Bunlardan ilki mekanosensör olarak görev alır. Diğer önemli bir görevi kalsiyum ve fosfor homeostazisini (FGF23, PHEX, DMPP1 ekspresyonları ile) sağlar. Diğer bir etkisi de kemiğin yapım ve yıkımını kontrol etmektir (RANKL, OPG, sclerostin salgılayarak) (21,22).

II. Fosfor Metabolizması

Fosforun vücudumuzda esansiyel bir rolü vardır (23). Bu etkinliğini gösterebilmesi için serum fosfor düzeyi belirli aralıklarda tutulmalıdır. Serum

fosfor düzeyi, barsak fosfor geri emilimi, renal fosfor atılımı ya da reabsorbsiyonu, kemik mineralizasyonu ve rezorbsiyon dengesi ile sağlanır. Paratiroid hormonu (PTH), 1-25-dihidroksivitamin D ve Fibroblast growth factor 23 (FGF23) gibi birçok humoral faktörler bu süreçte etkilidir (24).

Fosfor kalsiyumdan sonra vücudumuzda bulunan ikinci en çok mineraldir. Fosfor tüm hücrelerde hücre bütünlüğü, metabolik yolların çalışması, enerji sağlanması, kas ve iskelet sisteminin yapısı ve çalışması, DNA ve nükleik asitlerin yapısında yer alan böylece yaşamsal süreçlerin devamlılığında önemli bir yeri olan mineraldir (23). İnsan vücudu yaşamsal fonksiyonlarında esansiyel olan bu mineralden faydalanabilmek için intestinal emilimi, renal geri emilimi artırmış ve büyük miktarlarda kemiklerde depolamıştır. Erişkin bir insanda toplam vücut fosforunun %80-90 kadarı kemikte geri kalan miktar ise hücre dışı alan, yumuşak dokular, eritrositler ve hücre içinde yer alır. Plazma fosfor miktarı toplam fosfor miktarımızın %0,1 kadarıdır. Plazma fosfor düzeyi kalsiyum gibi katı ve dar bir sınırdan tutulmaz ancak belirlenmiş daha geniş değer aralığı vardır. Bunu sağlayan hemostatik kompleks süreçler vardır. Plazma fosfor limitleri canlılığın çeşidi ve yaşına göre değişmektedir. Örneğin balıklarda fosfor düzeyi oldukça yüksek iken insanlarda daha azdır. Ayrıca erişkin bir insanın plazma Pi düzeyi bir yenidoğan ya da infanta göre daha azdır (25). Diyet ile alınan fosforun %70 proksimal barsaklardan emilir. Normal şartlarda barsaklardan emilen fosfor miktarı renal kaybedilene eşit olup, nötr bir fosfor balansı vardır (23). Gerikalan %30 ise vitamin D ve Na-Pi kanallarının rol aldığı aktif bir süreçle emilir (26,27).

Ekstraselüler alandaki fosfor konsantrasyonu sıkı bir humoral mekanizmaların etkisi altındadır. Bu sürece fosfor hemostazisi adı verilir. Bu hemostazis günümüzde önemli bir ölçüde açıklanmış olsa da yine de tam anlaşılabilmiş değildir (24). Birçok organ bu hemostazide etkin bir rol alır. intestinal fosfor emilimi, renal fosfor reabsorbsiyonu, kemik mineralizasyon ve rezorbsiyonu etkileyerek fosfor denegesini sağlayan birçok humoral mekanizmalar vardır. Günümüz bilgileri ile fosfor hemostazisinin barsak-kemik-böbrek-paratiroid bez aksında kontrol edildiğini bilmekteyiz (24,28).

II.A. Sodyum-Fosfor Kotransporterleri

Kemik, barsaklar ve böbreklerde yer alan çeşitli fosfor transport sistemleri tüm vücuttaki fosfor homeostazisinin sağlanmasında esansiyel olduğunu bilmekteyiz. Birçok dokuda birçok çeşit transport sistemlerin eksprese edilmektedir (29). Fosforun anyonik yani negatif yüklü inorganik hali [inorganik fosfor (Pi)] hücrelerce kullanılmaktadır.

Bu durum negatif elektrokimyasal potansiyeli olan membrandan Fosforun basit difüzyon ile geçmesini engeller. Bu geçişte çeşitli fosfor transporterlarına ihtiyaç vardır. Hücreler ekstraselüler alandan negatif yüklü Pi'yi ikincil aktif transport ile almaktadırlar. Bu amaçla özelleşmiş sodyum bağımlı fosfor kanalları kullanılmaktadır (29). İn vivo ve invitro çalışmalarda üç ana tip sodyum/fosfor kotransporter tanımlanmıştır. Tüm bu Pi kotransporterler, membranı birçok kez geçen yapıdadırlar. "*Solute carrier series*" (SLC) protein ailesine aittirler (30).

II.A.a. Tip 1 Sodyum-Fosfor Kotransporter

İlk tanımlanan NaPi transporter üyesidir. Daha çok böbrek tübülüs hücreleri epitelinde yer almaktadır. Daha az olarak ta beyin ve karaciğerde bulunur. Sonradan anlaşılmıştır ki bu kotransporter aslında diğer anyonların taşınmasında daha çok görev almaktadır. Fosfordan kısıtlı beslenme durumunda ise bu kanalların ekspresyonu değişmemektedir (29).

II.A.b. Tip 2 Sodyum-Fosfor Kotransporter

Tip 2 NaPi iyon taşıyıcılar NaPi2a, NaPi2b, NaPi2c adı altında üç izoformu vardır.

NaPi2a, böbreğe spesifik olup, böbrek renal tübülüs ve epitel hücrelerin apikal yüzeyinde yer alır. Proksimal tübülüsden Pi reabsorbsiyonundan sorumlu en önemli proteindir. Bu proteini kodlayan gende fonksiyon kaybı fosfor atılımında ciddi bir artışa ve serumda hipofosfatemiye neden olur (31). Bu kanalın fonksiyonları Pi homeostazisinde rol alan hormonal yollarla kontrol edilmektedir. PTH bu kanalın en önemli düzenleyicisidir. PTH hücre apikal yüzeyinde yer alan bu kanalların internalizasyonuna neden olarak lizozomal degradasyona yönlendirir. Sonuçta Pi reabsorbsiyonu yapacak kanal sayısı azalır ve Pi atılımı artar.

Aynı şekilde FGF-23 de NaPi2a'nın ekspresyonunu azaltarak Pi atılımını artırır.

Tip 2 NaPi iyon taşıyıcılarının diğer izoformu **NaPi2c**'dir. Genel olarak NaPi2a ile benzer yerlerde eksprese olmaktadır. FGF23/Vitamin D aracılığıyla regüle edilmektedir. Etkisi NaPi2a ile de benzerdir. Ayırt edici özelliklerinden bir tanesi taşıdıkları sodyum molekül (Na) sayılarının farklı olması (NaPi2c iki adet, NaPi2a üç adet Na taşır) (32). Ratlarda yapılan çalışmada özellikle weaning döneminden önce NaPi2c'nin eksprese edildiğini daha sonra belirgin azaldığını göstermiştir (33). Belki bu nedenle NaPi2a'da meydana gelen bozukluklarda NaPi2c kompensasyon yapamamaktadır (32).

NaPi2b daha çok intestinal ve akciğer tip-2 alveolar hücrelerle ilişkilidir. Kalsitriol (1-25(OH)2-D3) intestinal Pi emilimini artırmaktadır. Bu etkisini NaPi2b ekspresyonunu artırarak yapar. NaPi2b, Pi homeostazisinde intestinal Pi reabsorpsiyonunda etkilidir ve böylece kan Pi düzeyini artırır (32).

II.A.c. Tip 3 Sodyum-Fosfor Kotransporter

NaPi iyon taşıyıcılarının en son tanımlanan üyesi Tip 3 Napi iyon taşıyıcısıdır. Bunlar ilk olarak "retroviral receptors for gibbon ape leukemia virus" (Glv-1) ve "receptors for rat amphotrophic virus" (Ram-1) olarak tanımlanmışlardır. Yeni keşfedilmiş özelliklerinden dolayı bu proteinler yeniden adlandırılmıştır (29). Pi transportunda esansiyel yolları ve birçok dokuda eksprese edilmesi nedeniyle Pi transporter anlamına gelen Pit1 ve Pit2 isimleri verilmiştir. Diğer Pi taşıyıcıların tersine bu proteinler beyin, karaciğer, kemik, böbrek plesanta, iskelet kası, kıkırdak, dalak, timus, prostat, tetis, over, ince barsak, lökositlerde eksprese oldukları gösterilmiştir.

NaPi1 birçok iyon için taşıyıcı özelliği olsa da Pit1 ve Pit2 sadece Pi ve Na'ya özgüdür. Ayrıca hücre dışı Pi azalmasında ya da diyetle Pi kısıtlanmasında dokularda Pit ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Tip 3 NaPi taşıyıcıları birçok dokuda Pi'nin hücre membranından taşınmasında esansiyel ve önemli bir rolü olduğunu söyleyebiliriz (32).

III. Kemiğin Mineralizasyonu

Kemik organik ve inorganik materyallerin uyumlu birlikteliklerinden oluşmuş biyolojik kompozit bir dokudur (34). Biyomineralizasyon sadece kemik ve dişlerle sınırlı bir alanda geçerlidir. Bu dokular dışındaki mineralizasyonlar yaşamsal sorunlar oluşturabilmektedir (35). Kemik birden çok özelleşmiş hücre ve kompleks bir ekstraselüler matriks içerir. Osteoblast kemik yüzeyinde bulunur ve kemik yapımından yani organik matriks ve inorganik yapıların formasyonundan sorumludur. Osteositogenezis osteoblastın osteosite dönüşüm sürecidir. Bu süreç mineralizasyon ile paralel gelişir.

III.A. Mineralizasyonun lokal ve sistemik regülasyonu

Mineralizasyonu kontrol eden süreçlerin ana hedefleri Ca ve fosfor iyonlarıdır. Bu iyonlar hidroksiapatit (HA) bileşenleri olup mineralizasyonun gerçekleşmesinde bu iyonların varlığı ve yeterliliği esansiyeldir (36). Bu iyonların yetersizliğinde mineralizasyon bozulur ve rikets, osteomalazi denilen hastalıklar meydana gelir. Fosfor tüm hücreler için olmazsa olmaz bir iyonudur. Hücre yaşamı, çoğalma, büyüme, iletişim, enerji metabolizması ve kemik mineralizasyonu için esansiyeldir (23). Fosforun serumda az olması (hipo-) ya da çok olması (hiper-) vücut için istenmeyen ve zararlı durumlardır. Besinlerle alınan organik ya da inorganik fosfor barsaklardan emilir ve dolaşıma karışır. Bu fosforun büyük kısmı kemiklerde depo edilir. Fazlası böbreklerden atılır.

III.A.a. Mineralizasyonda Lokal Pi Kontrolü

Mineralizasyonun lokal kontrolünde fosfor dengesi önemli bir rolü vardır (36). Diyetle fosfor eksikliği ya da renal atılım fazlalığı mineralizasyonu bozacaktır (37). Sistemik fosfor konsantrasyonu kemik dokudaki lokal Pi seviyesinde ve osteodin mineralizasyon sürecinde oldukça önemlidir. Ancak sistemik Pi düzeyinin ayarlanmasında bugüne kadar bildiğimiz PTH-Dvitamin aksı yetersiz kalmaktadır (38). Sistemik kontrolde bu aksa FG23'de eklenmiştir ve bu hormon fosforun vücuttaki net balansı üzerine etkilidir (32). Ancak bu hormonal düzeylerin tekbaşlarına kemik yada diş dokusundaki lokal Pi üzerine etkisi ve mineralizasyonu açıklamadaki rolleri yeterli değildir (39).

Tüm bu bilgiler ışığında, mineralizasyonun, sistemik (hormonal) etkilerin kolaylaştırdığı daha çok kemik lokal dokusundaki hücrelerce (osteoblast ve osteosit) kontrol edilen bir süreç olduğunu söyleyebiliriz.

III.A.b. Mineralizasyonun Sistemik Kontrolü ve FGF23

Sistemik kalsiyum ve fosfat homeostazisinde geleneksel bilgiler PTH ve 1,25(OH)₂D₃ aksında gerçekleşmiştir. PTH tübül epitellerin apikal yüzeyinde sodyum bağımlı fosfor kotransporterlerin miktarını azaltarak (internalizasyon ve degradasyon) renal fosfor reabsorpsiyonunu azaltır ve fosforun idrarla atılımını sağlar. Aynı anda kalsiyumun proksimal tübüllerden geri emiliminde sağlar böylece kalsiyumun idrarla atılımını azalır. Gerek PTH etkisi ile gerekse düşen fosforun etkisi ile böbrekte 1,25(OH)₂D₃ sentezi artar. Bu 1,25(OH)₂D₃ proksimal barsaklardan fosfor ve kalsiyum emilimini artırır. Böylece artan kalsiyumun fosforu azaltıcı etkisi ile birlikte artan kalsiyumun PTH üzerine baskılayıcı etkisi fosfatüriyi daha da azaltır. Tüm bu kısır döngü ile net fosfor kaybının olabileceği bir fosfor dengesinin sağlıklı açıklanmasında yetersiz kalmaktadır (38). Bu durumda Pi üzerine net fosforik etkiye sahip FGF23, ana düzenleyici olarak karşımıza çıkmaktadır. FGF23 yapısal olarak FGF ailesine benzese de kendisi dolaşıma salınan bir "hormon" olup böbrek üzerine etkileri vardır. Bu hormonun varlığı, mineral homeostazisinin kemik, barsak, böbrek, paratiroid bezi arasında feedback mekanizmalarla kontrol edildiği şeklinde tanımlanmasına neden olmuştur.

Fgf23 ilk kez otozomal dominant hipofosfatemik riketse neden olduğu etkilerinin keşfi ile tanımlanmıştır (37) Daha sonra tümör-ilişkili osteomalizide etkisi gösterilmiştir (26). Çok öncelerden renal fosfor atılımı fazla olan ve sonuçta hipofosfatemisi ve bu hipofosfatemi ile uyumsuz düşük kalsitriol seviyesi olan hasta grupları tanımlanmaktadır. Bu hastalık gruplarındaki keşifler ve çalışmalar FGF23'ün fizyolojik fosfor regülasyonunda ve kemik-böbrek ilişkili hastalıklarda anahtar rol oynadığı tanımlanmıştır (40).

FGF23, 30 kDa moleküler ağırlığında, FGF ailesinin bir üyesidir. Bir "hormon" olarak tanımlanır (40) . Büyük kısmı osteositler tarafından salgılanır daha az olarak osteoblastlardan salınır. Sonuçta kemikten kaynak alan bu hormonun hedef organı böbrektir. Hedef organlarında etkili olması için o

dokuda “klotho” adı verilen transmembran bir proteinin kofaktör etkisine ihtiyaç duyar (36). Reseptörü FGFR olup bir tirozin kinaz reseptörüdür. FGF23 hormonunun görevi proksimal tubüler sodyum-fosfor kotransporter ekspresyonunu azaltarak renal fosfor reabsorpsiyonunu inhibe etmek ve böylece fosfatüriye neden olmaktır (26,36). Ayrıca FGF23 renal 1-alfa hidroksilaz enzimini bilinmeyen bir şekilde inhibe eder ve 24-alfa hidroksilaz enzimini aktive eder. Böylece 1,25(OH)2D3 oluşumunu azaltır. Yüksek fosfor alımı ya da 1,25(OH)2D3 fazlalığı FGF23 ekspresyonunu artırır ve böbrek Pi atılımı artırır. Artan FGF23 1,25(OH)2D3 oluşumunu azaltır, PTH’ı baskılar ve sonuçta intestinal fosfor emilimi azalır (26,36). PTH, osteosit yüzeyindeki PTH1R reseptörü aracılığıyla kemiğe etki eder. Bu etki FGF23 ekspresyonunu artırır ve bu durum negatif feedback ile PTH kontrolü sağlar (36). FGF23’ün bu etkilerinden bağımsız olarak mineralizasyonu baskıladığı da gösterilmiştir. Ancak bu süreçte nasıl bir rol oynadığı halen netleşmemiştir (40). Wang ve ark. FGF23 overekspresyonu gerçekleştirdikleri rat kalvarya hücrelerinde mineralizasyonun sistemik fosfordan bağımsız inhibe olduğunu göstermişlerdir. Osteoblast hücre kültürlerine FGF23 tedavisinin benzer sonuçlar gösterdiği çalışmalarda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar FGF23 sistemik faktörlerden ve Pi’den bağımsız olarak mineralizasyonda gerekli ve etkili olduğunu göstermektedir (40,41). Bazı diğer çalışmacılar FG23 eksikliği olan “FG23-/-“ fareler üretmişlerdir (42,43). Bu fare grubunda beklenildiği gibi hiperfosfatemi, hiperkalsemi, yüksek 1,25(OH)2D3 ve baskılanmış PTH saptamışlardır. Ancak yüksek miktarda Pi, kalsiyum ve kalsitriole rağmen bu farelerin iskelet sistemlerinde ciddi mineralizasyon defektleri (osteomalazi, osteodosis) gözlenmiştir (43,44). Ayrıca Hipofosfatemik rikets (X bağımlı) fare modellerinde hipofosfatemi ve rikets geliştiği gösterilmesine rağmen sadece renal NaPi kanalları bloke edilen ve hipofosfatemi gelişen farelerde rikets ya da osteomalazi gelişmemiştir (45). Tüm bu çalışmalar kemik dokuda lokal Pi düzeylerinin, sistemikten ayrı olarak, mineralizasyonda etkili olduğunu göstermektedir.

