

## KULLANMAMAYA BAĞLI OSTEOPENİDE SALMON KALSİTONİN VE SENTETİK İNSAN KALSİTONİNİ KULLANIMININ BİYOMEKANİK SONUÇLARI

### The biomechanical results of the use of salmon calcitonin and synthetic human calcitonin in immobilization osteopenia

Ahmet Can<sup>1</sup>, Faruk Balkar<sup>2</sup>, Sinan Karaoğlu<sup>3</sup>, Eyüp S Karakaş<sup>4</sup>, Şevki Kabak<sup>3</sup>

**Özet:** Bu çalışmada; Wistar tipi erkek ratlarda deneysel olarak oluşturulan kullanmama osteopenisinde salmon kalsitonin (SKT) ve sentetik insan kalsitonini (İKT)'nin etkileri biyomekanik metodlar kullanılarak araştırıldı. Toplam 30 adet ratın 120 kemiğine (60 femur, 60 tibia) biyomekanik test uygulandı. Deney ve kontrol grubundaki tüm ratların sağ arka bacak siyatik sinirleri kesilerek immobilize edilirken, sol arka bacakları karşılaştırma için serbest bırakıldı. Deney süresince birinci grup 10 rata 3 IU/kg/gün SKT cilt altına, ikinci grup 10 rata 0.01 mg/kg/gün İKT cilt altına enjekte edildi. Kontrol grubu 10 rata plasebo olarak cilt altına serum fizyolojik enjekte edildi, bunun dışında ratlar normal olarak beslendi. İlaç başlanmasından 28 ve 56 gün sonra ratlar öldürülerek deney ve kontrol femurlarına torsiyonal test, tibialarına bending test uygulandı. 28 ve 56 günlük sonuçlara göre; hem SKT ve hem de İKT'nin kullanmama osteopenisini önlemede etkili olduğu görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Kalsitonin, Osteopeni

**Summary:** The effects of salmon calcitonin (SCT) and synthetic human calcitonin (HCT) on experimental immobilization osteopenia were studied in male Wistar rats using biomechanical methods. Biomechanical tests were applied to 120 bones (60 femora and 60 tibiae) of 30 rats. The right hind limbs of all rats in experimental and control groups were immobilized with dividing their sciatic nerves. Their left hind limbs were left intact for comparison. During the experiment SCT (3 IU/kg body weight/per day) was given to ten rats in group 1, HCT (0.01 mg/kg body weight/per day) was given to ten rats in group 2, both subcutaneously. Ten rats from control group were injected saline subcutaneously as placebo. Rats were fed naturally. After the rats were sacrificed at the 28th and the 56th day of the administration of the drugs, torsional tests on the femora and bending tests on the tibiae of all rats were performed. As a result SCT and HCT were found to be effective in preventing immobilization osteopenia at 28th and 56th days.

**Key Words:** Calcitonin, Osteopenia

Kemiklerde kullanmama bağlı olarak lokal veya generalize osteopeni gelişebilir (1). Bu tip osteopeni kemikleşmeyi yavaşlatan nedenlerden pratikte en sık görülenidir (2-5). Buradaki tablo diğer metabolik kemik hastalıklarına benzemediği için, trabeküler kemik kitlesindeki azalmayı daha iyi tanımlar düşüncesi ile osteoporoz yerine "osteopeni" terimi kullanılmıştır (3). İn vivo ve invitro ça-

lışmalarda hem SKT, hem de İKTA'nin; osteoklastların oluşum hızını yavaşlattığı ömürlerini kısalttığı ve aktivitelerini azalttığı, osteoblastların aktivitelerinde ise artmaya yol açtığı gösterilmiştir (1, 6-11).

Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan kullanmama osteopenisini önlemek amacı ile SKT ve İKT kullanıldı. Bu ilaçların kemiğin mekanik mukavemetini artırma derecelerini biyomekanik metodlarla saptayıp, ağrı ve patolojik kırık gibi komplikasyonlara yol açan osteopeninin önlenmesi ve tedavisindeki yerlerini belirlemeye çalıştık.

