

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**YÜKSEK VE DÜŞÜK DÖNGÜLÜ ÜREMİK KEMİK HASTALIĞI OLAN
KRONİK BÖBREK YETERSİZLİKLİ HASTALARIN SERUM
PROTEOMİKS ANALİZİ**

Dr. Mehmet TUNCAY

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

Kocaeli, 2010

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**YÜKSEK VE DÜŞÜK DÖNGÜLÜ ÜREMİK KEMİK HASTALIĞI OLAN
KRONİK BÖBREK YETERSİZLİKLİ HASTALARIN SERUM
PROTEOMİKS ANALİZİ**

Dr. Mehmet TUNCAY

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İtir Yeğenağa

Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Ahmet Yılmaz

Etik kurul onay tarih ve no: 20.5.2009-10/8

Proje Desteği: Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi: 2009/55

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	I
Şekiller Dizini	VI
Tablolar Dizini	IX
1. AMAÇ VE KAPSAM	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1 KRONİK BÖBREK HASTALIĞINDA KEMİK MİNERAL BOZUKLUĞU (KBH-KMB)	2
2.1.1 Tanım	2
2.1.2 Sınıflama	3
2.1.2.1 Sekonder Hiperparatiroidi (Osteitis Fibrosa)	4
2.1.2.2 Adinamik kemik Hastalığı	5
2.1.2.3 Osteomalazi	8
2.1.2.4 Mikst Üremik Osteodistrofi	8
2.2 KBH-KMB'NİN HİSTOMORFOMETRİK TANISI	9
2.3 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI-KEMİK VE MİNERAL BOZUKLUKLARINDA HİSTOPATOLOJİK TİPLERİN ETYOPATOGENEZİ	14
2.3.1 Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa B Ligand (RANKL), Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa B (RANK), Osteoprotegerin (OPG) Aksı	14
2.3.2 Sekonder hiperparatiroidizmin (sHPT) Patogenezi	16
2.3.3 Adinamik Kemik Hastalığının Patogenezi	18
2.3.4 Sitokinlerin Renal Osteodistrofideki Rolü	20
2.4 FOSFAT HOMEOSTAZI	21
2.4.1 Fosfatoninler	25
2.4.1.1 Fibroblast Growth Faktör-23/Klotho Aksı	25
2.4.1.2 sFRP-4 (secreted frizzled-related protein-4)	30
2.4.1.3 MEPE	31
2.5 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI-KEMİK VE MİNERAL BOZUKLUKLARINDA ÜREMİK TOKSİNLER	31
2.5.1 Parathormon	32
2.5.2 İndoksil Sülfat	37
2.5.3 Leptin	37
2.6 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI- KEMİK MİNERAL BOZUKLUKLARINDA VASKÜLER KALSİFİKASYONLAR	38
2.6.1 Kalsifikasyon Aktivatörleri	40
2.6.2 Kalsifikasyon İnhibitörleri	42

2.6.3 Vasküler Kalsifikasyonu Kolaylaştırıcı Faktörler	43
2.7 HİPERFOSFATEMİYE BAĞLI KLİNİK SONUÇLAR	46
2.8 RENAL OSTEODİSTROFİNİN TANISINDA KEMİK DÖNGÜSÜNÜN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİ	47
2.8.1 Kemik Oluşumunun Biyokimyasal Belirteçleri	47
2.8.2 Kemik Rezorbsiyonunun Biyokimyasal Belirteçleri	49
2.8.3 B2 Mikroglobulin ve Kemik Şekillenmesi	50
2.9 KALSİFİK ÜREMİK ARTERİOLOPATİ (KALSİFLAKSİ)	50
2.10 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI-KEMİK MİNERAL BOZUKLUKLARININ TEDAVİSİ	54
2.10.1 Hiperfosfateminin Tedavisi	54
2.10.1.1. Düşük Fosforlu Diyet	57
2.10.1.2 Bağırsaktan Fosfor Emilimini Azaltan İlaçlar	60
2.10.1.2.1 Fosfat Bağlayıcılar	60
2.10.1.2.1.1 Alüminyum İçeren	62
2.10.1.2.1.2 Kalsiyum İçeren	63
2.10.1.2.1.3 Kalsiyum İçermeyen	66
2.10.1.2.1.4 NaPi Kotransport İnhibitörleri	68
2.10.1.3 Diyalizle Fosfat Uzaklaştırılması	69
2.10.1.4 Vitamin D ve Kalsiyumu Yükseltmeyen D Vitamini Analogları	71
2.10.1.5 Renal Fosfat Ekskresyonunu Artıran İlaçlar	78
2.10.1.6 Kalsimimetikler	79
2.10.1.7 AST-120	81
2.10.1.8 Paratiroid Girişimleri	81
2.10.2 ADİNAMİK KEMİK HASTALIĞININ TEDAVİSİ	82
2.10.2.1 Alüminyumun Uzaklaştırılması	83
2.10.2.2 Diyalizattaki Kalsiyum Miktarının Azaltılması	83
2.10.2.3 Kalsiyum İçermeyen Fosfat Bağlayıcı Kullanılması	84
2.10.2.4 D Vitamini Tedavisini Dikkatli Uygulanması	85
2.10.2.5 Vitamin D Reseptör Aktivasyonu	85
2.10.2.6 Kemiği Uyarıcı Ajan Olarak Teriparatid	86
2.10.2.6 PTH'un Pulsatil Salınmasının Düzeltilmesi	86
2.11 ÜREMİ VE BÖBREK HASTALIKLARINDA PROTEOMİKS	87
2.11.1 Proteomiks Nedir?	87
2.11.2 Bio-belirteçler	88
2.11.3 Bio-belirteç Kaynakları	90
2.11.3.1 Kan	90
2.11.3.2 Dokular	93
2.11.3.3 İdrar	93

2.11.4 Plazma Analizinde Kullanılan Proteomiks Teknikler	93
2.11.4.1 İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforezi	95
2.11.5 Böbrek Hastalıklarında Proteomiks Uygulamaları	97
2.11.5.1 Böbrek Hastalıklarının Patojenik Mekanizmalarını veya Patofizyolojisini Aydınlatmak	98
2.11.5.2 Tanısal ve Prognostik Belirteçleri Tespit Etmek	99
2.11.5.3 Yeni Tedavi Hedeflerinin Tespit Edilmesi	100
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	101
3.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlık	101
3.2. Protein çözeltilerinin hazırlanması	101
3.2.1 Albumin İndirgenmesi	103
3.2.2 Trikloro asetik asit (TCA)-Aseton çöktürmesi	104
3.2.3 Protein miktarının belirlenmesi	105
3.2.4 Protein Standard Eğrisinin Çizilmesi	105
3.3 Proteomiks analizinde kullanılan jel ve solüsyonlar	106
3.3.1 %12 SDS Yürütme Jeli	106
3.3.2 Rehidrasyon solüsyonu:	107
3.3.3 Yürütücü solüsyon (TGS):	107
3.3.4 Sabitleştirici, Boyama ve Boya Uzaklaştırıcı Solüsyonlar	108
3.4 İki Boyutlu Jel Elektroforezi (2D Gel Elektroforezi)	108
3.4.1 Birinci Boyut: İzoelektrik fokuslama (IEF):	108
3.4.2 İkinci Boyut: Protein Jel Elektroforezi (SDS-PAGE):	110
3.5 Görüntüleme ve Analiz	112
3.6 MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi	114
3.7 Elde edilen kütle/yük değerlerinin analizi	115
4. BULGULAR	116
4.1 Hasta Özellikleri ve Laboratuvar Verileri	117
4.2 Serumun Proteomiks Analizi	119
5. TARTIŞMA	128
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	133
7. ÖZET	134
8. SUMMARY	136
9. KAYNAKLAR	138

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
AKH	Adinamik kemik hastalığı
ADHR	Otozomal dominant hipofosfatemik rikets
AGE	İleri glikasyon son ürünleri
AHSG	α -2 Heremans-Schmid glikoproteini
ALP	Alkalen fosfataz
ARHR	Otozomal resesif hipofosfatemik rikets
BALP	Kemiğe spesifik alkalen fosfataz
BMP	Kemik morfojenik proteinler
BMU	Basic multicelluler unit (Temel çok hücreli ünite)
Ca x P	Kalsiyum fosfor çarpanı
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
CAPD	Sürekli ayaktan periton diyalizi
CaR	Kalsiyum duyarlılaştırıcı reseptör
Cbfa-1	Core binding factor-1
CE	Kapiller elektroforez
CRP	C reaktif protein
DIGE	Ayrırdedici Jel elektroforezi (Differential Gel Electrophoresis)
DMP-1	Dentin matriks protein-1
DN	Diabetik Nefropati
DPD	Pyrodinolin

EGF	Epidermal büyüme faktörü
eNO	Endotelyal nitrik oksit
EPO	Eritropoetin
ESI	Electrospray Ionization
FGF-23	Fibroblast büyüme faktörü-23
FGFR	Fibroblast büyüme faktörü-23 reseptörü
FTC	Familyal tümöral kalsinozis
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance
GM-CSF	Granulosit-makrofaj koloni stimulan faktör
GN	Glomerulonefrit,
HDL	Yüksek dansiteli lipoprotein
HN	Hipertansif Nefropati
HOBIF	Hipotalamik osteoblast inhibitör faktör
HS	Heparan sülfat
HUPO	Human Proteome Organisation
ICTP	Prokollajen tip I çapraz bağlı karboksil terminal telopeptit
IEF	İzoelektrik fokuslama
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein
IL-1	İnterlökin-1
IL-1Ra	İnterlökin-1 reseptör antagonisti
IL-6	İnterlökin-6

IPG	İmmobilize edilmiş pH gradienti
IRMA	Immunoradiometric Assay
IS	İndoksil sülfat
IT	İon trap
K/DOQI	Kidney/Disease Outcome Quality Initiative
KBH	Kronik böbrek hastalığı
KBH-KMB	Kronik Böbrek Hastalığı- Kemik ve Mineral Bozuklukları
KBY	Kronik böbrek yetersizliği
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
LC	Likit kromatografi
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
m/z	kütle/yük oranı
mA	Moleküler ağırlık
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight
MARS	Multiple Affinity Removal System
MEPE	Matriks ekstraselüler fosfoglikoprotein
MGP	Matriks GIa protein
MS/MS	Tandem kütle spektrometrisi
MS	Kütle spektrometrisi
MUO	Mikst üremik osteodistrofi
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

NaPi	Sodyum-fosfat kotransporter
NO	Nitrik oksit
OC	Osteokalsin
OCT	22-Oxakalsitol
OPG	Osteoprotegerin
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
pI	İzoelektrik nokta
PICP	Prokollajen tip I karboksi terminal peptit
Pi	İnorganik fosfor
PKB	Polikistik Böbrek Hastalığı
PMF	Peptide mass fingerprint metodu
PPAR α	Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma
PTH	Paratiroid hormon
PTHr	Paratiroid hormon reseptörü
PTHrP	Paratiroid hormonla ilişkili peptit
PYD	Pyrodinolin
Q	Quadrupole
RANK	Reseptör aktivator nükleer faktör kappa B
RANKL	Reseptör aktivator nükleer faktör kappa B ligand
RAS	Renin anjiotensin sistemi
RIA	Radioimmünassay

ROD	Renal osteodistrofi
ROMK-1	Renal outer meduller potassium channel-1
sFRP-4	Secreted frizzled-related protein 4
sHPT	Sekonder hiperparatiroidi
sIL-6R	Solubıl IL-6 reseptörü
TGF- β	Transforming growth faktör- β
TIO	Tümörün neden olduğu osteomalazi
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
TOF	Time-of-flight
TRAP-5b	Kemiğe spesifik tartarata dirençli asit fosfataz tip 5b
TRAP	Tartarata dirençli asit fosfataz
TRPV5	Transient reseptör potansiyel vanilloid tip isoform 5
VDR D	Vitamini reseptörü
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein
VUR	Vezikoüreteral Reflü
Wnt	'Wingless integration site' genleri
XLH	X'e bağlı hipofosfatemik rikets

SEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sekil Alt Yazısı</u>	<u>Sayfa No</u>
1	KBY’de Üremik Kemik Hastalığının Farklı Alt Tipleri	4
2	a. Osteoklastların bulunmadığı ya da çok az sayıda bulunduğu, osteoid dokunun azalmış veya normal olarak tespit edildiği düşük döngülü kemik hastalığı	7
	b. Trabeküler yüzeyde alüminyum birikimi	7
	c. Osteoid yüzey ve volümün belirgin olarak artışıyla karakterize osteomalazi.	8
	d. Mikst üremik kemik hastalığı: hiperparatiroidizmin histolojik bulguları ve bozulmuş mineralizasyon, osteoblastlar, rezorpsiyon kavitesindeki osteoklastlar ve peritrabeküler fibrozisle kısmi olarak çevrili osteoid yüzeyi ve kalınlığı artırır	9
3	Kemik Histomorfometrisinin TMV sınıflaması	13
4	Üremide OPG birikiminin rolü	15
5	RANKL ve OPG’nin osteoklastlar üzerine etkisi	16
6	İnsanlarda Fosfor Homeostazı	22
7	FGF-23-Klotho Aksı ve İşlevleri	29
8	PTH testlerinin farklı tipleri	36
9	PTHrP ve C terminal PTH reseptörü aktivasyonunun biyolojik etkilerinin şematik olarak gösterilmesi	36
10	Vasküler kalsifikasyon mekanizmaları	40

11	Düz Kas Hücrelerinde Fosfat Metabolizmasının Düzenlenmesi	41
12	KBH'da geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörleri	46
13	Diyaliz hastalarında kemik mineral bozuklukları tedavisi için bir algoritma	56
14	Parikalsitol ve kalsitriolün kalsemik etkisinin karşılaştırılması	76
15	Paratiroid hiperplazisinin ilerlemesi ve güncel tedavi seçenekleri	82
16	MARSHu-14 kolonunda immünoafinite uygulanan plazma örneğinin SDS-PAGE jeli	92
17	Proteomikte sık kullanılan peptit ve protein iyonizasyon metodları	95
18	Renal ve idrar proteomiks uygulamaları ve metodolojilerinin şematik özeti	98
19	10 DG desalting kolonundan çıkan serum protein profili	102
20	Optimizasyon öncesi yürütülen 2D PAGE jel profili	102
21	Albumin indirgemesi manuel olarak yapılmış serum örneği	104
22	Bradford metodu ile hazırlanmış protein standart eğrisi	106
23	2D Gel Elektroforez sistemi	110
24	Protein emdirilmiş jelin Coomassie mavisi ile boyanması	112

25	VersaDoc Görüntüleme Cihazı	113
		113
26	EXQuest Spot Kesme Cihazı	
27	<i>Azotobakter vinelandii</i> nitrojenaz enziminin MALDI-TOF ile yapılmış analizi	114
28	HeLa hücrelerinde pH 5-8 aralığında 2D protein profilinin incelenmesi	116
29	Tuzlarından arındırılmış ve albumin indirgenmesi yapılmış serum örneklerine ait 2D PAGE profilleri	119-20
30	Serumda miktarı fazla olan proteinlerin 2D jel üzerinde Swiss-Prot veri bankasından faydalanılarak isimlendirilmesi	121
31	Çoklu spot analizi ve C örneğine ve H1' ait alt bölge spot analizi	122
32	Coomasie Mavisi ile Çoklu Spot Analizi	123
33	Coomasie Mavisi ile Boyanan Jellerin Spot Sayısı Az Bölgelerinin Analizi	124
34	SYPRO Ruby ile boyanmış jel örnekleri	124
35	Sağlıklı bireylerde indirgenme öncesi ve sonrası protein profili.	125
36	H6 örneğine ait ameliyat öncesi ve sonrasına ait serum protein profilleri ve bazı farklı protein spotlarının belirlenmesi.	126

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Tablo Üst Yazısı</u>	<u>Sayfa No</u>
1	Üremik Kemik Hastalığının Histomorfometrik Tanısı	11
2	Renal Osteodistrofide TMV Sistemi	12
3	Üremik Toksinlerin Sınıflandırılması	32
4	Üremik hastalarda vasküler kalsifikasyon için risk faktörleri	44
5	Kemik Döngüsünün Serum Belirteçleri	47
6	KBH Evrelerine Göre Fosfor, PTH Hedef Değerleri ve Ölçüm Sıklıkları	56
7	Bazı Gıdaların Fosfor İçeriği ve Fosfor/Protein Oranları	59-60
8	İdeal Fosfat Bağlayıcıların Özellikleri	61
9	Oral Fosfat Bağlayıcıların Avantaj ve Dezavantajları	61-62
10	Serum 25-OH D konsantrasyonuna göre D Vitamini durumunun değerlendirilmesi	72
11	AKH Tedavi Yaklaşımları	83
12	Biobelirtreç Araştırma Çalışmalarında Güncel Proteomiks Uygulama Çalışmaları	89-90
13	Sık Kullanılan Boyama Metodları	96
14	MALDI-TOF data analizi için protein prospector içerisinde kullanıma sunulan bazı programlar	115
15	Hastaların Klinik ve Laboratuar Bilgileri	117-18
16	Farklı spotların MALDI-TOF-TOF analizi	126
17	İsimlendirilmemiş proteine ait Mascot tarama motoru sonuçları	127

1. AMAÇ VE KAPSAM

Böbrek işlevleri azalmaya başladığında organizmanın mineral homeostazı gittikçe bozulmaya başlar. Diyalize giren kronik böbrek hastalarının (KBH) hemen hemen tümünde ve evre III-IV KBH'larının büyük çoğunluğunda üreminin neden olduğu kemik hastalığı gelişir. Anormal mineral metabolizması, bozulmuş kemik yapısı ve iskelet dışı kalsifikasyonlar KBH olan hastalarda mortalite ve morbiditede büyük artışa yol açmaktadır. Üremiye bağlı kemik hastalığı yelpazesinin bir ucunda yer alan yüksek döngülü kemik hastalığında (Sekonder hiperparatiroidi-Osteitis fibrosa) kemik oluşum ve rezorbsiyon dengesinin düzenlenmesi rezorbsiyon yönündedir. Paratiroid hormon (PTH) düzeyinin yüksekliği ve buna bağlı gelişen kemik iliği fibrozisi ile karakterizedir. Yelpazenin diğer ucunda yer alan adinamik kemik hastalığında (AKH) ise PTH düzeyinin düşük olmasına bağlı kemik oluşumu yoktur veya çok azdır. Her iki durumu kolaylaştıran faktörler (yaş, eşlik eden hastalıklar, uygulanan tedaviler gibi) ve yol açtığı sonuçlar iyi bilinmesine rağmen KBH hastalarının hangisinde adinamik, hangisinde yüksek döngülü kemik hastalığının gelişeceği tahmin edilememektedir. Bu amaçla kullanılabilir yaklaşımlar arasında en dikkat çekici olanı proteomiks uygulamalarıdır.

Proteomiks, hücre, doku veya biyolojik sıvıların protein profillerinin araştırılmasında bir anahtar teknolojidir. Proteom, bir organizma, doku veya hücrede herhangi bir anda bulunan proteinlerin tümünü ifade eder. Proteomiks araştırmaları, vücut sıvılarında, hücrelerde ve doku biyopsilerinde protein kökenli tanısal ve prognostik hastalık belirteçlerinin tanımlanmasını ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesini sağlayabilir. Vücutta patolojik bir durumun meydana gelmesi proteomda meydana gelen değişimlerle doğrudan ilişkilidir ve bu değişimlerin ve nedenlerinin anlaşılması etkin ve nedene özgü tedavilerin geliştirilmesini sağlayacaktır.

Hayvan çalışmalarında ekzojen PTH (1-84 ve 1-34) uygulanması sonrası kemik iliği hücrelerinde ve serumda PTH bağlı farklı proteinlerin ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bu proteinler osteoprogenitör hücrelerin osteoblast öncüllerine farklılaşmasında rol alabileceği veya PTH'a fizyolojik yanıtın protein belirteçleri olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Bu çalışmada serum PTH düzeyinin düşük olduğu AKH ve yüksek olduğu yüksek döngülü kemik hastalığında PTH bağlı serum protein profili

değişikliklerini ve üremik kemik hastalığının iki farklı formunu tanımlayabilecek belirteç tespit etmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KRONİK BÖBREK HASTALIĞINDA KEMİK MİNERAL BOZUKLUĞU (KBH-KMB)

2.1.1 Tanım

Kronik böbrek hastalığı (KBH) dünya nüfusunun yaklaşık % 5-10'unun etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. Prevalansı giderek artmakta ve böbrek işlevlerinin ilerleyici kaybı, kardiyovasküler hastalık ve erken ölüm gibi istenmeyen sonuçlara yol açmaktadır (1). Böbrek işlevleri azalmaya başladığında diğer birçok bozukluğun yanı sıra organizmanın mineral homeostazı gittikçe bozulmaya başlar. Fosfat ve kalsiyumun doku ve serum konsantrasyonları, ilgili hormonların dolaşımdaki miktarları da değişir. Bu hormonlar içerisinde Paratiroid hormon (PTH), 25-dihidroksivitamin D [25(OH)D₃], 1,25 dihidroksivitamin D [1,25(OH)₂D₃] (kalsitriol), diğer D vitamini metabolitleri, fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF-23) ve büyüme hormonu sayılabilir. PTH ve kalsitriol fosfor, kalsiyum metabolizmasını ve kemik döngüsünü kontrol eden hormonal aksın iki önemli üyesidir. Bu iki hormon birbirlerinin etkilerini tamamlayıcı olarak etki gösterir ve birçok negatif ve pozitif feedback mekanizması ile kontrol edilmektedir.

Evre III KBH'nın başlangıcından itibaren böbreklerin fosfat ekskresyonu yapabilme kapasitesi azalır. Böylece hiperfosfatemi, PTH ve FGF-23'ün artmasına bağlı olarak kalsitriol de düşüş meydana gelmeye başlar. Kalsitriol sentezinin azalması ise intestinal kalsiyum emilimini azaltır ve PTH sentezinin artmasına neden olur. Fosfat atılımını ve kalsiyum geri emilimi sağlayan PTH'a ve fosfat ekskresyonunu artıran FGF-23'e böbrekler yeteri kadar yanıt veremez. Ayrıca D vitamini reseptörleri dokularda sayısal olarak azalır ve PTH'a direnç gelişir.

KBH'da mineral ve endokrin işlevlerin bozulmasının hem büyüme, gelişme sürecinde kemik oluşumu (modeling) hem de erişkinlerde kemik işlev ve yapısı üzerinde (remodeling-yeniden şekillenme) kritik önemi vardır. Sonuç olarak diyalize giren KBH hastalarının hemen hemen tümünde ve evre III-IV KBH hastalarının

büyük çoğunluğunda üreminin neden olduğu kemik hastalığı vardır. Tüm bunlara ilave olarak KBH'da kemik mineral metabolizmasının bozulması ve bu bozuklukların düzeltilmesi için uygulanan tedaviler iskelet dışı kalsifikasyonların gelişmesine neden olabilir (2).

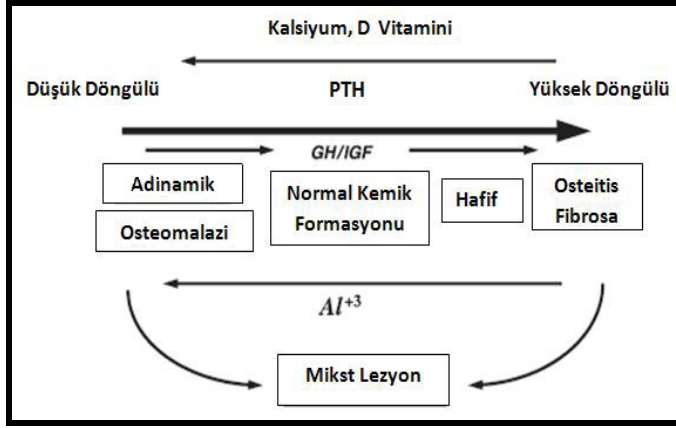
Anormal mineral metabolizması, bozulmuş kemik yapısı ve iskelet dışı kalsifikasyonlar özellikle vasküler kalsifikasyonlar birlikte KBH olan hastalarda mortalite ve morbiditede büyük artışa yol açmaktadır. Birçok çalışma mineral metabolizması ile fraktür riski, kardiyovasküler hastalık ve mortalite arasındaki ilişkiyi göstermektedir (3). Bu ilişkiye neden olan mekanizmalar tam olarak anlaşılacakla birlikte vasküler kalsifikasyonların neden olduğu olaylar kardiyovasküler yapının ve işlevlerin değişmesine yol açar. Bu değişikliklerin KBH'larında artmış kardiyovasküler risk ve bu nedenle oluşan ölümlere katkısı muhakkaktır. (4).

Geçmişte Renal osteodistrofi (ROD) KBH'da gelişen kemik morfolojisi anormalliklerini tanımlamak için kullanılmakta idi. Bu tanımlama KBH'da gelişen oldukça farklı klinik yelpazeyi tam olarak kapsamadığından Kronik Böbrek Hastalığı-Mineral ve Kemik Bozuklukları (KBH-KMB) tanımlaması geliştirilmiştir (2). Bu kavram şu durumların biri veya kombinasyonları olarak ortaya çıkan sistemik bir bozukluğu tanımlamaktadır: 1. Kemik döngüsü, mineralizasyon, volüm, lineer büyüme veya kemiğin dayanıklılık anormallikleri; 2. Kalsiyum, fosfor, PTH, D vitamini metabolizması bozuklukları; 3. Vasküler veya diğer yumuşak doku kalsifikasyonları. Böylece renal osteodistrofi terimi sadece KBH'na bağlı olarak gelişen kemik morfolojisini tanımlar hale gelmiştir. Renal osteodistrofinin kesin tanısı ve değerlendirilmesi için kemik biopsisi yapmak gerekmektedir ancak klinik tanı ve tedavi için zorunlu değildir.

2.1.2 Sınıflama

Kronik böbrek hastalığı kemik mineral bozukluklarının (KBH-KMB) bir komponenti olarak renal osteodistrofi (ROD) terimi günümüzde üremik hastalarda gözlemlenen yüksek (osteitis fibrosa-sekonder hiperparatiroidi) ve düşük döngülü (adinamik kemik hastalığı) kemik hastalığı arasında değişen kemiğin değişik morfolojik

değişikliklerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Hastalık yelpazesinin bu iki ucu arasında kemik mineralizasyonunun değişik oranlarda bozulduğu osteomalazi ve mikst üremik kemik hastalığı görülmektedir. (Şekil 1)



Şekil 1. KBY’de Üremik Kemik Hastalığının Farklı Alt Tipleri

Bu hastalıkların genel özellikleri şu şekilde özetlenebilir.

2.1.2.1 Sekonder Hiperparatiroidi (Osteitis Fibrosa)

Osteitis fibrosa kemik rezorbsiyon ve oluşumunda artışa bağlı olarak peritrabeküler fibrozis ile karakterize üremik kemik patolojisidir. Sekonder hiperparatiroidinin kemiklerde oluşturduğu bozukluktur. Diyaliz öncesinde ve diyalizin başlangıcında hastaların yaklaşık %50’sinde görülebilir. Osteoblast ve osteoklastların aktivitesi sonucu meydana gelen kemik oluşumu ve rezorbsiyonun dengesi bozulmuş ve denge ya rezorbsiyon yönüne ya da oluşum yönüne kaymıştır. Böylece toplam kemik volümünde pozitif veya negatif denge tespit edilebilir.

Osteitis fibrosada osteoid volüm ve osteoid yüzeyi artar. Osteoid dokunun yapısı değişir ve tabakalı hali pleksiform görünüm kazanır. Peritrabeküler fibrozis, eritropoezi bozar ve daralmış olan kemik iliğinin eritropoetine yanıtını azaltır. Aktive osteoblast ve osteoklast sayısı artar (5).

Osteitis fibrozada trabeküler kemik yüzeyinin tamamını kapsayacak şekilde fazla miktarda çift tetrasiklinli işaretlenme olur. Bu işaretlenme kemik oluşumunun hızlandığını ve belirgin mineralizasyon bozukluğu olmadığını gösterir.

Şiddetli osteitis fibrosada kemik rezorbsiyonunu artması sonucu kortikal kemik yaygın olarak göz göz hale gelir. Bu durum kemik sağlamlığında azalmaya ve kırık riskinde artışa yol açar (6).

2.1.2.2 Adinamik kemik Hastalığı

Renal osteodistrofi yelpazesinin diğer ucunda ise düşük döngülü kemik hastalığı veya adinamik kemik hastalığı (AKH) yer alır. Tetrasiklinli işaretleme ile ölçülen kemik oluşumunun olmaması veya düşük olmasıyla birlikte osteoblast ve osteoklast sayısının oldukça az olduğu klinik durumdur. Kemik döngüsü belirgin olarak baskılanmıştır ve özgün boyalarla aktif osteoklast tespit edilemez. Kemiğin histolojisi, osteoid dokunun ve aktive olmuş osteoblastların olmaması, ince bandların oluşması ve kemik rezorbsiyonunun belirgin olarak baskılanmış olması ile karakterizedir. Genellikle tetrasiklinle işaretlenme olmaz (Şekil 2a).

Adinamik kemik hastalığı, insidansının giderek artmasına, neden olduğu kemik kırıklarına ve vasküler kalsifikasyonlara bağlı olarak mortaliteyi artırması nedeniyle klinik olarak dikkat edilmesi gereken bir durumdur. Adinamik kemik hastalığında dirençli hiperkalsemi, kemik dışı kalsifikasyonlar ve kalsiflaksi (kalsifik üremik arteriolopati) sıklığı artmakta ve kemikteki kalsiyum miktarı düşmekte, spontan mikrofraktürlerin düzelmesi olmamaktadır.

Prevalansı tüm araştırma gruplarında giderek artmaktadır ve biopsi serilerinde %30-50 arasında değişmektedir. 1985 ve 2007 yılları arasında diyaliz hastalarında yapılan 1701 biopsi sonuçlarının incelenmesi ile adinamik kemik hastalığı prevalansı % 33; henüz diyalize girmeyen kronik böbrek hastalarında ise % 8 olarak tespit edilmiştir (7).

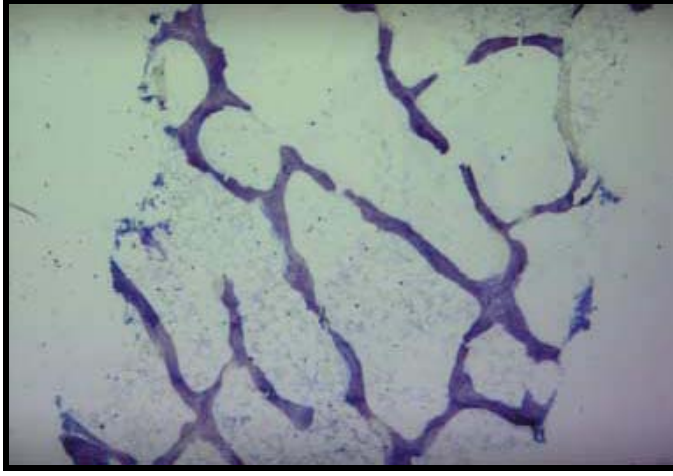
Yaşlı ve diyabetik hastalarda sık olarak tespit edilmektedir. Bu hastalarda osteoprotegerin (OPG) düzeyi artar ve böylece osteoklastogenezin baskılanması da adinamik kemik hastalığı gelişmesine katkıda bulunabilir (8). Genellikle paratiroidektomi yapılması, kalsiyum ve/veya D vitamini tedavisi gibi nedenlere bağlı olarak gelişen iatrojenik bir durumdur (9).

Aluminyum zehirlenmesi günümüzde çok nadir bir durum olmasına rağmen hala düşük döngülü kemik hastalığının önemli nedenlerinden biridir (Şekil 2b). Yaklaşık on yıl önce aluminyum içeren fosfat bağlayıcıların sık kullanılması nedeniyle kemiğin trabeküler yüzeyinde aluminyum birikimine bağlı adinamik kemik hastalığı diyaliz hastalarının %15'inde görülmekteydi (10). Aluminyumun adinamik kemik hastalığına neden olduğu ilk defa 1982'de gösterilmiş ve yapılan tüm çalışmalarda aluminyum toksikasyonu ile kemik döngüsünün baskılanması arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Bu metalin mineralizasyon yüzeyinde biriken miktarı ile osteoblastik aktiviteyi ve kemik oluşum hızını düşürmesi arasında belirgin bir ilişki vardır. Bu durum, adinamik kemik hastalığı gelişiminde mineralizasyon yüzeyinde biriken aluminyum miktarının serum aluminyum düzeyi veya kemikte bulunan aluminyum miktarından daha önemli olduğunu göstermektedir (11).

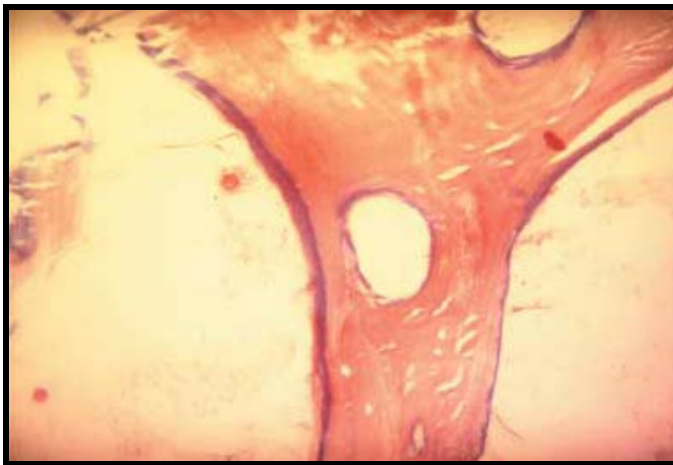
PTH sekresyonu azaldıkça adinamik kemik hastalığının gelişimi artmaktadır. Üremik hastalarda diyabet, hipotiroidi, steroid tedavisi, ileri yaş, kronik karaciğer hastalığı, demir ve florin toksikasyonu ve asidoz gibi faktörler adinamik kemik hastalığının gelişmesine en sık neden olan faktörlerdir (12, 13). Diyabette paratiroid bezinde mikrovasküler dolaşımın azalması, hiperglisemi ve insülin yetersizliği nedeniyle adinamik kemik hastalığı gelişebilir. AKH patogenezinde rol aldığı bilinen diğer bir faktör kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar ve D vitaminin fazla alınmasına bağlı olarak gelişen hiperkalsemidir. D vitamini hem PTH salgılanmasını azaltır hem de aralıklı olarak verildiğinde doğrudan PTH gen ekspresyonunu baskılayıcı etki gösterir. İatrojenik hipofosfatemi AKH'nın PTH aracılı diğer bir nedeni olarak tespit edilmiştir.

Sürekli ayaktan periton diyalizinde (CAPD) ise diyalizat sıvılarının kalsiyum içeriğinin yüksek olması veya yüksek doz oral kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların kullanılması nedeniyle adinamik kemik hastalığının görülme sıklığı artmıştır (14). Ayrıca bu hastaların peritoneal membrandan protein kaybının fazla olmasına bağlı serum albumin düzeyleri düşüktür. Serum albumin düzeyinin düşük olmasıyla kemik döngüsünün düşüklüğü arasında korelasyon olduğu bilinmektedir.

Kullanılan diyaliz membranlarının da adinamik kemik hastalığı gelişimine katkısı vardır. Poliakrilnitril diyalizörler kuprafon (selülozik) membranlardan daha fazla osteoblastik ve osteoklastik aktivasyonu azaltmaktadır (15). Bu durum daha fazla biyo uyumlu ve/veya geçirgen hemodiyaliz membranlarının kullanılmasının kemik döngüsünde azalmaya yol açtığını göstermektedir. Hücre aktivasyonunu sağlayan mediatörler (β_2 -mikroglobulin, ve inflamatuvar sitokinler) ultrafiltrasyona uğramakta veya bu membranlar hücre döngüsünün uyarılmasını azaltmaktadır.



Şekil 2a. Osteoklastların bulunmadığı ya da çok az sayıda bulunduğu, osteoid dokunun azalmış veya normal olarak tespit edildiği düşük döngülü kemik hastalığı (Toluidin mavisi boyası)

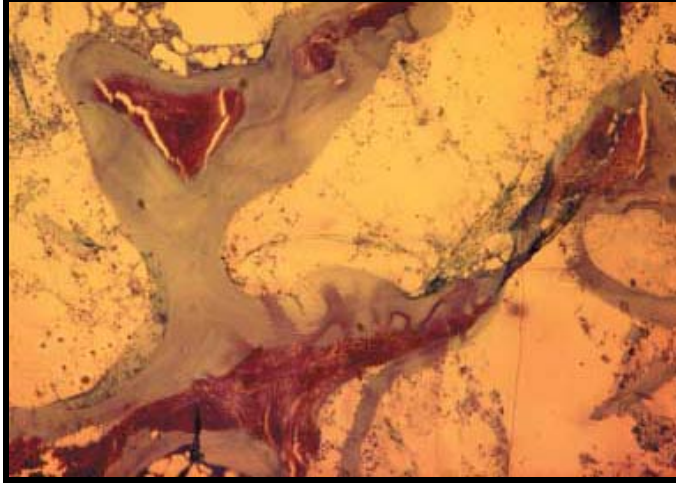


Şekil 2b. Trabeküler yüzeyde alüminyum birikimi (azurin solokrom boyası)

2.1.2.3 Osteomalazi

Üremik ortamda osteomalazi, aluminyuma akut veya kronik olarak maruz kalınmasından sonra bu metalin kemikte birikimi ve de aktif D vitamini eksikliği sonucu meydana gelir ve kemik mineralizasyonu bozular. Üremik hastaların çoğunluğunda kemik mineralizasyonu bozulmasına rağmen bu hastaların büyük bir kısmı osteomalazi kriterlerini tam olarak karşılamaz. Bu hastalığın insidansı giderek azalmakta ve diyaliz hastalarında yapılan kemik biopsi serilerinde %5'ten daha az tespit edilmektedir (7). Aluminyum kullanımının azalmasıyla birlikte osteomalazi oldukça nadir olarak görülmektedir ancak ciddi D vitamini yetersizliği olan hastalarda ağır metal maruziyeti sonrası tespit edilebilmektedir. Kemiğin histolojik incelemesi osteoid yüzey ve volümün belirgin olarak arttığını göstermektedir. (Şekil 2c) (16).

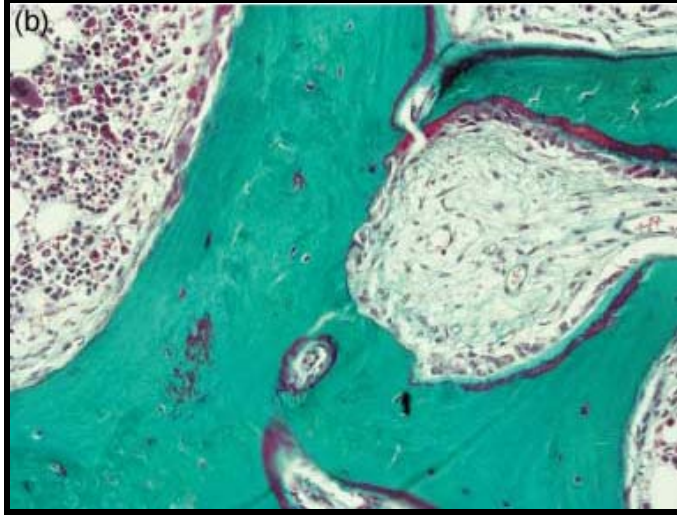
Osteoblastlar tarafından kollajen sentezi ve bu kollajenin mineralizasyonu bozuktur. AKH'den farkı ise mineralizasyondaki bozukluk kemik oluşumundaki bozukluktan daha fazladır. Böylece göreceli olarak osteoid fazlalığı meydana gelmektedir. Osteomalazide tabakalı görünümle birlikte ince bantlar vardır. Tetrasiklin işaretlenmesi azalmış ve bulanık görünümdeydir. Kemik döngüsü azalmıştır.



Şekil 2c. Osteoid yüzey ve volümün belirgin olarak artışıyla karakterize osteomalazi

2.1.2.4 Mikst Üremik Osteodistrofi

Mikst üremik osteodistrofi (MUO) sekonder hiperparatiroidizmin özelliklerini gösterir ve osteoid kalınlık ve volüm artmıştır. Tetrasiklinli işaretleme ile kemik mineralizasyonu bozulmuş ve lekeli veya buğulu bir görünüm vardır (Şekil 2d).



Şekil 2d. Mikst üremik kemik hastalığı: hiperparatiroidizmin histolojik bulguları ve bozulmuş mineralizasyon, osteoblastlar, rezorbsiyon kavitesindeki osteoklastlar ve peritrabeküler fibrozisle kısmi olarak çevrili osteoid yüzeyi ve kalınlığı artırır (Mason-Golder boyası)

2.2 KBH-KMB'NİN HİSTOMORFOMETRİK TANISI

Renal osteodistrofinin tanısını kesinleştirmek, şiddetini belirlemek, alt tiplerini tespit etmek ve değerlendirebilmek için kemik biopsisi yapmak gereklidir. İnvaziv ve hastaların tümüne kolayca yapılamamasına rağmen ROD tanısı için altın standarttır. Kompleks bir hastalık olması nedeniyle biyokimyasal testler var olan kemik histolojisini göstermek için yetersiz kalabilir. Bu nedenle klinik semptomların ve biyokimyasal bozuklukların etyolojisinin tespit edilemediği durumlarda kemik biopsisi yapılabilir. Kemik oluşum hızı çift tetrasiklinli işaretleme kullanılarak hesaplanır. Hastalara ya demeklosiklin ya da tetrasiklin hidroklorid 10 mg/kg/gün dozunda ardışık iki gün verilip 10 veya 20gün sonra ilaç aynı dozda iki gün süre ile yeniden verilir. Hastalara antibiyotik verildiği zaman fosfat bağlayıcı verilmemelidir. Verilen son antibiyotikten 3-7 gün sonra kemik biopsisi yapılır. Kemik histomorfometrisine ek olarak alüminyum veya demir birikimini göstermek için özel boyama yapılabilir. İliak kanat biopsisi hastaları hastaneye yatırma ihtiyacı olmadan

güvenle ve minimal komplikasyonlarla yapılabilen bir işlemdir. Kemik iliği biopsisi endikasyonları sadece tanımlanan durumlarla sınırlı olmamakla birlikte şunlardır:

- Biyokimyasal parametreler arasında uyumsuzluk,
- Açıklanamayan kemik kırıkları veya kemik ağrısı,
- Şiddetli progresif vasküler kalsifikasyon,
- Açıklanamayan hiperkalsemi,
- Alüminyum veya olası diğer metallerin birikimi veya toksisite şüphesi
- Eğer hasta geçmişte alüminyuma maruz kaldıysa veya biyokimyasal ölçümler sekonder veya tersiyer hiperparatiroidiyle uyumlu olmadığı durumlarda paratiroidektomi öncesi
- Düşünülyorsa bifosfanat tedavisi başlanmadan önce

Kemik biopsilerinin statik ve dinamik parametrelerinin ölçümleri histomorfometrik olarak Amerikan kemik ve mineral araştırmaları topluluğunun (Nomenclature Committee of the American Society for Bone and Mineral Research) önerileri doğrultusunda değerlendirilmektedir (Tablo 1) (17).

Tablo 1. Üremik Kemik Hastalığının Histomorfometrik Tanısı

Parametre	Kısaltma ve Birimler	Normal Değerler	Osteitis Fibrosa	Mikst Osteopati	Hafif Lezyo	ABD		Osteomalazi	
						Al+	Al ⁻	Al+	Al ⁻
Kemik Volümü	BV/TV Toplam Volümün %'si	21 ± 5	N - ↗	N - ↗	N	↘	N	N	N
Osteoid Volüm	OV/TV Toplam Volümün %'si	1.8 ± 0.4	↗	↗↗	N	N↘	N↘	↗↗	↗↗
Osteoid Yüzey	OS/BS Toplam Volümün %'si	11 ± 3	↗	↗↗	↗	N↘↗	N↘↗	↗↗	↗↗
Osteoid Kalınlık	µm	6.3 ± 1.5	N	N	N	N↘	N↘	↗↗	↗↗
Osteoblastik Kalınlık	Obs/BS Toplam Volümün %'si	3.6 ± 1.2	↗↗	↗-N	N	↘	↘	↘	↘
Erode Yüzey	ES/BS Toplam Yüzeyin %'si	3.5 ± 1.5	↗↗	↗	N	N	N	N	N
Osteoklast Yüzeyi	OCS/BS Toplam Volümün %'si	0.5 ± 0.2	↗↗	↗	N	N↘	N↘	N↘	↘N
Osteoklast Sayısı	NOC/T.Ar n/mm ²	0.2 ± 0.1	↗↗	↗	N	↘	↘	↘	↘
Medüller fibroz	Medüller - Kemik Alanının %'si	<0.5	>0.5	>0.5	N	N	N	N	N
Mineral eklenme Hızı	MAR µm/Gün	0.62 ± 0.22	↗-N	↗-N	N	↘	↘	↘	↘
Çift etiketli Yüzey	DLS/BS Toplam Volümün %'si	5.2 ± 1	↗	N - ↗	N	↘	↘	↘	↘
Doku Düzeyinde Kemik Formasyon Hızı	BFR/BS		↗↗	↗	N	↘	↘	↘	↘
Alüminyum Boyanması çimento çizgilerinde		0	±	++	±	+	-	+	-
Osteoid/kalsifiye kemik arayüzlerinde		0	0	+	0	+	-	+	-

(Albert Fournier, Roxana Oprisiu, Carine Hottelart, Paule Hardy Yverneau. Renal Osteodystrophy in Dialysis Patients: Diagnosis and Treatment. *Artif Organ*.1998, **22(7)**:530–557'den alınmıştır.)

Ana kriterler kutu içinde gösterilmiştir.

Bu parametreler:

- Kemik Volümü (BV/TV): Doku volümünün yüzdesi olarak ifade edilen mineralize olmuş kemik volümü
- Osteoid Volüm (OV/BV): Kemik volümünün yüzde olarak ifade edilmiş hali
- Osteoblast Yüzeyi (Ob.S/BS): Trabeküler kemik yüzeyinin yüzde olarak ifade edilmiş hali
- Osteoid Kalınlık: µm olarak ölçülür
- Osteoklast Yüzeyi (Oc.S/BS): Trabeküler kemik yüzeyinin yüzde olarak ifade edilmiş hali
- Mineralizasyon Duraklama Zamanı (Mlt): Gün olarak ifade edilir
- Mineral Eklenme (kemikleşme) Hızı: µm/gün olarak ifade edilir.

- Doku Volümüne göre Kemik Oluşum Hızı (BFR/TV): $\mu\text{m}^3/\text{mm}^2/\text{gün}$ olarak ifade edilir. Trabeküler kemik yüzeyinde günde birim başına yeni mineralize olan kemik miktarının volümetrik ölçümüdür.
- Kemik Yüzeyine göre Kemik Oluşum Hızı (BFR/BS): $\mu\text{m}/\text{gün}$

Histomorfometrik veriler kullanılarak belirlenen osteodistrofi tiplerinin ölçümleri şu şekildedir (17): Hiperparatiroidi, $\text{OV}/\text{BV} > 3\%$, $\text{BFR}/\text{TV} > 600 \text{ mm}^3/\text{mm}^2/\text{gün}$, $\text{Mlt} < 25$ gün; Osteomalazi, $\text{OV}/\text{BV} > 11\%$, $\text{BFR}/\text{TV} < 400 \text{ mm}^3/\text{mm}^2/\text{gün}$; mikst lezyon $\text{OV}/\text{BV} > 11\%$, $\text{BFR}/\text{TV} > 400 \text{ mm}^3/\text{mm}^2/\text{gün}$, $\text{Mlt} > 25$ gün; Adinamik Kemik hastalığı, $\text{OV}/\text{BV} < 11\%$, $\text{BFR}/\text{TV} < 210 \text{ mm}^3/\text{mm}^2/\text{gün}$, ve Normal kemik histolojisi $\text{OV}/\text{BV} 2-11\%$, $\text{BFR}/\text{TV} 210-600 \text{ mm}^3/\text{mm}^2/\text{gün}$.

Renal osteodistrofinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan kemik biopsilerinin yorumlanması için kemik döngüsü, mineralizasyon, volüm (TMV sistemi) olarak belirlenen üç histolojik tanımlayıcı kavram kullanılmaktadır (2) (Tablo 2, Şekil 3).

Tablo 2. Renal Osteodistrofide TMV Sistemi

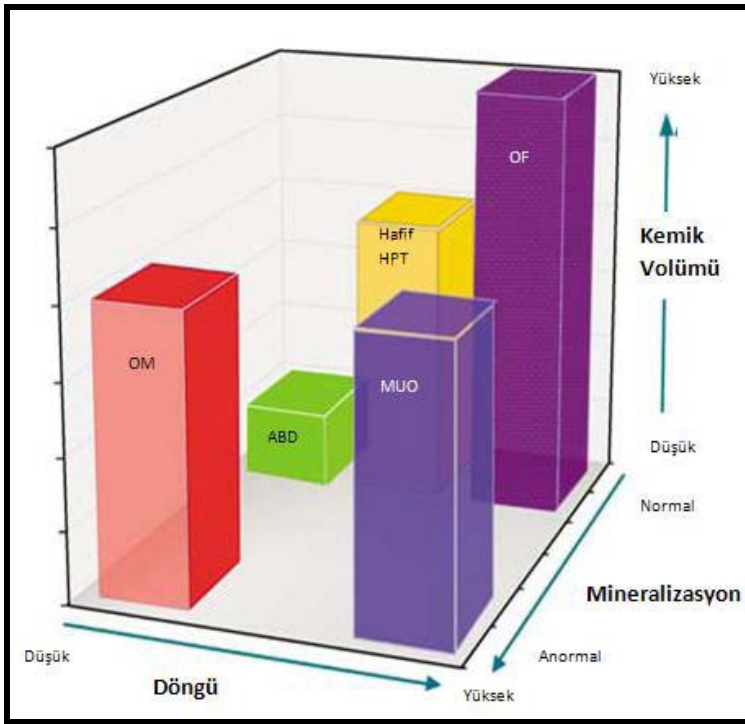
Döngü	Mineralizasyon	Volüm
Düşük	Normal	Düşük
Normal	Anormal	Normal
Yüksek		Yüksek

Kemik döngüsü (turnover) kemik oluşum ve rezorbsiyon süreci tarafından belirlenen iskelet yeniden şekillenmesini ifade eder. Çift tetrasiklinli işaretleme ile osteoblast işlevi dinamik olarak ölçülüp histomorfometrik olarak değerlendirilir. Kemik oluşum hızı ve aktivasyon sıklığı kemik döngüsünü değerlendirmek için kabul edilebilir parametreler sağlar.

Mineralizasyon iskelet yeniden şekillenmesinin oluşum fazında kemik kollajenin ne kadar iyi kalsifiye olduğunu ifade eder. Osteoid volüm ve osteoid kalınlığın statik ölçümleri, mineralizasyon duraklama zamanı ve osteoid maturasyon zamanının çift tetrasiklinli işaretleme ile dinamik olarak ölçülerek değerlendirilir. Mineralizasyonun

bozulma nedenleri D vitamini eksikliği, mineral yetersizliği, asidoz ve alüminyum toksisitesidir.

Volüm her bir doku başına düşen kemik miktarını gösterir. Kemik volümü süngerimsi kemikte statik olarak histomorfometrik olarak değerlendirilir. Bazen kortikal kemik volümü ve kalınlığının ölçümü ek bilgi sağlayabilir. Genel populasyon ve KBH hastalarında kemik volümünün belirleyicileri yaş, ırk, cinsiyet, genetik faktörler, endokrin bozukluklar, mekanik uyarılar, toksisiteler, nörolojik işlevler, vasküler dolaşımın yeterliliği, büyüme faktörler ve sitokinlerdir.



Şekil 3. Kemik Histomorfometrisinin TMV sınıflaması.

Her eksen TMV sınıflamasının tanımlayıcı kavramlarını göstermektedir: Döngü (düşük döngüden yükseğe), mineralizasyon (normalden anormale), kemik volümü (düşük volümden yükseğe). Her bir hastanın parametreleri grafik üzerine işaretlenebilir veya ortalamalar ve gruplanmış verilerin aralıkları gösterilebilir. Kırmızı sütun düşük kemik döngüsü ve anormal mineralizasyonla tanımlanan osteomalaziye (OM) göstermektedir. Kemik volümü osteopatinin şiddeti ve süresine ve diğer faktörlere bağlı olarak düşük ve orta derece arasında olabilir. Adinamik kemik hastalığını (AKH) temsil eden yeşil sütun, düşük kemik döngüsü, normal mineralizasyon ve düşük kemik volümünü göstermektedir. Sarı sütun (hafif hiperparatiroidiye –HPT- bağlı osteodistrofi) ve mor sütun (OF, osteitis fibrosa veya şiddetli hiperparatiroidizme bağlı osteodistrofi) orta, yüksek kemik döngüsü ve osteodistrofinin süresine bağlı olarak değişken kemik volümünü temsil eder. Mavi sütun (mikst üremik osteodistrofi, MUO) yüksek kemik döngüsü, normal kemik volümü, anormal mineralizasyonu gösterir. TMV sınıflama sistemi KHB’lığında meydana gelen kemik bozukluklarını kesin olarak tanımlar.

