



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

RADYOTERAPİYE BAĞLI EPİFİZ HASARININ ÖNLENMESİNDE
VİTAMİN D3'ÜN OLASI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. AYŞE KÖTEK

ADANA – 2012



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RADYASYON ONKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

RADYOTERAPİYE BAĞLI EPİFİZ HASARININ ÖNLENMESİNDE
VİTAMİN D3'ÜN OLASI ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞE KÖTEK

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ERKAN TOPKAN

ADANA – 2012

Bu tez (proje no: DA10/26) Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyasyon Onkolojisine araştırma görevlisi olarak başladığım günden bu yana bilgi ve deneyimlerinden yaralandığım ve uzmanlık tezimin tüm aşamalarında büyük destek ve katkısı olan tez danışmanım ve Anabilim Dalı Başkan'ım Sayın Doç. Dr. Erkan Topkan'a, dört yıllık eğitimim süresince bana sevgi ve desteklerini her zaman hissettiren, bundan sonraki tüm meslek hayatım boyunca temel olarak kullanacağım tüm bilgi ve becerileri kazanmamda emekleri geçen Prof. Dr. A. Aydın Yavuz'a, Prof. Dr. M. Nur Yavuz'a, Doç. Dr. H. Cem Önal'a, Yrd. Doç. Dr. Berrin Pehlivan'a, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını hiç esirgemeyen Öğr.Gör. Dr. Cem Parlak'a teşekkür ederim.

Araştırmamda bana değerli zamanlarını ayırıp katkıda bulunan deney hayvanları üretim araştırma merkezi sorumlusu Dr. Didem Bacanlı'ya ve Vet. Hek. Zeynep Yazıcıoğlu'na, Farmakoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ş. Remzi Erdem'e, Biyoistatistik uzmanı Çağla Sarıtürk'e teşekkür ederim.

Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık eğitimim sırasında sağladıkları geniş imkânlardan dolayı Kurucu Rektörümüz Sayın. Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, Rektörümüz Sayın. Prof. Dr. Kenan Araz'a teşekkür ederim.

Radyasyon Onkolojisi Uzmanlık eğitimim sırasında ve bu çalışmanın gerçekleşmesinde sağladıkları geniş imkânlardan dolayı Adana Uygulama ve Araştırma Hastanesi Merkez Müdürü Sayın Yrd. Doç. Dr. Turgut Noyan'a teşekkür ederim.

Asistanlığım boyunca birlikte çalışma olanağı bulduğum asistan arkadaşlarıma ve radyasyon onkolojisi kliniğinde bulunan bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi desteklerini esirgemeyen aileme, bu zorlu dönemimde beni yalnız bırakmayan ve varlığı ile bana güç veren nişanlım Ali Rıza Serin'e sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ayşe KÖTEK

Şubat-2012

ÖZET

Vitamin D3 kemik mineralizasyonunu, osteoblastik aktiviteyi ve longitudinal kemik büyümesini arttıran bir büyüme faktörüdür. Bu çalışmada radyoterapi (RT) öncesinde uygulanan vitamin D3'ün, RT'ye bağlı epifiz hasarını azaltıcı etkisinin olup olmadığı hayvan modelinde araştırılmıştır.

Çalışmada her biri 7 adet, 6 haftalık Sprague-Dawley türü erkek ratlar dört gruba ayrılmıştır: Birinci grubu kontrol hayvanları, üçüncü grubu vitamin D3 kontrol grubu oluşturmuştur. İkinci ve dördüncü gruptaki ratların sol distal femur ve proksimal tibia bölgesine 24 Gy (8 Gy/gün) RT uygulanmıştır. Sağ bacak korunarak kontrol olarak değerlendirmeye alındı. Dördüncü gruptaki ratlara RT'den bir gün önce intramüsküler (i.m.) 50000 IU/kg vitamin D3 ve ikinci gruptaki ratlara yalnızca i.m. 50000 IU/kg vitamin D3 uygulandı. Kemik büyümesi tedaviden 6 hafta sonra toplam bacak, femur ve tibia uzunluğuna göre hesaplanmıştır.

Yalnızca RT 56.2 ± 6.7 toplam bacakta büyüme kaybına ve 12.7 ± 1.3 toplam bacak uzunluk farkına neden oldu. RT + vitamin D3 tedavisi verilen grupta toplam bacak büyüme kaybı ve toplam bacak uzunluk farkı sırasıyla 28.5 ± 5.6 ve 4.4 ± 3.03 değerlerindedir. Bu farklar yalnızca RT grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.001$, her biri için).

Sonuç olarak bu çalışma vitamin D3'ün RT'ye bağlı epifiz plağı hasarını önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Vitamin D3, radyoterapi, rat, epifiz hasarı, radyoprotektan.

ABSTRACT

Role of Vitamin D3 in Prevention of Radiotherapy-Induced Epiphyseal Injury

Vitamin D3 is a growth factor improving bone mineralization, and regulating osteoblastic activity and longitudinal bone growth. In this study, impact of vitamin D3 supplementation administered prior to fractionated RT in reducing RT-induced epiphyseal injury is investigated.

Six week old male Sprague-Dawley rats were enrolled to one of the four groups: Group 1 was assigned as control group (n=7); Group 2 received fractionated RT alone; Group 3 received 50000 IU/kg i.m. vitamin D3 injection alone; and Group 4 received 50000 IU/kg i.m. vitamin D3 injection prior to fractionated RT. Fractionated RT in the irradiated groups was delivered to distal femur and proximal tibia in the left legs of each rats to a total dose of 24 Gy in 3 fractions with the contralateral right leg as the non-irradiated control. Vitamin D3 injection in Group 3 was performed on the day before the RT. Bone growth was calculated according to the lengths of femur, tibia and total leg measured on the radiographs taken at the time and 6 weeks after the delivery of RT.

RT resulted in a mean percent overall limb growth loss of $56.2\% \pm 6.7\%$ and a mean percent overall limb discrepancy of $12.7\% \pm 1.3\%$. Administration of 50000 IU/kg i.m. vitamin D3 before RT reduced the mean percent overall limb growth loss and the mean percent overall limb discrepancy to $28.5\% \pm 5.6\%$ and $4.4\% \pm 3.3\%$, respectively. These values were significantly different compared with the groups receiving irradiation alone (P=0.001 for each).

In conclusion, these result demonstrated the potential for vitamin D3 administered before fractionated RT to significantly reduce the RT-induced epiphyseal injury.

Key words: Vitamin D3, radiotherapy, rat, epiphyseal injury, radioprotection.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Normal Kemik Dokusu ve Gelişimi	3
2.1.1. Periyost ve Endosteum	4
2.1.2. Kemik Türleri	4
2.1.3. Kemik Hücreleri	6
2.1.4. Kemiğin Yapılanması (Modelling).....	8
2.1.5. Kemiğin Yeniden Yapılanması (Remodeling)	12
2.2. Radyasyonun Kemik Doku Üzerine Etkileri	14
2.3. Radyasyon Hasarının Önlenmesi.....	18
2.4. Radyoterapiye bağlı epifiz hasarını önlemeyi amaçlayan çalışmalar	22
2.5. Vitamin D	23
2.5.1. Klasik D vitamini Duyarlı Dokular	27
2.5.1.1. Bağırsaklar	27
2.5.1.2. İskelet Sistemi.....	29
2.5.1.3. Paratiroid Bezler.	33
2.5.1.4. Böbrek.....	33
2.5.2. Vitamin D'nin Klasik Olmayan Etkileri.....	33
2.5.2.1. Vitamin D ve Kanser	33
2.5.2.2. Vitamin D ve Kemoteropötikler.	34
2.5.2.3. Vitamin D ve Radyoterapi.	34
2.5.2.4. Vitamin D ve İmmun Sistem.	35
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	36
3.1. Çalışma grupları ve deney	36
3.2. Bacak uzunluklarının ölçülmesi.....	37

3.3. Kemik büyümesinin değerlendirilmesi	38
3.4. İstatistiksel Analiz.....	38
4. SONUÇLAR.....	39
4.1. Gerçek uzunluk ölçümleri.....	40
4.2. Fraksiyone RT sonrası büyüme kaybı	40
4.3. Ortalama yüzde toplam bacak uzunluk farkı analizi	41
4.4. İyileştirilmiş büyüme kaybı analizi.....	41
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR.....	47



ŞEKİLLER ve TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.2.	Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik görünüm.....	6
Şekil 2.1.4a.	Kıkırdak model üzerinde bir uzun kemiğin meydana gelişi.....	10
Şekil 2.1.4b.	Tipik büyüme plağı yapısı ve vasküler beslenmesi.....	12
Şekil 2.2.	Kemikte radyasyona bağlı hasar patogenezindeki gelişen bir dizi olaylar.....	18
Şekil 2.5.	Vitamin D2 ve D3'ün moleküler yapısı	24
Şekil 2.5.1.2a	D vitamini metabolizması ve 1,25 (OH)2D'nin, kalsiyum, fosfor ve kemik metabolizması üzerinde çeşitli biyolojik etkileri .	28
Şekil 2.5.1.2b	Kondrositlerde genomik 1,25(OH)2D sinyalinin direkt rolü	31
Şekil 3.2.	Dijital görüntü üzerinde bacak uzunluklarının ölçülmesi	37
Şekil 4.2.	Tedavi grubuna göre normal femur, tibia ve toplam bacakta büyümede yüzde azalma olarak radyasyona bağlı büyüme kaybı	40
Şekil 4.3.	Tedavi grubuna göre normal femur, tibia ve toplam bacakta büyümede yüzde azalma olarak radyasyona bağlı bacak uzunluk farkı	41
Tablo 2.1.5.	Kemik formasyonunu ve rezorpsiyonunu etkileyen faktörler.....	14
Tablo 2.2.	Tedavi parametreleri: Tolerans dozları	15
Tablo 4.	Her bir grup için kilo artışı ve femur, tibia ve toplam bacak büyüme verileri	39

KISALTMALAR LİSTESİ

ALP:	Alkalen fosfataz
GB:	Gerçek büyüme
BKY:	Büyüme kaybı yüzdesi
BUFY:	Bacak uzunluk farklılık yüzdesi
DBP:	D vitamini bağlayıcı protein
7 DHC:	7 Dehidrokolesterol
DVYE:	D vitamini yanıt elemanları
EH:	Endotel hücresi
Gy:	Gray
cGy:	Centigray
IU:	Uluslararası birim
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL:	İnterlökin
İBKY:	İyileştirilmiş büyüme kaybı yüzdesi
i.m.	İntramüsküler
i.p.	İntraperitoneal
KT:	Kemoterapi
OBH:	Osteoblast benzeri hücre
OPG:	Osteoprotogerin
PGE:	Prostoglandin E
PTH:	Paratiroid hormon
PTHrP:	Paratiroid hormon ilişkili protein
RANK:	NFkB reseptör aktivatörü
RANKL:	NFkB ligand reseptör aktivatörü
RT:	Radyoterapi
TD:	Tolerans doz
TGF- β :	Transforme edici büyüme faktörü beta
TNF- α :	Tümör nekroz faktör alfa
TR:	Terapötik oran
VEGF:	Vasküler endotel büyüme faktörü
VDR:	Vitamin D reseptörü

1.GİRİŞ

Çocukluk çağı kanserlerinde, çoklu ilaç tedavi ilkelerinin gelişmesi, operasyon tekniklerinin ve RT'nin iyileşmesi ve sağ kalımdaki gelişmeler daha fazla sayıda kanserli çocuğun erişkin yaşa ulaşmasına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak yaşam süresi uzamış kişilerde hastalığın kendisine ve tedavisine bağlı geç etkilerle karşılaşılmaya başlanmıştır. Çocukluk çağında iskelet ve yumuşak doku sarkomları için etkili bir tedavi olan RT, radyasyona bağlı epifiz plağının hasarına bağlı olarak iskelet sisteminde şekil bozukluğu, kısalık ve asimetri gibi kemik büyümesi üzerinde olumsuz etkiye neden olabilir ve bu da güvenli olarak uygulanabilecek radyasyon miktarını sınırlandırabilir.

Kanser tedavisinin başarısı terapötik oran ile ilişkilidir. Terapötik oran, tümör hücrelerinde antitümör etki oluşturan dozun, normal dokuda aynı miktarda hasar yaratan doza oranını ifade eder. Terapötik oranı iki şekilde artırmak mümkündür: a) Tümör hücrelerinin tedaviye duyarlılığını artırmak, b) Normal dokular üzerindeki olumsuz etkiyi azaltmak.

RT'nin epifiz plağı üzerinde oluşturduğu hasarı azaltmak için doz fraksinasyonu, hiperfraksinasyon ve radyoprotektan ajan kullanımı önerilen stratejilerdir. Yapılan çalışmalar hiperfraksinasyonun standart fraksinasyondan daha etkin şekilde kemik büyüme kaybını önlediğini göstermiştir. Ancak küçük çocuklarda bu yöntemin klinikte kullanımı çok sayıda anestetik sedasyon gerektirdiği için sınırlıdır. Fraksiyone RT öncesinde proflaktik radyoprotektan kullanımı alternatif bir yöntemdir. Preklinik çalışmalarda amifostin ve melatonin gibi radyoprotektanların kemik büyüme geriliğini tamamen olmasada önemli şekilde azalttıkları gösterilmiştir.

RT'den sonra vasküler değişiklikler, hücresel değişiklikler gibi birçok faktör büyüme plağındaki değişikliklerin patogeneğinde birlikte rol oynayabilir. Kondrositlerin ve osteoblastların hücresel ölümü ve sitolojik değişiklikleri, damarsal yapılardaki hasar ve kanlanmanın azalması büyüme kaybı ile sonuçlanabilir.

Vitamin D3, normal kemik gelişimi, kalsiyum-fosfor homeostazısı ve mineralizasyon için varlığına zorunlu ihtiyaç duyulan bir vitamindir. Endokondral kemik gelişimi sırasında otokrin ve parakrin rol oynamakta ve boyuna kemik büyümesine katkı sağlamaktadır. Büyüme plağı kondrositlerinde büyüme, farklılaşma ve fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Osteoblast gen transkripsiyonu, çoğalması, farklılaşması ve mineralizasyonu düzenlediği gösterilmiştir. Kondrositlerde vasküler invazyon zamanında ve osteoblastlarda vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF)

ekpresyonunu artırarak neoangiogenezi arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkiler vitamin D3'ün büyüme plağında radyasyonun oluşturduğu hasarı azaltabileceğini ve oluşan hasarın onarımı için gerekli kan akımının sağlanmasında yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bir büyüme faktörü olan vitamin D3, büyüme aktivasyonu yoluyla radyasyona bağlı hasar sonrası kemik ve kıkırdak dokunun korunmasında ve büyümenin pozitif yönde indükleyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca vitamin D3'ün meme, prostat, mesane, akciğer, kolon, endometrium, böbrek, over, pankreas, kemik ve beyin karsinomalarında, yumuşak doku sarkomlarında, nöroblastom ve myeloid lösemi hücrelerinde antineoplastik etkisinin olduğu bildirilmiştir. Bu etki, hücre çoğalmasının baskılanması, hücre farklılaşmasının ve apoptozisin artması ve anjiogenez inhibisyonu gibi mekanizmalarla olmaktadır. Prostat kanser hücrelerinde iyonizan radyasyon ve vitamin D3'ün sinerjistik etkisi olduğu, meme kanseri hücre kültüründe RT ile Vitamin D3'ün etkisinin birbirine eklendiği ve apoptozisi artırdığı gösterilmiştir. İnsan normal fibroblast hücre kültüründe ise RT'ye ek etkisinin olmadığı, apoptozisi artırmadığı bulunmuştur. Bu bulgular vitamin D3'ün kanser hücrelerinin radyasyona duyarlılığını artırırken normal hücrelerde koruma sağlayabileceğini, bu şekilde terapötik oranı artırabileceğini telkin etmektedir.

Bu çalışmada epifiz plağı ışınlanması yapılan ratlarda profilaktik olarak verilen vitamin D3 tedavisinin radyasyona bağlı büyüme kaybını azaltıp azaltmadığı incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Normal Kemik Dokusu ve Gelişimi

Kemik, mineralize kollajen çatısı olan özelleşmiş canlı ve dinamik bir bağ dokusudur. Ana görevi vücut için mekanik destek sağlamak, beyin ve spinal kord gibi önemli yapıları korumak, başta kalsiyum olmak üzere birçok mineral için depo görevi görmektir. Ayrıca hematopoezde ve immün sistem fonksiyonlarında da görev almaktadır (1, 2).

Kemik; tipi ve bölgesine göre değişen içeriği hücreler, damarlar ve kalsiyum bileşiği kristallerinden (hidroksiapatit: $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$) oluşan gözenekli mineralize bir dokudur. İskelet oluşumunu sağlayan hücresel farklılaşma süreci genetik bir süreç ile düzenlenir. Bu süreç, iskelet yapısının öncelikle kıkırdak ve mezenkim formunda oluşması, sonrasında hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasıyla devam eder (2, 3).

Ekstrasellüler matriks (büyük kısmı mineralize), kollajen ve hücreler kemiği oluşturan yapısal parçalardır (organik ve inorganik materyaller). Ağırlığının %70'ini mineraller veya inorganik madde, %5-8'ini su, geriye kalanını da organik veya ekstrasellüler matriks oluşturur (2).

Organik matriksin %98'ini Tip 1 kollajen ve non kollajenoz proteinler, %2'sini ise kemik hücreleri oluşturur. Organik matriks kemiğin mekanik ve biyokimyasal özelliklerinin belirleyicisidir. Büyüme faktörleri, sitokinler, osteopontin, osteonektin, osteokalsin, kemik sialoprotein, trombospondin, proteoglikan gibi ekstrasellüler matriks proteinleri, fosfoproteinler ve fosfolipidler total kemik hacminin çok az bir kısmını oluştururken, kemiğin biyolojik fonksiyonun da önemli rol oynamaktadır (4, 5). Osteokalsin düzeyi kemik yapım ve yıkım olaylarının bir göstergesi olup paratiroid hormon (PTH) tarafından inhibe ve 1-25 dihidroksivitamin D tarafından aktive edilir. Kollajen çok düşük çözünürlüğe sahip, her biri 1000 aminoasitten oluşan 3 polipeptid zincirinden oluşmuştur ve kemik matriksinin en önemli bileşenidir. Deri ve tendonlardaki tip 1 kollajenden farklı olarak kemikteki tip 1 kollajen mineralize olabilme kapasitesine sahiptir.

Inorganik yapının %95'i kalsiyum hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Temel olarak kalsiyum, fosfat, az miktarda bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum içerir. Hidroksiapatit kristalleri tip 1 kollajen boyunca belli bir düzende yerleşmişlerdir. Vücudun en sert ve sağlam dokusu olan kemiğin bu özelliği, hidroksiapatit kristalleri ile kollajen arasındaki ilişkiye bağlıdır (1).

2.1.1 Periyost ve Endosteum

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri, periyost ve endosteum diye adlandırılan, tabakalar halinde, kemik yapan hücreler ve bağ dokusu ile örtülüdür (6). Periyost; kollojen lif ve fibroblastlardan oluşan dış tabakaya sahiptir. Sharpey lifleri adı verilen kollojen lif demetleri, matriks içine girerek periyostu kemiğe bağlar. Periyostun içteki, hücrelerden daha zengin tabakasında osteoprogenitör hücreler bulunmaktadır. Periosteumdaki kan ve lenf damarları kemik dokunun beslenmesinde önemli bir rol oynar. Endosteum; kemik içindeki bütün boşlukları örter ve tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitör hücreler ile çok az miktardaki bağ dokusundan oluşur. Kemik dokunun beslenmesi ve devamlı olarak yeni osteoblast sağlanarak büyümesi ve onarımı bu iki membranın temel işlevleridir (6, 7).

2.1.2. Kemik Türleri

Anatomik olarak iskelette yassı (kafa kemikleri, skapula, mandibula ve ileum) ve uzun kemikler (tibia, femur, humerus) bulunur. Bu kemikler temelde sırasıyla intramembranoz ve endokondral yolla gelişir. Ancak uzun kemiklerin gelişiminde, her iki tip kemikleşme de rol oynar (8).

İskeleti oluşturan kemikler, aksiyal ve appendikuler iskelet sistemi diye iki sisteme ayrılır. Aksiyal sistemi kafatası kemikleri, vertebralar, kotlar ve sternum oluşturur. Appendikuler sistemi ise ekstremiteler, skapula, klavikula ve pelvis oluşturur. (7).

Mikroskopik olarak 2 tür kemik vardır: Birincil, olgunlaşmamış veya örgü kemik ile ikincil, yetişkin veya lamelli kemik. Birincil kemik; embriyolojik gelişim sırasında veya kırıkların onarımı sırasında görülmekle birlikte geçici bir kemik türüdür. Lameller yapı göstermez ve kollajen lifleri rastgele dizilmiştir. Kafatası yassı kemikleri, dış alveoller, tendonların kemiğe yapıştığı yerler dışındaki primer kemik dokusu, sekonder kemik ile değiştirilir (6). İkincil kemik; genellikle yetişkinlerde bulunan olgun kemik dokudur.

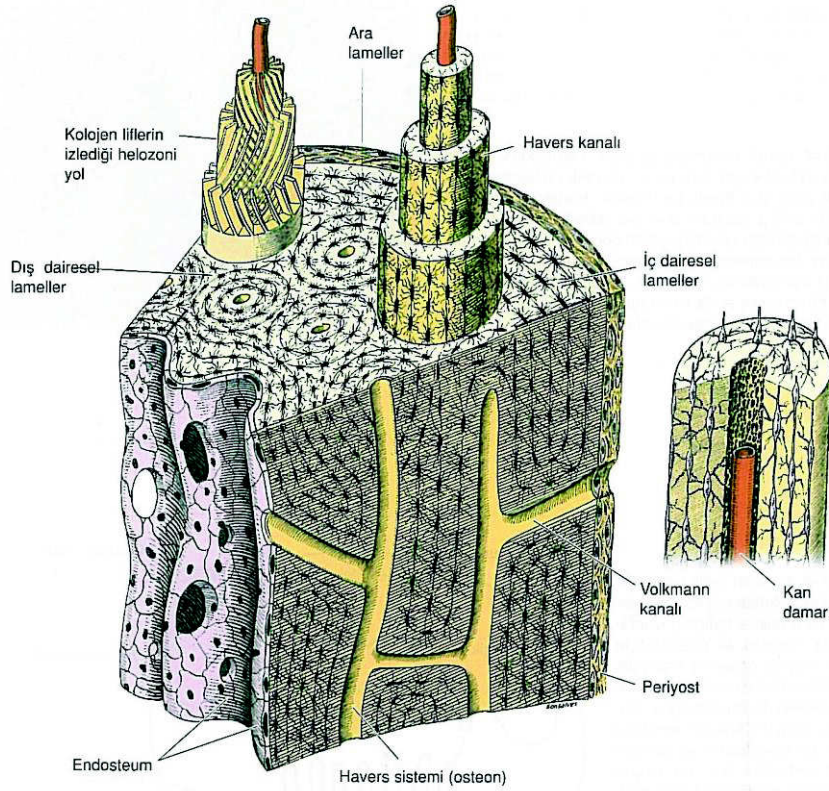
Makroskopik olarak ikincil kemiğin dış kısmına kortikal veya kompakt kemik, iç kısmına ise trabeküler, spongiyöz veya kanselloz kemik denir (6, 9). Bu iki çeşit kemik tipinin makroskopik ve mikroskopik yapıları farklıdır ancak kimyasal içerikleri aynıdır. Kortikal kemik esas olarak mekanik ve koruyucu bir fonksiyon üstlenirken, trabeküler kemik ise metabolik fonksiyondan sorumludur. İskeletin %80'ini kortikal kemik, %20'sini ise trabeküler kemik oluşturur.

