

**T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA BİR VİTAMİN A TÜREVİ RETİNOİD OLAN ASİTRETİNİN
EPIFİZYAL BÜYÜME PLAĞINA ETKİLERİNİN BİYOKİMYASAL VE
HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sevda ÖNDER
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Serap GÜNEŞ BİLGİLİ**

VAN-2014

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DERMATOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA BİR VİTAMİN A TÜREVİ RETİNOİD OLAN
ASİTRETİNİN EPİFİZYAL BÜYÜME PLAĞINA ETKİLERİNİN
BİYOKİMYASAL VE HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Sevda ÖNDER
UZMANLIK TEZİ

Jüri Başkanı

Üye

Üye

Üye

Tez Kabul Tarihi

Teşekkür

Bu Çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2012-TF-U039 proje numarası ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım boyunca bana yol gösterici olan tez danıŐmanım Doç.Dr. Serap GÜNEŞ BİLGİLİ'ye yardımları için teşekkür ederim.

Tez çalıŐmalarım süresince bana yardımcı olan Yrd.Doç.Dr.Gülay BULUT'a ve Doç.Dr.Sıddık KESKİN'e,

Ve sıkıntılı uzmanlık eğitimim süresince bana her daim destek olan, tez çalıŐmalarıma katkıdabulunan, kıymetli eŐim Dr.Hacı ÖNDER'e ve kızım Nehir'e bana gösterdikleri sabır için teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| İÇİNDEKİLER..... | IV |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | VI |
| ŞEKİLLER VE RESİMLER: | VII |
| TABLolar | VIII |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1.RETİNOİDLER..... | 3 |
| 2.1.1 Retinoidlerin Etki Mekanizması Ve Biyolojik Etkileri | 4 |
| 2.1.2. Retinoidlerin Metabolizması..... | 5 |
| 2.1.3. Retinoid Reseptörleri | 7 |
| 2.1.4.Sentetik Retinoidler | 9 |
| I.İsotretinoin (13-Cis Retinoik Asit) | 9 |
| II.Tretinoin | 9 |
| III.Asitretin Ve Etreinat | 10 |
| IV.Adapalen | 11 |
| V.Tazaroten | 11 |
| VI. Beksaroten..... | 12 |
| 2.2.BÜYÜME PLAĞI..... | 12 |
| 2.2.1. Kıkırdak Farklılaşması..... | 12 |
| 2.2.2.Büyüme Plağı Morfolojisi Ve Fizyolojisi..... | 13 |
| 2.2.3.Farklılaşmanın Düzenlenmesi..... | 14 |
| 2.3.KEMİK METABOLİZMASI | 15 |
| 2.3.1.Kalsiyum Metabolizması | 15 |
| 2.3.2.D Vitamini Metabolizması..... | 16 |
| 2.3.3.Paratiroid Hormonu | 17 |
| 2.3.4.Osteokalsin..... | 17 |

| | |
|--|---|
| 2.3.5.Kemik Alkalen Fosfataz | 17 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 19 |
| 3.1.Gereçler: | 19 |
| 3.2. Çalışmanın Yapılması..... | 21 |
| 3.3.Epifiz Plağının Histopatolojik İncelenmesi | 24 |
| 3.4.Yöntem (uygulama ve istatistiksel analiz)..... | 25 |
| 4. BULGULAR | 26 |
| 4.1.Histopatolojik Değerlendirme Bulguları. | 26 |
| 4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları | 38 |
| ÖZET | 48 |
| SUMMARY..... | Hata! Yer işareti tanımlanmamış. |
| KAYNAKLAR..... | 52 |
| ÖZGEÇMİŞ | 58 |

Simgeler ve Kısaltmalar

FDA: Amerikan ilaç ve gıda dairesi

DISH: Diffüz idyopatik iskelet hiperostozisi

at-RA: All-trans retinoik asit

RAR: Retinoik asit reseptörü

RXR: Retinoid X reseptörü

RBP: Retinoid bağlayan protein

AP1: Aktivatör protein 1

NF-IL6: Nükleer faktör interlökin 6

US: Birleşmiş milletler

MPC: Mezenkimal prekürsör hücreleri

ECM: Ekstraselüler matriks

ALP: Alkalen fosfataz

VEGF: Vasküler endotelyal growth faktör

PTH: Paratiroidhormon

KMY: Kemik mineral yoğunluğu

DEXA: Dual energy-X-ray absorbtometry

Şekiller ve Resimler:

| | |
|---|----|
| Şekil 1. Retinoidlerin kimyasal yapısı..... | 4 |
| Şekil 2. Retinoidlerin metabolizması | 6 |
| Şekil 3. Büyüme plağı zonları | 14 |
| Resim 1. Çalışmaya alınan ratlar..... | 19 |
| Resim 2. Asitretin çözeltisinin verilmesi | 20 |
| Resim 3. Kan alınması | 21 |
| Resim 4. Çalışılan kanlar | 22 |
| Resim 5. Tibiaların eksize edilmesi | 23 |
| Resim 6. Eksize edilmiş ratlar..... | 23 |
| Resim 7. Kontrol grubu dişi rat.HEX200..... | 29 |
| Resim 8. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen dişi rat.HEX200..... | 29 |
| Resim 9. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen dişi rat.HEX100..... | 30 |
| Resim 10. Kontrol grubu erkek rat.HEX100..... | 30 |
| Resim 11. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. HEX100..... | 31 |
| Resim 12. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat.HEX100..... | 31 |
| Resim 13. Kontrol grubu erkek rat.Toluidin blue boyama | 32 |
| Resim 14. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen dişi rat. Toluidin blue boyama..... | 32 |
| Resim 15. Kontrol grubu erkek rat.Tip 2 kollajen ile boyamax200..... | 34 |
| Resim 16. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 2 kollajen ile boyamax200..... | 35 |
| Resim 17. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 2 kollajen ile boyamax200 ... | 36 |
| Resim 18. Kontrol grubu erkek rat. Tip 1 kollajen ile boyamax200..... | 36 |
| Resim 19. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 1 kollajen ile boyamax200..... | 37 |
| Resim 20. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 1 kollajen ile boyamax200 ... | 38 |

Tablolar

| | |
|--|----|
| Tablo 1. Retinoidlerin kullanım endikasyonları..... | 8 |
| Tablo 2. Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupların histopatolojik incelemelerinin karşılaştırılması | 27 |
| Tablo 3. Dişi ve erkek ratların kendi aralarında histopatolojik incelemelerinin istatistiksel karşılaştırılması | 28 |
| Tablo 4. Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupların biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması | 39 |
| Tablo 5. Dişi ve erkek ratların kendi aralarında biyokimyasal değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması | 41 |

1.GİRİŞ

Yapısal ya da fonksiyonel benzerliği olan A vitamini ya da ilişkili bileşikler retinoidler olarak isimlendirilir. Retinoidlerin farklı biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rolü vardır. Hücresel büyüme, farklılaşma ve morfogenezini etkiler, tümör oluşumunu ve malign hücre büyümesini inhibe eder, immunmodülatuar etki gösterir ve hücresel yapışıklığı değiştirirler. Dermatoloji kliniklerinde topikal ve sistemik olarak sık kullanılmaktadırlar. Genel olarak akne vulgaris, psoriasis, kutane T hücreli lenfomalar, rozasea ve akne ilişkili sendromlar, keratinizasyon bozuklukları, neoplastik gelişimin kemoproflaksisi, neoplastik hastalıkların tedavisi ve daha birçok dermatozda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (1).

Dermatoloji servislerinde yaygın olarak kullanılan retinoidlerin yan etkileri kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Retinoidlerin en önemli yan etkisi teratojenitedir. Hemen hemen tüm sistemleri etkileyen yan etkileri mevcuttur. Kserozis, pruritus, keilit, mukoza kuruluğu, deri fragilitesi, palmoplantar soyulma gibi mukokütanöz yan etkilerin yanında sistemik yan etkileri de görülebilmektedir (2).

Asitretin etretinatın major metaboliti ve farmakolojik olarak aktif bileşiğidir. Asitretin ve etretinat eşit etkinlikte olmasına rağmen etretinata göre daha hızlı eliminasyonu nedeniyle asitretin farmakokinetik avantaja sahiptir (3).

Asitretinin etki mekanizması halen tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmalar diferansiyasyon ve proliferasyonun normalizasyonu ile inflamatuvar cevap ve nötrofil fonksiyonunda modifikasyon gibi etkileri olduğunu desteklemektedir. Asitretinin diğer retinoidler gibi en önemli yan etkisi teratojenitedir. FDA asitretin için en az 3 yıllık bir terapötik kontraseptif periyodu önermektedir (1).

Asitretin kullanımında sıklıkla mukokütanöz yan etkiler gözlenirken nadiren laboratuvar anormallikleri ve kemik değişiklikleri olabilir. Literatürde retinoik asit, isotretinoin ve az sayıda olmak üzere etretinat ile yapılmış çalışmalarda Diffüz idyopatik iskelet hiperostozisi (DISH) sendromu benzeri kemik değişiklikleri, ekstraspingal tendon ve ligament kalsifikasyonu, uzun kemiklerde osteoporotik değişiklikler, epifizlerde erken kapanma, periostal kalınlaşma ve miyopati gibi iskelet sistemi üzerine etkileri görülebilmektedir (4). Ancak asitretin ile yapılmış histopatolojik ve immunhistokimyasal çalışma sayısı yok denecek kadar azdır ve birçoğu olgu sunumu şeklinde bildirilmiştir. Dermatoloji servislerinde çok yaygın kullanım alanına sahip bu retinoidin epifizyal plak üzerine olan etkilerini

aydınlatabilmek, kemik belirteçleri üzerine olan etkilerini anlayabilmek ve daha güvenle bu ilacı kullanabilmek için bu çalışmayı yaptık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.RETİNOİDLER

Retinoidler vitamin A'nın doğal ve sentetik bileşikleridir (5). Oral A vitaminini başlangıçtaki klinik kullanımında tolere edilebilen dozlarda yeterli etki görülmemiş, daha yüksek dozlarda ise toksik olduğu gözlenmiştir.

A vitamininin bu dar terapötik penceresi nedeniyle daha düşük toksisite ve daha yüksek terapötik aktivitesi olan sentetik retinoid çalışmaları başlatılmıştır. Retinoidler A vitamini metabolizması sırasında doğal olarak oluşabilmesine rağmen birçok retinoid sentetiktir (1).

Retinolün doğal bir metaboliti olan all-trans retinoik asit (at-RA, tretinoin) sentezlenen ilk retinoiddir. Tretinoin hücrel farklılaşmadaki etkinliği nedeniyle akut premyolitik lösemide kullanılmıştır. at-RA retinolün güçlü biyolojik etkilerine sahip, hücrel büyüme ve farklılaşmayı düzenleyen metabolitidir (6).

13-cis-retinoik asit (isotretinoin) ilk kez 1955'te sentezlenmesine rağmen klinik çalışmalar yıllar sonra yapılmıştır. İso-tretinoin lameller iktiyoz ve diğer keratinizasyon bozukluklarındaki etkinliği aynı zamanda tedaviye dirençli kistik akne ve akne konglobatada sağladığı uzun remisyonlu tam cevap bu ajana ilgiyi canlandırmıştır (1).

1972 de Bollag iki aromatik retinoid bulmuştur: Bunlar etretinat ve onun serbest asit metaboliti olan asitretindir. Günümüze kadar en az 2500 yeni retinoid sentez edilerek incelenmiştir (7). Bunlardan halen ilaç olarak kullanılan veya klinik deneme aşamasında olanlar şunlardır (8).

1. Kuşak retinoidler (monoaromatik):

Tretinoin

İso-tretinoin

2.Kuşak retinoidler (monoaromatik):

Etretinat

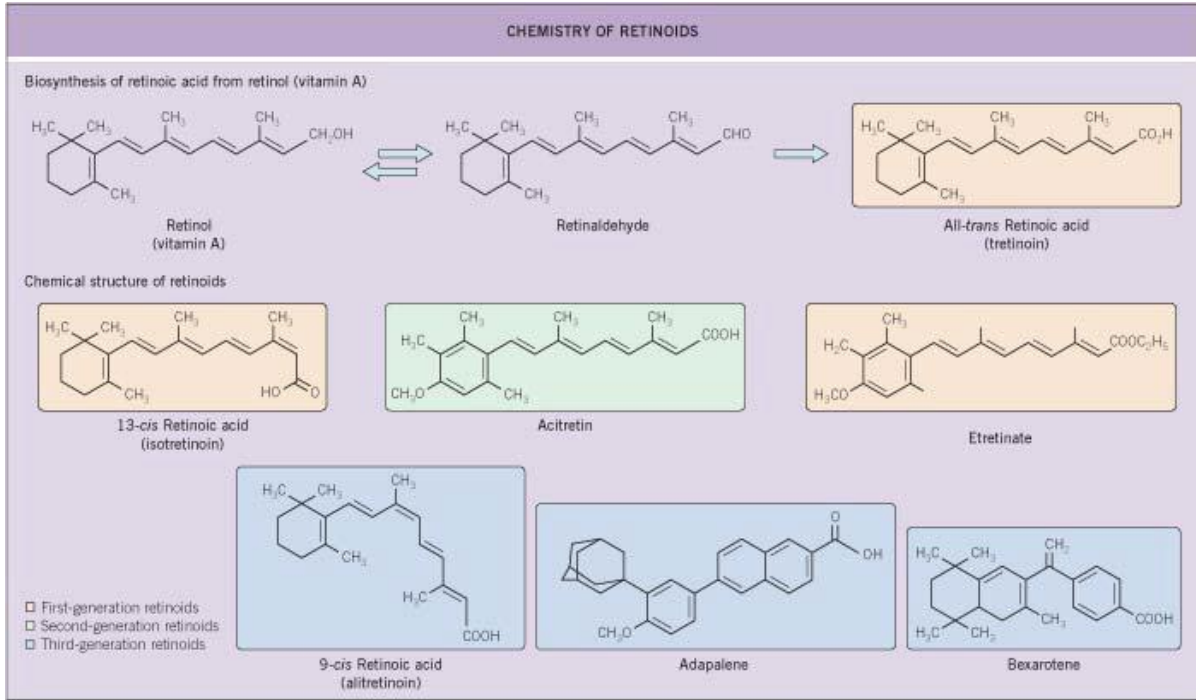
Asitretin

3.Kuşak retinoidler (poliaromatik ya da arotinoidler):

Adapalen

Beksaroten

Tazoroten



© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

Şekil 1. Retinoidlerin kimyasal yapısı (1)

Retinoidler biyolojik etkilerini DNA transkripsiyonu üzerindeki etkileri sonucu gösterirler. Retinoidlerin moleküler farmakolojik özellikleri ve etki mekanizmalarının anlaşılmasında major gelişim, retinoik asit reseptörleri (RARs) ve retinoid X reseptörleri (RXRs) olarak bilinen nükleer reseptörlerin keşfiyle olmuştur (5).

2.1.1 RETİNOİDLERİN ETKİ MEKANİZMASI VE BİYOLOJİK ETKİLERİ

Retinoidler hücrel büyüme, farklılaşmayı, immunmodülasyonu düzenler. Tümör promosyonunu, malign potansiyel hücreleri inhibe eder ve hücrel yapışıklığı değiştirirler (5). Retinoidler ayrıca derinin bariyer fonksiyonu, kemik sağlığı, embriyogenez ve üreme için vücutta gereklidir (9).

Retinoidlerin biyolojik fonksiyonları (1)

1-A vitaminin(retinol) fonksiyonları:

- Embriyonik büyüme
- Morfogenez
- Epitelyal dokuların farklılaşma ve idamesi
- Reprodüksiyon
- Görme fonksiyonları (retinaldehid)

2- Retinoidlerin biyolojik etkileri:

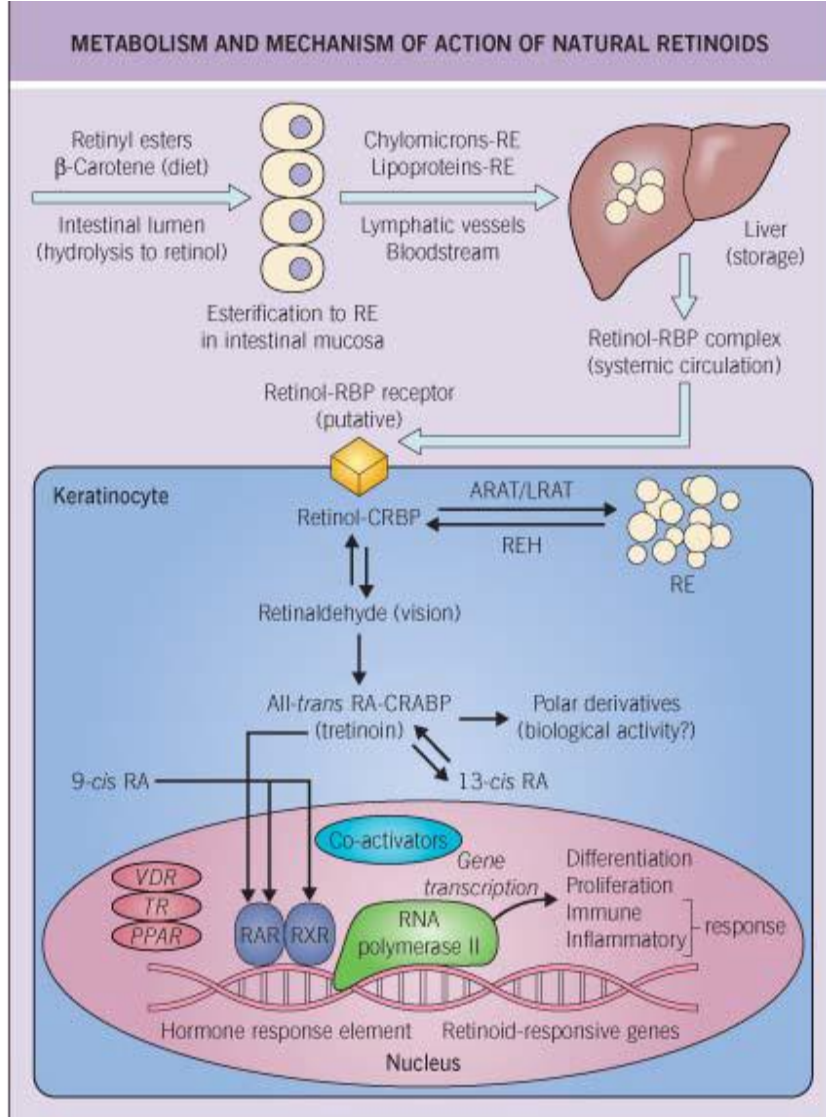
- Proliferasyon ve farklılaşmanın modülasyonu
- Antikeratinizasyon
- Hücre sel yapışıklığının değiştirilmesi
- Antiakne ve antiseboreik etkiler
- İmmünolojik ve antiinflamatuvar etkiler
- Tümörden korunma ve tedavisi
- Apoptoz indüksiyonu
- Ekstrasellüler matriks komponentleri üzerine etkiler

2.1.2. RETİNOİDLERİN METABOLİZMASI

Karaciğer retinoidler için vücuttaki en önemli alım, depolama ve dağıtımın olduğu dokudur (9). A vitamini (retinol) genellikle diyetle retinil esterleri ve A-provitamini karotenoidleri olarak bulunmaktadır. İntestinal lümeninde retinil esterleri retinole hidrolize edilir. Retinol daha sonra absorbe olur ve karaciğerde ester formda (özellikle retinol palmitat) depolanır. Retinol A vitaminin transport ve depo formu olmasının yanında ana diyet kaynağıdır. Dolaşıma geçtiğinde retinol ester/karaciğerdeki depo formunun salınımından sonra retinol, retinol bağlayan protein (RBP) ve transtretine bağlanarak taşınır (1).

