

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİYETLE YÜKSEK FOSFOR ALIMININ
KEMİK METABOLİZMASI VE VASKÜLER DEĞİŞİKLİKLER
ÜZERİNE ETKİSİNDE CİNSİYETİN ROLÜ**

DR. TUBA ŞAHİN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**KOCAELİ
2020**

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİYETLE YÜKSEK FOSFOR ALIMININ
KEMİK METABOLİZMASI VE VASKÜLER DEĞİŞİKLER
ÜZERİNE ETKİSİNDE CİNSİYETİN ROLÜ**

DR. TUBA ŞAHİN

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. NURBAY ATEŞ

**Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.**

Proje No: 2019/6

Etik Kurul Onay Tarihi: 28.02.2019

Karar No: KOÜ HAYDEK 2/3-2019

İÇİNDEKİLER DİZELGESİ

İÇİNDEKİLER DİZELGESİ	2
TEŞEKKÜR	5
KISALTMALAR DİZELGESİ	6
TABLolar DİZELGESİ	7
ŞEKİLLER DİZELGESİ	9
1. GİRİŞ VE AMAÇ	11
2. GENEL BİLGİLER	12
2.1. Fosforun Öyküsü	12
2.2. Vücutta Fosforun İşlevleri.....	14
2.3. Gıdalardaki Fosfor Tipleri ve Fizyolojik Etkileri	16
2.3.1. Doğal (Organik) Fosfor.....	16
2.3.1.1. Bitki Protein ve Fitatlarından Fosfor.....	16
2.3.1.2. Hayvansal Gıdalardan Fosfor.....	17
2.3.2. Fosforlu Katkı Maddeleri (İnorganik) Fosfor.....	17
2.4. Genel Fosfat Homeostazisi.....	24
2.5. Fosfatın Bağırsaklar aracılığıyla düzenlenmesi	25
2.6. Fosfatın Böbrekler aracılığıyla düzenlenmesi.....	27
2.7. Fosfatın kemikler aracılığı ile düzenlenmesi	28
2.7.1. Kemik Remodelling Sürecinin Hücreleri: Başlıca Oyuncular.....	28
2.7.2. Kemik Yeniden modellenme aşamaları ve düzenlenmesi.....	30
2.7.3. RANK / RANKL / OPG ve Vasküler Kalsifikasyon.....	33
2.7.4. Vasküler Kalsifikasyonun Patofizyolojisi, Fosfatın Rolü.....	35
2.7.5. Vasküler Kalsifikasyon ve Osteoporoz, Cinsiyetin Rolü.....	36
2.8. Fosfor Homeostazisinin Hormonal Düzenlenmesi: Paratiroid Hormon, Fibroblast Büyüme Faktörü 23 (FGF23) ve Klotho.....	37
2.9. FGF23-Klotho Aksı	38
2.10. Parathormon-VİTAMİN D Aksı	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Hayvanların Eldesi	41
3.2. Yemlerin Eldesi.....	41
3.3. Kan basıncı ölçümü.....	42
3.4. Hayvanlardan serum ve doku eldesi.....	42
3.5. ELISA Kitlerinin Çalışılması	43
3.6. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	44
3.8. Realtime PCR.....	45
3.9. Histojik görüntüleme için aort dokularının hazırlanması.....	45
3.10. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1. Kan Basıncı Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	47
4.2. Histolojik Görüntülemenin Değerlendirilmesi.....	48
4.3. Kan Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	53
4.4. Real- Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	60

5. TARTIŞMA.....	65
6. SONUÇLAR.....	73
7. ÖZET.....	74
8 ABSTRACT.....	76
9. KAYNAKLAR.....	78



TEŞEKKÜR

Tıpta Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden itibaren beni merakım doğrultusunda araştırma yapabilmem için teşvik eden, eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam ve tez danışmanım, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. Nurbay ATEŞ'e,

Tez çalışmamın hiç bir aşamasında desteğini esirgemeyen, özellikle ratlarda kan basıncı ölçümü ve sonuçların değerlendirilmesi konusunda büyük emeği olan, mesai saatleri dışında bile her zaman yardımcı olmaya çalışan, değerli hocam, Doç.Dr. Ayşe KARSON'a,

Çalışmalarım süresince bana engin bilgileriyle katkıda bulunan ve yönlendiren değerli hocalarım Prof.Dr.Deniz ŞAHİN ve Doç. Dr.Gül İLBAY'a,

Histolojik kesitlerin incelenmesinde emek veren değerli hocam Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK'e, ELISA çalışmalarında emeklerinden ötürü değerli hocam Prof. Dr. Hale Maral KIR'a, Arş. Gör. Fatih HUNÇ ve Esra ACAR'a, parafin bloklara doku gömme aşamasında laboratuvarlarını kullanmama izin veren Histoloji Anabilim Dalına ve yardımcı olan Arş. Gör. Selenay FURAT RENÇBER'e,

Real-Time PCR çalışmalarını yürüten, güler yüzünü ve ilgisini esirgemeyen, kendisiyle çalışmaktan inanılmaz keyif aldığım, değerli hocam, Dr. Öğretim Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI ve yardımlarından ötürü tüm KÖGEM ekibine ve değerli hocam Prof.Dr. Yusufhan YAZIR'a,

Projemizi destekleyen Kocaeli Üniversitesi BAP birimine ve mesai saatleri içerisinde çalışmalarımızı bitiremediğimizde bize anlayışla yaklaşan DETAB çalışanlarına,

Çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım; Fazilet DEDE, Elif Büşra GÖKCEN, Müge SARPER KAHVECİ, Sertan ARKAN, Sabriye KARADENİZLİ'ye,

Beni Kocaeli'nde yalnız hissettirmeyen sevgili komşularım Zeynep, Aslı, Yonca, Rabia ve aynı zamanda kütüphane arkadaşım olan Güler 'e ve bu zorlu süreçte bana destek olan canım aileme çok teşekkür ederim.

Dr. Tuba Şahin

KISALTMALAR DİZELGESİ

1,25 (OH) 2 D3	1,25-Dihidroksi Vitamin D3
ADI	Günlük Alınabilir Doz
cDNA	Komplementer DNA
DRI	Diyet Referans Değerleri
EAR	Tahmini Ortalama Gereksinim
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
P	Fosfor Atomu
PO4	Fosfat Molekülü
GFR	Glomerüler Filtrasyon Hızı
NFD	Normal Diyet ile Beslenen Dişi Kontrol
NFE	Normal Diyet ile Beslenen Erkek Kontrol
PTH	Paratiroid Hormonu
RANK	Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B
RANKL	Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B Ligand
RDA	Tavsiye Edilen Diyet Payı
SCOGS	Gras Maddeleri Seçim Komitesi
NaPiIIb	Tip 2 Sodyum Fosfat Kotransporter
YFD	Yüksek Fosforlu Diyet ile Beslenen Dişiler
YFE	Yüksek Fosforlu Diyet ile Beslenen Erkekler
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar DİZELGESİ

Tablo 1. GRASa maddeleri içeren yaygın olarak kullanılan fosfatın alfabetik listesi ve bunların SCOGSb güvenlik puanı

Tablo 2. Gen ekspresyon analizi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.

Tablo 3. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kan basıncı değerleri üzerine etkisi

Tablo 4. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin PTH değerleri üzerine etkisi

Tablo 5. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FGF-23 değerleri üzerine etkisi

Tablo 6. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin 1,25 di-OH vitamin D değerleri üzerine etkisi

Tablo 7. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Klotho değerleri üzerine etkisi

Tablo 8. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin OPG değerleri üzerine etkisi

Tablo 9. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FETU-a değerleri üzerine etkisi

Tablo 10. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Conc. TRAP değerleri üzerine etkisi

Tablo 11. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin DPD değerleri üzerine etkisi

Tablo 12. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Fosfor değerleri üzerine etkisi

Tablo 13. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Trigliserit değerleri üzerine etkisi

Tablo 14. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Tablo 15. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Tablo 16. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Tablo 17. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Tablo 18. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Tablo 19. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi



ŞEKİLLER DİZELGESİ

Şekil 1. Gıda işlemede kullanılan fosfat tuzlarının fosfat parçalarının çeşitli kimyasal formlarının (orto-, piro-, polifosfatlar) yapısı

Şekil 2. Kan basıncı ölçümü sırasında alınan cerrahi işlem görüntüsü

Şekil 3. Aort dokusu ve kullanılan kısımlar

Şekil 4. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kan basıncı değerleri üzerine etkisi

Şekil 5. NFD, NFE, YFD ve YFE grupları media tabakası kalınlık ölçüm (μm) sonuçları.

Şekil 6. Normal diyet ile beslenen dişi kontrol (NFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 7. Normal diyet ile beslenen erkek kontrol (NFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 8. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen dişi (YFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 9. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen erkek (YFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 10. Normal diyet ile beslenen dişi kontrol (NFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 11. Normal diyet ile beslenen erkek kontrol (NFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 12. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen dişi (YFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 13. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen erkek (YFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı.

Şekil 14. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin PTH değerleri üzerine etkisi

Şekil 15. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FGF 23 değerleri üzerine etkisi

Şekil 16. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin 1,25 di-OH vitamin D değerleri üzerine etkisi

Şekil 17. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Klotho değerleri üzerine etkisi

Şekil 18. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin OPG değerleri üzerine etkisi

Şekil 19. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FETU-a değerleri üzerine etkisi

Şekil 20. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Cocn. TRAP değerleri üzerine etkisi

Şekil 21. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin DPD değerleri üzerine etkisi

Şekil 22. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Fosfor değerleri üzerine etkisi

Şekil 23. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Trigliserit değerleri üzerine etkisi

Şekil 24. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 25. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 26. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 27. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 28. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Şekil 29. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda diyetle fosfor alımı, işlenmiş gıdaların tüketimi ile birlikte artış göstermiştir. Birçok ülkede, fosfor tuzları, gıda katkı maddeleri olarak gıdalara ilave edildiği için, ihtiyaç duyulandan daha yüksek oranda günlük fosfor alınmaktadır. Özellikle ‘fastfood’ tarzı besinler yüksek miktarda fosforlu katkı maddeleri içermektedir.

Fizyolojik fosfat homeostazisi, 1,25 (OH) 2D, paratiroid hormonu (PTH) ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) dahil olmak üzere birçok hormon tarafından düzenlenmektedir. Bu düzenleme, temel olarak kemik-böbrek-paratiroid bezin etkileşimlerini içermektedir.

Yüksek fosfor (P) alımının kemik sağlığı üzerine negatif etkileri olabileceği bilinmektedir. Yüksek serum fosfat seviyesinin ayrıca kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktörü olduğu hipertansiyon ve diyabet dahil olmak üzere diğer geleneksel kardiyovasküler hastalıklar için risk oluşturabilecek faktörler arasında sayılabileceği gösterilmiştir. Yüksek serum fosfat seviyelerinin kalp ve damar hastalığı ile ilişkisinin, cinsiyete göre değişkenlik gösterdiği keşfedilmiştir. Birçok epidemiyolojik çalışma vasküler kalsifikasyon, bozulmuş kemik metabolizması ve artan mortalite arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu ilişkiyi, osteoporoz ve vasküler kalsifikasyonun yaşlanmanın değiştirilemeyen bozuklukları olarak düşünüp göz ardı etmek doğru bir yaklaşım değildir. Genel popülasyonda günümüz tüketim alışkanlıkları ile artmış durumda olan diyetle yüksek fosfat alımının cinsiyete ve yaşa özgü ilişkiye katkıda bulunan mekanizmalarını tanımlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda yüksek serum fosfatının cinsiyet ile kardiyovasküler sistem ve kemik metabolizması üzerindeki ilişkisini araştırmak amaçlanmıştır. Yüksek fosforlu diyet ile beslenmenin genç yetişkin dişi ve erkeklerdeki PTH, D vitamini kemik turnover belirteçleri ve damar ve kemikteki RANK/RANKL/OPG sistemi ve kan basıncı üzerine olan etkisi araştırılarak olası mekanizmalar açığa çıkarılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fosforun Öyküsü

Antik Yunanda 'Fosfor' Venüs gezegeninin ismiydi, 'ışık taşıyıcı' olarak tercüme edilen kelimelerden türetilmiştir. Fosfor, 17. yüzyılda, felsefe taşı (metallerin, gümüşe veya altına dönüşmesini sağlayacağına inanılan bir madde) bulmaya çalışan amatör bir simyacı olan Hennig Brandt tarafından keşfedilmiştir. İdrar üzerinde çalışan, etrafındaki insanlardan litrelerce idrar toplayan Hennig Brandt, kendince yanlılık yaptığı bir deneyde, soluk yeşil bir ışık yayan parlak bir madde oluşmasına neden oldu. Bu yeni madde kendiliğinden oksijenle reaksiyona giriyor, herhangi bir ısı üretmeden ışık veriyordu. Fosfor ışıldama özelliği nedeniyle ilk başlarda bir kraliyet eğlencesiydi. İlk kullanımları arasında tıbbi ilaç yapımı da vardır; fakat terapötik olarak nispeten düşük etkinliği nedeniyle, fosforun ilk büyük ticari kullanımı 19. yüzyılda kibrit endüstrisindeki. Kibrit üretiminde çalışan işçilerde, çene kemiğinin ciddi nekrozu ile karakterize, tıp literatüründe "fossy jaw" olarak tarihe geçen duruma sebep olmuştur.[1][2][3]

Fosfor, askeri mühimmat bileşeni olarak da tarih sahnesinde karşımıza çıkmaktadır. I. Dünya Savaşında birlik hareketlerini gizlemek amacıyla bir duman perdesi yaratmak için; II. Dünya Savaşı sırasında ise, Molotof kokteyllerinin yapımında ve sinir gazı üretiminde kullanılmıştır.(Emsley J,2000)

İnsanlığa en kalıcı mirası ise muhtemelen tarımda yaygınlaşması ile olmuştur. On yedinci yüzyıldaki keşfinden önce bile, insanlar dolaylı olarak insan ve hayvan dışkısını toplayıp toprağın verimliliğini artırmak için tarlalara uygulayarak fosfor kullanmışlardır. Bu düzen, insanların ve hayvanların gıdalarla fosfor tükettiği ve daha sonra bu fosforun çoğunu gübre olarak tarlalara dolayısıyla toprağa geri kazandırdığı bir fosfor döngüsü oluşturuyordu.[4]

Önceleri, fosfor kaynağı olarak kemik külü kullanılırken, 20. yüzyılda, fosforun kaya yataklarından madencilik ile büyük miktarlarda elde edilmesi ve sülfürik asit ile işlenerek gübre olarak kullanılması, elde edilen mahsulü devasa ölçüde arttırmış, bu durum, daha sonra "Yeşil Devrim" olarak anılacak tarım devriminin bir parçası olarak kabul edilmiştir.[4]

Yeşil Devrim veya Üçüncü Tarım Devrimi, 1950 ile 1960'ların sonu arasında meydana gelen ve özellikle nüfusu gittikçe artan gelişmekte olan ülkelerde mahsul veriminin artırılmasıyla sonuçlanan; kimyasal gübreler, ilaçlama, sulama teknikleri ve mekanizasyon

gibi yenilikleri ifade etmektedir. Günümüzde fosfor, küresel gıda arzını desteklemede neredeyse vazgeçilmez hale gelmiştir. [5]

Bununla birlikte, fosforun madenden çıkarıldığı, sonrasında ise tekrar toprağa geri dönüşümü çok az olan kanalizasyonlarda kaybolduğu bu yapay tek yönlü sistemde döngü tamamlanamamaktadır. Sanayi Devrimi sırasında, kırsal bölgelerden büyük şehirlere doğru kitleler halindeki göçler, büyük halk sağlığı sorunlarını da beraberinde getirdi. Bunlardan biri de insan atıklarının nasıl güvenli ve verimli bir şekilde temizleneceği idi. Bu, nihayetinde, arazi bazlı imha yerine, su bazlı modern sanitasyon sistemlerinin geliştirilmesine yol açtı. Fakat, fosfor artık toprağa geri gönderilmeyip bunun yerine su bazlı kanalizasyon sistemlerinde bertaraf edildiğinden fosfor döngüsü de bozulmuştur. Bu durum, fosforun yakında sınırlı bir kaynak haline gelebileceği ve hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hızla artan nüfusu beslemek için gerekli tarımsal faaliyetleri tehdit edebileceği anlamına gelmektedir. Fosfor kıtlığının gelecekte tehdit edici bir unsur olmaması için, hem gıda arzında (tarımda veya gıda katkı maddesi olarak) hem temizlik malzemelerinde fosfor kullanımını azaltma çabaları arttırılmalı, hem de kullanılan fosforun insan ve hayvan atıklarından geri dönüştürmek için yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir.[6]

Son dönemde ise fosforun, gıdaların işlenmesi ve tüketiciye ulaşması aşamalarını yönlendiren önemli bir madde olarak, gıda katkı maddelerinde kullanımının giderek yaygınlaşmasına tanıklık etmekteyiz. Geçen yüzyıl boyunca, gıda işlemedeki teknik gelişmeler, gıdaların güvenliğini, lezzetini arttırmış, hazırlanması kolaylaşmış, birçok ciddi malnutrisyon kaynaklı hastalığının azalmasını sağlamıştır. Bununla birlikte, yirmi birinci yüzyılda, gıda işleme alanındaki bu teknolojik gelişmelerin bir kısmının, birçok insanın karşılaştığı ciddi halk sağlığı sorunlarına katkıda bulunabileceği fark edilmiştir.[7]

Yiyeceklere fosfat ilave edilmesinin yaygın olarak uygulanması ve bu konudaki genel bir farkındalık eksikliği, doğrudan fosfat tüketiminin artmasına sebep olmuş ve fosfat toksisitesinin neden olduğu tıbbi sorunların önemini arttırmıştır. Birçok gıdada doğal olarak fosfor bulunmaktadır, fakat işleme sırasında fosfat içeren gıda katkı maddeleri ilavesi sebebiyle, genel gıda tedarikindeki fosfor içeriği artmıştır. Çalışmaların birçoğunda yüksek fosfat seviyelerinin hem sağlıklı görünen bireyler hem de kalp, kemik veya böbrek hastalığı gibi diğer hastalıklarından muzdarip hastalar için olumsuz sağlık etkileri olabileceği bildirilmektedir. Fosfor maruziyetindeki bu değişikliklerin sadece hastaların değil, genel popülasyon için sağlık risklerinin değerlendirilmesi, gerekli önerileri yapılması gerekmektedir.[8] [9]

Uluslararası bir konferans 'the International Dietary Phosphorus Consensus Conference' 26 Haziran 2012'de ABD'de, doğal ve katkılı gıdalardaki fosforun , böbrek, kalp, kemik, mineral bozuklukları ve kanser hastalıklarındaki rolünü incelemek için toplanmıştır.

Fosfat toksisitesinin küresel bir sağlık krizi haline gelmesini engellenmesi için önlemler alınması gerektiği klinisyenler ve bilim insanları tarafından dile getirilmektedir. Fosforun biyolojik sistemleri etkilediği sayısız yol hakkındaki bilgi düzeyimiz, ilk keşfinden bu yana katlanarak artmıştır, fakat bir toksisite ajanı olarak ortaya çıkması onun hakkında öğrenmemiz gereken hala çok şey olduğunu ve insanlık tarihinde fosforun rolünün bitmediğini düşündürmektedir.

2.2.Vücutta Fosforun İşlevleri

Fosfat alımı, sağlıklı bir diyetin parçası olarak kabul edilir ve toplum genelinde yaygın olarak tüketilen yumurta, süt, et, balık, fındık gibi gıda kaynaklarından kolayca ve bol miktarda elde edilebilir. Birçok sağlıklı ve doğal gıdada bulunabildiği gibi, katkı maddeleri ve koruyucu maddeler içeren gıdalarda da bulunur.[10] [2]

Diyetle fosfor alımının genel olarak işlevi iskelet büyümesini ve yeniden modellenmesini desteklemek, boşaltım yoluyla gerçekleşen kayıpları yerine koymak, hücre dışı sıvıda normal bir fosfor seviyesini korumaktır. Hayatın hızlı bir büyüme ile karakterize olan erken dönemlerinde, yeterli fosfat alımı, kemik mineral oluşumu ve enerji metabolizması için kritiktir. Gıda kaynaklarından karşılanması kolay olsa da, yetersiz beslenme riski yüksek olan belirli hasta popülasyonlarında (örn., kronik alkolizm) ve yeniden beslenme sendromunda fosfor eksikliği ciddi bir sorundur [11][12].

Mevcut literatürde fosfor ve fosfat terimlerinin genellikle birbirlerinin yerine kullanıldığı görülmektedir. Klinik uygulamada normalde çok az önemi olan bu terminoloji, aslında bilimsel olarak aynı şeyi ifade etmez.

Fosfor terimi genellikle 30.97 g / mol molar kütleyle sahip fosfor atomunu (P) ifade eder. Oldukça reaktif olduğu için nadiren kendi başına doğada bulunur, ancak bunun yerine normalde iyonik formda dört oksijen atomu ile beraber yani fosfat molekülünde (PO₄) bulunur. Fosfor, vücut boyunca her yerde fosfat olarak dağılmış yaygın bir anyondur. Fosfat terimi PO₄ bileşiğini tanımlamak için kullanılmaktadır.[13]

Biyolojik sistemlerde Pi, organik veya inorganik formlarda, çeşitli organik esterlerle, kalsiyum, magnezyum veya sodyum gibi mono- veya iki değerlikli katyonlarla beraber

veya H_2PO_4 veya HPO_4 'ya sahip serbest (esterlenmemiş) formlar içerisinde de bulunabilir. Hücre dışı sıvıda ise fosfor ağırlıklı olarak inorganik formda bulunur.[14]

Fosfor, makul miktarlarda alındığında vücuda zararlı değildir. Aslında, normal hücresel fonksiyon için gereklidir ve insan vücudunda bol miktarda bulunur. İnsan yetişkin vücudu ağırlıkça yaklaşık %1 fosfordur (10 g/kg). Vücuttaki fosfor hem inorganik (Pi) hem de organik katyonlara bağlıdır, ancak neredeyse hepsi vücutta oksijene fosfat olarak oksijene bağlanır (PO_4) [15]

İnsan vücudundaki fosfatın yaklaşık %85'i hidroksiapatit denilen kalsiyum fosfat tuzu şeklinde kemik ve dişlerde bulunurken, geri kalanı, hücre metabolizmasında temel roller oynayan fosfat bileşikleri olarak dağılmış haldedir. [16]

Hücre zarlarında bulunan fosfolipitler fosfat içerir, fosfoproteinlerin, fosfoglikanların ayrıca nükleik asitlerin (DNA ve RNA) de yapısında bulunmaktadır. Fosfatın bir molekülden eklenmesi veya çıkarılması, fosforilasyon ve defosforilasyon olarak bilinir. Bu işlem, hücrelerde kimyasal depolama ve enerjinin serbest bırakılmasını ve birçok enzim, hormon ve ikinci habercinin düzenlenmesini içerir. Fosforilasyon, hücre sinyalleşmesinde rol oynar, adenosin trifosfat şeklinde hücresel metabolizma ve enerji depolaması için de kritiktir. Biosentez dahil birçok hücresel reaksiyon için gereken enerji, adenosin trifosfatın (ATP) hidrolizinden elde edilir.[17]

Hücre dışı sıvı, neredeyse sadece inorganik fosfor olarak mevcut olan toplam vücut fosforunun %0,1'ini içerir . Hücre dışı sıvıdaki bu inorganik fosfat havuzu, fosfor homeostazı için gereklidir ve diyetten ve kemikten emilimle oluşturulmaktadır, hücrelerin hem yapısal hem de yüksek enerjili fosfat kullanımını için fosfatı alabildikleri birincil kaynaktır. Serum fosforunun fizyolojik konsantrasyonu erişkinlerde 2,5 ila 4,5 mg/dL (0,9-1,45 mmol/L) arasında değişirken, aynı zamanda diurnal varyasyon da göstermektedir. [18][19]

2.3.Gıdalardaki Fosfor Tipleri ve Fizyolojik Etkileri

Doğada, fosforun oldukça reaktif olması dolayısıyla daima oksijene ve başka bir elemente veya bileşiğe bağlı haldedir; bağlı halde olduğu bileşik, fizyolojik etkisini önemli ölçüde etkiler.[20]

Besin kaynaklarımızdaki fosfor, doğal (organik) veya ilave (inorganik) olarak iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan gıdalarda doğal olarak bulunan fosfor tipi, proteinlere, lipitlere ve diğer hücre bileşenlerine kovalent olarak bağlıdır, bu da biyoyararlanımında azalmaya ve daha yavaş emilmesine sebep olur. Aksine, gıdaların işlenmesi sırasında daha büyük miktarlarda eklenen fosfat tuzları midenin asit ortamında kolayca ayrışır, hızla ve etkili bir şekilde emilir. Bu iki farklı tip diyet fosforunun KBH hastalarında ve sağlıklı genel popülasyonda, sağlık riski oluşturma konusunda farklılık gösterdiği düşünülmektedir. [21]

Kişilerin beslenme durumunun değerlendirilmesi amacıyla yaş ve cinsiyetler göz önünde bulundurularak her besin için 'diyet referans değerleri' (DRI) belirlenir. Yağ, protein, karbonhidratlar vitaminler ve mineraller, ve hatta su alım düzeyi için bile DRI değerleri vardır. DRI'ler, sağlıklı insanlar için diyet besin alımlarını değerlendirmek ve planlamak için kullanılan ve uluslararası geçerliliği olan RDA, RNI, DRI, AI ve EAR olarak tanımlanmış dört farklı referans değerinden oluşur. [22]

- Tahmini Ortalama Gereksinim (EAR): Aynı yaş ve cinsiyet grubundaki sağlıklı bireylerin yarısının gereksinimlerini karşıladığı tahmin edilen günlük ortalama alım değeridir.
- Tavsiye Edilen Diyet Payı- Recommended Dietary Allowance (RDA): Aynı yaş ve cinsiyet grubundaki hemen hemen tüm (%97-98) sağlıklı bireyin beslenme gereksinimlerini karşılamak için yeterli olan günlük ortalama diyet besin alımı düzeyini ifade eder. EAR, RDA'yı hesaplamak için kullanılır. Kişi günlük RDA aldığı sürece o besin eksikliğinin görülmesi olası değildir.
- Yeterli Alım - Adequate Intake (AI): sağlıklı insanlardan oluşan bir grup tarafından, o besinin alımının gözlemlenen etkilerine veya deneysel olarak belirlenen tahminlerine dayalı olarak önerilen ortalama günlük alım seviyesi. AI'lar bir RDA belirlenemediğinde kullanılır.
- Tolere Edilebilir Üst Alım Seviyesi- Tolerable Upper Intake Level (UL): popülasyondaki hemen hemen tüm bireyler için olumsuz sağlık etkileri riski oluşturmayacak en yüksek günlük besin alımı düzeyi. Alım UL'nin üzerine çıktıkça, yan etki riski artar.

Sağlıklı yetişkinlerde fosfor için RDA değeri 700 mg/gün'dür ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki daha büyük çocuklarda ve hamile kadınlarda 1,250 mg / güne kadar önerilmiştir.(Institute of Medicine. 1997)

Tipik Amerikan diyeti için günlük ortalama fosfor alımı yaş ve cinsiyete göre değişir, genç ve orta yaşlı erkeklerin %50'den fazlası günde 1,600 mg'dan fazla tüketirken, nispeten yaşlı kadınlar günde yaklaşık 1000 mg tüketmektedir.[23][24]

Bununla birlikte, diyet fosfor alımının bu tahminleri, büyük ölçüde gıdaların “doğal” fosfor içeriğini yansıtmaktadır. Aksine son dönemdeki araştırmalar, inorganik fosfor içeren gıda katkı maddelerinden gelen fosfor yükünün, gıdaların organik fosfor yönünden orantısız bir şekilde yüksek olduğunu göstermektedir. Gıda katkı maddelerinden gelen fosfor katkılarının güvenilir bir şekilde ölçülmesinde sıkıntılar olsa da, kişisel gıda seçimlerine bağlı olarak, fosfor alımının günde 1,000 mg kadar daha fazla olabileceği tahmin edilmektedir. [24]

2.3.1. Doğal (Organik) Fosfor

Diyet fosforunun esas olarak iki ana kaynağı, hayvansal ve bitkisel proteinleri içeren organik maddelerdir. Fosfor, hemen hemen tüm canlı organizmalarda mevcut olduğu için çoğu gıdada da bulunmaktadır. Diyet fosforunun ana besin kaynakları, süt ürünleri, et ve balık gibi hayvansal gıdalar ve baklagiller, kuruyemişler ve çikolatalar gibi bitkisel besinler de dahil olmak üzere protein bakımından zengin besinlerdeki çeşitli organik fosfor tipleridir. [25]

Organik fosfor, in vivo olarak proteinlere ve diğer hücre içi karbon içeren moleküllere in vivo olarak bağlandığından, doğal olarak protein yönünden zengin gıdalarda bulunur.