Kortikal veya kompakt kemik, başlıca appendikuler iskelet sisteminde hakimdir. Kortikal kemikte, yüzeyin hacme oranı düşüktür. Bu tip kemiklerdeki kemik hücreleri olan osteositler pasiftir. Hücreler lakuna içinde uzanırlar ve besin maddelerini kortikal kemiğin

içini kaplayan kanalcıklar aracılığı ile alırlar (2, 7). Kortikal kemik; Havers sistemleri veya osteon olarak adlandırılan silindir şeklindeki birimlerin biraraya gelmesiyle oluşmuştur. Osteonu oluşturan yapılar, Havers kanalı olarak bilinen nörovasküler kanal ve bu kanalı konsantrik olarak çevreleyen kemik lamelleridir. Osteosit içeren lakünalar, lamellerin arasında ve nadiren içlerinde bulunur. Kortikal kemiğin esas yapısal birimi olan osteonlar kemiğin uzun eksenini boyunca uzanır ve Volkman kanalları adı verilen yan dallar ile kemik iliği boşluğu, periyost ve birbirleriyle ilişkilidir. Osteonlar amorf madde çökeltisinden oluşan "sement" çizgileri ile birbirlerinden ayrılır (6, 9, 10) (Şekil 2.1.2).

Vertebra korpusu, uzun kemiklerin epifiz ve metafizleri trabeküler kemik yapısındadır. Trabeküler kemik normalde yatay ve dikey trabeküler plakların oluşturduğu bal peteği görünümündedir. Bu kısım kemik iliği ile doludur. Trabeküller stres çizgileri boyunca yerleşerek vertebra, kalça ve topukta karakteristik trabekül dizilimlerini oluştururlar. Trabeküler kemik, kompresif güçlere karşı kemiğin direncini arttıracak biçimde düzenlenmiştir. Ayrıca akut mineral eksikliklerinde temel mineral kaynağını oluşturur. (2, 16). Yüzey/hacim oranı trabeküler kemikte, kortikal kemikten daha fazladır. Kemik döngüsü yüzeye bağımlı olduğundan, erişkinde trabeküler kemikte remodeling (yeniden yapılanma) kortikal kemiğe oranla 5-10 kat daha fazla olmaktadır (1).

Uzun kemiklerin şişkince olan uç kısımlarına epifiz denir. Epifizler ince bir kompakt kemik tabakasıyla kaplanmış süngerimsi kemikten oluşmuştur. Diafiz adı verilen silindirik kısmın hemen hemen tümü kompakt kemikten yapıldır ve kemik iliği boşluğuna bakan yüzeylerinde çok az süngerimsi kemik vardır. Çoğu kez kısa kemiklerin merkezlerindeki süngerimsi kemik, kompakt kemikle çevrelenmiştir. Kafatası kemiklerini oluşturan yassı kemikler, diploe adı verilen süngerimsi kemik tabakasıyla ayrılan iki kompakt kemik tabakasına sahiptir. Süngerimsi kemikle uzun kemiklerin diafizlerindeki kemik boşlukları iki tür kemik iliği ile doldurulmuştur. Bunlardan biri, kan hücrelerinin oluşturduğu kırmızı kemik iliği, diğeri ise çoğunluğu yağ hücrelerinden oluşan sarı kemik iliğidir (6).



Şekil 2.1.2. Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik görünümü (Jungueira, 1992)

2.1.3. Kemik Hücreleri

Kemik dokuda, osteoprogenitör hücre, osteoblast, osteosit, osteoklast olmak üzere dört tip hücre vardır.

1. Osteoprogenitör hücreler: mezenşimal kök hücrelerden kaynaklanır. Periosteumun iç kısmında, endosteumda, Havers kanalları çevresinde, epifiz plağının yüzeyinde yer alan değişkenliğe uğramış osteojenik potansiyel kazanmış kemik hücreleridir. Bu hücreler, soluk boyanan oval çekirdekli, soluk sitoplazmalı ve yassı şekillidirler. Ayrıca kemik gelişimi ve doku iyileşmesinde aktif rol alırlar ve bölünüp çoğalarak, osteoblast ve osteoklastlara dönüşürler.

2. Osteoblastlar: kemik formasyonu ve mineralizasyonundan sorumlu olan hücrelerdir. Ayrıca, inorganik maddelerin kemiğe yerleşmesi için de osteoblastlara ihtiyaç vardır. Osteoblastlar hücre dışı sıvısı ve kemik yüzeyi arasındaki mineral iyonlarının hareketini hızlandırır. Bu hücreler adiposit, kondrosit, miyoblast ya da fibroblasta dönüşebilen mezenkimal kök hücrelerden köken almaktadırlar (2, 11). Osteoblastlar, komşu hücrelerle temas eden ve matris oluştuğunda belirginleşen sitoplazmik uzantılara sahip, büyük ve yuvarlak çekirdekli, ökromatik ve belirgin nükleoluslu hücrelerdir. Sentez döneminde koyu bazofil boyanan kübik biçimli ve sentez azalınca da yassılaştıran

hücrelerdir. Matriks üretimi periyodu sonuna doğru, osteoblastların %15'i üretilen matriks içine hapis olur ve osteosite farklılaşmasına rağmen bazı hücreler kemik yüzeyinde kalır ve düz sıra hücreler haline gelerek kemik yüzeyini örten hücreleri meydana getirirler. Osteoblastlar tarafından sentezlenen matriks elemanları; Kollajen (Tip 1), alkalen fosfataz (ALP), osteokalsin, kemik sialoproteini, osteopontin, proteoglikanlar, sitokinler ve büyüme faktörleridir. Aynı zamanda çeşitli nötral proteinazları salgılayarak kemik rezorbsiyonunu başlatırlar. Proteazlar yüzeyel osteoid dokuyu ortadan kaldırdıktan sonra, osteoklastlar kemik rezorbsiyonunda görev alırlar. Osteoblastlar, kemik metabolizmasında rol alan mediatörler için reseptörlere sahip olduklarından kemik döngüsünde önemli role sahiptirler. Osteoblastlar üzerinde yer alan reseptörler paratiroid hormon (PTH), paratiroid hormon ilişkili protein (PTHrP), östrojen, androjen, progesteron, büyüme hormonu, glukokortikoid, 1,25(OH)₂Vitamin D₃, insülin, prostanoidler, prolaktin, retinoidler, insülin benzeri büyüme faktörleri 1 ve 2 (IGF-1- 2), TGF-β (transforme edici büyüme faktörü beta), TNF-α (tümör nekroz faktör alfa), interlökin (IL)-1, 3, 4, 8, 11, endotelin ve nitrik oksittir (12, 13, 16). Osteoblast aktivitesi, hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanan parakrin ve otokrin büyüme faktörleri ile düzenlenir.

3. Osteositler: kemiğin esas hücreleri olup, osteoblastların mineralize matriks içinde kalıp, fonksiyonlarının ve morfolojik özelliklerinin değişmesiyle meydana gelirler. Osteoblastların osteositlere farklılaşması esnasında, protein sentezi aktivitesi belirgin olarak azalır ve hücrelerde çok sayıda protoplazmik uzantılar gelişir. Bu uzantılar kemik dokusundaki lakünalar boyunca osteon içindeki diğer osteositlerin uzantıları ve yüzey osteoblastlarının uzantıları ile bağlantı oluştururlar. Bu sayede kemik doku içindeki madde transferi sağlanır (7). Kemikte en fazla sayıya sahip olan osteositlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber mekanik uyarıların diğer hücrelere iletiminde görev aldıkları düşünülmektedir. Osteositler (muhtemelen), kemikte yeniden yapılanma ihtiyacı olan bölgeye osteoklastların yönelimini sağlayarak kemiğin yeniden yapılanmasının sağlanmasında ve kemik dokusu gerimine yanıt oluşturmada görev almaktadır (14). Osteositler PTH, 1,25(OH)₂ vitamin D'ye cevap verebilmektedirler. Osteoblastlara benzer şekilde kalsiyum regulasyonunda anlamlı bir rol oynayıp oynamadıkları açık değildir (7).

4. Osteoklastlar: hematopoetik mononükleer hücrelerden menşе alan, çapları 100 mm'ye ulaşabilen, çok nükleuslu, hareket edebilen, kemik rezorbe edici dev hücrelerdir. Tartrat-rezistan asit fosfataz, kollajenaz ve katepsin-K içeren lizozomal enzimlerden zengindir ve bu enzimler aracılığıyla kemik matriksini rezorbe ederler. Osteoklastlar; integrinler, osteopontin, kemik sialoprotein, trombospondin, osteonektin ve tip 1 kollajen

aracılığıyla kemik yüzeyine bağlanarak rezorbsiyonda rol alırlar. Trabeküler kemikte Howship lakünası adı verilen ve yeniden yapılanan yüzeylerde görülen rezorbtif kaviteleri oluştururlar. Kortikal kemikte ise ‘cutting cone’ bölgesinin apeksinde bulunurlar (15, 16). Morfolojik olarak en karakteristik özellikleri kıvrımlı hücre kenarları ve parmak şeklinde membran çıkıntılarınıdır. Bu şekilleri kemik rezorbsiyon işlevlerini kolaylaştırır. Osteoklastlar, kemik rezorbsiyonunu; kemik matriksi asidifikasyonu ve proteolizi ile, hidroksiapatit kristallerini ise hücre içine, kapsüle olarak alarak yaparlar. Kemik matriks rezorbsiyonunda ilk süreç, hidroksiapatit kristallerinin kollajen bağlantılarının sindirilmesiyle serbest hale gelmesidir. Sonrasında arta kalan kollajen kalıntıları katepsin ya da aktive kollajenazlar tarafından sindirilir. Sindirim sonrası oluşan kalıntılar hücre içine alınır ya da hücre boyunca taşınması sağlanarak hücrenin bazolateraline salınır. Osteoklast fonksiyonu hem lokal etkili sitokinler hem de sistemik hormonlar tarafından düzenlenir. Osteoklastlarda kalsitonin, IGF-1, androjenler, insülin, tiroid hormonu, PTH, IL-1 reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir (16).

2.1.4.Kemiğin Yapılanması (Modeling)

Kemik yıkım ve yapımı hayat boyunca devam eder. İskelet dokusunun büyümesi sürecinde bu işlemler daha hızlı oluşur. Büyüme, metabolik aktivitenin daha çok yapım tarafında kalmasının sonucudur. Buna kemiğin yapılanması (modeling) denir (7).

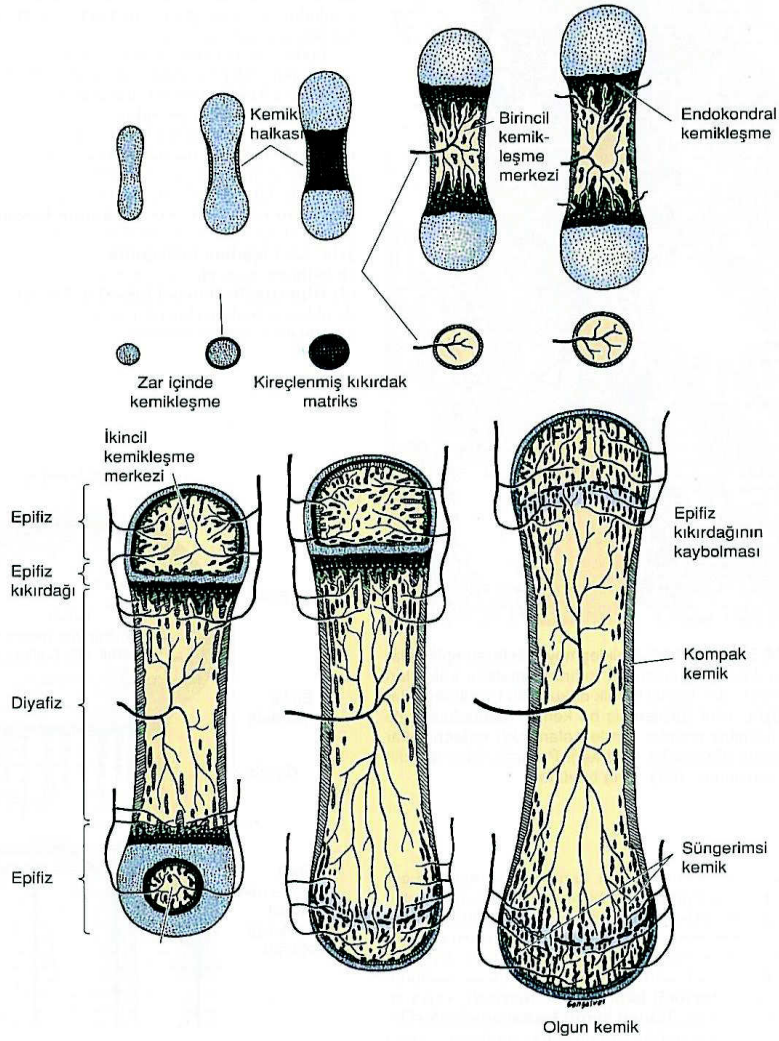
Kemik iki yolla şekillenir; osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile (intramembranöz kemikleşme) veya daha önce var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çöküşü ile (enkondral kemikleşme). Her iki kemikleşme şeklinde de, ilk olarak ortaya çıkan kemik dokusu, primer veya olgunlaşmamış kemik dokusudur (6).

Yassı kemiklerin oluşumu, kısa kemiklerin büyümesi ve uzun kemiklerin kalınlaşması intramembranöz kemikleşme ile gerçekleşir. Mezankimal doku yoğunlaşmaları içinde ossifikasyonun başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Olay bir grup mezankimal hücrenin osteoblasta dönüşmesi ile başlar. Yeni kemik matriksinin oluşmasını, kalsifikasyon süreci takip eder. Bazı osteoblastların etrafları sarılarak osteosit haline gelmeleri sağlanır. Gelişen bu kemik adacıkları kılcal kan damarları, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreleri içeren uzamış boşlukların duvarlarını oluşturur. Böyle birkaç grup kemikleşme merkezinde hemen hemen aynı zamanlarda ortaya çıkar, bunların duvarları kaynaştığında kemik süngerimsi yapıya kavuşur. Büyüyen kan damarları ve ek farklılaşmamış mezenkim hücreleri, kemik

duvarları arasında kalan bağ dokusu içine girerek kemik iliği hücrelerini ortaya çıkarır. Kalsifiye olmayan çevre mezenkim periosteum ve endosteuma dönüşür (6).

Enkondral kemikleşme, meydana getirilecek kemiğin şeklinin hiyalin kıkırdaktan oluşmuş küçük bir modeli ile oluşması olarak tarif edilebilir. Bu kemikleşme türü kısa ve uzun kemiklerin şekillenmesinden sorumludur (Şekil 2.1.4a.). Bir uzun kemiğin enkondral kemikleşme ile meydana gelişinde şu olaylar birbirini izler. Başlangıçta ilk beliren kemik dokusu kıkırdak modelin orta kısmını saran içi boş kemik silindiridir. Kemik halkası adı verilen bu yapı, o bölgedeki perikondriumun içinde intramembranöz kemikleşme ile meydana getirilir. Bu bölgedeki kıkırdak, kondrosit hücre büyümesi (hipertrofi) ve matriks kireçlenmesi gibi programlanmış hücre ölümleri ile yıkım sürecine girer, sonuçta kireçlenmiş kıkırdak matriksinden oluşan 3 boyutlu yapı açığa çıkar. Bu süreç, kıkırdak modelin merkezinde (diyafiz) bir süre önce osteoklastlar tarafından kemik halkasında açılan delikten, kan damarlarının içeri girdiği bölgeden, osteoprogenitör hücrelerine taşıyarak başlar. Bu hücreler proliferasyon olarak osteoblastları oluştururlar. Daha sonra, osteoblastlar kireçlenmiş kemik matriksine yapışır ve devamlı birincil kemik tabakalarını yaparak kıkırdağımsı kireçlenmiş matriksi sararlar. Bu şekilde birincil kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Sonra ikincil kemikleşme merkezleri kıkırdak modelin uçlarındaki şişliklerde (epifizler) ortaya çıkar. Bunların genişlemesi ve yeniden biçimlenmesi esnasında, birincil ve ikincil kemikleşme merkezleri giderek kemik iliği ile dolan boşluklar yaratır.

İkincil kemikleşme merkezlerinde, kıkırdak 2 bölgede kalır: yaşam boyu kalıcı olan ve uzunlamasına büyümede katkısı olmayan eklem kıkırdağı ve her iki epifizi diyafize bağlayan epifiz plağı olarak adlandırılan epifiz kıkırdağı. Epifiz kıkırdağı kemiğin uzunlamasına büyümesinden sorumludur ve yetişkinlerde ortadan kalkar. Bu nedenle kemik büyümesi yetişkinlerde sona erer. Epifizlerin kapanışları her kemiğe uygun kronolojik bir sırayı takip eder ve aşağı yukarı 20. yaşlarda tamamlanır (6).



Şekil 2.1.4a. Hiyalin kıkırdak model üzerinde bir uzun kemiğin meydana gelişi: Hiyalin kıkırdak noktalı, kalsifiye kıkırdak siyah ve kemik dokusu yatay çizgili olarak gösterilmiştir. Aradaki beş küçük çizim üst sıradaki şekillerin orta noktalarının enine kesitlerini göstermektedir (Bloom ve Fawcett,1968)

Epifiz kıkırdağında, epifizden diyafiz kemikleşme merkezine doğru sıralanan dört hücre tabakası bulunur (17, 18). Bu tabakalar şunlardır (Şekil 2.1.4b.);

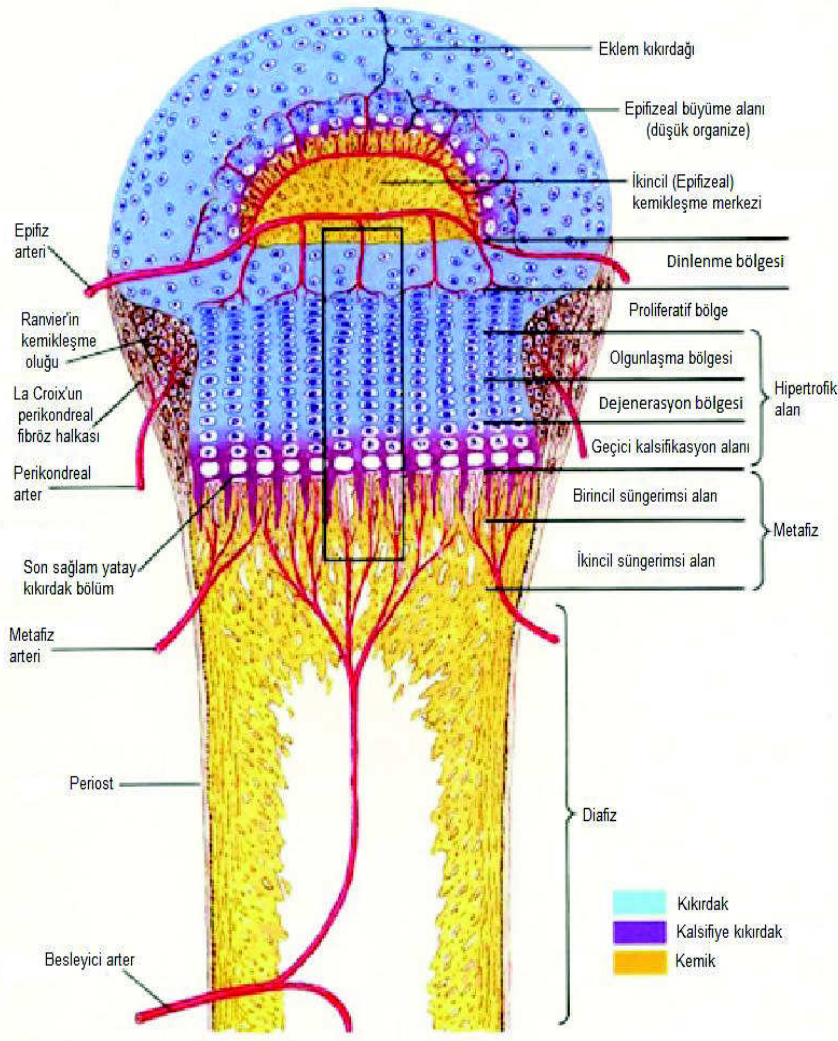
- 1) Dinlenme bölgesi (rezerv ya da germinal bölge olarak da bilinir); Epifize en yakın olan üst sırada bulunan hücrelerde yapısal değişiklik olmayan hiyalin kıkırdaktan meydana gelir. Germinal yapısını koruyarak protein sentezinden sorumludur. Bu bölge, düşük oranda proliferasyon, proteoglikan ve kollajen tip IIB sentezi ile karakterizedir.
- 2) Çoğalma (proliferasyon) bölgesi; Mitoz bölünme geçiren kıkırdak hücrelerinden oluşur. Kondrositler hızla bölünür ve kemiğin uzun eksenine dik sütunlar halinde

yığılırlar. Bu da epifiz plağının boyca büyümesine neden olur. Tip II ve tip XI kollajen sentezini arttırır.

- 3) Hipertrofik kıkırdak bölgesi; sitoplazmalarında glikojen birikmiş büyük kondrositleri içerir, kondrositler arasındaki eritilerek emilmiş matriks ince bir duvar haline gelmiştir. Bu seviye kondrositin en karakteristik özelliği, hücre bölünmesinin olmaması ve DNA sentezinin azalmış olmasıdır. Morfolojik değişiklikler alt ve üst hipertrofik tabakaya ayırır.
- 4) Kireçleşme bölgesi: diyafize en yakın tabaka olan bu bölgede terminal farklılaşmış kondrosit ve diğer bazı faktörler (örneğin metafiz içine damarların büyümesi) tarafından artmış matriks vezikülleri, alkalen fosfat ve kalsiyumun serbest bırakılması nedeniyle minerilizasyon yoğun olur. Bir yandan da kondrositler apoptoza uğrarayarak fizyolojik olarak ortadan kalkar.
- 5) Kemikleşme bölgesi; endokondral kemik dokusu belirir.

Kan kapilleri ve periyosttan köken alan hücrelerin mitoz bölünmeleri ile ortaya çıkan osteoprogenitör hücreler kondrositlerden geriye kalan oyukları doldurur. Osteoprogenitör hücreler, kesintili bir tabaka halinde kireçlenmiş kıkırdak matriksin duvarcıkları üzerine dağılarak osteoblastları meydana getirir. Eninde sonunda, osteoblastlar 3 boyutlu kireçlenmiş kıkırdak matriks üzerine kemik matriksini tortular. Böylece uzun kemiğin boyunun büyümesi, epifize komşu epifiz plağındaki kondrositlerin çoğalmaları ile meydana gelir. Aynı zamanda plakanın diyafize bakan tarafındaki kondrositler irileşerek; matriksleri kireçlenir ve hücreler ölür. Osteoblastlar birincil kemiği, kireçlenmiş kıkırdak matriks üzerine döşer. Karşılıklı gerçekleşen bu iki olayın (hücrelerin çoğalması ve ölümü) oranları tahminen eşit olduğundan, epifiz plağının kalınlığı değişmez. Bunun yerine, diyafizin ortasından uzaklaşarak yerini değiştirerek, kemiğin uzamasına sebep olur (6, 17).

Kondrosit çoğalma ve farklılaşması büyüme, tiroid ve cinsiyet hormonları, beta-katenin, kemik morfojenetik proteinler, IGF, leptin, nitrik oksit, TGF- β ve D vitamini metabolitleri gibi çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin ajanlar tarafından düzenlenir (17).