Yüksek fosfor uygulanmış damar düz kas hücre kültürlerinde kalsifikasyon geliştiği gözlenmiştir. Ayrıca bu kas hücrelerinde osteogenik

değişiklikler tespit edilmişti. Nonspesifik bir NaPi blokeri olan “Fosfonofosforik asit” (foscarnet) uygulanması ile yüksek fosfora rağmen mineralizasyon gerçekleşmemiş ve kas hücrelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir (35). Yine benzeri bir çalışmada damar düz kas hücre kültürlerinde Pit1 kanallarının spesifik ablasyonu ile kalsifikasyonda gerileme olduğu görülmüştür (46). Meleti ve ark. osteoblast benzeri hücre kültürlerinde inorganik fosfor konsantrasyonunun artması ile apoptozis geliştiği ve bu sürecin foscarnet uygulanması ile oluşmadığını göstermişlerdir (47). Damar düz kasında kalsifikasyon çalışılan araştırmalarda NaPi kotransporterlerinin ve dolayısıyla lokal Pi'nin mineralizasyonda esansiyel bir rolü olduğu dikkat çekmektedir.

Pi iyon konsantrasyonlarının özellikle matriks veziküllerinde ekstraselüler alana göre çok yüksek olmasına rağmen bu iyon akışı vezikül içine doğru olmaktadır. Bu durum özellikle fosfor transportunun transselüler ve aktif bir süreçle gerçekleştirdiğini düşündürmektedir (48,49). Kuşku yok ki bu süreçte ve dolayısı ile mineralizasyonda Pi kadar Pi'nin transportunda önemli bir basamaktır.

III.A.c. NaPi Kanallarının Mineralizasyon Sürecinde Etkileri

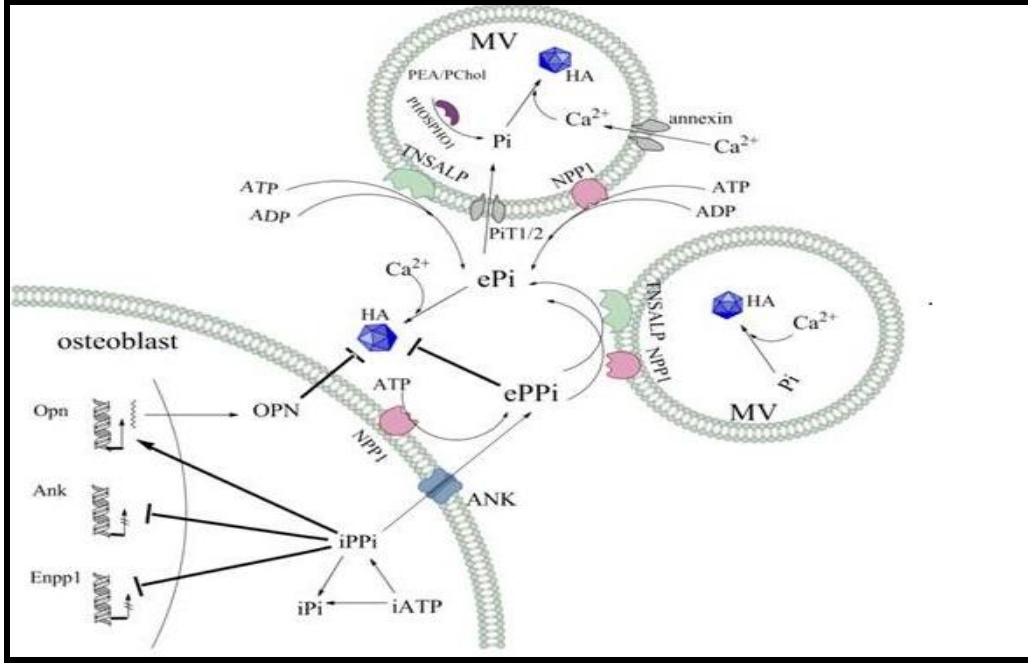
NaPi taşıyıcıları yukarıda anlatıldığı gibi üç ana grupta inceleyebilir. Bunlardan NaPi2a, NaPi2c ve NaPi3 (Pit1 ve Pit2) osteoblastların hücre yüzeyinde olduğu gösterilmiştir (39,49). İlk iki kanal daha çok sırasıyla böbrek, karaciğer ve akciğerde olduğu gösterilmiş olup NaPi3'ün ise çoğu dokuda eksprese edildiği bilinmektedir. Osteoblastlar yüzeyinde yer alan NaPi kanalların sadece Pit1 ve Pit2 olduğunu gösteren hücre kültür çalışmaları olmasına rağmen yine osteoblast ve benzeri hücre kültürlerinde NaPi2a ve NaPi2c kanallarını da gösterildiği çalışmalar yayınlanmıştır (39,49). Osteoblast yüzeyinde yer alan NaPi kanalların çeşitliği çelişkili olsa da bu kanalların mineralizasyon sürecinde önemli ve esansiyel bir rolü olduğu kuşku götürmüyor. Yinede özellikle Pit1'in intertisyel sıvıdan Pi absorpsiyonunu sağlamada merkezi bir rolü var gibi görünmektedir (39). Buna rağmen Pit1 ve Pit2 ablasyonunun hücre viabilitisinde önemli bir değişiklik yapmaması

bunların etkilerinin başka yollardan kompanse edilebildiğini gösteriyor (50). Ancak osteogenik hücrelerin gerçekleştirdiği mineralizasyon sürecinde esansiyel bir rolleri olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte gerek damar kas hücrelerine gerekse osteojenik hücre kültürlerine bir non-spesifik NaPi inhibitörü olan foscarnetin uygulanması, mineralizasyonu azalttığı yada tamamen engellediği görülmüştür (35).

III.A.ç. Matriks Vezikülleri

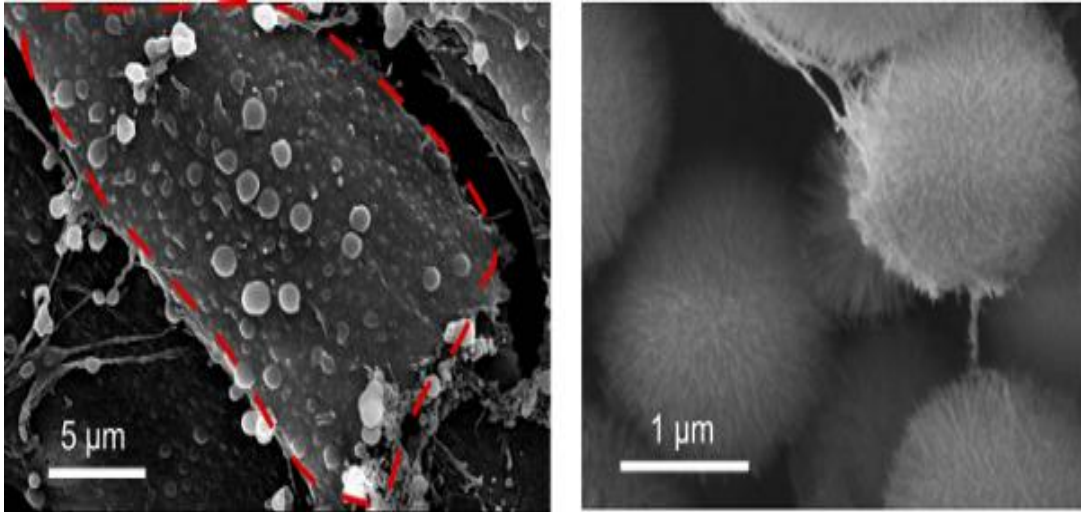
Matriks vezikülleri (MV) ekstraselüler, membrana bağlı yada ayrı 50-200nm boyutunda nanoveziküllerdir. Kondrositler, osteoblast ve odontoblastlarca hücre yüzeyinden tomurcuklanarak oluşturulur (51,52). Vezikül membran yapısı hücre membran yapısından farklı olduğu bilinmektedir. Hücre membranının yapması gerekenden bir kısmını fazlasıyla gerçekleştirmesi gerektiği için özelleşmiş bir membran yapısı vardır diyebiliriz. Vezikül membranları fosfolipidlerden zengindir. Bu durum Ca afinitesi sağlar. Ayrıca MV, kalsiyum kanalları (annexin A2,A3,A5 CaATPaz), kalsiyum bağlayan protein (calbidin), ALP, NPP1, NaPi kanallarından ve PHOSPHO1'den zengin bir yapıya sahiptir (53,54) (Şekil-3).

Matriks vezikülleri Ca ve Pi için bir toplanma alanı diyebiliriz, bu toplanma sonrası Ca-Pi amorf yapılar oluşur ve bu minerallerin birikiminin devam etmesi ile bu amorf yapılar veziküller içinde çözünemeyecek kadar çoğalmış olur ve HA kristallerini meydana getirirler. Bu süreç sonrasında HA kristalleri membranı parçalar ve ekstraselüler alan yani matrikse (osteoid alan) kollajenlere yapışarak otururlar (52). Daha sonraki adım, bu HA kristallerin bir odak olarak görev yapması ve ekstraselüler alanda HA olgunlaşması, büyümesi ve dağılımın gerçekleşmesidir (52). Bu süreçler elektron mikroskopisi ile gösterilmiş olup matriks vezikülleri aracılığıyla mineralizasyon yaklaşık 40 yıldır bilinmektedir (55) (Şekil-4). Günümüze kadar bu görüşün doğruluğuna ilişkin birçok araştırma yayınlanmıştır (56–58).



Şekil-3: Matriks veziküllerinde mineralizasyon (59).

Bu veziküllerin nasıl oluştuğu ve bu veziküllerin hangi sinyaller sonucu membrana gönderildiği net bilinmemektedir. Mineralizasyon sürecini açıklayan diğer hipotezler ve bulgular burada anlatılmamıştır. Ancak MV odak oluşumunda yada HA'nın büyümesinde ve yayılmasında bir şekilde etkili olduğunu söylemek yanlış olmaz.



Şekil-4: Matriks vezikülleri (60).

MV'de yer alan fosfolipidlerin çok olması Annexin kanalları ve kalsiyum bağlayan proteinlerin çok olması Ca için bir yapışma ve çekim merkezi olmaktadır. Zaten osteoblastlarca oluşturulduklarında MV içeriğinin Ca yönünden zengin olduğu gösterilmiştir (61). Bu Ca konsantrasyonunun artışı hücreden ayrıldıktan sonra devam eder.

III.A.d. Matriks Veziküllerinde Pi Konsantrasyonunun Artması

Pi birikimini vezikül yüzeyinde yer alan çoğunluğunu Pit1 ve Pit2' nin oluşturduğu yoğun NaPi kanalları sağlar. Bununla birlikte vezikül içinde Pi konsantrasyonunu artırmada önemli bir basamak olan PHOSPH1 enzimi özellikle organofosfatlardan (fosfokolin ve fosfoetonalamin) Pi serbestleştirir (62). Mineralizasyonu baskılayan PPI ise *Ank* kanalları aracılığıyla ekstraselüler alana atılır ve vezikül içinde mineralizasyonun daha da kolaylaşması sağlanır. Bunun dışında matriksden Pi sağlanması için vezikül ve hücre membranı yüzeyinde yer alan TNSALP, PPI'den Pİ serbestleştirir ve Pi vezikül içine geçer. Ayrıca bu basamak HA'nın matriksde büyümesi ve yayılımını PPI'yi azaltarak da kolaylaştırır. Nihayi sonuç, vezikülde Pi ve Ca konsantrasyonlarının artık çözünemeyecek düzeyde birikimi ve HA oluşumu ile sonuçlanır. Daha sonra HA'lar membranı parçalar ve matrikse yayılır. Burada ESM'deki Ca ve Pi ile olgunlaşmaya ve büyümeye devam eder (54,63–65).

III.A.e. Pi/PPI Oranının Mineralizasyona Etkisi

Lokal regülasyonun merkezinde iki inorganik fosfor (Pi) dan oluşmuş Pirofosfat (PPI) ve Pi/PPI oranı yer alır (64). Ekstraselüler PPI, Pi'nin kalsiyum ile kristal formu almasını (HA oluşumu) ve HA'nın büyümesini, yayılmasını inhibe eden anahtar düzenleyicidir (36). PPI hücrelerde birçok metabolik sürecin ek ürünü olarak meydana gelir (örn hücre içinde ATP den AMP oluşumunda açığa çıkar). Bu nedenle birçok dokuda hücre içi, hücre dışı ve plazmada bulunur (64). Ekstraselüller ve plazmada PPI'nin önemli miktarda bulunması, vücutta gelişmiş güzel kalsifikasyonun oluşumunu engeller. Vücutumuzda sadece PPI'nin parçalandığı ve konsantrasyonun ayarlanabildiği kemik, diş ve kıkırdak dokularda mineralizasyon gelişir. Bu

durum mineralizasyonun niye sadece kemik ve benzeri dokularda olabildiğini açıklamaktadır.

Ekstraselüler PPI, Pi'nin kalsiyum ile kristal formu almasını böylece HA oluşumunu inhibe eder (64). PPI'nin olmadığı ya da üretilmediği durumlarda mineralizasyon kontrolsüz bir şekilde oluşacak ve beklenildiği gibi yaygın ektojik kalsifikasyonlar meydana gelecektir. Ters bir durumda ise PPI'nin yıkılmadığı ya da çok yüksek düzeylere ulaştığında yeterli mineralizasyon sağlanamayacaktır (54).

Kemik dokuda hücre dışı PPI konsantrasyonunu sağlayan iki önemli protein vardır. Bunlardan birincisi "Nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1" (NPP1)'dir. NPP1 bir glikoprotein olup plazma membranında yer alan ektoenzimdir. Görevi ekstraselüler nükleotidlerinin pirofosfata hidrolizidir. Bu enzimi eksprese edemeyen fare modellerinde PPI düzeylerin düşük olduğu ve ektojik kalsifikasyonlar geliştiği görülmüştür (66). Aynı şekilde insanlarda NPP1 geninde delesyonların neden olduğu hastalıklar tanımlanmıştır. Bu hastalıklardan en dikkat çeken *"İnfantil Jeneralize Arterial Kalsifikasyon"* olup mortalitesi oldukça yüksektir. Günümüzde bu hastalar bir pirofosfat analogu olan bifosfonatlar ile tedavi edilmektedirler (67). Diğer PPI sağkayıcı ise *"Progresif ankylosis protein (ank)"* proteindir. Bu protein hücre membranında yer alır. Hücre içinde oluşan PPI'nin hücre dışına taşınmasını sağlar. Ank geninde delesyon oluşturulmuş fare modellerinde ektojik kalsifikasyon, eklemlerde kalsifikasyon ve anklizon gözlenmiştir (65,68). Bu iki protein dışında ekstraselüler alanda PPI konsantrasyonunu azaltan diğer bir protein ise *Dokuya Spesifik Olamayan Alkali Fosfataz (TNSALP)*'dir.

