

PIROFOSFAT VE BİSFOSFONATLARIN KALSİFİKASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

Sevtap İnce¹

Yayın kuruluna teslim tarihi: 20.12.1995

Yayına kabul tarihi: 2.1.1996

Özet

İnorganik pirofosfat ve bisfosfonatların kalsifikasyon üzerine etkileri incelenmiştir. Pirofosfat biyolojik sıvılarda bulunur ve kalsiyum fosfatın çökmesini engeller. Aynı zamanda amorf kalsiyum fosfatın kristal haline dönüşmesini yavaşlatır ve kristal kümelenmesi ve çözülmesini inhibe eder. Bu sonuçlar pirofosfatın fizyolojik öneme sahip bir bileşik olabileceğini gösterir. Bisfosfonatlar pirofosfattaki P-O-P yerine P-C-P bağları içeren bileşiklerdir. Bu maddelerin özellikleri pirofosfatinkilere benzer. Fakat pirofosfatın aksine kimyasal ve enzimatik hidrolize dirençlidir. Hidroksiapatit kristallerine bağlanır ve in vitro hem kristal oluşmasını hem de kristal çözülmesini inhibe eder. İn vivo yumuşak doku kalsifikasyonlarını ve normal kalsifikasyonu önler. Bu maddeler aynı zamanda kemik rezorpsiyonunun güçlü inhibitörleridir. Bisfosfonatlar özellikle sert dokularda birikir. Kalsifikasyonun inhibisyonuna ilişkin etki mekanizması kalsiyum fosfat kristallerinin büyümesinin engellenmesidir. Ancak kemik rezorpsiyonu üzerine etkisi büyük bir olasılıkla hücresele olabilir.

Bisfosfonatlar insanlarda heterotopik kalsifikasyon, diştaşı oluşumu ve diş çürüklerinin önlenmesinde, Paget hastalığı, osteoporotik immobilizasyon ve postmenopozal osteoporozis gibi hastalıklarda kemik rezorpsiyonunu yavaşlatmak için kullanılmaktadır.

Anahtar sözcükler: Pirofosfat, bisfosfonat, kalsifikasyon.

Kalsifikasyon mekanizması, ayrıntıları henüz tam olarak kesinleşmemiş çeşitli evreleri kapsar ve bu evrelere ilişkin değişik varsayımlar ileri sürülmüştür. Bunlardan en çok ilgi çekenini de Glimcher'in (35) ortaya atmış olduğu nükleasyon teorisi. Buna göre in vitro uygun çözeltiler içine bir kristal çekirdeği eklenmesiyle, bu maddelerin çözeltinin dengesini bozar ve moleküllerde yığımlarla küçük çekirdekler oluşur (nükleasyon). Bunlar da giderek irileşir ve kristallere dönüşür.

THE EFFECTS OF PYROPHOSPHATES AND BIPHOSPHONATES ON CALCIFICATION

Abstract

This paper reviews the actions on calcification of the inorganic pyrophosphate and bisphosphonates. Pyrophosphate was found to occur in many biological fluids and inhibited the precipitation of calcium phosphates. It also slowed the transformation of amorphous calcium phosphate to its crystalline form, and inhibited crystal aggregation and dissolution. These results suggested that it might be a compound of physiological significance. Bisphosphonates are compounds where the P-O-P bond of pyrophosphate is replaced by a P-C-P bond. These analogues have similar properties to pyrophosphate, but unlike pyrophosphate they are resistant to enzymic and chemical hydrolysis. Bisphosphonates bind to hydroxyapatite crystals and in vitro inhibit both crystal formation and dissolution. In vivo, they inhibit soft tissue calcification and normal calcification. Furthermore they are very potent inhibitors of bone resorption. Bisphosphonates accumulated specifically in mineralized tissues. The mechanisms of action for the inhibition of calcification is probably involves an inhibition of calcium phosphate crystal growth. However the mode of action on bone resorption is more likely to be cellular.

Bisphosphonates have been used in man to prevent heterotopic calcification, dental calculus, and dental caries and to slow down bone resorption in conditions such as postmenopausal osteoporosis, Paget's disease and osteoporotic immobilisation.

Key words: Pyrophosphate, bisphosphonate, calcification.