Şekil 2.1.4b. Tipik büyüme plağı yapısı ve vasküler beslenmesi (Netter F; The Ciba Collection of Medical Illustrations, 1987)

2.1.5. Kemiğin Yeniden Yapılanması (Remodeling)

Remodeling; iskelet maturasyonu tamamlandıktan sonra hem kortikal kemikte hem de trabeküler kemikte eski kemiğin yerini yeni kemiğin alması ile sonuçlanan ve hayat boyunca devam eden rezorpsiyon (yıkım) ve formasyon (yapım) olaylarının denge halinde olmasıdır. Remodeling ile kemik, üzerine binen mekanik streslere göre adaptasyon gösterir. Ayrıca mikrofraktürlerin tamiri ve mineral homeostazının devamlılığı için de kemiğin yeniden yapılanması gereklidir. Remodeling periostal, endostal, haversian kanalı ve trabeküler yüzeylerde gerçekleşir (16, 20).

Kemik kırıldığında, kemik matriksi yıkılır ve kırığa bitişik kemik hücreleri ölür. Hasara uğrayan kan damarları bölgesel kanamaya yol açar ve kan pıhtısı meydana getirir. İyileşme sürecinde kan pıhtısı, hücreler ve hasarlanmış kemik matriksi makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır. Kırık etrafındaki periost ve endosteum hızlı ve yoğun hücre

çoğalmasi ile yanıt vererek kırığı saran bir doku hazırlar ve kırık uçları arasına göçer. Daha sonra encondral ve intramembranöz kemikleşme yoluyla birincil kemik meydana gelir. Böylece oluşmuş düzensiz şeritler geçici kırık uçarını birleştirerek hızlı bir biçimde kemik kallusunu oluşturur. Kallusun birincil kemik dokusu kademeli biçimde eritilip emilerek ikincil doku ile yenilenecek, kemiğin yeniden modellenmesi ile ilk yapısına yeniden kavuşacaktır (6).

Kemiğin yeniden yapılanması aktivasyon, rezorbsiyon, reversal ve formasyon fazından oluşur: (1, 20).

Aktivasyon: Kemik yüzeyindeki osteoblastlar tarafından sentezlenen nötral proteazlar, kemik dokusu ile yüzeyel hücreler arasında bulunan mineralize olmamış osteoidi rezorbe ederler. Ayrıca PTH, 1,25(OH)2D3 ve PGE (prostoglandin E) uyarısına cevap olarak yüzeydeki osteoblastlar kontrakte olur ve mineralize matriks açığa çıkar ve aktivasyon süreci başlar. Erişkin iskelette her 10 saniyede bir aktivasyon olmaktadır. Osteoklast prekürsörleri osteokalsin, osteopontin, osteonektin gibi proteinlerin etkisiyle açığa çıkan matrikse yapışarak aktif hale gelirler.

Aktivasyon kemik iliğindeki osteositleri, sıra hücrelerini ve preosteoblastları içerebilir. Osteoblast serisindeki sorumlu gerçek hücreler halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Osteoblastlar, osteoklastogenesis için gerekli olan M-CSF (makrofaj koloni stimulan faktör) ve RANKL (NFkB ligand reseptör aktivatörü) yapımını gerçekleştirirler. Bu hücreler şekil değiştirerek enzim salgılamaya başlarlar. Enzimler kemik yüzeyindeki proteinleri sindirerek, TNF ailesi üyelerinden olan RANKL'ı açığa çıkarırlar. RANKL periosteumda osteoblast ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından eksprese edilir. RANK (NFkB reseptör aktivatörü) osteoklast öncü hücrelerin yüzeyinde bulunur. RANKL/RANK etkileşimi sonrası osteoklast serisi hematopoetik hücreler aktive olur, farklılaşır ve böylece rezorbsiyon süreci başlar. Bununla birlikte apoptozu baskılayarak osteoklastın yaşam süresini de uzatır. Bu etkileşim, kemik rezorbsiyonu ve kemik oluşumunun RANKL üzerinden birliktelik gösterdiğini işaret etmektedir (16,21). RANKL etkisi TNF reseptör ailesinden salgılanabilir dimerik bir glikoprotein olan osteoprotegerin (OPG) tarafından bloke edilir. OPG, RANKL için tuzak reseptör gibi hareket eder (antagonistik etkili çözünebilir reseptör). Temel olarak osteoblast serisi hücreler tarafından üretilen bu protein, kemik iliğindeki diğer hücreler tarafından da üretilir. OPG, osteoklastların farklılaşmasını ve aktivasyonunu engelleyerek, ayrıca apoptozunu indükleyerek, kemik rezorpsiyonunu düzenler (16, 21-23).

Rezorbsiyon: Aktive olan osteoklastlar temasta buldukları yüzeyin 2-3 kat daha fazla kemik yüzeyini rezorbe ederler. Yaklaşık 2-4 hafta kadar sürer.

Reversal: Kemik rezorpsiyonunun sona ermesi ve formasyonun başlaması arasında geçen süredir ve normal koşullarda 1-2 hafta sürer. Rezorbsiyon kavitesi belli bir derinliğe ulaşıncaya kollajenden fakir, proteoglikan ve glikoproteinden zengin dolgu maddesi (cement çizgisi) depolanır ve böylece daha ileri kemik rezorpsiyonu önlenir.

Formasyon: Osteoblastlar, çeşitli hormonların ve büyüme faktörlerinin etkisiyle farklılaşıp osteoid dokusunu sentezlerler. Yeni oluşan osteoid dokunun mineralizasyonu ile remodeling tamamlanmış olur.

Anlaşılabacağı üzere kemik formasyonu ve rezorpsiyonu çoklu faktörün rol oynadığı bir hadisedir. Bu faktörler Tablo 2.1.5.'deki gibi özetlenebilir (24).

Tablo 2.1.5. Kemik formasyonunu ve rezorpsiyonunu etkileyen faktörler

Kalsiyum seviyesini düzenleyenler	PTH 1,25 (OH) ₂ D3 Kalsitonin
Sistemik hormonlar	Glukokortikoidler İnsulin Büyüme hormonu (GH) Seks hormonları Tiroid hormonları Dolaşımdaki büyüme faktörleri (IGF-I,II)
Lokal faktörler	Prostaglandin E2 Kemik kökenli büyüme faktörü TGF Sitokinler Kemik ile ilgili proteinler Osteokalsin Osteonektin Kemik morfogenetik proteinler

2.2.Radyasyonun Kemik Doku Üzerine Etkileri

RT, sadece kanser hücrelerini yok etmez, aynı zamanda normal dokulara da hasar verir. RT'nin bu etkisi maruz kalınan toplam doza, fraksiyon dozuna, fraksiyonlar arası süreye, radyasyon alanın büyüklüğüne, ışın enerjisine, fraksiyon şemasına, hastanın yaşına, kişisel duyarlılığa, radyasyon hipersensitivitesi sendromlarının varlığına bağlıdır (25, 26). RT planlamasında tümör hacminin etrafındaki normal dokuların da belli oranda tedavi hacmi içine dahil edilmesi gerekliliği nedeniyle, RT'nin çeşitli normal doku reaksiyonları

ile birlikte düşünülmesi ve planlamanın görülebilecek bu yan etkilerle birlikte değerlendirilmesi gereklidir (27).

RT'ye bağlı akut yan etkiler genellikle çoğalan dokularda fonksiyonel parankim hücrelerinin sayısının azalması sonucu ortaya çıkar ve RT'nin başlangıcından itibaren ilk 6-8 hafta içinde görülen etkileri oluşturur. Akut reaksiyonların iyileşmesini sağlayacak yeterli kök hücresi yoksa bu defa subakut etkiler oluşur. Burada parankim hücrelerinin azalması ve bu nedenle yeterli repopülasyonun oluşamayarak doku bütünlüğünün bozulması söz konusudur. Subakut etkiler akut etkilerden hemen sonra oluşur ve ilerleyici değildir. Geç yan etkilerde ise etkilenen hücreler dokunun parankim hücreleri ile birlikte vasküler endotelial hücreler ve mezenkimal hücrelerdir. Vasküler yapıların hasarı ile telenjiektazi ve atrofi, mezenkimal hücrelerin hasarı ile de fibrozis ve kollajen birikimi ortaya çıkar. RT'nin başlangıcından itibaren 90 gün ve üzerindeki bir zaman diliminin geçmesinden sonra ortaya çıkan etkiler geç yan etkiler olarak yorumlanır ve bu etkiler aylar veya yıllar sonra ortaya çıkabilir. Toplam doz, fraksiyon büyüklüğü, fraksiyonlar arası süre ve ışınlanan doku veya organın hacmi geç yan etkiler açısından en önemli parametrelerdir. Bunlar dışında cerrahi girişimler ve kemoterapi (KT) uygulamaları da geç reaksiyonları etkileyen faktörlerdir (25, 27, 28).

Çeşitli dokular için tolerans doz eğrileri oluşturulmuştur. TD_{5/5} (minimal TD), tedavi sonrası 5 yıl içerisinde %5'den daha az ciddi komplikasyon oranına neden olabilecek radyasyon dozu iken TD_{50/5} %50 oranında komplikasyona neden olabilecek radyasyon dozudur. Kemik doku için tolerans dozları Tablo 2.2.'de gösterilmiştir (25, 29).

Tablo 2.2. Tedavi parametreleri: Tolerans dozları

TD _{5/5} (TEK DOZ)	TD _{50/5} (FRAKSİYONE DOZ)
Kemik > 30 Gy	Kemik >70 Gy

RT sahasının belirlenmesi sırasında kemik büyümesinin ağırlıklı olarak hangi bölgeden olduğunun bilinmesi ve buna göre epifizeal bölgelerin korunması morbiditeyi azaltacak bir yöntemdir. Femurda büyüme %30 proksimal, %70 distal epifizden olur. Tibiada %60 proksimal, %40 distal epifiz kaynaklıdır. Humerusta ise %80 proksimal, %20 distal epifizden büyüme olur (30).

Büyüyen kemik üzerine RT'nin etki mekanizmaları epifizyel alana verilen toplam radyasyon dozu, RT esnasındaki yaş, doz fraksiyon rejimi ve RT'nin niteliğine bağlıdır. Radyasyonun büyüyen kemik üzerine olan etkisinin başlıca kondroblastlar üzerinden

olduğu düşünülmektedir (30, 31). Tek dozda 2-20 Gy uygulanması kartilaj hücrelerinin çoğalmasını inhibe eder (32). 20 Gy üzerinde büyüme açığı geri döndürülemez. Radyasyonun kemik büyümesi üzerine etkisi daha yüksek dozlarda ve daha genç yaş grubu için daha ciddidir. Sekel özellikle 2 yaşından daha küçük çocuklarda ciddidir ve radyasyon ergenlik zamanına kadar boyu olumsuz etkileyebilir (33).

Radyasyona en hassas iskelet bölümü epifiz büyüme plağı kondrositidir. Şişlik, parçalanma ve kondrosit dejenerasyonu da dahil olmak üzere histolojik değişiklikler 300 cGy kadar düşük dozlarda iskeleti olgunlaşmamış hastalarda görülebilir (34). 400 cGy kadar düşük dozlarda büyüme geriliği oluşabilmesine rağmen, kalıcı değişiklikler 1200 cGy' den daha yüksek dozlarda genellikle belirgindir (35, 36). RT'den altı ay veya daha uzun süre sonra görünen gecikmeli değişiklikler kıkırdak dejenerasyonu ve kemik atrofisidir. Bu değişiklikler, doğrudan hücresel hasar ve vasküler yaralanmaya sekonder olabilir (35, 37).

Epifizde, belirgin büyüme geriliği oluşur (37). Işınlamadan 1 -2 ay sonra büyüme plağı genişlemiş olabilir, sıklıkla 6 ayda normale dönmektedir (36-38). Kıkırdak hipertrofiyle ilişkilendirilen görünür eklem boşluk genişlemesi tedaviden 8-10 ay sonra tarif edilmiştir (35-37). Metafiz ışınlanması kalsifiye kemik ve kıkırdakta absorpsiyon işlemini bozar ve metafiz değişiklikleri eğilme, düzensiz raşitizme benzeyen yıpranma ve band benzeri sklerozdur. Bu metafizyal değişikliklerin olmaması, kıkırdak hücrelerinin sterilizasyonu ve daha önemli bir sonuç olan ekstremitenin kısılmasını gösteriyor olabilir. Büyüyen diyafiz nispeten daha az radyasyona duyarlıdır. Diyafizer ışınlama periosteal yeni kemik oluşumunu bozar ve diyafiz şaftında anormal daralmayla sonuçlanır (36, 37).

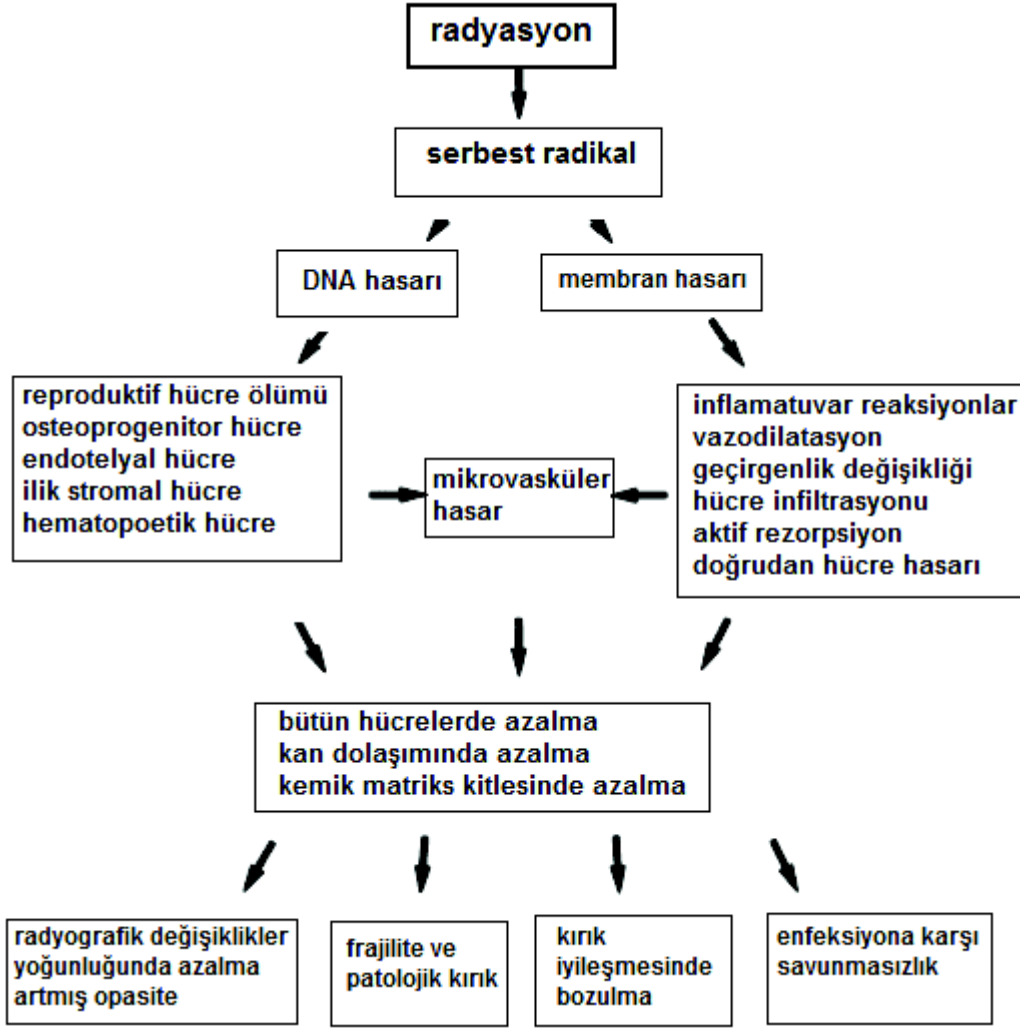
Üst femoral epifiz kayması, çocukluk döneminde pelvik ışınlamaya sekonder olarak ortaya çıkabilir. Bu komplikasyon tedaviden sonra 1-8 yıl sonra ortaya çıkar ve bu hastaların uzun dönem takibi gerekir (39). Bu RT sonrası görülen komplikasyonun, yapısal zayıflığa yol açan büyüme plağında vasküler beslenme ve proliferatif kondroblastların radyasyon hasarına sekonder oluştuğu düşünülmektedir (40). Kalçanın özellikle 4 yaş altı çocuklarda 25 Gy üzerindeki dozlarda ışınlanması femur başı epifiz kaymasına, özellikle 30 Gy üzerindeki dozlarda avasküler nekroza neden olur (41).

Kaburga, ileum ve yüz kemikleri gibi yassı kemiklerin büyümesi de RT'den etkilenir. İliak kanat ileumun toplam büyümesine % 40 katkıda bulunur ve radyasyon alanına dahil edilmesi ile şiddetli iliak hipoplazi oluşabilir (37). RT sonrasında kraniyofasiyal büyüme anormallikler önemli kozmetik ve fonksiyonel deformiteye neden olabilir ve bu durum derin psikolojik etkiler oluşturabilir. Radyasyonun membranöz kemik

gelişiminin öncül bağ dokusunda küçük kan damarları etkileyerek, düzensiz osteoid üretimi ve hatalı kemik oluşumuna neden olduğuna inanılmaktadır (39). Vertebraların asimetrik ışınlanmasına bağlı olarak skolyoz gelişir. RT uygulanan tarafa doğru vücut kaviteleşme gösterir. Vertebra büyümesi üzerindeki RT'nin direkt etkileri yanında Wilm's tümörü, nöroblastom gibi çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde uygulanan abdominal ışınlamalarda iliak kanatta hipoplazi ve kas atrofisine yol açarak da skolyoza neden olabilir (42).

Olgun kemik dokusu yavaş çoğalan hücrelerden oluştuğu için, radyasyona görece daha dirençli bir organdır. Radyasyon hasarının kemikte görülen primer etkisi atrofidir. Kemik hücrelerinin radyasyona cevabı yüksek dozlarda nekrozun, düşük dozlarda ise apoptozisin indüksiyonu şeklinde olur. Nekroz ancak 60-70 Gy gibi yüksek dozlarda görülebilir ve iyileşmesi güç olan en önemli kalıcı yan etkidir (43). RT'den sonra vasküler değişiklikler, kemik matrisindeki değişiklikler ve hücresel değişiklikler gibi birçok faktör kemikteki değişikliklerin patogeneğinde birlikte rol oynayabilir (Şekil 2.2.). Endotelial hücre sitoplazmasında görülen şişme, obliteratif endarterit ve periarterit sonucu oluşmaktadır. Kemik iliğindeki Havers kanallarındaki benzer değişiklikler kemik iliği kavitesinde sklerotik bağ dokusunun gelişmesine neden olur. Bu değişiklikler geç hasar olarak kabul edilmektedir. Daha ileriki zamanlarda kan damarlarındaki subintimal fibrozis ve hyalin kalınlaşma vasküler lümeninde daralmaya neden olur. Bunun sonucunda iyileşme için gerekli kan akımı azaldığından primer kemik hasarı artar (44, 45). Ayrıca osteoblastlardan salgılanan anjiojenik büyüme faktöründeki (VEGF) değişimler nedeniyle de anjiojenik yanıtın azaldığı bildirilmektedir (46). Osteoblastlarda ani ya da gecikmeli ölüm olabilir veya hücre bölünmesi etkilenebilir. Bu değişiklikler için eşik değer 3000 cGy, hücre ölümünün ortaya çıkması 5000 cGy' dir. (39). RT'den sonra osteoblast hücrelerinde sayı olarak azalma meydana gelir ve bu da kemik mineralizasyonunda rol alan kollajen üretimi ve ALP aktivitesinde azalmayla birlikte olur ve osteopeniye sonuçlanır. Radyolojik olarak kemik ışınlamadan yaklaşık 1 yıl sonra osteopenik görünür. Kemik atrofisinin kemik mineral kaybı ile birlikte olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (45, 47, 48).

RT'nin kemik üzerinde görülen diğer geç yan etkileri başlıca; atrofi/hipoplazi, avasküler nekroz, osteonekroz, kırık, osteoporoz, ödem, sekonder malignite (kemik, yumuşak doku), osteokondrom, ekzostoz, asemptomatik radyolojik bulgulardır (30).



Şekil 2.2.Kemikte radyasyona bağlı hasar patogenezindeki gelişen bir dizi olaylar

2.3.Radyasyon Hasarının Önlenmesi

Çocukluk çağı kanserlerinden sağ kalım oranı, çoklu ilaç tedavi ilkelerinin gelişmesi, operasyon tekniklerinin ve RT'nin iyileşmesi ile %60-77'nin üzerine çıkmıştır (49, 50). Çocukluk çağı kanserlerinin önemli ölçüde tedavi edilebilir bir hastalık grubu haline gelmesiyle, yaşam süresi uzamış kişilerde hastalığın kendisine ve tedavisine bağlı geç etkilerle karşılaşılmaya başlanmıştır. Bu durum da, sağ kalanlarda kanserin kendisinin ve tedavisinin geç dönem etkilerinin değerlendirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır (51).

Yaşam süresinin uzaması, kanser tedavilerinin geç etkilerinin olduğunu ve mümkün olduğunca çocukların normal fizyolojik fonksiyonlarını ve büyümelerini koruyacak şekilde tedavilerin düzenlenmesinin gerekliliğini göstermiştir. Gelişen, büyüyen dokuların hasarlanma eğiliminin daha yüksek olması nedeniyle çocuklarda kanser tedavisinin istenmeyen sonuçları daha ağır olmaktadır (50).

Geç etkilerin başında hastalığa veya tedavisine bağlı gelişebilen ikincil kanserler, hastaların hayat kalitesini etkileyen kognitif fonksiyonlar, seksüel yaşam ile ilgili geç etkiler, skolyoz, kraniyofasiyal displazi ve ekstremitte uzunluk farkı gibi kolayca fark edilebilen iskelet toksisiteleri gelir (51). Bununla birlikte, osteoporoz ve osteonekroz gibi diğer toksisiteler ileri evrelere ulaşana kadar sessiz seyredip, iyileştirilmesi daha zor duruma gelip, hayatta kalma süre ve kalitesini tehlikeye atabilir (49).

Erişkin hastalarda RT sonrası uzun dönemde radyasyona bağlı kemik kırıkları, örneğin prostat kanserinde sakral yetmezlik kırığı, önemli bir sorun olarak karşımızda durmakla birlikte çocukluk döneminde gelişen ve büyüyen dokularda tedaviye bağlı geç etkiler daha ağır seyretmektedir. Çocukluk çağı yumuşak doku sarkomlarının multimodalite tedavisinde RT önemli ve etkin bir yere sahiptir. RT, yumuşak doku sarkomlarında cerrahi sonrası ve Ewing sarkomu gibi bazı kemik tümörlerinde KT ile birlikte cerrahiye adjuvan veya alternatif olarak kullanılabilir. Ancak, henüz gelişimi tamamlanmamış çocuklarda RT uygulanması sonucu epifiz plak hasarına bağlı olarak iskelet sisteminde şekil bozukluğu, amputasyona dahi gidebilen kırıklar, kısalık ve asimetriyi içine alan birçok deformite oluşabilmekte ve bir ömür boyu sürmektedir. (52). RT' ye bağlı büyüme plağı hasarının önlenmesi için en uygun strateji henüz eksik olup, bu ekstremitte deformiteleri büyüyen çocuklarda ciddi fiziksel ve psikososyal sorunlara neden olabilir. Küçük yaşta RT'ye bağlı deformite gelişmiş bir çocuk yaşatlarının rahatlıkla yerine getirebileceği birçok fonksiyonu kısıtlı veya hiç yerine getiremeyebilir. Ayrıca bu eksiklikler nedeniyle iş bulmada zorluk veya evlenmede güçlük çekebilir, sosyal çevreden kendini kısıtlanabilir. Tüm bu sebeplerle şiddetli psikososyal sorunlar yaşayabilir. Bu nedenlerden ötürü, günümüzde RT hasarının azaltılması için çeşitli yöntemler ve radyoprotektan ajanların kullanımı önemli bir araştırma konusudur.