III.A.f. TNSALP ve mineralizasyon

Alkali fosfataz (ALP) membrana bağlı bir ektoenzimdir. Yüksek PH'da monofosfat esterlerini hidrolize eder. İnsan ALP'si TNSALP, *intestinal, plasenta, germ hücre* olmak üzere dört çeşittir. TNSALP karaciğer, böbrek ve kemik gibi birçok dokuda eksprese edilmekte olup kemik formasyonundan sorumlu çeşididir (69). TNSALP özellikle osteoblast, hipertrofik kondrosit ve odontoblastların hücre membranlarında ve matriks veziküllerin membranlarında eksprese edilir. TNSALP'nin doğal substratları PPI, pridoksal

5-fosfat (PLP) ve beklide ATP ve fosfotetonalamindir. TNSALP, mineralizasyon sürecinde PPI hidrolize ederek serbest Pi açığa çıkartır. Sonuçta bir mineralizasyon inhibitörü olan PPI azalmış olur ve ayrıca HA'nın bir bileşimi olan Pi konsantrasyonunun artışı gerçekleşir. Bu reaksiyon yeterli mineralizasyonun sağlanmasında özellikle matriksde HA formasyonunun büyüyüp, yayılmasını da etkilidir (51,70).

PLP, B6 vitamininin aktif bir formudur ve bu bileşik nöronal hücrelerin nörotransmitter oluşum reaksiyonlarında bir kofaktördür. PLP hücre ve kan beyin bariyerini geçemez. Bu nedenle öncelikle TNSALP tarafından defosforile edilmesi gerekir. Hücre membranını PL olarak geçer ve tekrar fosforillenerek PLP oluşur ve bu form nörotransmitter sentezlenmesinde görev alır (71).

TNSALP aktivitesinin levamizol ile baskılanması mineralizasyonda baskıladığı in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir (72). TNSALP'nin kemik mineralizasyonundaki etkinliği ALP gen defekti sonucu oluşan hipofosfatazyalı hastalarda ve transgenetik fare modellerinde de gösterilmiştir (73,74).

IV. Levamizolün Mineralizasyon Üzerine Olası Etkileri

Levamizol, günümüzde veteriner hekimlikte antihelmitik olarak kullanılmaktadır (75). Geçmiş yıllarda insanlarda kullanılmış olup yan etkilerinden (agranülositoz, cilt nekrozları) dolayı günümüzde insanlarda rutin bir uygulama alanı yoktur (76,77). Bununla birlikte özellikle antiproliferatif etkisinden dolayı, kolan kanserinde 5-FU ile birlikte tedavide kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır (78). Ayrıca immünmodulator etkilerine yönelik çalışmalar da olup özellikle nefrotik sendromlu çocukların tedavisinde denenmiş ve araştırılmıştır (79).

Yaklaşık 40 yılı aşkın bir süredir levamizolün TNSALP üzerine inhibitör etkisi olduğu bilinmektedir (80). Bu etkiyi doza bağımlı, substrattan bağımsız, geri-dönüşümlü olarak göstermekte ve nonkompetitif inhibisyon yapmaktadır (81). Levamizol ve stereoizomeri tetramizolün mineralizasyon

sürecinde yer alan TNSALP'nin etkisinin ortaya çıkarılmasında ve böylece mineralizasyonu daha iyi anlamamıza olanak vermiş bileşikler olduklarını söylemek yanlış olmaz. Beklide bu bileşikleri bilmemiz ve araştırmalarda yaygın kullanmamız günümüzde TNSALP'den daha çok söz etmemiz ve etkilerine daha hakim olmamızı sağlamıştır.

Günümüzde PPI'nin TNSALP için önemli bir substrat olduğunu bilmekteyiz. PPI'nin hidrolizi mineralizasyon için gerekli olan Pi için önemli bir kaynaktır. Ancak hücre kültür ortamlarında TNSALP substratı olarak B-GP kullanılmakta olup bu bileşik in-vivo PPI'nin yerini tutmayabilir. PPI eklenmiş hücre kültürlerinde ise TNSALP aktivitesi ve gen ekspresyonu azaldığı başka çalışmalarla da gösterilmiştir. Adisson ark. çalışmasında PPI'nin direkt büyüyen HA kristallerine bağlanarak, OPN ekspresyonunu artırarak ve TNSALP aktivitesini azaltarak mineralizasyonu baskıladığı en az üç muhtemel yol tarif edilmektedir (64).

Osteoblast hücre kültür, çalışmalarında TNSALP substratı olarak "beta-gliserofosfat" (B-GP) kullanılmaktadır. Levamizol bu hücre kültürlerinde TNSALP aktivitesinde azalma ve B-GP aracılıklı mineralizasyonda baskılanma meydana getirmektedir (64,82). Orimo ve ark.'nın çalışmasında B-GP'nin mineralizasyonu uyaran bir etkisi olduğunu göstermişlerdir. Yine bu çalışmada levamizol uygulanması ile TNSALP aktivitesi ile birlikte "TNSALP mRNA" ekspresyonu da azalmıştır (44). Araştırmacılar bu sonuca B-GP'nin TNSALP hidrolizi sonucu oluşan ürünlerinin mRNA ekspresyonun da etkili olabileceğini düşünmektedirler. B-GP, TNSALP ile hidrolizi ile Pi ve gliserol açığa çıkar. Bu ürünlerden gliserolün mineralizasyon ve ALP üzerine etkisi gözlenmemiştir. Pi, gerek HA formasyonunu kolaylaştırmakta gerekse henüz bilemediğimiz bir yoldan TNSALP ekspresyonunu artırmaktadır. İşte bu etkiler kültür ortamına levamizol eklenmesi ile gerçekleşmemektedir. TNSALP'de levamizol dozuna bağlı olarak tam inhibisyon sağlanabilmektedir. Bununla birlikte levamizol ortama eklenmesi AMP hidrolizini de bloke etmektedir. Ancak ATP eklenmesi ile gerçekleşen mineralizasyon sürecini (*ATP aracılıklı mineralizasyon*) etkilememesi (ya da kısmi etkilemesi) TNSALP'nin mineralizasyonda oynadığı rolü tek başına gerçekleştirmediğini

göstermektedir (51,83). TNSALP'ye benzer etki eden en az iki fosfataz daha vardır ve bu fosfatazlara levamizol etki etmemektedir (82,84,85). Burada diğer fosfatazların özellikleri ve fonksiyonları tartışılmayacaktır.

Tavuk embriolarından elde edilen kondrositlerden hazırlanan kültür ortamında levamizolün tip X kollajen sentezini ve bu kollajen aracılıklı mineralizasyonu azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca Tip X kollajen mRNA ekspresyonunda azaldığı ifade edilmiştir (86).

Levamizol mineralizasyon üzerine etkilerini inceleyen hücre kültür çalışmaları çok sayıda olsada invivo çalışmalar sınırlıdır. Bunun önemli bir nedeni invitro benzeri etki görmek için invivo toksik dozda levamizole ihtiyaç olacağı olabilir (77). Garba ve ark.'nın levamizolün 1,25(OH)2D3 aracılıklı mineralizasyona etkisini inceledikleri invivo çalışmada düşük doz (40 mg/kg) ve yüksek doz (80 mg/kg) tedavi uygulamışlardır. Bu gruplarda tartı ve büyümede farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Düşük doz levamizolün serum ALP düzeyini %18,4 ve yüksek doz levamizolün %61,3 oranında azalttığını saptamışlardır. Ayrıca ALP'nin mineralizasyon hızına etki edebilmesi için en azından %50 baskılanması gerektiği sonucuna ulaşılmışlardır. Ayrıca bu çalışmada doza bağlı olarak endosteal yüzeyde osteoid kalınlığındaki azalma mineralizasyon hızından daha belirgin olmuştur. Serum değerleri incelendiğinde ALP dışında, serum fosforun doz gruplarına göre sırayla %14,5 ve %22,8 azaldığı ancak kalsiyum değerlerinin ise değişmediği görülmüştür. Serum PPI düzeyi çalışılmamıştır. Bu çalışma levamizolün invivo serum biyokimyası ve kemik histomorfometresinin incelendiği tek çalışmadır (77). Özetle PPI düzeyinin mineralizasyon için kritik bir parametre olduğu düşünülürse bu düzeyi artıracak levamizol aracılıklı TNSALP inhibisyonu mineralizasyonu baskılamaktadır. Ayrıca osteoid doku sentezi ve kollajen sentezlerinin de etkilediği söylenebilir. Ancak bu ilacın invivo etkileri konusunda yeterli çalışmalar yoktur.

V. Fosfonoformik Asitin Mineralizasyon Üzerine Etkileri

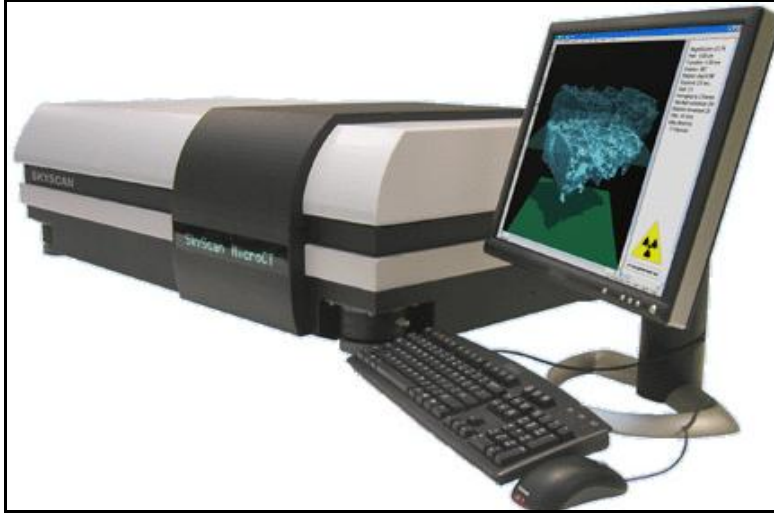
Fosfonoformik asid ya da diğeri bilinen ismi ile foscarnet bir PPI analogudur. Bu bileşik viral DNA polimeraz, RNA polimeraz ve reverse transkriptaz gibi enzimleri inhibe edici ajan olarak keşfedilmiş ve kullanılmaktadır. Günümüzde Herpes virüs hastalıklarında (ilaca dirençli sitomegalovirüs(CMV), herpes simleks tip1 ve tip2), CMV retinitis ve HIV tedavisinde yer almaktadır (87,88). Günümüz tıbbında yaygın kullanılan ve etkileri daha çok incelenmiş “Bifosfonatlarda” bir PPI analogudur. Bifosfonatlar “P-C-P” bileşiği içermesine karşın foscarnet sadece monofosfat bileşiği olarak “C-P” içerir (89). Foscarnet, bifosfonatlar gibi kemiklerde birikim göstermektedirler (89). Ancak foscarnetin invivo olarak kemik üzerine etkisi aydınlatılmış değildir. Bununla birlikte Swenson ve ark.’nın kedilere 14 gün boyunca uyguladıkları yüksek doz (1000 mg/kg/gün) foscarnetin etkilerini inceledikleri çalışma, foscarnetin invivo toksik etkilerinin tespiti açısından dikkat çekicidir. Bu çalışmada foscarnetin rikets benzeri değişikliklere neden olduğunu ve yeni mineralizasyon alanlarının gelişmediğini saptamışlardır (89). Özetle aktif mineralizasyon ve “calcein” tutulumu (kemiği işaretlemek ve mineralizasyon hızını hesaplamak için kullanılan HA’ya afinitisi olan işaretleyici madde) tamamen durmuştur. Ayrıca osteoklastların sayılarında artış görmüşlerdir. Ancak bu osteoklastların aktivitelerini ölçememişlerdir. Serum değişikliklerinde ise tedavi gruplarında kalsiyumun yükseldiği, fosfor ve ALP değerlerinin azaldığını saptamışlardır. ALP değerlerindeki azalmayı osteoblast aktivitesinde azalmaya veya foscarnetin direkt osteoblasta toksik etkisine bağlamışlardır. Ratlarda bifosfonatlar ile yapılmış çalışmalarda elde edilen serum ve histomorfometrik inceleme sonuçları ile çoğunlukla benzer sonuçlar saptanmıştır (90). Bununla birlikte bifosfonat grubunda mineralizasyon alanlarında artış saptanırken (rezorbsiyonda daha belirgin azalmasının etkisi) foscarnet çalışmasında mineralizasyon tamamen durmuştur (89). Özetle, PFA mineralizasyonu bifosfonatlara göre daha güçlü durdurmaktadır. Osteoblast yüzeyinde ve matriks veziküllerinin yüzeyinde Na bağımlı fosfor kanalları yer almaktadır. Bu kanallar “vezikül içi Pi” miktarının

artmasına ve Ca-Pi amorf yapılarını ve daha sonrada HA gelişimi üzerinde etkilidirler (91,92). Foscarnet bir non-selektif NaPi kotransport blokeridir. Hücre kültürlerinde NaPi kanallarının bloke edilmesi için foscarnet kullanılır. Kültür ortamında 1mM dozda kullanılan foscarnet, Pi transportunu yaklaşık %75 oranında azaltmıştır (49). Başka bir çalışmada, kültür ortamına Pi aracılıklı mineralizasyon incelenmiş ve foscarnet mineralizasyon gelişimini belirgin baskılamıştır. Aynı ortamda TNSALP ekspresyonu ve aktivitesinde anlamlı bir değişiklik oluşmamıştır Bu çalışmada foscarnet, gerek B-GP aracılıklı gerekse Pi aracılıklı mineralizasyonu baskıladığı ancak TNSALP'yi baskılamadığı gösterilmiştir (51).

Vasküler kalsifikasyon ateroskleroz gelişiminde önemli olup diyabet ve üremik hastalarda ciddi problemlere neden olmaktadır (35,46). Özellikle vasküler kalsifikasyon kronik böbrek yetersizliğinde önemli bir mortalite nedenidir. Bu kalsifikasyon sürecine ait invitro çalışmalarda vasküler düz kas hücre modelleri kullanılır. Bu hücre kültür ortamına yüksek Pi eklendiğinde düz kas hücrelerinde osteojenik değişiklikler olmakta ve bu süreç kalsifikasyon ile sonlanmaktadır. Yüksek fosfor içeren kültür ortamına foscarnet eklenmesi, bu kas hücrelerindeki değişikliği ve kalsifikasyonu inhibe etmektedir (35). Bu sonuç vasküler kalsifikasyonda, düz kas hücresi içerisine Pi akışının önemli bir mekanizma olduğunu, bu Pi akışında NaPi kanallarının önemli bir rolü olduğunu ve bu etkilerin foscarnet ile ortadan kaldırılabilirdiğini göstermektedir.

VI. Mikrotomografi

Mikrotomografi herhangi bir objeden mikron (mikrometre) (1/1000 mm) düzeyinde kesitler alınmasını ve uygun programlar aracılığı ile üç boyutlu modelleme yapılmasını ve objenin içerisindeki görüntülenmesini sağlayan gelişmiş bir X-ray tomografi cihazıdır (93). Mikrotomografi bu işlemi yaparken objede herhangi bir destruksiyon yapmaz ve bu materyal daha başka incelemeler (örn histolojik incelemeler) için rahatlıkla kullanılabilir (94).