Sert dokularda kalsiyum ve fosforun nükleasyonunu başlatıcı olarak kollajen lifcikler üzerinde durulmaktadır. Bu lifciklerin mineral matris oluşumu (nükleasyon) için uygun alanları kapsadıkları ve ilk oluşan kristallerin lifcikler içine aynı yönde sıralanarak polimerler arasındaki kısa aralıklara çökdiklerini sanılmaktadır (9). Ancak bu lifciklerin diğer bağ dokularının da asıl yapısal proteinlerinden biri oldukları halde bu yumuşak dokuların niçin kalsifiye olmadığı ve normal koşullarda kalsifikasyonun kemik ve dişlerde sınırlı

kaldığı sorusu ortaya atılmıştır. Fleisch ve ark. yumuşak dokularda kollagenin nükleasyonu başlatıcı aktivitesini önleyebilecek maddelerin bulunması gerektiği düşüncesinden hareket ederek araştırmalarına başlamışlar ve idrar (22), plazma (23), daha sonraları da tükürük (7) ve sinovyal sıvının (63) kalsiyum fosfatın çökmesini önleyebilen maddeler içerdiğini bulmuşlardır. Bunlardan biri izole edilmiş ve bu maddenin inorganik pirofosfatın (PPi) özelliklerini içerdiği gösterilmiştir.

PPi'm normalde vücut sıvılarında bulunduğu anlaşıldıktan sonra, bu maddenin yumuşak dokularda kollageni mineralize olmaktan koruduğu ve mineralizasyon yerinde lokal olarak parçalanabileceği ve bu etkiyi, pirofosfataz aktivitesine sahip, uzun süreden beri kalsifikasyonla ilişkisi olduğu bilinen alkali fosfatın yapacağı düşünülmüştür (22,23). Böylece pirofosfatın kalsifikasyonun fizyolojik regülatörlerinden biri olduğu görüşü güçlenmiştir.

Bu sonuçlardan hareket edilerek araştırmalar PPi'm fiziko-kimyasal etkilerine yönelmiştir. İn vitro yapılan araştırmalarda, biyolojik konsantrasyonlarda kalsiyum fosfatın kristalleşmesini engeller (22,31). Aynı zamanda amorf kalsiyum fosfatın kristal haline geçmesini (olgunlaşmasını) önler (27) ve kalsiyum fosfat kristallerinin kümelenmesine engel olur (37). Pirofosfatlar hidroksiapatit kristallerinin çözünmesini de inhibe eder (6,18,25). Buna ek olarak kalsiyum oksalatın kümelenmesi ve çökmesini de engeller (24). Bu etkileşim mekanizması tam olarak bilinmemesine karşın, PPi'm kristallerin yüzey tabakalarındaki iyonlarla kuvvetli bağlar oluşturmalarından olabilir (25).

Daha sonraki araştırmalar PPi'in in vivo olarak etkili olabileceğini göstermiştir. Sıçanlara subkütan olarak verildiğinde çeşitli yollarla meydana getirilen aort ve deri kalsifikasyonlarını inhibe etmiştir (67). İdrarda da bulunması taş oluşmasını engelleyici olarak önemli olabilir (24). Bu etkiler oral olarak verildiğinde görülmemektedir ve enzimatik hidrolize dirençli değildir (27).

Bu sonuçlar PPi'm fizyolojik ve patofizyolojik öneme sahip olduğunu göstermiştir. Yumuşak dokuların mineralize olmasını önler ve kemikte kalsifikasyon mekanizmasını düzenleyen fizyolojik regülatörlerden biridir (22).

Kemik, PPi'in oldukça fazla miktarlarını içerir. Paratiroid hormonun (PTH) rezorpsiyonu artırarak, tirokalsitonin azaltarak kemik üzerine

etki ettikleri bilinir. Bu etkilerin kristal yüzeyleri üzerine bağlanmış pirofosfat tabakasındaki değişimler nedeniyle olabileceği görüşü ilginçtir. Bu görüşü kanıtlayacak kesin bulgular olmamasına karşın birçok kemik hastalıklarında PPi metabolizmasında değişimler bulunmuştur. Böylece PPi'in idrardan atılımının hiperparatiroidizm, Paget hastalığı ve hipertiroidizm gibi kemik harabiyetinin artışıyla karakterize hastalıklarda normalin birkaç katı olduğu gösterilmiştir. Menopoz dönemindeki kadınlarda, pirofosfatın üriner atılımındaki yaklaşık iki kat artışın bu yaşta osteoporozun başlamasıyla ilişkili olması ve pirofosfatın anti-osteoporoz bir faktör olarak kabul edilmesi mümkündür. Kemikte pirofosfat düzeyinin düzenlenmesinin alkali fosfataz aracılığıyla yapılabileceği ilgi çekici bir fikirdir, çünkü bu enzimin pirofosfataza benzer bir işlevi olacağı gösterilmiştir (25). Pirofosfatın dişlerde ve yüksek konsantrasyonda tükürükte de bulunması nedeniyle, bu maddeleri içeren kontrol mekanizması kemiğe olduğu kadar dişlere de uygulanabilir (7). PPi'in apatit çözülmesi üzerine etkisi, çürüklerin önlenmesinde de fizyolojik bir mekanizma oluşturabilir (25).