2.3 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI-KEMİK VE MİNERAL BOZUKLUKLARINDA HİSTOPATOLOJİK TİPLERİN ETYOPATOGENEZİ

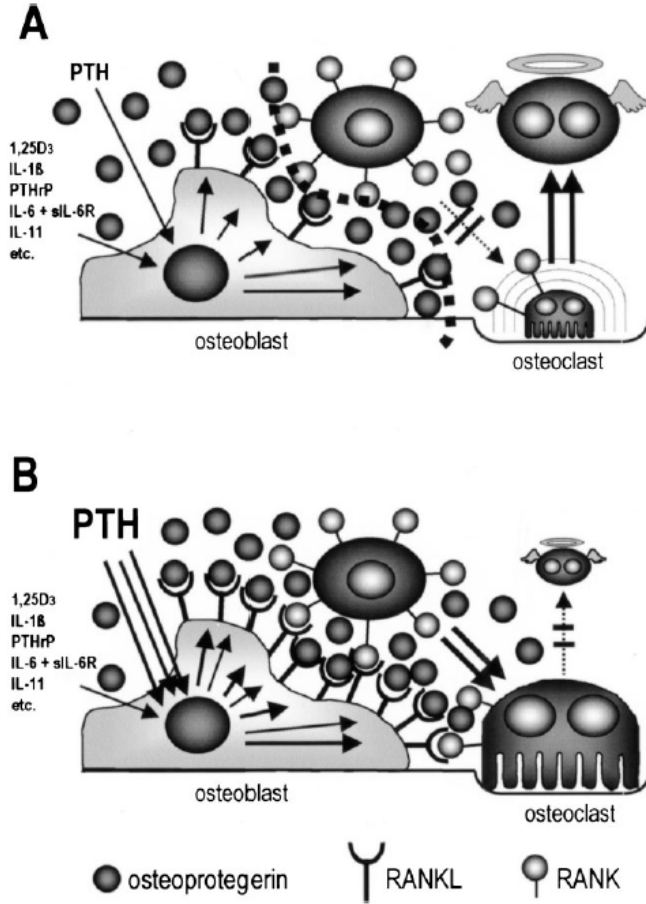
2.3.1 Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa B Ligand (RANKL), Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa B (RANK), Osteoprotegerin (OPG) Aksı

Osteoblast ve osteoklastlar arasındaki iletişim ve aktivasyon mekanizmaları tam anlaşılacakla birlikte reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ligand (RANKL), reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B (RANK), osteoprotegerin (OPG) aksının tespit edilmesi bu karmaşık etkileşimin kısmen de olsa anlaşılmasını sağlamıştır. OPG, osteoblastlar tarafından üretilen, *in vitro* osteoklastik aktivasyonu, *in vivo* kemik rezorpsiyonunu inhibe eden bir proteindir (18). RANKL (TNF ile ilişkili protein) osteoklastogenezisin düzenlenmesinde anahtar rolü olan bir faktördür. Osteoblastlar, aktive stromal hücreler ve sinovyal fibroblastlar da RANKL ekspresyonu yapmaktadır. RANKL bu hücrelerin yüzeyinde bulunan tip II transmembran proteinidir ve eriyik haldeki şekli proteolitik olarak salınır (19).

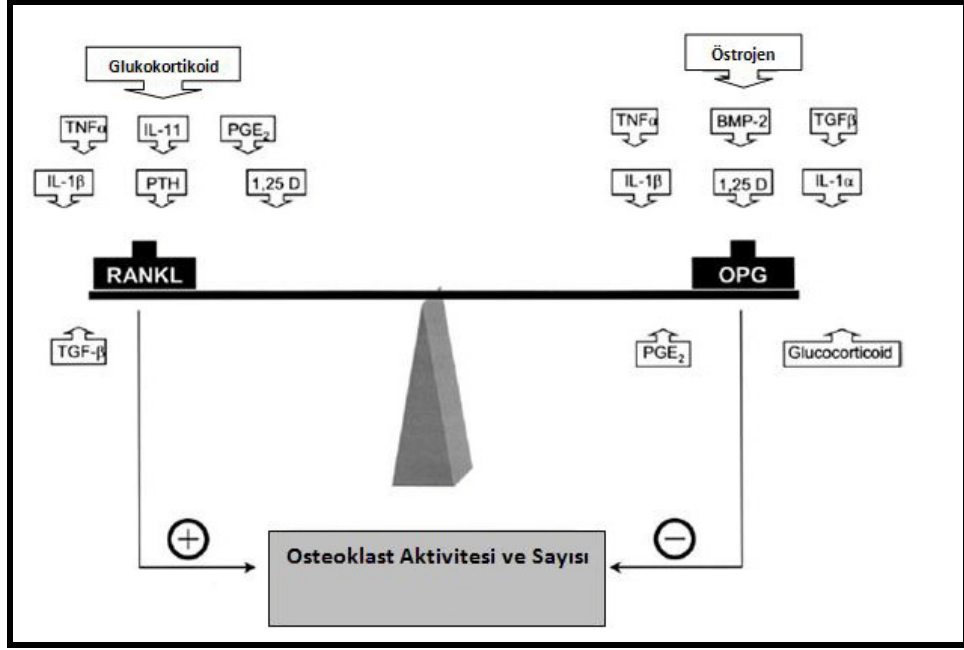
Osteoklast öncülü olan hücreler (progenitör) yüzeylerinde RANKL için reseptör olan RANK eksprese (ifade) ederler. RANK ve RANKL bağlanması osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonuna ayrıca bu reseptörleri yüzeylerinde eksprese etmelerine neden olur (20). RANKL için tuzak reseptör olan OPG, RANKL'ın RANK'a bağlanmasını engeller ve böylece osteoklastogenezisin aktivasyonu inhibe olur. RANKL/OPG oranı osteoklast gelişimi için temel bir faktördür. Osteoblastlar olgunlaştığında RANKL ekspresyonu düşerken OPG ekspresyonu değişmeden kalır (21). Bu da osteoblastların olgunlaşma durumuna bağlı olarak osteoklastogenezisi hem inhibe hem de kontrol ettiğini gösterir. Ayrıca, osteoblast farklılaşmasının ana düzenleyicisi olan BMP (kemik morfojenik protein) ve Wnt ('Wingless integration site' genleri) de RANKL/OPG aksını etkileyebilir. Bu bulguların tümü kemik yeniden şekillenmesi sırasında kemik oluşum ve rezorpsiyon dengesinin kompleksliğini vurgulamaktadır.

RANKL/RANK/OPG sistemi PTH, kalsitriol, östrojen, glukokortikoidler, interlökinler, transforming growth faktör- β (TGF- β) gibi hormon ve sitokinler

tarafından oldukça sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Şekil 5). Bu sistem kemik yeniden şekillenmesinin son ortak yolağı olarak düşünülebilir. Üremik koşullarda ise bu aks belirgin olarak etkilenmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Üremide OPG birikiminin rolü. (A) PTH düzeyi normal veya düşük. (B) PTH düzeyi yüksek. OPG birikimi PTH düzeyinden bağımsız olarak meydana gelir. PTH düzeyi yüksek olduğunda osteoblast yüzeyinde çok miktarda RANKL eksprese edilmektedir. RANKL aktivitesinin OPG tarafından engellenmesi tespit edilmemektedir (B). Tedavi ile PTH supresyonu sonrası meydana gelir (A).



Şekil 5. RANKL ve OPG'nin osteoklast aktivitesi ve sayısı üzerine etkisinin diagram olarak gösterilmesi

2.3.2 Sekonder hiperparatiroidizmin (sHPT) Patogenezi

ROD'de kemik yeniden şekillenmesi, kemik oluşum ve rezorbsiyon dengesinin düzenlenmesi bozulur. Sekonder hiperparatiroidinin (sHPT) bu süreçten sorumlu olduğu uzun zamandır bilinmektedir. PTH osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu artırarak ve OPG ekspresyonunu azaltarak (RANKL/OPG oranını değiştirerek) osteoklastogenezisi ve kemik rezorbsiyonunu artırır (Şekil 4) (22). PTH'ın osteoblastogenezis ve kemik oluşumu üzerindeki etkileri oldukça az bilinmektedir.

Yapılan hayvan çalışmalarında genetik olarak PTH defekti (*PTH -/-*) oluşturulmuş farelerde kemiğin büyüyen parçasında (spongiosa) osteoblast sayısının azalması nedeniyle büyüme durakladığı gösterilmiştir. (23). Ayrıca, bu farelerde kortikal kalınlık artarken osteoblast defekti trabeküler kemik kütlelerinin düşmesine neden olmaktadır. PTH *-/-* farelerde osteoblast sayısının azalmasının mezenkimal hücrelerden osteoprogenitör hücrelere dönüşümün azalmasına ve osteoblast apoptozunun artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. PTH *-/-* farelerde sonradan

kemik rezorbsiyonunun azalması yüzünden trabeküler kemik kütlesi ve PTH ilişkili peptitlerin anabolik aktivitesi artmaktadır (24).

PTH'nin kortikal ve trabeküler kemik üzerinde etkilerinin farklı olduğu görülmektedir. PTH reseptörünün aktive olması kortikal kemiğin azalmasına ve trabeküler kemiğin artmasına neden olur (25). Osteoklast sayısı ve kemik rezorbsiyonu kortikal ve trabeküler kemikte artarken osteoblast sayısı periost altında azalır fakat trabeküler kemik ve endosteumda artar. Primer hiperparatiroidizmde yapılan kemik dansitometrisi (26) ve histoloji (27) çalışmaları kortikal kemik kaybı ile birlikte trabeküler kemiğin korunduğunu veya arttığını ortaya çıkarmıştır. Benzer bulgular ROD ile birlikte sekonder hiperparatiroidide tanımlanmıştır (28). Sonuç olarak, paratiroid hormon artışı kortikal poroziteyi artırırken trabeküler kemik hacmini koruyor veya artırıyor görünmektedir.

In vitro çalışmalarda PTH'un aralıklı olarak verilmesi osteoblast proliferasyonunu uyarırken sürekli verilmesi inhibe ettiği gösterilmiştir. (29). Aralıklı PTH verildiğinde artan osteoblast sayısı mezenkimal kök hücrenin osteoblastlara farklılaşmasından çok osteoblast ömrünün uzamasına ve apoptozun azalmasına bağlı olabilir (30). Diğer hücre serilerinin veya osteositlerin osteoblastlara dönüşümü osteoblast sayısında artışa katkı sağlayan başka bir faktör olabilir (31). Ayrıca, *in vitro* çalışmalar PTH'nin mezenkimal kök hücreyi osteoblast serisine farklılaşması için uyardığını ancak olgun osteoblastlara farklılaşmayı kontrol etmek için yetersiz olduğunu da göstermiştir (32).

PTH'nun uzun süreli ve yüksek düzeyde kalması kemik iliğinde fibrozise de yol açar (33). Kemik iliği fibrozisi osteitis fibrosanın patolojik bulgusudur. Fibrozis hem primer hem de sekonder hiperparatiroidide görülür. Gerçekte pre-osteoblast olan fibroblast benzeri hücrelerin kemik iliği fibrozisinden sorumlu olduğu düşünülmektedir (35). Bu hücreler PTH'a yanıt olarak proliferasyon gösteren osteoblast öncüllerini (progenitor) eksprese ederler ancak osteoblastta farklılaşması bozuktur ve kemik oluşturamazlar. Fibroblast benzeri hücreler PTH uyarısı ile mezenkimal kök hücreden kaynaklanmakta ve tam olarak osteoblastlara farklılaşmamaktadır. Böbrek

işlevlerinin normal olduğu primer hiperparatiroidide bu hücreler PTH düzeyinin normale döndürülmesinden sonra tamamen osteoblastlara dönüşmektedir. Bu bulgular PTH'nin osteogenezisin kontrolünde yetersiz bir faktör olduğunu göstermektedir.

Pre-osteoblast olduğu düşünülen, fibroblast benzeri hücreler osteogenezi kontrol eden faktörler tarafından osteoblastlara dönüştürülebilir. Kemik morfojenik faktörler (BMPs) kemik üzerinde oldukça güçlü anabolizan etkisi olan faktörlerdir. Bu faktörlerden biri olan BMP-7 primer olarak böbrekler tarafından üretilir ve normal böbrek gelişimi için gerekli bir faktördür (34). BMP-7'nin farelerde genetik delesyonu displastik böbrek, iskelet gelişmesine ve lens defektlerine yol açmaktadır. BMP-7'nin mezenkimal kök hücrenin osteoblast serisine farklılaşmasını kontrol edebilen tek faktör olarak yeterlidir. Bu nedenle BMP-7 osteitis fibrosanın tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bir hayvan modelinde, BMP-7 tedavisi KBH ve sHPT peritrabeküler fibrozisi tamamen geri döndürmüştür (35) ve kemik iliği fibrozisindeki gerileme PTH düzeyinden bağımsızdır. Ayrıca, BMP-7 osteoblast sayısını ve kemik oluşumunu daha da artırmaktadır.

Böbrek işlevleri normal ve primer hiperparatiroidizm tespit edilen hastalarda PTH düzeyinin normale dönmesiyle kemik yeniden şekillenmesi normale döner (36) ancak aynı durum sHPT'de görülmez.

2.3.3 Adinamik Kemik Hastalığının Patogenezi (AKH)

KBH'nın klinik seyrinde PTH'un düzeyinin düşük olmasının yanı sıra fizyolojik düzeylerde de AKH ortaya çıkabilmektedir (37). Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Üremik kemik PTH'nun etkisine bir şekilde dirençlidir ve iskelet yeniden şekillenmesini sürdürmek için hormon düzeylerinin fizyolojik sınırların üstünde olması gerekir. Kemiğin PTH'a karşı dirençli olması sadece KBH'na özgü bir durumdur.

AKH'da kemik oluşumunun düşük olmasının birçok nedeni vardır. D vitamini yetersizliği, fosfor düzeyinin yüksek olması, metabolik asidoz ve dolaşımda sitokin düzeylerinin yüksek olması, östrojen ve testosteron düzeylerinin düşük olması gibi faktörler düzeltilebilir nedenler arasındadır. PTH direnci, dolaşımdaki inhibitör PTH fragmanlarının (PTH geniş C fragmanı) üremik durumda artmış olması ve kemikte

PTH reseptör ekspresyonunun azalması hipotezi ile açıklanabilir. (37). Biriken PTH (7-84) fragmanı sHPT'de azalmış olan PTH reseptörüne bağlanarak PTH'ın kemik üzerindeki anabolik etkilerini antagonize eder (38). PTH da kendi reseptörlerinin downregülasyonuna neden olur. PTH'ın osteoblast farklılaşmasındaki yetersizliği dikkate alındığında AKH'de kemik yeniden şekillenmesinin belirgin olarak kaybı sadece PTH direncine bağlanamaz.

Genetik olarak LDL reseptör defekti (*LDL -/-*) oluşturulmuş fareler fazla yağlı diyetle beslendiklerinde kemik yeniden şekillenmesinde belirgin olarak düşme görülmüştür (39). KBH oluşturulmuş, *LDL -/-*, fazla yağlı diyetle beslenen farelerde belirgin sHPT gelişmesine rağmen AKH gelişmiştir. Bu bulgular KBH'nın doğrudan kemik yeniden şekillenmesinin azalmasına katkısı olduğunu ve bu durumun PTH etkisinden kısmi olarak bağımsız olduğunu göstermektedir. KBH'da kemik yeniden şekillenmesini kontrol eden faktörlerin kaybolması veya kemik anabolizması inhibe eden faktörlerin birikmesi VDR (D vitamini Reseptörü) aracılı yolları veya diğer mekanizmaları bozarak kemik oluşumunun azalmasına neden olur. 1,25 dihidroksivitamin D düzeyinin düşük olması VDR ekspresyonunun düşük olmasına neden olur. VDR, osteoblast farklılaşmasını doğrudan artırdığından normal kemik oluşumu ve mineralizasyonu için en önemli faktördür. Osteoblastlar üzerindeki VDR'nün aktivasyonu osteoblast apoptozunu da önler (40). Ayrıca, osteoblastların 1α -hidroksilaz aktivitesi vardır ve 1,25 dihidroksivitamin D üretirler. Serum PTH düzeyinin yüksek olması bazı hastalarda yüksek döngülü kemik hastalığına neden olurken bazı hastalarda eşlik eden durumların katkısıyla VDR downregülasyonuna yol açar. Bu durum kemik oluşumunun daha da düşmesine neden olur. Yüksek fosfat düzeyi böbreklerden 1α -hidroksilaz ekspresyonunu düşürerek 1,25 hidroksivitamin D düzeyini, kemiklerde ve paratiroid bezinde VDR ekspresyonunu azaltır. Metabolik asidoz da 1α -hidroksilaz aktivitesini inhibe eder ayrıca doğrudan osteoblast işlevlerini etkileyerek kollajen sentezini azaltır. Osteoklastik aktiviteyi artırarak kemik rezorbisyonunu uyarır. Tüm bu faktörler osteoblastik aktiviteyi azaltarak kemik oluşumunun düşmesine neden olmaktadır. İleri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) birikimi de osteoblastik apoptozu kolaylaştırır. Ürik asit birikimi ise 1,25 dihidroksivitamin D sentezini baskılamaktadır.

Ostoblast apoptozunun düzenlenmesi kemik oluşum hızını belirleyen ana mekanizmalardan biridir. Kemik yeniden şekillenme birimlerinde osteoblastların yaklaşık %60-90'ı apoptozis ile ölmekte ve geri kalanlar ise osteosit ve diğer kemik çizgisindeki hücrelere dönüşmektedir. Aktif osteoblastlardaki antiapoptotik proteinler TGF β , Wnt, IGF-1, FGF-2, PTHrP ve IL-6 iken östrojen, androjen ve D vitamini analogları antiapoptotik hormonlardır. Aralıklı olarak PTH enjeksiyonu kemik oluşumu ve kitlesini artırarak antiapoptotik etki gösterir. TNF α , IL-1, BMP ve AGE ise proapoptotik proteinlerdir.

2.3.4 Sitokinlerin Renal Osteodistrofideki Rolü

Kronik böbrek yetersizliğinde (KBY) birçok sitokin kemik yeniden şekillenmesini siklusunun farklı evrelerinde etkileyebilir ve yeniden şekillenme (remodelling) bozukluklarının patogenezinde önemli rolleri vardır. Diyaliz hastalarında interlökin-1 (IL-1) düzeyinin yüksek olması kemik döngüsünü etkiler. IL-1 reseptör antagonisti (IL-1Ra) de KBY hastalarında yüksek olarak bulunmaktadır ve IL-1Ra ile osteoblast yüzeyi arasında ters bir ilişki tespit edilmiştir (41). Bir diğer yeniden şekillenme aktivatörü olan tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) da üremik hastaların serumunda yüksek olarak bulunmaktadır.

Osteoklasteogenesis ve osteoklast işlevleri RANK/RANKL/OPG sisteminin yanı sıra rezorbtif bir sitokin olan IL-6 tarafından da etkilenmektedir. Diyalize girmeyen böbrek yetersizlikli hastalarda ve diyaliz hastalarında IL-6 ve etkisini düzenleyen solubil IL-6 reseptörü (sIL-6R) düzeyi yüksektir. Üremik hastalarda sIL-6R/IL-6 oranı ile osteoklast yüzeyi arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiştir (41). Ayrıca üremik hastalarda osteoklastlarda IL-6 reseptörünün mRNA ekspresyon düzeyinin osteoklastların rezorbtif kapasitesi ile paralel olduğu tespit edilmiştir (42). sIL-6R/IL-6 düzeyindeki dengenin bozulması ile birlikte paratiroid bezi işlevlerindeki ve kalsitriol düzeylerindeki değişikliklerin yüksek veya düşük döngülü kemik hastalığına yol açtığı kabul edilmektedir. Bu sonuçlara göre IL-6, PTH ve kemik rezorbsiyonunu uyaran diğer faktörleri etkileyebilen bir faktördür (43). Tüm bu sitokinler osteoblast işlevlerini doğrudan azaltarak adinamik kemik hastalığı gelişimine katkıda bulunabilir.

Osteoblast büyümesi, farklılaşması ve aktivitesini düzenlediği bilinen faktörlerin de üremik durumda değiştiği bilinmektedir. Üremide insülin benzeri büyüme faktörünün (IGF-1) arttığı ve KBH olan hastalarda kemik oluşum hızı ile IGF-1 arasında PTH'dan bağımsız bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir (44). IGF-1 düzeyinin ya da IGFBP-5 (İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein) düzeyinin düşük olmasına bağlı kemik oluşumu azalabilir. Açıklandığı gibi BMP-7 büyük oranda böbreklerde üretilmektedir. Akut veya kronik böbrek yetersizliği olan bazı hayvan modellerinde BMP-7 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (45). Renal hasar sonucu BMP-7'nin kaybının AKH patogeneze katkıda bulunabilir. BMP-7 AKH'lı hayvan modellerinde kemik yeniden şekillenmesini düzeltmektedir. BMP-7 eksikliği potansiyel olarak PTH direncine neden olmasına rağmen BMP-7'nin PTH reseptör ekspresyonunu artırdığı ve osteoblast benzeri hücreler üzerinde PTH etkisini artırdığı gösterilmiştir (46). Ayrıca BMP-7 ve Wnt aktivitesinin olmaması durumunda kemik iliğinde kök hücre regülasyonu için PTH düzeyinin yüksek olması gerekir (47).

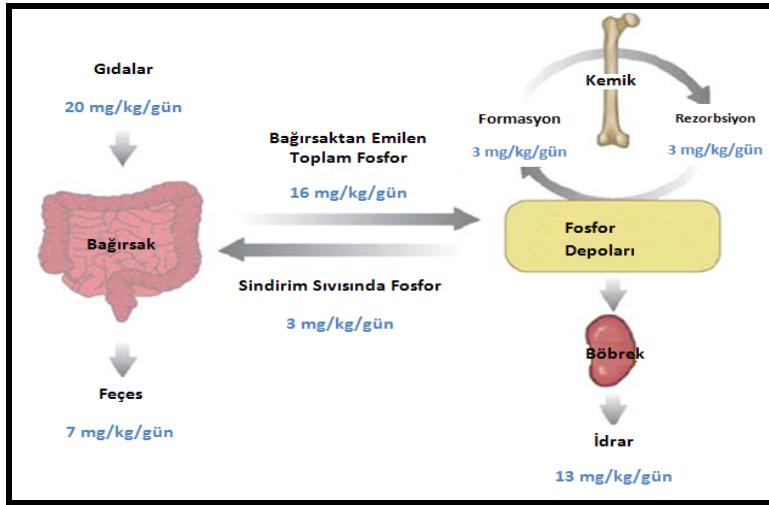
2.4 FOSFAT HOMEOSTAZI

Fosfat hücre yapısı ve metabolizmasında önemli rolü olan ana minerallerden biridir. Enerji metabolizması, proteinlerin fosforilasyonu aracılığıyla hücrelerdeki sinyal yollarının aktivasyonu, nükleik asit metabolizması, hücre bütünlüğü ve kemik metabolizmasında fosfat primer olarak rol alır. Erişkin bir erkekte vücudunda toplam 15-20 mol arasında (12 g/kg) fosfat bulunmaktadır bunun da çoğunluğu (%80-90) kemik ve dişlerde kalsiyumla birlikte hidroksiapatit oluşturur. Geri kalan fosfat yumuşak dokuda, hücre dışı sıvıda ve eritrositlerde bulunmaktadır. Yumuşak doku fosfor miktarı dokuların yaş ağırlığının %0,02'si kadardır. Plazma veya serumda fosfor inorganik fosfor (Pi, 0,71-1,36 mmol), lipid fosforu (2,23-3,13 mmol) ve fosforik asit (0,86-1,45 mmol) olarak bulunur. Plazmada vücut toplam fosforunun küçük bir kısmı bulunmaktadır ve inorganik fosfat vücuttaki toplam fosfor depolarını yansıtmaz. Fosfatın atom ağırlığı 31'dir, [mmol/L= (mg/dl x 10)/molekül ağırlığı] formülü ile mmol/L olarak ölçülebilir.

Hücre dışı fosfat konsantrasyonu kalsiyum kadar sıkı bir şekilde kontrol edilmez. Gün içinde konsantrasyonu oldukça değişkendir. Sabah erken saatlerde en düşük

değerindeyken en yüksek değerine akşam 20:00 civarında ulaşır. Ayrıca yaz aylarında kış mevsimiyle karşılaştırıldığında daha yüksektir.

Yeterli fosfat içeren bir diyetle yaklaşık 20 mg/kg/gün (~1500 mg) fosfat alınmaktadır. Bunun yaklaşık 16 mg/kg/gün (~1100 mg) ince bağırsaktan emilmekte ve 3 mg/kg/gün (~200 mg) pankreatik ve ince bağırsak salgıları ile sekrete edilmektedir. Böylece net 13 mg/kg/gün (~900 mg) emilimi olmakta, 7 mg/kg/gün fosfor feçesle atılmaktadır. Emilen fosfor hücre dışı sıvıya geçmekte ve ihtiyaç durumuna göre kemiklere yerleşmekte veya kemiklerden çıkmaktadır (~3 mg/kg/gün). Kemiğin yeniden şekillenme hızı (oluşum ve rezorbsiyon) serum fosfor konsantrasyonunun belirlenmesi için önemli bir faktördür. Plazma fosforu glomerullardan filtre edilir ve tubuler sıvıya geçer. Kalsiyum gibi plazma proteinlerine bağlı olmadığından fosforun tamamı tubuler sıvıya geçer ve plazma ile yaklaşık aynı konsantrasyonda bulunur. Yaklaşık 13 mg/kg/gün fosfor, bağırsaktan emildiği miktara eşit miktarda idrarla atılır (48) (Şekil 6).



Şekil 6. İnsanlarda Fosfor Homeostazı

(Theresa J. Berndt, Susan Schiavi and Rajiv Kumar. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F1170–F1182'den alınmıştır.)

Fosfor ince bağırsaktan, özellikle jejunumdan, transselüler ve paraselüler olarak emilmektedir. Transselüler mekanizma sodyum-fosfat tip IIb kotransporter (NaPi-IIb) sistemi ile sağlanmaktadır (49). Fosfat emiliminin paraselüler yolağında fosfor emilimi bağırsak lümenindeki fosfor konsantrasyonuna bağlıdır. Diyetle alınan fosfor

miktarı arttıkça fosfor emilimi de artmaktadır. Fosfor dolaşıma veya hücre dışı sıvıya ulaştıktan sonra fosfor kemikler başta olmak üzere çeşitli dokulara girer. Bunun bir kısmını da NaPi-III kotransporter aktivitesiyle sağlar. Plazma inorganik fosfatı glomerullere filtre olduktan sonra büyük bir bölümü proksimal tubulden NaPi-IIa kotransporter aracılığıyla geri emilir (50). NaPi-IIa kotransporter aktivitesi serum Pi düzeyi düşüklüğü ve 1,25 (OH)₂ D₃ vitamini ile artırılırken PTH ve fosfatoninler tarafınan azaltılır.

Fosfor homeostazının düzenlenmesi paratiroid hormon ve D vitaminin rol aldığı kompleks bir olaydır. Ancak inorganik fosfat homeostazına paratiroid hormon ve D vitamininin yanı sıra fosfatonin [Fibroblast growth faktör-23 (FGF-23) ve klotho, fibroblast growth faktör-7 (FGF-7), secreted frizzled-related protein 4 (sFRP-4), matriks ekstraselüler fosfoglikoprotein (MEPE)] olarak tanımlanan faktörler de katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, diyetteki fosfat miktarı, dopamin, adrenerjik aktivite ve kan pH'ı da plazma inorganik fosfor konsantrasyonunu etkiler. Bağırsaktaki fosfat konsantrasyonunun artması ile salınan özgün intestinal faktörler ('intestinal fosfatoninler') fosfatın böbreklerden geri emilimini değiştirmektedir (51). İntestinal fosfatoninler gıdalarla fosfat alındıktan sonra böbreklerden fraksiyone fosfat ekskresyonunu akut olarak etkilemekte ve diyetteki fosfat değişikliklerine akut adaptasyonda rol alıyor görünmektedir. Diyetteki fosfat değişimine uzun süreli adaptasyon PTH, kalsitriol ve fosfatoninlerce sağlanmaktadır.

FGF-23 ve sFRP-4 proksimal tubulden fosfat geri emilimini, 1,25(OH)₂D₃ sentezini ve bağırsaklardan fosfat emilimi azaltarak doğrudan ve dolaylı olarak negatif fosfat dengesi sağlar. FGF-7 ve MEPE ise böbrek epitelyal hücrelerde fosfat transpotunu inhibe eder ve MEPE'nin fosfatürük etkisi vardır. Ancak FGF-7 ve MEPE'nin hipofosfatemiyeye sekonder olarak 1,25(OH)₂D₃ artışını önlediği veya 1 α hidroksilaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmemiştir.

Kronik böbrek hastalığında ise fosfat homeostazı gastrointestinal emilim, spesifik hedef organlarda etkisini gösteren bir takım hormonlar tarafından endokrin kontrol [paratiroid hormon, D vitamini, fibroblast büyüme faktörü (FGF-23) ve klotho] ve renal ekskresyon tarafından sürdürülür. Kalsitriol üretiminin azalması kalsiyumun intestinal emilimin azaltarak hipokalsemiye neden olur. Hipokalsemi tarafından PTH

sekresyonunun uyarılması glomeruler filtrasyon hızının düşmesine rağmen fosfat ekskresyonun artırır.

Kalsitriol üretiminin azalması ayrıca osteosit ve osteoblastların FGF-23 üretimi için olumsuz bir sinyaldir. FGF-23 böbreklerde hem fosfat emilimini hem de kalsitriol sentezini inhibe eder (52).

Kronik böbrek hastalığında önemli bir tampon sisteminin kaybedilmesine rağmen hiperfosfatemi fosfatın intraselüler ortama geçmesi veya kemik, yumuşak dokuya birikimi ile düzeltilebilir. Bu nedenle iskelet, kronik böbrek hastalığında mineral düzeylerini tamponlayabilme kapasitesi nedeniyle fosfat dengesinde anahtar faktör olarak görünmektedir. Bu açıdan bakıldığında, bozulmuş mineral metabolizmasının yol açtığı klinik sonuçların önlenmesinde kemiğin sağlıklı olmasının çok büyük önemi vardır (53). Kronik böbrek hastalığında kemikler fosfat tamponlaması yapamaz ve hiperfosfatemi artırır. KBH’da kemik yeniden şekillenmesinin dengesi düşük veya yüksek döngü yönünde olabilir. Adinamik kemik hastalığında mineraller düşük döngü ve mineral alım kapasitesinin düşük olması yüzünden kemiğe normal olarak giremez. Hiperparatiroid kemik hastalığında ise kemikten net mineral çıkışı olur. Bu yüzden her iki durum hiperfosfatemiye katkıda bulunur. Kemiğin rezervuar işlevini yapamaması pozitif fosfat dengesine yol açar. Kemikler artan fosfat düzeylerini kompanse edemediği zaman damarlar ve yumuşak dokular mineral birikimi için hedef organ haline gelmektedir

Serum fosfat düzeyi tüm vücut fosfatının duyarlı olmayan bir ölçümüdür. Vücuttaki fosfatın sadece % 1’i serumda bulunmaktadır ve sabah ve akşam ölçümleri arasında yaklaşık % 30 fark tespit edilebilmektedir. Serum fosfat düzeyi glomeruler filtrasyon hızı 30 ml/dk’nın altına düşünceye kadar mineral homeostazının diğer parametrelerinde bozukluklar meydana gelmesine rağmen normal sınırlara arasında kalabilmektedir. (54). NHANES (National Health & Nutrition Examination Survey) III veritabanında 14772 hastanın bilgileri analiz edildiğinde, kreatinin klirensindeki her 10 ml/dk’lık düşüşün serum fosfat düzeyini sadece 0,03 mmol/L (0,093 mg/dl) artırdığı, kreatinin klirensi 20 ml/dk’nın altına düşünceye kadar serum fosfat düzeyinin böbrek işlevleri normal olan kişilerden sadece 0,30 mmol/l (0,93 mg/dl) yüksek olduğu görülmüştür (55). Bu ince değişiklikler ve gece gündüz değişkenliği

serum fosfat ölçümünün evre III ve IV kronik böbrek hastalığında klinik kullanım değerini azaltmaktadır.

2.4.1 Fosfatoinler

Fosfatoin terimi, ilk defa 1994 yılında tümörün neden olduğu osteomalazi olgularında (TIO) proksimal tubul hücrelerinde fosfat transportunu etkileyen faktör veya faktörleri tanımlamak için kullanılmaya başlanmıştır. Fosfatoinler cAMP'den bağımsız olarak etki gösteren, 25-hidroksivitamin D'nin 1- α hidroksilasyonunu azaltan dolaşımdaki fosfatürik faktörlerdir. Sonuç olarak hipofosfatemiyeye neden olmaktadır (56).

2.4.1.1 Fibroblast Growth Faktör-23/Klotho Aksı

Fibroblast growth faktor-23 (FGF-23) serum fosfat düzeyini düşüren bir hormondur. Serum fosfat düzeyi yükseldiğinde kemiklerden salınır ve böbreklerde fosfatürik ve D vitamini sentezini baskılayıcı olarak etki gösterir. FGF-23'ün FGF reseptörüne bağlanabilmesi için bir koreseptör olan Klotho'ya ihtiyacı vardır.

FGF-23 ilk defa otozomal dominant hipofosfatemik rikets (ADHR) hastalarında mutant bir gen olarak tespit edilmiştir (57). ADHR hastalarında FGF-23 geninde missense mutasyonu vardır ve bu mutasyon FGF-23'ün proteolitik yıkımını engeller. Sonuç olarak ADHR hastalarında FGF-23 düzeyi yüksektir. FGF-23 etkisi sonucu negatif fosfat dengesi meydana geldiğinden bu hastalarda hipofosfatemiyeye ve rikets gelişir. FGF-23'ün yüksek olmasının neden olduğu birçok fosfat kaybettirici sendrom tespit edilmiştir. Onkojenik osteomalazi veya tümörün neden olduğu osteomalazi (TIO) FGF-23 üreten tümörler tarafından oluşturulur ve tümörün çıkarılmasından sonra FGF-23 düzeyi zamanla normale döner (58). X'e bağlı hipofosfatemik rikets (XLH) ve otozomal resesif hipofosfatemik rikets (ARHR) sırasıyla PHEX ve DMP-1 (dentin matriks protein-1) genlerindeki mutasyon nedeniyle meydana gelir. PHEX X kromozomu üzerindeki endopeptidazlarla benzerlik gösteren fosfat düzenleyici bir gen dir ve fosfatürik peptitlerin parçalanmasından sorumludur. Osteositler tarafından eksprese edilen bu iki gen FGF-23'le birlikte üretilir ve sekrete edilir. PHEX gen delesyonu olan Hyp

farelerinde (İnsanlardaki X'e bağlı hipofosfatemik Rikets eşdeğeri fareler) XLH hastalarında görüldüğü gibi FGF-23 ekspresyonu ve serum düzeyi yüksektir. Buna bağlı olarak hipofosfatemi ve kemik mineral bozukluğu görülmektedir (59). DMP-1 geni olmayan farelerde de ARHR hastalarında olduğu gibi FGF-23 seviyesi yüksektir ve fosfat kaybettirici bir fenotip mevcuttur. Familial tümöral kalsinozis (FTC) ise fosfat kaybettirici hastalıkların aksine serum FGF-23 düzeyinin düşük olmasına bağlı olarak hiperfosfatemi ve ektopik kalsifikasyonlarla karakterizedir. FTC GALNT3 genindeki mutasyon tarafından oluşturulur. Bu gen bir glikozil transferaz olan enzimi kodlar. Bu enzim FGF-23'ün parçalanma bölgesinin O-glikolizasyonunu sağlayarak FGF-23'ü proteolitik parçalanmaya duyarlı hale getirir (60). FGF-23'ün hiç sentezlenmediği farelerde yaygın yumuşak doku kalsifikasyonları ve hiperfosfatemi meydana geldiği gözlenmiştir. (61).

FGF-19, FGF-21 ve FGF-23 diğer klasik FGF'lerin aksine etkilerini endokrin olarak gösterir ve endokrin FGF'ler olarak adlandırılırlar. Endokrin olarak etki göstermelerinin nedeni heparan sülfata (HS) afinitelerinin düşük olması olabilir. Genel olarak FGF ligandlarının HS bağlayıcı bölgenin bulunduğu 12 antiparalel sarmalından oluşan bir çekirdek bölgesi vardır. Endokrin FGF'lerin HS bağlayıcı bölgeleri diğer parakrin etkili FGF'lerden farklıdır ve bu fark HS ile HS bağlayıcı bölgedeki aminoasit kalıntıları arasında hidrojen bağı oluşumunu engeller. Böylece heparan sülfat afinitesi azalır. Endokrin FGF'lerin HS afinitesinin düşük olması bu faktörlerin HS'tan zengin hücre dışı matriksten kurtularak sistemik dolaşıma katılmalarını sağlar. HS afinitelerinin düşük olması, endokrin olarak etki gösterebilmeleri için avantaj olsa da endokrin FGF'lerin FGF reseptörlerine (FGFR) yüksek afinite ile bağlanabilmeleri için HS gerekli olduğundan dezavantaj yaratan bir durumdur. Bu nedenle endokrin FGF'lerin FGFR'üne bağlanarak aktivasyon ve dimerizasyon sağlayabilmek için bir kofaktöre ihtiyacı vardır. Bu kofaktörde klothodur (62)

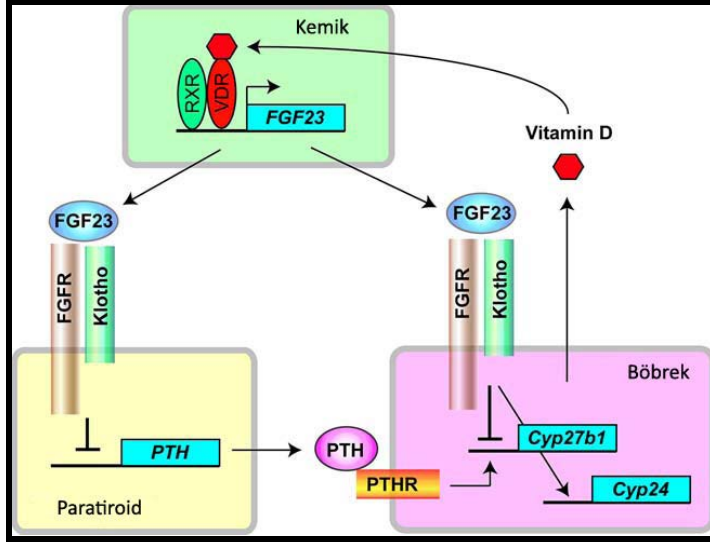
Klotho ilk defa otozomal ressesif olarak aktarılan, kalıtsal bir erken yaşlanma sendromu olan fare ırkında mutant bir gen olarak tespit edilmiştir (63). Klotho gen ekspresyonu yapamayan farelerde doğumdan 3-4 hafta sonra büyümede duraklama, hipogonadotropik hipogonadizm, timus atrofisi, cilt atrofisi, sarkopeni, vasküler kalsifikasyon, osteopeni, amfizem, işitme bozuklukları ve motor dejenerasyon gibi

yaşlanma benzeri fenotip geliştirmekte ve bu fareler ortalama iki ay içinde ölmektedir. Klotho genini fazla eksprese eden transgenik fareler ise normalden daha uzun yaşamaktadır. Bu nedenle klotho geni yaşam süresini uzatan, yaşlanmayı önleyen bir gen olabilir (64). Klotho polimorfizmi insanlarda da yaşam süresinin yanı sıra kemik mineral dansitesini, yüksek dansiteli lipoproteini, kolesterol düzeyini, kan basıncını, koroner arter hastalığını ve kognitif işlevleri etkileyerek yaşlanma sürecinin düzenleyicisi olabilir. Klotho geninin kodladığı transmembran proteini böbreklerde proksimal tubüllerde ve beyinde koroid pleksusta bulunur (63). Klotho proteinin *in vitro* zayıf β glukuronidaz aktivitesi vardır (65)

Klotho proteinin işlevi FGF-23 ve klotho sentezleyemeyen farelerde benzer fenotipin geliştiğinin farkedilmesiyle anlaşılmıştır. Her iki durumda da erken yaşlanma ve hiperfosfatemi gelişmektedir. Bu durum klotho ve FGF-23'ün ortak sinyal iletim yolunu kullandıklarını göstermiştir. Aslında, klotho proteini birçok FGF reseptör izoformu ile (FGFR1c, 3c, 4) ikili kompleks oluşturur ve özellikle FGF-23'ün bu FGF reseptörlerine afinitesini belirgin olarak artırır (66). Bu nedenle klotho proteini FGF-23 için zorunlu kofaktördür. Klothonun böbrekte özgün bir biçimde eksprese olması, FGF izoformlarını eksprese eden diğer birçok organ arasında neden böbreğin FGF-23'ün hedef organı olduğunda açıklar. Klotho proteini FGF-23'ün heparan sülfata karşı düşük olan afinitesini kompanse eder ve FGFR'ünün FGF-23 ile aktivasyonunu sağlar.

FGF-23 ve klotho tarafından düzenlenen kemik böbrek aksı fosfat homeostazının en önemli düzenleyicisidir. FGF-23 proksimal tubüllerin fırçamsı kenarında sodyum-fosfat kotransporter (NaPi-IIa) sayısını azaltır ve böylece böbreklerden fosfat ekskresyonunu kontrol eder. Ayrıca FGF-23 proksimal tubüllerde D vitaminin sentezini azaltır ve 1,25 dihidroksivitamin D₃'ün parçalanmasını kolaylaştırır (67). FGF-23 1- α hidroksilaz enzimini kodlayan *Cyp27b1* geninin ekspresyonunu azaltır ve böylece aktif D vitamini sentezlenemez. Ayrıca FGF-23 *Cyp24* geninin ekspresyonunu artırır. Bu gen 1,25 dihidroksivitamin D₃'ü hidrolize ederek inaktif hale getiren 24-hidroksilaz enziminin sentezlenmesini sağlar. D vitamini sentezinin azalmasıyla böbreklerden fosfat emilimi de azalır ve negatif fosfat dengesi sağlanmış olur. 1,25 dihidroksivitamin D₃ FGF-23 geninin ekspresyonunu artırır (Şekil 7).

Klotho proteini distal kıvrımlı tubullerde proksimal tubullerden daha fazla eksprese edilmektedir ancak hem fosfat geri emilimi hem de D vitamini sentezi proksimal tubullerde gerçekleşmektedir. Bu fark iki olasılıkla açıklanabilir. Birincisi, proksimal tubullerdeki klotho ekspresyonu distal tubullerdeki kadar fazla olmamasına rağmen FGF-23, proksimal tubullerdeki FGFR-Klotho kompleksi için sinyal olabilir ve NaPi-IIa ekspresyonunu ve D vitamini sentezini doğrudan kontrol edebilir. İkinci olasılık, FGF-23 ilk önce distal kıvrımlı tubullerde etkisini gösterir ve sonra proksimal tubullerde fosfat geri emilimini ve D vitamini sentezini azaltan sekonder sinyal oluşturur. Yapılan hayvan çalışmaları ikinci olasılığı desteklemektedir (68). Paratiroid hormon da fosfatürük bir hormondur ancak *Cyp27b1* gen ekspresyonunu artırarak 1,25 dihidroksivitamin D₃'ün sentezini artırır (69). Paratiroid bezi de endojen olarak yeterli miktarda Klotho proteini eksprese eden birkaç organdan biridir yani paratiroid bezi FGF-23'ün hedef organlarından biridir. Gerçektende, FGF-23 *in vivo* ve *in vitro* olarak PTH gen ekspresyonunu azaltır ve PTH sekresyonunu azaltır (70). Kronik böbrek hastalığında sekonder hiperparatiroidizmle birlikte FGF-23 düzeyinin yüksek olması bu faktörün PTH üretimini baskılayıcı ve sekresyonunu azaltıcı etkileri ile çelişmektedir. Bu durumun olası açıklamalarından biri, kronik böbrek hastalığında D vitamini düzeyinin düşmesine bağlı olarak Klotho ekspresyonunun hem böbrekte hem de paratiroid bezinde azalması ve bu organlarda FGF-23'e karşı direç gelişmesidir.



Şekil 7. FGF-23-Klotho Aksı ve İşlevleri. Kemik-böbrek-paratiroid endokrin aksı FGF-23 ve Klotho tarafından düzenlenmektedir. D vitamini kemikte reseptörüne bağlanır (VDR). Ligandı ile bağlanan VDR nükleer reseptör RXR ile heterodimer oluşturur ve FGF-23 geninin ekspresyonunu aktive eder. FGF-23 kemiklerden salınır ve böbreklerde ve paratiroid glandında eksprese edilen klotho-FGFR kompleksi üzerinde etkisini gösterir. FGF-23 böbreklerde *Cyp27b1* ekspresyonunu azaltarak aktif D vitamini sentezini baskılar ve *Cyp24* gen ekspresyonunu artırır. Böylece D vitamini homeostazı için negatif feedback kolu kapanmış olur. Paratiroid glandında FGF-23 PTH üretimini ve sekresyonunu baskılar. PTH ise böbreklerde reseptörüne bağlanarak *Cyp27b1* gen ekspresyonunu artırır. Böylece FGF-23'ün PTH supresyonu yapması *Cyp27b1* gen ekspresyonunu ve aktif D vitamini düzeyini azaltır. D vitamini homeostazının diğer negatif feedback kolu da kapanmış olur.

FGF-23-Klotho endokrin aksının düzenlenmesinin bozulması kronik böbrek hastalığında fosfat homeoatazının sürdürülememesinin nedenlerinden biridir. Kronik böbrek hastalığının evresi arttıkça serum FGF-23 düzeyi artmakta ve böbreklerdeki Klotho ekspresyonu azalmaktadır (71). Kronik böbrek hastalığının erken evrelerinde serum fosfat düzeyini normal sınırlarda tutabilmek için serum FGF-23 düzeyinin sağlıklı insanlardan daha yüksek olması gerekir. Böylece böbreklerde klotho ekspresyonunu azalmasına bağlı olarak gelişen FGF-23 direnci kompanse edilmiş olur. Ayrıca kronik böbrek hastalığında serum fosfat düzeyi artmaya başlamadan önce D vitamini düzeyinin düştüğü bilinmektedir (72). Epidemiyolojik çalışmalarda serum FGF-23 düzeyinin yüksek olmasının diyaliz hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (73).

Hayvan çalışmalarında Klothonun böbreği koruyan bir faktör olarak işlev gösterdiği tespit edilmiştir. Mekanizması tam olarak anlaşılmasına rağmen klotho ekspresyonunun fazla olması glomerulonefrit ve akut böbrek yetersizliği oluşturulan fare modellerinde renal hasarı iyileştirmektedir (74). Bu nedenle kronik böbrek hastalığında böbreklerin Klotho ekspresyonunu devam ettirebilmesinin iyileştirici bir etkisi olabilir. Klotho ekspresyonu anjiotensin II tarafından azaltılırken (75) peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) agonistleri (tizolinedionlar) tarafınan artırılır (76). Bu gözleme dayanarak anjiotensin dönüştüren enzim inhibitörleri ve tiazolinedionların renoprotektif etkilerini kısmi olarak böbreklerden klotho ekspresyonunu artırarak sağladığı söylenebilir. Klotho ekspresyonu kalsitriol tarafından da artırılır (77). Sekonder hiper-FGF-23-emi tarafından azaltılan serum D vitamini düzeyi klotho ekspresyonunu daha da düşürür. Klotho proteini birçok iyon kanalı ve büyüme faktörünün aktivitesini düzenleyen humoral faktör olarak da işlevi göstermektedir (78). Klotho proteininin hücre dışı parçası hücre membranına bağlı olarak bulunur (membran-anchored protease ADAM 10/17 ile bağlıdır) ve ekstraselüler alana salınır. Salgılanan klotho proteini (ektodomain) kan, idrar ve beyin omurilik sıvısında tespit edilebilir. Salgılanan klotho proteininin birçok iyon kanalında glikanların terminal sialik asit parçasını açığa çıkaran sialidaz aktivitesi olduğu varsayılmaktadır. Bu aktivite ile kalsiyum kanalı olan transient reseptör potansiyel vanilloid tip isoform 5 (TRPV5) ve bir potasyum kanalı olan renal outer meduller potassium channel-1 (ROMK-1)'in hücre yüzeyinde kalmasını sağlar. Böylece distal nefronda transepitelyal kalsiyum Emilimi ve potasyum selkresyonu artar. Böylece klotho proteini hem FGF-23 kofaktörü olarak fosfat metabolizmasında hem de TRPV5 ve ROMK-1 aracılığıyla kalsiyum ve potasyum metabolizmasında etkili olan bir faktör olarak tespit edilmektedir.

2.4.1.2 sFRP-4 (secreted frizzled-related protein-4)

sFRP-4 fosfatonin aktivitesi olan proteinlerden biridir. Yapılan çalışmalarda (79) sFRP-4 keseli sıçan böbreğinde doza bağlı olarak sodyum fosfat transport sistemini inhibe eder. Mutlak fosfat ekskresyonunu artırır. Sodyum ekskresyonunu çok az

etkilerken kalsiyum ekskresyonunu değiştirmez. sFRP-4 infüzyonu yapıldığında sekizinci saatte serum fosfat düzeyi düşer, fosfat ekskresyonu artar ancak böbreklerde 1- α hidroksilaz mRNA konsantrasyonu değişmez. Ayrıca sFRP-4 β -katenin düzeyini düşürür ve fosforillenmiş β -katenin düzeyini artırır. Böylece sFRP-4 böbrekte Wnt molekülü antagonisti olarak etki gösterir. İlave olarak sFRP-4 onkojenik osteomalazili hastalarda tespit edilen plazma proteinlerinden biridir.

2.4.1.3 MEPE

MEPE böbreklerden fosfat kaybettiren tümör örnekleri ve osteomalazide oldukça fazla eksprese edilen proteinlerden biridir. In vivo böbreklerden fosfat kaybına ve serum fosfat düzeyinin düşmesine neden olur (80). Ayrıca, MEPE kemik mineralizasyonunu inhibe eder. Bu protein X'e bağlı hipofosfatemik rikets patogeneğinde rol alabilir. MEPE 1,25(OH)₂D₃ üretimini inhibe etmez.

2.5 KRONİK BÖBREK HASTALIğI-KEMİK VE MİNERAL BOZUKLUKLARINDA ÜREMİK TOKSİNLER

Üremik sendrom sağlıklı böbreklerden normal koşullarda atılan çok sayıda bileşiğin progresif olarak birikimini tanımlayan bir kavramdır. Bu bileşikler organizmanın işlevlerini olumsuz olarak etkilediklerinden üremik toksinler olarak adlandırılır. Biriken bileşikleri üremik toksin olarak kabul etmeden önce bazı koşullara uygun olması gerekir: 1. Bileşikler kimyasal olarak tespit edilebilmeli ve biyolojik sıvılarda kantitatif olarak ölçülebilmelidir. 2. Total vücut ve plazma konsantrasyonu üremik hastalarda yüksek olmalıdır. 3. Yüksek konsantrasyonunun neden olduğu spesifik üremik işlev bozuklukları ve/veya semptomlar bileşiklerin konsantrasyonu düştüğünde azalmalı veya kaybolmalıdır. 4. Üremik durumda gözlemlenen klinik değişikliklere uygun biyolojik etkileri iv vivo, ex vivo, in vitro çalışmalarla kanıtlanabilmelidir. 5. Bu çalışmalardaki konsantrasyonlar üremik hastaların doku veya vücut sıvılarında tespit edilen miktarlarla uyumlu olmalıdır. En önemli organik üremik toksinler Tablo 3'te özetlenmiştir (81).

Tablo 3 Üremik Toksinlerin Sınıflanması

Küçük Suda Eriyen Solutler	Orta Çaplı Moleküller	Proteinlere Bağlı Solutler
Asimetrik dimetilarjinin	Adrenomedulin	Furan Propionik asit
B-Lipotropin	Atrial Natriüretik Peptit	Hippurik asit
Kreatinin	B ₂ mikroglobulin	Homosistein
Guanidin	Kompleman D	İndol-3 asetik asit
Hipoksantin	Degranulasyon inhibisyon proteini I	İndoksil sülfat
Malondialdehit	Endotelin	N-karboksimetillizin
Metilguanidin	Hyaluronik asit	P-Kresol
Oksalat	İnterlökin 1-β	Pentosidin
Simetrik dimetilarjinin	İnterlökin-6	Fenol
Üre	Leptin	Kinolinik asit
Ürik asit	Paratiroid hormon	Spermidin
Ksantin	Retinol bağlayıcı protein	
Osteoprotegerin	Tümör Nekroz Faktörü-α	

2.5.1 Parathormon

Üremik hastalarda yüksek paratiroid hormon (PTH) düzeyi üremik toksin olarak davranıp bazı anormalliklere neden olur. PTH düz kas hücreleri dışında birçok hücrede tip-1 kalsiyum kanallarını aktive ederek hücre içi kalsiyum düzeyini artırır. Üremik durumda periferik nöropati, karbonhidrat intoleransı, hiperlipidemi gibi değişikliklere yol açan patojenik faktördür.

PTH düzeyinin yüksek olması eritrositlerdeki kalsiyum miktarını artırır ve hüce bütünlüğünü etkiler (82). Hem amino terminal (1-34) PTH hem de intakt PTH (1-84) eritrositlerin osmotik frajilitesini artırır. Bu da üremik durumda eritrosit yaşam süresinin neden azaldığını açıklar. PTH'un eritrositlere kalsiyum girmesine neden olması kalsiyum ionoforlarına benzetilir. Hücre dışı kalsiyum konsantrasyonuna bağlı bu etki kısmi olarak verapamil tarafından bloke edilir. Ayrıca PTH kemik iliği fibrozisine neden olarak doğrudan eritropoezi azaltır (83).

Yüksek PTH düzeyi kalp kasında mitokondrial solunumu inhibe eder, fosforilasyonu azaltır ve oksidatif fosforilasyonu engeller. Oksidatif fosforilasyonun azalması ATP

sentezinin bozulmasına neden olur. Bu olaylar uzun dönemde miyokardda istenmeyen sonuçlara yol açar (84). PTH'un enerji üretimi ve kullanımındaki inhibitör etkisi iskelet kaslarında da görülür. Verapamil tedavisi PTH'un istenmeyen tüm etkilerini geri döndürür. Sekonder hiperparatiroidi gelişen üremik hastalarda PTH, kas işlevlerinin bozulmasından ve kas zayıflığından sorumludur. Hemodiyaliz hastalarında yüksek PTH düzeyinin sol ventrikül işlevleri ve kardiyak hipertrofi üzerinde olumsuz etkileri vardır (85). Üremik farelerde PTH'm kardiyak fibrozisi uyarıcı etkisi gösterilmiştir (86). PTH vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ve sayısını artıramaz ancak kollajenin yeniden düzenlenmesini ve üretimini artırır (87).