Retinolün nükleer reseptörlere bağlanan biyolojik olarak aktif ligandı atra'ya dönüştüren temel hücre sel yol iki basamaklı bir işlem den ibarettir. Reversible yolla retinol (A vitamini alkol), retinaldehide (A vitamini aldehid) oksidize olur, sonra irreversible olarak retinoik aside (A vitamini asit) dönüşür. Sitolik RBP olarak tanımlanan bağlayıcı

protein uygun enzimleri retinole ulaştırarak bu enzimatik reaksiyonları kolaylaştırır. İntraselüler olarak retinoik asit hem all-trans, hem de 9-cis konfigürasyonunda bulunur. at-RA aktif ligand olup retinoik asitin moleküler ve hücresel etkilerini en azından bir bölümünde rol oynayan, bilinen 3 nükleer RAR 'a bağlanır.



(1).© 2003 Elsevier - Bologna, Jorizzo and Rapini: Dermatology - www.dermtext.com

Şekil 2. Retinoidlerin metabolizması (1)

(RE, retinil esterler; RBP, retinol bağlayıcı protein; CRBP, hücresel retinol bağlayıcı protein; LRAT, lesitin retinol açil transferaz; ARAT, açil-CoA:retinol açil transferaz; REH, retinil ester hidrolaz; RA, retinoik asit; CRABP, sitozolik retinoik asit bağlayıcı protein; RAR, retinoik asit reseptör; RXR, retinoid X reseptör; VDR, vitamin D3 reseptör; TR, tiroid reseptör; PPAR, peroksizom proliferasyonunu aktive edici reseptör.)

2.1.3. RETİNOİD RESEPTÖRLERİ

Retinoidlerin fizyolojik etkileri RAR (retinoik asit reseptörleri) ve RXR (retinoid X reseptörleri) reseptörleri ile düzenlenir. Bu iki reseptör nükleer reseptör ailesinden olup ligand bağımlı transkripsiyonu düzenlerler. RAR ve RXR'nın 3 farklı reseptör isotipi (α, β, γ) identifiye edilmiştir. RAR ve RXR reseptörlerinin bulunduğu nükleer reseptör ailesinde steroid, D3 vitamini, tiroid reseptör hormonları yanında peroksim proliferatör aktive eden reseptörler bulunur ve bu reseptörler ligand aktive eden transkripsiyon faktörleri olarak rol oynarlar (6). RAR, RXR ile heterodimer olarak fonksiyon gösterir, oysa RXR homodimer olarak rol oynayabilir ya da D3 vitamini, tiroid hormonu ve peroksim proliferatör aktive eden reseptör gibi çok sayıda diğer nükleer reseptörlerle heterodimer oluşturmak üzere birleşebilir. Retinoid reseptörlerinin dimerleri (RAR/RXR ya da RXR/RXR) nükleusta lokalize olup hatta bir liganda bağlı olmadığı durumda bile retinoid duyarlı genlerin promotor bölgesindeki spesifik DNA düzenleyici alanlara (retinoid asit yanıt elementi; RARE) bağlanabilir (1).

Retinoidler RAR ve RXR ile gen transkripsiyonunu iki farklı yoldan hem direkt, hem de indirekt olarak etkiler. Direkt etki transkripsiyonu aktive eden hedef genlerin promotor bölgelerinde bulunan retinoid hormon yanıt elementlerine (retinoid asit yanıt elementi; RARE) retinoidlerin bağlanmasıyla gerçekleşir. Diferansiyasyon etkilerinin bazıları direkt etki mekanizması aracılığı ile oluşmaktadır.

Retinoidlerin indirekt etkilerinde ise tam tersine promotor bölgelerinde RARE içermeyen genlerin down regülasyonu sonucunda olur. Retinoid reseptör kompleksi, proliferatif ve enflamatuar yanıtla ilgili olan aktivatör protein 1 (AP1) ya da nükleer faktör–interlökin 6 (NF-IL6) gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon aktivitelerini antagonize ederek diğer genlerin ekspresyonunu azaltırlar (10).

| | | |
|---------------------------------|---|---|
| FDA Onaylı endikasyonlar | Psoriasis (asitretin) | Püstüler psoriasis, eritrodermik psoriasis, ciddi ve inatçı psoriasis |
| | Akne (isotretinoin) | Nodülökistik akne, skar eğilimi olan akne |
| | Kutane T hücreli lenfoma (bekсарoten) | En az bir sistemik tedaviye dirençli |
| FDA Onayı Olmayan Endikasyonlar | Rozasea ve Akne | Hidradenitis süpürativa, Eozinofilik püstüler folikülit, AIDS asosifiye eozinofilik püstüler folikülit, Piyoderma fasyale, Saçlı derinin dissekan selülit |
| | İlişkili Dermatozlar | |
| | Keratinizasyon Bozuklukları | Farklı iktiyoz formları, Darier hastalığı, Pityriasis rubra pilaris, Keratoderma, Papillon Lefevre sendromu |
| | Neoplastik gelişimin Kemoproflaksisi | Kseroderma pigmentosum, Nevoid bazal hücreli karsinom sendromu, Solid organ transplant hastalarında |
| | Neoplastik hastalıkların tedavisi | Epitelyal prekanseröz tablolar, Bazal hücreli karsinom, İleri evre epidermoid karsinom, Keratoakantom, Kaposi sarkomu, Sebace hiperplazi, Muir-Torre Sendromu, Lökoplaki, Langerhans hücreli histiyositoz |
| Diğer Tablolar | Atrofoderma vermikülatum, Uleritem ofriyogenes, Sarkoidoz, Liken planus, Granuloma anulare, Liken sklerosus, Subkorneal püstüler dermatoz, Lupus eritematozus, Foliküler müsinöz, Bazex paraneoplastik akrokeratozu | |

Tablo 1. Retinoidlerin kullanım endikasyonları

Çok sayıda ve farklı olarak dağılmış reseptör, dimer, hormon yanıt elementi, etki mekanizması ile düzenleyici proteinlerin varlığı retinoid etkisinin çok sayıdaki farklı yollarla oluştuğu ve bir çok uyumlu regüle edilen genin kompleks aktivasyon ya da inhibisyonu ile sonuçlandığı anlamına gelmektedir. Bununla birlikte retinoidlerin birçok dermatolojik antitedeki etki mekanizması bilinmemektedir (1).

2.1.4.SENTETİK RETİNOİDLER

1.İSOTRETİNOİN (13-CİS RETİNOİK ASİT)

İsotretinoin A vitamini metabolizmasında oluşan ve doğal olarak ortaya çıkan fizyolojik bir bileşiktir. İisotretinoin önce karaciğerde sonra enterohepatik siklusta metabolize olur. İisotretinoin ve major mateabolitleri idrar ve feçesle atılır (1). 13-cis retinoik asit isotretinoinin kimyasal adıdır. İisotretinoin gebelikte kesinlikle kontrendikedir ve talidomid ile fenitoin gibi X kategorisindedir. İisotretinoin tedavisi ile %15 abort riski oluşur. İisotretinoinin malformasyon oluşturma riskinin en yüksek olduğu zamanlar konsepsiyon sonrası 15- 40. günlerdir. Kadın fertilitesi üzerine uzun dönem etkileri yoktur (11).

Bu ilk jenerasyon retinoid bazal sebositlerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve aktivitesini azaltır. Aynı zamanda isotretinoin apoptozu bu hücrelerde indükler, foliküler keratinizasyonu normalleştirir, komedon oluşumunu engeller. Sebum ekskresyon hızı birkaç hafta sonra % 80 azalır. İisotretinoin etkili bir antimikrobiyal olmamasına rağmen etkili bir şekilde propionabacterium acnes popülasyonunu foliküler mikroçevreyi modifiye ederek azaltır. Klinik sonucu önemli sayıda kist sayı ve boyutlarını azaltmasıdır (12).

Teratojenite dışındaki etkileri kaşıntı, mukokütanöz kuruluk, fasyal deskuamasyon, lipid anormallikleri, myalji, artraljidir. Bu yan etkiler A hipervitaminozunun yan etkilerine benzer. Daha az görülen etkiler hepatit, fotosensitivitedir. Nadir görülen etkiler korneal opasiteler, inflamatuvar barsak hastalıkları, başağrısı ve psikiyatrik yan etkilerdir (12, 13).İdyopatik hiperostotik değışiklikler veya tendon ve ligamentlerin kalsifikasyonu idiopatik iskelet hiperostozisi (DISH) retinoid tedavisi ile sık görülür. İskelet hiperostozisi tipik olarak keratinizasyon bozukluklarında 2 mg/kg/gün dozlarında uzun dönem kullanan hastalarda görülür. Hiperostozis genellikle geri dönüşümsüzdür. Nadiren prematür epifizyal kapanma yüksek dozlarda isotretinoin alan çocuklarda raporlanmıştır (11).

2.Tretinoin

All-trans retinoik asit (at-RA, tretinoin) doğal olarak oluşan retinol (vitamin A) metabolitidir (14). İlk kez 1962'de Stuttgart ve Beer tarafından keratinizasyon bozukluklarında, çeşitli premalign ve malign lezyonların lokal tedavisinde kullanılmıştır (15). Daha sonra tretinoin 1969'da Kligman ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada hafif ve orta dereceli akne vulgarisli olgularda kullanılmış ve son derece etkili bulunmuştur (16).

Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve embriyonik gelişim üzerine çok yönlü etkileri olan tretinoinin akne tedavisi, keratinizasyon bozuklukları, foto hasarlanmanın geriye döndürülmesi ve çeşitli malignensiler üzerine tedavi edici faydalı etkileri gösterilmektedir (14).

3.Asitretin ve Etreinat

Asitretin etretinatın major metaboliti ve farmakolojik olarak aktif bileşimidir. Etreinat asitretinden elli kat daha fazla lipofilik olup plazma proteinlerine özellikle lipoproteinler ve albumine güçlü bir şekilde bağlanır (1).

Asitretin 2. jenerasyon sistemik bir retinoiddir. Etreinat kullanımı istenmeyen farmakokinetik profili nedeniyle sınırlandırılmıştır. Asitretin tanınmasından sonra US de Mart 1998'de etretinat pazardan kaldırıldı. Asitretin epitelyal dokularda hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu uyarır. Bu etkilerini nükleer reseptörleri aktive ederek transkripsiyon genlerini regüle eder. Asitretin RAR'ın 3 isotipini de aktive ettiği gösterilmiş. Etreinatın yarı ömrü 100 gün, asitretinin ise 2 gündür. Asitretin etretinatın karboksilik asid metabolitidir. Asitretin dokulardan çok daha kolay temizlenir (3,17).

Sentetik retinoidlerin major ciddi yan etkileri teratojenitedir. Bu nedenle bu ilaçların vücutta kalma süresi oldukça önemlidir. Etreinat subkutan yağ dokuda depolanır. Asitretin negatif yüklü bir grup taşır, etretinat kadar lipofilik değildir yağ dokusunda depolanmaz ve böylece vücuttan daha hızlı atılır.

Klinik çalışmalarda gözlenen asitretin ve etretinatın farmakokinetiği ve etretinatla daha önceki güvenlik tecrübeleri ele alınarak FDA asitretin için en az 3 yıllık bir terapötik kontraseptif periyodu önermektedir. Veriler bu ajanın diferansiyasyon ve proliferasyonun normalizasyonu ile inflamatuvar cevap ve nötrofil fonksiyonunda modifikasyon gibi etkilerinin olduğunu desteklemektedir (1).

Asitretinin antipsoriatik etkileri; nükleer reseptörlere bağlanarak hücrel farklılaşma, antiproliferasyon, antiinflamasyon, antikeratinizasyon ve nötrofil kemotaksisini inhibe ettiği düşünülmüyor (3,17).

Asitretin, lokalize ve jeneralize püstüler psoriasis, şiddetli ve tedaviye dirençli plak tip psoriasis, eritrodermik psoriasis tedavisinde FDA tarafından onaylanmıştır (1,18).

Asitretinin farklı psoriasis tiplerindeki etkinliği çalışmalarla gösterilmiştir. Murray ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 63 hastaya 50 mg/gün asitretin verilmiş ve 4 hafta sonunda PASI 75, 12 hafta sonunda ise PASI:34 değerine dşmştir (19). Püstüler psoriazisli hastalara genellikle 50 – 75 mg gibi yüksek dozlarda tedavi başlanması gerekir. Lezyonlar tipik olarak 10 gün sonra geriler. Pstlasyon geriledikten sonra düşük dozda devam edilmelidir (3). Pediatrik populyasyonda asitretinin etkinliği ve güvenilirliği henüz kanıtlanmamıştır. Pediatrik populyasyonda yapılmış çalışma yoktur (20).Asitretin kseroderma pigmentozum, immunsupresyon gibi predispozan durumu olan hastalarda yeni deri kanseri gelişimini önler (21).Asitretinin yan etkileri diğer sistemik retinoidlere benzerdir. En önemli yan etkisi teratojenitedir. Diğer yan etkileri, keilit, kserozis, retinoid dermatiti, alopesi, onikoreksis, myalji, artralji, psödotümör serebridir. Prematür epifizyal kapanma çocuklarda görülebilir. Diffüz idyopatik iskelet hiperostozisi (DISH) asitretinden çok isotretinoin ile görüldüğü raporlanmıştır. Bu etkilere ek olarak hiperlipidemi, hepatotoksisite, laboratuvar anormallikleri görülebilir (3,17).

4.Adapalen

Adapalen lipofilik özellikleri nedeniyle pilosebase ünite tarafından selektif olarak tutulur böylelikle hem sistemik abzorbsiyonu azalır hem de aktivitesine katkı sağlanır. Absorbe olan adapalen hepatobiliyer yoldan atılır. Teratojenite riski minimaldir (1). Topikal retinoidler foliküler epitelin deskuamasyonunu normalleştirir, yeni mikrokomedonların yani prekursor lezyonların oluşumunu önler. Böylece komedonların ve inflamatuvar akne lezyonlarının her ikisini de en aza indirir (13).Topikal retinoid kullanımı, antibiyotiklere karşı direnc gelişimini azalttığı icin antibiyotiklerle kombine kullanımı önerilmektedir. Adapalen nc nesil retinoiddir ve naftoik asit derivesidir. Topikal uygulamalarda tretinoinden daha az iritandır (22).

5.Tazaroten

Tazaroten nc ilaç olup deri esterazları ile hızlı bir şekilde aktif metabolit olan serbest karboksilik asit formuna dönüşür. Hızlı metabolizması nedeniyle sistemik etkisi düşüktür.

Tazaroten, retinoid sorumlu genlerin ekspresyonunu düzenleyerek psoriyazis patogenezi hafifletir. Bu genlerin yer aldığı durumlar şöyledir (1).

1-Hücre proliferasyonu

2-Hücre diferansiasyonu

3-İnflamasyondur.

6.Beksaroten

Spesifik RXR selektif retinoid olan beksaroten kutane T hücreli lenfoma tedavisi için 1999 da ABD de onaylanmıştır. Beksaroten plazmada henüz yeterince bilinmeyen çok sayıda proteine yüksek oranda bağlıdır. Beksaroten 7-9 saatlik terminal yarılanma ömrü ile isotretinoine benzer bir klirens profili gösterir (1)

2.2.Büyüme Plağı

Kıkırdak dokusu esas olarak hücre, lif ve temel maddeden (hücrelerarası amorf madde) meydana gelmiştir. Lif ve hücrelerarası maddenin oluşturduğu yapıya matriks (intersellüler substans veya ekstrasellüler matriks) adı verilir. Matriks proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan zengin olup PAS veya Toluidin mavisi gibi özel yöntemlerle belirlenebilir. Yapıdaki proteoglikanlar kıkırdağın sertliğini sağlarlar. Kıkırdak hücrelerine kondrosit, bunların yerleştikleri kavuklara laküna adı verilir. Kıkırdak dokusu etrafını perikondrium denen sağlam fibröz bir bağ dokusu kılıfı sarmaktadır. Bu kılıf ayrıca kıkırdak metabolizması için gerekli olan bir yapıdır. Organizmada içerdiği liflere göre 3 tür kıkırdak bulunur; hyalin kıkırdak, elastik kıkırdak, fibröz kıkırdak (23).

