

← CEVAT TUĞRUL TURGUT

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**D VİTAMİNİ VE PRP İÇEREN BİYOUYUMLU
TAŞIYICILARIN SIÇAN KALVARYASINDA
OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

CEVAT TUĞRUL TURGUT

**DANIŞMAN
PROF. DR. MEHMET YALTIRIK**

**AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
AĞIZ, DIŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ
PROGRAMI**

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Cevat Tuğrul Turgut



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bugünlere gelmemdeki koşulsuz katkıları, hayatımın her anında arkamdaki güç olarak nitelendirdiğim anneme, babama ve kardeşime;

Yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca benimle tüm bilgilerini paylaşan ve her zaman destek olan, her konuda fikrini danıştığım, bana hayat için ve mesleki olarak vizyon katan, üzerimdeki emeği asla göz ardı edemeyeceğim, ailemden biri olarak görmekte olduğum tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK'a

Tez çalışmam boyunca tüm yönlendirmelerinden dolayı eşsiz minnetlerimi sunduğum, bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi adına verebileceği tüm desteği veren, her türlü problemin çözümü için emek harcayan, bu sürecin olması gerektiği gibi ilerlemesini sağlayan Sayın Prof. Dr. Alper OKYAR'a, Sayın Prof. Dr. Yıldız ÖZTÜRK'e, Sayın Prof. Dr. Sevgi GÜNGÖR'e, Sayın Prof. Dr. Beyhan ÖMER'e, Sayın Prof. Dr. Bülent AHISALI'ya, Sayın Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN'a, Sayın Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Tuğba KOTİL'e, Sayın Dilek ÖZTÜRK'e, tez izleme jürimde yer alan hocalarım Sayın Prof. Dr. Refia Deniz FIRAT'a ve Sayın Prof. Dr. Barış Çağrı DELİLBAŞI'na, hayvan deneyi sürecindeki desteklerinden ötürü İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Araştırma Birimi çalışanlarına ve birim sorumlusu Sayın Vet. Hek. Hülya SANCI'ya, mikrotomografik çalışma için imkânlarını sunan İstanbul Üniversitesi TTM ekibine, bu tarama ve analizlerde yardımcı olan Sayın Müh. Göker KÜLÜŞLÜ'ye, biyokimyasal çalışma için imkânlarını sunan İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı ekibine, deneyin bu aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Lab. Emre İNAN'a, tez çalışmamda kullanılan malzemelerin temininde yardımlarını sunan Epifarma Kimyasal ve Tıbbi Ürünler Paz. San. Tic. LTD. ŞTİ'ne ve Ahmet UĞURLU'ya,

Doktora programı döneminde desteklerini gördüğüm sayın Prof. Dr. Çetin KASAPOĞLU'NA, mesleki yönlendirmelerine ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan, yardımlarını, tecrübe paylaşımlarını hiçbir koşulda eksik etmeyen, arkamda bir güç olarak hissettiğim ve hissedeceğim Sayın Doç. Dr. Mehmet Ali ERDEM'e, Sayın Doç. Dr. Abdulkadir Burak ÇANKAYA'ya,

Mesleki tecrübelerini her koşulda aile ortamındaymış gibi paylaşan, lisans ve yüksek lisans dönemimden beri yanımda olan Dr. Alen PALANCIOĞLU'na, Dr Abdülsamet KUNDAKÇIOĞLU'na, , Dr. Metin BERK KASAPOĞLU'na, 2008'den beri ailem kadar vakit paylaştığım, zorlu üniversite hayatımızda birbirimize destek verdiğimiz, aramızdaki bağın hiçbir dönemde kopmayacağı kardeşlerim Dr. Edip ÖZDEN'e, Dr. Mustafa PEKMEZCİ'ye ve Dr. Hakan YILMAZ'a

Lisans hayatımın son döneminden itibaren hemen her konuda bilfiil paylaşımda bulunduğum Dr Melek KOLTUK'a, tez deney sürecindeki ekipman katkısı ile desteklerini ileten TBU Dental A.Ş. müdürü Sunay ADEM'e ve bu süreçte beni koşulsuz destekleyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne vermiş olduğu destekten dolayı teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25572

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XV
ÖZET	XXİ
ABSTRACT.....	XXİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Doku.....	4
2.1.1. Kemik Tipleri.....	7
2.1.2. Kemik Yapısı	9
2.1.2.1. Woven (örgü) Kemik: Primer Kemik Dokusu	9
2.1.2.2. Lamellar Kemik	10
2.1.3. Kemik İç Yapısı	14
2.1.4. Kemik Hücreleri.....	17
2.1.4.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	18
2.1.4.2. Osteoblast Hücreleri.....	18
2.1.4.3. Osteoklast Hücreleri.....	19
2.1.4.4. Osteosit Hücreleri.....	21
2.2. Kemik Dokusunun Oluşumu ve Gelişimi	22
2.2.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu.....	22
2.2.2. Endokondral Kemik Oluşumu	24
2.3. Kemik Yapım-Yıkım Mekanizması.....	26
2.4. Kemikğin Şekillenmesi.....	27
2.5. Kemik Defektleri	27
2.6. Kırık İyileşmesi.....	30

2.6.1. Primer Kemik İyileşmesi	30
2.6.1.1. Tam Temasla (kontakt) İyileşme	31
2.6.1.2. Boşlukla (gap) İyileşme	31
2.6.2. Sekonder Kemik İyileşmesi	32
2.6.2.1. Başlangıç Fazı (Hematoma Fazı)	32
2.6.2.2. Kırıkta Kallus Fazı	37
2.6.2.3. Kemik Kallus Fazı	37
2.6.2.4. Yeniden Şekillenme Fazı	38
2.7. Kemik Yapım Yıkım Metabolizmasını Değiştiren Faktörler	39
2.7.1. Kemik Hücre İşlevlerini Düzenleyen Sistemik Faktörler	39
2.7.1.1. Paratiroid Hormon (PTH) ve Kalsitonin	39
2.7.1.2. Steroid Reseptörleri, Glukokortikoidler, Östrojen ve Androjen	40
2.7.1.3. Somatotrop Hormonu	42
2.7.2. Yerel Düzenleyici Faktörler	42
2.7.2.1. Prostaglandinler	42
2.7.2.2. Büyüme Faktörleri	42
2.7.2.3. TGF β (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)	42
2.7.2.4. FGF (Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü)	43
2.7.2.5. PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)	43
2.7.2.6. Somatostatin	44
2.7.2.7. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)	44
2.7.2.8. CDGF (Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü)	45
2.7.2.9. ECDGF (Endotelial Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörü)	45
2.7.2.10. BMP (Kemik Morfojenik Protein)	45
2.8. Kemik Yapım Yıkım Mekanizmasının Bozulduğu Durumlar	46
2.8.1.1. Osteoporoz	46
2.8.1.2. Osteopetroz	47
2.8.1.3. Paget Hastalığı	47
2.9. Kemik Defektlerinde ve Kırıklarında Kullanılan Greftler	48
2.9.1. Otojen Greftler	50
2.9.2. Allogreftler	50
2.9.3. Kseno Greftler (Heterojen Kemik Grefti)	51
2.9.4. Alloplastik Greftler	51

2.10. Trombositler.....	51
2.10.1. İyileşme Aşamaları	54
2.10.2. Yara İyileşmesi Mekanizmaları	55
2.10.2.1. Primer İyileşme	55
2.10.2.2. Sekonder İyileşme	56
2.10.2.3. Tersiyer İyileşme.....	56
2.11. Trombosit Kaynaklı Faktörler.....	57
2.11.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)	57
2.11.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)	58
2.11.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF)	58
2.11.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	59
2.11.5. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....	59
2.11.6. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	59
2.11.7. ADP VE ATP	60
2.11.8. Anjiopoetin-2	60
2.11.9. Faktör-V, XI, XIII, Fibrinojen, Von Willebrand Faktör	60
2.11.10. Serotonin	60
2.11.11. Fibronektin (Fn)	60
2.11.12. Osteokalsin (Oc)	60
2.12. Trombositten Zengin Plazma	61
2.13. Trombositten Zengin Fibrin	65
2.14. Trombosit Kaynaklı Kan Konsantratlarının Sınıflandırılması.....	69
2.14.1. Saf Trombositten Zengin Plazma (S-TZP):	69
2.14.2. Lökosit ve Trombositten (plateletten) Zengin Plazma (L-TZP)	69
2.14.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (S-TZF)	70
2.14.4. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (Choukroun'un TZF'si) (L-TZF)	71
2.14.5. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-PRF).....	71
2.14.6. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (I-PRF)	71
2.14.7. Titanyum Trombositten Zengin Fibrin (T-PRF) (T-TZF)	72
2.14.7.1. Konsantre Büyüme Faktörü (CGF).....	72
2.15. PRP Tedavisinin Kontraendikasyonları ve Yan Etkileri	72
2.16. D Vitamini	74
2.16.1. D Vitamini Metabolizması.....	82

2.16.2. D Vitamini ile Kemik Metabolizması Arasındaki İlişki	87
2.16.3. D Vitamininin Osteoblast ve Osteoklastlar Üzerindeki Etkileri	91
2.17. D Vitamini ve Ağız Sağlığı.....	95
2.18. K Vitamini	96
2.19. D Vitamini ile Genel Sağlık Arasındaki İlişki	97
2.20. D Vitamini Eksikliği Önleme ve Tedavi Yaklaşımı	98
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	102
3.1. Kemik Defekti Oluşturulması ve Kalsitriol, PRP ve Kitozanın Defekt Alanına Uygulanması	102
3.1.1. PRP Elde Edilmesi	108
3.1.2. Kitozan ve Kalsitriol Hazırlanması ve Seçilmesi	108
3.2. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Örneklerin Temini	113
3.3. Mikrotomografilerin Alınması.....	115
3.4. Histolojik ve İmmunhistokimyasal Çalışma ve Değerlendirme	118
3.4.1. Doku Preperasyonu	118
3.4.2. İmmunhistokimya Çalışması ve Değerlendirme.....	118
3.5. Biyokimyasal Analiz.....	119
3.6. İstatistiksel Analiz.....	119
4. BULGULAR.....	121
4.1. Mikrotomografi Bulguları.....	121
4.2. Histolojik ve İmmunhistokimyasal Bulgular	137
4.2.1. Histolojik Değerlendirme Bulguları.....	137
4.2.2. İmmunhistokimyasal Analiz Bulguları	138
4.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	148
4.4. İstatistiksel Bulgular	154
5. TARTIŞMA	155
KAYNAKLAR	174
ETİK KURUL KARARI	212
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	214
ÖZGEÇMİŞ	215

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: D vitamininin prekürsörleri ve metabolitlerinin terminolojisi.....	85
Tablo 3-1: İnsan yılı ile değişik gelişim dönemindeki sıçan günlerinin karşılaştırılması (361).....	112
Tablo 3-2: Sıçan yaşı vs insan yaşı: sosyal olgunluk dönemi (361).....	112
Tablo 3-3: Çalışma grupları-sıçan sayısı	114
Tablo 4-1: Gruplara ait kemik mineral yoğunluğu sayısal değerleri	122
Tablo 4-2: Gruplara ait kemik hacmi sayısal değerleri.....	123
Tablo 4-3: Gruplara ait doku alanı sayısal değerleri.....	124
Tablo 4-4: Gruplara ait kemikleşme miktarı sayısal değerleri	125
Tablo 4-5: Gruplara ait trabeküler kalınlık sayısal değerleri	126
Tablo 4-6: Gruplara ait kesişim yüzeyi sayısal değerleri	127
Tablo 4-7: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemikleşme yüzdesi değerlerinin karşılaştırılması.....	128
Tablo 4-8: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemik hacmi değerlerinin karşılaştırılması	130
Tablo 4-9: Kitozan, PRP ve kitozan + PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdesi değerlerinin karşılaştırılması.....	131
Tablo 4-10: Kalsitriol + kitozan, kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemik hacim değerlerinin karşılaştırılması.....	133
Tablo 4-11: PRP ve PRP + kitozan gruplarının kemik hacmi değerlerinin karşılaştırılması.....	134
Tablo 4-12: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarının kemik mineral yoğunluğu değerlerinin karşılaştırılması	135
Tablo 4-13: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdesi değerlerinin karşılaştırılması	136
Tablo 4-14: RANK, FGF23 ve VDR antikorlarının görevleri (özet)	138
Tablo 4-15: RANK antikorunun immunohistokimyasal bulguları	140
Tablo 4-16: FGF23 antikorunun immunohistokimyasal bulguları	142
Tablo 4-17: VDR antikorunun immunohistokimyasal bulguları	144
Tablo 4-18: FGF23 antikoruna ait immunohistokimyasal boyamalar	145

Tablo 4-19: RANK antikoruna ait immunhistokimyasal boyamalar	146
Tablo 4-20: VDR antikoruna ait immunhistokimyasal boyamalar	147
Tablo 4-21: D vitamini ve ağırlık ortalama değerleri	150
Tablo 4-22: Grupların 1. ve 2. haftalardaki başlangıç ve deney sonu D vitamini, PTH ve ağırlık değerleri.....	152
Tablo 4-23: Grupların 4. ve 8. haftalardaki başlangıç ve deney sonu D vitamini, PTH ve ağırlık değerleri.....	153



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kemik yapısı (195, 305).....	5
Şekil 2-2: Kemik tipleri (26).....	8
Şekil 2-3: Woven (örgü) ve lamellar kemik (341).....	9
Şekil 2-4: Kemik içindeki tanımlamalar (uzun kemik) (305).....	13
Şekil 2-5: Kompakt ve süngerimsi kemiklerin şematik diyagramı. Haversian kanallarının çevresinde çevresel kemik lamellerinden oluşan osteoklardan oluşan kompakt kemiği ve rastgele düzenlenmiş kemik trabeküllerinden oluşan süngerimsi veya süngerimsi kemiği gösteren uzun kemiğin çapraz ve boyuna kesitleri için şematik diyagram. www.training.seer.cancer.gov / National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, with Emory University, Atlanta SEER Cancer Registry, Atlanta, Georgia'dan alınmıştır (356).....	14
Şekil 2-6: Kemik iç yapısı (334).....	15
Şekil 2-7: Spongioz kemik (26).....	17
Şekil 2-8: Kemik hücreleri (26).....	18
Şekil 2-9: Kemik hücreleri; osteoblast, osteosit, osteoklast (402).....	22
Şekil 2-10: Kemik yapım, yıkım döngüsü (57)	27
Şekil 2-11: Kırık iyileşmesi (15)	36
Şekil 2-12: Transmisyon elektron mikroskopunda gözlenen insan trombosit hücresi. Salınan birçok granül (Gr), birkaç yoğun (delta) granül (DB), açık kanaliküler sistem (OCS), yoğun (delta) tübüler sistem (DTS). Glikojen (Gly), mitokondri (Mi), mikrotübüllerin sirkumferensiyal bandı (MT) (124)	52
Şekil 2-13: Trombositten zengin plazma şeması (178)	64
Şekil 2-14: D vitamininin kimyasal formülasyonu (294).....	76
Şekil 2-15: D vitamininin üretimi (68)	84
Şekil 3-1: Cerrahi alana bakış; kalvaryal tam kalınlıklı flap kaldırılmasının ardından karşılaşılan cerrahi alan (a), cerrahi alanın steril örtü ile örtülmesinin ardından trephan frez ile defekt oluşturulması (b).....	104
Şekil 3-2: Frezler; cerrahi işlem sırasında kullanılan meisigner trephan frez seti (a), 5 ve 10 mm 'lik meisigner trephan frezler (b).....	105
Şekil 3-3: Denek hayvanlarında defekt oluştururken uygulanan işlemler; cerrahi alanın traşlanması (a), cerrahi alana işlem öncesinde antiseptik ajanın tatbiki (b), tam kalınlıklı	

flap kaldırılması (c), 5 mm’lik Meisigner trephan frezle kemik defekti oluşturulması (d), kalvaryal kemikte defekt alanı (e), 5 mm’lik kalvaryal kemik defekti (f), cerrahi alanın anatomik olarak primer kapatılmasının ve antiseptik ajan tatbik edilmesinden sonraki görüntüsü (g).....	106
Şekil 3-4: Sakrifikasyon sonrası kalvaryal kemik alanı: 10 mm çaplı trephan frez uygulamasının ardından kalvaryal kemikte elde edilen defekt hattı (a), 10 mm çaplı trephan frez uygulamasının ardından kalvaryal kemikten çıkarılmış defekt (b)	114
Şekil 3-5: Defekt alanının mikrotomografik görüntüsü.....	115
Şekil 3-6: Defekt alanının kesit görüntüsü	116
Şekil 3-7: Defekt bölgesinde yeni oluşan doku etrafında ROI (region of interest) belirlenmesi.....	117
Şekil 3-8: Defekt bölgesinde yeni oluşan doku etrafında belirlenmiş ROI (region of interest)	117
Şekil 4-1: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemikleşme yüzdelerinin karşılaştırılması (%)	129
Şekil 4-2: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemik hacim değerlerinin karşılaştırılması	130
Şekil 4-3: Kitozan, PRP ve kitozan + PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdelerinin karşılaştırılması (%).....	132
Şekil 4-4: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemik hacimlerinin karşılaştırılması.....	134
Şekil 4-5: PRP ve kitozan, PRP gruplarına ait kemik hacim değerlerinin karşılaştırılması	134
Şekil 4-6: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemik mineral yoğunluklarının karşılaştırılması	135
Şekil 4-7: Kalsitriol, kitozan ve kalsitriol, kitozan, PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdelerinin karşılaştırılması	137
Şekil 4-8: Başlangıç ve deney sonu D vitamini ortalama değerleri.....	151
Şekil 4-9: Başlangıç ve deney sonu ortalama ağırlık değerlerinin karşılaştırılması.....	151

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

1,25 (OH)₂D: 1,25 dihidroksivitamin D

1,25(OH)₂D₃: 1,25 dihidroksivitamin D - D vitamini aktif metaboliti – kalsitriol

1,25(OH)D₂ D₃: 1,25 dihidroksivitamin D₂ vitamin D₃

25(OH)D: Kalsidiol

3 B TETLAB: İstanbul Üniversitesi Teknoloji Transfer Merkezi - 3 Boyutlu Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarı

7DHC: Pro vitamin D₃

ACD-A: Asit sitrat dekstroz,

ACS: Absorbable collagen sponge (absorbe kollajen sünger)

ADP: Adenozindifosfat

α: Alfa

A-PRF: Advanced PRF (gelişmiş trombositler zengin fibrin)

AR: Androjen reseptörü (NR3C3)

ATF4: Activating transcription factor 4 (aktive edici transkripsiyon faktörü 4)

ATP: Adenozintrifosfat

β: Beta

BC: Blood clot (kan pıhtısı)

BC: Buffy coat (lökosit ve trombositlerin çoğunu içeren orta tabaka)

BCP: Biphasic calcium phosphate (bifazik kalsiyum fosfat)

BCPG: Biphasic calcium phosphate ceramic (bifazik kalsiyum fosfat seramik)

BG: Bone graft (otojen kemik grefti)

BMP: Bone morphogenic protein (kemik morfojenik protein)

BRONJ Biphosphonate-related osteonecrosis of jaws (bisfosfonat kaynaklı çene kemiği osteonekrozu)

BS: Bone surface (kemik yüzeyi)

BV: Bone volume (Kemik hacmi)

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: Hydroxyapatite (hidroksiapatit)

Canaliculi: Kanalikül

CD34: CD34; insanlarda, farelerde, sıçanlarda ve diğer türlerde CD34 geni tarafından kodlanan bir zar ötesi fosfolipoprotein proteindir.

CD4: CD4, T yardımcı hücreleri, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir.

CD8: CD8, T hücresi reseptörü için bir yardımcı reseptör görevi gören bir zar ötesi glikoproteindir.

CDGF: Cndroblast derived growth factor (kondroblast kökenli büyüme faktörü)

CDHA: Calcium deficient hydroxyapatite (kalsiyum barındırmayan hidroksiapatit)

CGF: Consantrated growth factor (konsantre büyüme faktörü)

Col: Kollajen

CRP: C-reactive protein (c-reaktif protein)

CTGF: Connective tissue growth factor (bağ dokusu büyüme faktörü)

Cutting cone: Kesici konik uç

CYP27B1: Cytochrome P27B1 (sitokrom P27B1)

DBP: Vitamin D binding protein (D vitamini bağlayan proteinler)

D₃: Kolekalsiferol

DBB: Deproteinized bovine bone (deproteinize sığır kemik grefti)

DBBSR2: Deproteinized bovine bone strontium (deproteinize sığır kemik grefti stronsiyum)

dk: Dakika

ECDGF: Endotelial cell derived growth factor (endotelial hücre kaynaklı büyüme faktörü)

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

EGF: Epidermal growth factor (epidermal büyüme faktörü)

Endosteum: Endost

ER: Östrojen reseptörü (NR3A1-2)

Ff: Fibrinojen

FGF23: Fibroblast growth factor (fibroblast kaynaklı büyüme faktörü – fibroblast büyüme faktörü)

FGFR: Fibroblast growth factor receptor (fibroblast kaynaklı büyüme faktörü ve reseptörü)

Fn: Fibronektin

GAG: Glikozaminoglikan

Gap junction: Küçük boşluk bağlantıları

Gly: Glikojen

GR: Glukokortikoid reseptörü (NR3C1)

H⁺: Artı yüklü hidrojen iyonu

HAP: Hidroksiapatit

HCPOM: Termosensitif hidrojel greft (ısıya duyarlı hidrojel greft)

HGB: Hidrojinin yüklü olduğu BCP sünger iskele

IgE: Immunglobulin E

IGF: Insulin like growth factor (insulin benzeri büyüme faktörü)

IL: Interleukin (interlökin)

ILR: Interleukin receptor (interlökin reseptörü)

I-PRF: Injectable platelet rich fibrin (enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin)

IU: International ünit (uluslararası birim)

i.m.: Intramuscular

İÜDETAE: İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İÜEDEHAB: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Araştırma Birimi

K₁: Fillokinon

K₂: Menakinon

kDa: Kilodalton

KMY: Kemik mineral yoğunluğu

L-PRF: Leucosyt – platelet rich fibrin (lökosit içerikli trombosit zengin fibrin)

L-TZF: Lökosit ve trombosit zengin fibrin (Choukroun'un TZF'si)

L-TZP: Lökosit ve trombosit zengin plazma

MBGC: Sığır kaynaklı kollajen membran

M-CSF: Macrophage colony stimulating factor (makrofaj koloni stimüle edici faktör)

μ: Micro (mikro)

μg: Mikrogram

μL: Mikrolitre

Mi: Mitokondri

ml: Mililitre

MMP: Matriks metalloproteinaz

MR: Mineralokortikoid reseptörü (NR3C2)

MT: Mikrotübüllerin sirkumferensiyal bandı

National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Ulusal Kanser Enstitüsü'nün Gözetimi, Epidemiyolojisi ve Son Sonuçları

ng: Nanogram

nmol: Nanomol

oC: Santigrat derece

OCN: Osteocalcin (osteokalsin)

OH: Oksihidrojen

On: Osteonectin (osteonektin)

OPG: Osteoprotegerin

OPN (Opn): Osteopontin

Osteitis fibroza: Vonrecklinghausen hastalığı

PDAF: Platelet derived angiogenesis factor (trombosit kaynaklı anjiogenez faktörü)

PDGF: Platelet derived growth factor (trombosit kaynaklı büyüme faktörü)

Periosteum: Periost

PF4: Platelet Factor 4 (trombosit faktör 4)

PGLA: Poliglikolaktid

PMNL: Polimorfo nuclear leukocytes (polimorf nükleer lökosit)

PPP: Platelet poor plasma (trombositten fakir plazma – TFP)

P-PRP: Pure platelet rich plasma (saf prp)

PR: Progesteron reseptörü (NR3C3)

PRF: Platelet rich fibrin (trombositten zengin fibrin - TZF)

PRFG: Autologous platelet rich fibrin glue (otojen trombosit zengin fibrin yapıştırıcı)

PRP: Platelet rich plasma (trombositten zengin plazma - TZP)

PTH 1-34: Teriparatide

PTH: Paratroid hormon

PTH1R: Paratiroid hormonu ile ilgili protein PTHrP reseptörü

PTHrP: Paratiroid hormonu ile ilgili protein

R: Rotor merkezinden tüp içi örneğe olan santimetre cinsinden yarıçap

RANK: Reseptör aktivatör nükleer kappa β

RANKL: Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (nükleer faktör kappa- reseptör aktivatörü β ligand)

RCF: Relative centrifugal field (görece santrifüj alanı)

Remodelling: Yeniden şekillenme

ROI: Region of interest (ilgi bölgesi)

RPM: Repeat per minute (dakikadaki tur sayısı)

Runx2: Runt-related transcription factor 2

S: Dönüş/dakika

SP7: Osterix

SPF: Sun protection factor (güneş koruma faktörü)

S-TZP: Saf trombosit zengin plazma

SVF: Adipose tissue stromal vascular fraction (adipoz doku stromal damarsal fraksiyon)

T skoru: Kemik mineral yoğunluğu analizinde standart sapmayı gösteren değer

TBM: Total bone marrow (total kemik iliği) (tam içerikli kemik iliği)

TCIRG1: Proton ATPaz 116 kDa alt birimi bir izoform 3, insanlarda TCIRG1 geni tarafından kodlanan bir enzimdir.

TCP: β trikalsiyum fosfat

TGF: Transforming growth factor (transforme edici büyüme faktörü - dönüştürücü büyüme faktörü)

TGF β : Transforming growth factor β (transforme edici büyüme faktörü beta - dönüştürücü büyüme faktörü beta)

TNF: Tumor necrotizing factor (tümör nekrotizan faktör)

TNF α : Tumor necrotizing factor α (tümör nekrotizan faktör alfa)

TNFR: Tumor necrosis factor receptor (tümör nekrotize edici faktör)

T-PRF Titanium platelet rich fibrin (titanyum trombosit zengin fibrin)

TSP-1: Trombospondin-1

UVB: Ultraviole B ışını

VDR: Vitamin D receptor – D vitamini reseptörü

VEGF: Vasküler endotelyal growth factor (vasküler endotelyal büyüme faktörü)

Vn: Vitronektin

VPF: Vascular permeability factor (vasküler geçirgenlik faktörü)

vWF: von Willabrand factor

WH: Whitlockite $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6\text{PO}_3\text{OH}$ (özel kalsiyum fosfat seramik)

Woven kemik: Örgü kemik

γ : Gamma (gama)

ZnHA: Çinko hidroksiapatit (çinko hidroksiapatit)



ÖZET

Turgut CT. D Vitamini ve PRP İçeren Biyouyumlu Taşıyıcıların Sıçan Kalvaryasında Oluşturulan Kemik Defektleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş ve Çene Hastalıkları ve Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2020.

Bu çalışmanın amacı D Vitamini ve PRP İçeren Biyouyumlu Taşıyıcıların Sıçan Kalvaryasında Oluşturulan Kemik Defektleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması olup çalışmamızda kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan, iyileşmesi için biyouyarıcı materyallere ihtiyaç duyan kalvaryal defektlerde PRP (platelet rich plasma) (trombositten zengin plazma) ve biyomateryallerin bilinen olumlu etkilerini, kemik gelişimini hızlandırıcı etkisi olan D vitamini ekleyerek histopatolojik, radyolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırmalı bir şekilde araştırmayı planladık.

Çalışmada 52 adet erkek Sprague Dawley sıçan kullanılmış PRP elde etmek için kullanılan 4'ü hariç tümüne 5 mm'lik kemik defekti oluşturulup, sıçanlar rastgele 6 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu, kitozan grubu, kitozan+PRP grubu, PRP grubu, kalsitriol+kitozan grubu, kalsitriol+kitozan +PRP grubu. Sıçanlar eşit sayılarda 1., 2., 4., ve 8. haftalarda sakrifiye edilerek kalvaryal defektleri ve kanları incelenmiştir. Yeni oluşan kemik histopatolojik, mikrotomografik, makroskopik olarak kanlarda da biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir; immunhistokimyasal analizle FGF23, VDR, RANK ekspresyonu incelenmiştir.

Mikrotomografik değerlendirmelerde kalsitriolün ekli olduğu gruplarda diğer gruplara göre kemikleşme miktarı, kemik hacmi ve kemik mineral yoğunlukları özellikle 4. ve 8. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Histolojik ve makroskopik incelemelerde 'kalsitriol+kitozan+PRP' grubunda defekt alanının diğer gruplara göre daha çok yeni hücre ile dolduğu, defekt alanının diğer gruplara göre daha çok küçüldüğü tespit edilmiştir. Immunhistokimyasal incelemelerde RANK, FGF23, VDR antikorlarının ekspresyonunun kalsitriol+kitozan+PRP grubunda diğer gruplara göre fazla ve yoğun olduğu görülmüştür. Biyokimyasal olarak sadece kalsitriol+kitozan+PRP grubunda D vitamini seviyesinin yükseldiği, sadece bu grupta ağırlığın azaldığı görülmüştür.

Sonuç olarak defekt alanına eklenen D vitamini, PRP, kitozan formülasyonunun kemik defektlerinin onarımında olumlu katkı yaptığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: D vitamini, PRP, sıçan modeli, immunhistokimya, kemik iyileşmesi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25572

ABSTRACT

Turgut CT. Investigation of the effects of biocompatible carriers containing vitamin D and PRP on bone defects created in rat calvaria. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral Surgery. Doctoral Thesis. İstanbul. 2020.

The aim of this study is to investigate the Effects of Biocompatible Carriers Containing Vitamin D and PRP on Bone Defects Created in Rat Calvaria. We planned to investigate histopathologically, radiologically and biochemically with comparison.

In the study, 52 male Sprague Dawley rats were used, except for the 4 used to obtain PRP(Platelet Rich Plasma) 5 mm bone defect was created and rats were randomly divided into 6 groups. Control group, chitosan group, chitosan+PRP group, PRP group, calcitriol+chitosan group, calcitriol+chitosan+PRP group. Calvarial defects were examined by sacrificing the rats in equal numbers at the 1st, 2nd, 4th and 8th weeks. The newly formed bone was evaluated histopathologically, microtomographically, macroscopically the blood contents analyzed biochemically; immunohistochemically expression of FGF23, VDR, RANK was investigated.

In microtomographic evaluations, the amount of ossification, bone volume and mineral densities were found to be statistically significantly higher especially in the 4th and 8th weeks in the groups that calcitriol was attached. In histological and macroscopic examinations, it was found that the defect area was filled with new cells and the defect area shrank more than other groups in calcitriol+chitosan+PRP group. In immunohistochemical studies, the expression of RANK, FGF23, VDR antibodies was more and more intense in the calcitriol+chitosan+PRP group compared to other groups. Biochemically, it was observed that vitamin D level increased and weight decreased only in calcitriol+chitosan+PRP group.