Bütün bu araştırmalardan ve elde edilen sonuçlardan hareket ederek pirofosfata benzer etkileri olan ve in vivo kullanıldığında enzimatik hidrolize dirençli maddelerin araştırılmasına başlanmış ve sonunda bisfosfonatların aranan özellikleri içeren maddeler olduğu bulunmuştur. Bunlar pirofosfatlardaki P-O-P bağları yerine P-C-P bağları içermekte ve enzimatik hidrolize dirençli oldukları için hem oral hem de parenteral yolla verildiğinde bazı hastalıklardaki ektopik kalsifikasyon ve mineralizasyonu da önlemektedir. Bu maddelerden en çok kullanılanları 1-hidroksi-etiliden-1, 1-bisfosfonat (HEBP) ve diklorometilen bisfosfonat (Cl₂MBP)'dir. Kristal oluşması üzerine pirofosfat ve bisfosfonatların inhibe edici etkisi HEBP>PPi>Cl₂MBP sırası izlenmektedir (26,42).

Önceleri difosfonatlar olarak isimlendirilen bisfosfonatlar, in vitro kalsiyum tuzlarının davranışları üzerine pirofosfatların etkilerine çok benzer etkilere sahiptir. Böylece bu maddeler; a) kalsiyum fosfatın oluşmasını önler (27), b) amorf kalsiyum fosfatın hidroksiapatite dönüşmesini engeller (10,27,31), c) apatit kristallerinin kümeler halinde toplanmasını geciktirir (6,31,37), d) apatit kristal kümelerini parçalayarak kristallerin kolloidal duruma geçmesini sağlar (peptizasyon)

(6,42), e) kristallerin çözülmesini yavaşlatır (18,25). Kalsiyum fosfat üzerine etkilerine ek olarak kalsiyum oksalat kristallerinin oluşması ve kümelenmesine de engel olur (33,49).

Bisfosfonatların hidroksiapatit ve amorf kalsiyum fosfat üzerine yaptıkları etkinin yolu tam olarak bilinmiyor. Bunların kristalizasyon üzerine olası etkileri nükleasyonun önlenmesini kapsar ve sonraki kümelenme ve büyümeyi durdurur. Kalsiyum ve fosfatın oluşturduğu ilk kristal nükleuslarına bağlanır ve böylece bu küçük partiküllerin özelliklerini değiştirerek kristal büyümesi ve olgunlaşması gibi sonraki safhaları durdurur (50). Kristal çözülmesi üzerine etkileri de kristalin yüzey tabakalarına doğrudan bağlanmasıyla olabilir, böylece bunlar çözülmenin aktif olarak meydana geldiği yerlerin yapısını değiştirir ve kristalin çözünürlüğü azalır (64).

Bisfosfonatlar deneysel olarak meydana getirilen üriner taşlar (33) ve ektopik kalsifikasyon dahil yumuşak doku kalsifikasyonlarını da etkilemiştir (27,30,31), aynı zamanda sıçanlarda topik uygulamayla dıştaşı oluşumunu önemli derecede (11,29,32,59), çürük oluşmasını da %50 oranında (2) azaltmıştır.

Bisfosfonatlar sert dokuların normal mineralizasyonunu da engeller. HEBP deneysel koşullarda kemik (9,52,58), kırık (8,60) ve dentin (45,46) mineralizasyonunu önlemiştir. Gerekli dozlar; kullanılan fosfonatın türüne, hayvanın türüne, tedavinin süresine ve verilmiş yoluna göre değişim gösterir (43,52,61). Kemik üzerine olan mineralleşmeyi engelleme etkisi kırık üzerine olandan daha düşük dozlarda olur (8). Gelişmekte olan hayvanlarda iskeletsel lezyonların radyolojik görünüşleri D vitamini eksikliğiyle meydana gelenlere benzemektedir, ancak histolojik olarak; HEBP verilenlerde epifiz kırıkta olduğu hipertrofik hücrelerin sayısı fazla iken D vitamini eksikliğinde proliferen hücrelerin sayısı daha fazladır. Böylece kırıkta mineralizasyonunu engelleyerek epifiz plağının genişlemesine ve gelişim sırasında kemik şekillenmesinin bozulmasına neden olur (8,43,52,60). Ancak bu etkiler HEBP'nin verilmesi kesildikten sonra geriye döner (43,69). HEBP'nin yetişkin hayvanlardaki mineralizasyonu da önlediği görülür. Buna göre osteoid madde alanları genişler (43,61,69) ve kemik yapımı azalır (17,43,52,61). Osteoid maddenin yüksek dozlardaki artışının normalden çok kalsiyum ve fosfor alan hayvanlarda bile gözlenmesi (43) ve serumdaki kalsiyum ve fosfor düzeyinin yüksek olmasına kar-