Organik fosfor, bağırsak kanalında hidrolize edilir ve daha sonra inorganik fosfat olarak dolaşım içine emilir.[26]

2.3.1.1.Bitki Protein ve Fitatlarından Fosfor

Pek çok meyve ve sebze az miktarda organik fosfat içerirken, bazı bitki tohumları, fındık ve baklagiller fosfattan zengindir. Hücre içi bölümlerde organik fosfat olarak bulunan ve kolayca hidrolize olan ve kolayca emilen hayvansal proteinlerdeki fosforun aksine, bitkilerde, özellikle fasulye, bezelye, hububat ve kuruyemişlerde fosfor, çoğunlukla fitik asit veya fitat depolama formundadır. Fitat, buğday, yer fıstığı, soya ve baklagiller gibi

yaygın olarak tüketilen tahıl ve fındıkların tohumunda bol miktarda bulunur ve esasında çimlenme için gerekli fosforun depolanma şeklidir. Kovalent olarak bağlı fosforu ayıran bir enzimle (fitaz) işleminden geçirilmediği sürece, fosfor kolayca serbest bırakılmaz, biyoyararlanıma uygun değildir.[27]

İnsanlar, bu işlem için gerekli olan fitazı ifade etmedikleri için, fosforun bitkisel gıdalardan biyoyararlanımı, genellikle %40 civarındır.. Ayrıca bağırsaklardan fosfor emilim hızı, bitki proteininin gramı başına hayvan bazlı proteinlere göre daha düşük olabilir. [28] [29]

Bununla birlikte, son 25 yılda, fitatın önemli faydalı özellikleri gözlenmiş, antioksidan ve antikanser aktiviteleri , gıdaların glisemik indeksinin azaltılması, kan şekeri ve kan kolesterolü üzerinde olumlu etkileri de bulunmuştur.Bu bulgular, fitat ve diğer inositol fosfatların insan beslenmesindeki ve insan sağlığındaki önemi hakkındaki tartışmaları canlandırmıştır.[30][31][32]

2.3.1.2. Hayvansal Gıdalardan Fosfor

Vejeteryan olmayan bir batı diyetinde, diyet fosfor yükünün yarısından fazlası hayvansal proteinlerden kaynaklanmaktadır. Farklı hayvansal protein kaynakları, farklı oranda fosfor içerir.Bir örnek olarak, 1 büyük yumurta, 6 g protein ve 86 mg fosfor içerirken, 1 büyük yumurtadan (3,6 g protein) gelen yumurta akı, 5 mg fosfor içerir, bu da yumurta fosforunun kütesinin yumurta sarısında olduğunu gösterir. Kanatlılar, kırmızı etten ve balıktan daha az fosfor içerir [33].

Fosfor içeriğinin, protein içeriğiyle doğru orantılı olarak değiştiği görülmektedir. Bu sebeple düşük fosforlu gıda alması gereken kronik böbrek hastaları için protein miktarları kullanılarak fosforun hesaplanması için formüller geliştirilmiştir. Fakat et ve süt ürünlerinin, toplam fosfor içeriği, fosfat katkı maddelerinin eklenmesiyle belirgin bir şekilde değiştirilir [8][34].

2.3.2. Fosforlu Katkı Maddeleri (İnorganik) Fosfor

Drs. Jaime Uribarri ve Mona Calvo (2003) fosfat katkı maddeleri ve kronik böbrek hastalığı olan kişiler (CKD) üzerindeki etkileri hakkında bir makale yayınladılar. Bu makale, diyet fosforunun kaynaklarını ve bu katkı maddelerinin yaygınlığını ve halk sağlığı etkilerini araştıran sonraki araştırmaların kıvılcımı niteliğindedir.[35]

Gıda tedarikinde fosfat katkı maddelerinin kullanımı yıllar içinde yaygınlaşmıştır. 1990 yılında fosfat katkı maddelerinin Amerikan diyetine yaklaşık 470 mg / gün katkıda bulunduğu tahmin ediliyordu. Uribarri ve Calvo ise katkı maddelerinin bir bireyin gıda tercihlerine bağlı olarak 1000 mg / gün'e kadar katkıda bulunabileceğini öne sürdüler. [35]

Fosfat katkı maddelerinin gıda tedarikindeki boyutunu anlamak için León ve ark., 12 ay boyunca kuzeydoğu Ohio'da bir marketten gıda ürünleri satın aldılar. 15 kategoriye ayırdıkları 2400 çok satan gıda ürününün gıda etiketlerini fosfat katkı maddeleri açısından incelediler. En çok fosfat katkı maddesi içeren kategoriler: Hazırlanan dondurulmuş gıdalar (%72), kuru gıda karışımları (%70), paketlenmiş et (%65) ve ekmek/ fırınlanmış ürün (%57), çorbalar (%54) ve yoğurt (%51) şeklinde sıralanmıştır. İnceledikleri ürünlerin %44'ünde fosfat katkı maddeleri buldular. Fosfat katkısı artırılmış ürünlerin katkısız muadillerine kıyasla ne ölçüde daha yüksek fosfor oranlarına sahip olduğu protein içeriklerine oranlayarak hesapladılar. Örneğin, fosfat katkısı arttırılmamış bir domuz pirzolasının 9,59 mg PO₄/ g proteini bulunurken, arttırılmış domuz pirzolasında 17,35 mg PO₄/ g protein görülmüştür.[36]

Fakat sadece mg PO₄/ g protein oranını hesaplamak da yeterli değildir. Katkı maddelerinden fosfatın biyoyararlanımı, gıdalarda doğal olarak bulunan fosfattan çok daha yüksektir. Soğutulmuş veya dondurulmuş önceden pişirilmiş et, kümes hayvanı ve balık maddesi dahil 44 gıdanın fosfor ve protein içeriği ölçülmüş ve fosforun proteine oranı olması gerekenden çok daha yüksek bulunmuştur.[37] Bunun yanında işlenme miktarına göre de oran değişmektedir.[38]

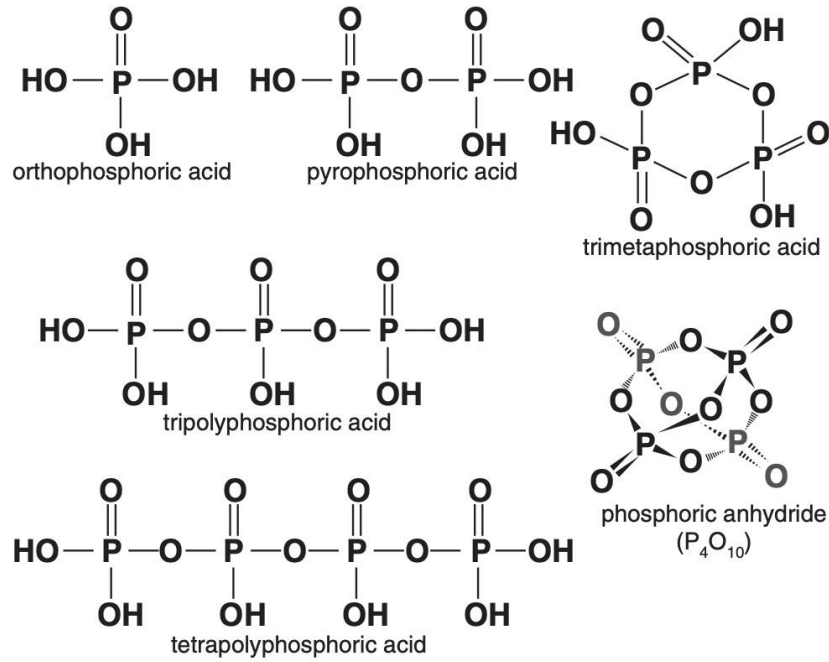
Bunun yanı sıra Sherman ve Mehta bazı fosfat katkısı geliştirilmiş ürünleri test etmiş, bileşenler arasında listelenmemiş olsalar bile fosfat katkı maddelerinin bulunabileceğini belirtmişlerdir. Bu katkı maddeleri, “et suyu” ve “solusyon eklendi” gibi terimlerle ya da genellikle bileşenler için karmaşık isimlerin kullanılması sebebiyle anlaşılmamaktadır.[39]

Gıda sınıfı fosfatlar, yiyeceklerin nem tutabilmesi, etlerin pH ayarlaması, kahve beyazlatıcısının tamponlanması, sosların hazırlanmasında protein dispersiyonu, baharat

karışımlarının dökülebilmesi için nem adsorpsiyonu, eritilmiş peynir dilimleri imalatında iyonizasyon, patates cipslerinde rengin korunması için minerallerin sekestrasyonu, kolaların lezzeti, yumurta akınının daha iyi çırpılması, çırpılmış köpüklerin stabilitesi gibi çeşitli fizikokimyasal özellikler kazandırılması için kullanılmaktadır.[40][41]

İnorganik fosfatların toksisitesinin en son incelemesinde, bu katkı maddeleri benzer toksisite verilerine ve kimyasına dayanarak dört farklı fosfat sınıfından birine gruplandırılmıştır: tek değerlikli tuzlar, iki değerlikli tuzlar, amonyum tuzları ve alüminyum tuzları [42].

Bunların çoğu, orto-, piro- ve polifosfatların mineral tuzlarıdır. Fosforik asit ve sodyum (Na), potasyum (K) ve kalsiyum (Ca) tuzları gibi inorganik gıda sınıfı fosfatlar ve bunların kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Bu fosfatlar genellikle güvenli kabul edilir ve Koşer ve Helal tanımlamaları için uygundur [10].



Şekil 1. Gıda işlemede kullanılan fosfat tuzlarının fosfat parçalarının çeşitli kimyasal formlarının (orto-, piro-, polifosfatlar) yapısı

İnsanların sağlıklı ve besleyici gıdalara olabilecek en ekonomik şekilde ulaşabilmeleri sağlanırken, gıda katkı maddelerinin neden olabileceği risklerin de önlenmesi gerekmektedir. Gıda Kodeks Komisyonu (CAC), Gıda Katkı ve Kontaminantları Kodeksi Komitesi (CCFAC), Gıda Katkıları FAO/WHO ortak uzmanlar Komitesi (JECFA), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) gibi

kuruluşlar, gıdalarda katkı maddelerinin analizleri ve toksikoloji testlerinin değerlendirilmesi ile ilgilenen uluslararası kabul görmüş kurumlardır.[43] [44]

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) aralıklı olarak raporlar yayınlamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde diğer bir uygulama da GRAS (Generally Recognized as Safe) listesidir. Bu raporlarda GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) katkı maddeleri listelenir. Genellikle kemirgenler üzerinde yapılan toksikoloji çalışmaları sonucu elde edilen ADI (Günlük Alınabilir Doz) değerleri belirlenir. JECFA da yine gıda katkı maddelerini A, B ve C olarak gruplandığı listeler yayınlamaktadır.[43]

Toksikoloji testleri ile ilgili teknik yetersizliklerin olduğu dönemlerde kullanımına girmiş başlangıçta zararsız gibi görünen bazı katkı maddelerinin, sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda sağlığa zararlı olduklarının saptandığı, kullanımlarının yasaklandığı bilinmektedir. 2011 yılında, FDA'nın maruziyet değerlendirme yaklaşımları gözden geçirilmiş ve kurumun önceki güvenlik kararlarını yeniden değerlendirmesi, bilime dayalı bir yaklaşım geliştirmesi ve tüketicinin kullanımı sonrası daha kapsamlı izleme yapması gerektiği sonucuna varılmıştır.[45]

EFSA ise 2008 yılında Avrupa'daki gıda güvenliği konularında bilimsel bir forum düzenlemiştir. Bu forumda, gıda katkı maddelerinin işlevselliğinin yanında bazı durumlarda sağlık üzerinde olumsuz etkileri olabileceği belirtilmiştir. 2010 yılında, Avrupa Komisyonu Yönetmeliği, EFSA ile birlikte, mevcut tüm onaylanmış gıda katkı maddelerini yeniden değerlendirmek için bir program başlatmıştır.[46]

Ulusal gıda yönetmelikleri hazırlanırken toplumun gıda tüketim alışkanlıkları dikkate alınmalı, ADI değerinin aşılması önlenmelidir. Ülkemizde gıda katkı maddelerinin kullanımını düzenleyen mevzuat 'TÜRK GIDA KODEKSİ YÖNETMELİĞİ'dir.

Fosfora aşırı maruz kalmak bir sorun olsa da, fosfat gıda katkı maddelerinin gıdaların genel kalite, güvenlik, besleyici değeri, lezzet çekiciliği, rahatlığı ve ekonomisine katkıda bulunduğu birçok yönünü de gözden kaçırmamak gerekir. [14]

Amerika Birleşik devletleri'nde FDA gıda tedarikindeki 1000'den fazla gıda katkı maddesinin denetimini sağlayarak halk sağlığını korumaktan sorumludur. 1969'da FDA, GRAS maddelerinin sistematik olarak gözden geçirilmesi için GRAS Maddeleri Seçim Komitesi'ni (SCOGS) kurdu. SCOGS, 1972-1980 yılları arasında 370'in üzerinde GRAS gıda maddesinin güvenliği hakkında yayınladıkları 115 rapordan görüş ve sonuçlara erişim sağlayan bir veritabanı derledi.

SCOGS veritabanı, GRAS bileşenlerine ilişkin SCOGS görüşünü içerir. SCOGS raporlarında GRAS olarak kabul edilen her bir madde değerlendirildi ve güvenlikle ilgili

bir sayısal bir puan verildi. Belirlenen 48 adet fosfat GRAS bileşeninden kırk birine, ‘makul seviyelerde kullanıldıklarında, mevcut bir tehlikeyi gösteren veya şüphelenmek için makul bir neden gösteren hiçbir kanıt yoktur’ anlamına gelen 1 güvenlik puanı verilmiştir [47][48].

Tablo 1. GRASa maddeleri içeren yaygın olarak kullanılan fosfatın alfabetik listesi ve bunların SCOGSb güvenlik puanı

	GRAS ingredient ^a	Score ^c	Report # ^d	CFR ^e
1.	Acetylated distarch phosphate	2	115	-
2.	Ammonium phosphate dibasic	1	32	184.1141
3.	Ammonium phosphate dibasic	1	34	184.1141
4.	Ammonium phosphate monobasic	1	34	184.1141a
5.	Calcium glycerophosphate	1	74	-
6.	Calcium hexametaphosphate	1	32	-
7.	Calcium hypophosphate	1	73	-
8.	Calcium phosphate dibasic	1	32	-
9.	Calcium phosphate monobasic	1	32	-
10.	Calcium phosphate tribasic	1	32	-
11.	Calcium phytate	1	45	586.6219
12.	Calcium pyrophosphate	1	32	182.8223
13.	Dibasic magnesium phosphate	1	60	184.1434
14.	Ferric phosphate	2	35	184.1301
15.	Ferric pyrophosphate	5	35	-
16.	Ferric sodium pyrophosphate	5	35	-
17.	Hydropropyl distarch phosphate	3	115	-
18.	Manganese glycerophosphate	1	74	-
19.	Manganese glycerophosphate- package	1	74	-
20.	Manganous hypophosphite	1	73	-
21.	Monostarch phosphate	2	115	-
22.	Phosphoric acid	1	32	182.1073
23.	Potassium glycerophosphate	1	74	-
24.	Potassium hypophosphite	1	73	-
25.	Potassium phosphate dibasic	1	32	-

26.	Potassium phosphate monobasic	1	32	-
27.	Potassium phosphate tribasic	1	32	-
28.	Potassium polyphosphate	1	32	-
29.	Potassium pyrophosphate	1	32	-
30.	Potassium tripolyphosphate	1	32	-
31.	Riboflavin 5#-phosphate	1	114	-
32.	Sodium acid pyrophosphate	1	32	182.087
33.	Sodium aluminum phosphate, acidic	1	43	182.1781
34.	Sodium aluminum phosphate, basic	1	43	182.1781
35.	Sodium ferricytropyrophosphate	5	35	-
36.	Sodium hexametaphosphate	1	32	-
37.	Sodium hypophosphite	1	73	184.176
38.	Sodium metaphosphate	1	32	182.6769
39.	Sodium phosphate dibasic	1	32	-
40.	Sodium phosphate monobasic	1	32	-
41.	Sodium phosphate tribasic	1	32	-
42.	Sodium phosphoaluminate-package	1	43	-
43.	Sodium pyrophosphate	1	32	182.6760
44.	Sodium tetrametaphosphate	1	32	-
45.	Sodium tetrphosphate	1	32	-
46.	Sodium trimetaphosphate	1	32	-
47.	Sodium tripolyphosphate	1	32	182.1810
48.	Tribasic magnesium phosphate	1	60	184.1434

aGRAS = Genellikle Güvenli Olarak Tanınır; bu terim, FDA tarafından piyasa öncesi incelemeye ve onaylamaya tabi olmayan bir gıda maddesini belirtmek için kullanılır, çünkü genellikle nitelikli uzmanlar tarafından amaçlanan kullanım koşulları altında güvenli olduğu kabul edilir.

bSCOGS = GRAS Maddeler üzerine Seçim Komitesi

cScore, GRAS içeriğinin güvenliği ile ilgili SCOGS Komitesi sonucunu temsil eder. Örneğin, bir (1) puanı, onaylanmış kullanım koşulları altında herhangi bir güvenlik kaygısı olmadığını gösterir.

Dördüncü sütündeki Report#^d numarası, komite tarafından yapılan görüşün temelini oluşturan güvenlik çalışmalarının ayrıntılarını içeren rapor sayısını temsil eder

eCFR = Federal Düzenlemeler Kodu. Bu sayı, madde bir düzenlemeye tabi ise ABD Federal Düzenlemeler Yasası'nın 21. maddesindeki atıf anlamına gelir

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) nın bir yetişkin için önerdiği günlük değeri (RDA) 700 mg/gün fosfordur. Fakat, 2001-2002'den bu yana yapılan ulusal araştırmalarda fosfor tüketimi asıl gereksiniminin (EAR) çok üzerinde çıkmaktadır.[49]

Sadece tahmini alımlar fosfor ihtiyacını aşmakla kalmaz, yüksek oranda işlenmiş hazır gıda tüketen bireylerde gerçek fosfor alımlarının hafife alındığı düşünülmektedir [50]

Bu eksik tahminler, gıda işlemede fosfat katkı maddelerinin kullanımının tam olarak açıklanmamasından kaynaklanmaktadır. Gıda üreticileri fosfat katkı maddeleri kullanarak ürünlerini iyileştirmek için daima yeni ve etkili yollar bulduklarından ABD gıda arzının fosfor içeriği sürekli artmaktadır. [28] Diyetteki fosfor alımının bilinmemesi hastalık biyobelirteçleri veya sonuçları arasındaki ilişkiyi de belirsizleştirmektedir. Bazı bireylerin Tıp Enstitüsü tarafından belirlenen Üst Düzey Güvenli Alım Seviyesine (UL= 4000 mg/gün) yaklaşan seviyelerde diyet fosforu tüketebileceğinden endişe duyulmaktadır. [26] Ayrıca, kümülatif fosfat katkı maddesi kullanımıyla ilgili mevcut tahminler belirsizdir.

2.4.Genel Fosfat Homeostazisi

Vücutta mineral homeostazisinin fizyolojik olarak düzenlenmesinde temel olarak üç önemli mekanizma vardır; gastrointestinal sistemden emilim, glomerüler filtrasyon (GFR) ile atılım&geri emilim ve kemiklerden salınım bu üç mekanizmayı oluştururken, hormonal mekanizmalar bunları düzenler.[51]

Hipofosfatemi raşitizm /osteomalazi gibi hastalıklarla ilişkiliyken hiperfosfatemi kardiyovasküler hastalıklar dahil zararlı sonuçlar doğurmaktadır. Bu nedenle, uygun plazma fosfat seviyelerinin korunması sağlık için temel bir gerekliliktir. Toplam vücut fosfatının (%1) yalnızca minimum bir miktarı plazmada kalmasına rağmen, konsantrasyonu sıkıca kontrol edilir. [52][53]

Diyetle alınan fosfat ince bağırsak boyunca emilir ve dolaşıma girdikten sonra, plazma fosfatı kemikler ve yumuşak dokular ile sürekli bir etkileşim içindedir. Glomerülde büyük ölçüde filtrelenen plazma fosfatı, tekrar emilime uğrar.[53]

Bu kontrol, büyük ölçüde fosfatın (yeniden) absorbe etme kapasitelerinin sürekli yeniden düzenlenmesi yoluyla, aralarında paratiroid hormonu, fibroblast büyüme faktörü 23, 1,25 (OH) 2 D3 vitamini ve başka birtakım hormonal ve metabolik faktörlerin de katıldığı, bağırsak böbrekler ve kemiklerin ortak hareketiyle gerçekleştirilir. Bağırsak tarafından emilen günlük fosfat miktarı böbrekler tarafından atılır. Bağırsak ve böbreğin fosfat taşıma

kapasitesi hormonal kontrol altındadır, paratiroid hormonu (PTH), FGF23 ve 1,25 (OH) 2 D3 mekanizmaları en iyi anlaşılmış faktörlerdir [54].

Bu fosfat düzenleyici hormonların seviyeleri, fosfat durumuna cevap olarak değişir. İnce bağırsak ve böbrek proksimal tübüllerinin epitelinde, fosfatın aktif taşınmasından sorumlu Na + bağımlı fosfat taşıyıcıları bulunur. Bu düzenleyici faktörler, Na + bağımlı fosfat cotransporterlerin bağırsak ve böbreklerde ekspresyonunu değiştirirler, fosfat ihtiyacı arttığında bağırsak ve böbrek (yeniden) absorpsiyonu artırırken, fosfat aşırı yükü varsa azaltır [55].

Membranlardan fosfor emiliminin gerçekleştiği sodyum bağımlı fosfat taşıyıcı ailesinin üç tip taşıyıcı üyesi vardır; NaPi2a, NaPi2b ve NaPi2c. İnce bağırsakta NaPi2b, renal tübülde NaPi2a ve NaPi2c bulunur. [56]

2.5.Fosfatın Bağırsaklar aracılığıyla düzenlenmesi

Bağırsaktan fosfat geri emilimi aktif ve pasif mekanizmalar yoluyla gerçekleşmektedir: apikal fırçamsı kenar boyunca taşınmanın aktif adımı oluşturduğu bir transselüler yol,ve pasif bir paraselüler yol.[57]

Gastrointestinal sistemde organik fosfat metabolize edilip inorganik forma dönüştürülerek emilir. Paraselüler fosfat taşınması ise doyuma ulaşmaz, çünkü difüzyon temellidir. Böylece, artan diyet fosfat alımıyla, fosfat emilimi doğrusal olarak artar. Fosfatın paraselüler yolla taşınmasından sorumlu moleküler mekanizmalar tamamen anlaşılmış değildir. Bağırsakta çalışan mekanizma (lar) ve bunların düzenlenmesiyle ilgili bilgilerin çoğu, aktif bileşenle sınırlıdır.[58]

Aktif bileşen olarak, fosforun bağırsak lümeninden kana transselüler hareketi şunları gerektirir:

- (a) bağırsağın luminal membranı boyunca taşıma
- (b) sitoplazma yoluyla taşıma
- (c) epitelyumun bazolateral plazma membranı boyunca taşıma.

Hız sınırlayıcı ve emilimin esas düzenlendiği adım luminal membran adımıdır. Burada fosfatın aktif absorpsiyonu, hormonal kontrol altındaki, sodyuma bağlı fosfat cotransporter NaPi-IIb'nin (SLC34A2) aktivitesine ve ekspresyonuna bağlıdır. [57]

NaPi-IIb'nin fosfat dengesinin korunmasına katkısı, çoğunlukla düşük fosfat durumlarında önemli hale gelir. Yüksek fosfat alımı olan sanayileşmiş toplumlarda yaşayan bireylerdeki

rolü muhtemelen daha az önemlidir. Dolayısıyla günümüzde diyet fosfat kısıtlaması ya da bağırsak emilimini azaltan terapötikler daha önemli hale gelmiştir.[57][42]

Intestinal Epithelialin luminal tarafından taşınma

İncebağırsaklarda villus intestinalislerin üzerini kaplayan epitel hücrelerinin her biri karakteristik bir özellik olarak lümene doğru uzanmış 1000 kadar mikrovilluse sahiptir. Bu fırçamsı kenar özelliği sayesinde absorpsiyon yüzeyi arttırılmış olur. Bu fırçamsı kenar epitel membranı boyunca taşıma mekanizması, bir sodyum-fosfat (NaPi) cotport taşıma sistemi, NaPiIIb (Npt2b / SLC34A2) içerir. [51]

NaPi taşıyıcılar, fosfat iyonunu bir elektrokimyasal gradyana karşı hücre dışından içeriye hareket ettirmek için Na gradyanının enerjisini kullanan ikincil aktif bir iyon taşıma şeklidir. İkincil aktif taşıma, enerji kaynağı olarak bir elektro-kimyasal gradyan kullanımı ile primer aktif taşımadan ayrılmaktadır. Apikal membran sodyum-inorganik fosfat (Pi) cotransport proteinleri, Pi'nin hücreye taşınması için sodyumun elektrokimyasal itici gücünü kullanır. Bazolateral membrandaki Na^+K^+ ATPase aktivitesi sayesinde de elektrokimyasal sodyum gradyanı korunur.[51]

Bağırsak NaPiIIb taşıyıcısı, düşük fosfat diyeti ve 1,25-dihidroksivitamin D3 ile upregüle edilir.D vitamini reseptörü (VDR) nakavt farelerde yapılan çalışmalar, taşıyıcıların düşük fosfat diyetine adaptasyonunun D vitamininden bağımsız olduğunu göstermektedir.[59]

Fosforun Transselüler Hareketi

Transselüler bağırsak fosforu taşınmasının ikinci bileşeni, fosforun lüminalden bazolateral membrana hareketini içerir.Bu transselüler sürece aracılık eden hücresel olaylar hakkında çok az şey bilinmesine rağmen, kanıtlar bağırsak hücrelerinin mikrotübüler mikrofilament sisteminin rolü olduğunu düşündürmektedir.Hücredeki mikrofilamentler, fosforun fırçamsı membranından bazolateral membrana taşınmasında önemli olabilir ve fosforun bazolateral zarda epitelyal hücreden çıkışında rol oynayabilir [57].

Bazolateral Membranda Fosfat Çıkışı

Bağırsak epitel hücrelerinin bazolateral zarındaki fosfat çıkış mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Fosforun elektrokimyasal gradyanı, hücrenin iç kısmı, bazolateral dış yüzeye kıyasla elektriksel olarak negatif olduğundan, hücre içi hücreden hücre dışı bölmeye geçişi destekler. Bu nedenle, bazolateral membran boyunca fosfor çıkışının bir pasif taşıma olayı olduğu düşünülür [48].

2.6.Fosfatın Böbrekler aracılığıyla düzenlenmesi

Fosfat homeostazı, paratiroid bezinin, kemik, bağırsak ve böbreğin koordine edilmiş hareketleriyle sağlanır. Böbrek fosfat alımına göre idrarla fosfat atılımını ayarlar ve fosfor konsantrasyonunu dar bir aralıkta tutar. Fosfatın renal atılımı, toplam vücut fosfat homeostazını düzenleyen son adım olduğundan, araştırmalar, renal fosfat düzenlenmesini anlamaya odaklanmıştır. Bu konudaki bilgilerin çoğu mikropoksiyon çalışmalarından elde edilmiştir.[60]

Serumda bulunan inorganik fosforun %85'i serbest olup, albümine önemli ölçüde bağlı olmadığından büyük kısmı glomerüler filtrasyona uğrar. Proksimal tübül filtrelenmiş fosforun yaklaşık %75'ini, distal tübül yaklaşık %10'unu tekrar emer. Glomerüler filtrasyona geçen PO₄ 'ün toplamda %85'i geri emilirken, idrarda %15'i kaybedilir.

