





T.C.  
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FİBRÖZ DİSPLAZİSİ OLAN ÇOCUK  
HASTALARDA TEDAVİDE KULLANILAN  
DENOSUMAB VE BİFOSFONATLARIN GELİŞİM  
ÇAĞINDAKİ RATLARDA BÜYÜME  
MERKEZLERİNE OLAN ETKİSİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**FATMA MERVE BAŞ**

**TEZ DANIŞMANI  
PROF. DR. CELAL ÇANDIRLI**

**AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI  
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ  
MAYIS/2024**

## İTHAF

“Tezimi, sevgi ve emekle beni büyüten biricik aileme ithaf ediyorum.”

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince mesleki bilgi ve birikimini benimle paylaşan, kendimi geliştirmem için bana yol gösteren her zaman destek olan ve çalışma azmini ve mesleki cesaretini örnek aldığım değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Celal ÇANDIRLI'ya**,

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda hiçbir zaman tecrübelerini ve bilgi birikimlerini esirgemeyen saygı değer hocalarıma ve üniversitemizdeki diğer öğretim üyelerine ve tüm idari personele,

Çalışmamın hayvan deneyleri aşamasında, benden hiçbir zaman yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen Sayın **Vet. Hek. Samed ÖZER'e**,

Çalışmamın histolojik değerlendirmeleri sırasında yoluma ışık tutan ve tezimdaki katkısına her zaman minnettar olacağım, bu süreç boyunca bana bildiği herşeyi öğretmek için çaba harcayan, çalışmamın laboratuvar aşamasında benden desteğini esirgemeyen Sayın **Doç. Dr. Alev CUMBUL'a**,

Doktora giriş mülakatlarından başlayarak hem doktora eğitim hayatım süresince hem de Tez çalışmamın her dönemini beraber geçirdiğim, bilgi birikimlerimizi tecrübelerimizi birbirimizden esirgemediğimiz, sürecimde hem bana dostluk kardeşlik eden, birbirimizi motive etmeye çalıştığımız canım kıdem arkadaşım **Dt. Semen Şeyma ATAÇ'a**,

Eğitim sürem boyunca bana kardeşlik eden, berbaber tecrübe ve daha birçok şey paylaştığımız, birlikte öğrendiğimiz, büyüdüğümüz, güldüğümüz, zorlukların üstesinden beraber geldiğimiz her konuda desteklerini yardımlarını esirgemeyen, can asistan arkadaşlarıma, ve özellikle bana her zaman ağabeylik eden canım kıdem arkadaşım **Dt. Muhammed Göksel TIMARCIOĞLU'na**,

Doktora eğitim sürem boyunca hastanemizde çalışan yardımlarını destekleri bizden esirgemeyen, öğrenmemiz için katkıda bulunan tüm hemşire, doktor, tekniker arkadaşlarımıza ve tüm yardımcı sağlık personellerimize,

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesine sağladığı maddi destekten dolayı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğüne (proje no:2022/192) en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu proje, ileri bilimsel araştırmaları desteklemek ve yeni bilgi birikimleri oluşturmak amacıyla sağladığı büyük destek sayesinde başarıyla tamamlanmıştır.

Mesleğimi sevme seçme nedenim olan, her zaman arkamda desteğini hissettiğim, meslekteki etik kuralları, tecrübeleri, öğrenme ve öğretme azmiyle bana ışık olan yön veren babam **Op.Dr.Abdulbaki BAŞ'a**, tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan benimle tekrar ders çalışan, motivasyon kaynağım ve şimdi de birlikte çalışmaktan ve öğrenmekten keyif aldığım, annem **Kezban BAŞ'a** ve her daim yanımda olan bana her zaman moral ve motivasyon veren, kendimi güçlü hissetmemi sağlayan sevgili kardeşlerim **Ceren Nur BAŞ** ve **Elif Asena BAŞ'a**, teşekkür ederim.Her birinize derin minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Yolumda beni destekleyen ve cesaret veren herkese tekrar teşekkür ederim.

Sevgi ve minnetle,  
Fatma Merve BAŞ

## İÇİNDEKİLER

İTHAF .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xi
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. ÇOCUKLARDA BÜYÜME VE GELİŞME, BÜYÜME MERKEZLERİ VE ÖLÇÜLEBİLİR KEMİKLER .....	3
2.1.1. Fiziksel Gelişim .....	3
2.1.2. Büyüme Merkezleri ve Ölçülebilir Kemikler .....	4
2.1.2.1. Büyüme merkezleri: .....	4
2.1.2.2. Ölçülebilir kemikler: .....	5
2.2. KEMİK DOKSUSU TANIMI VE İÇERİĞİ .....	6
2.2.1. Kemik Hücreleri .....	6
2.2.1.1. Osteoblastlar .....	6
2.2.1.2. Kemik astar hücreleri .....	8
2.2.1.3. Osteositler .....	8
2.2.1.4. Osteoklastlar .....	10
2.2.1.5. Fibroblastlar .....	12
2.2.2. Ekstraselüler Matriks .....	12
2.2.3. Kemik Oluşumu .....	13
2.2.3.1. İntramembranöz kemikleşme .....	13
2.2.3.2. Endokondral kemikleşme .....	14
2.2.3.3. Kemik yenilenme süreçleri .....	16
2.3. FİBRÖZ DİSPLAZİ .....	16
2.3.1. Fibröz Displazinin Altında Yatan Moleküler Mekanizmalar .....	18
2.3.2. Fibröz Displazide Klinik Uygulamalar ve Tedavi Modaliteleri .....	19
2.3.2.1. Bifosfonatlar .....	20
2.3.2.2. Denosumab .....	22
2.3.2.3. Tamoksifen .....	24

2.3.2.4. Hormon tedavisi.....	25
2.3.2.5. Cerrahi müdahale.....	25
2.3.2.6. Ağrı kontrolü .....	26
2.3.2.7. Fizik tedavi .....	26
2.3.3. Fibröz Displazide Hasta Takibi .....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. KULLANILAN DENEY HAYVANLARI .....	28
3.2. DENEY PROTOKOLÜ.....	29
3.3. İLAÇLARIN VERİLME ŞEKLİ.....	29
3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER .....	32
3.5. HİSTOPATOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK İNCELEMELER.....	36
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER .....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	44
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	46
4.3. RADYOLOJİK BULGULAR .....	52
5. TARTIŞMA .....	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR .....	73
EKLER .....	86

## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 2.1:</b> Günümüzde kullanılan bifosfonatların endikasyonları, kullanım dozu, doz aralığı ve veriliş yolu .....	20
<b>Tablo 3.1:</b> Kullanılan cihazlar.....	32
<b>Tablo 3.2:</b> Parafin blokların hazırlanma protokolü.....	37
<b>Tablo 3.3:</b> Masson Trikrom boyama protokolü .....	37
<b>Tablo 3.4:</b> H&E boyama protokolü .....	38
<b>Tablo 3.5:</b> Histopatolojik skorlama .....	41
<b>Tablo 4.1:</b> Deney gruplarının kilo ölçüm sonuçları.....	43
<b>Tablo 4.2:</b> Ratların biyokimyasal bulguların değerlendirilmesi .....	44
<b>Tablo 4.3:</b> Masson Trikrom ile enkondral bölgede kemikleşme alan kalınlığı analizleri ..	47
<b>Tablo 4.4:</b> Hemotoksilen&Eosin ile enkondral bölgede yapılan hücre analizleri .....	49
<b>Tablo 4.5:</b> Adams TS-1 ile osteosit ve proliferasyon zonu analizleri.....	50
<b>Tablo 4.6:</b> Ratların C kollu röntgen üzerinde boy ve dansite ölçümlerinin analizleri.....	52



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Osteoklastların hücre içi sinyali ve gelişimi .....	11
Şekil 2.2: Pirofosfat ve bifosfonatların moleküler düzeyde kimyasal yapısı .....	22
Şekil 2.3: RANKL antagonisti gelişiminin tarihi .....	23
Şekil 3.1: Deney hayvanları .....	28
Şekil 3.2: Kullanılan zoledronik asit .....	29
Şekil 3.3: Kullanılan denosumab .....	30
Şekil 3.4: Siemens C kollu röntgen ile ilk röntgen örneklerinin alınması .....	31
Şekil 3.5: Kardiyak ponksiyon ile kan örneklerinin alınması .....	32
Şekil 3.6: Satrifuj cihazı .....	33
Şekil 3.7: Diseke edilmiş total mandibula ve femur görüntüsü .....	36
Şekil 3.8: H&E ve ADAMS TS-1(immunohistokimya) ile boyanmış kesitlerin temsili görseli .....	40
Şekil 3.9: Kesitlerin incelendiği mikroskop sistemi.....	40
Şekil 3.10: Masson trikrom histomorfometrik inceleme için hazırlan kesitlerin temsili görseli .....	42

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ALP</b>	: Alkalen fosfataz
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BMP</b>	: Kemik morfogenetik proteini
<b>BMU</b>	: Temel tek hücreli birim
<b>BT</b>	: Bilgisayarlı tomografi
<b>cAMP</b>	: Siklik adenozin monofosfat
<b>DMP</b>	: Dentin matriks proteini
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>FD</b>	: Fibröz displazi
<b>FDA</b>	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>GH</b>	: Büyüme hormonu
<b>GNAS</b>	: Guanin nükleotidi protein alfa uyarıcı
<b>GPCR</b>	: G proteinine bağlı reseptör
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen ve eosin
<b>HRp</b>	: Avidin horsenadish peroksidaz
<b>IGF</b>	: İnsulin benzeri büyüme faktörü
<b>IGF-1</b>	: Somatomedin C
<b>iPTH</b>	: Parathormon intakt
<b>MAS</b>	: McCune-Albright Sendromu
<b>M-CSF</b>	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>MFD</b>	: Monostotik fibröz displazi
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>OCN</b>	: Osteokalsin

<b>OPG</b>	: Osteoprotegerin
<b>PFD</b>	: Poliostotik fibröz displaz
<b>PGE</b>	: Prostoglandin
<b>PKA</b>	: Protein kinaz A
<b>PTH</b>	: Parathormon
<b>RANKL</b>	: RANK ligand
<b>SÖRM</b>	: Selektif östrojen reseptör modülatörü
<b>TSH</b>	: Tiroit uyarıcı hormon
<b>ZA</b>	: Zoledronik asit

# FİBRÖZ DİSPLAZİSİ OLAN ÇOCUK HASTALARDA TEDAVİDE KULLANILAN DENOSUMAB VE BİFOSFONATLARIN GELİŞİM ÇAĞINDAKİ RATLARDA BÜYÜME MERKEZLERİNE OLAN ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı fibröz displazili çocuk hastalarda, kemik metabolizmasını iyileştirmek ve hastalığa bağlı oluşan ağrıyı dindirmek için kullanılan denosumab ve bifosfonatların, çocuğun büyüme plaklarındaki ve kemik metabolizmasındaki etkisini ratlar üzerinde araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada, 40 günlük, yaklaşık  $180 \pm 10$  gram ağırlığında, 30 adet dişi Sprague-Dawley sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar randomize olarak, her grupta 10 hayvan bulunacak şekilde üç gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu hayvanlara %0,1 NaCl subkutan olarak, denosumab grubu hayvanlara %0,1 NaCl içinde çözülmüş 10 mg/kg denosumab subkutan olarak ve bifosfonat grubuna %0,1 NaCl içinde çözülmüş 0,1 mg/kg zoledronik asit intravenöz olarak haftada bir kez olmak üzere üç ay boyunca uygulanmıştır. Deney sonunda, hayvanlardan kardiyak ponksiyonla kan örnekleri alınmış alkalen fosfataz (ALP), Somatomedin C (IGF-1), tiroit uyarıcı hormon (TSH), kalsiyum, fosfor, 25-hidroksi vitamin D3, ve parathormon intakt (iPTH) seviyeleri incelenmiştir. Histopatolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için elde edilen mandibula ve femur örnekleri, Hematoksilin ve Eosin, Masson Trikrom boyamaları ve immünohistokimyasal analizler için ADAMS-TS1 antikor boyaması ile incelenmiştir. Morfolojik incelemeler mandibula ve femur kemiklerinin röntgenleri elde edilerek gerçekleştirilmiştir.

**Bulgular:** Hayvanların vücut ağırlıkları üç ay boyunca anlamlı olarak artmış, fakat deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Biyokimyasal bulgulara göre, IGF-1 seviyeleri bifosfonat grubunda denosumab grubuna kıyasla anlamlı derecede düşükken, diğer serum parametreleri açısından gruplar arasında fark gözlenmemiştir. Histolojik değerlendirmelerde, bifosfonat grubunun kemikleşme ve proliferasyon alanları, kontrol ve denosumab gruplarına göre daha kalın bulunmuştur. Osteoblast yoğunluğu bifosfonat grubunda anlamlı olarak düşük, osteosit yoğunluğu ise denosumab grubunda kontrol grubuna göre düşük olarak gözlenmiştir. Radyolojik

değerlendirmeler, denosumab ve bifosfonat gruplarında kontrol grubuna kıyasla yüksek kemik yoğunluğu ve büyüme alanı kalınlığı göstermiş, özellikle denosumab grubunda bu değerler daha belirgin olarak saptanmıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızın sonuçları, zoledronik asit (bifosfonat) ve denosumab gruplarının kemik yoğunluğu ve büyüme alanı kalınlığı üzerinde etkili olduğunu, ancak denosumab grubunun bu parametrelerde daha belirgin bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, denosumabın kemik sağlığı üzerindeki potansiyel etkisini ve FD ve osteoporoz gibi kemik yoğunluğunu etkileyen durumların tedavisinde kullanılabilme potansiyelini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Bifosfonat, Denosumab, Fibröz displazi, Zoledronik asit

# EVALUATION OF THE EFFECTS OF DENOSUMAB AND BIPHOSPHONATES USED IN THE TREATMENT OF PEDIATRIC PATIENTS ON GROWTH CENTERS IN DEVELOPING RATS FOR FIBROUS DYSPLASIA

## ABSTRACT

**Aim:** The purpose of this study is to investigate the effects of denosumab and bisphosphonates, used to improve bone metabolism and alleviate pain associated with the disease in pediatric patients with fibrous dysplasia (FD), on the growth plates and bone metabolism in rats.

**Materials and Methods:** In this study, 30 female Sprague-Dawley rats, 40 days old and weighing around  $180 \pm 10$  grams, were used. The animals were randomized into three groups (n=10/group). The control group animals were administered 0.1% NaCl subcutaneously, the denosumab group animals received 10 mg/kg denosumab dissolved in 0.1% NaCl subcutaneously, and the bisphosphonate group was given 0.1 mg/kg zoledronic acid dissolved in 0.1% NaCl intravenously, once every weeks for three months. At the end of the experiment, cardiac puncture was performed to collect blood samples, and levels of alkaline phosphatase (ALP), Somatomedin C (IGF-1), thyroid-stimulating hormone (TSH), calcium, phosphorus, 25-hydroxy vitamin D3, and intact parathyroid hormone (iPTH) were examined. Mandibular and femur samples were evaluated for histopathological and histomorphometric assessments using hematoxylin and eosin, Masson's trichrome staining methods, and immunohistochemical analysis with ADAMS-TS1 antibody staining. Morphometric evaluations were conducted on the radiographs of the mandible and femur bones.

**Results:** The body weights of the animals significantly increased over three months, but there was no statistically significant difference between the experimental groups. Biochemical findings indicated that IGF-1 levels were significantly lower in the bisphosphonate group compared to the denosumab group, while no difference was observed in other serum parameters among the groups. Histological assessments showed that the ossification and proliferation areas in the bisphosphonate group were thicker compared to the control and denosumab groups. Osteoblast density was significantly lower in the bisphosphonate group, and osteocyte density was lower in the denosumab group compared

to the control group. Radiological evaluations demonstrated higher bone density and growth plate thickness in the denosumab and bisphosphonate groups compared to the control group, with these values being more pronounced in the denosumab group.

**Conclusion:** Our results indicate that both zoledronic acid (bisphosphonate) and denosumab groups are effective in improving bone density and growth plate thickness, with the denosumab group having a more pronounced effect on these parameters. These findings highlight the potential impacts of denosumab on bone health and its potential use in the treatment of conditions affecting bone density, such as FD and osteoporosis.

**Key Words:** Bisphosphonate, Denosumab, Fibrous dysplasia, Zoledronic acid

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fibröz displazi (FD) normal kemik ve kemik iliğinin yerini fibro-osseöz dokuya bırakan, kırık, fonksiyonel bozulma, deformite ve ağrıya yol açan nadir görülen bir iskelet bozukluğudur (1). FD tek bir kemikte tutulum gösteriyorsa monostotik, birden fazla kemikte tutulum gösteriyorsa poliestotik olarak sınıflandırılır (2). McCune-Albright Sendromu ise hipertiroidizm, akromegali, cushing sendromu gibi endokrin bozuklukluğu ile karakterize FD'nin diğer bir formudur (2). Bu sendromda erken gelişen puberte ve düzensiz sınırlı kahverengi deri lekeleri (cafe-au-lait) görülür (2). En fazla etkilenen kemikler tibia, femur, yüz ve kaburga kemikleridir (2).

Bifosfonatlar sentetik inorganik pirofosfat analogudur ve doğrudan kemik mineral yapıya katılarak osteoklastik aktiviteyi inhibe edici bir ilaç grubudur (3-5). Denosumab ise yeni çıkmış antirezorptif bir ajandır. Etki mekanizması, osteoklastların üretimi, fonksiyonu ve sağkalımı için gerekli olan osteogenik RANK ligandının inhibisyonunun üzerindedir (6). Çocuklarda fibröz displazi hastalığında kullanımı yakın zamanda bildirilmiştir. Ayrıca osteogenesis imperfekta, hiperkalsemi ve dev hücre tümörlerinde de kullanıldığı belirtilmiştir (7-9). Erişkinlerde denosumaba tolerans iyidir ve bifosfonatlara göre daha güvenilirdir. Aynı güvenlik çocuklar için henüz kanıtlanmamıştır (10). Teoride, çocuklarda denosumab lineer uzama ve kemik yeniden modellenmesi ile ilgili ilave riskler taşımaktadır (6,10).

Benzer hücresel hedefleri olmasına rağmen denosumab ve bifosfonatların farklı aktivasyon mekanizmaları bulunmaktadır. İki ilacın yarılanma ömrü arasında da fark bulunmaktadır; bifosfonatlar 10 yılda, denosumab ise 30 günden daha kısa sürede yarılanır (11). Transgenik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, anti RANKL antikoru ile tedavi modellemesinde radyografik olarak iyileşme bulgularının görülmesinin yanı sıra, yeni lezyon oluşumunun da durduğu gösterilmiştir (12).

Deney hayvanları ile kemik gelişimi, iyileşmesi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçleri ile ilgili de özellikle FD'li hastalarda; ALP, P1NP, CTX, IGF-1, FGF-23, TSH, kalsiyum, fosfat, 25-OHD vitamin D, PTH değerlerinin özellikle tedaviler esnasında değerlendirildiği birçok literatür bulunmaktadır (13,14).



Yeni oluşmuş kemik miktarı ve yumuşak doku miktarının ölçümünde kullanılan en güvenilir yöntemler iki boyutlu morfolometrik analiz ve üç boyutlu bilgisayarlı tomografi (BT) analizidir. Ancak bu miktarların morfolometrik incelenmesinde, micro BT, BT analizine göre daha geniş kesitler ile inceleme yapmaktadır. Bu yüzden mikro-BT analiz ile yapılan çalışmaların daha doğru ve ayrıntılı sonuç verdiği bildirilmiştir (15,16).

Bu çalışmanın amacı FD'li olan çocuk hastalarda, kemik metabolizmasını iyileştirmek ve hastalığa bağlı oluşan ağrıyı dindirmek için kullanılan denosumab ve bifosfonatların çocuğun büyüme plaklarındaki ve kemik metabolizmasındaki etkisini ratların üzerinde araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. ÇOCUKLARDA BÜYÜME VE GELİŞME, BÜYÜME MERKEZLERİ VE ÖLÇÜLEBİLİR KEMİKLER

Çocuklarda büyüme ve gelişim, doğumdan ergenliğe kadar olan süreçte meydana gelen fiziksel, bilişsel, duygusal ve sosyal değişiklikleri kapsamaktadır (17). Bu değişikliklerin farkında olmak ve anlamak, çocukla ilgilenen kişilerin ve sağlık profesyonellerinin çocukların gelişim dönemlerini sağlıklı bir şekilde takip etmelerini sağlamaktadır (18).

#### 2.1.1. Fiziksel Gelişim

Fiziksel gelişim; boy, kilo ve kas kütlesi gibi bedensel değişiklikleri ifade etmektedir ve genetik, beslenme ve çevresel faktörlerden büyük ölçüde etkilenir (17).

Çocuklarda büyüme, genellikle belirli dönemlerde yoğunlaşır: bebeklik ve ergenlik (18). Bebeklik döneminde hayatlarının ilk yıllarında olan çocuklar hızlı bir büyüme gösterir (19). Bu dönemde, aylık ve yıllık büyüme hızları en yüksektir (19). Ergenlik döneminde, ikinci bir büyüme atağı yaşanır, bu süreç hem erkeklerde hem de kızlarda farklı zamanlarda başlar ve biter (20).

Çocuklarda fiziksel gelişimi takip etmek için çeşitli büyüme tabloları kullanılmaktadır. Bu büyüme tabloları, çocukların boy, kilo ve baş çevresi gibi fiziksel ölçütlerinin yaş ve cinsiyetlerine göre nasıl değiştiğini gösteren araçlardır (21-23). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve diğer sağlık kuruluşları tarafından sağlanan bu tablolar, çocukların büyüme paternlerinin standart sapmalara göre nasıl değiştiğini gösterir (23). Sağlık profesyonelleri bu tabloları kullanarak bir çocuğun büyümesini kendi yaş grubundaki diğer çocuklarla karşılaştırır ve herhangi bir gelişimsel sapmayı erken saptayabilir.

Çocuklardaki fiziksel gelişimi incelemek için motor becerilerdeki gelişimin takibi de önemlidir. Motor beceriler, çocukların fiziksel etkinliklerde bulunma yeteneklerini ifade eder ve kaba motor beceriler ile ince motor beceriler olarak ikiye ayrılır (24). Kaba motor beceriler, yürüme, koşma, zıplama gibi büyük kas gruplarını kullanmayı gerektiren

aktivitelerle ilgilidir ve bu becerilerin gelişimi, çocukların fiziksel koordinasyonunu ve dengesini geliştirir (24). İnce motor beceriler ise, daha küçük kas gruplarının kullanımını içerir ve çocukların yazı yazma, çizim yapma, düğme ilikleme gibi daha detaylı görevleri yerine getirebilme yeteneğiyle ilgilidir (24). Her iki tür motor beceri de çocukların bağımsızlığının ve özgüveninin gelişiminde önemli rol oynar (24).

## **2.1.2. Büyüme Merkezleri ve Ölçülebilir Kemikler**

**2.1.2.1. Büyüme merkezleri:** Çocuklardaki büyüme merkezleri, kemik büyümesi ve gelişiminin karmaşık sürecini anlamada kritik öneme sahiptir. Bu merkezler, epifizler ve apofizler olarak bilinir, yerleri, işlevleri ve çocuğun büyüme aşamalarındaki rolleri açısından farklılık gösterirler.

Epifizler (büyüme plakları), femur, tibia ve radius gibi uzun kemiklerin uçlarında yer alır ve her uzun kemik genellikle her iki uçta olmak üzere iki epifize sahiptir (25). Bu alanlar, ossifikasyon olarak adlandırılan bir süreçle sonunda kemiğe dönüşen kıkırdak doku içerir (26). Epifizlerin temel işlevi, uzunlaşmasına kemik büyümesini sağlamaktır (27). Bu, büyüme plağındaki kondrositlerin proliferasyonu ile gerçekleşir (27). Bu hücreler çoğaldıkça ve olgunlaştıkça, büyüme plağının uzunluğunu artırır ve böylece kemiği uzatırlar (28). Sonunda bu kondrositler kalsifiye olur ve kemik hücreleri ile değiştirilirler, bu da kemiğin sertleşmesine ve uzamasına katkıda bulunur (28). Çocuklar ergenliğin sonuna yaklaştıkça, epifizyal füzyon denen süreçle büyüme plakları yavaş yavaş kapanmaya başlar (29). Bu kapanışın zamanlaması bireyler arasında değişir ve genetik, beslenme ve cinsiyet gibi faktörlerden etkilenir (30-32).

Apofizler, tendonların kemiklere bağlandığı bölgelerde bulunan kemik çıkıntılarıdır (33). Epifizlerin aksine, apofizler temel olarak kemikleri uzatma işlevine sahip değildir (25). Bunun yerine, kas ve tendonların bağlanma yerleridir, hareketi kolaylaştırmak için kaldıraç görevi görürler ve bağlanma noktaları olarak hareket ederler (34). Apofizler, çocuğun gelişimi sırasında farklı zamanlarda ortaya çıkar, genellikle erken ergenlik döneminde belirgin hale gelir ve bu alanlar, özellikle spor yapan çocuklarda ve ergenlerde fiziksel aktiviteler sırasında strese maruz kalır (35,36). Kas kasılmalarından kaynaklanan tekrarlayan çekme kuvvetleri, apofizit olarak da bilinen iltihaplanma ve ağrıya yol açabilir (36). Apofizit için yaygın bölgeler topuk (Sever hastalığı), diz (Osgood-Schlatter hastalığı) ve dirsektir (Küçük Ligci dirseği) (37). Bu

durumlar genellikle kendiliğinden çocuk büyüme atağını tamamladıkça ve apofizler ana kemikle kaynaştıkça çözülür.

**2.1.2.2. Ölçülebilir kemikler:** Ölçülebilir kemikler, bir çocuğun fiziksel büyümesi ve gelişimi hakkında hayati bilgiler sağlayan iskelet yapılarıdır (38). Bu kemikler, çocukların sağlıklı bir oranda büyüdüğünden emin olmak için pediatrik sağlık kontrolleri sırasında sıklıkla değerlendirilir.

2.1.2.2.a. Uzun kemikler (Femur, Tibia, Humerus, Radius, Ulna): Antropolojik çalışmalarda, özellikle insan evrimini ve popülasyonlar arası farklılıkları incelemede kullanılır. Uzun kemikler, boy, sağlık durumu ve hatta bazı genetik özellikler hakkında bilgi verebilir (39). Femur, insan vücudundaki en uzun kemik olup, kalçadan dize kadar uzanır (40). Uzunluğu, bir çocuğun genel büyüme ve gelişimi açısından önemli bir göstergedir (41). Femurun uzunluğundaki değişiklikler, çocuğun genel büyüme eğilimleri ve beslenme durumunu yansıtabilir (41). Radius, ön kolun iki kemiğinden biridir ve dirsekten bileğe kadar uzanır (42). Radius üst uzuvların büyümesini değerlendirmede önemli olup ince motor becerileri ile el-göz koordinasyonunun gelişiminde önemli role sahiptir (2). Tibia, dizden aşağıya bileğe kadar uzanan alt bacakta ki ana kemiktir ve uzunluğu, alt uzuvların büyümesini gösterir ve çocukların genel boy büyümesinin değerlendirilmesinde esastır (43,44).

2.1.2.2.b. Kafatası kemikleri: Kafatası, antropolojide, adli tıpta ve tıbbi araştırmalarda kullanılır. Kafatası ölçümleri, beyin büyüklüğü, yüz özellikleri ve popülasyonlar arası morfolojik farklılıkları anlamak için önemlidir (45).

2.1.2.2.c. Omurga kemikleri (Vertebrae): Omurga sağlığı ve postür analizinde, özellikle skolyoz gibi durumlar ve omurga bozukluklarının teşhis ve tedavisinde kullanılır (46).

2.1.2.2.d. Pelvis (Kalça kemikleri): Özellikle antropolojide, cinsiyet tayini ve doğumla ilgili araştırmalarda pelvis ölçümleri önemlidir (46).

2.1.2.2.e. Kaburga kemikleri: Göğüs kafesi yapısının analizinde ve torasik cerrahide kullanılır (47,48).

2.1.2.2.f. Karpal (El bileği) ve Tarsal (Ayak bileği) kemikler: Mikro-evrim çalışmalarında ve belirli el veya ayak bileği hastalıklarının tanımlanmasında kullanılır (49,50).

2.1.2.2.g. Mandibula (Alt çene kemiği): Diş sağlığı, beslenme biçimleri ve konuşma mekanizmaları üzerine araştırmalarda sıklıkla kullanılır.

Kemik ölçümleri, özellikle radyolojik görüntüleme teknikleri (röntgen, CT, MRI) ve fiziksel antropometri teknikleri kullanılarak yapılır. Bu ölçümler, insanların sağlık durumu, fizyolojik gelişimi ve tarihsel-evrimsel geçmişi hakkında derinlemesine bilgiler sunar (50).

## **2.2. KEMİK DOKSUSU TANIMI VE İÇERİĞİ**

Kemik dokusu, yenilenme ve onarım için doğal bir kapasiteye sahip özel bir bağ doku tipidir (51,52). Kemik dokusu iki temel tipten oluşur, bunlar kompakt kemik (veya kortikal kemik) ve süngerimsi kemik (trabeküler veya gözenekli kemik) (53). Kompakt kemik, tüm kemiklerin sert dış kabuğunu oluşturur ve onlara pürüzsüz, beyaz ve sağlam görünümlerini verir ve yetişkin insan vücudundaki toplam kemik kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturur (54). Kompakt kemik, bir mineral matris ve kan taşıyan kanaliküllerle birbirine bağlanan, canlı osteositler içeren silindirik yapılar olan sıkıca paketlenmiş osteonlardan ve havers sistemlerinden oluşur (54). Her bir osteon, havers kanalını çevreleyen kompakt kemik dokusunun eşmerkezli katmanlarından veya lamellerinden oluşur (55). Süngerimsi kemik, tüm kemiklerin iç tabakasını oluşturur ve insan vücudunun toplam kemik kütlelerinin yaklaşık %20'sini oluşturur (53). Trabekül olarak bilinen çubuk benzeri yapılardan oluşan bir ağdan oluşan gözenekli, petek benzeri bir yapıya sahiptir (56-58). Bu doku içindeki boşluklar, kan hücrelerini üreten kırmızı veya sarı kemik iliği ile doludur (54).

### **2.2.1. Kemik Hücreleri**

Kemik dokunun her tipi osteoblastlar, kemik astar hücreleri, osteositler ve osteoklastlar olmak üzere dört çeşit hücreden oluşur (59,60).

**2.2.1.1. Osteoblastlar:** Osteoblastlar, toplam kemik hücrelerinin %4-6'sını oluşturan ve kemik yüzeyi boyunca yer alan kübik hücrelerdir ve öncelikle kemik oluşturma işlevleriyle tanınırlar (61). Bu hücreler, bol miktarda pürüzlü endoplazmik retikulum ve belirgin golgi aygıtı, ayrıca çeşitli salgı vezikülleri gibi protein sentezleyen hücrelerin morfolojik özelliklerini sergiler (61). Kutupsal hücreler olarak osteoblastlar,

osteoidi kemik matriksine doğru salgırlar (62). Kemik matriksinin mineralizasyonu iki fazda gerçekleşir: veziköler ve fibriler fazlar (63).

2.2.1.1.a. Veziköler faz: Değişken çapta 30 ila 200 nm arasında değişen, matriks veziköleri adı verilen yapıların, osteoblastların apikal membran bölgesinden yeni oluşan kemik matriksine salındığı zaman gerçekleşir ve burada proteoglikanlar ve diğer organik bileşenlere bağlanırlar. Sülfatlı proteoglikanların negatif yükü nedeniyle, matriks veziköleri içinde depolanan kalsiyum iyonlarını hareketsiz hale getirirler (63). Osteoblastlar proteoglikanları parçalayan enzimleri salgıladığında, kalsiyum iyonları proteoglikanlardan salınır ve matriks veziköllerinin membranında bulunan kalsiyum kanallarından geçer. Bu kanallar annexin adı verilen proteinler tarafından oluşturulur (62). Öte yandan, fosfat içeren bileşikler, osteoblastlar tarafından salgılanan ALP tarafından parçalanır ve matriks veziköleri içine fosfat iyonları salınır. Sonra, veziköller içindeki fosfat ve kalsiyum iyonları çekirdeklenir ve hidroksiapatit kristallerini oluşturur (64).