Mustafa Kemal Paşa Devlet Hastanesi BURSA  
Ortopedi ve Travmatoloji Uzm. Dr.<sup>1</sup>  
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi 38039 KAYSERİ  
Doç. Dr.<sup>2</sup>, Öğr. Gör.<sup>3</sup>, Prof. Dr.<sup>4</sup>

Geliş tarihi: 8 Ocak 1996

## METODLAR

Bu çalışma için ağırlıkları 230-300 g (ortalama 265 g) olan ve yaşları sekiz ile on ay arasında değişen Wistar tipi erkek ratlar kullanıldı. Toplam 30 adet ratın sağ alt ekstremitelerinde, açık eter anestezisi kullanılarak, Carl ve ark (2) tarafından tarif edilen siyatik denervasyon ve immobilizasyon oluşturuldu. Deney süresince 1. grup 10 rata 3 IU/kg/gün SKT (Miacalcic, Sandoz) % 0.9'luk serum fizyolojik ile sulandırılarak sol uylukta cilt altına, 2. grup 10 rata 0.01 mg/kg/gün İKT (Cibacalcin, Ciba) % 3'lük mannitol ile sulandırılarak yine sol uylukta cilt altına enjekte edildi. Kontrol grubu 10 rat ise Ankara Yem Sanayi'nin standart palet yemi ve şehir şebeke suyu ile beslendi. Kontrol grubu ratlara plasebo olarak sol uylukta cilt altına serum fizyolojik enjekte edildi. İlaç başladıktan 28 gün sonra her üç gruptan rastgele beşer rat yüksek doz eter ile öldürüldü (1). Hepsinin her iki femur ve tibiası yumuşak dokulardan temizlenerek, biyomekanik teste tabi tutuluncaya kadar (ortalama 24-36 saat) izotonik ringer laktat solüsyonunda muhafaza edildi (12). Deneyin 56. günü geriye kalan 15 ratın femur ve tibiaları benzer şekilde çıkarıldı ve muhafaza edildi.

**Biyomekanik metod:** Biyomekanik testler gerilim ve uzama miktarını ölçen digital kumandalı elektronik cihaz (Tensometer 500-Monsanto, 471-1984-England) ile yapıldı. Cihaz seçilen birimlerde (Newton "N", milimetre) 1/100 hassasiyete sahiptir. **Bending testi:** Deney ve kontrol grubu tüm tibialara uygulandı. Tibianın uzunluğu ibre skalalı bir kumpasla (hassasiyeti mm/10) ölçülerek ortası işaretlendi. Tibia tensometrenin sabit çenesine tutturularak işaretli orta noktasından 90°'lik açıyla ve 0.85 mm/sn hızla kuvvet uygulandı (13) (Şekil 1). Tensometrenin kaydettiği değer "N" cinsinden "Maksimal Bending Kuvvet" olarak kaydedildi.

**Torsiyon testi:** Deney ve kontrol grubu tüm femurlara uygulandı. Test edilecek femur, bir diskmakara sistemiyle tensometrenin aksiyel yöndeki çekme kuvvetini direkt olarak torsiyon kuvvetine dönüştüren bir adaptör vasıtasıyla tensometre çenelerine tesbit edildi. Adaptörde kullanılan diskin çapı 115 mm idi ve tensometrenin kaydettiği "mm" cinsinden torsiyonel esneme miktarı, anguler deplasman

derecesine sayısal olarak eşit oluyordu. Femur kondillerine; 90°'lik açıyla ve 0.85 mm/sn hızla torsiyonel kuvvet uygulandı. Tensometrenin kaydettiği değer, diskin yarıçapı (57.5 mm) ve 10-3 ile çarpıldı. Elde edilen değer "Nm" cinsinden "Maksimal Torsiyonel Kuvvet" olarak kaydedildi.

Her iki testte de kırılma olmadan kemikte meydana gelen esneme miktarları (elastik deformasyon) ve buna tekabül eden kuvvetler iki kademede, kırılma anındaki esneme (plastik deformasyon) ve buna tekabül eden kuvvet son kademe olarak tensometre tarafından kaydedildi. Kırılmayı meydana getiren kuvvet "Maksimal Bending Kuvvet (N)" ve (Maksimal Torsiyonel Kuvvet (Nm)", esneme miktarı "Anguler Deplasman (Derece-D-)", kemiğin sağlamlığı "Stiffness" Maksimal Bending-Torsiyonel Kuvvet /Anguler Deplasman (N-Nm/D olarak kabul edildi. Tensometre tarafından testlerin grafiği çizildi ve eğrinin altında kalan alan "Enerji Absorpsiyonu (N-Nm)" olarak hesap edildi (Grafik 1, 2, 3, 4).