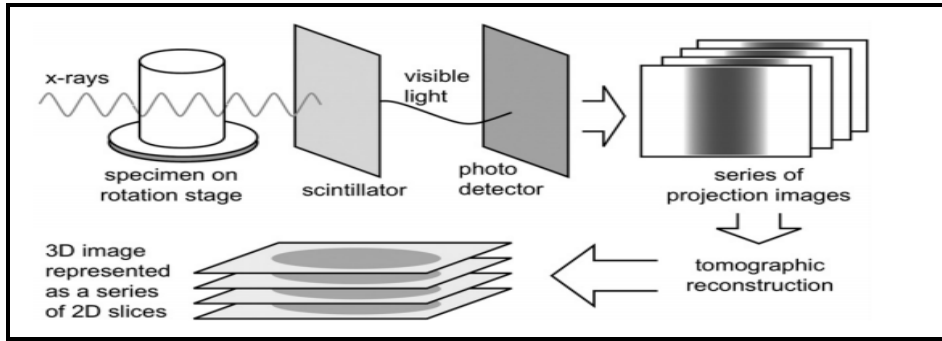
Şekil-5: Gelişmiş Mikron ya da mikron altı çözünürlükte tarama yapan bir mikrotomografi cihazı.

Rutin radyoloji teknikleri olan “X-ray direkt grafileri” ve “DXA (dual energy X-ray absorbtometry)” kemik hastalıklarının değerlendirilmesinde çoğunlukla kullanılmaktadır. Direkt grafilerin çözünürlüğünün düşük olması ve sadece büyük boyutlu makroskopik lezyon ya da değişiklikleri göstermesi nedeniyle daha yüksek çözünürlüklü görüntülemeler geliştirilmiştir.

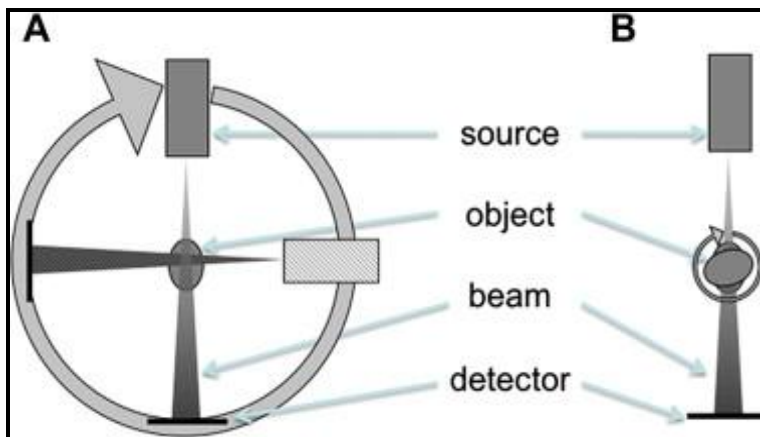
Mikrotomografinin çalışma şekli bilgisayar tomografilerine benzemektedir (Şekil-6). Bir X ışını kaynağı ve bu kaynaktan çıkan ışın örnekten geçer. Daha sonra bu ışınları toplayan bir dedektör ve elde edilen görüntüleri yapılandıran bir elektronik devre vardır Temel olarak iki tip mikrotomografi vardır. Bunlardan birincisi incelenecek canlı ya da örneğin sabit durduğu ancak kaynak ve dedektörün örnek etrafında döndüğü tip mikrotomografi cihazlarıdır (Şekil-7a). Bu çeşit tomografiler canlı hayvan incelemelerinde kullanılırlar. İkinci tip mikrotomografide dedektör ve kaynak sabittir ancak incelenecek örnek rotasyon yapar. Bu incelemede genelde ex-vivo örnekler incelenir ve daha yüksek çözünürlükte görüntüler sağlanabilir (94) (Şekil-7b).

Dokudan ne kadar ince kesitler alınırsa o dokunun yapısını ve değişikliklerini daha doğru analizi mümkün olacaktır. Buradan hareketle ilk kez 1980 yılında, Jim Elliott tarafından mikrotomografi yapılmış ve 50 mikron kalınlıkta kesitlerle bir salyangoz incelenmiştir (95). Günümüzde çoğunlukla kullanılan tıbbi bilgisayar tomografisi yaklaşık 1-2 mm kalınlıkta kesitler olarak

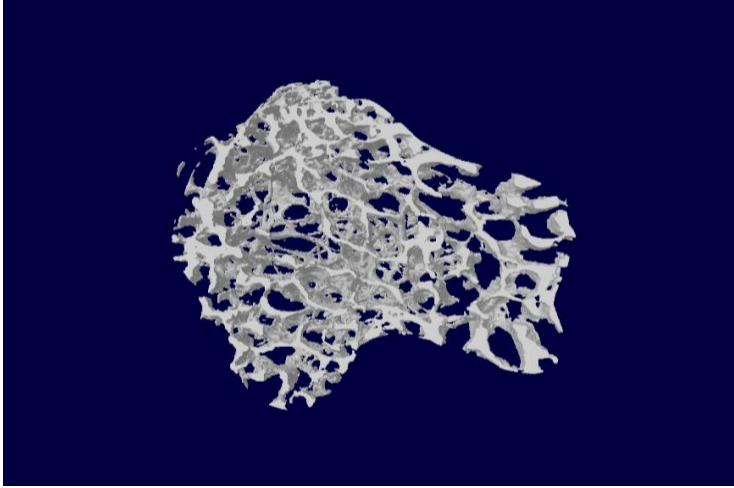
dokunun ya da materyalin incelenmesini sağlamaktadır. Yüksek çözünürlüklü bir medikal bilgisayar tomografi cihazının 1 mm'lik bir düzeyde aldığı tek bir kesite rağmen, bir mikrotomografi cihazı bu alandan yaklaşık 1000 kesit alabilir ve incelenmesini sağlayabilir (96). Bu nedenle günümüzde prelinik alanında küçük hayvan ve dokuların görüntülenmesinde kullanılmaktadır. Mikrotomografi iyi bir rezolüsyon sağlasa da yumuşak doku çözünürlüğü iyi değildir. Bu nedenle yüksek kontrast veren dokularda özellikle kemik ve diş incelemelerinde yaygın kullanılmaktadır. Ancak yumuşak dokuda dağılarak kontrast sağlayan ajanların kullanıma girmesi ile yumuşak doku taramaları da artık yapılabilmektedir (94). Kemik incelemelerinde mikromografi hacimsel kemik mineral yoğunluğu ölçümü sağlamaktadır. Bu ölçümde kemiğin korteks ve trabeküler yapılarının ayrı ayrı incelenmesi ve üç boyutlu olarak mineral yoğunlukların hesaplanması sağlanabilmektedir (97).



Şekil-6: Mikrotomografinin çalışma prensibi (94).



Şekil-7: Mikrotomografinin temel olarak iki şekilde çalışma prensibi vardır (94).



Şekil-8: Çalışmamızdan elde edilmiş bir trabeküler kemik 3D görüntüsü.

GEREÇ VE YÖNTEM

I. Gereç

Çalışmamız Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 01.07.2014 başvuru tarihli 2014-10/01 karar numaralı izni ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda ağırlıkları 20 gr civarında 21 adet 3 aylık erkek Balb/c türü fare kullanılmıştır. Fareler 21-24°C oda sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık foto periyodunda, polikarbon yapılı fare kafeslerinde 4'lü gruplar halinde, %18-20 protein içeren pelet fare yemi ve su ile "ad libitum" olacak şekilde beslenerek muhafaza edilmiştir. Hayvanların bakımı, terminasyon ve kan alma işlemleri ve bu işlemler için kullanılan anestezi protokolü Uluslararası Sağlık Enstitüsü'nün Laboratuvar Hayvanlarını Koruma ve Kullanma Rehberindeki önergelere göre yapılmıştır (98).

Bu çalışmada etkileri incelenen kimyasal bileşiklerden birincisi **Levamisole hydrochloride [(-)-Tetramisole hydrochloride]** (Sigma L9756, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) olmuştur (Şekil-9). Uygun doz (yaşamsal fonksiyonları etkilemeyecek yüksek doz) için ön çalışma yapılmıştır. Bu doz 25 mg/kg/gün intraperitoneal (ip) şeklinde uygulanması planlanmıştır. Levamizol, 10 mg/ml olacak şekilde %0,9 NaCl (Biosel İlac San. Ve Tic. A.S. , Beykoz, İstanbul) ile sulandırılmıştır. Her bir fareye tartısına göre doz ayarlanması yapılmış ve insülin enjektörleri ile ip olarak günlük tedavi uygulanmıştır. Her ilaç üç günde bir yeniden hazırlanmış ve bu hazırlanan miktar 4°C derecede muhafaza edilmiştir.

Sodium phosphonoformate tribasic hexahydrate (Foscarnet) (Sigma-P6801, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) çalışmada kullanılan diğer bir kimyasaldır (Şekil-9). Fare dozları 150 mg/kg/gün olup ip olarak uygulanmıştır. Foscarnet, 60 mg/ml olacak şekilde %0,9 NaCl (Biosel İlac San. ve Tic. A.S., Beykoz, İstanbul) ile sulandırılmıştır. Her bir fareye tartısına

göre doz ayarlanması yapılmış ve insülin enjektörü aracılığıyla ünite hacimlerinde ip olarak günlük verilmiştir Her ilaç üç günde bir yeniden hazırlanmış ve bu hazırlanan miktar oda ısısında muhafaza edilmiştir.

İlaçların hazırlanmasında 0,0001 gr hassasiyette **hassas terazi** (Radwag AS 220 Analitik Terazi Hassasiyet, Radom, Polonya) kullanılmıştır (Şekil-9). Kan alma anestezi işlemleri Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndaki cerrahi malzemeler kullanılarak yapılmıştır. **Mikrotomografi** işlemleri Bruker Skyscan 1172 (Skyscan Ltd, Kontich, Belçika) marka ve model mikrotomografi cihazı ile Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (SUNUM) gerçekleştirilmiştir.



Şekil-9: Çalışmada kullanılan ilaçlar ve hassas terazi.

II. Yöntem

Çalışma başlangıcında her bir grupta 7 fare olacak şekilde 3 grup oluşturulmuştur (Şekil-10).

- 1. grup:** kontrol grubu (serum fizyolojik, ip olarak uygulandı) (7 fare).
- 2. grup:** foscarnet grubu (0,15 gr/kg foscarnet ip olarak uygulandı) (7 fare).
- 3. grup:** levamizol grubu (25 mg/kg levamizol ip olarak uygulandı) (7 fare).



Şekil-10: Fare gruplarından genel bir görüntü.

İlaç dozları farelere her sabah saat 10:00'da ip yoldan uygulandı. Farelere toplam 21 gün tedavi uygulandı. Tedavi başlangıcında ve haftalık tartıları ölçüldü ve kaydedildi. Tedavinin 22. gününde, 8 saatlik açlık sonrası "İzofloran" anestezisi altında 2 ml'lik enjektör ile intrakardiyak ponksiyon uygulandı. Farelerden yaklaşık 500-800 mikrolitre kan örneği alındı ve servikal dislokasyon ile terminasyonları gerçekleştirildi (Şekil-11). Sakrifiye edilen farelerin sağ tibiaları çıkartıldı ve daha sonra mikrotomografi işlemi için uygun hazırlıkları yapıldı.

II.A. Biyokimyasal Analizler

Alınan kan örneklerinden serum kalsiyum, fosfor düzeyleri spektrofotometrik end-point yöntemiyle, serum ALP düzeyleri spektrofotometrik kinetik yöntemiyle Uludağ Üniversitesi Merkez Laboratuvarında tam otomatik biyokimya analizatörlerde çalışılmıştır.



Şekil-11: İnhalasyon anestezi cihazı, anestezi dönemi ve intrakardiyak ponksiyon işlemi.

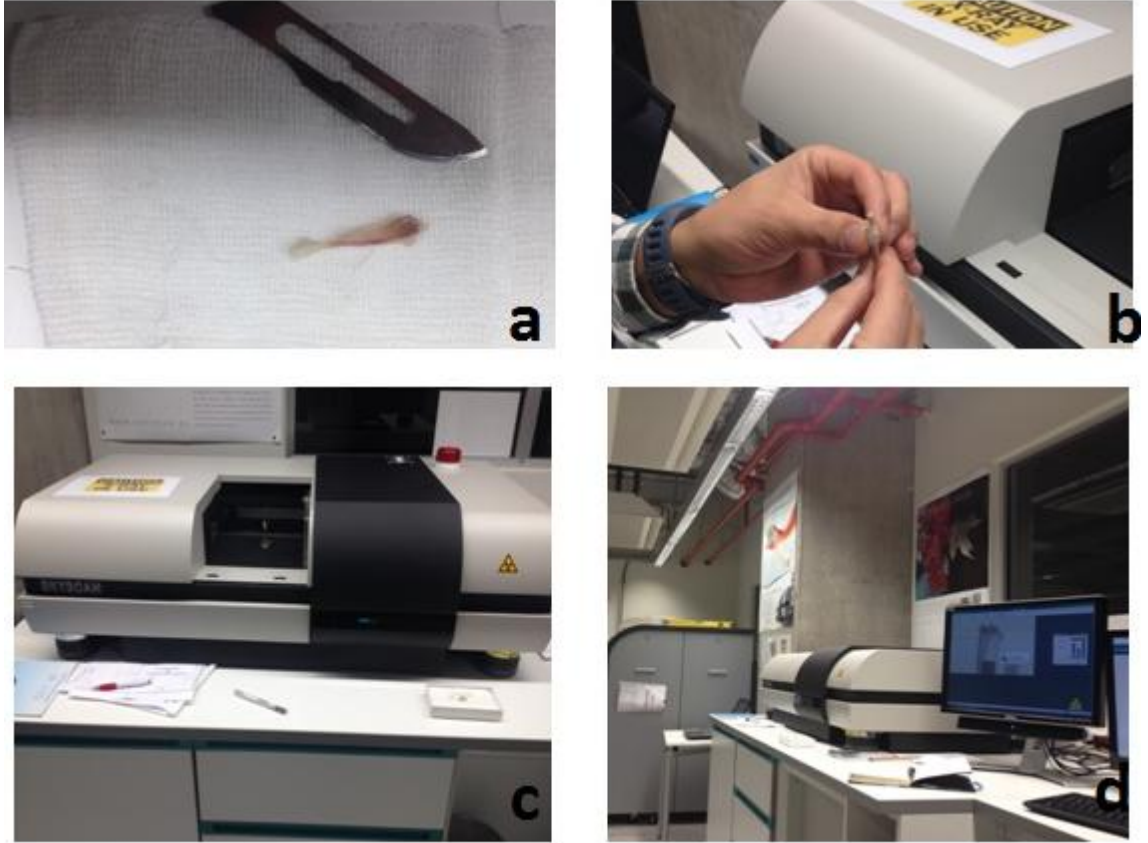
II.B. Mikrotomografi İçin Ön Hazırlıklar

Alınan tibialar deri, yumuşak doku ve kas tabakaları temizlenerek serum fizyolojik ile ıslatılmış gazlı bezlere sarılarak, Eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir. Numaralandırılan örnekler Mikrotomografi işlemine kadar -20°C derecede muhafaza edilmiştir.

II.C. Mikrotomografi ile Tarama ve Analiz Yöntemi

Çalışmada Bruker Skyscan 1172 marka ve model mikrotomografi kullanılmıştır. Görüntüler 4000x2672 piksel boyutundaki projeksiyonlardan 2.98 µm çözünürlükte elde edilmiştir. Numunelerin görüntü alanının dışına çıkmamaları için numunelerin uzun eksenleri, kendi ekseninde 180° döndürülen numune tutucunun uzun eksenleri ile mümkün olduğunca çakıştırılmıştır. Görüntüler 11 MP dijital dedektörden 8,75 µm fiziksel piksel boyutu ile elde edilmiştir. Cihaz, 86 kV, 116 µA enerji ayarlarıyla çalıştırılmış ve cihaza 0,5 mm alüminyum filtre yerleştirilmiştir. Filtre ışın sertleşmesi denilen etkiyi azaltmak adına yüksek enerjili fotonları kullanıp, düşük enerjili olanları filtrelemek için kullanılmaktadır. Halka yapaylığı denilen sorunu bertaraf etmek ve sinyal/gürültü oranını artırmak adına çekimden önce hizalama prosedürü ve yassı alan detektör kalibrasyonu yapılmıştır. 180° döndürülen numunelerden her 1° de 2000 ms poz süresi ile x-ışını projeksiyon görüntüsü alınmıştır. Her bir örnek için görüntüleme süresi 40-50 dakika olmuştur. TMD ve BMD için 0.25 ve 0.75 gr/cm³ hidroksiapatit

yoğunluğuna sahip fantom kullanılmıştır. Elde edilen projeksiyon görüntüleri NRecon isimli bir yazılımla yeniden oluşturulmuş ve kesitler elde edilmiştir. Kesit görüntüleri optimize etme adına "hizalama sonrası algortiması", "Kernel Gaussian (2 px) yumuşatma filtresi", "halka yapaylığı düzeltme algortiması", "ışın sertleşmesi düzeltme algortiması" kullanılmıştır. Hidroksiapatit fantomlar kullanılarak kalibrasyon yapılmış ve "Bone mineral density" (BMD) ve "Tissue mineral density" (TMD) ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil-12).