2.2.1.1.b. Fibriler faz: Matriks veziköleri içinde kalsiyum ve fosfat iyonlarının doyma noktasına ulaşmasıyla, bu veziköllerin yırtılması ve hidroksiapatit kristallerini çevreleyen matrikse yayılmasına neden olmasıyla gerçekleşir (65). Mezenkimal kök hücrelerden köken alır ve iskelet sisteminin oluşturulması, onarımı ve yeniden modellenmesi için gerekli hücrelerdir (66). Osteoblastlar, osteogenez adı verilen bir süreçte kemik matrisinin organik bileşenlerini sentezler ve salgırlar (67,68). Oluşturdukları ana bileşen, kemiğe gerilme mukavemetini sağlayan kolajendir (68). Ayrıca kemik matrisinin mineralizasyonunda yer alan osteokalsin ve osteopontin gibi kollajen olmayan proteinler üretirler. Kemik matrisini salgıladıktan sonra, bazı osteoblastlar matrise gömölerek osteositler haline gelirken, diğerleri kemik yüzeylerinde kalır ve kemik oluşumu tamamlandığında yassı kemik astar hücreleri (inaktif osteoblastlar) haline gelir (69,70). Osteoblastlar vücutta kalsiyum homeostazının korunmasında kritik rol oynar (71). Eski kemiğin osteoklastlar tarafından uzaklaştırıldığı ve osteoblastlar tarafından yeni kemiğin oluşturulduğu sürekli bir süreç olan kemiğin yeniden şekillenmesine katılırlar. Kandaki kalsiyum seviyeleri düşük olduğunda osteoblastlar, osteoklast öncüllerinin ve olgun osteoklastların yüzeyindeki RANK'ye bağlanan RANK ligand (RANKL) adlı bir protein üretir, bu da osteoklastların

aktivasyonuna ve dolayısıyla kemik erimesinin artmasına neden olur. Sonuç olarak kalsiyumun kan dolaşımına salınmasını sağlar (71,72).

**2.2.1.2. Kemik astar hücreleri:** Kemik astar hücreleri, osteoblastların ve osteoklastların çalışmasına uygun bir ortam oluşturmaya yardımcı olan kemik yüzeylerinde bulunan yassı hücrelerdir (73). Bu hücreler, kemiğin yeniden şekillenmeyen veya emilmeyen yüzeyinde bulunur (74). Literatürde daha önce belirtildiği üzere bu hücreler, kemik homeostazı ve yeniden şekillenmesinde önemli roller oynayan bir tür sakin veya dinlenme halindeki osteoblast olarak kabul edilmekteydi (74). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu hücrelerin spesifik işlevlerini henüz tam olarak tanımlayamamış da olsa, bunların  $Ca^{2+}$  homeostazında kemik ve sistemik hücre dışı sıvılar arasında bir iyon ayrışma sistemi olarak işlev gören epitel benzeri bir zar oluşturabildiğini belirtmektedir (75-77). Bunun yanında kemik astar hücreleri kemik onarım işlemi gibi durumlarda aktif osteoblastlara dönüşebilen bir hücre rezervuarı görevi görür (74). Kemik astar hücrelerinin salgı aktivitesi, kemik fizyolojik durumuna bağlı olarak değişir; bu hücreler salgı aktivitelerini yeniden kazanabilir, boyutlarını artırabilir ve kübik bir görünüm kazanabilir (78). Kemik astar hücrelerinin işlevleri tam olarak anlaşılmamıştır, ancak bu hücrelerin kemik rezorpsiyonunun gerçekleşmemesi gerektiği zaman; osteoklastlar ile kemik matriksi arasındaki doğrudan etkileşimi önlediği, ayrıca osteoklast farklılaşmasına katıldığı, osteoprotegerin (OPG) ve nükleer faktör kappa-B ligandının reseptör aktivatörünü (RANKL) ürettiği gösterilmiştir (79). Ayrıca, kemik astar hücreleri, diğer kemik hücreleriyle birlikte, kemik yenilenme döngüsü sırasında otamda bulunur ve temel çok hücreli birim (BMU) adı verilen anatomik bir yapıda önemli bir bileşendir (79).

**2.2.1.3. Osteositler:** Osteositler %90-95 oranıyla kemikte en bol bulunan hücre tipidir (52). Osteogenez olarak da bilinen kemik dokusu oluşturma sürecini tamamlayan osteoblastlardan elde edilirler (80). Bu hücreler, mineral homeostazı, kemiğin yeniden şekillenmesi ve mekanik transdüksiyon süreçleri dahil olmak üzere kemik sağlığı ve bakımı için kritik öneme sahiptir (81). Osteositler, lakuna adı verilen mineralleşmiş kemik matrisi içindeki küçük boşluklarda bulunur (82). Bu lakunalardan osteositler, kanalikül adı verilen kanallar yoluyla uzun, ince hücre uzantılarını gönderir (82). Bu uzantılar osteositlerin birbirleriyle ve kemik yüzeyindeki osteoblastlar ve osteoklastlarla iletişim kurmasını sağlar (71,83,84). Bu ağ, besinlerin ve atık ürünlerin

transferine izin verir ve hem osteoblastların hem de osteoklastların aktivitelerini etkileyerek kemiğin yeniden şekillenmesinin düzenlenmesini kolaylaştırır (85).

Osteositler, osteoblast farklılaşması yoluyla ekstraselüler matriks hattından türetilir. Bu süreçte dört tanımlanabilir aşama görülür: osteoid-osteosit, preosteosit, genç osteosit ve olgun osteosit (80). Bir kemik oluşum döngüsünün sonunda, osteoblastların bir alt popülasyonu osteositlere dönüşür ve kemik matriksine entegre olur. Bu süreç, yuvarlak osteoblast boyutunun azalması da dahil olmak üzere belirgin morfolojik ve ultrastrüktürel değişikliklerle birlikte gerçekleşir. Pürüzlü endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı gibi organellerin sayısı azalır ve çekirdek-sitoplazma oranı artar, bu da protein sentezi ve salgılanmasının azalmasıyla ilişkilidir (86).

Olgun osteositler mineralize kemik matriksi içine tamamen hapsedildiğinde, osteokalsin (OCN), BSP1, tip I kolajen ve ALP gibi osteoblast belirteçleri azalacak şekilde düzenlenir (salgılanmaları azalır). Öte yandan, dentin matriks proteini 1 (DMP1) ve sklerostin gibi osteosit belirteçleri yüksek düzeyde salgılanır (87). Osteosit hücre gövdesi lakuna içinde yer alırken, sitoplazmik uzantıları (her hücre başına 50'ye kadar) lakuna alanından çıkan ve osteosit lakunokanaliküler sistemini oluşturan kanalikülü adı verilen minik tünellerden geçer (87). Osteosit sitoplazmik yapıları, kemik yüzeyindeki osteoblastlar ve kemik döşeme hücrelerinin sitoplazmik yapıları birlikte, komşu osteositler ile arasında boşluk bağlantıları ile bağlanır, böylece prostaglandinler ve nitrik oksit gibi küçük sinyal moleküllerinin hücreler arası taşınmasını kolaylaştırır (87).

Ayrıca, osteosit lakunokanaliküler sistemi, oksijenin ve besinlerin osteositlere ulaşabilmesi için damar (vasküler) sistem ile yakın ilişkidir (82). Osteosit yüzeyinin, tüm Haversian ve Volkmann sistemlerinden 400 kat, trabeküler kemik yüzeyinden ise 100 kat daha büyük olduğu tahmin edilmektedir (88). Hücre-hücre iletişimi ayrıca, osteosit ve kanaliküllerin arasındaki akışkan olan interstisyel sıvı tarafından da sağlanır (88). Lakunokanaliküler sistem aracılığıyla, osteositler, mekanik baskıları ve yükleri algılayabilen bağlantılı ağları sayesinde mekanosensörler olarak işlev görür ve böylece kemiklerin günlük mekanik kuvvetlere adaptasyonuna yardımcı olurlar (88). Bu şekilde, osteositler, osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin düzenlenmesi yoluyla kemik yeniden şekillenmesinin koordinatörleri gibi hareket ederler (82,88).



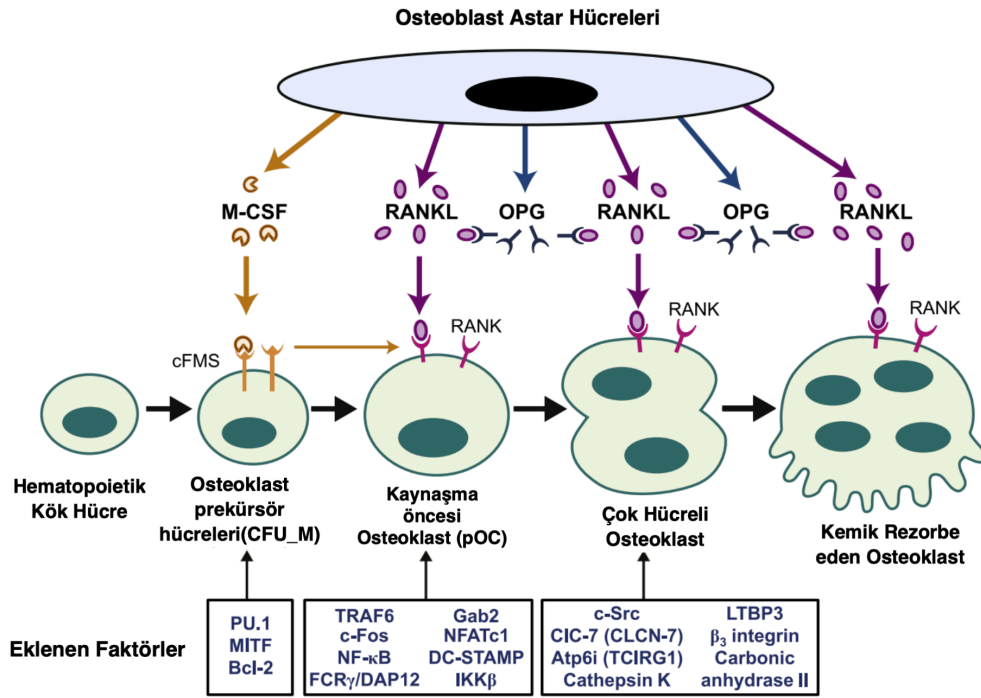
Ayrıca, osteosit apoptozisi, osteoklastik kemik resorpsiyonuna kemotaktik bir sinyal olarak tanınmıştır (88). Bununla uyumlu olarak, kemik resorpsiyonu sırasında apoptotik osteositlerin osteoklastlar tarafından yutulduğu gösterilmiştir (89).

Osteositlerin mekanosensitif işlevi, bu hücrelerin kemik matriksi içindeki stratejik konumları sayesinde gerçekleşir. Dolayısıyla, osteositlerin şekli ve matrikste yerleşimsel düzeni, onların algılama ve sinyal taşıma işlevleri ile uyumlu olup, mekanik uyarıları biyokimyasal sinyallere çeviren bir fenomen olan piezoelektrik etkiyi aktive eder (90). Osteositlerin mekanik uyarıları biyokimyasal sinyallere nasıl dönüştürdüğüne dair mekanizmalar ve bileşenler tam olarak bilinmemektedir. Ancak, mekanik stimülasyon sırasında, osteositler; adenosin trifosfat (ATP), nitrik oksit (NO), Ca<sup>2+</sup> ve prostaglandinler (PGE<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub>) gibi çeşitli ikincil haberciler üretirler, bunlar kemik fizyolojisini etkiler (87). Mekanizma ne olursa olsun, mekanosensitif işlevin osteositler arasındaki karmaşık kanallıklar ağ sayesinde mümkün olduğunu belirtmek önemlidir, bu ağ kemik hücreleri arasındaki iletişimi sağlar (87).

**2.2.1.4. Osteoklastlar:** Osteoklastlar, iskelet yapısını koruyan ve yapının yeniden şekillendirilmesinde önemli bir işlev olan kemik dokusunun rezorpsiyonundan sorumlu özel hücrelerdir (91). Mezenkimal kök hücrelerden köken alan osteoblastlar ve osteositlerin aksine, monositlerden farklılaşan makrofajlardan köken alır (92). Hematopoetik kök hücre soyundan gelen mononükleer hücrelerden, birkaç faktörün etkisi altında üretilirler. Bu faktörler arasında, osteoprogenitör mezenkimal hücreler, osteoblastlar tarafından salgılanan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve osteoblastlar, osteositler ve stromal hücreler tarafından salgılanan RANK ligand bulunur (93). Bununla birlikte, bu faktörler transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu ve osteoklastlarda gen ifadesini teşvik eder (94).

Bu hücrelerin büyük ve çok çekirdekli olması, kemik materyalini verimli bir şekilde parçalamalarına olanak tanır (73). Osteoklastlar kemik matrisine yapışır ve “ruffled border” adı verilen özel bir yapı oluşturur ve bu yapı aracılığıyla kemik dokusunu eritmek için enzim ve asit salgırlar (73). Osteoklastlar özellikle, kemiğin mineralize bileşenini çözmek için hidroklorik asit ve kemik matrisindeki ana protein olan kolajeni parçalamak için katepsin K salgırlar (95). Kemik parçalandıktan sonra ortaya çıkan mineraller ve protein parçaları kan dolaşımına yeniden emilir (96). Osteoklastların

aktivitesi, osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunda anahtar bir molekül olan RANKL dahil olmak üzere çeşitli faktörler ve sinyal yolları aracılığıyla sıkı bir şekilde düzenlenir (97). RANKL, osteoklastogenez için kritik bir faktördür ve osteoblastlar, osteositler ve stromal hücreler tarafından salgılanır. Osteoklast öncüllerindeki reseptör RANK ile bağlandığında, osteoklast oluşumu tetiklenir (83). Diğer yandan, osteoblastlar, stromal hücreler, gingival ve periodontal fibroblastlar dahil olmak üzere geniş bir hücre yelpazesi tarafından üretilen başka bir faktör olan osteoprotegerin (OPG), RANKL ile bağlanır, RANK/RANKL etkileşimini önler ve dolayısıyla osteoklastogenez'i inhibe eder (72). RANKL/RANK/OPG sistemi osteoklastogenezin ana aracıdır (98) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1:** Osteoklastların hücre içi sinyali ve gelişimi (11)

Ek olarak kalsitonin gibi hormonlar osteoklast aktivitesini inhibe edebilirken, paratiroid hormonu (PTH) bunu uyarabilir (106). Bunun yanında bu hücreler yalnızca kemiğin yeniden şekillenmesinde değil aynı zamanda kemik erimesi ve oluşumu arasında dengesizliğin olduğu osteoporoz gibi patolojik durumlarda da önemli bir rol oynar (107-109).

**2.2.1.5. Fibroblastlar:** Fibroblastlar, kemik dokusu dahil olmak üzere vücudun bağ dokularında kritik öneme sahip bir hücre tipidir (99). Kemik dokuda fibroblastlar özellikle periost ve endosteumda önemli rol oynarlar (99-101). Fibroblastlar, kemik sağlığının düzenlenmesinde, bağ dokularının hücre dışı matrisini üreterek, bakımını sağlamada önemli rol oynarlar (102). Hücre dışı matris kollajenler, fibronektinler ve proteoglikanlar içerir. Kemikte, bu, kemik hücrelerinin desteklenmesi ve kemik matrisinin kalitesi için gereklidir. Fibroblastlar tarafından üretilen hücre dışı matris, kemik rejenerasyonu ve onarımında yardımcı olan bir destek iskeleti sağlar (103,104). Ek olarak fibroblastlar, kemik içinde anjiyogeneze katkıda bulunur ve bu katkı, besinlerin taşınması, atık ürünlerin atılması ve onarım süreçlerinin kolaylaştırılması için kritiktir (105). Endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü aktive eden faktörler salgılayarak yeni kan damarlarının iç yüzeyini oluşturan hücrelerin oluşumunu desteklerler (106,107). Kemik dokusundaki fibroblastlar, bağışıklık yanıtında da bir rol oynayabilir. Enfeksiyon veya yaralanma yerlerine bağışıklık hücrelerini çeken sitokinler ve kemokinler salgılayarak patojenlere karşı savunma ve iyileşme sürecine katkıda bulunurlar (108). Ek olarak, bazı durumlarda, özellikle ciddi hasar sonrasında veya patolojik koşullarda, fibroblastlar kemik dokusunda fibrozis gelişimine sebep olabilirler (109,110).

### **2.2.2. Ekstraselüler Matriks**

Kemik, inorganik tuzlar ve organik matriks ile oluşur (111). Organik matriks, başta tip I kolajen olmak üzere, %90 oranında kolajenli proteinler ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, fibronektin ve kemik sialoprotein II, kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler) ve büyüme faktörleri gibi kolajensiz proteinleri içerir (111).

Kemikteki inorganik materyal, ağırlıklı olarak fosfat ve kalsiyum iyonlarından oluşur; ancak, önemli miktarda bikarbonat, sodyum, potasyum, sitrat, magnezyum, karbonat, florit, çinko, baryum ve stronsiyum da bulunur (52). Kalsiyum ve fosfat iyonları hidroksiapatit kristallerini oluşturmak üzere çekirdeklenir ve bu kristaller kimyasal formül  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  ile temsil edilir. Kolajen ile birlikte, kolajensiz matriks proteinleri hidroksiapatit birikimi için bir iskelet yapı oluşturur ve bu birliktelik kemik dokusunun sertlik tipi ve direncinden sorumludur (52).

Kemik matriksi, kemiğe mekanik destek sağlar ve kemik homeostazında temel rol oynayan karmaşık ve düzenli bir çerçeve oluşturur. Kemik matriksi, kemik hücrelerinin

aktivitesine müdahale eden birçok molekül salgılayabilir ve dolayısıyla kemik yeniden şekillenmesine (remodelasyonuna) katılım gösterir (112). Yalnızca kemik kütlesinin kaybı, kemik kırıklarına neden olmak için yetersizken (52,112), kemik matriks proteinlerindeki değişiklikler ve bu değişikliklerin modifikasyonları dahil olmak üzere diğer faktörlerin, kemik kırıklarını anlama ve tahmin etmede hayati önem taşıdığı öne sürülmektedir (113). Gerçekten de kolajenin kemik dokusunun yapısı ve işlevinde kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (52).

Kemik matriks proteinlerinin konsantrasyonunda yaş, beslenme, hastalık ve antiosteoporotik tedaviler ile değişiklik olduğu gösterilmiştir ve bu durum, kemik kırılmasına ve sonrasındaki deformasyona sebep olabilir (114). Örneğin, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, PTH tedavisi sonrası hyaluronik asit sentezindeki artışın sonraki kemik resorpsiyonu ile ilişkili olduğunu bildirmiştir, bu da hyaluronik asit sentezi ile osteoklast aktivitesindeki artış arasında muhtemel bir ilişkiyi göstermektedir (114).

Kemik hücreleri ile kemik matriksi arasındaki etkileşimler, daha önce tartışıldığı gibi, kemik matriksinin sadece kemik hücreleri için bir destek sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda çeşitli yapışma molekülleri aracılığıyla kemik hücrelerinin aktivitesini düzenlemede de önemli bir rol oynar (112).

İntegrinler, kemik hücreleri ile kemik matriksi arasındaki etkileşime dahil olan en yaygın bağlanma molekülleridir (52). Osteoblastlar, kemik matriks proteinleri içinde bulunan dizileri tanıyan ve bunlara bağlanan integrinler aracılığıyla kemik matriksi ile etkileşime girer; bunlar arasında osteopontin, fibronektin, kolajen ve kemik sialoprotein bulunur (115). Bu proteinler, osteoid sentezi sırasında osteoblastların kemik yüzeyindeki organizasyonunda da önemli bir rol oynar (52).

İntegrinler, osteosit-kemik matriksi etkileşimlerinde aracı bir rol oynar. Bu etkileşimler, bu hücrelerin mekanosensitif işlevi için esastır; böylece doku deformasyonu tarafından indüklenen sinyaller üretilir ve yapı güçlendirilir (116).

### **2.2.3. Kemik Oluşumu**

**2.2.3.1. İntramembranöz kemikleşme:** İntramembranöz kemikleşme, embriyonik dönemde mezenkimal bağ dokusundan doğrudan osteoblasta dönüşüm yoluyla gerçekleşen bir kemik oluşum sürecidir (117). Bu süreç, özellikle bazı kafatası ve yüz kemiklerinin gelişimi sırasında veya kemik onarımı sırasında gözlemlenir (118).

Mezenkimal öncü hücreler, stabilize edilmiş kemik segmentleri varlığında, kemik matriksi salgılayarak primer kemik spikülleri ve trabeküller oluştururlar. Bu spiküller zamanla anastomozlaşarak (birleşerek) ağsı bir kemik dokusu meydana getirir. Süreç, kalsifikasyon ile devam eder ve matriks içinde kalan osteoblastlar, osteositlere dönüşürken, kalsifiye olmayan iç ve dış kısımlar mezenşimden sırasıyla periosteuma ve endosteuma dönüşür (117).

Kemik oluşumunun ilk aşamalarında, kolajen ve diğer maddelerin salgılanmasıyla beraber, ara maddede kalsiyum çökelmemiş osteoid doku bulunur ve lamelsiz kemik yapı oluşumu hakimdir. Zamanla kalsifikasyon ilerleyerek osteoblastlar lakuna içerisine yerleşir ve böylece birçok ossifikasyon merkezinin birleşmesi sonucunda spongiyöz kemik oluşur. Bu süngerimsi kemik, sınırlı bir alanda kalmış trabeküllerin etrafında şekillenirken, bu bölgelerde mezenşimal bağ dokusu kırmızı kemik iliği olacak yönde farklılaşır. Kompakt kemikte ise, trabeküllerin üzerinde yeni yapılar oluşur, kemik kalınlaşır, damarlar ve çevresindeki bağ dokusu sıkışarak Havers kanallarını oluşturur (117,118).

Özellikle kafatasının yassı kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı bölümleri intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. Bu yassı kemikler, iç ve dış yüzeylerinde kompakt kemik, orta kısmında ise spongiyöz kemik barındırır (119).

**2.2.3.2. Endokondral kemikleşme:** Endokondral kemikleşme, memeli iskeletinin büyük bir kısmının oluşumunu sağlayan bir süreçtir ve kafatası kemikleri hariç, kıkırdak dokunun kemik dokusu ile yer değiştirilmesi sonucu meydana gelir (120). Vertebral kolon, pelvis ve ekstremitte kemikleri gibi yapılar bu süreç ile form bulur. Endokondral kemikleşmenin ilk adımı, uzun kemiklerdeki kıkırdak modelinin ortasında (diyafiz) kondrositlerin hipertrofisi ile başlar ve kemik oluşumu lokal olarak genişler (121). Bu süreçte, hyalin kıkırdaktan minyatür bir model oluştuktan sonra, bu model zamanla kemik dokusu ile yer değiştirir.

Kemik olgunlaşana kadar bir yandan yeni kemik yapılıırken, diğer yandan yapılan kemik belli bir oranda yıkıma uğrar (remodelling) (119). Kıkırdak modelin diyafiz bölgesinde, kıkırdağı örten perikondriumun iç katmanındaki mezenkimal hücreler bölünerek osteoprogenitör hücrelere dönüşür ve bunlar da osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar, kemik matriksini sentezleyip etraflarına salgırlar ve zamanla matriks içine gömülerek osteositlere dönüşürler, böylece kıkırdak modelin diyafizinde

intramembranöz kemikleşme ile silindir şeklinde bir kemik manşeti oluşur. Bu kemik manşeti çevreleyen doku artık periosteum olarak adlandırılır (119).

Normal şartlarda kıkırdak matriksi kan damarı içermediği için kıkırdak hücreleri, perikondriyumdaki kan damarlarından difüzyon yoluyla beslenirler. Ancak kemik manşet oluştuğunda difüzyon engellenir ve bu durum kemik manşeti çevreleyen alandaki kıkırdak hücrelerinin beslenememesine ve bozulmasına neden olur. Bu bozulma sürecinde hücreler önce büyür (hipertrofi) ve ardından dejenerasyona uğrar. Hücrelerin dejenerasyonu sonucu geriye sadece aralarındaki kıkırdak matriksi kalır. Bu aşamada, periosteumda osteoklastlar belirir ve kemik manşetini delerek foramen nutrisyumları açarlar, periosteumdaki kan damarlarının bir kısmı bu deliklerden girerek kıkırdak spiküllerinin arasındaki boşluklara yerleşir (120). Osteoblastların kemik matriksi salgılamasıyla primer ossifikasyon merkezi oluşur. Primer kemikleşme merkezinin büyümesi, periostal kemik manşetinin epifizlere doğru ilerlemesiyle aynı süreçler tekrarlanarak gerçekleşir (120).

Bu süreçte osteoklastlar aktif durumda olup, kemikleşmenin başlangıcından itibaren kemik spiküllerini merkezden itibaren rezorbe ederek kemik iliği boşluğunu oluştururlar. Bu boşluk, kıkırdak modelin kemikleşmesi ve uzaması tamamlanana kadar epifizlere doğru büyür ve dejenerasyonla ölen kıkırdak hücrelerinin kaybı, modelin epifizleri ile diyafizi arasında bulunan kondrositlerin hızlı mitoz bölünmeleriyle telafi edilmeye çalışılır. Mitozla çoğalan ve birbirine paralel dizilen kondrositler, izogen gruplar oluşturur. Bu çoğalmalar sonucunda kıkırdak taslağın boyu sürekli uzar ve bu uzama, epifizde görülen ikincil kemikleşme merkezi tarafından izlenir ve daha sonra başlayan diğer kemikleşme bölgeleri ile devam eder. İkincil kemikleşme merkezlerindeki kemikleşme, diyafizdekinden farklı olarak radial bir büyüme gösterir; bu sebeple epifizler şişkin bir biçim alır. Uzun ve kısa kemiklerin epifizlerindeki kemikleşme eklem yüzeylerine kadar devam etmez; bu kısımda kıkırdak bir bölge kalır ve büyüme tamamlandıktan sonra eklem kıkırdağı olarak varlığını sürdürür (121,122). Kemik uzamasına hizmet eden ve epifiz plağı olarak adlandırılan kıkırdak alan, kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarından diyafiz yönüne doğru kıkırdak hücrelerinin bölünüp, çoğalmasını sağlayarak sürekli kıkırdak dokusu üretir. Bu kıkırdak dokusu da yukarıda açıklanan yolla sürekli olarak yerini kemik dokusuna bırakır (121).

**2.2.3.3. Kemik yenilenme süreçleri:** Kemik yenilenme döngüsü, osteoklastların kemik resorpsiyonu ile başlayan başlangıç aşamasıyla başlar ve bunu osteoblastların kemik oluşumu ile devam eden bir aşama izler. Ancak bu iki aşama arasında bir geçiş (veya ters dönem) aşaması vardır. Döngü, osteositlerin ve kemik astar hücrelerinin koordine eylemleri ile tamamlanır (123). Başlangıç aşamasında, RANKL ve M-CSF gibi osteoklastojenik faktörlerin etkisi altında, hematopoietik kök hücreler belirli kemik yüzey alanlarına çekilir ve olgun osteoklastlara farklılaşarak kemik resorpsiyonunu başlatır (124).

Kemik yenilenme döngüsü sırasında, kemik hücreleri arasında, kemik matriksi içinde depolanan ve osteoklastların kemik resorpsiyonu sonrası salınacak olan çözünebilir bağ faktörlerini içeren doğrudan ve dolaylı iletişimler olduğu bilinmektedir (125). Örneğin, insulin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler), dönüşümsel büyüme faktörü  $\beta$ , BMP'ler, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve trombosit türevli büyüme faktörü gibi faktörlerin bağ faktörleri olarak işlev gördüğü düşünülür, çünkü bunlar kemik matriksinde depolanır ve kemik resorpsiyonu sırasında salınır (125). Bu fikir, insanlar ve fareler üzerinde yapılan genetik çalışmalar ile farmakolojik çalışmalar tarafından desteklenmektedir (125).

Yakın zamanda, semaforinler adı verilen başka bir molekül kategorisinin, kemik yenilenme sırasında kemik hücreleri arasındaki iletişimde rol oynadığı öne sürülmüştür (126). Başlangıç aşamasında, hasarlı veya yaşlı kemiğin tamamen çıkarılabilmesi için, osteoblastların farklılaşması ve aktivitesi inhibe edilmelidir. Osteoklastlar, kemik oluşumunu kemik resorpsiyonu sırasında inhibe eden Sema4D adlı bir faktör salgılar (126). Semaforinler, yalnızca zara bağlı değil aynı zamanda çözünebilir formlarda da bulunan ve immün yanıt, organogenez, kardiyovasküler gelişim ve tümör ilerlemesi gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynadığı gösterilen geniş bir glikoprotein ailesini oluşturur (127). Kemikte semaforinlerin, kemik yeniden şekillendirme döngüsü sırasında osteoklastlar ve osteoblastlar arasındaki hücre-hücre iletişiminde de rol oynadığı öne sürülmüştür (128).

### **2.3. FİBRÖZ DİSPLAZİ**

Fibröz displazi (FD), ilk olarak 20. yüzyılın başlarında tanımlanmış, kalıtsal olmayan bir iskelet bozukluğudur (129,130). Bu durum, normal kemik ve iliğin yerini fibro-osseöz dokunun aldığı anormal kemik metabolizması ile karakterizedir (2). FD'nin

oluşturduğu lezyonlar iyi huylu olarak kabul edilirken, kemiğin yapısal bütünlüğünü önemli ölçüde zayıflatabilirler ve bu zayıflama sonucunda kırıklar, kemik deformiteleri ve fonksiyonel bozulmaların oluşması ile hastaların yaşam kalitesi etkilenebilir (130). FD, tüm kemik tümörlerinin %2,5'ini ve tüm iyi huylu kemik tümörlerinin %7'sini oluşturur; bunlar doğuştan, metabolik ve genetik anormalliklerden kaynaklanır (131). FD, üç türü olan olağandışı bir gelişimsel anormallik olarak kabul edilir: monostotik FD (MFD), polioyotik FD (PFD) ve kraniyofasiyal. Literatür, pigmentli cilt lezyonlarının olduğu ve kadınlarda erken ergenlik ve hipertiroidizm gibi hormonal disfonksiyonların da eşlik ettiği bir PFD'yi tanımlar. Ayrıca, yalnızca sfenoid ve oksipital gibi kraniyofasiyal kompleksin kemikleriyle sınırlı olan kraniyofasiyal bir FD varyantı da vardır (131). Tarihte fibröz displazi sıklıkla osteofibröz displazi veya kemikleşmeyen fibromlar ve sementoosseöz displazi gibi diğer kemik hastalıklarıyla karıştırılmıştır (132). İleri görüntüleme ve moleküler teşhisler geliştirilene kadar fibröz displazinin klinik, radyolojik ve moleküler özelliklerine göre ayırıcı tanı elde edilmesi mümkün olmamıştır (133). FD'deki fibro-osseöz anomali, düzensiz ve dağınık yapısal özelliklere neden olur. FD nadir görülen ve sıklıkla yanlış teşhis edilen bir durum olduğundan, epidemiyolojisi hala yeterince bilinmemektedir (134). Etiyolojisinde, G sinyal iletim proteininin alfa-alt birimi olan guanin nükleotit bağlayıcı protein alfa uyarıcı (GNAS) geni tarafından ifade edilen bir mutasyonla ilişkilendirilmiştir (135). Hastalık, klinik özelliklerine göre sessiz, saldırgan olmayan veya saldırgan olarak sınıflandırılmıştır (133). Kemik ağrısı ve tekrarlayan kırıklar, çocukluk ve ergenlik döneminde en yaygın görülen belirtilerdir, bu belirtilerin ardından özellikle kafa ve yüz kemikleri etkilendiğinde malformasyon ve nörolojik basınç belirtileri izler (131). Yaklaşık olarak 1:30,000 bireyde görülür (136). FD vakalarının çoğu, hayatın erken dönemlerinde veya ikinci on yıllarında ortaya çıkar, kadınlarda erkeklere oranla 2:1 prevalans gösterir ve genellikle minimal ilerler ve semptom göstermez (137). Eğer tüm FD'lerin çocukluk veya ergenlik döneminde geliştiği varsayılırsa, monostotik örneklerin çoğu, aktif hale gelseler bile veya hayatın ilerleyen dönemlerinde tekrar aktive olsalarda, ilk kez teşhis edilene kadar fark edilemez (136). Erken ergenliğin en yaygın olduğu düşünülse de, etkilenen vakaların %21'i aşırı büyüme hormonu salınımı gösterir (138). Ancak, Waldron ve arkadaşları gibi birçok yazar, vakaların çoğunluğunun erken yetişkinlikte, iskelet olgunluğu sağlandığında "sönüp gittiğine" inanır. Eisenberg ve Eisenbud, bu iddiayı destekleyecek uzun vadeli FD vakası



araştırmalarının olmadığını düşünürler. Birçok FD vakası ağrısız olduğu için, ileri aşamada uzun süredir var olan bir lezyonun rastlantısal teşhisi tamamen mümkündür.

En sık etkilenen kraniyofasiyal kemik %58 oranla maksilladır, ardından mandibula (%43), frontal (%33), sfenoidal (%29), etmoidal (%24), parietal (%14), temporal (%5) ve oksipital kemikler gelir (%3-4) (147). Malign dönüşüm, vakaların %0,4 ila %4'ünde meydana gelir (133). FD, klinik, radyografik ve histolojik bulgulara dayanarak teşhis edilir (137). Ancak, tedavinin ana amacı her zaman işlevi korumak olmakla birlikte, temel kusuru tedavi ederek estetiği sağlamak, geliştirmek de meşru bir amaçtır (139).