Deney ve kontrol grubu ratların sağ (deney) femur ve tibialarına ait biyomekanik test değerleri, sol (kontrol) femur ve tibialarına ait değerlerin yüzdesi olarak hesap edildi. SKT ve İKT'ne ait yüzde değerleri, kontrol grubu yüzdeleri ile istatistiki olarak karşılaştırıldı (Tablo 1, 2, 3, 4). Çalışmamızda bulgular değerlendirilirken Mann-whitney U testi kullanıldı.

## BULGULAR

Tüm hayvanlarda gerek kalsitonin enjeksiyonuna ve gerekse ameliyata bağlı bir komplikasyon görülmedi. İlaç verilen ratların biyomekanik parametrelerine ait yüzdeler, kontrol grubu ile kıyaslandığında; 28 ve 56 günlük bending ve torsiyon testi sonuçları, SKT ve İKT için istatistikî olarak anlamlı idi (p<0.05, Tablo 1, 2, 3, 4).

28 günlük SKT grubunun biyomekanik değerleri İKT değerlerine göre % 1.8 - % 10.4 arasında değişen oranlarda daha yüksek idi. 56. günde ise SKT'e ait değerler, 28. güne göre % 3.4 - % 12.6 arası değişen oranlarda düştü ve bu değerler 56. gün İKT değerlerinden % 3.2 - % 16.4 arası daha düşük idi.

**Tablo I.** Yirmisekiz günlük torsiyon testi sonuçlarının, kontrollerine göre yüzdelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

Grup	n	Maksimum tork(%)		Angüler deplasman (%)		Stifnes (%)		Enerji absorpsiyonu (%)	
		med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)
Kontrol	5	55	(50-58)	65	(57-73)	86	(68-94)	37	(30-56)
İKT	5	81	(71-83)	86	(79-90)	90	(90-96)	66	(62-76)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05
SKT	5	86	(74-88)	92	(78-94)	94	(93-94)	82	(63-84)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05

n: denek sayısı

med: medyan

(min-maks): (minimum-maksimum)

**Tablo II.** Elliialtı günlük torsiyon testi sonuçlarının, kontrollerine göre yüzdelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

Grup	n	Maksimum tork(%)		Angüler deplasman (%)		Stifnes (%)		Enerji absorpsiyonu (%)	
		med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)
Kontrol	5	46	(44-52)	61	(55-65)	80	(71-85)	32	(31-38)
İKT	5	87	(71-89)	92	(89-93)	94	(80-98)	83	(67-85)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05
SKT	5	72	(62-86)	81	(73-90)	90	(82-95)	63	(51-80)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05

n: denek sayısı

med: medyan

(min-maks): (minimum-maksimum)

**Tablo III.** Yirmisekiz günlük beding testi sonuçlarının, kontrollerine göre yüzdelerinin kontrol grubu ile karşılaştırılması

Grup	n	Maksimum tork(%)		Angüler deplasman (%)		Stifnes (%)		Enerji absorpsiyonu (%)	
		med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)
Kontrol	5	63	(43-64)	71	(57-78)	85	(75-88)	49	(29-55)
İKT	5	81	(72-83)	86	(82-94)	87	(87-97)	74	(62-78)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05
SKT	5	88	(85-88)	93	(92-96)	92	(91-95)	82	(79-86)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05

n: denek sayısı

med: medyan

(min-maks): (minimum-maksimum)