Fosfat reabsorbsiyonu glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ve plazma fosfat konsantrasyonu ile yakından ilişkilidir. Serum fosfor seviyeleri arttıkça ve filtrelenen fosfor yükü arttığında, fosforu tekrar alma kapasitesi de artar. Tubüler fosfat reabsorbsiyonunun en güvenilir göstergesi, 2,5-4,2 mg/dl aralığındaki TmP/GFR oranıdır (tubuler maksimum fosfat reabsorbsiyonunun, glomeruler filtrasyona oranı). Serum fosfor 6 mg/dL konsantrasyonlarına ulaştığında, fosfor yeniden emilimi için maksimum taşıma hızı (Tm) elde edilir. GFR (glomerüler filtrasyon hızı) geniş bir aralıkta değişse bile, GFR ile tubuler reabsorbsiyon hızı arasında doğrudan bir ilişki vardır.[61]

Proksimal tübüler hücrelerin apikal zarı, tübüler sıvıda bulunan fosfor ve diğer çözünenlerin peritübüler kılcak ağ içine taşınması için geçmesi gereken başlangıç bariyeridir. Bu transepitelyal taşıma sistemi, geri emilimin sınırlayıcı adımını oluşturmaktadır.[60]

Hücre iç kısmının elektrik yükü dışı göre negatif olduğundan ve sitozolde fosfor konsantrasyonları daha yüksek olduğundan, fosfor hücre içine alınırken elektrokimyasal bir gradyana karşı hareket etmek zorundadır. Fırçamsı kenarda bulunan Na-P "cotransporter" fosfor reabsorbsiyonundan sorumludur. Burada yine sekonder aktif transport mekanizması devreye girer. Apikal membrandaki Na-fosfat co-transport proteinlerinin fosfatı fırça-sınır membranı (BBM) içeri taşınması için gereken enerji , Na'nın elektrokimyasal gradyanı sayesinde sağlanır. Bazolateral membrandaki Na-K - ATPaz'ın etkisiyle de, peritübüler kılcallara aktif Na ekstrüzyonu ile de mevcut gradyanın devamı sağlanmaktadır. [62]

Son kırk yılda yapılan çalışmalar, proksimal tübülün filtrelenmiş fosfatın yeniden emiliminin, en az üç farklı sodyum bağımlı fosfat taşıyıcısının aracılık ettiği bir düzenleme işlemi olduğunu göstermiştir:[60]

tip IIa sodyum fosfat cotransporter (Npt2a, NaPi-IIa, SLC34A1),

tip IIc sodyum fosfat cotransporter (Npt2c, NaPiIIc, SLC34A3),

ve tip III sodyum fosfat cotransporter Pit-2 (Ram-1, SLC20A2).

En kapsamlı çalışma farelerde yapılmış, proksimal tübül fosfatın yeniden emiliminin %70-80'ine Npt2a aracılık ettiğini, ardından Npt2c geldiğini, Pit-2'nin ise küçük bir katkısının bulunduğu gösterilmiştir.

Npt2a'nın yokluğu, osteomalazi, hipervitaminozu D, hiperkalsiüri ve böbrek taşlarının gelişmesiyle birlikte ciddi bir fosfat tüketen fenotip ile sonuçlanmaktadırken, Npt2c'nin yokluğu biraz daha hafif bir fenotiple sonuçlanır. Herediter hipofosfatemik rikets-hiperkalsiüri (HHRH) Npt2c'deki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Buna karşılık, bir çalışma haricinde, insan Npt2a'daki mutasyonlar veya polimorfizmler böbrek taşı gelişimi ve HHRH'den çok daha hafif bir fenotip olan osteoporoz riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir.[61][63]

Pit-1 ve Pit-2, çoğu hücrede yaygın olarak eksprese edilir ve çoğu hücreye fosfatın hücre içinde taşınması için bir temizlik işlevi sağladığı düşünülmektedir .[63]

2.7. Fosfatın kemikler aracılığı ile düzenlenmesi

İskelet sürekli yenilenen son derece dinamik bir yapıdır. Yetişkin kemik homeostazi sırasında, devamlı bir şekilde kemik yeniden şekillenmesi (remodelling) görülmektedir. Buna da kemiği emen osteoklastlar ve kemiği yeniden oluşturan osteoblastların dengelenmiş aktiviteleri aracılık eder, böylece kalsiyum ve fosfat homeostazının düzenlenmesinin yanı sıra strese uygun yanıt da sağlanmış olur.[64]

Fetal hayatta başlayan ve iskelet olgunluğuna kadar (yani epifiz plakasının kapanması veya iskeletin boylamasına büyümesinin tamamlanması) devam eden 'modelling', yeniden yapılandırma 'remodelling'den farklı bir süreçtir. Kemik modelleme süreci, pik kemik kütlelerinin elde edilmesine yol açar. Kemik modellemesi, kemiğin bir bölgeden çıkarılması ve farklı bölgelerde kemik oluşumu ile gerçekleşir. Kemik yeniden şekillenmesi ise yaşam boyunca gerçekleşir ve iskeleti yenileyen önemli bir fizyolojik süreçtir. Birincil, olgunlaşmamış kemiği ve eski, mikro hasarlı veya kırık kemiği değiştirerek ve ayrıca kalsiyum başta olmak üzere mineral homeostazını koruyarak kemik gücünü korur ve

iyileştirir. Kemik önce modellenme (modelling) süreci ile yapılandırılırken, sonrasında yeniden yapılandırılma (remodelling) ile de yüklenme stresine yanıt verebilmesi ve mineral homeostazına yanıt verebilmesi sağlanmaktadır.[64]

Kemik yeniden şekillenmesi İki aşamadan oluşur: emilim (resorption) ve yeniden yapım (formation). Önce eski veya hasarlı kemik emilirken, ardından yeni kemik malzemesi biriktirilir. [65]

Rezorpsiyon ve oluşum süreçleri denge halindedir ve her yıl yaklaşık %5 kortikal ve %20 trabeküler kemik remodelling ile yeniden yapılır. İki faz arasındaki denge, kemik kütesinin sağlamlığı ve sistemik mineral homeostazının sürdürülmesi için önemlidir.[66]

Remodelling, yaşam boyunca sürekli bir olaydır, ancak emilim ve oluşum arasındaki denge değişir. Sağlıklı bireylerde, oluşum, en yüksek kemik kütesi elde edilene kadar ilk otuz yıl boyunca baskındır, bu pik değer yaklaşık 20 yıl boyunca korunur (Kini ve Nandeesh, 2012). Daha sonra, rezorpsiyon oluşumdan ağır basmaya ve kütle azalmaya başlar.[67]

2.7.1. Kemik Remodelling Sürecinin Hücreleri: Başlıca Oyuncular

Normal fizyolojik kemik yeniden şekillendirmesini gerçekleştirmek için, farklı kemik hücreleri arasında doğrudan etkileşim gerekir. Osteoblast soyunun hücreleri (osteoblastlar, osteositler ve kemik astar hücreleri) ve kemik emici hücreler (osteoklastlar), progenitor hücrelerle beraber , kemiğin çok hücreli birimleri (BMU) adı verilen küçük ekipler halinde işlev görürler. BMU için 'bir kan kaynağı ve destekleyici bağ dokusu ile birlikte osteoklast ve osteoblast paketi' benzetmesi yapılabilir [68].

Osteoblastlar, kemik iliği stromasındaki mezenkimal hücrelerden köken alır ve kemik matriks sentezinden ve sonraki mineralizasyonundan sorumludur. Mezenkimal hücreler, osteoblastlar, kondrositler, miyositler ve adipositler gibi çeşitli hücre tiplerine ayrılabilen kök hücrelerdir. Osteoblastların temel işlevi, kemiğin ekstraselüler matrisinin organik bileşenlerini üretmektir. Bu organik matris daha sonra inorganik bileşikler ile mineralize edilir.[66]

Organik kemik matrisinin %90'ından fazlası Tip I kollajen dir. Osteoblastlar, sonunda mineralleşecek olan bu kollajenlerin (ağırlıklı olarak tip I kollajen) üretimini desteklemek için bol miktarda endoplastik retikulum içerir. Ortaya çıkan organik ve inorganik matris, hem strese hem de gerilmeye direnen ve maruz bırakıldığı yüklerle uyum sağlayan bir kompozit malzeme oluşturur (Wolff yasası). Kemik oluşum sürecinde osteoblast

progenitörleri, ihtiyaç duyulan bölgelerde kemik yüzeyine doğru göç ederek fonksiyonel osteoblastlara doğru farklılaşırlar.[69]

Osteoklastlar ise, monosit/ makrofajın mononükleer progenitörlerinin osteoklastogenez adı verilen bir füzyon reaksiyonuyla oluşan büyük, çok çekirdekli dev hücrelerdir. Osteoklast hücreleri kemik emilimine neden olur ve hematopoietik bir soydan köken alır. Osteoblast ve osteoklastlar, mekanik kuvvetlerin biyokimyasal sinyallere dönüştürüldüğü mekanotransdüksiyon denilen sürece dahil olurlar. Osteositler bu sinyal için iletken olarak işlev görür (veya eksikliği) ve bu hücrelere mekanik strese nasıl cevap verileceği, uyum sağlanacağı konusunda talimat verirler. [70]

Osteositler, görevi biten osteoblastların farklılaşmasıyla oluşurlar, olgun kemikte en fazla bulunan hücre tipidir. Bu hücre tipleri kemik matrisi içinde lakuna adı verilen mikroskopik boşluklarda bulunurlar. Osteositler, kemik (yeniden) modellemesinin orkestratörü olarak da düşünülebilir. Anatomist ve cerrah Julius Wolffun, stresle ilgili kemik yeniden şekillenmesinin doğasını tanımlayan yasası Wolff yasası olarak bilinir. Wolff Yasası, kemiklerin mekanik yükün derecesine adapte olacağını, yükteki bir artışın iç, süngerimsi kemiğin mimarisinin güçlenmesine ve ardından kortikal tabakanın güçlendirilmesine neden olacağını belirtir. Kemik üzerindeki stresin azalması ise, bu kemik tabakalarının zayıflamasına neden olacaktır. Kemiğe uygulanan kuvvetlerin süresi, büyüklüğü ve hızı, kemiğin bütünlüğünün nasıl değiştiğini belirlemektedir. Osteositlerin, osteoklastik rezorpsiyonu hem inhibe ederek hem de aktive ederek osteoklastların düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir. Yük arttığında, kemik kütlesini korumak için, osteositler osteoklast aktivasyonunu inhibe eden sinyaller gönderirlerken, aksine, yük az ise hipoksik, apoptotik veya ölmekte olan osteositler, rezorpsiyonu başlatmak için kemik yüzeyindeki osteoklastlara / preosteoklastlara sinyaller gönderir.[71]

Bu nedenle, kemik içindeki osteositler kemik oluşumunu düzenlerler. Mineralizasyon ve osteoklastik rezorpsiyonu inhibe edebilirken, belirli koşullar altında osteoklastları aktive edebilecek sinyalleri gönderme kapasitesine sahiptirler. Osteositler, kemik yüzeyine ve kan akışına doğru yayılan dendritik uzantılar yoluyla, mineralize matris boyunca düzenli olarak dağılmış halde, birbirine ve kemik yüzeyindeki hücrelere bağlıdırlar. Osteositlerin, bu geniş lakunokanaliküler ağ üzerinden mekanik yüklemenin etkilerine aracılık eden duyuşal hücreler ağı olarak işlev gördüğü düşünülmektedir. Bu hücreler sadece birbirleriyle ve kemik yüzeyindeki hücrelerle iletişim kurmakla kalmaz, aynı zamanda dendritik süreçleri kemik yüzeyini geçerek kemik iliğine ve vasküler boşluklara uzanabilir. Osteositlerin uzun süredir rezorpsiyon veya oluşum sinyalleri göndermek için mekanik

zorlamaya yanıt verdiği düşünölmektedir. Bu osteositler ağı, kemik yeniden düzenlemesini düzenleyen parakrin faktörlerini serbest bırakarak kemiğe yüklenen stresleri algılayıp yanıtlamalarını sağlayan karmaşık bir iletişim sistemi oluşturur.[72]

Bu hücrelere atfedilen fonksiyonların sayısı genişlemektedir, fosfat homeostazının düzenlenmesinde de görev aldıkları gösterilmiştir; bu nedenle osteosit ağı bir endokrin bezi olarak da düşünölmektedir. [73]

2.7.2. Kemik Yeniden modellenme aşamaları ve düzenlenmesi

Kemik yeniden şekillenme süreci hep aynı sırayı takip eden farklı aşamalar içermektedir. Döngü, sessizlik, aktivasyon, rezorpsiyon, ters faz, oluşum (formasyon) ve sonlandırma olmak üzere altı ardışık aşamayı ifade eder.[66]

Osteoklastlar tarafından rezorpsiyonun başlatılması için yeniden biçimlendirme sinyalinin algılanması gerekir. Rezorpsiyon fazında, osteoblastlar, osteoklast öncüllerini yeniden modelleme alanına çekerek, osteositler veya doğrudan endokrin aktivasyon sinyalleri tarafından üretilen sinyallere yanıt verirler.[66]

Rezorpsiyon fazı, osteoklast farklılaşması ve aktivitesinden sorumlu uyaranların seviyesine bağlı olarak sınırlı bir süreye sahiptir. Bunu hemen hemen tüm osteoklastların kaybolması ile karakterize olan ters faz takip eder. Formasyon fazı ise osteoklastik hücrelerin osteoblastik hücrelerle tamamen değiştirilmesiyle ayırt edilir. Kemik yeniden şekillenmesinin sonlandırma sinyalleri, osteoblastın farklılaşması ile verilmiş olur. Dinlenme halindeki kemik yüzeyi ortamı, bir sonraki yeniden biçimlendirme dalgası başlatılana kadar korunur. Trabeküler BMU'lar, bir kemik yeniden modelleme kompartmanı (BRC) oluşturmak için çevredeki kemik iliğinden bir kanopi ile ayrılır. BRC, parakrin sinyalizasyonuna elverişli eşsiz bir mikro ortam oluşturur ve BMU oluşumunu ve işlevini kolaylaştırır.[66]

Rezortif olayın anahtarı, osteoklastın kendisi ile altta yatan kemik matrisi arasında bir mikro ortam oluşturma kapasitesidir. Aktive olduklarında, kemik yüzeyine, integrinlerle yapışır ve kemiğin mineral ve organik bileşenlerini bozmak için hidrojen iyonları ve proteolitik enzimler (katepsin K, MMP9 ve MMP13 gibi asidik proteazlar) salgırlar ve bir rezorpsiyon çukuru oluştururlar.Genel hücre dışı boşluktan izole edilen bu bölme, bir elektrojenik proton pompası (H^+ ATPase) ve bir Cl^- kanalı ile asidik hale getirilir . Asitlenmiş ortam kemiğin mineralize bileşenini (hidroksiapatit, bir kalsiyum fosfat minerali) harekete geçirir, daha sonra ise katepsin K gibi lizozomal enzimler tarafından

organik matrisini ortaya çıkarılır. Proton pompasının, Cl- kanalının ve katepsin K'nın osteoklast etkisinde oynadığı kritik rol, her birinin azalmış fonksiyonunun osteopetroz gibi aşırı kemik kütlesi olan bir insan hastalığına neden olması ile de fark edilmektedir. [74]

Osteoklastogenez için iki sitokin gereklidir, ilki nükleer faktör - κ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörüdür. İkincisi M - CSF olarak adlandırılmıştır. Bu iki protein hem zara bağlı hem de çözünür formlar olarak bulunur, RANKLın membrana bağlı formu, çözünebilir olan formundan (örn., Aktive T hücreleri tarafından salgılanan) daha güçlü bir şekilde işlev görür. M - CSF ve RANKL esas olarak osteoblastlar ve osteositler dahil olmak üzere osteoblast soy hücreleri tarafından üretilir ve bu nedenle osteoklastların mononükleer öncüllerinden farklılaşması, bu hematopoietik olmayan, kemik hücrelerinin varlığını gerektirir. Bunlardan osteositlerin erişkin kemik turnover aşamasında RANKL'nin ana kaynağı olduğu gösterilmiştir. [75]

TNF süper aile sitokinlerinin bir üyesi olan RANKL, temel osteoklastojenik sitokindir, çünkü osteoklast oluşumu ve aktivasyonu bu sitokinin varlığını gerektirir ve osteoklastogenez RANKL eksikliğinde tamamen ortadan kaldırılır. M - CSF, osteoklast öncüllerinin çoğalmasına, sağ kalmasına ve farklılaşmasına ve ayrıca etkili kemik rezorpsiyonu için gerekli sağkalım ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine katkıda bulunur. [75]

RANKL'in keşfinden önce reseptörü RANK'dan daha yüksek afinite ile bağlandığı fizyolojik inhibitörü osteoprotegerin (OPG) tanımlanmıştır. RANKL'in RANK'a bağlanması, RANKL için osteoklastogenezini inhibe eden bir tuzak reseptörü olan osteoprotegerin (OPG) ile antagonize edilebilir. RANKL gibi OPG de osteoblastlar tarafından üretilir, yani kemik oluşumu ve rezorpsiyon arasındaki dengeyi kontrol etmede önemli bir role sahiptirler. Bu sinyaller sadece öncüllerinden çok çekirdekli osteoklast hücrelerinin oluşumunu düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda normal kemik yeniden modellenmesi sırasında ve çeşitli patolojik koşullarda aktivasyon ve hayatta kalmalarını etkiler. Osteoblast hücrelerinden salgılanan diğer protein olan OPG, güçlü bir osteoklast farklılaşması inhibitörüdür ve RANKL için bir tuzak reseptörü olarak hareket ederek ve RANKL'nin reseptörü RANK'a bağlanmasını önleyerek iskeleti aşırı kemik rezorpsiyonundan korur . Bu nedenle, RANKL/OPG oranı kemik rezorpsiyonunun önemli bir belirleyicisidir.[76]

Bu ilişki, osteoblast-osteoklast bağlanması üzerinde kontrole izin verir ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş yeniden modelleme sağlar. BRC'ler rezorpsiyon başlarken oluşurlar ve formasyon tamamlanana kadar dışı kapalı bir ortam yaratırlar. Kılcal damarlar BRC'ye

nüfuz eder ve BMU'ları oluşturmak ve sürdürmek için gerekli olan öncü hücreler için geçiş sağlarlar. Çünkü 6-9 ay arasında olan ömürleri, kurucu hücrelerden çok daha uzundur (osteoklastlar 2 hafta, osteoblastlar 3 ay). BRC'nin bozulması kemik döngüsünü olumsuz yönde etkiler ve dengesiz remodellinge neden olabilir, kemik rezorpsiyonu olur ama yeniden yapım sekteye uğrar.[77][66]

Patolojik kemik kaybı, etiyolojiden bağımsız olarak, iskeletin osteoblastlar tarafından oluşumuna göre osteoklastlar tarafından bozunma hızında bir artış anlamına gelir. Bu nedenle, osteoporoz gibi durumların önlenmesi, kemik rezorpsiyonunun moleküler mekanizmalarının anlaşılmasını gerektirir. [76]

Kemik yeniden şekillenmesinin genel süreci, birkaç hücre tipi tarafından düzenlenen, çeşitli lokal ve sistemik faktörler ve bunların ekspresyonu ve salınımının sıkı bir şekilde kontrol edildiği ve koordine edildiği bir işlemdir. Fizyolojik kemik yeniden şekillenmesi ve sistemik mineral homeostazının sürdürülmesi, kemik oluşumu ve kemik rezorpsiyonu arasında denge gerektirir . Bu hücrelerin, özellikle osteoklastların aktivitesi, hormonal sinyallerden doğrudan veya dolaylı olarak etkilenir. Kemik yeniden şekillenme hücreleri ve hormonları arasındaki bu etkileşim çok sayıda patofizyolojik sonuç için fırsat yaratmaktadır. Kalsitonin (CT), paratiroid hormonu (PTH), D3 vitamini östrojen, osteoklastik kemik rezorpsiyonunun başlıca hormonal düzenleyicileridir. İlk üçün salgılanması, fizyolojik serum kalsiyum seviyesini kontrol etme gereksinimi tarafından yönlendirilir. Sistemik hormonal düzenlemeye ek olarak, IGF'ler, TGF-y, FGF'ler, EGF, WNT'ler ve BMP'ler gibi büyüme faktörlerinin fizyolojik kemik yeniden şekillenmesinin düzenlenmesinde önemli roller oynadığı giderek daha belirgin hale gelmiştir.[78]

2.7.3. RANK / RANKL / OPG ve Vasküler Kalsifikasyon

Kemik, vasküler sistemle karmaşık bir bağlantıya sahiptir. Bu iki yapının mineralizasyon süreçleri benzerdir ve vücutta karşılıklı etkileşimlerle gerçekleşmektedir. [79]

Kemik kırılabilirliği ile vasküler kalsifikasyon arasındaki ilişkinin, kemik mineral yoğunluğu ile aortik kalsifikasyon arasında anlamlı ters korelasyondan kaynaklandığı bildirilmiştir .[80] Bu durum özellikle kronik böbrek hastalarında net bir şekilde gözlemlenir. Kronik böbrek hastalığının (KBH) erken evresinde, sistemik mineral metabolizması ve kemik bileşimi değişmeye başlar. Bu değişiklik kronik böbrek hastalığı-mineral kemik olarak bilinir (CKD-MBD). CKD-MBD' nin en sık görülen komplikasyonu

kemik turnover bozukluğu olduğu iyi bilinmektedir. Ayrıca, KBH hastaları genellikle mortalite ile yüksek oranda ilişkili vasküler kalsifikasyondan (VC) muzdariptir.[81]

Bozulmuş kemik metabolizmasının VC gelişiminde önemli bir rolü olduğu açıktır. VC'nin kemik yeniden biçimlenmesi gibi, hem uyarıcı hem de inhibe edici süreçler de dahil olmak üzere aktif olarak düzenlenmiş bir süreç olduğunu düşünmektedir .[81]. Rodriguez-Garcia ve diğ. hemodiyaliz hastalarını analiz etmiş ve büyük ve orta arterlerdeki kalsifikasyonun vertebral kırık olasılığının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışma hem VC hem de vertebral kırıkların araştırma örnekleri arasında artan mortalite ile ilişkili olduğunu göstermiştir . [82]

Bozulmuş kemik döngüsü, hemodiyaliz hastalarında koroner arter kalsiyum (CAC) skorunun ilerlemesi ile de ilişkilidir. Düşük kemik devri veya mineralize kemik hacminin koroner arter kalsifikasyonu ve vasküler sertlik derecesi ile ters ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur.[83]

VC, vasküler duvarda, vasküler düz kas hücreleri (VSMC) lerin osteojenik / kondrojenik dönüşümüne yol açan çeşitli mekanizmaları içerebilen aktif ve karmaşık bir süreçtir. Kronik böbrek hastalığı ile ilişkili VSMC kalsifikasyonunu da etkileyebilecek diğer birçok faktör vardır. Bunlar inflamasyon, kalsiprotein partikülleri, matris yıkımı ve aldosteron gibi teşvik edici faktörler olabildiği gibi kalsifikasyonu da arttıran MGP, fetuin-A ve pirofosfat gibi inhibe edici faktörlerin azalması ile de ilgili olabilir.[84]

Bozulmuş kemik döngüsünün, özellikle düşük veya yüksek kemik döngüsünün VC'nin ilerlemesini desteklediğini gösteren iyi kanıtlar vardır. Vucutta kemik rezorpsiyonu kemik oluşumundan daha hızlı ve belirgin şekilde gerçekleşirse, bu durum alınan ekstra fosfat için iskeletin tamponlama fonksiyonunun yetersizliği anlamına gelmektedir. Sekonder hiperparatiroidizmde olduğu gibi yüksek kemik döngüsü durumunda, kemikten çok fazla fosfat salınır ve yine iskeletin rezervuar fonksiyonu tahrip olur.Bu nedenle, yüksek veya düşük kemikteki dengenin düzeltilmesi VC'nin ilerlemesine karşı koruma sağlayacağı düşünülmektedir. [83]

Kemik oluşum sürecini etkileyen üç anahtar unsurdan bahsetmiştik: NF- κ B reseptör aktivatörü (RANK), NF- κ B ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü ve osteoprotegerin (OPG).

Osteoklast hücrelerinin yüzeyindeki bir tip I membran proteini olan RANK, osteoblastlar tarafından üretilen NF-ligB ligandının (RANKL) reseptör aktivatörü ile bağlandığında osteoklast hücre stimülasyonunda yer alır . RANK / RANKL / OPG triadı kemik metabolizmasıyla ilgiliyken VC gelişiminde de önemli rol alır. RANK / RANKL, VC'nin

uyarılmasında çok önemli olabilirken OPG, VC'yi inhibe eder. OPG, RANKL ve RANK aterosklerotik kalsifikasyonlar ve kardiyak kapak kalsifikasyonları gibi ekstraosseöz kalsifikasyonlarda bulunur. Ayrıca, nispi ekspresyon düzeyleri hastalığın evresine bağlı olarak farklıdır.[85] Panizo ve ark. RANKL'in RANK'a bağlanarak ve alternatif NF- κ B yolu ile BMP4 salgılanmasını uyararak VSMC kalsifikasyonunu doğrudan arttırdığını belirtmiştir . [86]

Shargorodsky ve ark. Serum OPG düzeyinin osteoporotik postmenopozal kadınlarda erken kardiyovasküler olayların bağımsız bir öngörücüsü olduğunu belirtirken, Augoulea ve ark. da diyabette ateroskleroz markerı olarak önermişlerdir. [87][88]

OPG, RANK RANKL farklı hastalıklar arasındaki yakın ilişkiyi tanımlamamıza yardımcı olabilecek moleküler bir bağ gibi görünmektedir.