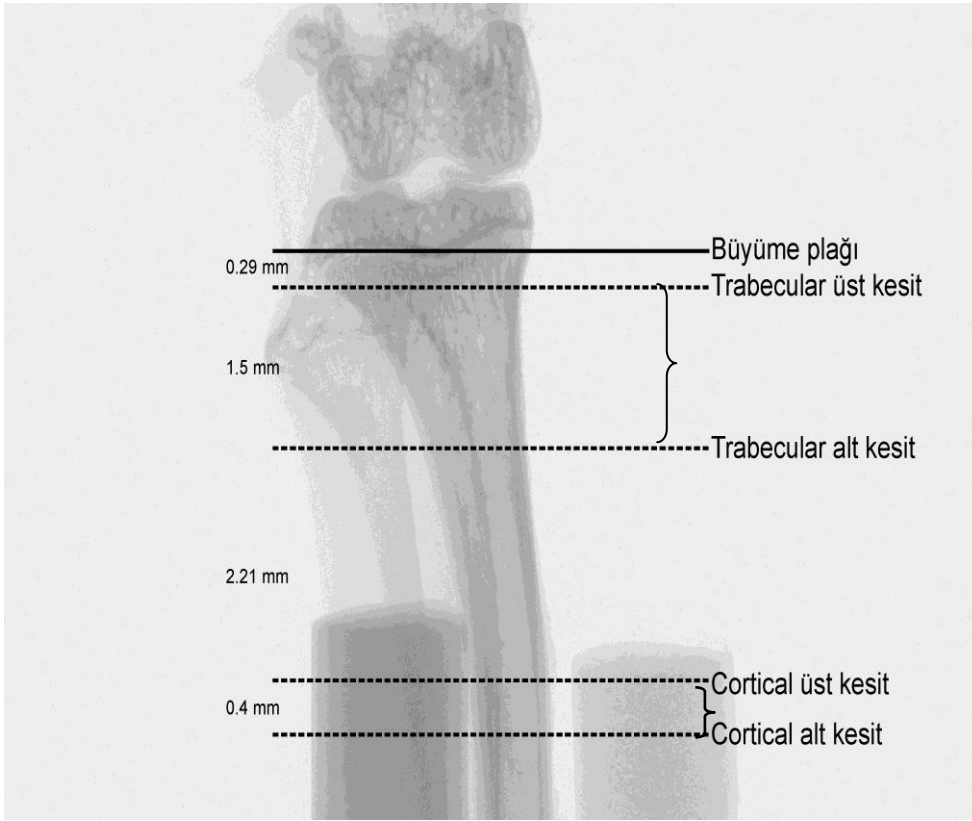


Şekil-12: Mikrotomografi için hazırlanan kemik (tibia) (a), kemik örneklerinin tutturucuya eklenmesi (b), cihaz içerisine yerleştirilmiş kemik ve tutturucu (c) ve mikrotomografi cihazından görüntü (d).

II.Ç. Mikrotomografi İncelemelerin Yapılacağı Alanların Bulunması

Tibia örneklerinden elde edilen görüntülerin veri analizleri her kemiğin benzeri alanlarından yapılması gerekir. Görüntü analizleri için doğru alanların bulunması için büyüme plağının distal ucu "başlangıç noktası" olarak belirlenmiştir. Görüntü kesitlerinde büyüme plağının bittiği son kesitten

başlanarak distale 97 görüntü kesiti (0,29 mm) inilerek incelenecek trabeküler alanın proksimal ucu bulunmuştur. Bu noktadan distale 503 görüntü kesiti (1,5 mm) daha inilerek trabeküler alanın distal ucu bulunmuştur. Bu iki uç arasındaki alandan trabeküler morfometri ve mineral yoğunluğu analizleri yapılmıştır (Şekil-13). Kortikal kemik analizleri için kemiğin diyafizi seçilmiştir. Her kemikte aynı kortikal alanların analizi için trabeküler alt kesitten 764 kesit (2,21 mm) daha inilerek kortikal alanın üst kesidine ulaşılmış bu noktadan aşağıya 308 kesitlik alan (0,4 mm) kortikal analizler için kullanılmıştır (Şekil-13).



Şekil-13: Mikrotomografi ile kortikal ve trabeküler analizlerin yapıldığı alanlar.

II.D. İstatistiksel Metot

Verilerin istatistiksel analizi SPSS16.0 (SPPS Inc. California, IL, USA) istatistik paket programında yapılmıştır. Veriler ortalama±standart sapma şeklinde belirtildi. Her bir gruptaki değişkenlerin normallik testleri Kolmogorov Smirnov testleri ile yapıldı. Verilerin dağılımının normal dağılıma uygun olduğu görüldü. Üç gruptaki verilerin ortalamalarının karşılaştırılması için “Tek

yönlü ANOVA” kullanıldı. ANOVA testinde anlamlık saptanan gruplarda “TUKEY HSD post hoc” analizleri yapıldı. Anlamlılık düzeyi $p=0,05$ olarak kabul edilmiştir.

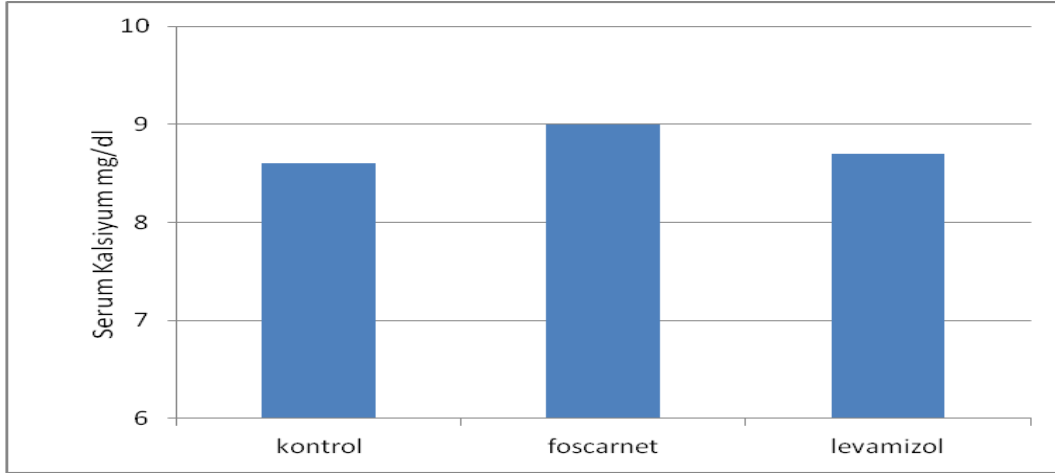
BULGULAR

Bu çalışmada levamizol ve fosfonofornik asidin serum ALP, kalsiyum, fosfor düzeylerine etkisi ve kemik mikroyapısı ve mineral yoğunluğunda meydana getirebilecekleri değişiklikler incelenmiştir.

I. Biyokimyasal Sonuçlar

I.A. Serum Kalsiyum Düzeyleri

Ortalama kalsiyum değeri foscarnet grubunda $9\pm 0,39$ mg/dl, kontrol grubunda $8,6\pm 0,22$ mg/dl ve levamizol grubunun $8,70\pm 0,43$ mg/dl olarak bulundu (Şekil-14). Her ne kadar kalsiyum değerleri foscarnet grubunda daha yüksek bulunsa da aradaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde değildi ($p>0,05$) (Tablo-1).

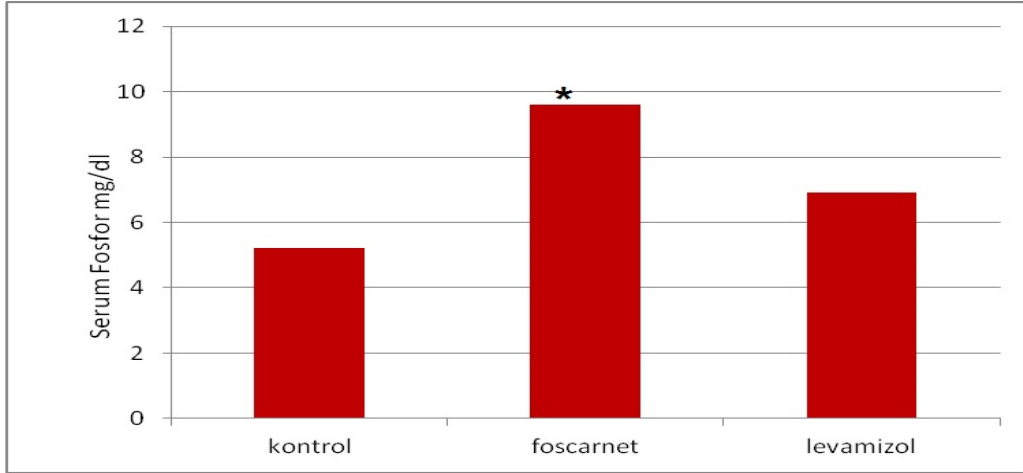


Şekil-14: Grupların ortalama serum kalsiyum değerleri.

I.B. Serum Fosfor Düzeyleri

Ortalama fosfor değerleri foscarnet grubunda $9,6\pm 3,1$ mg/dl, kontrol grubunda $5,2\pm 1,2$ mg/dl, levamizol grubunda ise ortalama fosfor değeri $6,9\pm 2,4$ mg/dl saptanmıştır. Foscarnet grubunun fosfor değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p=0,009$). Levamizol grubunun ortalama fosfor değeri kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim

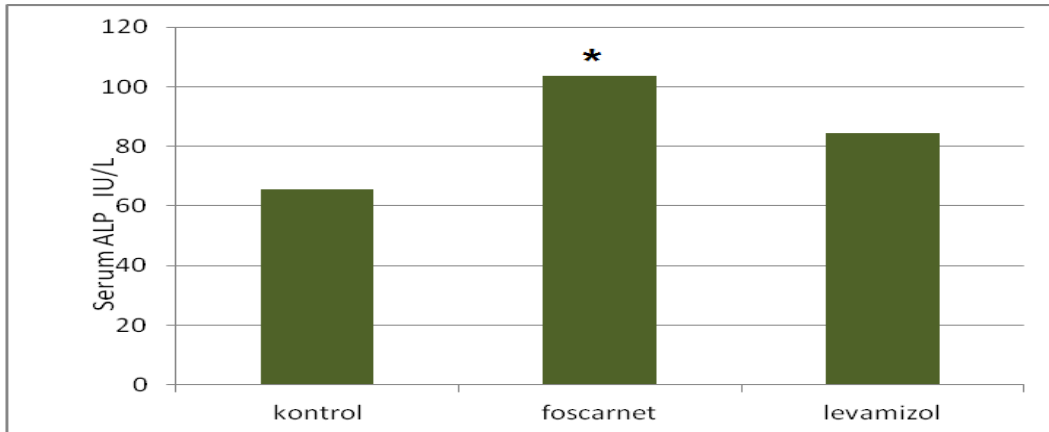
göstermemiştir ($p=0,415$). Ayrıca foscarnet ve levamizol grupları arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil-15) (Tablo-1).



Şekil-15: Grupların ortalama fosfor düzeyleri (*: kontrol grubu ile farklılığı $p=0,009$).

I.C. Serum ALP Düzeyleri

Foscarnet grubunun serum ALP ortalama değeri $103,85 \pm 17,4$ IU/L kontrol grubunda $65,42 \pm 5,5$ IU/L ve Levamizol grubunda ise $84,5 \pm 25,3$ IU/L olarak saptandı. Foscarnet grubunun ortalama ALP değeri, kontrol grubunun ortalama ALP değerinden anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü ($p=0,003$). Levamizol grubundaki artış anlamlı bulunmadı ($p=0,155$) (Şekil-16) (Tablo-1).



Şekil-16: Grupların ortalama ALP düzeyleri (* : kontrol grubu ile farklılığı $p=0,003$).

Tablo-1: Grupların ortalama biyokimyasal sonuçları (* : kontrol grubu ile farklılığı <p:0,05), (standart sapma).

	Kalsiyum	Fosfor	ALP
Kontrol	8,6 (0,22)	5,2 (1,2)	65,42 (5,5)
Foscarnet	9 (0,39)	9,6 (3,1)*	103,85 (17,4)*
Levamisol	8,7 (0,43)	6,9 (2,4)	84,5 (25,3)

II. Direkt Grafiler

Deney hayvanların tedavi bitiminde, kan örnekleri alınımının hemen akabinde direkt X-ray grafileri çekilmiştir. Bu görüntülerde makroskopik bir mineralizasyon defekti gözlenmemiştir (Şekil-17).

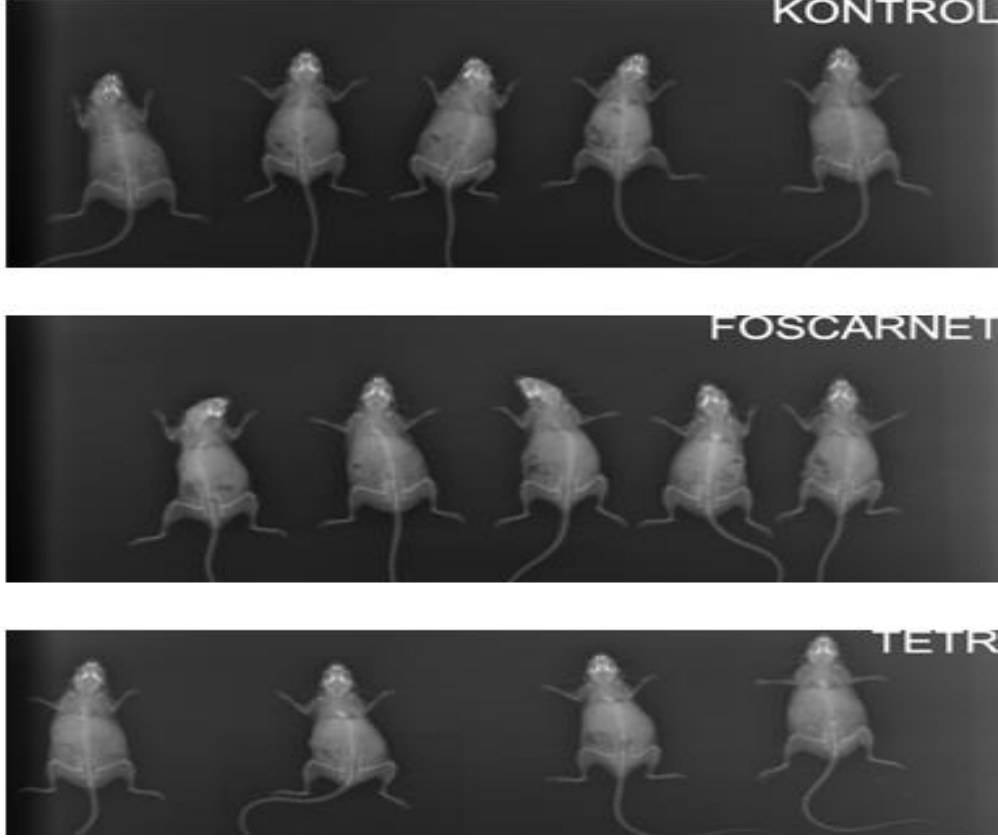
III. Mikrotomografi Analiz Sonuçları

Mikrotomografi ile elde edilen görüntülerin yapılandırılması ve analizleri Niğde Üniversitesi Jeoloji Mühendisliği Bölümü'nden Doç Dr.Orkun Ersoy'un desteği ile yüksek kapasiteli bilgisayarda görüntü rekonstrüksiyonu NRecon (version 1,6; Skyscan) ve ileri analizler CTAn (version 1.11; Bruker-microCT) yazılım paketi kullanılarak yapıldı. Onsekiz adet tibianın taranması, yapılandırılması sürecinde yaklaşık 150 GB veri elde edildi.