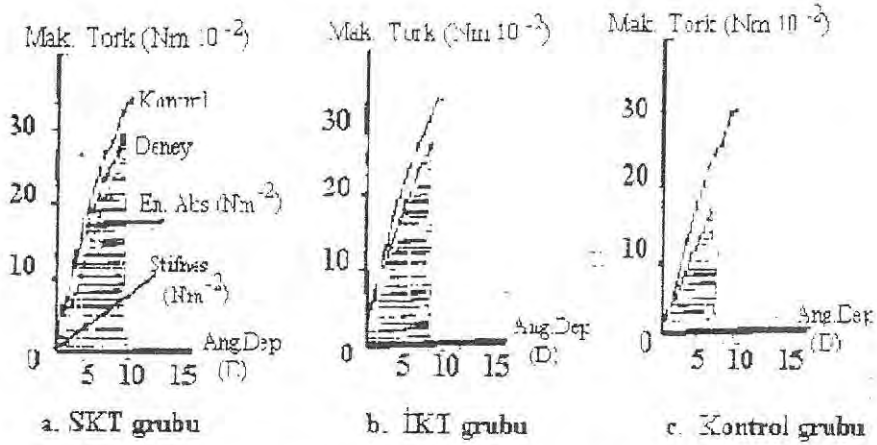
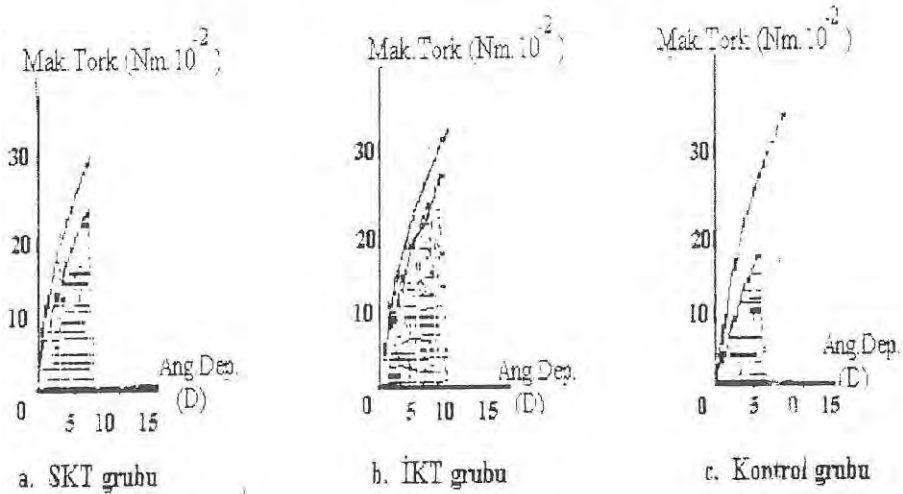
**Tablo IV.** Elli altı günlük bending testi sonuçlarının, kontrollerine göre yüzdelerin kontrol grubu ile karşılaştırılması

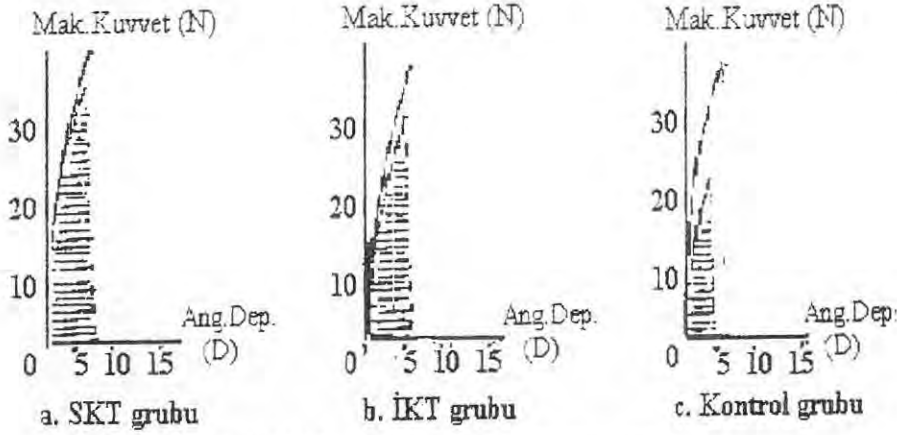
Grup	n	Maksimum tork(%)		Angüler deplasman (%)		Stifnes (%)		Enerji absorpsiyonu (%)	
		med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)	med.	(min-maks)
Kontrol	5	51	(48-53)	60	(59-70)	73	(73-88)	36	(33-40)
İKT	5	84	(79-91)	94	(85-97)	91	(87-99)	80	(67-88)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05
SKT	5	73	(68-84)	83	(75-94)	90	(82-95)	64	(57-81)
			P<0.05		P<0.05		P<0.05		P<0.05