Radyasyon hasarının azaltılmasında kullanılabilecek ilk yöntem dozun kısıtlanması olabilir, ancak tümör cevabının olumsuz etkilenmesi nedeniyle bu yöntem uygulanabilir değildir. Diğer önerilen yöntemler doz fraksinasyonu, hiperfraksinasyon ve radyoprotektan ajanların kullanımınıdır (53-64). Bununla birlikte, büyüme durması standart fraksinasyona rağmen ortadan kaldırılamamıştır (54-56). Hiperfraksinasyonun Sprague-Dawley sıçan modelinde standart fraksinasyondan daha etkin şekilde kemik büyüme kaybını önlediği gösterilmiştir (57, 58). Ancak, özellikle kısa etkili anestezikler ile sedasyonun birden çok seansı gerekli kılması küçük çocuklarda, lojistik nedenlerden dolayı klinik kullanım için pratik değildir.

Radyasyon ile ilişkili toksisiteyi azaltmak için yapılan çalışmalar teknolojik gelişmeler üzerinde odaklanmaktadır. Bunlar konformal RT, yoğunluk ayarlı RT, görüntü kılavuzluğunda RT ve protonterapi gibi teknikleri içermektedir. Amaç yüksek doz bölgesinden normal dokunun dışlanması ilkesine dayanmaktadır ve birden fazla tedavi alanlarının kullanımı, farklı ışın enerjilerin kullanımı, her bir ışın demetinde doz modülasyonu ve ışın demetinden tümör şeklinin kontürlenmesi elde edilebilir. Bu teknikler tedaviyle ilişkili toksisiteyi azaltmak için tedavi hacminin azaltılmasına ve böylece yoğunlaştırılmış tedaviye izin verir (64, 65). Bununla birlikte, RT teknolojisindeki ilerlemeler ve değiştirilmiş fraksinyasyon ile her ne kadar daha fazla iyileşme elde edilebilse de bunun da bir sınırı vardır. Bu nedenle, kabul edilemez toksisiteye neden olmadan RT'nin antitümör etkinliğinin daha da artırılmasını sağlayacak ek stratejilere ihtiyaç vardır. Seçici olarak normal dokuları korumak için, kimyasal radioprotektörlerin kullanımı, bariz bir stratejiyi temsil eder (64).

Radyoprotektanları kullanmak ve test çalışmalarında yorumlama mantığını anlamak için iki temel kavram vardır. Birincisi tümör kontrol olasılığı / normal doku komplikasyon olasılığı olarak tanımlanan terapötik orandır (TR). Bu parametrelerin her ikisi de sigmoid doz-yanıt eğrilerine sahiptir (66). Verilen herhangi bir tedavi için bu iki eğri arasında yatay ayrılma genellikle bu tedavinin genel programını belirleyecektir. Bu eğrilerin arasındaki mesafenin artması, kabul edilemez bir düzeyde morbiditeye neden olmadan ve tedavinin etkili olabileceği olasılığını artırır. Tersine, bu iki eğrinin birbirine yakınlığı, kabul edilemez bir düzeyde morbiditeye neden olmadan tedavinin etkili olabileceğinin daha az muhtemel olduğunu gösterir. İkinci kavram, TR'yi doğrudan etkileyen radioprotektan etkinlik/toksosite profilidir. Tümöre karşı RT etkinliğini azaltan bir radyoprotektan ajan TR'yi etkilemeyebilir hatta azaltabilir. Normal doku komplikasyon olasılığının azaltılması, belirli bir kimyasal değişiklik stratejinin ana hedefi olduğundan radioprotektorün intrinsek toksisitesi de göz önüne alınmalıdır. Söz konusu RT ile ilgili toksisiteyi azaltabilecek ise, kendi önemli olumsuz etkilere neden olan bir bileşik bile klinik kullanım için uygun hale gelebilir (66). Sonuç olarak ideal bir radyoprotektan; tedavinin antitümöral etkinliğini azaltmaksızın seçici bir biçimde normal hücreyi korumalı, yan etkileri tolere edilebilir sınırlarda olmalı, kolay uygulanabilmeli, geniş bir etki spektrumu olmalı ve aynı zamanda birden fazla dokuyu korumalıdır (67).

Radyasyona bağlı normal doku toksisitesine karşı kullanılan ajanlar genel olarak radyasyondan koruyucular, hasarı azaltıcılar ve tedavi ediciler olmak üzere 3 grupta sınıflandırılırlar. RT öncesinde veya tedavi ile eş zamanlı kullanılan, normal doku hasarını

önlemek veya azaltmak amacı ile kullanılan ilaçlar, radyasyondan koruyucular olarak adlandırılırlar. RT sırasında veya tedavi sonrasında, fakat normal doku hasarı oluşmadan önce uygulanan ilaçlar hasarı azaltanlar olarak, oluşan normal doku hasarını iyileştirmek amacı ile kullanılanlar tedavi ediciler olarak sınıflandırılırlar (67).

Işınlama sırasında ve kısa bir süre sonra doku ve hücrelerde meydana gelen olayların anlaşılması radyasyondan koruyucular ve hasarı azaltıcıların etki mekanizmasını anlamak için önemlidir. İyonlaştırıcı radyasyonun biyolojik etkilerinde esas hedef molekül DNA'dır. Radyasyonun canlı organizma üzerindeki etkisi direkt ya da indirekt olarak meydana gelir. Radyasyon etkisi ile oluşan bütün olaylar zinciri, radyasyon enerjisinin ilk kademedeki DNA ya da bir enzim molekülü gibi özel bir biyolojik yapı tarafından absorblanması ile başlamışsa buna "Radyasyonun Direkt Etkisi" denir. Radyasyon enerjisi biyolojik moleküllerin içinde bulunduğu ortam molekülleri (özellikle su) tarafından absorblanmışsa, değişime uğrayan ortam molekülleri (tipik olarak serbest radikal formunda) biyomolekülü dolaylı olarak değişime uğratır ki buna "Radyasyonun İndirekt Etkisi" denir. Canlılar %70-90 oranında H₂O (su) içerdiği için ışınladıklarında, radyasyon enerjisinin büyük oranda su molekülleri tarafından absorblanması olasılığı çok yüksektir. Radyasyon etkisi ile su molekülleri iyonlaşır ya da uyarılırlar. İyonlaşma ile pozitif yüklü bir iyon (H₂O⁺) ve hızlı bir serbest elektron (e⁻) oluşur. Bu olayı izleyen çeşitli reaksiyonlar ile değişik tipte serbest radikaller meydana gelir. Memeli hücrelerde radyasyona bağlı DNA hasarının yaklaşık üçte ikisine, hidroksil radikalinin neden olduğu tahmin edilmektedir (67-69). DNA hasarı meydana geldikten sonra, hasarlı hücre, doku veya organizmada DNA tamir mekanizmasının aktivasyonu, transdüksiyon sinyal yollarının aktivasyonu, radyasyon yanıt genlerinin salınımı, proliferasyonun uyarılması, inflamasyonun başlatılması gibi bir dizi olay gerçekleşir. Bu yollar, radyasyona maruz kaldıktan sonra hücre veya doku iyileşme için önemli olabilir ama aynı zamanda toksisite gelişiminde rol oynayabilir. Radyasyon hasarını azaltıcı ilaçlar, bu yolları hedef alarak toksisiteyi azaltır veya önlerler. Çok sayıda sitokin ve büyüme faktörleri radyasyon azaltıcılar olarak incelenmektedir (67).

Serbest radikaller, iyonizan radyasyonun neden olduğu hasarın büyük bir kısmından sorumludurlar. Bu nedenle radyasyondan koruyucu ajan primer olarak serbest radikal hasarından korumak için radyasyon uygulanma zamanında bulunmalı ve üretilen radikallerle yarışacak konsantrasyonda bulunmalıdır. Birçok serbest radikal temizleyiciler ve antioksidanlar, serbest radikaller tarafından arttırılan oksidatif stresi sınırlandırabilir. Süper oksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz serbest radikal

hasarına karşı koruyucu olarak oluşan doğal antioksidan ajanlardır. Glutasyon, beta-karoten, askorbik asit, melatonin, polifenol ve tokoferol gibi ajanların başlıca etki mekanizmaları serbest radikalleri temizleme ve hidrojen atomunu, DNA hasar bölgelerinde doğrudan kimyasal onarımı kolaylaştırmak için aktarmaktır (67).

Tüm antioksidanlar, radyasyondan koruyucu olarak kullanılamazlar. Birçok ilaç üzerinde prelinik ve erken klinik çalışma yapılmış olmasına rağmen, günümüzde sadece amifostin klinik olarak kullanılmaktadır. Amifostin ve yeni geliştirilen nitroksidler, sekonder radikalleri temizlemek için yeterli etkinliğe sahiptir. İyi bilinen vitamin C, vitamin E gibi antioksidanlar ise klasik radyasyondan koruyucular kadar etkin değildirlir. Bulantı, kusmayı arttırması ve toksik olması nedeni ile sülfidril ve tiol bileşenlerinin radyasyondan koruyucu olarak tanımlanmasından bu yana daha az toksik ve daha çok etkili ilaçlar araştırılmaktadır (67, 70).

2.4.Radyoterapiye Bağlı Epifiz Hasarını Önlenmeyi Amaçlayan Çalışmalar

Damron ve ark. (54) büyüyen 24 sprague-dawley sıçanı ya yalnızca fraksiyone RT ya da tedavi öncesi 100 mg/kg amifostin takibinde fraksiyone RT şeklinde 2 tedavi grubuna randomize etmişler. Her bir hayvanın sağ bacak distal femur ve proksimal tibia bölgesine toplam 17.5 Gy verilmiş. Ortalama büyüme kaybı toplam bacak için yalnızca RT kolunda $21.1 \pm 7\%$ ve tedavi kolunda $16.3 \pm 4.6\%$ olarak sonuçlanmıştır ($p = 0.006$). Damron ve ark. (60) ikinci bir çalışmasında 25 Gy'lik RT'nin 3 fraksiyonunun her birinden önce 100 ve 200 mg/kg amifostin eklenmesi ile toplam bacak için ortalama büyüme kaybında sırasıyla 35.2% , 28.5% azalma sağlamak ve yalnızca fraksinasyonla (44.8%) elde edilenin ötesinde hem de istatistiksel olarak anlamlıdır.

Yavuz ve ark.'nın (71) benzer şekilde tasarlanmış çalışmasında büyüyen sıçanlarda yalnızca fraksiyonasyona karşı melatoninin pozitif koruma etkisi gösterilmiştir. Toplam bacak için ortalama büyüme kaybı yalnızca fraksiyonasyondan, RT öncesi 5 ve 15 mg/kg melatonin verilen kollarında anlamlı bir şekilde daha az olduğu tespit edilmiştir (41.2% vs 33.9% ve 32.2%).

Topkan ve ark.'ları aynı şekilde dizayn edilen bir sıçan modelinde, ışınlanmış epifiz plakları üzerinde amifostin, melatonin ve bunların eşzamanlı uygulanmasının radyasyon hasarına karşı koruyucu etkilerini karşılaştırmışlardır. Amifostin 200 mg/kg ve melatonin 15 mg/kg uygulanmıştır. Toplam bacak için ortalama büyüme kaybı yalnızca fraksiyone RT, amifostin, melatonin ve amifostin + melatonin uygulanan fraksiyone RT gruplarında sırasıyla $56.9 \pm 8.1\%$, $46.8 \pm 7.7\%$, $36.6 \pm 4.3\%$ ve $38.5 \pm 5.1\%$ olarak tespit

edilmiştir. Melatonine amifostin eklenmesinin radyokoruyucu etkiye herhangi bir katkısı olmadığı ve radyasyona bağlı epifiz büyüme plağı hasarını önlemede melatoninin amifostinden üstün olduğu bildirilmiştir (72).

Yapılan çalışmalarda, kullanılan fraksinasyon şemaları ve radroprotektan ajanlar RT'ye bağlı epifiz plağında gelişen büyüme kaybını parsiyel olarak korumaktan öteye geçememiştir. Bu nedenle daha etkin ajanlara ihtiyaç vardır.

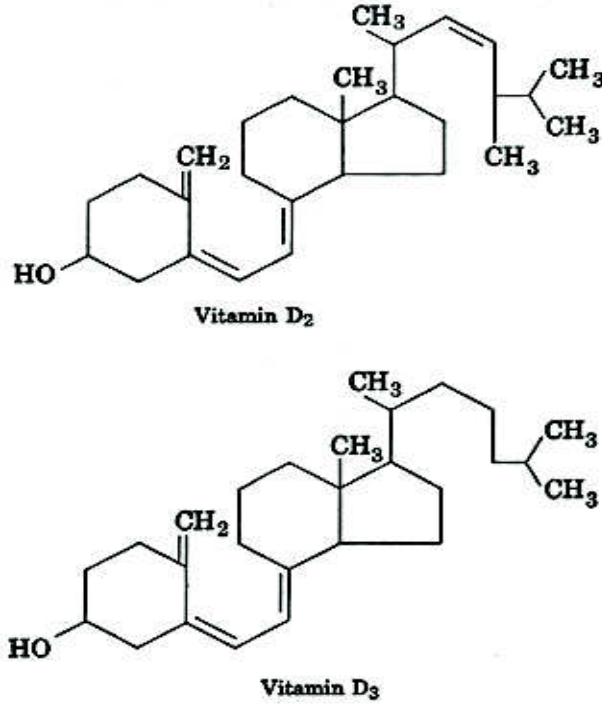
2.5.Vitamin D

Vitaminler, vücutta sentezlenmeyen dışardan alınması gereken ve çeşitli enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak görev yapan bileşiklerdir. Bunlardan birisi olan D vitamini klasik bir vitamin olmaktan çok, bir hormon olarak görev yapmaktadır. D vitamini güneş ışınlarının etkisiyle ciltte öncül madde olarak üretilmesini takiben karaciğer ve böbrekte iki defa transformasyona uğrayarak, biyolojik aktif madde şekline dönüşür ve hedef dokular üzerindeki etkilerini gösterir. Bu etkisi “feedback” mekanizmalar tarafından düzenlenir. D vitamini yağda eriyen vitaminler arasında bulunmaktadır (73).

D vitamini aile üyeleri siklopentanoperhydrofenanthrene halkasından türer ve kimyasal yapı olarak steroidlere benzerler (74). Ancak dört halka yapıları olmadığından gerçek anlamda steroid değildirler (75). Otuzdan fazla vitamin D metaboliti bildirilmekle birlikte çoğunluğu aktif olmayan bileşiklerdir (76). Bunlardan en önemlileri diyet ile alınan bitkisel kökenli ergosterolden türeyen ergokalsiferol [D2 vitamini; 25(OH)D2] ve hayvansal kökenli deride kolesterolün oksitlenme ürünü olan 7-dehidrokolesterolden (7-DHC) türeyen kolekalsiferoldür [D3 vitamini; 25(OH)D3]. İnsan vücudunda sadece D3 vitamini sentezlene bilse de her ikisi de aynı etkiyi oluşturur. Vitamin D2 ve D3 benzer yolla metabolize olduklarından her ikisi de D vitamini şeklinde isimlendirilmektedir (77-79, 82) (Şekil 2.5.).

Vücutta bulunan D vitaminin %90 kadarı güneş ışınlarının etkisi ile deride sentez edilirken, az bir kısmı ise diyetten sağlanır (73). Doğal olarak D vitamini içeren az sayıda besin vardır. D vitamini kaynağı hayvansal besinler, karaciğer ve yağlı balıktır. Diğer ana kaynaklar; makarna, tahıllar, meyve suyu, süt gibi besinlerdir. Günümüzdeki beslenme planlarında D vitamini için 400-800 IU günlük alım önerilmektedir (80). Dünya Sağlık Örgütü süt çocuklarında optimum kemik gelişimi için gerekli günlük D vitamini miktarını 400 IU olarak belirlemiştir (81). Beyaz ırktan bir insanın bir santimetre karelik derisinde, güneş ışınları etkisiyle yaklaşık olarak saatte altı ünite D vitamini yapılabilir. Sadece yanakları açık olan bir bebeğin, üç-dört saat güneş ışığında kalması bile günlük D vitamini

ihtiyacını karşılayabilmektedir. Derinin bir minimal eritem dozu (bir minimal eritem dozu, gün ortasında tüm vücudun 15-30 dakika, güneş ışınlarına maruz kalmasıdır) güneş ışınıyla karşılaşması ile 10000-20000 IU (250-500µg) D3 vitamini dolaşıma verilir. Bu sentez fonksiyonu, ülkenin bulunduğu enlem, mevsimler, güneş ışınlarının yeryüzüne geldiği açı (Zenith açışı), deri pigmentasyonu, hava kirliliği düzeyi, deriye sürülen koruyucu kremler, giyinme tipi, yaş gibi faktörlere bağlıdır (78, 79).



Şekil 2.5. Vitamin D₂ ve D₃'ün moleküler yapısı

Karaciğerde sentez edilen kolesterol burada 7-DHC'e çevrildikten sonra dolaşıma geçerek derinin malpighi tabakasına gelir. Güneş ışınlarındaki 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole B ışınları epidermisi geçer ve 7-DHC'deki çift bağlar tarafından absorbe olur, bunun sonucunda, inaktif pro D₃ vitamini (7-DHC) pre D₃ vitaminine dönüşür. Biyolojik olarak inert olan pre D₃ vitamini, termal izomerizasyon ile daha stabil bir izomere dönüşmektedir. Bu süreç 2-3 gün sürmekte olup mor ötesi ışınlar gerek duymaz. Deride yapılan D₃ vitamini bir α-1 globulin olan DBP (D vitamini Bağlayıcı Protein) ile karaciğere taşınır (78, 83).

Uzun süreli güneşe maruz kalma sonucu, previtamin D₃ alternatif iki inert izomer (lumisterol ve takisterol) şekline veya yeniden 7-DHC'e dönüşebilir. Bu nedenle D vitamini

intoksikasyonu oluşmamaktadır. Oluşan izomerlerin, kalsiyum metabolizması üzerine çok az etkili olduğu düşünülmektedir (80).

Hayvansal besinlerden alınan D3 vitamini veya bitkisel besinlerden alınan D2 vitamini ince barsaklardan absorbe edilir ve emilimi safra asitlerinin varlığını gerektirir. Absorbsiyondan sonra, şilomikronlarla duktus torasikustan genel kan dolaşımına katılarak karaciğere gelir (84).

Gerek deride sentezlenen, gerekse sindirim sisteminden emilen D vitamini karaciğere geldikten sonra metabolizmaları aynıdır. Karaciğere gelen D vitamini, hepatosit mitokondrial ve/veya mikrozomlarında bulunan D vitamin 25-hidroksilaz enzimi (25-OHase; veya CYP27A1) aracılığı ile 25-hidroksiergokalsiferole [25(OH)D₂] veya 25 hidroksikolekalsiferole [25(OH)D₃] dönüşür. Bu madde kalsidiol olarak da bilinir. D vitamininin karaciğerde 25-hidroksilasyonu ürün feedback mekanizması ile düzenlenir (83, 84).

25(OH)D vitamini vücudun tüm D vitamini havuzu hakkında en iyi bilgi veren parametredir. Normal serum konsantrasyonu 8-80 ng/ml (20- 200 nmol/L) arasında değişir. Serumdaki yarı ömrü 21 gündür (83).

Kalsidiol, DBP'ine bağlanarak kan yoluyla böbreğe gelir ve böbreklerde proksimal tübuler hücrelerin membranında bulunan megaline bağlanarak hücre içine geçmektedir. Hücre içinde serbestleşerek, mitokondride 25-hidroksivitamin D 1-alfa hidroksilaz [1α -OHase; veya CYP27B1) olarak da adlandırılan enzim ile ikinci kez hidroksilasyona uğrayarak, 1,25-dihidroksikolekalsiferol'e [1,25(OH)₂D] dönüşür. 1α hidroksilaz enziminin en önemli regülatörü paratiroid hormonudur. Östrojen, prolaktin ve büyüme hormonu 1,25(OH)₂D vitamini üretimini arttıran diğer faktörlerdir. Kalsiyum ve fosfor homeostazında sorumlu D vitamininin biyolojik olarak en aktif şekli 1,25(OH)₂D vitaminidir. Bu madde kalsitriol olarak da bilinir. İnsanda 1,25(OH)₂D₃ vitamini günde 1µg kadar üretilir ve plazmada 40-60 pg/ml (16-65 pmol/L) düzeyinde bulunur. Plazma yarılanma süresi 3-6 saattir (83,84).

25-hidroksilasyonunun % 90'ı karaciğerde, % 10'u fibroblast, böbrek, duodenum ve kemik gibi diğer dokularda gerçekleşir. Böbrekte özellikle proksimal tübül hücreleri, 1-alfahidroksilaz enzimi açısından zengindir. Ayrıca meme dokusu, kemik, granülatöz dokular, plasenta, prostat, kolon, akciğer ve makrofajlarda da 25-(OH)D₃'ün, 1,25-(OH)₂D₃'e dönüşebildiği gösterilmiştir. Ekstrarenal üretilen 1,25 (OH) 2D hücre proliferasyonu ve farklılaşma regülasyonunda otokrin/parakrin faktör olarak etki etmektedir (85, 86, 89).

D vitamininin yıkımı hem karaciğer hem de böbrekte 24-hidroksilasyon yoluyla. 24,25-(OH)2D3 daha polar olup hızla böbrekten atılır. 1,25-(OH)2D3 ise 24 hidroksilasyonla “kalsitroik aside” dönüşür ve safra yolu ile atılır (87).

Normal veya yüksek serum Ca ve/veya fosfat konsantrasyonunda ve 1,25(OH)2D3 yüksekliğinde renal 24-hidroksilaz aktive olur ve tübul hücrelerinde 1,25(OH)2D3 sentezi azalırken 24,25(OH)2D3 oluşarak inaktive olur.

24-25(OH)2D3 serum seviyesi 1-5 ng/ml'dir. D vitamini büyük miktarlarda oral ya da parenteral alındıktan sonra bu bileşiğin serum seviyesi yükselir ve artan 24,25(OH)2D3 kemikte hidroksiapatit kristallerinin çökmesini yani kalsifikasyonu sağlayarak plazma Ca'unu düşürücü etki yapar (88). 24,25(OH)2D3 kırıkta ve kemik dokusu tarafından da sentezlenebilir.

1,25(OH)2D3'un feedback regülasyonu vit D intoksikasyonu riskini azaltmaktadır. Artmış kalsiyum, fosfat, azalmış PTH direkt olarak 1 α -hidroksilaz aktivitesini azaltmaktadır. 1,25(OH)2D3'un üzerinde PTH'ın yaptığı promotör etkinin inhibisyonu ile 1 α -hidroksilaz mRNA'sını baskılar. 1 α -hidroksilaz geninin diğer bir negatif düzenleyicisi de “klotho geni” ürünüdür (89, 90). Ekstrarenal 1 α -hidroksilaz enzimi ise lokal sitokinler ve büyüme faktörlerinin etkisiyle regüle olur.