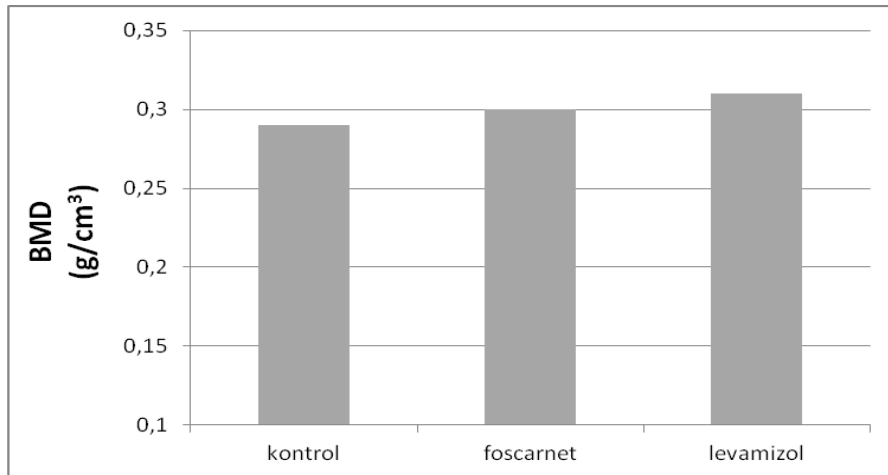
III.A. Trabeküler Parametrelerin analiz sonuçları

Trabeküler parametreler (*“percent bone volume”, Trabecular pattern factor, Structure model index, Trabecular thickness, Trabecular number, Trabecular separation, Tissue volume(TV), Bone volume (BV), Bone surface, Bone surface / volume ratio, Bone surface density*) ve trabeküler kemik mineral yoğunluğu (BMD) olmak üzere toplam 12 parametre değerlendirildi. Bu değerlendirmelerde uygulanan tedavi sonrası kemik trabeküler

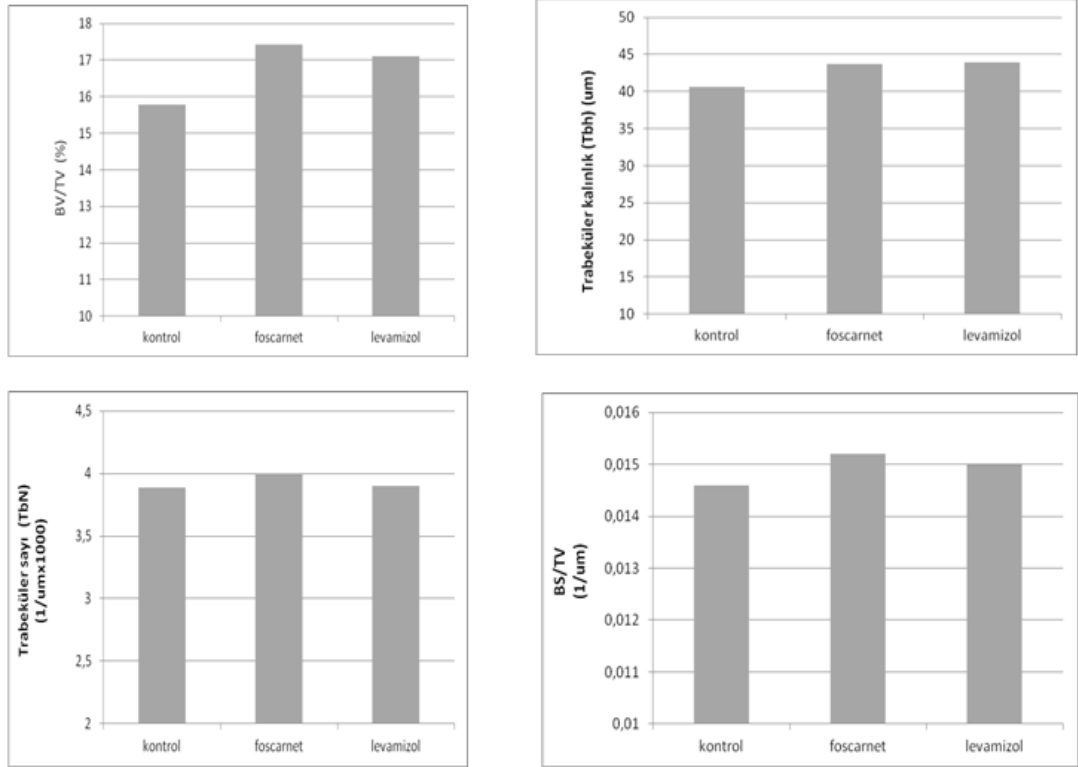
morfometresinde ve kemik mineral dansitesinde anlamlı bir değişiklik bulunmadı. Aşağıda elde edilen bazı trabeküler parametrelerin (Şekil-19) ve BMD (Şekil-18) sonuçların grafiksel gösterimi vardır.



Şekil-17: Farelerin direkt grafileri.



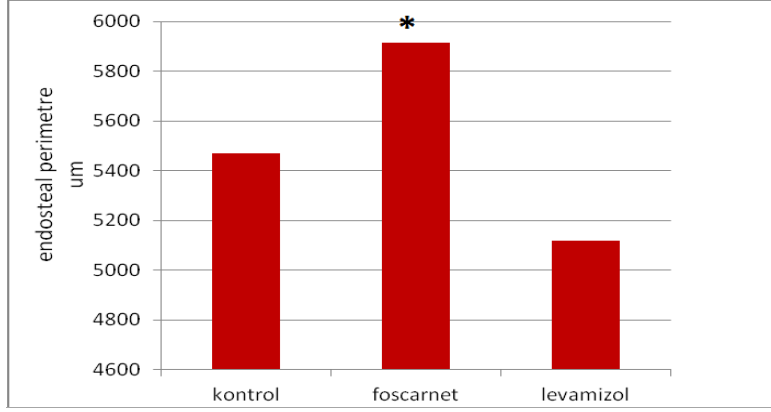
Şekil 18: Trabeküler alan kemik mineral yoğunluğu.



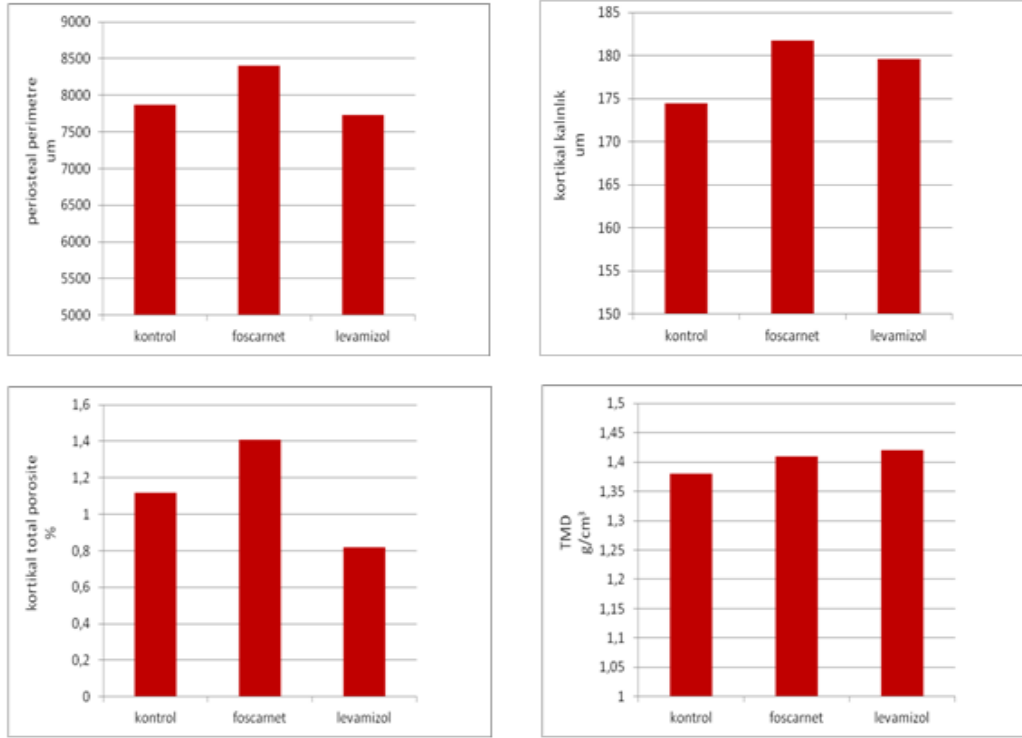
Şekil-19: Trabeküler parametrelerinde BV/TV, Trabeküler kalınlık, Trabeküler sayı ve BS/TV oranları.

III.B. Kortikal Parametrelerin Analiz Sonuçları

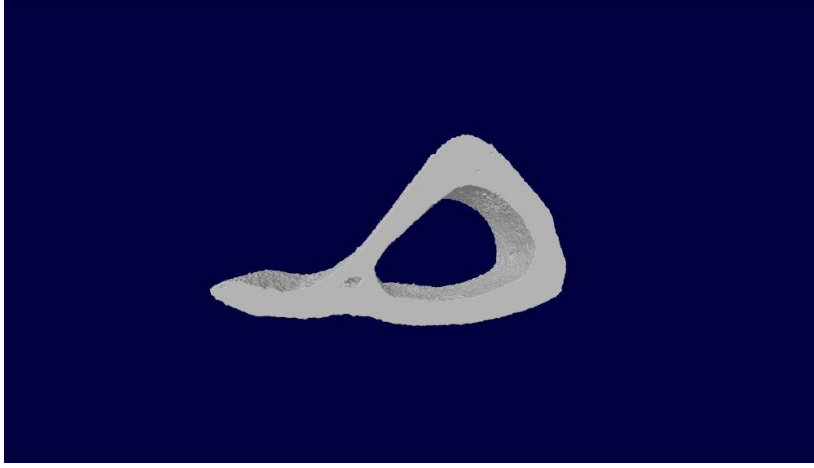
Kortikal kemik morfometrik parametreleri olarak “*Cortical Thickness (3D)*, *Cortical endosteal perimeter*, *Cortical crosssectional area*, *Cortical periosteal perimeter*, *Cross sectional thickness*, *Total porosity*” ve kortikal doku mineral yoğunluğu (TMD) olmak üzere toplam 7 parametre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerde uygulanan tedaviler sonrası kemik kortikal yapılarında değişiklik gözlenmiştir. Bu değişimlerden sadece foscarnet grubunda endosteal perimeter uzunluğunda anlamlı bir artış saptanmıştır ($p=0,002$). Diğer parametrelerde gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı (Şekil-20) (Şekil-21). Aşağıda elde edilen gruplara ait bazı kemiklerin 3D örnek görüntüleri yer almaktadır (Şekil-22).



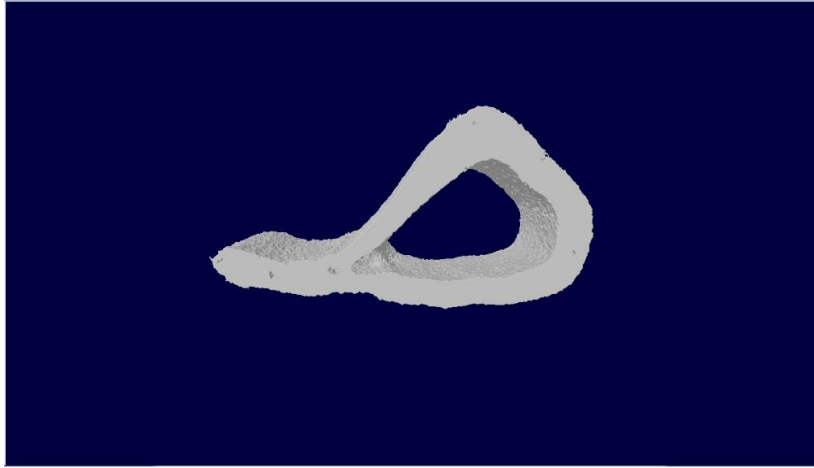
Şekil-20: Gruplardan elde edilen ortalama “Endosteal perimetre” uzunlukları (* : kontrol grubu ile farklılığı p=0,002).



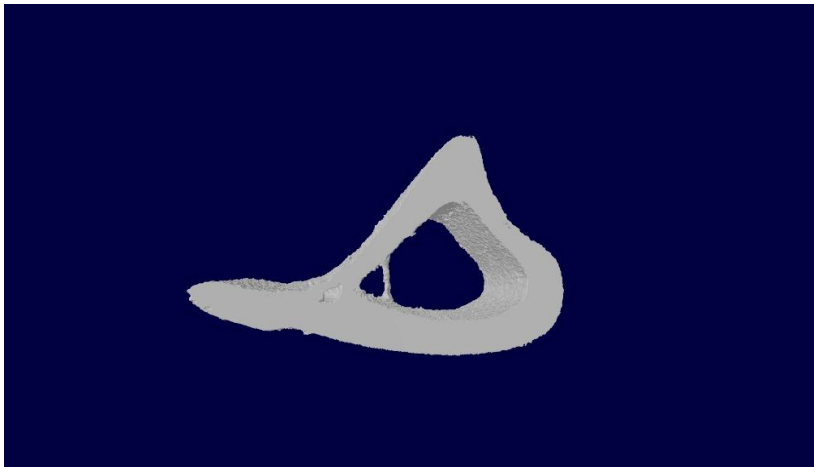
Şekil-21: Gruplardan elde edilen periosteal perimetre uzunlukları, kortikal kalınlık, kortikal total porosite ve kortikal kemik yoğunluğu (TMD) ortalamaları gösterilmiştir.



Şekil-22: Kontrol grubuna ait kortikal kemik 3D görüntüsü.



Şekil-23: Fosarnet grubuna ait kortikal kemik 3D görüntü.



Şekil-24: Levamisol grubuna ait kortikal 3D görüntü.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik birden çok faktörün (enzimler, sitokinler, interlökinler, hücreler, proteinler, hormonlar) uyumlu bir şekilde çalıştığı kompleks bir mineralizasyon sürecini içerir. Bu süreç uzun yıllardır ilgi çekmekte ve popüler bir araştırma konusudur. Günümüz kemik hastalıklarının araştırılmasında özellikle hücre kültürleri yaygın kullanılmaktadır (99). Bununla birlikte invitro çalışmaları her zaman invivo etkileri birebir yansıtamayacağı için transgenetik ya da knock out fare modelleri oluşturulmuştur (100,101). Herhangi bir hastalık modeli ya da istenilen değişikliğin (fonksiyon kazandıran ya da kaybettiren) oluşturulduğu bu fare modellerinde, araştırılmak istenilen hastalık ya da değişikliğin fizyopatolojisi, histopatolojisi ve mekanizmaları daha ayrıntılı ortaya konabilmektedir (102).

Bu çalışmada levamizol ve foscarnetin kemik mikromimarisine ve kemik mineral yoğunluğuna etkilerini incelemeyi hedefledik. Bu çalışma bu iki maddenin uzun dönemli invivo etkilerini mikrotomografi ile ortaya koyan ilk çalışmadır.