As a result, it has been observed that adding vitamin D, PRP, chitosan formulation to the defect area positively contributed to the repair of bone defects.

Key Words: Vitamin D, PRP, rat model, immunohistochemistry, bone regeneration

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 25572

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemiğin bütünlüğündeki eksiklik kemik defekti olarak tanımlanır. Bu defektlerdeki eksikliklerinin giderilmesi en başta fonksiyonel, sonrasında estetik kayıpların yerine konması açısından önemlidir. Oral ve maksillofasiyal cerrahide; cerrahi müdahalelerde onarım, geleneksel yöntemlerin yanında defekt alanına konulan iyileşmeyi hızlandıran materyaller ile de sağlanmaktadır. Sert doku kayıplarının onarımında kemik grefti uygulamaları en iyi tedavi seçeneklerindendir. Greftler, doku ve organların kazanılmış veya konjenital defektlerinin rekonstrüksiyonunda yer tutucu olarak görev alan, kemik yapımını uyaran materyallerdir ve osteointegrasyon, osteogenezis, osteokondüktif veya osteoindüktif özelliklerin birine veya birden fazlasına sahip olmalıdır. Son zamanlarda dokulardaki eksikliklerin tamamlanabilmesi için kişiden alınan otolog karakterdeki doku örnekleri; biyolojik uyum, enfeksiyon riskinin önüne geçme ve iyileşmeyi hızlandırması açısından tercih edilmeye başlanmıştır.

Günümüzde D vitamininin ve preparatlarının; kalsiyumun ve fosforun emilimi için önemli olduğu, kemik gelişimini olumlu yönde etkilediği, hayvanlarda büyüme oranını arttırdığı ve kalsiyum emilimini düzelttiği belirlenmiştir. Kemiğin gelişimi ve yeniden biçimlenmesi; hormonlar ve lokal olarak üretilen büyüme faktörleri tarafından yürütülen bir işlemdir. Bu işlem paratroid hormonu, kalsitonin hormonu, insulin hormonu ve büyüme hormonu gibi peptid hormonlar; 25-hidroksivitamin D, 1,25 dihidroksivitamin D, glukokortikoidler, seks hormonları ve tiroid hormonları tarafından desteklenir. Aktif metaboliti $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ olan D vitamini; insan metabolizmasının neredeyse tüm mekanizmalarında kendine geniş bir alan bulmaktadır. D vitamininin; kalsiyum, fosfor ve kemik metabolizmasında, immün sistemin dengesinde, biyolojik alanlarda önemli rol aldığı bilinmekte ve organizmanın fizyolojik görevlerini yerine getirmesindeki etkileri, hastalıklarla ilişkisindeki yerleri, doku hasarlarının tamirindeki rolleri üzerine de çalışmalar yapılmaktadır. D vitamini tüm bu etkilerinin yanında büyüme plaklarının mineralizasyonunda, trabeküler ve kortikal kemik üzerindeki osteoidlerin mineralizasyonunda da önemli görev üstlenmektedir. D vitamininin kemik metabolizmasında travma sonrasındaki başta kemik dokusu olmak üzere çevre dokuyu da iyileşme yönünde etkilediği de tespit edilmiştir.

Oral cerrahide kullanılan biyomateryallerle; kırıkların ve kist, tümör ameliyatlarından sonra oluşan kemik kavitelerinin, kemik defektlerinin kısa sürede iyileşmesini amaçlayan bir çok çalışma yapılmıştır. Biz de çalışmamızda PRP ve biyomateryallerin bilinen faydalarını bunlara kemik gelişimini hızlandırıcı özelliği olan D vitamini ekleyerek oluşturduğumuz karışımı kalvaryal defekt alanında deneyerek yeni kemik dokusunun daha hızlı bir şekilde gelişerek operasyon sonrası oluşan bu defektlerin hızlı bir şekilde iyileşmesini planladık. Çalışma sonucuna bağlı olarak bu materyalin çene operasyonlarından sonra çene kemiğinde oluşan defektlerde kullanılabileceğini ve kırık gelişme gibi komplikasyonların oluşmasının da önüne geçilebileceğini düşünmekteyiz.

Deneyisel hayvan çalışmaları; standardizasyonların sağlanabilmesi, deneylerin tekrarlanabilmesine imkan tanınması, zamandan ve yerden bağımsız olması, takip periyotlarının kolay yapılabilmesi, sonrasındaki dönemde gerekli analizlerin histopatolojik incelenebilmesi avantajlarını barındırmaktadır. İnsan çalışmalarında hastaların programa uyumunu sağlayabilmenin ve yapılan çalışmaların patolojik araştırmasının gerçekleştirilebilmesi için hastadan biyopsi alınmasının zorluğu; hastanın tekrar opere edilmesinin mümkün olamaması, kendi kendine iyileşmeyen kritik kemik defektine biyoyumlu taşıyıcı ile yerleştirilecek materyalin insanda uygulanmasının söz konusu olmaması, olası biyopsi sonrası doku kesitlerinden elde edilen sonuçların tüm organizma için yorumlamanın zorluğu, deneylerde uygulanan yöntemlerin dokular üzerindeki etkisini incelemek amacıyla biyopsi yapılması gerekliliği ve dokuların eldesinden önce sakrifikasyon şartı, süreç boyunca kan, tükürük gibi örneklerin toplanılabilmesi, doku mühendisliğinde kemirgen modellerinin çalışmalarda insan organizmasına genetik benzerliğiyle fayda getirdiğinin gösterilmesi, erkek Sprague Dawley sıçanlarıyla yapılan çalışmalarda insan çalışmalarına göre metabolik hız kaynaklı kısa sürede sonuç alınması ve bunun yeni yöntemlerin oluşmasına katkı sağlaması; eksperimental hayvan çalışması yapılmasının kararını oluşturmaktadır. Deneylerin ardından elde edilen bilgiler insanlar üzerindeki uygulamalara rehber oluşturmakta, morbiditenin azalmasını sağlamaktadır.

Kritik kemik defekti dışarıdan bir müdahale olmadan iyileşmeyen kemik defektidir. Kritik boyut kendi kendine iyileşme özelliği göstermeyen en küçük boyuttur. ‘Trefan frezlerle’ oluşturulmuş 5 mm çapındaki kalvaryal defekt 6 – 12 aylık süreçte

kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan bir defektir. Pariyetal kemik ise üzerine herhangi bir kuvvet gelmediği, oluşturulan defekt alanının sabit bir şekilde kaldığı, sıçan modelinde oluşturulduğu için anatomik olarak ekstremitelerin zarar vereceği alanın dışında olduğu ve pozisyon itibarı ile herhangi bir yere temas etmesinin mümkün olmadığı, defekt alanına konulan materyallerin etkisinin direkt olarak görülebildiği bir deney modeli olması ve bu materyallerin kemik dokusu ile direkt temasına olanak sunması deneysel kalvaryaya modeli seçilmesi kararını oluşturmuştur.

Günümüzde rejenerasyonu hedefleyen çalışmalarda biyomateryallerin çatı oluşturması üzerine yönelildiği görülmektedir. Biyouyumlu bir materyal olan kitozanın doğal bir polimer olması, porozite yapısını barındırması, kimyasal uygulamalara toleransının olması, uygulanırken jel haline kolayca getirilebilmesi, eklenen materyalin kimyasal yapısını değiştirmemesi, yapısının iskele oluşumuna yardımcı olabilmesi, absorpsiyona kolaylık sağlaması, üzerine eklenen materyalin kendi içinde etrafıca dağılmasına müsaade etmesi, içerisindeki metabolit yapılarına dokunun herhangi bir reaksiyon göstermemesi çalışmalarda kullanım alanı olarak seçilmesini ve çalışmamızda da kullanılması kararını oluşturmuştur.

Bu çalışma; kalsitriolün PRP ve kitozan ile karışımının; maksillofasiyal kemik defektlerinin onarımında erken dönemde kemik yapımını desteklemeyi, iyileşme süresini kısaltmayı, hastaların fonksiyon, fonasyon ve estetik kayıplarının en kısa sürede tamamlanabilmesini ve defekt iyileşmesinin görülebileceği bir deney yaparak gerçek hayatta uygulamayı rutin haline getirip iyileşmenin hızlandırılmasına katkıda bulunmayı, dişsizlik süresinin kısılmasına yardımcı olmayı, bölgenin erken fonksiyona girmesini ve estetiği hedeflemektedir.

Çalışmamızda D vitamininin ve çeşitli biyomateryaller ile farmasötik karışımlarının 10 – 12 haftalık Sprague Dawley kalvaryasında 5 mm'lik kemik defektlerindeki iyileşmeye ve kemik oluşumuna etkisini; PRP ve biyomateryallerin bilinen faydalarını bunlara kemik gelişimini hızlandırıcı özelliği olan D vitamini aktif metaboliti olan kalsitriolü ekleyerek histopatolojik, radyolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırmalı bir şekilde araştırmayı planladık ve kemik yapımını değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Doku

Kemik, vücutta önemli görevler üstlenen kompleks bir yapıdır. İskelet sisteminin yapıtaşı olan kemik; metabolik, hematopoetik ve biyomekanik işlevleri olan bir bağ dokusudur (297). Ortalama olarak, yetişkin bir insanda 206 kemik mevcut iken yenidoğanda bu sayı 300 üzerindedir, daha sonra gelişim sürecindeki füzyonlar ile birlikte bu sayı azalmaktadır.

Kas - iskelet sistemi (lokomotor sistem) organizmaya hareket etme yeteneği veren bir sistemdir. İskelet kemikleri; kırıkdağları, bağları, kasları, eklemleri, tendonları birbirine bağlayan bir bağ dokusudur. Kemik, bağ dokusunun mineralizasyon özelliği gösteren özelleşmiş bir formudur. Kas - iskelet sistemi vücuda şekil, destek, denge ve hareket sağlar (428).

Temel iki fonksiyonundan biri yapısal diğeri kalsiyum metabolizmasına destek olmaktır (37,133).

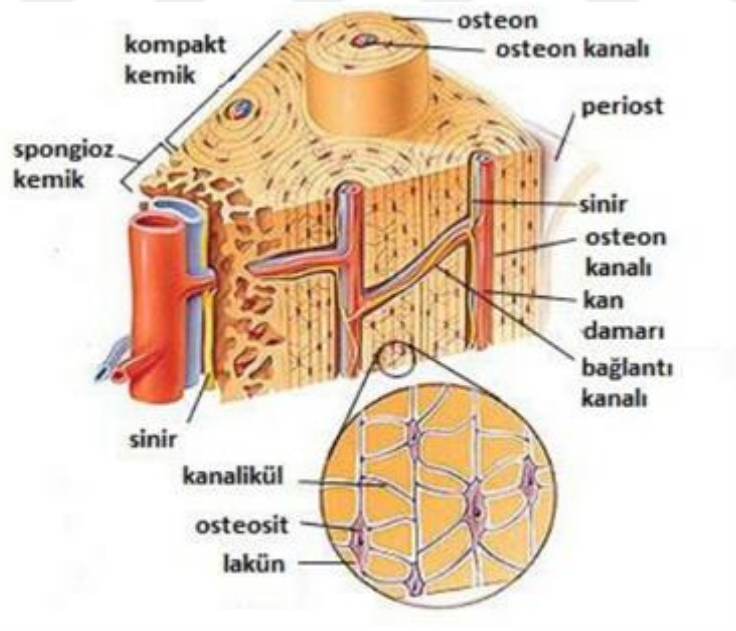
Organizmayı destekleyen kemik; kafatası, göğüs kafesi gibi organ boşluklarının etrafını sararak yaşamsal sürecin devamında rol almakta olan organları dış etkilere karşı korumaktadır, kaslar ile birlikte işlev göstererek organizmanın hareket etmesini sağlamaktadır, organizmanın ana şeklinin oluşması görevini üstlenerek vücuda destek vermektedir.

Kemik, metabolik aktivitesi olan dinamik bir dokudur (335). Yapısında inorganik matriks, organik matriks ve su içeriğini barındırır. İnorganik yapısı %60 hacimdedir, organik yapısı %30 hacimdedir ve geri kalan %10'luk hacimi su oluşturur (297). Mevcut su; mineral-kollajen yapısına bağlı olabilir veya kemik içinde kanallarda serbest bir şekilde bulunabilir. Serbest dolaşımdaki su ise iskeletsel yapı içine bağlanabilir, yeniden dağıtılabılır ve bu su; kemik içindeki hücrelerin algıladığı sinyallere katkıda bulunmaktadır (51,425).

Ağırlık ölçütünde kimyasal yapının %71'ini inorganik tuzlar, %18,5'ini kollajen, %0,25'ini mukopolisakkaritler, %1,75'ini proteinler ve %8,5'ini su oluşturmaktadır (193). Kemik formunu oluşturan kısım organik matrikstir, organik

matiks inorganik tuzların şekillenmesini sağlamaktadır. İnorganik matrikste potasyum, fosfat, stronsiyum, flor, karbonat, sitrat ve magnezyum element ve bileşikleri yer almaktadır. Kemik; tip I kollajen yapısında olup bu kollajen, tendonlardaki ve derideki kollajen ile benzerdir (323). Hacimce bu üç yapı kemik içinde homojen olarak dağılmıştır.

Kemik dokusu, dışta kompakt tabakada kortikal, ve içte boşluklu yapıdaki kısım olan spongiöz (trabeküler, kansellöz) olmak üzere iki temel kısımdan meydana gelmektedir. Kortikal kemik, osteon diye isimlendirilen birimlerden meydana gelmekteyken; spongiöz kemik, ilikle dōşeli trabeküler yapı özelliği gösteren ağdan oluşmaktadır. Hem osteon birimleri hem de trabeküler yapı kalsiyum, fosfat kristallerinden ve kollajen liflerden oluşur (Şekil 2-1). Kollajen lifleri 67 nm'lik aralıklar ile dizilmektedir. Kollajen molekülleri arasındaki boşluk 40 nm'dir. Hidroksiapatit kristalleri, kollajenler arası boşlukları doldurup kemiğin sertliğini ve dayanıklılığını sağlar (145, 195, 305).



Şekil 2-1: Kemik yapısı (195, 305)

Kemik dokusunun asıl yapısında en fazla sayıda bulunan inorganik tuz kristali; 20-25 nm uzunlukta, 15 nm genişlikte ve 2-5 nm kalınlıktaki alkali ve aynı zamanda kollajenler arası boşluğu dolduran hidroksiapatittir ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (297). Hacmi

oluşturan genişliğin, uzunluğun ve kalınlığın az olması küçük boyutta kristal oluşmasını sağlayarak daha fazla yüzey-hacim oranı oluşmasına imkan tanımaktadır. Kemğin üzerine gelen gerilme ve sıkışma kuvvetlerine direnci oluşturan da liflere bağlantı yapma görevi ile birlikte hidroksiapatitle ve dolayısıyla kristal yapı ile de ilişkilidir (145). Kristal yüzeyinde su ve iyon yer almaktadır. Bu yapı hidrasyon kabuğu olarak isimlendirilir. İyonlar hidrasyon kabuğu ve kristal yüzeyi arasında serbest hareket eder. Aynı zamanda bu tabaka; kristaller ile vücut sıvıları arasında iyon değişiminde rol alır. Bu durum kemik kristallerinin özel bir yapı olduğunu göstermektedir (122, 139, 395). Mineral fazının fiziksel ve kimyasal özellikleri; kimyasal analizler, x ray diffraksizyonu, transmisyon, atomik mikroskopi, küçük açılı scatterizasyon ve nükleer manyetik rezonans gibi değişik yöntemlerle saptanabilmektedir (35).

Organik komponent incelendiğinde kollajen ve non kollajen proteinler görülür. Organik fazın yapısal bileşimini tip I (fibröz) kollajen oluşturmaktadır, bu yapı %90 oranında kemiksel proteini, kalan %10'luk kısım da küçük ve yapısal olmayan osteokalsin, osteonektin, fosfoprotein, sialoprotein, büyüme faktörleri ve kan proteinleri içerir. Genel olarak %90'ı tip I kollajendir, %10'u non kollajenaz proteindir. Bu yapılar hem metabolik hem mekanik fonksiyonları ve yaşla birlikte bütünlüğü ve yapısal özellikleri (cinsiyet, özellikler, yer) oluşturmaktadır (36, 38, 258). Lif üretimi ve lifli yapı kollajenaz yapıdır. Kollajen proteinler tip I kollajen ve glikozaminoglikan yapısındadır. Kemik içi vasküler dolaşımın niteliğini ise yeniden şekillenme (remodelling), yapı formasyonu ve büyüme reaksiyonları belirlemektedir (21).

Tip I kollajen organizmada en bol olarak bulunan kollajendir. Tendonlarda, dermiste, ligamanlarda, organ kapsüllerinde, dişlerin dentinlerinde, fibröz kıkırdakta bu tip kollajen iplik veya demet halinde görülür. Kemikte sağlamlık kollajen ipliklere, sertlik ise hidroksiapatit kristallerine bağlıdır. Kristaller, kollajen fibril ağı içindedir. Etrafları su ve iyonlar içeren tabaka ile sarılıdır. Tabaka sayesinde vücuttaki kalsiyum ve fosfor eksikliğinde kemikten kana kalsiyum ve fosfor geçimi sağlanır (200).

Mekanik özellikler ve tüm bunlar; içindeki yapıların miktarlarının ayarlanması, uygun düzenlenmesi ile tanımlıdır. Kemğin kırılmaya karşı direnme kabiliyetini, her komponentin ağırlık yüzdesini, mineralizasyonunu, kollajen içeriğini ve kollajen çarpaz bağlarını, morfolojiyi, mikro çatlakları etkilemektedir. Bunlar kemiksel kaliteyi gösterir (196).

2.1.1. Kemik Tipleri

Kemik; içerisinde barındırdığı matriks yapısına göre 5'e ayrılabilir:

Uzun kemikler (femur, tibia, ulna ve radius), kısa kemikler (elin karpal kemikleri), düz ve yassı kemikler (kafatası, sternum ve skapula), düzensiz şekilli kemikler (vertebra ve ethmoid) ve sesamoid (susamsı) kemikler (tendonlara gömülü kemikler) (Şekil 2-2).

Uzun kemikler: Uzun kemiklerin kendi yapısı içinde iki ekstremitede komşuluğunda (epifiz) ve ortada silindirik kanalcık (diafiz) ve her ikisi arasında da geçiş alanı olan metafiz görülmektedir. Uzun kemiklerin büyümesinde epifiz ve diafiz bağımsız kemikleşme merkezi olarak köken almaktadır ve bunlar kartilaj yüzey tarafından epifizyal veya büyüme plağı olarak isimlendirilen yapı ile ayrılmaktadır (femur, tibia, ulna ve radius).

Kısa kemikler: Ayaktaki ve eldeki karpal ve tarsal kemikler tipik olarak kısa kemiklerin birer örnekleridir. Bu kemikler küp şekilli, sadece ince bir kompakt kemiğin iç kısımdaki süngerimsi (trabeküler kemiği) kemiği sardığı kemiklerdir (elin karpal kemikleri).

Yassı ve düz kemikler: İç ve dış kısımlarının kompakt kemikler ile sarılı olduğu süngerimsi özellikleriyle kafatasındaki kemikler tipik örnekleridir (kafatası, sternum ve skapula).

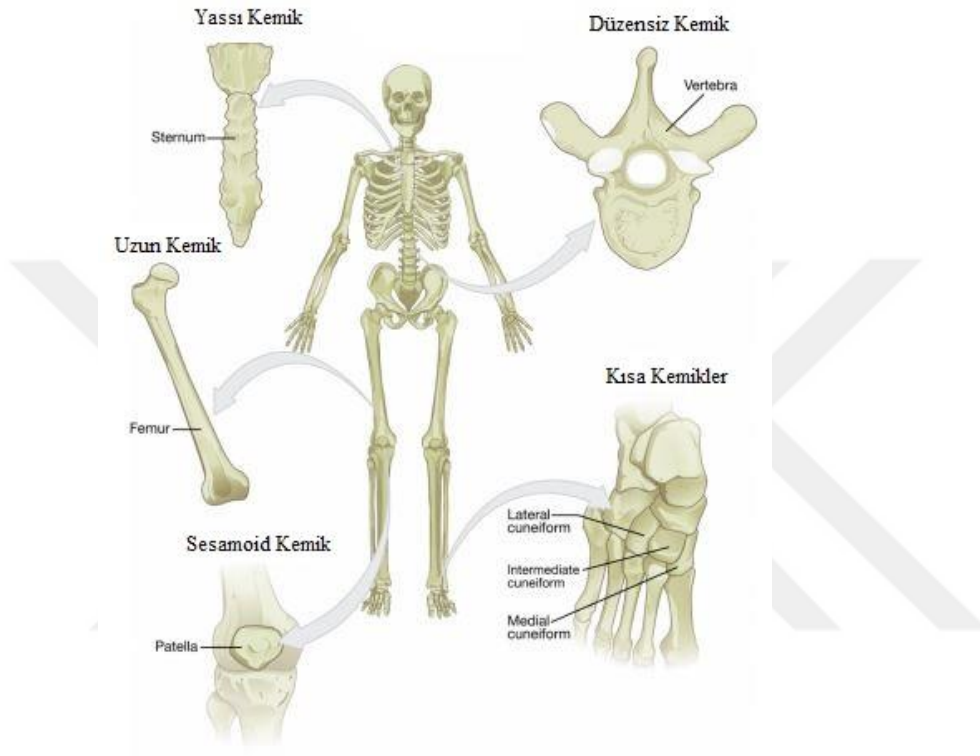
İskelet; morfolojik olarak yassı ve uzun kemiklerden oluşur. Dış tarafta kortikal tabaka var iken orta kısımda ilik ile sarılı medulla yer alır (193).

Düzensiz kemikler: İç kısımdaki süngerimsi kemiği saran dış kısımda ince kompakt kemiğin olduğu kemikler olarak nitelendirilebilirler. Skapula bu kemiklere örnek verilebilir.

Sesamoid kemikler: Bu kemikler kısa kemiklerin tendonlar ile sonlanan alt tipidir. Patella ve psiform kemikleri bunlar için örnek kabul edilir.

Kemiklerin ana farkı; matriks yapısı olmakla beraber embriyonik gelişimdeki farklı mekanizmalar ile şekillenmeleridir. Uzun kemikler endokondral kemikleşme gösterirlerken yassı kemikler intramembranöz kemikleşme gösterirler. Bu iki kemikleşme mekanizmasından da bahsedilecektir. Hem uzun hem de yassı kemikler serttirler ama göreceli olarak incedir ve dış kısımda yoğun bir şekilde organize olurlar.

Kompakt kemik yapısı korteks ya da kortikal olarak isimlendirilmektedirler. Korteks içinde; içinde hematopoetik elementlerin bulunduğu, yağ ve kemik çıkıntı alanları olduğu kemik iliği boşlukları vardır. Kemik çıkıntı alanlarından trabeküler, spongioz veya kansellöz kemik olarak da bahsedilmektedir (45, 215).

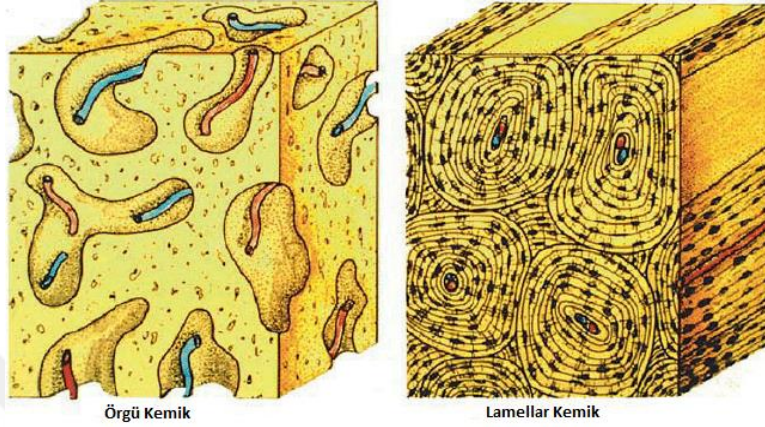


Şekil 2-2: Kemik tipleri (26)

Organ seviyesinde kartilojen eklemlerle beraber büyüme plaklarının kalsifiye kartilajı; kemik iliği ve mineralize kortikal, trabeküler kemik yapısı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu lamellanın matriksel düzenlenmesi kemiğin kortikal mı yoksa kansellöz mü olacağını belirlemede önemlidir. Matriks farkı, kemiğin kortikal mı spongioz mu olacağını belirleyen temel farklardandır. Her ikisi de osteonların birleşiminden oluşur. Kortikal veya kompakt kemik de osteositleri içinde barındırmakta ve yoğunlaşma alanları genelde havers kanalları etrafında olmaktadır. Kansellöz veya trabeküler kemik ise kemik lamellasının ağısı halinin bir formasyonudur. Areolar boşluklarda kemik iliği mevcuttur. Kortikal ve trabeküler kemiğin her ikisi de özelleşmiş organik matriks ve mineral fazı içermektedir (428).

2.1.2. Kemik Yapısı

Kemik, kollajen fiberlerin düzenlenmesine göre ise iki tipte sınıflanmaktadır; woven (örgü) ve lamellar kemik (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Woven (örgü) ve lamellar kemik (341)

2.1.2.1. Woven (örgü) Kemik: Primer Kemik Dokusu

Primer kemik dokusu (olgunlaşmamış, immatür, örgümsü) ismi verilen kollajen fiberlerin osteoblast ve osteoprogenitör hücreler doğrultusunda rastgele düzenlenmesiyle oluşan birincil kemik olarak da isimlendirilebilen kemik formudur. Bu form düzensiz lamellar içermektedir. Bu formun organizasyon özelliği zayıftır ve ömrü kısadır.

Polarize ışık altında keskin bir yapıya sahip olduğu ve lamellar kemiğe göre kontrast barındırdığı görülmektedir. Osteositleri barındıran lakünlerin şekli yuvarlaktır. Örgü kemik, lamellar kemiğe göre tek birim alanında daha fazla hücre barındırmaktadır. Örgü kemik; gelişen fetusta ana kemik tipi iken lamellar kemik erişkinlerde (olgun organizmada) olgunlaşmamış kemik barındıran bölümlerde görülmektedir. Embriyonik dönemde ve kemik hasarının onarımında şekillenmekle birlikte bu kemik geçici bir kemiktir, sonrasında sekonder kemiğe değişim gösterir. Özellikle kemiğin yeniden şekillenme gösterdiği alanlarda karşımıza çıkmaktadır. Kallus oluşumunda, travma iyileşmesinde ve kırık oluşmasından sonra patolojik durumlarda görülen ilk kemiktir. Primer kemik özellikle yassı kafatası kemiklerinin eklem yerlerinde oral kavitede alveolar soketlerde ve tendonların kemiğe bağlandığı yerlerde görülmektedir (308, 398). Verilen örneklerden bağımsız olarak örgü kemiğin erişkinlerde görülmesi patolojik

olarak nitelendirilir. Embriyodaki büyüyen iskelet, kırık kallus alanı, fibröz displazi olguları, osteosarkom yeniden modellenme göstermesi gibi hızlı büyümenin görüldüğü yerlerde ve bazı tümörlerde bu kemik tipi ile karşılaşılabilir. Oluşum hızı günde 30-50 nm'dir. Örgü kemiğin gelişiminde trombosit (platelet) kökenli büyüme faktörü (PDGF A - B), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-I, IGF-II) gibi moleküler sinyaller tetik oluşturmaktadır (17, 200, 273, 377).

2.1.2.2. Lamellar Kemik

Lamellar kemik erişkin kemiğin olgun halidir. Uzun, kısa ve düzensiz şekillerde olabilen 3-7 μm kalınlığında bulunan esas olarak kollajen fibril yapısındaki kemiklerdir. Lamelli bir yapı gösterdiğinden bunlara kemik lamelleri denir.

Sekonder organizasyon lamellar kemiğin önemli bir noktasıdır. Kemik lamellası kortekste; tubüler ve sirkumferansiyel düzenlenir. Tubüler düzenlenmeler osteon olarak isimlendirilir. Mikroskopta çember veya paralel yapraklar olarak görülmekte bu da histolojik hazırlıktaki kısımlara bağlı olarak değişmektedir. Tüp ortasında haversian kanal mevcuttur. İç yapısını oluşturan kanalcıklar ve bunu saran lamel sisteminin hepsine verilen isim havers sistemidir. Kanalcıklarının iç yapısı endosteum ile döşelidir. Bu kanal kan, lenf damarlarını ve siniri içerir. Sistemin diğer adı osteondur. Gerek havers gerek de volkman kanalları ilik ve periost ile ilişkide olup kanallar arası damar yapısı da ayrı olarak birbiriyle iletişindedir. Kortikal kemiğin mekanik özelliklerinde osteonlar önemli bir rol almaktadır. Osteonun uzun eksen kemiğin uzun eksenine paraleldir. Her osteon kemikte uzama ile birlikte kırığa direnç oluşturmaktadır.

Osteonlar polarize ışık mikroskobunda birikmiş kemik dokusunun paralel hatları halinde rahatça tespit edilebilmektedir. Çalışmalar lamellar kemiğin iyi organize kollajen fiberlere sahip olduğunu göstermektedir. Lamel alanındaki kollajen fibriller birbirine paraleldir, komşu lamellerdeki fibriller ise çapraz veya spiraldir. Fibrillerin bu seyir özelliği sekonder kemikler için dayanıklılık demektir. Kalsiyum tuzlarının kollajen fibrillerin üstünde hidroksiapatit kristalleri olarak yığılarak birikmesi mineralizasyonu tamamlar. Lamellar kemik kortikal ve spongioz (süngerimsi) kemik olmak üzere iki farklı alt sınıflamaya bölünür.

Havers sistemi (osteonlar) ve volkmann kanalları: bunlar 5-15 arası konsentrik lamella içeren osteonlar tarafından meydana getirilen uzunluk olarak 400 nm genişlik olarak da 200 nm şeklinde silindirik yapılardır, kortikal kısımda ağısı strüktür oluşturan silindirik ünitlerdir. Her lamella birkaç mikron kalınlığında olmakta ve fiberler, kanal etrafında spiral şekilde yer düzenlenmektedir. Havers kanallarının etrafı 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluşur (402).

Havers kanalları; kapillerler, venüller, lenfatik kanallar ve osteoprogenitör hücreleri barındıran gevşek bağ dokusu ve 1-2 adet damar içermektedir. Kan damarları etrafında dallanmış olarak düzenlendiğinden haversian sistemlerini görmek kolay olup kemiğin uzun eksenine paralel şekilde oryantanizasyonundan ötürü de uzun eksenle uyumaktadır. Volkmann kanalları da haversian kanallarını birbirlerine; periost içindeki kan damarları ve periost ile bağlayan vasküler kanallar olarak karşımıza çıkmaktadır. Osteositlerin bir kısmını da içeren kanalikül (canaliculi); kanala göre radyal bir düzende yerini oluşturmaktadır. Havers kanalları ile bağlantılı olan bu kanaliküller aynı zamanda osteositler ile kan damarları arasında maddelerin geçişini sağlarlar (73, 113, 380, 402). Bu bağlantılar hormonlar ve benzeri sinyallerin transferi için lenfovasküler kanalcıkların oluşmasına imkan tanımaktadır (193, 200, 273, 377, 398).