n: denek sayısı

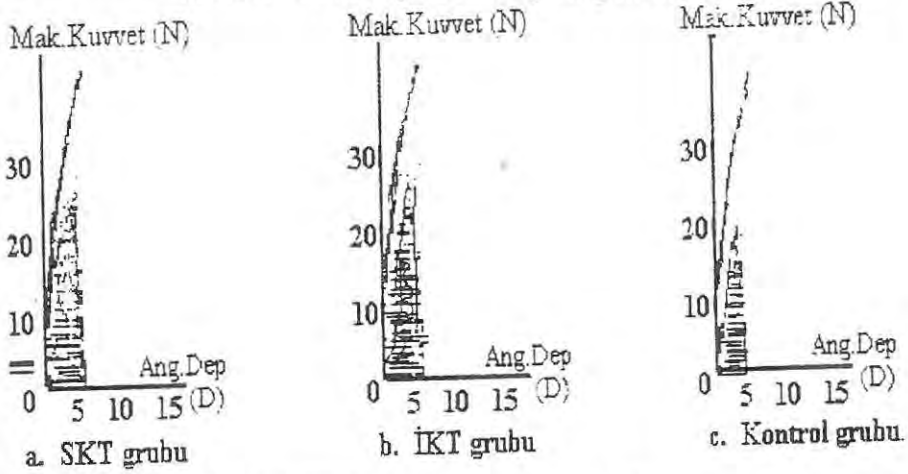
med: medyan

(min-maks): (minimum-maksimum)

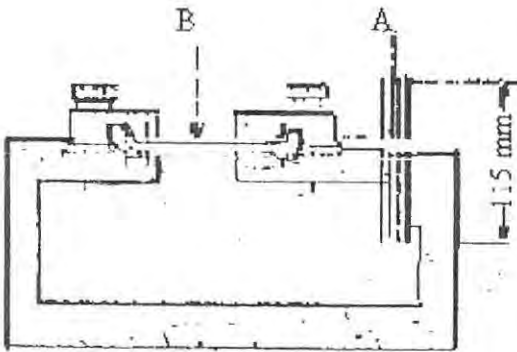
**Grafik 1.** Yirmisekiz günlük torsiyon testi grafikleri**Grafik 2.** Elli altı günlük torsiyon testi grafikleri



Grafik 3. Yirmisekiz günlük bending testi grafikleri



Grafik 4. Elli altı günlük torsiyon testi grafikleri



Şekil 1. torsiyon ve Bending test düzeneğinin şematize edilmiş kesiti

A: Torsiyon testi için kuvvet uygulama  
B: Bending testi için kuvvet uygulama yeri

## TARTIŞMA

Kalsitoninler osteoklast aktivitesi ve sayısını azaltarak kemik rezorpsiyonunu önlemelerinin yanı sıra, osteoblastları uyarak osteogenezisi de arttırmaktadırlar (3,6,14).

Baktır ve ark. (1) sol arka bacaklarını immobilize ettikleri tavşanlara SKT vererek serum kalsiyumunun düştüğünü, aklalen fosfatının yükseldiğini ve kemiğin kuru ağırlığının kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir. Hayashi ve ark. (4) hemikordotomili ratlara salmon kalsitonin vererek kemik kuru ağırlığında artma olduğunu göstermişlerdir. Osteoporozlu hastalarda SKT kullanımı ile kemik kütleindeki kaybın durdurulabileceğini bildiren

linik çalışmalar vardır (7,9,11).

Farrington ve ark. (15) renal osteodistrofili hastalara İKT vermişler ve yaptıkları iskelet biopsilerinde osteoklastlarda % 17'lik bir azalma tesbit etmişlerdir. Chevallier ve ark. (8) kemik metastazlı ve hiperkalsemisi olan 40 hastaya İKT vererek serum kalsiyumunun normala döndüğünü bildirmişlerdir. Lyritis ve ark. (16) postmenapozal osteoporozlu kadınlarda İKT kullanarak kemik trabeküllerinde % 16.7'lik artış gözlemlemişlerdir. Mac Intyre (10) İKT kullanımı ile osteoporozun efektif bir şekilde önenebileceğini bildirmiştir.