2.7.4. Vasküler Kalsifikasyonun Patofizyolojisi, Fosfatın Rolü

Kardiyovasküler kalsifikasyon histoanatomik olarak görüldüğü bölgeye göre 'vasküler duvar kalsifikasyonu ve kardiyak kapak kalsifikasyonu' şeklinde ikiye ayrılırken, patofizyolojik süreçlerdeki farklılığa göre ise 'ateroskleroz ve arterioskleroz' olarak sınıflandırılabilir. Çoğu hastada aynı anda ve üst üste binen patolojik süreçler yüzünden iki tür kalsifikasyon bir arada görülmektedir.[89][84]

İntimal tabakanın iltihaplanması, kalınlaşması ve kalsifikasyonuna ateroskleroz denir. Aterosklerozun özellikleri, esas olarak arter duvarının tunika intima ile sınırlı lipit yüklü plaklar ve bu aterosklerotik plakin mikro inflamasyonudur Ateroskleroz genç yaşta başlar ve sürekli olarak ilerler, çoğunlukla orta boy arterlerde ve arteriyel dallanma noktalarında görülür. Düzensiz ve lokal tutulumlu ilerleme gösterir ve ağırlıklı olarak epikard koroner, karotis, iliak ve femoral arterler gibi orta büyüklükteki kanal arterlerini etkiler. Arterioskleroz ise arteriyel duvarın mediaelastik matrisinde daha derin kalsifikasyonu ifade eder. Medial katman VSMC'ler ve elastin açısından zengin hücre dışı bir matris içerir. Arteriyoskleroz, büyük ve orta büyüklükteki arterlerde medial arter tabakasının fibrozu, kalınlaşması, sertleşmesi ve kalsifikasyonudur ve sol ventrikül hipertrofisine yol açabilir . Aterosklerozun fokal ve düzensiz dağılımının aksine, arteriyoskleroz tunika ortamını dağınık bitişik bir tarzda etkiler.[90] [91]

Medial arter kalsifikasyonunun (MAC) arteriyel hücre matris birikimi, elastin bozulması ve apoptotik cisimler dahil olmak üzere arteriyel duvarın mikro yapısındaki büyük değişikliklerle ilişkilidir. Aterosklerozdan farklı olarak, lipit yüklü plaklar MAC'lerin spesifik bir özelliği değildir .[91]

Kalsifikasyon, hidroksiapatit içeren veziküler yapıların VSMC'lerden salınmasından sonra başlar, aktif ve pasif iki basamaktan oluşur. Daha önce aktif işlem başlamalıdır. Bu basamak VSMC'lerin osteojenik/ kondrojenik fenotipe dönüştürülmesidir. Pasif işlem ise vasküler duvarlardaki VSMC'leri çevreleyen hücre dışı sıvıdan mineral çökmesi ile gerçekleşir.[92]

VC üzerinde genel veya lokal etkileri olabilecek birçok promoterin yanı sıra kalsifikasyon inhibitörleri de fark edilmiştir. Promotörler ve inhibitörler, sağlıklı popülasyonda denge halindedir.[92]

2.7.5. Vasküler Kalsifikasyon ve Osteoporoz, Cinsiyetin Rolü

Östrojen, iskelet büyümesinde ve kemik homeostazisinde temel bir rol oynar. Kadınlarda menopoz sonrası östrojen eksikliği sıklıkla osteoklastik kemik rezorpsiyonunu hızlandırır. Kadınlarda hızlanan fazın menopozdan sonraki ilk yıllarda belirgindir ve trabeküler kemik kaybı görülmektedir.[93]

Östrojen eksikliğinin kemik kayıplarına nasıl yol açtığına mekanizmalarının karmaşık olduğunu biliyoruz. Araştırmalar, östrojenin, bağışıklık sistemi üzerindeki ve oksidatif stres ve kemik hücreleri üzerindeki doğrudan etkileri üzerindeki beklenmedik düzenleyici etkiler yoluyla kemik homeostazisini düzenlediğini göstermiştir.[94]

Çözünebilir veya zara bağlı bir formda bulunan RANKL, seks hormonu progesteronu da dahil olmak üzere çeşitli uyaranlarla indüklenebilir. RANKL-tuzak reseptör osteoprotegerin'in (OPG) ekspresyonu östrojene büyük ölçüde bağlıdır, bu nedenle östrojeni kemik döngüsüne bağlar. Postmenopozal kadınlarda östrojen kaybı OPG'nin azalmasına ve dolayısıyla RANKL aktivitesinin göreceli olarak yükselmesine ve sonuçta kemik döngüsünün artmasına ve osteoporozu yol açar .[95]

Osteoporozlu kadınlarda, artmış RANKL plazma düzeyleri, artmış plazma OPG düzeyleri ve daha yüksek OPG / RANKL oranı tespit edilebilir. [96]

Plazma OPG seviyelerinin yükselmesi, artan RANKL seviyeleri için telafi edici bir mekanizma olarak açıklanabilir. Tamamen insan monoklonal RANKL-bloke edici antikor denosumab, osteoporoz ve iskeletle ilişkili olayların tedavisi için geliştirilmiş ve onaylanmıştır , zaten birçok hastaya fayda sağlamıştır.[97]

Östrojen, kemik yeniden şekillenmesinin aktivasyonunu ve yeni temel çok hücreli birimlerin (BMU'lar) başlatılmasını engeller;

Farklılaşmayı engeller ve osteoklastların apoptozunu teşvik eder, bu nedenle kemik rezorpsiyonu azalır ve östrojen erken mezenkimal progenitörlerin kendi kendine yenilenmesini bastırırken, bağlılığı ve farklılaşmayı organize eder ve osteoblastik hücrelerin apoptozunu önler, bu nedenle kemik oluşumu hücresele düzeyde devam eder.[93] Doku düzeyinde östrojen kemik döngüsünü azaltır. Östrojenin antiremodeling etkilerine osteosit aracılık etmesi muhtemeldir. Gerçekten de östrojenin geri çekilmesi, artmış osteosit apoptozu ile ilişkilidir . [98]

Östrojen hem doğrudan hem de dolaylı olarak kemik rezorpsiyonunu baskılar. Östrojenin baskın akut etkisi yeni osteoklast oluşumunu engeller. Ek olarak, östrojen osteoklastik hücrelerde RANK sinyalini modüle eder ve osteoklastların apoptozunu indükler.[99]

Östrojen iki reseptör, ER alpha ve beta yoluyla sinyal verir . Kemik hücreleri her iki reseptörü de içerir, ancak kemik içindeki dağılımları homojen değildir. İnsanlarda, ER alfa kortikal kemikte baskındır, ancak ER beta trabeküler kemikte baskındır. Osteoblastların, osteositlerin ve osteoklastların fonksiyonel östrojen reseptörlerini (ER) eksprese ederler. Bu reseptörler ayrıca osteoblastların öncüsü olan kemik iliği stromal hücrelerinde de eksprese edilir.[100]

Serum estradiol seviyeleri, osteositler tarafından üretilen Wnt sinyalinin anahtar inhibitörü sklerostinin serum seviyeleri ile ters orantılıdır ayrıca menopoz sonrası kadınların östrojen tedavisi dolaşımdaki sklerostin düzeylerini düşürmektedir .Wnt / β -katenin sinyallemesinin osteositin mekanik yanıt vermek için önemli olduğu, bu yanıtın ayrıca östrojen reseptörü a'ya (ERa) da bağlı olduğu gösterilmiştir. Mezenkimde Wnt sinyali kesilirse, osteoblast farklılaşması azalır ve iskelet gelişimi etkilenir . Bu nedenle, östrojen ve Wnt sinyal yolları arasında osteositler aracılık ediyor olabilir. [101][102]

2.8.Fosfor Homeostazisinin Hormonal Düzenlenmesi: Paratiroid Hormon, Fibroblast Büyüme Faktörü 23 (FGF23) ve Klotho

Kemik-iyon homeostazında, paratiroid hormonu PTH/D vitamini eksen temel düzenleyicidir. FGF23-kemik/böbrek ekseninin de iyon homeostazında büyük önem taşıdığı ortaya konulmuştur.[103]

FGF23-kemik-böbrek ekseni, PTH / D vitamini ekseni ile bağlantı halinde ve karmaşık bir endokrin ağ yoluyla kemiği diğer organ işlevlerine bağlayan yeni keşfedilen biyolojik sistemlerin bir parçasıdır. Osteoblastların ve osteositlerin FGF23 üretimi ve salgısının keşfiyle , kemiklerin kalsiyum ve fosfat için depo olma görevinin dışında, mineral homeostazına da karışan hatta diğer organlarla iletişim kuran bir endokrin işlevi de

tanımlanmıştır. Kemik tarafından salgılanan FGF23'ün esas hedefi böbrek üzerinden, fosfat emilimini ve D vitamini metabolizmasını düzenlemektir.[104]

2.9. FGF23-Klotho Aksı

FGF23- kemik / böbrek eksenini en az iki fizyolojik fonksiyona sahiptir:

- 1) Kemikten böbreğe bir fosforik sinyal göndermek- kemikten kana fosfat akışını dolayısıyla kemik döngüsündeki değişiklikleri kontrol etmek
- 2) FGF23 aracılığıyla 1,25 (OH) 2D üretimini baskılanmak, aşırı D vitamini maruziyetinin olumsuz etkilerinden organizmayı korumak için bir karşı düzenleyici hormon sağlamak.[103]

FGF23 ayrıca fosfat ve paratiroid bezi fonksiyonlarını düzenlemek için başka fonksiyonları, FGF23'ün fosfat ile regülasyonu ve PTH ile FGF23'ün karşılıklı regülasyonunu içeren olası bir paratiroid bez-kemik ekseninin fizyolojik önemi olabilir.[104]

FGF23; FGF15, FGF19 ve FGF21'i de içeren endokrin FGF'lerin alt ailesinin bir üyesidir. FGF23, en yüksek homoloji derecesini FGF21 ile gösterir. FGF19, bağırsaklardan salgılanan bir tokluk hormonudur. Beslenme sonrası metabolik yanıtları düzenlemek için hepatositlere etki eder. Açlık koşulları altında ise, karaciğer açlık hormonu FGF21'i salgılar, adipositlere ve suprachiasmatik çekirdeğe sinyal gönderir, hipotalamusun hipofiz-adrenal ekseninin ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonu yoluyla açlık ve strese metabolik yanıtları düzenler.[105]

FGF23 ise, fosfat alımına yanıt olarak kemikteki osteositler ve osteoblastlar tarafından salgılanır, ancak aynı zamanda tükürük bezleri, mide ve iskelet kası, beyin, meme bezi, karaciğer ve kalp dahil olmak üzere diğer dokular tarafından çok daha düşük konsantrasyonlarda olsa da salgılanmaktadır.[104]

FGF23 ilk olarak fare beyninin ventrolateral talamik çekirdeğinde tanımlanmış, önemi otozomal dominant hipofosfatemik raşitizmi (ADHR) hastalarda ortaya çıkmıştır. Mineral metabolizmasını düzenlemek için aKlotho-FGFR komplekslerine bağlanır.[106]

aKlotho mineral metabolizmasını düzenlemek için en çok renal tübüllerde eksprese edilir. Araştırmalar, FGF-Klotho endokrin sisteminin de diyabet, kanser, arterioskleroz ve kronik böbrek hastalığı gibi yaşlanma ile ilgili bozuklukların patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. [104]

Klotho proteinleri, α Klotho ve β Klotho, endokrin fibroblast büyüme faktörü (FGF) reseptör komplekslerinin temel bileşenleridir. FGF19, FGF21 ve FGF23'ün aynı kökenli FGF reseptörlerine (FGFR) yüksek afiniteli bağlanması için gereklidirler. Bu proteinler, memelilerde çoklu metabolik süreçleri yöneten endokrin sistemin önemli bir parçasıdır.

Kl geni ilk kez 1997 yılında Kuro-o ve arkadaşları tarafından farelerde tanımlanmıştır. Kuro-o ve arkadaşları, hipertansif transgenik fareler ürettikleri bir çalışma sırasında, bu farelerin, 3 haftaya kadar normal gelişme gösterdikten sonra ateroskleroz, osteoporoz gibi yaşlanma benzeri bir fenotip geliştirmeye başladıklarını ve henüz 8-9 haftalıkken öldüklerini fark ettiler ve bunun bir tür 'yaşlanmayı baskılayıcı' genin susturulması sebebiyle gerçekleştiğini düşündüler. Tesadüf eseri keşfettikleri bu gene Yunan mitolojisinde yaşamın ipliğini eğiren kader tanrıçalarından birinin adını 'Klotho' ismini verdiler. Birkaç yıl sonra, ağırlıklı olarak böbreklerin distal kıvrımlı tübüllerinde ifade edilen bir transmembran proteinini kodlayan Klotho genini tanımladılar. Bu keşiften yaklaşık 10 yıl sonra, aynı ekip Klotho'nun fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) için zorunlu yardımcı reseptör olarak işlev gördüğünü gösterdi. [107][108]

Fgf23-nakavt farelerin, Klotho-eksik farelerde gözlemlenen şekilde, karmaşık bir yaşlanma benzeri fenotipe sahip olması klotho ve FGF23 arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmüştü. O zamana kadar, FGF23, idrardan fosfat atılımını teşvik eden ve aktif D vitamini (1,25-dihidroksivitamin D3) 'in serum seviyelerini düşüren kemik kökenli bir hormon olarak biliniyordu. Fakat, FGF23 reseptörü tanımlanamamıştı. Çünkü FGF23, tüm FGF reseptörü (FGFR) izoformları için düşük afiniteye sahipti ve fizyolojik konsantrasyonlarda FGFR'lere minimal bağlanma gösteriyordu. Artık Klotho'nun FGF23'ün FGFR'ye yüksek afinite ile bağlanması için gerekli olduğunu ve FGF23'ün fizyolojik reseptörünün Klotho ve FGFR'nin ikili kompleksi olduğu bilinmektedir. [108]

Klotho ağırlıklı olarak böbrekte ve beyindeki koroid pleksusun epitelinde eksprese edilir. Bu bulgulara ek olarak hipofiz bezi, plasenta, iskelet kası, idrar kesesi, aort, pankreas, testis, yumurtalık ve kolonda düşük Klotho ekspresyonu rapor edilmiştir. Kl geninin alternatif işlenmesi ile ayrıca çözümlü formdaki Kl proteini de üretilir ve kana verilir. Transmembran Kl proteini ise fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF23)ün hücre membranlarında bulunan reseptörlerine bağlanması için ko-faktör olarak işlev görür. [109]

Klotho eksikliği, hayvan ve insan çalışmalarında vasküler kalsifikasyon ve kardiyak hipertrofi ve çözümlü Klotho'nun ve / veya zorlanmış aşırı ekspresyonun korunması dahil olmak üzere KBH'deki ilerleme ve kronik komplikasyonlarla ilişkilidir. Böbrek yaralanmalarında, böbrek fonksiyonunu korur ve böbrek fibrozunu baskılar.[110]

Raşitizm ve osteomalazi, kemik matrislerinin bozulmuş mineralizasyonu ile karakterize hastalıklar eğer D vitamini eksikliğine bağlıysa tedavi edilebilir fakat genetik ve edinilmiş formlarının tedavisi hala tam olarak mümkün değildir. Bu hastalıklar Klotho proteini ya da FGF23 hormonu sentezi ile ilgili defektlerle ilgilidir.[111]

2.10. Parathormon-VİTAMİN D Aksı

Paratiroid Hormon (PTH), böbrek tübüllerinde ve kemikteki osteoblastlarda /osteositlerde yüksek oranda eksprese edilen G protein bağlı reseptörleri hedefleyen peptit yapılı bir hormondur. Sekresyonu, ağırlıklı olarak paratiroid bezinde bulunan ve PTH salgılanmasını artırarak serum iyonize kalsiyumdaki azalmaya yanıt veren, kalsiyum algılayıcı reseptör (CASR) tarafından düzenlenir. [112] [113]

Paratiroid bezi tarafından hipokalsemi fonksiyonlarına yanıt olarak salgılanan PTH, böbreklerden Ca^{2+} reabsorpsiyonunu ve 1,25-dihidroksivitamin D üretimini artırarak, kalsiyum ve fosfatın bağırsak emilimini arttırarak ve kemikten de kalsiyum ve fosfatın kana akışını artırarak, serum kalsiyum ve fosfat seviyelerini korur. PTH-vitamin D ekseninin temel işlevi, 1,25-dihidroksivitamin D üretimini uyararak ve böbrek tarafından idrar kalsiyum atılımını azaltarak serum kalsiyum seviyelerini dar bir aralıkta tutmaktır.[113]

Kemikte PTH, osteoblastlar tarafından RANKL'nin uyarılması yoluyla kalsiyum ve fosfat akışını arttırır, bu da osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu uyarır. Kemik ve artan gastrointestinal emilimle artan fosfat, renal tübülden yeniden emilimini azaltılarak dengelenir.[114]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanların Eldesi

Hayvan deneyleri Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nde (DETAB) Deney hayvanları Etik Kurulunun 28.02.2019 tarihinde yapılan toplantısında alınan KOU HAYDEK 2/3-2019 sayılı karar doğrultusunda etik yönden 'uygun' bulunarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda DETAB laboratuvarlarında üretilen Wistar albino ırkı yetişkin 3-3.5 aylık erkek ve dişi sıçanlar kullanıldı .

Hayvanlar 12 saat aydınlık-karanlık döngüsüne uygun sabit ısı (20-25°C) odalarda, yiyecek ve içecek alımları serbest bırakılarak barındırılmıştır.

Gruplandırma aşağıdaki gibidir;

1. Grup: Normal diyet ile beslenen Dişi Kontrol (NFD) (n=10) (Katsumata ve diğ. 2014)
2. Grup: Normal diyet ile beslenen Erkek Kontrol (NFE) (n=8)
3. Grup: Yüksek Fosforlu Diyet ile Beslenen dişiler (YFD) (n:12) (Katsumata ve diğ. 2014)
4. Grup: Yüksek Fosforlu Diyet ile Beslenen Erkekler (YFE) (n:10)

Normal fosforlu diyetle yem olarak standart yem, yüksek fosforlu diyet içinse %1,2 oranında fosfor içeren yem kullanılmıştır (Katsumata ve diğ. 2014). Hayvanlar 16 hafta boyunca yukarıda belirtilen gruplarına göre diyetlerle beslenmişlerdir.

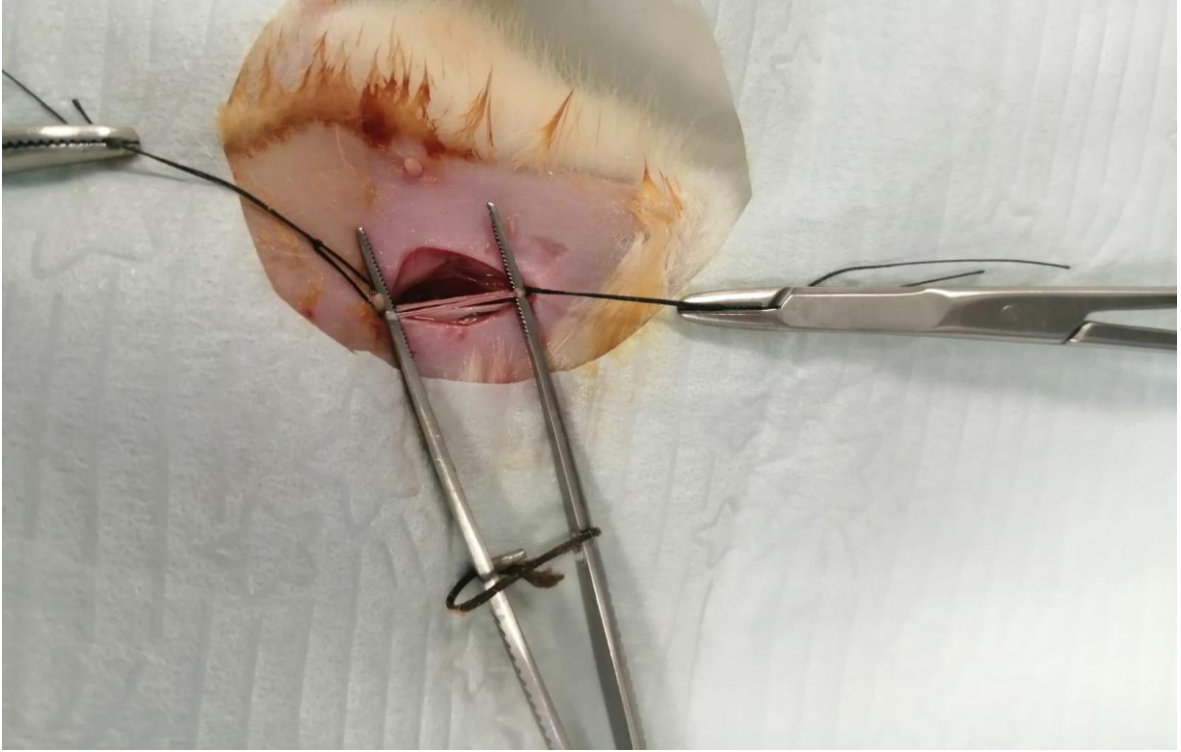
3.2. Yemlerin Eldesi

Yüksek fosfat içeriği %1,2 gr/kg olacak şekilde MBD firması tarafından üretilmiştir. Firmanın standart fosfat içerikli yemi üretim aşamasında iken literature uygun şekilde kg yem başına hesaplanıp içeriğine KH_2PO_4 ilave edilerek yüksek fosfatlı yem elde edilmiştir.[115] Firmanın standart yemi de literatürde normal fosfat düzeyi olarak kabul edilen %0.6 gr/kg düzeyindedir.[116] Normal fosfatla beslenen gruplar da bu standart yemle beslenmiştir.

3.3. Kan basıncı ölçümü

Tüm hayvanlardan diyet tamamlandıktan sonra bir kez olmak üzere kan basıncı ölçümü yapıldı. Diyetleri biten hayvanlar hafif eter anestezisi altına alınarak femoral arterleri kataterize edilip (heparinli serum fizyolojik (0.5 U/L) ile doldurulmuş bir polietilen kateter (P10/P50, Plastic One) kateter hayvanların iliak arterlerine kadar ilerletildi. Kateterin uzantısı kan basıncı kaydını gerçekleştirmek üzere basınç transduseri (FT03) aracılığıyla MP100 veri toplama sistemine (Biopac Systems, Inc, CA, USA) bağlandı (Şekil 2).

Bir saatlik bazal kan basıncı kayıtları alınıp, ortalama arteriyel kan basıncı, 1/3 nabız basıncı + diastolik basınç olarak hesaplanarak değerlendirildi.



Şekil 2. Kan basıncı ölçümü sırasında alınan cerrahi işlem görüntüsü

3.4. Hayvanlardan serum ve doku eldesi

Hayvanlar yüksek doz ketamin ksilazin anestezisi altında toraks açılmış, 4-5 ml olacak şekilde sağ ventrikülden biyokimyasal testler için kan alınmıştır. Sol ventrikülden (sağ atriyum bu arada kesilmiştir) perfuzyon yapılmış dekapite edilmiştir. Elde edilen kan tüpü santrifüje yerleştirilerek 3500 rpm 'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar toplandı ve kullanılana kadar -40°C'da depolandı.

Hayvanlardan bu tez çalışması için aort ve tibia kemiği disekte edilerek çıkarılmıştır (Şekil 3). (Etik kuruldan alınan izin doğrultusunda ileriki projerde çalışılmak üzere beyin, böbrek, yağ dokusu, over, testis, femur başı, akciğer, karaciğer ve kalp de ayrılmıştır.)



Şekil 3. Aort dokusu ve kullanılan kısımlar

Elde edilen aort 3 eşit parçaya ayrılmış, abdominal parçası formaldehit içerisinde bekletilerek histolojik çalışmalarda kullanılmak üzere, orta kısmı RNAlater içerisinde alınarak PCR çalışmasında kullanılmak üzere dondurularak -80 derecede saklanmıştır. Torakal aorta ise ileriki moleküler çalışmalar için yine -80 de dondurulmuştur. Elde edilen her tibia Real-Time PCR çalışmasında kullanılmak üzere yine -80 de dondurulmuştur .

3.5. ELISA Kitlerinin Çalışılması

eBioscience (Vienna, Austria) (BioTeke, Pekin, Çin) marka ELISA kiti kullanılarak serum örneklerinde PTH, D-vit, FGF23, klotho protein, kemik turnover belirteçleri (Deoksipridinolin ve tartraterezistan asit fosfataz), osteoprotegerin ve reseptör aktivatör nükleer kappa B (RANKL), progesteron, östrojen, testosteron ve fetuin A miktarları belirlenmiştir.

Çalışma kit protokolüne uygun olarak standartlar ve örnekler hazırlanarak plate duvarına pipetlendi ve örnekte bulunan hedef sitokin immobilize antikor tarafından bağlandı. Plate yıkandı ve biotin-konjuge anti rat sitokin antikoruna eklenerek ilk antikora bağlanan rat sitokinleri tarafından tutuldu. Sonra inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama yapılarak bağlanmamış biyotin-konjuge antikorlar uzaklaştırıldı. HRP-konjuge streptavidin kuyucuklara pipetlendi biotin-konjuge antikorlara bağlanması sağlandı. Tekrar yıkama yapılarak bağlanmayanlar uzaklaştırıldı. Streptavidin-HRP ile reaktif olacak substrat solüsyonu kuyucuklara eklenerek ölçülecek sitokin için renk

oluşması sağlandı. Daha sonra stop solüsyonu eklenerek renk oluşumu durduruldu ve absorban 450 nm’de ölçülerek miktar tayini yapılmış oldu.

3.6. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Deney gruplarının göreceli gen ekspresyon analizi için aort ve kemik örneklerinden total RNA izolasyonları RNA İzolasyon Kiti (Invitrogen, USA) ile gerçekleştirildi. Öncelikle dokuların homojenizasyonu yapıldı. Aort dokuları homojenizator (Ika Ultra-Turrax) kullanılarak, lizis solusyonu ile homojenize edilirken; kemik daha kompakt bir yapı olduğu için, kemik örnekleri sıvı azot içerisinde havanlar yardımıyla dövülerek toz haline getirildi sonrasında lizis solusyonu kullanılarak homojenizatör yardımıyla parçalandı. 22,000 x g de 5 dk santrifüj sonrası süpernatant yeni bir tüpe aktarılarak hücre artıkları uzaklaştırıldı. Süpernatanta 1:1 oranında %70 ethanol eklenilerek, vortex ile karıştırıldı. Bu karışım aşamalı olarak filtreli kolonlara aktarıldı. Santrifüj ile RNA içeriğinin kolonlara emdirilmesi sağlandıktan sonra kolonlar 2 farklı yıkama solusyonu ile 12,000x g’de 15 sn santrifüj edilerek 3 kez yıkandı. Kolonlar 1 dk boş çevrilerek kalan etanolun uzaklaştırılması sağlandı. Saf olarak RNA’yı içeren kolonlar temiz bir ependorf tüpüne alındı. 50 µL RNaz içermeyen su eklenerek santrifüj ile RNA'nın temiz ependorflara çöktürülmesi sağlandı.

Örneklerin saflığı ve miktarı Pikodrop cihazıyla ölçüldü. Saflığın istenilen 1,8-2,0 aralığında olduğu saptandı. Komplementer DNA (cDNA) sentez kiti ile (Thermo cDNA Synthesis Kit); RNA örnekleri, Oligo DT primerler ve nukleaz içermeyen su ve RNA örneklerinin bulunduğu bir karışım hazırlanarak termal cyler cihazında (TaKaRa Biotechnology, Japonya) 65°C de 5 dk bekletildi. Sonrasında reaksiyon buffer, ters transkriptaz enzimi, RNAaz inhibitörü, dNTP içeren bir karışım hazırlanarak örnekler eklendi. 42°C de 60 dk ve 70°C de 5 dk bekletilerek RNA’dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA’lar -20°C’de PZR aşamasına kadar saklanmıştır.

3.7. Kantitatif Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

PZR reaksiyonu için; Sybergreen DNA boyası içeren bir kit (KapaBiosystems) kullanılarak kantitatif Real-Time PZR yapıldı. Örneklerde RANKL ve OPG genleri (çizelge:) Real time PZR cihazında (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) çalışılmıştır. Housekeeping (Referans) gen olarak beta aktin (ACTB) geni kullanılmıştır. Deney gruplarında referans genlerinin ifadelerine göre hedef genlerin ifadeleri

karşılaştırılmış ve sonuçlar Roche Light cycler yazılımıyla $\Delta\Delta C_p$ metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. Gen ekspresyon analizi için kullanılan primerler ve baz dizilimleri.

Gen adı	Primer Baz Dizilimi (5'→3')
RankL (Receptor Activator of NF-KB ligand)	L: AGACACAGAAGCACTACCTGACTC
	R: GGCCCCACAATGTGTTGTA
Opg (Osteoprotegerin)	L: GAGGTTTCCAGAGGACCACA
	R: TGTCCATTCAATGATGTCCAA
Actb (Beta Actin)	L: CCCGCGAGTACAACCTTCT
	R: CGTCATCCATGGCGAACT

3.8. Realtime PCR

Proksimal femur ve aortada OPG ve RANKL mRNA ekspresyonları RT-PCR ile ölçüldü. Proksimal femur sıvı azot içinde toz haline getirildi ve Total RNA Hızlı Ekstraksiyon kiti (BioTeke, Pekin, Çin) ?? kullanılarak dokularda total RNA ekstre edildi. Ekstre edilen RNA cDNA sentez kiti yardımı ile cDNA'ya dönüştürüldü. SYBR-Greenmaster mix kiti ve OPG, RANKL ve referans gen olan Beta aktin primerleri kullanılarak mRNA ekspresyonları belirlendi. OPG ve RANKL mRNA'ların ekspresyon seviyeleri, Beta-aktin mRNA ekspresyon seviyesine göre normalleştirildi. RANKL/OPG oranı hesaplandı.

3.9. Histojik görüntüleme için aort dokularının hazırlanması

Formalin solüsyonu içerisinde bekletilerek fiksasyonu sağlanan abdominal aortalar, doku takibine alındı. Çeşme suyu altında yıkama işleminin ardından dokular, kademeli olarak artan etil alkol serilerinden (sırasıyla %70, %90, %96, %100) (Merck) geçirilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. 30 dk toluen (Merck) ile şeffaflandırma işlemini takiben dokular 58°C'lik etüvde 30 dk boyunca 1:1 oranında hazırlanmış toluen-parafin karışımında bekletildi. Ardından saf parafin içerisinde 2 saat kadar tutulan dokular, oda sıcaklığında parafin bloklara gömüldü.