Periferik nöropati kronik üreminin sık bir komplikasyonudur. Üremik durumda PTH periferik sinir hücrelerindeki kalsiyumu artırır ve motor sinir iletim hızını yavaşlatır. Üremik hayvanlarla yapılan deneysel çalışmalarda yüksek PTH düzeyi üremiye bağlı olarak glukoz intoleransına neden olur. Kronik böbrek yetersizliğinde PTH pankreas β hücrelerinin düzgün bir şekilde insülin salgılamasını engeller. Hiperparatiroidizm üremik durumda aldosteron sekresyonunu artırır, serum testosteron düzeyini azaltır ve dolaşımdaki prolaktin seviyesini artırır (88).

PTH'un lenfosit ve polimorfonükleer lökositler üzerinde direkt etkisi vardır ve sekonder hiperparatiroidizm immün sistemde anormalliklerin gelişmesine neden olmaktadır. PTH'un sürekli yüksek olması lenfosit proliferasyonunu azaltır. Diyaliz hastalarında B lenfositlerin immünglobulin üretimi azalır. Fagositoz diyaliz hastalarında belirgin olarak bozulur fakat verapamil ile normale dönebilir (89). Böbrek yetersizliği olan farelerde plazma trigliserid düzeyi doku lipoprotein lipaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak artmakta ve paratiroidektomi sonrası veya verapamil tedavisi ile normale dönmektedir (90).

Plazma PTH'u, 84 aminoasitlik (1-84) tek zincirli polipeptit olan intakt PTH (veya 'bütün' PTH) ve düşük molekül ağırlıklı karboksil terminal parçadan (C-PTH) oluşur. Hormonal parçalar periferik organlarda 1-84 PTH'un parçalanmasıyla birlikte paratiroid bezinden C-PTH parçasının salgılanmasıyla meydana gelir. PTH'un biyolojik etkisini göstermesi için gereken yapı molekülün amino terminal parçasıdır. C-PTH parçası için de spesifik reseptörlerin varlığı gösterilmiştir.

Paratiroid bezi hücreleri hem PTH (1-84) hem de C-PTH salgılar (91). C-PTH parçası ayrıca karaciğerde PTH (1-84)'un parçalanmasıyla da meydana gelir. C-PTH vücuttan böbrek yoluyla uzaklaştırılır bu nedenle böbrek yetersizliğinde vücutta C-PTH birikimi olur. PTH'un amino terminal parçası (N-PTH) karaciğer Kupffer hücrelerinde intakt PTH'un parçalanmasıyla meydana gelir ve hızla yıkılır.

Hiperkalsemi PTH (1-84)'un sekresyonu C-PTH'dan daha fazla azalır. Sağlıklı insanlarda C-PTH'un klirensi büyük oranda böbrekler tarafından (%33) sağlanırken böbrek yetersizliğinde ise kaslar (%25) tarafından sağlanmaktadır.

Diyaliz hastalarında dolaşımda amino terminali olmayan C-PTH uzun zamandır 'intakt PTH testi' olarak adlandırılan iki parçalı immunassay ile ölçülmektedir. Ancak bu test sadece bioaktif olmayan C-PTH parçasını tespit eder. Amino terminaldeki serin amino asidi PTH'un PTH reseptörüne (PTH1R) bağlanması ve sonuçta biyolojik aktivite için gereklidir. Böbrek yetersizliğinde amino terminali olmayan C-PTH toplam immünreaktivitenin % 50'sinden fazlasını oluşturur. Bu nedenle geleneksel 'intakt PTH' testi hem PTH(1-84) molekülünü hem de amino terminali olmayan büyük C-PTH parçasını ölçer (92). Bu nedenle PTH (1-84) molekülünü tanımlamak için 'bioaktif PTH' veya 'bütün PTH' terimi kullanılmaya başlanmıştır.

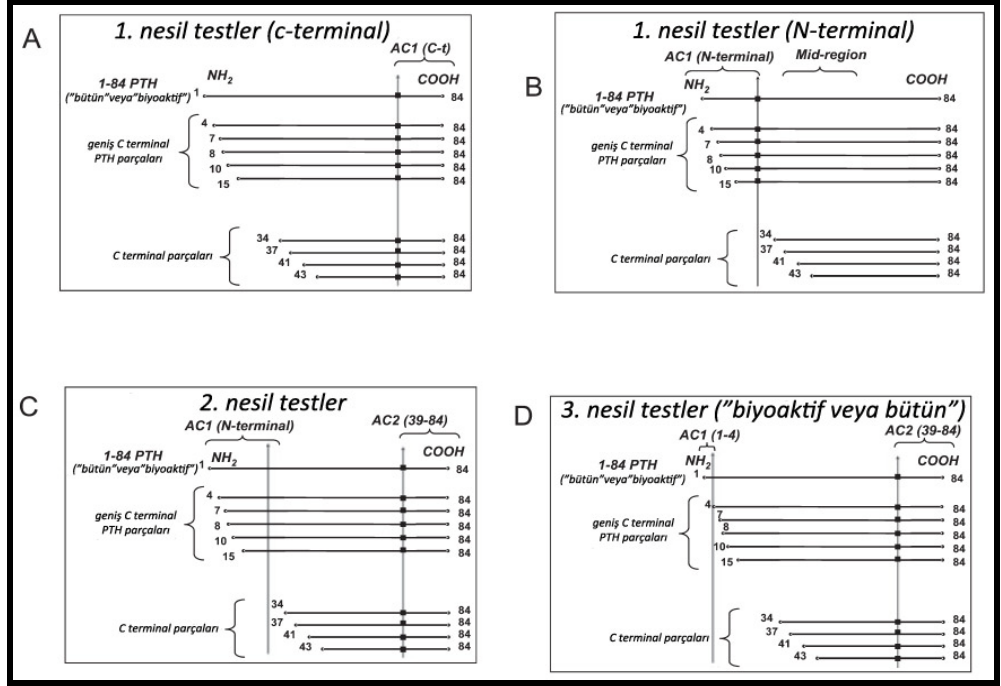
Birinci nesil PTH radioimmunassay (RIA)'de karboksil (C) ve amino (N) terminal PTH parçalarına karşı antikor kullanılmaktadır (Şekil 8 A ve B). Bu test dolaşımdaki tüm PTH parçalarını (1-84 PTH, C-PTH) ölçmektedir. İkinci nesil test olan IRMA'da (Immunoradiometric Assay) molekülün N terminaline (1-34) ve C terminaline (39-84 PTH) karşı iki antikor kullanılmaktadır. Bu test intakt PTH molekülünü tespit etmenin yanı sıra bazı büyük C terminal parçaları da ölçmektedir (Şekil 8 C). Bu test kullanılarak yapılan klinik çalışmalarda testin kemik histomorfometrik ölçümleri ile korele olduğu tespit edilmiş ve yıllarca intakt PTH (IRMA) testinin altın standart test olduğu düşünülmüştür. Yakın zamanda ise üçüncü nesil testlerde PTH molekülü N terminalin ilk 4-5 aminoasidine karşı antikor geliştirilmiş ve C terminal antikorlarla kombine edilerek 'bütün PTH'un' ölçülmesi sağlanmıştır (Şekil 8 D).

PTH'un N terminali adenilat siklaz aktivitesini sağlar ve C terminali (örneğin 15-35 kalıntısı gibi) ise reseptöre yüksek afinite ile bağlanması için gereklidir. PTH

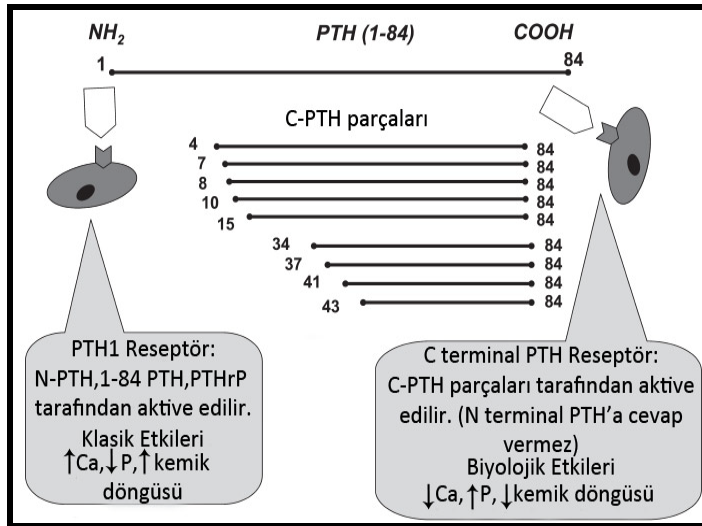
reseptörü (PTHR1) G proteinine bağlıdır ve 1-84 PTH, N-terminal PTH ve PTH'la ilişkili peptit (PTHrP) tarafından eşit şekilde aktive edilmektedir. PTHR1 kemik ve böbrekte oldukça fazla bulunmakla birlikte PTH'un klasik olarak hedefi olmayan organlarda da bulunmaktadır. Bu durum PTH'un tüm vücutta etkili olmasının nedenini ve böbrek yetersizliğinde üremik toksin olarak kabul edilmesinin sebebini açıklar. Diğer bir PTH reseptörü olan PTHR2 genellikle santral sinir sistemi, tiroid bezi, gastrointestinal sistem, pankreas adacık hücreleri ve kardiyovasküler sistemde bulunmaktadır. Ancak PTHR2 böbrek tubullerinde ve kemiklerde eksprese edilmemekte ve PTHrP tarafından da aktive edilmemektedir. PTHR2 PTH tarafından aktive edilir ve cAMP aracılığıyla hücre içi kalsiyum miktarını artırır.

Bazı çalışmalarda N terminal PTH'un intakt hormonun (1-84) bağlandığı dokulara kısmi olarak etkili olduğu gösterilmiştir. Bu da intakt hormonun bağlandığı dokuların tümünde PTH'un N terminali için reseptör bulunmadığını ve C-PTH'un bu dokulara bağlandığını gösterir. PTH (1-34) ve PTH (53-84) kullanılarak yapılan bir çalışmada böbreklerde C terminalin ve N terminalin bağlandığı bölgeler gösterilmiştir. C terminal bölgesinin afinitesi düşüktür ve adenilat siklaz aktivasyonu oluşturmaz (93).

Üremik hastalarda (7-84) PTH gibi büyük C-PTH parçaları belirgin olarak artmaktadır. PTH (7-84)'un hipokalsemik etkisi vardır, PTH (1-84)'un serum kalsiyumunu yükseltmesini önler ve fosfatürik etkisini azaltır. Ayrıca PTH (7-84) böbrek yetersizliğinde PTH (1-84) oluşturduğu kemik döngüsünü antagonize eder. C-PTH reseptörleri aracılığıyla osteoklast prekürsörlerini azaltarak kemik rezorbsiyonunu inhibe eder ve serum kalsiyumunu düşürür. Diyaliz hastalarında 1-84 PTH/C-PTH oranı kemik volümündeki değişikliklerin anlaşılmasında faydalı olabilir. C-PTH reseptörlerinin C-PTH parçaları ile aktivasyonu N terminal PTH ile aktive edilen PTHR1 sisteminin etkilerini antagonize eder (Şekil 9).



Şekil 8. PTH testlerinin farklı tipleri. Birinci nesil testlerde (A ve B) PTH'nin C veya N terminaline karşı antikor kullanılır. İkinci nesil testlerde (C) PTH'nin C terminaline ve amino terminalin farklı dizelerine karşı doğrudan iki antikor kullanılır. Üçüncü nesil testlerde (D) C terminale ve N terminalin 1-4 aminoasidine karşı antikor kullanılır.



Şekil 9. PTHR1 ve C terminal PTH reseptörü aktivasyonunun biyolojik etkilerinin şematik olarak gösterilmesi

2.5.2 İndoksil Sülfat

İndoksil sülfat (IS) triptofan metabolizması sonucu üretilir. Triptofan bağırsakta bakteriler tarafından metabolize edilir ve indol oluşur. Bağırsaklardan emilen indol karaciğerde indoksil ve indoksil sülfata dönüştürülür. IS proksimal tubullerden sekrete edilir bu nedenle böbrek yetersizliğinde birikir. IS serum konsantrasyonu diyalize girmeyen kronik böbrek hastalarında sağlıklı kişilerden 30-80 kat daha yüksektir. IS, üremik koşullara kan damarları ve kemiklerin verdiği yanıtta rol oynamaktadır (94). Üremik bir toksin olan IS renal yetersizliğin progresyonunu hızlandırır.

Kronik böbrek yetersizliğinde düşük kemik döngüsü varlığında böbrek işlevleri kötüleştiğinde osteoblast işlevleri de giderek bozulmaktadır. Bu gözlem kanda biriken üremik toksinlerin (indoksil sülfat gibi) düşük döngülü kemik hastalığına neden olduğu hipotezi ile uyumlu olabilir (37). IS'ın kanda birikmesini önleyen oral kömür, AST-120, hayvan çalışmalarında düşük döngülü kemik hastalığı gelişmesini önlemiştir (95). Bu durumdan IS birikiminin osteoblast işlevlerini bozduğu sonucu çıkarılabilir. Ayrıca serbest radikal üretimini kontrol ederek sitotoksik etki de gösterir; hücre canlılığını azaltır. Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres osteoblast gelişimini ve mineralizasyon kapasitesini azaltır. IS üremik durumda kemiğin PTH'a karşı direncinden sorumlu faktörlerden biri olabilir.

IS vasküler toksin olarak da etki gösterebilir. Konsantrasyona bağlı olarak farelerde vasküler düz kas hücrelere proliferasyonunu doğrudan uyarmaktadır (96).

2.5.3 Leptin

Leptin, hipotalamusta etkisini gösteren, iştahı ve termogenezi kontrol eden 16 kDa ağırlığında peptid yapıda bir hormondur. Esas olarak beyaz yağ doku hücreleri tarafından sentezlenir. Bu nedenle serum leptin düzeyi genellikle vücuttaki yağ dokusunun miktarı hakkında fikir verir. Leptin hem obezitede hem de kronik böbrek yetersizliğinde artar. Böbrek yetersizliğinde leptin düzeyindeki artış ultrafiltrasyondaki azalmaya bağlıdır (97). Leptin etkilerini altı farklı reseptör aracılığıyla gösterir (ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe ve ObRf). Leptin dolaşımında vasküler endotelial hücrelerden salınan ObRa reseptörüyle taşınır. Böylece kan

beyin bariyerini geçerek hipotalamusta ObRb reseptörünü aktive eder. ObRb reseptörünün aktivasyonu hipotalamik osteoblast inhibitör faktörün (HOBIF) ekspresyonunu uyarır böylece osteoblastların matriks sentezleme kapasitesini azaltır (98). JAK-STAT yolağı ile etkisini gösterir. Leptinin osteotropik etkileri de vardır. Kemik iliği stromal hücrelerin osteoblastlar farklılaşmasını kontrol eder ve osteoklast oluşumunu inhibe eder. 46 hemodiyaliz hastası ile yapılan bir kohortta serum leptin düzeyi ile kemik histomorfometrik ölçümleri arasında ters bir ilişki tespit edilmiştir (99). Bu ilişki leptinin osteoblast öncülleri üzerindeki doğrudan uyarıcı etkisi ile kemik aktivitesi üzerinde hipotalamus aracılığıyla dolaylı supresif etkisi arasında ince bir denge olduğunu gösterir.

Leptin vasküler kalsifikasyon gibi heterotopik kemik oluşumunda da rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada farelerin arter duvarında leptin reseptörü ekspresyonu tespit edilmiş ve leptinin in vitro osteoblast farklılaşmasını ve vasküler düz kas hücrelerinde kalsifikasyona neden olduğu gösterilmiştir (100). Ayrıca kalsifikasyon inhibitörü olan fetuin A ve leptin arasında ters korelasyon tespit edilmiştir.

2.6 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI- KEMİK MİNERAL BOZUKLUKLARINDA VASKÜLER KALSİFİKASYONLAR

Kalsifikasyon terimi kemik ve dişlerde meydana gelen normal bir süreci tanımlar ancak kan damarlarında, yumuşak dokuda, eklem çevresinde, kalp ve diğer solid organlarda oluştuğunda patolojik bir olayı tanımlamak için kullanılır. Sağlıklı kişilerde kemik ve dişlerin dışında oluşmaması yumuşak dokulardan salınan bazı faktörler tarafından kalsifikasyonun aktif olarak inhibe edildiğini gösterir. Hastalık durumunda ise anormal yerlerde kalsifikasyon oluşabilir ve bu süreç normal kalsifikasyon süreci ile benzer bir şekilde kontrol edilir. Etiyolojilerine göre tanımlanan iki farklı patolojik kalsifikasyon tipi mevcuttur: metastatik ve distrofik kalsifikasyon. Metastatik kalsifikasyon kalsiyum veya fosfor metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak gelişir ve son dönem böbrek yetersizliğinde kalp, kan damarları ve yumuşak dokularda oluşur. Distrofik kalsifikasyon ise kalsiyum ve

fosfor metabolizmasında bozukluk olmadan nekrotik dokular veya aterosklerotik plaklarda görülür (101).

Yumuşak doku kalsifikasyonu ile vasküler kalsifikasyon farklı olaylardır.

Kalsifik üremik arteriopatide (kalsiflaksi) cilt altı dokunun ve küçük damarların metastatik kalsifikasyonuna bağlı olarak oluşan deri ülserleri ile karakterize ciddi ve ölümcül bir durumdur. Diyaliz ve transplant hastalarında vasküler kalsifikasyonlara göre insidansı oldukça düşüktür. Kadınlarda, serum albumininin düşük olduğu, fosfor, alkalen fosfataz (ALP) ve CaxP yüksek olduğu durumlarda daha sık görülmektedir. Ayrıca protein C ve S eksikliği, obezite, lokal travma ve warfarin tedavisi de kalsiflaksi gelişimini kolaylaştırmaktadır. Fulminan sepsis mortalite ve morbiditenin sık nedenidir (102). Hayatı tehdit eden bir durum olması nedeniyle paratiroidektomi gibi agresif bir girişimle tedavi edilmesi gerekebilir.

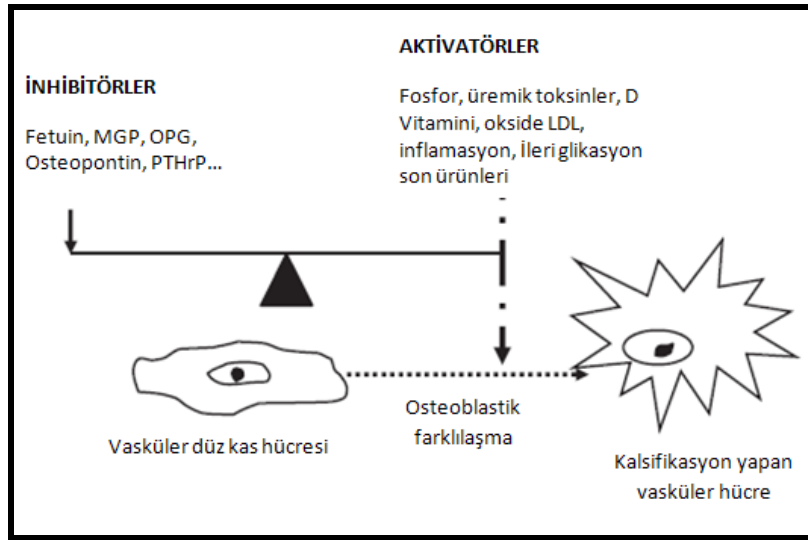
Üremik hastalarda metastatik ve distrofik kalsifikasyon genellikle birlikte bulunur.

Üremik ortamda dokulardaki anormal kalsifikasyon sürecini tanımlamak için genellikle 'üremik kalsifikasyon' kavramını kullanmak oldukça uygundur.

Son dönem böbrek yetersizliğinde vasküler kalsifikasyon damar duvarının iki tabakasında da oluşur. Media tabakasında düz kas hücrelerinde ve intimada ise aterosklerotik plakta meydana gelir. İntima kalsifikasyonu aterosklerotik tıkaçıcı lezyonlara bağlı olarak düzensizdir ve saçılmış bir halde bulunur. Periferik arterlerin medial kalsifikasyonu yaşlanmaya özgüdür ancak üremide ve diyabette de oldukça sık görülür. Mönckeberg'in sklerozu olarak da bilinen medial kalsifikasyon media tabakasında lamina elastika internada oluşur. Son dönem böbrek yetersizliğinde kalsifikasyonun her iki tipi sağ kalımı vasküler kalsifikasyon gelişmeyenlere göre belirgin olarak azaltmaktadır. Ancak medial kalsifikasyon bulunan hastaların sağ kalımı intimal kalsifikasyon olanlardan kısmi olarak daha iyidir (103). Medial ve intimal kalsifikasyon aynı hastanın aynı damarında bir arada bulunabilir (örneğin koroner arterler). Bu nedenle her iki durum böbrek yetersizliğinde kardiyovasküler olayların yüksek oranda olmasından birlikte sorumludur (104).

2.6.1 Kalsifikasyon Aktivatörleri

Üremik kalsifikasyonların mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Yıllardır hakim olan görüş, vasküler ve yumuşak doku kalsifikasyonlarının serum fosfor ve kalsiyum düzeyinin artmasına bağlı olarak pasif olarak meydana geldiği ve kalsiyum x fosfor (Ca x P) yüksekliği nedeniyle plazmanın bu iyonlara doymuş olmasının sürece neden olduğu idi. Günümüzde ise vasküler kalsifikasyonların sadece divalant iyonların presipitasyonuna bağlı olarak meydana gelmediği oldukça aktif olarak düzenlenen bir süreç olduğu bilinmektedir. Bu süreçte kemik mineral metabolizmasını kontrol eden çeşitli proteinler (osteopontin, alkalen fosfataz, kemik sialoproteini, tip I kollajen, kemik morfojenik protein-2a gibi) etkili olmakta ve kalsifiye arteriyel lezyonlar tarafından üretilmektedir (Şekil 10). Damar duvarında bu proteinlerin eksprese edilmesi vasküler düz kas hücrelerinin kalsifikasyon yapan hücrelere fenotipik olarak dönüşmesine neden olmaktadır.

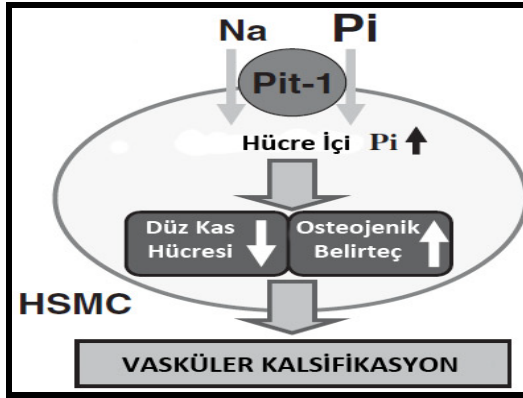


Şekil 10. Vasküler kalsifikasyon mekanizmaları

Adventisya perisitleri de diyabetik hastalarda gözlemlendiği gibi kalsifikasyon yapan vasküler hücrelere dönüşebilir (105). İlerlemiş lezyonlarda media tabakası osteosit ve kemik trabekülleri ile çepeçevre kaplanır, lezyonun ilerlemesi ile kemik iliği oluşumu da gözlenebilir (106).

Son dönem böbrek yetersizliğinde kalsiyum, fosfor gibi iyonların artmış konsantrasyonunun kalsifikasyona neden olduğu mekanizma tam olarak

anlaşılamamıştır. In vitro bir çalışmada üremik serum ve fosfat vericisi olan - gliserofosfat sıgır düz kas hücrelerinde alkalen fosfataz aktivitesine ve osteopontin ekspresyonuna neden olmuştur (107). Fosforun neden olduğu benzer sonuçlar insan aortik düz kas hücrelerinde de gösterilmiştir (108). Bu çalışmada hücre dışı fosfat konsantrasyonu yüksek olduğunda fosfor tip III sodyum-fosfat kotransporter sistemi (NaPi-III) ile hücre içine alınır. Böylece hücre içinde mineralizasyon süreci başlamış olur. Fosfatın en önemli etkisi core binding factor-1 (Cbfa-1) ekspresyonunu artırmaktır. Cbfa-1 osteoblast farklılaşması ve osteopontin, osteokalsin ve diğer matriks proteinlerinin düzenlenmesi için önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Cbfa-1'in osteoblast farklılaşması için anahtar gen olduğu düşünülmektedir. Aterosklerotik plaklarda platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) düzeyinin artması mineral dengesizliği olmasa da Pit-1 (NaPi-III) mRNA ekspresyonunun uyarılması için önemli bir faktördür. Bu nedenle PDGF hücre içine fosfor girişini artırarak aterosklerotik plaklarda fosfor düzeyinin normal olduğu koşullarda kalsifikasyon gelişmesini kontrol eder (109). Hücre içi fosfat miktarının artması hem osteojenik gen ekspresyonunun artması hem de SM22 α ve SM α gibi düz kas hücrelerine spesifik gen ekspresyonunun azalması için uygun bir ortam oluşturur. (Şekil 11)



Şekil 11. Düz Kas Hücrelerinde Fosfat Metabolizmasının Düzenlenmesi. Düz kas hücrelerinde fosfat konsantrasyonunun artması cbfa-1 ve osteokalsin gibi osteoblastlara spesifik genlerin ekspresyonunu artırarak vasküler kalsifikasyonu artırır.

Üremik vasküler kalsifikasyona hiperfosfateminin yanı sıra üremik serumdaki diğer faktörler de neden olur. Hücre içi osteojenik gen ekspresyonu, osteoblastik dönüşüm ve damar duvarlarından bazı kemik matriks proteinlerinin salgılanmasını sağlayan

bazı faktörler bilinmektedir. Okside LDL, kolesterol, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , kalsitriol, fibronektin, tip I kollajen, transforming growth factor (TGF)-1 α , 25-hidroksikolesterol ve ileri glikasyon son ürünleri (AGEs) gibi faktörler vasküler hücrelerin osteojenik transoluşumunu uyarır. Damar duvarında hücre ölümü ve apoptoz da kalsiyum ve fosfora hücre geçirgenliğini artırarak kalsifikasyonu başlatabilir ve distrofik kalsifikasyon gelişmesini kolaylaştırır. Hipertansiyonun neden olduğu hemodinamik değişiklikler, kronik vasküler hasar, kronik sıvı yükü ve renin anjiyotensin sisteminin (RAS) sistemik olarak aktivasyonu düz kas hücre proliferasyonu, medial hiperplazisine neden olur, damar duvar gerilimini artırır; sonuç olarak damar duvarında osteoblast benzeri hücrelerin oluşmasını sağlar.

2.6.2 Kalsifikasyon İnhibitörleri

Fetuin, matriks GIa protein, Osteoprotegerin (OPG) ve osteopontin sağlıklı insanlarda vasküler kalsifikasyonun en önemli doğal inhibitörleridir (110).

α -2 Heremans-Schmid glikoproteini (AHSG) olarak da adlandırılan fetuin-A karaciğerde sentezlenen ve hidroksiapatit yapısına bağlanarak kalsifikasyonu inhibe eden bir proteindir (111). Serum fetuin-A konsantrasyonu akut inflamasyon sürecinde düşer yani albumin gibi negatif akut faz reaktanı olarak davranır. Kronik böbrek yetersizliğinde proinflamatuvar sitokin konsantrasyonu (IL-1 β , CRP) ile Fetuin-A konsantrasyonu arasındaki korelasyon zıttır (112). Bu durum fetuin-A ekspresyonunun inflamasyona bağlı olarak azaldığını göstermektedir. Fetuin-A düzeyinin düşük olması kardiyovasküler ve bütün nedenlere bağlı mortalitedeki artışla neden olmaktadır ve üremik koşullarda aterosklerozun hızlanmasından sorumludur (113). Belki de fetuin-A konsantrasyonu üreminin erken evrelerinde vasküler kalsifikasyonu önlemek için artmakta ancak böbrek yetersizliğinin ileri evrelerinde üremik toksinlerin artması veya hemodiyalizle klirensinin artmasına bağlı olarak düşmektedir (112). Diyabetik hastalarda fetuin-A düzeyi ile koroner kalsifikasyonun şiddeti arasında güçlü ve pozitif bir korelasyon vardır.

Matriks GIa protein (MGP) kondrosit ve düz kas hücreleri tarafından sentezlenen arteriyel ve kıkırdak kalsifikasyonunun diğer bir inhibitörüdür. Minerallere ve

mineral iyonlarına α -karboksil glutamik asit kalıntısı ile bağlanır (114). MGP BMP-2 aktivitesini inhibe ederek osteojenik farklılaşmayı azaltır. Warfarin kullanımı MGP'nin α -karboksilasyonunu inhibe eder ve diyaliz hastalarında kalsiflaksi gelişmesi için risk oluşturur. Böbrek yetersizliği olmayan hastalarda MGP serum düzeyi ile koroner kalsifikasyon skoru arasında korelasyon olduğu tespit edilmiştir (115) ancak üremik hastalarda korelasyon olup olmadığı bilinmemektedir. Osteoprotegerin (OPG) ana görevi osteoklast farklılaşmasını ve aktivasyonunu inhibe etmek olan osteoblast kaynaklı bir faktördür. OPG defekti olan farelerle yapılan çalışmalarda kemik dansitesinde azalma, paryetal kemikte belirgin olarak incelme, fraktür riskinde artma ve renal arter ve aortada medial kalsifikasyon geliştiği gösterilmiştir (116).

Osteopontin normalde kemik ve dişlerde bulunan asidik fosfoproteindir. Bu protein kristal yüzeyine bağlanarak apatit büyümesini doğrudan inhibe ederek vasküler kalsifikasyon gelişmesini önler ve $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin aracılığıyla osteoklast aktivasyonu yapar. Osteopontin ayrıca monositlerde karbonik anhidraz II üretimini kontrol eder ve hücre dışı ortamın asidifikasyonunu artırır (117). Karbonik anhidraz eksikliği insanlarda yumuşak doku kalsifikasyonuna ve osteopetrozise neden olur. Osteopontin vasküler ve yumuşak doku kalsifikasyonlarını doğrudan ve dolaylı olarak önlemektedir. Bu nedenle ektopik kalsifikasyonların tedavisinde osteopontinin potansiyel bir tedavi seçeneği olabilir. Paratiroid hormonla ilişkili peptit (PTHrP) ekspresyonu BMP-2 ve alkalen fosfataz aktivitesini azaltır ve kalsifikasyonu önler. Kalsitriol PTHrP ekspresyonunu doğrudan inhibe eder ve düz kas hücrelerinde vasküler kalsifikasyonu kolaylaştırır.

2.6.3 Vasküler Kalsifikasyonu Kolaylaştırıcı Faktörler

Yıllardır yapılan çalışmalar kronik böbrek yetersizliğinde vasküler kalsifikasyon gelişmesine neden olan potansiyel risk faktörlerini tespit etmek için uğraşmaktadır. Böbrek yetersizliği olan hastalarda ateroskleroz ve aterosklerotik kalsifikasyon gelişmesine hem geleneksel olarak bilinen hem de üremiyle ilişkili faktörler neden olmaktadır. Serum fosfor, kalsiyum ve kalsiyum x fosfor gibi metabolik faktörlerin yanı sıra bu faktörlerin tedavisi için kullanılan ilaçlar (kalsiyum içeren fosfat

bağlayıcılar) böbrek yetersizliği olan hastalarda kardiyovasküler kalsifikasyon gelişmesine neden olmaktadır (Tablo 4).

Tablo 4. Üremik hastalarda vasküler kalsifikasyon için risk faktörleri

Değiştirilebilir Risk Faktörleri	Değiştirilemeyen Risk Faktörleri
Serum fosfor düzeyi	İleri yaş
Serum kalsiyum düzeyi	Diyaliz süresi
Kalsiyum x Fosfor değeri	Cinsiyet
Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı	İrk ?
Hiperparatiroidizm	Genetik
D vitamini kullanımı	
Dislipidemi	
İnflamasyon	
Hipertansiyon	
Diğer: oksidatif stres, warfarin, glukoz, ileri glikasyon son ürünleri	
homosistein, leptin, demir yükü	

Serum fosfor düzeyinin (>6,5 mg/dl; rölatif risk-RR- 1,27) ve fosfor x kalsiyum sonucunun (> 72 mg²/dl² rölatif risk 1,34) yüksek olması diyaliz hastalarında mortalite için bağımsız risk faktörüdür (118). Kalsiyum ve PTH risk faktörü olarak düşünülmemektedir ancak hiperkalsemi presipitasyona neden olarak kalsifikasyon sürecini kolaylaştırmaktadır. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların fizyolojik dozların üzerinde yaygın olarak kullanılması hiperkalseminin nedenlerinden biridir. Giderek artan veriler diyaliz hastalarında kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların kümülatif dozu ile kardiyovasküler kalsifikasyon ve olaylar arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (119). Üremik koşullarda PTH birçok metabolik bozukluğa neden olmasına ve kardiyovasküler risk faktörü olarak düşülmesine rağmen PTH düzeyinin yüksek olması ile kardiyovasküler kalsifikasyon arasındaki ilişki kesin değildir. Ayrıca PTH düzeyinin düşük olduğu düşük döngülü kemik hastalığında arteriyel kalsifikasyonlar oldukça fazladır. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların ve D vitamini analogları kullanımının PTH sekresyonunu baskılaması bu bulguların kısmen açıklayabilir.

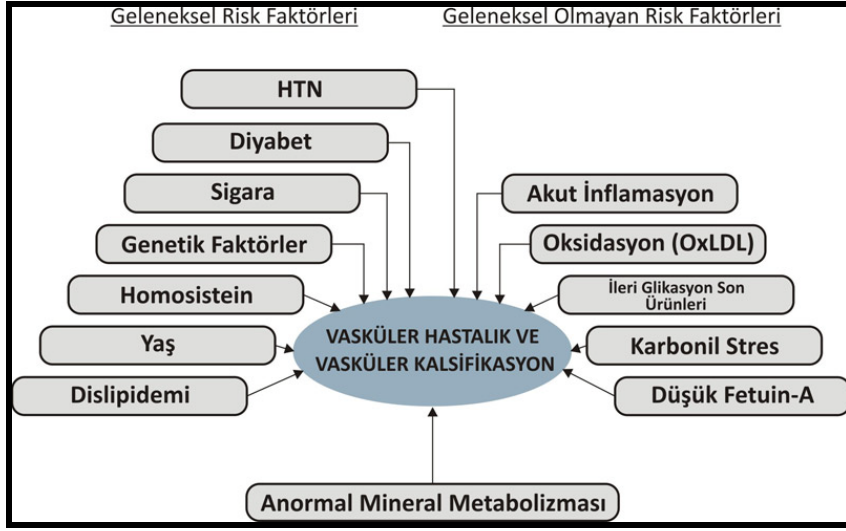
Aktif D vitamini sekonder hiperparatiroidizmin tedavisinde hiperkalsemi, hiperferfosfatemi ve kalsiyum x fosfor değerini yükseltmesine rağmen oldukça sık kullanılmaktadır. Ayrıca aktif D vitamini PTHrP ekspresyonunu azaltmakta, alkale fosfataz aktivitesini ve vasküler düz kas hücrelerinde osteopontin gen ekspresyonunu

artırmaktadır. D vitamini vasküler kalsifikasyonları hızlandırmaktadır ve plazma düzeyi vasküler kalsifikasyon progresyon hızı ve şiddetinin belirleyicisidir (120). Kan yağlarının da kalsifikasyonun düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir. Okside yağlar doza bağlı olarak alkalen fosfataz aktivitesini artırır ve kalsifikasyon yapan vasküler hücrelerin geniş bir alanda kalsifikasyon yapmasına neden olur. Ayrıca osteoblastların mineralizasyon yapmasını inhibe eder.

Üreminin kendisi ve diyaliz sırasında kanın diyaliz membranı ve diyalizatla temas etmesi proinflatuar sitokin salınımını uyarır ve proinflatuar bir ortam oluşturur. CRP ve fibrinojenin düzeyinin yüksek ve albumin değerinin düşük olması diyaliz hastalarında ve genel popülasyonda kardiyovasküler olayların ve kalsifikasyonun en önemli risk faktörleridir (121). TNF- α ve IL-6 gibi sitokinler tarafından kontrol edilen CRP enzimatik olarak parçalanıp düşük dansiteli lipoproteine (LDL) bağlanır ve intima-media tabakası arasında birikir, kompleman sistemini aktive eder. TNF- α ayrıca alkalen fosfataz aktivitesini artırır ve sığır aortik düz kas hücrelerinde matriks mineralizasyonuna neden olur.

Kan basıncı ve vasküler kalsifikasyon arasında da ilişki olduğu bilinmektedir. Sistolik kan basıncının artması ve diyastolik kan basıncının azaması (yani nabız basıncının artması) arteryel kalsifikasyonla oldukça ilişkili bir durumdur. Arteryel kalsifikasyonlar arter duvar sertliğine ve nabız dalga hızının artmasına neden olur. Diyabetik hastalarda vasküler kalsifikasyonların ön önemli göstergelerinden biri hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c})'dir. Klinik çalışmalarda HbA_{1c}'de %1'lik bir artış kalsifikasyon riskini 2.1 kat artırmaktadır. Kötü glisemik kontrol vasküler kalsifikasyonun güçlü bir risk faktörüdür. Diyabetik hastalarda aterosklerotik plakların altında oluşan ileri glikasyon son ürünleri osteoblastik farklılaşmaya ve mikrovasküler perisitlerde kalsiyum birikimine yol açar.

Yaş ve diyaliz süresi kardiyovasküler olay ve kalsifikasyonların değiştirilemeyen, bağımsız ve önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Kalsifikasyon hızı diyaliz hastalarında yaşın ilerlemesiyle hızlanmaktadır. Koroner arter kalsifikasyonu genç erişkin diyaliz hastalarında 20 ve 30 yaş arasında oluşmaya başlamaktadır (122). Erkek cinsiyet ve beyaz ırktan olmak da kalsifikasyonun diğer değiştirilemeyen faktörleridir (Şekil 12).



Şekil 12. KBH’da geleneksel ve geleneksel olmayan risk faktörleri

2.7 HİPERFOSFATEMİYE BAĞLI KLİNİK SONUÇLAR

Hiperfosfatemi, kronik böbrek hastalığı kemik mineral bozukluklarının (KBH-KMB) neden olduğu klinik sonuçların esas sorumlusudur ve kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin artmasına neden olmaktadır. Diyaliz hastalarında serum fosfat düzeyi 5,0 mg/dl (1,6 mmol/L) üzerine çıktıkça ölüm rölatif riski kademeli olarak artmaktadır. Serum fosfat düzeyi 5 mg/dl’den 6 mg/dl’ye (1,6 mmol/L’den 1,92 mmol/L) yükseldiğinde 1,07 olan rölatif ölüm riski serum fosfat düzeyi 9 mg/dl iken (2,88 mmol/L) 2,01’dir (123). Böbreğin ekskresyon işlevini devam ettiği evre III-IV KBH hastalarında hiperfosfatemi ve kardiyovasküler olaylar arasındaki ilişki tartışılmaya devam etmektedir. Ancak diyalize girmeyen KBH olan hastalarda serum fosfat düzeyinin artmasının mortalite riskini artırdığı gösterilmiştir. KBH hastalarıyla yapılan geniş bir kohortta ortalama 2 yıl takip sonucu serum fosfat düzeyi > 3,5 mg/dl (0,81 mmol/L) olan hastalarda mortalite riskinin arttığı gözlemlenmiştir. 3,5 mg/dl (0,81 mmol/L) üzerine her 1 mg/dl (0,32 mmol/L) artış ölüm riskini %23 artırmaktadır (124). Genel populasyonda yapılan uzun süreli takip (ortalama 16,1 yıl) sonucu proteinüri ve kronik böbrek hastalığı olmayan kişilerde yüksek serum fosfor düzeyinin kardiyovasküler olay riskini artırdığı tespit edilmiştir (125).

2.8 RENAL OSTEODİSTROFİNİN TANISINDA KEMİK DÖNGÜSÜNÜN BİYOKİMYASAL BELİRTEÇLERİ

Kemik döngüsünü gösteren ideal belirteçler kemiğe özgü, histomorfometrik bulgular ve radiokalsiyum kinetik sonuçları ile korele olmalıdır. Üremide kemik döngüsünü takip edebilmek için spesifik ve sensitif biyokimyasal testler araştırılmaktadır. Birçok enzim, osteoblastların sentezlediği matriks proteinlerinin ve kemik matriksinin parçalanmasıyla ortaya çıkan protein parçalarının kemik oluşumu ve rezorpsiyonunun dolaşımdaki biyokimyasal belirteçleri olabileceği düşünülmüştür (Tablo 5). Bu belirteçlerin serum düzeylerinin kullanılması sirkadyen ritim, diyet, yaş, cinsiyet, menapoz, karaciğer işlevleri ve böbrek işlevlerinin durumu gibi faktörler tarafından engellenmektedir (126).

Tablo 5. Kemik Döngüsünün Serum Belirteçleri

Kemik Oluşum Belirteçleri	Kemik Rezorpsiyon Belirteçleri
Alkalen Fosfataz (ALP)	Tartarata Dirençli Asit Fosfataz
Kemiğe Spesifik Alkalen Fosfataz (BALP)	Tip I Kollagen Çapraz Bağlı Telopeptit
Osteokalsin (OC)	Piridinolin
Prokollagen tip I Karboksil Terminal Propeptit	Deoksipiridinolin

2.8.1 Kemik Oluşumunun Biyokimyasal Belirteçleri

Alkalen Fosfataz (ALP) farklı organlar tarafından (karaciğer, kemik, böbrek, bağırsak ve plasenta) üretilen glikozillenmiş bir proteindir. Üremi ALP izoenzimlerinin yarı ömrünü değiştirmektedir. Bu nedenle total ALP ölçümü osteoblast işlevlerini değerlendirmek için yeterli değildir. Kemiğe spesifik alkalen fosfataz (BALP) ölçümü osteoblastik aktivitenin değerlendirilmesi için tercih edilen tanısal bir testtir. BALP sadece osteoblastlar tarafından üretilen 80-kDa ağırlığında bir proteindir. Diyalizle uzaklaştırılmaz ve böbrek işlevlerinden bağımsız bir proteindir. Karaciğerde metabolize olur. Primer fizyolojik işlevi kemik matriksinin mineralizasyonu sağlamak ve kemik oluşumu oluşturmaktır.

Yüksek döngülü kemik hastalığında BALP seviyesi, kemik döngüsü düşük veya normal olan hastalardan belirgin olarak yüksektir. Yapılan bir çalışmada plazma BALP düzeyi osteoklast yüzeyi ($r = 0.39$, $p < 0.0001$), milimetre karedeki (mm^2) osteoklast sayısı ($r = 0.36$, $p < 0.001$) gibi kemik rezorbsiyon parametreleri ile orantılı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca BALP kemik oluşum parametreleri olan osteoblast yüzeyi ($r = 0.50$, $p < 0.005$), ve kemik oluşum hızı ($r = 0.91$, $p < 0.0001$) ile de orantılıdır (127).

BALP düzeyi > 20 ng/ml olduğunda pozitif ve negatif prediktif değeri, yüksek döngülü kemik hastalığının diğer belirteçlerinden daha yüksektir (128). BALP düzeyinin yüksek olması (> 40 ng/ml) normal veya düşük döngülü kemik hastalığını PTH düzeyinden bağımsız olarak ekarte ettirir. BALP düzeyinin düşük olması PTH değerinin yüksek olması birlikte değerlendirildiğinde hemen hemen yüksek döngülü kemik hastalığı olmadığı söylenebilir (129). Diğer yandan BALP düzeyi yüksek ve PTH değeri normale PTH'dan bağımsız artmış kemik rezorbsiyonu olduğu düşünülebilir (130). BALP ekspresyonunun azalması osteoblastik aktivitenin ve kemik oluşum hızının azaldığını gösterir. Bu nedenle düşük BALP düzeyi, düşük döngülü veya adinamik kemik hastalığına işaret edebilir (131).

BALP düzeyinin ardışık olarak ölçülmesi tedavi sonrası kemik döngüsünün kontrolünde iyi bir belirteç olabilir. Sekonder hiperparatirodinin neden olduğu yüksek döngülü kemik hastalığının tedavisinde oral kalsitriol verilen hastalarda BALP düzeyinin düşmesi tedavinin yeterli olduğunu PTH değişikliklerinden daha iyi gösterir. BALP'nin ardışık olarak ölçümü tedavinin takibi için kullanılabilir ve BALP düzeyi düşük kalmaya devam ederse tedavi kesilebilir (132).

Osteokalsin (OC) kemik matriksinin kollajen olmayan K vitamini bağımlı bir proteindir. Osteokalsinin moleküler yapısı hidroksiapatit kristalleri ve osteokalsin arasında bağlantılı oluşturur. Osteokalsinin fizyolojik rolünün ayrıntıları henüz bilinmemektedir. OC'in kemik oluşumunun klasik uyaranlarından biri olduğu düşünülmektedir. OC aktif D vitaminin kontrolü ile osteoblastlar tarafından üretilmektedir ve kemik rezorbsiyonu ile dolaşıma geçmektedir.

Renal osteodistrofide kemik oluşum belirteci olarak OC kullanılması çeşitli nedenlerden dolayı sınırlıdır. OC serumda hızla aktif ve inaktif formlarına

parçalanmakta ve üremide birikmektedir. Ayrıca kemik matriksinin parçalanması sırasında da kemiklerden salınmaktadır. Varolan OC testlerin molekülün aktif ve inaktif formlarını ölçmektedir bu nedenle testler arasında değişkenlikler ortaya çıkmaktadır.

Prokollajen tip I karboksi terminal peptitler (PICP) tip I kollajenin kemiğe bağlanması sırasında osteoblastlar tarafından üretilir. Diyaliz öncesi kronik böbrek yetersizliğinde PICP kemik döngüsünün histomorfometrik dinamik parametreleri ve diğer humoral belirteçlerle oldukça yüksek korelasyon göstermektedir ancak statik parametrelerle korelasyonu yoktur (133).

Serum N terminal kollajen tip I propeptit (PINP) ve kemik morfojenik protein-7 (BMP-7) de kemik oluşumunun diğer belirteçleridir.

2.8.2 Kemik Rezorbsiyonunun Biyokimyasal Belirteçleri

Kemiğe spesifik tip 5b tartarata dirençli asit fosfataz (TRAP) kemik rezorbsiyonu sırasında osteoklastlar tarafından üretilir. TRAP dolaşımında 250 kDa'luk kompleks olarak bulunan 30 kDa ağırlığında proteindir. Osteopontin veya sialoprotein gibi kemik matriks proteinlerinin defosforilasyonu ile oluşur. TRAP osteoklastik aktivite ve kemik rezorbsiyon hızı ile koreledir. TRAP kemik rezorbsiyon belirteci olarak sık kullanılmaz. 14 diyaliz hastası ile yapılan bir çalışmada yüksek TRAP seviyesi ile artmış kemik rezorbsiyonu arasında belirgin bir korelasyon bulunmuştur. Yüksek TRAP düzeyi hiperparatirodizmde de tespit edilmektedir. Adinamik kemik hastalığı ve mikst renal osteodistrofide serum TRAP düzeyi oldukça düşük olarak bulunmuştur (134). TRAP'ın en büyük avantajı böbrek yetersizliğinde birikmemesidir.

Prokollajen tip I çapraz bağlı karboksil terminal telopeptit (ICTP) kemik rezorbsiyon sürecinde kemik matriksinden salınır ve tip I kollajenin helikal olmayan ucundaki küçük bir peptittir. Böbrek yetersizliğinde biritiğinden renal osteodistrofi tanısında klinik değeri düşüktür.

Kemik matriksinin yaklaşık %90' ı tip I kollajenden oluşmaktadır. Kemiğin stabilitesi kollajen lifleri arasındaki bağlantılara bağlıdır. Kemik yıkımı sırasında liziloksidaz gibi farklı enzimler bu kollajen yapıyı parçalar. Kollajen yıkım ürünlerinden tip I kollajenin α zinciri pyrodinolin (PYD) olarak adlandırılır. Kemik yıkımı sırasında

kemiklerden dolaşıma iki farklı protein, pyrodinolin ve dihidro-pyrodinolin (DPD), salınır. PYD ölçümü genel popülasyonda osteoporoz tanısı için kullanılmasına rağmen böbreklerden elimine edilmesi ve böbrek yetersizliğinde birikmesi nedeniyle renal osteodistrofide kullanılması yararsızdır (135). Diyaliz hastalarında serum PYD ve DPD düzeyi sağlıklı insanlardan yaklaşık 50-100 kat yüksektir. PYD düzeyi genel olarak yüksek döngülü kemik hastalığında oldukça yüksektir ve kemik oluşum ve rezorbsiyon parametreleri ile pozitif olarak koreledir.

2.8.3 B₂ Mikroglobulin ve Kemik Şekillenmesi

B₂ mikroglobulin moleküler ağırlığı 11.810 Da olan bir polipeptittir. Hemodiyaliz hastalarında kemik ve eklem çevresinde meydana gelen amiloid birikiminin esas elementidir. B₂ mikroglobulin katabolizması böbrekler tarafından sağlandığından böbrek işlevlerinin azalmasıyla birikmeye başlar ve anürik hastalarda oldukça yüksek düzeylerde bulunur (136). Yüksek döngülü kemik hastalığında serum düzeyi düşük döngülü kemik hastalığından daha yüksektir. Serum B₂ mikroglobulin düzeyi osteokalsin, kemiğe spesifik alkalin fosfataz ve de serbest pyrodinolin ile koreledir ancak PTH ile korelasyonu yoktur. B₂ mikroglobulin yüksek döngülü kemik hastalığında osteoid volüm ile ters olarak koreledir.

2.9 KALSİFİK ÜREMİK ARTERİOLOPATİ (KALSİFLAKSİ)

Kalsifik üremik arteriopatı (kalsiflaksi) sık görülmeyen ancak yaşamı tehdit eden bir durumdur. Özellikle kronik böbrek yetersizliği ve sekonder hiperparatirodizmi hastalarda görülmesine rağmen böbrek işlevleri ve kalsiyum, fosfor metabolizması normal olan kişilerde de görülebilir (137). Nadir bir hastalık iken kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı ve D vitamini kullanımının artması ile birlikte prevalansı artmaya başlamıştır. Patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Klinik risk faktörleriyle birlikte histopatolojik bulgular değerlendirildiğinde kalsiyum fosfor mekanizmasının bozulması kalsiflaksi patogenezinin merkezinde yer almaktadır.

Kalsiflakside tipik olarak alt ekstremitelerde oldukça ağrılı skarlar vardır. Batın duvarı ve penis gibi diğer bölgeleri de etkileyebilir ancak yüz ve üst ekstremitelerde görülmesi oldukça nadirdir. Sendrom tipik olarak eriteme benzer livedo retikularis gelişmesini takiben etkilenen bölgede duyu kaybı ile başlar ve derin ülserlere ilerler. Cilt altı ele

gelen kalsiyum birikimleri görülebilir. Lezyonlar oldukça ağırlıdır ve üzerindeki doku kaşıntılı olabilir. Lezyonlar kan akımının azalarak hipoksiye neden olduğu yağ dokusu bölgelerinde ortaya çıkabileceği düşünülmektedir ancak kalsiflaksinin yağ dokusunun bulunmadığı bölgelerde ortaya çıkması bu düşünce ile çelişmektedir. Malnutrisyon ve obezite kalsiflaksi gelişimi için risk faktörüdür. Obezite ile kalsiflaksi arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamakla birlikte abdominal yağ miktarının artması yağ dokusuna kan akımını azaltır ve küçük damarlarda tromboz gelişmesi için risk faktörü oluşturur. Kalsiflaksi gelişimi için en önemli risk faktörleri kadın olmak, diyabet ve yüksek serum fosfor düzeyidir. Serum fosfat düzeyinin artması ile kalsiflaksi gelişiminin riskinin artması ile koreledir. Hiperkalsemi ve aynı zamandan kalsiyum x fosfat düzeyinin artması kalsifikasyon gelişmesi için gerekli bir durumdur. PTH ile kalsiflaksi arasında direkt bir ilişki bilinmemesine rağmen PTH kalsiflaksi gelişmesine zemin hazırlayan ‘doku düzeyinde duyarlılaştırıcı’ olarak kabul edilmektedir (138). Primer hiperparatiroidili ve serum fosfat düzeyi normal veya düşük olan hastalarda kalsiflaksi görülmesi PTH’un patogenezdaki rolünü desteklemektedir.

Serum albumin düzeyi beslenme durumunun belirteci olarak kullanılabilir. Serum albumin düzeyinin düşük olması ile kalsiflaksi arasında önemli bir ilişki olduğu bilinmektedir. Hipoalbuminemi ayrıca diyaliz hastalarında mortalitede artışı gösteren bir belirteçtir ancak kalsiflaksi patogenezinde rolü olması olasılığı düşüktür.