şın, osteoid alan artışı (42) bisfosfonatların kristal üzerine olan etkilerini göstermektedir. Sıçan morallerinde yapılan bir çalışmada da predentindeki genişleme osteoid doku artışına benzetilmiştir (45). Buna karşılık bazı araştırmacılar da kristaller üzerine olan bu etkilerden başka HEBP'nin kemik hücrelerinin metabolizmasını da etkileyerek lizozomal enzim aktivitesinde azalma (17,19) ve hiperaktif osteoblast karakterinde atipik osteositler (58) ya da osteoblast sayısında azalma (52) gördüğünü bildirmişlerdir. Odontoblastlara ilişkin yapılan incelemelerde yüksek dozlarda bu hücreler içindeki veziküllerin granüler içerik kazanmalarıyla kollagen sentezinin hücre içi düzeyde bozulabileceği ileri sürülmüştür (45). Ancak Ikeye ve ark. (41) bisfosfonatların fetusta farklı kollagen tipleri üzerine etkilerini incelemişler ve bu maddelerin kollagen metabolizmasını da etkilediğini bildirmişlerdir. Bauer ve ark. (5) da HEBP'nin kemik hücrelerinin protein metabolizması üzerine doğrudan bir etkiye sahip olduğunu ve kemik matriksinin ince yapısını değiştirerek osteoindüktif aktiviteyi azalttığı görüşünü savunmuşlardır.

Minkin ve ark. (54) matris mineralizasyon derecesi ile osteoblastik aktivitenin regülasyonu ve indüksiyonu arasında bir ilişki olabileceğini ileri sürmüşler ve kemik oluşumunun etkilenmesinin bu yolla olabileceğini bildirmişlerdir. HEBP etkisinde in vitro (36) ve in vivo (58) olarak mitokondrion içindeki granüllerde artma olduğu görülmüştür. Buna göre HEBP mitokondrionlardan mineralleşme alanına kalsiyum iyonlarının pompalanmasını etkileyebilir. HEBP in vitro olarak lipid moleküllerinin düzenini ve yapısal özelliklerini değiştiren surfaktanlar gibi etki eder ve bu yolla dokudaki hücre ve matris vezikül membranlarını etkileyebilir (10).

Bisfosfonatların kristalleşme üzerine in vitro etkileri ile in vivo sert doku kalsifikasyonu arasında kesin bir bağlantı bulunamamıştır. Bazı bisfosfonatlar in vitro güçlü bir inhibitörken, in vivo düşük bir aktiviteye sahiptir. Örneğin; Cl_2MBP kristal büyümesi ve yumuşak doku kalsifikasyonu üzerine güçlü bir etkiye sahipken (27), kemik mineralizasyonu üzerine orta derecede bir etkisi vardır (21). Bu durum farklı dağılımlarından ya da kristal üzerine etkilerinden başka mekanizmalardan da olabilir (21,27,65).

Bisfosfonatlar daha düşük dozlarda (1 mg/kg/gün'den az) kristal çözünmesini inhibe eder ve etkileri $Cl_2MBP > HEBP > PPI$ sırasını izler

(26). Çözünmeyi engelleyerek rezorpsiyonu önler ve kemik turnoverini azaltır (52,56,60,61). Cl_2MBP alveol kemiğinde rezorpsiyonu engelleyerek ankiloza neden olur (60). Immobilizasyonla meydana getirilen osteoporoz (28) ve PTH gibi (27,54) çeşidi ajanlarla oluşturulan kemik rezorpsiyonunu önler. "Rice" türü sıçanlardaki periodontal destrüksiyonu da önlemiştir (47), yine sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda sistemik ve lokal olarak uygulanan bisfosfonatların ortodontik tedaviler sırasında alveolar kemik ve kök rezorpsiyonunu engelleyerek istenmeyen diş hareketlerinin önlenmesinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (1,40). Ancak düşük kalsiyum diyetiyle meydana getirilen rezorpsiyon üzerine etkili değildir (55).