### **2.3.1. Fibröz Displazinin Altında Yatan Moleküler Mekanizmalar**

FD temelde büyük ölçüde spesifik somatik mutasyonlara bağlı olarak kemik oluşturan mezenkimal hücrelerin bir bozukluğudur. Fibröz displazinin en iyi bilinen moleküler nedenlerinden biri, G proteinine bağlı reseptörlerden (GPCR'ler) sinyallerin aşağı akışındaki efektörlerine ileten heterotrimerik G protein kompleksinin bir parçası olan Gs proteininin alfa alt ünitesini kodlayan GNAS genindeki mutasyonlarda yatmaktadır (140,141). FD'de, GNAS'ta meydana gelen ve fonksiyonun artmasına sebep olan mutasyonlar, anormal sinyalleşmeye ve hücreSEL mekanizmaların bozulmasına yol aarak anormal kemik oluşumuna ve yeniden şekillenmeye neden olur (142). Bunun sonucunda yükselen siklik adenzin monofosfat (cAMP) seviyeleri protein kinaz A'yı (PKA) aktive eder ve onun etki ettiği efektörler üzerinden normal osteoblast ve osteoklast aktivitesi bozulur (143).

FD'de GNAS'ı etkileyen mutasyonlardan en yaygın olanları, sıklıkla Arg201 veya Gln227 rezidülerinde meydana gelen nokta mutasyonlarıdır (144). Bu mutasyonlar, Gs $\alpha$ 'nın yapısal olarak aktif hale gelmesine sebep olur (145). Gs $\alpha$ 'nın aktif GTP'ye bağlı durumda uzun süre kalmasına bağlı olarak sürekli cAMP sinyalleşmesine ve dolayısıyla hücre içi siklik adenzin monofosfat seviyelerinde artışa yol aar (141).

Yüksek cAMP seviyelerinin osteoblastlar üzerinde karmaşık etkileri vardır. Bazı durumlarda cAMP, PKA'yı aktive etmek için ikincil haberci görevi görür ve bu da hücre gelişiminin aşamasına ve ilgili diğer sinyal yollarına bağlı olarak osteoblast farklılaşmasını aktive edebilir veya inhibe edebilir (146-149). Aynı zamanda, yüksek cAMP seviyeleri, osteoklast aktivasyonu ve farklılaşması için önemli olan RANKL'nin

ekspresyonunu artırarak osteoklastik kemik rezorpsiyonunu da uyarabilir (150-152). Yüksek cAMP seviyeleri, PKA'nın aktivasyonuna yol açabilir; bu, daha sonra osteoklast farklılaşması ve aktivitesinin temel düzenleyicileri olan NF- $\kappa$ B ve c-Fos yollarını baskılayarak osteoklast aktivitesini inhibe eder (153).

Normal koşullar altında, cAMP yolu, cAMP'yi degrade fosfodiesterazların etkisi ve onu etkisiz hale getiren G protein alfa alt biriminin GTPaz aktivitesini içeren düzenleyici mekanizmalar bulunmaktadır (154). Buna karşın, Gs $\alpha$ 'nın mutasyona uğramış, yapısal olarak aktif formu nedeniyle bu düzenleyici mekanizmalar yetersiz kalmakta veya etkisiz hale gelmektedir (155).

FD lezyonları hem tek bir lezyon içinde hem de aynı kişideki farklı lezyonlar arasında önemli farklılıklar gösterir (130,156). Bu heterojenliğin klinik, radyolojik ve moleküler sonuçları vardır ve hastalığın farklı şekillerde gözlenmesine ve ilerlemesine sebep olur (157). Radyografilerde FD, radyolüsent bir alan, "buzlu cam" opasite veya yoğun sklerotik bir bölge olarak gözlenebilir (132,158,159). Bu değişkenlik sıklıkla mineralizasyon derecesini ve lezyon içindeki fibröz ve kemik doku oranını yansıtır (159). Bazı lezyonlar asemptomatik kalabilirken bazıları ağrıya, şişmeye veya fonksiyonel bozulmaya neden olabilir (2). Lezyonun konumuna ve yaygınlığına bağlı olarak patolojik kırıklar veya deformiteler de ortaya çıkabilir (2,160,161). Moleküler olarak incelendiğinde, FD lezyonlarının heterojenliğine çeşitli faktörler katkıda bulunmaktadır. GNAS genindeki post-zigotik mutasyonlar döllenmeden sonra meydana gelir ve bundan etkilenen normal hücrelerin mozaik desenine yol açtığı anlamına gelir (162). Aynı lezyon içindeki farklı hücreler farklı seviyelerde GNAS aktivasyonuna sahip olabilir, bu da klinik görünümde görülen değişkenliğe sebep olabilir (163,164). Bunun yanında FD lezyonlarındaki hücrelerin kemik oluşturma yetenekleri farklılık gösterir. Bazı bölgelerde daha osteojenik (kemik oluşturan) hücreler bulunabilirken, diğerleri ağırlıklı olarak fibröz dokudan oluşabilir (165). Ayrıca mekanik kuvvetler ve lokal büyüme faktörleri de dahil olmak üzere kemik mikro çevresi, FD lezyonlarındaki hücrelerin davranışını etkileyerek başka bir değişkenlik katmanı ekleyebilir (67,166).

### **2.3.2. Fibröz Displazide Klinik Uygulamalar ve Tedavi Modaliteleri**

Bazı FD vakaları asemptomatik olup müdahale gerektirmeyebilirken, bazı vakalarda ise ağrı, deformiteler ve kırıklar gözlenebilir ve terapötik yaklaşım gerekebilir. Özellikle lezyonlar asemptomatik veya minimal semptomatik olduğunda (156), belirli FD

vakalarında gözlem genellikle ilk basamak yaklaşımıdır (157). Bu gözlem süreci durumun ilerleyişini ve potansiyel komplikasyonlarını takip amacıyla ve aktif müdahale olmaksızın düzenli klinik ve radyografik değerlendirmeleri içerir (157).

Bunun yanında daha ileri FD vakalarında, vakanın gidişatına ve FD semptomlarına göre çeşitli ilaçlı tedavi yöntemleri ve cerrahi müdahale gibi tedavi yaklaşımları gerekebilir (167-169).

**2.3.2.1. Bifosfonatlar:** Bifosfonatlar, osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu inhibe eden ilaçlar sınıfına ait olup, osteoporoz, Paget kemik hastalığı ve belirli kanserlerle ilişkili kemik metastazları dahil olmak üzere çeşitli kemik hastalıklarının tedavisinde etkilidir (4,170). 1970'lerde piyasaya sürülen birinci kuşak bisfosfonatlar, etidronat gibi, kemik rezorpsiyonunu inhibe etmede etkiliydi ancak nispeten düşük potansiyelleri ve yüksek dozlarda kullanıldığında mineralizasyon defektlerini indüklemeye potansiyelleri nedeniyle klinik kullanımları sınırlıydı (171,172). Alendronat ve pamidronat gibi ikinci kuşak bifosfonatlar, 1980'lerin sonları ve 1990'ların başlarında geliştirildi ve bir önceki kuşaktan önemli ölçüde daha güçlüydü (173). Bu ikinci kuşak ilaçlar, yan etkilerin riskini azaltan daha düşük dozlarda kullanılabilir ve daha geniş bir kemik hastalığı yelpazesinde etkilidir. Zoledronik asit ve risedronat gibi üçüncü kuşak bifosfonatlar, 1990'ların sonlarında ve 2000'lerin başlarında ortaya çıktı (174). Bu bifosfonatlar, daha büyük potansiyele sahip olmaları ve daha az sıklıkta uygulanabilmeleri ile karakterizedir (175). Örneğin, zoledronik asit, osteoporoz tedavisi için yılda bir kez verilebilir (176) (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1:** Günümüzde kullanılan bifosfonatların endikasyonları, kullanım dozu, doz aralığı ve veriliş yolu (177,178)

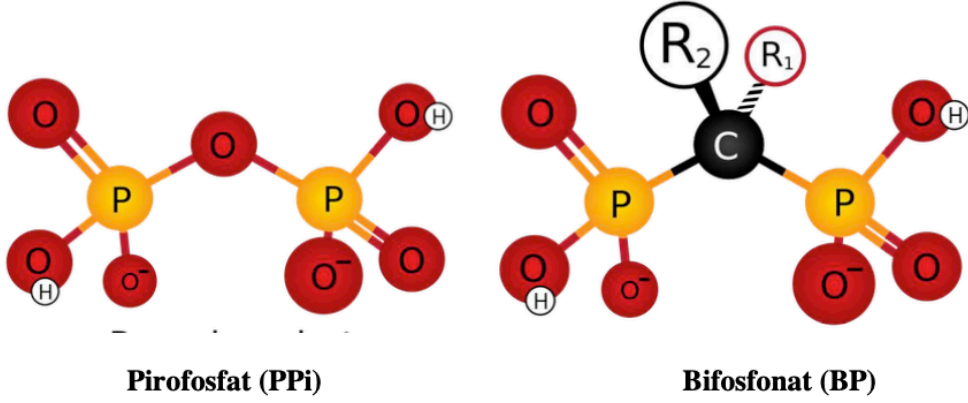
	<b>Nitrojen içerme</b>	<b>Bifosfonat</b>	<b>Ticari İsim</b>	<b>Endikasyon</b>	<b>Kullanım</b>
<b>Birinci kuşak</b>	-	Etidronat	Difosfen ® Osteum ®	Paget Malignite sonrası hiperkalsemi	Oral Aralıklı 200- 400 mg
<b>Birinci kuşak</b>	-	Tiludronat	Skelide ®	Paget	Oral 200 mg Aralıklı

**Tablo 2.1** (devam)

<b>İkinci kuşak</b>	+	Alendronat	Fosamax®	Osteoporoz	Oral Günlük 10 mg Haftalık 70 mg
<b>İkinci kuşak</b>	+	Pamidronat	Aredia®	Kemik metastazı Multiple myeloma Malignite sonrası hiperkalsemi	IV Aralıklı 3 haftada bir 90 mg
<b>Üçüncü kuşak</b>	+	Risedronat	Actonel® Acrel®	Osteoporoz	Oral Günlük 5 mg Haftalık 35 mg
<b>Üçüncü kuşak</b>	+	İbandronat	Boniva®	Osteoporoz	Oral/ IV Günlük 2,5 mg Aylık 150 mg 3 ayda bir 3 mg
<b>Üçüncü kuşak</b>	+	Zoledronat	Zometa®	Osteoporoz Kemik metastazı	IV Aralıklı, 3 haftada bir 4 mg yılda 5 mg

Bifosfonatlar, temel olarak kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücreler olan osteoklastların aktivitesini inhibe ederek etki gösterir (179). Aktif rezorpsiyon alanlarında kemik mineral yüzeylerine bağlanır, burada osteoklastlar tarafından yutulur (180). Osteoklastların içine girdikten sonra, bisfosfonatlar hücrenin fonksiyonunu bozar ve apoptozu tetikleyerek kemik rezorpsiyonunu azaltabilirler (181).

Temelde osteoporoz ve diğer osteoporotik bozukluklarının tedavisinde kullanılan bifosfonatların, FD tedavisindeki potansiyel etkileri giderek daha fazla dikkat çekmektedir (4,182,183). Bifosfonatlar, osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu inhibe eden inorganik pirofosfatın sentetik analoglarıdır (4) (Şekil 2.2). Etkisini hidroksiapatit kristallerine bağlanarak ve osteoklast aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirir (170).



**Şekil 2.2:** Pirofosfat ve bifosfonatların moleküler düzeyde kimyasal yapısı (4)

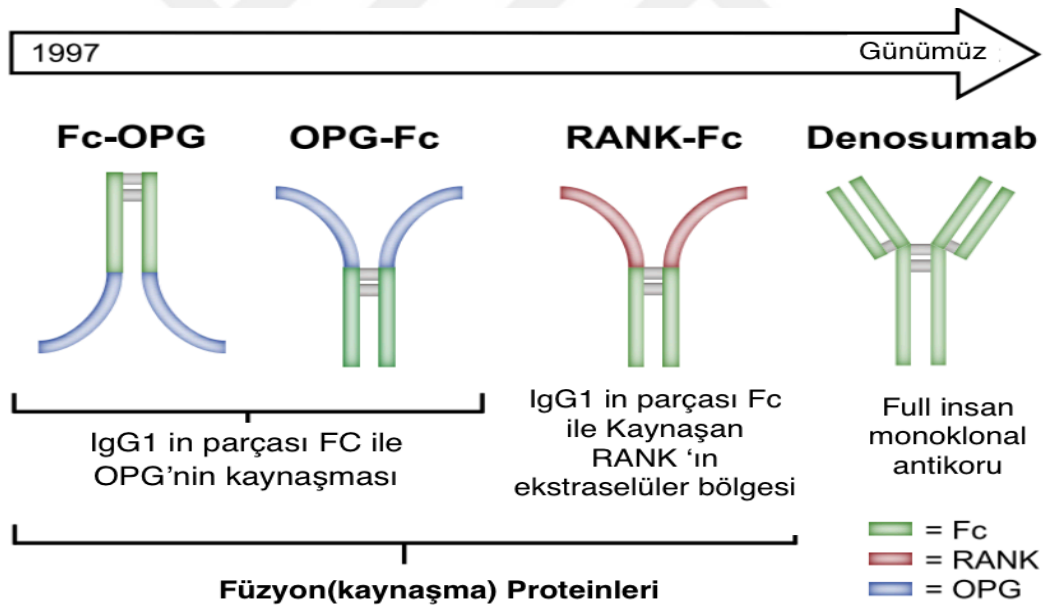
FD'nin başlıca semptomlarından biri kemik ağrısı olup birçok çalışma, bifosfonatların FD hastalarında ağrıyı etkili bir şekilde hafifletebildiğini bildirmiştir (184,185). Bunun yanında bifosfonatların kemikteki hidroksiapatit bağlanma bölgelerine, özellikle de aktif rezorpsiyon bölgelerine karşı yüksek afinitesi bulunmaktadır (186). Osteoklastlar kemiğin bir bölümünü rezorbe etmeye çalıştıklarında bir yandan da bifosfonatı alırlar (186). İlaç, osteoklast içindeki spesifik hücresel süreçlere müdahale ederek osteoklast aktivitesinde azalmaya yol açar ve sonunda osteoklastların apoptozunu indükler (187). Ayrıca FD sıklıkla alkalın fosfataz gibi kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerinde yükselmeye neden olurken bifosfonat tedavisi bu belirteçlerde düzelmeyi sağlayabilir (188).

Bisfosfonatlar genellikle iyi tolere edilirken, uzun süreli kullanım nadir ancak ciddi yan etkilerle ilişkilendirilmiştir, bunlar arasında çene osteonekrozu ve atipik femoral kırıklar bulunur (189). Bu riskler, özellikle kırık riski yüksek olan hastalarda, tedavinin faydalarıyla dengelenmeli ve buna göre tedavi uygulanmalıdır.

**2.3.2.2. Denosumab:** Denosumab, osteoporoz, tedaviye bağlı kemik kaybı, kemik metastazları ve kemikteki dev hücreli tümör tedavisinde kullanılan insan monoklonal antikordur (190,191). Kemik hastalıklarının farmakolojik yönetiminde önemli bir ilerlemeyi temsil eden denosumab, bifosfonatlara kıyasla alternatif bir mekanizma ile etki göstermektedir.

Denosumab, moleküler biyolojideki ilerlemeler ve kemiğin yeniden modellenmesinde kritik bir rol oynayan RANK/RANKL/Osteoprotegerin (OPG) yolakları hakkındaki bilgilerin artmasıyla geliştirildi. RANKL proteini, kemik rezorpsiyonundan sorumlu olan osteoklastların oluşumu, fonksiyonu ve hayatta kalması için hayati öneme sahiptir (192). OPG, RANKL ile etkileşime girerek RANKL 'ın RANK ile etkileşimini engeller ve osteoklast oluşumunu inhibe eder (193).

1990'ların sonları ve 2000'lerin başlarında, araştırmacılar kemik hastalıkları için terapötik bir strateji olarak RANK/RANKL etkileşimini hedef almaya odaklandı (194). Amgen tarafından geliştirilen denosumab, OPG'nin etki mekanizmasını taklit ederek osteoklastlar ve öncüllerinin yüzeyindeki RANK ile olan etkileşimini inhibe eden, RANKL'ye bağlanan tamamen insan monoklonal antikordur (195,196) (Şekil 2.3). Bu inhibisyon, kemik rezorpsiyonunu azaltır ve kemik kütleini ve gücünü artırır.



Şekil 2.3: RANKL antagonisti gelişiminin tarihi (11)

Denosumab, 2010 yılında kırık riski yüksek olan postmenopozal kadınlarda osteoporoz tedavisi için Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylandı (197). Sonraki onaylar, osteoporozlu erkeklerde kemik kütleini artırmak için tedavi, prostat veya meme kanseri için hormon ablasyon terapisi alan hastalarda kemik kaybı tedavisi ve kemikteki dev hücreli tümör tedavisini içerecek

şekilde endikasyonlarını genişletti (198,199). Denosumabın solid tümörlerden kemik metastazı olan yetişkinlerde osteoporoz ve iskeletle ilişkili problemlerin tedavisi için yakın zamanda onaylanmış olmasıyla birlikte (200, 201) FD tedavisindeki potansiyel rolü son yıllarda oldukça ilgi çekmektedir (10,202,203).

Yapılan çalışmalarda çeşitli bazı çalışmalar denosumabın FD semptomlarının iyileştirilmesinde yararlı olduğunu göstermiştir. Ağrı, FD'nin en fazla rahatsızlık veren semptomlarından biridir ve denosumabın FD/McCune-Albright Sendromu (MAS) sahibi hastalarda (204) ve FD hastalarında (205-207) ağrıyı ciddi şekilde azalttığı belirtilmiştir. RANKL inhibisyonu, özellikle FD lezyonlarında gözlenen yüksek RANKL ekspresyonu nedeniyle FD için de çekici bir tedavi yöntemi olmaktadır (208). FD/MAS modeli oluşturulan hayvanlarda gerçekleştirilen bir çalışmada denosumab tedavisinin yerleşik litik kemik lezyonlarının genişlemesini ve yeni odakların gelişmesini önlediği bildirilmiştir (202). Yapılan başka bir çalışmada ise denosumab FD hastalarında kemik döngüsünde azalmaya neden olmuştur (203).

Denosumab, kemik hastalıklarına karşı kullanılan ilaçlar arasında oldukça değerli bir yere sahiptir. Yılda iki kez deri altından uygulanması, bazı bifosfonatlara kıyasla daha az dozaj veya infüzyon gereksinimleri sebebiyle kolaylık sunmaktadır (209,210). Ancak, her tedavi gibi denosumabın da potansiyel yan etkileri bulunmaktadır. Bunlar arasında hipokalsemi, ciddi enfeksiyonlar ve nadiren çene osteonekrozu ve atipik femoral kırıklar bulunmaktadır (211). Ek olarak denosumab ile tedavi edilen hastalar, tedaviyi bıraktıktan sonra ribaund ilişkili omurga kırıkları sorunuyla da karşı karşıyadır (212) ve bu da tedaviyi durdurma üzerine dikkatli değerlendirme ve yönetim gerektirir.

**2.3.2.3. Tamoksifen:** Tamoksifen, selektif östrojen reseptör modülatörü (SÖRM) ilaçlar sınıfına ait bir ilaçtır ve meme kanseri gibi durumların tedavisinde kullanılır (213). Etki mekanizması, östrojenin hücrel etkilerini modüle etmek üzerine kuruludur, ancak bu etkiler dokudan dokuya değişiklik gösterebilir (214).

Tamoksifenin FD ve MAS üzerindeki etkilerini araştıran çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte çalışmalar sınırlı olup elde edilen sonuçlar çeşitlidir. FD ve MAS'de, özellikle erken puberte başlangıcı veya diğer östrojenle ilgili belirtiler içeren durumlar var olduğunda tamoksifenin kullanılması gerekçesinin altında SÖRM olarak etki etmesi yatmaktadır (215). Tamoksifen, bazı dokularda östrojenin etkilerini bloke edebilir, bu da özellikle erken puberte ve östrojen sinyalleşmesinden etkilenen kemik lezyonları ile ilgili

MAS semptomlarını hafifletebileceğini düşündürmektedir. Ancak, FD ve MAS'yi tedavi etmek için özel olarak tamoksifen kullanımı için geniş çapta raporlar bulunmamaktadır ve elde edilen kanıtlar çoğunlukla bireysel vaka raporları veya küçük vaka serilerinden gelmektedir. FD ve MAS'de tamoksifen kullanımının ana amacı, kemik ağrısını yönetmek ve fibroz displazi lezyonlarını stabilize etmektir (162). Bazı raporlar, tamoksifenin kemik ağrısını azaltmaya ve fibroz lezyonların büyümesini stabilize etmeye yardımcı olabileceğini öne sürmektedir, ancak bu sonuçlar tüm hastalarda tutarlı olarak gözlemlenmez. Osteodistrofli hastalarda kullanılan, osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe eden bifosfonatların, FD'de kullanımı sınırlıdır. Aromataz inhibitörleri ve tamoksifen uygulamalarının, MAS'li hastalarda erken puberte tedavisinde başarılı olduğu söylenmektedir (215,216). Ancak FD ve MAS'de tamoksifenin etkinliğini değerlendiren büyük ölçekli, kontrollü klinik çalışma eksikliği bulunmaktadır.

**2.3.2.4. Hormon tedavisi:** FD'li bazı hastalarda sıklıkla MAS'ın bir parçası olarak endokrin anormallikleri de görülür. MAS, FD, cilt hiperpigmentasyonu (café-au-lait lekeleri) ve hiperfonksiyonel endokrinopatilerden oluşan bir üçlüdür (237). Endokrinopatiler erken ergenlikte, hipertiroidizm, büyüme hormonu fazlalığı ve hormonla ilişkili diğer bozukluklar şeklinde ortaya çıkabilir (238). Hormonal tedavi ise bu MAS ilişkili endokrin anormalliklerin tedavisinde önemlidir.

**2.3.2.5. Cerrahi müdahale:** FD normal kemiğin fibröz kemik matriksiyle değiştiği, deformasyona ve kırılmaya yatkın, kemiklerin zayıflamasına yol açan bir kemik bozukluğudur. Genellikle bifosfonatlar tedavi de kullanılırken, tedavi için cerrahi de sıklıkla uygulanan bir yaklaşımdır.

FD tedavisinde cerrahi uygulanmasının çeşitli endikasyonları bulunmaktadır. Öncelikle zayıflamış kemik nedeniyle FD'li hastalar kırıklara karşı hassastır ve kırığı stabilize etmek ve iyileşmeyi hızlandırmak için ameliyat gerekebilir (217). Bunun yanında, özellikle femur gibi ağırlık taşıyan kemiklerde ilerleyici kemik deformiteleri fonksiyonel bozulmaya ve ağrıya neden olabilir, cerrahi müdahaleler bu tip bozuklukların tamirinde kullanılabilir (167,218). Diğer cerrahi endikasyonları ise tıbbi tedaviye cevap vermeyen sürekli ağrı (219) ve kistik lezyon varlığı (220) sayılabilir. Son olarak, nadir olmasına rağmen FD, osteosarkom, fibrosarkom veya kondrosarkoma gibi malign hastalıklara dönüşüme uğrayabilir ve bu gibi durumlarda tümörün geniş rezeksiyonu



gerekir (221, 222). Bir vaka raporunda ise, sfenoid sinüs FD'sinin cerrahi eksizyonunun baş ağrılarını önemli ölçüde hafiflettiği belirtilmiştir (223).

**2.3.2.6. Ağrı kontrolü:** Ağrı kontrolü için, ağrının şiddetine ve doğasına bağlı olarak steroidal olmayan antiinflamatuvar ilaçlar, analjezikler veya diğer ağrı modülatörlerinin bir kombinasyonu kullanılabilir (168). Bunun yanında FD/MAS'lı tek bir vakanın incelendiği bir raporda, intranazal kalsitonin uygulaması, kemik lezyonlarının bulunduğu bölgede ağrı şiddetinde iyileşme ve yaşam kalitesinde iyileşme ile ilişkilendirilmiştir (224) ancak FD/MAS kaynaklı ağrı üzerine kalsitoninin etkileri hala bilinmemektedir.

**2.3.2.7. Fizik tedavi:** FD'nin henüz bilinen bir tedavisi olmasa da fizik tedavi, hastalığın yönetiminde önemli bir rol oynar ve işlevin iyileştirilmesine, ağrının azaltılmasına ve yaşam kalitesinin artırılmasına yardımcı olur (157).

### **2.3.3. Fibröz Displazide Hasta Takibi**

FD'li hastalarda hasta takibi önemli yer tutmaktadır. Öncelikle FD hastaları, hastalığın ilerleyişini ve etkilenen kemiklerin durumunu değerlendirmek için düzenli izleme altında olmalıdır (157,225). Bu kontroller genellikle fiziksel muayeneler ve röntgen veya MR gibi görüntüleme analizlerini içerir ve sıklığı, hastalığın şiddeti ve ilerleyişine bağlı olarak değişebilir.

Semptom yönetimi FD hastalarının takibinde oldukça önemli yer tutmaktadır. FD ile ilişkili ağrılar ilaçlarla yönetilebilir. Ağrıyı azaltmak için genellikle nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlar kullanılmaktadır (184). Daha şiddetli ağrılar için daha güçlü ilaçlar reçete edilebilir (184). Hastaların, ağrı yönetimi stratejilerini sağlık sağlayıcıları ile tartışmaları önemlidir.

FD, ciddi kemik deformitesine, kırıklara veya işlevsel bozulmaya yol açtığında cerrahi müdahale gerekebilir. Cerrahi seçenekler, fibröz dokunun çıkarılması (küretaj), kemik grefti veya kemikleri stabilize etmek için vidaların yerleştirilmesini içerebilir (217,226). Cerrahi kararı birkaç faktöre bağlı olup bunlar arasında hastanın semptomları, etkilenen kemiğin yeri ve komplikasyon riski bulunmaktadır.

Özellikle fibroz displazide, cilt pigmentasyonu ve hormonal problemleri içeren FD/MAS durumları, endokrin bozukluklarla ilişkilendirilebilir, bu nedenle hastaların bir

endokrinolog tarafından değerlendirilmesi gerekebilir (227). Bu değerlendirmeler altta yatan herhangi bir hormonal dengesizliği tanımlamaya ve tedavi etmeye yardımcı olabilir.

FD hastalarının genel kemik sağlığını korumak önemlidir. Hastalar, yeterli kalsiyum ve vitamin D alımını sağlamalı, tolere edildikleri ölçüde ağırlık taşıyan egzersizler yapmalı ve sigara içmekten ve aşırı alkol tüketiminden kaçınmalıdır (157).

FD gibi kronik durumlar, zihinsel sağlığını etkileyebilir. Hastalar, uzun süreli bir hastalık durumuyla yaşamanın duygusal yönleriyle başa çıkmak için danışmanlık veya destek gruplarından fayda görebilir (228,229).

FD'li bireyler için düzenli diş kontrolü, hastalığın çene ve kafatası kemikleri üzerindeki olası etkisi nedeniyle hayati önem taşımaktadır (230). FD, bu kemiklerin yapısında ve bütünlüğünde değişikliklere neden olabilir, bu da diş sağlığını etkileyebilir (160).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. KULLANILAN DENEY HAYVANLARI

Bu çalışma Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (proje no:2022/192). Çalışmamızda 40 günlük yaklaşık  $180 \pm 10$  gram ağırlığında 30 adet dişi Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Hayvanların bakımları oda sıcaklığında ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü ile standart koşullar altında gerçekleştirildi. Hayvanların sağlık kontrolleri görevli veteriner hekim tarafından yapıldı ve randomize olarak her grupta 10 hayvan olacak şekilde üç gruba ayrıldı ve çalışma süresince beslenmeleri standart kemirgen yemi ve musluk suyu ile *ad libitum* olarak sağlandı (Şekil 3.1). Kafesler günlük olarak temizlendi. Çalışmada kullanılan protokol Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından onay almıştır (Etik No: HDK-2022/16).



Şekil 3.1: Deneyle hayvanları

### 3.2. DENEY PROTOKOLÜ

Hayvanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Kontrol grubunda bulunan hayvanlara sadece subkutan %0,1 NaCl enjeksiyonu yapıldı, denosumab grubu hayvanlara her hafta düzenli olarak denosumab (%0,1 NaCl içinde 10 mg/kg denosumab (Prolia Amgen), subkutan) uygulandı (6), bifosfonat grubu hayvanlara ise her hafta düzenli olarak zoledronik asit (%0,1 NaCl içinde 0,1 mg/kg zoledronik asit (Zolenat® 4 mg/5 mL, Mustafa Nevzat, Türkiye), intravenöz) uygulandı (5). Uygulamalar her hafta bir kere olacak şekilde üç ay boyunca ratların gelişim atak dönemi bitinceye kadar devam etti.

### 3.3. İLAÇLARIN VERİLME ŞEKLİ

Zoledronik asit grubu; İntravenöz enjeksiyon (%0,1 NaCl içinde 0,1 mg/kg zoledronik asit) uygulamak için en sık tercih edilen lateral kuyruk veni kullanıldı. Damarın daha iyi görülebilmesi amacıyla 45 derece sıcaklıktaki suya 5-10 saniye ratların kuyruğu daldırıldı ve alkolle silip damar genişlemesi sağlandıktan sonra insülin enjektörü ile ilaç zerk edildi. Bu esnada damarda şişlik oluşmamasına dikkat edildi. Şişlik oluştuğu durumda daha proksimal bir noktadan tekrar damara girip ilaç uygulandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Kullanılan zoledronik asit

Denosumab grubu; Subkutan enjeksiyon (%0,1 NaCl içinde 10 mg/kg denosumab) uygulamak için en sık tercih edilen bölge olarak sırtta iki omuz başı arasında oluşturulan üçgen bölgedeki gevşek deri tercih edildi. Alkolle sildikten sonra insülin enjektörünü üçgen bölgeden 10 mm kadar yaklaşık ilerletip ilaç zerk edildi. Bu esnada deri altında yayılımı görebilmek için şişlik olduğundan emin olarak doğru bölgede

olunduğu onaylandı. Enjeksiyonlarda peritonit riskinin en az şekilde olması amacı ile, enjeksiyon alanları sürekli kontrol edildi. Kızarıklık, şişlik, ödem görülürse sıçanların enjeksiyon bölgeleri değiştirilerek yine subkutan enjeksiyon için kullanılan abdomen bölgesinden enjeksiyon yapıldı (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3:** Kullanılan denosumab

Kontrol grubu; Subkutan enjeksiyon (%0,1 NaCl) yapabilmek için en sık tercih edilen bölge olarak sırtta iki omuz başı arasında oluşturulan üçgen bölgedeki gevşek deri kullanıldı. Alkolle sildikten sonra insülin enjektörünü üçgen bölgeden 10 mm kadar yaklaşık ilerletip ilaç zerk edildi. Bu esnada deri altında yayılımı görebilmek için şişlik olduğundan emin olarak doğru bölgede olduğuna onaylandı. Enjeksiyonlarda peritonit riskinin en az şekilde olması amacı ile, enjeksiyon alanları sürekli kontrol edildi. Kızarıklık, şişlik, ödem görülürse sıçanların enjeksiyon bölgeleri değiştirilerek yine subkutan enjeksiyon için kullanılan abdomen bölgesinden enjeksiyon yapıldı.

İlk ilaçlar verilmeden önce veteriner hekim denetiminde ratlara ortalama 100 mg/kg ketamin hidroklorid, (Ketasol, Richterpharma AG Avusturya) ve 50 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Almanya) ile genel anestezi sağlandı ve Siemens Arcadis Avantic circuit 10143408 v1 Gen1 marka C kollu röntgen ile femur kemikleri net görülecek şekilde görüntüleri alındı (Şekil 3.4). Ağırlık ölçümleri yapıp dozaj hesaplamalarına göre enjeksiyonlara başlandı. Her hafta 1 enjeksiyon yapılacak şekilde gelişim atak dönemlerini tamamlayacakları 90 gün süresince enjeksiyon işlemleri devam etti. Üç ayın sonunda, veteriner hekim denetiminde ratlara ortalama 100 mg/kg ketamin hidroklorid, (Ketasol, Richterpharma AG Avusturya) ve 50 mg/kg ksilazin (Rompun,

Bayer, Almanya) ile genel anestezi sağlandı. Hayvanlardan biyokimyasal analiz için kardiyak ponksiyonla kan örnekleri alındı (Şekil 3.5). Kan örnekleri alınan hayvanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen hayvanların giyotinle gövdeleri başlarından ayrıldı ve büyüme bölgelerinin değerlendirilebilmesi için total mandibula ve femur kemikleri rezeke edildi. Rezeke edilen femurlar ve mandibulaları histopatolojik incelemeye gönderilmeden önce Siemens Arcadis Avantic circuit 10143408 v1 Gen1 marka C kollu röntgen cihazı kullanılarak farklı dozlarda çekim yapılarak iki boyutlu görüntüler elde edildi.Elde edilen röntgenler Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi radyoloji bölümünde 2 farklı kör radyolog tarafından analiz edildi.