Kalsiflaksi tanısı öncelikle klinik olarak konulur ancak histolojik olarak doğrulanması gereklidir ve altın standarttır. Yumuşak doku grafilerinde ince ağaç dallanması şeklinde cilt damarlarının vasküler kalsifikasyonu görülebilir. Cilt biopsi yapmak iyileşmeyen ülserlere yol açabilir, bunun dışında önemli bir riski yoktur. Etkilenen alanlardan yapılan biopsilerde kalsiflaksiye özgü endovasküler fibroz ile birlikte vasküler kalsifikasyon, pannikülit (deri altı yağ dokunun inflamasyonu) ve sonuçta doku nekrozu görülür. Küçük damarlarda (kapiller, venüller ve 600 µm’den büyük arteriollerde) da tromboz görülür. Fibrin trombozları kalsiflaksinin yayılmasına neden olan prokoagulan bir durumun olduğunu gösterebilir. Obliteratif vaskülopati nekroz gelişmesine neden olan en önemli faktördür. Kalsiflaksinin ayırıcı tanısında periferik vasküler hastalık, kolesterol embolisi ve kriyopresipitat

bozuklukları düşünölmelidir. Histolojik olarak bu lezyonlar kolayca ayrılabilir.

Vasköler kalsifikasyon patogenezindeki mekanizmalar kalsiflaksi gelişmesi için geçerlidir. Pasif bir süreç değildir ve aktif olarak kontrol edilmektedir. İnorganik fosfat düzeyinin artması kalsiflaksi gelişmesi için en önemli faktör olarak düşünölmektedir. Yüksek fosfor düzeyi vasköler düz kas hücrelerinde osteojenik belirteçlerin ekspresyonunu artırmakta ve neden olduğu fenotipik değışiklikler (düz kas hücrelerinin osteoblastlara) kalsifikasyon için ortam oluşturmaktadır.

Osteopontinin vasköler düz kas hücrelerinde eksprese edilmesi kalsiflaksi lezyonlarının oluşmasını artırır ve ölü hücrelerin damar lümeninde düşmesini sağlayarak tromboz gelişmeden önce kan akımının yavaşlamasına yol açar (139).

Kemik morfojenik protein-4 (BMP-4) kemik dokusunun düzeltilmesi ve gelişiminden sorumludur ancak aterosklerotik lezyonlarda da gösterilmiştir.

Biopsilerde arteriollere komşu intradermal hücrelerde ekspresyonunun arttığı gösterilmesiyle kalsiflakside kalsifikasyonu kontrol eden faktörlerden biri olduğu düşünölmüştür (140).

Düz kas hücreleri pluripotenttir. Üremik koşullarda hiperfosfateminin etkisi ile düz kas hücresi gen ekspresyonu azalır ve osteoblastik farklılaşma artar. Bu durum kalsiyum bağlayan proteinlerin ve hücre dışı kalsiyum birikiminin oluşmasına neden olur. Sekonder hiperparatiroidizm ve hiperfosfatemi nedeniyle kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların kullanılması ektopik kalsifikasyon gelişmesini oldukça kolaylaştırır. Tip II diyabet hastalarında endotel işlevlerinin bozulması ile nitrik oksit (NO) sentezi azalır ve süperoksit radikallerinin oluşması artar. Beslenmesi bozulan üremik hastalarda folik asit yetersizliği lokal endotelial NO (eNO) üretimini ve vazodilatasyonu daha da bozar.

Warfarin kullanımı kalsiflaksi gelişmesinden sorumludur. Warfarin protein C ve S üretimini azaltır. Bu proteinlerin eksikliğinin kalsiflaksi gelişmesinde önemli bir rolü yoktur (141). Matriks GIa (MGP) proteininin işlev gösterebilmesi için K vitaminine bağlı γ -karboksilasyonu gereklidir. Warfarin MGP karboksilasyonunu bozarak kalsifikasyon kaskadı dengesini değıştirmekte ve vasköler kalsifikasyon gelişmesini kolaylaştırmaktadır.

Son dönem böbrek yetersizliği olan hastaların bir kısmında beslenmenin ve kalsiyum homeostazının düzeltilmesi ile kalsiflaksi önenebilir. Prognozu oldukça kötüdür ve hastaların yaklaşık %80'i özellikle yara enfeksiyonuna bağlı olarak ölmektedir.

Diyetin düzenlenmesi ve fosfat bağlayıcıların kalsiyum içermeyenlerle değiştirilmesinden sonra iyileşmenin sağlanabilmesi için yara bakımının yapılması en önemli faktördür. Yara bakımı, vakumlu sargılar ile yaralardaki nekrotik dokuların temizlenmesi, gergin dikiş kullanılmaması ve sistemik antibiyotik kullanılması ile sağlanır. Morfin teorik olarak hipotansiyona neden olup doku perfüzyonunu bozduğundan analjezi için fentanil tercih edilir.

Kalsiflaksi tedavisinde hiperfosfateminin düzeltilmesi hayati önemi olan bir adımdır. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar kalsiyum içermeyen fosfat bağlayıcılar veya cianalcet ile değiştirilmeli veya seçilen hastalara paratiroidektomi uygulanmalıdır.

Bifosfanatlar kalsiflaksi lezyonlarının iyileşmesini kolaylaştırmaktadır. Farmakolojik olarak hidroksiapatit kristallerinin büyümesini ve reabsorpsiyonunu değiştirir. Bu bileşikler osteoklast öncüllerinin kemik yüzeyine girmesini ve sonuç olarak olgun hücrelere dönüşmesini engeller. Ayrıca lokal makrofaj aktivitesini ve proinflamatuvar sitokin salınmasını azaltır. Vasküler düz kas hücrelerinin fenotipik olarak osteoblast ve osteoklastlara benzemesi kalsifikasyon alanlarında bifosfanatların bağlanmasını kolaylaştırır ve arteriyel kalsifikasyonun önlenmesini sağlar.

Sodyum tiosülfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) indirgeyici bir ajandır ve birçok metale bağlanarak suda eriyen bileşikler oluşturulmasını sağlar. Yaklaşık 110 yıl önce ilk defa siyanid zehirlenmesinin tedavisinde kullanılmıştır. Ayrıca sisplatin ve karboplatinin toksik etkilerini önlemek ve pitriasis versikolor tedavisinde kullanılmaktadır. Kalsiflakside kullanıldığında kalsiyum tiosülfat oluşturur ve antioksidan etki gösterir. Kalsiyum tiosülfat bileşiğinin suda eriyebilirliği oldukça fazladır, böylece damar duvarında kalsiyum fosfat presipitasyonu azalır. Sodyum tiosülfat ayrıca serbest kalsiyum konsantrasyonunu azaltır. Antioksidan özelliği endotelial işlev bozukluğunu düzeltir ve vazodilatasyonun sağlanmasına yardımcı olur.

Histolojik kesitlerde arteriyel trombüslerin izlenmesi düşük molekül ağırlıklı heparin gibi antikoagulanların güvenle kullanılabileceğini göstermektedir. Düşük molekül

ağırlıklı heparin sıklıkla bifosfanat ve hiperbarik oksijen tedavisi ile birlikte kullanılmaktadır.

Hiperbarik oksijen tedavisi sekonder hiperparatiroidizme bağlı olmayan kalsiflakside, paratiroidektomiye uygun olmayan ve cerrahi girişim düşünülmeyen hastalarda önemli bir seçenektir. Hiperbarik oksijen kanda çözünen ve dokulara ulaşan oksijen miktarını artırmaktadır. Fibroblast işlevlerini uyarıp kollajen matriks oluşumunu sağlayarak yara iyileşmesinin artmasını sağlamaktadır. Arteriyel vazokonstriksiyonu azaltarak ödem ve reperfüzyon hasarının düzelmesini sağlamaktadır. Ayrıca nötrofillerin bakterisidal aktivitesini artırmaktadır. Nötrofillerin bakterileri öldürebilmesi için hidrojen peroksit, süperoksit gibi serbest oksijen radikalleri ve hidroksil radikallerinin oluşması ve bunların oluşabilmesi için moleküler oksijen gereklidir.

Sonuç olarak, sodyum tiosülfat kalsiyum tuzlarının eriyebilirliğini artırmaktadır. Üremiye bağlı vasküler kalsifikasyonu önlemekte, kalsiflaksi lezyonlarının ağrısını azaltmakta ve lezyonları iyileştirmektedir.

2.10 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI-KEMİK MİNERAL BOZUKLUKLARININ TEDAVİSİ

2.10.1 Hiperfosfateminin Tedavisi

Hiperfosfateminin tedavisi aslında patogenezi dikkate alındığında sekonder hiperparatiroidinin tedavisidir. Sekonder hiperparatiroidinin patogenezinin dayanarak günlük pratikte birçok tedavi seçeneği kullanılmaktadır. Birincisi, fosfat alımını olabildiğince azaltmak (~ 800 mg/gün). Bu ancak protein alımını neredeyse kesmeyi gerektirdiğinden hastalar tarafından pek uygulanamamakta ve zamanla protein eksikliğinin yarattığı klinik ve laboratuvar bozukluklarına neden olmaktadır. İkincisi, diyaliz tekniklerinde hemodiyafiltrasyon ve geniş yüzeyli diyaliz filtrelerinin kullanılması gibi gelişmelerle vücuttan fosfat uzaklaştırılması artırılabilir. Bu da kullanılan fosfat bağlayıcı dozunun azalmasını sağlayabilir. Üçüncüsü, kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar serum fosfat ve PTH düzeyini düşürür ancak özellikle D

vitamini ile birlikte kullanıldığında serum kalsiyum düzeyini yükseltir. Dördüncüsü, kalsiyum ve alüminyum içermeyen yeni ilaçlar, sevelamer gibi, etkinliğinin düşük olmasına rağmen uygun hastalarda düşünülebilir. Beşinci olarak, kalsitriol ve diğer D vitamini metabolitleri bağırsaktan kalsiyum ve fosfat emilimini artırarak hiperfosfatemi, hiperkalsemiye neden olmak ve kemik döngüsünü baskılayarak dinamik kemik hastalığına yol açmak pahasına da olsa PTH düzeyini düşürür. Ayrıca kalsitriol tedavisi değişen oranlarda aortik kalsifikasyona neden olabilir. Kronik böbrek yetersizliğinin erken evrelerinde serum kalsiyumunun düşük olması sekonder hiperparatiroidiye neden olduğundan D vitamini önemli bir tedavi seçeneğidir. Son olarak, kalsimimetikler paratiroid bezinde kalsiyum duyarlılaştırıcı reseptörleri aktive ederek (CaR) PTH sekresyonunu doğrudan inhibe eder.

Sekonder hiperparatiroidinin tedavisine evre III KBH'da (GFR < 60 ml/dk) başlanmalı ve tedavi sürecinde nefrolog, diyetisyen ve hasta iletişimi etkin bir şekilde sağlanmalıdır. KBH'nın evrelerine göre değişen tedavi hedefleri belirlenmeli ve her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. GFR < 60 ml/dk tespit edilen tüm hastaların kalsiyum, fosfor, iPTH değerleri düzenli olarak takip edilmeli ve bu değerlere göre tedavi yönlendirilmelidir. K/DOQI (Kidney Disease Outcome Quality Initiative) klavuzunun önerdiği ölçüm sıklığı ve hedef değerler KBH evrelerine göre Tablo 6'de belirtilmiştir.

Sekonder hiperparatiroidinin tedavisi üç basamakla özetlenebilir (Şekil 13):

1. Birinci basamakta, kalsiyum ve fosfor düzeyi KBH evresine göre önerilen düzeylerde tutulmaya çalışılmalıdır. Bu değerler diyet tedavisinin düzenlenmesi ve fosfat bağlayıcılarla sağlanmaya çalışılmalıdır (kalsiyum asetat, sevelamer veya lantan). Evre III ve IV KBH'da 25-OH D vitamini düzeyi < 30 ng/ml ise al fakalsidiol, ergokalsiferol tedavisi başlanması düşünülmelidir.
2. İkinci basamakta, PTH ve D vitamini düzeyleri kalsimimetik ve/veya D vitamini analoglarıyla kontrol altına almaya çalışılmalıdır. Kalsiyum ve fosfor değerleri normalin üst sınırına yakın veya yüksekse cinacalcet

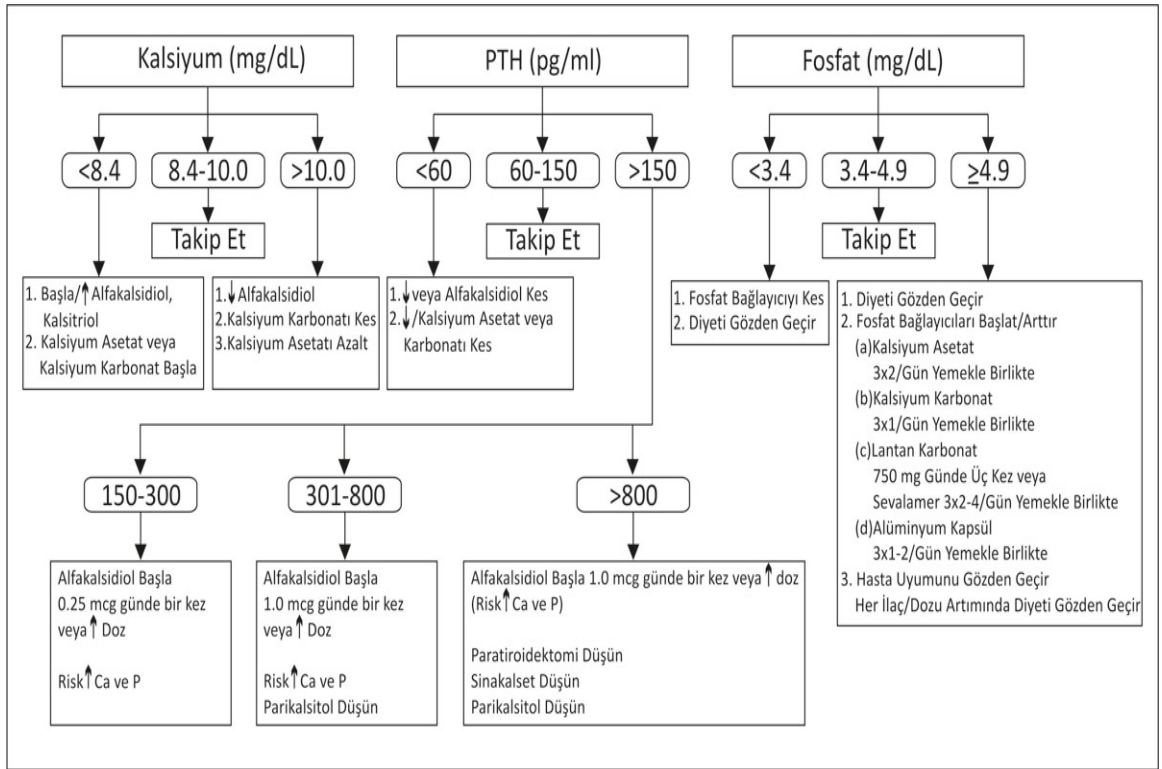
başlanabilir. Diğer yandan kalsiyum değeri normal sınırlardaysa D vitamini analogu başlamak iyi bir seçenek olabilir.

- Üçüncü basamakta, fosfat bağlayıcıların, kalsimimetiklerin ve D vitamininin dozu K/DOQI klavuzunun hedef değerlerine göre ayarlanır.

Tablo 6. KBH Evrelerine Göre Fosfor, PTH Hedef Değerleri ve Ölçüm Sıklıkları

Evre	GFR aralığı (ml/dk/1,73m ²)	PTH Ölçümü	Ca ve Pi Ölçümü	Pi Hedefi (mg/dl)	PTH Hedefi (pg/ml)
III	30-59	12 ayda 1 kez	12 ayda 1 kez	2,7-4,6	30-70
IV	15-29	3 ayda 1 kez	3 ayda 1 kez	2,7-4,6	70-110
V	<15 veya diyaliz	3 ayda 1 kez	Her ay	3,5-5,5	150-300

‘National Kidney Foundation 2003’ten uyarlanmıştır’



Şekil 13. Diyaliz hastalarında kemik mineral bozuklukları tedavisi için bir algoritma

(Delaney M. (2009). Managing Bone Mineral Disorders in CKD: An Overview of Current Therapies. *Journal of Renal Care* 35(s1) 107–110.’den uyarlanmıştır.)

2.10.1.1. Düşük Fosforlu Diyet

Böbrek yetersizliğinin ilerlemesi ile kaçınılmaz olarak fosfat birikmeye başlar. Glomeruler filtrasyon hızındaki azalma ile orantılı olarak diyetteki fosfat alımının azaltılması fosfat birikimini ve yol açtığı klinik sonuçları önleyebilir. Ancak günlük pratikte, alınması gereken gıdaların çoğunda fosfat bulunması ve düşük fosfor içeren diyetle uyum sağlayabilmenin oldukça zor olması nedeniyle kronik böbrek hastalığı/yetersizliğinde fosfat birikimini önleyebilmek pek mümkün değildir. Gıdaların protein ve fosfor içeriği arasında direkt bir ilişki mevcuttur (142). Besin dengesini sağlayabilmek ve protein malnutrisyonuna neden olmamak için stabil bir hemodiyaliz hastasının 1,2 g/kg/gün, periton diyalizi hastalarının 1,3 g/kg/gün protein içeren diyetle beslenmesi gerekir. Bu miktardaki proteinin sağladığı fosfor miktarı > 1000 mg/gün'dür ve bu miktar haftada üç gün standart diyalizin uzaklaştırılabileceği kapasitenin üzerindedir. Bu nedenle hemodiyaliz hastalarında düşük fosfor içeren diyetle birlikte fosfat bağlayıcıların kullanılması kaçınılmaz hale gelmektedir.

Diyetteki fosfatın kısıtlanması hipofosfateminin tedavisinde ve önlenmesinde farmakolojik tedaviyi destekleyen önemli bir tedavi yaklaşımıdır. Gıdaların fosfor/protein oranı protein dengesini bozmadan hangi gıdalardan kaçınılması gerektiğini gösteren faydalı bir belirteçtir. Aynı miktarda protein içeren ancak fosfor içeriği düşük olan gıdalar özellikler tercih edilmelidir (Örneğin, yumurta beyazının fosfor/protein oranı düşüktür).

Diyetteki fosfat içeriğinin doğru tespit edilebilmesi için üç ana kaynağı gözden geçirmek gerekir. Bunlar doğal fosfat içeren pişirilmemiş veya işlenmemiş gıdalar; gıdaların işlenmesi sırasında fosfat eklenenler ve fosfor içeren diyet ilaveleridir (vitaminler gibi).

Et, süt, süt ürünleri, yumurta ve tahıllar da doğal olarak fosfat içerir ve ortalama bir diyetle alınan toplam fosfatın büyük bir kısmını oluşturur. (Tablo 7). Ayrıca günümüzde işlenmiş gıda üretiminin ve tüketiminin artması ve bunların fosfat içeriğinin yüksek olması nedeniyle günlük fosfat alımı da artmaktadır. Et kalitesini artırmak amacıyla kullanılması gibi fosfatla gıda işlenmesi için fosforik asit kullanılmaktadır. İşlenmiş gıdalardaki fosforik asit gastrointestinal sistemden doğal gıdalarda bulunan fosfattan daha fazla emilmektedir.

Kalsiyum içeriği artırılmış gıdaların üretiminde yaygın olarak kalsiyum fosfat tuzu kullanıldığından diyetle alınan fosfat miktarını doğrudan etkilemektedir. Ayrıca karbonat veya sitrat gibi fosfat içermeyen tuzlarla gıdaların kalsiyum içeriği artırıldığında bu fazladan kalsiyum fosfat bağlayıcı olarak etki gösterir ve bağırsakta fosfatın biyoyararlılığını azaltır.

Farklı gıdaların içerdiği fosfatın biyoyararlılığı diyet kaynaklı fosfatın değerlendirilmesi için oldukça önemli bir konudur. Bitkilerdeki fosfatın büyük bir kısmı (~ % 75'i) fitatlardan oluşur. İnsanların ince bağırsağından fitatları parçalayıp fosfor salınmasını sağlayan fitaz enzimi salgılanmaz. Bu nedenle fitat fosforunun insanlarda biyoyararlanımı yoktur. Ancak gıdalar fitaz içeren mayalarla, ekmeğin mayalanmasında olduğu gibi, fitazla işlenirse biyoyararlanımlı hale gelir. Etlerdeki fosfor çoğunlukla hücre içinde organik bileşikler olarak bulunur. İnce bağırsakta hidrolize olduktan sonra inorganik fosfor oluşur ve oldukça iyi emilir. Sütteki fosfor farklı fraksiyonlarda bulunur ve her birinin farklı biyoyararlanımı vardır. Gıdaların işlenmesi sırasında eklenen fosfat çoğunlukla inorganik fosfat tuzlarıdır ve bu nedenle bağırsaklardan hemen hemen tümü emilir. Bu nedenle böbrek yetersizliği olan hastalarda fosfat yükünün daha da artmasına neden olur.

Sonuç olarak değişik faktörlere bağlı olarak karışık bir diyetteki fosforun sadece %60'ı emilir. Bu yüzden tüketilen gıda gruplarının hakimiyetine ve işlenmiş gıdaların tüketim oranına bağlı olarak değişir. Fosfat içeriği düşük bir diyet programı hazırlanırken fosfat biyoyararlanımı düşük bitkisel proteinler dikkate alınmalıdır. Uygun bir diyet hayvansal ve bitki kaynaklı proteinleri içermelidir.

Düşük fosfor içeren işlevsel gıdalar böbrek yetersizliği olan hastalarda gıda seçeneklerini artırmak amacıyla geliştirilmiştir. Ülkemizde bulunmamakla birlikte düşük fosfor içeren süt ve peynir ilk iki ürün olarak satışa sunulmuştur.

Demineralizasyon yöntemi gıdaların suda ıslatılarak minerallerin uzaklaştırılması yöntemidir. Örnek olarak demineralizasyon yöntemi öncesi ve sonrası yapılan ölçümlerde sebzelerde %51, bakla tohumunda %38, un için %70 ve çedar peynirinde %19 oranında fosfat azalması olmaktadır. Bu yöntemde hastalar yemeklerin hazırlanması için fazladan uğraştıklarından ve demineralize edilen gıdaların lezzetini kaybettiğinden yakınmaktadırlar. Gıdaların haşlanması da protein içeriğinin

korunmasını sağlayarak diyetteki fosfatın büyük ölçüde azalmasını sağlar. Yani diyetteki proteinin gramı başına fosfat alımı düşer.

Özetle, günümüzdeki diyaliz teknikleri ve fosfat bağlayıcılarla iyi beslenen diyaliz hastalarında serum fosfor düzeyini normal sınırlarda tutmak mümkün değildir.

Diyetteki fosfor miktarını sınırlamak için klinik pratik öneriler şunlar olabilir: 1. Orta derecede protein alınmalı (yaklaşık 1 mg/kg/gün). 2. İçerdiği fosfat oldukça az emildiğinden protein kaynağı olarak bitkisel proteinlerin oranı artırılmalı, 3. Oldukça fazla işlenmiş, kolayca tüketilebilen gıdaların tüketiminden uzak durmak. (143).

KBH 'da düşük fosfor içeren diyet evre III ve IV'te fosfor > 4,6 mg/dl ve evre V'te > 5,5 mg/dl olduğunda veya PTH normal değerlerinin üstünde ve kalsiyum ve fosfor normal sınırlarda olduğunda başlanmalıdır. Yüksek protein/düşük fosfor içeren diyetin sağkalımı belirgin olarak uzattığı ve düşük protein/düşük fosfor içeren diyetin mortaliteyi belirgin olarak artırdığı bilinmektedir (144).

Tablo 7. Bazı Gıdaların Fosfor İçeriği ve Fosfor/Protein Oranları

Besin	Porsiyon	P(mg)	Protein	P/protein
Et				
Dana eti	85 gr	212	31	6,8
Tavuk	140 gr	259	35	7,4
Kuzu	85 gr	162	22	7,4
Biftek	85 gr	200	26,4	7,6
Hindi	85 gr	208	24	8,7
Balık	85 gr	221	19,4	11,4
Domuz	85 gr	224	18	12,4
Yengeç	85 gr	238	16,5	14,4
Ekmek, tahıl ve kuru yemiş				
Ekmek	1 dilim	25	3,4	7,3
Baget	3,5"	68	7,5	9,0
Badem	85 gr	134	6	22,3
Şamfıstığı	85 gr	137	6	22,8
Ceviz	85 gr	98	4,3	22,8
Bisküvi	2,5"	98	4,2	23,3
Kahvaltılık				
gevrek	1 bardak	259	5,2	49,8

Tablo 7. Devam

Besin	Porsiyon	P(mg)	Protein	P/protein
Süt, süt ürünü, yumurta				
Yumurta akı	1 adet	5	3,6	1,4
Tavuk yumurtası	1 adet	96	6,3	15,3
Peynir	85 gr	133	6,6	20
Yoğurt	237 ml	327	11,9	27,5
Süt	1 bardak	222	7,9	28
Baklagiller ve pirinç				
Bezelye	1 kase	114	7,5	15
Kuru fasulye	1 kase	183	12	15
Mercimek	1 kase	356	17,9	19,9
Beyaz pirinç	1 kase	74	4	18,4
Kahverengi pirinç	1 kase	162	5	32

(USDA Ulusal Besin Veri Tabanından uyarlanmıştır)

2.10.1.2 Bağırsaktan Fosfor Emilimini Azaltan İlaçlar

2.10.1.2.1 Fosfat Bağlayıcılar

İdeal bir fosfat bağlayıcının özellikleri Talo 8’de özetlenmiştir. Bu kriterlere göre ideal bir ilaç kolayca yutulabilecek kadar ufak, tek, tadı güzel tablet veya kapsül olmalı; günde iki kez bir tablet dozunda fosfata oldukça iyi bağlanabilmeli; öğün arasında alınmalı ve serum fosfat düzeyini normal sınırlarda tutabilmelidir (2.60-4.40 mg/dl). Fosfat bağlayıcılar bağırsaktan emilmeden doğrudan atılmalı ve gastrointestinal sistemin herhangi bir yerindeki pH’dan bağımsız olarak kolayca fosfat bağlayabilmelidir.

Tablo 8. İdeal Fosfat Bağlayıcıların Özellikleri

Yüksek afinite ile fosfat bağlamalı, gereken tablet sayısı az olmalı
pH'a bağlı olmadan hızla fosfat bağlayabilmeli
Çözünürlüğü az olmalı
Emilimi az olmalı (tercihen olmamalı)
Toksik ve yan etkileri olmamalı
Katı oral formda olmalı
Tadı iyi olmalı ve uyumu artırmalı
Ucuz olmalı

Günümüzde kullanılan fosfat bağlayıcıların avantaj ve dezavantajları Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9. Oral Fosfat Bağlayıcıların Avantaj ve Dezavantajları

Fosfat Bağlayıcı	Avantajlar	Dezavantajlar
Kalsiyum	Aluminyum içermez	pH'dan etkilenir
Karbonat	Orta derece etkili Tablet sayısı çok değil Ucuz	Lezzetsiz Hiperkalsemi GI yan etkileri var Ektopik kalsifikasyon olasılığı var
Kalsiyum Asetat	Aluminyum içermez Etkinliği pH'a bağlı Ucuz olarak kabul edilebilir Kalsiyum içeriği karbonattan düşük	Yutulacak tabletlerin boyutu büyük Hiperkalsemi GI yan etkileri var Ektopik kalsifikasyon olasılığı var
Aluminyum Tuzları	Kalsiyum içermez Etkinliği çok iyi Ucuz pH'dan etkilenmez Kullanılan tablet sayısı az	Aluminyum toksisitesi Kesin güvenli dozu yok Sık izlem gerekli
Sevelamer	Kalsiyum ve aluminyum içermez GI Emilimi yok Orta derece etkili Total ve LDL kolesterolü düşürür	Pahalı pH'tan etkilenir Gerekli tablet sayısı fazla Yağda eriyen vitaminlere bağlanır

Tablo 9. Devam

Fosfat Bağlayıcı	Avantajlar	Dezavantajlar
Lantan	Kalsiyum ve alüminyum içermez	Pahalı
Karbonat	Çiğnenir, bütün olarak yutulmaz pH'dan bağımsız etkinliği oldukça iyi Kullanılan tablet sayısı az	GI yan etkileri var Minimal GI emilimi var

2.10.1.2.1.1 Alüminyum İçeren Fosfat Bağlayıcılar

Alüminyum içeren tuzlar oldukça etkili fosfat bağlayıcılardır ve 1980'li yılların ortalarına kadar yaygın olarak kullanılmışlardır. Gastrointestinal sistem alüminyum için geçirgen olmamasına rağmen bazı durumlarda yeteri kadar alüminyum emilerek kan ve dokularda alüminyum konsantrasyonunu artırmaktadır. Alüminyum sağlıklı insanlarda böbreklerden ekskrete edilmekte ve bu nedenle alüminyum toksisitesi görülmemektedir (145). Kronik böbrek hastalığı olan hastalarda ise vücutta özellikle kemiklerde önemli miktarda alüminyum birikimi olmaktadır. Gastrointestinal emilim yeni doğan ve çocuklarda erişkinlerden daha fazladır. Ayrıca vücutta biriken miktarı sitratla birlikte kullanıldığında daha da artmaktadır. Alüminyum birikimi osteomalazi, adinamik kemik hastalığı, mikrositik anemi ve ensefalopatiye neden olmaktadır. Diyaliz ensefalopatisi olarak adlandırılan sendrom başlangıçta sadece hemodiyaliz hastalarında rapor edilmiştir. Bu hastalarda alüminyum kaynağı olarak diyalizat solusyonu hazırlamak için kullanılan suyun alüminyum ile kontamine olması gösterilmiştir. Suyu daha iyi saflaştırarak alüminyumun uzaklaştırılmasıyla diyaliz ensefalopatisi görülmemeye başlanmıştır. Alüminyum birikimi Alzheimer hastalığı gibi diğer nörodejeneratif hastalıklara da neden olmaktadır.

Kidney Disease Outcome Quality Initiative (KDOQI) klavuzu alüminyum içeren fosfat bağlayıcıların tümünün kullanılmasına karşı dikkatli olunması gerektiğine dikkati çekmekte; kısa süreli (≤ 4 hafta) ve serum fosfor düzeyinin $> 7,0$ g/dl (2,26 mmol/L) olması durumunda, bir sefere mahsus kullanılmasını, ardından tedavinin diğer fosfat bağlayıcılar ile değiştirilmesini önermektedir (146).

Genel olarak, oral fosfat bağlayıcılar fosfat bağladıkları zaman anyonlarını bırakırlar. Ancak polimer tipi (sevelamer gibi) fosfat bağlayıcılarında olduğu gibi katyonik moleküller anyonlarını bıraktıktan sonra serbest katyonlar olarak kalmazlar. Bu özelliği nedeniyle katyonik moleküller fosfat bağlayıcı olarak kullanılacaksa bu metallerin gastrointestinal sistem boyunca emilimini engelleyebilmek için geniş bileşiklerin içine hapsedilmesi gerekir. Klinik pratikte kullanılan bu özelliğe sahip fosfat bağlayıcı bulunmamaktadır.

Metal bileşik tipi fosfat bağlayıcı fikri boehmite tipi alüminyumun (B-alm) gösterilmesiyle ortaya çıkmıştır. Alüminyum çok etkin bir fosfat bağlayıcıdır ancak bağırsaklardan emilip vücutta birikerek toksik etki göstermesi nedeniyle kullanımı oldukça sınırlıdır. Eğer alüminyum katyonunun gastrointestinal sistemden emilim engellenebilirse alüminyuma bağlı bütün sorunlar çözülmüş olacaktır. B-alm, $A_1O(OH)_nH_2O$ olarak ifade edilen alüminyum hidroksitten oluşan bir kristaldir. Bu kristal etanolde çözünmez ve suda çözünmesi oldukça zordur, gastrointestinal sistemden emilmez. Ayrıca kristal yapı özelliği nedeniyle alüminyum molekülleri B-alm yapısının dış kısmında alüminyum hidroksit jelinden daha fazla bulunur. Bu nedenle B-alm'ın fosfat bağlama kapasitesi alüminyum hidroksit jelinden çok daha fazladır.

B-alm'ın fosfat bağlayıcı olarak kullanıldığı klinik çalışma bugüne kadar düzenlenmemiştir. Kristal yapısı oldukça stabil ve sağlam olmasına rağmen bazı kristaller alkali ortamda parçalanabilmektedir. Bu nedenle çok az miktarda alüminyum bağırsaktan emilebilir. B-alm alüminyum hidroksit jelinden daha etkin ve güvenli bir fosfat bağlayıcı olarak kullanılabilir hale gelebilir (147).

2.10.1.2.1.2 Kalsiyum İçeren Fosfat Bağlayıcılar

Yüksek dozda kalsiyum karbonatın bağırsaktan Pi emilimini azalttığı otuz yıldan fazla süredir bilinmektedir ve yaklaşık yirmi yıldır kalsiyum içeren tuzlar fosfat bağlayıcı olarak kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan kalsiyum içeren Pi bağlayıcılar kalsiyum sitrat, kalsiyum asetat, kalsiyum karbonat ve kalsiyum ketoglutarattır. Kalsiyum tuzlarının mide (pH 1,5) ve bağırsak sıvılarında (pH 7,5) parçalanma süreleri oldukça farklıdır. Kalsiyum içeren tuzlar demir emilimini hafifçe

azaltmaktadır. Ayrıca kalsiyum karbonatın kurşun içerme olasılığı da ayrı bir kaygılandırıcı durumdur.

KDOQI klavuzu kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların sağladığı toplam elementer kalsiyumun 1500 mg/gün geçmemesini ve toplam alınan kalsiyumun (diyetle alınan kalsiyum dahil) 2000 mg/gün dozunu geçmemesini önermektedir. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar ve genel özellikleri şu şekilde özetlenebilir.

Kalsiyum Sitrat

Kalsiyum sitrat plazma Pi konsantrasyonunu ve PTH düzeyini etkin olarak düşürebilen bir tuzdur. Alüminyumla birlikte kullanıldığında plazma alüminyum konsantrasyonunun artmasına neden olur ve idrar alüminyum atılımı dört kat artar. Sitrat alüminyumun parasetülüler transportunu artırarak emilimini daha da artırır. İntestinal alüminyum emilimini artırmasının yanı sıra hiperkalsemi insidansının yüksek olması nedeniyle fosfat bağlayıcı olarak sitrat nadiren kullanılır ancak kalsiyum desteği için kullanılmaya devam edilmektedir.

Kalsiyum Karbonat

Kalsiyum karbonat intestinal fosfat emilimini etkin olarak azaltır ve serum düzeyini düşürür. Kalsiyum sitrat gibi alüminyum emilimini artırmaz. Pi bağlama kapasitesi pH 1,5'te en fazladır. Nötral sıvılarda kolayca çözünmez ve nötral pH'da Pi'a oldukça az bağlanır. Kronik böbrek yetersizliğinde büyük oranda asit salgılanması bozulmuştur ya da hastalar genellikle asit salgısını azaltan ilaçlar kullanmaktadır. Bu nedenle kalsiyum karbonatın çözünmesi azalır ve Pi bağlama kapasitesi düşer. Ancak gastrik asit sekresyonunun bu inhibitör etkisi serum Pi üzerinde pek fazla etki göstermez.

Kalsiyum karbonat, kalsiyum asetatın yaklaşık yarısı kadar Pi bağlama kapasitesine sahiptir. Ayrıca hiperkalsemik etkisi kalsiyum asetatın daha fazladır. Kalsitriol kullanan hastalarda hiperkalsemi kalsiyum karbonat ve asetatla benzer oranlarda görülmektedir. Hemodiyaliz uygulanan hastalarda düşük kalsiyum içeren diyalizatla (2,5 mEq/L) kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların birlikte kullanılması hiperkalsemi

insidansını azaltır. Düşük kalsiyum içerikli diyalizat kullanılması teorik olarak hiperparatiroidizme neden olur ancak düşük kalsiyum içeren diyalizatla birlikte kalsiyum karbonat kullanılması ile PTH değerinde yükselme tespit edilmemiştir.

Kalsiyum Asetat

Kalsiyum asetatin birçok özelliği kalsiyum karbonatla benzerdir fakat bazı Pi bağlama özellikleri farklılık göstermektedir. Kalsiyum asetat da alüminyum emilimini artırmaz. Kalsiyum karbonatın aksine nötral pH'da çözünür ve geniş bir pH aralığında Pi'a bağlanır. Bu nedenle gastrik asit sekresyonunu bozulması Pi bağlama kapasitesini etkilemez. Kalsiyum asetat oldukça fazla gastrointestinal yan etkiye neden olur bu yüzden hasta uyumu kalsiyum karbonattan kötüdür. Enterik kaplı tabletler Pi bağlama kapasitesinde değişikliğe neden olmadan ilaca karşı tolerasyonu artırır. Ayrıca hiperkalsemiye yol açma olasılığı daha düşüktür. Kalsiyum asetat kalsiyum karbonattan daha fazla miktarda Pi bağlar. Asetat tuzunun Pi bağlama kapasitesinin kalsiyum karbonattan neredeyse iki kat fazla olması düşük dozların kullanılmasını sağlar. Düşük dozlarda kullanılmasına rağmen kalsiyum asetat özellikle kalsitriolle birlikte kullanıldığında hiperkalsemiye neden olur. Kalsiyum karbonatın kurşun ihtiva etme olasılığına karşın kalsiyum asetatta kurşun kontaminasyonu yoktur.

Kalsiyum α -Ketoglutarat

Kalsiyum α -ketoglutarat fosfat bağlayıcı etkisi olan glutamik asit analogudur. Ketoglutarat krebs siklusunun metabolitlerinden biri ve birçok esansiyel olmayan amino asidin yapı yaşıdır. Anabolik ve nitrojen verici özellikleri dolayısıyla kalsiyum α -ketoglutarat malnutrisyonlu birçok hastada metabolik durumu düzeltmek için kullanılmaktadır. Hemodiyaliz hastalarına verildiğinde kalsiyum α -ketoglutarat plazma arjinin, prolin ve histidin konsantrasyonunu artırır ve serum fosfor düzeyini düşürür. Kalsiyum karbonatla yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre kalsiyum α -ketoglutarat daha güçlü Pi bağlayıcı olarak görünmektedir. Kalsiyum karbonattan iki kat daha etkilidir. Kalsiyum α -ketoglutaratın aynı miktarda fosfatı bağlayabilmesi için gereken elementer kalsiyum miktarı düşük olduğundan diğer kalsiyum tuzlarına göre hiperkalsemi insidansı daha düşüktür.

Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların hiperkalsemik etkileri yüksekten düşüğe kalsiyum sitrat > kalsiyum karbonat > kalsiyum asetat > kalsiyum α -ketoglutarat şeklindedir. (148)

2.10.1.2.1.3 Kalsiyum İçermeyen Fosfat Bağlayıcılar

Sevelamer

Sevelamer son dönem böbrek yetersizliğinde kullanılması kabul edilen kalsiyum ve alüminyum içermeyen ilk fosfat bağlayıcıdır. Fosfat anyonuna iyon değişimi ve hidrojen bağı ile bağlanan katyonik polimer [poli(alilamin hidroklorid)]'dir. 1 gramı yaklaşık 2,5-2,7 mmol Pi bağlar. Maksimum Pi bağlayabildiği pH 6 ve 8 arasındadır. Gastrointestinal sistemden emilmez ve feçesle atılır. Sevelamer ayrıca bağırsakta safra asitlerine bağlanır ve bu özelliği serum kolesterol konsantrasyonunun düşmesini sağlar. Jel halinde bulunduğu mide ve bağırsak sıvıları ile temas ettiğinde hidrate olur ve ağırlığının 6-8 katı kadar şişer. Nötral pH'da oldukça etkin bir biçimde Pi bağlandığından mide asidindeki değişiklikler etkinliğini pek değiştirmez. Plasebo veya kalsiyum karbonatla karşılaştırıldığında iyi tolere edilir. Sevelamere bağlı ortaya çıkabilecek yan etkiler bulantı, kabızlık, ishal ve dispepsidir. Kalsiyum karbonat veya asetat gibi bazı sağlamadığından sevelamer kullanımı ile ortaya çıkan potansiyel sorunlardan biri metabolik asidoz gelişmesi veya asidozun daha kötü hale gelmesidir. Bu problem genellikle ilaç yüksek dozda kullanıldığında ve henüz diyalize girmeyen hastalarda görülür. Diğer fosfat bağlayıcılarla ortak olan bir sorun da istenilen Pi düşürücü etkinin elde edilmesi için gereken dozun çok sayıda ilaç tableti ile sağlanabilmesidir. Ortalama günlük dozun 6,3 gram olduğu göz önüne alınacak olursa 800 mg'lık tabletlerden 8 tane alınmalıdır. İlacın maliyetinin kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılara göre 5 ila 10 kat yüksek olması göz önünde bulunması gereken diğer bir faktördür.

Sevelamer kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılarla karşılaştırılabilir oranda Pi düşüşünü belirgin hiperkalsemiye yol açmadan sağlar. İki klinik çalışmada ['Treat to Goal' (149) ve RIND (150) çalışmaları] sevelamerle tedavi edilen hemodiyaliz hastalarında koroner kalsifikasyon artışının kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılarla karşılaştırıldığında oldukça yavaş olduğu gösterilmiştir. Ancak bu iki çalışmada

sevelamerin bu olumlu etkisinin fosfat bağlayıcı etkisine mi yoksa lipid (LDL-C) düşürücü etkisine mi bağlı olduğunu ayırt etmek mümkün değildir. Bu nedenle yapılan CARE-2 çalışmasında (151), 1 yıl atorvastatinle tedavi edilip LDL-C düzeyi düşürüldükten sonra kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı ile tedavi edilen hemodiyaliz hastalarının koroner arter kalsifikasyon progresyon oranları sevelamerle tedavi edilen hastalarla benzer bulunmuştur.

Sevelamerin olumlu etkilerinin hastaların klinik sonuçlarını düzeltip düzeltmediği bilinmemektedir. Ancak, DCOR (Dialysis Clinical Outcome Revisited) çalışmasında sevelamer ve kalsiyum içeren fosfat bağlacı kullanılan gruplar arasında mortalite oranlarında (primer sonlanım noktası) fark olmadığı gösterilmiştir. Sadece sevelamerle tedavi edilen 65 yaş üzerindeki hastalarda mortalite oranları düşük bulunmuştur (%22 risk azalması, p=0,03) ancak bu risk azalması kardiyovasküler ölümlerle bağlı bulunmamıştır (152). Aynı şekilde, sevelamerle tedavi edilen genç hastalarda mortalite riski yüksektir ancak istatistiksel olarak anlamı yoktur. DCOR çalışması hasta düzeyi sonuçlar için çalışma gücü iyi ve sonuçları olumsuz olan fosfat bağlayıcılarla yapılmış ilk çalışmadır. Sevelamer alan yaşlı hastalarda kardiyovasküler mortalite kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı alan hastalardan farklı değildir. Bu nedenle, son dönem böbrek yetersizliğinde sevelameri ilk tercih edilecek tedavi ajanı olarak önermek için daha erken olabilir.

Lantan (La)

Lantan periyodik cetvelde nadir toprak grubunda yer alan üç değerlikli, metalik kimyasal elementtir. Lantanidler insan ve hayvanlarda kalsiyum kanallarını bloke eder. Nöronlar gibi birçok dokuda Ca²⁺-adenozin trifosfat (ATPaz) ve Mg²⁺-ATPaz enzim aktivitesini etkiler.

Lantan karbonat en fazla pH 3-5 arasında fosfat bağlar ancak pH 1-7 arasında da fosfat bağlamaya devam eder. Bu nedenle hem pH'ın düşük olduğu midede hem de yüksek olduğu duodenum ve jejunumda etkin olarak fosfat bağlar. Ayrıca yağda eriyen vitaminlerin emilimini etkilemez. Suda neredeyse erimeydiğinden gastrointestinal sistem boyunca emilimi oldukça azdır. Alüminyumla

karşılaştırıldığında vücutta birikime olasılığı oldukça düşüktür. Lantan vücuttan karaciğer yoluyla uzaklaştırılır, böbreğin işlevi yoktur. Bağırsaklardan emilen lantanın %80'i safra yoluyla uzaklaştırılırken %13'ü bağırsak sekresyonları ile atılır. Lantan alüminyumda olduğu gibi kan beyin bariyerini geçmez ve bu nedenle nörolojik etkilere neden olma olasılığı çok düşüktür.

Lantan katyonunun fosfat anyonuna karşı afinitesi oldukça fazladır ancak alüminyum hidroksitten daha az fosfat bağlar. Lantan karbonat (Fosrenol®) en az kalsiyum karbonat kadar etkili, hiperkalsemiye yol açmayan kalsiyum ve alüminyum içermeyen fosfat bağlayıcı olarak oldukça ümit verici bir elementtir. Hastaların çoğunluğunda 1500-3000 mg dozları arasında fosfat kontrolü sağlar. Kısa ve uzun süreli çalışmalarda günlük alınan ilaç miktarının az, etkin ve güvenli bir ilaç olduğu gösterilmesine rağmen bu eser elementin çeşitli dokularda birikerek lantan toksisitesine neden olabileceğine dair endişeler devam etmektedir (153). Bir yıl lantanla tedavi edildikten sonra iki yıl takip edilen hastalarda lantana bağlı kemik toksisitesi tespit edilmemiş ve üç yıl içinde karaciğer enzimlerinde artış olmadığı tespit edilmiştir (154). Yine de alüminyum hidroksitin fosfat bağlayıcı olarak kullanılmaya başlanmasından on yıl sonra bile yan etkilerinin ortaya çıkmadığı göz önüne alınırsa lantanın klinik kullanımında dikkatli olunmalıdır.

2.10.1.2.1.4 İntestinal NaPi Kotransport İnhibitörleri

Niasin

Niasin (nikotinik asit, vitamin B₃) ve metaboliti olan nikotinamid gastrointestinal sistemden fosfat emilimini azaltarak serum fosfat düzeyini azaltmaktadır. Niasin dislipidemi tedavisinde kullanılan bir ilaçtır ve spesifik nikotinik asit reseptörüne bağlanarak adiposit lipolizini inhibe eder. Düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) düzeyini düşürürken yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) miktarını artırır. Sevelamerde olduğu gibi diyaliz hastalarında fosfat düzeyini düşürür ve lipid profilini düzeltir.

Nikotinamid NaPi-IIb ve NaPi-IIa kotransporter sistemini gastrointestinal sistemde ve böbreklerde inhibe eder. Sodyuma bağlı fosfat emilimi gastrointestinal sistemde

duodenum ve jejunumda meydana gelmektedir. Sonuç olarak nikotinamid gıdalarla alınan fosfatın emilimini bozmaktadır. Kronik böbrek yetersizliği olan farelerle yapılan adenin modelinde nikotinamidin fosfat geri emilimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu modelde nikotinamid verilen farelerde tedavi edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum fosfat düzeyinin artmasını engellemiştir. Böbreklerden fraksiyonel fosfat ekskresyonu ve proksimal tubul fırçamsı kenarındaki NaPi-IIa ekspresyonu etkilenmemiştir. İntestinal fosfat emilimi jejunal fırçamsı kenar membranındaki NaPi-IIb ekspresyonunun azalmasıyla belirgin olarak düşmüştür. Nikotinamid bu deneysel bir modelde böbrek yetersizliğinin gelişmesini azaltmıştır (155).

Niseritrol

Niseritrol (pentaeritritol tetranikotinat) hiperlipidemi tedavisinde kullanılan nikotinik asit türevidir. Hemodiyaliz hastalarına verildiğinde serum Pi konsantrasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (156). Lipid düşürücü etkisine ilaveten niseritrol trombosit agregasyonunu inhibe eder. Bağırsakta kısmi olarak hidrolize olarak nikotinik asit oluşturur. Emildikten sonra karaciğerde nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) ve nikotinamid oluşur. Bahsedildiği gibi nikotinamid bağırsaktan fosfat emilimi azaltır ve böbrekten fosfat ekskresyonunu artırır.

2'-Fosfloretilin

2'-Fosfloretilin floretin türevlerinin fosforillenmiş şeklidir ve bağırsak hücreleri fırçamsı kenarında NaPi kotransporter sisteminin spesifik ve güçlü bir inhibitörüdür. Bu bileşik sağlıklı farelere oral yoldan iki hafta verildiğinde serum glukoz ve kalsiyum konsantrasyonunu etkilemeden fosfor konsantrasyonunu % 45 azaltır (157). Güçlü bir inhibitör olması nedeniyle potansiyel bir tedavi ajanı olarak ümit vermektedir.

2.10.1.3 Diyalizle Fosfat Uzaklaştırılması

Hemodiyalizle fosfat (Pi) uzaklaştırılmasının Kt/V ile orantısı azdır. Diyaliz yeterliliğinin standart ölçüsü olan Kt/V belirlenen kan ve diyalizat akımına göre üre klirensi (K), diyaliz süresi (t) ve üre dağılım volümü (V) kullanılarak hesaplanır.

Sonuç olarak diyaliz sırasında Pi uzaklaştırılmasında diğer faktörler de etkilidir. Hemodiyalizle Pi uzaklaştırılmasının kinetiği bifaziktir ve iki kompartmanlı model izlenir. Diyaliz seansının başlangıcında hücre dışı kompartmandan Pi hızla uzaklaştırılırken hücre dışı alandan hücre içine geçiş olması nedeniyle seansın devamında Pi uzaklaştırılması giderek azalır. Diyalizin tamamlanmasından sonra rebound fenomeni gözlemlenir ve bir saat içinde serum Pi konsantrasyonu %30-40 artar. Pi reboundu bikarbonat tamponu ile karşılaştırıldığında asetat tamponunda daha fazla belirgindir.

Teorik olarak diyalizle Pi uzaklaştırılması bazı manevralar uygulanarak artırılabilir:

1. Diyaliz süresinin uzatılmasıyla uzaklaştırılan Pi miktarının artırılır. Standart hemodiyalizle 4 saatlik seansta yaklaşık 930 mg (30 mmol) Pi uzaklaştırılır. Günde diyetle 1000 mg fosfat alındığı ve bunun %50'sinin emildiği varsayılırsa, Pi dengesi haftada beş kez 2 saat 40 dakika (800 dakika) veya haftada üç kez 5 saat 30 dakika (990 dakika) diyaliz uygulanarak sağlanabilir (158). Aslında bağırsaktan Pi % 60'ı emilmekte ve oral kalsitriol kullanıldığında emilim daha da artmaktadır.
2. Diyalizör yüzeyinin artırılması da uzaklaştırılan Pi miktarını artırmaktadır fakat diyaliz membranın tipi etkili görünmemektedir
3. Hemofiltrasyon Pi uzaklaştırmak için standart hemodiyalizden daha etkilidir.
4. Potasyum içermeyen diyalizatlar hücre içinden hücre dışı kompartmana Pi geçişini sağlayarak Pi uzaklaştırılmasını artırır. Ancak bu manevra bazı hastalar için tehlikeli olabilir.
5. Diyalizat sıvısının asitleştirilmesi hücre içinden hücre dışı kompartmana Pi geçişini sağlayarak uzaklaştırılmasını artırır. Bu metod diyaliz sonunda rebound etki ile Pi düzeyini artırdığından etkili bir manevra değildir.

Diyaliz süresinin artırılması ve geniş yüzeyli diyalizörlerin kullanılması dışında diğer metodlar hem net faydalarının olmaması hem de riskleri nedeniyle günlük pratikte kullanılmamaktadır.

Metabolik kontrolü düzeltilmesi nedeniyle kısa süreli gündüz (hemeral, 1,5-3 saat) veya noktürnal hemodiyaliz önerilmektedir (159).

2.10.1.4 Vitamin D ve Kalsiyumu Yükseltmeyen D Vitamini Analogları

İnsanlardaki D vitamininin kaynağı hem besinler (süt, yumurta, balık, balık yağı gibi) hem de derideki öncül moleküllerin ultraviyole ışınların etkisi ile endojen sentezdir (kalsitriol üretilir). Aslında D vitamini sadece gıdalardan elde edilmemesi ve biyolojik etkilerinin hormonlara yakın olması nedeniyle bir vitamin değildir. Ancak geleneksel olarak vitamin terimi kullanılmaktadır.

Doğal (nativ) ve aktif D vitamini farklı moleküllerdir ve birbirinden ayırmak gerekir. ‘Nativ’ terimi kaynağındaki D vitaminini tanımlamak için kullanılmaktadır. Bitki kaynaklı vitamin D₂ ve hayvansal ürünlerde ve deride bulunan vitamin D₃ arasında fark vardır ancak bunun pratikte önemi yoktur ve benzer biyolojik rolleri vardır. ‘Aktif’ D vitamini modifiye edilmiş molekülleri tanımlamaktadır. Bu modifikasyon sırasıyla karaciğer ve böbrekte olmak üzere iki basamaklı enzimatik hidroksilasyondan oluşmakta ve sonuçta kalsitriol (1,25 dihidroksikolekalsiferol) üretimi meydana gelmektedir.

Birinci hidroksilasyon vücutta nativ D vitamini varlığına bağlıdır. Bu nedenle 25-hidroksivitamin D’nin serum konsantrasyonu vücuttaki D vitamini durumunu gösterir (Tablo 10). İkinci hidroksilasyon birçok faktör tarafından oldukça sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Renal hidroksilasyon kalsitriolün vücutta dağılmasından sorumludur. Ayrıca birçok doku lokal olarak aktif D vitamini üretmektedir ancak üretilen miktar sistemik konsantrasyonu etkilememektedir. Nativ D vitaminlerinin biyolojik etkileri oldukça azdır. Bu nedenle nativ D vitaminlerinin metabolizması için böbreğin işlevi zorunludur.

D vitamini reseptörleri (VDR) steroid hormon nükleer reseptör üst ailesinin üyesidir. Bu reseptörler transkripsiyonel faktör olarak işlev göstermektedir.

Tüm hücrelerde sadece tek tip VDR mevcuttur ancak bunları kontrol eden genler farklıdır. D vitamininin birçok biyolojik rolü vardır. Bunlar hücre farklılaşmasının kontrolü, hücre olgunlaşması ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu olabilir (160).