Parafin bloklardan kesitler alındı. Alınan kesitlere, morfolojik incelemeler yapabilmek ve tunica media kalınlıklarını ölçebilmek için Hematoksilen & Eozin (H&E) boyaması yapılırken kalsiyum depolanmasını göstermek için Alizarin red boyamaları yapıldı.

Hematoksilen & Eozin (H&E) boyama amacıyla dehidrasyon işleminden geçmiş dokular hematoksilen ile 5 dk boyanmanın ardından 2 kez distile su ile yıkanan kesitler 10-15 saniye bluing reagent ile inkübe edildi. 2 kez distile sudan geçirilmelerinin ardından absolute etanolla muamele edildi. Sonrasında 2-3 dk Eosin Y (modifiye alkolik) solüsyonunda inkübe edilen kesitler absolute alkolde yıkanarak dehidre edildi. Toluende yaklaşık 30 dk bekletilen dokular Entellan aracılığıyla lamel ile kapatıldı.

3.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, Prisma 8 paket programı ile yapıldı. Normal dağılıma uygunluk testi Kolmogorov-Smirnov Testi ile değerlendirildi ve tüm veriler ortalama +/- standart sapma olarak gösterildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, normal dağılım göstermeyen parametreler ise Kruskal Wallis Testi ile belirlendi. Çoklu karşılaştırmalar için Tukey ve paired t testleri kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi. . Kan parametreleri arasındaki ilişkileri saptamak için Pearson korelasyon analizi uygulandı.

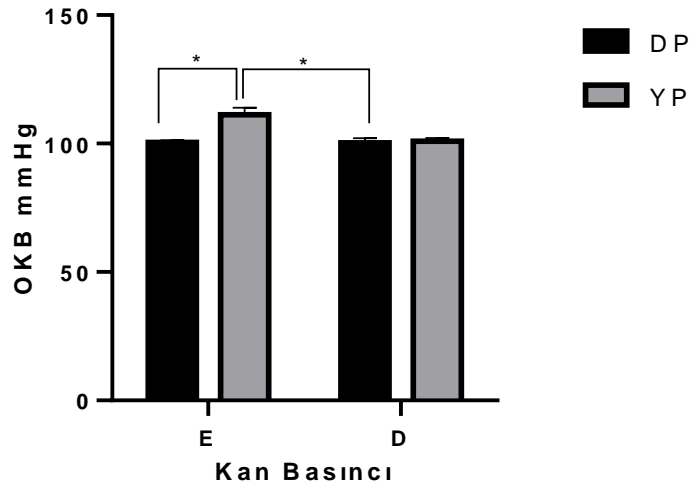
4. BULGULAR

4.1. Kan Basıncı Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın kan basıncı değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı bir farklılık bulunmazken diyetle ilgili anlamlı farklılık mevcuttur ($F(1,21)=4.66$, $p<.05$). Post-hoc analiz sonuçları yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkeklerin (YFE) kan basıncı değerlerinin normal diyet ile beslenen erkek (NFE) ve dişilere (NFD) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir ($p<.05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 3. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kan basıncı değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Ortalama Aort Basıncı-mmHg	100,3±1.87	100,4±0.92	100,9±1.16	111,2±4.34



Şekil 4. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kan basıncı değerleri üzerine etkisi. YFE grubu NFE ve NFD gruplarına göre anlamlı olarak yüksektir ($p<.05$).

4.2. Histolojik Görüntülemenin Değerlendirilmesi

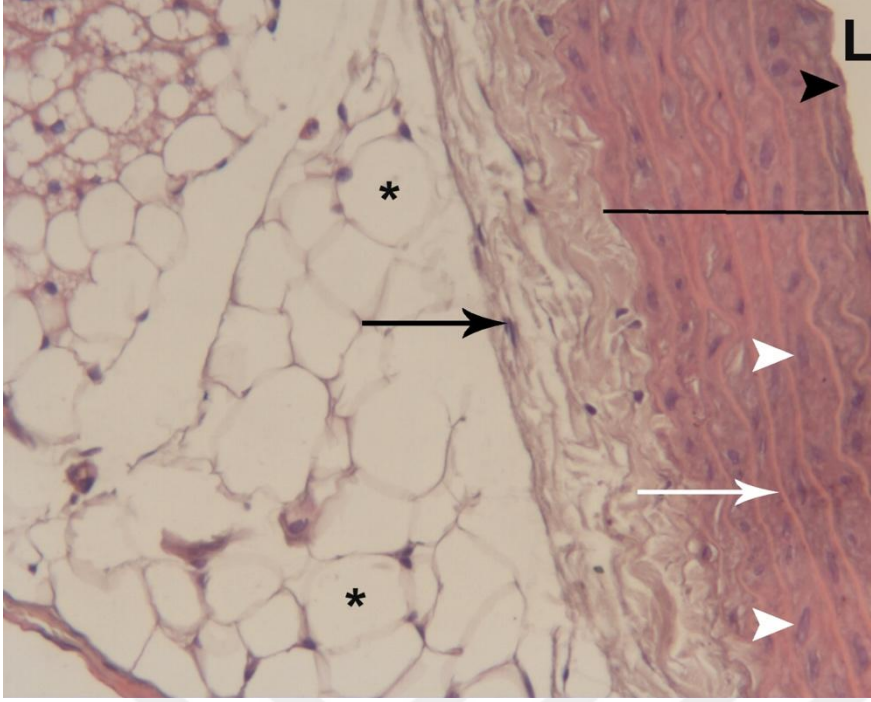
Normal diyet ile beslenen dişi kontrol (NFD) ve Normal diyet ile beslenen erkek kontrol (NFE) grublarına ait, hematoksilin ve eozin (HE) boyaması yapılan preparatlar incelendiğinde, normal elastik arter histolojik yapısına sahip oldukları gözlemlendi (Şekil. 1 ve 2). İntima tabakasında endotel hücreleri düzenli bir şekilde aort lümenini döşemişti. Endotel hücrelerinin altında kollajen liflerden zengin subendotel tabakası normal görünümdeydi. İntima ve media tabakaları arasında yerleşen elastik liflerden oluşan membrana elastika internanın, elastik liflerin yoğunluğu nedeniyle kesin olarak ayırım yapılamıyordu.

Media tabakasında bol miktarda elastik liflerden oluşan elastik lameller (membranlar) gözlemlendi. Elastik lamellerin arasında düz kas hücreleri ve kollajen lifler normal görünümdeydi. Elastik lameller arasına yerleşmiş düz kas hücreleri normal görünümdeydi. Media ve Adventisya tabakaları arasına yerleşen membrana elastika eksterna bol miktarda elastik liflerden dolayı seçilemiyordu. Adventisya tabakası bağ dokusunda yerleşmiş vaso vazorum, kollajen lif ve yağ dokusu içeriğiyle normal elastik arter histolojik yapısına sahipti.

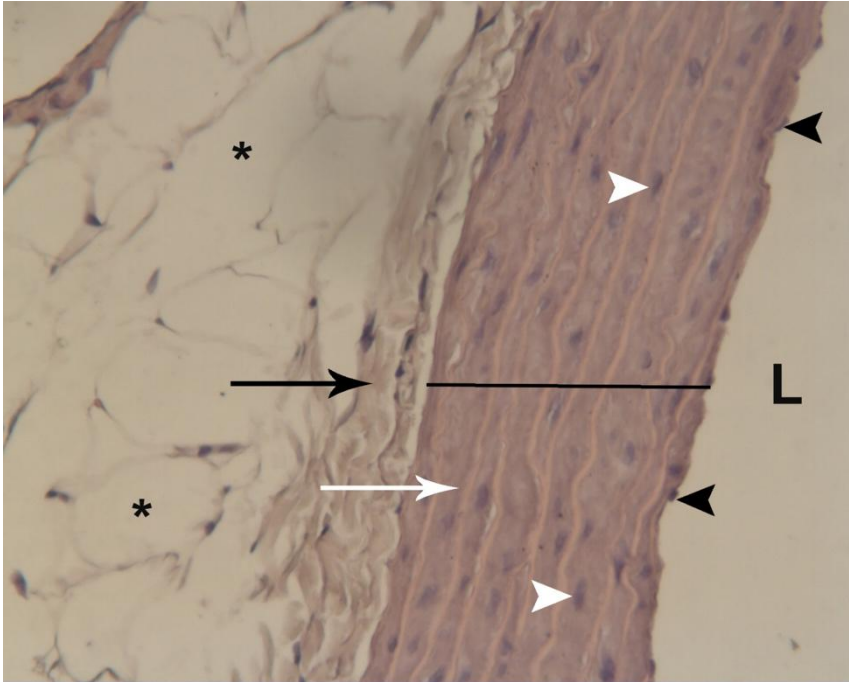
NFD ve NFE grublarına ait, kalsiyum depolarını (birikimlerini, kırmızı renkte) gösteren Alizarin red boyaması yapılan preparatlar incelendiğinde, damarların soluk kırmızı ve kırmızı renk tonlarında normal bir boyanma özelliğine sahip oldukları gözlemlendi. NFD ve NFE grublarında sadece elastik lameller etrafında soluk kırmızı boyanma gözlemlendi (Şekil 5 ve 6).

Yüksek fosforlu diyet ile beslenen dişi (YFD) ve Yüksek fosforlu diyet ile beslenen erkek (YFE) grublarının HE boyaması yapılan preparatlarda media tabakası incelendiğinde, kontrol (NFD ve NFE) gruplarıyla aralarında histopatolojik farklılıkların olduğu gözlemlendi. YFD ve YFE grublarının media tabakasında düz kas hücreleri dilate olmuş ve sitoplazmalarında dejenerasyonun göstergesi olarak vakuoller içeriyorlardı (Şekil 3 ve 4).

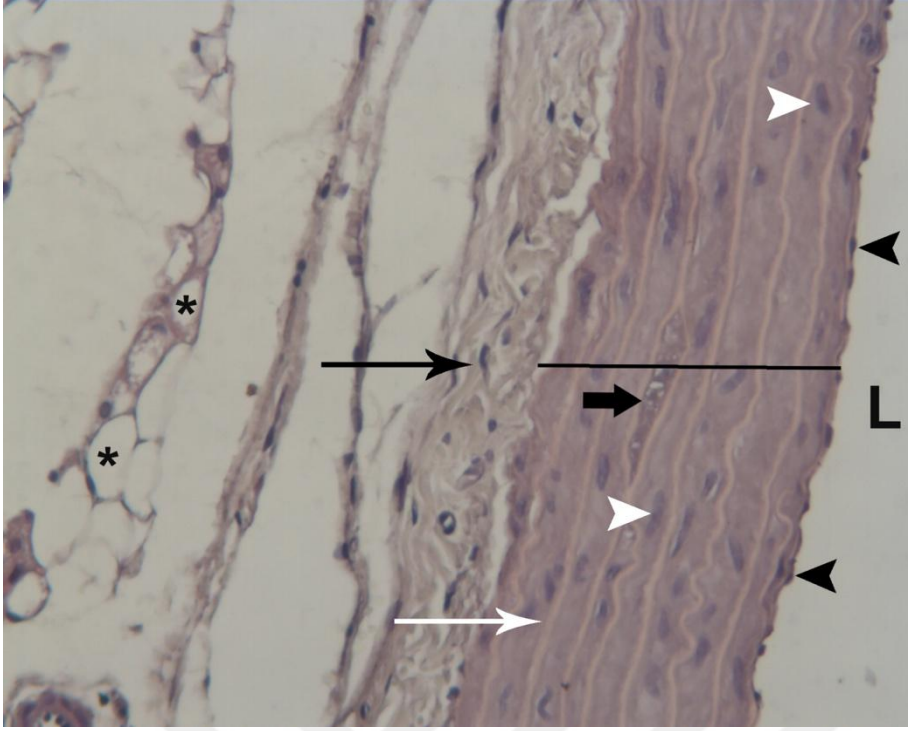
YFD ve YFE grublarının Alizarin red boyamalarında ise media tabakasında koyu kırmızı renkte boyanmış alanların olduğu gözlemlendi. Koyu kırmızı renkte boyanmalar özellikle düz kas hücrelerinde ve elastik lameller çevresinde yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 7 ve 8).



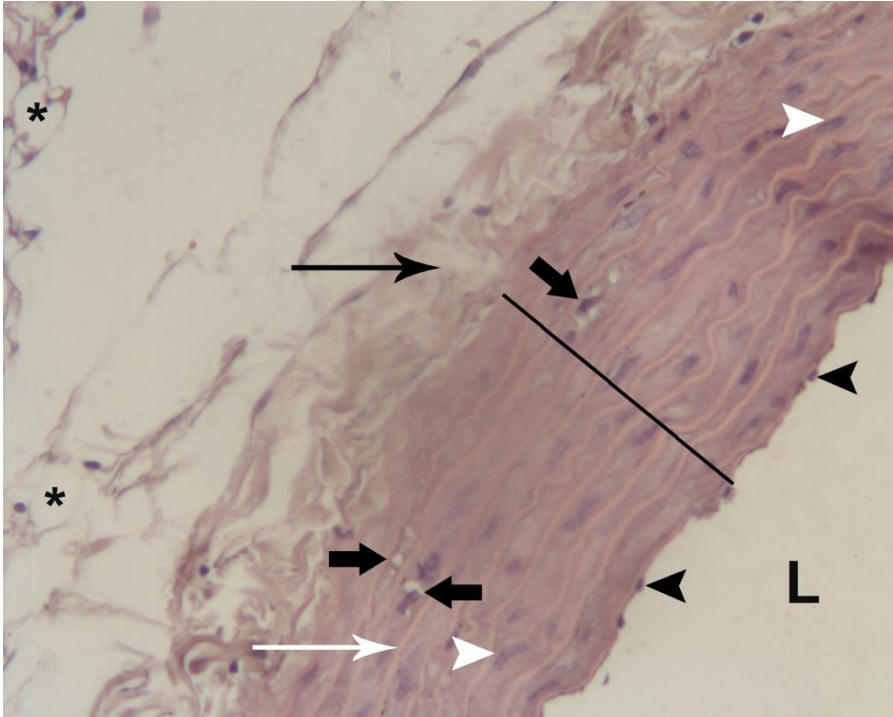
Şekil 6. Normal diyet ile beslenen dişi kontrol (NFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. İntima ve media tabakası düz çizgi, lümen L, yassı endotel hücreleri siyah okbaşı, düz kas hücreleri beyaz okbaşı, elastik lamel beyaz ok, adventisya siyah ok, adiposit asterisk. HE boyaması, büyütme x40.



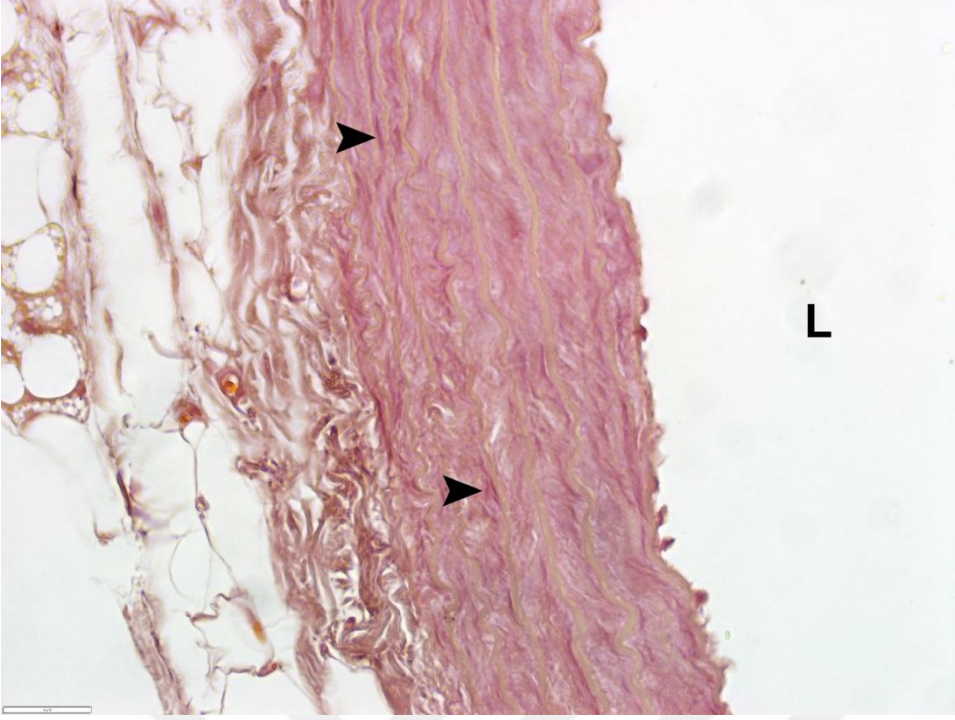
Şekil 7. Normal diyet ile beslenen erkek kontrol (NFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. İntima ve media tabakası düz çizgi, lümen L, yassı endotel hücreleri siyah okbaşı, düz kas hücreleri beyaz okbaşı, elastik lamel beyaz ok, adventisya siyah ok, adiposit asterisk. HE boyaması, büyütme x40.



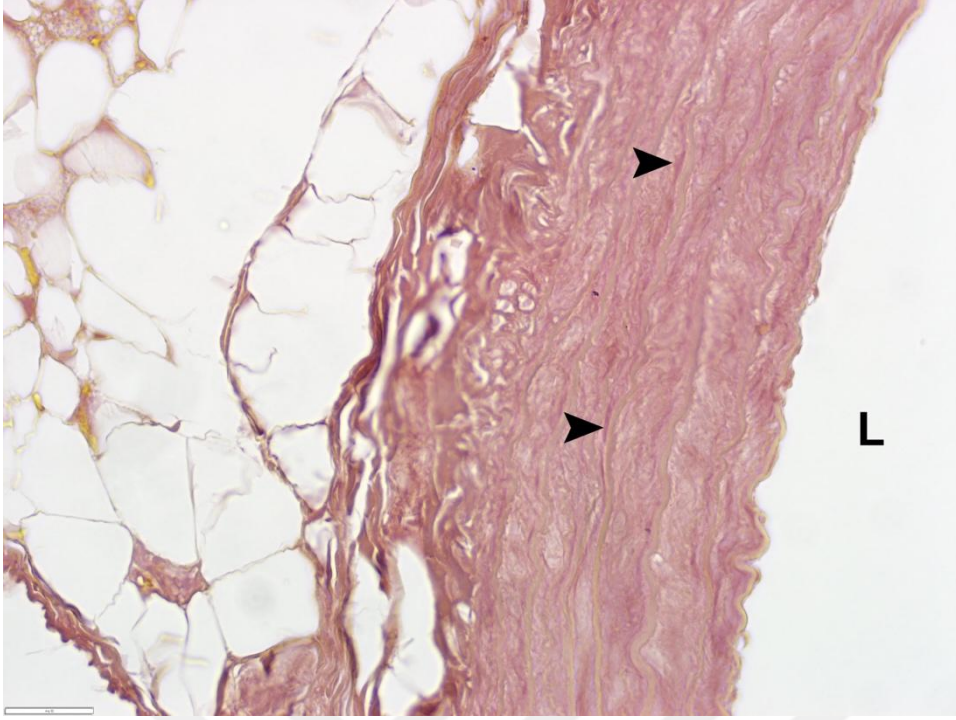
Şekil 8. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen dişi (YFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. İntima ve media tabakası düz çizgi, lümen L, yassı endotel hücreleri siyah okbaşı, düz kas hücreleri beyaz okbaşı, elastik lamel beyaz ok, adventisya siyah ok, adiposit asterisk, düz kas hücresinde vakuoller siyah kalın ok. HE boyaması, büyütme x40.



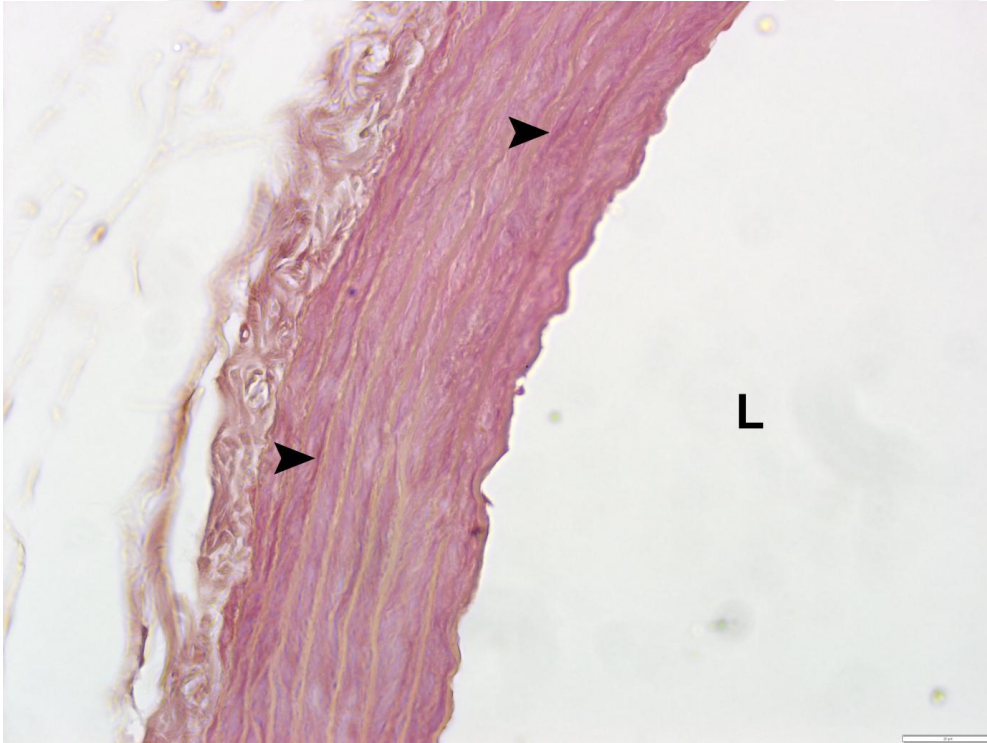
Şekil 9. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen erkek (YFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. İntima ve media tabakası düz çizgi, lümen L, yassı endotel hücreleri siyah okbaşı, düz kas hücreleri beyaz okbaşı, elas tik lamel beyaz ok, adventisya siyah ok, adiposit asterisk, düz kas hücresinde vakuoller siyah kalın ok. HE boyaması, büyütme x40.



Şekil 10. Normal diyet ile beslenen dişi kontrol (NFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. Lümen L, siyah okbaşları kalsiyum boyanması. Alizarin red boyaması, büyütme x40.



Şekil 11. Normal diyet ile beslenen erkek kontrol (NFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. Lümen L, siyah okbaşları elastik lameller çevresinde kalsiyum boyanması. HE boyaması, büyütme x40.



Şekil 12. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen dişi (YFD) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. Lümen L, siyah okbaşları elastik lameller çevresinde kalsiyum boyanması. HE boyaması, büyütme x40.



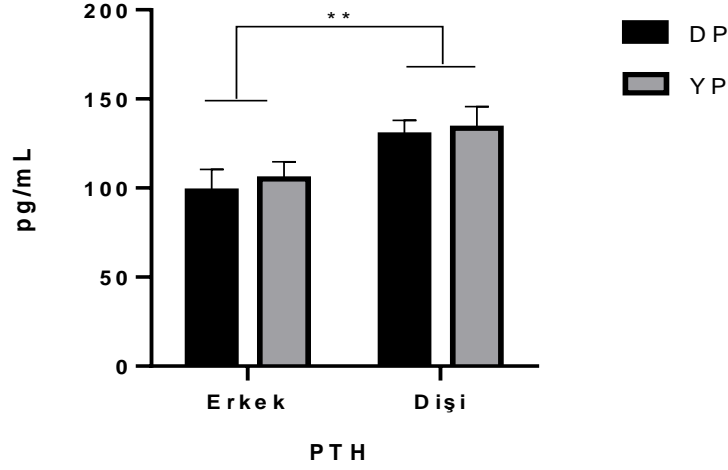
Şekil 13. Yüksek fosforlu diyet ile beslenen erkek (YFE) grubuna ait aort ışık mikroskopik fotoğrafı. Lümen L, siyah okbaşları elastik lameller çevresinde kalsiyum boyanması, beyaz okbaşları düz kas hücrelerinde kalsiyum boyanması. HE boyaması, büyütme x40.

4.3. Kan Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın PTH değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı anlamlı bir farklılık bulunurken ($F(1, 36) = 7,47; p < ,05$) diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo ve Şekil).

Tablo 4. Erkek ve dişilerde normal diyet ve yüksek fosfatlı diyetin PTH değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
PTH (pg/ml)	129,7±26,16	98,33±34,35	133,7±41,99	105±30,98

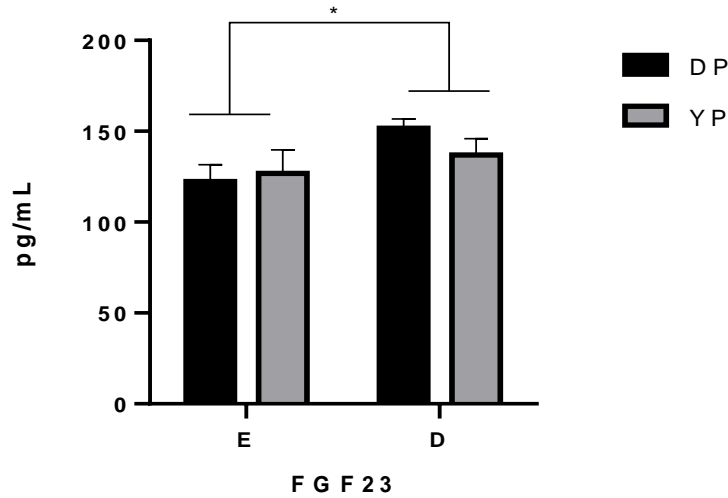


Şekil 14. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin PTH değerleri üzerine etkisi. Cinsiyet açısından anlamlı farklılık vardır (* = $p < 0,05$).

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın FGF-23 değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı anlamlı farklılık bulunurken ($F(1, 36) = 4,18; p < 0,05$), diyetle bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 5. Erkek ve dişilerde normal diyet ve yüksek fosfatlı diyetin FGF-23 değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
FGF-23 (pg/ml)	151,6±16,12	122,2±26,53	136,9±30,99	126,8±40,83

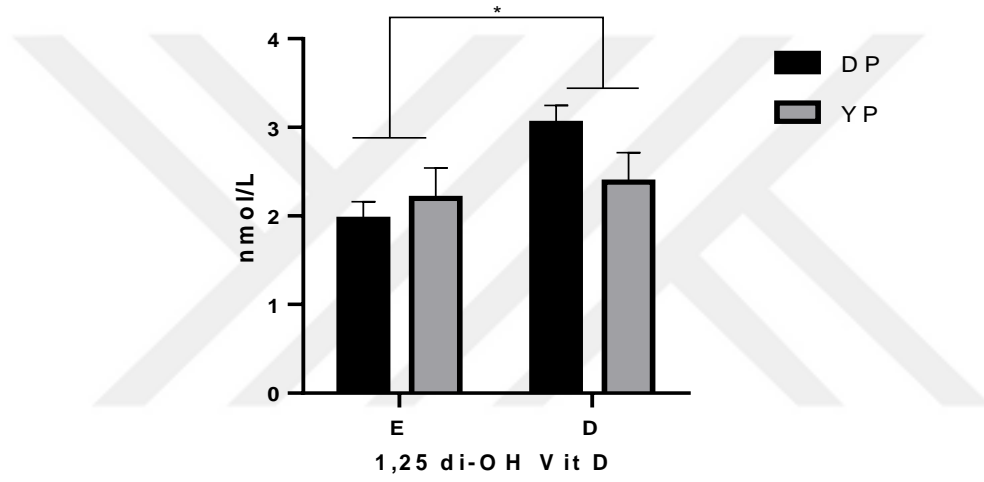


Şekil 15. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FGF-23 değerleri üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın 1,25 di-OH vitamin D değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı anlamlı farklılık bulunurken ($F(1, 36) = 4,57; p < 0,05$), diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 6. Erkek ve dişilerde normal diyet ve yüksek fosfatlı diyetin 1,25 di-OH vitamin D değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
1,25 di-OH vitamin D (nmol/L)	3,04±0,64	1,96±0,56	2,38±1,14	2,19±1,08

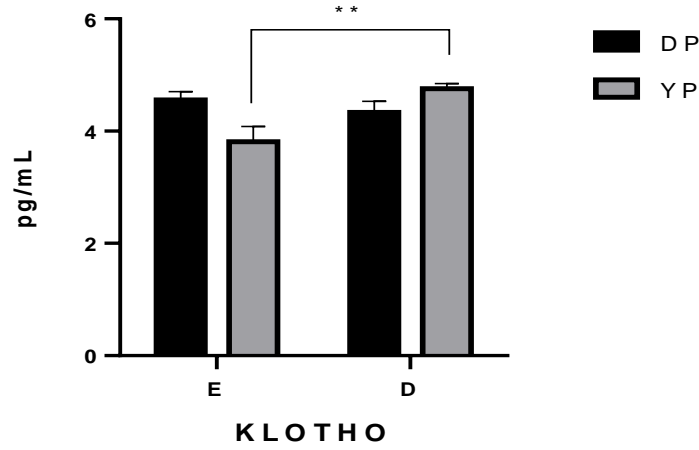


Şekil 16. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin 1,25 di-OH vitamin D değerleri üzerine etkisi.