A) Kortikal (kompakt) kemik: Kemiğin sert dış kabuğunu oluşturan, kemik iliği boşluğunu çevreleyen sert, yoğun kalsifiye kemik olarak karşımıza çıkar. Olgun iskeletin %80'ini meydana getirir (297). Yoğun, sert bir yapıya sahip olan bu yapı kemiğin taşıyıcılığının ve koruyuculuğunun devamında görev alır. Bu kemik tipi az boşluklu bir yapıdır. Yetişkinlik döneminde kortikal kemik, lamellar tipteki kemiğin yoğun toplanmasından oluşmaktadır. Kompakt kemik; vasküler destek için havers ve volkman kanallarını da içinde barındırmaktadır (333). Uzun kemiklerin gövde kısmı olan diyafiz kısmı kompakt kemikten yapılı olup, medullar kaviteye bakan yüzünde ise çok az spongioz kemik bulunur. Organizmada bulunan tüm kemiklerin dış yüzeyleri kompakt kemik yapısındadır. Kısa kemiklerin merkezindeki spongioz kemik dıştan kompakt kemikle çevrelenmiştir (398). Kortikal kemik dışardan ve içerden periostium ve endosteum ile sarılıdır.

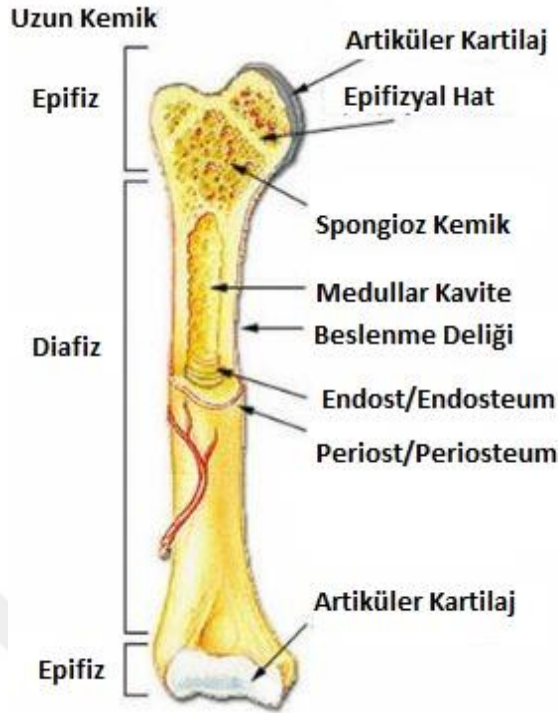
B) Periosteum (periost): Artiküler kartilaj hariç kemiğin dış yüzeyini saran kalın fibröz bağ dokusu zarıdır. Dıştaki fibröz tabaka ile iç kambiyum (hücresel)

osteojenik bağ dokusu tabakasının birleşiminden oluşur. Dışarıdaki tabaka fibroblastlar kadar sinir ve altta uzanan kemiğin vasküler desteğini de barındıran bir bağ dokusudur. Fibröz tabakada; dış yüzeyde kollajen fibriller ve fibroblastlar vardır. İç kambiyum (hücresel) tabaka çok miktarda hücre barındırmakta ve burada yeni kemik oluşumunda görev alan osteoprogenitör hücreler yer almaktadır. Bu iki katman vasıtası ile periost; kompakt kemik içindeki vertikal katmanlar arası ve çevredeki yumuşak doku ile iletişime imkan tanımaktadır. Sonraki ismi osteoprogenitör tabaka olur. Tendonların kemiğe girdiği kollajen fiberler (sharpey fibrilleri), periostu geçmekte ve kemik lamellasına ulaşmaktadır. Lenf damarları, kan damarları ve sinir lifleri ağı vardır. Periosteum osteojenik özelliktedir (113, 308). Kemiğin apozisyonel büyümesine katkı sağlar (49, 73). İç tabaka hücreden zengindir. Periosteal kollajen fibriller (sharpey fibrilleri) kemik matriksi içine uzanır ve periosteumun kemiğe bağlanmasını sağlar.

- C) Endosteum (endost): İç yüzeyi, kemik trabeküllerini ve volkmann kanalları ismini alan kan damarı kısımlarını kaplayan zar endosttur. Kemik iliğinin kemik ile karşılaştığı noktada dinlenme halinde olan; ışık veya elektron mikroskobu ile farkedilebilen bir tabaka değildir. Endosteum tabakası periosteum tabakasından daha incedir. Tek katlı yassı ya da kübik osteoprogenitör hücreler ile az miktarda retiküler bağ dokusundan oluşur. Kemikte bulunan tüm boşluklar, havers kanalları, volkman kanalları ve süngerimsi kemiğin ilik boşlukları da tamamen endosteum ile örtülüdür (113, 342). İlik ve kemik yüzeyi arasındaki sınırı oluşturur (73).

Periosteum ve endosteum kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüyebilmesi ve onarılabilmesi için gereklidir. Kemik doku için osteoprogenitör hücre ve osteoblast kaynağıdır, osteoblastların oluşumunu sağlar (80, 308) (Şekil 2-4).

D) Trabeküler kemik: Spongioz veya kansellöz kemik olarak isimlendirilebilen trabeküler kemik; süngerimsi kemik ilik boşlukları ile ayrılan ince spiküllerden ve kemik trabeküllerinden bu trabeküllerin anastomozu vasıtasıyla oluşur.

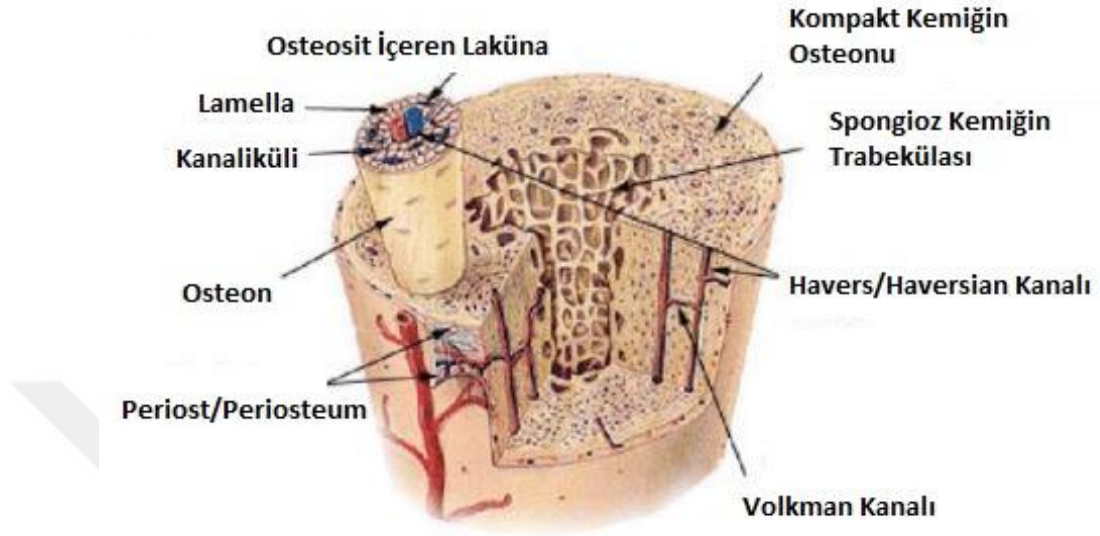


Şekil 2-4: Kemik içindeki tanımlamalar (uzun kemik) (305)

Trabeküler kemik; uzun kemiklerin iç kısmını, uzun kemiklerin metafizyel bölgesini ve kemiklerin epifiz uçlarını doldurur. Trabeküler kemik; kemik iliği boşluğu için iskele görevi gören, kemiği kendi içindeki boşluk yapısından ötürü ağırlığını hafifleten, kan damarlarına ve kemik iliğine yer açan rodand plaka benzeri elemanlardan oluşan bir ağ meydana getirir. Havers ve Volkman kanalları yoktur. Trabekül çıkıntıları genellikle birkaç lamellar kemik dokusundan oluşur (47, 398, 402).

Kemik dokusunun içerisinde bulunan rezorpsiyondan sorumlu ana hücreler ve yeni kemik yapımını üstlenen hücreler birlikte düzensiz kollajen liflerin yapıda bulunduğu kompakt veya spongioz kemiği meydana getirir. Spongioz yapı içindeki trabeküler oluşumlar yeterli miktara eriştiğinde vasküler bağ dokusu iliğe transformasyon gösterir (152, 193, 200, 262, 273, 297, 348, 377) (Şekil 2-5).

Kemik dokusu ve kemik dokusunun içeriği mekanik kuvvetlere bağlı olarak hacimce değişebilme potansiyeline sahiptir. Kemik döngü süreci vaskülariteye, iliğe olan mesafeye, yapı, fonksiyona, gelişime, travmaya uğramaya ve yaşa bağlı olarak değişebilmektedir. Farklı kemiklerdeki kortikal ve kansellöz kemik miktarları da yine birbirlerinden farklılık gösterebilir (193, 377).

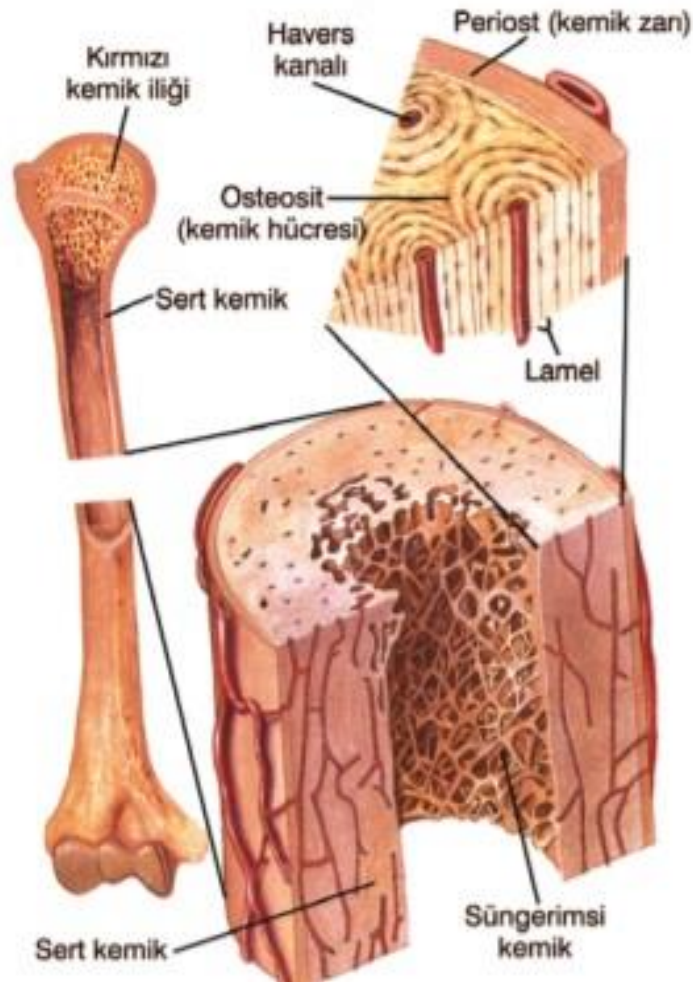


Şekil 2-5: Kompakt ve süngerimsi kemiklerin şematik diyagramı. Haversian kanallarının çevresinde çevresel kemik lamellerinden oluşan osteoklardan oluşan kompakt kemiği ve rastgele düzenlenmiş kemik trabeküllerinden oluşan süngerimsi veya süngerimsi kemiği gösteren uzun kemiğin çapraz ve boyuna kesitleri için şematik diyagram. www.training.seer.cancer.gov / National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, with Emory University, Atlanta SEER Cancer Registry, Atlanta, Georgia'dan alınmıştır (356)

2.1.3. Kemik İç Yapısı

- A) Epifiz: Tubüler kemiğin epifizyal (büyüme) plağı ile (gelişen kemik) artüküler kartilaj arasında kalan bölümü olarak karşımıza çıkar. Epifizler sert kemik içinde ince bir tabaka olarak çoğunlukla süngerimsi kemiklerden oluşmaktadır. Yetişkinlerde büyüme plağı yoktur.
- B) Epifizyel plak: Büyüme ve gelişim dönemlerinden önce çocuklarda büyüme plağı olarak belirtilen alandır. Hasarlar ve kesintiler bu kemiğin hacmini ve şeklini ciddi etkileyebilir. Örneğin epifiz etrafındaki vaskülaritenin artması kırık sonrasındaki iyileşme sürecinde uzvun uzamasına sebebiyet verir. İnflamatuvar yıkım ise kısaltmaya sebep olurken kısmi yıkım angular deformite ile sonuçlanabilir. Fizyal plağın kırıkları, kesintinin miktarı ve türü bakımından sınıflandırılır. Bu Salter Harris sınıflandırmasından temel alır (47).

- C) Metafiz: Silindirik diafiz ile epifiz arasındaki kemik alanının genişletilmiş kısmını işaret eden alandır. Bu alandaki yeniden şekillenme ve şekillenme defektleri multiple osteokondromatozis gibi durumlarda sıktır. Bir çok tümör; metafizi merkez olarak seçmektedir.
- D) Diyafiz (şaft): Tubüler kemiğin ortasındaki silindirik kısım olarak nitelendirilebilir. Kemik iliği boşluğunu saran kalın korteksi mevcuttur.
- E) Kemik iliği: Medullar kavite; hematopoetik kemik iliğinin, yağ ve trabeküler kemiğin değişen oranlarıyla doludur. Genç yaştakilerde uzun kemiğin metafizyel bölümlerinde kemik iliği daha yaygın vaziyettedir. Yetişkinlerde diafiz büyük oranda yağ içerir. Apendiküler iskelet (omuz, pelvis kuşağı ve ekstremiteler) ile karşılaştırıldığında aksiyal iskelet daha çok kemik iliği içermektedir (Şekil 2-6).



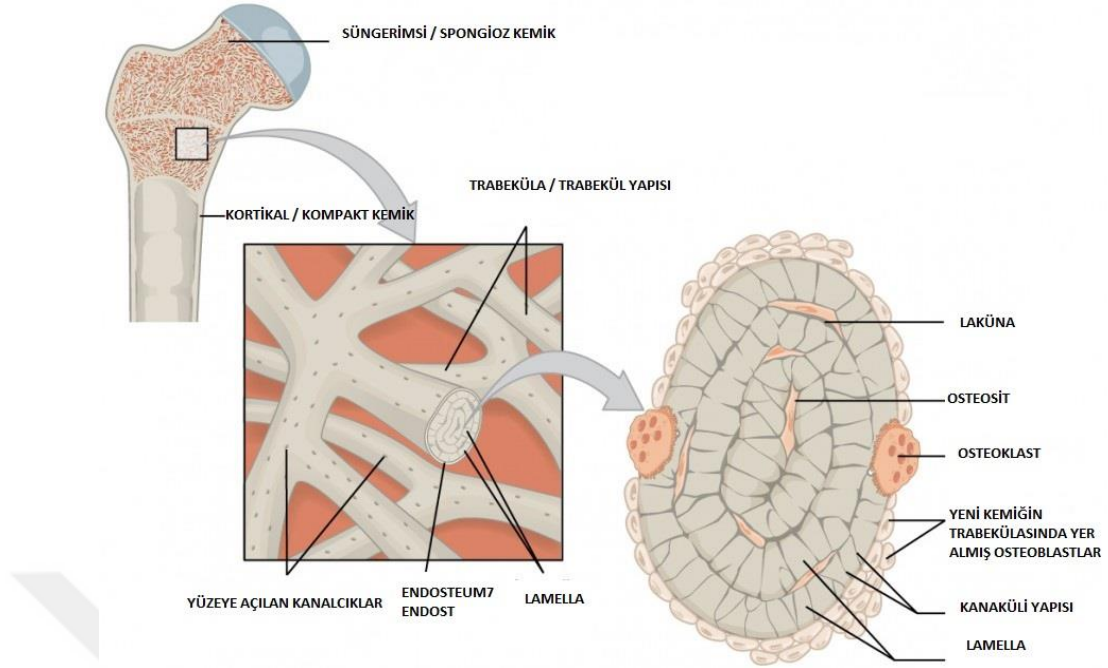
Şekil 2-6: Kemik iç yapısı (334)

Olgun / lamellar kemik standart olarak uzun gövdeyi meydana getiren diafiz yapısından ve her iki uçta epifiz yapısından oluşmaktadır. Diafiz yapısı ilerleyen dönemde genişleme göstererek epifiz ile metafiz bağlantısının oluşmasını sağlamaktadır. Epifiz ve diafiz her iki uçta bulunduğundan eklem kıkırdağı komşuluğunda yer alır, bu iki yapının bağlantısının sağlanabilmesi açısından diyafizyel alan yapı itibarı ile daha geniştir.

Epifiz yapısı dışta hafif kalınlıkta kortikal kemik ile sarılı merkezde spongioz kemik yapısındadır (Şekil 2-7). Diafizin ise kemik boşluğuna bakan yüzeyi kortikaldir. Yassı kemiklerin epifizi yoktur (193).

Bu yapıya bakıldığında kemiklerin her iki ucunda yer aldığı için epifiz genel olarak kemiğin uzamasından sorumlu bölgedir. Epifiz erişkinlik döneminde yok olmaktadır. Bu durumda kemiğin uzaması sona erer. Ancak sona erme periyotları her kemik için farklı sürelerde gerçekleşir. Epifizler kaybolduktan sonra kemiğin boyca uzaması olmaz ancak diafizler vasıtasıyla enine kalınlaşma kuvvet geldiği sürece devam eder. Diafiz yapısının beslenmesi uzun kemiklerde medullar vaskülarite ile gerçekleşmektedir. Bu damarsal oluşum epifiz - diafiz füzyonundan sonra metafizyel ve epifizyal arteriyolları de barındırır (276). Kemik içerisine ulaşan ana arter inen ve çıkan iki damar ile endosteuma kadar uzanan dallar verecek şekilde ilerlemektedir. Uçtaki ve kemik içindeki her dokunun beslenmesinin gerçekleştirilebilmesi çapları gittikçe küçülen arteriyollarla mümkün olabilmektedir. Periosttan itibaren başlayan damarlar uzun kemiklerde diafiz bölgesinde santral alanda sonlanmaktadır. Venüllerde drenaj periost ve endost ile gerçekleşmekle birlikte uzun kemiklerde ven sistemleri aynı bölgedeki arter yerleşmesi gibidir. Büyük venler medullada birleşip distal proksimalden çıkan venlerle birleşir (193). Ağsal yapı kemik hücrelerinin meydana gelmesini sağlamakla ve oksijen ihtiyacını da karşılamaktadırlar. Vasküler kapiller sistemde karbonatlar, fosfatlar, kalsiyum gibi iyonlar salınır (209).

Kapiller damarlanma, kansellöz kemik trabeküllerinin içindeki kemik iliği boşluklarında görülmektedir. Bu damarların kesintisiz endotel tabakaları ve bazal membranları mevcuttur (78, 193, 199, 273, 308, 377, 398).

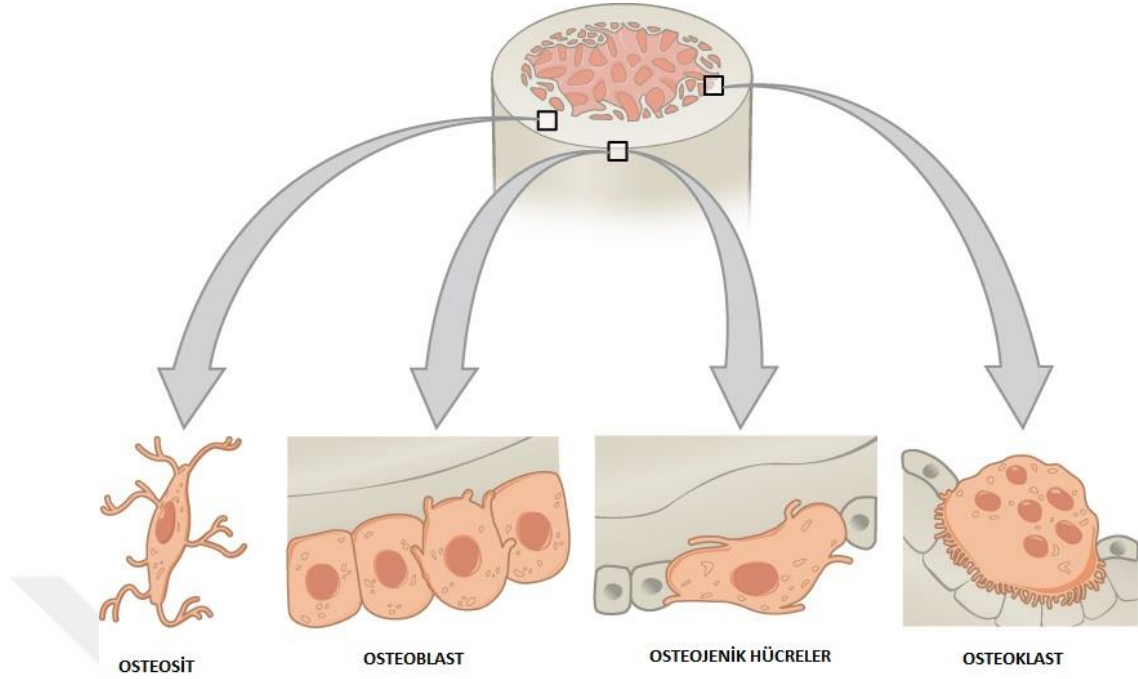


Şekil 2-7: Spongios kemik (26)

2.1.4. Kemik Hücreleri

Mineralizasyonlu bağ dokusu olarak nitelendirilen kemik dokusu temelde 3, bu üç hücre arasında olan ara hücre ile birlikte toplamda 4 hücre barındırır (51, 73, 425). Bu hücreler; osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve interstisyel hücrelerdir (Şekil 2-8). Kemik; yapım yıkım metabolizması ile sürekli bir yapıya sahiptir. Yapım için görev alan hücreleri osteoblastlar yıkım için görev alan hücreleri osteoklastlardır. Bu süreçte kemik üzerine gelen kuvvetleri osteositler algılamakta ve süreci yapım yıkım açısından düzenlemekte ve yönetmektedirler. İnterstisyel hücreler ise iç yüzeyi döşemekte görev mekanizması halen tam olarak açıklanamamaktadır (73).

Kemiğin yapımında, yapım ve yıkım sürecinin bir devinim halinde olmasında görevi; osteoblastlar, osteoprogenitör hücreler, osteoklastlar ve osteositler üstlenir. Osteoklastlar hemopoiyetik hücrelerden köken alır ancak diğerleri ise mezenkim kökenlidir (113, 402).



Şekil 2-8: Kemik hücreleri (26)

2.1.4.1. Osteoprogenitör Hücreler

Kemik dokusunu oluşturma görevini üstlenen mezenkim hücreleridir. Embriyonik mezenkimden meydana gelmektedir. Şeklen fibroblastlara benzemekte birlikte ve mitoz bölünmeyle farklılaşırlar sonrasında osteoblastlara dönüşürler. Endostta ve periostta yer almaktadır. Kemik büyümesi sürecinde ve kırık iyileşmesi aşamalarında da mezenkimal hücrelerden osteoblastlara farklılaşıp kemik matriksini salgılar (17, 113, 154, 284, 366).

2.1.4.2. Osteoblast Hücreleri

Osteoblastlar; hücrelerin %4-6'sını oluşturan, kübik şeklindeki kemik oluşumundan sorumlu, mezenkimal hücrelerden köken alan, 20-30 mikron genişliğinde, fibroblasttan farklılaşan ana hücrelerdir. Tip 1 kollajen lifleri ve matriks proteinlerini sentezleyip salgılarlar böylece non kalsifiye osteoid doku oluşur. İçinde endoplazmik retikulumu, golgi cisimciğini, salgı veziküllerini barındırır. Matrix mineralizasyonunu kontrol ederler (250). Üstlendikleri salgı fonksiyonu ile birlikte, glikozaminoglikanları (GAG), glikoproteinleri (gp), kalsiyum bağımlı osteokalsini ve osteonektini, alkalin fosfatazı salgılarlar (367, 398). Tek katlı epital gibi yanyana dizilirler. Bu hücreler 1,25

dihidroksivitamin D'ye, paratroid hormonuna, kalsitonin hormonuna, östrojen hormonuna, sitokine, glukokortikoide, gonadal ve adrenal steroidlere, lenfokin gibi moleküllere özel reseptör barındırır. K vitaminine bağlı polipeptid olan osteoklasın kollajen dışı protein olup kalsiyumu bağlamaktadır. Yapım olmadığında stabil bir vaziyette durur. Yapım olduğunda ise bazofilik sitoplazmalı ve büyük hale geçerler. Yaşlandıklarında asidik hale değişirler. Osteoblastların aktivitesini gösteren en önemli belirteç alkalen fosfatazdır. Sitoplazmaları bol miktarda alkalen fosfataz enzimi barındırmaktadır. Mevcut kalsiyumun, kalsiyum fosfat halinde matrikse çökmesini sağlar ve bu durum kemik mineralizasyonuna, matriksin kalsifikasyonuna ve kireçlenmesine bir katkı ile sonuçlanır. Osteoblastların yeni salgıladıkları ancak kalsifiye olamamış matrikse osteoid denir.

Osteoblastların gelişim basamaklarında preosteoblast, osteoblast, osteosit ve kemiği saran hücre şeklinde sınıflanan dört olgunlaşma fazı gözlenir. Preosteoblastlar mezenkimal hücrelerden gelişirler, alkalen fosfataz pozitif boyanırlar, kalsifiye doku meydana getirme özellikleri mevcut değildir. Osteoblastlar preosteoblasttan gelişim gösterir kübik formdadır, bunlar da alkalen fosfataz pozitif boyanır. Osteoblastlar tip 1 kollajeni ihtiva eder, osteokalsin ve alkalen fosfatazı sentezler (244). Sonraki aşamada olgun osteoblastların yaklaşık %70'i planlı yıkılırken, kalanların bir miktarı osteositlere farklılaşabilir (73). Osteokalsinin, osteonektinin ve osteopontinin yer aldığı non kollajen matriks içinde bulunan proteinler vasıtası ile metabolik düzenleme işlevini (osteokalsin)(ocn), kemik oluşumu işlevini (osteonektin)(on) ve yeniden şekillenme işlevini (osteopontin)(opn) gerçekleştirir. Bütün bu proteinler osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir (154, 193, 199, 253, 273, 377).

2.1.4.3. Osteoklast Hücreleri

Osteoklastlar; rezorpsiyon görevini üstlenen büyük, çok çekirdekli (5-50) makrofaj, monosit ailesi üyesi olarak karşımıza çıkan, hemotopoietik hücre kökenli, büyüklüğü mineralizasyonun fazlalığı ile orantılı, hareket potansiyeli bulunan bir hücrelerdir. İçinde bulundurduğu hücre sayısı mineral çökmesi ile bağlantılıdır. Haversian kanal sistemi içinde endosteal yüzeylerde ve periost altında bulunur. Monosit füzyon hücresidir. $1\mu\text{m}^3$ dokuda 2-3 tane bulunur. Yeniden şekillenmede ve mekanik etkenlerle ilişkili olarak yıkım görevi almaktadırlar (193, 273, 377, 393).

Osteoklastlar, hareketli evre ve rezorpsiyon evresi olmak üzere iki evrede yer alırlar. Hareketli evrede, kemik iliğinden yıkım alanına göç etmekte iken rezorpsiyon evresinde yıkımı gerçekleştirirler. İki evrede birbirlerinden farklı yapısal özellikleri mevcuttur. Hareketlide daha düz ve pürüzsüz yüzeyliken rezorpsiyon evresinde daha polarize, pürüzlü ve düzensiz yüzeye sahiptirler. Hücreler asidik boyanır, sitoplazmalarında bol miktarda lizozom ihtiva eder; lizozomal enzimleri, kemik dokusuna bakan tarafta ve çok sayıdaki uzantıları ile hücre dışına vererek kemikleri yıkmaya çalışırlar (248, 398). Osteoklastlar, H^+ iyonu ve katepsin K enzimlerini salgılayarak, asit fosfataz, kollajenaz gibi proteolitik enzimlerle kemik yıkımını gerçekleştirir (73). Kemik yapımı esnasında, trabeküllerin yüzeylerine veya kompakt bölümün iç tarafında yerleşip yıkımı sağlar; bu sırada aynı anda osteoblastlar yeni kemiği üretirler. Bu sayede kemik dokusuna uzama ve genişleme veya yıpranan ve yaşlanan kısımları ortadan kaldırıp yeniyi oluşturma imkanını doğurur (398).

Osteoklastlar kemik iliği kaynaklıdır ve kan dolaşımı yoluyla kemiklere erişmektedir. Bu hücreler çeşitli uyarıların etkisi ile (reseptörler, kemokin, sitokin vb) rezorpsiyonun sürdüğü ve oluşacağı modelleme birimine doğru çekilirler. Progenitör hücreler, makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve reseptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) moleküllerinin uyarısı yolu ile osteoklast öncü hücrelerine dönüşürler (40). Aynı zamanda RANKL ile osteoklastların aktive olduğu düşünülmektedir. Rezorpsiyon bitince osteoklast hücresinin yaşamı son bulur veya kaynak olan hücreye farklılaşır. Osteoklastların etkileri, bifosfanat ile, kalsitonin hormonu, östrojen hormonu ile azalmaktadır; paratiroid hormonu ve tiroksin hormonu ve D vitamini ile artmaktadır (30, 139, 193, 199, 273, 393).

Kemik üzerine kuvvet geldiğinde veya hasar oluştuğunda osteositlerin uyarısı sonucu osteoklast öncü hücrelerinin kemik yüzeyine göç ettikleri teorisi mevcuttur. Katabolik reaksiyonda RANKL'in uyardığı, osteoklast oluşumunu başlatan yine kökeni RANKL olan osteositlerdir. İskeletsel gelişimde RANKL üretiminden sorumlu olan kondrositler ve osteoblastlardır. Monosit, makrofaj ailesine ait ve kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar, anabolik reaksiyon görevini üstlenen osteoblast denetimindedir. Osteoblastın sentezlediği RANKL, M-CSF ve osteoprotegerin; osteoklastların farklılaşmasının denetiminde rol üstlenirler (292, 296).