D vitamininin genomik etkileri birkaç adımda gerçekleşmektedir:

1. D vitamininin VDR reseptörüne bağlanması,
2. Retinoid X reseptörü ile birleşerek (heterodimerizasyon olarak da adlandırılır) VDR-RXR oluşturmak,
3. VDR-RXR kompleksinin D vitaminine yanıt veren element olarak adlandırılan hedef genin kontrol edici bölgesine bağlanması,
4. Gen transkripsiyon hızının hücre içi düzenleyicilerinin aktif hale gelmesi

D vitamininin etkisini gösterdiği en önemli yer PTH gen transkripsiyonunun VDR aktivasyonu ile kontrol edildiği paratiroid bezidir. VDR'ünün aktivasyonunun düşük olduğu durumlarda gen transkripsiyonu artar ve oldukça fazla miktarda PTH üretilir. Tam tersi biçimde VDR aktivasyonu PTH üretimini azaltır. PTH gen transkripsiyonunu kontrol etmenin yanı sıra VDR aktivasyonu paratiroid bezi proliferasyonunu da kontrol eder, hiperplazi VDR'ünün uzun süre aktif hale gelmemesi sonucu meydana gelir. Ayrıca VDR aktivasyonu ve CaR (Kalsiyum duyarlılaştırıcı reseptör) ekspresyonu arasında da bir ilişki vardır.

Tablo 10. Serum 25-OH D konsantrasyonuna göre D Vitamini durumunun değerlendirilmesi

D Vitamini Durumu	25-Hidroksivitamin D (nmol/l)
Eksiklik	0-25
Yetersizlik	25-50
Hipovitaminoz	50-70 (100)
Normal düzeyler	70 (100)-250
Toksisite	250'nin üzeri

[Michael F. Holick, Vitamin D Deficiency. N Engl J Med 2007;357:266-81'den uyarlanmıştır. (1 nmol/L= 2,5 ng/ml)]

Sekonder hiperparatiroidinin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen D vitamini analogları serum kalsiyumunu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'den (kalsitriol) daha az yükseltir ve PTH'u baskılayıcı etkisi daha azdır. Genel olarak, D vitamini analoglarının biyolojik profilleri dört protein veya protein sınıfı ile etkileşimi tarafından belirlenir: (i) genomik etkilerine aracılık eden VDR (D vitamini reseptörü), (ii) serum D vitamini bağlayıcı protein (DBP) ve lipoproteinler D vitaminlerini taşır ve hedefi oldukları hücrelere girişini kontrol eder, (iii) Vitamin D'yi 24-hidroksilaz ve diğer minör enzimler bu analogları metabolize eder veya aktivasyonlarını azaltır, (iv) D vitamini bileşiklerinin hızlı, genomik olmayan etkilerine aracılık eden hücre yüzeyindeki reseptörler.

Birinci nesil D vitamini bileşiklerinin kullanılmasına oldukça aktif bir D vitamini olan 1,25 dihidroksivitamin D_3 'ün keşfedilmesinden hemen sonra başlanmıştır. Sentetik 1,25 dihidroksivitamin D_3 (kalsitriol), D vitamini veya 25-hidroksivitamin D'den daha seçici olarak VDR'ne bağlanır. İkinci nesil bileşikler yan zincir 25. karbonda yer alan hidroksil grubunun çıkarılmasıyla elde edilmiştir [d - hidroksivitamin D_3 (alfakalsidiol), 1α -hidroksivitamin D_2 (doxerkalsiferol)]. 25-hidroksil grubunun olmaması nedeniyle VDR'ne selektif olarak bağlanamazlar bu nedenle prohormondurlar. Etki gösterebilmeleri için karaciğerde hidroksillenmeleri gerekir. Üçüncü nesil bileşikler 1 ve 25. karbonu hidroksillenmiş D vitamini bileşiklerinden oluşmaktadır. Bu bileşikler ya halka yapısında [1-nor-1,25 dihidroksi vitamin D_2 (parikalsitol)] ya da yan zincirlerinde [22-oxakalsitriol (maxakalsitol)] değişiklik yapılarak oluşturulmuşlardır. Bu bileşikler kalsitriolle karşılaştırıldıklarında daha az kalsemik ve fosfatemiktirler.

22-Oxakalsitol (OCT, Maxakalsitol)

22-oxakalsitol paratiroid bezi üzerine seçici etkisi olduğu gösterilen ilk D vitamini analogudur. OCT ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ arasındaki tek fark molekülün yan zincirindeki 22. karbonunun yerini oksijen almasıdır. Seçiciliğinin nedeni belki de en iyi anlaşılan kalsemik etkili D vitamini analogudur. VDR afinitesi kalsitriolden sekiz kat daha azdır ve bu durum PTH düzeylerini baskılayıcı etkisinin düşük olmasının nedenini açıklar. DBP afinitesinin düşük olması (kalsitriolden yaklaşık 500 kat daha az) kalsemik etkisinin oldukça düşük olmasını sağlar. Hayvan çalışmalarında OCT

dolaşımdan hızla uzaklaştırılmakta ve bu da maksimum konsantrasyonunun (C_{max}) en düşük olmasını sağlamaktadır. C_{max} düşük olmasına rağmen enjeksiyondan hemen sonra intestinal VDR ve paratiroid bezi ile etkileşen OCT miktarı kalsitriolden daha fazladır. OCT uygulandıktan sonra bağırsaktan kalsiyum emilimini ve kemiklerden kalsiyum mobilizasyonunu geçici olarak artırırken kalsitriolün aynı etkisi çok daha uzun sürmektedir.

Bağırsak ve kemik üzerinde OCT'ün etkisinin kısa süreli olmasından sorumlu olan faktör farmakokinetik özellikleridir. OCT uzun süreli infüzyon şeklinde uygulandığında kalsitriol infüzyonuyla benzer şekilde bağırsaktan sürekli kalsiyum transportuna neden olur. İnfüzyon kesildiğinde 24 saat içinde kalsiyum transportu normal haline döner ancak kalsitriol infüzyonu kesildiğinde kalsiyum transportu uzun süre artmış olarak kalır (161). Ayrıca, OCT'ün kemik rezorpsiyonunu uyarıcı etkisi kalsitriole eşittir.

OCT'ün kemik ve bağırsak üzerindeki etkilerinin geçici olmasına rağmen PTH gen ekspresyonu üzerindeki baskılayıcı etkisi uzun sürelidir. Hayvan çalışmalarında tek doz OCT enjeksiyonundan sonra serum PTH düzeyindeki azalmanın 48 saatten fazla sürdüğü gösterilmiştir (162). OCT'ün paratiroid bezi, kemik ve bağırsak üzerinde etki süresindeki fark paratiroid hücrelerinin nükleusunda bu analogun uzun süre birikmiş olarak kalabilmesine bağlıdır. Bu nedenle, PTH supresyonu OCT'e uzun süreli bir yanıtken bağırsaktan kalsiyum emilimi ve kemiklerden kalsiyum mobilizasyonu kısa süreli bir yanıt ve sürekli D vitamini analogu uyarısı gerektirir. OCT hızla serumdan uzaklaştırıldığından seçici olarak etki göstermektedir.

OCT'ün biyolojik etkilerinin özgün olmasında diğer faktörlerinde katkısı olabilir. OCT-VDR kompleksi kalsitriol-VDR kompleksi ile aynı koaktivatöre bağlanmaz (163).

OCT böbreklerde 1α hidroksilazı inhibe ederek ve 24-hidroksilaz enzimini aktivitesini artırarak endojen kalsitriol miktarını azalmasına neden olur. Bunun OCT'ün biyolojik etkileri üzerinde önemli etkisi vardır. Sonuç olarak selektif kalsitriol eksikliği meydana geleceğinden etkileri de azalmış olacaktır.

OCT'ün hücrelerde özgün bir biçimde katabolize edilmesi de bu analogun seçici olarak etki göstermesini sağlamaktadır. OCT ve kalsitriol sığır paratiroid hücrelerinde eşit oranda katabolize edilmektedir (164). Ayrıca OCT insan

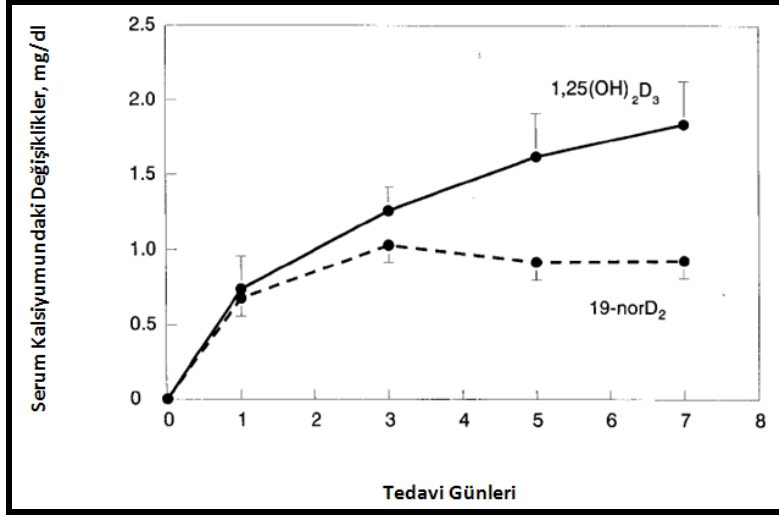
makrofajlarında kalsitriolden daha yavaş (165) keratinositlerde daha hızlı parçalanmaktadır. Farklı hızda katabolize olması OCT'ün hücrelere spesifik etkilerinin oluşmasını sağlamaktadır.

PTH'un OCT ile suprese edilmesi hayvan modellerinde ve böbrek yetersizliği olan insanlarda yüksek döngülü kemik hastağının düzelmesini sağlar. Osteitis fibrosa geliştirilmiş fare modelinde OCT PTH düzeyini azaltır ve kemik oluşum ve rezorbsiyon hızını azaltır; ayrıca hiperkalsemi ve adinamik kemik hastalığına yol açmadan kemiğin fibrozis volümünü düşürür (166).

OCT'ün PTH'u baskılamadaki etkinliği, yüksek döngülü kemik hastalığını düzeltmesi ve kalsemik etkisinin düşük olduğu göz önüne alındığında bu analog böbrek yetersizliği olan hastaların tedavisinde güvenli bir tedavi aracıdır.

19-Nor Vitamin D₂ (Parikalsitol)

19-Nor Vitamin D₂'de yapısal olarak ekzosiklik 19. karbon bulunmaz ve kalsitriolün vitamin D₃ yan zinciri yerine vitamin D₂ yan zincirine sahiptir. Etki mekanizması 22-oxakalsitriolden daha az bilinmektedir ve farmakokinetik özelliklerine bağlı değildir. 19-Nor Vitamin D₂'nin VDR afinitesi kalsitriolden yaklaşık üç kat daha azdır ve bu özelliği PTH baskılayıcı etkisinin az olmasından sorumludur. 19-Nor Vitamin D₂'nin DBP afinitesi OCT'den kısmi olarak fazla ancak kalsitriolden üç kat daha azdır. 19-Nor Vitamin D₂ ve kalsitriolün klirens oranları ve dokulardaki yerleşimleri benzerdir. 19-Nor Vitamin D₂'nin kalsemik etkisinin düşük olmasına rağmen VDR afinitesi, kemik ve bağırsaktaki yerleşiminin kalsitriolle benzerdir. 19-Nor Vitamin D₂ tek enjeksiyondan sonra kalsitriolde olduğu gibi bağırsaktan kalsiyum Emilimini ve kemiklerden kalsiyum mobilizasyonunu 24 saat doza bağlı olarak artırır. 19-Nor Vitamin D₂ ve kalsitriolün kalsemik etkisi tek doz enjeksiyondan sonra benzer sürede ortaya çıkmakta ve serum kalsiyum düzeyini benzer oranda artırmaktadır ancak tedavi devam ettikçe bu süreç 19-Nor Vitamin D₂ için değişmektedir (Şekil 14).



Şekil 14. Parikalsitol ve kalsitriolün kalsemik etkisinin karşılaştırılması

Şekil 13'te görüldüğü gibi 7 günlük tedaviden sonra 19-Nor Vitamin D₂ ve kalsitriolün ince bağırsaktan kalsiyum transportu ve kemiklerden kalsiyum mobilizasyonu üzerindeki etkilerinde belirgin değişiklik olmaktadır (167).

Uzun süreli 19-Nor Vitamin D₂ tedavisi sonrası (2 ay) bağırsaktaki VDR düzeyi endojen kalsitriol düzeyinin düşmesine bağlı olarak azalır (168). Bu nedenle 19-Nor Vitamin D₂ OCT'de olduğu gibi serum kalsitriol düzeyini azaltır ve D vitamini yetersizliği oluşturur. Ayrıca VDR miktarının azalması uzun süreli 19-Nor Vitamin D₂ sonrası kalsemik etkisinin azalmasına neden olan bir faktör olabilir.

19-Nor Vitamin D₂'nin osteoklast maturasyonu ve osteoklastik kemik mobilizasyonu üzerindeki etkileri fare kemik iliği kültürü kullanılarak in vitro olarak değerlendirilmiştir. Bu modelde, D vitamini bileşikleri tartarata dirençli asit fosfataz ve diğer olgun osteoklast belirteçlerini eksprese eden osteoklast öncüllerinin multinükleer hücrelere farklılaşmasını kontrol eder (169). Bu farklılaşmayı osteoblastların yüzeyinde RANKL indüksiyonu ile sağlar. Kemik veya diş yüzeyinde olgun osteoklast ve osteoblast içeren kültürlerde D vitamini bileşikleri RANKL indüksiyonu ile osteoklastların kemik yüzeyinde rezorbsiyon yapmasını sağlar. Bu modelde, 19-Nor Vitamin D₂ osteoklast olgunlaşmasını kalsitriolle eşit güçle sağlarlarken osteoklastların kemik rezorbsiyonunu sağlayan etkisi kalsitriolden daha azdır (170). 19-Nor Vitamin D₂'ye yanıt olarak oluşan kemik rezorbsiyonunun düşük olması rezorbsiyonun defektif olmasına veya RANKL indüksiyonu yapabilme kapasitesinin azalmış olmasına bağlı olabilir.

19-Nor Vitamin D₂ serum PTH düzeyini azaltarak yüksek döngülü kemik hastalığı gelişmesini önleyebilir veya geri döndürebilir. Ayrıca paratiroid bezi hücrelerinin hiperplazik hale gelmesini engelleyebilir. 19-Nor Vitamin D₂'nin antiproliferatif etki mekanizması TGF- α ekspresyonunu baskılaması ve paratiroid bezinde hücre siklusu inhibitörü p21'in oluşmasını sağlaması olabilir (171).

1 α -Hidroksivitamin D₂ (Dokserkalsiferol)

1 α -Hidroksivitamin D₂, 1 α -hidroksivitamin D₃ (1 α -OH D₃, Alfakalsidiol)'de olduğu gibi ön ilaçtır ve fizyolojik koşullarda 1,25 (OH)₂D₂'ye dönüşerek aktif hale gelmektedir. 1 α -OH D₂'nin hiperkalsemiye neden olmamasını sağlayan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Uzun süre kullanıldığında 1 α -OH D₃'ten daha az toksiktir. 1,25 (OH)₂D₂'nin ince bağırsaktan kalsiyum Emilimi ve kemiklerden kalsiyum mobilizasyonunu sağlayan etkisi 1,25(OH)₂D₃'e eşittir. Vitamin D₂ güçlü bir hücre diferansiyasyon metaboliti olan 1,24(OH)₂D₂'ye dönüştürülebilir. Bu metabolitin hiperkalsemik etkisi 1,25 (OH)₂D₂ ve 1,25 (OH)₂D₃'ten daha azdır. 1 α -OH D₂ hedef dokularda aktif metabolitini oluşturmak üzere 24. karbonundan hidroksillenir ve böylece serum kalsiyum ve fosfor düzeyini daha az yükseltir (172).

1,25 Dihidroksi-26,26,26,27,27,27-heksaflorovitamin D₃ (Falekalsitriol)

Falekalsitriol 26. ve 27. karbondaki hidrojenin yerini flor atomunun aldığı D vitamini analogudur. Metaabolizmasının yavaş olması nedeniyle 1,25 (OH)₂D₃'ten daha aktiftir. Etki mekanizmasının farklı olmasını sağlayan farmakokinetik özelliğidir. Yan zincirinde yer alan flor atomu molekülün katabolizmasını yavaşlatır. 23 ve 24. karbonundan hidroksillenerek oksidatif olarak kalsitroik aside dönüşen 1,25 (OH)₂D₃'ten farklı olarak falekalsitriol sadece kısmi olarak 23. karbonundan hidroksillenmiş şekline metabolize olarak 1,23,25-trihidroksi-26,26,26,27,27,27-heksoflorovitamin D₃'ü oluşturur. Bu ara formun yeterli biyolojik aktivitesi vardır. Moleküldeki flor atomu DBP'ne bağlanan miktarı da düşürür ve falekalsitriol 1,25 (OH)₂D₃'ten biraz daha hızlı serumdan uzaklaştırılır (173). Dolaşımdaki yarı ömrünün kısa ve VDR afinitesinin 3 kat daha az olmasına rağmen falekalsitriolün

hedef dokularda metabolizmasının yavaş olması nedeniyle biyolojik aktivitesi uzun süreli ve oldukça güçlüdür.

KBH'da D vitamini kullanımı için K/DOQI klavuzu önerileri (146):

1. Ergokalsiferol evre III ve IV KBH'da serum 25-OH D düzeyi <30 ng/ml olduğunda kullanılabilir.
2. Aktif oral D Vitamini steroller evre III ve IV KBH'da (kalsitriol, parikalsitol ve doxerkalsiferol) 25-OH D >30 ng/ml ve PTH düzeyi yüksek olduğunda endikedir.
3. Aktif D vitamini steroller evre V KBH'da Ca < 9,5 mg/dl, fosfor < 5,5 mg/dl ve PTH > 300 pg/ml olduğunda endikedir.
4. Diyaliz hastalarında aralıklı intravenöz D vitamini kullanılması oral formunun kullanılmasından daha etkilidir.

2.10.1.5 Renal Fosfat Ekskresyonunu Artıran İlaçlar

Fosfonokarboksilik asit farlere verildiğinde hem böbreklerde hemde bağırsakta NaPi kotransporter sistemini inhibe eder, fosfatüriye neden olur. Fosfonoformik asit ise 5/6 nefrektomi yapılmış farelere verildiğinde plazma Pi konsantrasyonunu değiştirmeden idrar Pi ekskresyonunu artırır. fosfonoformik asit NaPi kotransporter sisteminin zayıf bir inhibitörüdür. İntravenöz verildiğinde nefrotoksik, elektrolit bozuklukları, penil ülserasyon ve epilepsiye neden olması nedeniyle insanlarda kullanılmaz (174).

2.10.1.6 Kalsimimetikler

Kalsiyum duyarlılaştırıcı reseptörleri (CaR) aktive eden ve PTH sekresyonunu inhibe eden moleküller, paratiroid hücrelerinde hücre dışı kalsiyumun etkilerini artırdıkları veya taklit ettikleri için kalsimimetik olarak adlandırılır. Kalsimimetikler serum PTH ve kalsiyum düzeyini kalsiyum tarafından düzenlenen PTH sekresyonunun eşik değerini aşağı çekerek düşürür. CaR paratiroid bezinde hiperplazinin gelişmesinde önemli bir rol oynar.

Serum iyonize kalsiyum düzeyi PTH etkisi ile fizyolojik sınırlar arasında tutulur. Paratiroid glandı yüzeyinde bulunan CaR serum iyonize kalsiyum düzeyindeki hafif dalgalanmalara yanıt vererek ya PTH sekresyonunu artırır (serum kalsiyumu düştüğü zaman, yani CaR aktive olmaz) ya da PTH sekresyonu durdurur (serum kalsiyumu arttığında CaR aktive olur).

Serum kalsiyumundaki akut düşüşler hızla PTH sekresyonunu artırır. Hipokalsemi uzar veya kronikleşirse paratiroid glandı saatler, günler içinde PTH gen ekspresyonunu artırır ve günler, haftalar içinde paratiroid hüceleri sayı ve boyutlarını artırarak hiperplastik bir yanıt oluşturur. Kronik uyarı daha da artarsa hiperplazik gland nodüler hal alır ve nodüler glandda CaR ve D vitamini reseptörü (VDR) ekspresyonu azalır (175). CaR ekspresyonunun azalması paratiroid hücrelerinin hücre dışı kalsiyum konsantrasyonuna duyarlılığının azalmasına neden olur. Bu durum sekonder hiperparatiroidizmin patogenezinin temellerinden biridir.

Kalsimimetik bileşikler G proteinine bağlı olan CaR'ünün hücre dışı kalsiyuma duyarlılığını artırır ve PTH aşırı salgılanmasını ve paratiroid hücre proliferasyonunu azaltır (176).

Cinacalcet HCL (Sensipar®) ticari olarak bulunan tek kalsimimetiktir. Hemodiyaliz hastalarına verildiğinde serum PTH ve kalsiyum düzeyini, Ca x P değerini düşürür, K/DOQI klavuzunun önerdiği hedef değerlere ulaşılmasını kolaylaştırır (177).

Kalsimimetikler yüksek döngülü kemik hastalığı olan üremik farelere verildiğinde serum PTH düzeyini düşürerek osteitis fibrozayı düzeltir ve kortikal kemik direncinin normale dönmesini sağlar (178). Ayrıca hafif sekonder hiperparatiroidiye rağmen düşük döngülü kemik lezyonları olan farelere verildiğinde kalsimimetiklerin anabolik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum serum PTH düzeyinin aralıklı olarak düşürülmesinin homolog reseptör duyarsızlığını geri döndürmek için yeterli olması ile açıklanabilir. Uzun süre yüksek PTH düzeylerine maruz kalmak PTH reseptörlerinde PTH'a karşı duyarsızlığa neden olmaktadır (179).

Yüksek döngülü kemik hastalığını düzeltmesine bağlı olarak kemik fraktür riski cinacalcetle tedavi edilen hastalarda %54 azalmaktadır. Ayrıca cinacalcet kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerini azaltmakta (180) ve kemik mineral yoğunluğunu düzeltmektedir (181).

PTH'nin aşırı baskılanmasının, kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılarının neden olduğu hiperkalseminin ve D vitamini analoglarının kullanılmasının dinamik kemik hastalığına neden olduğu ve kardiyovasküler kalsifikasyonu artırdığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Kalsimimetikler ise vasküler kalsifikasyona yol açmadan ve kalsitriolün neden olduğu vasküler kalsifikasyonu önleyerek serum PTH düzeyini düşürür (182). Kalsimimetikler kalsifikasyonu engelleyici etkilerini hem $Ca \times P$ sonucunu artırmadan PTH düzeyini azaltarak hem de arter duvarında hücresel düzeyde doğrudan etki göstererek sağlayabilir.

Hemodiyaliz hastalarında cinacalcet tedavisi sonrası Osteoprotegerin düzeyinin arttığı ve fetuin-A düzeyinin düştüğü bilinmektedir (183). Bu önemli tespit, vasküler kalsifikasyon riskinde artışa işaret edebileceği gibi tedaviyle mineral metabolizmasındaki düzelmeye bağlı vasküler kalsifikasyona karşı feedback savunma mekanizmalarına ihtiyacın azaldığı şeklinde de yorumlanabilir.

Kalsimimetik tedavisi ile sekonder hiperparatiroidinin düzeltilmesi hipertansiyon, lipid metabolizması bozukluklarının gelişmesini azaltır. Kalsimimetikler CaR aktivasyonu ile doğrudan veya iyonize kalsiyum düzeyini düşürerek dolaylı olarak periferik vasküler direnci azaltır. Ayrıca kalsimimetiklerin kan basıncını düşürücü etkisi serum PTH düzeyinin baskılanmasıyla da ortaya çıkabilir (184).

PTH düzeyinin azalmasının böbrek yetersizliğinin ilerlemesini azalttığı bilinmektedir (185). PTH'un neden olduğu hemodinamik değişikliklerin düzelmesi ile böbrek yetersizliğinin ilerlemesi yavaşlar. Ayrıca, PTH'un baskılanması nefrokalsinozisi azaltır veya önler. Kalsifikasyon-presipitasyon hipotezine göre rezidüel nefron ekskresyon kapasitesini aşarak emilen fosfat tubuler lümende, peritubuler alanda, interstisyum ve kapillerde kalsiyum fosfat mikrokristalleri birikir. Bu nedenle kronik böbrek yetersizliğinde işlevler giderek kötüleşir. Kalsimimetiklerle PTH düzeyinin azaltılması tubuler fosfat konsantrasyonunu kritik eşik değer altına düşürür ve fosfat presipitasyonu önlenmiş olur.

Cinacalcet paratiroid glandında hücre proliferasyonunu önler ve paratiroid glandını küçülterek ağırlığını azaltır (186).

Cinacalcetin en sık görülen yan etkisi hipokalsemi ve gastrointestinal yan etkilerdir. Hipokalseminin nedeni PTH düzeyinin azalması ile kemiklerden kalsiyum mobilizasyonunun azalmasıdır. Hipokalsemi genellikle asemptomatiktir ve diyalizattaki

kalsiyum artırılarak, kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı veya D vitamini kullanarak kolayca düzeltilebilir. Gastrointestinal yan etkilerine neden olan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. CaR gastrointestinal sistemde birçok doku ve hücre tipinde eksprese edilmektedir. Ancak gastrointestinal hormonların sentez ve sekresyonunu ve gastrointestinal geçişi önlemesi olası mekanizmalardandır. Cinacalcet alınmasından 4 saat sonra ya vazoaktif intestinal peptitin azalmasının (VIP) ya da substans P'nin artmasının istenmeyen gastrointestinal semptomlara yol açıp açmadığı bilinmemektedir. Bulantı, kusma, ishal ve iştah kaybı sık görülen yan etkilerdir. Cinacalcet sitokrom p450 2D6 izoenziminin güçlü bir inhibitörüdür ve bu nedenle birçok ilaçla etkileşimi vardır.

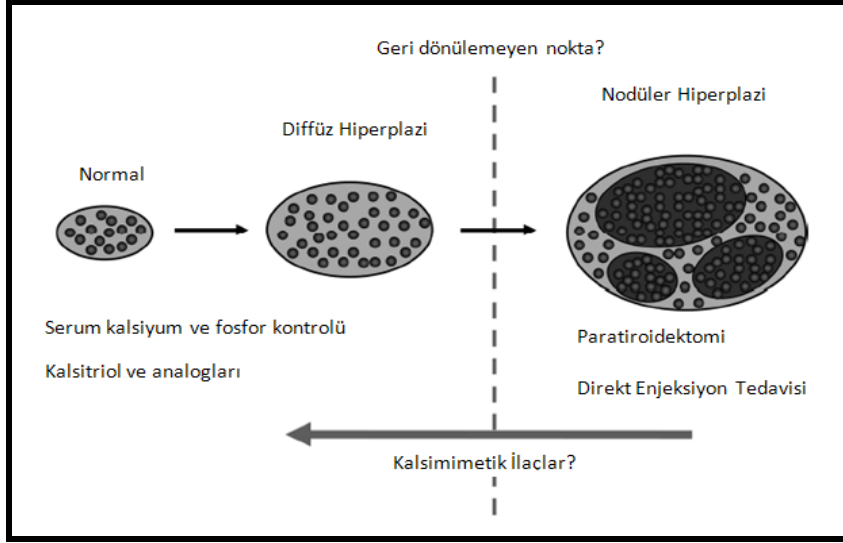
2.10.1.7 AST-120

AST-120 (Kremezin®) proteinlere bağlı molekülleri uzaklaştırma kapasitesi olan intestinal sorbenttir. Özellikle indoksil sülfatın uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Yapılan hayvan çalışmalarında böbrek yetersizliğinin ilerlemesini yavaşlatmak ve düşük döngülü kemik hastalığının insidansını azaltmak gibi özellikleri gösterilmiştir.

2.10.1.8 Paratiroid Girişimleri

Cerrahi paratiroidektomi, enjeksiyon tedavisi gibi paratiroid girişimleri nodüler hiperplazi ile birlikte dirençli hiperparatiroidizmde (iPTH > 800 pg/ml) uygulanmaktadır. Üç farklı cerrahi yaklaşım vardır: oto transplantasyon yapılan veya yapılmayan total paratiroidektomi, subtotal paratiroidektomi, minimal invaziv cerrahi. Genellikle sekonder hiperparatiroidizmde total paratiroidektomi ile birlikte ön kol otoplasti tercih edilmektedir. Çünkü sekonder hiperparatiroidizm tekrarladığında otoplasti ön koldan kolaylıkla çıkarılabilmektedir (187). Minimal invaziv cerrahi tek, soliter, radyoaktif tutulumlu nodülü olan hastalarda etkin ve oldukça az invaziv bir yöntemdir. Perkutan etanol (PEIT), kalsitriol (PCIT), maksakalsitol (PMIT) enjeksiyon tedavisi gibi yöntemler de dirençli hiperparatiroidizmde oldukça etkilidir. Paratiroidektomi ve enjeksiyon tedavileri arasındaki esas fark işlevsel glandın seçilmesidir. Otoplasti yapılan total paratiroidektomide tüm glandlar çıkarılmakta ve en küçük gland ön kola yerleştirilmektedir. Enjeksiyon tedavisinde nodüler olarak büyüyen glanda etanol veya Kalsitriol (veya analogları) enjekte edilmekte ve geri

kalan diffüz hiperplazik gland medikal olarak tedavi edilmektedir. Enjeksiyon tedavisinden hemen sonra yeterli dozda kalsitriol veya analogları kullanılmalıdır (188). Paratiroid girişimi için uygun metodun seçimi genişleyen glandın yeri ve sayısının yanı sıra ektopik glandın olup olmamasına göre yapılmaktadır. (Şekil 15)



Şekil 15 Paratiroid hiperplazisinin ilerlemesi ve güncel tedavi seçenekleri. Nodüler hiperplazik gland genellikle kalsitriol ve analogları gibi medikal tedavilere dirençlidir. Cerrahi paratiroidektomi veya enjeksiyon tedavisi nodüler hiperplazide önerilmektedir. Kalsimimetik ilaçlar ümit vericidir ancak hiperplazik glandı etkin bir şekilde küçültüp küçültmeyeceği araştırılmalıdır.

2.10.2 ADINAMİK KEMİK HASTALIĞININ TEDAVİSİ

Adinamik kemik hastalığının tedavisi yüksek döngülü kemik hastalığının tedavisinde olduğu gibi yeteri kadar araştırılmamıştır ve bu konuda geniş çaplı randomize kontrollü çalışmalar yoktur (189). AKH tedavisinin temel ilkeleri şu şekilde açıklanabilir: birincisi, kalsiyum ve vitamin D yükünü azaltmak ve ikincisi, PTH aktivitesini düzeltmek. Bu yaklaşımlarla AKH hastaların büyük bir bölümünde düzeltilebilmektedir. (Tablo 11)

Tablo 11. AKH Tedavi Yaklaşımları

Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıları kes ve kalsiyum ve alüminyum içermeyen fosfat bağlayıcı başla
Diyetle alınan kalsiyum miktarını gözden geçir ve günlük <2000 mg kalsiyum alınmasını sağla
Aktif D vitamin bileşiklerini kes veya azalt
Diyalizattaki kalsiyum miktarını 5 mg/dl'ye veya daha düşük bir değere düşür
Seçilmiş hastalarda tanıyı doğrulamak ve kemikteki alüminyum miktarını ve dağılımını değerlendirmek için kemik biopsisi yapmayı düşün
Alüminyuma maruziyeti engelle ve desferrokasmin şelasyon tedavisi düşün
AKH ve patolojik kırıklı osteoporozu olan hastalarda PTH (1-34) tedavisi düşün
Kalsimimetik ve kalsilitiklerin tedavideki yeri bilinmemekte
Bifosfonat, stronsiyum ve florid tedavisinden kaçın

2.10.2.1 Alüminyumun Uzaklaştırılması

Alüminyum günümüzde hiperfosfateminin tedavisinde sık kullanılmamasına rağmen alüminyuma bağlı AKH düşünülen hastalarda desferroksamin (DFO) şelasyon tedavisi uygulanır. DFO kemikten alüminyum uzaklaştırılmasını ve proteinlere bağlı alüminyumun miktarının azalmasını sağlar. Böylece diyalizle alüminyum uzaklaştırılması kolaylaşır

2.10.2.2 Diyalizattaki Kalsiyum Miktarının Azaltılması

Serum iyonize kalsiyum düzeyi PTH sentez ve ekskresyonunu en güçlü uyaranlarından. Özellikle D vitamini tedavisiyle birlikte yol açtığı pozitif kalsiyum dengesi kemik döngüsünü baskılar. Hemodiyaliz ve CAPD hastalarında diyalizattaki kalsiyum konsantrasyonunun azaltılmasının dinamik kemik hastalığını düzelttiği laboratuvar verileri ve histomorfometri sonuçlarıyla gösterilmiştir (190). Diyalizattaki kalsiyum konsantrasyonunun 7 mg/dl (1,75 mmol/L) veya 6 mg/dl (1,5 mmol/L)'den 5 mg/dl'ye (1,25 mmol/L) düşürülmesi serum iyonize kalsiyum miktarını azaltır ve hiperkalsemi epizotlarının sayısını düşürür ve 3-6 ay içinde iPTH (4 kat), BALP, TRAP-5b düzeyini artırır (191). Kemik biopsisi ile AKH gösterilmiş 51 CAPD hastası ile yapılan prospektif bir çalışmada diyalizat kalsiyum

konsantrasyonu 6,5 ve 4 mg/dl olan iki grup karşılaştırılmıştır (192). 16 ay sonra yapılan kontrol kemik biopsisi sonuçları kalsiyum konsantrasyonu düşük olan grupta BFR'nin (kemik oluşum hızı) $18,1 \pm 5,6$ 'dan $159 \pm 59 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 'ye yükselmiştir. Ayrıca bu grupta serum iyonize kalsiyum miktarının düşmesi sonucu PTH düzeyi % 300 artmıştır (57 ± 15 'den $237 \pm 34 \text{ pg/mL}$ 'ye). K/DOQI klavuzu AKH'da diyalizattaki kalsiyum konsantrasyonunun 4 ya da 5 mg/dl'ye düşürülmesini önermektedir (146).

2.10.2.3 Kalsiyum İçermeyen Fosfat Bağlayıcı Kullanılması

Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların alternatifi olarak AKH düşünülen hastalarda alüminyum ve kalsiyum içermeyen fosfat bağlayıcılar vardır. İki prospektif kemik biopsi çalışması diyaliz hastalarında kalsiyum içeren ve içermeyen fosfat bağlayıcıların kemik metabolizması ve histolojisi üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Lantan karbonat (1250 mg/gün) ve kalsiyum karbonatın (2000 mg/gün) kemik üzerindeki etkilerini karşılaştıran 63 hastalık çalışmada (193) tedaviden sonraki birinci yılda her iki grupta kemik döngüsü artan AKH'li hasta sayısı benzer olarak bulunmuştur (kalsiyum karbonat 3/6, lantan karbonat 4/6). Ancak takip sırasında yüksek döngülü kemik hastalığından adinamik döngüye geçen hasta sayısı kalsiyum karbonat grubunda 6 iken lantan karbonat grubunda 1 olarak tespit edilmiştir. Sevelamer ve kalsiyum karbonatın karşılaştırıldığı 68 hastanın tedavi öncesi ve tedaviden 1 yıl sonra yapılan kemik biopsileri değerlendirildiği diğer çalışmada (194) sadece sevelamer grubunda her kemik yüzeyi başına BFR'da belirgin artış tespit edilmiştir. Çalışmanın sonunda sevelamerle tedavi edilen grupta 3 hastada (%9) yeni AKH gelişirken kalsiyum karbonat grubunda 6 hastada (%17) gelişmiştir.

Birçok çalışma kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların sevelamerle değiştirilmesi sonrası kemik döngüsündeki düzelmeye işaret eden veriler sunmaktadır. Treat to Goal çalışmasında (149) sevelamerle (6,5 g/gün) kalsiyum karbonat (3,9 g/gün) ve kalsiyum asetat (4,6 g/gün) 200 hemodiyaliz hastasında randomize edilmiştir. 53 hafta sonunda ortalama PTH düzeyi sevelamer grubunda stabil olarak kalırken (220 pg/ml) kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı grubunda belirgin olarak düşmüştür (200'den 138 pg/ml'ye). Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcı grubunda kemik yoğunluğunun

göstergesi olan torasik vertebra trabeküler kemik güç yitimi (thoracic vertebral trabecular bone attenuation) düşüş gösterirken sevelamer grubunda stabil olarak tespit edilmiştir.

Bahsedilen çalışmalar gibi örnekler AKH tedavisinde kalsiyum içermeyen fosfat bağlayıcıların önemli bir yeri olduğunu göstermektedir.

2.10.2.4 D Vitamini Tedavisinin Dikkatli Uygulanması

KBH'ında aktif D vitamini bileşiklerinin kullanılması kemik döngüsünü azaltır. Alfakalsidiol (0,25-1,0 µg/gün) ile plasebonun randomize edildiği 176 KBH (GFR 15-50 ml/dk) hastasında 2 yıllık tedavi sonrası karşılaştırılmıştır. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda yapılan kemik biopsileri değerlendirildiğinde alfakalsidiol tedavisi osteoblast yüzeyini, osteoblast sayısını, erode yüzeyi ve BFR'yi belirgin olarak azaltırken plasebo grubunda anlamlı değişiklik olmamıştır (195). Biopsi çalışmaları son dönem böbrek yetersizliği olan hastalarda yüksek doz aktif D vitamini (kalsitriol) kullanılmasının AKH gelişmesine yol açtığını göstermektedir.

2.10.2.5 Vitamin D Reseptör Aktivasyonu

VDR analogları kemik oluşumunu uyardığından dinamik kemik hastalığının tedavisinde değerli bir ilaç olarak günümüzde kullanılmaktadır. VDR aktivasyonu osteoblast gelişimi, normal kemik oluşumu ve mineralizasyonu için gereklidir. Aktif D vitamini tedavisi osteoklastik aktiviteyi baskılayarak kemik rezorpsiyonunu kalsiyumdan bağımsız olarak azaltmaktadır. Parikalsitol tedavisinin LDL (-/-) farelerde kemik mineralizasyonunu artırarak düşük kemik volümünü düzelttiği ve kemik rezorpsiyonunu azaltması oldukça ilginç bir bulgudur (196). Düşük 25-hidroksi vitamin D düzeyinin tedavisi kemik oluşumunu artırmak için gereklidir. Osteoblastlarda megalin reseptörleri bulunur. Bu reseptörler 25-hidroksi vitamin D'nin osteoblast içine alınmasını sağlar. Böylece 25-hidroksi vitamin D osteoblastların 1α hidroksilaz aktivitesi ile aktif forma dönüşmektedir. VDR analogları tedavisi megalinin upregülasyonunu sağlayarak 25-hidroksi vitamin D'nin hücre içine alınmasını artırmaktadır. 25-hidroksi vitamin D düzeyinin düşük olması diyaliz hastalarında kemik oluşumunun düşüklüğü ile koreledir ve ergokalsiferol tedavisi diyaliz hastalarında gelişen osteomalazinin tedavisinde etkilidir (197). VDR analogları kemik kayıplarını azaltarak kemik yoğunluğunu artırmaktadır.

2.10.2.6 Kemiği Uyarıcı Ajan Olarak Teriparatid

Teriparatidin [PTH(1-34)] günlük cilt altı uygulanması osteoporoz tedavisinde önemi giderek artmaktadır. Teorik olarak teriparatidin AKH hastalarında kemik metabolizmasının düzeltmesi beklenir (198). Ancak KBY'li hastalarda yapılmış kontrollü bir çalışma yoktur. Böbrek dışı nedenlerle hipoparatiroidi gelişen hastalarda 3 yıllık PTH(1-34) tedavisi kemik döngüsünü gösteren belirteçlerde belirgin bir artış sağlamıştır (199). Teriparatidin patolojik kırıklı osteoporoz nedeniyle yapılan kemik biopsilerinde AKH tespit edilen diyaliz hastalarında kemik ağrılarını azalttığı ve BALP düzeylerinde geçici yükselmeye neden olduğu rapor edilmektedir.

2.10.2.6 PTH'un Pulsatil Salınmasının Düzeltilmesi

PTH'un biyolojik etkileri tümüyle pulsatil salınmasına bağlıdır. AKH hastalarda PTH'un pulsatil salınmasını düzeltebilecek iki grup bileşik vardır: kalsimimetikler ve kalsilitikler. Kalsimimetik ajan sinakalset başlangıçta PTH düzeyini belirgin olarak düşürür fakat ardından PTH rebound olarak artarak sirkadyen salınımı sağlanmış olur (200). Kalsimimetiklerin *in vivo* alışmalarda kemikler üzerinde koruyucu ve anabolik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (179). Kalsilitik ajanlar paratiroid bezinde kalsiyum duyarlılaştırıcı reseptörleri geçici olarak bloke ederek PTH salınımını kontrol eder. Böylece PTH'un pulsatil salınmasını sağlayarak kemik döngüsünün uyarılmasını sağlar. Oral kalsilitik olan NPS 2143 kemik oluşum ve rezorbsiyonunda belirgin artış sağlar ancak net kemik kütlesi üzerine etkisi yoktur.

2.11 ÜREMİ VE BÖBREK HASTALIKLARINDA PROTEOMİKS

2.11.1 Proteomiks Nedir?

Proteom' terimi ilk kez 1994 yılında genom tarafından ifade edilen tüm proteinleri tanımlamak için kullanılmıştır (**PRO**Tein-gen**OME**) (201). Proteomiksin dinamik doğasını vurgulamak için daha açık bir tanımlama yapılırsa proteom, yer ve zaman dikkate alındığında, bileşimi dokudan dokuya veya hücreden hücreye değişen proteinlerin tümüdür. Proteomun yapısı çevresel faktörler, yaş, cinsiyet ve hastalıklar, fizyolojik durumlar (hücre siklusu, apoptoz gibi) gibi iç ve dış faktörlere bağlıdır. Bu durum genom doğasının tam tersi bir durumu yansıtmaktadır.

Proteomun temel birimi olan bir protein aminoasitlerden oluşur ve hücrede bulunan aktif formu üç boyutlu haldedir. Proteinlerin aminoasit dizeleri uygun genler tarafından belirlenmesine rağmen genetik bilgi bir protein hakkında bütün bilgileri sağlamaz. Bir gen bir protein korelasyonu günümüzde anlamını yitirmiş bir kavramdır. Çünkü dört nükleotidin kombinasyonu ile belirlenen tek boyutlu genomik bilginin aksine proteinlerde kodlanan bilgi sadece aminoasit dizeleriyle sınırlı değildir. Proteinler hücreler tarafından birçok düzenlemeye tabi tutulmaktadır. mRNA'nın alternatif şekillerinin oluşması (splicing), füzyonlar ve post-translasyonel modifikasyonlar gibi düzenlemeler proteomiksin sıkı bir şekilde kontrol edilen dinamik yapısına, çok boyutluluğuna, değişkenliğine katkıda bulunmaktadır. Bu durum çok sayıda özgün protein molekülünün nasıl oluştuğunu açıklamaktadır (202). Vücutta patolojik bir durumun meydana gelmesi proteomda meydana gelen değişimlerle doğrudan ilişkilidir ve bu değişimlerin ve nedenlerinin anlaşılması etkin ve nedene özgü tedavilerin geliştirilmesini sağlayacaktır (203).

Proteomiks öncesi ağırlıklı olarak yapılan çalışmalar transkriptomiks adı altında RNA seviyesindeki değişikliklere ışık tutmaktaydı. Ancak, RNA seviyesindeki değişiklikler birebir olarak protein seviyesinde görülmemektedir. Son dönemde yapılan bir çalışmada 23 farklı insan hücre çizgisinde hem RNA hem de protein ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Protein ekspresyon seviyelerinin sadece %33 düzeyinde RNA ekspresyon seviyeleri ile uyduğu görülmüştür (204). Bu nedenle en doğru yaklaşım RNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri belirlemek yerine protein ekspresyonlarındaki değişiklikleri takip etmektir.

Proteomiks proteom araştırmalarının temel yöntemidir ve oldukça yeni, hızla gelişen bilim dalıdır. Proteom düzeyinde gen ekspresyonunu değerlendirmek için kullanılmaktadır. Proteinlerin spesifik özellikleri nedeniyle proteomiks, yeni proteinlerin tespit edilmesi, miktarlarının belirlenmesi, post translasyonel modifikasyonların, protein yapısının ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılması ve olası etkileşimlerin tespit edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Hızla gelişen teknolojik araçlar, kompleks karışımlardaki (dokular veya biyolojik sıvılar) birçok proteinin tespit edilmesi, hüresel ve hücre düzeyinin altında meydana gelen etkileşimlerin haritalanması ve biyolojik etkilerinin araştırılması olanağını sağlamıştır. İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2D-PAGE) ve MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight) kütle spektrometrisi (MS), likit kromatografi (LC) ve ESI (Electrospray Ionization) MS, kapiller elektroforez (CE) ve ESI MS gibi proteomiks tekniklerin kombinasyonu sık kullanılan yöntemlerdir. Bioinformatik ise proteomiksteki ilerlemelerin bir diğer temel noktasıdır. Verilerin toplanması, depolanması, işlenmesi ve görünür hale getirilmesi proteomiks çalışmaların olmazsa olmazıdır.

Klinik proteomiks temel amaçları şu şekilde özetlenebilecek ümit verici, yeni bir analitik disiplindir: (i) hastalıkların erken tanısı, risklerin veya tedavi yanıtlarının izlenebilmesi için bio-belirteçlerin keşfi, (ii) klinik sonuçları düzeltebilecek yeni tedavilerin geliştirilebilmesi için protein hedeflerinin tespit edilebilmesi (205).

2.11.2 Bio-belirteçler

Hastalıkların patofizyolojisinin zamanla anlaşılması hastaların başarıyla tedavi edilebilmesini etkileyen en temel faktördür (206). Günümüzde biyolojik örneklerde moleküler yöntemler kullanılarak bir takım belirteçler yardımı ile tanı konulması olağan bir uygulamadır. Bu belirteçlerin konsantrasyonlarındaki değişikliklerin tespit edilmesi hastalıklar için yüksek riskli bireylerin taranmasını, erken tanı konulmasını, prognoz tahminini ve tedavi yanıtının izlenmesini sağlamaktadır. Klinik uygulamada kullanılan bu belirteçlerin esas amacı mortalite ve morbiditeyi azaltmaktır.

Bio-belirteçler genellikle monoklonal antikor tabanlı metodlarla tespit edilen veya miktarı ölçülen protein molekülleridir. Ancak günümüzde bio-belirteç olarak kullanılan veya belirteç potansiyeli olan birçok molekül tek başına ideal bir

molekülün özelliklerini taşımamaktadır. Teorik olarak her hastalık özgün bir bio-belirteçle ortaya çıkarılabilir ve karakterize edilebilir ve bu belirteçler tek bir molekül olabilir. Başka bir alternatif ise hastalığa özgü bir protein olmak yerine hastalık durumunda posttranslasyonel modifikasyonlarla değişmiş olan bir protein veya proteinler paneli olabilir (207).

Proteinlerin tanısal araç olarak potansiyelinin bilinmesi ve proteomiks teknolojilerdeki ilerlemeler bio-belirteç araştırmalarına ilginin artmasına neden olmuştur. Bu çalışmaların iç hastalıkları klinik pratiğinde önemli olanları Tablo 12’de sunulmuştur.

Tablo 12. Biobelirtreç Araştırma Çalışmalarında Güncel Proteomiks Uygulama Çalışmaları

Araştırma Konusu ve Faydası	Proteomik Platform ve Doğrulama Metodu	Aday Belirteçler	Ref
Membranöz Nefropati-Tanısal Belirteçler	Glomeruler protein ekstraktı ve Western Blotting uygulanmış serumundan yapılan SDS-PAGE	Fosfolipaz A ₂ 'ye karşı otoantikör	208
Hepatoselüler Karsinom(HCC)-Tanısal Belirteçler	HepG2 hücre ekstraktı ve Western Blotting uygulanmış serumundan yapılan SDS-PAGE ELISA	Sadece HCC serumuna immünoreaktif 11 protein spotu arasında HSP60 ve HSP70	209
Akciğer adenokarsinomu-kanser gelişimi ve ilerlemesi için biyobelirteçler	WGA lektin afinite kromatografisi, 2D-PAGE(DIGE) ile serum analizi Western Blot	Adiponektin, seruloplazmin, siklin H, protoonkojen protein kinaz Fyn, vanin-2 (GPI bağlı 80-kDa glikoprotein)	210
Kolorektal kanser(CRC)-Tanısal Belirteçler	PAGE(DIGE) ile doku örneği analizi Western Blot	CRC gelişimiyle ilişkili 51 protein spotundan S100A8 ve S100A8 hastaların plazmalarında artmış olarak bulundu	211
Renal hücreli karsinom- Tanısal Belirteçler	Serumun SELDI-TOF profillemesi	Ökaryotik başlangıç faktörü 2B δ olarak tespit edilen m/z 8937 piki, ek 24 pik sinyali	212

Tablo 12. Devam

Araştırma Konusu ve Faydası	Proteomik Platform ve Doğrulama Metodu	Aday Belirteçler	Ref
Melanom-erken evre hastalarda prognostik belirteçler	Serumun MALDI-TOF profillemesi Spesifik olmayan immunassay	Serum amiloid A olarak tespit edilen m/z 11680 piki kötü prognozla ilişkili	213
Hepatoselüler karsinom etyolojisinde HCV'nin yeri- Tanısal belirteçler	Serumun MALDI-TOF profillemesi	Kompleman C3 ve C4a peptitleri ve diğer 4 pik sinyali	214
Meme kanseri- Tanısal Belirteçler	İnsan plazma proteinlerinden salınan N-glikanların MALDI-TOF profillemesi	8 glikan sinyali meme kanseri için karakteristik	215
Kronik allograft disfonksiyonu- Tanısal belirteçler	İdrar peptitlerinin LC-MSMS (etiketsiz) analizi Extracted Ion Chromatograma dayalı LC-MSMS	Uromodulin SGSVIDQSRVLNLPITR Kininojen peptit DLIATMMPPISPAPIQSDDDWPDIQI, m/z 645.59 ve 642.61 iyonları	216

2.11.3 Bio-belirteç Kaynakları

Bio-belirteç araştırmalarında önemli konulardan biri biyolojik örneğin ulaşılabilirlik durumudur. Çok sayıda vücut sıvısı içinde kan ümit verici bir kaynak olarak düşünülmektedir. İdrar, amniyotik sıvı, tükürük, serebrospinal sıvı, meme aspirasyon sıvısı, sinovyal sıvı gibi sıvılar kan kadar protein profili sağlamazlar ve bu sıvılara ulaşmak bazen oldukça güç olabilir. Bio-belirteç kaynağı olarak kana kolayca ulaşılır, toplanması minimal invaziv ve risksizdir.

2.11.3.1 Kan

Kanın en önemli avantajı organizmadaki hemen hemen tüm hücrelerle temas halinde olmasıdır. Salgılanma ve dökülme veya spesifik olmayan sızıntılar nedeniyle dokuların proteinleri kan akımına karışmaktadır (217). Bu nedenle patolojik durumdan etkilenen hücrelerle birlikte düzensiz proteomlar dolaşıma hastalıkla

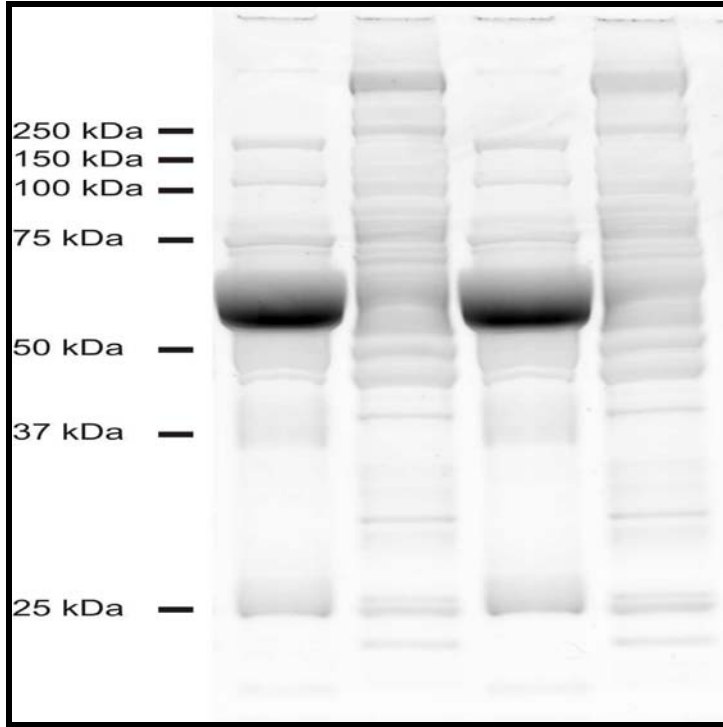
ilişkili proteinler salarak 'özgün molekül' oluşturur. Ayrıca organizmanın hastalığa karşı yanıtı sonucu da 'özgün molekül' oluşabilir (218). 'Özgün molekül', geleneksel tekniklerle kolayca analiz edilebilen, fazla miktarda bulunan (high-abundance) proteinler de olabilir. Ayrıca bütünlüğü korunmuş proteinlerin dışında proteaz/peptitaz etkisi sonucu oluşan protein fragmanları da 'özgün molekül' olabilir. (219). Ancak en ilginç proteinler patolojik durumdan etkilenen hücre kökenli proteinlerdir. Kan hacminin fazla olması nedeniyle tanısal olarak anlamlı proteinlerin konsantrasyonları her mililitrede nanogram (ng/ml) hatta daha düşük seviyelere düşmektedir. Bu nedenle serum kullanarak proteom çalışmak örneklerin zenginleştirilmesini gerektirir. (220).