**Şekil 3.4:** Siemens C kollu röntgen ile ilk röntgen örneklerinin alınması



**Şekil 3.5:** Kardiyak ponksiyon ile kan örneklerinin alınması

### 3.4. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

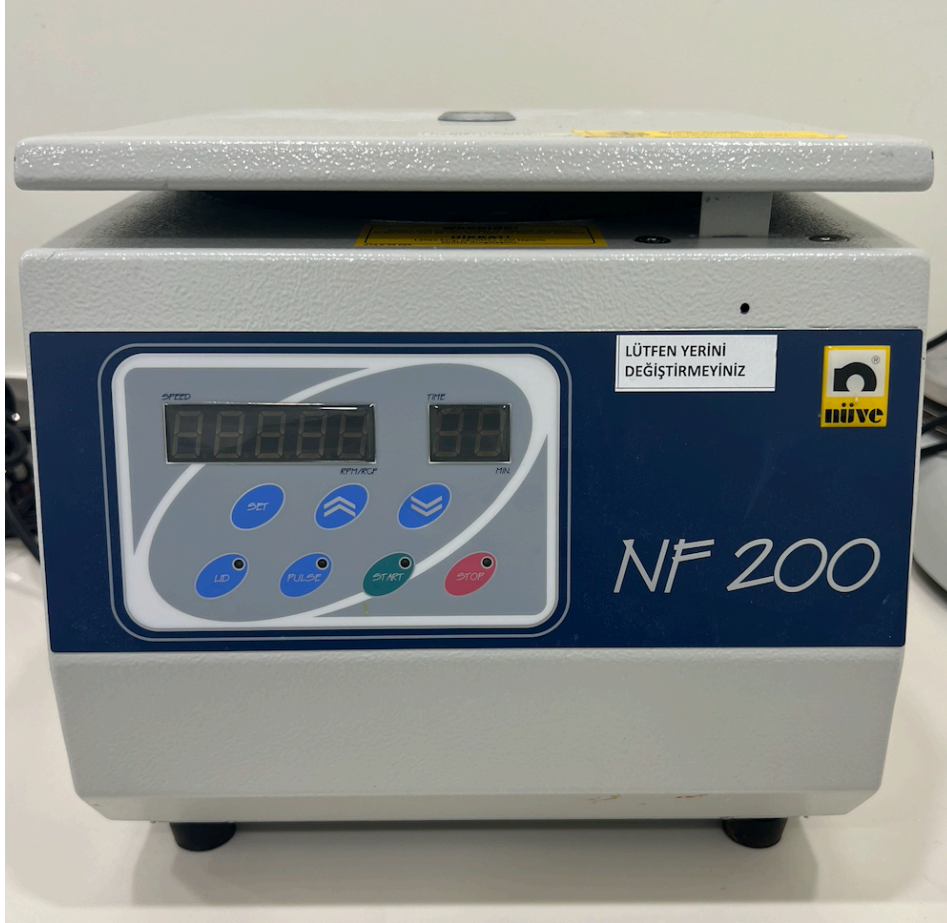
Alınan kan örnekleri serum tüplerine alındı ve (Nüve; NF200) 3000 rpm’de 10 dakika 4°C’de santrifüj edilerek serum elde edildi (Şekil 3.6). Elde edilen serumlar, eppendorf tüplerine transfer edildi ve analiz zamanına kadar -80°C’de saklandı. Alınan serumlarda alkalen fosfataz (ALP), somatomedin C (IGF-1), tiroit uyarıcı hormon (TSH), kalsiyum, fosfor, 25-hidroksi vitamin D3, parathormon intakt (iPTH) parametreleri analiz edildi. (13,14) (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1:** Kullanılan cihazlar

Otoanalizör (Modular PP)
Çoklu pipet (Thermo 30-300 µl)
Plastik tüp (Sarı kapaklı jelli vakoteynır tüpü)

**Tablo 3.1** (devam)

UV spektrofotometre
Etüv (Nüve NF200)
Eppendorf tüpü
ELISA yıkayıcı (Stat Fax 2600)
ELISA okuyucu (Stat Fax 2100)



**Şekil 3.6:** Satrifuj cihazı

Saklama sıcaklığı  $-80^{\circ}\text{C}$  olan serumlar, ölçümlerden bir gece önce  $-20^{\circ}\text{C}$ 'ye, ardından ise yavaş çözünme sağlamak amacıyla  $+4^{\circ}\text{C}$ 'lik buzdolabına aktarıldı.



IGF-1 (somatomedin C) ölçümü; Elabscience marka Rat IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) ELISA Kit Katalog no: E-EL-R3001 kullanılarak ölçüldü. Bu ölçüm, çift antikorlu sandviç Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu yöntemde, öncelikle spesifik antikorlar ile kaplanmış bir plakaya örnekler eklenir. İkinci bir antikor (detection antibody), ölçüm yapılacak protein ile bağlanır ve sonrasında bir enzimle konjuge edilen üçüncü bir antikor eklenir. Tepkime, bir substratın eklenmesiyle enzimatik olarak tetiklenir ve oluşan renk değişimi,  $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$  dalga boyunda ölçülen protein miktarını kantitatif olarak belirlemek için kullanılır.

Alkalenfosfataz (ALP) ölçümü; Kolorimetrik yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Sandviç tekniği olan elisa yöntemi kullanıldı. Serum alkalenfosfataz düzeyleri, Shimadzu UV 120 spektrofotometre ile  $405 \text{ nm}$  dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlendi. Bu süreçte, Abcam marka Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric) (ab83369) kiti kullanıldı.

Kalsiyum ölçümü; Elabscience marka Calcium (Ca) Colorimetric Assay Kit (Katalog numarası: E-BC-K103-M kiti) kullanıldı. Numunedeki kalsiyum iyonları, alkali çözeltide Metil Timol Mavisi ile bağlanarak mavi bir kompleks oluşturuldu. Bu mavi kompleksin  $715 \text{ nm}$  özgül bir absorpsiyon tepe noktası vardı ve kalsiyum içeriği,  $610 \text{ nm}$ 'de ölçülen optik yoğunluk değeri ile hesaplandı.

Fosfor ölçümü; Elabscience marka Phosphorus (Pi) Colorimetric Assay Kit (Phospho Molybdate Method) Kiti (Katalog numarası: E-BC-K245-M) kullanıldı. İnorganik fosfor, molibdenik asit ile reaksiyona girerek fosfomolibdenik asit üretti. Bu fosfomolibdenik asit, bir indirgeyici ajanın etkisi altında molybdenum mavisini olarak bilinen maddeye indirgendir. Molybdenum mavisinin  $660 \text{ nm}$  dalga boyunda maksimum bir absorpsiyon tepe noktası vardı ve fosfor içeriği,  $660 \text{ nm}$ 'de ölçülen optik yoğunluk değeri aracılığıyla dolaylı olarak hesaplandı.

25-hidroksi vitamin D3 ölçümü; Elabscience marka 25-HVD3 (25-Hydroxy Vitamin D3) ELISA Kiti (katalog numarası: E-EL-0015) kullanıldı. ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), antijen-antikor kompleksi oluşturarak, antikorlara özgü enzimlerin antikorlara bağlanması ve sonrasında antikora bağlı enzimin uygun kofaktör ve substratı kullanılarak tetiklenen kimyasal reaksiyon sonucu oluşan renk değişiminin ölçülmesi yoluyla enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlendiği bir yöntemdir. Bu ELISA kitinde, Yarışmalı-ELISA prensibi kullanılmıştır. Kitte sağlanan mikro ELISA

plakası 25-HVD3 ile önceden tamamen kaplanmıştır. Tepkime sırasında, örnek veya standarttaki 25-HVD3, sabit bir miktar yüzey destekçisi üzerindeki 25-HVD3 ile 25-HVD3'e özgü Biotin ile işaretlenmiş Tespit Antikoru (Ab) üzerindeki bağlanma yerleri için rekabet eder. Fazla konjüгат ve bağlanmamış örnek veya standart yıkanarak uzaklaştırılır ve her mikro plakaya Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjüгатı eklenir ve sonra inkübe edilir. Ardından her plakaya TMB substrat çözeltisi eklenir. Enzim-substrat tepkimesi, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk maviden sarıya dönüşür. Optik yoğunluk 450 nm  $\pm$  2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

İntakt paratiroid hormon ölçümü (iPTH); Elabscience marka Rat PTH (Parathyroid Hormone) ELISA Kit (Katalog No: E-EL-R0535) kullanılarak enzime bağlı immünosorbent deney (ELISA) yöntemi ile değerlendirildi. Bu ELISA kiti, Sandviç-ELISA prensibini kullanır. Kite yer alan mikro ELISA plakası, Rat I-PTH'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler mikro ELISA plakalara eklenir ve özgül antikor ile birleştirilir. Ardından, Rat I-PTH için biyotinle işaretlenmiş bir tespit antikoru ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjüгатı sırasıyla her bir plakaya eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Her bir plakaya substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca Rat I-PTH, biyotinle işaretlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjüгатı içeren plakalar mavi renkte görünür. Enzim-substrat tepkimesi, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve rengin sarıya dönüşü gözlemlenir. Optik yoğunluk (OD), 450 nm  $\pm$  2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Tiroid stimulan hormon ölçümü; Elabscience marka Rat TSH (Thyroid Stimulating Hormone) ELISA Kit Katalog No: E-EL-R0976 kullanıldı. Bu ELISA kiti, Sandviç-ELISA prensibini kullanmaktadır. Kite sağlanan mikro ELISA plakası, Rat TSH'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standartlar veya örnekler mikro ELISA plakalarına eklenip ve özgül antikor ile birleştirilir. Ardından Rat TSH için biyotinle işaretlenmiş bir tespit antikoru ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjüгатı ile sırasıyla her bir plakaya eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır ve uzaklaştırılır. Her bir plakaya substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca Rat TSH, biyotinle işaretlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjüгатı içeren plakalar mavi renkte görünür. Enzim-substrat tepkimesi, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve

renk sarıya dönüşür. Optik yoğunluk (OD), 450 nm  $\pm$  2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

### 3.5. HİSTOPATOLOJİK VE HİSTOMORFOMETRİK İNCELEMELER

Dokular (Şekil 3.7) histopatolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler için %10'luk fosfat tamponlu nötral formaldehit (pH=7.4) ile bir hafta fikse edildi. Histopatolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Fiksasyon aşamasından sonra dokular Morse solüsyonunda (%10 sodyum sitrat ve %22,5 formik asit) bir hafta boyunca dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sürecinde, solüsyon iki defa yenilendi. Dekalsifikasyon sonrası dokular artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve parafine bloklar hazırlandı (Tablo 3.2). Kesitler kondil yapısı ve femur başını içerecek şekilde 10  $\mu$ m kalınlıkta sagittal olarak alındı. Alınan kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara aktarıldı ve histomorfometrik olarak incelenmek için Masson Trikrom boyama kiti (Merck, #100485) ile (Tablo 3.3); (Şekil 3.8), histopatolojik olarak hematoksilin ve eosin (H&E) (HistoPlus™ Haris Hematoksilin) ile (Tablo3.4; Şekil 3.8) ve immunohistomkiyasal olarak Adams-TS1 (Anti-ADAMTS1 antikoru; ab216977) ile dokular incelenmek için boyanarak kapatıldı. H&E ile boyanan dokular ışık mikroskopunda (Şekil 3.9) osteoklast, osteoblast, osteosit ve proliferasyon zonu için gruplar kör bir histolog tarafından histopatolojik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.5) (231).



**Şekil 3.7:** Diseke edilmiş total mandibula ve femur görüntüsü

**Tablo 3.2:** Parafin blokların hazırlanma protokolü

<b>Adım</b>	<b>Süre</b>
Çeşme suyunda yıkama	1 gece
Etil alkol (%70)	1 saat
Etil alkol (%80)	1 saat
Etil alkol (%90)	1 saat
Etil alkol (%96)	1 saat
Etil alkol (%96)	1,5 saat
Etil alkol (%100)	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	3 saat

**Tablo 3.3:** Masson Trikrom boyama protokolü

<b>Adım</b>	<b>Süre</b>
Etüvde inkübasyon	10 dk
Fırında inkübasyon	3 dk
Ksilen	5 dk
Ksilen	5 dk
Ksilen	5 dk
Etil alkol (%100)	5 dk
Etil alkol (%90)	5 dk
Etil alkol (%80)	5 dk
Etil alkol (%70)	5 dk

**Tablo 3.3** (devam)

Çeşme suyu	2 dk
Hemotoksilen	6 dk
Çeşme suyu	1 dk
Asit alkol (%1)	1 dk
Çeşme suyu	1 dk
Asit fuksin	3 dk
Distile su	1 dk
Fosfomolibdik asit	5 dk
Kurutma	
Anilin blue (metilen mavisi)	5 dk
Distile su	1 dk
Asit alkol (%1 asetik asit)	2 dk
Etil alkol (%70)	1 dk
Etil alkol (%80)	1 dk
Etil alkol (%96)	1dk
Etil alkol (%100)	1dk
Ksilen	10 dk
Ksilen	10 dk
Lam	Etelan damlatma
Lamel	Kapatma

**Tablo 3.4:** H&E boyama protokolü

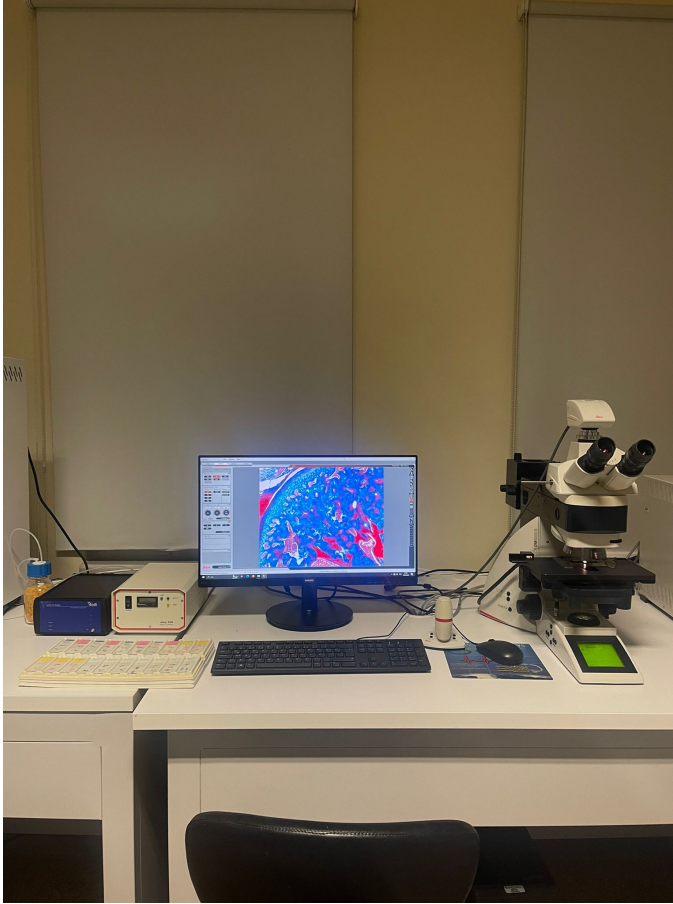
<b>Adım</b>	<b>Süre</b>
Etüvde inkübasyon	10 dk
Fırında inkübasyon	3 dk
Ksilen	10 dk
Ksilen	10 dk
Ksilen	10 dk

**Tablo 3.4 (devam)**

Etil alkol (%100)	5 dk
Etil alkol (%90)	5 dk
Etil alkol (%80)	5 dk
Etil alkol (%70)	5 dk
Etil alkol (%50)	5 dk
Distile su	5 dk
Hemotoksilen	8 dk
Çeşme suyu	1 dk
Asit alkol (%1)	1 dk
Eosin	5 dk
Çeşme suyu	1 gece
Etil alkol (%50)	30 sn
Etil alkol (%70)	30 sn
Etil alkol (%80)	60 sn
Etil alkol (%96)	60 sn
Etil alkol (%96)	60 sn
Etil alkol (%100)	60 sn
Ksilen	10 dk
Ksilen	10 dk
Ksilen	10 dk
Lam	Entellan damlatma
Lamel	Kapatma



**Şekil 3.8:** H&E ve ADAMS TS-1(immunohistokimya) ile boyanmış kesitlerin temsili görseli



**Şekil 3.9:** Kesitlerin incelendiği mikroskop sistemi

**Tablo 3.5:** Histopatolojik skorlama

Skor	Değerlendirme
0	Yok
1	Çok az
2	Orta
3	Şiddetli

İmmünohistokimyasal boyama, üretici firmanın protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 30 dakika boyunca %10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilen preparatlarda endojen peroksidaz aktivitesi ortadan kaldırıldı. Ardından kesitler oda sıcaklığında bir saat normal keçi serumu (Invitrogen) ile bloklandı ve Adams-TS1 antikoru (Anti-ADAMTS; ab216977; 1:100 dilüsyon) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Antijen retrieval yöntemi için ROCHE/ Cell Conditioning 1 (CC1) (EDTA) ile CC1 64 dakika standart protokol uygulandı. Sekonder görüntüleme için ROCHE/ UltraView Universal DAB Detection Kit ile Standart UltraView IHC Protokolü uygulandı ve kesitler kapatıldı (Şekil 3.10). Tüm işlemler BenchMark XT IHC Stainer (ROCHE/Ventana, Tucson AZ – USA) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Örneklerin analizleri boyanma var/yok olarak değerlendirildi.

### 3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

G\*Power programı kullanılarak yapılan Power analizi sonucunda Histolojik skor ortalama parametresi için etki büyüklüğü (effect size) 1.6109033 ve SD:0.60 aldığımızda Power:0.80 ve  $\alpha$ :0.05 için tespit edilen örneklem sayısı her bir grup için minimum n:8 olarak saptandı. Sıçan sayısını her grup için 10 olarak belirlememizin sebebi, herhangi bir kayıp varlığında çalışmamızın anlamlılığının bozulmamasıdır.

İstatistiksel analizlerde GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, ABD) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Hayvanların vücut ağırlıklarının farklı zamanlardaki ölçümler ve gruplar arası farklılıkları iki yönlü varyans analizini takiben Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile incelendi. Biyokimyasal parametrelerin analizinde tek yönlü analizini takiben Tukey'in



çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Histolojik skorlamaların istatistiksel analizinde Kruskal-Wallis testini takiben Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.



Şekil 3.10: Masson trikrom histomorfometrik inceleme için hazırlan kesitlerin temsili görseli

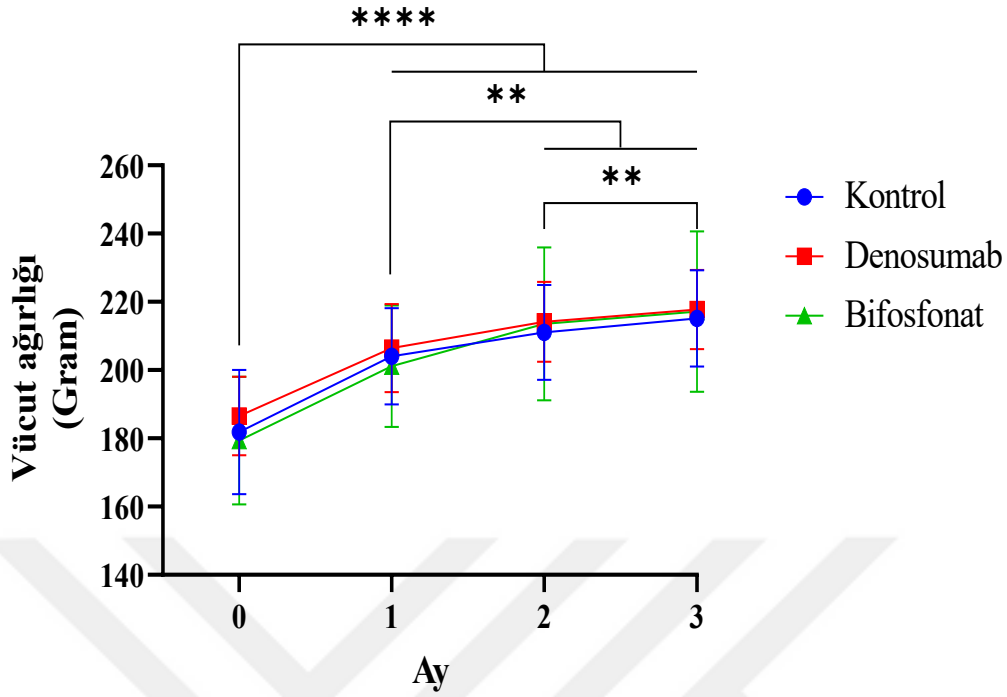
## 4. BULGULAR

Çalışmamızda cerrahi sonrası yalnızca denosumab grubunda bir hayvan kaybedilmiş olup, diğer gruplarda herhangi bir hayvan kaybı yaşanmamıştır. Hayvanların vücut ağırlıkları üç ay süresince anlamlı şekilde artarken ( $p<0,01$ ; Şekil 4.1, Tablo 4.1) kontrol ve deney grupları arasında herhangi bir anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

**Tablo 4.1:** Deney gruplarının kilo ölçüm sonuçları

	<b>Kontrol (n:10) (Ort±St.S)</b>	<b>Denosumab (n:9) (Ort±St.S)</b>	<b>Zoledronik Asit (n:10) (Ort±St.S)</b>
<b>0. AY</b>	181,8 ± 18,25	186,55 ± 11,52	179,3 ± 18,77
<b>1. AY</b>	204 ± 14,11	206,4 ± 12,86	201,2 ± 17,80
<b>2. AY</b>	211,1 ± 13,95	214,11 ± 11,76	213,5 ± 22,41
<b>3. AY</b>	215,2 ± 14,11	217,77 ± 11,65	217,2 ± 23,59
<b>p</b>	<0,01	<0,01	<0,01

İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p<0,01$



**Şekil 4.1:** Deney gruplarındaki hayvanların deney süresi boyunca vücut ağırlığı takibi (\*\* $p < 0,01$  ve  $p < 0,0001$ )

#### 4.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Serum örneklerinden IGF-1, iPTH, 25-hidroksi vitamin D3, ALP, fosfor, kalsiyum ve TSH parametreleri biyokimyasal olarak incelenmiştir. IGF-1 seviyeleri denosumab grubuna kıyasla bifosfonat grubunda anlamlı olarak düşük bulunmuştur ( $p < 0,05$ ; Şekil 4.2) ancak diğer gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ek olarak serum iPTH, 25-hidroksi vitamin D3, ALP, fosfor, kalsiyum ve TSH seviyeleri kontrol, denosumab ve bifosfonat gruplarında benzer bulunmuştur ( $p > 0,05$ ; Tablo 4.2, Şekil 4.2).

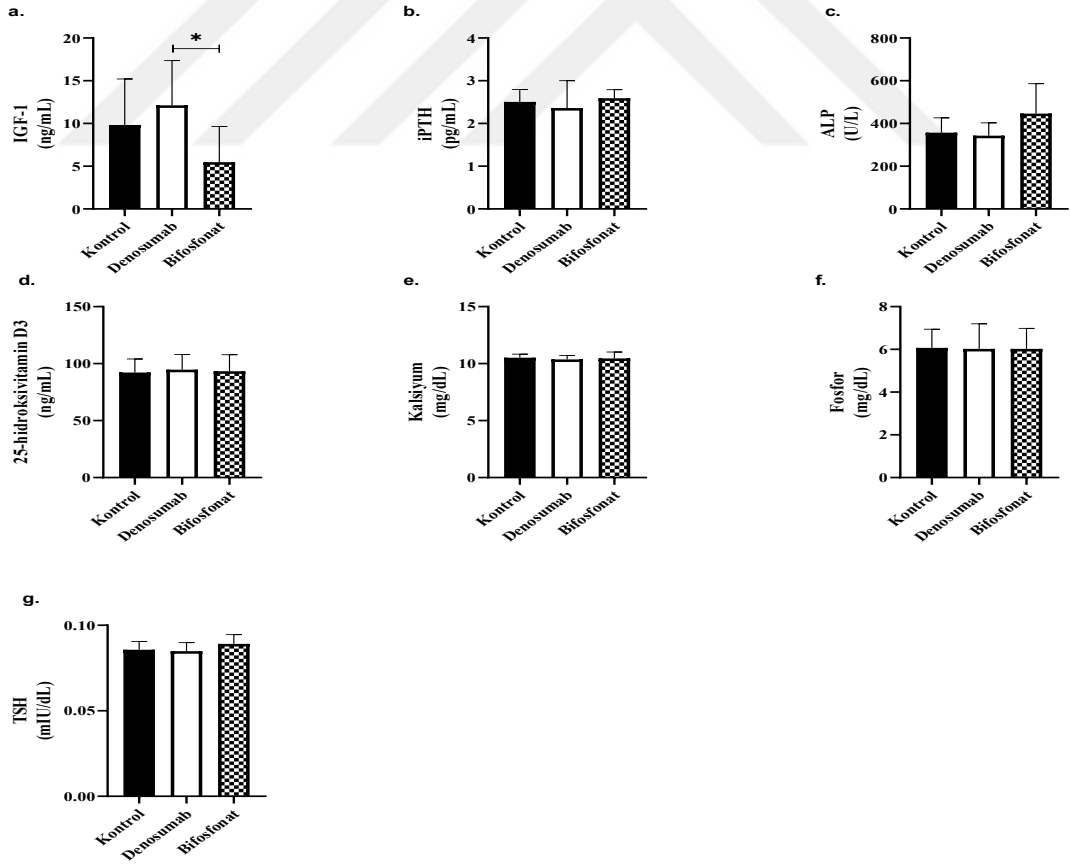
**Tablo 4.2:** Ratların biyokimyasal bulguların değerlendirilmesi

	Kontrol (n:10) (Ort±St.S)	Denosumab (n:9) (Ort±St.S)	Zoledronik Asit (n:10) (Ort±St.S)	P
IGF-1 (ng/ml)	9,82 ± 5,38	12,11 ± 5,23	5,47 ± 4,16	<0,05

Tablo 4.2 (devam)

PTH intact (pg/ml)	2,50 ± 0,29	2,14 ± 0,19	2,60 ± 0,20	>0,05
25 hidroksi vitD3(ng/ml)	92,18 ± 11,4	94,7 ± 13,3	93,26 ± 14,52	>0,05
Fosfor(mg/dl)	6,05 ± 0,88	6,02 ± 1,17	6,02 ± 0,96	>0,05
Kalsiyum(mg/dl)	10,7 ± 0,60	10,37 ± 0,34	10,46 ± 0,56	>0,05
ALP(U/L)	356,7 ± 69,43	342,89 ± 59,80	446,2 ± 140,24	>0,05
TSH(mIU/L)	0,085 ± 0,005	0,085 ± 0,005	0,089 ± 0,005	>0,05

İstatistiksel anlamlılık düzeyi p<0,05 , p>0.05

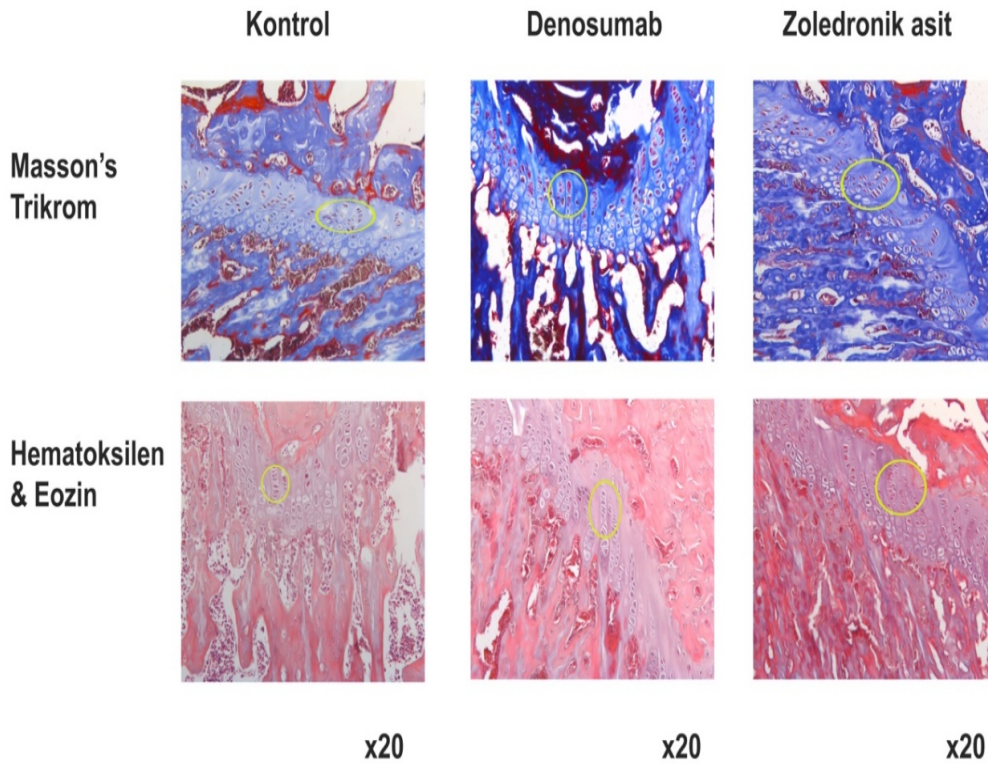


Şekil 4.2: Serum (A) IGF-1, (B) iPTH, (C) 25-hidroksi vitamin D3, (D) ALP, (E) fosfor, (F) kalsiyum ve (G) TSH (\*p<0,05)

## 4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

H&E boyaması ile osteoblast, osteoklast, osteosit ve proliferasyon zonu yoğunluğu incelenmiştir.

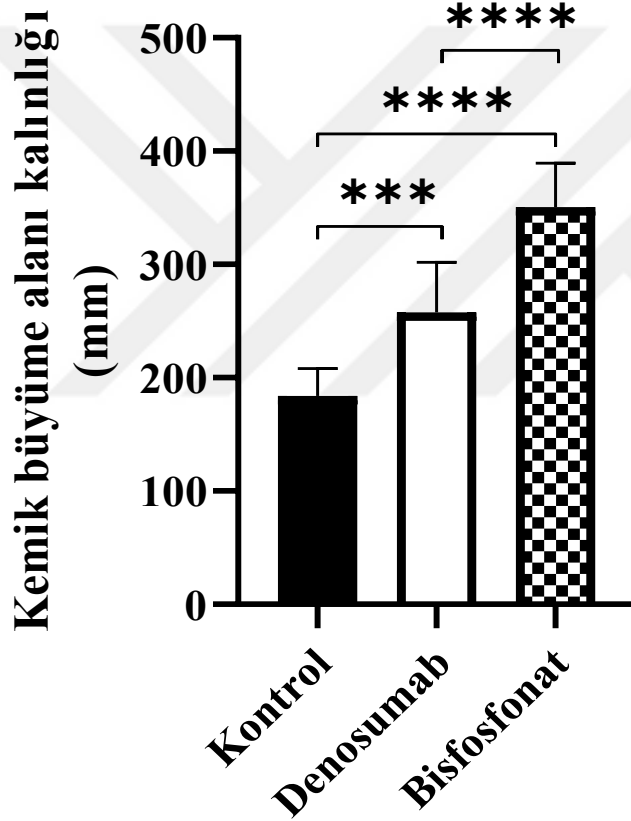
Kontrol grubundaki endokondral ossifikasyon alanında kemikleşme katmanları normal histolojik bulgular ışığındadır. Bifosfonat (Zoledronik asit) uygulanan grupta ossifikasyon alanının çok daha kalın olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Bu grupta ayrıca proliferasyon alanında kondrosit hücrelerinin birbirinden bağımsız bir şekilde daha fazla olduğu ve hücrelerin diğer gruplara göre daha fazla düzensiz sıra oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.3). Kemik büyüme alanı kalınlıkları karşılaştırıldığında ise denosumab ve bifosfonat grubunun kontrol grubuna kıyasla daha kalın olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,0001$ ; Şekil 4.4, Tablo 4.3). Ek olarak, bifosfonat grubu hayvanların kemik büyüme alanı denosumab grubuna kıyasla daha kalın gözlenmiştir ( $p<0,0001$ ; Şekil 4.4, Tablo 4.3).