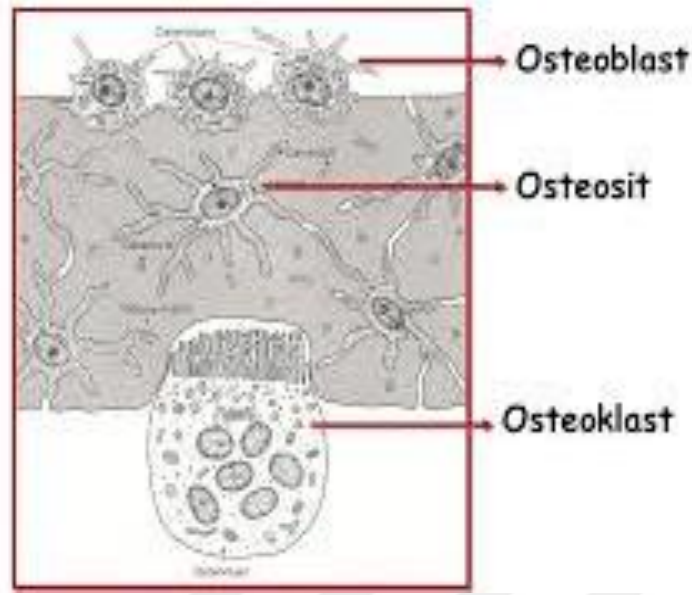
2.1.4.4. Osteosit Hücreleri

Olgun iskelet içindeki kemik hücrelerinin %95'ini oluşturan, mezenkimal kökenli, 25 yıl kadar ömrü olan, kalsifiye matriks içinde yer bulan ve metabolik işlevleri yavaşlayan osteoblastlardan farklılaşmış, şekil olarak yassı ve oval olup granüllü endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve koyu kromatin barındıran, bölünemeyen hücrelerdir.

Osteoblastlar, salgılanan osteoid doku içinde gömülü bir şekilde kalırlar ve matriks kalsifiye hale gelince faaliyetlerini yavaşlatıp şeklen basıklaşarak osteosit haline dönerler. Osteoblastlar ve osteositler bölünemeyen hücrelerdir (113, 128, 193, 273, 275, 328, 367, 377, 393, 398).

Bazı sitokin ve sklerotin proteinlerinin üretimini üstlenen osteositler, kavun çekirdeği şeklindeki lakünlere yerleşmişlerdir. Sayı olarak osteoblastların yaklaşık 10 katı kadarlardır. Osteositler; mekanik stimülasyonlara cevabı, formasyon ve rezorpsiyon sürecini denetlemekte olup osteoklast ve osteoblastların fonksiyonlarını organize eder. Mekanik olarak stimüle edilen osteositler kendi aralarında küçük boşluk bağlantıları (gap junction) ile iletişimde dirler. Gap junctionlar iyon geçişine sitoplazmik uzantılarla müsaade ederek bu iletişimi sağlamakta, besin maddelerini ve hormonları içeren doku sıvısı sitoplazmik hücreden hücreye geçmektedir. Böylece kan damarlarından uzaktaki osteositlerin beslenmeleri sağlanmış olur. Matriks bu hücreleri birbirlerinden uzaklaştırmaktadır. Osteositler olası kemik yaralanmasında osteoblastlara formasyon gösterebilirler. Kemik yaralanması osteosit göçünü stimüle eder. Apoptoz da denen bu göç sonrasında kemik yapımı ve yıkımı sağlanır ancak osteositler; osteoblast hücrelerinin kalsiyum tuzlarının birikimi sonucu görülen osteoid madde içinde kalır (273, 328). Yaşlanıp ölen osteositlerin oldukları yerlerdeki matriks bozulur ve osteoklastlarla rezorbe edilir. Kemik matriksi kalsifiye olduğundan madde alışverişi osteositler üzerinden işlemektedir. Osteositler, osteoblastlar ile birlikte mineralize inorganik apatitleri de barındırmaktadır (342, 367, 398, 402) (Şekil 2-9).

Kemik üzerine gelen kuvvetin devamlı ve sürekli olması ostrojen hormonu sonrasında takım hücrelerin azalması veya kaybı, uzun dönemli glukokortikoid hormonu ile muamele ve yaşlanma osteosit sayısını azaltan faktörlerdir (193, 194, 198, 220, 273, 299, 377).



Şekil 2-9: Kemik hücreleri; osteoblast, osteosit, osteoklast (402)

2.2. Kemik Dokusunun Oluşumu ve Gelişimi

Erken fetal dönemde mezenkimal yoğunlaşmalar iskeletsel gelişimi başlatmaktadır. Kemik yapımına aynı zamanda kemikleşme adı verilir. Bu aşama daha sonrasında endokondral veya intramembranöz kemikleşme ismi verilen kemik oluşum mekanizmaları ile devam etmektedir. Ana yapı bakımından intramembranöz kemikleşme direkt kemik oluşumu olarak isimlendirilen, bağ dokusunun oluşturduğu bir iskeletin yeni kemik oluşumuna yardımcı olduğu, endokondral kemikleşme ise kıkırdak matriks vasıtası ile gerçekleşen dolaylı kemikleşmedir. Kıkırdak dokusunun meydana getirdiği iskelet yapı yeni kemik ile yer değiştirir (193). Bu iki yolla da ilk gelişen kemik primer kemik olup zaman içerisinde yerini sekonder kemiğe bırakır. Kemik gelişimi döneminde primer, sekonder kemik ve rezorpsiyon alanları yan yana görülür (210, 430).

2.2.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu

İntramembranöz kemikleşme bağ dokusu aracılığıyla oluşturulan ve embriyodaki mezenkimal bağ dokusu yapısından farklılaşarak kemik haline dönüşen kemikleşmedir. Direkt olarak osteoblastlar tarafından salgılanan matriksin mineral maddesi haline gelmesiyle görülür (55).

İntramembranöz kemikleşme mandibulada, kafa kemiğinde, klavikulada karşılaşılan ve mini vida kullanılabilen kırık iyileşmelerinde görülür .

Fibröz bağ dokusuna osteoblast hücrelerinin kollagen matriks inşası ve kalsiyum fosfat çökmesi ile oluşmaktadır (398).

Mezenkimden kökenli embriyonel bağ dokusu sınırında gerçekleşen intramembranöz kemikleşmede membranöz kemik; kemik gelişimi olacak alana göç ettikten sonra morfodifferansiyasyon göstererek fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar ana görev olarak kollajen ağları meydana getirerek bağ dokusunu sentezlerler.

İç ve dış zarları oluşturduktan sonra mezenkimal hücreler, osteojenik ve osteoprogenitör hücrelere ve daha sonra da osteoblastlara farklılaşır, kemik matriksi salgılanmaya başlanır (63). Osteoblastik aktivite ile kollajen ve ara madde evresinde kemiğe lamelsiz kemik yapısı hakim olup primer spongiyöz kemik şekillenir. Ara maddede kalsiyum çökelmemiş olup osteoid doku bulunur. Zaman içerisinde kalsifikasyon şekillenerek osteoblastlar lakün içerisine yerleşir. Birçok ossifikasyon merkezinin birleşmesiyle spongiyöz kemik oluşur. Süngerimsi kemiğin şekilleneceği bölgelerde, trabeküller belli bir alanda sınırlı kalarak mezenkimal bağ dokusu kırmızı kemik iliği yönünde differansiye olur. Kompakt kemikte ise trabeküllerin üzerinde yeni yapımlar olup kemik kalınlaşır. Damarlar ve onu çevreleyen bağ dokusu sıkışır ve havers kanalları şekillenir (82, 308).

Kafatasının yassı kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı bölümleri bu tür kemikleşmeyle meydana gelir. Kafatası yassı kemiklerinde içi ve dışı kompakt kemik, orta kısmı ise spongiyöz kemik oluşturur (308).

İlk kemikleşen yer primer kemikleşme merkezidir. Merkezdeki osteojenik hücrelere mineral tuzları çökelerek kalsifikasyon başlar. Osteojenik hücreler osteoblastlara farklılaşmaktadır sonrasında primer kemikleşme merkezindeki hücreler mitoz bölünme göstererek osteoblast sayısını arttırmaktadır. Mineralizasyon döneminde ise kalsifiye olmuş osteoid madde içinde bulunan osteoblastlar osteositlere formasyon gösterirler (152, 193, 262, 297, 348). Kalsifiye olmayan iç ve dış kısımlarda mezenkim periosteum ve endosteuma dönüşür.

2.2.2. Endokondral Kemik Oluşumu

Kıkırdak matriks içindeki kemik oluşumu olarak nitelendirilen endokondral kemikleşme, başlangıcı embriyonik yaşamda olan bitişi de büyüme tamamlanmasına kadar olan dönemde kıkırdaktan gelişen kemikleşmedir. Kafatası kemikleri hariç memeli iskeletinin çoğunluğu kıkırdağın yerini kemik dokunun aldığı endokondral kemikleşme ile meydana gelir (397, 435). Kıkırdak eskizden gelişim olduğu için indirek (dolaylı) kemikleşme olarak da adlandırılabilir. Buradaki kollajen matriks osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Daha sonra kan arteriyollerinin kaplanmasıyla kıkırdak yıkılır. Epifiz ve diyafizden oluşan uzun kemiklerdeki kemikleşme ile beraber kafa kaidesi, pelvis ve ekstremitelerde, tibia ve femurda, vertebral kolon kırıkların fiksasyon ile tedavisinde görülür (55, 193, 246). Osteoid sentezi, matriks mineralizasyonu ve yeniden şekillenme (remodelling) olarak üç temel aşama karşımıza çıkmaktadır (222).

Bu kemikleşmede ilk önce kıkırdak dokusu oluşur ve sonunda kemik dokusu ile yer değiştirir. Apozisyonel büyüme, görülen ilk basamak olup bu basamak ile birlikte boy artışı gerçekleşir. Endokondral kemikleşmenin ilk belirtisi uzun kemikte kıkırdak modelinin ortasındaki (diyafiz) kondrositin hipertrofisiyle kemik oluşumunun lokal bir genişleme göstermesidir (233). Kıkırdak yüzeyinde periost, kemik oluşturmaya başlamakta ve ardından mezenkim doku ve kan damarları gelişimi görülmektedir. Mezenkim doku osteoblastlara değişim gösterir. Hiyalin kıkırdaktan minyatür bir model oluşur, bunu takiben kıkırdak modelin yerini kemik doku alır. Kıkırdak doku damar ağları ile sarılır sonrasında aşamalı olarak yıkıma uğrar ve osteoblastlar kollajen matriks salgılamasını başlatır. Osteoblastların kendisi de matriks içinde gömülü kalıp osteositlere dönüşürler. Matriks üzerine kalsiyum fosfat çökerek mineralizasyon görülür (110, 193, 273, 377).

Ayrıca kıkırdak modelin diyafizinde, intramembranöz kemikleşme ile silindirik biçiminde bir kemik manşet oluşur. Kemik manşeti saran zar da artık, periosteum olarak adlandırılır. Normalde kıkırdak matriksi kan damarı içermediği için kıkırdak hücreleri, perikondriyumdaki kan damarlarından çıkan besin maddelerinin difüzyonuyla beslenir. Ancak kemik manşet şekillenince difüzyon engellenir ve böylece kemik manşetin çevrelediği alandaki kıkırdak hücrelerinin beslenemeyip bozulmalarına yol açar. Bozulmaya yüz tutan hücreler önce hipertrofi gösterir, peşinden de dejenere olmaya başlar. Hücreler dejenere olup yıkıldıktan sonra geriye sadece hücreler arasındaki

kıkırdak matriksi (kıkırdak çıkıntıları) kalır. Bu sırada periosteumda osteoklastlar belirir ve bunlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar, periosteumdaki kan damarlarının bir kısmı bu deliklerden girip, kıkırdak spiküllerinin arasında kalan boşluklara filizlenirler (82, 397).

Kemik matriksinin ifrazı osteoblastlar tarafından gerçekleştirilerek ile primer ossifikasyon merkezi modellenir. Bu merkezin büyümesi, periostal yapının epifizler tarafına gitmesi ile gerçekleşir. Aynı süreç tekrar edilir. Aynı zaman diliminde osteoklastlar aktiftir ve kemikleşmenin başlamasından beri kemik spiküllerini santral alanlarından itibaren yıkarlar, bu şekilde kemik iliği boşluğu oluşur. Kemik iliği boşluğunun alanı, kıkırdak modelin ossifikasyonu, uzaması, büyümesi bitene kadar epifiz tarafına doğru olur. Kıkırdak modelin ossifikasyonu ile kaybedilen kıkırdak dokudaki kıkırdak hücreleri diyafiz ve epifiz arasındaki kondrositlerin mitoz bölünme vasıtasıyla çoğalması ile tamamlanmaya çalışılır. Bölünmeleri mitozla olan ve bir sıra ile dikey yerleşen kondrosit hücreleri aynı zamanda paralelliği tespit edilmiş hücrelerden oluşan kordonumsu yapıyı oluşturur ve bunun diğer ismi izojen gruptur. Hücrelerin mitoz bölünmeleri ile sayılarının artışıyla kıkırdak taslak uzunluk olarak hep bir artış gösterir, bu işlemi de epifizler alandaki kemikleşme merkezinin ikincili takip eder. Kemikleşme merkezinin ikincilinde ossifikasyon diyafizde gerçekleşenden farklı olarak ışınsaldır. Işınsallık epifizlerin şişmiş hale erişmesine sebebiyet verir. Kemikleşmenin sınırı kısa ve uzun kemiklerin diyafizel alanları haricindeki epifiz alanına kadar olmaz ve ossifikasyonun olmadığı ve intakt kıkırdak alan oluşumu ile görülür. Büyüme işlemi tamamlansa bile bu bölge eklem kıkırdağı olarak varlığını sürdürür (82, 308). Kemikleşmenin primer ve sekonder merkezleri arasında uzamanın gerçekleşmesi için bulunan kıkırdak bir saha vardır bu sahanın adı epifiz plağıdır. Kemikleşme süreci bitinceye kadar sahadaki (epifiz plaklarındaki) kıkırdak hücreleri diyafizin doğrultusunda çoğalarak kıkırdak dokuyu meydana getirir (82). Uç kısım ile orta kısım arası komşuluğu ve bu iki oluşum arasındaki sınırı yapan öncü kemikleşme merkezidir. Kemik oluşumunun orta alanda başlamasıyla gerçekleşen süreç epifiz ve diyafiz yapısının oluşumudur. Epifiz yapısının ucunun ve ortasının arası büyüme plağıdır. Büyüme tamamlandığında kıkırdak oluşumu da bitmektedir. Epifiz ve diafiz birleşmesi büyüme plaklarının kemikleşmesi sonucunda gerçekleşir. Bu aşamadan sonra kemiğin uzama süreci sona ermektedir ancak kütleli kalınlaşma olabilir. Kemik dokunun büyümesi genetik, lokal veya sistemik faktörlere de bağlı bir şekilde

değişmektedir (273, 377). Endokondral kemikleşme, dolaşım yoluyla sıkı bir şekilde kontrol edilir. Kemikler son şeklini alıncaya kadar bir taraftan yeni kemik yapılır, diğer taraftan da yapılan kemiğin bir bölümü yıkılır. Bu, yeniden şekillenmedir (110, 111, 193, 308, 377).

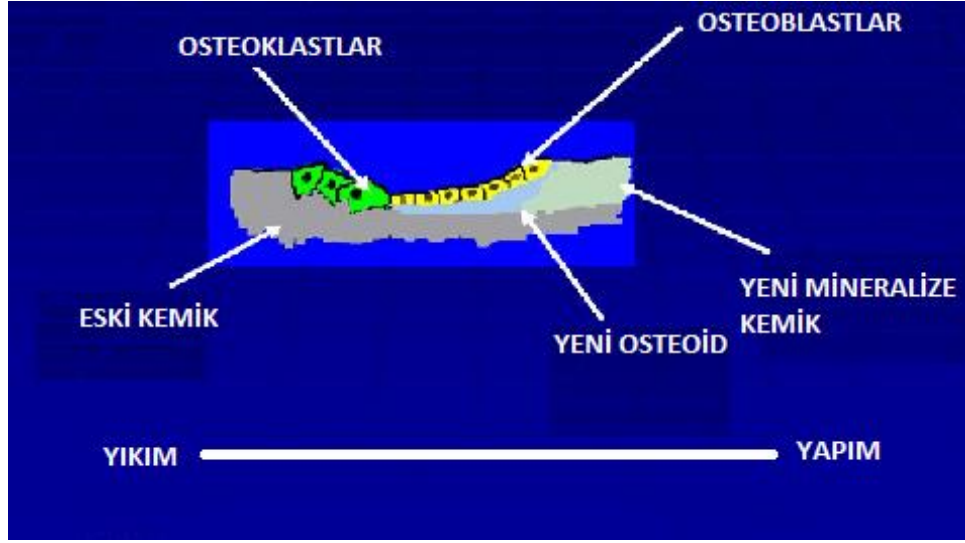
2.3. Kemik Yapım-Yıkım Mekanizması

Kemik, kendi varlığını sürdürmek, bütünsel olarak stabil durumunu korumak ve vücut kalsiyum dengesini korumak için sürekli olarak yapım ve yıkım göstermektedir. Kemik doku içerisindeki osteoblastlar ve osteoklastlar anabolik ve katabolik mekanizmalardan sorumludur. Doku içerisindeki organik matriksin mineralizasyonundan sorumlu osteoblast hücreleri ile çok çekirdekli makrofaj, monosit ailesi üyesi, yıkımdan sorumlu osteoklastların bir arada çalışması ile kemiğin yapım ve yıkım süreçleri bir döngü halinde ilerler. Süreci de kontrol eden hücreler arasında osteositler ve dolayısıyla osteoprogenitör hücreler de mevcuttur (57, 113, 402) (Şekil 2-10).

Anabolik ve katabolik sürecin devamı ve birbiri ile etkileşimde olması osteoblast ve osteoklast arasındaki otokrin ve parakrin hormonal mekanizmalara da etki eden proteinler ile gerçekleştirilmektedir. Bu proteinlerle düzgün bir koordinasyon sağlanır.

Monosit, makrofaj farklılaşma özelliği gösteren hücrelerden osteoklastların oluşumu, osteoblastlar ve osteositlerin düzenlemesi altındadır (57). Kemik anabolik katabolik döngüsünün doğru yönetimi, yaşlanmış ve travma ile karşılaşmış kemiğin aynı hacimdeki kemik ile yer değiştirmesi ile olabilir.

Bu süreç; osteoklastlar, osteoblastlar ile aynı zamanda yer alan dolaşım ve periferik innervasyondan oluşan birimler içinde gerçekleşir. İlk aşamada kemik osteoklastlar tarafından rezorbe edilir, geçiş süreci üç fazdan oluşur: Başlangıç fazında osteoklastlar kemiği yıkar, geçiş fazında rezorpsiyon sonrasında yeni kemiğe dönüşüm gerçekleşir ve kemik oluşum fazında ise yeni kemik osteoblastlar tarafından yapılır.



Şekil 2-10: Kemik yapım, yıkım döngüsü (57)

2.4. Kemik Şekillenmesi

Kemik büyümesi ve şekillenmesi beraber olan bir döngüdür. Büyüme önce fonksiyonel ve mekanik ihtiyaç ile başlayan sonra bir takım etkenler ile birlikte yol alan bir süreçtir. Şekillenme anabolik ve katabolik (yapım ve yıkım) süreçleri ile ilgilidir. Erişkinliğe doğru anabolik faaliyetler katabolik faaliyetlerden fazla olmaktadır. Yaşlılıkta katabolizma anabolizmadan fazla olmaktadır. Büyümeyi, anatomik yapıyı, formunu ve mekanik özelliklerini formasyon belirlemektedir. Kompakt alandaki kalınlık artışı ilik boşluğunun genişlemesi ve uç kısımların formasyonu bu yapıya bağlıdır (103). Mekanik kuvvetler değiştiğinde şekillenme ile kemik yapısı kuvvete bağlı olarak yön ve şekil değiştirebilir. Kemik üzerine kronik ve eşik değer üzerinde kuvvet geldiğinde bu mekanik uyarana bağlı olarak direnç ve ağırlık artarak kırık oluşmasının önüne geçilir, kalınlık artar kemik kompaksitesi yükselir. Kuvvet eşik değerinin altında olursa yapım mekanizması kalınlaşma ve direnç artışı olarak değişmez. Eşik değerinin çok üstü olan akut kuvvetler de kırığa yol açar (192).

2.5. Kemik Defektleri

Kemik devamlılığının ve bütünlüğünün değiştiği durumda organizma ve kemik dokusu kendi devamlılığını sağlama adına fizyolojik bir süreç başlatır. Bu süreçte kırık veya defekt alanı farkedilemeyecek şekilde herhangi bir skar dokusu olmaksızın tamamlanmaktadır. 0,2 mm ye kadar olan kortikal kemik defektleri lamellar kemikle

iyileşme gösterirken büyük defektlerde yeniden değişim ve formasyonel dönüşüm görülmektedir (127, 306).

Kemik defektleri kendi içlerinde ana sınıflama olarak dörde ayrılmaktadır. Bunlar;

1) Limitli defektler (%20'den daha az):

- a. Diafizyel
- b. Metafizyel
- c. Epifizyal

2) Temasta olan defektler:

- a. Anatomik yapıların birbirleriyle tam temasta olduğu defektler
- b. Anatomik yapılarda boyutsal kısalma olmayan limitli bir şekilde temasta olan defektler
- c. Anatomik yapılarda boyutsal kısalma olan limitli bir şekilde temasta olan defektler

3) Temasta olmayan defektler:

- a. Boyutsal kısalma olmayan segmental defektler
- b. Boyutsal kısalma olan segmental defektler
- c. Subtotal defektler

4) Artiküler defektler:

- a. Epifizyal defektler
- b. Epimetafizyal defektler
- c. Epimetadiyafizyal defektler
- d. Amputasyon defektleri

olarak sınıflandırılabilir.

Ağız içerisindeki defektler Glickman tarafından 1964 yılında tanımlanıp sınıflandırılmıştır. Bu sınıflamada osseoz kraterler, kemik içi defektler, bulboz kemik konturları, hemisepta defektleri, normal anatomik yapı ile uyumsuz kemik marjinleri,

normal anatomik yapı ile uyumsuz kemik çıkıntıları ve horizontal kemik kayıpları kendine yer bulmaktadır. Pritchard'ın 1965'te yapmış olduğu sınıflamada ise interproksimal kraterler, normal anatomik yapı ile uyumsuz kemik marjinleri, hemisepta defektleri, furkasyon kaybı görülen defektler, kemik içi defektler ve bu sayılan defektlerin kombinasyonları yer almaktadır.

Kemik dokusunda bir defekt meydana geldiği zaman çevredeki yumuşak dokuda ve kemik içinde bir hemoraji meydana gelir. Defekt alanı hemorajik dokularla dolduğunda kanın pıhtılaşma mekanizması ve daha sonraki proseslerde kemik iyileşmesi başlamış olmaktadır. İltihabi aşamanın başlamasının ardından defekt alanı deoksijenize ve asidik bir hal almaktadır. Patolojik yıkımla birlikte lizozomal enzimler ortamda serbest bırakılır ve anında yıkım ile birlikte nekrotik alan oluşumu ile karşılaşmaktadır. Defekt sahası mast hücreleri, makrofaj hücreleri ve lökositler açısından zenginleşir. İyileşme anında salgılanan mediyatörler de yapım rolü üstlenen rejeneratif hücrelerin yapımının uyarılmasını sağlar. Aynı zamanda çevre dokulardan da planlı hücre göçü başlamaktadır. Makrofaj, monosit ailesinin hücreleri bu bölgedeki nekroz dokuları ortadan kaldırmaya başlamaktadır. Bu aşamadan sonra yara alanının organizasyonu periost ve endosteumdaki kemik dokularından vasküler ağlar ile defekt alanına hücrelerin girmesiyle devam etmektedir. Granülasyon dokusu olarak adlandırılan bu yapı yumuşak kallustur. Bu yapı fibroblast, kondroblast, osteoblast ve vasküler ağların içinde barındığı bir kollajen ve glikoprotein matrikstir. Kallus kendi içinde dış ve iç olmak üzere ikiye ayrılırken dış kallusta kemik yapım hücrelerinin sentezlenme yerleri bulunur. Kemik yapım hücrelerinin sentezlenme yerleri periostun osteoblastik tabakasındadır. İç kallusta ise endosteal hücrelerin sentezlenme yerleri bulunur. Organizasyon aşaması olarak adlandırılan bu süreç 3 ila 4 haftalık bir dönemi kapsamaktadır. Bu dönemden sonra yumuşak kallus, sert kallus rejenerasyonuna dönmektedir. 2. ve 3. aya kadar olan bu dönemde kemik dokusu örgü kemik haline dönmektedir ve yapı düzensiz bir hal almaktadır. Hücre sayısının artışı, proliferasyon ve ortamdaki vaskülarizasyon bu aşamalarda devam etmektedir. Dönem ilerledikçe vaskülarize alan devaskülarize bir alan haline dönmektedir. Osteoblastlar rol alarak osteoid maddeyi sentezler, pH artmaya başlar. 10. günden itibaren alkali fosfataz üretimi olmakta ve osteoid içinde mineralizasyon ve kireçlenme görülmektedir. Düzensiz olan bu yapı ile osteoklastlar sınırı düzenlemekte ve düzenli bir form oluşturmaya devam etmektedir. Bu aşama yıllar boyu sürebilir.

İntraoral defektler var olan natürel oklüzyonun bozulmasına, organizmanın gerekli besin desteği almasının sekteye uğramasına, yeterli alınamayan besinler sonucu metabolizmanın bozulup hastalık gelişimine, defekt alanında daha sonraki süreçte kuvvetsizlik ve fonksiyonsuzluk atrofisi oluşmasına, kontur kaybına, maksillomandibular bütünlükte fonksiyonların yerine getirilememesine, buna bağlı olarak da estetik kayıplara yol açmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı intraoral defektler ve intraoral kayıplar kısa sürede yerine konmalıdır. Bu eliminasyon ile iyileşmenin hızlanması dişsizlik sürecinin kısılması, bozulan oklüzyonun sağlanması ve erken fonksiyonun yerine getirilmesi önemlidir.

Kemikte doku üzerine kuvvet geldiğinde veya hasar oluştuğunda osteositlerin uyarısı sonucu osteoklast öncü hücrelerinin kemik yüzeyine göç ettikleri teorisi mevcuttur. Katabolik reaksiyonda RANKL'in uyardığı osteoklast oluşumunu başlatan RANKL'in kökeni olan osteositlerdir. İskeletsel gelişimde RANKL üretiminden sorumlu olanlar kondrositler ve osteoblastlardır. Monosit, makrofaj ailesine ait ve kemik yıkımından sorumlu osteoklastlar, anabolik reaksiyon görevini üstlenen osteoblast denetimindedir. Osteoblastın sentezlediği RANKL, M-CSF ve osteoprotegerin osteoklastların farklılaşmasının denetiminde rol üstlenirler (159, 280, 292, 296).

2.6. Kırık İyileşmesi

Kemik üzerine gelen yük veya travma kemiğin direnç gösterebileceği dereceden fazla ise kırık görülmektedir. Formasyon, remodelling ve fizyolojik uyum ile kırık onarılır (121, 159, 280, 314, 318, 368).

2.6.1. Primer Kemik İyileşmesi

Açık repozisyon ve sabit osteosentezde internal kallus ile devam ederek görülen primer kemik iyileşmesi; mekanik stabilizasyonun olmadığı kemik iyileşmesi olarak görülmektedir. Doğal akışta fraktürün iyileşmesinde çok seyrek olarak primer iyileşme karşımıza çıkmaktadır. Segmentler arası hareketsizliğin varlığında anatomik redüksiyon olduğunda dokuların kan ile buluşmasında bir engel mevcut değilse kallussuz, osteoblast ve osteoklastların etkinliği sonrasında görülen iyileşmedir. Kansellöz kemikte

karşımıza çıkan bu durum kemiğin uzun eksenine paralel şekilde düzenlenen osteon üretimi ile meydana gelmektedir. Fraktür; tam denge sağlandığında primer iyileşmektedir. Bu iyileşmede biyomekanik şartların oluşması gerekmektedir (315).

Kırık hattının iki tarafından da osteojenik hücre ve vasküler damarlar çoğalmaya başlar, yapının olacağı yerde yıkım da aynı düzende ilerleyeceği için osteoklastlara farklılaşma da görülebilir. Hücreler havers kanallarının genişlemesiyle yollarına devam etmekte kanal içine osteoblastlar göçerek lamel oluşumunu gerçekleştirmektedir. Osteonlarla yer değiştiren internal kallus sonrasında havers kanallarının oluşumu sürecinde sabit ve sürekli bir osteosentez gereklidir. Radyografide kallus görülmez (17, 44, 58, 157). Kırık alanları birbirleriyle tam temas edecek veya aralarında boşluk kalacak şekilde iyileşme gösterebilir.

2.6.1.1. Tam Temasla (kontakt) İyileşme

Kırık segmentleri arasındaki açıklık 0,01 mm'den fazla değilse primer iyileşmede segmentler arası gerilim %2'den fazla olmamaktadır ve tam temasla (temaslı) (kontakt) iyileşme görülür (364). Kırık alanına yakın yerdeki osteonların uç kısımlarında kesici konik uç (cutting cone) yer alır. Tepe kısımlarında yer alan osteoklastlar fraktür hattı boyunca 50-100 mikrometre/gün hızında nekroz kemik dokusunu katabolize eder, vaskülarizasyona ve osteoprogenitör hücrelere yer açar. Haversiyan sisteminin vaskülarizasyonu ile mezenkimal kök hücreleri buraya transfer olur. Köprü görevi üstlenen osteonlar olgunlaşıp yeniden şekillenerek lamellar kemiğin yapılmasına imkan tanır. Tüm bunların sonucunda periosteal kallus oluşmaksızın iyileşme gerçekleşir.

2.6.1.2. Boşlukla (gap) İyileşme

Primer iyileşme sırasında anatomik redüksiyonda kırık segmentleri arası 800 nm - 1 mm'den fazla değilse görülen iyileşme boşlukla iyileşmedir (264). İlk olarak kırık sahasında lamellar kemiğin oluşumu uzun aksa dik şekilde olmakta ve vaskülarize olan osteoprogenitör hücreleri barındıran osteonlar, üretimi 3 ila 8 hafta boyunca devam ettirmektedir. Bu yeniden şekillenme süreci kemik dokusunun biyomekanik ve anatomik özelliklerinin karşılanabilmesi için gereklidir (264).

2.6.2. Sekonder Kemik İyileşmesi

Bir çok kırıkta görülen kemik iyileşmesi sekonder kemik iyileşmesidir. Kemik alanları arasında bir stabilite olmadığında görülen bu iyileşmede öncelikle alanlar arasında yumuşak kallus oluşur daha sonrasında yumuşak kallus sert kallusa döner.