Sentez edilen 1,25(OH)2D3 vitamini, lipofilik bir molekül olduğu için DBP'ye bağlanarak böbrek, kemik ve barsak gibi hedef dokulara taşınır. Kalsitriol hem genomik hem de non-genomik mekanizmalar üzerinden etki eder. Genomik etkilerini sitoplazma ve nükleus içinde bulunan Vitamin D Reseptörleri (VDR) aracılığıyla göstermektedir. VDR'ler, steroid hormonlar için nükleer reseptör süperaillesine üyedir ve ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörü gibi görev yapar (91). VDR'lerin hormon bağlayıcı kısmı, DNA bağlayıcı bölgesi ve N-terminal bölgesi bulunur. VDR'leri barsak, kemik, böbrek dışında cilt, meme, mide, kalp, hipofiz, paratiroid bezi, pankreas beta hücreleri, gonadlar, beyin, iskelet kası, dolaşımdaki monositler, aktive T ve B lenfositlerde de bulunduğu gösterilmiştir (92). Normal dokuların yanı sıra çeşitli kanser hücrelerinde de vitamin D reseptörleri bulunmaktadır (93, 94). Birçok onkogen ürününü içeren elliden fazla proteinin 1,25(OH)2D3 tarafından düzenlendiği bilinmektedir. VDR içeren bu dokular aynı zamanda 1,25(OH)2D3 üreten yerlerdir. D vitamini reseptöre bağlandıktan sonra sterol-reseptör kompleksi retinoik asit X reseptörü ile ilişkiye girer. Ortaya çıkan heterodimerik kompleks, özgül DNA dizilerine bağlanır. Bu özgül dizilere D vitamini yanıt elementleri (DVYE) denir (95). DVYE'ler ile kurulan bu ilişki gen transkripsiyon ve translasyonu ile sonuçlanır. DVYE içeren 200'den fazla gen bildirilmiştir. Bu genler hücre proliferasyonu,

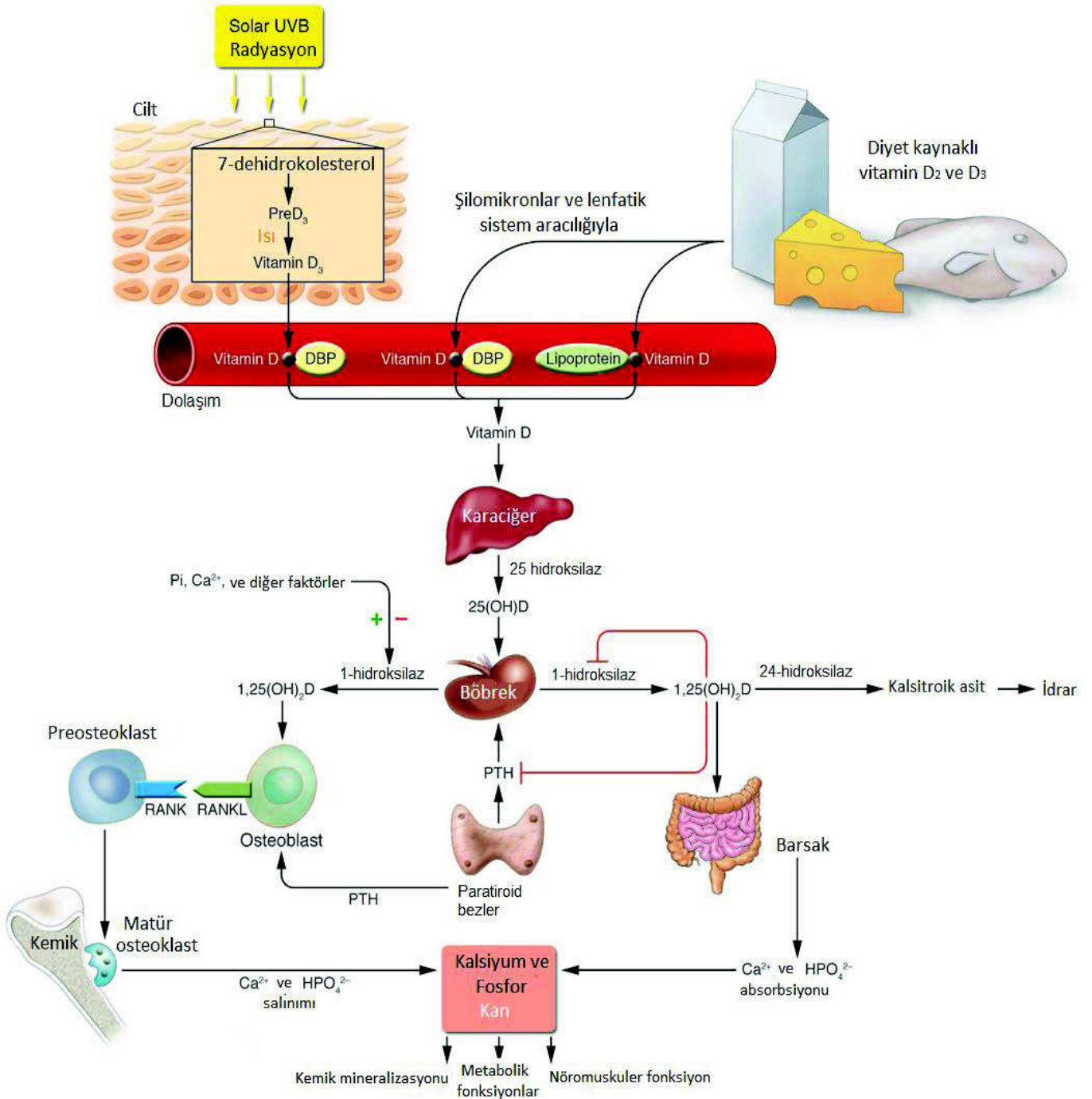
diferansiasyonu, apoptozis ve anjiogenezisi üzerinde etki etmektedir. Bu genlere örnek olarak kemik ile ilişkili genler [osteokalsin, osteopontin, kemik sialoprotein, kalsiyum bağlayıcı proteinler Calbindin-D28k ve D9K, fruktoz 1,6-bisphosphatase, PTH, PTHrP, insan büyüme hormonu ve RANKL], hücre döngü regülatör p21, insülin reseptörü, 25(OH)D3 24-hidroksilaz, TNF- α , ürokinaz plazminojen aktivatörü, protein lipaz C γ , TGF- β 2, fibronektin, β 3 integrin verilebilir (96). Buna ek olarak, kalsitriolün, steroid reseptör-ligand-DNA etkileşimi aracılık etmeden doğrudan ve non-genomik etkiler olarak tanımlanan, gen transkripsiyonunu düzenlemeden bağımsız hızlı etkileri de vardır (97). Kalsiyumun hızlı barsak emilimi, voltaj kapılı kalsiyum ve klor kanallarının açılması, intrasellüler depolardan kalsiyum serbest bırakılması ve protein kinaz C, protein kinaz A, fosfatidilinositol-3 kinaz ve fosfolipaz C aktivasyonunu içeren bir dizi non-genomik yanıtlara neden olur (98). Bu aktiviteler keratinositler, enterositler, kas hücreleri, osteoblastlar, kondrositler gibi birçok hücrede bulunmaktadır.

2.5.1.Klasik D vitamini Duyarlı Dokular

Vitamin D ekstraselüler kalsiyumu dar bir aralıkta tutmak ve kemik bütünlüğünü sağlamak için böbrek, kemik, paratiroid bezler ve bağırsaklar arasındaki etkileşimin gerekli bir bileşenidir (84) (Şekil 2.5.1.2a.).

2.5.1.1.Barsaklar

D vitamini ince bağırsaktan kalsiyum ve fosfat emilim verimliliğini artırmak için gereklidir. D vitamini olmadığında diyetten kalsiyumun % 10–15'i, fosforun % 60'ı emilebilmektedir. Vitamin D reseptör aktivasyonu olduğunda ise kalsiyum emilimi % 30-80, fosfor emilimi ise % 80 oranında artmaktadır (99, 172). Kalsiyumun bağırsaklardan optimal emilimi için hem 1,25(OH)2D3 hem de VDR'e ihtiyaç duyulur (100). Barsak mukoza epiteline gelen 1,25(OH)2D3 sitozolde bulunan reseptörlere bağlanarak bu hücrelerin çekirdeklerine taşınır ve orada Ca bağlayan protein mRNA'nın yapılmasını sağlar. Bu spesifik mRNA yardımıyla barsak mukoza hücresinde sentez edilen Ca bağlayan protein (kalbindin), Ca'un barsaktan kana geçişini düzenler (86).



Şekil 2.5.1.2a.D vitamini metabolizması ve 1,25(OH)₂D'nin, kalsiyum, fosfor, ve kemik metabolizması üzerinde çeşitli biyolojik etkileri (Holick MF, 2006)

2.5.1.2. İskelet sistemi

Vitamin D iskelet gelişimi ve mineralizasyonunun devamı için gereklidir. Vit D eksikliği olan hayvanlarda hipokalsemi, hipofosfatemi, hiperparatiroidizm, rikets ve osteomalazi geliştiği gösterilmiştir (101).

Organizmadaki 25(OH)D₃ vitamini düzeyinin normal olduğu durumlarda D vitamini kemiklerin mineralizasyonu üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Başka bir ifadeyle, barsaklardan Ca emiliminin yeterli olduğu durumlarda 1,25(OH)₂D₃ düzeyi de normal olmakta ve bu aktif hormonun etkisiyle bir taraftan barsaklardan Ca ve P emilimi sağlanırken, diğer yandan kemik mineralizasyonu sürdürülmektedir (102). VDR olmayan farelerde yüksek kalsiyum, fosfat ve laktoz içeren kurtarma diyetleri ile iskelet büyümesi, olgunlaşması ve yeniden yapılanmasının sağlanması, vitamin D iskelet homeostazında olmazsa olmaz mıdır sorusunu akla getirmiştir (103). Vitamin D bağımlı tip 2 riketste de kalsiyum infüzyonu ile kemik mineralizasyonunun normale dönmesi bu görüşü desteklemiştir. Ancak takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda iskelet homeostazında vitamin D'nin serum kalsiyum normalizasyonu ile yerine konamayacak etkileri olduğu gösterilmiştir (100). Büyüme plağının gelişimi kalsiyum ve 1,25(OH)₂D₃'nin koordineli işlevini gerektirirken, osteoblastik kemik yapımı ve osteoklastik kemik rezorpsiyonu 1,25(OH)₂D₃ ve VDR varlığını gerektirir.

VDR ile 1,25(OH)₂D₃ sistemi sağlıklı kemik döngüsü için mutlak gereklidir. 1,25(OH)₂D₃-VDR etkileşimi bozuk mutantlarda hem osteogenez hem osteoklastogenez bozular. Hipokalsemi nedeniyle oluşan yüksek PTH seviyelerinin anabolik etkisi göz önüne alındığında, 1,25(OH)₂D₃-VDR etkileşiminde mutasyon olanlarda osteoblast sayısı, alkalen fosfataz seviyesi, kemik yapımı ve kemik volumü artmış olarak beklenir. Ancak hipokalsemi ve sekonder hiperparatiroidi düzeltilindiğinde anormal osteoblastogenez açığa çıkar. Benzer şekilde 1,25(OH)₂D₃-VDR sistemi bazal ve PTH aracılı osteoklastogenez için de gereklidir. 1,25(OH)₂D₃-VDR mutant farelerde osteoklast sayısı uygunsuz şekilde düşüktür (100).

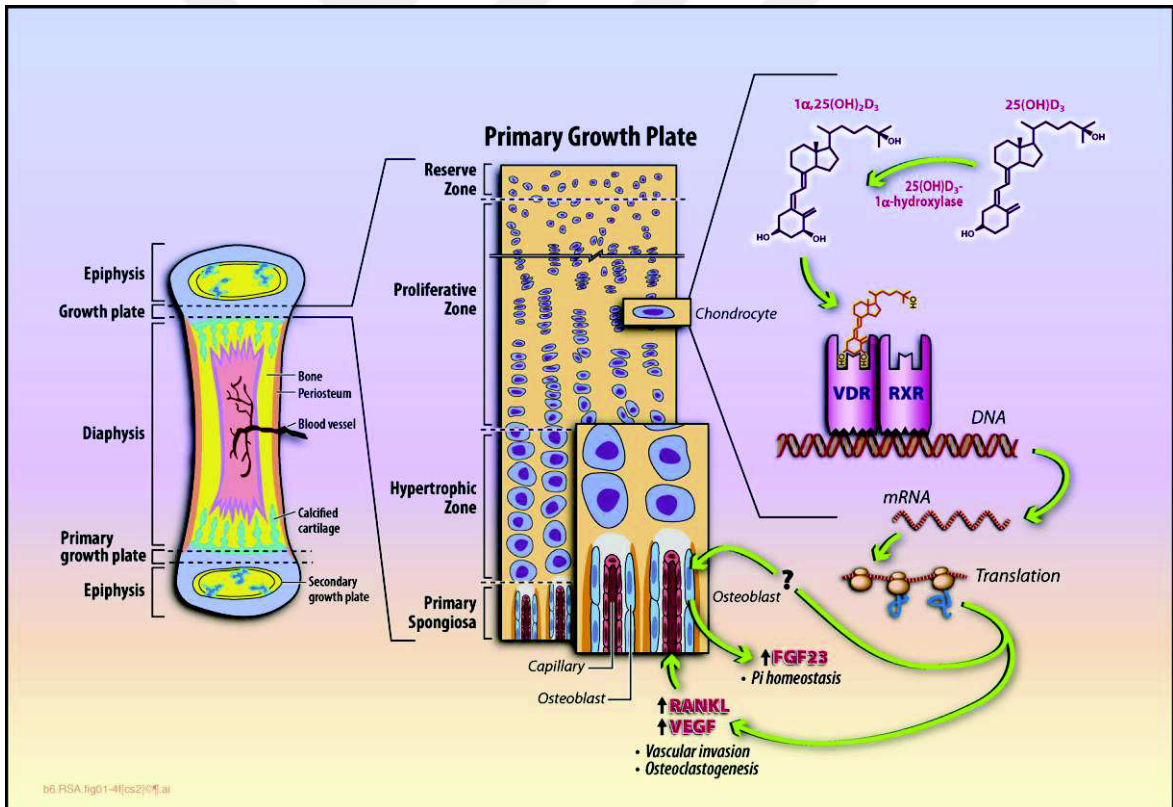
Yeni kemik oluşumu osteoblast aktivitesiyle olur. Osteoblastlar kalsitriol reseptörlerine sahiptirler (100, 104). Vitamin D'nin, osteoblast gen transkripsiyonu, çoğalması, farklılaşması ve mineralizasyonu düzenlediği gösterilmiştir (104, 105). Vit D ve VDR osteoblastlardan ekspresse edilen birçok matrix proteinleri kodlayan genlerin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Vit D osteoblastlarda sentezlenen osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi proteinlerin genlerini kodlayan güçlü bir transkripsiyon aktivatördür (105, 108). Osteokalsinin mineralizasyonu başlatmada önemli rol oynadığı

bildirilmektedir (106). Vit D ALP aktivitesini artırır ve kollejen sentezini azaltır (108). ALP'ın serum düzeyi, kemik yapımında artar. ALP'ın P gruplarını ayırarak mineralizasyonu da kolaylaştırdığı bilinmektedir (107).

Osteoblastlar PTH'a ve kalsitriole cevap olarak prostoglandinler, TGF- β ve IL-1 gibi osteoklast aktivitesini stimüle eden faktörler açığa çıkarırlar (106). Normal kemik döngüsünde osteoblastlar üzerinde bulunan RANKL'in RANK ile etkileşime girmesi osteoklastların farklılaşması ve olgunlaşmasını indükler (109). 1,25(OH)2D3, PTH ve prostaglandinler gibi RANKL ekspresyonunu uyarmaktadır (110). Bunu yaparken bir yandan 1,25(OH)2D3 OPG (RANKL antagonisti) üretiminde engellemektedir (111). D vitamini, böylece matür osteoklast havuzunu arttırarak kemik rezorpsiyonunu arttırmaktadır (45). Yaşlanmış kemik dokusunda osteoklastik aktivasyon aracılığıyla kalsiyum mobilizasyonu ve dolayısıyla sağlıklı yeni kemik oluşumunu indükler. Kurtarma diyeti ile osteoklast sayısı artarken, osteoblastlar üzerindeki RANKL miktarı etkilenmemektedir.

1,25(OH)2D, büyüme plağı kondrositlerinde büyüme, farklılaşma ve fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (115). In vitro çalışmalar, büyüme plağı kondrositlerin 1,25(OH)2D ve 24,25-(OH)2D ile doğrudan ancak diferansiyel yanıt sergilediğini göstermiştir (113). Bu deneyler D vitamini metabolitlerine fare kostokondral kondrositlerinin yanıtının matürasyon bölgesine bağlı olduğunu ortaya koymuştur (114). Prehipertrofik ve üst hipertrofik bölgelerin (bu kültür sisteminde 'büyüme bölgesi' olarak tanımlanır) 1,25-(OH)2D'ye öncelikle cevabı; metabolit proliferasyonunu inhibe etmek ancak, alkalin fosfataz aktivitesi, kollajen sentezi ve proteoglikan sentezini uyarmaktır (116). Büyüme bölgesi kondrositleri üzerine 1,25-(OH)2D'nin diğer etkileri membran akıcılığında artışlar (117), araşidonik asit turnover uyarılması (118) ve protein kinaz C aktivitesinin aktivasyonudur (119). Bunlar kondrositlerde non genomik 1,25-(OH)2D sinyalizasyon rolünü gösteren güçlü bir destek sağlar.

Kemikte 1,25-(OH)₂D genomik direkt etkisini, kondrositlerde VDR vasküler invazyon, osteoklastogenesis ve fosfat homeostazı sırasında kemiğin uygun endokrin etkileşimini sağlayarak gösterir (Şekil 2.5.1.2b). Hızla çoğalan kondrosit VDR yanında cyp27b1 eksprese eder. 1,25-(OH)₂D ligand bağlayıcısı VDR/RXR dimer gen transkripsiyonunu düzenler ve çalışmalar kondrositlerde VDR-aracılı sinyalin kondro-kemik bileşkede, vasküler invazyon ve osteoklastogenezi ayarlayan artan RANKL ve VEGF ekspresyonuna yol açtığını göstermektedir (120, 121). Ayrıca, kondrositlerde genomik 1,25-(OH)₂D sinyalasyonu primer spongiosada osteoblastlardan FGF23 (fibroblast büyüme faktörü 23, böbrekte fosfat emilimini bloke etmektedir) salgılanması üzerinde etkili henüz tanımlanmamış bir salgılama faktörünün (Şekil 2.5.1.2b'de “?” olarak belirtilmiş) ekspresyonunu etkiler (122). Böylece vit D endokondral kemik gelişimi sırasında otokrin ve parakrin rol oynamakta ve boyuna kemik büyümesine katkı sağlamaktadır (115).



Şekil 2.5.1.2b. Kondrositlerde genomik 1,25(OH)₂D sinyalinin direkt rolü. Büyütülmüş büyüme plağı yapısı ile uzun kemik morfolojisi gösterilmiştir (Arnauld R.- 2008)

Büyüyen memelilerde, D vitamini eksikliği, raşitizm olarak bilinen iskelet anomalilerine neden olur. Büyüme plağı hipertrofik bölgenin genişliği artar ve mineralizasyon bozuktur (123, 124). Benzer etkiler, vitamin D reseptör yoksun farelerde

meydana gelir. Bu farelerde sütunların metafiz ucunda hipertrofik kondrositlerin apoptozisi azalır ve kan damarları ve kemik hücreleri tarafından invazyon gecikir (125). Raşitizm, aynı zamanda, hipofosfatemik farelerde ve insanlarda meydana gelir, azalmış ekstraselüler fosfat D vitamini eksikliğinde oluşur, raşitizmde önemli bir rol oynayabilir. Gerçekten de, mineral ile zenginleştirilmiş diyet, D vitamini eksikliği ve vitamin D dirençli hayvanların büyüme plaklarını normalleştirebilmektedir (126, 127). Bu nedenle D vitamini büyüme plağı etkileri, öncelikle, intestinal lümeninden kalsiyum ve fosfat emilimini arttırmada öncü intestinal epitel hücrelerinde vitamin D reseptör ekspresyonu aracılığı ile olabilir.

Bununla birlikte, vitamin D metabolitleri, büyüme plağı üzerien doğrudan etkileyebilir. 24,25-dihidroksivitamin D₃ raşitik civciv büyüme plaklarının içine direkt olarak enjekte edildiğinde iyileşme ile sonuçlanmıştır (128). In vitro, 1,25-dihidroksi D₃ dinlenme ve proliferatif bölgelerde proliferasyonu azaltırken, 24,25-dihidroksivitamin D₃ farklılaşmayı uyarır, ancak dinlenme bölge hücrelerinde proliferasyonu azaltır (129). Bu etkiler, fosfolipaz, prostaglandinler ve mitojenle aktive protein kinaz kaskadı, hücre yüzey reseptörlerini içeren kondrositlerde bir sinyal iletim yolağı aracılığı ile ortaya çıkmaktadır (130). Büyüme plağı üzerinde lokal D vitamini etkisinin fizyolojik rolü belirsizliğini sürdürmektedir.

Kırık iyileşmesi üzerine D vitamininin etkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. (131-135). Bu çalışmalarda kemik kallusun mikroyapısını geliştirerek ve mekanik gücünü arttırarak iyileşmeyi hızlandırdığı bildirilmiştir. Kırık tamirinde 24,25-(OH)₂D'nin rolünü, tavuklarda kırık iyileşmesi sırasında CYP24A1 aktivite artışı nedeniyle 24,25-(OH)₂D dolaşımdaki seviyelerinin artması desteklemektedir (136). CYP24A1 eksik farelerde kemik kırık iyileşmesinde gecikme dışarıdan verilen 24,25-(OH)₂D ile düzeldiği gözlenmiştir (137). Buradan kemik kırıkları, travma veya metabolik kemik hastalıkları tedavisinde de yararlı olabileceği sonucuna varılabilir (137).

Kemik tamirinde, VEGF'nin insan osteoblast benzeri hücreler tarafından aktivasyonu sonucu mRNA'nın miktarının arttırılması yolu ile olur. Çalışmalar vitamin D₃ uygulamasının bunu arttırdığını, dolayısıyla neoangiogenezi arttırdığını göstermiştir (138-141). Kemik oluşumu enerji bağımlı bir süreç olduğundan ve hipoksinin engellenmesini sağlayacağından, neoangiogenezin arttırılması damar yapılarının intakt kalmasını, dolayısıyla kemik onarımını arttıracakı ön görülmektedir (138-141).

2.5.1.3.Paratiroid Bezler

Vitamin D paratiroid fonksiyonunun kuvvetli bir düzenleyicisidir. Vitamin D eksikliği paratiroid bezlerinde hiperplazi, artmış PTH sentez ve sekresyonuna neden olurken, 1,25(OH)2D3 verilmesi paratiroid hücre büyümesini ve PTH sentezini baskılar. PTH geninin 1,25(OH)2D3-VDR kompleksi ile direk baskılanmasının yanı sıra, 1,25(OH)2D3 paratiroid bezindeki VDR seviyesini ve paratiroid bezlerin kalsiyuma yanıtını kontrol eder. 1,25(OH)2D3 paratiroid bezindeki VDR'lerini artırır (muhtemelen artmış kalsiyum etkisiyle) ve VDR yıkımını azaltır (142).