Levamizol bir TNSALP inhibitörü olarak hücre kültür modellerinde kullanılagelmiş olup, halen mineralizasyon sürecinin araştırıldığı kültür çalışmalarda bir TNSALP inhibitörü olarak yaygın kullanılmaktadır (51,64,72,82). Mineralizasyon sürecinin gerçekleşebilmesi için organik bir matriks oluşturulması ve daha sonra mineral hammaddelerin çökmesinin sağlanması gerekmektedir. Ancak bu organik matiksin mineralizasyonu ortamda bulunan Pi, Ca miktarına ve daha önemlisi PPI konsantrasyonuna bağlıdır (36). Birçok kültür çalışması ve hipofosfatazya modellerinde PPI'nin mineralizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (64,73). Bu PPI bileşimini hidroliz eden ve ortaya Pi açığa çıkaran pirofosfataz, TNSALP'dir. TNSALP özetle ortamda mineralizasyonu inhibe eden PPI'yi azaltarak ve mineralizasyona Pi sağlayarak bu süreci kolaylaştırır (103). Adisson ve ark çalışmasında PPI'nin büyüyen HA kristallerine direkt bağlanarak, osteopontin ekspresyonunu artırarak ve ayrıca TNALP'yi inhibe ederek etki ettiğini belirtmiştir (64).

Bununla birlikte birçok kültür çalışmasında B-GP aracılıklı mineralizasyon levamizol ile bloke edilmiştir. Levamizol bu etkisini TNSALP'yi doza bağımlı, substrattan bağımsız, geri-dönüşümlü olarak ve nonkompetitif inhibe ederek göstermektedir (81). Levamizolün mineralizasyon üzerine etkilerini inceleyen hücre kültür çalışmaları çok sayıda olsa da in vivo çalışmalar sınırlıdır (77). Bunun önemli bir nedeni invitro benzeri etki görmek için invivo toksik dozda levamizole ihtiyaç olabileceği olabilir (77).

Levamizolü 25 mg/kg/gün ip olarak uyguladığımız erişkin farelerde kontrol gruplarına göre tartılarında herhangi bir farklılık saptamadık. Farelerin bu ilaç dozunu iyi tolere ettiğini gördük. Farelerin serum ALP düzeylerinin baskılanmadığı hatta anlamlı olmamakla birlikte bir miktar arttığını saptadık. Bununla birlikte serum fosfor düzeyinin kontrol grubuna göre azalmadığını, hatta anlamlı olmasa da bir miktar arttığı görüldü. Serum kalsiyum değerlerinde ise kontrol grubuna göre belirgin bir değişiklik saptamadık. Garba ve ark. levamizolün 1,25(OH)₂D₃ aracılıklı mineralizasyona etkisini inceledikleri invivo çalışmada subkutan olarak uyguladıkları düşük doz (40mg/kg) ve yüksek doz (80 mg/kg) tedavi alan gruplarda tartı ve büyümede farklılık bulmamışlardır. Ancak düşük doz levamizolün serum ALP düzeyini %18,4 ve yüksek doz levamizolün %61,3 oranında azalttığını saptamışlar. Kalsiyum değerlerinin değişmediği ancak fosfor değerlerinde sırayla %14,5 ve %22,8 azaldığını saptamışlardır (77). Burada elde edilen veriler ile bizim çalışmamızdaki sonuçlar çelişmektedir. Kalsiyum her iki çalışmada da değişmemiştir. Ancak ALP ve fosforda anlamlı olmasa da bir artış olması dikkat çekicidir. Garba, çalışmasında 28 günlük büyümesi devam eden bir grup seçmiştir. Bizim çalışmamızda ise 3 aylık erişkin fare grubu kullanılmıştır. Belki de levamizolün büyümekte olan fare grubuna etkisi farklı olabilir.

Çalışmamızda tedavi sonrası levamizol ve kontrol gruplarının sağ tibia proksimalleri kortikal ve trabeküler analizler için mikrotomografi ile taranmış ve incelenmiştir. Bu incelemeden elde edilen sonuçlarda levamizolün kullandığımız dozda, 21 gün süre ile, uygulanması erişkin fare kemik

morfometresin de herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. Ayrıca kortikal porosite, TMD ve BMD değerlerinde de anlamlı bir değişim olmamıştır.

Gerek laboratuvar sonuçları gerekse mikrotomografi incelemeleri levamizolün 25 mg/kg/gün ip dozda kemik üzerinde herhangi bir anlamlı etkisinin olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte levamizol için LD₅₀ dozu farelerde intravenöz 18 mg/kg ve intraperitoneal dozu 34 mg/kg dır (104). Bu dozlara yakın dozlarla yaptığımız ön çalışmada 40 mg/kg ip dozda enjeksiyondan hemen sonra fare grubunda ölümler gördük ve bu nedenle çalışmada kullanılacak levamizol dozunu “güvenli” olarak ifade edebileceğimiz 25 mg/kg/gün olarak karar verdik. Bu nedenle levamizolün kültür ortamlarında görülen etkilerine benzer etkiler ve mineralizasyona etki yaratabilecek daha yüksek dozların fareler için letal olabileceğini düşünmekteyiz.

Foscarnet bir PPI analogu olup yapısal olarak bifosfonatlara benzerdir. Bir nonselektif NaPi kotransporter blokeridir. Herpes virüs, CMV ve HIV gibi viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (87). Yapısal olarak bifosfonatlara benzerliği kemik üzerine etkilerinin de incelenmesine neden olmuştur. Bu nedenle foscarnet de PPI ve bifosfonatların mineralizasyona inhibe edici etkisine benzer etkiler göstermesi beklenebilir (89). Swenson ve ark genç ve erişkin kedi gruplarına yüksek doz (1000 mg/kg/gün) foscarnet uyguladıkları çalışmalarında, kemiklerde rikets benzeri histomorfometrik değişikler görmüşler ve yeni mineralizasyon alanların gelişmediğini saptamışlar ve aktif mineralizasyonun tamamen durduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca osteoklast sayısında da artış saptamışlar ancak osteoklast aktivitesini ölçmemişlerdir. Serum değişikliklerinde ise tedavi gruplarında kalsiyum yükseldiği, fosfor ve ALP değerlerinin azaldığı bulunmuştur (89). Çalışmamızda 3 aylık fare grubuna 150 mg/kg/gün ip olarak 21 gün tedavi sonrasında farelerin direkt grafi incelemelerinde makroskopik bir değişiklik saptanmadı. Serum değerlerinde foscarnet grubunda ortalama fosfor değeri %45, TNSALP ise %58 oranında anlamlı artışlar oldu. Kalsiyum değerlerinde ise artış gözlenmiş ancak istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır. Bu sonuçlar bahsi geçen çalışma sonuçları ile çelişmektedir (89). Ayrıca çalışmamızda

tibia kemikleri mikrotomografi ile incelenmiştir. Bu incelemelerde trabeküler kemik parametreleri kontrol grubu ile kıyaslandığında herhangi bir anlamlı farklılık saptanmadı. Genelde osteoporoz çalışmalarında kemikte meydana gelen değişiklikler trabeküler bölgede daha belirgin olmaktadır (105,106). Mineralizasyonun inhibisyonuna neden olan bir ajana yanıt olarak trabeküler yapılarda beklediğimiz değişiklikler, bizim çalışmamızda gözlenmemiştir. Trabeküler alandaki kemik mineral yoğunluğunu ifade eden BMD değerinde de bir değişiklik saptanmadı. Ancak çalışmamızda histomorfometrik incelemeler yapılmadığı ve osteoklast fonksiyonları değerlendirilmediği için buradaki histolojik değişiklikleri söyleyemiyoruz. Bununla birlikte trabeküler mikroyapıya etki edebilecek önemli bir değişiklik gerçekleşmediğini söyleyebiliriz. Kortikal parametreler değerlendirildiğinde sadece “endosteal perimetrede” anlamlı bir artış saptadık. “Periostal perimetre” ve “kortikal kalınlıklarda” artış olmakla birlikte bunlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu değerler dışında kortikal porositelerde değerlendirildi ve anlamlı bir değişim gözlenmedi. Ayrıca kortikal mineral yoğunluğu kontrol grubu ile benzer bulundu. Çalışmamızda foscarnet tedavisi farelerde serum TNSALP ve fosfor değerleri ile endosteal perimetrede anlamlı bir artış oluşturmuştur.

Pi mineralizasyon için önemli bir mineraldir (91). Gerek matriks veziküllerine gerekse osteoblast içerisine Pi alımı NaPi kanalları ile olmaktadır (91,92). Yoshiko ve ark.'nın çalışmasında osteodin mineralizasyonunda osteoblast aracılıklı NaPi transportunun önemli bir süreç olduğunu ifade etmektedir (39). Olgun osteoblast yüzeyinde Pit1 ve Pit2 olduğunu diğer NaPi kanallarının saptanmadığını belirtmiştir. Bu çalışma osteoblast subkültürlerine (profilasyonunu tamamlanmış olgun osteoblastlardan oluşan kültür ortamı) foscarnet eklenmiş ve mineralizasyonun baskılandığı ve NaPi transportunun azaldığı görülmüştür. Ayrıca OPN mRNA ekspresyonu azalmış ancak ALP mRNA seviyeleri değişmemiştir. Bununla birlikte ortama artan konsantrasyonlar Pi eklenmesi OPN ve mineralizasyonda artış sağlamıştır. Ayrıca artan Pi konsantrasyonu hücre canlılığında azalmaya neden olmuş ve ortama foscarnet eklenmesi bu bozulmaların gelişimini engellemiştir. Bu kültür ortamı çalışmaları osteoblastın, matriks mineralizasyonunu yine osteoblast

ilişkili NaPi transportu aracılığı ile kontrol ettiğini göstermektedir (39). Yine aynı çalışmada sistemik etki yapmadığı belirlenmiş foscarnet dozu, yenidoğan fare kalvaryalarına enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyon yerlerinde mineralizasyon defektleri geliştiği ve osteoid dokunun arttığı görülmüştür (39). Bu bölgeden yapılan histolojik incelemelerde osteoblast sayısı ve kemik kalınlığında değişiklik olmaması NaPi'nin osteoblastın mineralizasyonunda esansiyel bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu çalışmadan foscarnetin mineralizasyonu azaltırken osteoblastın osteoid doku üretimini ve kemik kalınlığını etkilemediği, çok yüksek dozlar kullanılmadığı sürece osteoblastlar üzerine toksik etki yapmayabileceği söylenebilir.

NaPi ile ALP ilişkisine baktığımızda yine Yoshiko'nun aynı çalışmasında Pit1 antisense (AS) oligonükleotidler (*anti sense oligonükleotid*) kullanılarak Pit1 knock-down gerçekleştirilmiştir (39). Böylece OPN ekspresyonu azaldığı ancak ALP ekspresyonunun değişmediği görülmüştür. Foscarnet uygulanmış kültür ortamında ilk önce STC1 (stanniocalcin1) mRNA upregülasyonu daha sonra ALP ve daha sonrada Pit1 ve Pit2 mRNA ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir. Ayrıca ortama Pi kaynağı (B-GP) eklendiği zaman STC1 downregüle olduğu görülmüştür. Yine ortama STC1 eklendiğinde NaPi transportu ve mineralizasyon artmıştır. STC1 bloke edildiğinde ise Pit1 ekspresyonu azalmıştır. Tüm bu bulgular, STC1'in Pit1 ve ALP ekspresyonlarını kontrol ettiğini ve bu kontrolü, hücre içinde yer alan Pi konsantrasyonuna göre yaptığını öne sürmektedir (39). Başka bir çalışma kültür ortamında Pi azalmasının Pit1 ekspresyonunu artırdığını ancak ALP gen ekspresyonunda azalma olmadığını göstermektedir (50).

Bu çalışmalarla birlikte NaPi kanallarının overaktif fonksiyonlarının etkilerinin incelendiği Suzuki ve ark.'ın çalışmasında Pit1 overekspresyonu olan fare modeli (Tg-Pit1) geliştirilmiştir (107). Dört aylık Tg-Pit1 fare modelinde WT (wild type) grubu ile karşılaştırıldığında serum fosforunun arttığı, kalsiyumun azaldığı ve PTH'nin arttığı görülmüştür. Kültür çalışmalarında ise NaPi transportunun yaklaşık üç kat arttığı, ALP aktivitesinin ise belirgin azaldığını saptanmıştır. Serum fosforun artışını bir miktar Pi renal reabsorpsiyondaki artışa bağlamışlardır. Belirgin kemik deformiteleri

olmamakla birlikte hiperfosfatemiye rağmen bir miktar BMC (kemik mineral içeriğinin) azaldığı görülmüştür. Ayrıca çalışmacılar Pi transportunda artmanın hücre canlılığında ve mineralizasyonda belirgin değişiklikler yapmamasını hücre içi Pi yüklenmesini önleyen kompensatuvar mekanizmaların varlığıyla açıklamışlardır (107). Suzuki ve ark.'nın Tg-Pit1 fare modeli çalışması ve Yoshiko'nun yukarda özetlenen çalışmaları NaPi kotransporterlerinin etkilerini ortaya koyan ve birbirlerinin sonuçlarını destekleyen iki zıt çalışmadır. Bu iki çalışmanın verilerinden yola çıkarak foscarnet uygulanması sonucu Pit1 bloke edilmesi ve bununla osteoblast içi Pi'yi azaltmasını ve bu durumun da ALP gen ekspresyonunu ve Pit1 ekspresyonlarını artırması beklenebilir (39,107). Hücre içi Pi azalması aynı şekilde (NaPi aracılıklı) matriks vezikülleri içinde de Pi konsantrasyonunda azalma yaratacağından mineralizasyonun azalması beklenebilir. Mineralizasyon sürecinde önemli miktarda fosfor dolaşımdan osteoide yer değiştirir (49). Bu değişimdeki aksama serum fosforunda artışa neden olabilir. Nitekim çalışmamızda da serum fosforu artmıştır. Bahsettiğimiz upregülasyon yolağına göre hücre içi Pi konsantrasyonunun azalması ALP ekspresyonunu artıracaktır. Nitekim çalışmamızda da muhtemel bir ALP gen ekspresyon artışı serum ALP değerinde artışa neden olmuş olabilir.

Periosteal yüzeydeki osteogenezis, kemiğin enine büyüme, genişleme, şekillenme ve kırık iyileşmesinde önemli bir rolü vardır (1). Kemiğin modeling sürecinde periosteal yüzeyde kemik yapımı (kemik formasyonu) tipik olarak yıkımdan daha fazladır. Bu nedenle kemik yaşlandıkça enine büyüme devam edecektir. Endosteal yüzeyde ise yeniden şekillenme daha çok aktiftir. Bu yüzeyde kemik rezorpsiyonu daha fazladır. Bu süreç ilik mesafesinin kapanmasını engeller. Modeling, büyüme dönemi tamamlandıktan sonra oldukça düşük bir hızda devam edecektir. Çalışmamızda foscarnet tedavisinin endosteal çevrede artışa neden olduğunu gördük ayrıca periosteal çevrede de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir artış eşlik etmektedir. Histomorfometrik incelemeler yapmadığımız ve osteoklast aktiviteleri ölçmediğimiz için teorik olarak endosteal yüzeyde rezorpsiyonun artışı ya da kemik formasyonunda azalmanın gerçekleşmiş

olabileceği düşünölebilir. Ancak, trabeköler alanda belirgin değişiklik olmaması foscarnete bağlı etkilenmenin kortikal bölgelerde daha yoğun olduğunu düşünödürebilir. Bu değişikliği periosteal kemik çevresinde ve kortikal kalınlıkta hafif artış ile birlikte değerlendirdiğimizde kemik formasyonu üzerine etkisinin olabileceği söylenebilir. Foscarnet tedavisi ile kemikte oluşan bu değişiklikler dikkat çekicidir. Kemiklerin farklı yüzeylelerinden yapılacak statik ve dinamik histomorfometrik incelemeler NaPi kotransporterlerinin bloke edilemesinin etkilerini daha net ortaya çıkarabilir.

Sonuç olarak, çalışmamız bir TNSALP inhibitörü olan levamizolün toksik doza yakın uygulanmasının serum ALP, fosfor, kalsiyum ve kemik morfometresinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını gösteren ilk invivo çalışmadır. Ayrıca foscarnet tedavisinin, költür çalışmalarında elde edilen sonuçlar ile uyumlu olacak şekilde, serum TNSALP ve fosfor değerlerinde belirgin artışa ve ayrıca kortikal kemik parametrelerinde yapım lehine değişikliklere neden olduğu ilk defa gösterilmiştir. Foscarnet veya Pit1'e spesifik kanal blokeri olabilecek ajanların kemik üzerindeki invivo etkilerini inceleyen histomorfometrik incelemelere ihtiyaç vardır. Bu bileşiklerin etkilerinin invivo olarak incelenmesi kemik hastalıklarının tedavilerini iyileştirmede bize yol gösterici olabilir.