Fraktür alanında periosteal bölgenin altında intramembranöz kemikleşme vasıtasıyla medüller sert kallus kırık hatlarının uç kısımlarında ve periostun dış kısmında endokondral kemikleşme yolu ile yumuşak kallus oluşur.

Defektlerde görülen kemikleşme sekonder kemikleşmedir. Radyografide kallus görülür. Başlangıç – kırıkta kallus – kemik kallus ve yeniden şekillenme olarak 4 evreden oluşur (121).

2.6.2.1. Başlangıç Fazı (Hematom Fazı)

İnflamasyon fazında hasar sonrasında medüller arası ve çevresel hemoraji ile birlikte alanda kemik iliği hücrelerinin de yer alan bir hematoma oluşmaktadır. Bu süreçte beraber inflamatuvar reaksiyon da tetiklenir.

İnflamatuvar cevabın yanında fraktür çevresinde ve fraktürün uçları arasındaki hematoma yapısında pıhtılaşma ile varlığı görülen fibrin, tamirde görev alacak hücrelerin alana planlı göçünü kolaylaştıran yapı görevi üstlenmekte ve plateletler de bu anda büyüme faktörlerini salgılamaktadır.

Hematopoietik kök hücrelerinin ve büyüme faktörlerinin kökeni hematomdur. Hasarın gerçekleştiği alandaki bütünlüğünde zarar oluştuğunda osteositler ve bölgedeki matriks dokusundaki inflamatuvar mediyatörler (TGF β , IL 6 [(IL): (interleukin) (interlökin)], IL 17, IL 18, IL 23, TNF α [tumor necrosis factor α - tümör nekrotizan faktör]) damarların kontraksiyonunun azalmasına vazodilatasyona ve inflamatuvar hücreleri alanda istiflenmesine sebebiyet verir (lenfosit, PMNL, makrofaj) (PMNL: polimorfo nuclear leukocytes - polimorf nükleer lökosit).

İnflamatuvar sitokinlerin geniş sürede serbest bırakılması kemik dokusu üzerine negatif etkilere sebebiyet vermektedir. Ancak az zaman zarfında planlı ve kontrol altındaki inflamatuvar cevap fraktürün iyileşmesinde ciddi ve gözardı edilemez bir önemdedir. Akut inflamatuvar cevap 24 saatlik süreçte en üst düzeye ulaşmaktadır ve bir haftalık süreç sonuna kadar devam etmektedir (69). İlk dönemde IL-6, IL-11, IL-18

ve TNF α seviyelerinde yükseliş görülmektedir. İlk günün sonunda TNF α en üst düzeye ulaşmaktadır. 72. saatte ise standart düzeyine inmektedir, kemotaktik etki ile birlikte ikincil enflamasyona sebep olmaktadır (136). Mezenkimal ve enflamatuvar hücrelerin formasyonunu stimüle edici tesirlerini osteoblast ve osteoklast üzerindeki TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1 - tümör nekrotizan faktör reseptörü 1) ve TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2 - tümör nekrotizan faktör reseptörü 2) reseptörleri yoluyla göstermektedir. Kırığın iyileşmesinde fazla sayıdaki interlökinlerin tesiri mevcuttur ancak bazı interlökinlerin özellikle IL-1 ve IL-6'nın diğerlerine göre biraz daha kritik önemde oldukları bilinmektedir. Makrofajlar vasıtası ile IL-1 seviyesinin yükselmesi IL-6'nın osteoblastlardan serbestlenmesini arttırmaktadır. Bunlar da kırıkta kallus gelişimini ILR1 (interleukin receptor 1) (interlökin reseptörü 1) ve ILR2 (interleukin receptor 2) (interlökin reseptörü 2) reseptörlerinin uyarımını sağlayıp vaskülarizasyonu yükseltir. IL-6 yalnızca akut süreçte salgılanmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörünün (vasküler endotelial growth faktörü) salınımını stimüle edici, vaskülarizasyonu, osteoklast ve osteoblast formasyonunu uyarıcı bir etki oluşturmaktadır (224). Periost tabakasının iç kambiyumunda etraftaki komşu dokularda ve sistemik dolaşımdaki mezenkimal stem hücrelerinin varlığı önemlidir. Mezenkimal hücrelerin sayı artışından sorumlu olan kemik morfojenik proteinlerden (bone morphogenic protein) (KMP-BMP) BMP-2 ve BMP-7'dir (126, 255). İnflamasyon sürecinde zarar görmüş olan ve nekroze dokular yıkılır, sitokinler ile birlikte yeni damar oluşumu uyarılmaktadır. Kırık alandaki kemiğin içerdiği osteoprogenitör hücreler, mezenkimal hücreler, endosteal taraftaki osteoblastlar ve fibroblastlar çoğalarak granülasyon dokusunu oluşturur.

Onarım fazında karşımıza kırıkta kallus, damarlanma ve mineralizasyon, kırıkta kallus rezorpsiyonu çıkmaktadır.

Kırıkta kallus aşamasında zarar görmüş olan dokuların kapladığı alanı yavaş yavaş iyileşme dokusuna bırakmasıyla beraber BMP-2'nin mezenkimal hücrelerin sayıca fazlalaşmasının yanında mezenkimal hücrelerinin formasyonunda ve migrasyonunda kritik rolde olduğu bilinmektedir. Sekonder iyileşme sürecinde hem endokondral hem de intramembranöz kemikleşme görülmektedir. Hematom formasyonunun sonrasında fibrinden zengin granülasyon dokusu meydana gelmektedir. Kırık hatlarının karşı karşıya geldiği uç noktalarda, orta alanda ve periostun dış

kısımında endokondral kemikleşme görülmeye başlamakta ve fazla miktarda fibröz ve kıkırdak doku barındıran yumuşak kallus oluşmaktadır. Vakit geçtikçe kıkırdak matriksin üzerinde mineral birikimi ve kondrositlerin planlı yıkımı, vaskülarizasyon, osteoblastların çoğalmaları ve endokondral kemikleşme vasıtasıyla sert kallus forme olmaktadır. Bazı eksperimental çalışmalarda yumuşak kallusun 7. ila 9. günlerde başladığı ve matriks içinde tip II kollajen düzeyinde ve proteoglikan seviyelerinde sayıca fazlalık olduğu görülmüştür (106). Bu süreçle beraber kırık alanında periost altı alanda segmentleri birbirlerine bağlayan intramembranöz kemikleşme vasıtası sonucu sert kallus oluşumu görülmektedir. İntramembranöz kemikleşme sürecinde mezenkimal hücreler osteoblastlara formasyon göstermektedir ve direkt kemik oluşumu görülmektedir.

TNF- β oluşturduğu etki ile birlikte kıkırdak dokusunun ortamda görülmeye başlaması ve endokondral kemikleşme stimule edilirken intramembranöz kemikleşme için gerekli hücre sayısı artışı oluşturarak BMP-5 BMP-6 'dır (69).

Damarlanma fazında kemik kırık hatlarının düzgün füzyonunun sağlanabilmesi, olması gerektiği gibi iyileşmenin görülebilmesi için revaskülarizasyonun (yeniden damarlanma) olması gerekmektedir. Endokondral kemikleşmede kondrositlerin programlı yıkımı ve hücrelerin ve matriks dokusunun ortadan kaldırılması vasküler ağın alana doğru büyümesi ve hareketini sağlar. Vaskülarizasyon; vasküler endotelial büyüme faktörü ve anjiyopoetin ile ilişkili olarak iki yolak ile gerçekleşir. İyileşmenin başlangıç safhalarında anjiyopoetin I ve II düzeyi yükselir (247). Osteoblastlardan ve büyük hacim oranında kondrositlerden salgılanan vasküler endotelial büyüme faktörü, vaskülarizasyonda önemli bir görev üstlenmektedir. Vasküler endotelial büyüme faktörü mezenkimal hücrelerin sayıca artışı sağlamayı uyarmakta, damarların içeri girişine imkan tanıyarak damar içermeyen kıkırdak dokusunun damarlı kemik dokusuna formasyonunu sağlamaktadır. Yeni damar oluşumunda BMP'ler (bone morphogenic protein) (kemik morfojenik protein) ve vasküler endotelial büyüme faktörü birbirlerinin etkilerini arttırmaktadır ve fiziksel bir uyarı fraktür alanında VEGFR2 reseptörü yoluyla anjiyojenik tesir oluşturur (203).

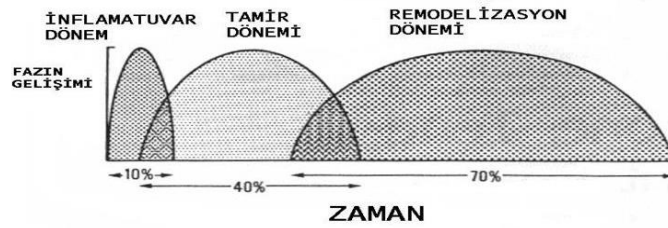
Mineralizasyon ve kıkırdak kallus rezorpsiyonu fazında yumuşak kallusun sert kallusa dönüşümü aşamasında RANKL, MCSF (monosit koloni uyarıcı faktör), TNF- α ve OPG etkisiyle mineralize olmuş kıkırdak dokunun yıkımı başlamaktadır. OPG,

MCSF'nin ve RANKL'in (reseptör activator kappa β ligand) örgü kemiğin anabolik reaksiyonunda osteoklast ve osteoblastlar dahilinde bir etki oluşturduğu ortaya konan teorilerdendir. Ana yıkıcı mediyatör olarak görülen TNF α kondrosit yıkımı ile birlikte mezenkimal stem hücrelerini stimüle edici görevi de mevcuttur (136). Kalsiyum parçacıkları hücreler arası alandaki matrikse transfer edilerek fosfat ile füzyon sağlanır. Bu parçacıklar kallustaki kondrosit sitoplazmalarından elde edilmektedir. Bu aşama sonrası minerallerin depo edilmesi sağlanmaktadır.

Kallus dokusu içinde kondrositlerin sitoplazmasında mevcut bulunan ve alanlarından ayrılan kalsiyum molekülleri, hücrelerin dışındaki matrikse transfer edilerek fosfat ile füzyon kurar ve mineralin depolanması başlar. Kalsiyum ve fosfat birleşimi ile birlikte bu materyalin rezervlerinden apatit kristalleri meydana gelmektedir. Araştırmalar sonucunda elde edilen bilgi osteonektin, tip I kollajen, alkalin fosfataz ve osteokalsin düzeylerinin incelenmesiyle sert kallus içi mineralizasyonun en fazla 14. günde tepe noktaya ulaştığı öğrenilmiştir (106). Sert kallus oluştuğu örgü kemik kendi yerini mineralize kıkırdaktan alır ve iyileşme dokusu fiziksel olarak daha rijit (katı) olur. Kırık hatlarında füzyon oluşana kadar, kortikal kemik kısımlarında bütünlük sağlanana değin onarım devam etmektedir. Bunun gerçekleşmesinin miktarı, hacmi, hızı, şekli ve içerik özellikleri farklılık barındırabilir. Kemiğin maddesel özelliği kortikal veya kansellöz strüktürü etraftaki yumuşak dokusunun vermiş olduğu destek ve stabilitiye göre iyileşme değişmektedir.

Yeniden şekillenme aşamasında sert kallus; kemiğin o bölgedeki fiziksel sabitliğinin devamını sağlayan daha katı ve esnemez bir yapı özelliği göstermesine rağmen kemiğin normal biyomekanik özelliklerini barındıramamaktadır. Sert kallusun normal kemik yapısına dönmesi remodelling sürecine bağlıdır. Yıkım aşamasında IL-1 ve TNF- α düzeylerinde artış ile karşılaşılmalıdır (286). Sert kallusun katabolik mekanizmaya uğraması osteoklastlar ile sağlanırken yıkımın devam ettiği bu aşama sürecinde aynı zamanda lamellar kemiğin osteoblastlar tarafından yapılmasıyla dengelenmektedir. Fraktürün rehabilite edilmesi sürecinde 3-4 hafta sonrasında yeniden şekillenme süreci başlamaktadır ve bir ömür boyu devam etmektedir. Kemiğin içinde mevcut bulunan osteokalsin ve alkalin fosfataz seviyelerinin normale gelme dönemi yıllar sürmektedir (434). Kemiğin remodelling sürecinden sonra eski gücünün ancak %80'ine ulaşabildiği göz ardı edilmemesi gereken bir bilgidir. Alkalin fosfataz ve

osteokalsin değerlerinin seviyesi yıllar boyu istenilen düzeye gelemediği gibi ömür boyunca da osteoblast ve osteoklastların yapmış olduğu yapım yıkım reaksiyonları ve bu hücrelerin aktivite sinyalleri devam etmektedir (434). Kemikğin üzerine etkiyen kuvvetlerle, maruz kaldığı stresle ve travmalarla birlikte sürekli bir yeniden şekillenme süreci yaşanmaktadır. Aksiyel düzlem boyunca veya horizontal kuvvetler kemikğin değişik yüzeylerinde farklı elektrostatik değişimlere yol açarak belirli yerlerde örgü belirli yerde lamellar kemiğe, eksternal kallusun internal kallusa formasyon göstermesiyle sonuçlanır. Başarılı bir yeniden şekillenme süreci yeterli vaskülarizasyona, kemikğin maruz kaldığı kuvvetlerin dengeli dağılımına bağlıdır. Gerilme ve hidrostatik kompresyonlar kemikğin bölgelerindeki hücre ve doku değişiminin asıl belirteci olduğu yadsınamaz bir gerçektir.



Şekil 2-11: Kırık iyileşmesi (15)

Yaşlanma ile birlikte doğal olarak genç dönemdeki gibi dayanıklılık özelliği olamaz, azalmaya başlar. Yıkılan kemikğin yerine kuvvete bağlı olarak şekillenme amacının nihayi sona varması için yeni kemik yapılır. Şekillenme için önce yıkım olması şarttır (192, 250). Kortikal yapıda turnover 20 yıl, spongioz yapıda 1-4 yıldır. Yeniden şekillenme ile hasar onarımı gerçekleşir. Hücre üretimi yapılarak kalsiyum iyonunun metabolizması kontrol altında tutulur (43). Yeniden şekillenme kemikğin kalitesinde olumlu ve olumsuz özelliklerini gösterir. Mikro yerel baskı kuvvetleri kemik şekillenmesi ile kemik üzerindeki baskı alanlarının ortadan kalkmasını ve kemikğin buna göre şekillenmesini sağlar iken kortikal kalınlık direnci azaltabilir, yeniden şekillenmede perforasyon oluşturabilir ve porozite artabilir (53). Kemik yoğunluğu ve denge için yeniden şekillenme önemlidir (152).

Defekt oluşumu sonrasında defekt alanına komşu yüzeylerde kan damarlarında ve dolayısıyla etraftaki yumuşak dokuda hasar ve laserasyon görülebilir. Hasar, kanın azalmasına sebebiyet verirken bunun sonucunda da mikro dolaşımın bozukluğu

hipoksiye, hipoksi ölüme yol açmaktadır. Ölüm alanı ile aseptik nekroz enflamasyonla ve ödemle devam eder (53, 280, 349). İyileşmenin ilk basamağı kanama ve sonrasında gelişen hematomdur. Kanamanın hematoma dönmesinin ardından kan pıhtısının içindeki vasküler elemanlar ilk iyileşme basamağı için çok gereklidir. Hematom daha sonra fibroz yapıya döner, fibroz yapının oluşumunda kollajen dokusu da kendine görev bulmaktadır (159, 314, 322). Enflamatuvar yanıt sonrasında gelişen reaksiyonel süreçte hematom içindeki öncü hücreler yani alana çeşitli hücre göçleri ile farklılaşma özelliği olan hücreler; osteoblastlara, kondrojenik hücreler ve fibroblastlara farklılaşırlar. Fibroblastlardan kollajen sentezlenir. Tüm bu yapı sonrasında granülasyon dokusunu meydana getirir (58, 121, 243, 348, 368).

2.6.2.2. Kıkırdak Kallus Fazı

Kıkırdağın kalsifiye olup kondroblastların kondrositlere dönüştüğü eksternal yoldur. Bu, kıkırdak kallus aşaması olarak isimlendirilir. Bu dönüşüm sonrasında osteoblastların sayısı da artmaktadır. Osteoblastların olduğu her yerde osteoklastlar görüleceği için bu yıkım hücreleri de kendilerine yer bulurlar (53, 121, 280). Eksternal kallus oluşumu internal kallusa paralel şekilde gelişir. Kırık uçlarının arasında da osteoblastlar oluşmaya başlar ve oluşumlarına devam eder. Kanlanma ile birlikte nekrotik alan diğer iyileşmelere göre daha azdır. Bu evrede kondroblastlar büyüme faktörü salgırlar. Tip II kollajen ve hyaluronik asit salgılanması da görülmektedir (53, 121, 322).

2.6.2.3. Kemik Kallus Fazı

Oluşan kıkırdak kallusta vaskülarizasyon da artmaya başlar. Vaskülarizasyon ile oksijenizasyon, diffüzyon ile beslenme artışı görülmektedir. Alana göç eden osteoblastlar, osteoid madde sentezler ve kalsifikasyonla kemik oluşur. Tanımlanan kemik, primer kemiktir (53, 121, 280, 314, 322, 348, 368).

2.6.2.4. Yeniden Şekillenme Fazı

Kemik kallus oluşumundan sonra hayat boyu devam eden yeniden yapılanma görülür. Tüm süreç yeniden şekillenme ile sürekli bir devinime girer. Başlangıç fazındaki yeniden şekillenme ile aynı süreçtir (53, 121, 280, 314, 322, 348, 368).

Kemik defektinin ve kemik kırığının varlığı, kırığın seviyesi, mevcut durumu, yapım yıkımının seviyesi, kırığın iyileşme aşamaları için kullanılan en yaygın objektif parametre radyografi ve radyografik takiptir. 4 kortikal tabakalanmadan en az üçünün kortikal köprülenme yapması kırık iyileşmesinde birinci kriter olarak kabul edilmektedir (140, 141 ,142).

Kırık, kemik ve defekt iyileşmesinde bu zamana kadar bir çok radyolojik skorlama sistemi kullanılmıştır ancak hangisinin daha efektif olduğu ile ilgili görüş birliği sağlanamamıştır (43, 331, 369, 404). Yapılan bir araştırmada bu zamana kadar yalnızca çalışmalardan %2'sinde kemik, defekt veya kırık iyileşmesinde hem radyolojik hem klinik muayenenin kriterlerinin beraber kullanıldığını açıklamışlardır (78). Radyografik değerlendirmede en sık faydalanılan; ilgili bölgede kallus doku köprüleşmesidir bunu da 3 korteks köprüleşmesi ve kortikal bütünlüğün izlenmesi takip etmektedir (105, 420).

Direkt radyografi dışında radyonüklid görüntüleme, bilgisayarlı tomografi, ultrasonografi ve rezonans frekans analizleri kırık iyileşmesini göstermede iyi sonuçlar vermişlerse de, klinik uygulamaları pahalı ve zordur (112, 135, 278, 347, 370, 399). Son dönemlerde en çok uygulanan kriter kallus alanının köprüleşmesi, kırık veya defekt birleşim yerinin üç düzlemde de köprüleşmesi ve hattın radyografik olarak görülemeyecek kadar silinmesidir (83, 103, 207, 278). Kortikal bütünlük devamı torsiyonel kuvvetlere karşılık verilebilmesi için güçlü bir parametre olduğu ancak kallusun nispeten daha zayıf bir gösterge olduğu düşünülmektedir (24, 310). Kabul edilen bir kriter de yeni kemik formasyonunun tespit edilmesi, kemik oluşum alanlarının kaybolması ve yeniden şekillenmenin tespiti (239, 310).

2.7. Kemik Yapım Yıkım Metabolizmasını Değiştiren Faktörler

Genetik faktörler çocukluk ve ergenlik döneminde; oluşan kemiğin %60'ı ila %80'inden sorumludur. Ergenlik dönemi ve menapozda diğer belirleyici faktörler olarak karşımıza hormonal faktörler çıkmaktayken hormonal faktörler yaşam boyunca da etkisini sürdürmektedir.

Beslenme ile elde edilen kalsiyum, fosfor, florür, A, C ve D vitaminleri gibi bileşenler; kemik gelişimi ve metabolizmasını önemli derecede etkileyen besin faktörleridir (402). Vücudun kalsiyum ihtiyacı arttığında veya kan kalsiyum düzeyi düştüğünde, gerekli kalsiyum kemiklerden sağlanır. Bunun için hormonal faktörler devreye girer.

Sistemik hormonlar ve lokal olarak üretilen sinyal faktörleri PTH (paratiroid hormonu) ile ilgili protein (PTHrP) ve bunların reseptörü PTH1R, fibroblast kaynaklı büyüme faktörü 18 (FGF-18) ve reseptörü FGFR3, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), insulin benzeri büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, kemik morfojenik proteinler (BMP'ler), transforme edici büyüme faktörü; büyüme plağındaki kondrositlerin çoğalmasında ve farklılaşmasında defekt oluşumu veya kırık benzeri durumlarda ve kemiğin hacimsel bütünlüğünün korunmasında büyük rol oynamaktadırlar (53, 121, 368, 435).

2.7.1. Kemiğin Hücresel İşlevlerini Düzenleyen Sistemik Faktörler

2.7.1.1. Paratiroid Hormon (PTH) ve Kalsitonin

PTH, kalsiyum homeostazının en önemli regülatörüdür. Paratiroid hormon, vücutta kalsiyum metabolizması üzerine etkisi olan, paratiroid bezlerce salgılanan, etkisini böbrek üzerinde gösteren, organizmada karmaşık etkiler ortaya çıkaran hormondur. Serum kalsiyum konsantrasyonlarını; kemik rezorpsiyonunun stimülasyonu, renal tübüler kalsiyum reabsorpsiyonunun artışı ve renal kalsitriol üretiminin artışı ile korumaktadır. Kemikte yeniden şekillenme sürecinde etkilidir. Yeniden şekillenmede sürecindeki rolü kritiktir. PTH'ın aralıklarla organizmaya salınması veya dışarıdan aralıklarla verilmesi kemik oluşumunu stimule eder. Kesintisiz bir şekilde verildiğinde ya da salgılandığında ise osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonunu stimule eder (236). Osteoblastlar, PTH reseptörlerini barındırırken

osteoklastlar içerisinde böyle bir reseptör yer almamaktadır (250, 273). PTH, osteoklast sentezlenmesini arttırarak matriks metalloproteinaz (mmp) oluşumuna da sebebiyet vermektedir. PTH sentezinin, osteoklast farklılaşmasını düzenleyen molekülleri aktive ettiği düşünülmektedir. Bu süreci başlatan tümör nekrotizan faktör ailesine ait olan RANKL'dır. Osteoblast öncülerinde de yer alan RANKL'ın hem PTH eksikliğinde hem östrojen azlığında üretimi artmaktadır. Yıkımın yanında yapımın da olması bu süreçte PTH'ın dolaylı etkisi ile osteoblast konsantrasyonunun artışı da sağlanmış olur (240). Direkt etkisini ise osteoblast öncülerinin kimyasal aktivatörlerini uyarak sonrasında osteoblast üretimi ile ve programlı hücre ölümünü önleyerek yapmaktadır. PTH aynı zamanda makrofaj koloni uyarıcı faktörü de uyarak monosit ailesinden olan osteoklastı ve osteoklastogenezisin oluşumunu da etkilemektedir. Bu hormonun aşırı salgılandığı durumlarda ise kalsiyum aşırı derecede boşalır, rezorbe edilen kemiğin yerini fibröz bağ dokusu alır, bu patolojik duruma osteitis fibroza (vonrecklinghausen hastalığı) denir (136, 186, 283, 429).

Kalsitonin ise kemikten materyal emiliminin önüne geçer, kandan kemiğe mineral ürünlerinin geçişine sebebiyet verir. PTH'ın mekanizmasının tersi şeklinde etkisi vardır. Tiroid bezindeki parafoliküler hücreler tarafından salgılanır. Sekresyonu iyonize kalsiyum tarafından düzenlenir ve iyonize kalsiyum miktarı arttıkça kalsitonin salınımı artar. Parathormonun tersine matriks resorpsiyonunu inhibe eder. Osteoblastları aktive ederek kemik yapımını sağlar, böylece kalsiyum kandan kemiğe geçer (116).

2.7.1.2. Steroid Reseptörleri, Glukokortikoidler, Östrojen ve Androjen

Hücre yüzeyinde olduğu gibi hücre içinde etrafı membranla kaplanmış organellerde de reseptörler mevcuttur. Bu reseptörler hücre içi aktif sinyal moleküllerinin ortaya çıkışıyla ilgilidir. Steroid hormonlar hücresel düzeyde etkilerini D vitamini, retinoik asit ve tiroid hormonlar gibi hücre içi reseptörler üzerinden gerçekleştirirler. Bu reseptörler;

GR: Glukokortikoid reseptörü (NR3C1)

MR: Mineralokortikoid reseptörü (NR3C2)

PR: Progesteron reseptörü (NR3C3)

AR: Androjen reseptörü (NR3C3)

ER: Östrojen reseptörü (NR3A1-2)'dürler.

Steroid reseptörleri ile ilişkilendirilen uzantılar yağda çözünebilen hücrelere ve çekirdeklere taşıyıcı proteinler ile taşınır (197, 300, 427).

Kemik rezorpsiyonunu engelleyen hormonal oluşum olarak görülen glukokortikoidlerin PTH ve IGF-I (insulin like growth factor) (insulin benzeri büyüme faktörü) hormonu ile etkinliği artmaktadır. PTH katabolik prosesi aktifler. Osteoblastların üzerine negatif etkili oldukları tespit edilmiş olup programlı hücre ölümüne sebebiyet verirler. Glukokortikoid fazlalığının; iskelet kas sisteminde doğrudan kemik hücreleri üzerine etkisi olması beklenirken vasküler ağ ve hücreler arası etkileşimin kesilerek kemik kuvveti azalması arasında da bir etkisi mevcuttur (300). Direkt etki hücrelerde karşımıza çıkar, kemik anabolik ve katabolik hücrelerin üretimlerini azaltır. Osteoblast ve osteoklast hücrelerinin planlı ölümüne sebebiyet verir bunun yanında da osteoklastların yaşam süresini uzatır (126, 343).

Testosteron (androjen) ve östrojen hormonları: Hayat boyunca iskelet gelişim ve kemik üzerine doğrudan bir etkiye sahiptirler. Erkeklerde testosteron seviyesi, 40 yaşından sonra her yıl yaklaşık %1,6 oranında azalmaktadır. Testosteron eksikliği yaşayan erkeklerde, hipogonadizme bağlı infertilite dışında, obezite, insülin direnci, dislipidemi, hipertansiyon ve osteoporoz gibi metabolik sendromunda da geliştiği belirlenmiştir. Kısacası steroid hormonlar kemik yıkımını engeller, kemik yapımını stimüle eder. Steroid hormonların kemik doku üzerindeki bu regüle edici etkisine karşılık, kemik doku da gonadları osteokalsin aracılığıyla regüle eder (93). Kemik kütlelerinin korunmasında görev aldığı bilinen östrojenler yapımı ve bazı durumlarda yıkımı engelleyici bir işleve yol açar. Androjenler gelişim döneminde kemik yapımını tetiklemekte, eksikliğinde de rezorpsiyon olduğu ortaya çıkmaktadır. Dişilerde postmenapozal dönemde gerçekleşen östrojen eksikliğine bağlı olarak, osteoporoz riskinde artış görülmektedir. Menapoz sonrasında kemik rezorpsiyonu %90 iken kemik yapımı %45'dir. Bu yüzden özellikle menopozdan sonraki ilk yılda aşırı kemik yıkımı gerçekleşir. Östrojen hormonunun azalmasında IL-1, IL-6 gibi yıkımla ilişkilendirilen interlökinlerde artışa sebebiyet verdiği belirtilmiştir. Östrojenlerin osteoklast apoptozisine TGF ile sebep olduğu da belirtilmiştir.

2.7.1.3. Somatotrop Hormonu

Hipofiz ön lobu tarafından sentezlenir, birçok fonksiyonu ile birlikte kemiğin büyümesini uyarır, özellikle epifiz plağı üzerine etkilidir. Büyüme döneminde bu hormonun azlığı durumunda cüceliğe (pituitary dwarfism), fazlalığında ise gigantism denen aşırı büyümeye neden olur. Yetişkinlerde bu hormonun fazlalığı, epifiz diski kemikleşmesi sonucunda uzama olamayacağından, kemiklerin kalınlaşmasına neden olur, buna akromegali adı verilir (116).

2.7.2. Yerel Düzenleyici Faktörler

2.7.2.1. Prostaglandinler

Oksijenden zengin doymamış yağ asidi olarak karşımıza çıkan prostoglandinler organizmada farklı fizyolojik görevleri ve patolojik durumlarda rolleri olan bir hormondur.

Fibroblastlar, eritrositler, lökositler, trombositler, lenfositler ve makrofajlarda üretilmektedirler. Süt, menstrüel ve seminal sıvı ve amniyotik sıvıda varlığı ortaya konmuştur. 1970’li yıllara değin kemiğin yıkımından PTH sorumlu tutulurken 1970 yılında yapılan bir çalışmada PTH’nın adenilat siklazı stimüle ettiği belirlenmiştir. Buna ek olarak prostoglandin E₂’nin PTH ile aynı şekilde osteoklastların aktivasyonunu artırarak kemik yıkımına yol açtığı tespit edilmiştir (302).

2.7.2.2. Büyüme Faktörleri

Kemik matriksi bu büyüme faktörlerinin deposu olarak nitelendirilebilir. Büyüme faktörleri, inflamatuvar hücrelerin osteojenik hücelere ve anabolizmaya katkı vererek kemik iyileşmesine yardımcı olur (21, 190, 387). Bu faktörler de migrasyona, kemotaksiye, proliferasyona ve mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşmesini sağlar (250).

2.7.2.3. TGFβ (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta)

Kemik iyileşmesi ile birlikte iltihabi reaksiyonda görev alır ve dokunun rejenere olmasına yardımcı olurlar. Tüm hücrelerin yüzeyinde bu faktöre ait reseptör vardır.

Osteoblastlarda sentezlenen, makrofaj hücrelerinden salınan, en güçlü kemotaktik faktördür. Ekstrasellüler matriks ve platelet ana kaynağıdır. Endokondral kemikleşmede ekstrasellüler matrikste birikir, ekstrasellüler matrikste birikimi ile kollajen, proteoglikan ve fibronektinin yapımını artırır. Granülasyon dokusu oluşumunu başlatır (214, 216).