Büyüme plağı veya epifizyal büyüme plağı mezoderm kaynaklı ileri derecede özelleşmiş bir kıkırdak yapısıdır. Uzunlamasına kemik büyümesinden sorumludur. Puberte sonrasında, kıkırdak hücrelerinin bölünmesi azalır ve kıkırdağın yerini tamamen kemik olarak, primer ve sekonder ossifikasyon merkezleri birleşir ve büyüme plağı kapanmış olur (24).

2.2.1. KIKIRDAK FARKLILAŞMASI

Kondrosit farklılaşmasının 4 major evresi vardır (25)

1. Mezenkimal prekürsör hücreler (MPCs),
2. Prekondrositler
3. Erken kondroblastlar
4. Terminal farklılaşmış kondrositler

Kıkırdak oluşumunun başlangıç basamağı, MPC"lerin 12-15/1000 μm^2 olacak şekilde yoğunlaşmasıdır. Mezenkimal prekürsör hücreler bölünürler ve prekondrositleri oluştururlar. Bu değişim N-Catherin ve glikozaminoglikan varlığına bağlıdır (26). Farklılaşan hücreler Sox

ailesi genlerini yüksek oranda eksprese ederler. Sox genleri, kollajen tip 2A1, 9A1 ve 11A2 sentezini regüle eder. Prekondrositlerin farklılaşması sonucu kondroblast olarak adlandırılan, hızla çoğalabilen ve yeni kemik dokusu oluşturabilen aktif kondrojenik hücreler ortaya çıkar. Kondroblastlar farklılaşmanın devamı için Sox eksprese etmeye devam eder (27).

Prekondrosit farklılaşması sonucu sonraki evre, erken kondroblastlar oluşur. Erken kondroblastlar, düz bir şekil alırlar ve kemiğin uzunlamasına kolonlar şeklinde organize olurlar ve hızla çoğalarak kıkırdak büyüme plağını geliştirirler. Buradaki hücreler daha sonradan bölünmelerinin durmasıyla farklılaşma dönemine geçer ve hipertrofik zonu oluştururlar. Hipertrofik zondaki hücreler farklılaşarak daha önceki hücrelerden 6-10 kat daha uzun hale gelirler ve bu durum uzunlamasına büyümenin en önemli fazıdır. Hipertrofik zon kondrositleri ekstrasellüler matriks ve kemik hücrelerinden salınan faktörlerin etkisiyle kan damarları ve vasküler endotelial büyüme faktörlerinden etkilenmeye, böylelikle de kalsifiye olarak kemik dokusuna dönüşmeye başlar. Büyüme plağı kondrosit proliferasyonu ve uzunlamasına kemik gelişim hızı yaş ile birlikte azalır. İntrensik faktörlerin etkisiyle büyüme plağının fonksiyonu ve selülaritesi azalmaya başlar. İnsanlarda seksüel olgunlaşmanın tamamlanmasıyla büyüme plağı kondrositlerinin proliferatif kapasitesi azalır ve bu durum epifizyal füzyon olarak adlandırılır (28).

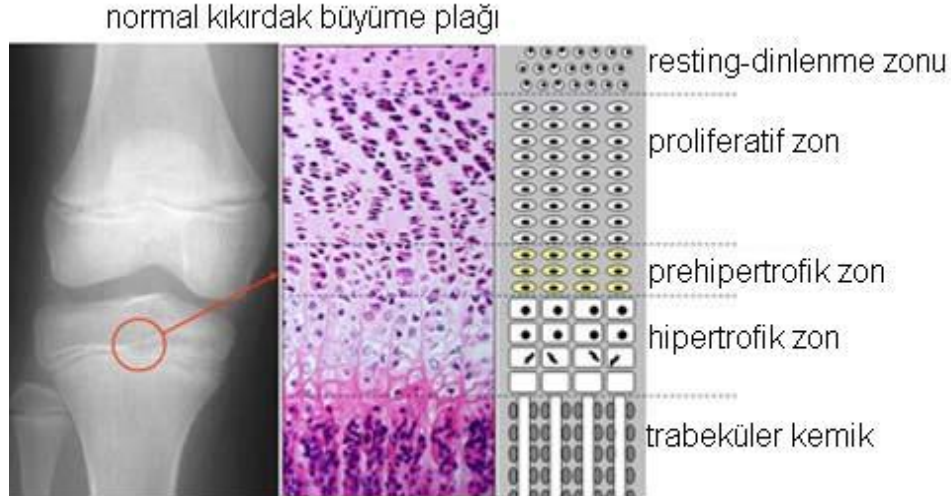
2.2.2.BÜYÜME PLAĞI MORFOLOJİSİ VE FİZYOLOJİSİ

Büyüme plağı resting zon (reserve zon, germinal zon, dinlenme zon), proliferatif zon ve hipertrofik zon olmak üzere üç zondan (şekil) oluşur. Resting zon hücreleri küçük, uniform, lipid ve vakuollerden zengin hücrelerdir. Resting zonda ekstraselüler matrixin hücre hacmine oranı fazladır. Resting zonda proliferasyon hızı ile proteoglikan ve Tip-2B kollajen sentezi düşüktür (24,29).

Resting zonun devamında ikinci tabaka olan proliferatif zon başlar. Buradaki kondrositler düz ve kemiğin uzunlamasına kolonlar halinde dizilmişlerdir ve hızla bölünürler (24). Mitotik aktivite sadece kolonların bazalinde vardır. Bu tabakada tip2 ve tip11 kollajen sentezi artmıştır. Proliferatif zonun altında hipertrofik zon vardır. Hipertrofik zondaki kondrositlerin en önemli karakteristiği hücre bölünmesinin olmaması ve DNA sentezinin azalmasıdır (25).

Hücreler çoğalma yerine ekstraselüler matriksin (ECM) çeşitli elemanlarını yüksek miktarda sentezlerler. Kısa zincirli kollajen içeren tek zondur. Alkalen fosfatın (ALP) sentez edildiği ilk zondur. ALP kalsifikasyon için gerekli fosfat iyon düzeyini arttırarak,

büyüme plağının genişlemesinden sorumludur. Bu zondaki kondrositler diğer zonlara göre oldukça büyüktürler ve farklılaşarak şişerler.



Şekil 3. Büyüme plağı zonları

Trabeküler kemiğe (Primer spongiosa zon) yaklaşıldıkça dejenerasyona uğramış hücre miktarı artar ve kondrositler hücrelerarası bileşkeleri kaybedip ECM tarafından oluşturulmuş özel yerlerde lokalize olurlar (24).

Major fenotipik değişiklik kondroblastlar prehipertrofik ve hipertrofik kondroblastlara dönüştüğünde olur. Stoplazmik hacim 10 kat artar ve erken kıkırdak matrisi genleriyle ilgili mRNA düzeyi artar. Hücreler şişerken mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi organellerin miktarında da artış olur (30) Trabeküler kemik (Primer spongiosa zon), osteoprogenitör hücrelerin varlığıyla karakterizedir ve küçük kan damarları görülebilir (24).

Büyüme plağı erken dönemde avaskülerdir ve epifizin metafiz tarafındaki vasküler yapılardan difüzyon aracılığıyla ihtiyacı olan besinleri ve oksijeni alır. Vasküler yapılar, kalsifiye kıkırdak ile hipertrofik kondrositlerin en alt sırası arasında yerleşmiştir. Hipertrofik kondrositlerden salınan VEGF (vasküler endotelial growth faktör), vasküler yapıların büyümesindeki anahtar faktördür (31).

2.2.3.FARKLILAŞMANIN DÜZENLENMESİ

Hipertrofik hücreleri elimine etmenin iki mekanizması vardır. Bunlardan biri hücrelerin öldüğü apoptozistir. İkinci mekanizma ise olgun kondrositlerin kemik yapıcı hücrelere veya osteoblastlara dönüştüğü transdiferansiyasyon işlemidir (31).

Apoptozis gelişmekte olan büyüme plağında oluşmaktadır. Resting zondaki kondrositler aktif proliferasyona girdikten sonra farklılaşmaya başlarlar. Bu olayları takibinde apoptozis ve mineralizasyon gerçekleşir.

2.3.KEMİK METABOLİZMASI

Kemik, kalsiyum tuzlarının çökmesiyle güçlenen sert organik bir matriksten ibarettir. Kompakt kemikte ağırlığın %30 kadarı matriks, %70 kadarı tuzlardan oluşur. Kemiğin organik matriksi %90-95 kollajen liflerden, geri kalanı da ana madde denilen homojen jelatinöz bir ortamdan ibarettir. Kollajenler başlıca kemiğin kuvvet çizgileri boyunca uzanır. Ana madde ekstraselüler sıvı ile proteoglikanlardan, özellikle kondroitin sülfat ve hiyalüronik asitten oluşur. Kemiğin tuzları ise başlıca kalsiyum ve fosfattan ibarettir (32).

A vitamini (retinol) retinil ester veya karetonoidler olarak diyetle alınır ve aktif metabolitlerine ayrıştırılır. Bunlardan 11-cis retinol görmede önemliyen ATRA A vitamininin primer olarak biyolojik etkilerine aracılık eder. A vitamini kemik hücresi fonksiyonları dahil birçok hücresel fonksiyonda etkin rol oynar. Ancak yüksek A vitamini seviyelerinin iskelet kırılabilirliği ile sonuçlanan kemik üzerinde zararlı etkileri anlaşılmıştır. Kemik kütlesi kemik erimesi ve kemik oluşumu arasındaki dengeye bağlıdır. Kemik kütlesindeki bir azalma resorpsiyonun artması veya kemik yapımının azalması sonucu oluşur. Bazı çalışmalarda A vitamininin kemik resorpsiyonunu arttırdığı gösterilmiş, yakın zamanda yapılan çalışmalarda ise A vitamininin kemik yıkımı ile ilgili olan osteoklastların oluşumunu stimüle ettiği gösterilmiştir (33).

2.3.1.KALSİYUM METABOLİZMASI

Kalsiyum (Ca) iskelet mineralizasyonunda ve birçok biyolojik fonksiyonlarında önemli rol alır Bu element vücuda sadece diyet yoluyla alınmaktadır. Normalde erişkin insan vücudunda 1-2 kg kadar kalsiyum vardır ve bunun %99'u kemikte hidroksi apatit kristalleri şeklinde bulunur ve bu kalsiyum iskeletin mekanik dengesini temin ettiği gibi, ekstraselüler sıvıdaki (ESS) Ca⁺⁺ konsantrasyonunun devamını sağlar. Kemikteki Ca un 2 iki görevi vardır; iskeletin gücünü sağladığı gibi, intraselüler ve ekstraselüler Ca havuzlarının devamını temin için dinamik bir depo görevi görür. Ca ekstraselüler ve intraselüler sinyalizasyonda, sinir uyarı transmisyonda ve kas kontraksiyonları gibi önemli fonksiyonlarda rol oynar. Kandan kemiğe ve kemikten kana günde 250-500 mg gibi oldukça fazla Ca geçişleri olur. Kanda total Ca konsantrasyonu normalde 8.5-10.5 mg/dl (2.2-2.6 mmol) olup bunun %50'si ionizedir, geri kalanı iyonik olarak negatif yüklü proteinlere esas

olarak da albumin ve immunglobulinlere bağlanır veya PO₄, CO₃, sitrat, SO₄, okzalit veya diğerk anyonlarla gevşek olan kompleksler yapar (34).

Kalsiyum homeostazı; barsak, böbrek ve kemikteki kalsiyumun transportunu kontrol eden integre bir hormonal sistemle temin edilir. Bu kalsiyum regule edici sistem 2 ana hormon ve onların reseptörleri sayesinde yapılır: Kandaki PTH ve PTH reseptörü, 1,25 (OH)₂ D ve vitamin D reseptörü, iyonize Ca ve kalsiyum algılayıcı reseptör bu integre sistemi oluştururlar. Kan iCa u direkt olarak PTH'yı, paratiroid kalsiyum algılayıcı reseptörü aktive ederek süprese eder, iCa ayrıca PTH salgısını 1,25(OH)₂ D yapımı üzerinden indirekt olarak etkiler. Bu inhibitör etki, aktif D vitamini metabolitinin henüz anlaşılmamış bir mekanizma ile negatif geri tepim mekanizması ile oluşur (32).

2.3.2.D VİTAMİNİ METABOLİZMASI

Vitamin D vücutta kemik mineralizasyonu yanı sıra hücre membran depolarizasyonunda da görev alır. Gerek diyet ile alınan, gerekse cilt-altı yağ dokusunda ultraviyole ışınlarının etkisiyle provitamin D₃'ten (7-dehidrokolesterol) endojen olarak sentezlenen vitamin D önce karaciğerde bir sitokrom P450 enzimi olan 25-hidroksilaz ile 25-hidroksivitamin D'ye, daha sonra böbrek proksimal tubuluslarında bulunan 1- α -hidroksilaz enzimi ile 1,25(OH)₂D'ye (kalsitriyol) dönüştürülür. Bu son ürün aktif D vitamini olup, kalsiyum ve fosfor metabolizması ile kemikleşme sürecinde aktif rol oynar (35).

Vitamin D metabolitleri sistemik kalsiyum homeostazisinde, barsak, böbrek ve kemikteki etkileri ile önemli rol oynar. Kalsitriol molar bazda en güçlü olan metabolittir. Kalsitriol, oral olarak alınmış olan Ca un aktif olarak barsaktan absorpsiyonunu, ve tubuler reabsorpsiyonunu Vitamin D reseptörleri üzerinden sağlar ve normal fizyolojik serum Ca düzeylerinin idamesini temin eder. D vitamini olmadığında diyetdeki kalsiyumun sadece %10-15'i ve fosforun %60'ı barsaktan emilir (34).

1,25 (OH)₂ D vitamini protein sentezi ve PTH varlığını gerektiren bir işleme kemikten kalsiyum ve fosfat serbestleşmesini uyarır. Sonuç plazma kalsiyum ve fosfatında artmadır. Bu nedenle kemik, plazma kalsiyum düzeyini sürdürmek için önemli bir kaynaktır. D vitamini eksikliği çocuklarda rikets erişkinlerde osteomalaziye yol açan kemik demineralizasyonuna neden olur. Osteomalazide önceden bulunan kemiklerin demineralizasyonu kırığa duyarlılığı arttırır (36).

Bir çalışmada artmış A vitamini alımının D vitamini konsantrasyonunu azaltarak kemik kırılabilirliğini arttırdığı gösterilmiştir. Prospektif randomize bir çalışmada 40 kişiye günlük 7576 mikrogram/gün retinol palmitat verilmiş. 40 kişi ise kontrol grubu olarak kabul edilmiş. 2., 4., ve 6. haftalarda serum kemik turnover markerlarında hiçbir değişiklik gözlenmemiş (33).

2.3.3.PARATIROID HORMONU

Uzun yıllardan beri paratiroid bezi aktivitesinin artması ile kemikten kalsiyum tuzlarının hızla absorpsiyona uğradığı ve sonuçta ekstraselüler sıvıda hiperkalsemi olduğu bilinmektedir. Bunun aksine paratiroid bezlerinin hipofonksiyonu ise hipokalsemiye ve sıklıkla tetaniye neden olur. Paratiroid hormon, kalsiyum metabolizması için olduğu kadar fosfat metabolizması için de önemlidir. Paratiroid hormonun kemikten kalsiyum ve fosfat absorpsiyonuna neden olan iki ayrı etkisi vardır. Bunlardan ilki dakikalar içinde ortaya çıkar ve birkaç saat boyunca giderek artar. Bu dönemin mevcut kemik hücrelerinin kalsiyum ve fosfat absorpsiyonunu arttırmalarına bağlı olduğuna inanılmaktadır. İkinci dönem ise daha yavaş olan ve tam gelişmesi için günler hatta haftalar gerektiren dönemdir. Bu dönemde kemikten kalsiyum fosfat absorpsiyonundan ziyade kemiğin osteoklastik resorpsiyonunda artış izlenmektedir (32).

2.3.4.OSTEOKALSİN

Osteokalsin osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteindir. Kemikte en bol bulunan nonkollajenöz protein olup kemige oldukça spesifiktir. Osteokalsin, kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bir proteindir. Osteokalsin gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur. Osteokalsin sentezi, vitamin D aracılığıyla olur. Vitamin D, osteokalsin gen transkripsiyonunu regule eder. Osteokalsin, mineral depolanmasında ve kemiğin remodellinginin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu peptidin kan düzeylerinin tespiti metabolik hastalıklarının tanısında; kalsitonin, vitamin D3 ve kalsitriol tedavisinin etkinliğinin değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır (37).