Bisfosfonatların rezorpsiyon üzerine düşük dozlardaki bu etkileri sadece kristaller üzerine fiziko-kimyasal etkilerinden değildir. Örneğin, HEBP bazen osteoklastlarda vakuollerde azalma (52), kırışık kenarların büzülmesi (58) ya da ortadan kalkması (66), bazen de sayılarının ve nükleuslarının artması (52,53) ya da oldukça azalması (1,40) ve sitoplazmanın daha iri olması (52,62) gibi değişmelere neden olur. Ayrıca bu hücrelerin aktivitelerini (12,14,65) ve çoğalmalarını (39) engeller, protein sentezinin önemli derecede azalmasına neden olur (12). Böylece bu madde osteoklast metabolizmasını da etkiler. Bir başka görüşe göre de HEBP kemikten serbesdeşen kristallerle birlikte fagosite olarak osteoklastların sekonder lizozomlarında çözülür ve orada yoğunlaşarak asit hidrolazları etkisiz duruma getirir (19,65) ya da membran fonksiyonunu bozarak ve iyonlara karşı geçirgenliğini artırarak metabolizmayı etkileyebilir (20,66). Doku kültürlerinde rezorpsiyonu inhibe edici etkisi bu yollarla da açıklanmaya çalışılmıştır.

Bisfosfonatlar insanlarda klinik olarak da çeşidi amaçlarla kullanılmaktadır. ^{99m}Tc -metilen bisfosfonat nuklear tıpta tanı amacıyla (48) ve yüksek kemik turnoverli metabolik kemik hastalıklarında (34) iskelet marker'ları olarak kullanılmıştır. HEBP bazı hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır. Ektopik yumuşak doku kireçlenmelerinde (71) ve myositis ossificans'ta ektopik kemik oluşumu HEBP ile birkaç gün içinde gerilemiştir (4). Kalsinosis universalis'te de kalsifikasyonun gerilediği görülmüştür (16).

Kristallerin çözünmesini engellediği için ke-

mik yıkımını önlemek amacıyla terapötik olarak kullanılmaktadır. Bu alanda en önemli uygulamayı kemik turnoveri ile karakterize Paget's hastalığında yeni kemik yapımı ve rezorpsiyonunu durdurarak iyileşme meydana getirmesi oluşturur (15,21,38). Yine son yıllarda bisfosfonatlar postmenopozal osteoporozun tedavisinde kullanılmaktadır. Tedavi sonrası kemikte mineral yoğunluğunda önemli derecede artış saptanmıştır. Yan etkileri yok denecek kadar azdır (68,70).

Diş Hekimliği alanında da yapılan klinik çalışmalarda HEBP mine yüzeyi üzerinde koruyucu bir film oluşturarak etkin bir diffüzyon bariyeri sağlar ve diştışı oluşmasını önler (26,56). Belirli oranlarda HEBP içeren ağız yıkayıcı solüsyonlar ve diş macunları da çürükten koruyucu etkisi nedeniyle bazı ülkelerde kullanılmaktadır (44,57).

İnce barsaklardan emilen bisfosfonatların yaklaşık %50'si vücut tarafından tutulur, geri kalanı hızla idrardan atılır. Tutulan bisfosfonatın hemen tümü sert dokularda birikir, çok azı yumuşak dokularda bulunmuştur. Bir başka deyişle bu maddeler dişler ve kemikler için birer hedef organdır (51).

Toksikolojik çalışmaların çoğu hayvanlar üzerinde genellikle HEBP ile yapılmıştır. Birçok hayvan türlerinde akut, subakut ve kronik olarak uygulandığında çok az bir toksisiteye sahiptir. Heterojenik, mitojenik ve karsinojenik testler negatiftir. En önemli etkileri kemik ve kırıldak mineralizasyonunun inhibisyonudur. Bisfosfonatlar insanlarda da hayvanlardaki gibi çok az önemli yan etkilere sahiptir. Çok uzun süreli ve yüksek dozlarda uygulanan tedavi kemik turnoverinin sürekli azalmasıyla kemik kırıklarına neden olur (21).

Bisfosfonatların sert dokular üzerine etki mekanizmalarının tam olarak açıklığa kavuşmaması ve uygulanan çeşidi deneylerde türe, yaşa, tedavinin süresine, veriliş yoluna ve kemiğin durumuna göre değişik dozlarda etki etmesi ve bisfosfonatın türüne göre farklı derecelerde etkilerin ortaya çıkması klinikteki kullanım alanlarını kısıtlamaktadır. Bu alanda daha ileri araştırmalar sürdürülmektedir.