2.7.2.4. FGF (Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü)

Fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri kemik yapımında kritik görev üstlenen proteinlerdendir (302). Araştırmalarda FGF 2, 4, 9, 18'in, yapımı sağlanan yeni kemikte hücrelerin çoğalmasında önemleri ortaya konmuştur (185, 365, 417). Fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri osteoblast hücrelerinin çoğalmasında bir uyarıcı olduğu da tespit edilmiştir. Dolaylı olarak osteogeneze de katkı verir (185, 417). Osteoblastların farklılaşp çoğalmalarında bir etkisi olduğu, bu etkinin alkalen fosfataz ve osteokalsin matriks proteinlerinin üretimiyle sağlandığı ve RUNX2 (runt-related transcription factor 2) (runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü) serbestlenmesini gerçekleştirerek oluşturduğu belirlenmiştir. Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü kemikte enine genişleme ile karakterize süreçte önemli bir protein olup gerilim direncinin artmasını sağlamaktadır (250, 324).

2.7.2.5. PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)

Özellikle kan sirkülasyonu düzeninde travma ve defekt alanında, kırık sahasında yerini alır. Makrofaj ve monositlerin bölgeye migrasyonunu stimüle etmektedir. Defekt veya kırık alana lokal uygulama yapılması kallusun yoğunluğunu ve hacmini dolayısıyla da ağırlığını da arttırmaktadır. Fibroblastların etkinliğini arttırarak kollajen sentezini sağlamaktadır (16, 214, 216).

PDGF bağ dokusunun oluşumu için hücresel aktivatörlerden biridir. (156, 158, 160, 167). Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün üzerinde etkiye sebep olduğu belli hücreler; fibroblastlar, arteriyel ve kapiller endotel hücreleri, glia hücreleri, arteriyel düz kas hücreleri ve bir takım lökositlerdir (156, 158, 160). Yara alanının iyileşmesi, santral sinir sisteminin gelişimi, erişkinliğe ulaşınca değin vasküler sistemin gelişimi, embriyogenez, plasentanın gelişimi, glikogenez gibi temel fizyolojik mekanizmaların

yanında inflamasyon tepkimeleri, keloid oluşması, karaciğer fibrozisi, kemik iliğinin ve akciğerin fibrozisi, ateroskleroz, donör hücreleri ile konak arasındaki reaksiyonu (graft vs host), romatoid artrit ve skleroderma gibi aşırı duyarlılık reaksiyonlarında ve tümör proliferasyonunda rolü mevcuttur. Düz kas ve fibroblast hücre proliferasyonunu stimüle ederek yara iyileşmesine katkı vermektedir. Granülasyon dokusu oluşumu ile birlikte bağ dokusu hücreleri matriks proteinlerini sentezler (156, 160, 167). Vasküler ağda güçlü bir vazokonstriktördür. Planlı hücre göçünü de uyarmaktadır (156, 158, 160, 167).

2.7.2.6. Somatomedin C

Diğer adı insulin büyüme faktörü 1 olan somatomedin çocukluk büyümesini ve erişkinlerde yapıma yönelik mekanizmaları uyaran bir hormondur. Matriks oluşumuna yardımcıdır ve kondroblastlar üzerine etkindir.

2.7.2.7. EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)

Kemik döngüsünü hızlandırırlar (214, 216). Epidermal büyüme faktörü iyileşme dokusunda mevcut bulunan keratinositlerin, fibroblastların ve vasküler endotel hücrelerinin proliferasyonunu uyarmaktadır. Aynı zamanda kemik metabolizmasında geri emilim reaksiyonlarını arttırmaktadırlar. Yara alanında mevcut olan hücrelerin yeni vasküler ağ oluşumu ile ekstrasellüler matriks çoğalmasını ve olgun hale gelmesini sağlamakta aynı zamanda granülasyon dokusunu oluşturmaktadır. Miyofibroblastların aktive edilmesi ile yara yüzeyinin kasılarak küçülmesini sağlamaktadır. Epitel hücrelerinin programlı göçü ve migrasyonu ile yara alanının yeniden doku ile kaplanmasını sağlamaktadır (48).

Vasküler geçirgenliğin artışı ve hemodinamik etkileri: VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü); damarsal sızıntının fazlaşmasına sebebiyet vermekte ve bu özelliğinden dolayı vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) (vascular permeability factor) ismiyle de anılır. Patolojik bir süreç hali olarak karşılaşılan inflamasyon olgularında temel görev üstlenmesinin ana nedeni geçirgenliği arttırmasıdır (358).

2.7.2.8. CDGF (Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü)

Köken olarak kondroblastı alır. Özellikle tip II kollajenin ve hyaluronik asitin düzenleyicisidir. Kondroblast hücre proliferasyonunu da uyaran bu faktör kıkırdak ekstrasellüler matriks sentezinin oluşmasına ve uyarılmasına katkı vermektedir.

2.7.2.9. ECDGF (Endotelyal Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörü)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü ailesi ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü ailesinin bir alt üyesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Endotelyal doku tarafından salgılanan ve fizyolojik mekanizmalarda görev üstlenirken patolojik hastalıkların etyopatogenezinde, tümör rahatsızlıklarının proliferasyonunda ve büyümesinde rol oynar. Sentezlenmesi sonrasında yeni vasküler ağlar görülmektedir.

Kemik iliği hücreleri ve hematopoeze etkileri şu şekildedir: Primer olarak makrofaj ailesinden monositlerin alana göçüne destek verdiği belirlenmiştir (113). Makrofaj, granülosit öncü hücrelerinin olgun alt üyeleri ile füzyonunu ve koloni kurmasını stimule etmektedir. B lenfosit hücre sentezini ve olgunlaşmamış kemik iliği hücrelerinin de uyarılmasına yardımcı olur (48, 214, 216).

2.7.2.10. BMP (Kemik Morfojenik Protein)

Transforme edici büyüme faktörü β (TNF- β) tarafından salgılanan sinyal protein olan kemik morfojenik proteinlerin hedef hücreleri ise mezenkimal kaynaklı kök hücrelerdir. Mezenkim kaynaklı kök hücreler bu protein reseptörlerinin hepsini bünyesinde barındırır (229). Kıkırdak matriks üretiminden sonra kondrosit hücreleri kendi hücre sikluslarını tamamlarken son aşamalarda hipertrofiye uğrarlar, kalsifikasyon ile matriksin kemikleşmesine maruz kalırlar. Bu aşamaların hepsi ortada bulunan osteoblast hücrelerinin damarlanması ile mümkündür. Tüm bu süreçte de kemik morfojenik protein aktif olarak görev almaktadır (206).

2.8. Kemik Yapım Yıkım Mekanizmasının Bozulduğu Durumlar

Yeni kemik oluşumunu ile birlikte gerçekleşen kemik yıkımı her iki metabolik faaliyetin birbiriyle olan ilişkisi ile mümkün hale gelmektedir. Ancak bu şekilde sistem bir bütün olarak çalışmasına devam etmekte ve dokunun mineral bütünlüğünün devamı sağlanmaktadır. Denge durumunun yıkıma doğru kayması kemik kaybına sebebiyet vermektedir. Bu kemik kaybı etkenin lokal veya genel olmasına göre farklılık barındırır. Yıkımın tolere edilebilenden fazla olması kemik kırıklarına sebebiyet vermektedir (39).

Yapım ve yıkım mekanizmasındaki değişikliğin tolere edilebilenden fazla olması durumunda osteopeni, osteoporoz veya osteopetroz klinik tablosuna sebebiyet verebilmektedir. Bu döngünün gidiş yolunun bilinmesi hastalıkların prognozunun kontrol altına alınması açısından önemlidir (232).

2.8.1.1. Osteoporoz

Kemiğin anabolik ve katabolik sürecinde durumun yıkıma doğru kayması osteoporozu ortaya çıkarmaktadır. Bu da kemiğin kütsel olarak azalması ile birlikte kırılğan hale erişime vermektedir. Östrojen seviyesinin azlığı, kalsiyumun noksanlığı ve yaşa bağılı faktörlerin dışında menapoz sonrası kadınlarda veya yaşlı ileri erkeklerde görülen osteoporoz primer osteoporozdur. Bundan başka hastalıklarda veya çeşitli ilaçlara bağılı gelişen osteoporoz ise sekonder osteoporozdur (389).

Femur boyundaki mineral yoğunluğu ölçümü ile osteoporoz tanısı konulabilmektedir. Bu bölgedeki mineral yoğunluğu değerin (t skoru olarak adlandırılır) en çok -2,5 olması osteoporoz hastalığının teşhisi ile sonlanmaktadır. Değerin daha düşük olması hastalığın şiddetini arttırmaktadır. Kemiğin aşırı kırılğanlığı ile ve fazla sayıdaki kırıkla ilişkilendirilir (75). T skorunun -2,5 ila -1 arasında olduğu durum osteopeni olarak nitelendirilebilirken normalden daha düşük mineral yoğunludur.

D vitaminin azlığı, genetik, durağan yaşam, kalsiyum eksikliği nedenler arasındadır (184, 205). Postmenapozal osteoporozda anabolik ve katabolik hız yükselmiştir, aslında patofizyoloji çok çeşitli olabilir ama altta yatan neden osteoporozun gidişatını belirlemektedir. Menapoz sonrasında yapım ve yıkım artmakta ama yapımdaki azalma sonucu asıl negatif yeniden şekillenme - rezorpsiyon dengesi

görülmektedir (398). Yaşlanma sonucu normal proseste vücudun yıkıma doğru gitmesi kütleli ve hacimsel olarak kemiğin azalması kırık oluşması ihtimalini yükseltir (184, 205, 330, 336, 406, 412).

2.8.1.2. Osteopetroz

Osteoklastların mekanizmasındaki bozukluğa eşlik eden artmış ancak işlevsiz kemik yoğunluğu fazlalığı ile görülen bir durumdur. Yine osteoporoz gibi çeşitli gen faktörleri bu tablonun gelişiminde rol alabilmektedir (RANKL, TCIRG1 mutasyonları asidifikasyon defektleri, karbonik anhidraz II mutasyonu ve 7. klorür kanal gen mutasyonu). Kesin tedavi kemik iliği transplantasyonudur (165, 212, 372, 373).

2.8.1.3. Paget Hastalığı

Sıklık bakımından osteoporozdan sonra birinci sırada gelen, normal sınırları dışına çıkan kemik anabolik katabolik reaksiyonlarının artışıdır. Artmış osteoklastik aktiviteyi, normal olarak artmış osteoblastik aktivite sonrası fazla miktarda kemik dokusu ile birlikte vasküler fibrotik doku ile değişim karakterizedir. Ağrı, deformasyon ve genişleme, kemik kırıkları; görülen semptomlar arasında bulunmaktadır. %1 osteosarkom görülür (369).

Osteoklastik dejenerasyon sonrası görülen paget hastalığında; rezorpsiyon görülmekte, osteoklast boyut, hücre miktarı artması, RANKL ve 1,25(OH)D₂ D₃'e aşırı yanıtla karşılaşılmaktadır. Rezorpsiyon sonrası kemik yapımında da artış karakterizedir. Yeni kemik son derece sklerotiktir (295).

Endokrin, otokrin ve parakrin salgısı olan maddeler dışında nörotransmitterle de kemik yapımı ve yıkımı kontrol altında tutulmaktadır. İskelet doku içindeki kanal sistemi, damar ve sinir ağ yapısı pek çok nörotransmitterin, faktörün, hormonal sıvıların dokuya etki etmesine imkan tanıyarak iskelet metabolizmasında aktif rol oynamaktadır. Substance P sinir lifleri, vasoaktif intestinal peptid, kalsitonin, gene bağlı protein, n metil aspartat salgılanmaktadır. Santral sinir sistemi içerisinde ise hipotalamus ve beyin sapının, kemik döngüsünde etkili olduğu düşünülmektedir (298). Kemik metabolizması için de bir diğer faktör immün sistemdir. Kemik hücreleri ve otoimmün sistem hücreleri arasındaki etkileşim, yapımı ve yıkımı yönlendiren hücrelerin (osteoblast ve osteoklast)

farklılaşmasını ve aktivitesini düzenlemektedir. Otoimmün hastalıklarda kemik kayıpları ve patolojik kırıklar bu yönlenmeyi göstermektedir (163).

2.9. Kemik Defektlerinde ve Kırıklarında Kullanılan Greftler

Kemik defektleri ve kırıklarının rehabilitasyonunda normal organizma sürecinin hızlanmasını sağlayabilme, defekt ve kırık alanındaki iyileşmenin etkinliğinin artırılabilmesi, fizyolojik sürecin kısaltılabilmesi, daha çabuk bir şekilde fonksiyonun sağlanabilmesi ve estetik hedefler amacıyla değişik materyallerden faydalanılmaktadır.

Travma, kuvvet, kırık, enfeksiyon hastalıkları, tümör ve genetik bozukluklar sonucu oluşabilen kemik defektlerinin, kemik kırıklarının rejenerasyonu vücut fonksiyonlarının ve olası estetiğin devamı için gereklidir. Ancak pozisyonu, sebebi, büyüklüğü ve seçenekleri bakımından restorasyonları zor olabilmektedir. Rejenerasyon amacıyla çoğu zaman greft kullanılması gündeme gelebilmektedir. Bu defektlerde kullanılan greft seçenekleri otojen greftler, allojenik greftler, ksenojen greftler, alloplastik greftlerdir. Otolog kemik; osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerini kendi içinde barındırdığı için altın standarttır ancak otogreft yerine daha çok allojenik greftler veya sentetik greft materyalleri kullanılabilmektedir. Bu greftlerin etraflarındaki yüzeye bağlanma, hücre göçü sağlama gibi değişik özellikleri vardır. Bunlar osteointegrasyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenez olarak isimlendirilebilir. Osteointegrasyon; kemik yüzeyi ile greft arasında fibrotik doku olmadan kimyasal tutunmayı tanımlar. Osteoindüksiyon; bir çok hücreye farklılaşabilen kök hücrelerin etraftaki dokularda osteoblastik formasyona dönmelerini uyarmayı tanımlar. İndüksiyon için greft içine morfojenik proteinler ve kök hücreler ilave edilir. Bu biyoaktif maddeler direkt doku içine verilir. Bununla beraber çeşitli onarım hücrelerinin alana doğru göçünü sağlar. Oral cerrahide en çok kullanılan osteoindüktif materyaller kemik allogreftleridir. Değişik genetik yapıdaki insanlardan alınan dokularda karakterizedir. Osteokondüksiyon; greftin konulduğu kemikte damarsal ve damar yapılarının çevresindeki oluşumların greft alanına ilerleyebilmesi için çatı görevi üstlenebilen ve destek oluşturabilen yapıyı tanımlar. Sentetik greftler bu özelliktedir. Osteokondüksiyon yönteminde çözünebilir bariyer kullanılır ve bu, materyal içinde mevcuttur. Onarımda kullanılacak ise bu bariyerler sonrasında çözünür. Kemik dokusunun büyümesi apozisyonel kemik ile karakterizedir. Osteokondüksiyon; kemik veya farklılaşmamış

mezenkimal hücre mevcutsa olur. Osteogenez; greft çerisindeki hücre yapılarının nakilden sonra alıcı alanda yeni kemik oluşurabilmesi olarak tanımlanır. Osteogenezi oluşturan karakterdeki tek kemik otojen kemiktir. İçerisinde osteoprogenitor hücre barındırmalıdır. Oral cerrahide otojen kemik; iliak kemik, tuber maksilla, angulus – ramus mandibula kesişim yeri ve simfiz alanlarından elde edilir.

Greftlerin her biri en az bu özelliklerin birini barındırır. Tüm özelliklerin bir greft içinde toplanmaya çalışılması yeniliklerin peşisıra gelmesini ve maaliyetin azalmasına imkan tanır (119, 132, 151, 388). Tüm bu materyallerin genel adı biyomateryal olarak isimlendirilebilirken biyolojik ortama konan ve diğer dokulara uyumlu olup doğal veya sentetiktirler. Oral ve maksillofasiyal cerrahide defektlerde, kavitelerde travma sonrası gibi durumlarda sert doku kayıplarında kullanılmaktadırlar.

Son zamanlarda doku mühendisliğinin de katkılarıyla kemiğin rejenerasyonu günümüzde üzerine çalışılan konu haline gelmiştir. Kök hücre, sinyal molekülleri ve ekstrasellüler matriks yapılarının uygun çerçevede birleştirilmesi temel prensip olarak karşımıza çıkmaktadır. Kök hücre herhangi başka bir hücreye farklılaşabilen, yenilenme gücü olan hücre olarak tanımlanmaktadır. Rejenerasyonda kullanılan önemli hücre türlerinden biridir. Yetişkinlerden elde edilen formları özelleşmiş hücre grupları oluşturabilen, uygun ortamda kıkırdak, kemik, sinir, kas ve vasküler dokuları oluşturabilecek şekilde fibroblast, osteoblast, sinir hücresi, myoblast veya hematopoetik hücrelere forme olabilirler. Ekstrasellüler matriks ise çatı görevini üstlenerek diğer hücrelerin göç ve formasyonuna katkı verir (180). BMP, BMP-2, BMP-7, PRP ve PRF (platelet rich fibrin - trombosit zengin fibrin) osteogenez ve osteoindüksiyon vasıtasıyla rejenerasyonda en yaygın kullanılan faktörlerdir (327).

Doku mühendisliği de kondüksiyon, indüksiyon ve hücre transplantasyonu yöntemlerini içerir. Kondüksiyon ve indüksiyondan farklı olarak transplantasyonda ise vericiden elde edilen kök hücreler, polimer matriks yapıya yerleştirilir ve invitro olarak istenen doku oluşturulur. Rejenere olan bu doku daha sonra defekt kavitesine nakledilir. Bu kemik, maksillar–mandibular defektlerde ve damak yarıklarında, sinüs augmentasyonlarında ve kret augmentasyonlarında kullanılır (11, 41, 58, 187).

2.9.1. Otojen Greftler

Organizmada bir alandan başka bir alana transfer edilen greftlerdir. Diğer greftlere göre altın standarttır. Bu greftlerden kanselloz, vaskülarize olmayan kortikal, vaskülarize kortikal ve ilik olarak faydalanılabilir. Değişik oranlarda osteokondüktif, osteojenik veya osteoindüktif özellikleri vardır (303, 390). Kanselloz greftler kemik kayıplarında, fraktür tedavisinde, omurga kemik kaynaşması durumlarında tedavide kullanılmaktadır. Bu grefte osteojenik kemik ve ilik, osteokondüktif kollajen ve matriks proteinleri, osteoindüktif matriks proteinleri nakil edilir. Otojen nakil sonrasında greft içi hücreler osteoblastlara farklılaşır (52). Otojen kanselloz kemik grefti iliak kaynaklı olarak alınabilir.

Kortikal greftler otojen kanselloz grefte göre daha az biyolojik uyum sağlar. Kortikal kemiğin anatomik olarak porozitesinin çok az olması nedeniyle vasküler yapıların içeri ilerlemesi zordur. Aynı zamanda osteoblastik potansiyeldeki hücre sayısı da azdır. Nakil sonrası adaptasyonda sıkıntı yaşanabilir. Ama nakil işlemine direnç azdır (77). Mekanik etkenlere dayanıklılık göstermeleri ve büyük miktar alınabilmesi avantajları olarak görülebilir.

Kanselloz kemikler ise kortikalin aksine yük taşıma özelliği barındırmaz iyileşme mevcut greftin üzerine kemik birikimi ile olmaktadır. Sadece yüzeysel bölgesinde osteoblastlar yaşamaya devam edip yeni kemik oluşturur.

Mikrocerrahi sistemlerinin gelişmesi ile vaskülarize greftlerin kullanımları da artmıştır. Nakil sonrasında yapılan anastomozlar sonrası kemik ana hücreleri olan osteoidler yaşamını sürdürmeye devam etmektedir. Donör alanlar kosta, iliak köşesi fibula ve tibiadır (14, 77, 282).

2.9.2. Allogreftler

Boşluklu yapısında endotelial ve progenitor hücrelerin yapıştığı kimyasal ajanlar içerir. Eğer osteoklastlar tarafından katabolizmaya uğrarsa matriksleri içinde büyüme faktörlerini açığa çıkartırlar. Osteoindüktif özelliği kendinde barındırırlar. Mineral kaybına uğratılmaları matriks içindeki büyüme faktörlerinden yararlanımı arttırmaktadır. Mineralizasyonun kaybı çeşitli virüslerin greftin uygulanacağı hastaya geçmesini engeller (385). Demineralizasyon ile birlikte elde edilmiş greftin eriticilere maruz bırakılması antijen ve virütik hastalıkların geçmesini önlemektedir (390).

Allogreftlerin otogreftlere göre alıcı alanda oluşan morbidite azlığı, yeterli miktarda alınabilmesinin kolay olması, daha büyük hacimde alınabilmesi ve çeşitli materyal özelliklerinde elde edilebilmesi (toz, fiber, jel, macun) üstünlükleri vardır (77). En sık kullanılan allojenik kemik; mineralize ve demineralize dondurulmuş kemiktir. Osteokondüktif niteliğe sahiptir.

2.9.3. Kseno Greftler (Heterojen Kemik Grefti)

Herhangi bir canlıdan başka birine transfer edilen greftlere verilen addır. Osteokondüktif niteliktedir. Oral ve maksillofasiyal bölgede kendine fazla bir yer bulamamış olup etkilerini arttırma yönünde uğraşlar devam etmektedir. Yeni kemik için matriks çatı oluşturmaya yönelik etkileri vardır. Bir canlı türünden başka bir tür canlıya nakledilen greftlere ksenogreft denir (121).

2.9.4. Alloplastik Greftler

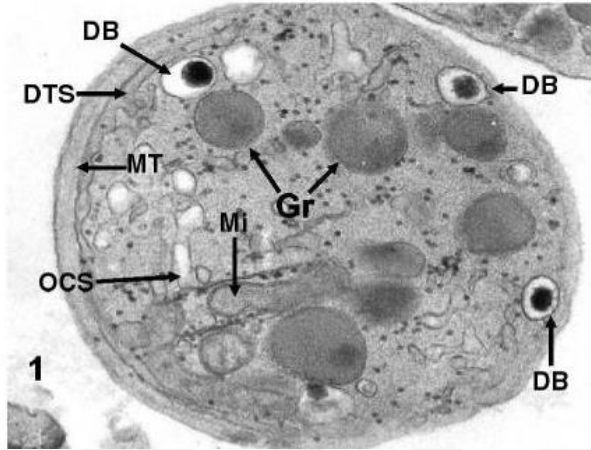
İnorganik olarak kemiğe benzeyen ama elde edilme yöntemi sentetik olan greftlerdir. Otojen greftlere benzer riskleri barındırmamaktadır. Elde edilmeleri kolaydır. Polimetilmetakrilat, poliortoester, silikon, biyocam, kalsiyum fosfat grubu seramik ve trikalsiyum fosfat örnekler arasındadır.

Dokudaki hastalıkların cerrahi olarak tedavisinde sağlıklı olmayan yapıların ortamdaki eliminasyonu ve mevcut durumun tekrarlanmasını önleyecek yeni şekle kavuşturulmasına yönelik rezektif tedavi uygulanabilir. Diğer bir yöntem de rejeneratif tedavidir. Rejenerasyon yöntemi son zamanlarda daha çok tercih edilir hale gelmiştir. Bunun bu yöne varmasının nedeni hasta beklentilerini iyi bir şekilde karşılık verebilmesidir. Bunun uygulanması amacıyla doku mühendisliği gelişimleri yaşanmış olup asıl hedef büyüme faktörleri haline gelmiştir.

2.10. Trombositler

Kan, vücuttaki kapalı vasküler sistem içinde bulunan, içerisinde dokuların ve hücrelerin beslenmesini sağlayan ürünlerin, hücrelerin ve dokuların yaşamını idame ettirebilmesi için gazların bulunduğu hormonal iletme ve hücreler arası iletişime katkı

veren, büyük çoğunluğu sudan oluşan bir bağ doku sıvısıdır. İçinde protein, glikoz, mineral iyonları ve vitaminleri barındıran hayati bir yapıdır. İçindeki hücrelerden ikisi kırmızı kan hücresi (eritrosit), beyaz kan hücresidir (lökosit). Bir de büyük ölçüde hemostazda rol alan trombosit mevcuttur. (Şekil 2-12).



Şekil 2-12: Transmisyon elektron mikroskopunda gözlenen insan trombosit hücresi. Salınan birçok granül (Gr), birkaç yoğun (delta) granül (DB), açık kanaliküler sistem (OCS), yoğun (delta) tübüler sistem (DTS). Glikojen (Gly), mitokondri (Mi), mikrotübüllerin sirkumferensiyal bandı (MT) (124)

Bir kan örneğinde hücresel elemanların dağılımı; %93 kırmızı kan hücresi ki eritrosit olarak isimlendirilir, %6 platelet, %11 lökosit hücresi şeklindedir (89). Plateletler küçük, çekirdeksiz, çapları yaklaşık 2 mm olan, bölünemeyen, yuvarlak veya oval biçimli, 300'den fazla faktör salgılayan ve kemik iliğinde megakaryositlerden derive ve ömürleri yaklaşık 5–9 gün olan hücrelerdir (272).

Koagülasyonda, yaranın iyileşmesi ve rejenerasyonunda alfa granül kaynaklı büyüme faktörleriyle görevlerini icra ederler. Periferel kanda tespitleri yapılabilmektedir. Makrofajlar ile yıkıma uğratılmaktadırlar (266). Vücutta sayı olarak kan mikrolitresi (μL) başına $1,5-4,5 \times 10^5$ olabilmesi için gün döngüsünde yaklaşık sayısı $1,5-4 \times 10^{10}$ olmalıdır (100). Metabolik aktif nitelendirilen trombositler yapısında 50-80 arasında sayısı olan; içinde trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- β), fibroblast kaynaklı büyüme faktörü (FGF), trombosit faktörü 4, interlökin-1, trombosit kaynaklı anjiyogenezis faktörü, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı endotelial büyüme faktörü,

von Willabrand factor (vWF), osteokalsin, osteonektin, fibrinojen, vitronektin, fibronektin, trombospondin-1, adenosin difosfat salınımı yapan, onları depolayan ve aktivatör görevi olan ve içinde adenosindifosfat, adenosintrifosfat, tromboksan A2, serotonin, dopamin, histamin, kalsiyum bulunmakta aynı zamanda sindirim enzimleri de yer almaktadır. Salgıladığı büyüme faktörleri ile hücre çoğalmasını stimüle edici sinyaller üreterek kemik tamiri, rejenerasyonu, fibroblastın değişimi ve yara anjiyogenezi artışı ile bağ dokusu iyileşmesinde rol üstlenir (99, 312, 437). Tüm faktörler hücrelerin formasyonunu, inflamasyonunu, rejenerasyonunu ve çoğalmasını uyarmaktadır (238). Trombositlerin en kritik görevi tromboz ve hemostazdır. Normalde vasküler duvara yakın şeklinde seyrine devam ederken endotel perforasyonunda veya endotel altı matriks açığa çıktığında veya çeşitli inflamatuvar olaylarda proteinlerin temasıyla beraber aktivasyon göstermektedir ve seyrini değiştirmektedir. Kollajenler ve von willebrand faktör; matrikse ve diğer trombositlere temas eder, trombositler kendi aralarında psödopotik bağlantı oluşturarak kümelenirler. Bu sayede trombosit pıhtısı oluşmaktadır. Alfa ve yoğun granüllerin içindeki moleküller salgılandıktan sonra plateletlerin ve diğer faktörlerin olay yerine migrasyonuna imkan tanınmaktadır. İlk pıhtı ile kaskad sistemi başlamaktadır. Fibrin tabakası meydana gelir ve trombüs oluşur (143, 272 432).

Dokunun hasara uğraması sonucu açığa çıkan plateletler vasküler ağ membranı ve subendotelyal fibriller ile temasa geçerler ve formları farklılaşır. Aktivasyonla beraber alfa granüller plazma membranına yapışır ve proteinler salınır. Aktivasyonda adenosin difosfat, adrenalin ve trombin yönetici faktörlerdir (437).

Meydana gelen hasar boyut olarak az olduğunda trombosit tıkaçı mevcut durumu kontrol altına almaktadır. Ancak geniş hasarlarda kan pıhtısının oluşumu gerekmektedir. Bu yapının aktivasyonu ekstresek ve intrinsek yollarla olur. Defekt geliştiğinde intrinsek yol aktive olur. Hasar almış dokulardan salgılanan faktörler mevcut bölgedeki kan teması sonrasında aktive olur. Hem intrinsek hem ekstresek yolda çeşitli faktörler salgılanır ve pıhtının oluşumuna kadar bir dizi reaksiyon birbirini takip eder. Bu iki yolak farklı faktörlerle başlasalar da belirli bir basamaktan sonra aynı yolda birleşirler.

Fibrinojenden fibrin oluşması sonunda polimerizasyon gerçekleşir. Bu mekanizmanın devamının tek yolu trombin ve kalsiyumun ortamda olmasıdır. Fibrin

pıhtı; fibroblast ve endotel hücreleri başta olmak üzere onarımda rol alan faktörlerin bölgeye planlı göçü sağlaması için ideal ortamı bir matriks ortamı oluşturur (290). İyileşme; büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks ile kontrol altında tutulan bir mekanizmadır.

2.10.1. İyileşme Aşamaları

Hemostaz, inflamasyon, proliferasyon (granülasyon ve kontraksiyon) ve yeniden şekillenme (matürasyon) olarak sıralanan 4 aşama vardır. İlk iki faz tek bir faz olarak değerlendirilebilir (50).

Birinci proste hemostaz ve inflamasyon meydana gelmektedir ve bu fazın oluşumu yaranın meydana gelmesiyle tetiklenmektedir. Ortalama iki ile beş gün arasında sürmektedir. Yaralanma oluşmasından itibaren ilk günlerde platelet sayısı en üst sayıya erişmekteyken plateletler çeşitli faktörler tarafından aktive edilen matriks yüzeyine ve psodöpotlarla birbirlerine yapışmaya başlamaktadır. Fibrin yapısı ile plateletten zengin pıhtı oluşumu gerçekleşmekte ve hemostaz oluşmaktadır. Platelet içindeki faktörler ve granüllerin zerki aşağı yukarı yaralanmanın ilk 10 dk'sında gerçekleşmektedir ancak total salınım 7-9 gün boyunca azalan şekilde sürmektedir. Granül zerki ile birlikte büyüme faktörleri kemokin ve sitokinlerin salımı inflamasyonla takip edilir. Bu faktörler çeşitli hücrelerin alana planlı göçüne sebebiyet vermektedir. (87, 272, 432).

Bu fazda ilk savunma hattı oluşmuştur. Alana gelen makrofaj kökenli hücreler ve makrofajlar hasar bölgesinde bakterileri fagosite ederler. Ekstrasellüler enzimler nekrotik dokuların yıkılmasını gerçekleştirir ve ikinci savunma hattı oluşur. Bu ekstrasellüler enzimler metalloproteinaz ailesine aittir. Nekrotik dokuların yıkımı ve artıkların çıkartılması ve hasar tamirinde görev alan metalloproteinazlar doku inhibitörleri ile deaktive olmaktadır ve böylece olması gerekenden fazla ve zarar verecek boyuta varan tepkimenin önüne geçilmiş olunur. Makrofajların epidermal fibroblast dönüştürücü β faktörleri ve interlökin gibi faktörlerin salgılanması görevi de olmakla beraber bu aşama proliferasyonu yönlendirmektedir (130).