**Şekil 4.3:** Gruplardaki endokondral kemikleşme alanları. Proliferasyon katmanı sarı daire ile işaretlenmiştir (Büyütme= 20x)

**Tablo 4.3:** Masson Trikrom ile encondral bölgede kemikleşme alan kalınlığı analizleri

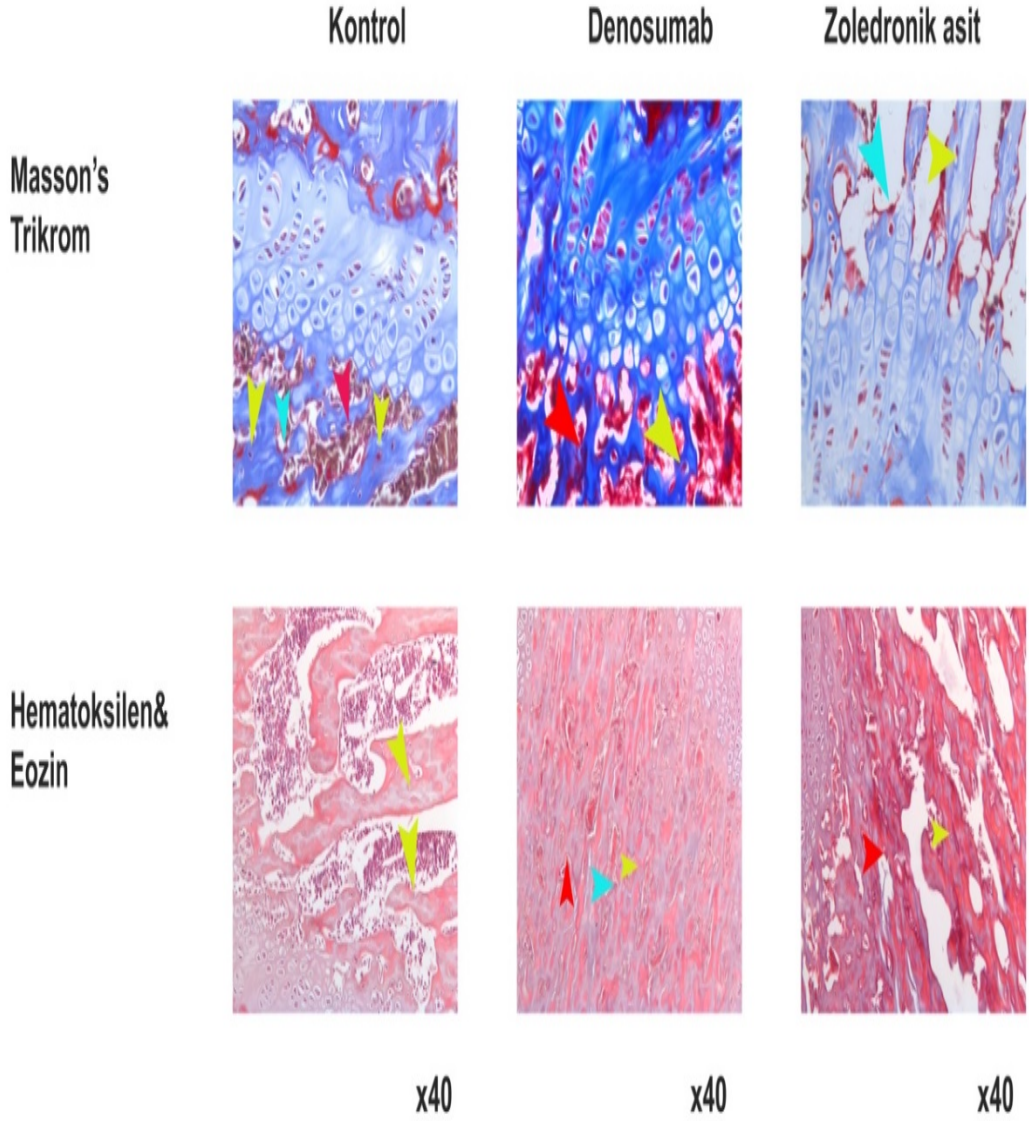
	<b>Kontrol (n:10) (Ort±St.S)</b>	<b>Denosumab (n:9) (Ort±St.S)</b>	<b>Zoledronik Asit (n:10) (Ort±St.S)</b>	<b>P</b>
<b>Encondral bölge kemikleşme alanı kalınlığı (tüm zonlar dahil)</b>	184± 24,28	257,76 ± 44,15	350,67 ± 38,78	<0,01



**Şekil 4.4:** Gruplardaki kemik büyüme alanı kalınlığı

Şekil 4.5'te gruplar arasındaki encondral kemikleşme alanı gösterilmektedir. Bölgedeki osteoblast, osteoklast ve osteosit yoğunlukları incelendiğinde (Tablo 4.4), osteoblast yoğunluğu bifosfonat grubunda denosumab ve kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede düşük bulunurken ( $p < 0,01$ ; Şekil 4.6a), osteoklast yoğunlukları her grupta benzer bulunmuş ( $p > 0,05$ ; Şekil 4.6b), osteosit yoğunluğu ise denosumab

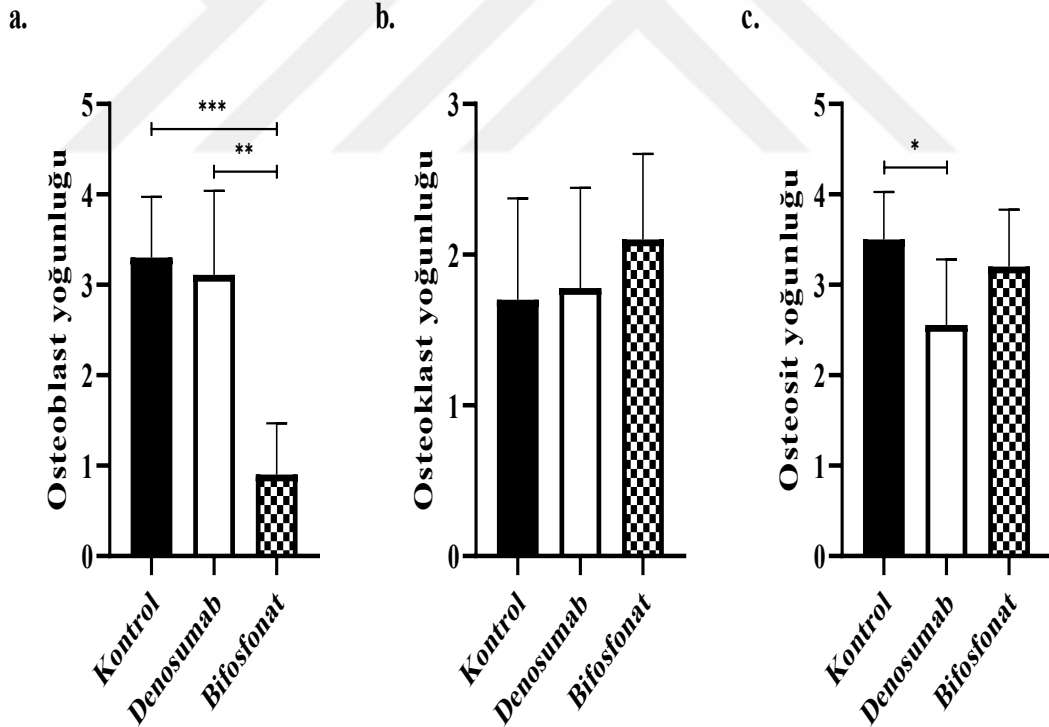
grubunda kontrol grubuna kıyasla düşük bulunmuştur ( $p<0,05$ ; Şekil 4.6c). Buna karşın proliferasyon alanındaki hücre yoğunlukları incelendiğinde (Tablo 4.4), bifosfonat grubunda diğer iki gruba kıyasla bu alandaki hücre yoğunluğu daha yüksek bulunmuştur ( $p<0,0001$ ; Şekil 4.7).



**Şekil 4.5:** Endokodral kemikleşme alanındaki hücre tipleri. Sarı ok başı osteositleri, kırmızı ok başı osteoblastları ve mavi ok başı osteoklastları ifade etmektedir (Büyütme= 40x)

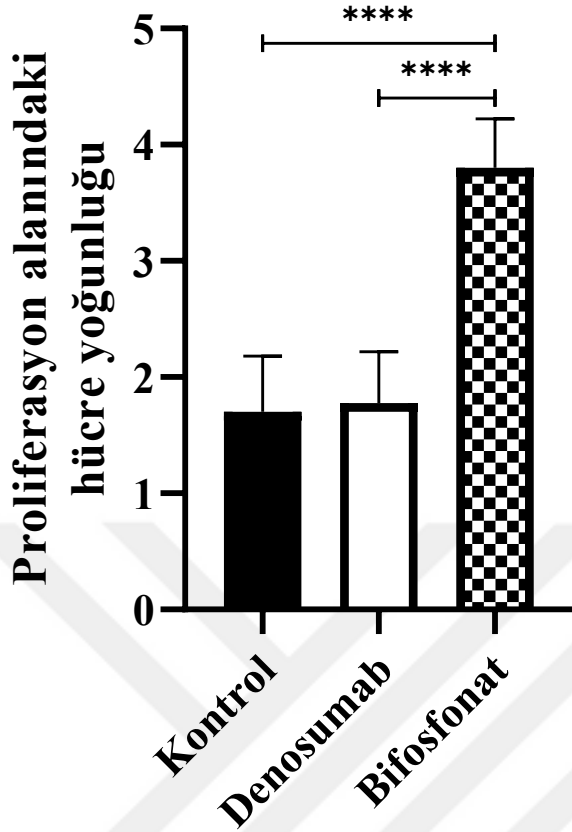
**Tablo 4.4:** Hemotoksilen&Eosin ile endokondral bölgede yapılan hücre analizleri

	<b>Kontrol (n:10) (Ort±St.S)</b>	<b>Denosumab (n:9) (Ort±St.S)</b>	<b>Zoledronik Asit (n:10) (Ort±St.S)</b>	<b>p</b>
<b>Osteosit</b>	3,55± 0,52	2,60 ± 0,69	3,20 ± 0,63	<0,05
<b>Osteoblast</b>	3,33 ± 0,70	3,10 ± 0,87	0,90 ± 0,56	<0,01
<b>Osteoklast</b>	1,66 ± 0,70	1,80± 0,63	2,10 ± 0,56	>0,05
<b>Proliferasyon zonu</b>	1,66 ± 0,50	1,80 ± 0,42	3,80 ± 0,42	<0,001



**Şekil 4.6:** Endokondral kemikleşme alanındaki hücre yoğunlukları (\*p<0,05, \*\*p<0,01 ve \*\*\*p<0,001)





Şekil 4.7: Proliferasyon alanı hücre yoğunluğu (\*\*\*) $p < 0,001$ )

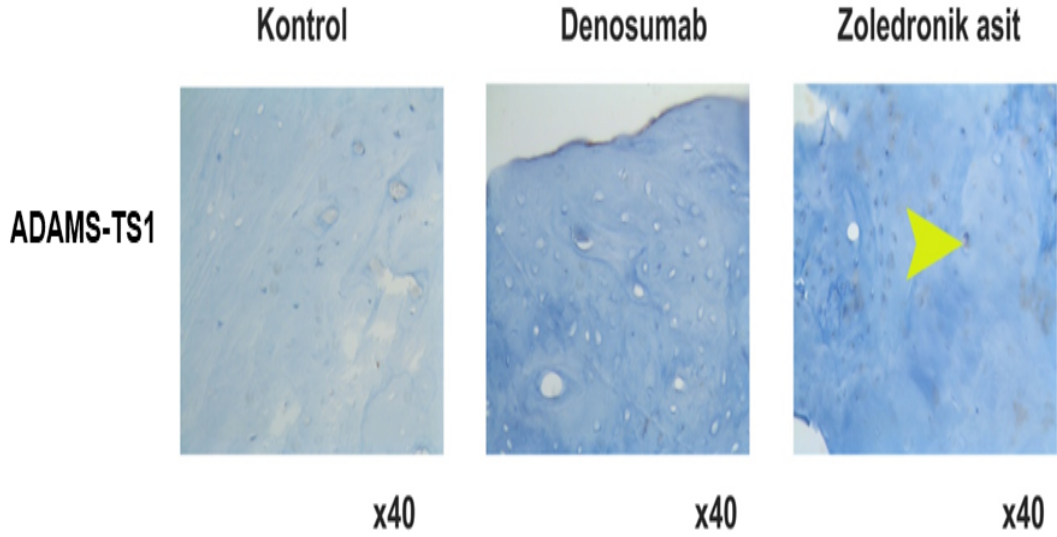
Kontrol ve deney gruplarını karşılaştırdığımızda ADAMS-TS1 ile pozitif reaksiyon gösteren osteositler zoledronik asit grubunda yoğun olarak boyanmış olarak gözlenmiştir (Şekil 4.8). Yapılan boyama skorlanmalarında deney gruplarında boyanan hücre sayısı kontrol grubundan fazla olma eğilimi gösterse de ne osteositlerde ne de proliferasyon bölgesinde ADAMS-TS1 boyanma yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Adams TS-1 ile osteosit ve proliferasyon zonu analizleri

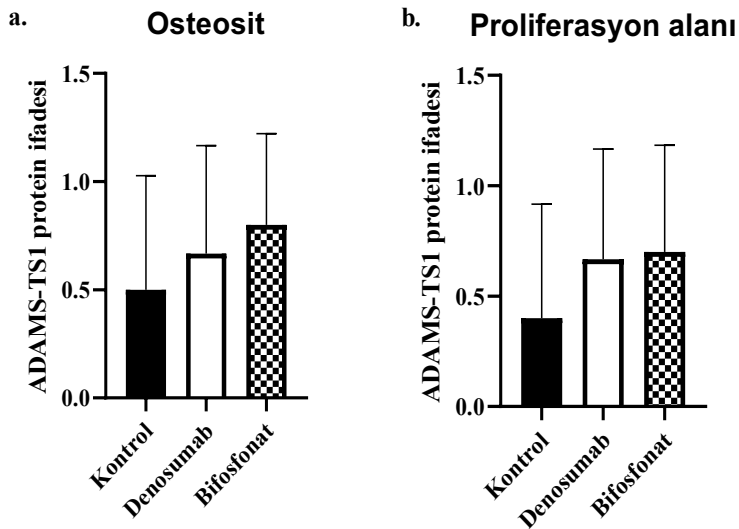
	Kontrol (n:10) (Ort±St.S)	Denosumab (n:9) (Ort±St.S)	Zoledronik Asit (n:10) (Ort±St.S)
Osteosit	0,5± 0,52	0,6 ± 0,51	0,8 ± 0,42

Tablo 4.5 (devam)

Proliferasyon zonu	0,4 ± 0,51	0,6 ± 0,52	0,7 ± 0,48
--------------------	------------	------------	------------



Şekil 4.8: Kondil bölgesinde uygulanan ADAMS-TS1 proteini için gerçekleştirilen immunohistokimyasal boyama. Sarı ok başı osteositleri göstermektedir (Büyütme= 40x)



Şekil 4.9: Kondil bölgesinde uygulanan ADAMS-TS1 proteini için gerçekleştirilen immunohistokimyasal boyama skorlamaları

### 4.3. RADYOLOJİK BULGULAR

Uygulamaların kemik üzerine etkileri radyolojik olarak incelendi (Şekil 4.10).

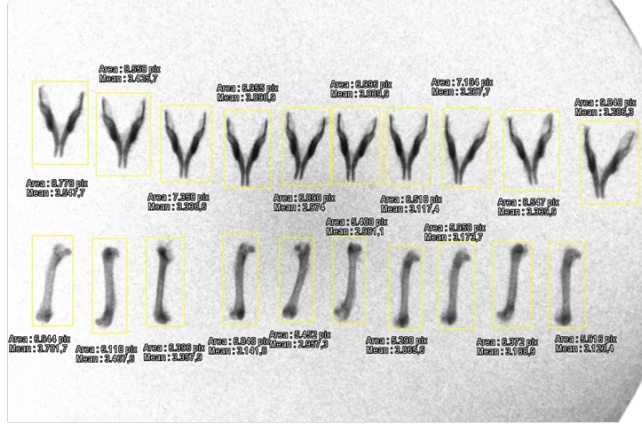
Hayvanların kemik büyüme alanı kalınlıkları incelendiğinde deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha yüksek kemik büyüme alanı kalınlığı gözlenirken, bifosfonat grubunda denosumab grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha kalın bir kemik büyüme alanı gözlemlendi (Şekil 4.11).

**Tablo 4.6:** Ratların C kolu röntgen üzerinde boy ve dansite ölçümlerinin analizleri

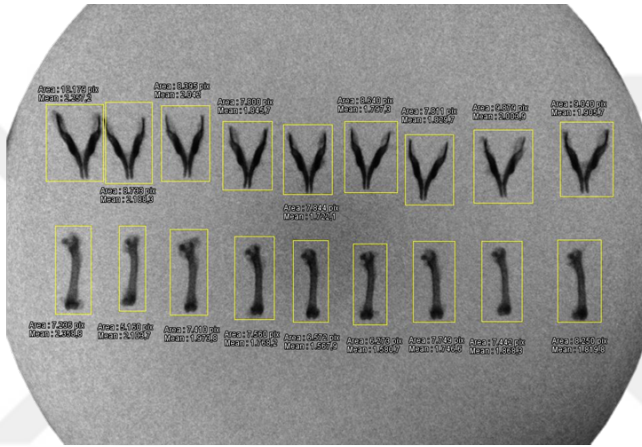
	Kontrol (n:10) (Ort±St.S)	Denosumab (n:9) (Ort±St.S)	Zoledronik Asit (n:10) (Ort±St.S)	p
Femur uzunluk 40. Gün	19,46± 0,66	19,30 ± 0,81	20,05 ± 0,62	<0,01
Femur uzunluk 3. Ay	28,69 ± 0,72	28,28 ± 0,95	27,44 ± 1,17	<0,01
Femur boy değişimi	9,23 ± 0,48	8,99 ± 0,95	7,39 ± 1,15	p<0,001
Femur dansite	1,86 ± 0,08	3,85 ± 0,68	3,15 ± 0,28	p<0,001
Mandibula uzunluk 40. Gün	21,89± 0,86	21,45± 0,84	21,78± 0,66	
Mandibula uzunluk 3.Ay	26,51± 1,13	26,43± 1,47	25,15± 0,72	
Mandibula boy değişimi	4,61± 1,75	4,98± 1,05	3,37± 1,01	p<0,001
Mandibula dansite	2,37± 0,19	4,46± 0,32	3,76± 0,28	p<0,001

(\*\*\*p<0,001 ve \*\*\*\*p<0,0001)

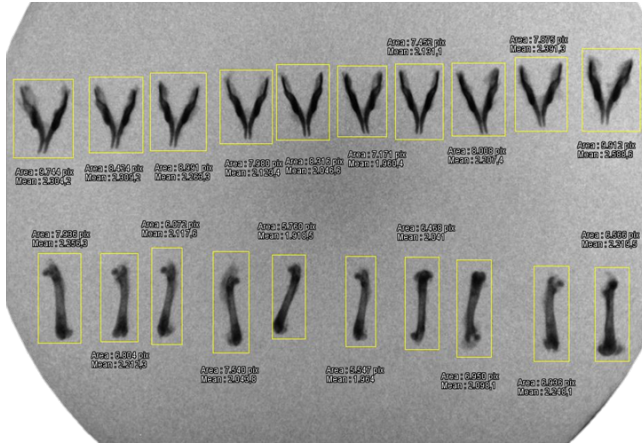
**Kontrol**



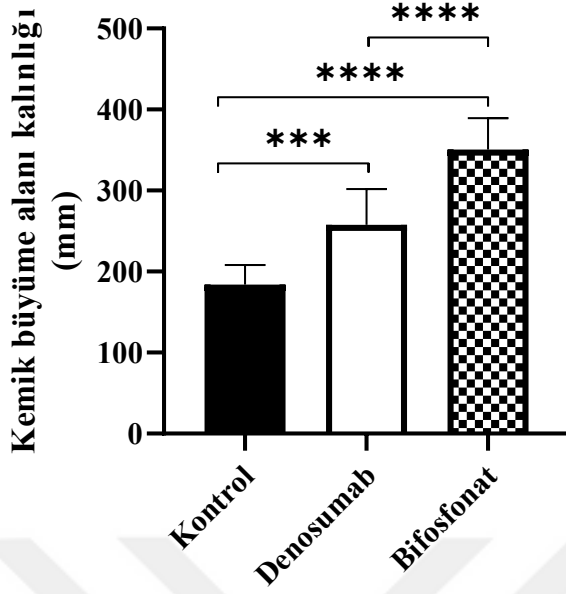
**Denosumab**



**Bifosfonat**

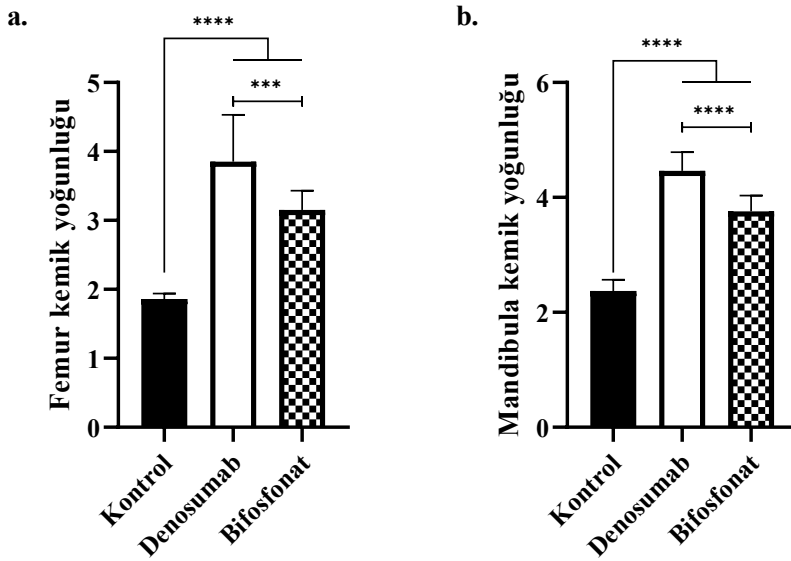


**Şekil 4.10:** Radyolojik ölçümlerin temsili görüntüsü



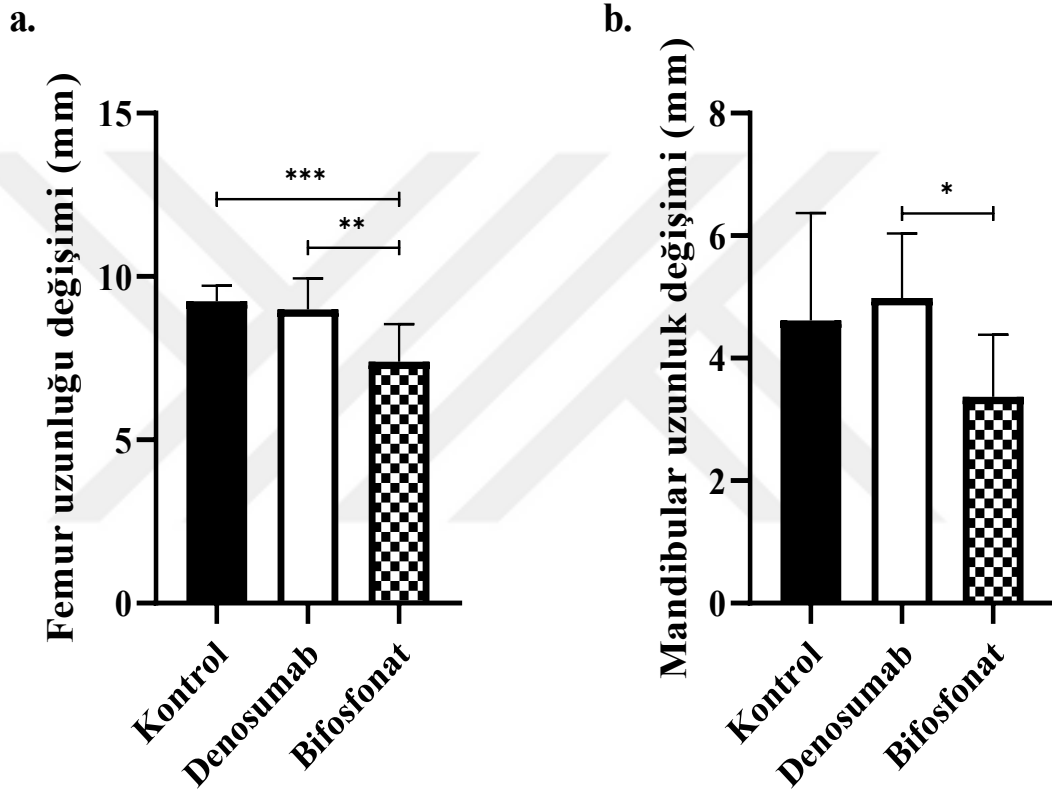
Şekil 4.11: Kemik büyüme alanı kalınlığı (\*\*p<0,001 ve \*\*\*\*p<0,0001)

Femur ve mandibula kemik yoğunlukları incelendiğinde, denosumab ve bifosfonat gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek kemik yoğunluğu gözlenirken (p<0,0001; Şekil 4.12a), bifosfonat grubunda denosumab grubuna kıyasla daha düşük kemik yoğunluğu gözlemlendi (p<0,0001; Şekil 4.12b, Tablo 4.6).



Şekil 4.12: (a) Femur kemik yoğunluğu ve (b) mandibula kemik yoğunluğu (\*\*p<0,001 ve \*\*\*\*p<0,0001)

Deney başlangıcında ve 3. ay sonunda femur ve mandibula uzunluklarında meydana gelen değişiklikler incelendiğinde, kontrol ve denosumab grubunda femur uzamasının bifosfonat grubuna kıyasla anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlenirken ( $p<0,01$ ; Şekil 4.13a), mandibula kemiği uzaması bifosfonat grubunda denosumab grubuna kıyasla daha düşük bulundu ( $p<0,01$ ; Şekil 4.13b).



Şekil 4.13: Deney başlangıcı ve 3. ay arasında (a) femur kemik uzunluğu ve (b) mandibula kemik uzunluğu değişimi (\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  ve \*\*\* $p<0,001$ )

## 5. TARTIŞMA

Pirofosfatların fizyolojik inhibisyon mekanizmalarına dayanan ve bunların kararlı, sentetik karbon analogları olan bifosfonatlar, çeşitli kemik patolojilerinin tedavisinde etkin ve güvenilir bir terapötik ajan sınıfı olarak kabul edilmektedir. Bu ilaçlar, malinitelere bağlı hiperkalsemi, solid tümörlerin osteolitik kemik metastazları (örneğin meme, prostat ve akciğer kanseri), multipl miyelom ilişkili osteolitik lezyonlar, fibröz displazi, metabolik kemik hastalıkları (osteoporoz, osteopeni, Paget hastalığı) ve konjenital bozukluklar (osteogenesis imperfecta gibi) gibi durumların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu geniş spektrumlu kullanım, bisfosfonatların klinik önemini ve terapötik değerini pekiştirmektedir (4).

Denosumab, RANKL'ye karşı tamamen insan kökenli, monoklonal antikor olup, osteoporoz ve meme kanseri, prostat kanseri gibi kemiklere metastaz yapma potansiyeline sahip kanserlerin tedavisinde, ayrıca iskelet tümörlerinin komplikasyonları için umut verici bir tedavi olarak ortaya çıkan ilaçtır. Denosumab'ın FD'deki potansiyel rolüne olan ilgi ise, dev hücreli tümörlerin tedavisindeki etkinliğiyle ilgili raporların ortaya çıkmasıyla artmıştır. Bu iyi huylu ancak lokalize agresif olan tümörler genellikle yetişkinlerin ikinci ile dördüncü on yıllarında görülür ve FD ile anahtar histolojik özellikleri paylaşırlar (232-234).

Osteoklast aracılı kemik yıkımını inhibe eden bisfosfonatlar, FD de dahil olmak üzere çeşitli kemik hastalıklarının tedavisinde önemli bir ajan olmuştur (4). Öte yandan, RANKL'yi hedefleyen monoklonal bir antikor olan denosumab, osteoklast aktivitesini farklı bir biyolojik yoldan inhibe ederek ayrı bir mekanizma sunmaktadır (241,235). Bu ajanların FD'de kullanılma gerekçesi, kemik kalitesini iyileştirerek ve iskelet deformitelerini ve ağrıyı azaltarak hastalığın seyrini değiştirebilecek etkileri bulunmasından kaynaklanmaktadır (183,204,242-236).

FD ve osteoporoz gibi iskelet bozukluklarının tedavisinde bisfosfonatlar ve denosumab gibi farmakolojik müdahaleler öne çıkan tedavi seçenekleri arasında yer almaktadır (168,183). Çalışmamızda, denosumab ve bifosfonat grubu bir ilaç olan zoledronik asidin kemik gelişim parametreleri ratlar üzerinde biyokimyasal, histopatolojik ve histomorfometrik olarak incelenmiştir.

Çeşitli hayvan çalışmaları, bisfosfonatların uygulama yolu, dozajı ve zamanlaması açısından farklılıklar göstermektedir. Örneğin, Senel ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 60 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan üzerinde, intraperitoneal (IP) yol ile 0,1 mg/kg dozunda Zoledronik Asit (ZA) haftada üç kez, altı ve sekiz hafta süresince uygulanmıştır (235-237). Hornby ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise menopoz sonrası osteoporoz modellenen ratlarda kemik dönüşümünün idrar biyokimyasal belirteçlerindeki ve femoral kemik mineral yoğunluğundaki zaman içindeki değişiklikleri, statik ve dinamik histomorfometrik parametrelerdeki ve mekanik güçteki değişiklikleri ölçmek ve bu parametreler üzerinde ZA'nın kronik tedavisinin önleyici etkilerini değerlendirmek için kullanmıştır. ZA'nın düşük dozu (haftada 0,3 mg/kg, subkutan), yüksek dozları ise (haftada 1,5 ve 7,5 mg/kg, subkutan) şeklinde belirlenmiştir (236-238).

Diğer bir çalışmada ise Biasotto ve arkadaşları, çene bölgesinde osteonekroz modeli geliştirmek amacıyla, 10 adet Wistar cinsi dişi sıçan üzerinde intravenöz yol ile haftada bir kez 0,04 mg/kg ZA uygulamıştır ve bu tedavi beş hafta süreyle devam etmiştir. Bu araştırmada, ZA'nın dozajı konusunda herhangi bir standardizasyon yapılmamış olup, seçilen doz, insanlardaki hematolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan miktarlar ve insan ile sıçan arasındaki kemik metabolizmasındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir (237-239). Yine Negin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kapalı sıçan kırık modelinde karbon-14 ile işaretlenmiş ZA kullanılmıştır ve farklı uygulama protokollerinin tedavi etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışmada sıçanlar beş tedavi grubuna ayrılmış olup her grupta 25 sıçan bulunmaktadır. Gruplar şu şekildedir: salin kontrol grubu, yerel olarak uygulanan 0,01 mg/kg ZA grubu ve kırığın gerçekleştiği an, kırıktan 1 hafta sonra ve kırıktan 2 hafta sonra olmak üzere farklı zamanlarda sistemik bolus ZA (0,1 mg/kg) uygulanan üç grup şeklinde dokular histomorfometrik ve radyolojik olarak değerlendirilmiştir (238-240).

Çeşitli hayvan çalışmaları, denosumab uygulama yolu, dozajı ve zamanlaması açısından yine farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte denosumab zoledronik aside kıyasla daha yeni bir ilaç grubu olup, çalışmalar da daha kısıtlıdır. Yapılan



çalışmalardan birinde Bernhardsson M. ve arkadaşları Anti-RANKL tedavisinin implant fiksasyonunun iyileştirilmesinde zoledronik asitlere göre daha etkili olup olmadığını test etmek için erkek Sprague-Dawley sıçanlara sağ proksimal tibia bölgesine paslanmaz elik vida yerleştirmiş ve sol tibiada ise delik açmıştır (n = 42). Sıçanlar, alendronat (günde 20 mg/kg), yüksek doz alendronat (günde 200 mg/kg), osteoprotegerin Fc etiketi ile (haftada iki kez 8 mg/kg) veya tuzlu su kontrolü olacak şekilde subkutan enjeksiyonlar için randomize seçilmişlerdir. Dört hafta sonra, elik vidasının fiksasyonu çekme testi ile ölçülmüş ve delik açılan tibia ise mikro-BT ile değerlendirilmiştir (239-241).