2.3.5.KEMİK ALKALEN FOSFATAZ

Alkale fosfatazın kemik spesifik izoenzimi olan bone alkale fosfataz (BAP) osteoblast membranına yerleşik bir protein olup osteoblast aktivasyonu varsa dolaşıma salınır. BAP'ın ölçümü, kemik dışı patolojilerden daha az etkilenir ve kemik oluşumunu değerlendirmede iyi bir markerdir. Osteoporoz tanısı için osteoblastlardan kaynaklanan bu enzim fraksiyonunu ölçmek gereklidir. 13 ile 17 yaşları arasındaki çocuklarda total alkale fosfataz düzeyinin

%87'sinin kemik izoenzimine, %8.5'unun karaciğer izoenzimine, %1.5'unun barsak fraksiyonuna ait olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla serum total alkalin fosfataz düzeyleri eğer karaciger-safra bozukluklan dışlanabilirse sadece kemik yapımının bir indeksi olarakta kullanılabilir (37).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER:

Çalışma Grupları:

Çalışma için Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından B.30.2.YYÜ.0.05.06.00/300 sayı numarası ile etik kurul izni alındı ve çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından 2012-TF-U039 proje numarası ile desteklendi. Çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Denepleri Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmada ağırlıkları 250-300 gram arasında değişen standart laboratuvar yemi ile beslenen 30 adet Wistar albino türü 15 erkek ve 15 dişi rat kullanıldı. Ratlar 4-8 haftalık olup beşerli kafeslerde oda sıcaklığında tutuldu. Deney hayvanlarına normal su gibi uygun diet verilerek ve 12 saatlik aydınlık-karanlık sıklüsleri oluşturularak yaşamları sağlandı. Denekler her grupta 10 adet rat olacak şekilde 3 grup oluşturuldu.

Deneyisel çalışmada ratların gruplandırılması

1. Grup (n=10): 10 mg/kg/g asitretin verilen rat (5 erkek,5 dişi rat)
2. Grup (n=10): 3 mg/kg/g asitretin verilen rat (5 erkek, 5 dişi rat)
3. Grup (n=10): Sadece standart yem ve su verilen kontrol grubu (5 erkek, 5 dişi rat)



Resim 1. Çalışmaya alınan ratlar

Asitretin verilmesi:

Asitretin (Neotigason CAPSULE®, Actavis, Portekiz) 10 mg ve 25 mg kapsül içinde piyasada mevcuttur. Grup 1 için 20 mg kapsül 5 ml deiyonize su içinde seyreltilerek 10mg/kg/gün dozda verildi. Grup 2 için 10 mg kapsül 10 ml deiyonize su içinde seyreltilerek 3mg/kg/gün dozda verildi. Soeta ve ark.nın yaptığı çalışmaya (38) benzer şekilde karışım deiyonize su içinde hazırlandı. Cam şişede hazırlanan karışım UV den muhafaza etmek için alüminyum folyo ile sarıldı. İnsülin enjektörü kullanılarak Grup 1 ve Grup 2 de uygun dozda seyreltilmiş asitretin çözeltisi günde bir kez oral olarak 4 hafta süre ile verildi.



Resim 2. Asitretin çözeltisinin verilmesi

Kontrol grubu:

Kontrol grubuna standart yem ve su verildi.

3.2. ÇALIŞMANIN YAPILMASI

Çalışmaya başlama ve takip:

Çalışmaya 22 Ocak 2013 tarihinde başlandı ve 4 hafta sonunda tamamlandı. Tedavi ve takip sırasında; grupların hiçbirinde oral tedavi sonrasında kusma olmadı. Ratların hiçbirinde saldırgan davranış tespit edilmedi.

Kan alınması:

Çalışmanın 29. gününde tüm ratlara sıra ile ketamine-HCL (hidroklorür) (100 mg/kg; Ketanest 100 mg/ ml) intraperitoneal olarak uygulandı böylece ratlarda kan alma ve sakrifikasyon sırasında anestezi sağlandı. 5 cc'lik enjektör ucu ile intrakardiak girilip 2–3 cc kan alındı ve boş camlı biokimya tüplerine aktarıldı. Kanlar 4.500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant, ependorf tüplere konulup folyo ile kapatıldı. Rat serumları çalışılması için Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderildi. Hayvanlar kanın vücuttan uzaklaştırılması (eksanguinasyon) suretiyle sakrifiye edildi.



Resim 3. Kan alınması



Resim 4. Çalışılan kanlar

Tibiaların çıkarılması:

Tüm ratların her iki tibiası eksize edildi. %10 formaldehit içinde bırakıldıktan sonra Yüzüncü Yıl Üniversitesi Patoloji Laboratuvarında çalışılmak üzere saklandı.



Resim 5. Tibiaların eksize edilmesi



Resim 6. Eksize edilmiş tibialar

Serum değerlerinin ölçülmesi:

Serumlar Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. Serum kalsiyum, magnezyum, fosfor değerleri Roche Diagnostic COBASc501 Japan cihazında (HITACHI High Technologies Corporation,

Tokyo, Japan) fotometrik olarak ölçüm yapıldı. Rat 1,25-OH D vitamini (CSB-E13342r numaralı Cusabio marka ELISA kiti, Japan) çalışıldı. Rat 25-OH D vitamini (CSB-E08098r numaralı Cusabio marka ELISA kiti, (Japan) ile çalışıldı. Rat BALP CSB-E11865r numaralı Cusabio marka ELISA kiti, (Japan) ile çalışıldı. Rat PTH CSB-E07866r numaralı Cusabio marka ELISA kiti, (Japan) ile çalışıldı. Rat osteokalsin CSB-E05129r numaralı Cusabio marka ELISA kiti, (Japan) ile çalışıldı.

3.3. Epifiz Plağının Histopatolojik İncelenmesi

Yüzüncü Yıl üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edilen rat tibiaları formik asit ile dekalsifiye edildi. Işık mikroskopunda incelenmek üzere otomatik vakumlu doku takip cihazında takibe alındı. Parafin bloklara gömüldü. Dört mikron kalınlığında kesitler alındı. Lamlara alınan bu kesitler histopatolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin, Toluidin Blue ve Masson Trichrom ile boyandı.

En sonunda lamların üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu altında 40'lık objektifte incelemeye alındı. Değerlendirmelerde epifizyal büyüme plağındaki dinlenme zon, proliferatif ve hipertrofik zonlar ölçüldü. Her bir kemik rudimentinden kemiğin uzun eksenine paralel birbirlerinden 30 mikron uzaklıkla üç kesit aldık. Daha sonra üç kesitin ortalama değeri hesaplandı.

Kıkırdaklarda Kollajen 1 ve 2 boyamaları Kırıkkale Üniversitesi Biyoloji laboratuvarında yapıldı. Tip 10 kollajen ile yapılan boyamada kıkırdak ve kemik dokuda boyanma gösterilemedi. Proximal tibialar Tip 1 ve Tip 2 kollajene karşı Polyclonal Anti-COLIA1 Antibody, PA2140-2 katalog numaralı, (Boster Biological Technology-USA), Collagen II Antibody C0155-1, C0155-2, C0155 katalog numaralı (Boster Biological Technology-USA) antikolar kullanılarak immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyama işlemi sonrası değerlendirmeler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Patoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Kollajen boyanması değerlendirmeleri; boyanma yoğunluğuna göre; Boyanma yok: (-) (skor 0) , Şüpheli boyanma: (+)/(-) (skor 1), Zayıf boyanma: (+) (skor 2), Orta derecede boyanma: (++) (skor 3), Kuvvetli boyanma: (+++) (skor 4), Boyanma yaygınlığına göre; Hücrelerin %0-10'unda boyanma: (+), Hücrelerin %11-50'sinde boyanma: (++) , Hücrelerin %51-75'inde boyanma: (+++) , Hücrelerin %76-100'ünde boyanma: (++++) şeklinde değerlendirildi.

3.4.Yöntem (uygulama ve istatistiksel analiz)

Hesaplanan ölçümler istatistiksel analiz edildi. Üzerinde durulan özelliklerden sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; Ortalama, Standart Sapma, Minimum ve Maksimum değerler olarak ifade edilirken, Kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Sürekli değişkenlerin bakımından grup ortalamalarını karşılaştırmada Tek yönlü Varyans analizi yapılmıştır. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Duncan testi kullanılmıştır. Gruplar ile Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemede ise Ki-kare testi yapılmıştır. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Histopatolojik Değerlendirme Bulguları: Çalışmamızda her grupta 5 erkek ve 5 dişi rat mevcuttu. Veriler hem cinsiyetin etkileri, hem de cinsiyet bağımsız olarak değerlendirildi. Değerlendirmelerde epifizyal büyüme plağındaki resting zon, proliferatif ve hipertrofik zonlar ölçüldü. Her bir kemik rudimentinden kemiğin uzun eksenine paralel birbirlerinden 30 mikron uzaklıkla üç kesit aldık. Daha sonra üç kesitin ortalama değeri hesaplandı. Kontrol grubunun resting zon ortalama değeri: 53,75 µm düşük doz verilen grubun ortalama değeri: 58,25 µm ve yüksek doz verilen grubun ortalama değeri:62 µm olarak ölçüldü. Proliferatif zonun ortalama yüksekliği kontrol grubunda:108,75 µm, düşük doz verilen grupta:116,75 µm ve yüksek doz verilen grupta: 116,75 µm olarak ölçüldü. Hipertrofik zonun ortalama yüksekliği kontrol grubunda:100,75 µm, düşük doz verilen grupta: 75,00 µm ve yüksek doz verilen grupta: 67,00 µm olarak ölçüldü. Büyüme plağının tüm ortalama yüksekliği kontrol grubunda: 263,25 µm, düşük doz verilen grupta: 243,20 µm yüksek doz verilen grupta: 245,75 µm olarak ölçüldü. Hematoksilen- eozin ile yapılan boyamada kontrol grubu, düşük doz asitretin çözeltisi verilen ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında düşük doz ve yüksek doz çözelti verilen gruplarda kontrol grubuna göre hipertrofik zonda istatistiksel olarak anlamlı azalma vardı. Yüksek doz verilen grupla düşük doz verilen grup arasında istatistiksel olarak hipertrofik zonda anlamlı fark yoktu. Diğer zonlarda istatistiksel anlamlı bir azalma görülmedi. Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupların karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre düşük doz çözelti verilen grup ile yüksek doz çözelti verilen gruplarda resting zonda kalınlaşma olmasına rağmen bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Büyüme plağının tüm kalınlığında kontrol grubuna göre düşük doz çözelti verilen grupla yüksek doz çözelti verilen grupta azalma olmakla beraber bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupların histopatolojik incelemesinin karşılaştırılması Tablo-2’de verilmiştir

| | | N | Ort. | St. Sap. | Min. | Max. | P |
|-----------------------|------------|----|----------|----------|--------|--------|------|
| Resting zon | Kontrol | 10 | 53,75 | 13,65497 | 25,00 | 75,00 | ,279 |
| | Düşük Doz | 10 | 58,25 | 9,57790 | 47,50 | 80,00 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 62,00 | 10,19259 | 50,00 | 75,00 | |
| Proliferatif zon | Kontrol | 10 | 108,75 | 31,38582 | 50,00 | 142,50 | ,723 |
| | Düşük Doz | 10 | 116,75 | 21,53969 | 87,50 | 150,00 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 116,75 | 22,45520 | 75,00 | 150,00 | |
| Hipertrofik zon | Kontrol | 10 | 100,75 a | 13,89694 | 75,00 | 125,00 | ,001 |
| | Düşük Doz | 10 | 75,00 b | 17,67767 | 50,00 | 112,50 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 67,00 b | 16,27882 | 37,50 | 87,50 | |
| Büyüme plağı tüm zonu | Kontrol | 10 | 263,25 | 44,78420 | 175,00 | 312,50 | ,454 |
| | Düşük Doz | 10 | 243,20 | 32,93360 | 194,50 | 312,50 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 245,75 | 36,13343 | 187,50 | 300,00 | |

Aynı sütünde farklı küçük harfi alan grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.05$)

Tablo 2. Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupların histopatolojik incelemesinin karşılaştırılması.

Dişi ve erkek gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde resting zonda dişilerde kontrol grubu ile yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupta istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre kalınlaşma gözlemlendi. Proliferatif zonda erkek cinsiyette olan fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Erkeklerde kontrol grubunda proliferatif zonda dişi gruba göre anlamlı incelmeye saptandı. Hipertrofik zonda hem erkeklerde hem de dişilerde yüksek ve düşük doz çözelti verilen gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Ancak yüksek ve düşük doz verilen gruplar arasında hipertrofik zonda anlamlı fark yoktu. Büyüme plağının tüm kalınlığı hesaplandığında ise erkek ve dişi grupta azalma varken bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı azalma değildi. Masson trikrom ile yapılan boyamada anlamlı sonuçlara rastlanmadı.

Dişi ve erkek ratların kendi aralarında histopatolojik incelemelerinin istatistiksel karşılaştırılması Tablo-3'de verilmiştir.

| | | Dişi | | | | | Erkek | | | | |
|----------------------|---------|----------------------|----------|--------|---------|---------|--------------------|----------|--------|---------|---------|
| | | Mean | St. Dev. | Median | Minimum | Maximum | Mean | St. Dev. | Median | Minimum | Maximum |
| Resting zon | Kontrol | 52,50 b | 7,50 | 50,00 | 45,00 | 65,00 | 55,00 | 18,96 | 62,50 | 25,00 | 75,00 |
| | D.Doç | 53,50 b | 7,20 | 50,00 | 47,50 | 62,50 | 63,00 | 9,91 | 60,00 | 55,00 | 80,00 |
| | Y.Doç | 66,00 a | 8,77 | 62,50 | 55,00 | 75,00 | 58,00 | 10,81 | 52,50 | 50,00 | 75,00 |
| Proliferatif zon | Kontrol | 132,50 # | 8,48 | 135,00 | 122,50 | 142,50 | 85,00 | 27,10 | 87,50 | 50,00 | 125,00 |
| | D.Doç | 118,00 | 26,18 | 110,00 | 87,50 | 150,00 | 115,50 | 18,82 | 112,50 | 95,00 | 142,50 |
| | Y.Doç | 129,00 | 19,81 | 125,00 | 100,00 | 150,00 | 104,50 | 19,15 | 112,50 | 75,00 | 125,00 |
| Hipertrofik zon | Kontrol | 109,00 ^a | 11,81 | 112,50 | 95,00 | 125,00 | 92,50 ^a | 11,18 | 100,00 | 75,00 | 100,00 |
| | D.Doç | 87,50 ^{b #} | 15,31 | 87,50 | 75,00 | 112,50 | 62,50 ^b | 8,84 | 62,50 | 50,00 | 75,00 |
| | Y.Doç | 76,50 ^b | 12,94 | 82,50 | 62,50 | 87,50 | 57,50 ^b | 14,25 | 62,50 | 37,50 | 75,00 |
| Büyüme plağı tüm zon | Kontrol | 294,00 # | 15,06 | 300,00 | 275,00 | 312,50 | 232,50 | 43,84 | 225,00 | 175,00 | 287,50 |
| | D.Doç | 259,00 | 35,12 | 245,00 | 225,00 | 312,50 | 227,40 | 24,15 | 225,00 | 194,50 | 262,50 |
| | Y.Doç | 271,50 # | 21,26 | 262,50 | 250,00 | 300,00 | 220,00 | 28,78 | 225,00 | 187,50 | 262,50 |

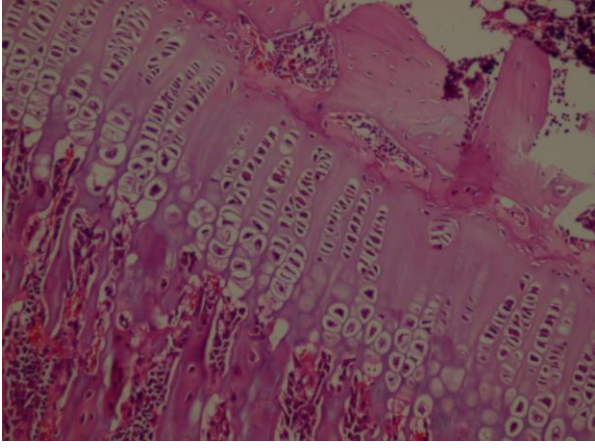
D. doz: Düşük doz asitretin verilen grup, Y.doç: Yüksek doz asitretin verilen grup

Aynı sütünde farklı küçük harfi alan grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05)

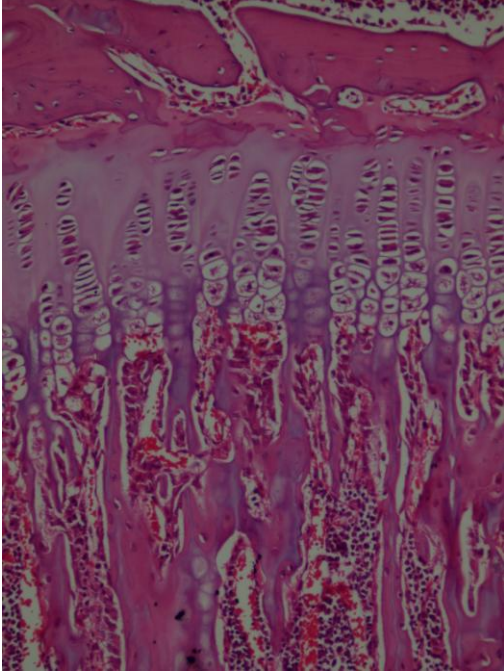
#: Erkek cinsiyetten olan fark önemlidir (p<0.05)

Tablo 3. Dişi ve erkek ratların kendi aralarında histopatolojik incelemelerinin istatistiksel karşılaştırılması

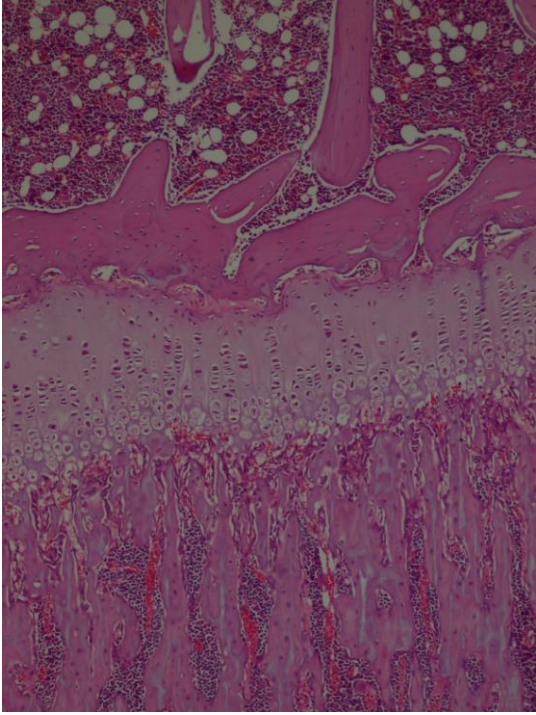
Deney gruplarının histopatolojik (Resim 7-12) preparat örnekleri ise aşağıda verilmiştir.