2.5.1.4.Böbrek

1,25(OH)2D3'nin böbrekteki en önemli endokrin etkisi, kendi sıkı kontrolünü sağlamak için 1 α -hidroksilazın supresyonu, 24-hidroksilazın uyarılması ve proksimal tübülde megalin ekspresyonudur (143).

1,25(OH)2D3'nin renal kalsiyum ve fosfat mekanizması üzerine etkileri tartışmalıdır. Bir yandan serum PTH'sını düşürürken, bir yandan intestinal kalsiyum ve fosfat emilimini artırarak böbreğe gelen iyon yükünü etkilemektedir. 1,25(OH)2D3 renal kalsiyum emilimini ve kalbindin ekspresyonunu artırır, idrar kalsiyum atılımının ana belirleyicisi olan ve VDR'lerinin en fazla bulunduğu yer olan distal tübülde PTH bağımlı kalsiyum transportunu hızlandırır (144).

2.5.2.Vitamin D'nin Klasik Olmayan Etkileri

2.5.2.1.Vitamin D ve Kanser

Vitamin D3'ün antineoplastik aktivitesi ilk olarak fare myeloid lösemi hücrelerinde gösterilmiştir (145). İn vitro ve in vivo çalışmalarda vitamin D'nin meme, kolon, prostat, endometrium, mesane, akciğer, pankreas kanser ve osteosarkom hücre kültürlerinde büyümeyi engelleyici etkisi gösterilmiştir (146, 147). Epidemiyolojik çalışmalarda vitamin D'nin kolon, meme, over, prostat kanserlerinde kanser riski ve mortalitesini azalttığı saptanmıştır (148, 149). Garland ve ark. (148) günlük 160 IU veya üzerinde vitamin D alımının kolorektal kanser gelişme riskini %32 oranında azalttığını bildirmiştir. Benzer şekilde meme kanserli kadınlarda yapılan NHANES I epidemiyoloji çalışmasında güneşe yeterli oranda maruz kalan ve günlük yeterli vitamin D alan kadınlarda meme kanseri riskinin azaldığı gösterilmiştir (150).

1,25-(OH)2 vitamin D3, antikanser etkisini hücre çoğalmasını baskılayarak, hücre siklusunun durdurulması, anjiogenez ve metastazın inhibisyonu, onkojen açılımında

değişiklik, apoptoz indüksiyonu, lipid peroksidasyonunun azaltılması ve diferansiasyonun indüklenmesi gibi çeşitli yollar üzerinden gösterdiği düşünülmektedir (151, 152).

Meme, kolon, prostat kanserleri ve myeloma, B-hücreli kronik lenfositik lösemi gibi tümör modellerinde vitamin D'nin apoptozisi artırdığı gösterilmiştir (153-157). Bu etki antiapoptotik protein Bcl-2'nin azalması, pro-apoptotik Bax proteininin artması, kaspaz aktivasyonu, klasterin, katepsin-B ve TGF gibi apoptozis ile ilişkili proteinlerin artması gibi çeşitli yollarla olmaktadır (153-157).

2.5.2.2.Vitamin D ve Kemoteropötikler

Vitamin D' nin kanser hücrelerinin çeşitli sitotoksik ajanlara duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir. Kalsitriol'ün platinli bileşenler, mitoksantron, dosetaksel, paklitaksel ve adriamisin gibi ajanların antitümör etkisini artırdığı gösterilmiştir (158-160).

2.5.2.3Vitamin D ve Radyoterapi

Vitamin D, apoptozisi artırarak, hücre çoğalmasını azaltıp hücre siklusunu durdurarak kanser hücrelerini radyasyona daha duyarlı hale getirebilir (161-163, 147). Dunlap ve ark. in vitro olarak insan prostat kanseri hücrelerinde RT ve vitamin D3'ün sinerjistik etki gösterdiğini bildirmiştir (161). Vitamin D ve RT'nin apoptozisi farklı yollardan başlattığı, bu nedenle birbirinin etkisini artırabilecekleri ileri sürülmüştür (161). LNCaP hücrelerinde RT'den önce vitamin D uygulanmasının apoptotik indeksi arttırdığı gösterilmiştir (164, 165). Vitamin D'nin bu etkiyi antiapoptotik protein Bcl-2'yi azaltarak gösterdiği düşünülmektedir.

Vitamin D'nin hücre siklusunu G1/S ve G2/M evresinde durdurduğu bilinmektedir (161). Bu evrelerde hücreler radyasyona daha duyarlı olduklarından, RT'den önce vitamin D verilmesinin duyarlılığı artırıcı etkisinin olacağı düşünülmektedir. Vitamin D'nin ışına duyarlılaştırıcı etkisinin seçici olduğu, kanser hücrelerinin radyasyona duyarlılığını artırırken, normal fibroblastlarda, meme epitel hücrelerinde ve prostat hücrelerinde bu etkinin görülmediği bildirilmiştir (147, 161). Polar ve ark. (147) vitamin D3'ün, meme kanseri hücre kültüründe RT ile aditif etki gösterdiğini ve apoptozisi artırdığını, ancak normal insan fibroblast hücre kültüründe benzer bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu bulgular vitamin D'nin normal hücrelerde koruyucu etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

2.5.2.4. Vitamin D ve İmmün Sistem

D vitamininin hücrel ve hümoral immün cevabın oluşmasında da rol aldığı gösterilmiştir. Makrofajlarda lizozomal enzim aktivitesini artırır ve fagositozu kolaylaştırarak sitotoksik etkiyi hızlandırır. Bunu spesifik Fc reseptörlerine aracılık ederek yapar (166). Ayrıca makrofajlar 1 α -hidroksilaz enzimine sahip oldukları için 25(OH)D₃ den 1,25(OH)₂D₃'ü kendisi üretebilir (167). Vitamin D eksikliği ile giden raşitizmde, tekrarlayan enfeksiyonların varlığı, vitamin D'nin immün sistemin işleyişi üzerindeki etkilerini destekler niteliktedir (168). Vit D eksikliği ile tüberküloza yatkınlık arasında ilişki bildirilmiştir (169, 170). D vitamini makrofajlardan interlökin IL-1, IL-6, IL-12 ve TNF- α gibi sitokinlerin salınımını azaltabilir. Makrofajların lenfositlere antijen sunma etkisini azaltır ve bunu hücre yüzeyindeki MHC-II'yi azaltarak yapar (169). Kalsitriol aynı zamanda Th1 hücrelerinden IL-2 salınımını azaltır ve T hücre proliferasyonunun güçlü bir inhibitörüdür (171).

D vitamini reseptör polimorfizmiyle tüberküloz, psöriazis, osteoporoz, Alzheimer ve multipl skleroz gibi çeşitli hastalıklarla ilişki kurulmaktadır. Romatoid artrit, inflamatuvar barsak hastalıkları, hipertansiyon, şizofreni ve depresyonda düşük D vitamini düzeylerinin olduğu epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Diyetle D vitamini alınmasının Tip 1 diyabet riskini azalttığı öne sürülmektedir (172).

Gerek in-vitro ve gerekse in-vivo çalışmaların sonuçları, vitamin D'nin ileride otoimmün hastalıkların tedavisinde ve transplantasyon uygulamalarında, rejeksiyonunun önlenmesi ve graft ömrünün uzatılmasında kullanılabileceği umudunu vermektedir. Kalsemik etkiden arındırılmış bazı D vitamin analogları, psöriazis gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Vitamin D, enfeksiyonlara ve sekonder malignitelere yatkınlık doğuran klasik immüsupresif ajanlara alternatif bir immünomodülatör olarak, gelecek tedavi protokollerinde yer alabilme potansiyeli taşımaktadır (169).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Çalışma Grupları ve Deney

Bu çalışma 2011 yılında Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi (BÜTF) Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (proje no: DA10/26) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

Sprague-Dawley ratlar, yaşamlarının ilk 15 haftası büyümelerinin en hızlı dönemi olması ve kemik büyüme bozukluklarının amplifikasyonu sağlanırken, hassas kemik ölçümlerine izin verecek kadar büyük olduğundan iskelet büyüme etkilerinin incelenmesi için oluşturulmuş bir hayvan modelidir (55, 58). Çalışmada, ortalama ağırlıkları 74g (53-101g) olan 6 haftalık, 28 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar BÜTF Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlandı. Tüm ratlar, plexiglas kafeslerde, %50-70 nem oranı sağlanarak, saatte 18 kez havası değişecek şekilde, 20-22 °C sıcaklıkta olan ortamda tutuldu ve günlük temizlikleri yapıldı. Standart ticari rat preperatları ile beslendi, suları steril şişeler ile sağlandı. Tüm ratların vücut ağırlıkları çalışmanın başında, her 72 saatte bir ve çalışmanın sonunda ölçüldü. Çalışma öncesi 7'şer ratlık 4 adet çalışma grubu oluşturuldu ve tüm deney gruplarındaki hayvanlar numaralandırıldı.

1. grup kontrol (grup K)
2. grup sadece RT (grup RT)
3. grup sadece 50000 IU/kg i.m. vitamin D3 (grup VIT D)
4. grup RT + 50000 IU/kg i.m. vitamin D3 (grup RT + VIT D)

Ratlara, 50 mg/kg intraperitoneal (i.p.) Ketamin ve 7 mg/kg i.p. Xylazine verilerek anestezi sağlandı.

Vitamin D3 (Devit 3 ampül, Deva İlaç, İstanbul, Türkiye) tedavisi i.m. yoldan 50000 IU/kg olacak şekilde RT'den bir gün önce tek doz, üçüncü ve dördüncü grup ratlara uygulandı. Kontrol ve RT kontrol gruplarına da i.m. 0,5 cc %0,9 NaCl enjeksiyonu yapıldı.

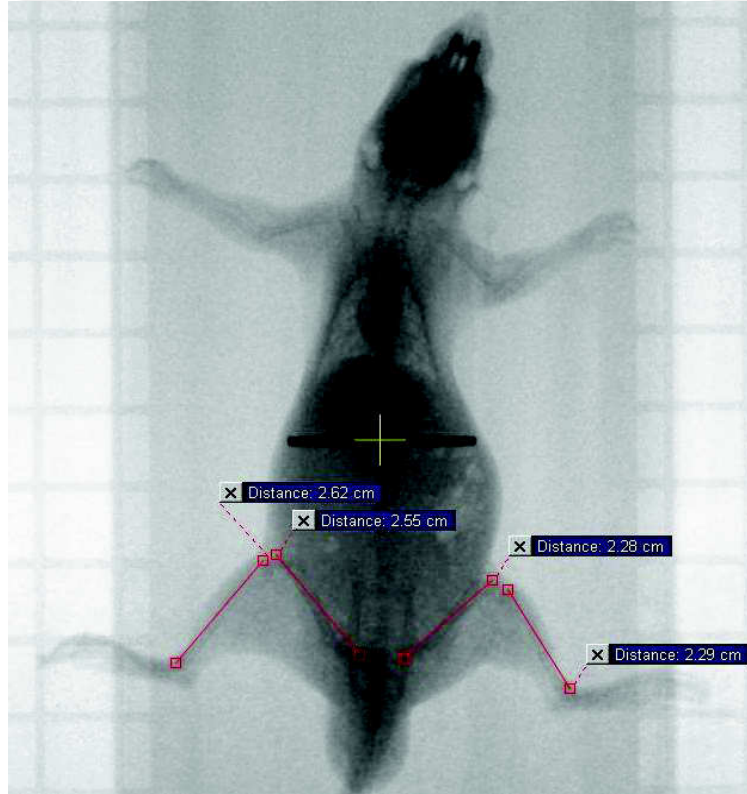
İkinci ve dördüncü gruptaki ratlara RT uygulandı. Anestezi altındaki her bir ratın diz bölgesini (sol femur distal ½ ve sol tibia proksimal ½) kapsayacak şekilde 3x3 cm boyutlarında tedavi alanları açıldı. Uygun kolimasyon açıları ve korumalar kullanılarak, ratların tedavi alanı dışındaki bölgeleri korundu. Sağ bacak korunarak kontrol olarak değerlendirmeye alındı. Bir santimetre bolus kullanılarak kaynak cilt mesafesi 100 cm olarak ayarlandı. 6 MeV elektron (Linac DHX-3323, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak, ardışık 3 gün süreyle, toplam 24 Gy'lik fraksiyone RT uygulandı. Daha önce 17,5-25 Gy radyasyon dozunun bizim kullandığımız fraksiyone şema yada tek

fraksiyon uygulamalar ile Sprague-Dawley ratlarda kemik büyümesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (53, 54, 58-60).

Birinci ve 3. gruptaki ratlara, aynı dozda anestezi ile uyutularak yalnızca RT uygulandı.

3.2. Bacak Uzunluklarının Ölçülmesi

RT öncesi (0. gün), anestezi altındaki her bir rat, 20x30 cm boyutlarında hazırlanmış tahta levhalar üzerine ön ve arka bacakları gerilerek, yapıştırıcı bantlar ile sırt üstü yatacak şekilde tespit edildi. Simülatör cihazı (Acuity, Varian Medical Systems, ABD) kullanılarak, X ışını (40 mA, 80 kVp, 2.7 mAs) ile direkt radyografileri görüntüledi. Altı hafta sonra, aynı teknikle kontrol radyografileri çekildi. Dijital görüntüler üzerinde, ölçüm cetveli kullanılarak, her bir ratın 0. gün ve 6. hafta, sağ ve sol femur başının en proksimal noktalarından, femoral kondillerin en distal noktalarına kadar ölçümü yapıldı (Eclipse, Tedavi Planlama Sistemi, Varian, ABD). Ölçüm sırasında ölçümü yapan kişi grupların hangisi olduğunu bilmiyordu. Ayrıca her iki tibia diz eklemindeki en proksimal uç noktasından, medial malleustaki en distal uç noktasına kadar ölçüldü (Şekil 3.2.). Toplam bacak uzunluğu, ölçülen femur ve tibia uzunluklarının toplamı ile hesaplanarak kaydedildi. Bu çalışmada hiçbir denek hayvanı kurban edilmiştir.



Şekil 3.2. Dijital görüntü üzerinde bacak uzunluklarının ölçülmesi

3.3. Kemik Büyümesinin Değerlendirilmesi

Işınlanmış ve ışınlanmamış bacaklar arasındaki büyüme farkı, radyasyon uygulanması nedeni ile oluşan büyüme inhibisyonunun primer göstergesi olarak kullanıldı. Gerçek büyüme (GB), büyüme kaybı yüzdesi (BKY), iyileştirilmiş büyüme kaybı yüzdesi (İBKY), bacak uzunluk farklılık yüzdesi (BUFY)' ni içeren sonlanım noktaları hesaplandı.

Gerçek büyüme (GB), ışınlanmış bacak uzunluğunun 6. hafta ve 0. hafta arasındaki fark olarak tanımlandı ve aşağıdaki formül ile ifade edildi;

$$GB = L_6 - L_0, \quad (3.3.1.)$$

L_6 ; 6. haftadaki ışınlanmış bacak uzunluğunu ve L_0 ; ışınlanmış bacağın başlangıçtaki bacak uzunluğunu ifade etmektedir.

Büyüme kaybı yüzdesi (BKY), aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$BK\% = [(R_6 - L_6) / \text{ortalama } (R_6 - R_0)] \times 100, \quad (3.3.2.)$$

R_6 ; 6. haftadaki ışınlanmamış bacak uzunluğunu, L_6 ; 6. haftadaki ışınlanmış bacak uzunluğunu, R_0 ; başlangıçtaki ışınlanmamış bacak uzunluğunu ifade etmektedir. Her gruptaki tüm hayvanların her biri için, $R_6 - R_0$ farklılığının ortalaması, ışınlanmamış kontrol bacak için normal büyümenin bir ölçüsü gibi kullanıldı.

Vitamin D₃ ile iyileştirilmiş büyüme kaybı yüzdesi (İBKY), aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$\dot{I}BK\% = [(BK_{RT} - BK_{RTD}) / BK_{RT}] \times 100, \quad (3.3.3.)$$

BK_{RT} ; RT grubundaki büyüme kaybını, BK_{RTD} ; kombine RT ve vitamin D₃ grubunda karşılık gelen büyüme kaybını ifade etmektedir.

6. haftadaki bacak uzunluk farklılık yüzdesi (BUFY), aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$BUF\% = [(R_6 - L_6) / RL_6] \times 100, \quad (3.3.4.)$$

3.4. İstatistiksel Analiz

Analizler SPSS 20.0 istatistiksel yazılımı (IBM SPSS Inc, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı. Bütün veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Her bir tedavinin ana etkisini saptamak için bir değişken olarak kemik uzunluk ölçümleri ile faktöryel varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmeler için $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

4.SONUÇLAR

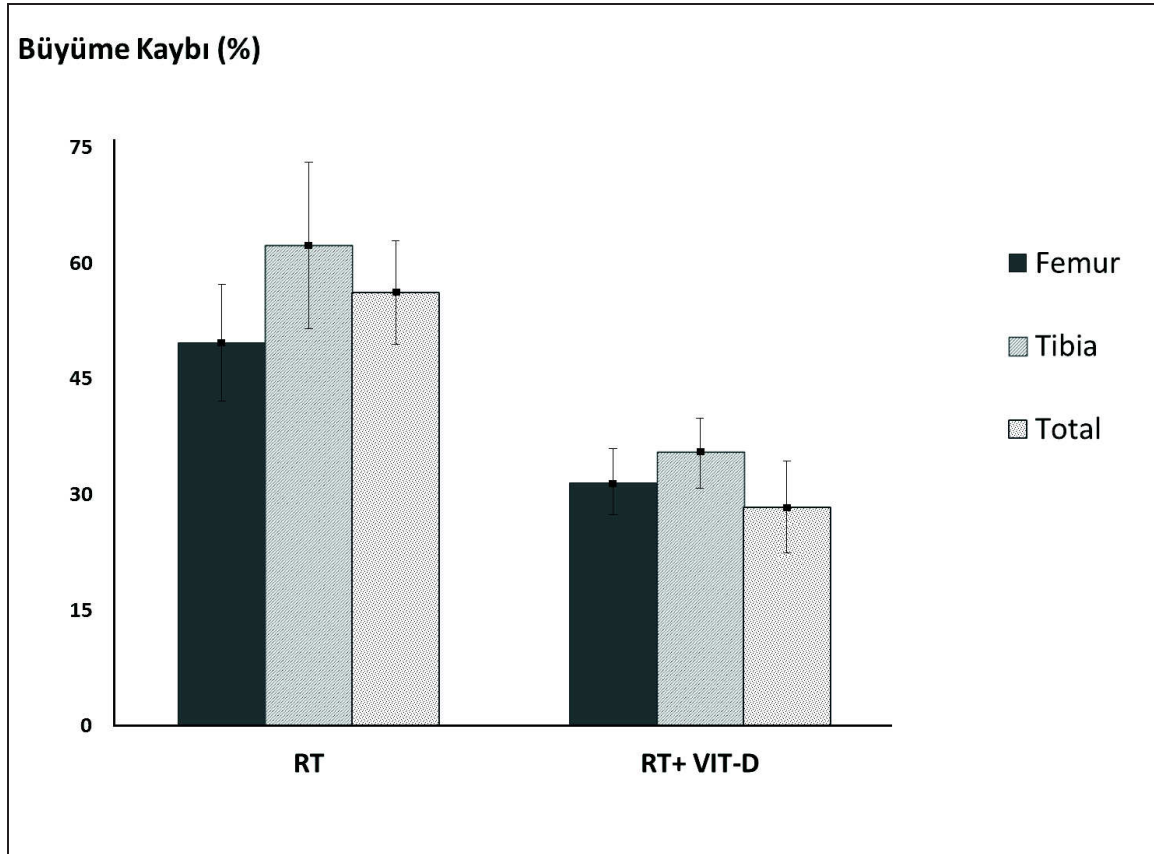
Çalışmada radyasyon veya ilaç uygulamasına bağlı ölüm görülmemiştir. Her bir gruptaki ratların, RT öncesi (0) ve RT'den 6 hafta sonra (6) ölçülen sağ ve sol toplam bacak (B) uzunluk ölçümleri ve kilo artış değerleri Tablo 4.'deki gibidir. Tabloda da görüldüğü üzere kilo alımı, vitamin D ve RT grubunda benzer ve profilaktik ilaç kullanımı ile ilişkilendirilen anlamlı bir fark yoktur ($p=0.51$).

Tablo 4. :Her bir grup için kilo artışı ve femur, tibia ve toplam bacak büyüme verileri

Parametreler	GRUP 2	GRUP 4	p
6haftadaki kilo artışı (g)			
Ortalama±SS	47,7 ± 22,6	51,5 ± 14,5	0,51
Aralık	19,0-73,0	28,0-69,0	
Her iki B₀ (mm)			
Ortalama±SS	47,1 ± 2,1	47,6 ± 1,7	0,22
Aralık	45,2-50,8	44,2-51,8	
Sol B₆ (mm)			
Ortalama±SS	53,0 ± 1,1	57,1 ± 1,0	0,11
Aralık	50,2-54,2	56,6-59,4	
Sağ B₆ (mm)			
Ortalama±SS	61,3 ± 1,8	62,2 ± 0,5	0,19
Aralık	58,2-63,9	59,3-64,3	
Gerçek büyüme sağ B₆ (mm)			
Ortalama±SS	12,4 ± 2,5	13,7 ± 1,3	0,39
Aralık	10,6-13,7	10,7-15,8	
Gerçek büyüme sol B₆ (mm)			
Ortalama±SS	4,2 ± 1,5	8,2 ± 1,2	<0,001
Aralık	2,0-6,6	4,9-11,2	
Gerçek büyüme sol T₆ (mm)			
Ortalama±SS	1,8 ± 0,6	4,5 ± 0,9	<0,001
Aralık	1,0-2,6	2,6-6,1	
Gerçek büyüme sol F₆ (mm)			
Ortalama±SS	2,4 ± 1,0	3,7 ± 0,7	<0,001
Aralık	1,2-4,0	2,8-4,8	
Sağ ve Sol B₆ farkı (mm)			
Ortalama±SS	8,3 ± 1,2	4,4 ± 1,8	<0,001
Aralık	6,2-10,2	1,1-6,4	
Kısaltmalar: B ₀ : Radyoterapi öncesi bacak uzunluğu, B ₆ : Radyoterapi sonrası 6 hafta bacak uzunluğu, F ₆ :Radyoterapi sonrası 6 hafta femur uzunluğu, T ₆ : Radyoterapi sonrası 6 hafta tibia uzunluğu, Grup 2: RT, Grup 4: RT + vitamin D3			

4.1. Gerçek Kemik Uzunluk Ölçümleri

Tablo 4.'de görüldüğü gibi, ışınlanmamış sağ ekstremitelerin kemik uzunlukları 6 hafta sonunda iki grupta da benzer bulunmuştur ($p > 0.05$). Ancak, son bacak uzunluklarında sağ-sol farkı RT ve VIT D + RT grubu arasında anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.005$) ve VIT D + RT grubu lehinedir.