Bir diğer çalışmada Transgenik fareler, kuyruk omurlarında ve femurlarda radyografik olarak tespit edilebilen FD benzeri lezyonlar için fareler anti-fare RANKL monoklonal antikoru ile tedavi edilmiştir. Gelişmekte olan FD benzeri iskelet lezyonlarına sahip yirmi dört genç fare, tam gelişmiş FD benzeri lezyonlara sahip dört yetişkin fare, haftada iki kez 14 hafta boyunca intraperitoneal enjeksiyon yoluyla ya anti-RANKL mAb ya da rat IgG2a izotip kontrolü 300 µg/fare olarak tedavi edilmiştir (202). Yine başka bir çalışma da denosumab, overektomize sıçanlarda, lomber füzyona bitişik intervertebral disk dejenerasyonunu, endplak osteokondral yeniden yapılanmasını engelleyerek ve vertebral osteoporozu azaltmak için değerlendirilmiştir ve iki taraflı overektomi ameliyatından 4 hafta sonra L4-L5 posterolateral lomber füzyon ve spinoz proses teli fiksasyonu uygulanan üç aylık dişi Sprague-Dawley sıçanlara posterolateral lomber füzyon ameliyatından 4 hafta sonra haftada 5 gün, 4 hafta boyunca günde 0.25 mg/kg olacak şekilde denosumab subkutan olarak verilmiştir. Ağırlıkları haftalık olarak kaydedilmiş ve denosumab dozları buna göre ayarlanmıştır (240-242).

Biz de tüm bu çalışmaları değerlendirdik ve bunların ışığında fareleri 40 günlük olacak şekilde gelişim atak döneminin hemen öncesinde olacakları zamana göre seçtik ve 3 gruba randomize ayırdık. Tüm gruplara haftada 1 olacak şekilde ve kiloları kontrol edilerek ilaç dozlarını subkutan denosumab, intravenöz zoledronik asit ve subkutan izotonik olacak şekilde 3 ay boyunca gelişim atak dönemi bitene kadar uyguladık.

Çalışmamızda tüm gruplarda gözlenen vücut ağırlığında anlamlı artış, hayvanların sağlık durumlarının çalışma boyunca iyi olduğunu ve normal büyüme

yaşadığını gösterir. Bu sonuç, ilaç uygulama süreci boyunca hayvanların genel sağlık durumları ve metabolik süreçleri üzerinde herhangi bir olumsuzluk olmadığını göstermektedir ve bu sebeple önemli bir temel bulgudur. Ayrıca, çalışmamızda kullanılan ilaçların (denosumab ve zoledronik asit) genel büyümeyi etkileyen veya kilo kaybına neden olan ciddi yan etkilere sahip olmadığını düşündürmektedir. Schwartz AV. ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği randomize ve kontrollü bir çalışmada alendronat ve denosumab ile vücut ağırlığında plaseboya kıyasla daha pozitif yönde değişiklik gözlemlenirken, zoledronik asitin herhangi bir etkisi görülmemiştir (243). Gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Reid IR. ve arkadaşları zoledronik asit tedavisinin osteopenik yaşlı kadınlarda kullanımı ile yağ kütlelerinin korunduğunu ve bunun sonucunda vücut ağırlığı kaybının yavaşlaması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (244).

Çalışmamızda incelenen biyokimyasal parametrelerden IGF-1 seviyeleri bifosfonat grubunda denosumab grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunurken diğer parametreler (iPTH, 25-hidroksi vitamin D3, ALP, fosfor, kalsiyum ve TSH) tüm gruplarda benzer bulunmuştur. IGF-1, büyüme ve gelişimde önemli bir rol oynar ve kemik metabolizması ile onarımı için önemli bir belirteçtir (245). IGF-1, büyüme hormonu (GH) tarafından tetiklenir ve kemik yoğunluğu ve sağlığında önemli rolleri bulunmaktadır (245). Çocukluk çağında GH eksikliği kemik mineral yoğunluğunu azaltırken, GH tedavisi kemik büyümesini ve gücünü artırır (246). IGF-1 ise uzunlamasına kemik büyümesi, iskelet olgunlaşması ve yalnızca büyüme sırasında değil aynı zamanda yetişkin yaşamda da kemiğin korunmasında, kemik kütlesi kazanımı için gereklidir (247). Çalışmamızda gözlemlediğimiz, bisfosfonat grubunda denosumab grubuna kıyasla IGF-1 seviyelerinin anlamlı olarak düşük bulunması, bu tedavilerin kemik metabolizması üzerinde farklı etkileri olduğunu düşündürmektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada IGF-1'in osteoklast farklılaşmasını teşvik ederek osteoklastogenezi düzenlediği ve IGF-1'in RANKL ve RANK ifadesinin düzenlenmesi yoluyla osteoklastogenezi desteklemek amacıyla osteoblast ve osteoklast arasındaki normal etkileşimin sürdürülmesinin gerekliliği için mekanizmada kullanıldığı belirtilmiştir (248). Ek olarak, osteoklastlar, osteoblastlar ve osteositler tarafından otokrin veya parakrin olarak üretilen IGF-1 kemik yeniden modellenmesinde önemli roller oynamakta olup (249-253), osteoblastlar üzerindeki

doğrudan etkileri yoluyla hem kemik oluşumunu hem de rezorpsiyonunu indükleyebilmektedir (254-257).

Bifosfonatların osteoklast progenitör gelişimini ve ortama göçünü azaltarak ve osteoklast apoptozunu teşvik ederek osteoklast aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (257). Osteoklastlar üzerindeki inhibitör etkilerine ek olarak bifosfonatların glukokortikoid kaynaklı osteoporoz fare modelinde osteosit ve osteoblast apoptozunu önlediği raporlanmıştır (258). Çalışmamızda ise endokodral kemikleşme alanındaki osteoblast yoğunluğu bisfosfonat grubunda kontrol ve denosumab gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Koch FP ve ark. gerçekleştirdiği bir in vivo çalışmada zoledronik asidin osteoblast proliferasyonunu düşürdüğü bulunmuştur (259) ve bu durum osteoblast yoğunluğundaki düşüşü açıklayabilir. Ek olarak çalışmamızda gözlediğimiz, zoledronik asit grubundaki IGF-1 düşüklüğü de osteoblast yoğunluğundaki düşüşle ilişkili olabilir.

De Castro ve ark. yaptığı denosumab'ın kemikte fibröz displazi için güvenlik ve etkililiği değerlendirilen çalışmada denosumab tedavisinin, fibroz displazi hastalarında lezyon aktivitesini azaltarak osteojenik hücre olgunlaşmasını ve kemik oluşumunu sağlayarak klinik fayda sağlayabildiği kanısına varılmıştır. Ancak, özellikle yüksek hastalık yüküne sahip olan bazı hastalarda belirgin kemik devri geri tepmesi ve hiperkalsemi görülmüştür. Bu çalışmanın bulguları, fibroz displazinin patogenezi daha iyi anlamamızı sağlar ve denosumab'ın mekanistik olarak odaklanmış bir tedavi stratejisi olarak kullanımını destekler gibi görünmesine rağmen bununla birlikte, geri tepme hiperkalsemisinin potansiyel oluşumunun dikkatli olunması gereken önemli bir husus olduğunu vurgular. Hiperkalsemi oluşabileceği birçok çalışmada vurgulanmıştır (203). Denosumabın kesilmesinin ardından hiperkalsemi gelişen üç vaka bildirilmiştir. İlk raporda, McCune-Albright sendromu ve poliostotik fibroz displazi olan 9 yaşındaki bir erkek çocuk, yedi ay süren denosumab tedavisini bıraktıktan iki ay sonra hiperkalsemi gelişmiştir (10). İkinci vaka, ikinci denosumab enjeksiyonundan yedi hafta sonra hiperkalsemi gösteren ciddi bir juvenil Paget hastalığı formuna sahip 8 yaşındaki bir kız çocuğu olarak bildirilmiştir (260). En son olarak, Gossai ve diğerleri, denosumab tedavisini kesmesinden beş ay sonra hiperkalsemi geliştiren metastatik GCTB'li 10 yaşındaki bir kız çocuğunu bildirmiştir (261). Yakın zamanda Setsu, ve arkadaşları da bu vakalara ek olarak sakrumunda dev hücreli tümörün tedavisi için denosumab kullanımı

sonrası 10 yaşındaki kız çocuğunda hiperkalsemi gözlemlenmiş ve vaka raporu olarak sunulmuştur (262). Bu dört vakada da daha önceki bifosfonat tedavisi veya süregelen hastalıklar gibi sistemik kemik metabolizmasını etkileyebilecek karmaşık klinik geçmişler bulunmuştur. Bu nedenle, bu vakalarda gözlemlenen hiperkalseminin nedenlerini yorumlamak zor olmuş ve denosumabın kesilmesinin etkileri muhtemelen gizlenmişti. Buna karşılık, mevcut hastada (262) osteolitik lezyonlardan bağımsız olarak hiperkalsemi gelişmiştir, bu da hiperkalseminin hastanın mevcut hastalıklarından ikincil olarak değil, daha çok denosumabın kesilmesinden kaynaklandığını göstermiştir (262). Tüm bu vakalar ve osteoklastik kemik yıkım aktivitesinde keskin bir artışın kemikten hızla fazla miktarda kalsiyumun salınmasını tetikleyebileceğini ve hiperkalsemiye neden olabileceğini desteklemektedir.

Hızlı kemik yıkım aktivitesinin geri dönüşünün hiperkalsemiyi tetikleyebileceği hipotezi, bifosfonatla ilişkili hiperkalsemi vakasının bildirilmemiş olmasını açıklayabilir. Denosumab gibi bifosfonatlar da osteoklastik kemik yıkımını ve kemik devir hızını önemli ölçüde baskılar, ancak bu iki ajan arasında etki mekanizması ve yarı ömür uzunluğu açısından belirgin farklar vardır. Bifosfonatlar kemikte birikir ve kemik yıkımını baskılar, ancak osteoklast oluşumunu engellemez. Özellikle bifosfonatlar, kemik dokusuna yüksek afiniteleri nedeniyle yıllar boyunca yavaşça salınır. Bu farklılıklar nedeniyle, bifosfonat tedavisinin kesilmesi osteoklastik kemik yıkımında bir geri dönüşe neden olmayabilir (263).

Ayrıca birçok büyük çalışma, hipokalseminin denosumab tedavisinin bir yan etkisi olduğunu göstermiştir. Fizazi K. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kastrasyona dirençli prostat kanserli erkeklerle yapılan Faz III denemesinde denosumab ve zoledronik asit karşılaştırıldığında, denosumab alan katılımcılarda hipokalsemi oranları, zoledronik asit alanlara göre anlamlı derecede yüksek (%13'e karşı %6) bulunmuştur (264). Çoklu miyelom ve diğer ileri kanserlerde denosumab ile zoledronik asiti karşılaştıran başka bir randomize, kontrollü, çift kör denemede, denosumab alan katılımcıların %5,7'si hipokalsemi tedavisi için intravenöz Ca infüzyonuna ihtiyaç duyarken, zoledronik asit alanların sadece %2,7'si bu tedaviye ihtiyaç duymuştur (265). Bu gözlemler, böbrek hücreli karsinom, çoklu miyelom veya miyelofibrozis ile ilişkili maligniteye bağlı hipokalsemi vakalarında denosumab kullanımına alan açmıştır (266-267). Spångeus ve arkadaşlarının retrospektif olarak yaptıkları bir çalışmada denosumab

enjeksiyonu sonrası hipokalsemi prevalansına bakılmıştır. Denosumab enjeksiyonlarının %6'sını takiben enjeksiyon sonrası hipokalsemi gözlemlenmiştir, bu durum enjeksiyon sayısından bağımsız bulunmuştur. Şiddetli enjeksiyon sonrası hipokalsemi nadir görülmüştür ve şiddetli böbrek yetmezliği ile beslenme durumu önemli öngörülen sebepler gibi görünmektedir (268). Magnezyum ve fosfat, enjeksiyon öncesi risk değerlendirmesine değer katabilir bulunmuştur. Bütün bunlara ek olarak çalışmada erkeklerde hipokalsemi kadınlara oranla yüksek bulunmuştur (268). Tüm bu değerlendirmelerin sonuçlarına dayanarak biz de serum kalsiyum seviyelerinde değişim beklemiştik, ancak bizim sonuçlarımızda serum kalsiyum seviyelerinde anlamlı bir artma ya da azalma görülmemiştir. Bunun sebebinin hem sağlıklı genç ratlar üzerinde çalışmamız olduğu, hem herhangi bir sistemik hastalıklarının olmaması sebebiyle olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca hiperkalsemi çocuk hastalarda tedavi kesildikten belli bir süre sonra raporlanmıştır. Biz tedavi bitiminin hemen ardından kanı aldığımız için bu sonucu görememiş olabiliriz.

Makras P. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada menopoza sonrası osteoporoz tedavisi için denosumab kullanan hastalarda paratiroid hormon incelenmiş, bulgularında ise, denosumab sonrası PTH artış değişiklikleri saptanmıştır. Çalışma, bunun esas nedeni olarak serum kalsiyumundaki değişikliklere bağlandığını öne sürmektedir. Ayrıca, menopoza sonrası hasta grubunda, kalsiyum ve vitamin D yüklemesinin, denosumab kaynaklı serum kalsiyumundaki düşüşü ve dolayısıyla tedavinin en azından ilk ayında kompanzatuvar PTH artışını önleyebileceğini göstermiştir (269). Paul J Kostenuik ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise Denosumab, Alendronat veya Alendronat Sonrası Denosumab'ın overektomize sinomolgus maymunlarında kemik devir hızı, kalsiyum homeostazı, kemik kütlesi ve kemik gücü üzerine etkileri değerlendirilmiştir sonuçlarında biyokimyasal bulgulara PTH değişiminin serum kalsiyum değişikliklerinin tam zıttı şekilde sonuçlar gösterdiği ve serum fosfor değerlerinin de serum kalsiyum ile paralel sonuçlar şeklinde bulunduğu belirtilmiştir (270).

Miyaoka ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise denosumabın normal böbrek fonksiyonuna sahip osteoporotik hastalarda serum fosforunu düşürerek glomerüler filtrasyon oranını iyileştirmesini değerlendirmişlerdir ve bu çalışmada tek bir denosumab enjeksiyonunun osteoporotik hastalarda serum fosfor (Pi) seviyelerini 6 aya

kadar önemli derecede azalttığını bulmuşlardır (271). Yapılan çalışmada denosumab uygulaması; serum fosforunu (Pi), kalsiyum-fosfor çarpımını ve kalsiyumun düzeltilmiş formunu (cCa) önemli ölçüde baskılamıştır (271). Kemik yıkımının inhibisyonu, dolaşıma salınan Pi düzeyinin düşmesiyle ilişkili olabilir ancak serum Pi düzeyi, kemik anti-resorptif etkisi hafif olduğunda FGF-23, vitamin D ve PTH tarafından aracılı koruyucu etki nedeniyle mutlak (her zaman) değişmeyebileceği sonucuna ulaşmışlardır (271).

Del Mar Morales Hernandez ve arkadaşlarının yaptığı bir vaka raporunda 78 yaşındaki erkek hastaya, prostat kanseri ve yaygın kemik metastazları sebebiyle denosumab uygulanmış ve denosumab tedavisine başlamadan önce fosfor düzeyi düşük normal aralıkta bulunmuştur, 11 gün sonra ise şiddetli hipofosfatemi görülmüştür. Şiddetli hipofosfatemi ve sekonder hiperparatiroidizm görülmesi denosumab uygulamasına bağlanmıştır. (272). Serum kalsiyum seviyeleri bizim çalışmamızda artmadığı için iPTH değerlerinde de herhangi bir anlamlı fark görülmediği söylenebilir.

Yapılmış bir çalışmada hipokalsemi ve denosumab tedavisi sonrası kemik mineral yoğunluğu değişikliklerini son dönem böbrek hastalığı olan hastalar üzerinde Meta-Analiz olarak çalışmışlardır. Tedavi öncesi ve sonrası serum kalsiyum veya fosfat seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş fakat ALP ve PTH seviyelerinde anlamlı azalmalar bulunmuştur (273). Kong ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada menopoz sonrası osteoporozu olan kadınlarda zoledronik asit ve denosumab osteoklastlar için kıyaslanmıştır ve her iki grupta da 24 hafta sonra alkalen fosfataz seviyeleri önemli ölçüde azalmıştır ve 48 hafta sonunda, denosumab grubundaki ALP seviyeleri zoledronat grubuna göre anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (274).

Basso ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada zoledronik asitlerin osteoblast aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir ve bu çalışma, zoledronik asit (ZA) adlı bir bisfosfonatın osteoblastlardaki alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmıştır (275). ALP, kemik matriks mineralizasyonu ile yakından ilişkili bir enzimdir ve bu enzimin aktivitesi bir son nokta testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, osteoblastların 7 gün boyunca 5 µM ZA çözeltisi ile tedavi edildiklerinde artmış ALP aktivitesinin gözlemlendiğini göstermiştir, 14 gün sonra, her iki ZA konsantrasyonu da (1 ve 5 µM) kontrol grubuna kıyasla ALP aktivitesini önemli ölçüde azaltmış, 21 günlük

periyotta ise, deney ve kontrol grupları arasında ALP açısından bir fark bulunamamıştır (275). Bizim bulgularımızda serum alkalin fosfataz düzeyi zoledronik asitte, kontrol ve denosumab grubuna görece yüksek çıksa da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Başaran ve arkadaşlarının yaptığı bir vaka raporu çalışmasında uzun süreli bifosfonat kullanımına bağlı olarak gelişen bilateral inkomplet atipik femur fraktürü değerlendirilmiş, 25-hidroksi vitamin D3 ve paratiroid hormon seviyeleri normal aralıklarda bulunmuştur (276). Nakamura Y. ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada Japon menopoz sonrası OP hastalarında, ekstra vitamin D olmaksızın 3 yıl süren bifosfanat tedavisi sonrası serum 25(OH)D3 düzeylerinde belirgin bir artış bulmuşlardır. Diğer yandan, Japon menopoz sonrası OP kohortunda 4 ay süren BP'lerden sonra serum 25(OH)D anlamlı şekilde azalmıştır (277). Bu nedenle, uzun süreli BP tedavisinde vitamin D eklemesinin isteğe bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (277). Son yaptıkları denosumab çalışmasında, serum 25(OH)D düzeyleri, vitamin D ve kalsiyum takviyesi olsun ya da olmasın 3 yıl boyunca sürekli artmıştır (278). Öte yandan Augoulea ve arkadaşları, denosumab tedavisi nedeniyle oluşan PTH artışının serum 25(OH)D düzeyleri ile ilişkili olmadığını bildirmiştir (279).

Karga H. ve arkadaşları, zoledronik asit infüzyonunun (5 mg/100 mL) tiroid fonksiyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, Aralık 2021'e kadar MEDLINE'da uygun çalışmaları araştırmıştır (280). Serum TSH seviyesi esasen değişmemiştir (280). Yapılan başka bir çalışma da ise hastanın zoledronik asit infüzyonundan 11 gün sonra TSH seviyesi yüksek (10,56 mU/L) çıkmış ve 53 gün sonra bile yüksek kalmıştır (6,30 mU/L) (281). TSH seviyesi, günlük oral levotiroksin (100 mcg) reçetesi ile 3 ay sonra normal bulunmuştur (281). Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise (n=163, %95'i postmenopozal kadın), zoledronik asit infüzyonundan (5 mg) sonra 0, 1, 2, 3, 7 ve 42. günlerde tiroid fonksiyon testleri incelenmiştir ve bu infüzyonlardan sonra TSH artmış ve artış 42. gün son kontrole kadar devam etmiştir (282) TSH'deki artış, tiroid otoimmünite belirtisi olan hastalarda daha belirgin bulunmuştur (282).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada osteoklast yoğunlukları tüm gruplarda benzer bulunmuştur. Osteoklast geri dönüşümü RANKL sinyallemesi tarafından düzenlenir ve RANKL inhibisyonu, osteomorfaların birikimine yol açar ve bu durum, aktif osteoklastları oluşturmak üzere yeniden kaynaşma kapasitesine sahip hazırlanmış bir osteoklast öncülleri (osteomorf) havuzu sağlar (283). Yapılan bazı çalışmalarda

bifosfonatların osteoklast oluşumunu engellediği belirtilirken (187) uzun süreli alendronat tedavisinin gecikmiş apoptoz geçiren belirgin dev, hipernükleer ve ayrılmış osteoklastları içeren osteoklastların sayısında artışa sebep olduğunu belirtmiştir (284). Ek olarak, gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda Zoledronik asidin RANKL aracılı yolları baskılayarak osteoklastogenezini inhibe ettiği belirtilmiştir (285,286). Bir başka *in vitro* çalışmada ise zoledronik asidin osteoklastogenez sırasında RANK ekspresyonunu ve osteoklast öncüllerinin göçünü engellediği bildirilmiştir (287). Başka bir çalışmada ise farelerde uzun süreli (13 ay) zoledronik asit tedavisinden sonra ayrılmış osteoklast sayısında artış gözlenmiştir (288).

Liverani ve arkadaşları, monosit–osteoklast diferansiyasyonu için bir hücre kültür modeli kullanarak deneyler gerçekleştirmiş ve zoledronik asit varlığında vakuole dönüşmüş osteoklastların oluştuğunu, buna karşın denosumab varlığında osteoklastların oluşmadığını bulmuşlardır. Bu durum, zoledronik asidin diferansiye olmuş osteoklastlar üzerinde etkili olduğunu öne sürmektedir (289).

Shibuya ve arkadaşları yaptığı bir çalışmada osteoklast diferansiyasyonunun denosumab tarafından inhibe edildiğini ancak zoledronik asit varlığında osteoklast sayısında geçici bir artış gözlendiğini bildirmişlerdir (290). Yine aynı çalışmada birincil hücre popülasyonundan mononükleer hücreleri çıkararak kalan segmenti osteoklastların sağ kalımını değerlendirmek için kullanmışlardır ve çalışmanın sonucunda zoledronik asit tarafından indüklenen osteoklast sayısında belirgin bir azalma bulmuşlardır, buna karşın kontrol grubunda osteoklastlar zamanla kaybolmuş, denosumab ile tedavi edilen grup ile kontrol grubu arasında fark bulunmamıştır (290). Bu durum denosumab ajanının osteoklastların kendilerinin sağ kalımını baskılamadığını göstermektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın bulgusu, denosumab'ın GCTB dokusunda osteoklastların kaybolmasına neden olan temel mekanizmanın osteoklast diferansiyasyonunun baskılanması olduğunu göstermiştir (290).

Denosumabın preosteoklastlardan osteoklasta farklılaşma sürecini engellemesi (291) ancak preosteoklastları içeren osteoklast popülasyonu üzerindeki etkilerinin daha düşük olması çalışmamızda gözlemediğimiz osteoklast yoğunluğunun kontrol grubu ile benzerliği açıklayabilir. Ek olarak bifosfonat grubunda da gözlenen osteoklast yoğunluğunun kontrol grubu ile olan benzerliği zoledronik asit tedavisinin mevcut osteoklastları öldürse bile, osteoklast öncüllerinden yeni hücrelerin



diferansiyasyonunun devam edebilmesi ile açıklanabilir. Eğer bu yenilenme hızı, öldürülen osteoklastların hızına yakın veya eşitse, toplam osteoklast yoğunluğunda net bir azalma gözlemlenmeyebilir.

Osteositler yalnızca kemik kütlesinin değil aynı zamanda kemik kalitesinin düzenlenmesinde de önemli rol oynar. Çalışmamızda, denosumab uygulaması sonrası kontrol grubuna kıyasla osteosit yoğunluğunda anlamlı azalma gözlemledik. Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada aktif denosumab tedavisi ile canlı osteositlerde bir azalma olduğu ve buna daha fazla sayıda mikropetrotik osteosit lakuna eşlik ettiği gösterilmiştir (292). Her iki durum da kemik patolojilerinde veya eski kemiğin var olduğunu gösteren ve düşük kemik döngüsü olan durumlarda görülmektedir (293-296). Ek olarak, vertebral cisimlerin aseptik nekrozu (Kümmels hastalığı) üzerine gerçekleştirilen çalışmalarda, denosumabın kesilmesi sonucu daha fazla sayıda boş osteosit lakunasının eşlik ettiği gözlenmiştir (297,298). Ayrıca, denosumabın kesilmesinden 12 ay sonra boş osteosit lakünlerinin sayısı, aktif denosumab tedavisi gören hastalarınkiyle benzer bulunmuştur (294). Bir diğer olası mekanizma ise denosumab ile RANKL inhibisyonudur. RANKL, hücre sağkalımını destekleyen sinyal yollarının bir parçasıdır (299) ve RANKL inhibisyonu, osteositlerdeki sağkalım sinyallerini azaltarak apoptoz riskini artırabilir (300).

Fu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, denosumab uygulaması, büyüme plağı kırıkta hücrelerinde Tnfrsf11b gen ifadesi üzerinde bariz bir etkiye sahip olmamış ancak osteositleri azalttığı bulunmuştur. Osteositlerdeki Tnfrsf11b ifadesindeki değişimi iki şekilde niceliklendirmişlerdir; İlk olarak, görüntü analizi kullanarak osteositlerdeki hibridizasyon sinyalinin yoğunluğunu ölçmüşler ve süngerimsi kemiğin sinyal yoğunluğunda yaklaşık dört kat azalma olduğunu doğrulamışlardır ve ikinci olarak, Tnfrsf11b ifade eden osteosit sayısını ölçmüşler ve bunun yaklaşık yarı yarıya azaldığını bulmuşlardır (301). Osteositler, bisfosfonatlar için de önemli hedef hücreler olabilir. Deneysel hayvanlarda, osteosit apoptozu glukokortikoid maruziyeti, mekanik yüklenme, mikro hasar ve ağırlıksızlık gibi birçok uyarıcı tarafından indüklenir (302). Bisfosfonatların osteoklast apoptozunu indükleme yeteneğinin aksine, birkaç bisfosfonatın çok düşük konsantrasyonlarının osteositleri (ve osteoblastları) in vitro glukokortikoide bağlı apoptozdan koruduğu görülmüştür (303). Osteositler üzerindeki bisfosfonat etkilerinin, osteoklastlar üzerindeki etkilerinden bağımsız olduğunu

destekleyen veriler vardır (304). Sıçanlarda, düşük doz risedronat ve alendronatın, döngüsel mekanik yüklenme sonrası osteosit apoptozunu baskıladığı gösterilmiştir (305).

Çalışmamızda hem denosumab hem de bifosfonat grubunda kontrol grubuna kıyasla endokondral kemik büyüme alanı kalınlıkları anlamlı olarak yüksek bulundu. Denosumab, RANKL'yi hedefleyerek aktif osteoklastların oluşumunu, aktivasyonunu ve sağkalımını inhibe eder (306). Bu durum, kemik rezorpsiyonunun azalmasına ve dolayısıyla kemik kütlesinin korunmasına veya artmasına yol açar. Denosumabın bu etkisi, kemik yıkımını azaltırken, mevcut kemik yapısının daha uzun süre korunmasını sağlar, bu da kemik büyüme alanının kalınlığının artmasına neden olabilir (292,307). Bifosfonatlar, özellikle zoledronik asit, osteoklastların kemik yüzeyindeki rezorptif aktivitesini engelleyerek çalışır (308). Bu ilaçlar, osteoklastların apoptozunu teşvik eder ve kemik yıkımını önemli ölçüde azaltır (309). Bifosfonatların kemik büyüme alanlarında denosumabdan daha etkili olması, bu ilaçların kemik yıkımını daha güçlü bir şekilde inhibe etmesi ve kemik yapısının daha fazla korunmasıyla ilişkilendirilebilir (310).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir vaka çalışmasında 9 yaşında fibröz displazili bir hastada denosumab tedavisi uygulanmış ve büyüme plakları incelenmiştir. Büyüme plaklarında yapılan radyografik ve histolojik incelemelerde tedavi sırasında ve sonrasında kalınlığının artmaya devam ettiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada denosumabın çocuklarda lineer büyüme üzerindeki etkilerine dair yayımlanmış raporlar bulunmadığı ve RANKL inhibisyonunun büyüme etkilerinin belirlenmediği bildirilmiştir (311). Yaptıkları tedavinin kesilmesinden sonra transvers bantların büyüme plaklarından uzaklaşması, büyüme plaklarının aktif olduğunu ve lineer büyümenin bu dönemde devam ettiğini göstermişlerdir. Çalışma da epifiz bölge aktivasyonunun devam ettiği bulunmuştur. Denosumab'ın önemli ölçüde büyümeyi engelleyici etkilerinin olmadığını düşündüren bulgularını umut verici bulmuşlardır (311).

Bifosfonatlar osteoklastları hedef alarak kemik rezorpsiyonunu inhibe eder (312). Osteoklast aktivitesinin azalması, kemik yapısının korunmasına ve dolayısıyla kemik matrisinin stabilizasyonuna yardımcı olabilir (313). Çalışmamızda, endokondral kemik proliferasyon bölgesinde bifosfonat grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yoğun hücre gözlenirken, denosumab grubu hayvanlardaki hücre yoğunluğu kontrol grubuyla benzer bulundu. Bunun çeşitli sebepleri olabilir. İlk

olarak, osteoklastların inhibe edilmesi, teorik olarak, kemik oluşumunun azalmasına neden olabilir çünkü kemik yıkımı ve yeniden yapılanma süreçleri birbiriyle bağlantılıdır (314). Zoledronik asit osteoklastları etkili bir şekilde inhibe ettiğinde, osteoblastların uyarılması için gerekli sinyallerin azalması veya artması, osteoblast sayısında düşüşe neden olabilir (194,315). Buna ek olarak osteoblastlar, mezenkimal kök hücrelerden diferansiye olur (316). Osteoklast aktivitesinin azalması, osteoblast prekürsörlerinin osteoblasta dönüşümünü tetikleyen lokal büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin azalmasına neden olabilir (316,317). Bu durum da osteoblastların gelişimini ve sayısını azaltabilir. Son olarak kemik yüzeyindeki osteoklast aktivitesinin azalması kemik matrisinin biyokimyasal yapısını ve çevresel sinyallenmeyi değiştirebilir (194,318). Bu değişiklikler ise osteoblastların sağlığı ve aktivitesi üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir. Ponzoni ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada epifizial büyüme plaklarındaki farklı bölgeler incelenmiştir ve yapılan çalışmada epifiziyal büyüme plağının azalmış olduğu bulunmuş ve bunun sebebi olarak; dinlenme, çoğalma ve hipertrofik zon bölgelerinin azalmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (319). Aynı çalışmada kalsifikasyon zon alanında ise artış meydana geldiği gösterilmiş ve ilacın dozajına ve süresine bağlı olarak büyüme plaklarını etkileyebileceğini savunmuştur (319).

Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarını karşılaştırdığımızda ADAMS-TS1 ile pozitif reaksiyon gösteren osteositler zoledronik asit grubunda yoğun olarak boyanmış olarak gözlenmiştir ancak yapılan boyama skorlanmalarında deney gruplarında boyanan hücre sayısı kontrol grubuna göre fazla olma eğilimi gösterse de ne osteositlerde ne de proliferasyon bölgesinde boyanma yoğunluğunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. ADAMS-TS1, metalloproteinazların bir alt grubu olan ADAMTS ailesine aittir ve kemik matrisinin düzenlenmesi ve doku remodelasyonunda rol oynar (320,321). Bifosfonat grubunda bu protein ile pozitif reaksiyon gösteren osteositlerin daha yoğun olarak boyanmış olması, zoledronik asidin osteositler üzerinde belirgin bir etkiye sahip olabileceğini gösterir ve bu durum, zoledronik asitin kemik matrisinin biyokimyasal yapısını ve osteositlerin işlevselliğini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, zoledronik asitin osteositlerde ADAMS-TS1 ekspresyonunu artırması, bu hücrelerin aktive edildiğine ve zoledronik asidin kemik dokusu üzerindeki etkisinin bu hücreler aracılığıyla gerçekleştiğine işaret edebilir. Ek olarak, bu yoğun boyanma, denosumab grubunda da gözlenen hücre

sayısının fazlalığı ile kıyaslandığında, her iki ilacın da kemik matriks bileşenleriyle etkileşime girebileceğini düşündürmektedir.

Denosumab ve zoledronik asidin kemik büyüme alanları ve kemik yoğunluğu üzerine etkileri radyolojik olarak incelendiğinde, denosumab ve zoledronik asidin her iki tedavi grubunun da kontrol grubuna kıyasla kemik üzerinde belirgin pozitif etkileri sunduğunu göstermektedir. Denosumab ve bifosfonat tedavileri, kontrol grubuna kıyasla kemik büyüme alanı kalınlığını artırmıştır, bu da her iki tedavinin de kemik kazanımını desteklediğini göstermektedir. Bifosfonat grubunda, denosumab grubuna kıyasla daha kalın kemik büyüme alanları gözlenmiştir. Bu durum zoledronik asidin kemik rezorpsiyonunu daha etkili bir şekilde inhibe edebileceğini ve böylece kemik matrisinin korunmasını ve kalınlığının artmasını sağlayabileceğini işaret etmektedir. Kemik yoğunluğu sonuçları incelendiğinde, her iki tedavi grubu da kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek kemik yoğunluğuna sahiptir, bu da osteoporoz gibi durumlar için potansiyel tedavi etkilerini vurgulamaktadır (307,322).