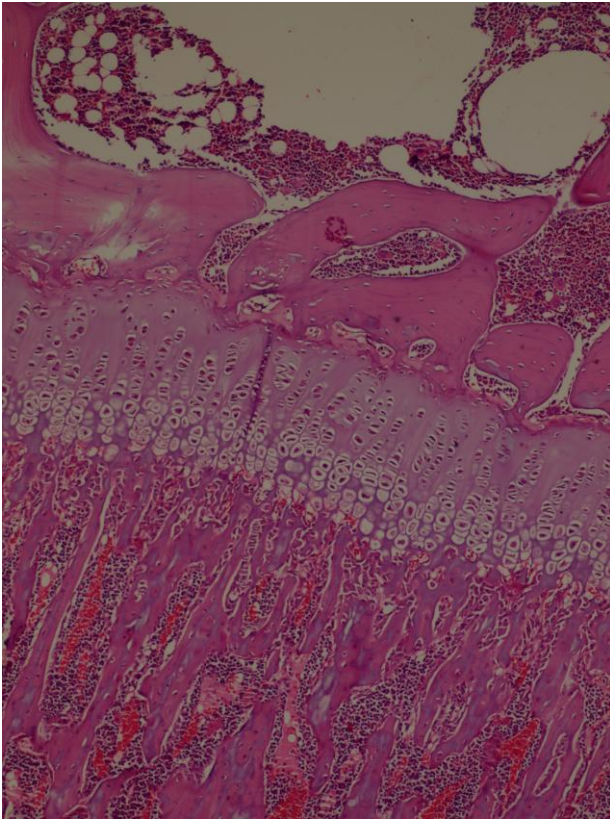
Resim 7. Kontrol grubu dişi rat. HEX200,Bar=50µm



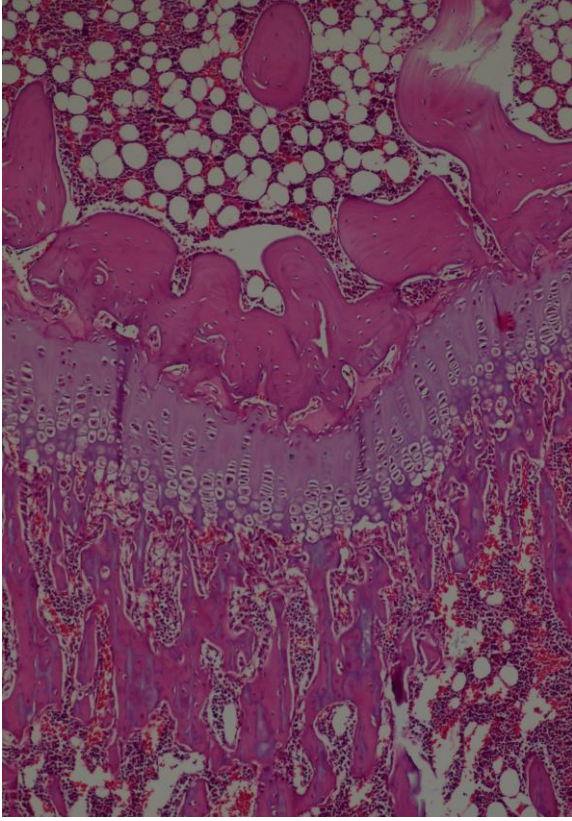
Resim 8. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen dişi rat. HEX200,Bar=50µm



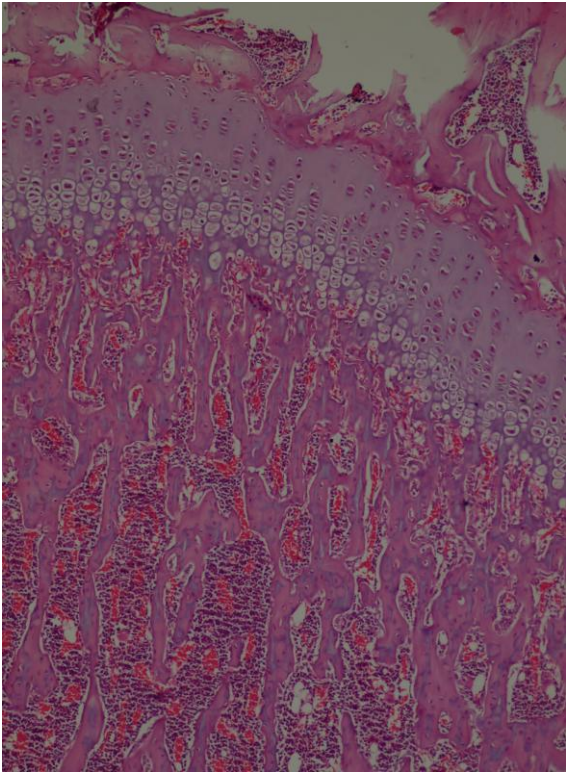
Resim 9. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen dişi rat. HEX100,Bar:100 μ m



Resim 10. Kontrol grubu erkek rat. HEX100,Bar=100 μ m

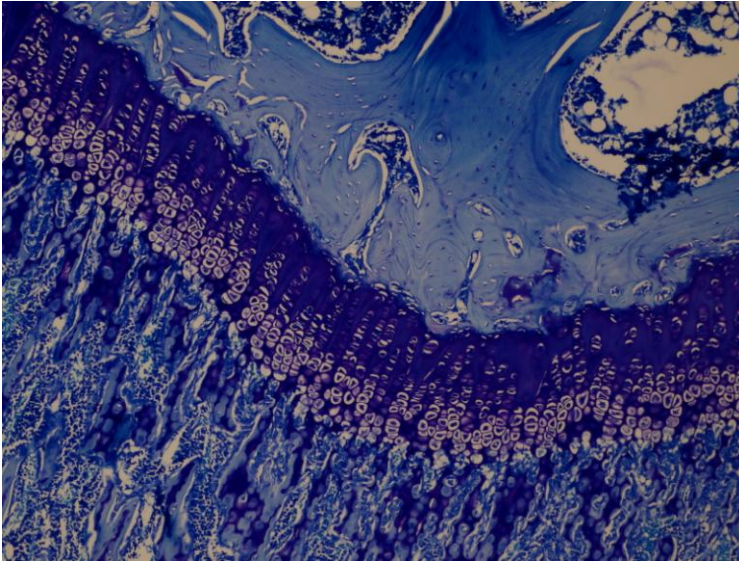


Resim 11. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. HEX100, Bar=100 μ m

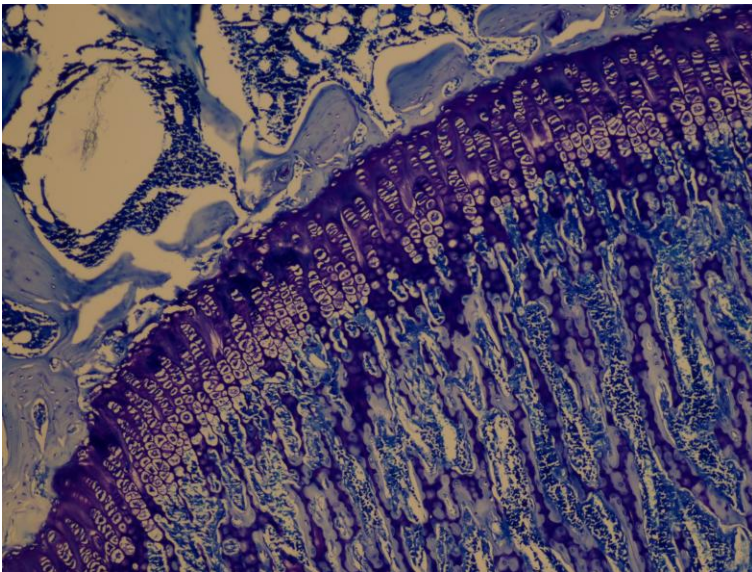


Resim 12. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. HEX100, Bar=100 μ m

Toluidin-blue ile yapılan değerlendirmede epifizyal büyüme plağındaki kondrositlerin kolumnar dizilimi kontrol grubunda % 90.9, düşük doz verilen grupta %9.1 ve yüksek doz verilen grupta %0 şeklinde belirgin azalmış ve kaybolmuştu. İrregüler kalınlaşma kontrol grubunda hiç yokken düşük doz verilen ve yüksek doz verilen her iki grupların tamamında vardı. Metakromazi artmış olanların %91'i kontrol grubunda, % 9 'u düşük doz verilen grupta ve yüksek doz verilen grupta metakromazide artma yoktu. Metakromazi azalmış olanların % 47,4 ü düşük doz verilen grup, %52.6 sı yüksek doz verilen grup idi ve kontrol grubunda azalma yoktu. Deney gruplarının histopatolojik (Resim 13-14) preparat örnekleri aşağıda verilmiştir.



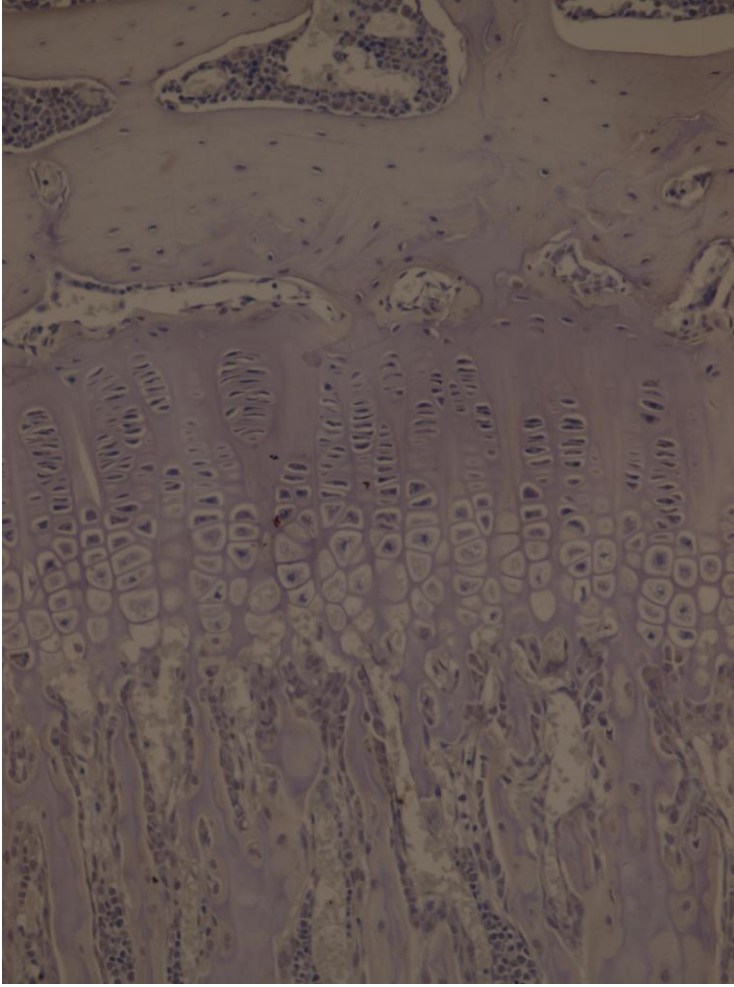
Resim 13. Kontrol grubu erkek rat. Toluidin blue boyama. Bar=100µm



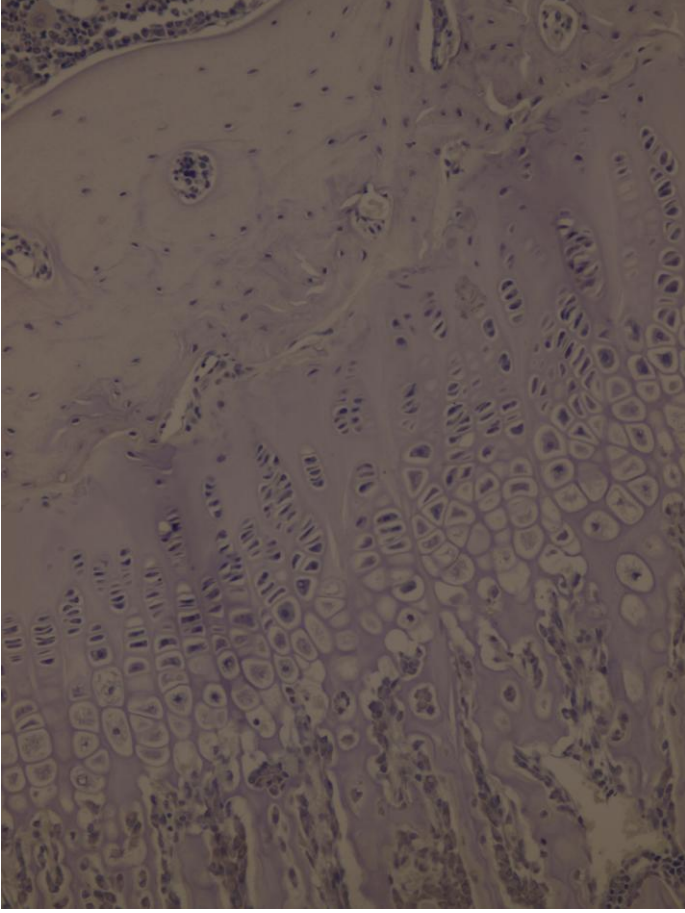
Resim 14. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen dişi rat. Toluidin blue boyama, Bar=100µm

Mason trikrom ile yapılan boyamada anlamlı sonuçlara rastlanmadı.

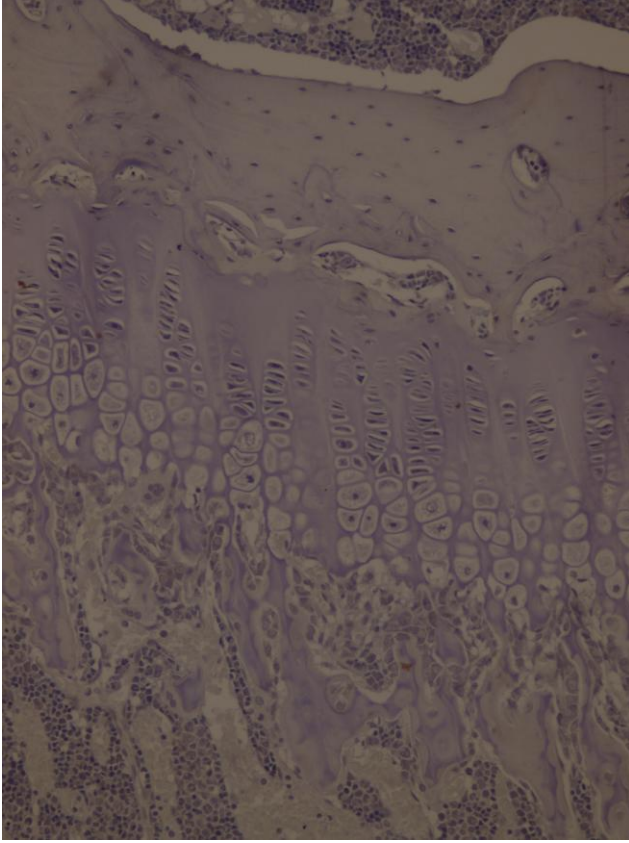
Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda kontrol grubu, düşük doz asitretin çözeltisi verilen grup ile yüksek doz asitretin çözeltisi verilen gruplarda Tip 2 kollajene epifizyal kemikte, proliferatif zon ve hipertrofik zonda rastlanmadı. Osteoid ve osteoblastlarda Tip 2 Kollajen görülmedi. Tip 1 Kollajen ise tüm gruplarda hipertrofik zonda ve proliferatif zonda hiç görülmedi. Tüm gruplarda epifizyal kemikte, osteoid ve osteoblastlarda tip 1 kollajen 4 (+++) yaygınlığında tespit edildi. Gruplar arasında Tip 1 kollajen boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu bakımından anlamlı farklılık tespit edilmedi. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen ratların epifizyal kemik, osteoid ve osteoblastlarda Tip 1 Kollajen boyamasında, hücrelerin %80'i 3 (%51-75) oranında , %10 'u 2 (%11-50) oranında ve %10'u 4 (%76-100) oranında boyandı. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen ratların epifizyal kemik, osteoid ve osteoblastlarda Tip 1 Kollajen boyamasında hücrelerin %90'ı 3 (%51-75) oranında ,%10'u 4 (%76-100) oranında boyandı. Kontrol grubundaki hayvanların epifizyal kemik, osteoid ve osteoblastlarda Tip 1 Kollajen boyamasında hücrelerin % 60'ı 3 (%51-75) oranında ,%40'ı 4 (%76-100) oranında boyandı. Boyanma yoğunluğu bakımından gruplar arasında görülen fark anlamlı değildi (p:0,230). Cinsiyetler arasında Tip 1 kollajen boyanma ve yaygınlığı açısından görülen fark anlamlı çıkmadı. Tip 10 kollajen ile yapılan boyamada kıkırdak ve kemik dokuda boyanma görülmedi. Deney gruplarının immünohistokimyasal (Resim 15-20) preparat örnekleri aşağıda verilmiştir.