Proliferasyon fazı, hasar oluşmasından yaklaşık 4 gün sonra başlayan mevcut hasar sahasının büyüklüğü ile ilişkili ve sistemik sağlık haline bağlı olarak 21 gün kadar

devam edebilen bir süreçtir. Bu proses yeni vasküler ağ oluşumu, anjiyogenez, kollajenlerin depozisyonu, ortamda iyileşmeye ve asıl dokuya zemin hazırlayacak olan granülasyon dokusu oluşumu ile devam etmekte; mevcut yaranın kasılıp büzülmesinin (kontraksiyon) ve sonra da epitelizasyon aşamalarının karşımıza çıktığı bir süreçtir. Proliferasyonda yer alan hücreler; fibroblast, endotel hücreleri, makrofajlar, perisitler ve keratinositlerdir. Matriks metalloproteinaz ile bu yapıyı yıkan metalloproteinazların ve doku inhibitörlerinin; yapım ve yıkımda bir dengenin sağlanabilmesi için belirli oranlarda birlikte bulunması gerekmektedir. Bu oran yapım ve yıkımın belli bir düzende ilerlemesini sağlamaktadır. Konik yaralarda inflamatuvar sitokinler ve matriks metalloproteinazlar yüksek oranda iken metalloproteinazların doku inhibitörleri ve büyüme faktörleri düşük orandadır. Büyüme faktörlerine az tepki verilmesi, gerekli yanıtın yetersiz olması, bakteri sayısı ve oranının fazlalığı, nekrotik dokular ve tekrarlanan travmalar sonucunda iskemilerle karşılaşılabilir (254). Yeniden şekillenme fazı son aşama olarak görülür. Yara iyileşmesinde belirli bir doku stabilizasyonunun sağlanması için kollajenin dolayısıyla bağ dokunun yeniden formasyonunun sağlanması gerekmektedir. İlerleyen zamanlarda hücre sayısı ve vasküler yoğunluk azalmakta ve bu süreç aşağı yukarı 2 yıla kadar uzayabilmektedir (254).

2.10.2. Yara İyileşmesi Mekanizmaları

Yara iyileşmesi; yara yüzeylerinin karşılıklı gelmesine, yüzeylerin arasındaki boşluğa, içerdikleri yapılara bağlı olarak primer, sekonder ve tersiyer iyileşme olmak üzere 3 şekilde görülür. Tüm bu iyileşme şekillerinde benzer aşamalar benzer sırada ilerlemektedir. İyileşmenin sağlanması biyolojik ve metabolik faaliyetlerin koordinasyonuna bağlıdır.

2.10.2.1. Primer İyileşme

Yüzeyi herhangi bir şekilde kapatılmış temiz yaranın komplikasyonsuz olarak iyileşme durumu primer iyileşme olarak nitelendirilir. Yaranın kenarları başbaşa getirildiğinde aradaki boşluğun trombositler vasıtasıyla oluşturulan fibrin ile dolması

sonucunda başlayan iyileşmedir. Fibrin ile fibrinöz birleşme olmakla beraber yaklaşık 24 saat süren süreçten bahsedilmesi söz konusudur.

2.10.2.2. Sekonder İyileşme

Hasar alanının açık yaralarda granülasyon dokusu ile doldurulduğu iyileşme durumu sekonder iyileşme olarak nitelendirilir. Dokunun büzülmesi ve yüzey bölgesinin epitelizasyonunun görüldüğü bu iyileşme süreci primer iyileşmeye göre daha uzun sürmektedir. Özellikle kontamine alanlarda ve yanıklarda karşılaşılan iyileşme türüdür. Her yara iyileşmesinde olduğu gibi öncelikle pıhtı dokusunun doldurduğu yara yüzeyi 4-5 günlük süreçte yerini fibroblastlara bırakmaktadır. Bu iyileşmede eksuda görülmektedir. Özelleşmiş fibroblastlar süreç içinde miyofibroblastlara formasyon gösterir ve yara yüzeyinin kasılarak birbirlerine yaklaşmasını sağlarlar. Doku zedelenmesinin 30-40 günlük sürecinde yüzey, skar epiteli haline gelir. Bu epitel oldukça kırılgan olup en ufak bir etkende hemoraji görülür. Yüzeyin altında olan dermis tabakası ile bağlantısı zayıftır. Kontraksiyon ile birlikte fibroblastlar çapraz bağlara sahip önce tip I sonra tip III kollajenin oluşmasını sağlarlar. Kollajenlerin tipi ve çapraz bağ yapısı skar dokusunun temelini oluşturmaktadır. Epitel dokusu yara kenarlarından başlayarak mevcut yara yüzeyinin üzerini örter 6-12 aylık proseste skar dokusundaki kollajen yapısı matür hale ulaşır.

2.10.2.3. Tersiyer İyileşme

Dokuların devital olduğu, yabancı cisim reaksiyonunun görüldüğü ve enfekte yaralarda veya yara yüzeyinin kontaminasyonunu engellenmek amacıyla üzerinin kapatıldığı iyileşme tersiyer iyileşme olarak nitelendirilebilir.

Tüm yara iyileşmelerinde yaklaşık iki gün içerisinde yara yüzeyine fibroblast migrasyonu olmasıyla birlikte proliferatif proses başlamakta; bu dönemde fibroblast ve diğer hücrelerin proliferasyonu sonrasında bölgeye programlı hücre göçü gerçekleşmesinin ardından doku onarımı ve anjiyogenez başlamaktadır. Trombositlerden kaynak alan büyüme faktörleri ve diğer moleküller; düzenlemeyi, farklılaşmayı ve proliferasyonu uyarmaktadır. Yeniden şekillenme prosesi ile skar

dokusunun oluşumunu içeren kollajen olgunlaşması 1 yıla kadar uzayan son süreçle tamamlanır (87, 272, 432).

2.11. Trombosit Kaynaklı Faktörler

Trombositlerden salınan büyüme faktörleri şu şekilde sıralanabilir.

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor - PDGF)

Transforme Edici Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor - TGF)

Trombosit Kaynaklı Anjiogenez Faktörü (Platelet Derived Angiogenesis Factor - PDAF)

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor-VEGF)

Trombosit Faktör 4 (Platelet Factor 4 – PF4)

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-Like Growth Factor - IGF)

Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor - EGF)

Osteonektin (On)

Osteokalsin (Oc)

Vitronektin (Vn)

Fibrinojen (Ff)

Fibronektin (Fn)

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Trombospondin-1 (TSP-1)

Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (Connective Tissue Growth Factor = CTGF)

2.11.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

Trombositlerden ilk elde edilmiş büyüme faktörlerinden olan PDGF ilk olarak özellikle trombositlerde sonrasında ise fibroblastlarda, keratinositlerde, kemiğin

matriksinde, monositlerde ve endotel hücrelerinde kendine yer bulmaktadır (21, 257, 263).

Üstlendiği görev endotel hücrelerinin, fibroblastların, osteoblastların ve mezenkimal kökenli hücrelerin bölünmesini ve kemotaksisi stimule etmek ve yara iyileşmesi proseslerindeki tüm fazlarda düz kas hücreleri ve fibroblastların üzerine mitojen etki göstermektedir (371).

PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD olmak üzere beş alt grubu bulunmaktadır (204, 252, 424). Ekstrasellüler matriks sentezinde ve mezenkimal farklılaşmada görev almadığı düşünülen PDGF'nin büyüme faktörleri olmaksızın tek başına bile bu ligament hücrelerini ve mevcut osteoblastları proliferasyon yönünde uyarma potansiyeli mevcuttur (21, 138).

2.11.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

Yapıca insüline benzediği için bu isimle nitelendirilen insülin benzeri büyüme faktörü ana olarak hücrelerin farklılaşmasından ve çoğalmasından sorumlu tutulmaktadır. Osteositler oluşurken preosteoblastların uyarılmasında ve dönüşümünde kemik travma ve defektlerinin iyileşmesinde planlı bir şekilde mevcut alana göçte (apoptosis), göçün ve hücrelerin düzenlenmesinde ve tip I kollajenin stimülasyonunda rol almaktadır (162, 416).

2.11.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF)

Kemik ve trombositlerden elde edilmektedir. Yara iyileşmesinde enflamatuvar cevaplarda immün yanıtın taşıyıcı sinyali ile hedef sinyalin aktive edilmesinde yapı olarak kemik morfojenik proteinlere benzeyen ve embriyogeneizde kendine görev bulan, kemik kökenli hücrelerinin kemotaksisini uyaran büyüme faktörüdür. Hücrelerin proliferasyonunda ve farklılaşmasında temel düzenleyicidir (2, 56, 86, 97, 129, 153, 270, 339, 438).

Alt sınıflamasında TGF $\beta 1$ 'i ve TGF $\beta 2$ 'yi barındırır. Kemik formasyonunda ve kartilaj farklılaşmasında da görev üstlendikleri için morfojen ismi de verilmektedir. Fibroblast stimülasyonunda da rol alırlar (109, 208, 382).

2.11.4. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Kemotaksis, anjiyojenik ve mitojenik etkilerini mezodermal dokular üzerinde gösteren fibroblast büyüme faktörü; periodontal ligament hücrelerinin olduğu kadar endotel hücrelerinin çoğalmasını, alana göçünü (migrasyon), vaskülarizasyonunu ve rejenerasyonunu sağlayan kemik iliği kökenli bir büyüme faktörüdür (21, 257). Kemik travmalarında, kırıklarında ve defektlerinde osteoblastik hücreler ile kemik oluşumunu stimüle etmektedir. Kalsiyum ve fosfat seviyesinin normal düzeyde devam etmesini de sağlamaktadırlar (98, 226, 268, 367, 400). Fibroblast büyüme faktörü kemikte enine genişleme ile karakterize süreçte önemli bir protein olup gerilim direncinin artmasını sağlamaktadır (250, 324).

2.11.5. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

Periodontal dokuların formasyonunda ve epitel hücrelerinin çoğalmasında görev alan endotel hücreleri, fibroblast ve keratinositler için mitojenik faaliyet göstermektedir. Epitelyal, endotelyal ve mezodermal kaynaklı hücrelerin DNA sentezini uyarmaktadır. Bağlantı epitelinden alınan hücrelerde epidermal reseptörler ve büyüme faktörleri tespit edilmiştir (149, 245).

2.11.6. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Osteoblastlardan ve büyük hacimdeki kondrositlerden salgılanan VEGF, vaskülarizasyonda önemli bir görev üstlenmektedir. Endotelyal mezenkimal hücrelerin sayıca artışının sağlanmasını uyarmakta, damarların içeri girişine imkan tanıyarak damar içermeyen kıkırdak dokusunun damarlı kemik dokusuna formasyonunu sağlamaktadır. Yeni damar oluşumunda BMP'ler ve vasküler endotelyal büyüme faktörü birbirlerinin etkilerini arttırmaktadır. Fiziksel bir uyarı fraktür alanında VEGFR2 reseptörü yoluyla anjiyojenik tesiri oluşturur (71). Anjiyogenezisin ve vasküler ağın oluşmasına katkı veren hücreler tarafından salınan, endotel hücre stimülasyonunda etki gösteren temel düzenleyici büyüme faktörlerden biridir. Anjiyogeneziste görev aldığı için kemik travmalarında, kırıklarında ve defektlerinde olumlu etkisi vardır (97).

2.11.7. ADP VE ATP

PRP'de (trombositten zengin plazmada) yüksek yoğunlukta bulunan bu iki molekül; adenzindifosfat ve adenzintrifosfat osteoblastların çoğalmasını arttırmakla beraber PDGF ve IGF ile sinerjizm içindedir (97).

2.11.8. Anjiopoetin-2

Vasküler endotelde iyileşme sürecini kısaltmaktadır (97).

2.11.9. Faktör-V, XI, XIII, Fibrinojen, Von Willebrand Faktör

Bu faktörler koagülasyon kaskadında pıhtı oluşumunda görev almaktadırlar. Yara iyileşmesinde önemli görevler üstlenmektedirler (97).

2.11.10. Serotonin

Nörotransmitter olarak karşımıza çıkan ekstrasöral alanda hormon görevi üstlenen; karaciğer ve kemik dokularında ve santral sinir sisteminde mitojenik aktivite görevini alırlar. Osteoblast çoğalmasında da rol oynarlar (97).

2.11.11. Fibronektin (Fn)

Adezyon özelliğine sahip, kemik iyileşmesinde görev alan kemik yapımı ana hücreleri olan osteoblastların yaşam süresinin uzamasında, sayıca çoğalmalarında ve farklılaşmalarında rol almaktadırlar (97).

2.11.12. Osteokalsin (Oc)

Kemik formasyonunda etkili olduğu düşünülen ancak halen hangi aşamada nasıl bir katkıda bulunduğu tam olarak ortaya konamayan matriks içinde küçük hacimde yer almış hafif bir molekül olarak karşımıza çıkan osteokalsin; fibrin yapıştırıcı olarak günümüzde kullanılan ürünün ilk halidir. Konsantre fibrinojen ile birleştirilen fibrin yapıştırıcı, doğal pıhtılaşmada karşılaşılan fibrin ile hemostaz sürecini desteklemektedir (97, 381). Fibrinin oluşması trombinin, fibrinojeni fibrine çevirmesi ile mümkündür.

Cerrahi işlemlerden sonra yara yüzeyine uygulanan fibrin içerikli biyomateryal ile yara yüzeyi arasında sıkı tutunmayı gerçekleştirir. Kanama kontrolü oluşturulur. İyileşme süreci optimum seviyeye çıkartılır. Fibrin, faktör XIII'e bağlanarak pıhtıyı sağlamlaştırır (265).

Fibrin yapıştırıcıdaki temel proteinler konsantre fibrinojen ve fibrin olarak karşımıza çıkmaktadır. Trombin ile fibrinojen kendi aralarında uygun konsantrasyonlarda karıştırıldığında üç boyutlu ve kolonize bir ağ elde edilmiştir. Karışım kıvamı sonrasında dokuya adhezyonu birkaç saniye içinde tamamlanmaktadır (94).

Fibrin yapıştırıcılar kullanılmaya başladığından itibaren doku mühendisliği bu alana da kaymıştır. Otolog veya allojenik olan bu yapıştırıcılardan otolog yapıştırıcılar; hastanın kendi kan dokusundan hazırlandığı için kontaminasyonları düşük olmakla beraber yine hastanın kendi dokusunu barındırdığından olası reaksiyonların da önüne geçebilmektedir. Operasyon sonrası hematoma önlenmesinde, kanamanın önüne geçilmesinde, pıhtılaşma problemi olan bireylerde flap operasyonunun ardından iyileşme sürecini hızlandırabilmektedirler (59).

2.12. Trombositten Zengin Plazma

Trombositten zengin plazma; organizmadan alınan venöz kanın çeşitli materyaller ile muamelesi sonrasında belirli devinimde belirli sürede santrifüj işlemine tabi tutulmasıyla elde edilen trombosit zengin içeriği tanımlar.

İlk kuşak trombosit konsantrasyon ürünü olan trombosit zengin plazma (TZP) (PRP) venöz kanın belli devinim sayısında belli dakika santrifüjü ile elde edilmektedir. Ana hedef çok sayıda trombositin bu küçük konsantrasyon kan hacminde ayrışmasını sağlayabilmektir (101, 340). Trombositten zengin plazma elde edilebilmesi için değişik yöntemler mevcut olduğu gibi çeşitli araştırmacıların kendine yönelik geliştirdikleri protokoller de mevcuttur. Bunlar da kendi kurallarını kendileri getirmektedirler (289, 354).

Cerrahi müdahaleden önce cerrahi müdahalede bulunulacak hastadan 20 ila 80 mg venöz kan alınmaktadır. Bu venöz kan içinde antikoagülan materyal bulunan

özelleşmiş tüp içerisine nakledilir. Bundaki amaç venöz kandaki kalsiyum iyonlarının bağlanması ile protrombinden trombin dönüşümünün engellenmesidir.

PRP'nin hazırlığı santrifüj ve aktivasyon olmak üzere iki ana aşama sonrasında oluşur; konsantrasyon hazırlığı çeşitli protokollere bağlı olarak değişmekte ve klinikte tam anlamıyla elde edilip uygulanması 1 saat sürmektedir (354). Santrifüj sonrası eklenen trombin, klorür ve kalsiyum; plazma aktivasyonu için kullanılmaktadır. Fibrinin polimerizasyonu ve trombositlerin degranülasyonuna sebebiyet veren aktivatörler; trombosit jelinin oluşumunu ve faktörün salgılanmasına yol açmaktadır (407). Trombosit jel oluşumu sonrasında aktivasyon için eklenen sığır trombinini ksenofaktör olarak karşımıza çıkmakla beraber yüksek düzeyde antikor oluşumuna sebep olabilir. Otolog trombin, sığır trombinini yerine kullanılabilir.

Günümüzde bu materyallerin tek tek eklenmesi yerine özelleşmiş tüpler içerisinde bütün bu elemanlar birlikte bulunmaktadır. İçinde kendiliğinden bulunan büyüme faktörlerinin sayısı taze trombosit sayısı ile ilgilidir. Tüm bu işlemler sonrasında faktör salınımı ilk 10 dk içinde başlamaktadır. İlk bir saat içerisinde bu faktörlerin %95'i salgılanmaktadır (345, 355). Eğer aktivasyon için gerekli elemanlar eklenmediyse 8 saat intakt kalabilir (4, 355).

Günümüzde her materyal hazırlığında olduğu gibi PRP geleneksel olarak materyallerin tek tek eklenmesi şekilde hazırlanabildiği gibi ticari kitler ile otomatik olarak da hazırlanabilir. Otomatik şekilde ticari olarak hazırlanabilen kitler steril olabilmekte, kullanıma hazır şekilde otomatik ve kolayca hazırlanabilirken maliyet yüksekliği, belirli miktarda elde edilebilmesi gibi olumsuzluklara sahiptirler. Mevcut kitler, içerilerindeki solüsyonların oranları ve bunlara bağlı olarak santrifüj süre ve sayı farklılıkları, trombosit konsantrasyon oranları ve de büyüme faktörleri çeşitliliği ile de ayrılabilir. Ticari kitler kendi aralarında normal konsantrasyon katları 2,5-3 kat ve yüksek konsantrasyon katları 5-9 kat olarak ikiye ayrılabilir (87, 95, 267, 277, 346).

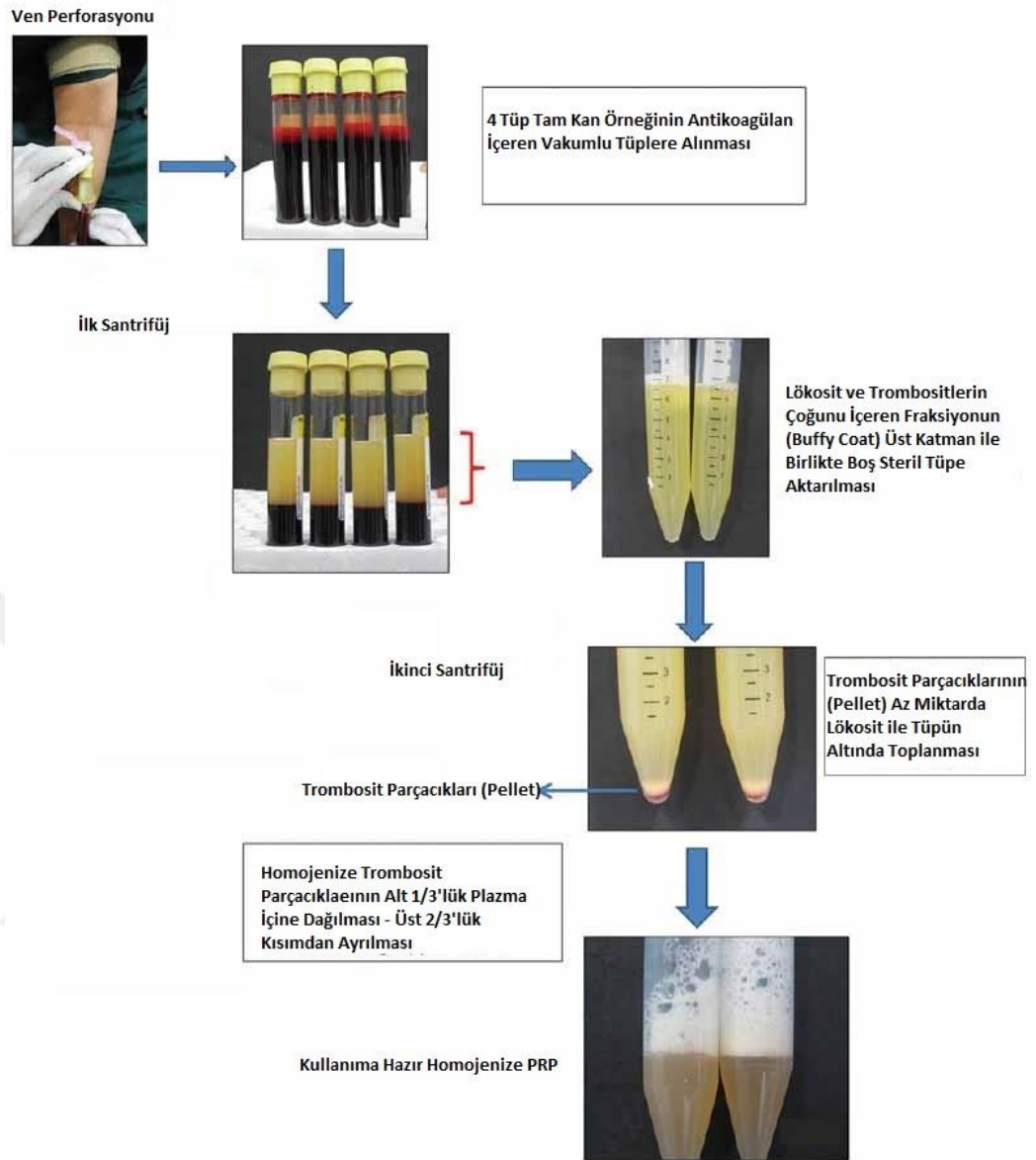
PRP materyallerin tek tek eklendiği (sürecin aşamalarının ayrı olarak yapıldığı) çift santrifüj veya tek santrifüj yöntemleri ile elde edilebilmektedir (346). Çift santrifüj yönteminde, düşük kuvvetle (softspin) uygulanan ilk santrifüj işleminin ardından plazma; tüp içinde üç tabakaya ayrılır; sarı renkli üst tabaka bir miktar lökosit ve platelet içerir, beyaz renkli ince bulutumsu orta tabaka (buffy-coat (BC)), lökosit ve

plateletlerin büyük çoğunluğunu içerir, en alt kırmızı tabakada ise kırmızı küreler (eritrosit topluluğu) yer alır.

P-PRP oluşturulmak isteniyorsa BC yüzeyi (orta tabaka) ile birlikte üst tabakanın tamamı, L-PRP elde edilmek isteniyorsa bir miktar kırmızı küre tabakası (alt tabaka – eritrosit topluluğu) ile beraber BC (orta tabaka) ve üst tabakanın tamamı aspire edilerek ikinci bir tüpe aktarılır.

İkinci santrifüj işlemi tüm hücreleri tüpün altında biriktirecek, ancak plateletleri parçalamayacak yüksek kuvvette (hardspin) santrifüj edilir. İkinci santrifüj sonrası tüpün en altında yumuşak hücre toprakları olduğu gözlenebilir. Üst 2/3 plazma atılarak, hücrelerle beraber alt 1/3 plazma aspire edilir. Yavaş bir şekilde birkaç sefer geri verilip aspire edilerek hücrelerin plazma içinde homojen dağılması sağlanır. Eğer dağılmayan sert topraklar gözleniyorsa plateletler aktivasyonu ile fibrin oluşturmuş demektir, bu durumda solüsyon enjeksiyon-uygulama için uygun değildir. Tek santrifüj yönteminde ise tam kan üç tabakaya ayrıldıktan sonra, üst kısmın yaklaşık yarısı atılarak, lökosit isteğine göre tüm BC (orta Tabaka) veya yüzeyel BC (orta tabaka) ile birlikte üzerindeki 1 cc'lik plazma aspire edilir (87, 277, 346) (Şekil 2-13).

Elde edilen PRP solüsyonu içindeki plateletler, enjeksiyonun hemen öncesinde bir eksternal pıhtılaşma faktörü kullanılarak eksojen olarak aktive edilebilir. Bu işlem için sıgır trombini, kalsiyum klorid veya mekanik travma kullanılabilir. Ancak PRP enjekte edildiği dokuda kollajen ve doku tromboplastini ile temas ettiğinde endojen olarak kendiliğinden aktive olmaktadır. Bu sebeple aktivasyon işlemi uygulanmasının gerekliliği tartışmalıdır. Üstelik eksojen aktivasyon uygulanması, büyüme faktörlerinin kısa sürede ve yüksek konsantrasyonda salınarak, hızla tükenmelerine, reseptörlerin büyüme faktörlerine maruziyet süresini kısılmasına neden olabilir (87, 90, 346).



Şekil 2-13: Trombositten zengin plazma şeması (178)

Trombosit sayısı mikrolitre başına 150.000-400.000 arasındadır. Trombositten zengin plazma elde edilmesi durumunda is bu sayı 300.000-800.000 ila 750.000 - 2.000.000 arasına erişebilmektedir.

PRP preparatları kendi içlerinde barındırdıkları trombosit konsantrasyonlarına göre bazal seviyenin 5 katı veya üzeri olarak da alt sınıflara ayrılmıştır. Ancak PRP içindeki olması gereken ideal trombosit sayısı ile ilgili net bir değer mevcut bulunmamaktadır (141, 370). Teorik olarak gerekli trombosit sayısı olumsuz bir ters etkiye sebebiyet vermeyecek en fazla sayıda büyüme faktörünün reseptörünü uyaracak trombosit sayısıdır. Bu da aşağı yukarı 4 veya 5 x 10⁶ sayısına tekabül etmektedir.

Ancak son zamanlarda sayıdan ziyade mutlak değerin daha önemli olduğu düşünülmektedir (87, 95, 267).

Düşük konsantrasyon seviyelerinde yeterli cevap oluşamamakta bu seviyede görülen etkilerin trombositlerin aktive olmasından çok plazma içinde bulunan büyüme faktörlerine bağlı olduğu düşünülmektedir (87). Çok yüksek konsantrasyon seviyelerinde planlı hücre yıkımı, büyüme faktörü reseptörlerinde negatif etki ve reseptörlerin hassaslığının ortadan kalkması sonucunda paradoksik inhibitör etki ortaya çıkar. Ancak 1-4 kat ve 4-6 kat konsantrasyonlarda istenilen terapotik etkinliğe ulaşıldığını ortaya koyan araştırmalar vardır. Aynı içerikteki PRP preparatlarının farklı dokulara uygulanması sonucunda etkileri de farklı olabilmektedir (267).

2.13. Trombositten Zengin Fibrin

Trombositten zengin fibrin isimli ikinci kuşak trombosit konsantrasyon ürünü preparat ilk olarak 2001 yılında Fransa'da kullanılmaya başlamıştır. Bu preparat aynı zamanda lökosit ve trombosit kökenli fibrin materyali olarak nitelendirilirken trombositten zengin fibrin materyali trombositten zengin plazmadan farklı olarak çeşitli maddeler ve aktivatör katılmaksızın silika esaslı jel kaplı plastik tüplerde elde edilmektedir (164, 405). 10 ila 80 mg tedaviden hemen öncesinde hastadan alınan venöz kan, 10 ml kuru silika esaslı jel kaplı plastik tüpte antikoagülan ilavesiz dağıtılır. Kan trombosit aktivasyonun önlenmesi için geniş lümenli bir kanül yardımıyla alınmalıdır. Alım süresi ile trombosit konsantrasyonu arasında ters orantı vardır (150, 421). Kan alınır iken enjektör içine de antikoagülan eklenebilmekte ve trombositlerin aktive olması ve kan dokusunun santrifüj sırasında pıhtılaşmasının önüne geçilerek koagülasyonun önlenmesi için sodyum sitrat veya asit sitrat dekstrozu, ACD-A kullanılmaktadır. Trombositlerin hücre zarlarına zarar verebilme ihtimalinden ötürü etilendiamin tetra asetik asit kullanımı pek tercih edilmese de uygun oranlarda kullanılmasında pek bir sakınca olmamaktadır. Sodyum sitrat kullanılan tanısal incelemelerde tercih edilebilirken ACD-A sık tercih edilen antikoagülan olup ACD-A için 2-8 sodyum sitrat için 1/9 oranları uygulanmalıdır. Ancak tüpe alındıktan sonra tüm partiküllerin antikoagülan ile teması için bir iki kez tüp ters çevrilmelidir (150, 267, 422). Alınan kan 10-12 dk boyunca 2700-3000 RPM'de santrifüj edilir. Üstte PPP (platelet poor plasma, trombositten fakir plazma), altta kırmızı kan hücreleri ortada PRF

(platelet rich fibrine, trombositten zengin fibrin) olmak üzere 3 katman oluşur (279). Tüp içerisindeki trombositin aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu doğal yollarla meydana gelmektedir (146). Kan alındığında santrifüj işlemi uygulanmaz ise yaygın polimerizasyon başlamakta ve trombosit konsantrasyonu oluşmamaktadır, PRF'in alt katmana çökmesinin engellenmesi için santrifüj sonrasında tüpten alınmalıdır. Santrifüj işlemine başlanma süresi kabın içinde sitrat yok ise 2 dk 30 sn'dir (201).

Santrifüj sırasında maruz kalınan kuvvet yer çekiminin bir kaç bin misli olup faz farkının oluşabilmesi için gereken kuvvet RCF diye isimlendirilir (relative centrifugal field). Maruz bırakılan g kuvveti yükselterek işlemin daha çabuk sonlanabilmesi sağlanılabilir. Formülasyon $g=(1.118 \times 10^{-5})RS^2$ olarak karşımıza çıkar (R; rotor merkezinden tüp içi örneğe olan santimetre cinsinden yarıçap, s;dönüş/dakika) (347). Bu dönüş işlemlerinin oda sıcaklığında yapılması düşük sıcaklıktaki aktivasyonun önlenmesi için gereklidir (422).

Plazma içinde konsantre haldeki trombositlere verilen isim olan, organizmanın kendi kanından elde edilen, normalden fazla sayıda trombosit ve büyüme faktörü oranına sahip konsantre plazma yapısı olarak tanımlanan trombositten zengin plazma, asıl olarak iyileşmeyi hızlandırma amacıyla kullanılmaktadır ve fazla miktarda trombosit, büyüme faktörünü, aynı zamanda pıhtılaşma kaskadının tüm bileşenlerini içermektedir (338). Doğal kan komponentlerinin oranlarından farklı olarak %95 trombosit, %4 eritrosit, %1 lökosit barındırmaktadır ancak bu yapının aktif olarak işe yarayabilmesi için en az mikrolitrede 10^5 adet trombosit içermelidir ve totalde 5 ml kan olmalıdır (117). Normal bir kanda ise yaklaşık %93 eritrosit, %6 trombosit ve %1 lökosit dağılımı vardır (13, 432).