Bifosfonat grubu ve denosumab grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise bifosfonat grubundaki kemik yoğunluğu, denosumab grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu durum zoledronik asidin, denosumaba göre kemik matrisinin yoğunluğunu farklı şekillerde etkileyebileceğini ve ilaçların kemik üzerindeki mikro yapısal etkilerinin farklı olması ile ilişkili olabilir.

Haider ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada buldukları sonuçlardan biri de, yüksek kemik devri olan genç hayvanlarda, tek bir klinik olarak uygulanan önemli ZA dozunun, kemik hacminde hızlı ve belirgin bir artışa neden olduğunu ve bu artışın en az 10 gün boyunca korunduğunu açıkça göstermiştir (323).

Amanat ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer olarak, tek bir sistemik ZA dozunun bile, bir sıçan modelinde kallus hacmini, kallus BMU'ini ve kırık onarım gücünü arttırdığı doğrulanmıştır (240).

Gerstenfeld ve arkadaşları kırık iyileşmesinde bifosfanat ve denosumab ilaçlarını birbiriyle kıyaslamıştır ve sonuçlarında her iki tedavi grubunun (ALN ve DMAB) kallusları, hem 21 hem de 42. günlerde kontrol grubundan daha büyük bulunmuştur (323). İki tedavi grubu karşılaştırıldığında, DMAB ile tedavi edilen hayvanların kallusu ve kemik hacmi, hem 21 hem de 42. günlerde ALN ile tedavi edilen hayvanların kalluslarından önemli ölçüde daha büyük kemik hacmine sahip bulunmuş. Bununla

birlikte, her iki tedavi grubunun gelişmiş mekanik bütünlüğü, kontrollere kıyasla bu kallus dokularının daha büyük hacimleri, daha yüksek enine kesit alanları ve daha yüksek mineral içerikleri bulunmuştur (324). Tüm bu yayınlardan çıkan sonuçlar bizim çalışmamızdaki röntgen bulgularını kanıtlar niteliktedir.

Çalışmamızda denosumab ve kontrol gruplarında, bifosfonat grubuna kıyasla femur uzaması daha fazla olmuştur. Bu durum denosumabın kemik uzamasını destekleme potansiyelini ve zoledronik asidin bu bağlamda daha kısıtlayıcı olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde mandibula uzaması, bifosfonat grubunda denosumab grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum da yine bifosfonatların bazı kemik tiplerinde büyümeyi daha fazla kısıtlayabileceğini işaret etmektedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamız fibröz displazili çocuk hastalarda, kemik metabolizmasını iyileştirmek ve hastalığa bağlı oluşan ağrıyı dindirmek için kullanılan denosumab ve bifosfonatların, çocuğun büyüme plaklarındaki ve kemik metabolizmasındaki etkisini gelişim çağındaki ratlar üzerinde araştıran ve bu iki ilacı birbiri ile kıyaslayan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda sistemik olarak bifosfonat ve denosumab uygulanan hayvanların biyokimyasal değerlendirilmesinde, 25-hidroksi vitamin D3, serum kalsiyum ve serum fosfor değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ve benzer düzeyler çıkmıştır. Buna bağlı olarak iPTH değerleri, serum kalsiyum ile ilişkili olduğundan, denosumab grubunda düşük çıkmış olmasına rağmen anlamlı bir fark görülmemektedir. Yapılan çalışmaların bazılarında ekstra sistemik hastalığın varlığının hiperkalsemiye ve bu sebepten ötürü PTH değerlerinin değişmesine sebep olduğu görülse de bizim çalışmamız sağlıklı ve büyüme gelişim döneminde olan ratlarda yapıldığı için beklediğimiz gibi sonuçlanmıştır. TSH değerleri tüm gruplarda benzer şekilde bulunmuştur. ALP düzeyi sırasıyla en yüksek bifosfanat grubunda, sonra kontrol ve en düşük denosumab grubunda çıkmış olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. IGF-1 değerleri sırasıyla en yüksek denosumab grubunda onu takiben kontrol ve en düşük bifosfanat grubunda çıkmış olup, istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren tek biyokimsal bulgumuzdur. Bu sonuç bize zoledronik asidin osteoblastik aktiviteyi düşürdüğü bilgisini verir. Bu bizim için büyüme ve gelişim çağı dönemi için önemli bir bulgudur.

Histolojik değerlendirmelerde, kemik büyüme alanının kalınlığı, en kalın bifosfanat, sonra sırasıyla denosumab ve kontrol grubu olacak şekilde sonuçlanmıştır ve İstatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Histolojik değerlendirmede bifosfanat grubunda çok daha düzensiz ve kontrolsüz bir kalınlaşma izlenmiştir. Kemik büyüme kalınlığı bifosfanat grubunda anlamlı şekilde fazla görünse de bu durum bize hücre yoğunluğu, düzensizliği ve kalitesi hakkında detaylı bilgi vermemektedir. Bölgedeki osteoblast yoğunluğu subjektif olarak değerlendirildiğinde bifosfonat grubundaki yoğunluk kontrol ve denosumab grubuna göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Osteoklast seviyeleri sırasıyla en yüksek bifosfonat olup denosumab ve kontrol grubunda benzer değerler

bulunmuş olmasına rağmen anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Osteosit yoğunluğu denosumab grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Proliferasyon alanında hücre yoğunlukları değerlendirildiğinde ise bifosfonat grubunda anlamlı derecede diğer iki gruba göre daha yüksek bulunmuştur. İmmunohistokimyasal olarak osteosit ve proliferasyon alanları değerlendirilmiş olup bifosfonat grubu ve denosumab grubu yüksek boyanmaya sahip olsa da anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Radyolojik değerlendirmeleri biyokimyasal ve histolojik bulguları desteklemek için çalışmaya kattık. Femur ve mandibulada kemik yoğunlukları değerlendirildiğinde sırasıyla en yüksek denosumab sonra bifosfonat ve en düşük kontrol grubu olduğu görüldü ve bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Ayrıca femur ve mandibula boy uzamaları değerlendirildiğinde femurda, denosumab grubunda kontrol ve bifosfonat grubuna oranla daha fazla uzama gözlemlenirken, mandibuladaki uzama farkı sadece bifosfonata göre anlamlı yüksek bulundu. Tüm radyolojik değerlendirmelerde bulduğumuz sonuçlar histolojik değerlendirmelerimizi doğrular nitelikteydi.

Tüm bu veriler ışığında büyüme gelişim döneminde uygulanan bifosfonatların büyüme gelişim merkezlerine daha agresif etkileri sebebiyle kemik boylarının daha kısa kaldığı, denosumab grubunun ise bifosfonat grubuna göre kemik uzama miktarı olarak büyüme atılımına devam ettiği bulunmuştur. Bu sebeplerle büyüme gelişim çağında medikal tedavi endikasyonu doğan çocuklarda ilaç seçimleri için anlamlı sonuçlar doğuran bir çalışma olmuştur. Bu çalışmanın en büyük limitasyonu hastalık yaratmadığımız için hastalık var olduğu durumda başka yapıları etkileyip sonuçlarımızı değiştirebilecek olmasıdır ancak bizim çalışmadaki asıl amacımız ilacın mekanizmasını başka parametreler olmadan kemik üzerinde direkt değerlendirmektir. Ayrıca yapılan son çalışmalarda denosumabın ratlar üzerinde etkisinin insanlarla benzerliği de tartışma konusu olmuştur. Tüm bu bilgiler ışığında, hayvan sayısının artırılarak daha detaylı bir sonuca ulaşılması ve biyokimyasal markırların ilaç enjeksiyonunu takiben aylık kontrollerinin yapılabileceği ve mikro-BT analizleri ile değerlendirilecek çalışmaların ileride olacak çalışmalara dahil edilmesi gerektiği kanaatindeyiz. Bu çalışmanın ileride yapılacak başka hayvan deneyleri ve klinik deneylerle desteklenmesi, daha kapsamlı ve uygulanabilir bilgilerin elde edilmesine katkıda bulunacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Chen YR, Chang CN, Tan YC. Craniofacial fibrous dysplasia: an update. *Chang Gung Med J*. 2006;29(6):543-9.
2. Adetayo OA, Salcedo SE, Borad V, Richards SS, Workman AD, Ray AO. Fibrous dysplasia: an overview of disease process, indications for surgical management, and a case report. *Eplasty*. 2015;15:e6.
3. Florez H, Peris P, Guañabens N. Fibrous dysplasia. Clinical review and therapeutic management. *Med Clin (Barc)*. 2016;147(12):547-53.
4. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(9):1032-45.
5. Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR. Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res*. 2008;23(4):544-51.
6. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, Kostenuik PJ, Dougall WC, Sullivan JK, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG-RANK-RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(5):401-19.
7. Majdoub F, Ferjani HL, Nessib DB, Kaffel D, Maatallah K, Hamdi W. Denosumab use in osteogenesis imperfecta: an update on therapeutic approaches. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2023;28(2):98-106.
8. Horiuchi K, Kobayashi E, Mizuno T, Susa M, Chiba K. Hypercalcemia following discontinuation of denosumab therapy: A systematic review. *Bone Rep*. 2021;15:101148.
9. Sydlík C, Dürr HR, Pozza SB, Weißenbacher C, Roeb J, Schmidt H. Hypercalcaemia after treatment with denosumab in children: bisphosphonates as an option for therapy and prevention? *World J Pediatr*. 2020;16(5):520-7.
10. Boyce AM, Chong WH, Yao J, Gafni RI, Kelly MH, Chamberlain CE, et al. Denosumab treatment for fibrous dysplasia. *J Bone Miner Res*. 2012;27(7):1462-70.
11. Baron R, Ferrari S, Russell RG. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. *Bone*. 2011;48(4):677-92.
12. Palmisano B, Labella R, Spica E, Remoli C, Corsi A, Robey P, et al. Anti-RANKL treatment in a murine model of fibrous dysplasia. *Bone Abstracts*. 2017;6.
13. Majoor BC, Appelman-Dijkstra NM, Fiocco M, van de Sande MA, Dijkstra PS, Hamdy NA. Outcome of Long-Term Bisphosphonate Therapy in McCune-Albright Syndrome and Polyostotic Fibrous Dysplasia. *J Bone Miner Res*. 2017;32(2):264-76.
14. Eastell R, Pigott T, Gossiel F, Naylor KE, Walsh JS, Peel NFA. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Bone turnover markers: are they clinically useful? *Eur J Endocrinol*. 2018;178(1):R19-r31.
15. Villanueva-Alcojol L, Monje F, González-García R, Moreno C, Monje A. Characteristics of newly formed bone in sockets augmented with cancellous porous bovine bone and a resorbable membrane: microcomputed tomography, histologic, and resonance frequency analysis. *Implant Dent*. 2013;22(4):380-7.
16. Deluiz D, Oliveira LS, Pires FR, Tinoco EM. Time-dependent changes in fresh-frozen bone block grafts: tomographic, histologic, and histomorphometric findings. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(2):296-306.
17. Balasundaram P, Avulakunta ID. Human Growth and Development. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
18. Smith TS, Coleman E. Growth and Development During Adolescence. In: Kyle T, editor. New York: Springer Publishing Company. p. 125-33.
19. Bier DM. Growth in the first two years of life. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2008;61:135-44.
20. Viner RM, Allen NB, Patton GC. Puberty, Developmental Processes, and Health Interventions. In: Bundy DAP, Silva ND, Horton S, Jamison DT, Patton GC, editors. *Child and Adolescent Health and Development*. Washington (DC): The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank
- © 2017 International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank.; 2017.
21. Group WMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta Paediatr Suppl*. 2006;450:76-85.
22. Khadilkar V, Khadilkar A. Growth charts: A diagnostic tool. *Indian J Endocrinol Metab*. 2011;15 Suppl 3(Suppl3):S166-71.



23. Casadei K, Kiel J. Anthropometric Measurement. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
24. Sutapa P, Pratama KW, Rosly MM, Ali SKS, Karakauki M. Improving Motor Skills in Early Childhood through Goal-Oriented Play Activity. *Children (Basel)*. 2021;8(11).
25. Caine D, DiFiori J, Maffulli N. Physical injuries in children's and youth sports: reasons for concern? *Br J Sports Med*. 2006;40(9):749-60.
26. Karimian E, Chagin AS, Säwendahl L. Genetic regulation of the growth plate. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2:113.
27. Pines M, Hurwitz S. The role of the growth plate in longitudinal bone growth. *Poult Sci*. 1991;70(8):1806-14.
28. Wolpert L. Arms and the man: the problem of symmetric growth. *PLoS Biol*. 2010;8(9).
29. Jee YH, Baron J. The Biology of Stature. *J Pediatr*. 2016;173:32-8.
30. De Sanctis V, Di Maio S, Soliman AT, Raiola G, Elalaily R, Millimaggi G. Hand X-ray in pediatric endocrinology: Skeletal age assessment and beyond. *Indian J Endocrinol Metab*. 2014;18(Suppl 1):S63-71.
31. Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(12):6871-6.
32. Ominde BS, Igbigbi PS, Kayode R. Age determination from epiphyseal appearance and union around the elbow and wrist joints and their correlation with gender: a radiological study in a Nigerian population. *Acta Scientiae Anatomica*. 2019;1(2):88-97.
33. Malherbe K. Traction apophysitis of the knee: A case report. *Radiol Case Rep*. 2019;14(1):18-21.
34. Hall SJ. Basic Biomechanics, 8e. McGraw-Hill New York, NY, USA; 2019.
35. Hébert KJ, Laor T, Divine JG, Emery KH, Wall EJ. MRI appearance of chronic stress injury of the iliac crest apophysis in adolescent athletes. *AJR Am J Roentgenol*. 2008;190(6):1487-91.
36. Bateni C, Bindra J, Haus B. MRI of sports injuries in children and adolescents: what's different from adults. *Current Radiology Reports*. 2014;2:1-12.
37. Adirim TA, Cheng TL. Overview of injuries in the young athlete. *Sports Med*. 2003;33(1):75-81.
38. Levine MA. Assessing bone health in children and adolescents. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16(Suppl 2):S205-12.
39. Cardoso HF. A test of three methods for estimating stature from immature skeletal remains using long bone lengths. *J Forensic Sci*. 2009;54(1):13-9.
40. Noussios G, Theologou K, Chouridis P, Karavasili G, Alafostergios G, Katsourakis A. A Rare Morphological Study Concerning the Longest Bone of the Human Anatomy in the Population of the Northern Greece. *J Clin Med Res*. 2019;11(11):740-4.
41. Heppel DH, Medina-Gomez C, de Jongste JC, Raat H, Steegers EA, Hofman A, et al. Fetal and childhood growth patterns associated with bone mass in school-age children: the Generation R Study. *J Bone Miner Res*. 2014;29(12):2584-93.
42. Patel M, Varacallo M. Anatomy, Shoulder and Upper Limb, Forearm Bones. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
43. Kihara K, Kawasaki Y, Yagi M, Takada S. Relationship between stature and tibial length for children with moderate-to-severe cerebral palsy. *Brain Dev*. 2015;37(9):853-7.
44. Fuchs RK, Warden SJ, Turner CH. 2 - Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading. In: Planell JA, Best SM, Lacroix D, Merolli A, editors. *Bone Repair Biomaterials*: Woodhead Publishing; 2009. p. 25-68.
45. Wood C. The age-related emergence of cranial morphological variation. *Forensic Sci Int*. 2015;251:220.e1-20.
46. Moreel L, Betrains A, Molenberghs G, Vanderschueren S, Blockmans D. Epidemiology and predictors of relapse in giant cell arteritis: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2023;90(1):105494.
47. Liebsch C, Graf N, Appelt K, Wilke HJ. The rib cage stabilizes the human thoracic spine: An in vitro study using stepwise reduction of rib cage structures. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178733.
48. Brasiliense LB, Lazaro BC, Reyes PM, Dogan S, Theodore N, Crawford NR. Biomechanical contribution of the rib cage to thoracic stability. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2011;36(26):E1686-93.
49. Winkler LA. Appearance of ossification centers of the lower arm, wrist, lower leg, and ankle in immature orangutans and chimpanzees with an assessment of the relationship of ossification to dental development. *Am J Phys Anthropol*. 1996;99(1):191-203.
50. Doan MK, Long JR, Verhey E, Wyse A, Patel K, Flug JA. Cone-Beam CT of the Extremities in Clinical Practice. *Radiographics*. 2024;44(3):e230143.
51. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(1):45-54.

52. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:421746.
53. Baig MA, Bacha D. *Histology, bone*. 2019.
54. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.
55. Weatherholt AM, Fuchs RK, Warden SJ. Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity. *J Hand Ther*. 2012;25(2):123-31; quiz 32.
56. Kumar N, Kumar A, Uniyal P, Ramalingaiah B, Sharma S, Goni VG, et al. Mimicking high strength lightweight novel structures inspired from the trabecular bone microarchitecture. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*. 2020;378(2167):20190448.
57. Wehrli FW. Structural and functional assessment of trabecular and cortical bone by micro magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging*. 2007;25(2):390-409.
58. Mosekilde L, Ebbesen EN, Tornvig L, Thomsen JS. Trabecular bone structure and strength - remodelling and repair. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2000;1(1):25-30.
59. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000;21(2):115-37.
60. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25103-8.
61. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:3-12.
62. Damoulis PD, Hauschka PV. Nitric oxide acts in conjunction with proinflammatory cytokines to promote cell death in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 1997;12(3):412-22.
63. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep*. 2003;5(3):222-6.
64. Yoshiko Y, Candelieri GA, Maeda N, Aubin JE. Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization. *Mol Cell Biol*. 2007;27(12):4465-74.
65. Boivin G, Bala Y, Doublier A, Farlay D, Ste-Marie LG, Meunier PJ, et al. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. *Bone*. 2008;43(3):532-8.
66. Mizoguchi T, Ono N. The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2021;36(8):1432-47.
67. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, et al. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23(3):268-80.
68. Henry JP, Bordoni B. *Histology, Osteoblasts*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
69. McNamara LM. 2.10 Bone as a Material. In: Ducheyne P, editor. *Comprehensive Biomaterials II*. Oxford: Elsevier; 2017. p. 202-27.
70. Matic I, Matthews BG, Wang X, Dyment NA, Worthley DL, Rowe DW, et al. Quiescent Bone Lining Cells Are a Major Source of Osteoblasts During Adulthood. *Stem Cells*. 2016;34(12):2930-42.
71. Kim JM, Lin C, Stavre Z, Greenblatt MB, Shim JH. Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*. 2020;9(9).
72. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139-46.
73. Mohamed AM. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *Malays J Med Sci*. 2008;15(1):4-12.
74. Stains JP, Civitelli R. Cell-cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005;75(1):72-80.
75. Dedic C, Hung TS, Shipley AM, Maeda A, Gardella T, Miller AL, et al. Calcium fluxes at the bone/plasma interface: Acute effects of parathyroid hormone (PTH) and targeted deletion of PTH/PTH-related peptide (PTHrP) receptor in the osteocytes. *Bone*. 2018;116:135-43.
76. Marenzana M, Shipley AM, Squitiero P, Kunkel JG, Rubinacci A. Bone as an ion exchange organ: evidence for instantaneous cell-dependent calcium efflux from bone not due to resorption. *Bone*. 2005;37(4):545-54.
77. Talmage RV. Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Am J Anat*. 1970;129(4):467-76.
78. Donahue HJ, McLeod KJ, Rubin CT, Andersen J, Grine EA, Hertzberg EL, et al. Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *J Bone Miner Res*. 1995;10(6):881-9.

79. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol.* 2009;174(1):239-47.
80. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235(1):176-90.
81. Wawrzyniak A, Balawender K. Structural and Metabolic Changes in Bone. *Animals (Basel).* 2022;12(15).
82. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658-90.
83. Kalenderer Ö, Turgut A. Bone. In: Korkusuz F, editor. *Musculoskeletal Research and Basic Science.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 303-21.
84. Intemann J, De Gorter DJJ, Naylor AJ, Dankbar B, Wehmeyer C. Importance of osteocyte-mediated regulation of bone remodelling in inflammatory bone disease. *Swiss Med Wkly.* 2020;150:w20187.
85. Matsuo K. Cross-talk among bone cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(4):292-7.
86. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):5-24.
87. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
88. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1116:281-90.
89. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):25-34.
90. Knothe Tate ML. "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. *J Biomech.* 2003;36(10):1409-24.
91. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504-8.
92. Yao Y, Cai X, Ren F, Ye Y, Wang F, Zheng C, et al. The Macrophage-Osteoclast Axis in Osteoimmunity and Osteo-Related Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:664871.
93. Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):1-20.
94. Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(3):204-16.
95. Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Lüth A, et al. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates SIP-dependent bone formation. *J Clin Invest.* 2013;123(2):666-81.
96. Lukina YS, Mishchenko B, Zaytsev V, Vasilev M, Selezneva I. Osteoplastic Material Based on a Bone Matrix Resistant to Osteoclastic Resorption under Conditions of a Pronounced Regenerative Process as a Carrier for rhBMP. *Inorganic Materials: Applied Research.* 2022;13(4):952-60.
97. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells.* 2017;40(10):706-13.
98. Longhini R, Aparecida de Oliveira P, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol.* 2014;85(8):1115-25.
99. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell.* 2021;184(15):3852-72.
100. Li C, Fennessy P. The periosteum: a simple tissue with many faces, with special reference to the antler-lineage periosteum. *Biol Direct.* 2021;16(1):17.
101. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002;110(3):341-50.
102. Davis BH, Ott HC, Taylor DA. 14 - Cardiac Cell Transplantation. In: Halberstadt C, Emerich D, editors. *Cellular Transplantation.* Burlington: Academic Press; 2007. p. 259-74.
103. Maruyama M, Rhee C, Utsunomiya T, Zhang N, Ueno M, Yao Z, et al. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:386.
104. Wang H, Qi LL, Shema C, Jiang KY, Ren P, Wang H, et al. Advances in the role and mechanism of fibroblasts in fracture healing. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;15:1350958.
105. Hankenson KD, Dishowitz M, Gray C, Schenker M. Angiogenesis in bone regeneration. *Injury.* 2011;42(6):556-61.
106. Velazquez OC, Snyder R, Liu ZJ, Fairman RM, Herlyn M. Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *Faseb j.* 2002;16(10):1316-8.
107. Hsu T, Nguyen-Tran HH, Trojanowska M. Active roles of dysfunctional vascular endothelium in fibrosis and cancer. *J Biomed Sci.* 2019;26(1):86.
108. Cavagnero KJ, Gallo RL. Essential immune functions of fibroblasts in innate host defense. *Front Immunol.* 2022;13:1058862.

109. Huang F, Wei G, Wang H, Zhang Y, Lan W, Xie Y, et al. Fibroblasts inhibit osteogenesis by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of YAP in mesenchymal stem cells and secreting DKK1. *Biol Res.* 2024;57(1):4.
110. Gao S, Chen B, Gao M, Xu Y, Yang X, Yang C, et al. Substrate Stiffness of Bone Microenvironment Controls Functions of Pre-Osteoblasts and Fibroblasts In Vitro. *Biomimetics (Basel).* 2023;8(4).
111. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int.* 2002;71(2):145-54.
112. Vashishth D. Collagen glycation and its role in fracture properties of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5(4):316.
113. Tang SY, Zeenath U, Vashishth D. Effects of non-enzymatic glycation on cancellous bone fragility. *Bone.* 2007;40(4):1144-51.
114. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet Disord.* 2004;5:12.
115. Marie PJ. Role of N-cadherin in bone formation. *J Cell Physiol.* 2002;190(3):297-305.
116. Litzemberger JB, Kim JB, Tummala P, Jacobs CR. Beta1 integrins mediate mechanosensitive signaling pathways in osteocytes. *Calcif Tissue Int.* 2010;86(4):325-32.
117. Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012;4(2):64-8.
118. Topaloğlu U, Ketani MA, Saruhan BG. Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2017;10(1):62-71.
119. Gilbert SF. Osteogenesis: the development of bones. *Developmental biology.* 2000;6.
120. Zhang X, Siclari VA, Lan S, Zhu J, Koyama E, Dupuis HL, et al. The critical role of the epidermal growth factor receptor in endochondral ossification. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2622-33.
121. Kume K, Satomura K, Nishisho S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S, et al. Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem.* 2002;50(2):159-69.
122. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):E47-51.
123. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19(5):444-51.
124. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011;17(10):1231-4.
125. Segovia-Silvestre T, Neutzsky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, Karsdal MA, et al. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet.* 2009;124(6):561-77.
126. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *Bonekey Rep.* 2012;1:183.
127. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med.* 2011;17(11):1473-80.
128. Hughes A, Kleine-Albers J, Helfrich MH, Ralston SH, Rogers MJ. A class III semaphorin (Sema3e) inhibits mouse osteoblast migration and decreases osteoclast formation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2012;90(2):151-62.
129. Lichtenstein L. Polyostotic fibrous dysplasia. *Archives of Surgery.* 1938;36(5):874-98.
130. Robinson C, Collins MT, Boyce AM. Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome: Clinical and Translational Perspectives. *Curr Osteoporos Rep.* 2016;14(5):178-86.
131. Kamble VR, Waghmare SN, Rangari AV, Meti M, Pohankar P, Paraye S. Fibrous dysplasia of maxilla—A rare case report. *Indian Journal of Case Reports.* 2021;7(11):485-8.
132. Eversole R, Su L, ElMofty S. Benign fibro-osseous lesions of the craniofacial complex. A review. *Head Neck Pathol.* 2008;2(3):177-202.
133. Obermeier KT, Hartung JT, Hildebrandt T, Dewenter I, Smolka W, Hesse E, et al. Fibrous Dysplasia of the Jaw: Advances in Imaging and Treatment. *J Clin Med.* 2023;12(12).
134. Kim HY, Shim JH, Heo CY. A Rare Skeletal Disorder, Fibrous Dysplasia: A Review of Its Pathogenesis and Therapeutic Prospects. *Int J Mol Sci.* 2023;24(21).
135. Vigano L, Powierza M, VIGANÒ V, Casu C. Fibrous dysplasia of the mandible: differential diagnosis. 2021.
136. MacDonald DS. Maxillofacial fibro-osseous lesions. *Clin Radiol.* 2015;70(1):25-36.
137. Berberi A, Aoun G, Khalaf E, Aad G. Monostotic Fibrous Dysplasia of the Mandible in a 9-Year-Old Male Patient Treated with a Conservative Surgical Treatment: A Case Report and 15-Year Follow-Up. *Case Rep Dent.* 2021;2021:9963478.

138. Aslan SG, Tezel K, Ordu-Gökkaya NK. Fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome: A case report with review of literature on the rehabilitation approach. *Turk J Phys Med Rehabil.* 2023;69(2):252-6.
139. MacDonald-Jankowski DS. Fibro-osseous lesions of the face and jaws. *Clin Radiol.* 2004;59(1):11-25.
140. Jour G, Oultache A, Sadowska J, Mitchell T, Healey J, Nafa K, et al. GNAS Mutations in Fibrous Dysplasia: A Comparative Study of Standard Sequencing and Locked Nucleic Acid PCR Sequencing on Decalcified and Nondecalcified Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(9):660-7.
141. Turan S, Bastepe M. GNAS Spectrum of Disorders. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(3):146-58.
142. Riminucci M, Robey PG, Saggio I, Bianco P. Skeletal progenitors and the GNAS gene: fibrous dysplasia of bone read through stem cells. *J Mol Endocrinol.* 2010;45(6):355-64.
143. Zhao X, Deng P, Iglesias-Bartolome R, Amornphimoltham P, Steffen DJ, Jin Y, et al. Expression of an active G $\alpha$ (s) mutant in skeletal stem cells is sufficient and necessary for fibrous dysplasia initiation and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(3):E428-e37.
144. Isobe Y, Takahashi K, Kiso H, Nakao K, Ikeno M, Koyama N, et al. Direct evidence for the age-dependent demise of GNAS-mutated cells in oral fibrous dysplasia. *Arch Oral Biol.* 2018;93:133-40.
145. Karaca A, Malladi VR, Zhu Y, Tafaj O, Paltrinieri E, Wu JY, et al. Constitutive stimulatory G protein activity in limb mesenchyme impairs bone growth. *Bone.* 2018;110:230-7.
146. Siddappa R, Mulder W, Steeghs I, van de Klundert C, Fernandes H, Liu J, et al. cAMP/PKA signaling inhibits osteogenic differentiation and bone formation in rodent models. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(8):2135-43.
147. Wu X, Zeng LH, Taniguchi T, Xie QM. Activation of PKA and phosphorylation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 by prostaglandin E2 promote osteoblast-like differentiation in MC3T3-E1 cells. *Cell Death Differ.* 2007;14(10):1792-801.
148. Lo KW, Kan HM, Ashe KM, Laurencin CT. The small molecule PKA-specific cyclic AMP analogue as an inducer of osteoblast-like cells differentiation and mineralization. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(1):40-8.
149. Yang DC, Tsay HJ, Lin SY, Chiou SH, Li MJ, Chang TJ, et al. cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. *PLoS One.* 2008;3(2):e1540.
150. Fu Q, Jilka RL, Manolagas SC, O'Brien CA. Parathyroid hormone stimulates receptor activator of NF $\kappa$ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 2002;277(50):48868-75.
151. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999;140(8):3552-61.
152. Kondo H, Guo J, Bringham FR. Cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A mediates parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor regulation of osteoclastogenesis and expression of RANKL and osteoprotegerin mRNAs by marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 2002;17(9):1667-79.
153. Zhang Q, Yang J, Hu N, Liu J, Yu H, Pan H, et al. Small-molecule amines: a big role in the regulation of bone homeostasis. *Bone Res.* 2023;11(1):40.
154. Bolger GB. The cAMP-signaling cancers: Clinically-divergent disorders with a common central pathway. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;13:1024423.
155. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med.* 1991;325(24):1688-95.
156. Bhattacharya S, Mishra RK. Fibrous dysplasia and cherubism. *Indian J Plast Surg.* 2015;48(3):236-48.
157. Javaid MK, Boyce A, Appelman-Dijkstra N, Ong J, Defabianis P, Offiah A, et al. Best practice management guidelines for fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome: a consensus statement from the FD/MAS international consortium. *Orphanet J Rare Dis.* 2019;14(1):139.
158. Davidova LA, Bhattacharyya I, Islam MN, Cohen DM, Fitzpatrick SG. An Analysis of Clinical and Histopathologic Features of Fibrous Dysplasia of the Jaws: A Series of 40 Cases and Review of Literature. *Head Neck Pathol.* 2020;14(2):353-61.
159. Holmes KR, Holmes RD, Martin M, Murray N. Practical Approach to Radiopaque Jaw Lesions. *Radiographics.* 2021;41(4):1164-85.
160. Burke AB, Collins MT, Boyce AM. Fibrous dysplasia of bone: craniofacial and dental implications. *Oral Dis.* 2017;23(6):697-708.