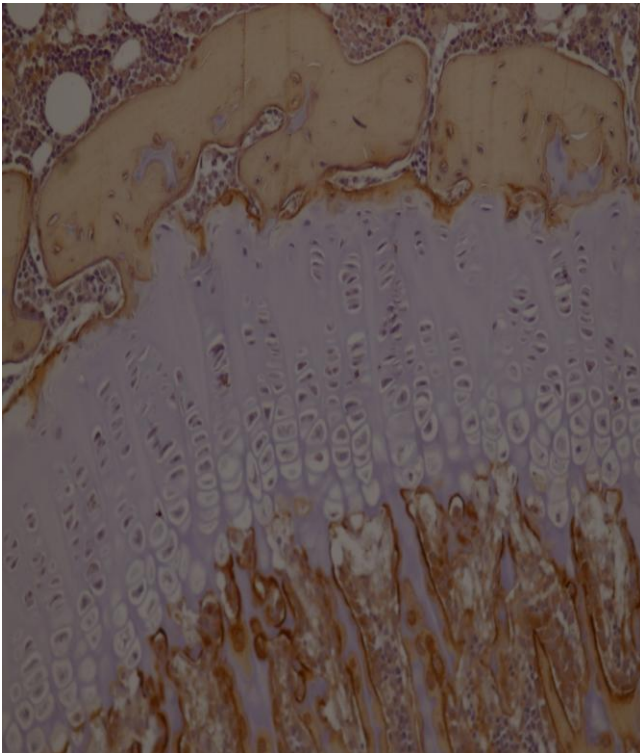
Resim 15. Kontrol grubu erkek rat. Tip 2 kollajen ile boyama x200. Bar: 50 μ m



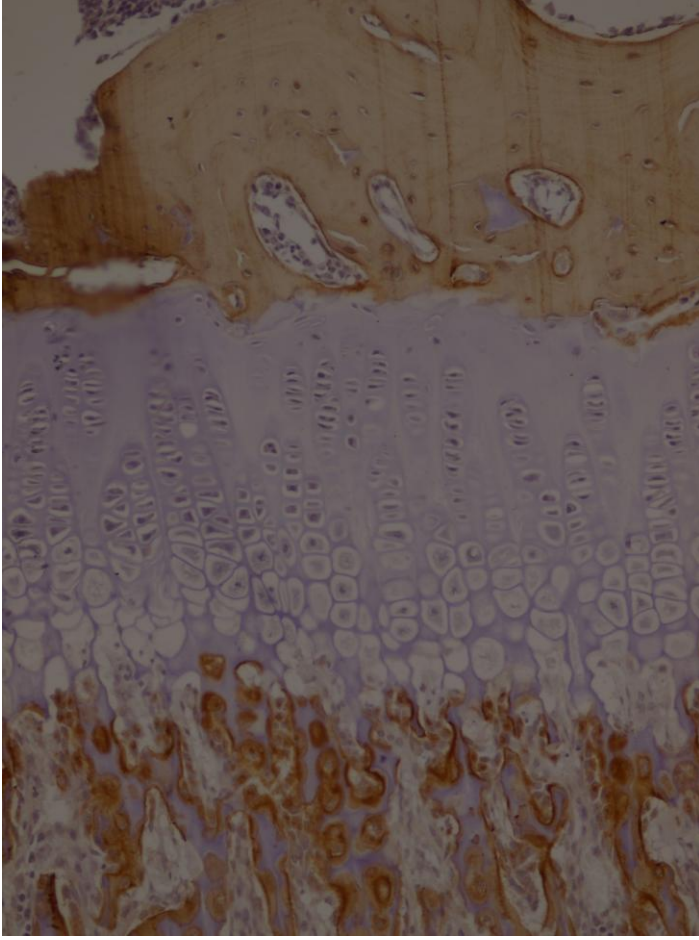
Resim 16. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 2 Kollajen ile boyama x200
Bar:50 μ m



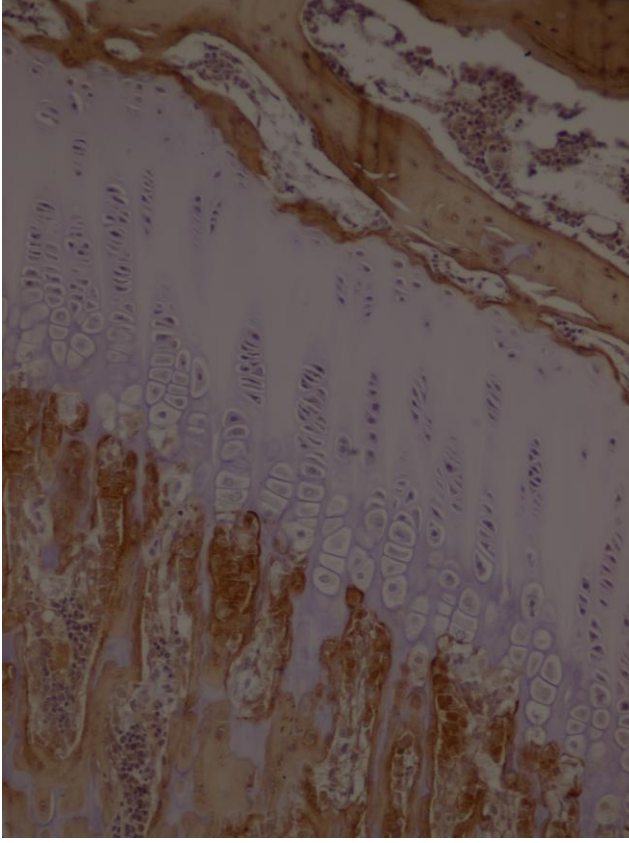
Resim 17. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 2 kollajen ile boyamax200
Bar:50 μ m



Resim 18. Kontrol grubu erkek rat. Tip 1 Kollajen ile boyamax200 Bar:50 μ m



Resim 19. Düşük doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 1 kollajen ile boyamax200
Bar:50 μ m



Resim 20. Yüksek doz asitretin çözeltisi verilen erkek rat. Tip 1 kollajen ile boyamax200
Bar:50 μ m

4.2. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları: Biyokimyasal parametrelere baktığımızda 3 grup karşılaştırıldığında 1,25 (OH) vitamin D, osteokalsin, Kemik ALP, fosfor ve magnezyum seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark yoktu. 25 OH vitamin D, PTH ve kalsiyum seviyelerinde ise istatistiksel olarak yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükselme tespit edildi. Düşük doz verilen grupla kontrol grubu arasında anlamlı fark görülmedi. (Tablo-4)

| | | n | Ort. | St. Sap. | Min. | Max. | p |
|------------------------|------------|----|------------|----------|----------|----------|------|
| 1-25OH VITD fmol/L | Kontrol | 10 | 3409,894 | 682,433 | 2057,635 | 4239,751 | ,871 |
| | Düşük | 10 | 3304,002 | 1110,937 | 1610,832 | 4846,145 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 3524,019 | 959,511 | 1886,608 | 4793,942 | |
| 25-OH VITD mikrog/L | Kontrol | 10 | 18,2184 b | 8,99407 | 5,99 | 33,87 | ,027 |
| | Düşük | 10 | 26,8939 ab | 15,57467 | 6,95 | 63,67 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 34,5627 a | 12,79427 | 18,13 | 55,23 | |
| PTH pg/mL | Kontrol | 10 | 20,307 b | 1,223452 | 18,755 | 22,003 | ,015 |
| | Düşük | 10 | 21,461 ab | 1,680668 | 19,459 | 24,510 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 22,261 a | 1,235734 | 19,972 | 24,022 | |
| OSTEOKALSIN pg/mL | Kontrol | 10 | 1,07460 | ,207654 | ,744 | 1,389 | ,083 |
| | Düşük | 10 | ,95110 | ,141971 | ,803 | 1,275 | |
| | Yüksek Doz | 10 | ,89450 | ,172337 | ,599 | 1,231 | |
| BALP U/L | Kontrol | 10 | 5,616 | 3,345 | 1,004 | 10,4223 | ,944 |
| | Düşük | 10 | 5,1407 | 3,738 | 1,101 | 13,043 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 5,315 | 2,231 | 1,975 | 9,0631 | |
| Kalsiyum mg/dL | Kontrol | 10 | 10,20 b | ,462 | 10 | 11 | ,035 |
| | Düşük | 10 | 10,58 ab | ,516 | 10 | 12 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 11,02 a | ,922 | 10 | 13 | |
| Fosfor mg/dL | Kontrol | 10 | 8,370 | 1,1363 | 6,6 | 10,0 | ,726 |
| | Düşük | 10 | 8,110 | ,9410 | 6,6 | 9,6 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 8,460 | ,9395 | 7,0 | 10,1 | |
| Magnezyum mg/dL | Kontrol | 10 | 2,720 | ,4158 | 2,1 | 3,6 | ,319 |
| | Düşük | 10 | 2,870 | ,3592 | 2,4 | 3,6 | |
| | Yüksek Doz | 10 | 3,090 | ,7549 | 2,5 | 5,1 | |

Tablo 4. Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen grupların biyokimyasal değerlerinin karşılaştırılması

Cinsiyete göre değerlendirme yaptığımızda 1,25 OH vitamin D, 25-OH Vitamin D, Osteokalsin, fosfor, magnezyum, ALP değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. PTH değerlerinde ise hem erkek hem dişi ratlarda anlamlı fark vardı. Dişilerde düşük doz verilen grup ve yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre PTH değerinde yükselme vardı. Erkeklerde ise yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre artma varken düşük doz verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Kalsiyum değerlerinde ise dişilerde yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükseliş varken düşük doz verilen grupta buna rastlanmadı.

| Özellik | Gruplar | Dişi | | | | | Erkek | | | | |
|-------------------------|---------|--------------|---------|---------|---------|---------|--------------|---------|---------|---------|---------|
| | | Mean | St.Dev. | Median | Min. | Max. | Mean | St.Dev. | Median | Min. | Max. |
| 1-25OH VITD fmol/L 2 | Kontrol | 3396,94 a | 818,22 | 3502,63 | 2057,64 | 4239,75 | 3422,85 a | 614,78 | 3624,50 | 2653,03 | 4198,31 |
| | D.Doç | 3869,75 a | 1032,59 | 4062,90 | 2120,13 | 4846,15 | 2738,25 a | 954,19 | 3128,03 | 1610,83 | 3725,65 |
| | Y.Doç | 4018,19 a | 874,35 | 4230,51 | 2558,87 | 4793,94 | 3029,85 a | 834,57 | 2991,55 | 1886,61 | 4130,09 |
| 25-OH VITD mikrog/L | Kontrol | 15,51 a | 7,70 | 16,43 | 5,99 | 25,22 | 20,92 a | 10,22 | 22,28 | 7,44 | 33,87 |
| | D.Doç | 38,11 a | 14,95 | 35,65 | 18,13 | 55,23 | 31,02 a | 10,65 | 32,06 | 19,42 | 47,35 |
| | Y.Doç | 31,76 a | 21,16 | 31,17 | 6,95 | 63,67 | 22,03 a | 6,24 | 20,27 | 14,67 | 28,74 |
| PTH pg/mL | Kontrol | 19,65 b | 1,16 | 19,42 | 18,76 | 21,60 | 20,96 b | ,98 | 21,33 | 19,59 | 22,00 |
| | D.Doç | 22,33 a | 1,70 | 22,64 | 20,17 | 24,51 | 20,59 b | 1,25 | 20,05 | 19,46 | 22,62 |
| | Y.Doç | 21,90 a | 1,42 | 22,76 | 19,97 | 23,00 | 22,62 a | 1,04 | 22,55 | 21,57 | 24,02 |
| OSTEOKALSİN pg/mL | Kontrol | 1,04 a | ,22 | 1,05 | ,74 | 1,34 | 1,11 a | ,21 | ,99 | ,94 | 1,39 |
| | D.Doç | ,93 a | ,10 | ,93 | ,81 | 1,04 | ,97 a | ,19 | ,92 | ,80 | 1,28 |
| | Y.Doç | ,81 a | ,15 | ,86 | ,60 | ,96 | ,98 a | ,16 | ,93 | ,83 | 1,23 |
| BALP U/L | Kontrol | 6,29 a | 3,58 | 6,15 | 1,00 | 10,23 | 4,95 a | 3,35 | 4,40 | 1,30 | 10,42 |
| | D.Doç | 4,07 a | 1,85 | 3,92 | 1,98 | 6,83 | 6,56 a | 1,98 | 7,12 | 4,01 | 9,06 |
| | Y.Doç | 4,99 a | 3,20 | 4,60 | 1,59 | 9,74 | 5,30 a | 4,60 | 3,53 | 1,10 | 13,04 |
| Kalsiyum mg/dL | Kontrol | 10,10 b | ,56 | 10,00 | 9,60 | 11,00 | 10,30 a | ,38 | 10,10 | 9,90 | 10,80 |
| | D.Doç | 10,86 ab | ,54 | 10,90 | 10,10 | 11,60 | 10,30 a | ,33 | 10,20 | 9,90 | 10,80 |
| | Y.Doç | 11,42 a | ,94 | 11,20 | 10,50 | 13,00 | 10,62 a | ,79 | 10,40 | 10,00 | 11,90 |
| Fosfor mg/dL | Kontrol | 8,54 a | 1,30 | 8,70 | 6,60 | 9,70 | 8,20 a | 1,07 | 8,10 | 7,30 | 10,00 |
| | D.Doç | 7,74 a | 1,17 | 7,30 | 6,60 | 9,60 | 8,48 a | ,53 | 8,20 | 8,00 | 9,10 |
| | Y.Doç | 8,26 a | ,82 | 8,50 | 7,00 | 9,20 | 8,66 a | 1,10 | 8,70 | 7,10 | 10,10 |
| Magnezyum mg/dL | Kontrol | 2,70 a | ,22 | 2,70 | 2,40 | 3,00 | 2,74 a | ,58 | 2,60 | 2,10 | 3,60 |
| | D.Doç | 2,98 a | ,42 | 3,00 | 2,50 | 3,60 | 2,76 a | ,29 | 2,70 | 2,40 | 3,10 |
| | Y.Doç | 3,28 a | 1,04 | 2,90 | 2,50 | 5,10 | 2,90 a | ,35 | 2,80 | 2,60 | 3,40 |

Tablo 5. Dişi ve erkek ratların kendi aralarında biyokimyasal değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Aynı stünda farklı küçük harfi alan grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır ($p<0.05$)

#: Erkek cinsiyetten olan fark önemlidir ($p<0.05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Asitretin 2. kuşak bir sentetik retinoiddir ve etretinatın farmakolojik olarak aktif bileşigidir. Dermatoloji kliniklerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. En önemli yan etkisi teratojenitedir ancak sıklıkla kullanımı sırasında mukokütanöz yan etkiler gözlenir (1). Sistemik retinoid tedavisi akut ve kronik toksisitelere neden olabilir (39).

Akut toksisite sonuçları kısa süreli retinoid tedavisi ile meydana gelir ve genellikle tedavi bırakıldıktan sonra geriler. Ancak kemik üzerine olan etkiler hem kısa süreli hem uzun süreli tedavilerde meydana gelebilir ve bu etkiler tedavi bırakıldıktan sonra düzelmez. 1973 yılında Kenya’da 1.6 milyon yıllık kemik toksisitesi olan iskeletler bulunmuş ve bu durum kronik hipervitaminoz A ile ilişkilendirilmiştir (39).

Literatürlere baktığımızda retinoidlerin iskelet sistemi üzerindeki etkileri insanlarda ve hayvanlarla yapılmış çalışmalarda isotretinoin, etretinat veya retinoik asitler kullanılarak incelenmiş. Asitretin ile yapılan incelemeler isotretinoin ve etretinata göre daha sınırlı sayıdadır. Bu durum ortaya isotretinoin ile daha fazla veri çıkarırken asitretinin kemik üzerindeki etkilerini anlaşılır hale getirmemiştir. Yaptığımız çalışmada asitretini 4 haftalık ratlara 4 hafta süresince günlük tek doz oral olarak verdik. Asitretinin kemik üzerindeki etkilerini incelediğimiz bu çalışmamızda ratların proximal tibialarını çıkarıp epifiz büyüme plağını histolojik ve immunhistokimyasal olarak değerlendirdik ve aynı zamanda 4.hafta sonunda ratları sakrifiye edip kanda kemik belirteçlerini (25-OH vitamin D, 1-25-OH vitamin D, ALP, serum kalsiyum, fosfor, osteokalsin, PTH, magnezyum) değerlendirdik.

Retinoidlerin kullanımı sırasında hiperostotik değişiklikler veya tendon ve ligament kalsifikasyonları en yaygın görülen etkileridir (40). Bu değişiklikler DISH (diffüz idyopatik skeletal hiperostozis) olarak tanımlanır. 1983 ‘te 2-6 yıl arasında 3-4 mg/kg/gün isotretinoin tedavisi alan 4 hastada hiperostoz saptanmış (41). Bir çalışmada isotretinoin ve etretinat verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırılmış ve araştırmacılar isotretinoin verilen grupta daha fazla DISH benzeri değişiklikler gözlemişlerdir. Prospektif yapılan radyografik başka bir çalışmada kornifikasyon bozuklukları nedeniyle isotretinoin verilen 8 hastanın 2 sinde ilk 6 ay hiperostoz saptanmış ve 1. yıl sonunda 8 hastanın 6 sında hiperostoz tespit edilmiş. Bu da bize DISH benzeri değişiklikler için en az 6 ay retinoid kullanımı gerektiğini göstermektedir. Bu çalışmalarda bu değişiklikler özellikle isotretinoin kullanan hastalarda gözlenmiştir. Gilbert

ve ark. nın yaptığı bir çalışmada 1986'da 8 psoriasis hastası etretinat ile tedavi edilmiş ve herhangi bir kemik değişikliğine rastlanmamıştır (42).