Plazma proteomundaki değişimler sadece patolojik durumlarda oluşmadığından bio-belirteç keşfetmeye çalışan araştırmaların ön hazırlıkları oldukça önemlidir. Yaş, sirkadyan ritim, stres, ilaç kullanımı, fiziksel aktivite, gebelik gibi faktörler plazma protein profilini büyük ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle kanın alınması, taşınması ve depolanması gibi araştırmaların ön hazırlık basamaklarının tümü standardize edilmeli ve izlenmelidir. Böylece plazma proteomunda rastgele ve hastalıkla ilişkisi olmayan değişikliklerin meydana gelmesi önlenmiş olunur. Bu fazda oluşacak en ufak sapma yanlış analiz sonuçlarına neden olabilir. Çalışmaya alınacak olgu ve kontrol sayısı da yanıltıcı sonuçlara neden olabilecek diğer bir önemli faktördür.

Kanın protein ve peptit içeriği çok fazladır. Ayrıca proteinlerin çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlar ve alternatif splicing nedeniyle uğradıkları değişim göz önüne alınacak olursa plazma proteomundaki farklılıklar daha da artmaktadır. HUPO (Human Proteome Organisation) konsorsiyumu bugüne kadar 9000'den fazla plazma proteininin tespit edildiğini bildirmiştir. Bu nedenle kan, organizmanın içinde bulunduğu durumu yansıtmaya açısından oldukça uygun bir kaynak olmasına rağmen bio-belirteç araştırmalarında analizi zor bir örnektir.

Plazma protein miktarının geniş bir yoğunluk aralığında bulunması analizi zorlaştıran bir diğer faktördür. Özetle, plazma proteinlerinin yaklaşık % 99'unu oluşturan 20 protein arasında plazma kaynaklı proteomiks ile bio-belirteç özelliği taşıyabilecek bir molekülünü tespit edebilmek oldukça güçtür (221).

Serum proteomiks araştırmalarında fazla miktarda bulunan ve tanısals değeri bulunmayan proteinleri immünafinite ile uzaklaştırmak ilk yapılan işlemlerden biridir. Bunun için immobilize poliklonal antikorlar kullanılmaktadır. Bu antikorlar belirli protein ve izoformlarına bağlanır ve toplam plazma proteinlerinin ~%95'ini uzaklaştırır. (şekil 16) Böylece serumun kompleksliği azalır, tespit edilen proteinlerin sayısı artar ve protein miktarları kesin olarak tespit edilebilir (222). Bu yöntemin sakıncası albumin gibi miktarı fazla olan proteinlerle birlikte tanısals belirteç değeri olabilecek diğer küçük proteinlerin de uzaklaştırılmasına neden olmasıdır. Örneğin, önemli bir taşıyıcı protein olan plazma albuminin uzaklaştırılması diğer 814 proteinin de birlikte uzaklaştırılmasına neden olmaktadır (223). Ayrıca miktarı fazla olan proteinlerin de tanısals değeri olabilir. Serumdan miktarı fazla olan proteinleri uzaklaştırmak yerine peptit kütüphaneleri kullanılarak plazma proteinleri benzer düzeylere getirilerek dengelenmesi kullanılan bir diğer yöntemdir.



şekil 16. MARS (Multiple Affinity Removal System) Hu-14 kolonunda (Agilent) immünoafinite uygulanan plazma örneğinin SDS-PAGE jeli. Birinci ve üçüncü şeritteki band fraksiyonu miktarı fazla olan proteinleri içerirken ikinci ve dördüncü şerit miktarı fazla proteinleri uzaklaştırılmış serum örneğini göstermektedir.

2.11.3.2 Dokular

Hastalıklardan etkilenen dokuların normal dokular ile karşılaştırılması bio-belirteç olarak kullanılacak protein ve peptitlerin tespit edilmesini sağlayabilir. Ancak dokular genellikle klinik pratik uygulamada kolayca elde edilememekte ve hastalığın izlenmesinde kullanılamamaktadır. Bununla birlikte doku kaynaklı proteinler çok düşük miktarlarda da olsalar serumdan immünojenik testlerle analiz edilebilir.

2.11.3.3 İdrar

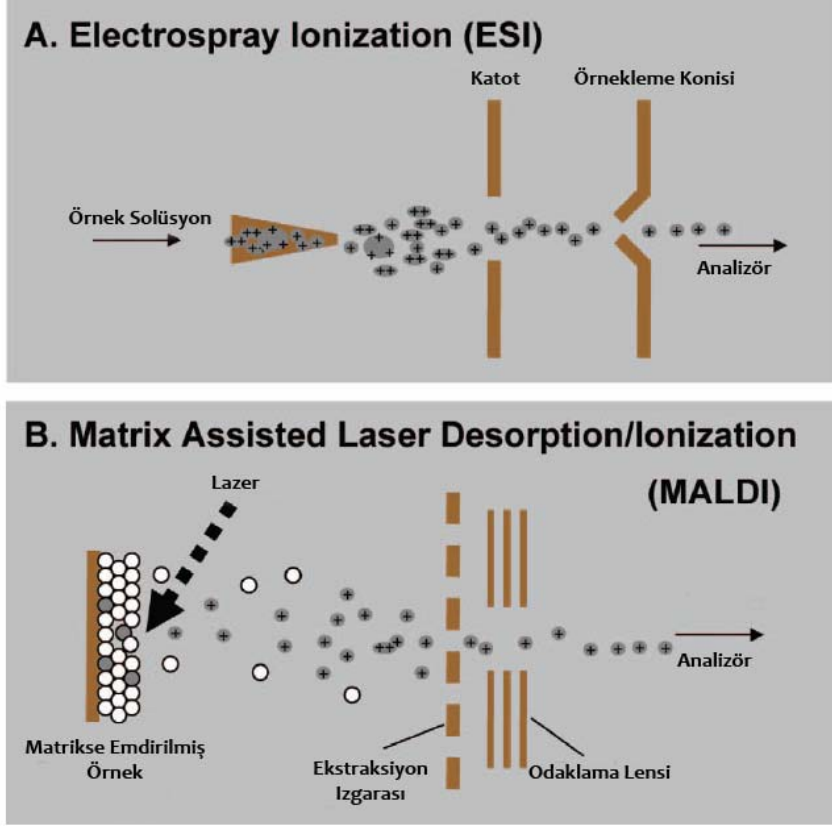
İdrarın geçmişte kararlı olmadığı ve hastalıklar hakkında yeteri kadar bilgi sağlamadığının düşünülmesine rağmen günümüzde proteomiks tekniklerin gelişmesiyle kolay, tıbbi personele gereksinim olmadan ve çok miktarda elde edilebilmesi nedeniyle sık araştırılan bir kaynak haline gelmiştir. İdrar proteomunun oldukça dengeli olduğu da dikkat çekicidir. Bu kararlılık büyük ölçüde idrarın mesanede kalma süresinin endojen proteozlarca proteolitik parçalanma için yeterli olmamasına bağlıdır. İdrar proteomu 4°C'de 3 gün, oda ısısında 6 saat herhangi bir değişime uğramadan kararlılığını korumaktadır (224). Bu durum idrar proteomunun serumdan daha fazla stabil olduğunu göstermektedir. Ayrıca -20 °C'de yıllarca proteomda değişim olmadan saklanabilmektedir. İdrardan elde edilecek verilerin kalitesini ve karşılaştırılabilirliğini protein miktarını değiştirerek etkileyebilecek faktörlerin başında diyet ve egzersiz gelir.

İdrar proteomu böbrek, mesane ve vasküler sistem gibi doğrudan teması olan organların hastalıkları hakkında aşırı hastalık belirtileri ortaya çıkmadan bilgi verebilir, patojenik mekanizmaların anlaşılmasını sağlayabilir (225) .

2.11.4 Plazma Analizinde Kullanılan Proteomiks Teknikler

Günümüzde bio-belirteç araştırmalarında kullanılan üç primer yaklaşım mevcuttur(2D-PAGE, Likit Kromatografisi, Kapiller elektroforez). Her bir metodun hem kendine özgü üstün yanları hem de özgün ve önemli sakıncaları vardır. Bu nedenle tekniklerin hiçbirinin ideal olmadığı göz önüne alınmalı ve araştırılan konuya en uygun teknik seçilmelidir. Bu üç metodun esasları farklı olmasına rağmen ortak yanları kütle spektrometrisidir (MS).

2D-PAGE üzerinde, likit kromatografisi veya kapiller elektroforez sonrası toplanan fraksiyonlar içerisinde bulunan proteinlerin isimlendirilebilmesi için modifiye kütle spektrometresinden faydalanılır. Bir kütle spektrometrisi üç ana parçadan oluşur: iyon kaynağı, analizör ve dedektör. Tipik bir MS deneyinde örnek moleküller iyonize edilir, iyon kaynağında gaz faza dönüştürülür ve analizörde kütle/yük (m/z) oranına göre ayrıştırılır. Sonuçta dedektör tarafından ölçülür. Proteomiks araştırmalarda en sık kullanılan iyon kaynakları MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) ve ESI (Electrospray Ionisation)'dur. Bir MALDI kaynağında analize edilecek moleküller lazer ışınları ile katı halden iyonize hale getirilir. ESI kaynağı ise çözülmüş molekülleri kütle analizörüne doğru oldukça ince ışınlar halinde püskürterek iyonlaştırır (Şekil 17). En sık kullanılan analizörler ise TOF (time-of-flight), quadropole (Q), ion trap (IT), Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) ve Orbitrap'tir. Bunlar ya tek başına ya da ardışık (tandem) kullanılır. Tandem kütle spektrometrisinde (MS/MS) kütle analizinin birçok basamağı boşlukta ayrılmış farklı farklı analizörle veya her basamağı ayrı zamanlarda tek bir analizörle yapılabilir. Boşlukta ayrılmış MS/MS'de analizörler fiziksel olarak ayrılır ancak vakumu sürdürmek için sıkıca bağlanır. Bu yapılanma Q-TOF, TOF-TOF, üçlü Quadropole şeklinde kullanılabilir. Diğer yandan zamanda MS/MS aynı boşlukta ion trap'la yapılabilir. Her bir analiz basamağı ayrı zamanlarda yapılır. Bu amaçla ion traplar veya FT-ICR'lar kullanılabilir.



Şekil 17. Proteomikte sık kullanılan peptit ve protein iyonizasyon metodları. A. Elektrospray İonizasyon (ESI)'de solusyondaki protein ve peptitler uçucu hale getirilir ve iyonlaştırılır. B. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI)'de lazer ışınları katı yapıyı iyonize eder. İyonlar sonra kütle analizörüne yollanır. (Jacek R. Wisniewski. Mass Spectrometry-Based Proteomics; Arch Pathol Lab Med—2008; Vol 132'den alınmıştır.)

2.11.4.1 İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (2D-PAGE)

Kapsamlı proteomiks deneylerinde ilk kullanılan ve altın standart olan metod iki boyutlu poliakrilamid jel elektrofrezidir. Bu metotta proteinler jel matriks içinde izoelektrik noktalarına (pI) ve moleküler ağırlıklarına (mA) göre ayrılırlar (226). Bu iki bağımsız fizyokimyasal özelliğin kombinasyonu ile proteinlerin yüksek çözünürlükle ayrıştırılması sağlanır.

Birinci boyutta protein karışımları pI değerlerine göre izoelektrik fokuslama (IEF) kullanılarak ayrıştırılır. IEF ticari immobilize edilmiş pH gradient (IPG) stripleri ile yapılır (227). Fokuslanmış proteinleri içeren IPG stripler ikinci boyutta moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırılır. Böylece iki boyutlu jel haritası oluşur. Burada proteinler çeşitli yaklaşımlarla görünür hale getirilir.

Geleneksel boyama protokolleri CoomassieTM Blue G-250, R-250 veya gümüş boyamadır. Sık kullanılan floresans boyalar SyproTM Ruby ve Deep PurpleTM’dir. Klasik boyalarla kıyaslandığında floresan bazlı boyalar ölçümlerin doğrusallığının ve duyarlılığının artmasını sağlar. Ayrırdedici Jel elektroforezi (Differential Gel Electrophoresis-DIGE) 2D-PAGE öncesi proteinlerin üç flororasan boya ile (Cy2, Cy3 ve Cy5) kovalent olarak işaretlemesi prensibine dayanır. DIGE metodu ile aynı jel üzerinde iki farklı örneğe ait proteinleri tek seferde görüntülemek mümkündür. Böylece klasik 2D-PAGE yaklaşımında karşılaşılan jeller arası yürütme koşullarından kaynaklanan farklılıklar engellenmiş olur (228). Boyama protokolleri seçilirken duyarlılık, dinamik doğrusallık ve kütle spektrometrisine uygunluğu dikkate alınmalıdır (Tablo 13).

Tablo 13. Sık Kullanılan Boyama Metodları

Boyama Metodu	Uygulama Prensibi	Duyarlılık	Ölçüm Doğrusallığı	MS Uygunluğu
Coomassie TM Blue G-250, R-250	Absorbsiyon	++	++	+
Gümüş Boyama	Absorbsiyon	+++	+	-/+
Sypro TM Ruby	Florosans	+++	+++	+
CyDyes-DIGE Boyaları	Florosans	++++	++++	+

(Kaynak: Miller I, Crawford J, Gianazza E: Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics* 2006; **6**: 5385-5408)

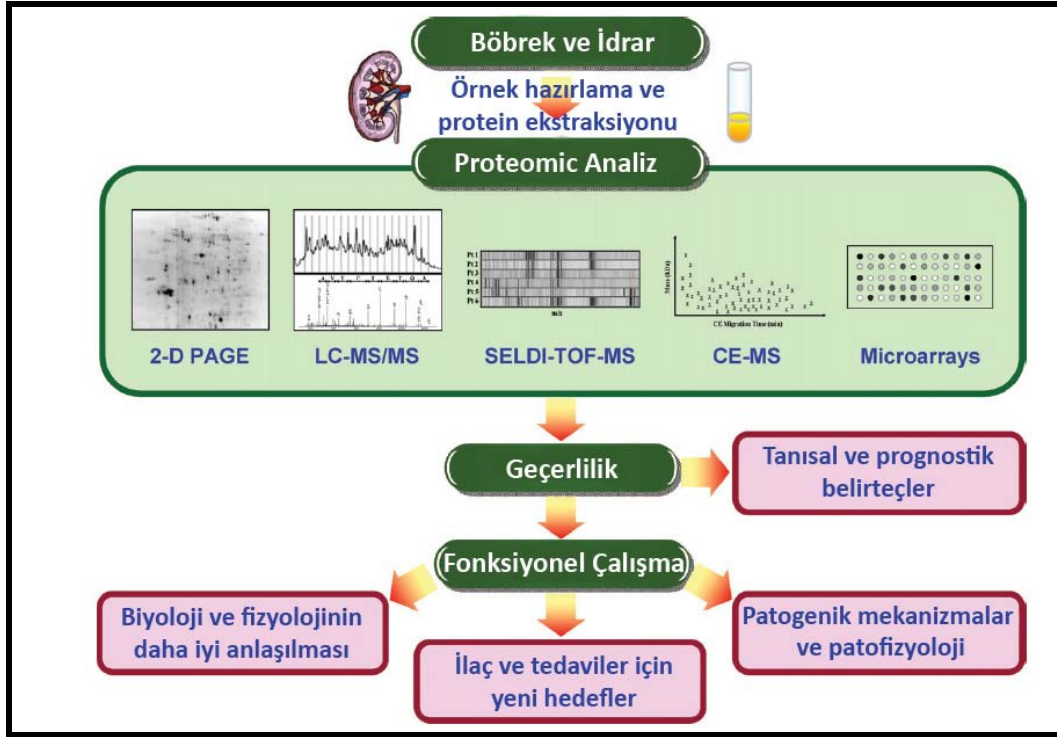
Sonuçta boyanan jeller bilgisayara yüklenir ve boyanan spotların yoğunluğunun karşılaştırılması ile proteinleri ölçebilen özelleşmiş yazılımlarla değerlendirilir. Belirlenen protein spotları kütle spektrometri metodlarından birinde incelenir. Genellikle peptit kütle parmak izi metodu (peptide mass fingerprint method-PMF) kullanılır. İzole protein içeren jel parçası kesilir ve tripsin veya diğer spesifik proteazlarla enzimatik olarak parçalanır, sonuçta bir peptit karışımı elde edilir. Kütle spektrometrisi her bir peptit için kütle/yük oranını (m/z) belirler (229). Bugüne kadar aminoasit dizisi bilinen tüm proteinler için sanal ortamda tripsin kesimi yapılmış ve

açığa çıkan peptitlerin m/z oranları veri bankasında depolanmıştır (Swiss-Prot veri bankası www.expasy.org).

Tek bir 2D-PAGE'den yüzlerce, binlerce protein spotu elde edilebilir. Bu metod benzer protein izoformlarını ayırtmak için en uygun yöntemlerden biridir. Ancak 2D-PAGE'nin sakıncaları da vardır. İşlemlerin yoğun emek ve zaman gerektirmesi ve ciddi bir alt yapı gereksinimi önemli bir sorun oluşturmaktadır. Ayrıca en sık karşılaşılan teknik zorluklar arasında protein karışımlarındaki tuz oranının fazla olması, polisakkarid ve nükleik asitlerin varlığı, miktarı fazla olan proteinler (albumin gibi) miktarı az olan proteinlerin tespit edilmesini engellemesi sayılabilir. Tüm bunların ötesinde hidrofobik membran proteinlerinin izolasyonu ve çalışılması bir diğer problemdir. Ayrıca pI ve MA göre protein ayırması yapıldığından çakışan spotlar belirlenemez.

2.11.5 Böbrek Hastalıklarında Proteomiks Uygulamaları

Biyomedikal proteomiks araştırmalarının bir alt disiplini olarak böbrek ve idrarda proteomiks uygulamaları giderek artmaktadır. Böbrek proteomiks çalışmalarının artması, nefrologların temel klinik soru ve sorunlarının cevaplarının araştırılması sürecinde proteomiks uygulamalarına ilgilerinin oldukça fazla olduğunu göstermektedir. İdrarın proteom analizi hem böbrek hem de diğer organların hastalıkları ile ilişkili bio-belirteçlerin keşfedilmesi için önemli bir araçtır (230). İdrar ve böbrek proteomiks araştırmalarının amacı şu şekilde özetlenebilir: (i) böbreğin biyoloji ve fizyolojisini daha iyi anlamak; (ii) böbrek hastalıkları ve böbrekle ilişkili bozuklukların patogenik mekanizma ve/veya patofizyolojisini araştırmak ve çözmek; (iii) tanısal ve prognostik belirteçleri tespit etmek; (iv) yeni tedavi hedefleri, ilaçlar ve tedavi seçenekleri tanımlamak (Şekil 18).



Şekil 18. Renal ve idrar proteomiks uygulamaları ve metodolojilerinin şematik özeti

2.11.5.1 Böbrek Hastalıklarının Patojenik Mekanizmalarını veya Patofizyolojisini Aydınlatmak

Böbrek hastalıklarında proteomiks uygulamalarında en sık araştırılan konu diabetik nefropatidir (DN). *db^{-/-}/db^{-/-}* murin modeli kullanılarak tip 2 diyabette renal kortikal proteom değişikliklerini araştıran bir çalışmada 147 korteks kaynaklı proteinin düzeyinin değiştiği tespit edilmiştir. Değişen bu proteinler özellikle metabolik yollarda olmak üzere birçok biyolojik olayda rol almaktadır. Bu çalışmada değişen proteinler arasındaki etkileşimi gösteren bir harita oluşturulmuş ve peroxisome proliferator-activated receptor-alpha'nın (PPAR α) moleküller arası etkileşimin ortak noktası olduğu gösterilmiştir (231).

Yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kalan insan mezengial hücrelerinin membran ve sitozolik subproteom değişikliklerini araştıran bir çalışmada ise sitozolik fraksiyonda artan proteinlerden birinin calmodulin olduğu tespit edilmiştir (232). Yüksek glukoz konsantrasyonunda mezengial hücrelerde calmodulin artışı immün boyama yapılarak da doğrulanmıştır. Western blot analizi de hem mezengial hücrelerde hem de fare ve murin diabetik böbrekte calmodulin artışını doğrulamıştır.

Calmodulin W7 ve trifluoperazinle inhibe edildiğinde mezengial hücelere TGF- β aracılı glukoz alımının durduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuç göstermektedir ki calmodulin mezengial hücelerde glukoz transportunda önemli bir rol oynamaktadır. *db/db* diabetik farelerde glomeruler proteom değişikliklerini inceleyen bir çalışmada ise 40 glomeruler proteinin düzeyinin değiştiği tespit edilmiştir. Bunlardan redoks yollarında bulunan süperoksid dismutaz izoform 1, peroksiredoksin-3 ve glutatyon peroksidaz-1 gibi birçok proteinin artışı özellikle dikkati çekmektedir (233). Proteomiks teknolojisi böbrek taşı hastalıklarında da uygulanmıştır. Kristal ve hücre etkileşiminin böbreğin taş hastalıklarının patojenik mekanizmasındaki rolü ortaya çıkarılmıştır. 2D-PAGE proteomiks yaklaşımı ile kristallerle hücreler arasında bağlanmayı sağlayan bazı proteinler tespit edilmiştir. Kalsiyum oksalat monohidrat kristalleri ile renal tubuler hücrelerin etkileşimi ile ortaya çıkan proteom değişiklikleri (234) kalsiyum oksalat dihidrat kristalleri ile tubuler hücre etkileşimi sonucu ortaya çıkan değişiklikler (235) birbirinden oldukça farklıdır. Kalsiyum oksalat monohidrat kristallerinin adsorbtif kapasitesi oldukça fazladır. Bu fark böbreğin taş hastalıklarının patogeneğinde kalsiyum oksalat monohidrat kristallerinin önemini açıklamak için yeterli olabilir.

2.11.5.2 Tanısal ve Prognostik Belirteçleri Tespit Etmek

Tip 1 diyabetli hastalar ve sağlıklı kişilerin idrar protein profilleri karşılaştıran bir çalışmada diyabetik hastalardan elde edilen profillerin oldukça farklı olduğu görülmüştür. Aynı çalışmanın alt grup analizinde ise nefropati gelişmiş ve nefropati gelişmemiş diyabetik hastaları ayırmak için kullanılabilir potansiyel biyobelirteç profili elde edilmiştir (236).

Başka bir çalışmada ise nefropati gelişmiş diyabetik hastalardan, diyabet dışı nedenlerden dolayı proteinürik ve sağlıklı kontrollerden elde edilen idrarların SELDI proteom profillemesi yapılmıştır. Nefropatik ve nefropatik olmayan hastalar karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında ekskresyonu farklı, kütle yük oranları (m/z) 6188, 11744 ve 14766 olan üç SELDI spektrumu elde edilmiştir. İlginç olarak bu spektrumlar diyabetik nefropati gelişen hastaları nefropati gelişmeyenlerden ayırt etmektedir. Sonuç olarak bu proteinler sırasıyla ubiquitin, β_2 mikroglobulin, UBA52

ubiquitin ribozomal füzyon proteini olarak tanımlanmıştır (237). Bu proteinler diyabetik nefropati tanısı için potansiyel bio-belirteç olabilir.

Proteomiks teknolojisi diyabetik nefropati dışında böbrek hastalıklarına uygulanmış ve birçok bio-belirteç adayı protein tespit edilmiştir. Neonatal üreteropelvik bileşke (UPJ) obstrüksiyonunda bio-belirteç tespiti için yapılan bir çalışmada oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hastalar ameliyat gerektirmeyen, ameliyat olasılığı bulunan ve doğumdan hemen sonra ameliyat gerektirenler olarak üç gruba ayrılmıştır. Kapiller elektroforez ve kütle spektrometrisi kullanılarak doğumdan hemen sonra ameliyat gerektiren hastaları sağlıklı yeni doğan ve operasyon gerektirmeyen hastalardan ayırt eden 19 idrar polipeptidini içeren potansiyel bio-belirteç profili elde edilmiştir. Bu belirteçler doğumdan hemen sonra ameliyat gerektiren hastalarla operasyon gerektirmeyenleri %94 sensitivite ve %80-100 spesifisite ile ayırt edebilmektedir (238).

Başka bir örnekte ise, sisplatinle akut böbrek hasarı oluşturulmuş farelerden elde edilen idrar eksozomları 2D-DIGE-MS kullanılarak potansiyel bio-belirteç olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerden eksozomal fetuin-A düzeyinin sisplatinle oluşturulan böbrek hasarında arttığı Western Blott analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca, eksozomal fetuin-A düzeyinin bilateral renal iskemi ve reperfüzyon hasarı oluşturulmuş hayvanlar ve yoğun bakımda akut böbrek hasarı gelişen hastalarda arttığı tespit edilmiştir (239).

Bu veriler ışığında proteomiks teknoloji, böbrek ve diğer sistemlerin hastalıkların tanısını koyabilecek ve prognozu belirleyebilecek olası bio-belirteçleri tespit edebilmek için ümit verici bir tekniktir.

2.11.5.3 Yeni Tedavi Hedeflerinin Tespit Edilmesi

Bio-belirteç keşfine odaklanan çalışmaların bazılarında potansiyel yeni tedavi hedefleri de tespit edilmiştir. Örneğin, elastin (240) ve kollajen fragmanları diyabetik nefropati gelişen hastalarda fibrojenezin önlenmesi ve tedavisinde, üriner trefoil faktör (TFF-1) böbrek taşı oluşumunun önlenmesinde potansiyel hedeflerdir.

İdiopatik membranöz nefropatinin hedef glomeruler antijeni olarak M tipi fosfolipaz A₂ reseptörü (PLA₂R) immünoproteomiks teknikle başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (208). Sonuçlar idiyopatik membranöz nefropatili hastalardan elde edilen

seruma karşı reaktif rekombinant PLA₂R kullanılarak doğrulanmıştır. Ayrıca bu hastaların serumunda tespit edilen IgG (özellikle IgG₄) sekonder membranöz nefropatili hastalarda tespit edilmemiştir. Bu veriler böbrek ve diğer sistemlerin hastalıklarında yeni ilaçların ve tedavilerin geliştirilmesine neden olacaktır. Sonuç olarak tüm bu proteomiks yaklaşımlar kullanılarak bulunan belirteç proteinler ufkumuzu açmıştır. Gelecekte hakim tenolojinin proteomiks teknolojisi olduğunu göstermiştir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlık

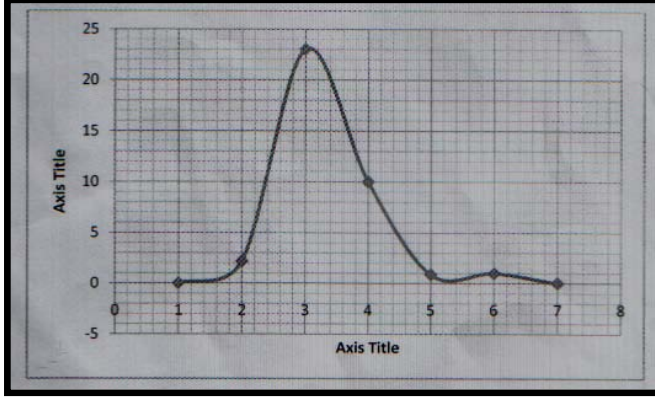
Çalışmaya, en az 3 ay içinde ölçülen serum PTH değeri <100 pg/ml olan hastalar adinamik (düşük döngülü) kemik hastalığı bulunan 10 hasta (4 Erkek, 6 Kadın, yaş ortalaması 47,6±13,4) ile, serum PTH değeri>1000 pg/ml olan yüksek döngülü kemik hastalığı bulunan 10 (4 Erkek,6 Kadın, yaş ortalaması 41,2±12,9) hasta alındı. Bu hastalar 18 yaşından büyük ve en az 6 aydır haftada 3 gün 4'er saat hemodiyaliz tedavisi görmekte idiler. Serum örnekleri Kocaeli Devlet Hastanesi ve Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyaliz Ünitelerinde hemodiyaliz uygulanan hastalardan diyaliz seansı öncesi aydınlatılmış onamları alınarak toplandı. PTH düzeyi <100 pg/ml olan hastalar C1-10, >1000 pg/ml olan hastalar ise H1-10 olarak kodlandı. C ve H olarak kodlanan hastaların özellikleri Tablo 15'de verilmiştir.

Çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Etik kurul tarafından İAEK-10/8 sayılı 2009/80 no'lu proje olarak kabul edildi.

3.2. Protein çözeltilerinin hazırlanması

Hastalardan alınan 5 ml kan örnekleri buz üzerinde 30 dakika tutulduktan sonra 3500 xg'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Üst faz 0,5 ml parçalar halinde dondurularak -80 °C'de saklandı. Örneklerin çalışılmasına karar verildiğinde buz üzerinde çözüldü, bir sonraki adıma geçildi. İki boyutlu jel elektroforezinde örnekteki tuz miktarı proteinlerin jeller üzerindeki yürümesini engellediğinden dolayı her bir serum örneği tuzdan arındırıldı. Bu amaç için 10 DG desalting kolonları (Bio-

RAD, USA) (cut-off limiti 10kDA) kullanıldı. Kolondan çıkan en yoğun fraksiyonlar birleştirilerek bir sonraki aşamaya geçildi (Şekil 19).



Şekil 19. 10 DG desalting kolonundan çıkan serum protein profili.

Şekil 20'de 2D-PAGE deneylerinin optimizasyonu sırasında uygun hazırlayamadığımız bir serum örneğinin protein profili verilmiştir.



Şekil 20. Optimizasyon öncesi yürütülen 2D PAGE jel profili.

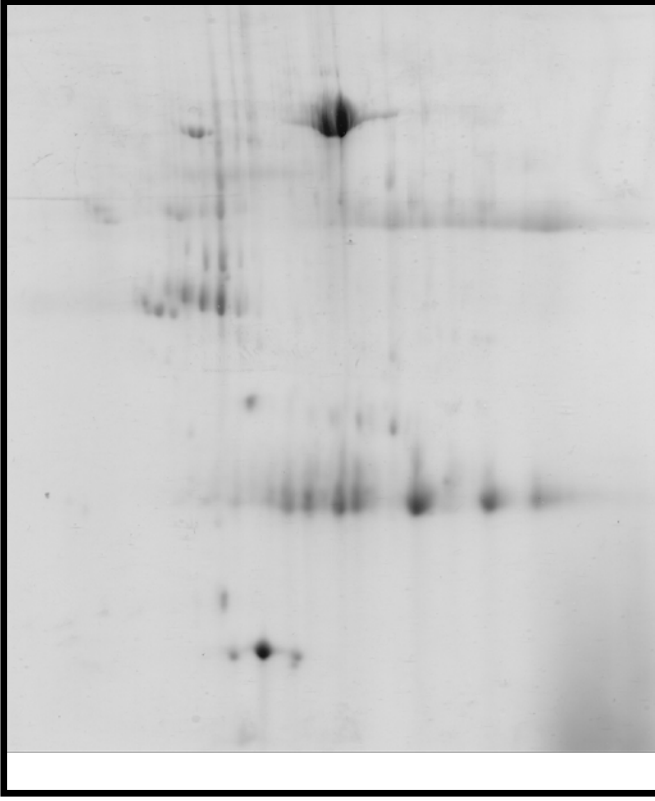
Örnekte görülen izole veya gruplar halindeki siyah renkli noktalar *spot* olarak adlandırılmaktadır. Spotların her biri bir protein veya protein fraksiyonunu ifade etmektedir.

3.2.1 Albumin İndirgenmesi

Serum örneklerinde albumin, globulin, transferin, seruloplazmin ve haptoglobulin gibi protein fraksiyonları fazla miktarda bulunduğundan 2D-PAGE üzerinde belirteç protein olabilecek adayları gizler. Bu nedenle analiz öncesi uzaklaştırılmaları önerilmektedir. Bu amaçla Aurum Serum Protein Mini Kit (Bio-RAD, USA) kullanıldı.

Protokol;

Dibe çöken reçineleri ayırmak için serum protein kolonu test tüpünde 5 dakika bekletildikten sonra kolonun altındaki tıpası ayrıldı, kolon test tüpüne tekrar yerleştirildi ve yer çekimi ile akım başladı. 1 ml serum protein bağlayıcı tampon ile kolon iki kez yer çekimi akımı kullanılarak yıkandı. Sonrasında kolon boş 2 ml toplayıcı tüpe yerleştirildi, reçine yatağını kurutmak için 20 sn, 10000 xg de santrifüj edildi. Kolonun altına tıpası yerleştirilip kolon temiz test tüpüne konuldu. Ayrı bir tüpte, 60 µL üst faz sıvı 180 µL serum protein bağlayıcı tampon ile seyreltilerek örnek hazırlandı. 200 µL seyreltilmiş üst faz sıvısı kolondaki reçine yatağının üzerine konuldu. Beşer dakika aralarla 3 kez kolon şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Kolon altındaki sarı tıpa çıkarılıp kolon şiddetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra 20 sn 10000 xg de santrifüj edildi ve protein fraksiyonları toplama tüpüne alındı. Ancak kitten elde edilen fraksiyonlar az miktarda protein içerdiği için 7 cm'lik jellerle ön tarama yapmak amacıyla kullanıldı. 17 cm'lik büyük jellerle analiz yapabilmek için kendi geliştirdiğimiz protokolü kullandık. Bu protokolda 0,5 ml Blue Gel maddesi 0,2 ml serum örneği ile karıştırılıp 1,5 ml hacimdeki kolonlardan geçirildi. Albumini indirgenmiş örnekler bir sonraki adım için hazır hale getirildi (Şekil 21).



Şekil 21. Albumin indirgemesi manuel olarak yapılmış serum örneği.

3.2.2 Trikloro asetik asit (TCA)-Aseton çöktürmesi

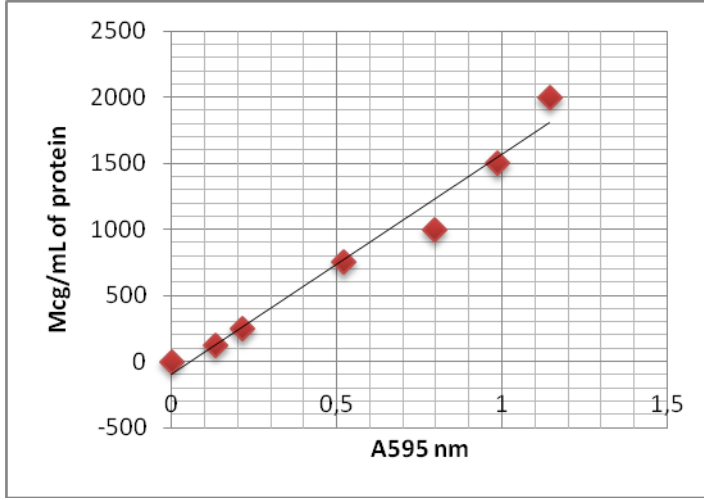
Albumini indirgenmiş ve temizlenmiş serum örneklerinin iki boyutlu jel elektroforezine uygun tamponda çözülebilmesi için TCA-aseton çöktürmesi yapıldı. Çöktürme şu şekilde özetlenebilir. Her bir örneğin hacimce dörtte biri kadar TCA örneklere eklendi ve gece boyu -20°C 'de bekletildi. Tüpler mikrosantrifüjde 14000 xg de 20 dk santrifüj edildi ve çöken proteinlerden sıvı kısım dikkatli bir şekilde ayrıldı. Protein çöktürmeleri $200 \mu\text{L}$ aseton ile yıkandıktan sonra mikrosantrifüjde 14000 xg de 5 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Sonrasında asetonu uzaklaştırmak için proteinler 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Çökelek $250 \mu\text{L}$, rehidrasyon tamponu içerisinde çözüldü ve protein konsantrasyonu belirlendi (10 ml ReadyPrep rehidration tampon 8 M urea, $0,2(\text{w/v})$ Bio-Lye $3/10$ ampholytes, 2% CHAPS, 50 Mm dithiothreitol (DTT) ve Bromophenol Blue).

3.2.3. Protein miktarının belirlenmesi

Temizlenmiş serum örnekleri içerisindeki protein miktarı iki farklı yöntem kullanılarak belirlendi. Eğer örnekler betamerkaptoetanol, DTT (Ditiotreitol), PBT (Tribütilfosfayn) içeriyorsa Lowry protein assay metodu, içermiyorsa Bradford dye binding assay metodu kullanıldı. Her iki yöntem de Bio-Rad firmasının pazarlanan kitler aracılığı ile uygulandı. Lowry metodu (RCDC protein assay, Bio-Rad, USA) kalorimetrik bir metod olup protein ile alkalın bakır tartarat çözeltisinin ve folin ajanının etkileşimine dayanılarak değerlendirilir. Renk oluşumu tirozin ve triptofan ile birlikte çok az miktarda sistein ve histidin katkıları ile olur. Oluşan mavi renk 750 nm’de spektrofotometre yardımı ile okunur ve bir standart aracılığı ile miktara çevrilir. Bradford metodu proteinlerin asidik ortamda Coomassie Brilliant mavisini ile vermiş olduğu reaksiyona dayanır. Spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldıktan sonra elde edilen absorbans değerleri standart BSA çözeltilerinin absorbansları ile karşılaştırılarak ve dilüsyon faktörü de göz önüne alınarak protein miktarı hesaplanır.

3.2.4 Protein Standard Eğrisinin Çizilmesi

Saf Bovin serum albumin proteini örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesinde kullanıldı. Şekil 22’de Bradford metodu için hazırlanmış standart eğri verilmiştir. Lowry metodu ile hazırlanan eğride benzer şekildedir. Protein standardı olarak 0,2–2 mg/ml arasında beş adet hazırlanan bovine serum albumin (BSA) dilüsyonları ile 595 nm dalga boyunda ölçülen absorbanslar kullanılarak lineer grafikler elde edildi ve bu eğriler kullanıldı.



Şekil 22. Bradford metodu ile hazırlanmış protein standart eğrisi

3.2 Proteomiks analizinde kullanılan jel ve solüsyonlar

3.3.1. %12 SDS Yürütme Jeli:

Destek ortam olarak genellikle poliakrilamid jeller tercih edilmektedir. Poliakrilamid jel ile yapılan elektroforez, örneklerin daha iyi ayrılmasını sağlar. Çünkü ayırma hem moleküler hem de elektroforetik mobiliteye dayanır. Poliakrilamid jeller, minimum protein adsorpsiyonu, hızlı analize olanak sağlanması, kolay hazırlanması, boyama, kopyasını alabilme ve gözenek büyüklüğünün ayarlanabilir olması gibi birçok olumlu özelliğe sahiptir. 2D gel elektroforezinde proteinlerin yürütülmesinde kullanılan poliakrilamid yürütme jeli (% 12) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı:

Saf su	:3,5 ml
0.5 M Tris.Cl pH 6.8	:2,5 ml
TEMED ¹	:10 µl
% 10 SDS ²	:100 µl
% 10 APS ³	:50 µl
% 30	:4 ml
Akrilamid/bisakrilamid ⁴	

¹)Ticari olarak satılan N,N,N', N'-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) kullanıldı (Sigma, USA).

²) Sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10) hazırlamak için 1 g SDS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

³) Amonyum persülfat (APS) (% 10) hazırlamak için 1 g APS tartılıp 10 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.

⁴) Akrilamid – bisakrilamid (% 30) hazırlamak için 29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid tartılıp 100 ml saf suda çözüldü. Filtre edildi ve +4 °C'de saklandı.

3.3.2 Rehidrasyon solüsyonu:

10 ml ReadyPrep rehidration tampon 8M urea, %0,2(w/v) Bio-Lye 3/10 ampholytes, %2 CHAPS, 50 Mm dithiothreitol (DTT ve Bromophenol Blue) içerir.

3.3.3 Yürütücü solüsyon (TGS):

25 Mm Tris, 192 mmolar glycine , %0,1 SDS, Ph: 8,3

3.03 r Tris base, 14.4 gr glycine, 1 gm SDS, 1 L su ile hazırlanır.

3.3.4 Sabitleştirici, Boyama ve Boya Uzaklaştırıcı Solüsyonlar:

Sabitleştirici solüsyon için 40 ml metanol ve 10 ml asetik asit karıştırılarak su ile 100 ml'ye tamamlandı. Görünür bölgede boyama yapabilmek için sabitleştirici solüsyonun içerisine 0,25 g Coomassie mavisi eklenerek boyama solüsyonu hazırlandı. Ultraviöle bölgede boyama yapabilmek için Sypro Ruby (Bio-RAD, USA) kullanıldı.

3.4 İki Boyutlu Jel Elektrofözezi (2D Gel Elektrofözezi)

Protein miktarları belirlenen örneklerin 2D gel elektrofözezi aşağıda tarif edildiği gibi yapıldı.

3.4.1 Birinci Boyut: İzoelektrik odaklama (IEF):

2D jel elektrofözende birinci boyuttaki amaç kompleks proteinlerin izoelektrik noktalarına göre odaklamaktır. Klasik elektrofözden farklı olarak izoelektrik odaklamada, proteinlerin ayrıştığı mesafeler, ortamdaki pH gradyanına bağlıdır. Bu pH gradyanını oluşturan moleküllere amfolitler denir. Amfolitler, molar kütleleri 300-1000 g/mol aralığında olan poli-aminoasitlerdir. Bu moleküller, proteinler gibi bir izoelektrik noktaya (pI) sahip oldukları için bu noktalarda net elektrik yükleri sıfırdır. Amfolitler poliakrilamit jellere katılarak, pH 3-10 arasında bir pH gradyeni oluştururlar.

IPG (İmmobilize pH Gradient) stripleri için rehidrasyon işlemine geçilmeden önce her bir stripe ekilibrasyon (denkleştirme) işlemi uygulandı. Stripler önce 15 dk ekilibrasyon tampon 1 (6 M üre, 0,375 M Tris-HCL, Ph 8,8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 (w/v) DTT) ile muamele edildi. Daha sonra 15 dk ekilibrasyon tampon 2 (6 M üre, 0,375 M Tris-HCL, Ph 8,8, %2 SDS, %20 gliserol, %2,5 (w/v) iodoacetamid) ile muamele edildi. Birinci boyutta ilk aşamada hücre çökelti örnekleri için 50 mikroamper aktif rehidrasyon işlemi yapıldı. İzoelektrik odaklamada 7 veya 17 cm'lik IPG stripleri (pH 3-10 ReadyStrip) ile yapıldı. Rehidrasyon tamponu ile muamele edilen her bir örnekten değişen miktarlarda (50 ile 200µg arasında) protein çözültisi (150 µl 7cm'lik striplemi 300µl 17cm'lik stripler için) rehidrasyon tabakasına koyuldu (Şekil 23 A-B). IPG stripler '+' kutup sol tarafa gelecek şekilde dikkatli bir şekilde tabaka içindeki örneklerin üzerine yerleştirildi. Rehidrasyon

sırasında 1. saat sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için üzerlerine 2-3 ml mineral yağı ilave edildi ve yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam edildi.

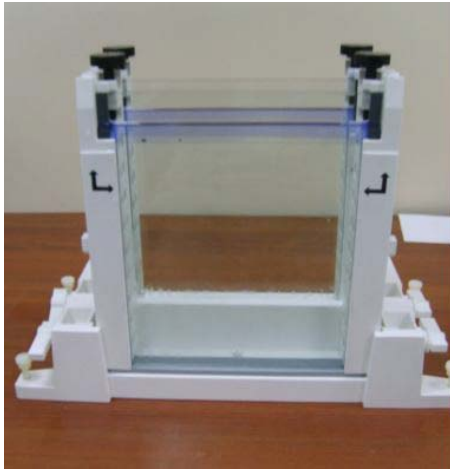
Rehidrasyon işleminden sonra izoelektrik odaklamaya geçildi. Mineral yağdan arıtılmış IPG stripler '+' kutup sol tarafa gelecek şekilde PROTEAN IEF odaklama tabakasına alındı ve üzerlerine 2-3 ml taze mineral yağ koyuldu. IPG strip artan voltaj programı ile birlikte 20 °C' de adım adım yürütüldü (Şekil 20A-B). Rehidrasyon işleminden sonra izoelektrik odaklamaya geçildi. IPG strip artan voltaj programı ile birlikte 20 °C' de adım adım yürütüldü (7cm'lik stripler için 250 volt: 20 dakika, 10000 volt: 2,5 saat lineer, 10000 volt: hızlı ve toplamda 40000 kilowatt/saat gücünde ortalama 7 saat). (17cm'lik stripler için 250 volt: 20 dk, 4000volt: 2 saat lineer, 4000volt: 2,5 saat, hızlı ve toplamda 14 kilowatt/saat gücünde)



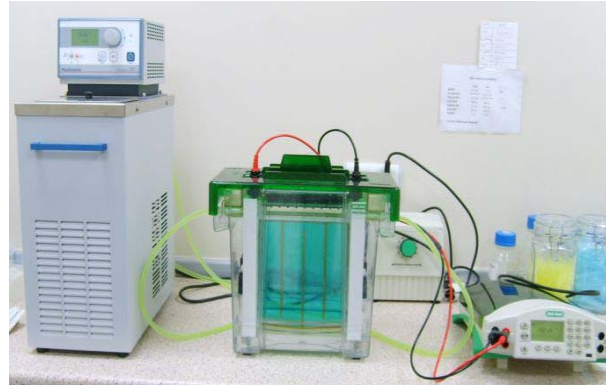
A



B



C



D

Şekil 23. 2D Gel Elektroferez sistemi. **A:** İzoelektrik fokuslamada (IEF) kullanılan rehidrasyon tabakası, **B:** IEF cihazı, **C:** Cam yükleme jel plakaları, **D:** SDS-PAGE yürütme tankı

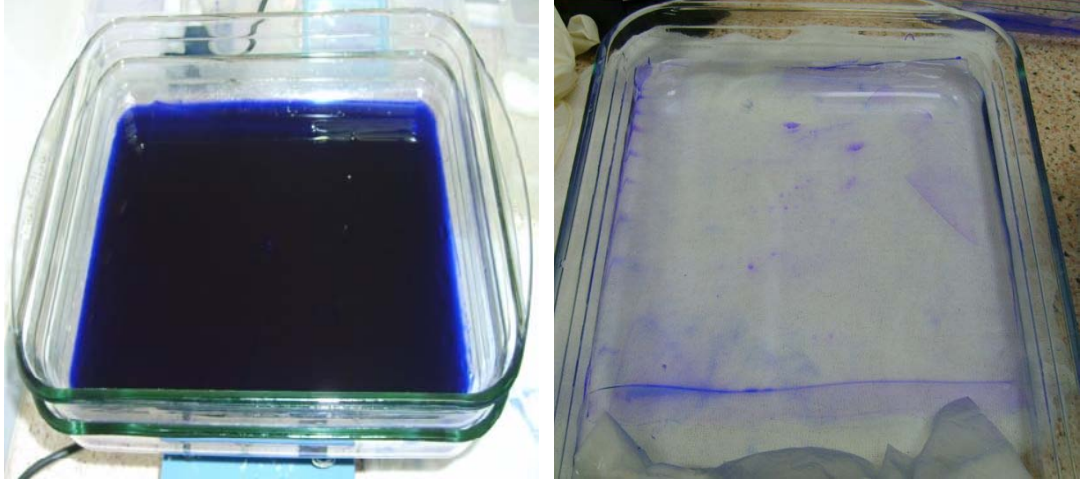
3.4.2 İkinci Boyut: Protein Jel Elektroforezi (SDS-PAGE):

Protein moleküllerin elektrik alandaki hareketleri hem yüklerine hem de boyutlarına bağlıdır. Protein moleküllerin yükleri eşit ise hareket sadece büyüklüğe bağlı olacaktır. Eğer proteinlerin disülfid bağları MET β (-Merkapto etanol) aracılığı ile kırıldıktan sonra elektroferez uygulanırsa, proteinlerin moleköl ağırlıkları hesaplanabilir. Protein moleküllerinin sodyum dodesil sülfat (SDS) ile muamelesi sonucu polipeptit zincirlerinin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıları parçalanır. Ayrıca deterjan, proteinin hidrofobik bölgelerine bağlanarak, proteinlerin doğal yüklerini maskeler. Sonuçta, polipeptit zincirlerinde sabit bir yük/kütle oranına sahip

tek bir yapı ortaya çıkar. SDS-polipeptit kompleksi, SDS ile hazırlanmış bir jelle konulduğunda ortamdaki hızını belirleyen temel etken molekül kütesidir. Elektrik alan sadece filtrasyon olayının itici gücü görevini yapar.

2D jel elektroforezin 2. boyutunda IPG stripler poliakrilamid jel üzerinde yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldılar.

7 cm'lik ve 17 cm'lik iki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasına yükleme jeli üstten 1 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeye 2 mm yüksekliğe kadar su ile doyurulmuş izopropanol eklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı ile cam plakalar arası temizlendi (Şekil 23 C). Polimerize olan jel rezervuar tanka yerleştirildi. IPG stripler yürütücü solüsyonda 1-2 dakika bekletildikten sonra jel üzerine yerleştirildi ve arada boşluk kalmaması için agaroz solüsyonu eklendi. Tank yürütücü solüsyon ile doldurularak 7 cm IPG striplerdeki proteinler SDS PAGE' de 1.0 mm kalınlıktaki jelde 180 voltta, 60 dk yürütüldü. Yürütme sonunda jel cam plakalardan çıkarıldı. Jel 30 dk sabitleştirici solüsyonda yıkandıktan sonra Coomassie mavisi içeren boyama solüsyonunda 3 saat bekletildi ve daha sonra distile su ile yıkandı. 17 cm' lik IPG striplerdeki proteinler 48 voltta 7 saat yürütüldü (Şekil 23 D). Yürütme sonunda jel cam plakalardan çıkarıldı, 2 saat sabitleştirici solüsyonda yıkandıktan sonra Coomassie mavisi içeren boyama solüsyonunda 3 saat bekletildi ve daha sonra distile su ile yıkandı (Şekil 24). SYPRO Ruby ile boyama yapıldığı zaman jeller önce metanol asetik asit çözeltisinde 1 saat sabitlendi, daha sonra gece boyu boya içerisinde bırakıldı. Distile su ile boya uzaklaştırıldıktan sonra görüntüleme aşamasına geçildi.



A

B

Şekil 24. A:Protein emdirilmiş poliakrilamit jelin Coomassie mavisi ile boyanması, B:SDS-PAGE jelin boya uzaklaştırılması sonrası görüntüsü

3.5 Görüntüleme ve Analiz

Jellerin görüntülenmesi işlemi VersaDoc görüntüleme cihazı (Şekil 25) ile yapıldı. Görüntüleme işlemi için Quantity One yazılımı kullanıldı. Görüntüler yüksek çözünürlüklü CCD kamera ile alındı ve Tiff dosyası olarak saklandı. Görüntülerin analizi PDQuest advanced yazılımı ile gerçekleştirildi. Analiz sonrası tespit edilen farklı spotlardan 9'u spot kesici (ExQuest) (Resim 26) ile kesildi ve m/z belirleyebilmek için MALDI-TOF analizi için gönderildi.



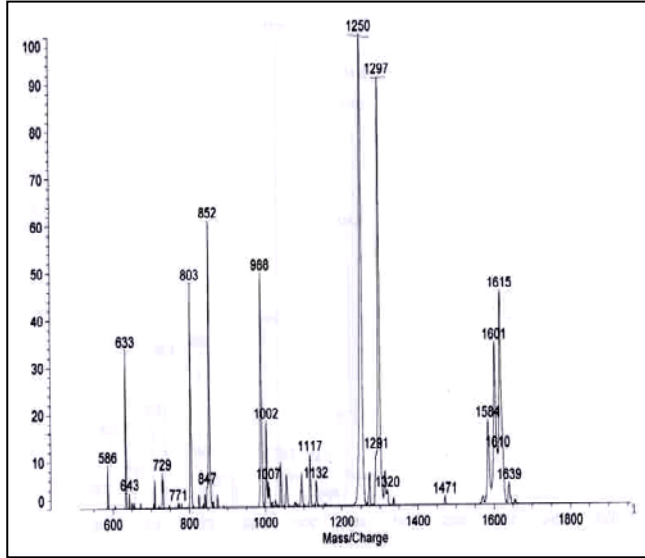
Şekil 25. VersaDoc Görüntüleme Cihazı



Şekil 26. EXQuest Spot Kesme Cihazı

3.6. MALDI-TOF Kütle Spektrometrisi Analizi

Kütle spektrometre (MS) aletleri iyonlaştırılmış maddeleri gaz fazında analiz ederler. Bu nedenle bir kütle spektrometresi iyon kaynağı, kütle/yük oranını belirleyebilen bir kütle analiz cihazı ve bir detektörden oluşur. Proteinlerin ve biyolojik moleküllerin gaz fazına taşınılabilmesi elektron-spray iyonizasyon (ESI) veya matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) teknikleri ile yapılır. MALDI tekniğinde analizi yapılacak maddeler katı bir kristal matrix ortamından lazerle iyonize edilir. Matriksin olmadığı ortamda biyomolekül parçalanacağı için matriksin kullanılması şarttır. İyonlaştırılmış biyomoleküller elektrik alan içerisinde hızlandırılarak bir tüp içerisine aktarılır. İyonların bu tüp içerisindeki hızları her bir iyonun kütle ve yükü ile doğru orantılıdır. Böylece her bir iyonun tüpten çıkış anı sahip olduğu kütle/yük sinyal oranına bağlı olarak değişir (Şekil 27).



Şekil 27. *Azotobacter vinelandii* nitrojenaz enziminin MALDI-TOF ile yapılmış analizi (Şekil Kasap, M. 2002'den alınmıştır).

MALDI-TOF metodu kullanılarak proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin karakterizasyonu ve tanımı mümkündür. Bu metod oldukça duyarlı olup moleküler ağırlıkları 400 ile 350,000 Da arasındaki polipeptidlerin 10^{-15} - 10^{-18} mol seviyesinde tanımlanmasını sağlar.