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın Klotho değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyete bağlı bir anlamlılık bulunmazken, yüksek fosfat tüketen erkek ve dişi grupların bazal değerlerine göre zıt yönde değişimi etkileşimde anlamlılık oluşturmuştur ($F(1, 36) = 9,83; p < ,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 7. Erkek ve dişilerde normal diyet ve yüksek fosfatlı diyetin Klotho değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Klotho (pg/ml)	4,33±0,63	4,55±0,40	4,75±0,31	3,81±0,84

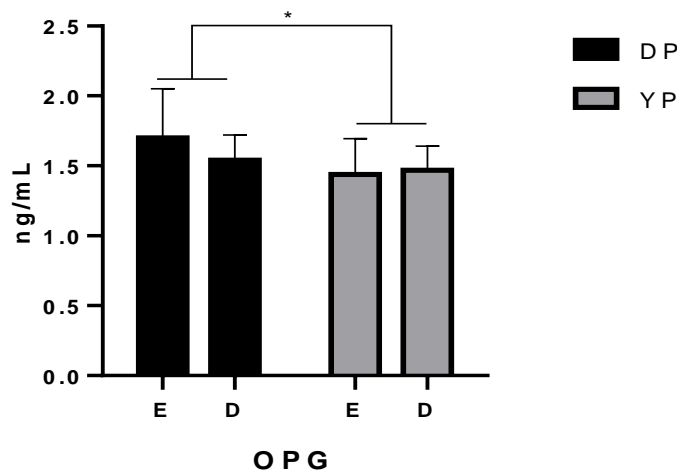


Şekil 17. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Klotho değerleri üzerine etkisi. YFD grubu ve YFE grubuna arasında zıt yönde etkileşim vardır (** $p < ,05$).

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın OPG değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı bir farklılık bulunmazken diyete bağlı anlamlı farklılık mevcuttur ($F(1,36) = 4,73; p < ,05$). Post-hoc analiz sonuçları YFE’de OPG değerlerinin NFE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir ($p < ,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 8. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin OPG değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
OPG (ng/ml)	1,55±0,18	1,70±0,35	1,51±0,15	1,43±0,25

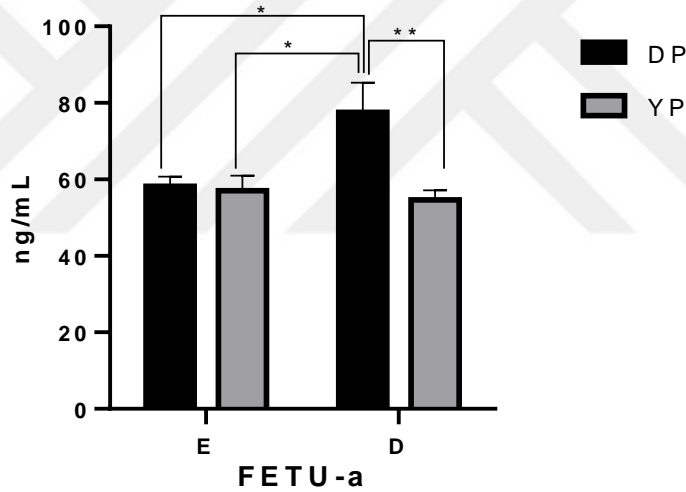


Şekil 18. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin OPG değerleri üzerine etkisi. YFE grubu NFE grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($*p < ,05$).

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın FETU-a değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı bir anlamlılık bulunmazken, diyete bağlı anlamlı bir farklılık mevcuttur ($F(1, 36)= 6,47; p < ,05$). Post-hoc analiz sonuçları YFD'de FETU-a değerlerinin NFD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir ($p < ,05$). Ayrıca normal fosfat tüketen dişi grubunun bazal değerlerine göre NFE ve YFE grubunun bazal değerlerinin zıt yönde değişimi etkileşimde anlamlılık oluşturmuştur ($F(1, 36)= 5,27; p < ,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 9. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FETU-a değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
FETU-a (ng/ml)	77,57±24,50	58,24±7,03	55,91±9,94	57,06±12,25

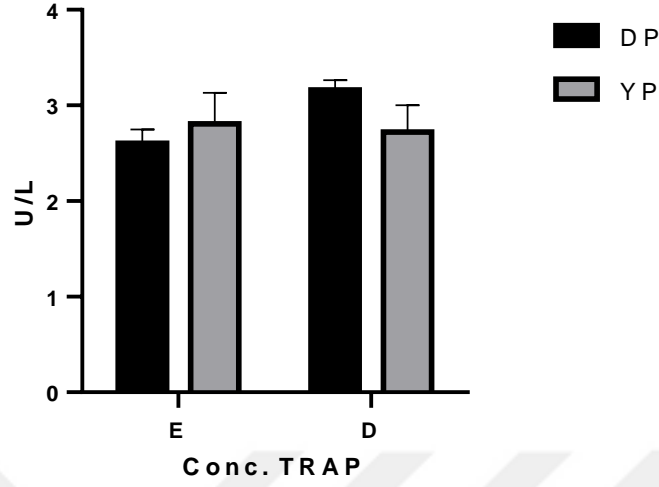


Şekil 19. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin FETU-a değerleri üzerine etkisi. YFD grubu NFD grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır (** = $p < 0,001$); YFD ile NFE ve YFE grupları arasında zıt yönde etkileşim vardır (* = $p < 0,05$)

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın Conc. TRAP değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 10. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Conc. TRAP değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Conc. TRAP (U/L)	3,61±0,32	2,60±0,40	3,17±0,69	3,02±0,83

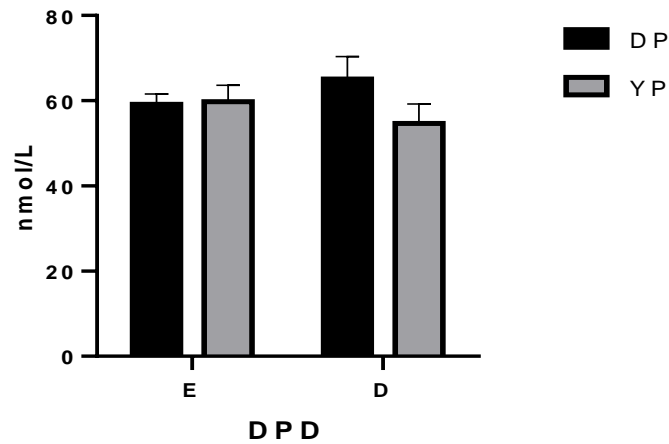


Şekil 20. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Conc. TRAP değerleri üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın DPD değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyetle bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 11. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin DPD değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
DPD (nmol/L)	65,08±16,79	59,15±6,78	54,72±15,61	59,79±12,05

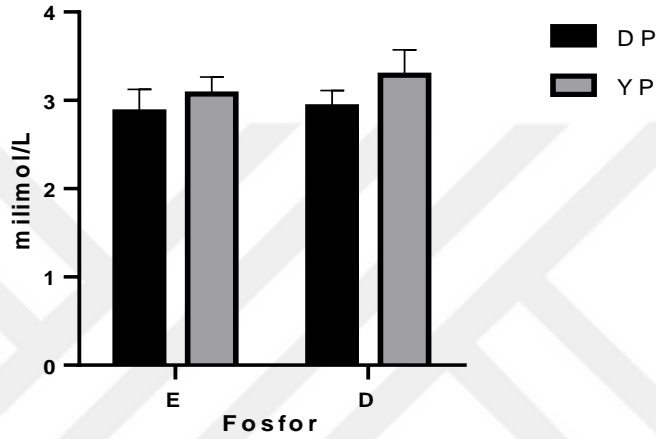


Şekil 21. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin DPD değerleri üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın Fosfor değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 12. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Fosfor değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Fosfor (milimol/L)	2,92±0,58	2,86±0,72	3,28±0,95	3,07±0,60

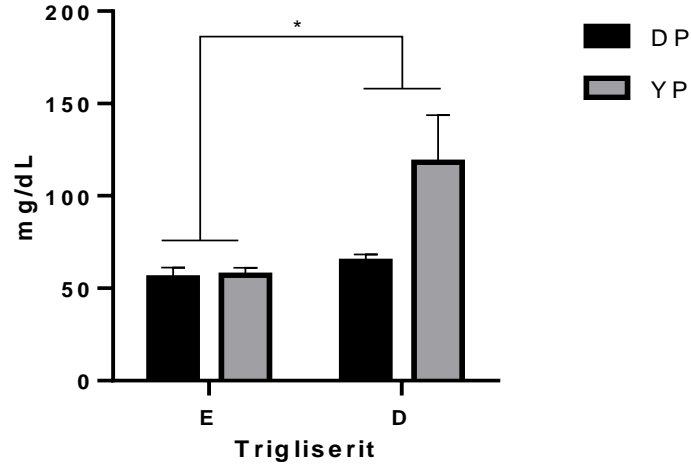


Şekil 22. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Fosfor değerleri üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın Trigliserit değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı anlamlı bir farklılık bulunurken ($F(1, 35) = 5,41$; $p < 0,05$) diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo ve Şekil).

Tablo 13. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Trigliserit değerleri üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Trigliserit (mg/dL)	64,60±11,47	55,50±16,48	118,2±84,99	57,00±12,90



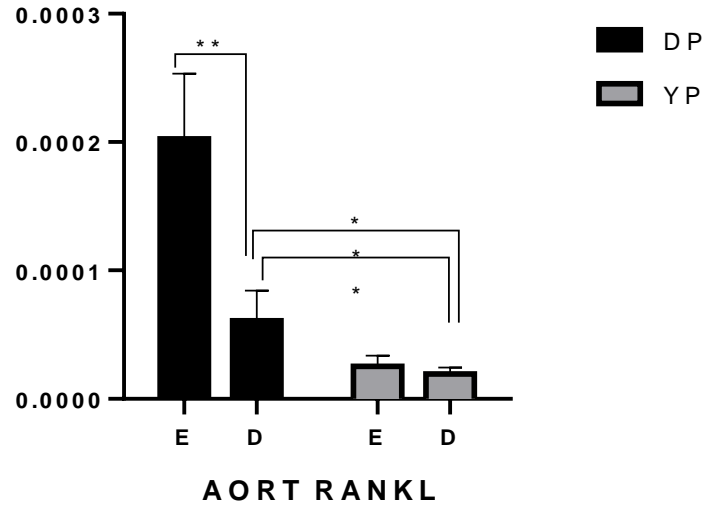
Şekil 23. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin Trigliserit değerleri üzerine etkisi. Cinsiyet açısından anlamlı farklılık vardır (* = $p < 0,05$).

4.4. Real- Time PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın Trigliserit değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ($F(1, 15) = 5,43; p < ,05$) ve diyete bağlı anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($F(1, 15) = 11,90; p < ,05$). (Tablo ve Şekil). Post-hoc analiz sonuçları YFE’de aort RANKL değerlerinin NFE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir ($p < ,05$). Aynı şekilde YFD’de aort RANKL değerlerinin NFD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını göstermektedir ($p < ,05$). Ayrıca normal fosfat tüketen erkek grubunun bazal değerlerine göre NFD ve YFD grubunun bazal değerlerinin zıt yönde değişimi etkileşimde anlamlılık oluşturmuştur ($F(1, 15) = 4,60; p < ,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 14. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Aort RANKL	0,00005	0,00013	0,000017	0,000024

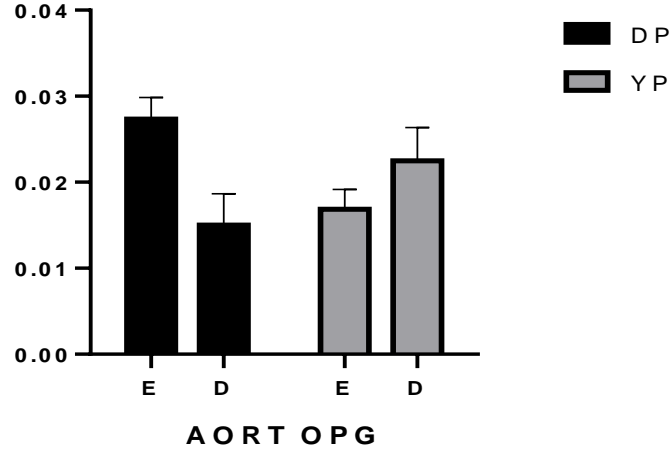


Şekil 24. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort RANKL ekspresyonu üzerine etkisi. YFE grubu NFE grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($*= p < 0,05$); YFD grubu NFD grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($*= p < 0,05$); NFE ile NFD ve YFD grupları arasında zıt yönde etkileşim vardır ($** = p < 0,05$)

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın aort OPG değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca gruplar arasında bazal değerlerinin zıt yönde değişimi etkileşimde anlamlılık oluşturmuştur ($F(1, 16) = 8,09; p < ,05$) (Tablo ve Şekil).

Tablo 15. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Aort OPG	0,015±0,008	0,027 ± 0,005	0,022±0,008	0,016±0,005

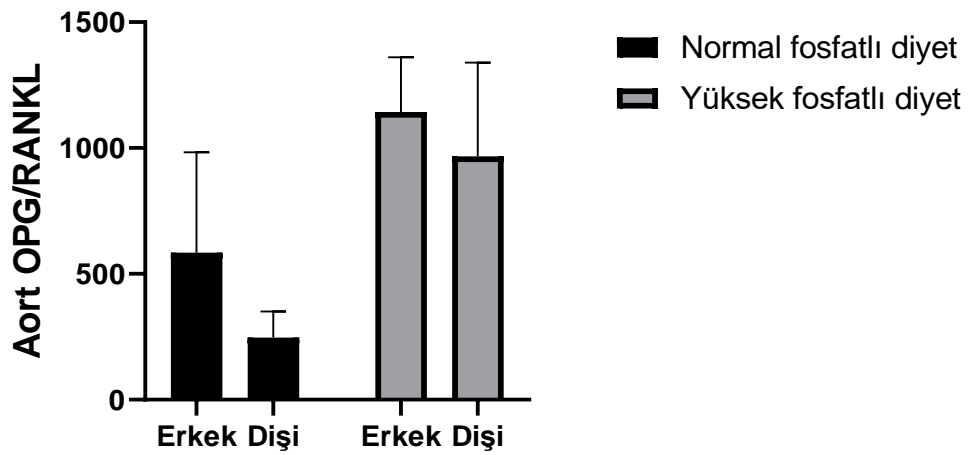


Şekil 25. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın aort OPG/RANKL değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyetle bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 16. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Aort OPG/RANKL	6,077e-005± 5,802e005	0,0002±0,0001	1,947e-005 ± 9,655e-005	2,535e-005 ±1,673e-005

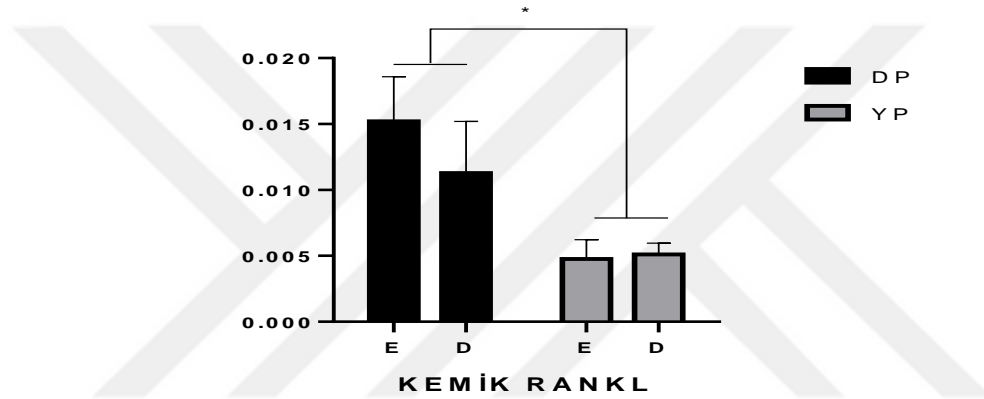


Şekil 26. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin aort OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın kemik RANKL ekspresyonu üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete bağlı farklılık bulunmazken, diyete bağlı anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($F(1, 11) = 5,64; p < 0,05$).

Tablo 17. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Kemik RANKL	0,011±0,007	0,015±0,007	0,005±0,002	0,005±0,003

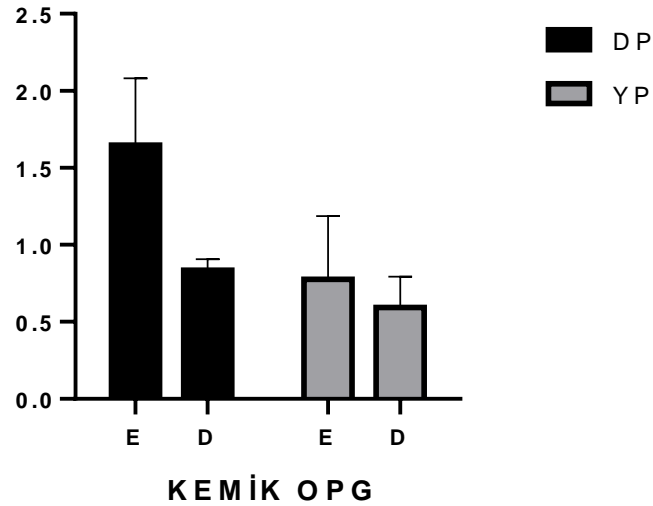


Şekil 27. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın kemik OPG değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyete bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 18. Erkek ve Dişilerde Normal diyet ve Yüksek Fosfatlı diyetin kemik OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Kemik OPG	0,83±0,14	1,64±0,97	0,59±0,45	0,78±0,71

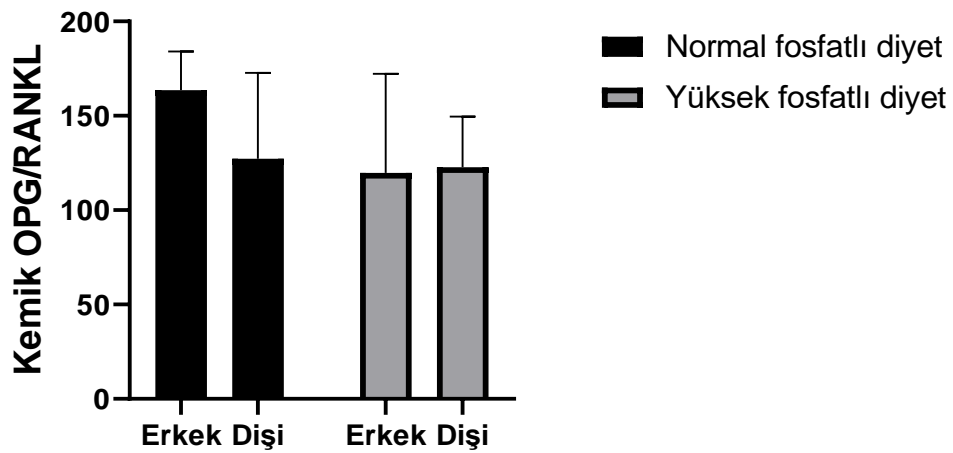


Şekil 28. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG ekspresyonu üzerine etkisi

Normal ya da yüksek fosfatlı diyet ile beslenen erkek ve dişilerde fosfatın kemik OPG/RANKL değerleri üzerine etkisi iki yönü varyans analizi ile değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyete ve diyetle bağlı bir farklılık bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Tablo 19. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

Gruplar	NFD	NFE	YFD	YFE
Kemik OPG/RANKL	127,3±78,79	163,5±41,15	122,8±53,41	119,8±104,9



Şekil 29. Erkek ve dişilerde normal ve yüksek fosfatlı diyetin kemik OPG/RANKL ekspresyonu üzerine etkisi

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, yüksek fosfatlı diyetin; (1) fosfat regülasyonu, (2) kardiyovasküler sistem ve (3) kemik turnoverı üzerine etkileri ve cinsiyete bağlı olası farklılıklar dikkate alınarak moleküler, yapısal ve fonksiyonel düzeyde incelenmiştir. Çizilen çerçevede elde edilen bulgular fosfat tüketiminin ve/veya cinsiyetin fosfat regülasyonu ile ilişkili fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Vücutta fosfat regülasyonunda rol oynayan hormonların kan seviyelerinin, yüksek fosfatlı diyetle ilişkili olarak anlamlı değişiklik göstermediği; fakat, dişi sıçanlarda fosfatürik hormonlar olan PTH ve FGF-23 düzeylerinin daha yüksek, fosfat emilimini arttıran hormon olan 1, 25 (OH)₂ kolekalsiferolün ise erkek sıçanlara göre düşük olduğunu gösterilmiştir. Kanda yüksek fosfatlı diyet uygulanan dişi ve erkek grupların serum fosfat düzeylerinde, anlamlı olmasa da, artış yönünde marjinal değişiklik saptanmıştır. Bu durum hayvanların sağlıklı olması, özellikle atılım organı olan böbreklerde fonksiyon kaybının bulunmaması, başka bir ifadeyle, serum fosfatını düzenleyici mekanizmaların gerek hormonal gerekse organ düzeyinde işler durumda olması ile açıklanabilir. Aynı zamanda fosfat regülasyonun tüm bileşenleri dikkate alındığında cinsiyete bağlı farklılıkların olabileceği görülmektedir.

Literatürde yüksek fosfatlı diyet etkilerinin incelendiği insan çalışmalarının genellikle kronik böbrek hastaları üzerinde gösterilmesi, yapılan hayvan deneylerinin ise genellikle 5/6 nefrektomili hayvanlarda yapılması bizim ise sağlıklı hayvanlarla çalışmamız serumda anlamlı artışlar görmemizi etkilemiş olabilir. Ayrıca, fosfatın primer olarak hücre içi bir anyon olduğunu ve damar ve kemik dokusu başta olmak üzere doku seviyesinde kalsiyum bileşikleri oluşturduğu dikkate alınırca, sadece serum fosfat ölçümünün toplam fosfat dengesinin ve bununla ilişkili risklerin yalnızca kısmi bir değerlendirmesini sağlaması mümkündür (Smith et al., 2012; Cupisti, 2013; Ferreira et al., 2013; Akiyama, Kimura, & Shiizaki, 2018). Bunun yanında, kalsifikasyon eğiliminin potansiyel bir belirteci olan serum CPP seviyelerinin, kronik böbrek hastalığı olanlarda hiperfosfateminin ortaya çıkmasından önce yükselmeye başladığının gözlemlenmesi, fosfat dengesi ile ilişkili patolojik süreçlerin serum fosfat seviyelerine yansımadan da ortaya çıkabileceğini göstermektedir [117]. İlave olarak, fosfat dengesini korumak üzere oluşan yanıtlar, daha yüksek serum fosfat seviyeleri ve olumsuz sonuçlar arasındaki ilişkilerden sorumlu olabilir. Dolayısı ile burada telafi edici mekanizmaların olası toksisitesinden söz edilebilir.

Kan trigliserit düzeylerinde cinsiyetler arasında yüksek fosfatlı diyetten etkilenme açısından anlamlı farklılık saptanmıştır. Yüksek fosfatlı diyetle beslenen dişi grubunda trigliserit düzeyinde anlamlı artışın saptanması, dişilerde fosfat metabolizmasına metabolik süreçlerin de dahil edilebileceğini düşündürmektedir. Korelasyon çalışmasının sonuçları da yüksek fosfatlı grupta PTH, TG ve P arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu, östrojenin ise P ile negatif bir korelasyon gösterdiğini göstermektedir. Hiperlipidemi ve osteoporoz arasında ilişkiyi gösteren yayınlarda da bu ilişkiye dikkat çekilmiştir [120].

Kemik turnoverının rezorbsiyon süreçlerini yansıtan kan parametreleri içinde, kollagen yıkım ürünlerinden biri olan DPD ve osteoklastik aktiviteyi yansıtan TRAP grupları arasında anlamlı farklılık göstermese de her iki parametrenin grupları arasında aynı paterni gösterdiği fark edilmiştir. Kanda rezorbsiyon belirteçleri anlamlı bir değişiklik yansıtmamaktadır. Bu, kemiklerde rezorbsiyonun artmadığını ya da kemik turnoverında azalmayı gösteren bir durum olarak yorumlanabilir. Ayrıca kemik dokusunda incelenen, osteositlerden ve osteoblastlardan salgılanan ve osteoklastik aktiviteyi yansıtan RANKL mRNA düzeylerinin hem dişi hem erkek grubunda yüksek fosfatlı diyetle bağlı olarak anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Bu durum kandaki rezorbsiyon belirteçlerinin anlamlı değişiklik göstermemesi ile uyumlu bir bulgudur. Diyetle alınan fosfat yüküne bağlı hiperfosfateminin kronik böbrek hastalığındaki hiperfosfatemiden farkı söz konusudur. KBH'nın sekonder hiperparatiroidiye yol açtığı ve kemik rezorbsiyonu artırdığı bilinmekteyken, diyetteki mekanizma araştırılmalıdır. Beraber değerlendirildiğinde, yüksek fosfatlı diyetin kemik turnoverını azaltıp, kemikleri düşük turnoverlı osteopenik bir duruma sokuyor olma ihtimali söz konusu olabilir. Kronik böbrek yetmezlikli hastalarının bazılarının yüksek turnover ve rezorbsiyon artışı ile gelişen durumlardan muzdaripken bazılarında ise düşük turnoverlı duruma girildiği ve buna bağlı gelişen osteomalazi ya da adinamik kemik hastalığı gibi mineralizasyon kaybının gözlemlendiği durumların yaşandığı bilinmektedir. Fakat bu farklılığın sebebi ya da adinamik kemik hastalığının (AKH) patogenezi henüz açığa çıkarılmamıştır [121].

Yoshiko Iwasaki-Ishizuka 2005 ve arkadaşları böbrek yetmezliğinde görülen düşük kemik turnover durumunun iskeletin PTH direnci geliştirilmesi sonucu gelişebileceğini göstermişlerdir [122]. AKH'nın patofizyolojisi çok faktörlü ve oldukça karmaşıktır. Temel olarak AKH, paratiroid hormonunun (PTH) kemik metabolizmasına direncinden veya PTH salımının aşırı baskılanmasından kaynaklanmaktadır, ancak bu sonucun öncesinde neler olduğunun açığa çıkarılması önemlidir [123]. Kronik böbrek hastalarında fibroblast büyüme faktörü-23'ün (FGF-23) artarken, eş-reseptörü olan alpha-Klotho'da azalma

gözlenmektedir. Bu peptit, yüksek fosfat ve kalsitriol seviyelerine yanıt olarak osteositler ve osteoblastlar tarafından salgılanır ve böylece fosfatın atılımının artmasına izin verir. A-Klotho ekspresyonunun azalması, FGF-23'e direnç gelişmesine, dolayısıyla, FGF-23 üretiminde bir artışa, kalsitriol düzeylerinde azalmaya, nispi hipokalsemi ve sekonder hiperparatiroidizme yol açar. Bu kaskat, sonunda PTH reseptörünün aşağı regülasyonu ve PTH etkisine karşı iskelet direnci ile sonuçlanır. PTH' nin aşırı baskılanmasının dinamik kemik hastalığının bir özelliği olduğu düşünülürse, bu direnci geliştirmeye yatkın hasta grupları ve altta yatan mekanizmalar çalışılmalıdır. Sağlıklı insanlarda kronik yüksek fosfatlı diyetin de PTH direncine yol açacağını ileri süren çalışmalar bizim tespit ettiğimiz düşük turnover durumunun sebebinin kemiklerde gelişen PTH direnci sebebiyle oluşabileceğini düşündürmüştür [118]. Sekonder hiperparatiroidizmlili diyaliz hastalarının kalsitriol tedavisinin ardından dinamik kemik hastalığı geliştirdikleri görülmüştür.