Yaptığımız çalışmada; 28 ve 56 günlük bending ve torsiyon testi sonuçları, kontrol grubuna göre hem SKT ve hem de İKT için istatistikî olarak önemli ölçüde yüksek idi. Yukarıda bahsedilen çalışmalarda, SKT ve İKT'nin kemik rezorpsiyonunu azaltıcı ve yeniden kemik yapımını artırıcı etkileri olduğu biokimyasal, histolojik ve klinik çalışmalarla ortaya koyulmuştur. Biz çalışmamızda biyomekanik metodlar kullanarak bu çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde ettik.

Yirmisekiz günlük SKT grubunun biyomekanik değerleri, İKT değerlerine göre % 1.8-10.4 arası daha yüksek idi. Azria ve ark. (17) genç tavşanlarda yaptıkları araştırmalar sonucu SKT'nin, İKT'ne göre % 30 daha potent olduğunu bildirmiştir. Gennari ve ark. (18) sağlıklı gönüllülerde yaptığı araştırmada 50 IU SKT ile 90 IU İKT'nin eş değer potentte olduğunu gözlemlemişlerdir. Williams ve ark. (19) ratlarda yaptıkları çalışmada hipokalsemik etki açısından SKT'nin, İKT'ne göre daha potent olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda; 28 günlük grupta SKT'nin, İKT'ne göre bir miktar daha fazla etkili bulunması bahsedilen literatür bilgileri ile uyumludur. Elli altı günlük SKT grubunun biyomekanik değerleri, 28 günlük değerlere göre % 3.4-12.6 arası oranlarda düşük idi ve bu değerler 56. gün İKT değerlerinden % 3.2-16.4 arası daha düşük idi.

Salmon kalsitonin kullanım esnasında etkilerine karşı direnç gelişmesi ve bu direncin mekanizması konusunda literatürde farklı hipotezler vardır. Nakamura ve ark. (20) SKT verilmesi esnasında

osteoklast sayısında bir artış ve bunların kemik eritici özelliklerinde artma olduğunu, agressif osteoklastlar oluştuğunu bildirmişlerdir. Feldman ve ark. (21) SKT ile karşı karşıya gelen hücrelerin duyarız hale gelebileceğini, spesifik kalsitonin reseptörlerinin kalsitonine karşı affinitelerinin azalacağını bildirmişlerdir. Sekonder direncin bir başka muhtemel açıklaması ise kalsitonine karşı antikörlerin oluşmasıdır. Ancak Gennari ve ark. (22) SKT verdikleri paget'li hastaların bir kısmında antikör oluşmamasına rağmen SKT etkilerine direnç geliştiğini ve yine bir kısım hastada da (+++) anti-kör tesbit edilmesine rağmen direnç gelişmediğini bildirmişlerdir. Williams ve ark. (19) ratlara intravenöz SKT ve İKT vererek yaptıkları çalışmada; SKT enjeksiyonundan sonra plazma kalsiyumunun düştüğünü, ancak buna paralel olarak idrar kalsiyumunda da artış olduğunu; tekrarlayan zerklerde idrar kalsiyumundaki artışın progressif bir şekilde yükseldiğini bildirmişlerdir. Benzer etki İKT ile tesbit edilememiştir. Araştırmacı bunu SKT'nin; kemik ve böbrekteki reseptörlerinin farklı olmasına ve renal reseptörler üzerinde nispeten daha etkili olmasına bağlamakta, ve yine SKT'nin, kronik uygulamada negatif kalsiyum balansına yol açabileceğini savunmaktadır.

Schatzker ve ark. (23) standart kırık oluşturdukları tavşanlara SKT vererek, yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. 3 haftalık kırıkta, kalsitonin verilen tavşanlarda kontrol grubuna göre belirgin kallus oluştuğunu, 6 haftalık grupta ise kallus miktarında kontrol grubuna göre azalma olduğunu ve kırık çizgisinin daha uzun süre sebat ettiğini yayınlamışlardır.

Yukarıdaki literatür bilgilerinden anlaşıldığı gibi SKT kullanımı esnasında etkilerine karşı mekanizması tam bilinmemekle birlikte direnç gelişebilir. Biz çalışmamızda 56 günlük sonuçlardaki nisbi düşmeyi SKT'ne karşı gelişebilen dirence bağladık. Çalışmamız daha uzun süreli olsaydı daha aydınlatıcı sonuçlar alabilirdik.