3.7 Elde edilen kütle/yük değerlerinin analizi

MALDI-TOF analizinden elde edilen kütle/yük değerleri Swiss-Prot data bankasında Prospector adı verilen ve ücretsiz ulaşılabilen bir programda araştırılabilir (<http://prospector.ucsf.edu/>). Bu programın amacı araştırılan proteinin kütle/yük değerlerini bugüne kadar bilinen tüm kütle/yük değerleri ile karşılaştırmak, veri tabanındaki değerlerle eşleşip eşleşmediğini araştırmak ve hangi proteine ait olduğunu tespit etmeye çalışmaktır. Protein prospector içerisinde birkaç farklı programı kullanmak mümkündür (Tablo 14).

Tablo 14. MALDI-TOF data analizi için protein prospector içerisinde kullanıma sunulan bazı programlar

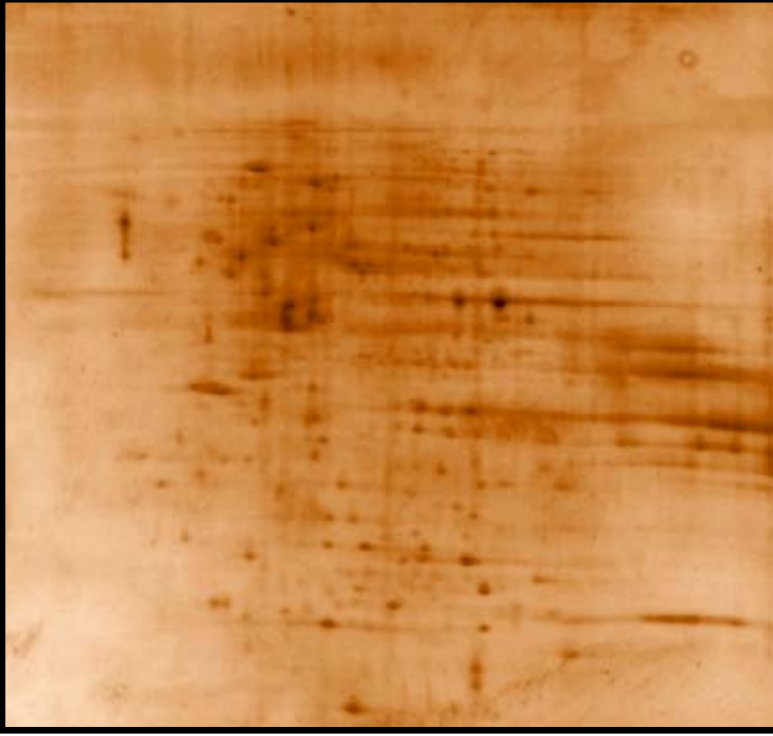
MS-Fit	peptid kütle bilgilerini kullanarak araştırma
MS-Tag	parça iyon eklerini kullanarak araştırma
MS-Seq	dizi eklerini kullanarak araştırma
MS-Homology	benzerlik kullanarak araştırma
MS-NonSpecific	spesifik olmayan kesimleri araştırma
MS-Fit Batch	kütle verilerini araştırma

(Kaynak: Swiss-Prot data bankası, <http://prospector.ucsf.edu/>)

Bu bağlamda kullanabileceğimiz ikinci bir program da Peptident adı altında sunulan ve Expasy veri bankası tarafından ücretsiz olarak kullanıma açılan veri (<http://ca.expasy.org/tools/peptident.html>). Oldukça kolay kullanılabilen bir kullanıcı-ortamına (*interface*) sahip olan bu program elde edilen kütle/yük değerlerini direk olarak veri bankası içerisinde araştırır.

4. BULGULAR

İlk deneylerimizi yeni kurulan proteomiks sisteminin çalışabilirliğini test etmek amacıyla gerçekleştirdik. Bu deneylerdeki amaç düzgün hazırlanmış ve uygun şekilde yürütülmüş bir protein örneğinin iki boyutlu jel üzerinde vereceği spotların miktar ve sayısının literatürle uyumluluğunu göstermektir. Bu amaçla kültüre edilmiş standart HeLa hücrelerinden protein ekstraktları hazırlanıp iki boyutlu jel elektroforezine tabi tutuldu (Şekil 28). Yapılan analizde pH 3-10 aralığında 17 cm'lik bir jelde 198 adet ayrılmış farklı spot görüntülendi. Analizde kullanılan programın duyarlılığı artırıldığında tespit edilen spot sayısı 480'e ulaştı. Bu durum kullandığımız tekniğin ve analiz programının doğru, duyarlı ve güvenilir olduğunu göstermekteydi.



Şekil 28. HeLa hücrelerinde pH 5-8 aralığında 2D protein profilinin incelenmesi

4.1 Hasta Özellikleri ve Laboratuvar Verileri

Hastaların klinik, laboratuvar bulguları ve tedavileri tablolarda özetlenmiştir.

Tablo 15 A. H Olarak Gruplandırılan Hastaların Klinik Bilgileri

		Yaş	Cinsiyet	KBY Nedeni	Hemodializ Süresi (yıl)
H1	S.C.	29	E	PKB	4
H2	F.Z.	20	K	VUR	4
H3	N.O.	44	E	Nefrolithiasis	8
H4	S.K.	19	K	?	3
H5	F.Ö.	49	K	GN	9
H6	B.S.	42	E	PKB	10
H7	A.D.	54	K	HN	3
H8	K.U.	50	K	HN	8
H9	S.Ü.	53	K	GN	15
H10	M.Y	52	E	HN	11

Tablo 15 B. H Olarak Gruplandırılan Hastaların Laboratuvar Bilgileri

	PTH Düzeyi (pg/ml)	Ca (mg/dl)	PO ₄ (mg/dl)	ALP IU/L	Tedavi
H1	1098	8,9	6,0	544	2, 1
H2	1507	8,6	3,7	163	2, 4
H3	1569	10,8	3,5		2, 1, 4
H4	1088	11,7	3,9		1, 4
H5	1942	9,2	3,9	1053	1
H6	3601*	9,7	4,7	630	2, 1, 3, 5, 6
H7	1167	10,4	2,6	183	2, 3
H8	1699	9,1	3,3	216	2, 3
H9	1323	9,3	4,2	278	2, 3
H10	1162	9,4	3,0	132	3

(* H 6 olarak kodlanan hastanın paratiroidektomi sonrası PTH değeri 71,8 pg/ml olarak ölçülmüştür. Hastaların ortalama değerleri: Diyaliz süresi: 7,5±3,7 yıl; PTH Düzeyi: 1615,6±714,7 pg/ml; Ca: 9,7±0,9 mg/dl; Fosfor: 3,9±0,9mg/dl; ALP: 400±300 IU/L)

Şekil 15 C. C Olarak Gruplandırılan Hastaların Klinik Bilgileri

		Yaş	Cinsiyet	KBY Nedeni	Hemodializ Süresi (yıl)
C1	E.Y.	78	K	DN	9
C2	S.E.	72	E	HN	2
C3	F.D.	37	K	?	?
C4	N.E.	49	K	DN	4
C5	K.E.	50	E	HN	4
C6	A.U.	76	K	DN	4
C7	Z.Ö.	55	K	DN	2
C8	S.Z.	58	K	HN	1
C9	H.H.H.	41	E	DN	3
C10	N.K.	60	E	HN	3

Şekil 15 D. C Olarak Gruplandırılan Hastaların Laboratuvar Bilgileri

	PTH Düzeyi (pg/ml)	Ca (mg/dl)	PO ₄ (mg/dl)	ALP IU/L	Tedavi
C1	48,85	10,5	2,4	101	1
C2	76,6	8,9	6,1	95	1
C3	22,9	5,6	3,9	67	-
C4	96,9	8,1	5,1	61	1
C5	33,7	9,4	6,1	42	1, 2
C6	59	8,4	1,7	60	-
C7	86	9,4	5,9	56	-
C8	47,9	8,9	3,4	55	1
C9	73,1	8,7	4,8	109	1
C10	16,85	9,7	4,5	63	1

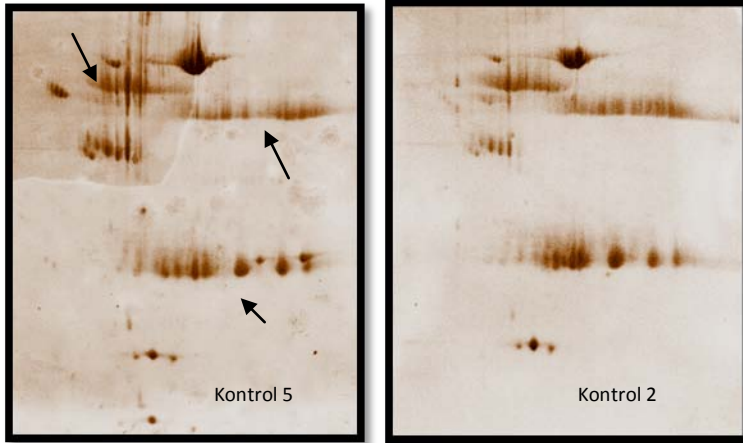
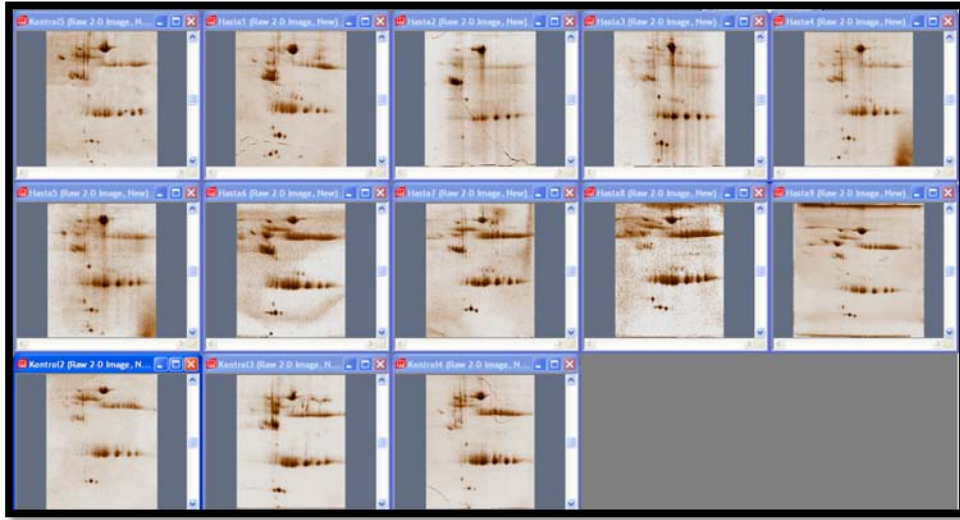
(Hastaların ortalama değerleri: Diyaliz süresi:3,5±2,1yıl; PTH Düzey: 56,18±25,6 pg/ml; Ca: 8,76±1,2 mg/dl; Fosfor: 4,4±1,45 mg/dl; ALP: 71±21,3 IU/L)

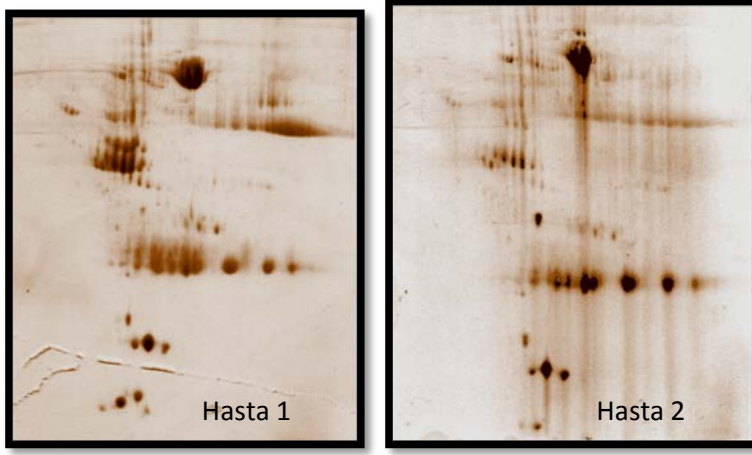
E: Erkek, K: Kadın, DN: Diabetik Nefropati, HN: Hipertansif Nefropati, PKB: Polikistik Böbrek Hastalığı, VUR: Vezikoüreteral Reflü, GN: Glomerulonefrit,

1: Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar (Kalsiyum Asetat, Kalsiyum Diasetat, Kalsiyum Karbonat), 2: Kalsiyum içermeyen fosfat bağlayıcılar (Sevelamer), 3:D vitamini (Kalsitriol, Kolekalsiferol), 4:D Vitamini analogu (Parikalsitol), 5: Kalsimimetik (Sinakalset), 6: Paratiroidektomi

4.2 Serumun Proteomiks Analizi

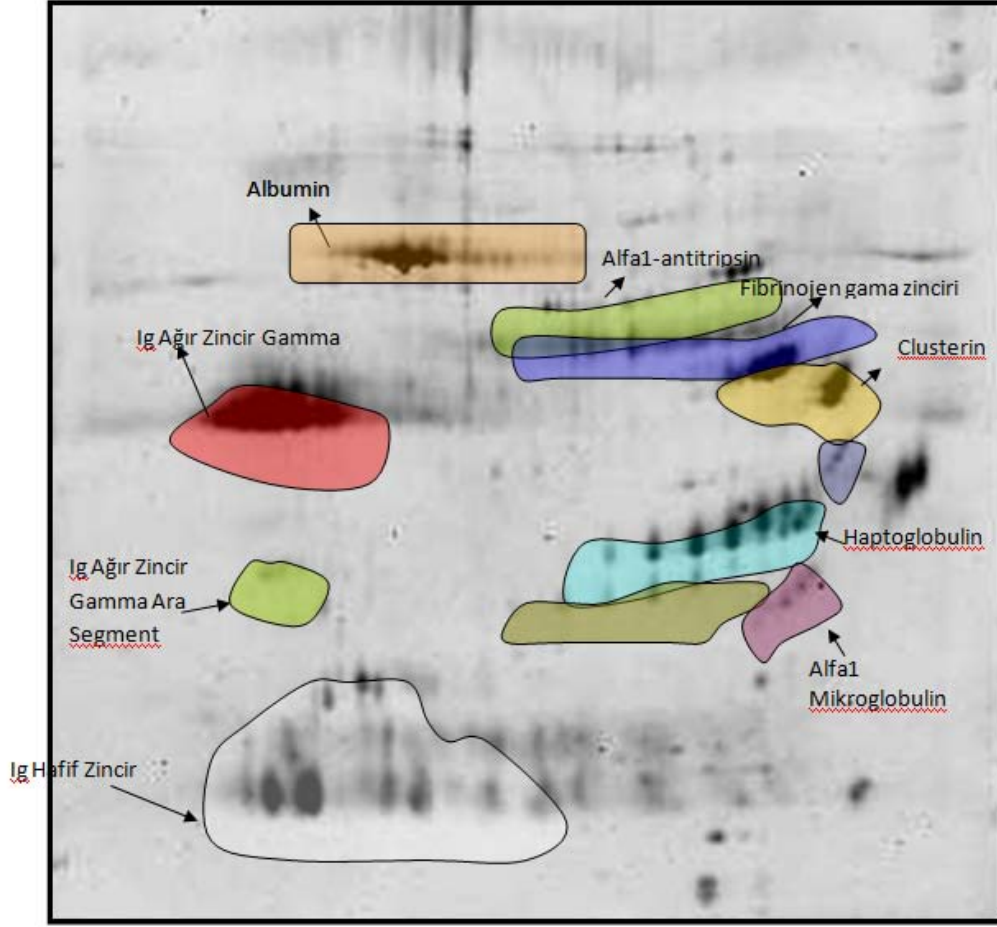
Tuzlardan arındırma, serumda miktarı fazla olan proteinlerin indirgenmsi işleminden sonra hazırlanıp 2D PAGE yürütüldükten sonra elde edilen protein spotların analizi yapıldı. Şekil 29'da tuzları uzaklaştırılmış ve miktarı fazla olan proteinlerin indirgemesi yapılmış örnek jeller gösterilmiştir.





Şekil 29. Tuzlarından arındırılmış ve albumin indirgenmesi yapılmış serum örneklerine ait 2D PAGE profilleri.

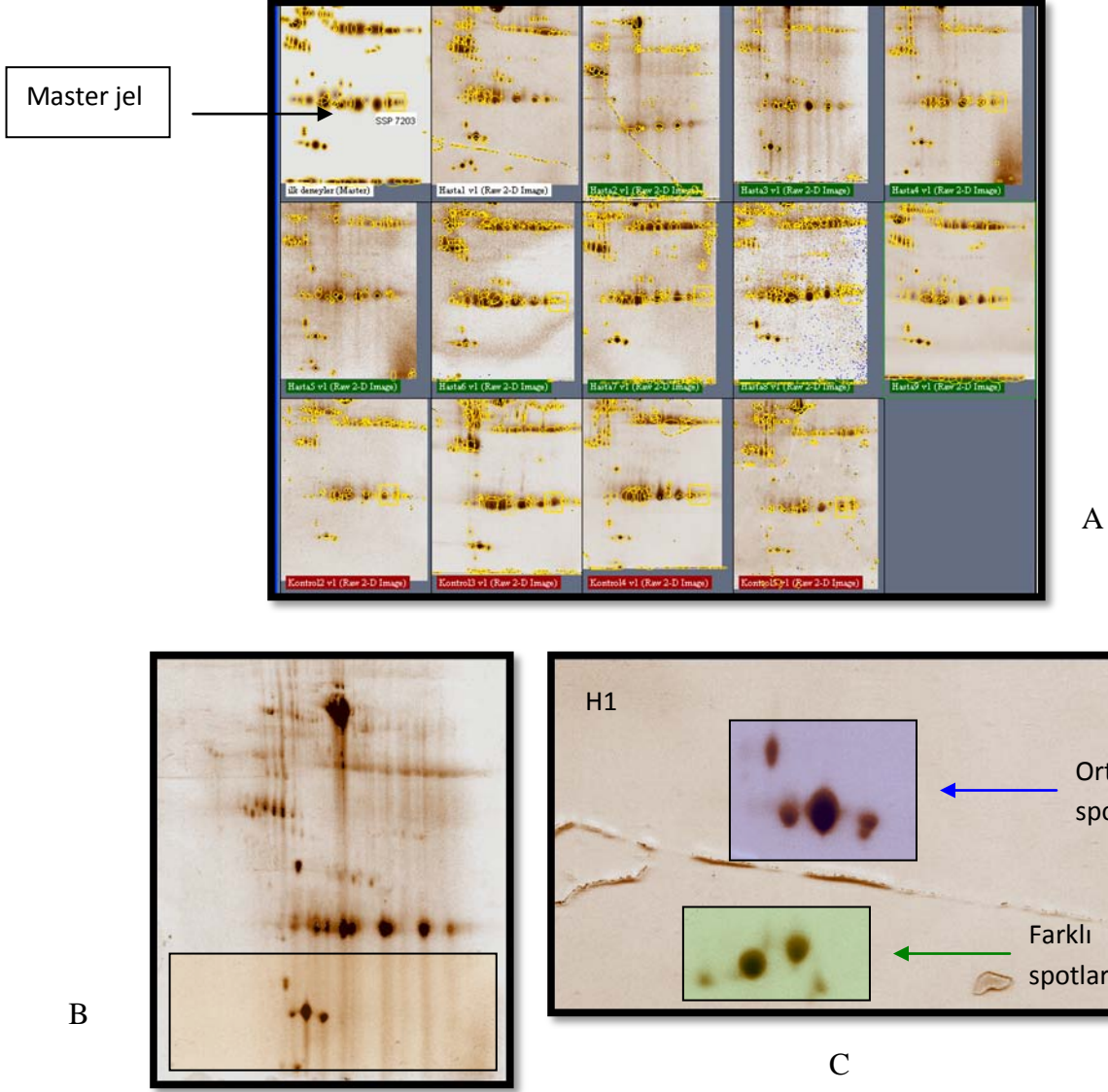
Literatürde insan serumu ile yapılan çalışmalar serumda bulunan ve sıkça karşılaşılan proteinleri belirlemiştir. Belirlenen bu proteinler içerisinde çok fazla miktarda bulunanlar indirgenme yapıldıktan sonra bile belirgin bir şekilde 2D jel üzerinde görülebilmektedir. Bu spotların isimlendirilmesi Swiss-Prot 2D data bankasından faydalanılarak yapılabilir (Şekil 30). Benzer şekilde bir hastamızın serumuyla 17 cm'lik IPG striple yürüterek hazırladığımız jelin analizi şekilde verilmiştir ve belirlenen spotlar jellerimizin tamamında görülmektedir.



Şekil 30. Serumda miktarı fazla olan proteinlerin 2D jel üzerinde Swiss-Prot veri bankasından faydalanılarak isimlendirilmesi.

20 hastanın (C ve H grubu) serumu ile 17 cm'lik IPG stiplerle yapılan jellerle oluşturulan master (ortak) jelde C ve H grubu arasında 51 farklı spot belirlendi. Ancak jellerin tek tek incelemesi sonucunda elde edilen veriler bize protein indirgemesinin yeterince verimli olmadığını gösterdi. Jellerde özellikle karşımıza çıkan problemlerden biri çoklu spot olarak karşılaştığımız alanların aslında tek bir proteine ait olmasıydı. Bu spotlar serumda miktarı fazla olan proteinlerin jelde yayılmış halleridir. Örneğin immünglobulin hafif ve ağır zincir gibi (Şekil 29, ok işaretli bölgeler).

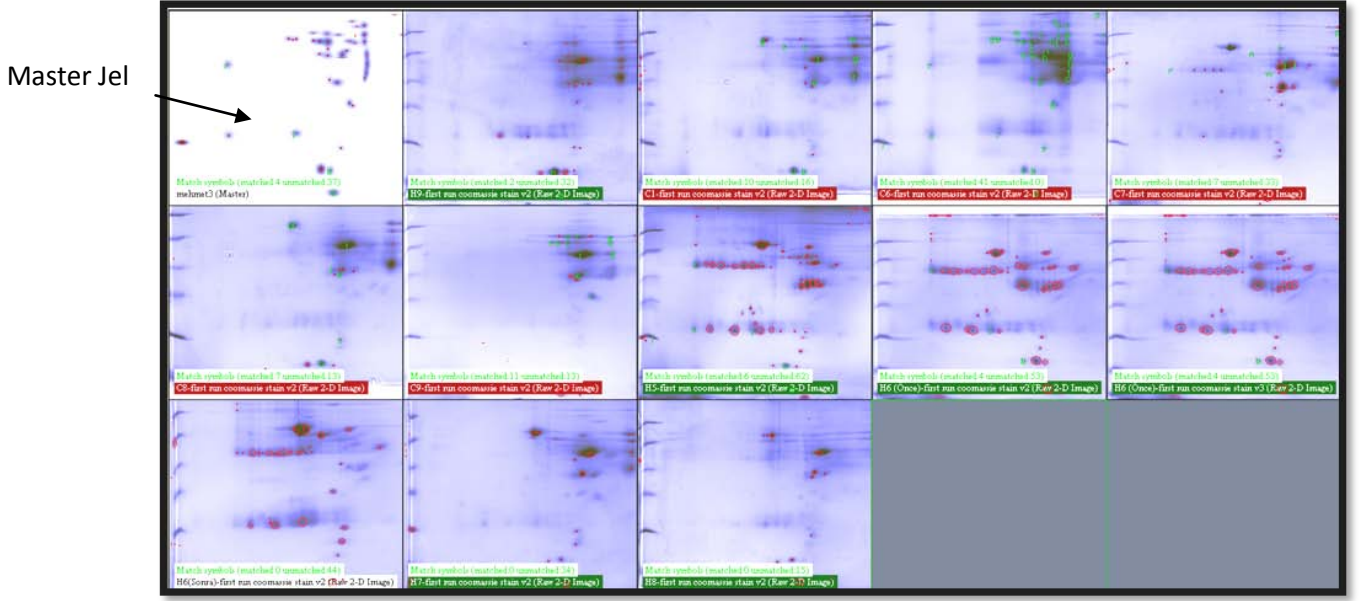
Jellerin spot miktarı az bölgelerini ayrıca analiz etmek mümkün olduğundan bu bölgelerin değerlendirilmesine geçildi. (Şekil 31. A. B. C).



Şekil 31 A. B. C Çoklu spot analizi ve C örneğine ve H1' ait alt bölge spot analizi.

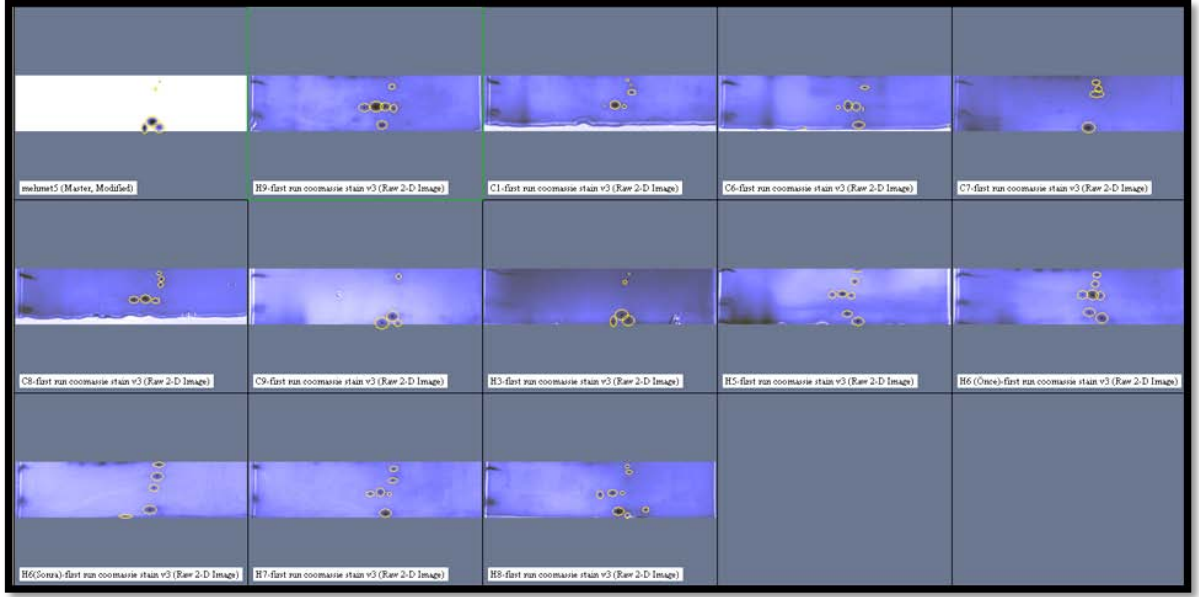
Analiz sonucu oluşturulan master jelde 4 adet spot ortak olarak tespit edildi. Örnekler tek tek incelendiğinde H1'de diğer hastalarda bulunmayan 3 spota rastlandı (Şekil 31 C). Ancak bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Bu nedenle daha tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için Blue G maddesi yerine optimizasyonu yapıldığı idda edilen ticari albumin indirgeme kiti (Bio-RAD, USA) kullanıldı. 7 cm'lik IPG striplerle yürütülen jeller Coomassie mavisii ile boyandıktan sonra analiz edildi. Analiz sonucu oluşturulan master jelde 41 adet belirgin protein spotu saptandı (Şekil 32).

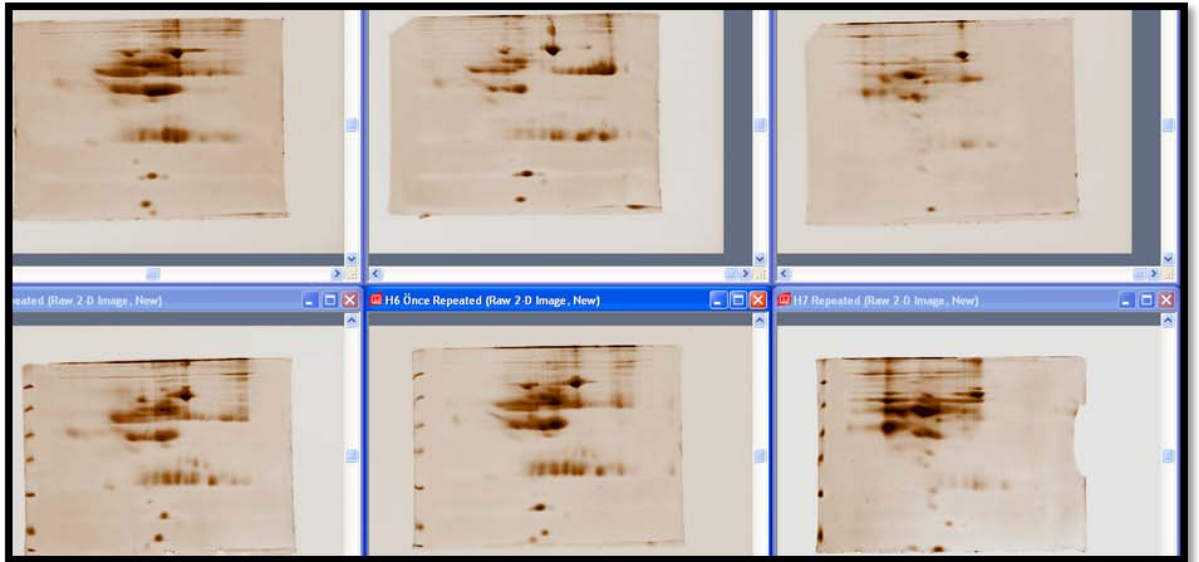


Şekil 32. Coomassie Mavisi ile Çoklu Spot Analizi

Ancak protein indirgeme kiti kullanılmış olmasına rağmen jeller arası varyasyonun oldukça fazla olması istatistiksel analizi imkânsız hale getirdiği görüldü. Bazı jellerde immünglobulin ağır zincir tamamen uzaklaştırılmış olmasına rağmen diğerlerinde indirgenememişti. Heterojenik spot dağılımından dolayı jellerin spot sayısı az olan kısımları ayrıca analiz edildi. Analiz sonucu H olarak gruplandırılan hastaların spot sayısı ve spot profilleri büyük oranda benzerlik gösterirken C olarak gruplandırılan hastaların spot sayısı ve profilleri kendi içinde benzerlik göstermekteydi. Örneğin H5 ile H6, H9 spot profilleri birbirine benzerken C1, C7, C8, C9 spot profilleri birbirine benzemekteydi. Genelleme yapmak gerekirse H olarak gruplandırılan hastalarda daha fazla farklı protein spotu gözlemlendi. (Ortalama H grubunda 7 spot, C grubunda 4 spot) (Şekil 33).

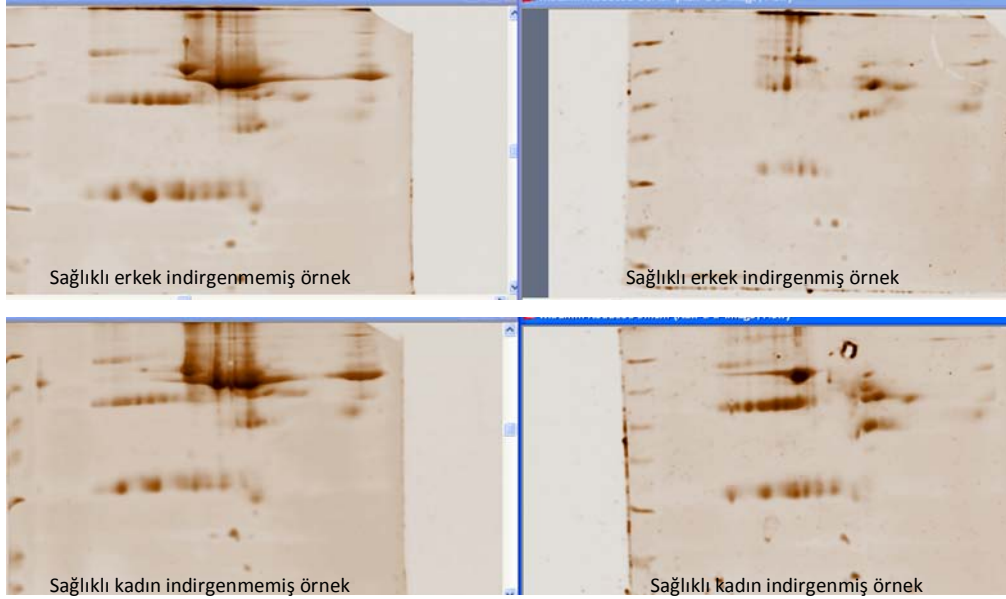


Şekil 33. Coomassie Mavisi ile Boyanan Jellerin Spot Sayısı Az Bölgelerinin Analizi
 Coomassie mavisi ile boyanan jellerin analiziden yola çıkılarak seçilen 6 örnek (C3, C8, C10, H5, H6, H7) tekrar iki boyutlu jel elektroforezine tabi tutulup daha duyarlı olan Sypro Rubby boyası ile boyandı. Buradaki amaç Coomassie mavisi ile tespit edemediğimiz spotları görebilmektir. Örneklere protein indirgeme kiti uygulanmasına rağmen diğer örneklerde olduğu gibi homojen albumin indirgemesi yapılamadığı görüldü (Şekil 34). Yapılan analizde bu boyanın ek avantaj sağlamadığı, derinlik ve miktar açısından benzer spot profili verdiği görüldü.



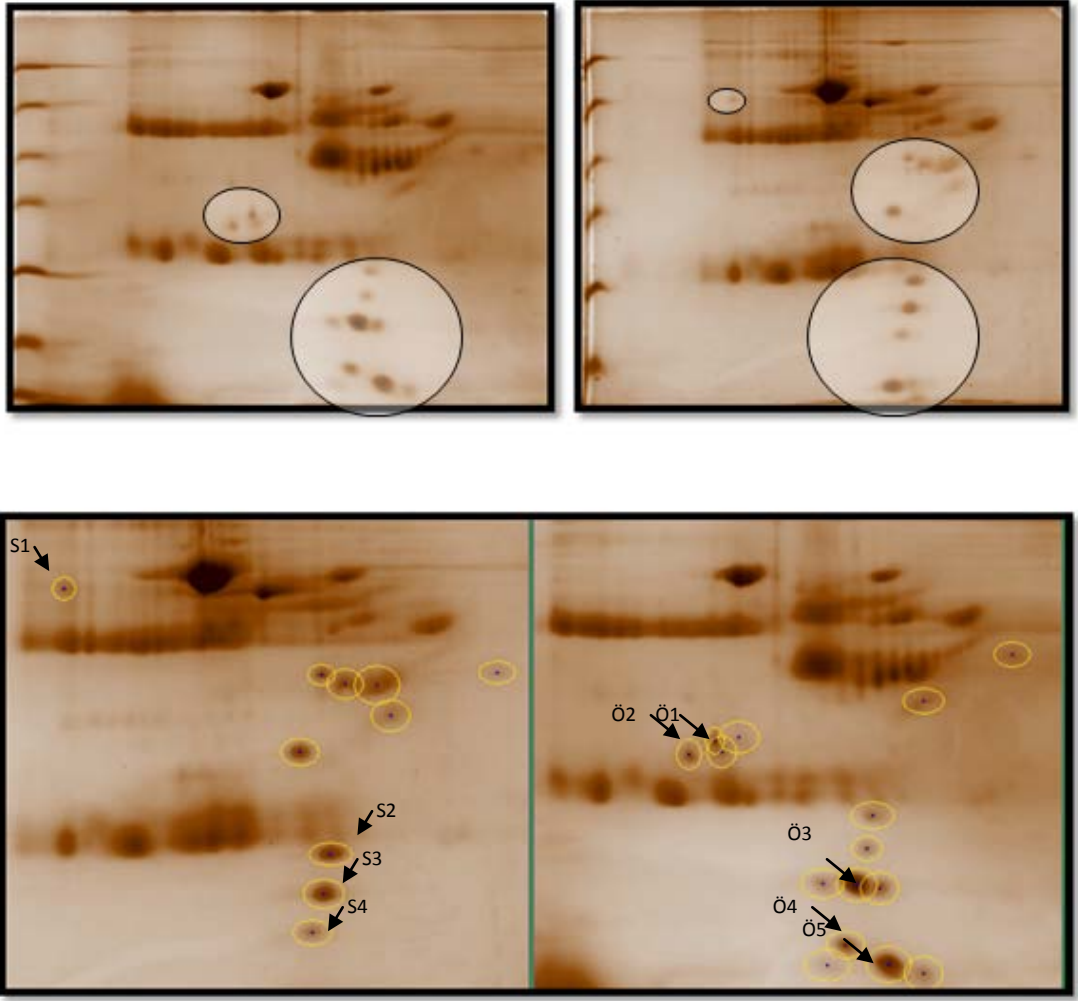
Şekil 34. SYPRO Ruby ile boyanmış jel örnekleri.

Bir sonraki adımda albumin indirgemesi yapmak yerine serum örnekleri doğrudan iki boyutlu jel elektroforezine tabi tutuldu. Bu örneklere daha sağlıklı karşılaştırma yapabilmek için 1 erkek ve 1 kadın sağlıklı bireylerden alınan serum örnekleri de analize dahil edildi. Sağlıklı bireylerden alınan örneklere ayrıca ticari kit kullanılarak albumin indirgemesi de yapıldı. Albumin indirgemesi yapılmış örneklerle indirgenmemiş örnekler karşılaştırıldığında aslında protein indirgemesinin protein profilinin çözünürlüğüne fazla katkısı olmadığı görüldü (Şekil 35).



Şekil 35. Sağlıklı bireylerde indirgenme öncesi ve sonrası protein profili.

Bu yaklaşım hasta bireylerden albumin indirgemesi yapmadan serum örneklerinin iki boyutlu jelde yürütülmesi fikrini verdi. H3, H6, C6, C9 serumları albumin indirgemesi yapılmadan iki boyutlu jel elektroforezinde yürütüldü. Bunlar içinde en ilginç spot profili H6 örneğinden elde edildi. H6 serum PTH düzeyi en yüksek olan hastaydı. Çalışmanın başlangıcında sekonder hiperparatiroidizme bağlı paratiroid adenomu nedeniyle operasyon planlanan hastaya çalışma devam ederken paratiroidektomi yapıldı. Ameliyat sonrası serum PTH düzeyi < 100 pg/ml olarak ölçüldü. Bu hastadan diyaliz öncesi alınan serumunun iki boyutlu jel protein profili ameliyat öncesi ile karşılaştırıldığında 5 farklı bölgede 25 farklı spot belirlendi (Şekil 36). Bu spotları isimlendirebilmek için spotlar spot kesici (ExQuest) ile kesildi ve m/z belirleyebilmek için MALDI-TOF analizine gönderildi.



Şekil 36. H6 örneğine ait ameliyat öncesi ve sonrasına ait serum protein profilleri ve bazı farklı protein spotlarının belirlenmesi.

Tablo. 16 Farklı spotların MALDI-TOF-TOF analizi

- Ö1** İsimlendirilmemiş protein (Homo sapiens)
- Ö2** İmmunoglobulin G1'in Fc parçasının Fukozillenmiş kristal yapısı, zincir A
- Ö3** Haptoglobin, izoform CRA_b [Homo sapiens]
- Ö4** Transthyretin Varyant V20s'nin kristal yapısı, zincir A
- Ö5** Haptoglobin, izoform CRA_b [Homo sapiens]
- S1** Albuminle kompleks yapmış Miristik Asid ve Lizofosfatidil'in kristal yapısı zincir A
- S2** Lipid içermeyen Apolipoprotein A-I'in kristal yapısı, zincir A
- S3** Transthyretin-Retinol Bağlayıcı Protein-Fab Kompleksinin kristal yapısı, zincir E
- S4** Haptoglobulin2-alfa [Homo sapiens]

Tablo 16’da H6 örneğinin paratiroidektomi öncesi ve sonrası serumlarından elde edilen jellerde tespit edilen farklı spotların MALDI-TOF-TOF analizi ile belirlenen proteinler gösterilmektedir. Bu spotlar içinde ikisi oldukça ilgi çekiciydi. Bunlardan ilki Ö1 olarak isimlendirdiğimiz molekül ağırlığı 57476 Da, pI değeri 6,12 olan proteindi (İsimlendirilmemiş protein). Bu proteine ait MALDI- TOF-TOF analizi sonrası tespit edilen peptit dizileri tablo 17’de verilmiştir. Analiz sonucu bu spotun %100 güvenirlilikle bir proteine ait olduğu belirlenmiştir. Bu protein veri tabanında AK293191 nolu gen bankası numarası ile karşımıza çıkmakta ve kompleman C4b proteinine oldukça benzerlik göstermektedir. Bu proteinin hastalıkla ilişkisinin ne olabileceği hakkında yorum yapmak hem çok erken hem de güçtür. İkinci dikkat çekici protein ise H6 örneğinin paratiroidektomi sonrası jelinde görülen, S2 olarak adlandırdığımız lipid içermeyen Apolipoprotein A-I’dir. Diğer tüm spotların serumda fazla miktarda bulunan proteinlere ait olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 17. İsimlendirilmemiş proteine ait Mascot Tarama Motoru sonuçları

Ölçülen Kütle	Dizi Başlangıcı	Dizi Sonu	Diziler	
969,5039	969,4791	390	397	VEYGFQVK
976,4345	976,4162	383	389	FACYYPR
976,4345	976,4162	383	389	FACYYPR
1052,4644	1052,4469	372	380	GLQDEDGYR
1086,6306	1086,6006	414	422	ITQVLHFTK
1233,6198	1233,6022	233	241	VHYTVCIWR
1233,6198	1233,6022	233	241	VHYTVCIWR
1909,8816	1909,8352	345	361	LLATLCSAEVCQCAEGK
2128,1582	2128,1228	245	265	VGLSGMAIADVTLTLLSGFHALR
2144,1531	2144,1128	245	265	VGLSGMAIADVTLTLLSGFHALR
2680,3042	2680,2488	278	300	YVSHFETEGPHVLLYFDS VPTSR
2680,3042	2680,2488	278	300	YVSHFETEGPHVLLYFDS VPTSR
3500,6677	3500,5706	301	331	ECVGFEAVQEVVGLVQ

5. TARTIŞMA

KBH-KMB, kemik ve mineral metabolizmasındaki bozukluklara baęlı olarak kemiklerde, damarlarda ve yumuřak dokularda meydana gelen patolojileri ve anormal laboratuvar parametrelerini kapsayan bir kavramdır (243). Kreatinin klirensi (< 60 ml/dk) dūřuk olan ve diyalize giren hastaların çoęunluęunda hem bōbrek hastalıęına hem de uygulanan tedavilere baęlı olarak ūremik kemik hastalıęı (ROD) gelişmektedir. Bōbrek yetersizlięinin ilerlemesiyle meydana gelen hiperfosfatemide, hiperparatiroidizm, hipokalsemi ve D vitamini yetersizlięi KBH-KMB gelişiminde anahtar rolü oynamaktadır Bōbrek yetersizlięiyle yařanan sūre uzadıkça KBH-KMB řiddeti artmakta ve yol aętıęı sonuęlar bōbrek yetersizlięi olan hastalarda hastalıklılık hali ve artmıř ūlūm oranının en ūnemli nedeni haline gelmektedir (123). Ayrıca hiperfosfatemide baęlı geliřtięi dūřūnūlen kařıntı, yaygın eklem aęrıları, kas gūcsūzlūęū, kemik aęrıları ve kemik kırıkları gōz ūnūne alındıęında tedaviye dikkatle yaklařılması ve titizlikle uygulanması gereklilięi ortaya çıkmaktadır.

Bu bilgiler ışıęında ęalıřmamızda, nedenine bakılmaksızın bōbrek yetersizlięi nedeniyle diyalize giren hastalar serum PTH dūzeyine gōre (PTH <100 pg/ml, >1000 pg/ml) dinamik ve yūksek dōngūlū kemik hastalıęı olarak gruplandırılıp, gūncel bir yōntem olan proteomiks yaklařımı ile serum protein profili arařtırılması amaęlandı. Buradaki amaę serumda hem kemik dōngūsūnū kontrol etme potansiyeli olan, bilinen veya bilinmeyen proteinleri hem de kemik dōngūsū sırasında kemiklerden ortaya ęıkan ve bu dōngūyū temsil edebilecek proteinleri tespit etmeye ęalıřmaktı.

Proteomiks yaklařık on yıl ūnce geliřtirilen bir teknoloji olup gūnūmūzde post-traslasyonel dūzeyde protein ekspresyonu analizi ięin sık kullanılan ūnemli bir yōntemdir. Proteom, genom ve ęevresel faktōrlerin etkisiyle sūrekli deęiřim halindedir. Proteinlerin ęeřitlilięindeki artıř mRNA dūzeyindeki deęiřikliklere, post-traslasyonel modifikasyonlara baęlı olarak meydana gelmektedir. Bu nedenle protein farklılıkları sadece gen ekspresyon dūzeyi arařtırmalarıyla būtūnūyle ortaya ęıkarılamaz. Proteomiks teknolojisi protein farklılıklarını tespit ederek protein kaynaklı bio-belirteęlerin keřfini saęlamakta kullanılan ūnemli bir yōntemdir.

Proteomiks çalışmalarında kolay elde edilmesi açısından sıkça kullanılan bir örnek olan serum, sıra dışı bir proteom kaynağıdır. İnsan çalışmalarından elde edilen proteomlar içinde serum diğer dokuların proteomlarını da içerdiğinden oldukça kompleks bir örnektir. Bu nedenle, çok fazla albumin (%55) içermesi, bilinen diğer proteinlerin oldukça geniş dinamik aralıkta bulunmaları ve bu proteinlerin glikoprotein şekillerinin heterojenitesi nedeniyle serum çalışılması çok zor bir örnektir. (244). Serumun protein içeriğinin yaklaşık %99'unu 22 protein oluşturmaktadır. Bu nedenle proteomiks yaklaşımı ile araştırılan belirteç potansiyeli olan protein (sitokinler ve dokulardan sızan proteinler gibi) konsantrasyonlarının pikomol düzeyinin de altında olması serumla yapılan çalışmaları güçleştiren diğer bir nedendir. Etkin bir proteomiks çalışması yapabilmek ve çalışmaların devamını sağlayabilmek için yapılacak ilk işlerden biri serumda miktarı çok fazla olan proteinleri özellikle albumini uzaklaştırmak veya indirgemektir. Bu amaçla iki temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar reçine (Cibacron mavisi, Blue Dye) ve antikor tabanlı (multiple affinity removal system (MARS), IgY-microbeads kit) protein indirgeme sistemleridir. Biz çalışmamızda reçine kökenli Blue Dye protein indirgeme sistemini kullandık. Bu sistemlerden MARS yüksek protein bağlama kapasitesi ve 6 miktarı fazla olan proteini (albumin, transferin, IgG, IgA, haptoglobulin, antitripsin) özgün ve tekrarlanabilir biçimde uzaklaştırmasıyla daha yararlı gibi görünmektedir (245).

Bizim örneklerimizin analizini güçleştiren en önemli sorunlardan biri miktarı fazla olan proteinlerin etkin ve homojen olarak uzaklaştırılmamasıydı. Analiz sırasında özellikle albumin ve immüoglobulinlerin ağır ve hafif zincirlerini temsil eden bölgelerde jellerin bazılarında yoğun yayılma görülürken bazılarında ise indirgeme başarılı olarak tespit edildi. Bu durum Blue G reçinesinin etkin bir yöntem olmadığı fikrini doğurdu. Araştırmanın bir sonraki aşamasında serumun protein indirgeme kitiyle elde edilen sonuçlar Blue G maddesi ile benzerdi. Bu bulgular literatürde sıkça bahsedilen serumun proteomiks analizinde miktarı fazla olan proteinlerin uzaklaştırılmasının sorun yaratabileceği vurgusu ile uyumluydu. Ayrıca miktarı fazla olan proteinlerin uzaklaştırılması sırasında 'albuminin sünger etkisi' ile diğer miktarı az olan proteinlerin de birlikte uzaklaştırılma riski de göz önünde bulundurulmalıdır.

KBH-KMB'larında kemikte kemik döngüsünü dengeli ve sürekli bir şekilde sürdüren osteoblast ve osteoklastların hem sistemik hem de yerel düzenlenmesi bozulmuştur. Hiperparatiroidizmde osteoblastlarda RANKL ekspresyonu artarken OPG ekspresyonu azalır. Böylece osteoklastların aktivitesi ve ömrü artarak kemik yıkımında artış ortaya çıkar. Kemik yıkımının artması ile kollajen matriksten ortaya çıkmış olan aktive olmuş osteoklast kaynaklı proteinlerin dolaşıma karışması; yüksek döngülü kemik hastalıklarının tespitinde veya tedavisinde hedef olabilecek moleküllerin proteomiks yaklaşımla tespit edilmesini sağlayabilir. Tam tersi şekilde kemik döngüsünün neredeyse durduğu, aktif osteoklast ve osteoblastların sayısının çok az olduğu dinamik kemik hastalığında ise tespit edilebilecek proteinlerin kemik kaynaklı olması pek beklenmemelidir. AKH'da serumda tespit edilmesi olası proteinler, kemik anabolizmasını baskılayıcı moleküller olabilir.

Günümüzde KBH-KMB'larının patogenezinde rol alan osteoblast ve osteoklast fonksiyonlarında ve bu hücrelerin olgun haline farklılaşması sürecindeki bozukluklar proteomiks çalışmalarının ilgi alanı haline gelmiştir. Osteoblastlar multipotent mezenkimal kök hücrelerin osteoblastik seriye farklılaşması sonucu oluşmaktadır. Mezenkimal kök hücrenin farklılaşması sırasında 2 D elektroforez veya 2 D LC ve MALDI analizi ile birçok klondan protein profili elde edilmiştir. Özellikle farklılaşması az olan (ekspansiyon hızı yüksek) mezenkimal kök hücrelerde kalmodulin, T-kompleks protein 1- α subünite ve tropomiyozin ekspresyonu artarken ekspansiyon hızı düşük olan hücrelerde kaldesmon ve mineralokortikoid reseptör ekspresyonu azalmış olarak bulunmuştur (246). Kalmodulinin ekspresyonunun kemik döngüsüne etkisi bilinmektedir, sözü edilen çalışmanın bulguları da bu bilgi ile örtüşmektedir (247).

Osteoklastlardan salınan ve membran proteinleri ile yapılan proteomiks çalışmalarında osteoklast belirteci olarak adlandırılacak proteinler tanımlanmıştır. Bunlar vakuoler H-ATPazlar ve katepsin K, gelsolin ve arp2/3 gibi daha önce bilinmeyen proteinlerdir. Bu proteinler osteoklast olgunlaşmasında önemli role sahiptir ve RANKL aktivasyonuna yanıt verirler (248). Yüksek döngülü kemik hastalığının patogenezinde RANKL/RANK/OPG aksının rolü göz önüne alınacak olursa sekonder hiperparatiroidili hastaların serum yukarıda sözü edilen proteomiks analizinde tanımlanan proteinlerin etkili olması beklenebilir.

İnsan PTH(1-34)'u kullanılarak PTH'un oluşturduğu fizyolojik yanıtı ve serum protein profilini değerlendirmek için düzenlenen hayvan çalışmasında PTH, 3 veya 11 gün, günde bir kez uygulanmış ve kontrole karşılaştırılmıştır (242). SAX2 (Strong anion Exchange) sonrası SELDI-TOF MS analizinde m/z 14821 ve 15532 değerlerinde serum protein tepe yoğunluğunun arttığı tespit edilmiştir. PTH (1-34) uygulaması 11. güne kadar uzatıldığında m/z 14821 ve 15532 tepe yoğunluğunun daha da arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre PTH tarafından düzenlenen proteinlerin oldukça durağan ve zamanla birikim gösterdiği düşünülmüştür. Çünkü uzun süreli PTH uygulaması sonrası belirteç proteinin miktarı artmaktadır, bu çalışmada, bu bulgunun belirteç protein mi yoksa hemoglobinin alfa ve beta zinciri (ortalama 14,8 ve 15,4 kDa) mi olduğu da tartışma konusu yapılmıştır. PTH'un eritrositlere kalsiyum girişini sağlayarak osmotik frajiliteyi artırarak hücrenin ömrünü kısalttığı bilinmektedir (242).

Bir başka proteomiks çalışmasında farelere 150 µg/gün 5gün PTH (1-84) uygulanarak kemik iliği hücrelerinin protein profilindeki değişiklikler araştırılmıştır (241). Çalışmanın sonucunda vimentinin de aralarında bulunduğu yedi proteinin miktarı azalırken calreticulin ve thioredoxin domain containing 7 proteini de içeren dört proteinin miktarı artmıştır. Vimentinin mRNA'sındaki düşüş ve calreticulin ve thioredoxin domain containing 7 protein mRNA'sındaki artış semikantitatif RT-PCR (Real Time-Polimerase Chain Reaction) ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak PTH 'ya bağlı olarak kemik iliğinde farklı eksprese olan bu proteinler osteoprogenitör hücrelerin preosteoblastlara farklılaşmasını sağladıkları öngörülmüştür.

KBY'de yalnızca total PTH değil PTH metabolitlerinin kemik döngüsüne etkili olduğu da bilinen bir gerçektir. Şöyle ki; N-PTH'un karaciğerde hızla yıkılmasına ve klirensinin sağlanamamasına bağlı C-PTH artar. C-PTH'ın hipokalsemik, hiperfosfatemik ve kemik döngüsünü baskılayıcı etkisi mevcuttur. Ancak paratiroid bezlerinden bir veya daha fazlasının adenoma bağlı olarak otonomi kazanarak sürekli PTH salınımını (1-84 ve C-PTH) söz konusu olduğunda C-PTH/PTH (1-84) dengesi iyice bozularak kemik döngüsünün yönüne işaret edebilir.

Bu çalışmada yüksek ve düşük döngülü kemik hastalığı olarak belirlenen gruplarda farklı protein spotu tespit edilemedi. Bunun en önemli nedenlerinden biri miktarı fazla olan proteinlerin çöktürmesi sırasında yaşanan teknik problemlerdi. Yöntem

üzerinde çalışılarak bu sorun zamanla aşılabileceği düşünülmektedir. H6 olgusunun paratiroidektomi öncesi ve sonrası serumundan elde edilen jellerde tespit edilen 25 farklı spotun 9'unun MALDI-TOF analizi sonucu tespit edilen proteinler serumda miktarı fazla olan proteinlerdir (Tablo 16). Bu proteinlerin serumdaki farklı profilleri renal osteodistrofi patogeneğinde rolü olabilir. Proteomiks çalışmalarında araştırılan belirteç aday proteinler daha önce tespit edilmemiş proteinler olabileceği gibi bilinen proteinler de olabileceği göz önüne alındığında bu sonuçların daha ileri araştırmalarla doğrulanması gerekmektedir.