KAYNAKLAR

1. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:131–9.
2. Taichman RS. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005. 2631–9.
3. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, et al. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect* 1996;45:371–86.
4. Hunziker EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech* 1994;28:505–19.
5. Buck D, Dumanian G. Bone Biology and Physiology: Part II. Clinical Correlates. *Plast Reconstr Surg* 2012;129:950–56.
6. Roberts WE, Huja SS, Roberts JA. Bone modeling: Biomechanics, molecular mechanisms, and clinical perspectives. *Seminars in Orthodontics* 2004;10:123–61.
7. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med* 2013;19:179–92.
8. Ubara Y, Fushimi T, Tagami T, et al. Histomorphometric features of bone in patients with primary and secondary hypoparathyroidism. *Kidney Int* 2003;63:1809–16.
9. Ubara Y, Tagami T, Nakanishi S, et al. Significance of minimodeling in dialysis patients with adynamic bone disease. *Kidney Int* 2005;68:833–9.
10. Kobayashi S, Takahashi HE, Ito A, et al. Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone* 2003;32:163–9.
11. Takayanagi H. Osteoclast differentiation and activation. *Clin Calcium* 2007;17:484–92.
12. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* 2006;12:17–25.
13. Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, et al. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech* 2003;6:504–13.
14. Everts V, Korper W, Hoeben KA, et al. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res* 2006;21(9):1399–408.
15. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988;175(2):266–76.
16. Aubin JE, Triffitt JT. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. *Principles of bone biology* 2002;12:59-81.
17. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 2002;61:29–31.

18. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reum Port* 2007;32:103–10.
19. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocr Rev* 2013;34:658–90.
20. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011;26(2):229–38.
21. Sapir-Koren R, Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporos Int* 2014;26:685–700.
22. Divieti Pajevic P. Recent progress in osteocyte research. *Endocrinol Metab (Seoul, Korea)* 2013;28(4):255–61.
23. Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:17–25.
24. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *Bonekey Rep* 2014;3:1-5.
25. Berndt T, Kumar R. Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol* 2007;289:1170–82.
26. Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 2010;61:91–104.
27. Bergwitz C, Jüppner H. Phosphate Sensing. *Advances in Chronic Kidney Disease* 2011;18:132–44.
28. Jüppner H. Novel regulators of phosphate homeostasis and bone metabolism. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 2007;11:12-5
29. Virkki L V, Biber J, Murer H, Forster IC. Phosphate transporters: a tale of two solute carrier families. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(3):643–54.
30. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. Phosphate transporters of the SLC20 and SLC34 families. *Mol Aspects Med* 2013;34:386–95.
31. Tenenhouse HS, Martel J, Gauthier C, Segawa H, Miyamoto K. Differential effects of Npt2a gene ablation and X-linked Hyp mutation on renal expression of Npt2c. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(6):1271–8.
32. Prié D, Ureña Torres P, Friedlander G. Latest findings in phosphate homeostasis. *Kidney Int* 2009;75:882–9.
33. Segawa H, Kaneko I, Takahashi A, et al. Growth-related renal type II Na/Pi cotransporter. *J Biol Chem* 2002;277(22):19665–72.
34. Boskey AL. Mineralization of bones and teeth. *Elements* 2007;3(6):385–91.
35. Villa-Bellosta R, Sorribas V. Phosphonoformic acid prevents vascular smooth muscle cell calcification by inhibiting calcium-phosphate deposition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29(5):761–6.
36. Sapir-Koren R, Livshits G. Bone mineralization and regulation of phosphate homeostasis. *IBMS Bonekey* 2011;8(6):286–300.
37. Bergwitz C, Jüppner H. Disorders of phosphate homeostasis and tissue mineralisation. *Endocrine Development* 2009;6:133–56.
38. Quarles LD. Evidence for a bone-kidney axis regulating phosphate homeostasis 2003;112(5): 642-6.

39. Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol* 2007;27(12):4465–74.
40. Guo Y, Yuan Q. Fibroblast growth factor 23 and bone mineralisation. *Int J Oral Sci* 2015;7(1):8–13.
41. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res* 2008;23(6):939–48.
42. Sitara D, Razzaque MS, St-Arnaud R, et al. Genetic ablation of vitamin D activation pathway reverses biochemical and skeletal anomalies in Fgf-23-null animals. *Am J Pathol* 2006;169(6):2161–70.
43. Razzaque MS, Sitara D, Taguchi T, St-Arnaud R, Lanske B. Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. *FASEB J* 2006;20(6):720–2.
44. Yuan Q, Sato T, Densmore M, et al. FGF-23/Klotho signaling is not essential for the phosphaturic and anabolic functions of PTH. *J Bone Miner Res* 2011;26(9):2026–35.
45. Beck L, Karaplis AC, Amizuka N, et al. Targeted inactivation of Npt2 in mice leads to severe renal phosphate wasting, hypercalciuria, and skeletal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):5372–7.
46. Li X, Yang HY, Giachelli CM. Role of the sodium-dependent phosphate cotransporter, Pit-1, in vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2006;98(7):905–12.
47. Meleti Z, Shapiro I, Adams C. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone* 2000;27:359–66.
48. Marenzana M, Shipley AM, Squitiero P, Kunkel JG, Rubinacci A. Bone as an ion exchange organ: Evidence for instantaneous cell-dependent calcium efflux from bone not due to resorption. *Bone* 2005;37(4):545–54.
49. Lundquist P, Murer H, Biber J. Type II Na-P_i Cotransporters in Osteoblast Mineral Formation: Regulation by Inorganic Phosphate. *Cell Physiol Biochem* 2007;19(1-4):43–56.
50. Zoidis E, Ghirlanda-Keller C, Gosteli-Peter M, Zapf J, Schmid C. Regulation of phosphate (Pi) transport and NaPi-III transporter (Pit-1) mRNA in rat osteoblasts. *J Endocrinol* 2004;181(3):531–40.
51. Orimo H, Shimada T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem* 2008;315(1-2):51–60.
52. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Relat Res* 1995;(314):266–80.
53. Golub EE. Role of matrix vesicles in biomineralization. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2009;12:1592–8.
54. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch = Nihon Ika Daigaku zasshi* 2010;77(1):4–12.
55. Anderson HC. Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J Cell Biol* 1967;35(1):81–101.

56. Ali SY. Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Fed Proc* 1976;35(2):135–42.
57. Xiao Z, Camalier CE, Nagashima K, et al. Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. *J Cell Physiol* 2007;210(2):325–35.
58. Anderson HC. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 1969;41(1):59–72.
59. Zhou X, Cui Y, Zhou X, Han J. Phosphate/pyrophosphate and MV-related proteins in mineralisation: Discoveries from mouse models. *Int J Biol Sci* 2012;8(6):778–90.
60. Uddin M, Matsumoto T, Okazaki M. Biomimetic fabrication of apatite related biomaterials. *Biomimetics* 2010:289–305.
61. Anderson HC. The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. *Current Opinion in Orthopaedics* 2007;18:428–33.
62. Houston B, Stewart AJ, Farquharson C. PHOSPHO1 - A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. *Bone* 2004;34(4):629–37.
63. Johnson K, Goding J, Van Etten D, et al. Linked deficiencies in extracellular PP(i) and osteopontin mediate pathologic calcification associated with defective PC-1 and ANK expression. *J Bone Miner Res* 2003;18(6):994–1004.
64. Addison WN, Azari F, Sørensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. *J Biol Chem* 2007;282(21):15872–83.
65. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science* 2000;289(5477):265–70.
66. Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(14):9445–9.
67. Ramjan KA, Roscioli T, Rutsch F, Sillence D, Munns CFJ. Generalized arterial calcification of infancy: treatment with bisphosphonates. *Endocrinology & metabolism* 2009;5:167–72.
68. Zaka R, Williams CJ. Role of the progressive ankylosis gene in cartilage mineralization. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(2):181–6.
69. Harris H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 1990;186(2):133–50.
70. Anderson HC, Sipe JB, Hessle L, et al. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am J Pathol* 2004;164(3):841–7.
71. Millán JL. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signal* 2006;2(2):335–41.

72. Tenenbaum HC. Levamisole and inorganic pyrophosphate inhibit beta-glycerophosphate induced mineralization of bone formed in vitro. *Bone Miner* 1987;3(1):13–26.
73. Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 1997;208(3):432–46.
74. Waymire KG, Mahuren JD, Jaje JM, et al. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nat Genet.* 1995;11(1):45–51.
75. Keane OM, Keegan JD, Good B, et al. High level of treatment failure with commonly used anthelmintics on Irish sheep farms. *Ir Vet J* 2014;67:1–7.
76. Larocque A, Hoffman RS. Levamisole in cocaine: Unexpected news from an old acquaintance. *Clinical Toxicology* 2012;50:231–41.
77. Garba MT, Marie PJ. Alkaline phosphatase inhibition by levamisole prevents 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated bone mineralization in the mouse. *Calcif Tissue Int* 1986;38(5):296–302.
78. Figer A, Nissan A, Shani A, et al. Mature results of a prospective randomized trial comparing 5-fluorouracil with leucovorin to 5-fluorouracil with levamisole as ad-juvant therapy of stage II and III colorectal cancer - The Israel Cooperative Oncology Group (ICOG) study. *J Cancer* 2011;2(1):177–85.
79. Ekambaram S, Mahalingam V, Nageswaran P, et al. Efficacy of levamisole in children with frequently relapsing and steroid-dependent nephrotic syndrome. *Indian Pediatr* 2014;51(5):371-3.
80. Borgers M, Thoné F. The inhibition of alkaline phosphatase by L-p-bromotetramisole. *Histochemistry* 1975;44(3):277–80.
81. Van Belle H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. *Clin Chem* 1976;22(7):972–6.
82. Nakano Y, Addison WN, Kaartinen MT. ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* 2007;41(4):549–61.
83. Nijweide PJ, Kawilarang-de Haas EW, Wassenaar AM. Alkaline phosphatase and calcification, correlated or not? *Metab Bone Dis Relat Res* 1981;3(1):61–6.
84. Boskey AL, Doty SB, Binderman I. Adenosine 5'-triphosphate promotes mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell cultures. *Microsc Res Tech* 1994;28(6):492–504.
85. Linde A, Magnusson BC. Inhibition studies of alkaline phosphatase in hard tissue-forming cells. *J Histochem Cytochem* 1975;23(5):342–7.
86. Thomas JT, Boot-Handford RP, Grant ME. Modulation of type X collagen gene expression by calcium beta-glycerophosphate and levamisole: implications for a possible role for type X collagen in endochondral bone formation. *J Cell Sci* 1990;95:639–48.
87. Swenson CL, Sams RA., Polas PJ, Michael DF, Mathes LE. Age-related differences in pharmacokinetics of phosphonoformate in cats. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34(5):871–4.

88. Upadhyayula S, Michaels MG. Ganciclovir, Foscarnet, and Cidofovir: Antiviral Drugs Not Just for Cytomegalovirus. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2013;2(3):286–90.
89. Swenson CL, Weisbrode SE, Nagode LA, Hayes KA., Steinmeyer CL, Mathes LE. Age-related differences in phosphonoformate-induced bone toxicity in cats. *Calcif Tissue Int* 1991;48(5):353–61.
90. Miller SC, Jee WSS. The comparative effects of dichloromethylene diphosphonate (Cl₂MDP) and ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) on growth and modeling of the rat tibia. *Calcif Tissue Res* 1977;23(1):207–14.
91. Caverzasio J, Bonjour J. Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism. *Kidney Int* 1996;49:975-80.
92. Montessuit C, Caverzasio J, Bonjour JP. Characterization of a Pi transport system in cartilage matrix vesicles: Potential role in the calcification process. *J Biol Chem* 1991;266(27):17791–7.
93. Landis EN, Keane DT. X-ray microtomography. *Materials Characterization* 2010;61:1305–16.
94. Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods* 2010;50(1):2–13.
95. Elliott JC, Dover SD. X-ray microtomography. *J Microsc* 1982;126:211–3.
96. Flannery BP, Deckman HW, Roberge WG, D'Amico KL. Three-Dimensional X-ray Microtomography. *Science* 1987;237(4821):1439–44.
97. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen B, et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010;25(7):1468–86.
98. National Institutes of Health. Guide for the care and use of laboratory animals (revised 1985). NIH Publication No 86-23.
99. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004;22:79–102.
100. McCauley LK. Transgenic mouse models of metabolic bone disease. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13(4):316–25.
101. Van 't Hof RJ. Bone Research Protocols. *Methods Mol Biol* 2012;816:461–76.
102. Thyagarajan T, Totey S, Danton MJS, Kulkarni AB. Genetically Altered Mouse Models: The Good, The Bad, And The Ugly. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2003;14: 154–74.
103. Rezende A, Pizauro JM, Ciancaglini P, Leone FA. Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem J* 1994;301:517–22.
104. Chiryo to Y (eds). *Pharmacology and Therapeutics*. 3rd edition. Tokyo: Yaesu, Chuo-ku;1982.
105. Laib A, Kumer JL, Majumdar S, Lane NE. The temporal changes of trabecular architecture in ovariectomized rats assessed by microCT. *Osteoporos Int* 2001;12(11):936–41.

106. Lane NE, Kumer JL, Majumdar S, et al. The effects of synthetic conjugated estrogens, a (cenestin) on trabecular bone structure and strength in the ovariectomized rat model. *Osteoporos Int* 2002;13(10):816–23.
107. Suzuki A, Ammann P, Nishiwaki-Yasuda K, et al. Effects of transgenic Pit-1 overexpression on calcium phosphate and bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 2010;28(2):139–48.

TEŞEKKÜR

Yandal eğitimim süresince görev yapmış olan bilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Betül SEVİNER'e göstermiş olduğu mütevazî ve başarılı yönetiminden dolayı teşekkür ederim.

Bizlerin iyi bir çocuk endokrinoloji uzmanı olarak yetişmemizi sağlayan bu güzide bilim dalımızın kurucusu ve iyi bir öğretici olan Sayın Prof. Dr. Ömer TARIM'a en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Sürekli sorgulayan ve soran, farklı düşünmeyi bizlere öğreten ve beraber çalışmaktan gurur duyduğum Sayın Doç. Dr. Halil SAĞLAM'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beraber çalışmaktan onur duyduğum sayın Doç. Dr. Erdal EREN'e, Uzm. Dr. Hatice Dilek CAN'a, Uzm. Dr. Elif SÖBÜ'ye, Uzm. Dr. Şahin ERDÖL'e, Uzm. Dr. Sevil DORUM'a ve Sayın Hemşiremiz Zehra KUŞÇU'ya teşekkür ederim.

Beraber çalışma fırsatı yakaladığım asistan ve hemşire hanımlara en içten teşekkürler.

Çalışma hayatımızda olmazsa olmazları sayın diyetisyen, sekreter ve personel arkadaşlarımıza teşekkürler.

Bazen hastalarımızdan çok şey öğreniriz. Onlar artık aramızda olmasalar da bizlere çok şey öğretiler, Emre Mert ve Yağmur Yıldırım'a en içten duygularıyla ve saygılarımla teşekkürler.

Sevgili eşim Uzm. Dr. Vildan Sema DOĞAN'a, kızım Aygen Gökçen DOĞAN'a teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

30 Kasım 1980 tarihinde Mersin’de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Mersin’de tamamladım. Üniversite eğitimimi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’nde tamamladım. Aynı fakültenin Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalında uzmanlık ihtisassımı yaptım. Kısa süreli Erciş ve Konya’da uzman doktor olarak çalıştım. Kasım 2011 tarihinde Uludağ Üniversitesi Çocuk Endokrinoloji Bilim Dalında yandal eğitime başladım. Evli ve bir kız çocuk babasıyım.