161. Kushchayeva YS, Kushchayev SV, Glushko TY, Tella SH, Teytelboym OM, Collins MT, et al. Fibrous dysplasia for radiologists: beyond ground glass bone matrix. *Insights Imaging*. 2018;9(6):1035-56.
162. Boyce AM, Collins MT. Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome: A Rare, Mosaic Disease of Gs Activation. *Endocr Rev*. 2020;41(2):345-70.
163. Happle R. The McCune-Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin Genet*. 1986;29(4):321-4.
164. Riminucci M, Liu B, Corsi A, Shenker A, Spiegel AM, Robey PG, et al. The histopathology of fibrous dysplasia of bone in patients with activating mutations of the Gs alpha gene: site-specific patterns and recurrent histological hallmarks. *J Pathol*. 1999;187(2):249-58.
165. Sakamoto A, Oda Y, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Frequent immunoexpression of TGF-beta1, FGF-2 and BMP-2 in fibroblast-like cells in osteofibrous dysplasia. *Oncol Rep*. 2007;17(3):531-5.
166. Hao S, Wang M, Yin Z, Jing Y, Bai L, Su J. Microenvironment-targeted strategy steers advanced bone regeneration. *Mater Today Bio*. 2023;22:100741.
167. Leet AI, Collins MT. Current approach to fibrous dysplasia of bone and McCune-Albright syndrome. *J Child Orthop*. 2007;1(1):3-17.
168. Tucker-Bartley A, Selen DJ, Golden E, van Gool R, Ebb D, Mannstadt M, et al. Pharmacological Interventions Targeting Pain in Fibrous Dysplasia/McCune-Albright Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3).
169. Ono K, Yoshioka N, Kunisada Y, Nakamura T, Nakamura Y, Obata K, et al. Craniomaxillofacial Fibrous Dysplasia Improved Cosmetic and Occlusal Problem by Comprehensive Treatment: A Case Report and Review of Current Treatments. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(9).
170. Cremers S, Drake MT, Ebetino FH, Bilezikian JP, Russell RGG. Pharmacology of bisphosphonates. *Br J Clin Pharmacol*. 2019;85(6):1052-62.
171. Fleisch H, Russell RG, Francis MD. Diphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and bone resorption in tissue culture and in vivo. *Science*. 1969;165(3899):1262-4.
172. Russell RG, Mühlbauer RC, Bisaz S, Williams DA, Fleisch H. The influence of pyrophosphate, condensed phosphates, phosphonates and other phosphate compounds on the dissolution of hydroxyapatite in vitro and on bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture and in thyroparathyroidectomised rats. *Calcif Tissue Res*. 1970;6(3):183-96.
173. Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
174. von Moos R, Costa L, Gonzalez-Suarez E, Terpos E, Niepel D, Body JJ. Management of bone health in solid tumours: From bisphosphonates to a monoclonal antibody. *Cancer Treat Rev*. 2019;76:57-67.
175. Young CM, Fahrholz CN, Manikowski KJ, Hum JM, Skinner BW. Chapter 34 - Drugs for metabolic bone disease. In: Ray SD, editor. *Side Effects of Drugs Annual*. 44: Elsevier; 2022. p. 471-81.
176. Sunyecz JA. Zoledronic acid infusion for prevention and treatment of osteoporosis. *Int J Womens Health*. 2010;2:353-60.
177. Tenore G, Palaia G, Gaimari G, Brugnoletti O, Bove L, Giudice RL, et al. Medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ): Etiological update. *Senses and Sciences*. 2014;1(4).
178. Eid A, Atlas J. The role of bisphosphonates in medical oncology and their association with jaw bone necrosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014;26(2):231-7.
179. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest*. 1990;85(2):456-61.
180. Pazianas M, van der Geest S, Miller P. Bisphosphonates and bone quality. *Bonekey Rep*. 2014;3:529.
181. Wang B, Zhan Y, Yan L, Hao D. How zoledronic acid improves osteoporosis by acting on osteoclasts. *Front Pharmacol*. 2022;13:961941.
182. Lewiecki EM. Bisphosphonates for the treatment of osteoporosis: insights for clinicians. *Ther Adv Chronic Dis*. 2010;1(3):115-28.
183. Chapurlat R, Legrand MA. Bisphosphonates for the treatment of fibrous dysplasia of bone. *Bone*. 2021;143:115784.
184. Chapurlat RD, Gensburger D, Jimenez-Andrade JM, Ghilardi JR, Kelly M, Mantyh P. Pathophysiology and medical treatment of pain in fibrous dysplasia of bone. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7 Suppl 1(Suppl 1):S3.
185. Valadares LP, de Araújo Ferreira BS, da Cunha BM, Moreira LA, Batista FGA, da Fonseca Hottz C, et al. Effects of zoledronic acid therapy in fibrous dysplasia of bone: a single-center experience. *Arch Endocrinol Metab*. 2022;66(2):247-55.
186. Leu CT, Luegmayr E, Freedman LP, Rodan GA, Reszka AA. Relative binding affinities of bisphosphonates for human bone and relationship to antiresorptive efficacy. *Bone*. 2006;38(5):628-36.
187. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000;88(12 Suppl):2961-78.

188. Aragão AL, Silva IN. Oral Alendronate Treatment for Severe Polyostotic Fibrous Dysplasia due to McCune-Albright Syndrome in a Child: A Case Report. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2010;2010:432060.
189. Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc*. 2009;84(7):632-7; quiz 8.
190. Boyce AM. Denosumab: an Emerging Therapy in Pediatric Bone Disorders. *Curr Osteoporos Rep*. 2017;15(4):283-92.
191. Silva-Fernández L, Rosario MP, Martínez-López JA, Carmona L, Loza E. Denosumab for the treatment of osteoporosis: a systematic literature review. *Reumatol Clin*. 2013;9(1):42-52.
192. Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ. Murine osteoclast formation and function: differential regulation by humoral agents. *Endocrinology*. 2006;147(4):1979-85.
193. Rousseau J, Lamoureux F, Picarda G, Gouin F, Trichet V, Rédini F. Chapter 28 - Animal Models of Malignant Primary Bone Tumors and Novel Therapeutic Approaches. In: Heymann D, editor. *Bone Cancer*. San Diego: Academic Press; 2010. p. 333-46.
194. Xu H, Wang W, Liu X, Huang W, Zhu C, Xu Y, et al. Targeting strategies for bone diseases: signaling pathways and clinical studies. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):202.
195. Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, Warmington KS, Kurahara C, Sun N, et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. *J Bone Miner Res*. 2009;24(2):182-95.
196. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *Int J Clin Pract*. 2012;66(12):1139-46.
197. Zaheer S, LeBoff M, Lewiecki EM. Denosumab for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2015;11(3):461-70.
198. Litak J, Czyżewski W, Szymoniuk M, Sakwa L, Pasierb B, Litak J, et al. Biological and Clinical Aspects of Metastatic Spinal Tumors. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19).
199. Lipton A, Smith MR, Ellis GK, Goessl C. Treatment-induced bone loss and fractures in cancer patients undergoing hormone ablation therapy: efficacy and safety of denosumab. *Clin Med Insights Oncol*. 2012;6:287-303.
200. Fizazi K, Bosserman L, Gao G, Skacel T, Markus R. Denosumab treatment of prostate cancer with bone metastases and increased urine N-telopeptide levels after therapy with intravenous bisphosphonates: results of a randomized phase II trial. *J Urol*. 2009;182(2):509-15; discussion 15-6.
201. McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, Bolognese MA, Woodson GC, Moffett AH, et al. Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med*. 2006;354(8):821-31.
202. Palmisano B, Spica E, Remoli C, Labella R, Di Filippo A, Donsante S, et al. RANKL Inhibition in Fibrous Dysplasia of Bone: A Preclinical Study in a Mouse Model of the Human Disease. *J Bone Miner Res*. 2019;34(12):2171-82.
203. De Castro LF, Michel Z, Pan K, Taylor J, Szymczuk V, Paravastu S, et al. Safety and Efficacy of Denosumab for Fibrous Dysplasia of Bone. *N Engl J Med*. 2023;388(8):766-8.
204. Trojani MC, Gensburger D, Bagouet F, Cortet B, Couture G, Marcelli C, et al. Denosumab use in bone fibrous dysplasia refractory to bisphosphonate: A retrospective multicentric study. *Bone*. 2023;174:116819.
205. Ganda K, Seibel MJ. Rapid biochemical response to denosumab in fibrous dysplasia of bone: report of two cases. *Osteoporos Int*. 2014;25(2):777-82.
206. Ikuta K, Sakai T, Koike H, Ito K, Imagama S, Nishida Y. Successful treatment with denosumab for pelvic fibrous dysplasia: A case report and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(49):e28138.
207. Benhamou J, Gensburger D, Chapurlat R. Transient improvement of severe pain from fibrous dysplasia of bone with denosumab treatment. *Joint Bone Spine*. 2014;81(6):549-50.
208. De Castro LF, Burke AB, Wang HD, Tsai J, Florenzano P, Pan KS, et al. Activation of RANK/RANKL/OPG Pathway Is Involved in the Pathophysiology of Fibrous Dysplasia and Associated With Disease Burden. *J Bone Miner Res*. 2019;34(2):290-4.
209. Cairoli E, Eller-Vainicher C, Chiodini I. Update on denosumab in the management of postmenopausal osteoporosis: patient preference and adherence. *Int J Womens Health*. 2015;7:833-9.
210. Anastasilakis AD, Toulis KA, Polyzos SA, Anastasilakis CD, Makras P. Long-term treatment of osteoporosis: safety and efficacy appraisal of denosumab. *Ther Clin Risk Manag*. 2012;8:295-306.
211. Wang D, Tang X, Shi Q, Wang R, Ji T, Tang X, et al. Denosumab in pediatric bone disorders and the role of RANKL blockade: a narrative review. *Transl Pediatr*. 2023;12(3):470-86.
212. Popp AW, Zysset PK, Lippuner K. Rebound-associated vertebral fractures after discontinuation of denosumab-from clinic and biomechanics. *Osteoporos Int*. 2016;27(5):1917-21.
213. Chang BY, Kim SA, Malla B, Kim SY. The Effect of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) on the Tamoxifen Resistant Breast Cancer Cells. *Toxicol Res*. 2011;27(2):85-93.

214. Martinkovich S, Shah D, Planey SL, Arnott JA. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clin Interv Aging*. 2014;9:1437-52.
215. Eugster EA, Rubin SD, Reiter EO, Plourde P, Jou HC, Pescovitz OH. Tamoxifen treatment for precocious puberty in McCune-Albright syndrome: a multicenter trial. *J Pediatr*. 2003;143(1):60-6.
216. Roth C, Freiberg C, Zappel H, Albers N. Effective aromatase inhibition by anastrozole in a patient with gonadotropin-independent precocious puberty in McCune-Albright syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2002;15 Suppl 3:945-8.
217. Fang X, Liu H, Lang Y, Xiong Y, Duan H. Fibrous dysplasia of bone: Surgical management options and outcomes of 22 cases. *Mol Clin Oncol*. 2018;9(1):98-103.
218. Stanton RP, Ippolito E, Springfield D, Lindaman L, Wientroub S, Leet A. The surgical management of fibrous dysplasia of bone. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7 Suppl 1(Suppl 1):S1.
219. Lu Y, Canavese F, Lin R, Wang W, Zhang X, Chen S. Does the management of osteofibrous dysplasia of the tibia and fibula in children should be tailored to the extent and location of the lesion? A case control study investigating different surgical options. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2023;109(3):102888.
220. Lustig LR, Holliday MJ, McCarthy EF, Nager GT. Fibrous dysplasia involving the skull base and temporal bone. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;127(10):1239-47.
221. Wahyudi M, Alaztha Z. Chondrosarcoma arising in monostotic fibrous dysplasia treated with total femur resection and megaprosthesis: A case report. *Int J Surg Case Rep*. 2021;85:106194.
222. Qu N, Yao W, Cui X, Zhang H. Malignant transformation in monostotic fibrous dysplasia: clinical features, imaging features, outcomes in 10 patients, and review. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(3):e369.
223. Jawad J, Al-Domaidat D, Abaza M. Fibrous dysplasia of the sphenoid sinus: headache relieved by surgical excision-a case report. *J Surg Case Rep*. 2022;2022(11):rjac518.
224. Figuera TM, Spritzer PM. Effect of Intranasal Calcitonin in a Patient with McCune-Albright Syndrome, Fibrous Dysplasia, and Refractory Bone Pain. *Case Rep Endocrinol*. 2017;2017:7898713.
225. Hartley I, Zhadina M, Collins MT, Boyce AM. Fibrous Dysplasia of Bone and McCune-Albright Syndrome: A Bench to Bedside Review. *Calcif Tissue Int*. 2019;104(5):517-29.
226. Gaski G, Hansen D, Willis LM, Bos GD, Kean JR. Intramedullary rod fixation of fibrous dysplasia without use of bisphosphonates. *J Child Orthop*. 2013;7(4):277-83.
227. Akintoye SO, Boyce AM, Collins MT. Dental perspectives in fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;116(3):e149-55.
228. Meier ME, Hagelstein-Rotman M, van de Ven AC, Van der Geest ICM, Donker O, Pichardo SEC, et al. A multidisciplinary care pathway improves quality of life and reduces pain in patients with fibrous dysplasia/McCune-Albright syndrome: a multicenter prospective observational study. *Orphanet J Rare Dis*. 2022;17(1):439.
229. Konradi A. Fibrous dysplasia patients with and without craniofacial involvement report reduced quality of life inclusive of stigma, depression, and anxiety. *Chronic Illn*. 2022;18(4):927-36.
230. MacDonald DS. Maxillofacial fibro-osseous lesions. *Clinical Radiology*. 2015;70(1):25-36.
231. Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, Aydin MS, Yuksel M, Ogunc AV, et al. The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Sci*. 2011;89(11-12):402-7.
232. Al-Ibraheemi A, Inwards CY, Zreik RT, Wenger DE, Jenkins SM, Carter JM, et al. Histologic Spectrum of Giant Cell Tumor (GCT) of Bone in Patients 18 Years of Age and Below: A Study of 63 Patients. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(12):1702-12.
233. Martin-Broto J, Cleeland CS, Glare PA, Engellau J, Skubitz KM, Blum RH, et al. Effects of denosumab on pain and analgesic use in giant cell tumor of bone: interim results from a phase II study. *Acta Oncol*. 2014;53(9):1173-9.
234. Chawla S, Henshaw R, Seeger L, Choy E, Blay JY, Ferrari S, et al. Safety and efficacy of denosumab for adults and skeletally mature adolescents with giant cell tumour of bone: interim analysis of an open-label, parallel-group, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2013;14(9):901-8.
235. Fink D, Shane E. Parathyroid Cancer☆. In: Huhtaniemi I, Martini L, editors. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2015. p. 139-50.
236. Raborn LN, Burke AB, Ebb DH, Collins MT, Kaban LB, Boyce AM. Denosumab for craniofacial fibrous dysplasia: duration of efficacy and post-treatment effects. *Osteoporos Int*. 2021;32(9):1889-93.
237. Senel FC, Kadioglu Duman M, Muci E, Cankaya M, Pampu AA, Ersoz S, et al. Jaw bone changes in rats after treatment with zoledronate and pamidronate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(3):385-91.
238. Hornby SB, Evans GP, Hornby SL, Pataki A, Glatt M, Green JR. Long-term zoledronic acid treatment increases bone structure and mechanical strength of long bones of ovariectomized adult rats. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(4):519-27.



239. Biasotto M, Chiandussi S, Zacchigna S, Moimas S, Dore F, Pozzato G, et al. A novel animal model to study non-spontaneous bisphosphonates osteonecrosis of jaw. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(5):390-6.
240. Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2007;22(6):867-76.
241. Bernhardsson M, Sandberg O, Aspenberg P. Anti-RANKL treatment improves screw fixation in cancellous bone in rats. *Injury*. 2015;46(6):990-5.
242. Sun Q, Tian FM, Liu F, Fang JK, Hu YP, Lian QQ, et al. Denosumab alleviates intervertebral disc degeneration adjacent to lumbar fusion by inhibiting endplate osteochondral remodeling and vertebral osteoporosis in ovariectomized rats. *Arthritis Res Ther*. 2021;23(1):152.
243. Schwartz AV, Schafer AL, Grey A, Vittinghoff E, Palermo L, Lui LY, et al. Effects of antiresorptive therapies on glucose metabolism: results from the FIT, HORIZON-PFT, and FREEDOM trials. *J Bone Miner Res*. 2013;28(6):1348-54.
244. Reid IR, Horne AM, Mihov B, Stewart A, Bastin S, Gamble GD. Zoledronate Slows Weight Loss and Maintains Fat Mass in Osteopenic Older Women: Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial. *Calcif Tissue Int*. 2020;106(4):386-91.
245. Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:235060.
246. Boot AM, Engels MA, Boerma GJ, Krenning EP, De Muinck Keizer-Schrama SM. Changes in bone mineral density, body composition, and lipid metabolism during growth hormone (GH) treatment in children with GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2423-8.
247. Giustina A, Mazziotti G, Canalis E. Growth hormone, insulin-like growth factors, and the skeleton. *Endocr Rev*. 2008;29(5):535-59.
248. Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD. Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2006;21(9):1350-8.
249. Yang F, He C, Sun X, Wang J, Luo C, Liu G, et al. The Regulatory Mechanism of MLT/MT1 Signaling on the Growth of Antler Mesenchymal Cells. *Molecules*. 2017;22(10).
250. Kasukawa Y, Miyakoshi N, Mohan S. The anabolic effects of GH/IGF system on bone. *Curr Pharm Des*. 2004;10(21):2577-92.
251. Yakar S, Courtland HW, Clemmons D. IGF-1 and bone: New discoveries from mouse models. *J Bone Miner Res*. 2010;25(12):2543-52.
252. Tahimic CG, Wang Y, Bikle DD. Anabolic effects of IGF-1 signaling on the skeleton. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:6.
253. Fulzele K, Clemens TL. Novel functions for insulin in bone. *Bone*. 2012;50(2):452-6.
254. Wang Y, Bikle DD, Chang W. Autocrine and Paracrine Actions of IGF-I Signaling in Skeletal Development. *Bone Res*. 2013;1(3):249-59.
255. Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, et al. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res*. 2007;22(9):1329-37.
256. Fulzele K, DiGirolamo DJ, Liu Z, Xu J, Messina JL, Clemens TL. Disruption of the insulin-like growth factor type 1 receptor in osteoblasts enhances insulin signaling and action. *J Biol Chem*. 2007;282(35):25649-58.
257. Hyun S. Body size regulation and insulin-like growth factor signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(13):2351-65.
258. Plotkin LI, Lezcano V, Thostenson J, Weinstein RS, Manolagas SC, Bellido T. Connexin 43 is required for the anti-apoptotic effect of bisphosphonates on osteocytes and osteoblasts in vivo. *J Bone Miner Res*. 2008;23(11):1712-21.
259. Koch FP, Yekta SS, Merkel C, Ziebart T, Smeets R. The impact of bisphosphonates on the osteoblast proliferation and Collagen gene expression in vitro. *Head Face Med*. 2010;6:12.
260. Grasemann C, Schundeln MM, Hovel M, Schweiger B, Bergmann C, Herrmann R, Wiczorek D, Zabel B, Wieland R, Hauffa BP (2013) Effects of RANK-ligand antibody (denosumab) treatment on bone turnover markers in a girl with juvenile Paget's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 8:3121–3126
261. Gossai N, Hilgers MV, Polgreen LE, Greengard EG (2015) Critical hypercalcemia following discontinuation of denosumab therapy for metastatic giant cell tumor of bone. *Pediatr Blood Cancer* (Epub ahead of print)
262. Setsu, Nokitaka, et al. "Severe hypercalcemia following denosumab treatment in a juvenile patient." *Journal of bone and mineral metabolism* 34 (2016): 118-122.
263. Papapoulos SE, Cremers SC (2007) Prolonged bisphosphonate release after treatment in children. *N Engl J Med* 10:1075–1076

264. Fizazi K, Carducci M, Smith M, et al. Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet*. 2011;377:813–822.
265. Henry DH, Costa L, Goldwasser F, et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2011;29:1125–1132.
266. Boikos SA, Hammers HJ. Denosumab for the treatment of bisphosphonate-refractory hypercalcemia. *J Clin Oncol*. 2012;30:e299.
267. Khoury N, Chang J, Gru AA, Whyte MP. Resorptive hypercalcemia in post-essential thrombocythemia myelofibrosis: treatment with denosumab. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:3051–3055.
268. Spångeus, A., Rydetun, J., & Woisetschläger, M. (2024). Prevalence of denosumab-induced hypocalcemia: a retrospective observational study of patients routinely monitored with ionized calcium post-injection. *Osteoporosis International*, 35(1), 173-180.
269. Makras P, Polyzos SA, Papatheodorou A, Kokkoris P, Chatzifotiadis D, Anastasilakis AD. Parathyroid hormone changes following denosumab treatment in postmenopausal osteoporosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):499-503.
270. Kostenuik, Paul J., et al. "Effects of denosumab, alendronate, or denosumab following alendronate on bone turnover, calcium homeostasis, bone mass and bone strength in ovariectomized cynomolgus monkeys." *Journal of Bone and Mineral Research* 30.4 (2015): 657-669.
271. Miyaoka, D., Inaba, M., Imanishi, Y., Hayashi, N., Ohara, M., Nagata, Y., ... & Emoto, M. (2019). Denosumab improves glomerular filtration rate in osteoporotic patients with normal kidney function by lowering serum phosphorus. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(11), 2028-2035.
272. Del Mar Morales Hernandez, M., Castellanos-Diaz, J., Kadiyala, S., & Xhikola, M. (2022). ODP085 Denosumab Induced Severe Hypophosphatemia. *Journal of the Endocrine Society*, 6(Supplement\_1), A161-A161.
273. Thongprayoon, C., Acharya, P., Acharya, C., Chenbhanich, J., Bathini, T., Boonpheng, B., ... & Cheungpasitporn, W. (2018). Hypocalcemia and bone mineral density changes following denosumab treatment in end-stage renal disease patients: a meta-analysis of observational studies. *Osteoporosis International*, 29, 1737-1745.
274. Kong, S. H., Kim, J. H., Kim, S. W., Jeong, A. J., Lee, S. H., Ye, S. K., & Shin, C. S. (2022). Effect of Denosumab on the change of osteoclast precursors compared to Zoledronate treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Bone Metabolism*, 29(2), 93.
275. Basso, F. G., Silveira Turrioni, A. P., Hebling, J., & de Souza Costa, C. A. (2013). Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. *Gerontology*, 59(6), 534-541.
276. Başaran, S., Benlidayı, İ. C., Akın, B., & Güzel, R. (2017). Bilateral Incomplete Atypical Femoral Fracture due to Long-Term Bisphosphonate Use: A Case Report. *Meandros Medical and Dental Journal*, 18(2), 139.
277. Nakamura Y, Uchiyama S, Kamimura M, Ikegami S, Komatsu M, Kato H. Increased Serum 25(OH)D3 Levels in Post-Menopausal Japanese Women with Osteoporosis after 3-Year Bisphosphonate Treatment. *Tohoku J Exp Med*. 2017;242(3):241–246.
278. Suzuki, T., Nakamura, Y., & Kato, H. (2018). Calcium and vitamin D supplementation with 3-year denosumab treatment is beneficial to enhance bone mineral density in postmenopausal patients with osteoporosis and rheumatoid arthritis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 15-22.
279. Augoulea A, Tsakonas E, Triantafyllopoulos I, et al. Comparative effects of denosumab or bisphosphonate treatment on bone mineral density and calcium metabolism in postmenopausal women. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2017;17(1):444–449.
280. Karga H, Giagourta I, Papaioannou G. Transient changes in thyroid functions tests after zoledronic acid infusion. *Endocr J*. 2011;58:969–77.
281. Nurmi-Lüthje, I., & Lüthje, P. (2022). Lessons learned from long-term side effects after zoledronic acid infusion following denosumab treatment: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, 16(1), 473.
282. Kumar S, Brar KS, Bansal N. Thyroid dysfunction with Zoledronic acid infusion for osteoporosis. Poster presentation. Society for Endocrinology BES 2021:77 LB 37 Edinburgh, United Kingdom 08 Nov 2021–10 Nov 2021.
283. Kim AS, Girgis CM, McDonald MM. Osteoclast Recycling and the Rebound Phenomenon Following Denosumab Discontinuation. *Curr Osteoporos Rep*. 2022;20(6):505-15.
284. Weinstein RS, Roberson PK, Manolagas SC. Giant osteoclast formation and long-term oral bisphosphonate therapy. *N Engl J Med*. 2009;360(1):53-62.

285. Huang XL, Huang LY, Cheng YT, Li F, Zhou Q, Wu C, et al. Zoledronic acid inhibits osteoclast differentiation and function through the regulation of NF- $\kappa$ B and JNK signalling pathways. *Int J Mol Med*. 2019;44(2):582-92.
286. Huang XL, Liu C, Shi XM, Cheng YT, Zhou Q, Li JP, et al. Zoledronic acid inhibits osteoclastogenesis and bone resorptive function by suppressing RANKL-mediated NF- $\kappa$ B and JNK and their downstream signalling pathways. *Mol Med Rep*. 2022;25(2).
287. Kimachi K, Kajiya H, Nakayama S, Ikebe T, Okabe K. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2011;383(3):297-308.
288. Kuroshima S, Go VA, Yamashita J. Increased numbers of nonattached osteoclasts after long-term zoledronic acid therapy in mice. *Endocrinology*. 2012;153(1):17-28.
289. Liverani C, Mercatali L, Spadazzi C et al (2014) CSF-1 blockade impairs breast cancer osteoclastogenic potential in co-culture systems. *Bone* 66:214–222
290. Shibuya, I., Takami, M., Miyamoto, A., Karakawa, A., Dezawa, A., Nakamura, S., & Kamijo, R. (2019). In vitro study of the effects of denosumab on giant cell tumor of bone: comparison with zoledronic acid. *Pathology & Oncology Research*, 25, 409-419.
291. Zhang N, Zhang ZK, Yu Y, Zhuo Z, Zhang G, Zhang BT. Pros and Cons of Denosumab Treatment for Osteoporosis and Implication for RANKL Aptamer Therapy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:325.
292. Jähn-Rickert K, Wölfel EM, Jobke B, Riedel C, Hellmich M, Werner M, et al. Elevated Bone Hardness Under Denosumab Treatment, With Persisting Lower Osteocyte Viability During Discontinuation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:250.
293. Milovanovic P, Zimmermann EA, Vom Scheidt A, Hoffmann B, Sarau G, Yorgan T, et al. The Formation of Calcified Nanospherites during Micropetrosis Represents a Unique Mineralization Mechanism in Aged Human Bone. *Small*. 2017;13(3).
294. Milovanovic P, Busse B. Phenomenon of osteocyte lacunar mineralization: indicator of former osteocyte death and a novel marker of impaired bone quality? *Endocr Connect*. 2020;9(4):R70-r80.
295. Rolvien T, Milovanovic P, Schmidt FN, von Kroge S, Wölfel EM, Krause M, et al. Long-Term Immobilization in Elderly Females Causes a Specific Pattern of Cortical Bone and Osteocyte Deterioration Different From Postmenopausal Osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2020;35(7):1343-51.
296. Busse B, Djonic D, Milovanovic P, Hahn M, Püschel K, Ritchie RO, et al. Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. *Aging Cell*. 2010;9(6):1065-75.
297. Biamonte F, Rao SD, Cipriani C, Pepe J, Biondi P, Minisola S. Multiple Vertebral Osteonecroses (Kümmell's Disease) After 10 Years on Denosumab: Is Osteocyte Apoptosis to Blame? More Evidence Needed. *Calcif Tissue Int*. 2018;103(1):109-10.
298. Maugars Y, Bart G, Guillot P, Chemel-Mary M, Glémarec J, Gahier-Penhoat M, et al. Multiple Vertebral Osteonecroses (Kümmell's Disease) After 10 Years on Denosumab: Is Osteocyte Apoptosis to Blame? *Calcif Tissue Int*. 2018;102(3):368-72.
299. Kim HH, Shin HS, Kwak HJ, Ahn KY, Kim JH, Lee HJ, et al. RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Faseb j*. 2003;17(14):2163-5.
300. Plotkin LI, Gortazar AR, Davis HM, Condon KW, Gabilondo H, Maycas M, et al. Inhibition of osteocyte apoptosis prevents the increase in osteocytic receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) but does not stop bone resorption or the loss of bone induced by unloading. *J Biol Chem*. 2015;290(31):18934-42.
301. Fu, Q., Bustamante-Gomez, N. C., Reyes-Pardo, H., Gubrij, I., Escalona-Vargas, D., Thostenson, J. D., ... & O'Brien, C. A. (2023). Reduced osteoprotegerin expression by osteocytes may contribute to rebound resorption after denosumab discontinuation. *JCI insight*, 8(18).
302. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J Bone Miner Res* 2006;21:605–15.
303. Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest* 1999;104:1363–74.
304. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/ osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006;39:443–52.
305. Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 2007;40: 1172–7.
306. Narayanan P. Denosumab: A comprehensive review. *South Asian J Cancer*. 2013;2(4):272-7.

307. Törring O. Effects of denosumab on bone density, mass and strength in women with postmenopausal osteoporosis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2015;7(3):88-102.
308. Gossiel F, Hoyle C, McCloskey EV, Naylor KE, Walsh J, Peel N, et al. The effect of bisphosphonate treatment on osteoclast precursor cells in postmenopausal osteoporosis: The TRIO study. *Bone.* 2016;92:94-9.
309. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res.* 1995;10(10):1478-87.
310. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P. THERAPY OF ENDOCRINE DISEASE: Denosumab vs bisphosphonates for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(1):R31-r45.
311. Wang, H. D., Boyce, A. M., Tsai, J. Y., Gafni, R. I., Farley, F. A., Kasa-Vubu, J. Z., ... & Collins, M. T. (2014). Effects of denosumab treatment and discontinuation on human growth plates. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(3), 891-897.
312. Jensen PR, Andersen TL, Chavassieux P, Roux JP, Delaisse JM. Bisphosphonates impair the onset of bone formation at remodeling sites. *Bone.* 2021;145:115850.
313. Omi M, Mishina Y. Role of osteoclasts in oral homeostasis and jawbone diseases. *Oral Sci Int.* 2020;18(1):14-27.
314. Bolamperti S, Villa I, Rubinacci A. Bone remodeling: an operational process ensuring survival and bone mechanical competence. *Bone Res.* 2022;10(1):48.
315. Hughes R, Chen X, Hunter KD, Hobbs JK, Holen I, Brown NJ. Bone marrow osteoprogenitors are depleted whereas osteoblasts are expanded independent of the osteogenic vasculature in response to zoledronic acid. *Faseb j.* 2019;33(11):12768-79.
316. Hu L, Yin C, Zhao F, Ali A, Ma J, Qian A. Mesenchymal Stem Cells: Cell Fate Decision to Osteoblast or Adipocyte and Application in Osteoporosis Treatment. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
317. Kitaura H, Marahleh A, Ohori F, Noguchi T, Shen WR, Qi J, et al. Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14).
318. Da W, Tao L, Zhu Y. The Role of Osteoclast Energy Metabolism in the Occurrence and Development of Osteoporosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021;12:675385.
319. Ponzoni, D., Fernandes, E. K., Silva, M. M. D., Souza, I. C. C. D., Neubert, J. K., & Quevedo, A. S. D. (2021). Effects of bisphosphonates on different zones of the epiphyseal growth plate of rats. *Research, society and development.* São Paulo. Vol. 10, no. 14 (2021), e518101422159, 11 p.
320. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:463-516.
321. Aiken A, Khokha R. Unraveling metalloproteinase function in skeletal biology and disease using genetically altered mice. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):121-32.
322. Lambrinoudaki I, Vlachou S, Galapi F, Papadimitriou D, Papadias K. Once-yearly zoledronic acid in the prevention of osteoporotic bone fractures in postmenopausal women. *Clin Interv Aging.* 2008;3(3):445-51.
323. Haider, M. T., Holen, I., Dear, T. N., Hunter, K., & Brown, H. K. (2014). Modifying the osteoblastic niche with zoledronic acid in vivo—Potential implications for breast cancer bone metastasis. *Bone*, 66, 240-250.
324. Gerstenfeld, L. C., Sacks, D. J., Pelis, M., Mason, Z. D., Graves, D. T., Barrero, M., ... & Einhorn, T. A. (2009). Comparison of effects of the bisphosphonate alendronate versus the RANKL inhibitor denosumab on murine fracture healing. *Journal of bone and mineral research*, 24(2), 196-208.

## EKLER

### EK-1.Etik Kurul Onayı



SAYI: HDK-2022/16  
KONU: ACU-HADYEK 2022/16 sayılı başvurunuz

11.02.2022

Sn. Prof. Dr. Celal ÇANDIRLI

ACU-HADYEK 2022/16 sayılı "Fibröz Displazisi olan Çocuk Hastalarda Tedavide kullanılan Denosumab ve Bifosfanatların Gelişim Çağındaki Ratlarda Büyüme Merkezlerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi" isimli projeniz Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 09.02.2022 tarihli 02. toplantısında incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

2022/16 sayılı karar ektedir.

Prof. Dr. Serap ARBAK

Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı



HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (ACU-HADYEK)  
KARAR FORMU

BAŞVURU TARİHİ: 09.02.2022	KARAR TARİHİ: 09.02.2022		
BAŞVURU SAYISI: 2022/16	KARAR SAYISI: 2022/16		
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Bölümünden Prof. Dr. Celal ÇANDIRLI'nın yürütücüsü olduğu "Fibröz Displazisi olan Çocuk Hastalarda Tedavide kullanılan Denosumab ve Bifosfanatların Gelişim Çağındaki Ratlarda Büyüme Merkezlerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi " isimli proje başvurusu ACU-HADYEK'in "09.02.2022" tarih ve "02" sayılı toplantısında görüşülmüş ve etik açıdan			
<input checked="" type="checkbox"/> Uygun <input type="checkbox"/> Düzeltilmesi Gerekir <input type="checkbox"/> Koşullu Olarak Uygun <input type="checkbox"/> Uygun Değil			
olarak değerlendirilmiştir.			
Kurul Üyesi	İmza	Karara Katılıyorum	Karara Katılmıyorum
Prof. Dr. Serap Arbak (Başkan)		( )	( )
Prof. Dr. Güldal Süyen (Başkan V.)		(X)	( )
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus		( )	( )
Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman		( )	( )
Prof. Dr. Halime KENAR		(X)	( )
Doç. Dr. Devrim Öz Arslan		( )	( )
Doç. Dr. Emel TİMUÇİN		(X)	( )
Dr. Öğr. Üyesi Elif KESKİNÖZ		(X)	( )
Dr. Öğr. Üyesi Melis YAVUZ		( )	( )
Dr. Öğr. Üyesi Gözde ARITICI ÇOLAK		(X)	( )
Dr. Öğr. Üyesi Perinur BOZAYKUT EKER		(X)	( )
Vet. Hek. Samed Özer		(X)	( )
Sabiha TURGUT GENÇ		( )	( )
İpek YÜKSEL		( )	( )