Guit ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 5 yıl etretinat verilen 11 hastalık grupta yalnızca ikisinde bilateral radius ulna arasında ossifikasyon gözlenmiştir (43). Asitretinin kemik üzerine etkileri henüz tam olarak anlaşılammış olsa da etkilerinin etretinat ile benzeştiği düşünülmektedir. Bu verilerle kronik hipervitaminozun sonuçlarından olan DISH isotretinoine oranla asitretinle tedavi edilen hastalarda daha az görülmektedir.

Retinoidlerin iskelet sistemi üzerindeki bir diğer etkisi prematür epifizyal kapanmadır. 10.5 yaşında bir erkek hasta epidermolitik hiperkeratoz nedeniyle 4.5 yıl 3-5 mg/kg/gün isotretinoin ile tedavi edilmiş ve prematür epifizyal kapanma gelişmiştir (44). Konjenital nonbüllöz iktiyoziform eritroderma nedeniyle 6.5 yıl 0.5-2.5 mg/kg/gün etretinat tedavisi verilen 8.5 yaşında bir hastada sağ tibial distal epifizde füzyon ve travmatik fraktür tespit edilmiş. 1 yaşında epidermolitik hiperkeratozu olan ve 5.5 yıl 1mg/kg /gün etretinat verilen hastada simetrik dirsek epifizinde ve femoral epifizde füzyon görülmüştür (40).

Bazı çalışmalarda retinoidlerin demineralizasyona ve osteoporozu neden olduğu bildirilmiştir. DiGiovanna ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 15 hastaya 10 yıl etretinat tedavisi verilmiş, 9 hastaya ise 6.3 yıl isotretinoin tedavisi verilmiş. Etretinat verilen grupta kemik mineral dansitesinde azalma tespit edilmiş. Bu durum etretinatın daha uzun süre kullanılmış olmasına bağlanmıştır (45). Demineralizasyonun araştırıldığı başka bir çalışmada ise isotretinoin verilen 20 akneli hastada kemik mineral dansitesi ve kemik markerlarında değişiklik saptanmamış. Bu veriler ile demineralizasyonun retinoid tedavisi ile sık görülmediği ve yaşa bağımlı olduğu düşünülmektedir (40). DiGiovanna ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada akneli hastalara 1 mg/kg/gün 16-20 hafta isotretinoin verilmiş ve tedavi öncesi ile sonrasında kemik mineral dansitesi DEXA ile lomber kemik incelenerek ölçülmüş. Klinik olarak anlamlı bir değişiklik saptanmamış ve hiperostoz hiçbir hastada görülmemiştir (46). Leachman ve ark.nın yaptığı prospektif bir çalışmada 17-25 yaşlarında kistik akneli isotretinoin tedavisi verilen hasta grubunda kemik dansitesi ve kalsiyum seviyelerine bakılmış. Ortalama kemik dansitesi tüm alanlarda azalmış ancak kalsiyum ölçümleri hem kontrol hem tedavi verilen grupta değişmemiş (47). Çalışmamızda kalsiyum seviyeleri yüksek doz asitretin verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi.

Retinoidler yaygın kullanılan önemli terapotik ajanlardır. Ancak yarar/zarar oranı genellikle olumludur. Vitamin A nın toksik etkileri insanda ve hayvanda hiperkalsemi,

kortikal yeni kemik formasyonu, prematür epifizyal kapanma ve demineralizasyon ile fraktürlere sebep olmasıdır (47). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada kadınlarda retinolden zengin diyetle beslenenlerde osteoporoz ve kalça fraktürü riskinde artış gözlenmiştir (48). Bir çok çalışmada ise isotretinoin ile osteoporoz arasında ilişki saptanmamıştır. Serum kalsiyum, fosfat, PTH, 25-OH vitamin D, 1-25 OH vitamin D değerlerinde anlamlı değişim saptanmamış (49). Ertuğrul ve ark. 50 akne hastasına 5 ay süreyle 0.5-0.75 mg/kg izotretinoin tedavisi vermiş ve izotretinoinin D vitamini üzerine olan etkilerini incelemişler. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası 25 (OH)D, 1.25 (OH)2D, Kemik ALP, Ca, P, PTH, Magnezyum, Hemoglobin, Kreatinin, Ürik asit, Aspartat ve Alanin aminotransferaz, albumin, total kolesterol, trigliserit, yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) bakılmış. Tedavi sonrası 25 (OH) D ve serum kalsiyum seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma varken 1.25 (OH)2D, PTH, Kemik ALP seviyelerinin tedavi sonrası belirgin olarak arttığı görülmüş (50).

Yaptığımız çalışmada epifizyal büyüme plağında anlamlı bir azalma olmadı. Biyokimyasal değerlerde ise 3 grup karşılaştırıldığında 1,25 (OH) vitamin D, osteokalsin, Kemik ALP, fosfor ve magnezyum seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark yoktu. 25 OH vitamin D, PTH ve kalsiyum seviyelerinde ise istatistiksel olarak yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükselme tespit edildi. Bu veriler bize asitretinin kronik dermatozlarda uzun dönemde kullanılabilecek güvenilir retinoid olduğunu düşündürmektedir.

Şu ana kadar uzun dönem asitretin ile tedavi edilen hastalarda osteoporoz riskini arttırdığına dair bulgulara rastlanmamıştır. Birkaç çalışmada etretinat tedavisi ile osteoporoz gözlenmiş (45,51).

McMullen ve ark.nın yaptığı bir çalışmada farklı dermatozlar nedeniyle 30 hastaya 9 ay asitretin verilmiş. Tedavi sonunda serum kalsiyum, fosfat, ALP, tiroid fonksiyonları, serum Bence-Jones proteinleri ve testesteron düzeyleri ile kemik mineral dansitesi bakılmış. Tedavi sonunda serum seviyelerinde anlamlı fark olmadığı ve kemik mineral yoğunluğunun 30 hastanın 25'inde normal olduğu saptanmıştır (52).

Ülkemizde Tekin ve ark.nın yaptığı bir çalışmada 36 hasta 4-6 ay isotretinoin tedavisi verilerek nodülökistik akne nedeniyle takip edilmiş. DEXA ile kemik mineral yoğunluğu ve serum kalsiyum, fosfat, PTH, ALP, osteokalsin, serbest deoksihidrolin, üriner kalsiyum tedavi öncesi ve sonrasında ölçülmüş. Tedavi sonunda yapılan istatistiksel analizlerde hem kemik mineral yoğunluğunda hem de serum seviyelerinde anlamlı farklılıklar saptanmamış (53)

DiGiovanna ve ark. yaptığı çalışmada benzer şekilde bu markerlarda farklılık bulunmazken Kindmar ve ark. yaptığı çalışmada PTH da artma saptamışlar (54).

Lamellar iktiyoz nedeniyle 20 yıl asitretin kullanan hastada sol el işaret parmağının terminal falanksında radyografik olarak gözlenen belirgin rezorpsiyon görülmüş ve diğer parmaklardada rezorpsiyonu başlangıç bulgularına rastlanmıştır. Aynı hastada serum PTH, vitamin D ve kalsiyum seviyeleri normal ölçülmüştür (55).

Osteoporozun kronik hipervitaminoz A ile ilişkili olduğu kabul edilmekle beraber yapılan çalışmalarda asitretinle osteoporoz riskinde artış gösterilmemiştir (52).

A vitamininin etkileri yapılan çeşitli immünohistokimyasal çalışmalarla ortaya konmaya çalışılmıştır. Ancak literatürde asitretin ile yapılmış biyokimyasal çalışmalar ve kemik mineral dansitesi incelemeleri az sayıda olmasına rağmen immünohistokimyasal çalışma yoktur. Bu açıdan elde ettiğimiz verilerin asitretin tedavisine yön verme konusunda önemli olacağını düşünmekteyiz.

Soeta ve arkadaşları ratlarda yüksek doz verilen A vitamininin proximal tibialarında büyüme plağı kartilajlarını immünohistokimyasal olarak incelemişler. 1 ila 5. günlerde Tip 1, Tip 2 ve Tip 10 kollajene karşı antikorlar kullanılarak değişiklikleri değerlendirmişlerdir. Tip 1 ve Tip 2 kollajen 5.günde kısmen kaybolmuş Tip 10 kollajen positif alanlar 4.günde azalmış ve 5.günde belirgin kaybolmuştur (38). Bizim çalışmamızda da 4.hafta sonunda yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda kontrol grubu, düşük doz asitretin çözeltisi verilen grup ile yüksek doz asitretin çözeltisi verilen gruplarda Tip 2 kollajene epifizyal kemikte, proliferatif zon ve hipertrofik zonda rastlanmadı. Osteoid ve osteoblastlarda Tip 2 Kollajen görülmedi. Tip 1 Kollajen ise tüm gruplarda hipertrofik zonda ve proliferatif zonda hiç görülmedi. Tüm gruplarda epifizyal kemikte, osteoid ve osteoblastlarda tip 1 kollajen 4 (+++) yaygınlığında tespit edildi. Gruplar arasında Tip 1 kollajen boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu bakımından anlamlı farklılık tespit edilmedi. Yine soeta ve ark. yaptığı bu çalışmada kontrol gruplarında kolumnar dizilim gözlenirken Avitamini verilen ratlarda kondrositlerin kolumnar dizilimi 3.günden sonra kaybolmuştur. Epifizyal plağın kalınlığı ise 5.günde kontrol grubuna göre %40 azalmıştı (38). Bizim çalışmamızda da epifizyal büyüme plağındaki kondrositlerin kolumnar dizilimi kontrol grubunda %90.9, düşük doz asitretin verilen grupta %9.1 ve yüksek doz asitretin verilen grupta belirgin azalmış ve kaybolmuştu. Elde ettiğimiz bu veriler bize kolumnar dizilimin asitretin dozunun yükselmesiyle giderek kaybolduğunu göstermektedir. Çalışmamızda epifizyal plağın hipertrofik zonunda anlamlı incelleme olmasına rağmen

epifizyal plaktaki azalma anlamlı değildi. Asitretinin büyüme plağı yüksekliğinde belirgin azalma yapmadığını gördük.

Francesco de luca ve ark. yaptığı bir çalışmada RA nın büyüme plağı üzerinde direk etkili olup olmadığını belirlemek için, fetal rat metatarsal kemikleri RA varlığında kültüre edilmiş. Tek doz oral RA'nın rat proksimal tibial büyüme plağının yüksekliğini azalttığı gösterilmiştir (56). Çalışmamızda epifizyal plaktağı yüksekliğindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Normal endokondral ossifikasyonda kondrositler epifizyal büyüme plağında dinlenme hücreleri, proliferatif hücreler ve hipertrofik hücreler olarak ayırt edilir. Dinlenme ve proliferatif zonda kartilaj matrix çoğu alanda tip 2 kollajen içerir. Tip 10 kollajen içermez. Hipertrofik zonda ise kartilaj matrix tip 10 kollajene ek olarak tip 2 kollajen içerir. Normal durumda tip 1 kollajen kemik matrixinin ana komponentidir ve epifizyal büyüme plağı kartilaj matriksinde tespit edilmez (38)

Soeta ve ark. nın yaptığı bir başka çalışmada yüksek doz A vitamini verilen ratlarda epifiz büyüme plağı kırıkdağında fokal kayıp incelenmiş. 5 gün A vitamini verildikten 1 hafta ve 2. hafta (12 ve 19.günler) sonra epifizyal plak değerlendirilmiş. 12.günde vitamin A verilen ratlarda anormal kartilaj matrixin epifizyal büyüme plağında geliştiğı görülmüştür. 19.günde kolumnar dizilimde azalma ve epifiz büyüme plağında bir veya iki fokal kayıp tüm A vitamini verilen ratlarda tespit edilmiş. Buna ek olarak kalsifiye kırıkdağ matriks yüzeyleri ince bir kemik doku tabakası ile kaplıymış. Çalışmamızda da yüksek doz asitretin verilen grupta anlamlı olarak kolumnar dizilimde azalma ve irregüler kalınlıkta artma gözlenmişti. Bu çalışmada Tip 2 kollajen kontrol ratlarda hem epifizyal plakta kartilaj matrixte hem de primer kemik trabekülünde tespit edilmiş. Vitamin A verilen ratlarda da tip 2 kollajen epifizyal plakta kartilaj matrixte tespit edilmiş. Tip 1 kollajen ise kontrol ratlarda epifizyal kartilaj matrikste görülmezken osteoidde görülmüş vitamin A verilen ratlarda 12.günde epifizyal plağın unkalsifiye kartilaj matriksinde tespit edilmiş ve 19.günde epifizyal plağı çevreleyen kemik dokusunda birkaç osteoid ve osteoblast tabakası görülmüş (57). Çalışmamızda gruplar arasında Tip 1 kollajen boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu bakımından anlamlı farklılık tespit edilmedi. Tip 2 kollajen ise tüm gruplarda tespit edilmedi. Çalışmamızda da kontrol grubu, düşük doz çözelti verilen grup, yüksek doz verilen gruplarda kontrol grubuna göre hipertrofik zonda azalma anlamlı bulundu. Hem dişi hem erkeklerde kontrol grubuna göre hipertrofik zonda anlamlı azalma görüldü. Bir hayvan çalışmasında A vitamini verilen hayvanlarda distal

femur ve proximal tibia epifizyal büyüme plaklarında fokal kayıplar ve incelmeler görülmüştür (58).

A vitamininin kondrositlerin proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu regüle ettiği bazı çalışmalarda gösterilmiş olsa da yüksek doz A vitamininin epifizyal büyüme plağında meydana getirdiği değişiklikler net olarak anlaşılamamıştır (59-62) .

Cancedda ve ark. yaptığı hayvan çalışmasında retinoik asitlerin tip 2 kollajen sentezini azaltıp tip 1 kollajen sentezini arttırdıklarını göstermişlerdir. Çalışmalarında tip 1 kollajenin artmasını kondrositlerin osteoblast benzeri faza dönüştüklerini savunmuşlardır (60). Çalışmamızda her üç grupta Tip 2 kollajen epifizyal kemikte, proliferatif zon ve hipertrofik zonda gösterilemedi. Osteoid ve osteoblastlarda Tip 2 Kollajen görülmedi. Tip 1 kollajen ise tüm gruplarda hipertrofik zonda ve proliferatif zonda hiç görülmedi. Tüm gruplarda epifizyal kemikte, osteoid ve osteoblastlarda tip 1 kollajen 4 (+++) yaygınlığında tespit edildi.

Sonuç olarak asitretin ile yaptığımız bu hayvan çalışmasında 4 hafta sonunda asitretinin epifiz plağında dejenerasyon yapmasına rağmen belirgin incelme yapmadığı ve asitretinin düşük doz ve uzun süreli tedavilerde güvenle kullanılabilir bir retinoid olduğu varsayımına vardık.

ÖZET

Önder S, Ratlarda Bir Vitamin A Türevi Retinoid Olan Asitretinin Epifizyal Büyüme Plağına Etkilerinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi Dermatoloji Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, VAN, 2014.

Giriş: A vitamini ve türevlerinin iskelet sistemi üzerine etkileri bilinmekle beraber henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Asitretin kullanımında sıklıkla mukokütanöz yan etkiler gözlenirken nadiren laboratuvar anormallikleri ve kemik değişiklikleri olabilir.

Amaç: Asitretin ile yapılmış histopatolojik ve immunhistokimyasal çalışma sayısı yok denecek kadar azdır ve birçoğu olgu sunumu şeklinde bildirilmiştir. Dermatoloji servislerinde çok yaygın kullanım alanına sahip bu retinoidin epifizyal plak üzerine olan etkilerini aydınlatabilmek, kemik turnover markerları üzerine olan etkilerini anlayabilmek ve daha güvenle bu ilacı kullanabilmek için bu çalışmayı yaptık.

Materyal ve Metod: Çalışmada 4-8 haftalık 30 adet Wistar albino türü 15 erkek ve 15 dişi rat kullanıldı. Her grupta 10 adet rat olacak şekilde 3 grup oluşturuldu. 1. gruba (n:10, 5 erkek, 5 dişi rat) 10 mg/kg/gün oral asitretin çözeltisi verildi, 2. gruba (n:10, 5 erkek, 5 dişi rat) 3 mg/kg/gün oral asitretin çözeltisi verildi. Kontrol grubu normal standart yem ve su ile beslendi. 4 hafta sonunda ratlar sakrifiye edildi. Daha sonra proximal tibialar eksize edilerek histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Biyokimyasal değerlendirmede serumda 1,25(OH)₂ vitamin D, 25 (OH) vitamin D, parathormon (PTH), kemik alkalenfosfataz (ALP), osteokalsin, kalsiyum, fosfor, magnezyum değerleri çalışıldı.