Sonuç olarak; her iki kalsitonin de osteopeniyi önlemede etkilidirler. Ancak uzun süreli kullanımda SKT etkilerine karşı direnç gelişebilir. Tedavinin takibi süresince bu değerlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Baktır A, Karakaş ES, Patıroğlu TE, et al: The effect of salmon calcitonin on immobilization osteopenia. *Acta Orthop Scand* 1988, 59: Supplementum 227.
2. Carl TB, Gregory TT, Solomon RP: Treatment of sciatic denervation disuse osteoporosis in the rat tibia with capacitively coupled electrical stimulation. *J Bone Joint Surg* 1985, 67-A: 1022-1028.
3. Chiroff RT, Jowsey J: The effect of calcitonin on immobilization osteopenia. *J Bone Joint Surg* 1970, 52-A: 1138-1146.
4. Hayashi T, Yamamuro T, Okumura H, et al: Effect of (Asul-7)-cel calcitonin on the prevention of osteoporosis induced by combination of immobilization and ovariectomy in the rat. *Bone* 1989, 10: 25-28.
5. Vaes G: Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. *Clin Orthop* 1988, 231: 239-272.
6. Accardo G: Support for the clinical use of calcitonin: electron microscope study of the functional state of bone cells of rats after chronic treatment with calcitonin. *Curr Ther Res Clin Exp* 1982, 31: 422-433.
7. Alevizaki M, Stevenson JC, Girgis SL: Altered calcitonin gene in a young patient with osteoporosis. *BMJ* 1989, 298: 1215-1216.
8. Chevallier B, Peyron R, Basuyau JP, et al: Synthetic human calcitonin in malignant hypercalcaemia. *Presse Méd* 1988, 17: 2375-2377.
9. Haas HG, Liebrich BM, Schaffner W: Calcitonin and osteoporosis a critical review of the literature 1980-1989. *Klin Wochenschr* 1990, 68: 359-371.
10. Mac Intyre I, Stevenson JC, White MI, et al: Calcitonin for prevention of postmenopausal bone loss. *Lancet* 1988, 8591: 900-901.
11. Veinerman SA, Bockman RS: Medical therapy of osteoporosis. *Orthop Clin North Am* 1990, 21: 109-124.
12. Bak B, Jorgenson HP, Andreassen TT: Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 1990, 61: 54-57.
13. Barlet JP: effect of porcine, salmon and human calcitonin on urinary excretion of some electrolytes in sheep. *J Endocr* 1972, 55: 153-161.
14. Thomson J, Urist MR: Influence of cortisone and calcitonin on bone morphogenesis. *Clin Orthop* 1970, 71: 253-259.
15. Farrington K, Varghese Z, Moorhead JF: Human calcitonin in the treatment of renal osteodystrophy. *J Lab Clin Med* 1980, 96: 299-306.
16. Lyritis G, Tsakalagos N, Karachalios T, et al: Treatment of postmenopausal osteoporosis with the ADFR regimen. *The 21 European Symposium on Calcified Tissues. Jerusalem, 1989.*
17. Azria M: Comparison of the hypocalcemic activities of three calcitonins using new biological method. *Current Clinical Practice Series* 1986, 42: 104-110.
18. Gennari M: Acute effects of salmon, human and porcine calcitonin on plasma and cyclic AMP levels in man. *Curr Ther Res Clin Exp* 1981, 30: 1024-1032.
19. Williams CC, Matthews EW, Moseley JM, et al: The effects of synthetic human and salmon calcitonins on electrolyte excretion in the rat. *Clin Science* 1972, 42: 129-137.
20. Nakamura T: Whole body irradiation inhibits the escape phenomenon of osteoclasts in bones of calcitonin-treated rats. *Calcif Tissue Int* 1985, 37: 42-45.
21. Feldman RS, Krieger NS, Tashjian AH Jr: Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1980, 107: 1137-1143.
22. Gennari C, Gonelli S, Chierichetti SM, et al: Antibody problem in calcitonin administration. *Excerpta Medica* 1985, 663: 457-467.
23. Schatzker J, Chapman M, Fornaiser L, et al: The effect of calcitonin on fracture healing. *Clin Orthop* 1979, 141: 303-306.