PTH'nin kemik dokusuna etkileri üzerine yapılan çalışmalarda cinsiyet nadiren dikkate alınmıştır. Bu etkiyi inceleyen az sayıdaki çalışmadan birinde, Yongmei Wang ve arkadaşları PTH' nin erkek sıçanlar üzerindeki anabolik etkisinin dişilerden daha belirgin olduğunu göstermiştir [124]. H D White ve arkadaşları da growth hormon eksikliği olan hastalara uygulanan PTH tedavisine yanıtlarda cinsiyet farklılığına dikkat çekmişler, kadınlarda yeni kemik oluşumunun daha geç başladığını bildirmişlerdir [125]. Primer hiperparatiroidinin kadınlarda erkeklere göre 3 kat daha fazla görüldüğü bilinmektedir, Danica M. Vodopivec ve arkadaşları paratiroidektomi sonrası erkek hastaların kadın hastalara göre kemik mineral dansitesini daha etkili bir şekilde arttırabildiklerini söylemişlerdir. PTH' nin kemik metabolizması üzerine etkileri kadın erkek arasında farklılık gösteriyorsa, bu farklılığın PTH resistansı geliştirilmesi ve düşük kemik turnover süreci ile ilişkisinin araştırılması gereklidir [126]. Bizim deney protokolümüzde, sağlıklı hayvanlara uygulanan yüksek fosfatlı diyetin, kemik dokusunda osteosit ve osteoblastların RANKL ekspresyonlarının baskılanmasına ya da bu hücrelerin sayısının azalmasına neden olarak düşük kemik turnoverına yol açması muhtemeldir. Bu açıdan değerlendirildiğinde, kemikler üzerinde immünohistokimyasal çalışmalarla osteosit/osteoblast ve osteoklast hücre yoğunluğunun ve ligand ekspresyonlarının ölçümünün yanında, kemik dansitometresi ölçümleriyle olası osteopenik durumun araştırılması faydalı olabilir. Bununla birlikte kemik dokusundaki RNA seviyesinde azalmanın, protein seviyesinde de doğrulanması gerekmektedir. Kanda ölçülen OPG düzeylerinin, yüksek fosfatlı diyetle beraber anlamlı olarak her iki cinsiyette de düşük olması ve primer kökeni olan kemikte de benzer şekilde OPG mRNA sının yüksek fosfatlı diyetle bağlı olarak her iki cinsiyette de

anlamalı düşüş göstermesi birbiri ile uyumlu parametrelerdir, aynı şekilde kemik dokusu düzeyinde osteoblast/osteosit sayında düşme ve ekspresyon azalması ile açıklanabilme durumu ve mekanizmasının araştırılmasını gerektirmektedir.

RANKL ve OPG, kemik döngüsünün düzenlenişinde rol oynayan ana faktörler içinde yer aldıkları gibi immün mekanizmalar ve vasküler kalsifikasyon oluşumu ile de ilişkili faktörlerdir. OPG ile vasküler kalsifikasyon ilişkisi incelendiğinde uyumsuz sonuçların olduğu görülmektedir. Diyaliz hastalarında OPG seviyeleri yüksek fosfat düzeyleri, artmış arter kalsifikasyonları ile ilişkili bulunmuşken, prelinik çalışmalarda OPG nakavt farelerin, transgenik OPG enjeksiyonuyla önlenebilen vasküler kalsifikasyon geliştirdiği gösterilmiştir [127]. Ayrıca sıçanlarda OPG uygulamasının, varfarin ve D vitamini ile indüklenen arter kalsifikasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Bizim çalışmamızda yüksek fosfatlı diyetle kan OPG düzeylerinin anlamlı olarak her iki cinsiyette düştüğü bulunmuştur. Bu noktada kan OPG düzeylerinin kaynağının hangi doku olduğunun bilinmesi önemlidir ve muhtemel kaynak kemik dokusudur. KBH' nda görülen OPG seviyelerinin kemik rezorpsiyonunu uyaran faktör olan RANKL seviyelerindeki artışı telafi edici bir mekanizma olarak arttığı söylenebilirken [114], bizim çalışmamızda da görüldüğü gibi düşük turnover' lı bir durum söz konusu olduğunda OPG düzeylerindeki düşme OPG nakavt hayvanlarda görülene benzer bir durum geliştirebilecektir. Diyete bağlı değişiklikler ve cinsiyete bağlı olası farklılıklar vasküler sistem için değerlendirildiğinde yüksek fosfatlı diyetin ortalama kan basıncı değerlerini anlamlı bir şekilde arttırdığı, ilave olarak diyete bağlı bu artışın erkek grubunda daha belirgin olduğu görülmüştür. İncelenen histolojik kesitlerde, yüksek fosfatlı diyetle beslenen dişi ve erkek sıçanların aortlarının, özellikle tunica media tabakasında kalsiyum birikiminin arttığı ve beraberinde vezikül artışı da olduğu görülmüştür. Bu gözlem, yüksek fosfatlı diyetle beslenen gruplarda anlamlı olduğu saptanan kan basıncı artışlarıyla uyumludur fakat erkeklerde daha yüksek kan basıncını açıklamayabilir. Hücresel metabolizma perspektifinden ele alınırsa, fazla fosfatın fosforilasyona bağlı sinyal yollarının düzensizliğine neden olabileceği düşünülebilir. Ek olarak, yakın zamanda yapılan çalışmalar, yüksek hücre dışı fosfat konsantrasyonlarının, mitokondriyal membran potansiyelini artırarak mitokondriyal oksidatif strese neden olduğunu, kaspaz aktivasyonuna ve ardından apoptozis indüklenmesini sağladığını göstermiş, hızlandırılmış yaşlanma ve vasküler kalsifikasyona neden olabileceği belirtilmiştir [128]. Vasküler düz kas hücrelerindeki apoptozis yanıtı arasındaki farklılık ise dişi ve erkek farkını gösteriyor olabilir. Gözlemlenen veziküller kalsifikasyon için çekirdek

gibi işlev gören apoptotik veziküller olabileceği gibi, veziküllerin otofaji ile olası ilişkisi moleküler çalışmalarda araştırılmalıdır.

Yüksek fosfatla beslenen erkek grubunda kan basıncı değişiminin daha fazla olması, yüksek fosfatla beslenen dişi ve erkek gruplarda birbirine ters bir şekilde anlamlı olarak farklı yönlerde değişmiş olan bazı kan parametreleri ile ilgili olabilir. Kanda soluble Klotho (sKl) düzeyleri, yüksek fosfatla beslenen erkek grupta normal fosfatla beslenen erkek gruba göre azalırken, dişi gruplarda tam tersi şekilde yüksek fosfatla beslenen dişi grupta düşük fosfatla beslenen dişi gruba göre artış göstermiştir. Membrana bağlı klothonun böbrek dokusunda fosfotirik olduğu bilinirken, soluble klotho vücutta koroid pleksus, kemik gibi farklı dokulardan salgılanabilmektedir ve metabolik etkileri olabileceği belirtilmiştir [129]. Vasküler sistem üzerine etkisi, farklı doku düzeyinde ekspresyonları, dişi erkek arasında farklılıklar açısından araştırılmalıdır. sKl, TRPV5'in hücre yüzeyinde sunulumunu arttırarak renal kalsiyum reabsorpsiyonunu doğrudan arttırır. Ayrıca yine kalsiyumla ilişkili olduğunu düşündürecek şekilde damar endotel fonksiyonunu koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, hormonal sKl'nin etki mekanizması tamamen anlaşılammıştır, çünkü sKl için membran reseptörleri tanımlanmamıştır. Son çalışmalar bu bilgi boşluğuna ışık tutmuş ve lipid raftlarında bulunan monosialogangliosidler GM1 ve GM3'ü sKl reseptörleri olarak tanımlamıştır [130]. KBH'ında s klotho düşüklüğü kardiyovasküler olaylarla ilişkili bulunmuş, yapılan çalışmalarda özellikle kardiyak hipertrofiye karşı koruyucu etkisi saptanmıştır. Kardiyoprotektif etkilerini bu yeni reseptörler üzerinden FGF23 ten bağımsız olarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir [131]. Yüksek fosfatlı dişilerde artması kardiyoprotektif etkisini göstermektedir, yüksek fosfatlı dişilerde trigliserit düzeyinin de artmış olması ve yeni keşfedilen lipid raft reseptörlerin metabolik işlevlerinin araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Fetuin A ise damar kalsifikasyonları ile ilişkisi bağlamında incelendiğinde, normal fosfat ile beslenen dişilerde yine normal fosfat ile beslenen erkek gruba göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu dişi grupların erkek gruplara göre anlamlı şekilde daha yüksek kan PTH seviyelerine sahip olduğu- yani kemiklerinin rezorbsiyona eğilimli bir durumda olduğu- göz önünde bulundurulursa normal fosfatla beslenen dişilerde serum kalsiyum-fosfat seviyelerini korumaya yönelik bir değer olarak yorumlanabilir. Fakat, bu anlamlı yükseklik, yüksek fosfatla beslenen dişi grupta ortadan kalkmıştır. Yüksek fosfatla beslenen dişilerde, yine yüksek fosfatla beslenen erkek grubuna benzer şekilde gözlenen damar değişikliklerini açıklayabilir.

Seks hormonlarının ateroskleroz sırasında bağışıklık tepkisini değiştirdiğini ve cinsiyete göre farklı hastalık fenotiplerine neden olduğu bilinmektedir. Örneğin, kadınlar artan antikör ve otoantikör tepkileri ile enfeksiyona ve hasara cevap verirken, erkekler doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonunu arttıırlar. Kadınlarda otoimmün hastalıklar daha sık görülürken, ateroskleroz gelişme olasılığı erkeklerden daha düşüktür [132]. Bu durum erkeklerde KAH'a yol açan bağışıklık mekanizmalarının kadınlardan farklı olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarda hipokalsemi oluşturulan hayvanlarda ani düşüşlerin PTH salınımının etkisiyle gerçekleşen kemik rezorbsiyonundan önce serumda bir mekanizma ile yükseltildiğini göstermiştir. Radyoaktif Ca kullanılarak yapılan çalışmalarda da gün içerisinde kemik ve ekstrasellüler sıvı arasında gerçekleşen kalsiyum akışının kemik yeniden modellenmesiyle harekete geçirilebilen Ca miktarını aştığını göstermiştir. Bu gözlemler kemikte hızlı bir yanıt veren PTH dışında bir mekanizma olduğunu kanıtlamış bu durum arada mevcut olan bir havuza benzetilmiş ve değiştirilebilir kalsiyum havuzu olarak adlandırılmıştır [133]. Bu havuzun tamponlama kapasitesini değiştirebilecek durumların bizim deneyimiz açısından da araştırılması gerektiğini düşünüyoruz. Düşük kemik turnover ı da bunlardan biri olabilir, ya da hangisinin daha önce geldiği de dşnlmelidir. Bu havuzun kemikteki yeri ve mekanizmaları tartışma konusu olmaya devam etmektedir. Kemikte hidroksiapatit dışında da kalsiyum fosfat tuzları olduğu gösterilmiştir. Bunlar, çözünürlükleri açısından da farklılık göstermektedirler [134]. Kemik metabolizmasını ve bahsedilen kemik/ plazma ara yüzünü etkileyen durumlar bu tuzların oranını değiştirebilir. Diyetle yüksek fosfat alımı da bunlardan biri olabilir. Bunun yanında fizikokimyasal düzenlemeler yerine hücre aracılı mekanizmaları ön plana alan çalışmalar da vardır(Katsumata, Masuyama, Uehara, & Suzuki, 2019; Kanatani, Sugimoto, Kano, Kanzawa, & Chihara, 2003). Bizim düşüncemiz iki mekanizmanın birbiri ile bağlantılı olduğudur. Yeni geliştiren matematik model hızlı bir fosfat infüzyonundan sonra kemikteki değiştirilebilir havuzun geçici bir fosfat bölmesi olarak görev yaptđını göstermiştir [137]. Hızlı Ca değişimleri ise Ca albumine bağlanacağı için böyle bir mekanizmaya ihtiyaç duymayabilir.

Bağırsaklardan inorganik fosfatın difuzyonla neredeyse tamamen parasellüler emilimi sebebiyle, böbrekleri sağlam bir kişide, kronik böbrek hastaları gibi sürekli halinde bir hiperfosfatemi yaratmayacak fakat kısa süreli ve ani fosfat tampolama ihtiyaç doğuracaktır [58]. Bu durum akut ya da kronik süreçlerden farklı mekanizmaları tetikleyebilir. şuan halk sağlığını etkileyen diyetle yüksek fosfor alımı kronik maruziyet

olarak mı yoksa aralıklı ama uzun süreli maruziyet olarak mı değerlendirileceği net değildir(Calvo & Uribarri, 2013; Takeda, Yamamoto, Yamanaka-Okumura, & Taketani, 2014) Sağlıklı insan çalışmalarında genellikle akut etkiler araştırmıştır. Çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerde metabolizmayı etkileyecek patolojik durumlar tespit edilememiştir.

Burada kemik/ plazma arayüzü ve etkileyen durumlar lakunokanaliküler alan düşünüldüğünde belki de çok ön planda olmayan osteolitik osteoliz de önemli olabilir. Mevcut durumda özellikle osteoklast aracılı rezorbsiyonu tartışılmıştır, fakat artık osteositik osteoliz de daha detaylı araştırılması gereken bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır [65]. Osteositler kemik oluşumunu azaltan sklerostin (SOST geni) üretirler. Sklerostin antagonizması osteoporoz tedavisi olarak düşünülmektedir (Hohman et al., 2018; Ferreira et al., 2013).

Ayrıca sürekli PTH uygulamasının FGF23’de artışa yol açtığı, aralıklı PTH uygulamasının ise FGF23 düzeyinde azalma yaptığını gösteren çalışmalar da hiperfosfateminin her zaman değil ara ara gerçekleşen bir durum olmasının önemli olabileceğini göstermektedir [139].

Bizim sonuçlarımızda da yüksek fosfatlı diyet uygulamasına rağmen kronik böbrek yetmezliğine benzer şekilde FGF 23 düzeyinde artış görülmemesi aralıklı PTH uygulamasına benzer bir mekanizmanın devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Diyetle yüksek fosfor alımının kemik böbrek paratiroid bezi ve damarları etkileyen bir durum olduğu açıktır. Fakat burada tamamen iç içe geçmiş sistem bir kısır döngü yaratmaktadır. Dolayısıyla ilk önce hangi sistemin etkilendiği ve tetikleyici konumunda olduğu olduğunun tespiti önemlidir. Kronik böbrek hastalarında gerçekleşen FGF23 ve PTH yüksekliğinin ve D vit. düşüklüğünün dahi ilk önce hangi parametrede bozulma ile tetiklendiği henüz kesinlik kazanmamış hatta bu hastalarda görülen D vit eksikliği FGF 23 e sekonder geliyorsa D vit. takviyesi yapılmaması gerektiği FGF23’ ü daha da arttırabileceği tartışılmaya başlanmıştır [139]. Gerçekten de KBH’ na verilen kalsitriol tedavisinin FGF 23 ü daha da arttırdığı bilinmektedir. Hatta kardiyovasküler olayları tetikleyebileceği yönünde yayınlar vardır (Wetmore, Liu, Krebill, Menard, & Quarles, n.d.; Manuscript, 2011) .

Bizim çalışmamızda, PTH FGF23 ve D vit değerlerinin yüksek fosfatlı diyetle beslenen gruplarda farklılık göstermemesi dikkat çekicidir. Kronik böbrek hastalarında görülen yüksek PTH, FGF23 ve düşük D vit prototipinin görülmemesi sağlıklı popülasyonun yüksek fosfat tüketimi ile KBH’ nda görülen hiperfosfateminin birbirinden farklı süreçler olduğunu düşündürmüştür. Sağlıklı popülasyon için bizim deney sonuçlarımızla uyumlu bir şekilde FGF23 artışına sebep olmayan bir mekanizma söz konusu ise FGF 23 artışı ve

kardiyovasküler sistemi bununla ilişkilendiren hipotezlerdence, FGF23 ün vücuttaki ve farklı dokulardaki etkilerini, kan ve o dokunun klotho düzeylerinden etkilendiğini belirten yayınlar açıklayıcı olmaktadır [131]. Nitekim yüksek fosfatla beslenen dişi ve erkek gruplarımız klotho kan düzeyleri açısından etkileşim göstermiştir.

Bunun yanında bizim deney grubumuzdaki normal fosfatlı besinle beslenen dişi grubumuz normal fosfatla beslenen erkek gruba göre D vit düzeyleri bakımından anlamlı olarak yüksektir. Bunun kadınlarda D vit eksikliğinin sık görüldüğü insan popülasyonunda farklı bir koşul olduğu açıktır. D vit. düşüklüğünün insan popülasyonunda hiperfosfateminin kardiyovasküler etkisini daha da kötüleştirici bir faktör olarak rol oynadığı ileri sürülmüştür [142].

Katkı maddelerinin özelinde araştırma yapmak istediğimizde E450 olarak yaygın olarak katkı maddesi olarak kullanılan pirofosfatların etkilerini gözden geçirdik. Bunun sebebi bisfosfanatlar olarak bilinen osteoporoz tedavisinde kullanılan kemik rezorbsiyonunu azaltırken hiperlipidemiye üzerine etkisi gösterilen terapötiklerin kimyasal olarak pirofosfatlara benzerlik taşıması, bazen analog olarak geçmesidir (Ara, Ee, Tauber, & Oatamed, 1999; Guney, Kisakol, Ozgen, & Yilmaz, 2008). Güncel yayınlar, pirofosfatların kemik rezorbsiyonunu azaltırken matriks veziküllerine kalsiyum fosfat çökmesini regüle ettiğini bildirmektedir [145]. Serumdaki oranı önemli ve bizim bulgularımızla ilgili olabilir. Ayrıca çalışmamızda genç yetişkin hayvanlar kullanılmış, kemik metabolizması zaten yavaşlamış olan yaşlı deneklerde ve osteoporozdaki yüksek fosfatlı diyetin etkisi incelenmemiştir. Bunun yanında yüksek fosfat diyetinin etkisi aortta incelenmiş, küçük çaplı damarlar değerlendirilmemiştir.

6. SONUÇLAR

Fosfat, sağlıklı hücre fonksiyonu için gerekli bir elementtir; Bununla birlikte fosfatın aşırı yüklenmesi açıkça zararlıdır. Fakat artan fosfat alımının mineral metabolizması üzerine etkisi ve sistemler üzerindeki patofizyolojik etkileri normal böbrek fonksiyonuna sahip kişilerde kan parametrelerinde yansıtılmayabilir.

Çalışmamızda, diyetle yüksek fosfat alımının her iki cinsiyette de düşük turnovera sebep olabileceği gösterilmiştir. Kemikler ve kardiyovasküler sistem üzerine negatif etkileri histolojik kesitlerde aortta kalsifikasyonlar ve yaşlanma benzeri veziküller ile gösterilmiştir ve kan basıncını her iki cinsiyette de yükselttiği bulunmuştur.

Yüksek fosfatlı diyetle beslenen erkek sıçanlarda kan basıncının dişi sıçanlara göre daha fazla yükseldiğinin gösterilmesi, kadın erkek arasında farklı homeostatik mekanizmaların tetikleniyor olabileceğini, bu durumun aort OPG düzeylerinin farklılığı, kanda ise s-klotho ve fetuin a düzeylerinin farklılığı ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

Vücutta mineral metabolizmasının genellikle kalsiyum üzerinden değerlendirilmesinin, fosforun ikincil olduğu anlayışının değiştirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Kalsiyum-fosfat homeostazındaki, kemik-böbrek-kardiyovasküler eksene artık immün sistem ve metabolik ağların da eklenmesine ve kadın/erkek farklılıklarının göz önünde bulundurulmasına, sonuç olarak kemik ve mineral homeostazı hakkında yeni bir anlayışın oluşturulmasına ihtiyaç vardır.

Diyetle yüksek fosfor alımının olumsuz etkilerini azaltmak için, fosfatın fizyolojik absorpsiyonu ve depolanması arkasındaki mekanizmaları ve çeşitli patolojilerin bu süreci değiştirme yeteneğini araştırmak için daha ileri çalışmalar yapılması ve olumsuz etkilerin tedavisi için yeni terapötik yaklaşımların oluşturulması gerekmektedir.

Diyetle yüksek fosfora alımı incelenirken literatürde, fosfor katkılarının özelinde veya genel popülasyonda maruziyet tipik olarak birden fazla fosfat katkısı ile gerçekleşmesine rağmen fosfat katkısını inceleyen çalışmalarda bu yaklaşıma rastlanmamıştır. Diyetle alınan fosfat yüküne bağlı hiperfosfateminin kronik böbrek hastalığında görülen hiperfosfatemiden farkı ve sonuçları ile bağlantıları ayrıca araştırılmalıdır.

Fosfat içerikli ürünlerin oluşturduğu risklerle ilgili farkındalığı arttırmak için yapılacak eğitimler, diyet fosfat toksisitesine bağlı olumsuz sağlık etkilerini azaltmak için kritik öneme sahiptir.

ÖZET

Giriş: Diyetle fosfor alımı, işlenmiş gıdaların tüketimi ile birlikte artış göstermiştir. Serum fosfat düzeyleri temel olarak kemik-böbrek-paratiroid bezi içine alan, 1,25 (OH) 2D, paratiroid hormonu (PTH) ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) gibi faktörlerin aracılık ettiği bir sistem tarafından düzenlenmektedir. Çalışmamızda yüksek serum fosfatının kardiyovasküler sistem ve kemik metabolizması üzerindeki ilişkisinin kadın ve erkek cinsiyet farklılığı üzerinden araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda 40 adet Wistar ırkı sıçan (3-3,5 aylık dişi (22) ve erkek (18) kullanılmıştır ve wistarlar rastgele 4 gruba ayrılmışlardır . Gruplar 4 ay boyunca yüksek ve normal fosfatlı besinle beslenmişlerdir. Gruplar NFD (normal fosfatlı diyetle beslenen dişi), YFD (yüksek fosfatlı diyetle beslenen dişi), NFE (normal fosfatlı diyetle beslenen erkek), YFE (yüksek fosfatlı diyetle beslenen erkek) şeklindedir.

Diyetin etkileri kanda elisa parametreleri (PTH, D-vit, FGF23, klotho protein, Deoksipridinolin tartraterezistan asit fosfataz, osteoprotegerin, progesteron, östrojen, testosteron ve fetuin A), trigliserit ve fosfat KOÜ merkez lab, RANKL VE OPG mRNAaort ve kemikte RT-PCR ile, aortta histolojik görüntüleme ve beslenme sonunda femoral kateter ile kan basıncı ölçülerek değerlendirilmiştir.

Bulgular: Kan PTH, FGF23 ve D3 diyete bağlı diyete bağlı fark göstermezken, cinsiyetler arası anlamlılık göstermektedir.OPG diyete bağlı anlamlı fark göstermiştir. Hem erkek hem de dişi gruplarda OPG seviyeleri azalmıştır.Fetuin A ve Klotho düzeyleri cinsiyetler arası diyete bağlı etkileşim göstermiştir. TG düzeyi YFD grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Diğer kan parametreleri anlamlılık göstermemiştir.

RTPCR sonuçlarımızda kemikte hem RANKL m RNA hem de OPG mRNA düzeylerinde her iki cinsiyette de diyete bağlı anlamlı azalma gözlenmiştir. RTPCR aortta RANKL mRNA anlamlılık göstermezken, OPG mRNA düzeyi yüksek fosfatla beslenen dişi grupta artarken erkek grubunda azalmıştır.

Ortalama kan basıncı değerleri, yüksek fosfatla beslenen erkek ve dişi gruplarında artarken erkeklerde artış daha yüksektir, aort histolojik görüntülemelerinde yine her iki yüksek fosfatla beslenen grupta kalsifikasyonlar ve veziküller gözlemlenmiştir.

Tartışma: Erkek ve dişi yüksek fosfatla beslenen gruplarda kan basıncı ve damar kalsifikasyonlarında artış göstermiştir, bu tarz diyetin olumsuz sonuçlarını göstermektedir. YFE grupta kan basıncının daha yüksek olması, Fetuin A ve Klotho düzeylerinin interaction göstermesiyle ilgili olabilir. TG düzeyi YFD grupta anlamlı yüksek olması dişilerde metabolik yolların dahil olabileceğini düşündürmüştür. Kemik mRNA sonuçları yüksek fosfatlı diyetin düşük turnover ile sonuçlanabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Sonuç: Diyetle yüksek fosfat alımının her iki cinsiyette de kemikte düşük turnovera sebep olabileceği ve kardiyovaskuler sistem üzerine negatif etkileri her iki cinsiyette de gösterilmiştir. Aynı zamanda kan basıncında erkeklerde daha fazla artış olması ve kan parametrelerinde yüksek fosfatla gelişen birbirine ters etkiler kadın erkek arasında farklı homeostatik mekanizmaların olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kemik, Kardiyovasküler Sistem, Klotho, OPG/RANKL, Fetuin A, Cinsiyet

ABSTRACT

Objective: Dietary phosphorus intake increased with consumption of processed foods. Serum phosphate levels are mainly regulated by a system involving bone-kidney-parathyroid gland, mediated by factors such as 1.25 (OH) 2D, parathyroid hormone (PTH) and fibroblast growth factor 23 (FGF23). In this study was aimed to investigate the association of high serum phosphate on the cardiovascular system and bone metabolism based on sex differences.

Method: In our study we used 40 wistar rats (3-3.5 months- male (18) and female (22) and wistar rats were randomly allocated to four groups. They were fed with high and normal phosphate food during 4 months. The groups are NFD (female, normal phosphate diet), YFD (female, high phosphate diet), NFE (male, normal phosphate diet), YFE (male, high phosphate diet).

The effect of the diets were assessed by ELISA (PTH, D-vit, FGF23, klotho protein, Deoxypiridinoline tartrate acid phosphatase, osteoprotegerin, progesterone, estrogen, testosterone and fetuin A), triglyceride and phosphate, Real time PCR (m RNA RANKL,OPG in aorta and bone tissue), histological imaging in aortic tissue and measuring blood pressure with the femoral catheter at the end of feeding.

Results: It was observed that while blood PTH, FGF23 and D3 do not show differences depending on diet, it shows gender differences. OPG levels were showed a significant difference based on diet. OPG levels were decreased in both male and female groups. It was observed that interaction between gender based on diet in the Fetuin A and Klotho levels. It was found that TG levels of YFD group were significantly higher than other groups. There wasn't observed any significant in other parameters.

In our Real Time PCR results were observed decreases RANKL and OPG mRNA levels in bone of both gender based on diet. In our RT PCR results weren't observed change RANKL mRNA levels in aort, while aort OPG mRNA levels were increased in the female group fed with high phosphate, decreased in the male group.

While the blood pressure increased in both high-phosphate-fed groups, the increase in the male group was higher than the female group. It was observed that calcifications and vesicles in high phosphate-fed groups with aortic histological imaging.

Discussion: In high-phosphate-fed groups have shown increasing in blood pressure and vascular calcifications, indicating the negative consequences of this type of diet. Higher blood pressure in the YFE group may be related to the interaction of Fetuin A and Klotho levels. TG level was significantly higher in the YFD group, suggesting that metabolic pathways may be involved in females. It was interpreted that bone mRNA results may result in a low turnover of a high phosphate diet.

Conclusion: It has been shown that dietary high phosphate intake may cause low turnover of bone and has negative effects on the cardiovascular system in both genders. Also, it was shown that there may be different homeostatic mechanisms between men and women because of higher blood pressure in men and adverse effects that develop with high phosphate in blood parameters.