Bulgular: Hematoksilen-eozin ile yapılan boyamada kontrol grubu, düşük doz asitretin çözeltisi verilen ve yüksek doz asitretin çözeltisi verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında düşük doz ve yüksek doz çözelti verilen gruplarda kontrol grubuna göre hipertrofik zonda istatistiksel olarak anlamlı azalma vardı. Yüksek doz verilen grupla düşük doz verilen grup arasında istatistiksel olarak hipertrofik zonda anlamlı fark yoktu. Diğer zonlarda istatistiksel anlamlı bir azalma görülmedi. Büyüme plağının tüm kalınlığında kontrol grubuna göre düşük doz çözelti verilen grupla yüksek doz çözelti verilen grupta azalma olmakla beraber bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Biyokimyasal parametrelere baktığımızda 3 grup karşılaştırıldığında 1,25 (OH) vitamin D, osteokalsin, kemik ALP, fosfor ve magnezyum seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark yoktu. 25 OH vitamin D, PTH ve kalsiyum seviyelerinde ise istatistiksel olarak yüksek doz verilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükselme tespit edildi. Düşük doz verilen grupla kontrol grubu arasında anlamlı fark görülmedi. Toluidin-blue ile yapılan değerlendirmede epifizyal büyüme plağındaki

kondrositlerin kolumnar dizilimi kontrol grubunda % 90.9, düşük doz verilen grupta %9.1 ve yüksek doz verilen grupta %0 şeklinde belirgin azalmış ve kaybolmuştu. Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda kontrol grubu, düşük doz asitretin çözeltisi verilen grup ile yüksek doz asitretin çözeltisi verilen gruplarda Tip 2 kollajene epifizyal kemikte, proliferatif zon ve hipertrofik zonda rastlanmadı. Osteoid ve osteoblastlarda Tip 2 Kollajen görülmedi. Tip 1 Kollajen ise tüm gruplarda hipertrofik zonda ve proliferatif zonda hiç görülmedi. Tüm gruplarda epifizyal kemikte, osteoid ve osteoblastlarda tip 1 kollajen 4 (++++) yaygınlığında tespit edildi. Gruplar arasında Tip 1 kollajen boyanma yaygınlığı ve yoğunluğu bakımından anlamlı farklılık tespit edilmedi. **Sonuç:** Elde ettiğimiz veriler bize asitretinin epifiz plağında dejenerasyon yapmasına rağmen belirgin bir incelmeye yapmadığını ve düşük doz verilen tedavilerin hem epifiz plağı üzerindeki etkiler hem de kemik mineralizasyonu üzerindeki etkiler açısından daha güvenli olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: asitretin, epifiz plağı, kemik mineralizasyonu, rat

ABSTRACT

Onder S, Assessment of Biochemical and Histopathological Effect of Acitretin which is a derivate of vitamin A on Epiphyseal Growth Plate in Rats, Yuzuncu Yil University, Faculty of Medicine, Department of Dermatology, Specialization Thesis, VAN, 2014.

Introduction: Although Vitamin A and its derivatives have known effects on skeletal system, this is not yet fully elucidated. During acitretin treatment the mucocutaneous side effects are often observed while rarely laboratory abnormalities and bone modifications may occur.

Purpose: Number of histopathologic and immunohistochemical studies made with acitretin is negligibly small and most of those studies are in the form of case reports. Since it is highly used in Dematology Services, to elucidate the effects on epiphyseal plate, identify the effects on bone turnover markers and to allow the safe usage of this retinoid.

Material and Method: In this study, total of 15 male and 15 female Wistar Albino, 4-8 weeks old rats rats have been used. The rats are divided in 3 groups of 10 rats in each group. The first group (n:10, 5 male, 5 female rats) was given dose of 10 mg/kg/day oral diluted acitretin. The second group (n:10, 5 male, 5 female rats) was given dose of 3 mg/kg/day oral

diluted acitretin. Control group was given a standard feed and water. The rats were sacrificed after 4 weeks. Then the proximal tibias were excised and histopathological and immunohistochemical evaluated. Then the average measurement of those 3 sections were calculated. In the serum, the appropriate kits with the appropriate values of 1,25 (OH)² vitamine D, 25 (OH) vitamine D, PTH, bone ALP, osteocalcin, calcium, phosphorus and magnesium were used.

Findings: For the hematoxylin and eosin stained samples, a statistically significant decrease was observed in the hypertrophic zones of low dose and high dose solution given groups, compared to the control group. In the comparison of hypertrophic zones between low dose solution given group and high dose solution given group, there was no statistically significant difference. There was no statistically significant decrease observed in other zones. In the comparison of control group, low dose acitretin solution given group and high dose acitretin solution given group, although a thickening in resting zone was observed in low dose and high dose acitretin solution given groups compared to control group, that result was not statistically significant. Although a decrease in total thickness of growth plate was observed in low dose and high dose acitretin solution given groups compared to the control group, that was not considered as statistically significant.

From the biochemical parameters perspective, there was no statistically significant difference between the 1,25 (OH) vitamine D, osteocalcin, bone ALP, phosphorus and magnesium levels of 3 groups. However, there was a statistically significant increase in the 25 (OH) vitamine D, PTH and Calcium levels of high dose acitretin given group compared to the control group.

For Toluidine blue stained samples, the columnar array of chondrocytes in epiphyseal growth plate were observed as 90,9% in control group, significantly decreased and observed 9,1% in low dose acitretin given group and observed as 0% and disappeared in high dose acitretin given group.

In the immunohistochemical studies we have performed, there was no Type 2 collagene observed in epiphyseal bone, proliferative zone and hypertrophic zone in any of the control group, high dose and low dose acitretin given groups. There was no Type 2 collagene observed in osteoid and osteoblasts. There was no Type 1 collagene observed in hypertrophic zone and proliferative zone for any of the groups. In all of the groups, Type 1 collagene was detected in hypertrophic zone and proliferative zone with a 4(+++) prevalence. There was no

significant difference in Type 1 collagene staining prevalence and concentration between the groups.

Conclusion: The result of our study showed us that although acitretin causes degeneration in epiphysis plate, it does not cause a significant slimming. This study verifies that although acitretin has degenerative effects on epiphysis plate, the lower dose treatment is more safe in terms of the effects on epiphysis plate and bone mineralization.

Key Words: acitretin, epiphysis plate, bone mineralization, rat.

KAYNAKLAR

- 1- Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP et al. Retinoids. Kuenzli S, Saurat J-H. Dermatology.2nd.ed. Edinburgh, Mosby.2008.p.1935-1948.
- 2- Burgdorf W.H.C, Plewig G, Wolf H.H, Landtheler M, Systemic therapy, Gollnick H, Braun-Falco's Dermatology, 3 rd. ed., Germany, Springer Medizing Verlag, 2009;1577-1578
- 3- Lee CS, Koo J. A review of acitretin, a systemic retinoid for the treatment of psoriasis. Expert Opin Pharmacother. 2005;6(10):1725-34.
- 4- DiGiovanna JJ. Isotretinoin effects on bone. J Am Acad Dermatol. 2001;45(5):S176-82.
- 5- Ellis CN, Krach KJ. Uses and complications of isotretinoin therapy. J Am Acad Dermatol. 2001;45(5):S150-7.
- 6- Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. Differentiation. 2007;75(9):853-70.
- 7- Nicolaidou E, Katsambas AD. Vitamins A, B, C, D, E, F, trace elements and heavy metals: unapproved uses or indications. Clin Dermatol. 2000 ;18(1):87-94.
- 8-Kayaalp OS, Yağda çözünen vitaminler, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11.baskı, Ankara, Hacettepe Taş Kitapçılık ltd.şti. 2005,1307-1332.
- 9- Brun PJ, Yang KJ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. Retinoids: Potent regulators of metabolism. Biofactors. 2013; 39(2):151-63.
- 10- Johnson A, Chandraratna RA. Novel retinoids with receptor selectivity and functional selectivity. Br J Dermatol. 1999 ;140 :54:12-7.
- 11-Lowenstein EB, Lowenstein EJ. Isotretinoin systemic therapy and the shadow cast upon dermatology's downtrodden hero. Clin Dermatol. 2011;29(6):652-61.
- 12- Rigopoulos D, Larios G, Katsambas AD. The role of isotretinoin in acne therapy: why not as first-line therapy? facts and controversies. Clin Dermatol. 2010;28(1):24-30.

- 13-Tripathi SV, Gustafson CJ, Huang KE, Feldman SR. Side effects of common acne treatments. *Expert Opin Drug Saf.* 2013;12(1):39-51.
- 14- Shapiro SS, Latriano L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations of retinoids: tretinoin. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39(2 Pt 3):S13-6.
- 15-Orfanos CE, Ehlert R, Gollnick H. The retinoids. A review of their clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs.* 1987 ;34(4):459-503.
- 16-Atakan N. Retinoidler. X. Lütü Tat Simpozyumu, Deri ve Zührevi Hastalıklarda Yenilikler. Ed. Taşpınar A. Ankara. 1992:Sayfa 97-107.
- 17-Pang ML, Murase JE, Koo J. An updated review of acitretin--a systemic retinoid for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 ;4(7):953-64.
- 18- Arechalde A, Saurat JH. Retinoids: unapproved uses or indications. *Clin Dermatol.* 2000;18(1):63-76.
- 19- Geiger JM, Saurat JH. Acitretin and etretinate. How and when they should be used. *Dermatol Clin.* 1993;11(1):117-29.
- 20- Rowe A. Retinoid X receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 ;29 (2) :275-8.
- 21- Berbis P. [Acitretine]. *Ann Dermatol Venereol.* 2001;128 (6-7):737-45.
- 22- Irby CE, Yentzer BA, Feldman SR: A review of adapalene in the treatment of acne vulgaris. *J Adolesc Health* 2008;43:421-4.
- 23- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W, Cartilage, Histology A Text and Atlas With Cell and Molecular Biology, 4.th ed. Philadelphia PA; 2002:164-180
- 24- Ballock RT, O'Keefe RJ. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003;69(2):123-43.

- 25- Melrose J, Smith SM, Smith MM, Little CB, The use of Histochoice for histological examination of articular and growth plate cartilages, intervertebral disc and meniscus, *Biotech Histochem.* 2008 ;83 (1):47-53.
- 26- Wezeman FH. Morphological foundations of precartilage development in mesenchyme, *Microsc Res Tech.* 1998 15;43(2):91-101
- 27- Huang W, Zhou X, Lefebvre V, de Crombrughe B, Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(11):4149-58.
- 28- Gafni RI, Weise M, Robrecht DT, Meyers JL, Barnes KM, De-Levi S, Baron J, Catch-up growth is associated with delayed senescence of the growth plate in rabbits. *Pediatr Res.* 2001;50(5): 618-23
- 29- Burdan F, Szumiło J, Korobowicz A, Farooquee R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumiło M, Solecki M, Klepacz R, Dudka J. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate, *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(1):5-16.
- 30- Lefebvre V, Smits P, Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2005 ;75(3):200-12.
- 31- Hunziker EB, Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Tech.* 1994; 15;28(6):505-19.
- 32- Guyton AC, Hall JE, Paratiroid Hormonu, Kalsitonin, Kalsiyum ve Fosfat Metabolizması, D Vitamini, Kemik ve Dişler, Hall JE, *Textbook of Medical Physiology*, 9.baskı, Pennsylvania: WB Saunders,2006;985-1000
- 33- Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Vitamin A Metabolism, Action, and Role in Skeletal Homeostasis. *Endocr Rev.* 2013.

- 34- Sözen T, Yavuz Gogas D, Kalsiyum Metabolizması, Sözen T. Metabolik Kemik Hastalıkları, 2.Baskı, Bayt Grafik Tasarım ve Yayın Hizmetleri, 2013:1-25
- 35-Güleç P, Hızarcıoğlu M, Vitamin D dependent rickets type I and II: Case reports, İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi 2011; 1(3):131-136
- 36- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR, Vitaminler, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 3.baskı, Baltimore, 2005:371-387
- 37-Haspolat K, Söker M, Kemiğe Ait Biyokimyasal Değerler ve Onkoloji, Dicle Tıp Dergisi 2002 C:29 S:3.
- 38- Soeta S, Mori R, Kodaka T, Naito Y, Taniguchi K. Immunohistochemical observations on the initial disorders of the epiphyseal growth plate in rats induced by high dose of vitamin A. J Vet Med Sci. 1999;61(3):233-8.
- 39- Walker A,Zimmerman MR, Leakey REF. A possible case of hypervitaminosis A in Homo erectus. Nature 1982;296:248-50
- 40- DiGiovanna JJ. Isotretinoin effects on bone. J Am Acad Dermatol. 2001;45(5):S176-82.
- 41- Pittsley RA, Yoder FW. Retinoid hyperostosis: skeletal toxicity associated with long-term administration of 13-cis-retinoic acid for refractory ichthyosis.N Engl J Med 1983;308(17):1012 4.
- 42- Gilbert M, Ellis CN, Voorhees JJ. Lack of skeletal radiographic changes during short-term etretinate therapy for psoriasis. Dermatologica 1986;172(3):160-3
- 43- Guit GL, Obermann WR, van der Schroeff JG, Sillevs-Smitt HJ. Cortical hyperostosis and enthesopathy due to long-term etretinate administration. Diagn Imaging Clin Med 1986; 55:214-8.
- 44- Milstone LM, McGuire J, Ablow RC. Premature epiphyseal closure in a child receiving oral 13-cis-retinoic acid. J Am Acad Dermatol 1982;7:663-6.
- 45- DiGiovanna JJ, Sollitto RB, Abangan DL, Steinberg SM, Reynolds JC. Osteoporosis is a toxic effect of long-term etretinate therapy. Arch Dermatol 1995;131:1263-7.
- 46- DiGiovanna JJ, Langman CB, Tschen EH, Jones T, Menter A, Lowe NJ, Eichenfield L, Hebert AA, Pariser D, Savin RP, Smith SR, Jarratt M, Rodriguez D, Chalker DK, Kempers S,

Ling M, Rafal ES, Sullivan S, Kang S, Shah LP, Wu E, Newhouse J, Pak J, Eberhardt DR, Bryce GF, McLane JA, Ondovik M, Chin C, Khoo KC, Rich P. Effect of a single course of isotretinoin therapy on bone mineral density in adolescent patients with severe, recalcitrant, nodular acne. *J Am Acad Dermatol.* 2004 51(5):709-17.

47- Leachman SA, Insogna KL, Katz L, Ellison A, Milstone LM. Bone densities in patients receiving isotretinoin for cystic acne. *Arch Dermatol.* 1999;135(8):961-5.

48- Melhus H, Michaëlsson K, Kindmark A, Bergström R, Holmberg L, Mallmin H, Wolk A, Ljunghall S. Excessive dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral density and increased risk for hip fracture. *Ann Intern Med.* 1998 15;129(10):770-8.

49-Margolis DJ, Attie M, Leyden JJ. Effects of isotretinoin on bone mineralization during routine therapy with isotretinoin for acne vulgaris. *ArchDermatol.* 1996 ;132(7):769-74

50-Ertugrul DT, Karadag AS, Tural E, Akin KO. Therapeutic hotline. Does isotretinoin have effect on vitamin D physiology and bone metabolism in acne patients? *Dermatol Ther.* 2011;24(2):291-5.

51- Okada N, Nomura M, Morimoto S et al. Bone mineral density of the lumbar spine in psoriatic patients with longterm etretinate therapy. *Dermatol* 1994; 21: 308–11

52- McMullen EA, McCarron P, Irvine AD, Dolan OM, Allen GE. Association between long-term acitretin therapy and osteoporosis: no evidence of increased risk. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28 (3):307-9.

53- Tekin NS, Ozdolap S, Sarikaya S, Keskin SI. Bone mineral density and bone turnover markers in patients receiving a single course of isotretinoin for nodulocystic acne. *Int J Dermatol.* 2008 ;47(6):622-5.

54- Kindmark A, Rollman O, Mallmin H, Petré-Mallmin M, Ljunghall S, Melhus H. Oral isotretinoin therapy in severe acne induces transient suppression of biochemical markers of bone turnover and calcium homeostasis. *Acta Derm Venereol.* 1998 ;78(4):266-9.

- 55- Saravana S, Wittkop B, Rai A. Distal terminal phalanx bone resorption and long-term acitretin therapy. *Int J Dermatol.* 2008 ;47(11):1211-2.
- 56- De Luca F, Uyeda JA, Mericq V, Mancilla EE, Yanovski JA, Barnes KM, Zile MH, Baron J. Retinoic acid is a potent regulator of growth plate chondrogenesis. *Endocrinology.* 2000 ; 141(1):346-53
- 57- Soeta S, Mori R, Kodaka T, Naito Y, Taniguchi K. Histological disorders related to the focal disappearance of the epiphyseal growth plate in rats induced by high dose of vitamin A. *J Vet Med Sci.* 2000;62(3):293-9.
- 58- Takaki H, Fukuda S, Mori R, Kodaka T, Sato R, Naito Y. Changes in bone metabolism and epiphysial growth plate in bovine Hyena disease induced by administration of vitamin AD3E premix or Vitamin A. *J Vet Med Sci.* 1996; 58(5):407-12.
- 59- Ballock RT, Heydemann A, Wakefield LM, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB. Inhibition of the chondrocyte phenotype by retinoic acid involves upregulation of metalloprotease genes independent of TGF-beta. *J Cell Physiol.* 1994; 159(2):340-6.
- 60- Descalzi Cancedda F, Gentili C, Manduca P, Cancedda R. Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *J Cell Biol.* 1992;117(2):427-35
- 61- Freyria AM, Ronzière MC, Boutillon MM, Herbage D. Effect of retinoic acid on protein synthesis by foetal bovine chondrocytes in high-density culture: down-regulation of the glucose-regulated protein, GRP-78, and type II collagen. *Biochem J.* 1995 15;305 :391-6
- 62- Freyria AM, Ronzière MC, Boutillon MM, Herbage D. Two-dimensional electrophoresis of intracellular and secreted protein synthesized by fetal bovine chondrocytes in high-density culture. *Electrophoresis.* 1995; 16 (7):1268-72.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adıyaman'da doğdum. İlk okulu Menderes İlk okulunda okudum. Orta ve Lise eğitimimi Adıyaman Anadolu Lisesinde tamamladım. 2000 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesine girdim. 2006 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp fakültesinden mezun oldum. 2006 yılında Adıyaman Doyran sağlık ocağında çalıştım.2007-2009 yılları arasında Adıyaman'da Aile Hekimi olarak çalıştım. 2009 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dermatoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Evli ve 1 çocuk annesiyim.