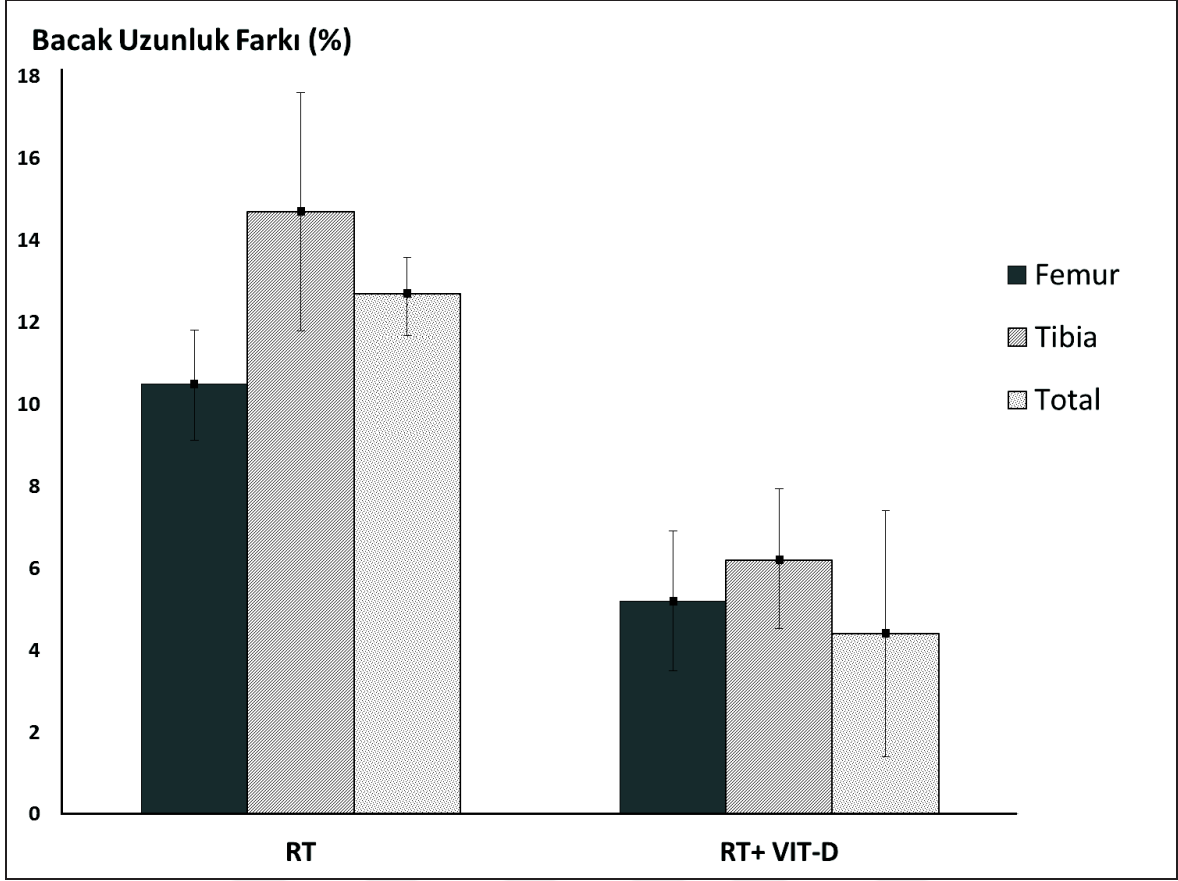


Şekil 4.2: Tedavi grubuna göre normal femur, tibia ve toplam bacakta büyümede yüzde azalma olarak radyasyona bağlı büyüme kaybı

4.2. Fraksiyone RT Sonrası Büyüme Kaybı

Fraksiyone RT uygulanması ile ışınlanan sol bacakta 56.2 ± 6.7 ortalama toplam bacak BKY'ye neden oldu. VIT D'nin profilaktik kullanımı toplam bacakta ortalama BKY'yi 28.5 ± 5.6 'ye getirdi ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.001$) (Şekil 4.2.).

Yalnız RT grubunda femur ve tibia için ortalama BK yüzdeleri sırasıyla 49.7 ± 7.6 ve 62.3 ± 10.8 olarak bulundu. VIT D + RT grubunda femur (31.5 ± 3.3) ve tibia (35.5 ± 4.3) için BK anlamlı ölçüde daha az tespit edildi ($p = 0.001$, her biri için).



Şekil 4.3: Tedavi grubuna göre normal femur, tibia ve toplam bacakta büyümede yüzde azalma olarak radyasyona bağlı bacak uzunluk farkı

4.3.Ortalama Yüzde Toplam Bacak Uzunluk Farkı Analizi

Ortalama BUF değerleri incelendiğinde yalnız RT grubunda 12.7 ± 1.3 , VIT D + RT grubunda 4.4 ± 3.03 olarak bulundu (Şekil 4.3.). Böylece, BUF tedavi grubunda RT grubundan önemli ölçüde daha az olduğu gözlenmiştir ($p = 0,001$).

Femurda BUF benzer şekilde RT grubunda VIT D + RT grubundan daha büyüktür (10.6 ± 1.3 , 5.3 ± 1.7 , sırasıyla). Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,001$).

Tibiada BUF, femur ve toplam bacakdaki gibi RT grubunda (14.7 ± 2.9) VIT D + RT grubundan anlamlı olarak daha büyüktür (6.1 ± 1.7 , $p=0,001$).

4.4. İyileştirilmiş Büyüme Kaybı Analizi

Tek başına RT alan grup ile karşılaştırıldığında, VIT D ile iyileştirilmiş büyüme kaybı yüzdesi tibia için 26.4 , femur için 33.8 , toplam bacak için 31.6 'dır. Bu değerler vitamin D3 tedavisinin fraksiyone RT'nin neden olduğu büyüme kaybını iyileştirmede önemli ölçüde etkili olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada 24 Gy (8 Gy/gün) diz ışınlaması yapılan ratlara RT öncesi vitamin D3 uygulamasının RT'ye bağlı epifiz hasarını azaltıcı etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Tek başına RT'nin femur, tibia ve toplam bacak uzunluklarını istatistiksel olarak anlamlı şekilde kısalttığı gösterilirken, RT öncesi vitamin D3 uygulamasının büyüme plağını radyasyonun etkilerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede koruduğu ve kemik büyümesini arttırdığı tespit edilmiştir.

D vitamini, normal kemik gelişimi, kalsiyum-fosfor homeostazısı ve mineralizasyon için varlığına zorunlu ihtiyaç duyulan bir vitamin olup endokondral kemik gelişimi sırasında otokrin ve parakrin roller oynamakta ve boyuna kemik büyümesine katkı sağlamaktadır. Bu sebeplerle özellikle raşitizm, osteomalazi ve osteoporoz tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. RT, çocuk çağı yumuşak doku ve kemik tümörlerinin multimodal tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Ancak, büyüyen çocukta, epifiz plağı RT alanına dahil edildiğinde kemik büyümesinde azalma; kalıcı kısalık, şekilsel deformite ve geç dönem patolojik kırıkları en önemli doz sınırlayıcı faktörlerdir. Bildiğimiz kadarıyla bir büyüme faktörü ve kemik yapımı düzenleyicisi olan vitamin D3'ün RT'ye bağlı epifiz hasarının önlenmesindeki olası etkinliği hakkında literatür bilgisi mevcut değildir. Ancak Graham ve ark. (173) tarafından yapılan bir çalışmada vitamin D3'ün RT'ye bağlı akciğer hasarını etkin bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Bu bulguya dayanarak kemik büyüme faktörü olan vitamin D3'ün bu etkinliğinin epifiz büyüme plağı üzerinde de etkili olup olmayacağını test etmeyi amaçladık.

Bu çalışmada fraksiyone RT'nin toplam bacakta $56.2 \pm 6.7\%$, femurda $49.7 \pm 7.6\%$ ve tibiada $62.3 \pm 10.8\%$ oranında büyüme kaybına neden olduğunu ve profilaktik vitamin D3 uygulaması ile toplam bacak ($28.5 \pm 5.6\%$), femur ($31.5 \pm 3.3\%$) ve tibia ($35.5 \pm 4.3\%$) için ortalama BK'nın anlamlı ölçüde daha az olduğunu tespit ettik ($p=0.001$, her biri için). Literatürde vitamin D3 ve RT birlikteliği ile ilgili benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle anlamlı bir kıyaslama yapmak mümkün değildir. Ancak bu bulgular diğer güçlü radyoprotektanlar ile yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilir. Bu noktada literatürde en çok çalışılan güçlü bir radyoprotektan olan ve sıkça klinikte kullanılan amifostinin, RT'nin epifiz plağında oluşturduğu hasara bağlı büyüme kaybını yalnızca fraksiyasyonun ötesinde anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Damron ve ark. bunu destekler bulgular elde etmişlerdir (54, 60). Yavuz ve ark. (71) doğal bir antioksidan ve radyoprotektan olan melatoninin epifiz plağı üzerinde radyasyondan

koruyucu etkinliğini araştırmış ve toplam bacak için ortalama büyüme kaybı RT ncesi 5 ve 15 mg/kg melatonin verilen kollarda yalnızca fraksinasyondan, anlamlı bir şekilde daha az olduğunu bildirmişlerdir (%41.2 vs %33.9 ve %32.2). Daha sonra buna dayanarak kliniğimizde yapılan benzer bir çalışmada ışınlanmış epifiz plağı üzerinde amifostin, melatonin ve bunların eşzamanlı uygulanmasının radyasyon hasarına karşı koruyucu etkileri karşılaştırılmıştır. Topkan ve ark. (72) tarafından sonuçları bildirilen bu çalışmada toplam bacak için ortalama büyüme kaybı fraksiyone RT, RT + amifostin, RT + melatonin ve RT + amifostin + melatonin uygulanan gruplarda sırasıyla %56.9 ± %8.1, %46.8 ± %7.7, %36.6 ± %4.3 ve %38.5 ± %5.1 olarak tespit edilmiştir. Melatonine amifostin eklenmesinin radyokoruyucu etkiye herhangi bir katkısı olmadığı ve radyasyona bağlı epifiz büyüme plağı hasarını önlemede melatoninin amifostinden üstün olduğu bildirilmiştir.

Büyümekte olan kemik ve epifiz plağının radyasyonun etkilerine son derece duyarlı olduğu bilinmekte olup radyasyon hasarı oluştırmada rol oynayan ana dokular proliferatif kondrosit, distal metafiz ve epifizyal damarlardır (44, 174, 175). Proliferatif kondrositlerde, 5 Gy radyasyonun tek bir fraksiyonu ile sitolojik değişiklikler ve hücre ölümü görülebilir (174). Dört haftalık bir rat modelinde, tibiaya 9.5 Gy tek doz sonrası bir hafta içinde damar çapı ve miktarında azalma ile distal metafiz damarlarda hasarın belirgin olduğu gösterilmiştir (175). Epifiz kıkırdağa oksijen sunumunun temel yolu olan epifiz vasküler beslemesinde az miktarda azalma bile, hipoksik hücresel hasara ve kondrogenезisi durdurmaya neden olabilir (44, 55). Radyasyon hasarının erken aşamalarında inflamasyon benzeri stromal reaksiyonlar ve doğrudan hücre hasarı gelişir. Damarsal endotel hasarına bağlı geçirgenlikte artış, genişleme ve kapiller yoğunluğunda azalma, osteoblast sayısında azalma ve iskemi nedeniyle kemik oluşumu belirgin olarak azalır (44). Bizim bu çalışmada göstermiş olduğumuz radyoprotektan etkiyi morfolojik ve biyokimyasal bir çalışma olmaması nedeniyle net bir şekilde yorumlamak mümkün değildir. Ancak olası mekanizmalardan birisi vitamin D'nin büyüme plağı kondrositlerinde büyüme, farklılaşma ve fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynaması olabileceğini düşünüyoruz. D3 vitamini büyüme bölgesinde metabolit proliferasyonunu engellerken, alkalen fosfataz aktivitesi, kollojen sentezi ve proteoglikan sentezini uyarmaktadır (115, 116). Ayrıca mebran akıcılığında artış, araşidonik asit turnover uyarılması ve protein kinaz c aktivasyonu büyüme bölgesi kondrositlei üzerine diğer etkileridir (117-119). Kondrositlerde vitamin D3 genomik direkt etkisini vasküler invazyon, osteoklastogenезis ve fosfat homeostazı sırasında kemiğin uygun endokrin etkileşimini sağlayarak gösterir.

Vitamin D3, kırık-kemik bileşkede vasküler invazyon ve osteoklastogenezisi ayarlayan RANKL ve VEGF ekspresyonuna neden olur (120, 121). Böylece vitamin D3 boyuna kemik büyümesine katkı sağlamaktadır (115). Bir diğer olası mekanizma ise vitamin D3'ün osteoblast gen transkripsiyonu, çoğalması, farklılaşması ve mineralizasyonu üzerine etkisidir (104, 105). Bunun yanında vitamin D3 kemik oluşumundan sorumlu osteokalsin, osteopontin, ALP gibi matriks proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu artırır (105, 108). Vitamin D3 ile indüklenen osteoblast aktivasyonu ve mineralizasyonun düzenlemesi kemik yapımını arttırmaktadır. Bu da çalışmamızda bulunan koruyucu etkinin başka bir nedeni olabilir.

Li ve ark. (138) in vivo çalışmalarında vitamin D3 ile insan osteoblast benzeri hücrelerde (OBH) VEGF salgılanmasına yol açan VEGF mRNA ekspresyonu arttığını göstermişlerdir. OBH'ler VEGF üreterek endotel hücre (EH) proliferasyonunu uyarıp, sonra aktive EH'ler IGF-I ve ET-1 gibi osteotropik büyüme faktörleri üreterek osteoblast benzeri hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmasını güçlendirdiğini bildirmişler ve böylece vitamin D'nin, uzun süreli ve geliştirilmiş VEGF reseptör ekspresyonu ile neoangiogenezisi arttırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar, RT'ye bağlı epifiz hasarında oluşan vasküler değişiklikleri, vitamin D3'ün fazla miktarda yeni kapiller oluşturarak önleyebileceğini düşündürmekte olup bulgularımızın altında yatan temel nedenlerden olabileceği imajını vermektedir. Ayrıca vitamin D3'ün lenfosit proliferasyonu ve sitokin üretimini kontrol ederek inflamasyonu azaltması, immunmodülatör olması nedeniyle radyasyon hasarının erken döneminde gelişen inflamatuvar reaksiyonları azaltabileceğini düşündürmektedir. Ancak bunların ispatlanması için histolojik ve biyokimyasal bulgularla desteklenmiş çalışmalara ihtiyaç vardır.

D vitamini, bazı kanser türlerine karşı antineoplastik etkilere de sahiptir (146, 147, 152). Aynı zamanda hücre çoğalmasını inhibe ederek, hücreleri farklılaşma yönünde indükleyerek, G1/S ve G2/M fazlarında hücre siklusunu durdurarak ve apoptozisi indükleyerek tümör hücrelerinin radyosensivitesini artırır (147, 161, 163, 165). D vitamininin radyoduyarlayıcı etkisi seçici olup normal sağlıklı fibroblast ve keratinositler üzerinde böyle bir etkisi yoktur (161, 176). Vitamin D'nin seçici radyasyon duyarlayıcı ve antineoplastik etkilerinin moleküler mekanizmalarını değerlendirmek bu çalışmanın amacı dışındadır. Ancak, antineoplastik etkileri de olan bir radioprotektan ajan radyasyon onkoloğu için cazip bir tedavi yöntemidir ve terapötik endeksi artırmak için çeşitli tümör tiplerinin tedavisinde kullanılabilir. Klinik olarak D3 vitaminin bu amaca uygun olup olmadığı ileride yapılacak çalışmalar sonucunda anlaşılacaktır.

Literatürde günlük D vitamini uygulamasının dozu 200-800 IU arasında değişmektedir (177, 178). Türkiye’de günde 400-800 IU D vitamini doğumdan sonraki 15. günde başlanmakta ve en az bir yıl süre ile uygulanmaktadır. D vitaminin 600 000 IU dozunda depo şeklinde uygulandığı stoss tedavileri sırasında nadiren ağır D vitamini intoksikasyonu bulguları gelişirken, aralıklı yüksek doz D vitamini kullanımı ile (100 000 IU’nin üzerinde) risk daha fazladır (76). Küçük çocuklarda D vitaminin günde 40000 IU 1-4 ay, erişkinde ise günde 100000 IU birkaç ay kullanımı sonrasında vitamin D intoksikasyonu görülebilmektedir (179). Bu çalışmada kullanılan depo 50000 IU/kg vitamin D3 dozu ile toksisite görülmemiştir. Vitamin D3’ün ratlarda kemik iyileşmesi üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda 60 ng/kg/gün ve 2.5 µ/kg/gün, 1.25 µ/kg/gün, 0.125 µ/kg/gün ve bizim çalışmamızdaki gibi 50000 IU/kg dozlarda kullanılmış ve bu dozlarda toksisiteye rastlanmamıştır (131-135). Daha yüksek dozlarda vitamin D3’ün RT’ye bağlı büyüme plağı hasarını önlenmede daha yüksek etkililiğe sahip olabileceğini öngörsek de bu öngörünün doğruluğu ileride yapılacak çalışmalarla ortaya konacaktır.

Bu çalışmanın en önemli handikapı konvansiyonel 1.8-3 Gy fraksiyon dozları yerine 8Gy/fr’nun kullanılması olup geç hasarın fraksiyon dozuyla kuvvetli bir ilişki içerisinde olması dolayısıyla vitamin D3’ün hiperfraksiyone ve/veya konvansiyonel şemalarda daha etkin olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Sonuç olarak bu çalışma vitamin D3'ün RT'ye bağlı epifiz plağı hasarını önemli ölçüde azaltabileceğini göstermektedir. Ancak kesin sonuçlara ulaşabilmek klinik çalışmalarla mümkün olabilecektir. Standart fraksiyone RT şemaları ile vitamin D3'ün daha yüksek dozlara çıkıldığı ve/veya amifostin, melatonin gibi radyoprotektanların eklenmesinin koruyucu etkinliği artırıp arttırmayacağı da gelecekte araştırılmaya değer olduğu kanaatindeyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Cassandra A, Thomas AE. The Bone Organ System: Form and Function. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J, eds. Osteoporosis, San Diego, Academic Press; 2001. p.3-20.
2. Yazıcı M, Kutlu M. Kemiğin Yapısı ve Kemik Döngüsünün Düzenlenmesi. Türkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics: 4 (2): 1-8, 2011.
3. Wellik DM, Capecchi MR. Hox 10 And Hox 11 genes are required to lobally pattern the mammalian skeleton. Science; 301 (5631):363-7, 2003.
4. Canalis E. İnsulin like growth factor and local regulation of bone formation. Bone;14(3): 273-6, 1993.
5. Gowen M. Cytokines regulate bone cell function. Rheumatology Review;1:43-50, 1991.
6. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. (Çeviri: AYTEKİN Y, SOLAKAĞLU S). Bölüm 8: kemik. Nobel Tıp kitabevi, cilt 2: 141-159, 2006
7. Kutlu M, Odabası E. Kemik Doku ve Fizyolojisi. Türkiye Klinikleri J Endocrin; 2: 73-89, 2004.
8. Baron R: Anatomy and ultrastructure of bone. Favus Mj(ed): Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Lippincott Raven, Philadelphia, pp 3-9, 1993.
9. Adler CP. Bones and bone tissue, normal anatomy and histology in bone diseases. New York, Springer Verlag; 1-30, 2000.
10. Bonner JF, Chesnut CH, Fitzsimmons A, Lindsay R. Osteoporosis. In: Delisa JA, Gans BM, eds. Physical Medicine and Rehabilitation, Philadelphia, Lippincott; p.1453-74, 1998.
11. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature biology, and potential applications. Stem Cells; 19(3):180-92, 2001.
12. Lian JB, Stein G. Osteoblast biology. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J, eds. Osteoporosis, San Diego, Academic Press; p.21-71, 2001.
13. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. Growth Factors; 22(4): 233-41, 2004.
14. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodelling. Calcif Tissue Int; 53 (Suppl 1):102-6, 1993.
15. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science; 289 (5484): 1504-8, 2000
16. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. New York academy of Science. Ann NY Acad Sci; 1092:385-96, 2006.
17. Burdan F, Szumi J, Korobowicz A, Farooque R, Patel S, Patel A, Dave A, Szumilo M, Solecki M, Klepacz R, Dudka J. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. Folia histochemica et cytobiologica Vol. 47, No. 1, pp. 5-16, 2009.
18. Melrose J, Smith SM, Smith MM, Little CB. The use of Histochoice for histological examination of articular and growth plate cartilages, intervertebral disc and meniscus. Biotech Histochem.; 83:47-53, 2008.
19. Netter F; The Ciba Collection of Medical Illustrations, Musculoskeletal System, Vol.1, 1987.
20. Martin JM, Rodan AG. Coupling of bone resorption and formation during bone remodeling. MarcusR, Feldman DD, Kelsey J, eds. Osteoporosis. San Diego, Academic Press; p.189-212, 2001.
21. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch Biochem Biophys. 473(2):139-46, 2008.

22. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *TRENDS in Molecular Medicine* Vol.12 No.1, 17-25, 2006.
23. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, , Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*; 89(2): 309-19, 1997.
24. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodelling. *Clin Orthop*. 250:261-76, 1990.
25. Chao KSC, Perez CA, Brady LW. Radyasyon onkolojisi tedavi kararları. Gemici C, Mayadağlı A, Parlak C (çeviri editörleri). İstanbul: Nobel tıp kitabevi; 4-5, 2004.
26. Dalinka MK, Haygood TM. Radiation changes. In: Resnick D. *Diagnosis of bone and joint disorders*. Philadelphia, Pa: Saunders, 3276-3308, 1995.
27. Oral EN. Radyoterapiye bağlı geç yan etkiler. *Remisyon Güncel Onkoloji Dergisi*;7(1):30-36, 2005.
28. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiotherapy and Oncology*; 61:223-31, 2001.
29. Perez Ca, Brady LW, Halperin EC, Schmidt-Ullrich RK. *Principles and practice of radiation oncology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins:357-60, 2003.
30. Ağaoğlu F. Çocukluk çağında uygulanan radyoterapinin büyüme-gelişme ve gonadal fonksiyonlar üzerine etkileri. *Türk Onkoloji Dergisi*, Cilt 19, Sayı 4, 2004.
31. Donaldson SS. Effects of irradiation on skeletal growth and development. In: Green DM, D'Angio GJ, eds. *Late effects of treatment for childhood cancer*. New York:Wiley Liss;63-70, 1992.
32. Blackburn J, Wells AB. Radiation damage to growing bone; the effect of x-rays doses of 100-1000 rads on mouse tibia and knee joints. *Br J Radiol*; 36:505-513, 1963.
33. Robertson WW Jr, Butler MW, D'angio GJ, Rate WR. Leg length discrepancy following irradiation for childhood tumors. *J Pediatr Orthop*; 11: 284-287, 1991.
34. Dalinka MK, Mazzeo VP. Complications of radiation therapy. *Cmit Rev Diagn Imaging*; 23:235-267, 1985.
35. Dawson WB. Growth impairment following radiotherapy in childhood. *Clin Radiol*; 19: 241-256, 1968.
36. Mitchell MJ, Logan PM. Radiation-induced changes in bone. *Radiographics*.18(5):1125-36, 1998.
37. Bluemke DA, Fishman EK, Scott WW Jr. Skeletal complications of radiation therapy. *Radiographics*. 14(1):111-21,1994.
38. DeSmet AA, Khuns LR, Fayos JV, Holt JF. Effects of radiation therapy on growing long bones. *AJR*; 127:935-939, 1976.
39. Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol*;16(3):619-33, 2006.
40. Eifel PJ, Donaldson SS, Thomas PRM. Response of growing bone to irradiation: a proposed late effects scoring system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31:1301-1307, 1995.
41. Libshitz HI, Edeiken BS. Radiotherapy changes of the pediatric hip. *AJR Am J Roentgenol*;137(3):585-8, 1981.
42. Mayfield JK, Riseborough EJ, Jaffe N, Nehme M. Spinal deformity in children treated for neuroblastoma. *J Bone Joint Surg Am* 63: 183-193, 1981.