Keywords: Bone, Cardiovascular System, Klotho, OPG/RANKL, Fetuin A, Gender

KAYNAKLAR

- [1] M. E. Weeks, “The DISCOVERY of the ELEMENTS . XXL SUPPLEMENTARY NOTE on the DISCOVERY of PHOSPHORUS *,” vol. 21, pp. 302–306, 1932.
- [2] H. Komaba and M. Fukagawa, “Phosphate—a poison for humans?,” *Kidney Int.*, vol. 90, no. 4, pp. 753–763, 2016.
- [3] R. A. Pollock, T. W. Brown, D. M. Rubin, and J. Walker, “‘ Phossy Jaw ’ and ‘ Bis-phossy Jaw ’ of the 19th and the 21st Centuries : The Diuturnity of John Walker and the Friction Match the jaw,” pp. 262–270, 2015.
- [4] K. Ashley, D. Cordell, and D. Mavinic, “Chemosphere A brief history of phosphorus : From the philosopher ’ s stone to nutrient recovery and reuse,” *Chemosphere*, vol. 84, no. 6, pp. 737–746, 2011.
- [5] D. Cordell, J. Drangert, and S. White, “The story of phosphorus : Global food security and food for thought,” vol. 19, pp. 292–305, 2009.
- [6] G. M. Filippelli, “Chemosphere Phosphate rock formation and marine phosphorus geochemistry : The deep time perspective,” *Chemosphere*, vol. 84, no. 6, pp. 759–766, 2011.
- [7] S. Erem and M. S. Razzaque, “Dietary phosphate toxicity: an emerging global health concern,” *Histochem. Cell Biol.*, vol. 150, no. 6, pp. 711–719, Dec. 2018.
- [8] E. Takeda, H. Yamamoto, and Y. Taketani, “Effects of Natural and Added Phosphorus Compounds in Foods in Health and Disease,” in *Clinical Aspects of Natural and Added Phosphorus in Foods*, New York, NY: Springer New York, 2017, pp. 111–121.
- [9] H. Komaba and M. Fukagawa, “Phosphate—a poison for humans?,” *Kidney Int.*, vol. 90, no. 4, pp. 753–763, Oct. 2016.
- [10] L. E. Lampila, “Applications and functions of food-grade phosphates,” 2013.
- [11] U. Trautvetter, G. Jahreis, M. Kiehntopf, and M. Glei, “Consequences of a high phosphorus intake on mineral metabolism and bone remodeling in dependence of calcium intake in healthy subjects – a randomized placebo-controlled human intervention study,” *Nutr. J.*, vol. 15, no. 1, p. 7, Dec. 2015.
- [12] D. Importancia, “The refeeding syndrome. Importance of phosphorus,” *Med. Clínica (English Ed.)*, no. xx, 2018.
- [13] O. S. Iheagwara, T. S. Ing, C. M. Kjellstrand, and S. Q. Lew, “and phosphate,” pp. 479–482, 2013.
- [14] A. Cooke, “Dietary Food-Additive Phosphate and Human Health Outcomes,” vol. 16, 2017.
- [15] C. Huang and O. W. Moe, “Clinical assessment of phosphorus status , balance and renal handling in normal individuals and in patients with chronic kidney disease,” vol. 22, no. 4, pp. 452–458, 2013.

- [16] S. Osuka and M. S. Razzaque, “Can features of phosphate toxicity appear in normophosphatemia ?,” pp. 10–18, 2012.
- [17] B. M. P. Tang, G. D. Eslick, C. Nowson, C. Smith, and A. Bensoussan, “Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older : a meta-analysis,” pp. 657–666.
- [18] G. J. Becker, R. G. Walker, T. D. Hewitson, and E. Pedagogos, “Phosphate levels — time for a rethink ?,” 2009.
- [19] H. J. Jeon *et al.*, “Article Association of Serum Phosphorus Concentration with Mortality and Graft Failure among Kidney Transplant Recipients,” no. 17, pp. 653–662, 2017.
- [20] D. E. St-jules, R. Jagannathan, L. Gutekunst, K. Kalantar-zadeh, and M. A. Sevick, “Examining the Proportion of Dietary Phosphorus From Plants , Animals , and Food Additives Excreted in Urine,” *J. Ren. Nutr.*, pp. 1–6, 2016.
- [21] N. Noori *et al.*, “Kidney diseases Organic and Inorganic Dietary Phosphorus and Its Management in Chronic Kidney Disease,” 2010.
- [22] S. P. Murphy and S. I. Barr, “Recommended Dietary Allowances should be used to set Daily Values for nutrition labeling 1 – 3,” vol. 83, no. May, pp. 1223–1227, 2018.
- [23] M. S. Calvo and Y. K. Park, “Changing phosphorus content of the U.S. diet: potential for adverse effects on bone.,” *J. Nutr.*, vol. 126, no. 4 Suppl, pp. 1168S–80S, Apr. 1996.
- [24] A. Ortiz, E. Gonz, and C. Gracia-iguacel, “Phosphorus and Nutrition in Chronic Kidney Disease,” vol. 2012, 2012.
- [25] A. Cupisti and M. Gallieni, “Urinary Phosphorus Excretion: Not What We Have Believed It to Be?,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 13, no. 7, pp. 973–974, Jul. 2018.
- [26] M. SHIMADA, Y. SHUTTO-UCHITA, and H. YAMABE, “Lack of Awareness of Dietary Sources of Phosphorus Is a Clinical Concern,” *In Vivo (Brooklyn)*, 2019.
- [27] L. Bohn, A. S. Meyer, and S. K. Rasmussen, “Phytate : impact on environment and human nutrition . A challenge for molecular breeding *,” vol. 9, no. 3, pp. 165–191, 2008.
- [28] M. S. Calvo, A. J. Moshfegh, and K. L. Tucker, “Assessing the Health Impact of Phosphorus in the Food Supply: Issues and Considerations,” *Adv. Nutr.*, 2014.
- [29] A. Cupisti, “Management of Natural and Added Dietary Phosphorus Burden in Kidney Disease,” *YSNEP*, vol. 33, no. 2, pp. 180–190, 2013.
- [30] M. Verghese, D. R. Rao, C. B. Chawan, L. T. Walker, and L. Shackelford, “Anticarcinogenic effect of phytic acid (IP 6): Apoptosis as a possible mechanism of action \$,” vol. 39, pp. 1093–1098, 2006.
- [31] S. Lee, H. Park, H. Chun, and S. Cho, “Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice,” vol. 26, pp. 474–479, 2006.
- [32] S. Lee *et al.*, “Dietary phytic acid improves serum and hepatic lipid levels in aged ICR mice fed a high-cholesterol diet,” vol. 27, pp. 505–510, 2007.
- [33] L. M. Taylor *et al.*, “DIETARY EGG WHITES FOR PHOSPHORUS CONTROL

- IN MAINTENANCE HAEMODIALYSIS PATIENTS : A PILOT STUDY,” pp. 16–24, 2011.
- [34] D. E. St-jules, K. Woolf, M. Lou Pompeii, K. Kalantar-zadeh, and M. A. Sevick, “Reexamining the Phosphorus – Protein Dilemma : Does Phosphorus Restriction Compromise Protein Status ?,” *J. Ren. Nutr.*, vol. 26, no. 3, pp. 136–140, 2016.
- [35] J. Uribarri and M. S. Calvo, “Hidden Sources of Phosphorus in the Typical American Diet: Does it Matter in Nephrology?,” *Seminars in Dialysis*, vol. 16, no. 3, pp. 186–188, 2003.
- [36] J. B. León, [Junior Researcher, C. M. Sullivan, A. R. Sehgal, and D. Neuhauser, “The Prevalence of Phosphorus Containing Food Additives in Top Selling Foods in Grocery Stores,” *J Ren Nutr*, vol. 23, no. 4, pp. 265–270, 2013.
- [37] C. M. Sullivan, J. B. Leon, and A. R. Sehgal, “Phosphorus-Containing Food Additives and the Accuracy of Nutrient Databases: Implications for Renal Patients,” *J. Ren. Nutr.*, vol. 17, no. 5, pp. 350–354, Sep. 2007.
- [38] L. Murphy-gutekunst, “Hidden Phosphorus : Where Do We Go From Here ?,” vol. 17, no. 4, pp. 31–36, 2007.
- [39] R. A. Sherman and O. Mehta, “Phosphorus and Potassium Content of Enhanced Meat and Poultry Products : Implications for Patients Who Receive Dialysis,” no. 732, pp. 1370–1373, 2009.
- [40] E. Takeda, H. Yamamoto, H. Yamanaka-Okumura, and Y. Taketani, “Increasing dietary phosphorus intake from food additives: potential for negative impact on bone health.,” *Adv. Nutr.*, vol. 5, no. 1, pp. 92–7, Jan. 2014.
- [41] V. E. Kemi *et al.*, “Habitual high phosphorus intakes and foods with phosphate additives negatively affect serum parathyroid hormone concentration: A cross-sectional study on healthy premenopausal women,” *Public Health Nutr.*, vol. 12, no. 10, pp. 1885–1892, 2009.
- [42] M. L. Weiner, W. F. Salminen, P. R. Larson, R. A. Barter, J. L. Kranetz, and G. S. Simon, “Toxicological review of inorganic phosphates,” vol. 39, pp. 759–786, 2001.
- [43] H. Verhagen *et al.*, “Food Safety Regulatory Research Needs 2030,” vol. 17, no. June 2019, 2020.
- [44] W. H. O. Food, A. Series, J. Fao, W. H. O. E. Committee, and F. Additives, *Safety evaluation of certain food additives.* .
- [45] H. M. Alger, M. V Maffini, N. R. Kulkarni, E. D. Bongard, and T. Neltner, “Perspectives on How FDA Assesses Exposure to Food Additives When Evaluating Their Safety : Workshop Proceedings,” vol. 12, 2013.
- [46] A. Altieri, M. Mengelers, A. Havelaar, D. Liem, and V. Silano, “EFSA 15th scientific colloquium : Emerging risks in food - from identification to communication,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 22, no. 5, pp. 249–252, 2011.
- [47] O. M. Guti, “Sodium- and Phosphorus-Based Food Additives : Persistent but Surmountable Hurdles in the Management of Nutrition in Chronic Kidney Disease,” vol. 20, no. 2, pp. 150–156, 2013.
- [48] O. Gutierrez, K. Kalantare-Zadeh, and R. Mehrotra, “Clinical Aspects Phosphorus in and Added of Natural Foods,” in *Nutrition and Health*, 2017, pp. 175–183.
- [49] M. S. Calvo and J. Uribarri, “Diet and Dialysis : Current Issues Series Editor : Jaime

- Uribarri Contributions to Total Phosphorus Intake : All Sources Considered.”
- [50] M. S. Calvo and J. Uribarri, “Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population,” *American Journal of Clinical Nutrition*. 2013.
- [51] C. Bergwitz and H. Jüppner, “Regulation of Phosphate Homeostasis by PTH, Vitamin D, and FGF23,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 61, no. 1, pp. 91–104, Feb. 2010.
- [52] K. R. Tuttle and R. A. Short, “Longitudinal Relationships among Coronary Artery Calcification, Serum Phosphorus, and Kidney Function,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 4, no. 12, pp. 1968–1973, Dec. 2009.
- [53] T. Saito and S. Fukumoto, “Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) and Disorders of Phosphate Metabolism,” vol. 2009, no. Figure 1, 2009.
- [54] M. L. Mace, E. Gravesen, A. Nordholm, K. Olgaard, and E. Lewin, “Fibroblast Growth Factor (FGF) 23 Regulates the Plasma Levels of Parathyroid Hormone In Vivo Through the FGF Receptor in Normocalcemia, But Not in Hypocalcemia,” *Calcif. Tissue Int.*, 2018.
- [55] S. Chande and C. Bergwitz, “Role of phosphate sensing in bone and mineral metabolism,” *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 14, no. 11, pp. 637–655, Nov. 2018.
- [56] H. Ohta *et al.*, “INTRODUCTION Effects of gender and body weight on fibroblast growth factor 23 responsiveness to estimated dietary phosphorus.”
- [57] Y. Sabbagh, H. Giral, Y. Caldas, M. Levi, and S. C. Schiavi, “Intestinal Phosphate Transport,” *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 18, no. 2, pp. 85–90, 2011.
- [58] M. Saurette and R. T. Alexander, “Minireview Intestinal phosphate absorption : The paracellular pathway predominates ?,” pp. 1–9, 2019.
- [59] C. J. V. Id, P. J. Lachcik, L. O. Aromeh, S. M. Moe, X. Chen, and K. M. H. Gallant, “Effect of dietary phosphorus intake and age on intestinal phosphorus absorption efficiency and phosphorus balance in male rats,” pp. 1–15, 2018.
- [60] E. Gratton, I. C. Forster, and C. A. Wagner, “Mechanisms of phosphate transport,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 15, no. August, pp. 482–500, 2019.
- [61] I. A. Holm, M. J. Econs, and T. O. Carpenter, “and Related Disorders,” pp. 699–726, 2012.
- [62] I. C. Forster, N. Hernando, J. Biber, and H. Murer, “Proximal tubular handling of phosphate : A molecular perspective,” *Kidney Int.*, vol. 70, no. 9, pp. 1548–1559, 2006.
- [63] E. Lederer and D. Program, “U . S . Department of Veterans Affairs,” vol. 23, no. 5, pp. 502–506, 2015.
- [64] B. F. Boyce, E. Rosenberg, A. E. De Papp, and L. T. Duong, “The osteoclast , bone remodelling and treatment of metabolic bone disease,” vol. 42, pp. 1332–1341, 2012.
- [65] H. Qing and L. F. Bonewald, “Osteocyte Remodeling of the Perilacunar and Pericanalicular Matrix,” vol. 1, no. 2, pp. 59–65, 2009.
- [66] R. Owen and G. C. Reilly, “In vitro Models of Bone Remodelling and Associated Disorders,” vol. 6, no. October, pp. 1–22, 2018.
- [67] H. Chen, X. Zhou, H. Fujita, M. Onozuka, and K. Kubo, “Age-Related Changes in Trabecular and Cortical Bone Microstructure,” vol. 2013, 2013.

- [68] R. L. Jilka, "Biology of the Basic Multicellular Unit and the Pathophysiology of Osteoporosis," pp. 182–185, 2003.
- [69] E. W. Bradley, J. J. Westendorf, and A. J. Van Wijnen, "Osteoblasts : Function , Development , and Regulation," pp. 31–37, 2019.
- [70] H. Hemmatian, A. D. Bakker, J. Klein-nulend, and G. H. Van Lenthe, "Aging , Osteocytes , and Mechanotransduction," pp. 401–411, 2017.
- [71] M. P. Yavropoulou and J. G. Yovos, "The molecular basis of bone mechanotransduction," vol. 16, no. 3, pp. 221–236, 2016.
- [72] M. Granjeiro and K. B. S. Paiva, "Matrix Metalloproteinases in Bone Resorption , Remodeling , and Repair," vol. 148, pp. 203–303, 2017.
- [73] S. L. Dallas, M. Prideaux, and L. F. Bonewald, "The Osteocyte : An Endocrine Cell and More," no. C, pp. 1–34, 2013.
- [74] J. Kular, J. Tickner, S. M. Chim, and J. Xu, "An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level," *Clin. Biochem.*, vol. 45, no. 12, pp. 863–873, 2012.
- [75] T. Nakashima, M. Hayashi, and H. Takayanagi, "New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 23, no. 11, pp. 582–590, 2012.
- [76] T. Ono, M. Hayashi, F. Sasaki, and T. Nakashima, "RANKL biology : bone metabolism , the immune system , and beyond," vol. 3, pp. 1–16, 2020.
- [77] K. Wesseling-perry, "The BRC Canopy An Important Player in Bone Remodeling," vol. 184, no. 4, 2014.
- [78] N. C. Partridge and B. Remodeling, "REVIEWS Physiological Bone Remodeling : Systemic Regulation and Growth Factor Involvement," no. 52, pp. 233–245, 2016.
- [79] L. L. Demer and Y. Tintut, "Vascular Calcification Pathobiology of a Multifaceted Disease Clinical Impact of Arterial Calcification," pp. 2938–2948, 2015.
- [80] E. Schulz, K. Arfai, X. Liu, J. Sayre, L. Linda, and L. Linda, "Aortic Calcification and the Risk of Osteoporosis and Fractures," vol. 89, no. May, pp. 4246–4253, 2015.
- [81] S. Yamada and C. M. Giachelli, "Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho," *Bone*, vol. 100, no. 2017, pp. 87–93, 2017.
- [82] M. Rodr, G. Carlos, M. Naves-d, J. Bernardino, C. Diaz-corte, and J. B. Cannata-and, "Vascular calcifications , vertebral fractures and mortality in haemodialysis patients," no. August 2008, pp. 239–246, 2009.
- [83] D. V Barreto *et al.*, "Association of Changes in Bone Remodeling and Coronary Calcification in Hemodialysis Patients : A Prospective Study," *YAJKD*, vol. 52, no. 6, pp. 1139–1150, 2008.
- [84] K. Lu, C. Wu, J. Yen, and W. Liu, "Vascular Calcification and Renal Bone Disorders," vol. 2014, 2014.
- [85] M. Heymann, F. Herisson, J. Davaine, and C. Charrier, "Cytokine Role of the OPG / RANK / RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques : Comparison between carotid and femoral beds," vol. 58, pp. 300–306, 2012.
- [86] S. Panizo *et al.*, "RANKL Increases Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Through a RANK-BMP4 – Dependent Pathway," 2009.

- [87] M. Shargorodsky, M. Boaz, A. Luckish, Z. Matas, D. Gavish, and M. Mashavi, "Osteoprotegerin as an independent marker of subclinical atherosclerosis in osteoporotic postmenopausal women," vol. 204, pp. 608–611, 2009.
- [88] A. Augoulea *et al.*, "Osteoprotegerin as a Marker of Atherosclerosis in Diabetic Patients," vol. 2013, 2013.
- [89] W. E. Moody, N. C. Edwards, C. D. Chue, C. J. Ferro, and J. N. Townend, "Arterial disease in chronic kidney disease," pp. 365–372, 2013.
- [90] J. B. Cannata-andi, M. Rodri, and M. Naves-di, "Impact on Clinical Outcomes," no. 6, pp. 267–273.
- [91] W. L. Lau and J. H. Ix, "Consequences of Medial Arterial Calcification : A Pattern of," vol. 33, no. 2, pp. 93–105, 2013.
- [92] A. L. Durham, M. Y. Speer, M. Scatena, C. M. Giachelli, and C. M. Shanahan, "Role of smooth muscle cells in vascular calcification : implications in atherosclerosis and arterial stiffness," pp. 590–600, 2018.
- [93] S. Khosla, L. J. M. Iii, and B. L. Riggs, "J BMR The Unitary Model for Estrogen Deficiency and the Pathogenesis of Osteoporosis : Is a Revision Needed?," vol. 26, no. 3, pp. 441–451, 2011.
- [94] R. Sapir-koren and G. Livshits, "Postmenopausal osteoporosis in rheumatoid arthritis : The estrogen de fi ciency-immune mechanisms link," *Bone*, vol. 103, pp. 102–115, 2017.
- [95] C. Streicher *et al.*, "Estrogen Regulates Bone Turnover by Targeting RANKL Expression in Bone Lining Cells," *Sci. Rep.*, 2017.
- [96] E. Grimaud, L. Soubigou, P. Coipeau, A. Moreau, N. Passuti, and D. Heymann, "Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL)/ Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis," vol. 163, no. 5, pp. 2021–2031, 2021.
- [97] L. Kiesel and A. Kohl, "Maturitas Role of the RANK / RANKL pathway in breast cancer," *Maturitas*, vol. 86, pp. 10–16, 2016.
- [98] K. B. Emerton *et al.*, "Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice," vol. 46, pp. 577–583, 2010.
- [99] V. Sigl, L. P. Jones, and J. M. Penninger, "RANKL / RANK : from bone loss to the prevention of breast cancer," 2016.
- [100] L. Vico and J. Vanacker, "Sex hormones and their receptors in bone homeostasis : insights from genetically modified mouse models," pp. 365–372, 2010.
- [101] J. A. Clowes *et al.*, "J BMR Regulation of Circulating Sclerostin Levels by Sex Steroids in Women and in Men," vol. 26, no. 1, pp. 27–34, 2011.
- [102] S. Kondoh, K. Inoue, K. Igarashi, H. Sugizaki, Y. Shirode-fukuda, and E. Inoue, "Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice," *Bone*, vol. 60, pp. 68–77, 2014.
- [103] C. Cheng, M. Kuro-o, and M. S. Razzaque, "Molecular Regulation of Phosphate Metabolism by Fibroblast Growth Factor-23 – Klotho System," *Adv. Chronic Kidney Dis.*, vol. 18, no. 2, pp. 91–97, 2011.
- [104] J. E. Blau and M. T. Collins, "The PTH-Vitamin D-FGF23 axis," 2015.
- [105] M. J. Potthoff, S. A. Kliewer, and D. J. Mangelsdorf, "Endocrine fibroblast growth

- factors 15 / 19 and 21 : from feast to famine,” pp. 312–324, 2012.
- [106] T. Yamashita, M. Yoshioka, and N. Itoh, “Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor , FGF-23 , Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain,” vol. 498, pp. 494–498, 2000.
- [107] M. Kuro-o, Y. Matsumura, H. Aizawa, H. Kawaguchi, T. Suga, and T. Utsugi, “Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing,” pp. 45–51, 1997.
- [108] M. Kuro-o, “The *Klotho* proteins in health and disease,” *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 15, no. January, 2019.
- [109] H. Olauson, R. Mencke, J. Hillebrands, and E. Tobias, “PT NU,” *Bone*, no. 2016, 2017.
- [110] X. Lu and C. Hu, “Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder : Review *Klotho* / FGF23 Axis in Chronic Kidney,” pp. 15–23, 2017.
- [111] Y. Kinoshita and S. Fukumoto, “X-Linked Hypophosphatemia and FGF23-Related Hypophosphatemic Diseases: Prospect for New Treatment,” pp. 274–291, 2017.
- [112] H. Juppner *et al.*, “A G Protein-Linked Receptor for Parathyroid Hormone and Parathyroid Hormone-Related Peptide,” vol. 254, no. 1990, pp. 1990–1992, 1991.
- [113] D. Goltzman and C. Marcocci, “Physiology of the Calcium-Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis,” vol. 50, pp. 1–13, 2018.
- [114] C. H. Byon and Y. Chen, “Molecular Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: The Link between Bone and the Vasculature,” *Current Osteoporosis Reports*. 2015.
- [115] P. Taylor *et al.*, “High Phosphorus Diet Changes Phosphorus Metabolism Regardless of PTH Action in Rats High Phosphorus Diet Changes Phosphorus Metabolism Regardless,” no. November 2014, pp. 37–41.
- [116] A. Q. J. Ara, E. L. L. Ee, D. E. S. Tauber, and F. A. M. Oatamed, “Phosphate depletion in the rat : Effect of bisphosphonates and the calcemic response to PTH,” vol. 55, pp. 1434–1443, 1999.
- [117] E. R. Smith, M. L. Ford, L. A. Tomlinson, C. Rajkumar, L. P. McMahon, and S. G. Holt, “Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD,” no. November 2011, pp. 1957–1966, 2012.
- [118] J. C. Ferreira *et al.*, “Effects of dietary phosphate on adynamic bone disease in rats with chronic kidney disease - Role of sclerostin?,” *PLoS One*, 2013.
- [119] K. Akiyama, T. Kimura, and K. Shiizaki, “Biological and clinical effects of calciprotein particles on chronic kidney disease-mineral and bone disorder,” *Int. J. Endocrinol.*, vol. 2018, 2018.
- [120] C. Poiana, V. Radoi, M. Carsote, and J. P. Bilezikian, “New Clues that May Link Osteoporosis to the Circulating Lipid Profile,” *Nat. Publ. Gr.*, pp. 260–266, 2013.
- [121] R. J. Lund, M. R. Davies, A. J. Brown, and K. A. Hruska, “Successful Treatment of an Adynamic Bone Disorder with Bone Morphogenetic Protein-7 in a Renal Ablation Model,” pp. 359–369, 2004.
- [122] M. Fukagawa, “Downregulation of parathyroid hormone receptor gene expression and osteoblastic dysfunction associated with skeletal resistance to parathyroid

- hormone in a rat model of renal failure with low turnover bone,” no. June, pp. 1904–1911, 2005.
- [123] S. K. Sista and S. M. Arum, “Journal of Clinical & Translational Endocrinology Management of adynamic bone disease in chronic kidney disease : A brief review,” *J. Clin. Transl. Endocrinol.*, vol. 5, pp. 32–35, 2016.
- [124] Y. Wang *et al.*, “Gender differences in the response of CD-1 mouse bone to parathyroid hormone : potential role of IGF-I,” pp. 279–287, 2006.
- [125] R. Peter, J. P. Vora, and W. D. Fraser, “Gender variation in PTH sensitivity and rhythmicity following growth hormone replacement in adult growth hormone-deficient patients,” pp. 516–526, 2004.
- [126] D. M. Vodopivec *et al.*, “Gender differences in bone mineral density in patients with sporadic primary hyperparathyroidism,” no. March, pp. 1–9, 2018.
- [127] B. H. Min *et al.*, “Osteoprotegerin Reverses Osteoporosis by Inhibiting Endosteal Osteoclasts and Prevents Vascular Calcification by Blocking a Process Resembling Osteoclastogenesis,” vol. 192, no. 4, 2000.
- [128] T. T. Nguyen *et al.*, “Mitochondrial Dynamics and Oxidative Stress in Disease Mitochondrial oxidative stress mediates high-phosphate-induced secretory defects and apoptosis in insulin-secreting cells,” no. 48, pp. 933–941, 2020.
- [129] R. Watanabe *et al.*, “Enpp1 is an anti-aging factor that regulates Klotho under phosphate overload conditions OPEN,” 2017.
- [130] G. Dalton, S. An, S. I. Al-juboori, N. Nischan, J. Yoon, and E. Dobrinskikh, “Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling,” pp. 1–6, 2016.
- [131] G. D. Dalton, J. Xie, S. An, C. Huang, and R. G. Erben, “New insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho,” vol. 8, no. November, pp. 1–10, 2017.
- [132] D. Fairweather, “Sex Differences in Inflammation During Atherosclerosis,” vol. 8, pp. 19–22, 2014.
- [133] M. Pirklbauer and G. Mayer, “The exchangeable calcium pool : physiology and pathophysiology in chronic kidney disease,” pp. 2438–2444, 2011.
- [134] S. Bertazzo, W. F. Zambuzzi, D. D. P. Campos, T. L. Ogeda, C. V Ferreira, and C. A. Bertran, “Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 78, no. 2, pp. 177–184, 2010.
- [135] S.-I. Katsumata, R. Masuyama, M. Uehara, and K. Suzuki, “High-phosphorus diet stimulates receptor activator of nuclear factor- κ B ligand mRNA expression by increasing parathyroid hormone secretion in rats,” 2019.
- [136] M. Kanatani, T. Sugimoto, J. Kano, M. Kanzawa, and K. Chihara, “Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity,” *J. Cell. Physiol.*, 2003.
- [137] D. Granjon, O. Bonny, and A. Edwards, “Coupling between phosphate and calcium homeostasis : a mathematical model,” no. 55, pp. 1181–1199, 2020.
- [138] E. E. Hohman *et al.*, “PT US,” *Bone*, p. #pagerange#, 2018.
- [139] L. D. Quarles, “NIH Public Access,” vol. 318, no. 9, pp. 1040–1048, 2013.
- [140] J. B. Wetmore, S. Liu, R. Krebill, R. Menard, and L. D. Quarles, “Effects of

Cinacalcet and Concurrent Low-Dose Vitamin D on FGF23 Levels in ESRD,” pp. 110–116.

- [141] A. Manuscript, “NIH Public Access,” vol. 78, no. 12, pp. 1232–1239, 2011.
- [142] M. C. Hu *et al.*, “Dietary vitamin D interacts with high phosphate-induced cardiac remodeling in rats with normal renal function,” no. August 2019, pp. 411–421, 2020.
- [143] A. Q. J. Ara, E. L. L. Ee, D. E. S. Tauber, and F. A. M. Oatamed, “Phosphate depletion in the rat : Effect of bisphosphonates and the calcemic response to PTH,” vol. 55, pp. 1434–1443, 1999.
- [144] E. Guney, G. Kisakol, A. G. Ozgen, and C. Yilmaz, “Effects of bisphosphonates on lipid metabolism,” vol. 29, no. 2, pp. 252–255, 2008.
- [145] C. T. M. Sc *et al.*, “Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles,” *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 17, no. 1, pp. 64–72, 2009.