Bisfosfonatlar kemik oluşumu ve rezorpsiyonu mekanizmalarını incelemede uygun bir araç ve sert dokularda pirofosfatın etkilerini incelemek için uygun bir model olabilir.

KAYNAKLAR

1. Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of topical administration of a bisphosphonate (Risedronate) on orthodontic tooth movements in rats. *J Dent Res* 1994; **73**: 1478-84.
2. Anbar M, St John GA, Elward TE. Organic polymeric polyphosphonates as potential preventive agents of dental caries: In vivo experiments. *J Dent Res* 1974; **53**: 1240-4.
3. Anbar M, St John GA, Scott AC. Organic polymeric polyphosphonates as potential preventive agents of dental caries: In vitro experiments. *J Dent Res* 1974; **53**: 867-8.
4. Bassett GAL, Donath A, Macagno F, Preisig R, Fleisch H. Diphosphonates in the treatment of myositis ossificans. *Lancet* 1969; **2**: 845.
5. Bauer FCH, Nilsson OS, Tornkvist H, Lindholm TC, Lindholm TS. Effect of diphosphonate on the osteoinductive activity of rat bone matrix. *Clin Orthop Rel Res* 1984; **185**: 266-9.
6. Bisaz S, Felix R, Hansen NB, Fleisch H. Disaggregation of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta* 1976; **451**: 560-6.
7. Bisaz S, Russell RGG, Fleisch H. Isolation of inorganic pyrophosphate from bovine and human teeth. *Arch Oral Biol* 1968; **13**: 683-96.
8. Bisaz S, Schenk R, Kunin AS, Russell RGG, Mühlbauer R, Fleisch H. The comparative effects of vitamin D deficiency and ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate administration on the histology and glycolysis of chick epiphyseal and articular cartilage. *Calc Tiss Res* 1975; **19**: 139-52.
9. Bloom W, Fawcett WD. The mechanism of calcification. In: A Textbook of Histology. 2nd ed. Philadelphia: W B Saunders Comp, 1972; 269-72.
10. Boskey AL, Goldberg MR, Posner AS. Effect of diphosphonates on hydroxyapatite formation induced by calcium-phospholipid-phosphate complexes. *Calc Tiss Intl* 1979; **27**: 83-8.
11. Briner WW, Francis MD, Widder JS. The control of dental calculus in experimental animals. *Int Dent J* 1971; **21**: 61-73.
12. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest* 1990; **85**: 456-61.
13. Cecchini MG, Felix R, Fleisch H, Cooper PH. Effect of bisphosphonates on proliferation and viability of mouse bone marrow-derived macrophages. *J Bone Min Res* 1987; **2**: 135-42.
14. Chambers TJ. Diphosphonates inhibit bone resorption by macrophages in vitro. *J Pathology* 1980; **132**: 255-62.
15. Chapuy MC, Briancon D, Vignon E, Durhon S, Meunier PJ. The short-term effects of intravenous EHDP in Paget's disease of bone. *Calc Tiss Intl* 1982; **34**: 29.
16. Cram RL, Barmada R, Ray RD. Diphosphonate treatment of calcinosis universalis. *N Engl J Med* 1972; **285**: 1012-3.
17. Doty SB, Jones R, Finerman GA. Diphosphonate influence on bone cell structure and lysosomal activity. *J Bone Joint Surg* 1972; **54A**: 1128-9.
18. Evans JR, Robertson WG, Morgan DB, Fleisch H. Effects of pyrophosphate and diphosphonates on the dissolution of hydroxyapatites using a flow system. *Calc Tiss Intl* 1980; **31**: 153-9.
19. Felix R, Russell RGG, Fleisch H. The effect of several diphosphonates on acid phosphohydrolases and other lysosomal enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1976; **429**: 429-38.
20. Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: Interactions between bisphosphonates, osteoclasts and bone. *Calcif Tiss Int* 1991; **49**: 407-15.
21. Fleisch H. Experimental basis for the use of bisphosphonates in Paget's disease of bone. *Clin Orthop Rel Res* 1987; **217**: 72-8.
22. Fleisch H, Bisaz S. Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Amer J Physiol* 1962; **203**: 671-5.
23. Fleisch H, Bisaz S. Mechanism of calcification: Inhibitory role of pyrophosphate. *Nature* 1962; **195**: 911.
24. Fleisch H, Bisaz S. The inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis. *Experientia* 1974; **20**: 276-7.
25. Fleisch H, Maerki J, Russell RGG. Effect of pyrophosphate on dissolution of hydroxyapatite and its possible importance in calcium homeostasis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966; **122**: 317-20.
26. Fleisch H, Russell RGG. Experimental and clinical studies with pyrophosphate and diphosphonates. In: Davids S, David eds. Calcium Metabolism in Renal Failure and Nephrolithiasis. *John Wiley and Sons, Inc.* 1977; 293-336.
27. Fleisch H, Russell RGG, Bisaz S, Mühlbauer RC, Williams DA. The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Europ J Clin Invest* 1970; **1**: 12-8.
28. Fleisch H, Russell RGG, Simpson B, Mühlbauer RC. Prevention by a diphosphonate of immobilization "osteoporosis" in rats. *Nature* 1969; **223**: 211-2.
29. Francis MD, Briner WW. The effect of phosphonates on dental enamel in vitro and calculus formation in vivo. *Calc Tiss Res* 1973; **11**: 1-9.
30. Francis MD, Flora L, King WR. The effects of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on adjuvant-induced arthritis in rats. *Calc Tiss Res* 1972; **109**: 21.
31. Francis MD, Russell RGG, Fleisch H. Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science* 1969; **165**:

1264-6.

32. Francis MD, Slough GL, Briner WW, Oertel RP. An in vitro and in vivo investigation of mellitate and ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate in calcium phosphate systems. *Calc Tiss Res* 1977; **23**: 53-60.

33. Fraser D, Russell RGG, Pohler O, Robertson WG, Fleisch H. The influence of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on the development of experimentally induced urinary stones in rats. *Clin Sci* 1972; **42**: 197-207.

34. Geusens P, De Vos P, Dequeker J. 24-hour Technetium-99m-methylene diphosphonate-retention in metabolic bone disease, with special reference to symptomatic idiopathic postmenopausal osteoporosis. *Calc Tiss Intl* 1981; **S33**: 138.

35. Glimcher MJ, Krane SM. The organization and structure of bone and mechanism of calcification. In: Ramachandran GN, Gould BS ed. Treatise on collagen. IIB Biology of Collagen. Academic Press, 1968.

36. Guiland DF, Sallis JD, Fleisch H. The effect of two diphosphonates on the handling of calcium by rat kidney mitochondria in vitro. *Calc Tiss Res* 1974; **15**: 303-14.

37. Hansen NB, Felix R, Bisaz S, Fleisch H. Aggregation of hydroxyapatite crystals. *Biochim Biophys Acta* 1976; **451**: 549-59.

38. Harinck HIJ, Bijvoet OLM, Blanksma HJ, Dahlinghaus-Nienhuys PJ. Efficacious management with aminobisphosphonate (APD) in Paget's disease of bone. *Clin Orthop Rel Res* 1987; **217**: 79-84.

39. Hughes DE, Mac Donald BR, Russell RGG, Gowen M. Inhibition of osteoclast-like cell formation by bisphosphonates in long-term cultures of human bone marrow. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1930-5.

40. Igarashi K, Mitani H, Adachi H ve Shinoda H. Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate on tooth movements in rats. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 1994; **106**: 279-89.

41. Ikeo T, Takaya T, Yamauchi K, Miwa M, Shioji I, Sakiyama Y. Effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on fetal mice during pregnancy. *J Osaka Univ* 1987; **21**: 45-53.

42. Jung A, Bisaz S, Fleisch H. The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals. *Calc Tiss Res* 1973; **11**: 269-80.

43. King WR, Francis MD, Michael WR. Effect of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate on bone formation. *Clin Orthop* 1971; **78**: 251-70.

44. Koch G, Bergmann-Ardodottir I, Bjarnason S, Finnbogason S, Höskuldsson O, Karlsson R. Caries-preventive effect of fluoride dentifrices with and without anticalculus agents: A 3-year controlled clinical trial *Caries Res* 1990; **24**: 72-9.

45. Larsson A. The short-term effects of high doses of ethylene-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate upon early dentin formation. *Calc Tiss Res* 1974; **16**: 109-27.

46. Larsson A, Larsson SE. Studies on dentinogenesis in the rat. Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) inhibits crystal growth in predentin calcification. *Virchows Arch Abt A Path Anat* 1973; **360**: 315-25.

47. Leonard EP, Reese WV, Mandel EJ. Comparison of the effect of ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate and dichloromethylene diphosphonate upon periodontal bone resorption in rice rats. *Arch Oral Biol* 1979; **24**: 707-8.

48. Mazess RB, Bendsen H, Dawros W. 99m Tc-diphosphonate retention by whole-body profile scanning. *Calc Tiss Intl* 1982; **S34**: 34.