PTH'un üremik kemik hastalıklarında hem katabolik hem de anabolik etkilerinin moleküler mekanizmalarının anlaşılması bu hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde ilerleme sağlayacağı muhakkaktır. Hastalıkların moleküler düzeyde araştırıldığı günümüzde proteomiks uygulamaları üremik kemik hastalıklarının tanınması ve tedavisi için yararlı olabilecek kemik döngüsü belirteçlerinin keşfedilmesi için en önemli araçlardan birisi olarak kullanılabilir.

Çalışmanın Sınırlılıkları

Proteomiks araştırmaları 'az tıp çok teknoloji' olarak özetlenebilir. Bu teknolojinin çalıştırılması sırasında gereken malzemenin ve alt yapının ülkemizde üretilmemesi nedeniyle hem ulaşılmasının kısmi olarak güç hem de maliyetinin yüksek olması proteomiks çalışmalarını kısıtlamaktadır. Tekrarlanabilirliğini güçleştirmektedir. Ayrıca MALDI analizinin ülkemizde birkaç merkezde mevcut olmasına rağmen hizmet satın alımının hizmet sağlayıcılar tarafından zamanında karşılanamaması bir başka sınırlılıktır. Bu nedenle jellerimizden kestiğimiz spotların tümü isimlendirilememiştir. Elde edilen verileri literatürler ışığında yorumlamak dışında çalışmacılara yeterli getirimi sağlanamamıştır. Zaman içerisinde bu güçlükler aşıldığında bu konuda daha iddialı olabilecek sonuçları bildirmek mümkün olabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Proteomiks teknolojisi 2 D PAGE'nin 1970'li yıllarda keşfinden sonra son on yılda hızla ilerleyen ve çok iyi sonuç veren bir teknolojidir. Çalışmamız fakültemiz Klinik Araştırmalar Birimi bünyesinde kurulan Proteomiks laboratuvarında yapılan ikinci deneyimdir. Serumun analizi güç bir örnek olmasının yanı sıra uygulanan protokollerin optimizasyonunun tam sağlanamaması elde edilen sonuçların verimliliğini düşürmektedir. Çalışmamızdan elde edilen veriler, hasta sayısının yetersiz olması, örnek toplanmasındaki yaşanan güçlükler, albuminin ortamdan uzaklaştırılmasında yaşanan sorunlar, yürütülen jellerin homojen olmaması sonucunu doğurmuştur. Bu nedenle elde edilen verileri doğru olarak yorumlamak güç hale gelmiştir.

Unutmamak gerekir ki literatürde renal osteodistrofi hasta grubunda çalışılmış hem serum hem de kemik iliği proteomiks analizi yoktur. Ayrıca proteomiks analizi uygulamasının laboratuvarımızda ilk kez uygulanmaya başlanması nedeniyle araştırmanın içeriği ve yöntemi çok büyük önem taşımaktadır. Ayrıca ülkemizde yapılan proteomiks çalışmalarının sayısının da çok fazla olmadığı unutulmamalıdır. Bu çalışma, fakültemizde gelecekte yapılacak olan proteomiks uygulamalarının önünü açan bir araştırma olmuştur. Çalışma süreci, örneklerin nasıl toplanması ve saklanması gerektiğini, deneylerin her bir basamağında sık yapılabilecek hataları, zamanın bu araştırmalar için nasıl etkin kullanılabilceğini göstermiştir. Ayrıca serumla çalışma protokollerini uygulanabilir hale getirmiştir. Bu tür çalışmaların daha geniş araştırma bütçesi ve buna bağlı malzeme eksikliği, malzemenin tasarruflu kullanılması endişesi olmadan yapılması gereklidir. Bu koşullar sağlandığında deneyler daha fazla tekrarlanır böylece daha etkin sonuçların elde edilecektir.

7. ÖZET

Amaç: Kronik böbrek hastalığında böbrek işlevlerinin gittikçe azalması sonucunda mineral ve kemik metabolizması bozulur. Bu bozukluklara bağlı olarak renal osteodistrofi başlığı altında tanımlanan adinamik kemik hastalığı, osteomalazi, mikst üremik osteodistrofi ve yüksek döngülü kemik hastalığı gelişir. Renal osteodistrofi diyaliz hastalarında veya böbrek nakli sonrası morbiditenin önemli nedenlerinden biridir. Bu nedenle tedavisi veya önlenmesi büyük önem taşımaktadır. Çığır açan bir teknoloji olan proteomiks ise son yıllarda vücut sıvı ve dokularında protein profillerinin belirlenmesinde, hastalıkların mekanizmalarının proteine dayalı araştırılmasında, tanı için yeni bir bio-belirteç keşfinde ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesinde gittikçe önem kazanan güçlü bir yöntemdir. Proteomiks araştırmaları böbrek hastalıklarında giderek artmakta ve ümit verici sonuçlar elde edilmektedir.

Bu çalışmada adinamik kemik hastalığı ve yüksek döngülü kemik hastalığı olduğu düşünülen hastaların serumlarında farklı protein ekspresyonlarının var olup olmadığının incelenmesi ve bunların hastalık patogenezinin katkısı olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Metod: Diyaliz seansı öncesi PTH <100 pg/ml (C) ve >1000 mg/dl (H) olan hastalardan alınan serumlar 2D jel elektroforezinde yürütüldü. Coomassie mavisi ve Sypro Ruby ile boyanıp ortaya çıkarılan protein spotları VersaDoc görüntüleme cihazı ile görüntülendi. PDQuest advanced yazılımı ile analiz edildi. Genellikle hastaların çoğunluğunda bir fark belirlenemez iken paratiroidektomi yapılan H6 kodlu hastada paratiroidektomi öncesi ve sonrası alınan serum örneklerinden yürütülen jellerde anlamlı farklılıklar gözlemlendi ve bu farklı olduğu düşünülen spotlar EXQuest cihazı ile kesilerek MALDI-TOF analizi için gönderildi.

Bulgular: H ve C olarak gruplandırılan hastalarda 51 farklı protein spotu tespit edilmesine rağmen bunlar gruplar arasında benzer dağılım göstermemekteydi. Miktarı fazla olan proteinlerin indirgenmesinin yeteri kadar başarılı olmaması spot analizini güçleştirdiği görüldü. SyproRuby boyası belirlenen spotlardan daha farklı

spot tespitini sağlamadı. Spot profilindeki en belirgin farklılık H6'nın serumundan yürütülen jellerde görüldü ve jel üzerinde 5 farklı bölgede 25 farklı spot belirlendi.

Sonuç ve tartışma: Serum, çok yoğun protein içerdiği ve albumin indirgenmesi güçlüğü nedeni ile proteomiks analizinin yorumlanması problem yaratabilir. Ancak kolay elde edilebilmesi ve tüm dokularla teması olması, fizyolojik ve patolojik koşullarda meydana gelen protein profilindeki değişiklikleri iyi yansıtması nedeniyle önemli bir kaynaktır. Analizinde miktarı fazla olan proteinlerin indirgenmesi en önemli adımdır. Bu proteinlerin indirgenme işlemi sırasında, belirteç adayı olabilecek miktarı az olan proteinlerin de uzaklaştırılmasına neden olabileceği akılda tutulmalıdır. Mevcut imkanlarla bu proteinlerin indirgenmesi henüz yeteri kadar sağlanamamaktadır. Literatürde üremik kemik hastalarının serumlarında yapılmış proteomiks çalışması yoktur. Ancak hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda eksojen PTH'un serum ve kemik iliği hücrelerinin protein profilini değiştirdiği tespit edilmiştir. Bu proteinler kemik döngüsünün düzenlenmesinde rol alabileceği gibi kemik yeniden şekillenmesi sırasında kemikten salınan proteinler olabilir. Bu bilgiler ışığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da H ve C grubundan elde edilen spot farklılığı PTH düzeyine yanıt olabilir. Ayrıca H6'nın ameliyat öncesi ve sonrası serum PTH düzeyi dikkate alındığında her iki durumda yürütülen jellerden elde edilen spot farklılıklarının PTH'a yanıt olarak salınan proteinlere ait olabileceği yorumu yapılabilir. Bu varsayım ispatlanabilir ise adinamik kemik hastalığı patogenezi ile ilgili bir protein belirtecinin varlığının gösterilmiş olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Proteomiks, Renal Osteodistrofi, Üremik Kemik Hastalığı, adinamik kemik hastalığı

8. SUMMARY

In kidney diseases, due to a gradual loss of kidney function, the metabolisms of mineral and bone are disrupted. As a result of these disturbances, a group of bone diseases, named as renal osteodystrophy and includes adynamic bone disease, osteomalasia, mixed uremic bone disease and high turnover bone disease emerges. Renal osteodystrophy is a significant reason for morbidity in dialysis patients and renal transplantation. The treatment of renal osteodystrophy is therefore very important. A breakthrough technology which allows scientists to visualize and perform comparative analysis on protein profiles of biological fluids and discover new biomarkers for early detection of diseases and understand the effects of drugs on treatment is rapidly emerging. Proteomics research is taking part in renal diseases and promising results are being obtained.

In this study, the protein profiles of patients who had adynamic or high turnover bone diseases were elucidated by using serum as the biological material and a relationship was tried to be established between the pathologic state of the diseases and the protein profiles with an hope of discovering a new protein marker.

Methods: 2D gel electrophoresis was performed on pretreated serum samples which were obtained before dialysis of the patients with a PTH values of <100 pg/ml and >1000 mg/dl. The 2D gels were stained with Coomassie blue or SyproRuby and images were taken with VersaDoc imager. The images were analyzed with an image analysis software, PDQuest. In general, we did not detected any significant differences in protein profiles of patients and controls except that the protein profile of the the patient H6 displayed spot that could not be detected in others. We were also able to analyze the protein profile of this patient after paratiroidectomy. Spots that were different were cut with ExQuest and analyzed with MALDI TOF-TOF.

Results: Although we found 51 different spots in between groups formed by H and C, the distributions were not uniform. We faced a difficulty of eliminating high abundance proteins from samples due to the nonspecific binding to Blue G column. The results of analysis were independent of staining procedure and using Coomassie

stain or Sypro ruby did not make a difference. The analysis of H6 sample revealed 25 unique spots grouped in 5 different regions in gels and this was repeatable.

Discussion: Serum is a difficult sample to work with because of the presence of high abundant proteins that blocks the low abundant proteins in 2D gels. However, because of the ease of reaching serum and because serum may represent the protein profile of disease states of the body, serum is an important material to work with. The first step in analysis of serum samples is to reduction of the high abundance proteins, such as albumin, haptoglobin, ferritin and etc. A difficulty that researchers face with during reduction is the loss of low abundance proteins. With the present opportunities in our lab, we were not able to escape from these difficulties. Besides, to our knowledge there is no proteomics study performed with serum samples of uremic bone disease. The studies that we found used animal models and administered exogenous PTH and studied the effect on serum protein profiles. The protein spots that were determined play roles in bone turnover and bone remodeling. Although statistically not significant, the different spot that was observed might be a response to the PTH levels. This finding can be supported by the finding that spot profiles of a patient before and after parathyroid surgery differed significantly. If this can be strengthen further, a marker protein or a group of proteins can be used to predict the state adynamic bone disease.

Keywords: Proteomics, Renal Osteodystrophy, Uremic Bone Disease, Adynamic Bone Disease

9. KAYNAKLAR

1. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R et al. The burden of kidney disease: Improving global outcomes. *Kidney Int* 2004; **66**: 1310–1314
2. Moe S, Drueke T, Cunningham J et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006; **69**: 1945–1953
3. Block GA, Cunningham J. Morbidity and mortality associated with abnormalities in bone and mineral metabolism in CKD. In: Olgaard K (ed). *Clinical Guide to the Basics of Bone and Mineral Metabolism in CKD*. Chapter 4 National Kidney Foundation: New York, 2006, pp 77–92
4. London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and Cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; **14**: 525–531
5. Rao SD, Shih M-S, Mohini R. Effect of serum parathyroid hormone and bone marrow fibrosis on the response to erythropoietin in uremia. *N Engl J Med* 1993; **328**:171–5
6. Hutchison AJ, Whitehouse RW, Boulton HF, Adams JE, Mawer EB, Freemont TJ *et al*. Correlation of bone histology with parathyroid hormone, vitamin D3 and radiology in end-stage renal disease. *Kidney Int* 1993; **44**:1071–7
7. Samina S. Khan, Mohammad R. Iraniha, Diagnosis of Renal Osteodystrophy Among Chronic Kidney Disease Patients. *Dialysis & Transplantation* 2009, Vol.38, Iss. 2, pp.45-57
8. Doi, S, Yorioka, N, Masaki, T, Ito, T, Shigemoto, K, Harada, S. Increased serum osteoprotegerin level in older and diabetic hemodialysis patients. *Ther. Apher* 2004. *Dial.*, **8**: 335-9

9. Couttenye MM, D'Haese P, Verschoren WJ, Behets G, Schrooten I, De Broe M. Low bone turnover in patients with renal failure. *Kidney Int* 1999; **56** (Sup. 73):0–76
10. Diaz-Lopez JB, Jorgetti V, Caorsi H, Ferreira A, Palma A, Menendez P *et al.* Epidemiology of renal osteodystrophy in Ibero-America. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13**:41–5
11. Altmann P. Aluminum toxicity in dialysis patients: no evidence for a threshold serum aluminum concentration. *Nephrol Dial Transplant* 1993; **8**:25–34
12. Cannata-Andía JB. Hypokinetic azotemic osteodystrophy. *Kidney Int* 1998; **54**:1000–16.
13. Fournier A, Yvernau PH, Hué P, Said S, Hamdini N, Eldin HM *et al.* Adynamic bone disease in patients with uremia. *Curr Opin Nephrol Hypert* 1994; **3**:396–410
14. Coburn JW. Mineral metabolism and renal bone disease: effects of CAPD versus hemodialysis. *Kidney Int* 1993; Sup. **40**:92–100
15. Ferreira A, Ghazali A, Galvão J, Souberbielle JC, Jehle PM, Mohan S *et al.* Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; **16**:1230–8
16. Ferreira A, Drüeke TB. How to diagnose the different forms of renal osteodystrophy: Role of biochemical markers. *Am J Med Sci* 2000; **320**:85–9
17. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, *et al.* Bone histomorphometry: standardisation of nomenclature, symbols and units. *J Bone Min Res* 1987; **2**:596–610
18. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**:309–19

19. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis – inhibitory factor and is identical to TRACE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:3597–602
20. Boyle WB, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; **423**:337–42
21. Deyama Y, Takeyama S, Koshikawa M, Shirai Y, Yoshimura Y, Nishikata M, Suzuki K, Matsumoto A: Osteoblast maturation suppressed osteoclastogenesis in coculture with bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **274**:249–254
22. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA: PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004; **19**:235–244
23. Miao D, He B, Karaplis AC, Goltzman D: Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *J Clin Invest* 2002; **109**:1173–1182
24. Miao D, Li J, Xue Y, Su H, Karaplis AC, Goltzman D: Parathyroid hormone-related peptide is required for increased trabecular bone volume in parathyroid hormone-null mice. *Endocrinology* 2004; **145**:3554–3562
25. Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MD, Giovannetti A, Saxton JM, Kronenberg HM, Baron R, Schipani E: Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J Clin Invest* 2001; **107**:277–286
26. Boechat MI, Westra SJ, Van Dop C, Kaufman F, Gilsanz V, Roe TF: Decreased cortical and increased cancellous bone in two children with primary hyperparathyroidism. *Metabolism* 1996; **45**:76–81

27. Van Doorn L, Lips P, Netelenbos JC, Hackeng WH: Bone histomorphometry and serum concentrations of intact parathyroid hormone (PTH(1-84)) in patients with primary hyperparathyroidism. *Bone Miner* 1993; **23**:233–242
28. Lindergard B, Johnell O, Nilsson BE, Wiklund PE: Studies of bone morphology, bone densitometry and laboratory data in patients on maintenance hemodialysis treatment. *Nephron* 1985; **39**:122–129
29. Ishizuya T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S, Yamaguchi A: Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1997; **99**:2961–2970
30. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC: Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1999; **104**:439–446
31. Dobnig H, Turner RT: Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 1995; **136**:3632–3638
32. Isogai Y, Akatsu T, Ishizuya T, Yamaguchi A, Hori M, Takahashi N, Suda T: Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages. *J Bone Miner Res* 1996; **11**:1384–1393
33. Lotinun S, Sibonga JD, Turner RT: Evidence that the cells responsible for marrow fibrosis in a rat model for hyperparathyroidism are preosteoblasts. *Endocrinology* 2005; **146**:4074–4081
34. Karsenty G, Luo G, Hofmann C, Bradley A: BMP 7 is required for nephrogenesis, eye development, and skeletal patterning. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **785**:98–107
35. Gonzalez EA, Lund RJ, Martin KJ, McCaRtney JE, Tondravi MM, Sampath TK, Hruska KA: Treatment of a murine model of high-turnover renal osteodystrophy by exogenous BMP-7. *Kidney Int* 2002; **61**:1322–1331

36. Christiansen P, Steiniche T, Brixen K, Hesse I, Melsen F, Heickendorff L, Mosekilde L: Primary hyperparathyroidism: whole-body bone mineral density in surgically treated Danish patients: a three-year follow-up study. *Bone* 1999; **25**:597–602
37. Iwasaki-Ishizuka Y, Yamato H, Nii-Kono T, Kurokawa K, Fukagawa M: Downregulation of parathyroid hormone receptor gene expression and osteoblastic dysfunction associated with skeletal resistance to parathyroid hormone in a rat model of renal failure with low turnover bone. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**:1904–1911
38. Langub MC, Monier-Faugere MC, Wang G, Williams JP, Koszewski NJ, Malluche HH: Administration of PTH-(7-84) antagonizes the effects of PTH-(1-84) on bone in rats with moderate renal failure. *Endocrinology* 2003; **144**:1135–1138
39. Davies MR, Lund RJ, Mathew S, Hruska KA: Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**:917–928
40. Vertino AM, Bula CM, Chen JR et al. Nongenotropic, anti-apoptotic signaling of 1 alpha, 25(OH)₂-vitamin D₃ and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. Mediation by Src, phosphatidylinositol 3- and JNK kinases. *J Biol Chem* 2005; **280**: 14130–14137
41. Ferreira A, Simon P, Drüeke T. Potential role of cytokines in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 1996; **11**:399-400
42. Langub MC Jr, Koszewski NJ, Turner HV, Monier-Faugere MC, Geng Z, Malluche HH; Bone resorption and mRNA expression of IL-6 and IL-6 receptor in patients with renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1996; **50(2)**:515-20
43. A. Ferreira, Development of renal bone disease. *European Journal of Clinical Investigation* 2006; **36 (Suppl. 2)**: 2–12

44. Andress DL, Pandian MR, Endres DB, Kopp JB. Plasma insulin-like growth factors and bone formation in uremic hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1989; **36(3)**:471-7
45. Wang S, Hirschberg R. : Loss of renal tubular BMP7 during the evolution of experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**:655A, [Abstract]
46. Kitten AM, Lee JC, Olson MS. Osteogenic protein-1 enhances phenotypic expression in ROS 17/2.8 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1995; **269**:E918–E926
47. Kuznetsov SA, Riminucci M, Ziran N, Tsutsui TW, Corsi A, Calvi L, Kronenberg HM, Schipani E, Robey PG, Bianco P. The interplay of osteogenesis and hematopoiesis: expression of a constitutively active PTHrP receptor in osteogenic cells perturbs the establishment of hematopoiesis in bone and of skeletal stem cells in the bone marrow. *J Cell Biol* 2004 ; **167**:1113–1122
48. Fleisch H. Homeostasis of inorganic phosphate. In: *Fundamental and Clinical Bone Physiology*, edited by Urist MR. Philadelphia, PA: Lippincott, 1980, p. 268–282
49. Forster IC, Virkki L, Bossi E, Murer H, Biber J. Electrogenic kinetics of a mammalian intestinal type IIb Na(+)/P(i) cotransporter. *J Membr Biol*. 2006; **212(3)**:177-90
50. Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H Proximal tubular handling of phosphate: a molecular perspective. *Kidney Int* 2006; **70**:1548–1559
51. Berndt T, Thomas LF, Craig TA, Sommer S, Li X, Bergstralh EJ, Kumar R Evidence for a signaling axis by which intestinal phosphate rapidly modulates renal phosphate reabsorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:11085–11090

52. Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD: Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1305–1315
53. Spasovski GB: Bone health and vascular calcification relationships in chronic kidney disease. *Int Urol Nephrol* 2007; **39**:1209–1216
54. Levin AI, Bakris GL, Molitch M *et al.* Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney International*. 2007; 71(1), 31-38
55. Hsu C. & Chertow G. Elevations of serum phosphorous and potassium in mild to moderate renal insufficiency. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 2002; 17, 1419-1425
56. Cai Q, Hodgson SF, Kao PC, Lennon VA, Klee GG, Zinsmeister AR, and Kumar R. Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1645–1649
57. White KE, Evans WE, O'Riordan JLH, Speer MC, Econs MJ, Lorenz-Depiereux B, Grabowski M, Meitinger T, Storm TM Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 2000; **26**:345–348
58. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**:6500–6505
59. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; **291**:E38–E49
60. Kato K, Jeanneau C, Tarp MA, Benet-Pages A, Lorenz-Depiereux B, Bennett EP, Mandel U, Strom TM, Clausen H. Polypeptide GalNAc-transferase T3

- and familial tumoral calcinosis. Secretion of fibroblast growth factor 23 requires O-glycosylation. *J Biol Chem* 2006; **281**:18370–18377
61. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest* 2004; **113**:561–568
62. Makoto Kuro-o, Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol.* 2009; DOI 10.1007/s00467-009-1260-4
63. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima Y Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 1997; **390**:45–51
64. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence. *Biol Chem* 2008; **389**:233–241
65. Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima Y Klotho is a novel beta-glucuronidase capable of hydrolyzing steroid beta-glucuronides. *J Biol Chem* 2004; **279**:9777–9784
66. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, Kuro-o M. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho. *J Biol Chem* 2006; **281**:6120–6123
67. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004; **19**:429–435
68. Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD. FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**:2342–2350
69. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; **289**:F8–F28

70. Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Many T, Silver J. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007; **117**:4003–4008
71. Koh N, Fujimori T, Nishiguchi S, Tamori A, Shiomi S, Nakatani T, Sugimura K, Kishimoto T, Kinoshita S, Kuroki T, Nabeshima Y. Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; **280**:1015–1020
72. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Juppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**:2205–2215
73. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 2008; **359**:584–592
74. Haruna Y, Kashihara N, Satoh M, Tomita N, Namikoshi T, Sasaki T, Fujimori T, Xie P, Kanwar YS. Amelioration of progressive renal injury by genetic manipulation of Klotho gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104**:2331–2336
75. Saito K, Ishizaka N, Mitani H, Ohno M, Nagai R. Iron chelation and a free radical scavenger suppress angiotensin II-induced downregulation of klotho, an anti-aging gene, in rat. *FEBS Lett*. 2003; **551**:58–62
76. Zhang H, Li Y, Fan Y, Wu J, Zhao B, Guan Y, Chien S, Wang N. Klotho is a target gene of PPAR-gamma. *Kidney Int* 2008; **74**:732–739
77. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol* 2003; **17**:2393–2403

78. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science* 2005; **309**:1829–1833
79. Berndt T, Craig TA, Bowe AE, Vassiliadis J, Reczek D, Finnegan R, Jan De Beur SM, Schiavi SC, and Kumar R. Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent. *J Clin Invest* 2003; **112**: 785–794
80. Rowe PS, Kumagai Y, Gutierrez G, Garrett IR, Blacher R, Rosen D, Cundy J, Navvab S, Chen D, Drezner MK, Quarles LD, and Mundy GR. MEPE has the properties of an osteoblastic phosphatonin and minhibin. *Bone* 2004; **34**: 303–319
81. Vanholder R, Glorieux G, Smet RD, Lameire N, for the European Uremic Toxin Work Group (EUTox) New insights into uremic toxins. *Kidney Int* 2003; **84**:S6–S10
82. Bogin E, Massry SG, Levi J, Djaldeti M, Bristol G, Smith J: Effect of parathyroid hormone on osmotic fragility of human erythrocytes. *J Clin Invest* 1982; **69**:1017–1025
83. Potasman I, Better OS: The role of secondary hyperparathyroidism in the anemia of chronic renal failure. *Nephron* 1983; **33**:229–231
84. Bogin E, Levi J, Harary I, Massry SG: Effects of parathyroid hormone on oxidative phosphorylation of heart mitochondria. *Miner Electrolyte Metab* 1982; **7**:151–156
85. Drueke T, Fauchet M, Fleury J, Lesourd P, Toure Y, Le Pailleur C, de Vernejoul P, Crosnier J: Effect of parathyroidectomy on left-ventricular function in haemodialysis patients. *Lancet* 1980; **1**:112–114
86. London GM, De Vernejoul MC, Fabiani F, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, London AM, Llach F: Secondary hyperparathyroidism and Cardiac hypertrophy in hemodialysis patients. *Kidney Int* ; **32**:900–907

87. Perkovic V, Hewitson TD, Kelynack KJ, Martic M, Tait MG, Becker GJ: Parathyroid hormone has a pro-sclerotic effect on vascular smooth muscle cells. *Kidney Blood Press Res* 2003; **26**:27–33
88. Raymond JP, Isaac R, Merceron RE, Wahbe F: Comparison between the plasma concentrations of prolactin and parathyroid hormone in normal subjects and in patients with hyperparathyroidism or hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; **55**:1222–1225
89. Chervu I, Kiersztejn M, Alexiewicz JM, Fadda GZ, Smogorzewski M, Massry SG: Impaired phagocytosis in chronic renal failure is mediated by secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1992; **41**:1501–1505
90. Klin M, Smogorzewski M, Ni Z, Zhang G, Massry SG: Abnormalities in hepatic lipase in chronic renal failure. *J Clin Invest* 1996; **97**:2167–2173
91. Santamaria R, Almaden Y, Felsenfeld A, Martin-Malo A, Gao P, Cantor T, Aljama P, Rodriguez M: Dynamics of PTH secretion in hemodialysis patients as determined by the intact and whole PTH assays. *Kidney Int* 2003; **64**:1867–1873
92. Brossard JH, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barre´ M, D’Amour P: Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**:3923–3929
93. McKee MD, Murray TM: Binding of intact parathyroid hormone to chicken renal plasma membranes: evidence for a second binding site with CaRboxyl-terminal specificity. *Endocrinology* 1985 ; **117**:1930–1939
94. Adijiang A, Goto S, Uramoto S, Nishijima F, Niwa T: Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2008; **23**:1892-1901
95. Iwasaki Y, Yamato H, Nii-Kono T, Fujieda A, Uchida M, Hosokawa A, Motojima M, Fukagawa M: Administration of oral charcoal adsorbent (AST-

- 120) suppresses low-turnover bone progression in uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**:2768–2774
96. Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y, Kusano E: Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2006; **69**:1780–1785
97. Whitfield JF: Leptin: brains and bones. *Expert Opin Investig Drugs* 2001; **10**:1617–1622
98. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G: Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; **100**:197–207
99. Coen G, Ballanti P, Fischer MS, Balducci A, Calabria S, Colamarco L, Di Zazzo G, Lifrieri F, Manni M, Sardella D, Nofroni I, Bonucci E: Serum leptin in dialysis renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 2003; **42**:1036–1042
100. Parhami F, Tintut Y, Ballard A, Fogelman AM, Demer LL: Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. *Circ Res* 2001; **88**:954–960,
101. Giachelli CM: Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**:S300–S304
102. Mathur RV, Shortland JR, El Nahas AM: Calciphylaxis. *Postgrad Med J* 2001; **77**:557–561
103. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H: Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and Cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 2003; **18**:1731–1740
104. Goodman WG, London G, Amann K, Block GA, Giachelli C, Hruska KA, Ketteler M, Levin A, Massy Z, McCarron DA, Raggi P, Shanahan CM, Yorioka N: Vascular calcification in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2004; **43**:572–579

105. Vattikuti R, Towler DA: Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; **286**:E686–E696
106. Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K: Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; **61**:638–647
107. Chen NX, O'Neill KD, Duan D, Moe SM: Phosphorus and uremic serum up-regulate osteopontin expression in vascular smooth muscle cells. *Kidney Int* 2002; **62**:1724–1731
108. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM: Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Circ Res* 2000; **87**:E10–E17
109. Giachelli CM, Jono S, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H: Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 2001; **38**:S34–S37
110. Davies MR, Hruska KA: Pathophysiological mechanisms of vascular calcification in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001; **60**:472–479
111. Ketteler M, Vermeer C, Wanner C, Westenfeld R, Jahnen-Dechent W, Floege J: Novel insights into uremic vascular calcification: role of matrix Gla protein and alpha-2-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin. *Blood Purif* 2002; **20**:473–476
112. Serum fetuin-A concentrations are inversely related to cytokine concentrations in patients with chronic renal failure. Erkan Dervisoglu, Hale Maral Kir, Betul Kalender, Cigdem Caglayan, Ceyla Eraldemir. *Cytokine* 2008; **44**:323–327
113. Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnen-Dechent W, Floege J: Association of

- low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with Cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003; **361**:827–833
114. Luo G, Ducy P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G: Spontaneous calcification of arteries and Cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997; **386**:78–81
115. Jono S, Ikari Y, Vermeer C, Dissel P, Hasegawa K, Shioi A, Taniwaki H, Kizu A, Nishizawa Y, Saito S: Matrix Gla protein is associated with coronary artery calcification as assessed by electron-beam computed tomography. *Thromb Haemost* 2004; **91**:790–794
116. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS: Osteoprotegerindeficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998; **12**:1260–1268
117. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM: Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol* 2002; **161**:2035–2046
118. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK: Association of serum phosphorus and calcium \times phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis* 1998; **31**:607–617
119. Braun J, Asmus HG, Holzer H, Brunkhorst R, Krause R, Schulz W, Neumayer HH, Raggi P, Bommer J: Long-term comparison of a calciumfree phosphate binder and calcium CaRbonate–phosphorus metabolism and CaRdiovascular calcification. *Clin Nephrol* 2004; **62**:104–115
120. Goldsmith DJ, Covic A, Sambrook PA, Ackrill P: Vascular calcification in long-term haemodialysis patients in a single unit: a retrospective analysis. *Nephron* 1997; **77**:37–43

121. Arici M, Walls J: End-stage renal disease, atherosclerosis, and CaRdiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 2001; **59**:407–414
122. Goodman WG, Goldin J, Kuizon BD, Yoon C, Gales B, Sider D, Wang Y, Chung J, Emerick A, Greaser L, Elashoff RM, Salusky IB: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2000; **342**:1478–1483
123. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM: Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 2208–2218
124. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL: Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**:520–528
125. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D’Agostino Sr RB, Gaziano JM, Vasan RS: Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of Cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med* 2007; **167**:879–885
126. Anibal Ferreira, Tilman B. Drüeke. Biological Markers in the Diagnosis of the Different Forms of Renal Osteodystrophy. *Am J Med Sci* 2000; **320**(2):85–9
127. Urena P, Hruby M, Ferreira A, Ang KS, de Vernejoul MC. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996; **7**:506–12
128. Urena P, De Vernejoul MC. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 1999; **55**:2141–56
129. Marie PJ, Lomri A, de Vernejoul MC, Morieux C, Graulet AM, Gueris J *et al.* Relationships between histomorphometric features of bone

- formation and bone cell characteristics *in vitro* in renal osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; **69**:1166–73
130. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med* 1995; **333**:166–74
131. Couttenye MM, D’Haese PC, Van Hoof VO, Lemoniatou E, Goodman W, Verpooten GA *et al.* Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996; **11**:1065–72
132. Urena P, Prieur P, Petrover M. Calcitriol may directly suppress bone turnover. *Nephron* 1997; **75**:116–7
133. Coen G, Ballanti P, Bonucci E, *et al.* Procollagen type I C-terminal extension peptide in predialysis chronic renal failure. *Am J Nephrol* 1992; **12**:246–51
134. Chu P, Chao TY, Lin YF, Janckila AJ, Yam LT. Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2003; **41**:1052–9
135. Urena P, Ferreira A, Kung VT, Morieux C, Simon P, Ang KS *et al.* Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients. *J Bone Miner Res* 1995; **10**:932–9
136. Gejyo F, Homma N, Suzuki Y, *et al.* Serum levels of B2-microglobulin as a new form of amyloid protein in patients undergoing long-term hemodialysis. *N Engl J Med* 1986; **314**: 585–6
137. Pollock B, Cunliffe W, Merchant W: Calciphylaxis in the absence of renal failure. *Clin Exp Dermatol* 2000; **25**:389
138. Mazhar AR, Johnson RJ, Gillen D, Stivelman JC, Ryan MJ, Davis CL, Stehman-Breen CO: Risk factors and mortality associated with calciphylaxis in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2001; **60**:324–332

139. Ahmed S, O'Neill KD, Hood AF, Evan AP, Moe SM: Calciphylaxis is associated with hyperphosphatemia and increased osteopontin expression by vascular smooth muscle cells. *Am J Kidney Dis* 2001; **37**:1267–1276
140. Griethe W, Schmitt R, Jurgensen JS, Bachmann S, Eckardt KU, Schindler R: Bone morphogenic protein-4 expression in vascular lesions of calciphylaxis. *J Nephrol* 2003; **16**:728–732
141. Perez-Mijares R, Guzman-Zamudio J, Payan-Lopez J, Rodriguez-Fernandez A, Gomez-Fernandez P, Almaraz-Jimenez M: Calciphylaxis in a haemodialysis patient: Functional protein S deficiency? *Nephrol Dial Transplant* 1996; **11**:1856–1859
142. Rufino M, deBonis E, Martin M, et al. Is it possible to control with diet, without inducing protein malnutrition? *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13 Suppl. 3**: 65-7
143. Jaime Uribarri. Phosphorus Homeostasis in Normal Health and in Chronic Kidney Disease Patients with Special Emphasis on Dietary Phosphorus Intake. *Seminars in Dialysis* 2007; (**20,4**): pp. 295–301
144. Shinaberger CS, Kilpatrick RD, Regidor DL, et al. Longitudinal associations between dietary protein intake and survival in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2006; **48**:37– 499
145. Willis MR, Savory J. Aluminum and chronic renal failure: sources, absorption, transport, and toxicity. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; **27**: 59-107
146. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 2003; **42**: S1–201
147. Junichiro James Kazama. Oral phosphate binders: History and prospects. *Bone* 2009; **45**:8–12
148. Mahmoud Loghman-Adham. Safety of New Phosphate Binders for Chronic Renal Failure. *Drug Safety* 2003; **26 (15)**: 1093-1115

149. Chertow GM, Burke SK, Raggi P: Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002; **62**:245–252
150. Block GA, Spiegel DM, Ehrlich J, Mehta R, Lindbergh J, Dreisbach A, Raggi P: Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis. *Kidney Int* 2005; **68**:1815–1824
151. Qunibi W, Moustafa M, Muenz LR, He DY, Kessler PD, Diaz-Buxo JA, Budoff M, CARE-2 Investigators: A 1-year randomized trial of calcium acetate versus sevelamer on progression of coronary artery calcification in hemodialysis patients with comparable lipid control: The Calcium Acetate Renagel Evaluation-2 (CARE-2) study. *Am J Kidney Dis* 2008; **51**:952–965
152. Suki WN, Zabaneh R, Cangiano JL, Reed J, Fischer D, Garrett L, Ling BN, Chasan-Taber S, Dillon MA, Blair AT, Burke SK: Effects of sevelamer and calcium-based phosphate binders on mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; **72**:1130–1137
153. Hutchison AJ, Maes B, Vanwalleghem J, Asmus G, Mohamed E, Schmieder R, Backs W, Jamar R, Vosskuhler A: Long term efficacy and tolerability of lanthanum Carbonate: results from a 3-year study. *Nephron Clin Pract* 2006; **102**:61–71
154. Spasovski GB, Sikole A, Gelev S, Masin-Spasovska J, Freemont T, Webster I, Gill M, Jones C, De Broe ME, D’Haese PC: Evolution of bone and plasma concentration of lanthanum in dialysis patients before, during 1-year treatment with lanthanum Carbonate and after two years of follow up. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **532**:2217–2224
155. Eto N, Miyata Y, Ohno H, Yamashita T: Nicotinamide prevents the development of hyperphosphataemia by suppressing intestinal sodiumdependent phosphate transporter in rats with adenine-induced renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**:1378–1384

156. Nakahama H, Nakanishi T, Uyama O, et al. Niceritrol reduces plasma lipoprotein (a) levels in patients undergoing maintenance hemodialysis. *Ren Fail* 1993; **15**:189-93
157. Pearce BE, Clarke R. A phosphorylated phloretin derivative: synthesis and effect on intestinal Na⁺-dependent phosphate absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; **283**: G846-55
158. Messa P, Gropuzzo M, Cleva M, et al. Behavior of phosphate removal with different dialysis schedules. *Nephrol Dial Transplant* 1998; **13 Suppl. 6**: 43-8
159. Lindsay RM, Kortas C, Daily/Nocturnal Dialysis Study Group. Hemeral (daily) hemodialysis. *Adv Ren Replace Ther* 2001; **8**: 236-49
160. Michael F. Holick, Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med* 2007;**357**:266-81
161. Brown AJ, Finch J, Grieff M et al. The mechanism for the disparate actions of calcitriol and 22-oxacalcitriol in the intestine. *Endocrinology* 1993; **133**: 1158–1164
162. Brown AJ, Finch JL, Lopez-Hilker S et al. New active analogues of vitamin D with low calcemic activity. *Kidney Int* 1990; **29 [Suppl 29]**: S22–S27
163. Takeyama K, Masuhiro Y, Fuse H et al. Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analogue. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 1049–105
164. Brown AJ, Berkoben M, Ritter C et al. Metabolism of 22-oxacalcitriol by a vitamin D-inducible pathway in cultured parathyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **189**: 759–764
165. Kamimura S, Gallieni M, Kubodera N et al. Differential catabolism of 22-oxacalcitriol and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ by normal human peripheral monocytes. *Endocrinology* 1993; **133**: 2719–2723

166. Hirata M, Katsumata K, Masaki T et al. 22-Oxacalcitriol ameliorates high-turnover bone and marked osteitis fibrosa in rats with slowly progressive nephritis. *Kidney Int* 1999; **56**: 2040–2047
167. Brown AJ, Finch JL, Takahashi F et al. The calcemic activity of 19-nor-1,25(OH)₂D₂ decreases with duration of treatment. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 2088–2094
168. Takahashi F, Finch JL, Denda M et al. A new analogue of 1,25-(OH)₂D₃, 19-nor-1,25-(OH)₂D₂, suppresses serum PTH and parathyroid gland growth in uremic rats without elevation of intestinal vitamin D receptor content. *Am J Kidney Dis* 1997; **30**: 105–112
169. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in Mouse bone marrow cultures. *Endocrinology* 1988; **122**: 1373–1382
170. Holliday LS, Gluck SL, Slatopolsky E et al. 1,25-Dihydroxy-19-nor-vitamin D₂, a vitamin D analogues with reduced bone resorbing activity in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 1857–1864
171. Cozzolino M, Lu Y, Finch J et al. 1,25(OH)₂D₃ (1,25D) and 19-nor-1,25(OH)₂D₂ (19-nor) prevent the phosphorus-induced parathyroid gland growth in early uremia by inducing p21CIP1/WAF1 and reducing the expression of transforming growth factor α (TGFα) expression. *J Am Soc Nephrol* 2000; **11**: 574A
172. Mawer EB, Jones G, Davies M et al. Unique 24-hydroxylated metabolites represent a significant pathway of metabolism of vitamin D₂ in humans: 24-hydroxyvitamin D₂ and 1,24-dihydroxyvitamin D₂ detectable in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; **83**: 2156–2166
173. Tanaka Y, DeLuca HF, Kobayashi Y et al. 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D₃: a highly potent, longlasting analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Arch Biochem Biophys* 1984; **229**: 348–354

174. Szczepanska-Konkel M, Yusufi AN, VanScoy M, et al. PhosphonoCaRboxylic acids as specific inhibitors of Na⁺-dependent transport of phosphate across renal brush border membrane. *J Biol Chem* 1986; **15**: 6375-83
175. Brown EM. Calcium receptor and regulation of parathyroid hormone secretion. *Rev Endocr Metab Disord* 2000; **1**:307-15
176. Colloton M, Shatzken E, Miller G, Stehman-Breen C, Wada M, Lacey D et al. Cinacalcet HCl attenuates parathyroid hyperplasia in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2005; **67**:467-76
177. Moe SM, Chertow GM, Coburn JW et al. Achieving NKF-K/DOQI[trade] bone metabolism and disease treatment goals with cinacalcet HCl. *Kidney Int* 2005; **67**: 760-771
178. Wada M, Ishii H, Furuya Y et al. NPS R-568 halts or reverses osteitis fibrosa in uremic rats. *Kidney Int* 1998; **53**: 448-453
179. Ishii H, Wada M, Furuya Y et al. Daily intermittent decreases in serum levels of parathyroid hormone have an anabolic-like action on the bones of uremic rats with low-turnover bone and osteomalacia. *Bone* 2000; **26**: 175-182
180. Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG et al. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004; **350**:1516-25
181. Lien YH, Silva AL, Whittman D. Effects of cinacalcet on bone mineral density in patients with secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**:1232-7
182. Henley C, Colloton M, Cattley RC et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar^(R)/Mimpara^(R)) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2005; **20**: 1370-1377

183. Messa P, Alberti L, Como G et al. Calcimimetic increases osteoprotegerin and decreases fetuin-A levels in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2007; **22**: 2724–2725
184. Odenwald T, Nakagawa K, Hadtstein C et al. Acute blood pressure effects and chronic hypotensive action of calcimimetics in uremic rats. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 655–662
185. Shigematsu T, Caverzasio J, Bonjour J. Parathyroid removal prevents the progression of chronic renal failure induced by high protein diet. *Kidney Int* 1993; **44**: 173–181
186. Colloton M, Shatzen E, Miller G, Stehman-Breen C, Wada M, Lacey D et al. Cinacalcet HCl attenuates parathyroid hyperplasia in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2005; **67**:467–76
187. Tominaga Y, Uchida K, Haba T, et al. More than 1,000 cases of total parathyroidectomy with forearm autograft for renal hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis* 2001; **38 (Suppl 1)** : S166-S171
188. Tanaka M, Itoh K, Matsushita K, Matsushita K, Fukagawa M. Combination therapy of intravenous maxacalcitol and percutaneous ethanol injection therapy lowers serum parathyroid hormone level and calcium x phosphorus product in secondary hyperparathyroidism. *Nephron Clin Pract* 2006; **102**: c1-c7
189. Martin KJ, Gonzalez EA. Metabolic bone disease in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007; **18**: 875 885
190. Spasovski G, Gelev S, Masin-Spasovska J et al. Improvement of bone and mineral parameters related to adynamic bone disease by diminishing dialysate calcium. *Bone* 2007; **41**: 698–703
191. Fujimori A, Yorifuji M, Sakai M et al. Low-calcium dialysate improves mineral metabolism in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 2007; **67**: 20–24

192. Haris A, Sherrard DJ, Hercz G. Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium. *Kidney Int* 2006; **70**: 931–937
193. D’Haese PC, Spasovski GB, Sikole A *et al.* A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients. *Kidney Int Suppl* 2003; **63**: S73–S78
194. Ferreira A, Frazao JM, Monier-Faugere MC *et al.* Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 405–412
195. Hamdy NA, Kanis JA, Beneton MN *et al.* Effect of alfacalcidol on natural course of renal bone disease in mild to moderate renal failure. *BMJ* 1995; **310**: 358–363
196. Okuda N, Takeda S, Shinomiya K *et al.* ED-71, a novel vitamin D analog, promotes bone formation and angiogenesis and inhibits bone resorption after bone marrow ablation. *Bone* 2007; **40**: 281–292
197. Hernandez JD, Wesseling K, Boechat MI *et al.* Osteomalacia in a hemodialysis patient receiving an active vitamin D sterol. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007; **3**:227–232
198. Shao JS, Cheng SL, Charlton-Kachigian N *et al.* Teriparatide (human parathyroid hormone (1–34)) inhibits osteogenic vascular calcification in diabetic low density lipoprotein receptor deficient mice. *J Biol Chem* 2003; **278**:50195–50202
199. Winer KK, Ko CW, Reynolds JC *et al.* Long-term treatment of hypoparathyroidism: a randomized controlled study comparing parathyroid hormone-(1–34) versus calcitriol and calcium. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:4214–4220
200. Goodman WG, Hladik GA, Turner SA *et al.* The Calcimimetic agent AMG 073 lowers plasma parathyroid hormone levels in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**:1017–1024

201. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I: Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium* *Electrophoresis* 1995; **16**: 1090-1094
202. Seo J, Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol* 2004; **37**: 35–44
203. Espina V, Geho D, Mehta AI, *et al.* Pathology of the future: molecular profiling for targeted therapy. *Cancer Invest* 2005; **23**: 36–46
204. Marcus Gry, Rebecca Rimini, Sara Strömberg, Anna Asplund, Fredrik Pontén, Mathias Uhlén¹ and Peter Nilsson. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines; *BMC Genomics* 2009, **10**:365
205. Gerhard A. Müller, Claudia A. Müller and Hassan Dihazi: Clinical proteomics—on the long way from bench to bedside? *Nephrol Dial Transplant* 2007 **22**: 1297–1300
206. Etzion i R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radıch J, Anderson G, Hartwell L: The case for early detection. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 243-252
207. Rifai N, Gillette MA, Carr SA: Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006; **24**: 971-983
208. Beck LH, JR., Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, Klein JB, Salant DJ: M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009; **361**: 11-21
209. Looi ks, Nakayasu ES, Diaz RA, Tan EM, Almeida IC, Zhang JY: Using proteomic approach to identify tumor-associated antigens as markers in hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2008; **7**: 4004-4012

210. Hongsachart P, Huang-Liu R, Sinchaikul S, Pan FM, Phutrakul S, Chuang YM, Yu CJ, Chen ST: Glycoproteomic analysis of WGA-bound glycoprotein biomarkers in sera from patients with lung adenocarcinoma. *Electrophoresis* 2009; **30**: 1206-1220
211. Kim HJ, Kang HJ, Lee H, Lee ST, Yu MH, Kim H, Lee C: Identification of S100A8 and S100A9 as serological markers for colorectal cancer. *J Proteome Res* 2009; **8**: 1368-1379
212. Xu G, Xiang CQ, Lu Y, Kang XN, Liao P, Ding Q, Zhang YF: Application of SELDI-TOF-MS to identify serum biomarkers for renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2009; **282**:205-213
213. Findeisen P, Zapatka M, Peccerella T, Matzk H, Neumaier M, Schadendorf D, Ugurel S: Serum amyloid A as a prognostic marker in melanoma identified by proteomic profiling. *J Clin Oncol* 2009; **27**: 2199-2208
214. Goldman R, Resson HW, Abdel-Hamid M, Goldman L, Wang A, Varghese RS, An Y, Loffredo CA, Drake SK, Eissa SA, Gouda I, Ezzat S, Moiserwitsch FS: Candidate markers for the detection of hepatocellular carcinoma in low-molecular weight fraction of serum. *Carcinogenesis* 2007; **28**: 2149-2153
215. Kyselova Z, Mechref Y, Kang P, Goetz JA, Dobrolecki LE, Sledge GW, Schnaper L, Hickey RJ, Malkas LH, Novotny MV: Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clin Chem* 2008; **54**: 1166-1175,
216. Quintana LF, Campistol JM, Alcolea MP, Banon-Maneus E, Sol-Gonzalez A, Cutillas PR: Application of label-free quantitative peptidomics for the identification of urinary biomarkers of kidney chronic allograft dysfunction. *Mol Cell Proteomics* 2009; **8**: 1658-1673
217. Zhang X, Li L, Wei D, Yap Y, Chen F: Moving cancer diagnostics from bench to bedside. *Trends Biotechnol* 2007; **25**: 166-173
218. Bijian K, Mlynarek AM, Balys RL, Jie S, Xu Y, Hier MP, Black MJ, DI Falco MR, Laboissiere S, Alaoui-Jamali MA: Serum proteomic approach for the identification of serum biomarkers contributed by oral squamous cell

- carcinoma and host tissue microenvironment. *J Proteome Res* 2009; **8**: 2173-2185
219. Hashiguchi T, Tanaka K, Lee LJ, Sasaki K, Natsugoe S, Kawahara KI, Arimura K, Maruyama I: Diagnostic value of serum peptidome analyses for protease activated pathological conditions beyond cancer diagnosis. *Med Hypotheses* 2009
220. Anderson NL, Polanski M, Pieper R, Gatlin T, Tirumalai RS, Conrads TP, Veenstra TD, Adkins JN, Pounds JG, Fagan R, Lobley A: The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. *Mol Cell Proteomics* 2004; **3**: 311-326
221. Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS: Biomarkers: Mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics* 2005; **4**: 409-418
222. Huang HL, Stasyk T, Morandell S, Mogg M, Schreiber M, Feuerstein I, Huck CW, Stecher G, Bonn GK, Huber LA: Enrichment of low-abundant serum proteins by albumin/immunoglobulin G immunoaffinity depletion under partly denaturing conditions. *Electrophoresis* 2005; **26**: 2843-2849
223. Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG, Fang R, Tolie N, Moore RJ, Smith RD: Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics* 2005; **5**:4034-4045
224. Theodorescu D, Wittke S, Ross MM, Walden M, Conaway M, Just I, Mischak H, Frierson HF: Discovery and validation of new protein biomarkers for urothelial cancer: a prospective analysis. *Lancet Oncol* 2006; **7**:230-240
225. Visith Thongboonkerd: Current status of renal and urinary proteomics: ready for routine clinical application? *Nephrol Dial Transplant* 2010; **25**: 11-16

226. Carrette O, Burkhard PR, Sanchez JC, Hochstrasser DF: State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nat Protoc* 2006; **1**: 812-823
227. Bjellqvist B, EK K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 1982; **6**: 317-339
228. Unlu M, Morgan ME, Minden JS: Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; **18**: 2071-2077
229. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ: Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 1993; **3**: 327-332
230. Thongboonkerd V. Urinary proteomics: towards biomarker discovery, diagnostics and prognostics. *Mol Biosyst* 2008; **4**: 810–815
231. Tilton RG, Haidacher SJ, Lejeune WS *et al.* Diabetes-induced changes in the renal cortical proteome assessed with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2007; **7**: 1729–1742
232. Ramachandra Rao SP, Wassell R, Shaw MA *et al.* Profiling of human mesangial cell subproteomes reveals a role for calmodulin in glucose uptake. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **292**: F1182–F1189
233. Barati MT, Merchant ML, Kain AB *et al.* Proteomic analysis defines altered cellular redox pathways and advanced glycation end-product metabolism in glomeruli of db/db diabetic mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; **293**: F1157–F1165
234. Semangoen T, Sinchaikul S, Chen ST *et al.* Proteomic analysis of altered proteins in distal renal tubular cells in response to calcium oxalate monohydrate crystal adhesion: implications for kidney Stone disease. *Proteomics Clin Appl* 2008; **2**: 1099–1109

235. Semangoen T, Sinchaikul S, Chen ST *et al.* Altered proteins in MDC Krenal tubular cells in response to calcium oxalate dihydrate crystal adhesion: a proteomics approach. *J Proteome Res* 2008; **7**: 2889–2896
236. Meier M, Kaiser T, Herrmann A *et al.* Identification of urinary protein pattern in type 1 diabetic adolescents with early diabetic nephropathy by a novel combined proteome analysis. *J Diabetes Complications* 2005; **19**: 223–232
237. Mischak H, Kaiser T, Walden M *et al.* Proteomic analysis for the assessment of diabetic renal damage in humans. *Clin Sci (Lond)* 2004; **107**: 485–495
238. Decramer S, Wittke S, Mischak H *et al.* Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis. *Nat Med* 2006; **12**: 398–400
239. Zhou H, Pisitkun T, Aponte A *et al.* Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int* 2006; **70**: 1847–1857
240. Thongboonkerd V, Barati MT, McLeish KR *et al.* Alterations in the renal elastin–elastase system in Type 1 diabetic nephropathy identified by proteomic analysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 650–662
241. Seong Hwan Kim, Sujung Jun, Hee-Sun Jang, Sung-Kil Lim. Identification of parathyroid hormone-regulated proteins in Mouse bone marrow cells by proteomics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; **330**: 423–429
242. Agasanur K. Prahalad, Robert J. Hickey, Jeffrey Huang, Derek J. Hoelz, Lacey Dobrolecki, Sreemala Murthy, Therry Winata, and Janet M. Hock. Serum proteome profiles identifies parathyroid hormone physiologic response. *Proteomics* 2006, **6**: 3482–3493

243. KDIGO Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney International* **76 (Suppl. 113)**; S1–S130.
244. N. Leigh Anderson and Norman G. Anderson. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Molecular & Cellular Proteomics* 2002; **Vol.:1**: 845–867
245. Hyoung-Joo Lee, Eun-Young Lee, Min-Seok Kwon and Young-Ki Paik. Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology* 2006; **10**:42-49
246. Celebi B, Elcin YM. Proteome analysis of rat bone marrow mesenchymal stem cell subcultures. *J Proteome Res* 2009; **8**:2164–2172
247. Zhang L, Feng X, McDonald JM. The role of calmodulin in the regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinology* 2003;**144**:4536–45439
248. Hengwei Zhang, Proteomics in bone research. *Expert Rev Proteomics*. 2010; **7(1)**: 103–111