43. Ergün H, Howland WJ. Postradiation atrophy of mature bone. *CRC Crit Rev Diagn Imaging*;12(3):225-43, 1980.
44. Takahashi S, Sugimoto M, Kotoura Y et al. Long-term changes in the haversian systems following high-dose irradiation. An ultrastructural and quantitative histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am*; 76:722–738, 1994.
45. Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol*; 41: 208-11, 2003.
46. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* ;106(5):1049-61, 2000.
47. Hiranuma H, Jikko A, Iwamoto M, Fuchihata H. Effects of X-ray irradiation on terminal differentiation and cartilage matrix calcification of rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Bone*;18(3):233-8, 1996.
48. Howland WJ, Loeffler RK, Starchman DE, Johnson RB. Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. *Radiology* 117:677–685, 1975.
49. Kaste SC. Bone-mineral density deficits from childhood cancer and its therapy. *Pediatr Radiol*; 34:373-8, 2004.
50. Bircan İ. Malign hastalıkların endokrin etkileri. In: Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoglu S (eds). *Pediatric endokrinoloji. Birinci baskı. Ankara: Pediatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları*; 623-38, 2003.
51. Canpolat C. Çocuklarda kanser tedavisinin geç etkileri. *Remisyon Güncel Onkoloji Dergisi*;7(1):37-43, 2005.
52. Goldwein JW. Effects of radiation therapy on skeletal growth in childhood. *Clin Orthop*; 262:101–107, 1991.
53. Masuda K, Reid BO, Hunter N et al. Bone growth retardation induced by single and multifractionated irradiation. *Radiother Oncol*; 18:137–145, 1990.
54. Damron TA, Spadaro JA, Tamurian RM et al. Sparing of radiation-induced damage to the physis: fractionation alone compared to amifostine pre-treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 47:1067–1071, 2000.
55. Eifel PJ, Sampson CM, Tucker SL et al. Radiation fractionation sensitivity of epiphyseal cartilage in a weanling rat model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 19:661–664, 1990.
56. Alheit H, Baumann M, Thames HD et al. Fractionation effect on radiation-induced growth retardation of tibia in rabbits and rats. *Acta Oncol*; 372:151–158, 1998.
57. Hartsell WF, Hanson WR, Conterato DJ et al. Hyperfractionation decreases the deleterious effects of conventional radiation fractionation on vertebral growth in animals. *Cancer*; 63:2452–2455, 1989.
58. Eifel PJ. Decreased bone growth arrest in weanling rats with multiple radiation fractions per day. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 15:141–145, 1988.
59. Damron TA, Spadaro JA, Tamurian RM et al. Dose response of amifostine in protection of growth plate function from irradiation effects. *Int J Cancer (Radiation Oncology Invest)*; 90:73–79, 2000.
60. Damron TA, Marguiles B, Biskup D et al. Amifostine before fractionated irradiation protects bone growth in rats better than fractionation alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 50:479–483, 2001.
61. Curran WJ. Radiation-induced toxicities: the role of radioprotectants. *Seminars in Radiation Oncology*; 8(Suppl. 1): 2–4, 1998.
62. Shaker JL, Fallon MD, Goldfarb S et al. WR-2721 reduces bone loss after hindlimb tenotomy in rats. *J Bone MinerRes*; 4:885–890, 1989.

63. Weiss J, Walker ST, Fallon M et al. In vivo and in vitro effects of WR-2721 in experimental hypercalcemia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*; 238:969–973, 1986.
64. Andreassen CN, Grau C, Lindegaard JC. Chemical radioprotection: a critical review of amifostine as a cytoprotector in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*; 13:62–72, 2003.
65. Tubiana M, Eschwege F: Conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy—Clinical data. *Acta Oncol* 39:555-567, 2000.
66. Brizel DM. Pharmacologic approaches to radiation protection. *J Clin Oncol*. 25(26):4084-9, 2007.
67. Cıtrın D, Cotrim AP, Hyodo F, Baum BJ, Krishna M, Mitchell JB, Radioprotectors and mitigators of radiation-induced normal tissue injury, *The Oncologist* (elektronik dergi), 15:360-371, 2010. Erişim: (www.TheOncologist.com).
68. Hall EJ, Giaccia AJ, *Radiobiology for the radiologist*, Sixth Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins: 5–15, 2006.
69. Von Sonntag C, *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor & Francis: 31–56, 1987.
70. Xavier S, Yamada K, Samuni AM, Differential protection by nitroxides and hydroxylamines to radiation-induced and metal ion-catalyzed oxidative damage, *Biochim Biophys Acta*; 1573:109 –120, 2002.
71. Yavuz MN, Yavuz AA, Ulku C, Sener M, Yaris E, Kosucu P, Karslioglu I. Protective effect of melatonin against fractionated irradiation-induced epiphyseal injury in a weanling rat model. *J Pineal Res*. 35(4):288-94, 2003.
72. Topkan E, Tufan H, Yavuz AA, Bacanlı D, Onal C, Kosdak S, Yavuz MN. Comparison of the protective effects of melatonin and amifostine on radiation-induced epiphyseal injury. *Int J Radiat Biol*. 84(10):796-802, 2008.
73. Yurdakök M, Bilginturan N, Özsoylu S, Yordan N. ve Çoskun T. D vitamini yetersizliğine bağlı rikets, *Katkı Pediatri Dergisi*; 11(4):345-386, 1990.
74. Burnand B, Sloutskis D. and Gionali F.: Serum 25-hydroxyvitamin D: distribution and determinants in Swiss population, *Am J Nutr* 56:537-540. 1992.
75. Karlson P. *Introduction to Modern Biochemistry*. Çeviri: Telefoncu A. Biyokimya.12 Baskı, 253, Sermet Matbaası, Kırklareli 1988.
76. Kruse K. Endocrine Control of Calcium and Bone Metabolism. In “*Clinical Pediatric Endocrinology*” Ed. Brook CGD, 3th ed, 712-743. Blackwell Science Ltd. Oxford, 1995.
77. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *J J Clin Nutr*. 80: 1689- 96, 2004.
78. Alagöl F. D Vitamini Metabolizması. *Türkiye Klinikleri J Endocrin*; 2:141-145, 2004.
79. P. Lips. Vitamin D physiology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92: 4–8, 2006.
80. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 80:1678-88, 2004.
81. Specker BL, Ho ML, Oestreich A, Yin TA, Shui QM, Chen XC, Tsang RC. A prospective study of D vitamini supplementation and rickets in China. *J Pediatr*; 120: 733–739, 1992.
82. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 391(5):1917-30, 2008.
83. İliçin G, ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G, İç Hastalıkları cilt 2 2. Baskı Ankara: Güneş Kitabevi ISBN 975- 8531- 78- 6. S:2217- 2219.
84. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 116: 2062-72, 2006.

85. Hewison M, Zehnder D, Chakraverty R, and Adams JS. Vitamin D and barrier function: a novel role for extra-renal 1 α -hydroxylase. *Mol Cell Endocrinol* 215: 31–38, 2004.
86. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*; 289(1): F8-28, 2005.
87. Zempleni J. *Handbook of vitamins*. 4th ed. CRC Press. New York. 608, 2008.
88. Kruse K; Calcium and Bone Metabolism. “Clinical Pediatric Endocrinology”. (Ed.GD Brook)’da. Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, Blackwell Scientific Publication. 487-510, 1989.
89. Aydın K, Gürlek A. Vitamin D: Metabolizma ve Etkiler. *Turkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics*;4(2):20-7, 2011.
90. Tsujikawa H, Kurotaki Y, Fujimori T, Fukuda K, Nabeshima Y. Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Mol Endocrinol*;17(12):2393-403, 2003.
91. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 83:835–9, 1995.
92. Berger U, Wilson P, McClelland RA, Colston K, Haussler MR, Pike JW. Immunocytochemical detection of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*, 67: 607–13, 1988.
93. Freidrich M, Rafi L, Tilgen W, ve ark. Expression of 1,25- dihydroxyvitamin D3 receptor in breast carcinoma. *J Histochem Cytochem*;46:1335-1337, 1998.
94. Ahonen MH, Tenkanen L, Teppo L, ve ark. Prostate cancer risk and prediagnostic serum 25- dihydroxyvitamin D3 (calcitriol). *J Urol*;159:2035-2039, 1998.
95. Kliewer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*, 355:446–9, 1992.
96. Beer T, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: From the lab to the clinic. *Mol Cancer Ther*. 3(3):373–381, 2004.
97. Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 4: 46-56, 2003.
98. Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov*; 3: 27-41, 2004.
99. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr*; 69: 842-856, 1999.
100. Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN. Inactivation of the 25-hydroxy vitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem*;279(16):16754-66, 2004.
101. Halloran, B.P., DeLuca, H.F. Effect of vitamin D deficiency on skeletal development during early growth in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* 209, 7–14, 1981.
102. Khasla S, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. In Favus MJ (ed). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 4. edition, Lippincott Williams Wilkins,:128–134, 1999.
103. Li YC, Amling M, Pirro AE, Priemel M, Meuse J, Baron R, Delling G, and Demay MB. Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology* 139: 4391–4396, 1998.
104. Anderson P, Atkins G. The skeleton as an intracrine organ for vitamin D metabolism. *Molecular Aspects of Medicine* 29: 397–406, 2008.

105. Atkins, G.J., Kostakis, P., Pan, B., Farrugia, A., Gronthos, S., Evdokiou, A., Harrison, K., Findlay, D.M., Zannettino, A.C., RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J. Bone Miner Res.* 18 (6), 1088–1098, 2003.
106. Khasla S, Kleerekoper M. Biochemical markers of bone turnover. In Favus MJ (ed). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 4. edition, Lippincott Williams Wilkins, 128–134 1999.
107. Aurbach GD, Marx SJ, Spiegel AM. *Metabolic Bone Disease*. In Wilson JD, Foster DW (ed). *Williams Textbook of Endocrinology* 8. edition. Philadelphia: WB Saunders Company Pres, 1477–1517, 1992.
108. Demay, M. B., Roth, D. A. & Kronenberg, H. M. Regions of the rat osteocalcin gene which mediate the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on gene transcription. *J. Biol. Chem.* 264: 2279-2282, 1989.
109. Boyle WJ, Simonet WS, and Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–342, 2003.
110. Kitazawa S, Kajimoto K, Kondo T, and Kitazawa R. Vitamin D₃ supports osteoclastogenesis via functional vitamin D response element of human RANKL gene promoter. *J Cell Biochem* 89: 771–777, 2003.
111. Kondo T, Kitazawa R, Maeda S, and Kitazawa S. 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. *J Bone Miner Res* 19: 1411–1419, 2004.
112. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *New Engl J Med*:320: 980–991, 1989.
113. Boyan B.D., Schwartz Z., in: Feldman D. , J.W. Pike, F.H. Glorieux (Eds.), *Vitamin D*, second ed., Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 575–597 2005.
114. Boyan BD, Schwartz Z, Carnes DL Jr, Ramirez V. The effects of vitamin D metabolites on the plasma and matrix vesicle membranes of growth and resting cartilage cells in vitro. *Endocrinology*. 122(6):2851-60, 1988.
115. Arnaud R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15;473(2):225-30, 2008.
116. Schwartz Z, Dean DD, Walton JK, Brooks BP, Boyan BD. Treatment of resting zone chondrocytes with 24,25-dihydroxyvitamin D₃ [24,25-(OH)₂D₃] induces differentiation into a 1,25-(OH)₂D₃-responsive phenotype characteristic of growth zone chondrocytes. *Endocrinology*. 136(2):402-11, 1995.
117. Swain LD, Schwartz Z, Caulfield K, Brooks BP, Boyan BD. Nongenomic regulation of chondrocyte membrane fluidity by 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ is dependent on cell maturation. *Bone*. 14(4):609-17, 1993.
118. Schwartz Z, Swain LD, Ramirez V, Boyan BD. Regulation of arachidonic acid turnover by 1,25-(OH)₂D₃ and 24,25-(OH)₂D₃ in growth zone and resting zone chondrocyte cultures. *Biochim Biophys Acta*. 1027(3):278-86, 1990.
119. Sylvia VL, Schwartz Z, Schuman L, Morgan RT, Mackey S, Gomez R, Boyan BD. Maturation-dependent regulation of protein kinase C activity by vitamin D₃ metabolites in chondrocyte cultures. *J Cell Physiol*. 157(2):271-8, 1993.
120. Lin R, Amizuka N, Sasaki T, Aarts MM, Ozawa H, Goltzman D, Henderson JE, White JH. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *J Bone Miner Res*. 17(9):1604-12, 2002.
121. Takamoto M, Tsuji K, Yamashita T, Sasaki H, Yano T, Taketani Y, Komori T, Nifuji A, Noda M. Hedgehog signaling enhances core-binding factor a1 and receptor

- activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) gene expression in chondrocytes. *J Endocrinol.* 177(3):413-21, 2003.
122. Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, Van Looveren R, Maes C, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest.* 116(12):3150-9. 2006.
 123. Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res.* 64(4):157-65. 2005.
 124. Dean DD, Boyan BD, Schwart Z, Muniz OE, Carreno MR, Maeda S, Howell DS: Effect of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 24R,25- dihydroxyvitamin D3 on metalloproteinase activity and cell maturation in growth plate cartilage in vivo. *Endocrine* 14: 311–323, 2001.
 125. Donohue MM, Demay MB: Rickets in VDR null mice is secondary to decreased apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Endocrinology.* 143: 3691–3694, 2002.
 126. Amling M, Priemel M, Holzmann T, Chapin K, Rueger JM, Baron R, Demay MB: Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology.* 140: 4982–4987, 1999.
 127. Underwood JL, DeLuca HF: Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol.* 246:E493–E498, 1984.
 128. Lidor C, Atkin I, Ornoy A, Dekel S, Edelstein S: Healing of rachitic lesions in chicks by 24R,25- dihydroxycholecalciferol administered locally into bone. *J Bone Miner Res* 2: 91–98, 1987.
 129. Boyan BD, Sylvia VL, Dean DD, Del Toro F, Schwartz Z: Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1alpha,25-(OH)2D3 and 24R,25-(OH)2D3 involves cell-maturation specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13: 143–154, 2002.
 130. Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, Larsson D, Hardin RR, Bingham V, Lopez D, Dean DD, Boyan BD: 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen- activated protein kinase. *Endocrinology.* 143: 2775–2786, 2002.
 131. Andreen O, Larsson SE. Effects of parathyroidectomy and vitamin D on fracture healing. *Fracture biomechanics in rats after parathyroidectomy and treatment with 1,25-dihydroxycholecalciferol.* *Acta Orthop Scand*;54: 805-9, 1983.
 132. Lindholm TS, Sevastikoglou JA. The effect of 1alphahydroxycholecalciferol on the healing of experimental fractures in adult rats. *Acta Orthop Scand*;49:485-91, 1978.
 133. Omeroglu H, Ates Y, Akkus O, Korkusuz F, Bicimoglu A, Akkas N. Biomechanical analysis of the effects of single high-dose vitamin D3 on fracture healing in a healthy rabbit model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 116:271–4, 1997.
 134. Omeroglu S, Erdogan D, Omeroglu H. Effects of single high-dose vitamin D3 on fracture healing. An ultrastructural study in healthy guinea pigs. *Arch Orthop Trauma Surg* 116:37-40, 1997.
 135. Aslan B, Kalacı A, Bozlar M, Atik E, Yanat N, Taşçı A. Effects of vitamin D3 and calcium on fracture healing in rats. *Turkiye Klinikleri J Med Sci,* 26:507-513, 2006.
 136. Seo, E.G., Norman, A.W., Three-fold induction of renal 25-hydroxyvitamin D3–24-hydroxylase activity and increased serum 24, 25-dihydroxyvitamin D3 levels are correlated with the healing process after chick tibial fracture. *J. Bone Miner. Res.* 12, 598–606, 1997.

137. Arnaud R, St, Naja R.P. Vitamin D metabolism, cartilage and bone fracture repair. *Molecular and Cellular Endocrinology* 347;48–54, 2011.
138. Li T, Yu YT, Wang J, Tang TS. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates bone neovascularization by enhancing the interactions of osteoblasts-like cells and endothelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 86(3):583-8, 2008.
139. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV Jr, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci US*. 99:9656–9661, 2002.
140. Schlaeppli JM, Gutzwiller S, Finkenzeller G, Fournier B. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces the expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Endocr Res*; 23:213–229, 1997.
141. Stern PH. Vitamin D and bone. *Kidney Int Suppl*; 29:17-21, 1990.
142. Brown AJ, Zhong M, Finch J, Ritter C, and Slatopolsky E. The roles of calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the regulation of vitamin D receptor expression by rat parathyroid glands. *Endocrinology* 136: 1419–1425, 1995.
143. Liu W, Yu WR, Carling T, Juhlin C, Rastad J, Ridefelt P, Akerstrom G, and Hellman P. Regulation of gp330/megalyn expression by vitamins A and D. *Eur J Clin Invest* 28: 100–107, 1998.
144. Friedman PA and Gesek FA. Vitamin D3 accelerates PTH-dependent calcium transport in distal convoluted tubule cells. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 265: F300–F308, 1993.
145. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, et al. Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci USA*;76:4990-94, 1981.
146. Akther J, Goerdel M, Morris DL, Vitamin D3 analog (EB1089) inhibits in vitro cellular proliferation of human colon cancer cells. *Br J Surg* 83:229-30, 1996.
147. Polar MK, Gennings C, Park M, et al. Effect of vitamin D3 analog ILX 23-7553 on apoptosis and sensitivity to fractionated radiation in breast tumor cells and normal human fibroblasts. *Cancer Chemother Pharmacol*; 51:415-421, 2003.
148. Garland C, Shekelle R, Barrett-Connor E. Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer. A 19-year prospective study in men. *Lancet* 1985;1:307-309
149. Garland FC, Garland CF, Gorham ED, Young JF. Geographic variation in breast cancer mortality in the United States: a hypothesis involving exposure to solar radiation. *Prev Med*; 19:614-622, 1990.
150. John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I Epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*; 8:399-406, 1999.
151. Freedman LP. Transcriptional targets of the vitamin D3 receptor-mediating cell cycle arrest and differentiation. *J Nutr*;129(2S Suppl):581-586,1999.
152. Beer TM, Myrthue A. Calcitriol in cancer treatment: From the Lab to the Clinic. *Mol Cancer Ther*; 3:371-381, 2004.
153. Park W.H, Seol JG, Kim ES, Hyun JM, Jung CW, Lee CC, Binderup L, Koeffler HP, Kim BK, Lee YY. Induction of apoptosis by vitamin D3 analogue EB1089 in NCI-H929 myeloma cells via activation of caspase 3 and p38 MAP kinase. *Br J Haematol*; 109: 576-583, 2000.
154. Simboli-Campbell, Narvaez C.J, Tenniswood M, Welsh J. 1,25Dihydroxyvitamin D3 induces morphological and biochemical markers of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 58: 367-376, 1996.

155. Vandewalle B, Wattez N, Lefebvre J. Effects of vitamin D3 derivatives on growth, differentiation and apoptosis in tumoral colonic HT 29 cells: possible implication of intracellular calcium. *Cancer Lett*; 97: 99-106, 1995.
156. Guzey M, Kitado S, Reed JC. Apoptosis induction by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*; 1: 667-77, 2002.
157. Eltsner E, Linker- Israeli M, Umiel T, Le J, Grillier I, Said J, Shintaku IP, Krajewski S, Reed JC, Binderup L, Koeffler HP.. Combination of potent 20-epi-vitamin D3 analogue (KH 1060) with 9-cis-retinoic acid irreversibly inhibits clonal growth, decreases bcl-2 expression and induces apoptosis in HL-60 leucemic cells. *Cancer Res*; 56: 3570-3576, 1996.
158. Beer TM, Hough KM, Garzotto M, Lowe BA, Henner WD. Weekly high dose calcitriol and docetaxel in advanced prostate cancer. *Semin Oncol*; 28:49-55, 2001.
159. Moffatt KA, Johannes WU, Miller GJ. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) and platinum drugs act synergistically to inhibit the growth of prostate cancer cell lines. *Clin Cancer Res*; 5: 693-703, 1999.
160. Ahmed S, Johnson CS, Rueger RM, ve ark. Calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) potentiates activity of mitoxantrone/ dexamethasone in an androgen independent prostate cancer model. *J Urol*; 168; 756-761, 2002.
161. Dunlap N, Schwartz GG, Eads D Cramer SD, Sherk AB, John V, Koumenis C.. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) and its analogue, 19-1, 25-(OH) 2D2, potentiate the effects of ionizing radiation on human prostate cancer cells. *Br J Cancer*; 89: 746-53, 2003.
162. Hsiao M, Tse V, Carmel J, ve ark. Functional expression of human p21 (WAF1/CIP1) gene in rat glioma cells suppresses tumor growth in vivo and induces radiosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun*; 233: 329-335, 1997.
163. Gewirtz D.A, Gupta M.S ve Sundaram S. Vitamin D3 and Vitamin D3 analogues as an adjunct to cancer chemotherapy and radiotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents*; 2: 683-690, 2002.
164. Welsh J, Simboli-Campbell M, Narvaez C.J, Tenniswood M. Role of apoptosis in the growth inhibitory effects of vitamin D in MCF-7 cells. *Adv Exp Med Biol*; 375: 45-52, 1995.
165. Narvaez C.J, Zinser G ve Welsh J. Functions of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) in mammary gland: From normal development to breast cancer. *Steroids*; 66: 301-308, 2001.
166. Boltz-Nitulescu G, Willheim M, Spittler A, Leutmezer F, Tempfer C, Winkler S. Modulation of IgA, IgE, and IgG Fc receptor expression on human mononuclear phagocytes by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines. *Journal of Leukocyte Biology*. 58:256-262, 1995.
167. Rigby WFC. The immunobiology of vitamin D. "Immunology Today".9:54-58, 1988.
168. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisyle-grand)*;49:277-300, 2003.
169. Ardeniz O. Vitamin D ve İmmun Sistem. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 28:198-205, 2008.
170. Tuberculosis and vitamin D deficiency. *J Assoc Physicians India*;50:554-8, 2002.
171. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr*;125(6 Suppl):1704S- 8S, 1995.
172. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*; 357: 266-281, 2007.
173. Graham MM, Evans ML, Dahlen DD, ve ark. Pharmacological alteration of the lung vascular response to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 19:329-339, 1990.

- 174.Hinkel CL. The effect of roentgen rays upon the growing long bones of albino rats. II. Histopathological changes involving endochondral growth centers. *AJR*; 49:321–348, 1943.
- 175.Kember NF, Coggins J. Changes in the vascular supply to rat growth cartilage during radiation injury and repair. *Int J Radiol Biol*; 12:143–151, 1967.
- 176.Trémezaygues L, Seifert M, Vogt T, Tilgen W, Reichrath J. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates effects of ionizing radiation (IR) on human keratinocytes: in vitro analysis of cell viability/proliferation, DNA-damage and -repair. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121(1-2): 324–327, 2010.
- 177.Specker BL, ve Ho ML. Prospective study of vitamin D supplementation and in China. *J Pediatr*. 120:733-739, 1992.
- 178.American Academy of Pediatrics: Section on Breastfeeding ve Committee on Nutrition. Prevention of Rickets and Vitamin D Deficiency: New Guidelines for Vitamin D Intake. *Pediatrics*; 4:111, 2003.
- 179.The ABC of vitamin D a primer for physicians Susie Langley. *Medical post*. Toronto: vol43, Iss. Pg. 23, 1pgs, 2007.