49. Meyer JL, Lee KE, Bargert JH. The inhibition of calcium oxalate crystal growth by multidentate organic phosphonates. *Effect of pH*. *Calc Tiss Res* 1977; **28**: 83-6.

50. Meyer JL, Nancollas GH. The influence of multidentate organic phosphonates on the crystal growth of hydroxyapatite. *Calc Tiss Res* 1973; **13**: 295-303.

51. Michael WR, King WR, Wakim JM. Metabolism of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (disodium etidronate) in the rat, rabbit, dog and monkey. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; **21**: 503-15.

52. Miller SC, Jee WSS. Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) effects on growth and modeling of the rat tibia. *Calc Tiss Res*, 1975; **18**: 215-31.

53. Miller SC, Jee WSS, Kimmel DB, Woodbury L. Ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) effects on incorporation and accumulation of osteoclast nuclei. *Calc Tiss Res* 1977; **22**: 243-52.

54. Minkin C, Rabadjija L, Goldhaber P. Bone remodeling in vitro: The effects of two disphosphonates on osteoid synthesis and bone resorption in mouse calvaria. *Calc Tiss Res* 1974; **14**: 164-8.

55. Morgan DB, Gasser A, Largiader U, Jung A, Fleisch H. Effect of diphosphonate on calcium metabolism in calcium deprived rats. *Amer J Physiol* 1975; **228**: 1750-6.

56. Mühlemann HR, Bowles D, Schait A, Bernimoulin JP. Effect of diphosphonate on human supragingival calculus. *Helv Odont Acta* 1970; **14**: 31-3.

57. Nixon GA, Buehler EV, Newman EA. Preliminary safety assessment of disodium etidronate as an additive to experimental oral hygiene products. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; **22**: 661-71.

58. Plasman CMT, Jap PHK, Kuijpers W, Sloof TJJH. Influence of a diphosphonate on the cellular aspect of young bone tissue. *Calc Tiss Intl* 1980; **32**: 247-56.

59. Regolati B, Mühlemann HR. Effects of diphosphonate and fluoride on caries, fluorine content and dissolution of rat molars. *Helv Odont Acta* 1970; **14**: 37-43.

60. Reynolds JJ, Murphy H, Mühlbauer RC, Morgan DB, Fleisch H. Inhibition by diphosphonates on bone resorption in mice and comparison with greylethal osteopetrosis. *Calc Tiss Res* 1973; **12**: 59-71.

61. Rosenblum IY. The effects of disodium ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonate (EHDP) on mineral and orga-

nic components of rat bone. *Calc Tiss Res* 1974; 16: 239-50.

62. Rowe DJ, Hausmann E. The alteration of osteoclast morphology by diphosphonates in bone culture. *Calc Tiss Res* 1976; 20: 53-60.

63. Russell RGG, Bisaz S, Fleisch H, Currey HLF, Rubinstein HM, Dietz AA, Bouissina I, Micheli A, Fallet G. Inorganic pyrophosphate in plasma, urine and synovial fluid of patients with pyrophosphate arthropathy (chondrocalcinosis or pseudogut). *Lancet* 1970; 2: 899-902.

64. Russel RGG, Smith R. Diphosphonates. Experimental and clinical aspects. *J Bone Joint Surg* 1973; B55: 66-86.

65 Sahni M, Guenter HL, Fleisch H, Collin P, Martin TJ. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993; 91:2004-11.

66. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Radon GA. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991; 88: 2095-105.

67. Schibier D, Russell RGG, Fleisch H. Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D3 in rats. *Clin Sci* 1968; 35: 363-72.

68. Storm T, Thamsborg G, Steiniche T, Genant HK, Sørensen OH. Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1990; 322: 1265-71.

69. Tenenbaum HC, Torontali M, Sukhu B. Effects of bisphosphonates and inorganic pyrophosphate on osteogenesis in vitro. *Bone* 1992; 13: 249-55.

70. Watts NB, Harris ST, Genant HK, Wasnich RD, Miller PD, Jackson RD, Licata AA, Ross P, Woodson GC, Yanover MJ, Mysiw WJ, Kohse L, Rao MB, Steiger P, Richmond B, Chesnut CH. Intermittent cyclical etidronate treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1990; 323: 73-9.

71. Weinstein RS. Focal mineralization defect during disodium etidronate treatment of calcinosis. *Calc Tiss Intl* 1982; 34: 224-8.

Yazışma adresi:

Prof Dr Sevtap İnce

İ Ü. Diş Hek Fak

Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı

34390 Çapa - İstanbul