Santrifüj işlemlerinden sonraki ilk 10 dk içinde büyüme faktörlerinin salınımı başlamaktadır. Faktörlerin etkinliği 7 güne kadar sürmektedir (10). Manuel hazırlanmada tüp içerisindeki alfa granüllerin aktive edilmesi gerekmektedir. Bu aktivasyon trombositten zengin plazma içine kalsiyum-trombin katılması ile mümkün olmaktadır. İlk bir saat içinde faktörlerin yaklaşık %95'i salgılanmaktadır ve kullanımı oda koşullarında 10 dk içinde tamamlanmalıdır (62).

Trombositten zengin plazma; kullanılacak alana enjeksiyon, eppendorf, taşıma veya çeşitli materyallerle karıştırılma esasına göre uygulanmaktadır. Trombositten zengin plazma; ilgili bölgeye enjeksiyon yoluyla saf şekilde veya greft ile karıştırılarak

uygulanabilmektedir. Fakat kullanılacağı zaman hızlı bir şekilde kullanılmalıdır. Trombositopeni hastalarında, karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda, malignite varlığında, hipofibrinojenemide, hamilelerde ve emzirenlerde, otoimmün hastalık varlığında kullanılmamalıdır (221). Düşük hemoglobin ve hematokrit seviyesi olan hastalarda trombositten zengin plazma uygulamasında herhangi bir risk olmadığını ifade eden çalışmalar bulunmaktadır (288).

Bu tedavinin amacı organizmanın genetik olarak tanımlı tamir yeteneğini normale göre daha yüksek orana çıkmasını sağlamak ve iyileşmeyi stimüle etmektir. Aferez ünitelerinde, tam kan donörleriyle standart kan üniteleri ile, test tüpüne manuel eklentilerle ve ticari olarak otomatik santrifüj cihazları vasıtasıyla (PRP yöntemi) 3 yöntem ile hazırlanabilir (269).

Genel olarak hastadan antikoagülan içeriğine karıştırılan venöz kan toplanması, santrifüj ve yapının hedef alana uygulanması aşamalarını taşımaktadır. İntraoperatif veya topikal nakil mevcuttur (87, 89).

Eritrosit hücrelerinin ayrılması için düşük hızda santrifüjün ardından yüksek hızda santrifüj uygulanır daha sonra venöz kan sitrat dekstrozu içeren tüpe konur ve santrifüj edilir, sitrat dekstrozu antikoagülandır. Böylelikle trombosit ve lökosit içeren üst tabaka, lökositten zengin ara tabaka ve eritrositlerden oluşan alt tabaka şeklinde 3 tabaka oluşmaktadır (269).

Saf PRP için üst tabaka ve ara tabaka boş bir tüp içine nakledilir. Lökositten zengin PRP için üst katman ara katman ve birkaç eritrosit boş bir tüpe nakledilir, ikinci santrifüj ile eritrosit ve PRP'nin ayrışması elde edilirken bu santrifüjün ardından aktivatör (trombin ve kalsiyum klorid) katılarak PRP jeli hazırlanır. Bunun ile PRP hazırlanması yaklaşık 25-30 dk sürmektedir. PRP'nin 6 saat içinde kullanılması gerekir. Rutin klinikte kullanılan yöntem budur (269). PRP'nin elde edilmesinde ve kullanılmasında kan hacmi, santrifüj sayısı, santrifüj kuvveti, kanın alınması, sıcaklık ve zaman olarak değişken faktörler olabilir. Trombosit tabakasının değişkenliği, trombosit büyüklüğü, kalitesi, bireyler arası fark ve hematokrit olarak farklılıklar görülebilmektedir. Etkinliği kaybolursa da osteoblast yaşam süresi 3 aya kadar ulaştığı için etkinliği devam edebilmektedir (9, 96, 161).

Tüp içerisinde antikoagülatif olarak asit sitraz dekstroz ve EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) olabilir ancak EDTA trombosit membranları üzerine yıkıcı etkide bulunabildiği için önerilmez. PRP için çift santrifüj şarttır (101).

Çalışmalarda fazla miktarda, bütün kullanılacak materyallerin tek tek eklendiği PRP elde edilme yönteminden bahsedilmektedir. Yöntemlerin kendi içlerinde farkları santrifüje edilirken dakikadaki tur sayısı ve harcadığı zaman, santrifüjün momenti, rotor merkezi ve içerdeki partiküllerin arası aralık olarak karşımıza çıkmaktadır. Manuel olarak maliyeti makul optimum bir PRP preparatının hazırlanması olasıdır. Kullanılacak materyallerin tek tek eklendiği yöntemi seçen her klinik bu adımları kendilerine göre modifiye ederek uygulayabilmekle beraber her vakada aynı ölçütleri hazırlanması, dezenfeksiyon ve sterilizasyon kurallarının aksatılmaması, her an belirli aralıklarla protokollerin sabitliğinin kontrol edilmesi etkili bir PRP tedavisinin yapılması için önem arz eder (150).

PRP; iskelet kas sistemi hastalıkları ve defektleri, spor hekimliği, ağız, diş ve çene cerrahisi, dermatoloji, üroloji, plastik cerrahi, kalp damar cerrahisi alanlarında kullanılabilir. Kullanılıp uygulandığı alanda trombosit sayıca artışa geçmekte, büyüme faktörlerini sayıca yükseltmekte, kök hücreleri aktive ederek kemik rejenerasyonuna katkı sağlamaktadır. Bunda asıl etkinin büyüme faktörleri ile olduğu düşünülmektedir. Amaç tamir mekanizmasının stimülasyonu ile koagülasyonu, hücre formasyonu, angiogenezi, matürasyonu ve yeniden şekillenmeyi ve inflamasyon etkinliğini arttırmaktır. Amaç bu faktörlerle ilişkilidir.

Trombosit karışımları içinde barındırdıkları trombositlerin konsantrasyon miktarına, lökosit konsantrasyon miktarına, mevcut fibrinin içinde barındırdığı yapıya ve yapılan aktivasyon çeşidine göre alt sınıflara ayrılabilir (420). Son zamanlarda geçerli olan sınıflandırma fibrin içeriğine ve lökosit konsantrasyon miktarına göre olmaktadır. Buna göre trombosit konsantrasyonu bir kaç grupta incelenmektedir (150).

2.14. Trombosit Kaynaklı Kan Konsantratlarının Sınıflandırılması

2.14.1. Saf Trombositten Zengin Plazma (S-TZP):

Sitrat içeren kan preparatı 5 ml'lik özelleşmiş tüplerde 460 g'de 8 dakika boyunca santrifüjlenip tabanda eritrosit (RBC), BC (orta tabaka – buffy coat) ve asellüler plazma olarak üç tabakaya ayrılır. Lökosit içermemektedir ancak aktive olmasının ardından daha derişik fibrin ağı barındırır (420). Büyüme faktörleri bakımından zengin plazma (PRFG - autologous platelet rich fibrin glue - otojen trombosit zengin fibrin yapıştırıcı) tabakası uzaklaştırılır, ayrı bir yere transfer edilir. Sonrasında pıhtılaşma için kalsiyum klorür eklenir. Klinik düzeninde yapılması kolay olduğu için maliyeti düşüktür (95).

2.14.2. Lökosit ve Trombositten (plateletten) Zengin Plazma (L-TZP)

İçinde lökosit barındıran fibrinin daha az yoğunluklu olduğu karışımlardır (420). Steril tüpe alınan kan ilk olarak primer santrifüje tabii tutulur. Bu tüp, içerisinde antikoagülan içermemektedir. Santrifüj sonrası hücreden fakir plazma ve buffy coat tabakası ve bir kısım eritrosit içeren tabakanın bir miktarı yeni tüpe nakledilir. Yüksek devirde yapılan sekonder santrifüj sonrası hücreden fakir tabaka ortamdan uzaklaştırılır. Aktivatör olarak kalsiyum ve trombin ilavesi gerçekleştirilir. Manuel şekilde yapıldığında hazırlanması vakit alan L-PRP'in yoğunluğu azdır. Yoğunluğun az olması sonucu uygulandığı bölgeden çabuk şekilde eliminasyonu görülmektedir. Manuel olarak hazırlandığı için el hassasiyeti her zaman eşit derecede ayarlanamayacağı için aynı kalite oluşturulamayabilir (95). Piyasada bulunan çoğu preparat bu sınıftadır (95).

P-PRP ve L-PRP preparatlarının ana uygulama avantajları aktive edilmeden önce akışkan sıvı halde bulunmalarından mütevellit değişik skaladaki hastalıklarda, iskelet - kas sistemi patolojik durumlarında enjeksiyon formu ile bölgeye uygulanabilir olmalarıdır. İstenilen uygulanma durumundan hemen önce aktive edilerek defekt yara veya sutür bölgelerine adapte edilebilirler (95).

PRP'nin içinde lökositin olup olmaması bu zamana kadar tartışılan bir konudur. Bu hücrelerinin ortamda bulunması inflamatuvar prosesi aktive ederek uygulanması düşünülen terapi üzerinde negatif etkiye sebebiyet verebilme ihtimalini ortaya koyan çalışmalarda, başta nötrofil ve CD8 lenfositlerin uygulanması ve başarıya ulaşması

hedeflenen PRP terapisinde olumsuz etkileyebileceği, bölgeye nötrofil geçişinin defekt bölgesinde serbest oksijen radikallerini arttırarak oksidatif hasar oluşturabileceği, alanı normal doku yapısından fibrotik hale çevirebileceği ve iyileşmeyi inhibe edebileceği ortaya konabilmektedir (87, 95). Ayrıca lökositler ve lökositler hücreler yıkıma yol açarak sitokinler ve yıkımın ana hücrelerinden matriks metalloproteinazların salgılanmasına sebep olur. Eksperimental çalışmalarda CD8 lenfosit ailesi ve nötrofil eksikliği olan hayvanlarda mevcut yara iyileşmesinin hızlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte büyüme faktörü yapımının fazlalaşması analjezik medyatörlerin ortama bırakılması naturel antimikrobiyal etki amacıyla PRP solüsyonlarının içinde belli bir miktar lökosit bulunması gerektiğini savunan fikirler de mevcuttur (95).

Aynı zamanda salınan bu antienflamatuvar sitokinler ve peptidler inflamatuvar prosesi düzenlemektedir ve aljeziyi azalttıkları sanılmaktadır (95). Salgılanan proteolitik enzimlerle hasarlı dokuları dokuların artıklarını fagosite ederek ortadan kaldırma özellikleri bir pozitif etki olarak görülmektedir (87).

2.14.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (S-TZF)

10 ila 80 mg tedaviden hemen öncesinde hastadan alınan venöz kan, 10 ml kuru silika esaslı jel kaplı plastik tüpte antikoagülan ilavesiz dağıtılır. Kan, trombosit aktivasyonun önlenmesi için geniş lümenli bir kanül yardımıyla alınmalıdır. Alım süresi ile trombosit konsantrasyonu arasında ters orantı vardır (346). Kan alınır iken enjektör içine de antikoagülan eklenebilmekte ve trombositlerin aktive olması ve kan dokusunun santrifüj sırasında pıhtılaşmasının önüne geçilerek koagülasyonun önlenmesi için sodyum sitrat veya asit sitrat dekstroza A, ACDA kullanılmaktadır.

Alınan kan 10-12 dk boyunca 2700-3000 RPM’de santrifüj edilir. Üstte PPP (platelet poor plasma - trombositin fakir plazma – TFP), altta kırmızı kan hücreleri ortada PRF olmak üzere 3 katman oluşur (394). Tüp içerisindeki trombositin aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu doğal yollarla meydana gelmektedir (201). Kan alındığında santrifüj işlemi uygulanmaz ise yaygın polimerizasyon başlamakta ve trombosit konsantrasyonu oluşmamaktadır, PRF’in alt katmana çökmesinin engellenmesi için santrifüj sonrasında tüpten alınmalıdır. Santrifüj işlemine başlanma süresi kabın içinde sitrat yok ise 2 dk 30 sn’dir (201).

L-TZP'den farkı aktivatörün sekonder santrifüj sonrası eklenmesi olup klinikte elde edilmesi maliyeti yükseltmektedir. Lökosit barındırmamaktadır (95).

2.14.4. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (Choukroun'un TZF'si) (L-TZF)

İçinde lökosit barındıran fibrinin yoğun olduğu solüsyonlardır (95). Antikoagülan içeriği barındırmayan bir tüpte venöz kan biriktirildikten sonra hemen sonra yumuşak bir şekilde santrifüje edilen kanda koagülasyon başlamaktadır. Orta tabakada güçlü fibrin pıhtı, üstte hücreden fakir plazma, altta eritrosit yer alacak şekilde üç katman meydana gelmektedir. Antikoagülasyon içeriği barındırmadığı için ikinci kuşak trombosit konsantrasyonu olarak isimlendirilir (405). Bu yöntemde aynı anda L-PRF üretimi de olmaktadır, L-PRF her iki taraftan sıkıştırılmayla beraber bir membran oluşturulabilir. L-PRF kana ait tüm materyalleri içeren bir trombosit konsantrasyonudur (235, 394). Teknik sonucunun kalitesi, kanın eldesi ve santrifüje yerleştirilmesine kadar geçen süre ile ilgilidir. Trombosit kanın tüpe teması ile birlikte koagülasyona başlarlar süre uzarsa fibrin dağınık şekilde polimerize olarak kaliteyi düşürür (405). L-PRF oral ve maksillofasiyal cerrahide, kulak burun boğaz kliniklerinde ve plastik cerrahide de kullanılmaktadır. Bu teknikte trombosit ve lökositler yüksek oranda ve kalitede elde edilmektedir. Buradaki lökositler immun sistemin yükseltilmesinde rol almakta ve enfeksiyon baskılanmasında görev üstlenmektedir (262, 248, 299). Oral ve maksillofasiyal cerrahide fazla kullanılmaktadırlar (95).

2.14.5. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-PRF)

L-PRF ile ana farklı 2700 RPM 12 dk yerine 1500 RPM 14 dk ile santrifüj ve dakika farklı olmasıdır. A-PRF içerisinde tüm hücre partikül miktarı çok daha fazladır. Aynı zamanda artan materyal ve büyüme faktörü sonrasında sitokin salınımını uyardığı ve hücre migrasyonuna yardımcıdır.

2.14.6. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (I-PRF)

Enjekte edilebilir PRF üretimi son gelişmelerden biri olarak karşımıza çıkmakta bu preparatın hazırlanması için antikoagülan içermeyen plastik tüplere kan alınır 2-3

dakikalık süre bazında 2400-2700 RPM’de santrifüje edilir. I-PRF ile greft ve PRF karıştırılması ile birlikte hacim artışına erişilerek PRF blok materyali elde edilebilir.

2.14.7. Titanyum Trombositten Zengin Fibrin (T-PRF) (T-TZF)

PRF materyalinin elde edilmesi için alınan ürünü medikal titanyum tüplerde elde edilmesi sonucu ortaya çıkan materyale T-PRF denmiştir. T-PRF’nin, L-PRF’e göre daha düzenli bir ağ yapısı ile donatılı olduğu görülmüştür. 12 dakika 2800 RPM’de elde edilen T-PRF mukozal yara iyileşmesinde görece daha iyidir (423).

2.14.7.1. Konsantre Büyüme Faktörü (CGF)

CD34 kök içeriğini barındıran konsantre büyüme faktörünün trombositler zengin plazma ve fibrinden en önemli farkı budur. Enjeksiyon ile likit veya membran şeklinde uygulanabilen CGF içinde; trombositler, lökositler büyüme faktörleri ve sitokinleri barındırır.

2.15. PRP Tedavisinin Kontraendikasyonları ve Yan Etkileri

PRP terapisinin bilinen bir sistemik yan etkisi ortaya konulmamış olup otojen elde edildiğinden dolayı organizma reaksiyonu veya viral bulaş ihtimali ihtimali yoktur (89, 344). Sadece işlem öncesinde standart olarak uygulanabilen lokal anestezi için alerji veya anafilaksi riski göz önüne alınmalıdır. PRP’nin el ile aktivasyonunda; aktivasyonda kullanılabilen sıgır trombinin sonrasında faktör IV’e, XI’e ve trombine oluşan uygulanacak hastanın vereceği reaksiyon sonrası fulminant koagülopati görülebilmektedir. Dolayısıyla alerji olarak bu da değerlendirilmelidir (12, 89, 272).

Son zamanlarda PRP içindeki büyüme faktörleri hücrelerin çoğalmasını ve bunun da kontrolsüz şekilde olabilmesi ile kanser ve metastatik sürecin tetiklenebileceği düşüncelerini doğurmakta ancak ana etki hücre membran düzeyinde olduğu hücre çekirdeğine bir etki yapmadığı için sadece teori düzeyinde kalabilmektedir. Mevcut gen salgısına; genetik ekspresyonu uyarması sonucu mitojen etki kazandırmasına sebebiyet vermesine ancak bunun bir karsinogenik sürece yola açmayacağı düşünülmektedir (12, 267). Enjeksiyonun ilk anlarında normal fizyolojik cevaplar sonucu bir kötü hissedim

durumu olabilir ancak bunun da sebebi PRP içindeki materyallere olan ilk tepkidir. Nadir olarak enjeksiyona bağlı sinir, damar yaralanması, skar dokusu oluşumu ve kalsifikasyon görülebilir bunun önüne geçilmek için insülin enjektörü kullanılabileceği önerilmiştir (89). Tümör mevcudiyeti, aktif enflamasyonun devam edişi, tüm cerrahi işlemler için kesin kontrendikasyon sebebi olan kandaki trombosit sayısının mikrolitrede 10 binden az oluşu, metastazik prosesler, gebelik ve laktasyon dönemleri kontrendike durumlar olarak karşımıza çıkabilmektedir. Uzun süreli ve sabit olarak antikoagülan, antiagregan kullanılmasına devam edilmesi trombosit fizyolojisini değiştirebilecek potansiyel barındırdığı için etkinliği değiştirebilir olup negatif sonuçla karşılabilmektedir (91, 271).

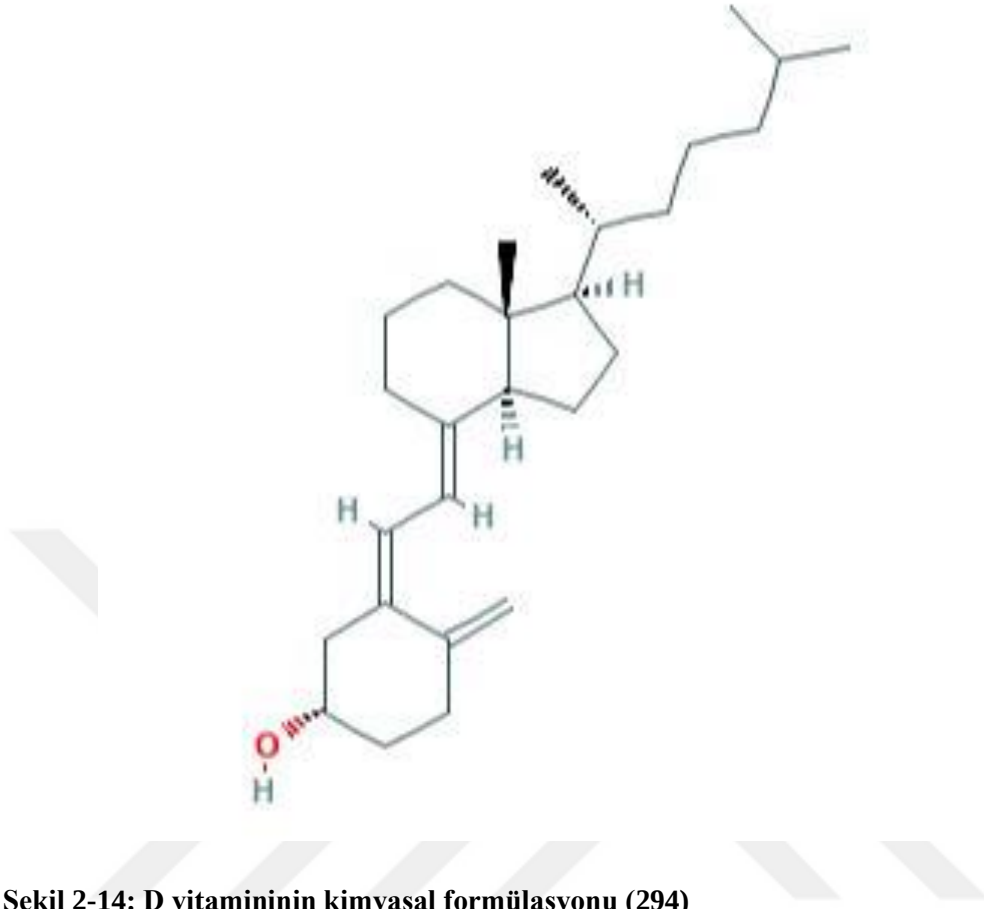
Kişinin kendi kanından elde edildiği için PRP – PRF ile ilgili herhangi bir alerjik reaksiyon olasılığı nadirdir. Ancak yapılan bir çalışmada aktivatör olarak sonradan eklenen kalsiyum sitrata karşı hastada PRP uygulanan alanında intradermal teste pozitif yanıt alındığı belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada PRP uygulanır uygulanmaz dokuda reaksiyon tespit edilmiş serum IGE seviyelerindeki artış tespit edilmiştir. Ayırıcı tanıda faktör olarak kalsiyum sitrat olduğu düşünülmüştür (242). Başka bir çalışmada direk L- PRP ile değil ancak L-PRP ile kemik kavitesi içine kemik grefti konduğunda kemik greftinin yıkımına bağlı olarak tüm materyale karşı bir reaksiyon geliştiği açıklanmıştır (25). Venöz bacak ülser tedavisinde PRP kullanıldığında bir hastada tromboflebit geliştiği diğer hastada ülserin tetiklendiği yine yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (375). Henüz yeni yaygınlaşmakta olan bu terapide alerjik reaksiyon ile ilgili daha fazla dataya ihtiyaç duyulmaktadır.

Görülen hipersensitivite tip I reaksiyonunun hemen olması, IgE seviyesinin artışının ve intradermal testte pozitif yanıtın kalsiyum sitrata bağlı geliştiği ortaya konmuştur. Tip I reaksiyon genel olarak IgE tarafından tetiklenen mast hücre salınımı sonrasında gerçekleşmektedir. PRP terapisinde araştırmacılara bağlı farklı konsantrasyonlar farklı yöntemler (kan hacmi, lökosit, eritrosit sayısı, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri , TGF1 β , VEGF) kullanılırken bir fark oluşturan ise tüp içerisine konan antikoagülanlar veya aktivatör farklılığıdır. En sık kullanılanları da daha önce bahsedildiği üzere heparin, sitrat, asit sitrat, dekstroz sitrat, teofilin, adenosin, dipramidoldür.

2.16. D Vitamini

Metabolik faaliyetlerin, büyümenin ve sinirlerin gelişimi ve fonksiyonel özellikleri ile ilgili görevlerde rol alan maddelere vitamin denir. Yağda ve suda çözünebilenler olmak üzere iki gruba ayrılan vitaminlerden yağda çözünenler A, D, E ve K vitaminleri karaciğerde ve yağ hücrelerinde depolanmakta ancak gereğinden fazla alımı organizma için zararlı olmakta ve özellikle prematüre ölümlerde risk barındırmakta olup suda çözünebilenler ise B kompleks vitaminleri ve C vitaminleridir. Yağda çözünenlerden farklı olarak depo edilebilme özellikleri olmamakla birlikte yağda eriyenler kanın hemostazında, kemiğin metabolik devamında, immün sistemin virus bakteri ve mantar enfeksiyonlarına karşı reaksiyon oluşturmada, antioksidan faaliyetlerde ve birçok hastalığın önlenmesinde karşımıza çıkmaktadır. Suda çözünenler organizma için alınması kati surette gerekli olup metabolik faaliyetlerde yollara dahil olmakta, aksiyon olabilmesi için gerekli enerjinin ortaya çıkarılmasında, yapım ve yıkımın çift yönlü olabildiği reaksiyonlarda, karbonların reaksiyonlar düzeninde aktarılmasında görev almaktadırlar. A vitamini bakteri, virüs, mantar veya protozoalara karşı bağışıklık sisteminin güç artışı, optik sistemin işlevinde ve olağan döngüde kemik büyümesinde görev almaktadır. Süt, yumurta sarısı, meyve, sebze ve karaciğer gibi gıdalarda bulunan A vitamini oksidatif metabolizmada ve obezitenin yönetiminde rol almaktadır. Olası eksikliği yağ kütlesinin bir yerde toplanmasıyla ve obezite ile ilgili kronik enfeksiyon riskinin artması ile ilişkilendirilmiştir. Toklukla korelasyon göstermesiyle bilinen optik fonksiyonun sağlanabilmesi ve cilt doku sağlığının devamının sağlanmasında rol üstlenen B vitamini; kırmızı ette, balıkta, sütte, yumurtada; bezelyede, tahıllarda, taze sebzelerde ve fasülyede bulunmaktadır. B1 vitamini organların görevlerini yerine getirebilmesi için bir koenzim olarak bilinmekte, eksikliğinde piruvat ve laktatın fazla miktarda depolanıp birikimine, asetat, asetilkolin, alfa keto gluterat ve sitrat seviyelerinin düşmesine sebep olmaktadır. B6 eksikliği ise romatoid artrit, çölyak, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi aşırı duyarlılık hastalıklarının mevcudiyetinde arteriyel damar çeperlerinin bütünlüğünün bozulmasına, platelet fonksiyonlarının kaybına ve kolesterol mekanizmasında görev alan enzimlerin bozulmasına sebep vermektedir ve CRP seviyesinin yükselmesine yol açmaktadır. Homosisteinin metionine dönüşümünde rol üstlenen kofaktör olan B12 vitamininin eksikliği insulin direnci oluşmasına, kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına ve metionin metabolizma bozukluğuna yol açabilir. B12 vitamini DNA hasarını oluşturan

serbest radikallere karşı savunma gücü oluşturan antioksidan olarak görev almakta aynı zamanda kalp hastalıklarının, kanserin ve artırtlerin oluşumunun önlenmesinde rol üstlenmektedir. Cilt dokusunda, kıkırdaklarda, tendonlarda, kan damarlarında ligamentlerde bulunan kollajenin üretiminde rol almaktadır. Eksikliği skörbüt ile karakterize bu vitamin brüksel lahanası, brokoli, biber, domates, patates gibi besinlerde bulunmaktadır. Hemostazın engellenmesinde, hücrelerin membranının bütünlüğünün devamında görev alan E vitaminin eksikliği durumunda karşımıza vasküler, üreme ve sinir sistemleri bazında sorunlar çıkmaktadır. Obezitenin tedavisinde adiponektinin sentezlenmesinde leptinlerin ortaya çıkmasında proenflamatuvar sitokinleri uyarma görevlerinde etkisi mevcuttur. Soya, mısır ve zeytin yağında, antep fıstığında, ayçiçek çekirdeğinde, fındıkta, büyük karideslerde ve fıstıkta kendine yer bulmaktadır. Kanın hemostazında ve yaranın iyileşmesinde görev alan K vitamini hemostazda rol alan 13 proteinden biri olarak nitelendirilebilir. Eksikliği durumunda yetişkinde osteomalazi, çocuklarda rikets karşılabılilen hastalıklardandır. Güneş ışınları ile birlikte ciltte yapımı sağlanabilir, yumurtada, yağlı balıkta, kahvaltılık, tahıllarda ve karaciğerde bulunur. Güneş ışığı vitamini ise D'dir (131, 294, 396).



Şekil 2-14: D vitamininin kimyasal formülasyonu (294)

Vitaminin esas kaynakları; meyve suları, bazı tahıllar, süt, peynir ve yoğurt iken depo halde olarak ringa balığında, karaciğer yağında, morinada, somonda ve orkinosta kendine yer bulmaktadır (171). Yiyecekler içine yetersizlik durumlarını elimine etmek adına geç 1940’larda Avrupa’da eklenmiş ama toksikasyonlarla karşılaşılması üzerine bundan vazgeçilmiştir ancak kontrollü olarak sütün, margarinin, bazı tahılların içine eklenmesi gerçekleştirilmektedir (171).

Güneş ışığı vitamini olan D vitamini organizmada üretimi yapılabilen tek hormon olarak karşımıza çıkmakta olup neredeyse 1 asırdır kemiğin mevcut sağlık durumunun devamında rol aldığı belirlenmiştir. Fosfor ve kalsiyum sisteminin gelişiminde rol almakta ve sağlıklı kemik ve iskelet mekanizmasında etkisi önem arz etmektedir. 1960’lı yıllarda Whistler ve Glisson ile eksikliği tanımlanmış ve bulunmuş olup, yetersizlik ve eksiklik durumlarında kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser, otoimmün ve enfeksiyöz hastalıklar, metabolik sendrom ve bir sürü özellikle kemik hastalıkları ile ilişkide olabileceği ortaya konmuştur. Yağda eriyen vitaminler içinde kendine yer bulan, endojen bir şekilde, optimum ortamda sentez edilebilen bir steroldür.

(102, 171, 173, 309). Yağda çözülebilen ve sentezi deriden güneş ışığı vasıtasıyla 280-315 nm dalga boyu sekansında olan ultraviyole ışıklar ile başlamaktadır (118). Mevsimsel döngü bazında yazın gün içinde yaklaşık yarım saatlik güneşten faydalanma ile yeterli miktarda D vitamini sentezi yapılabilir (118, 335). Koyu cilt barındıran kişilerde, obezlerde ve yaşlılarda D vitamini sentezi metabolik olarak azalmaktadır. Deri kaynaklı ve diyet ile alınan D vitamini karaciğerde 25(OH) ile metabolize olmakta ve D vitamini aktif metaboliti böbreklerde 1,25 dihidroksivitamin D'ye dönmemektedir (173). D vitamini seviyesinin kontrolü 25(OH) ile yapılır. D vitamini seviyesinin normal konsantrasyonu 40-60 ng/ml olmalıdır, ancak alt kritik sınır 25 ng/ml'dir. (118, 175, 256).

Solunum fonksiyonları, sindirim mekanizması, uyku, dokunun fonksiyonları, laktasyon, üreme, stres, gelişme gibi fizyolojik, davranışsal, metabolik faaliyetler, doku ve organlar arası bağlantının sağlanmasında rol almakta olan hormonlar; hedef yerdeki görevlerini bunlara özel alıcı proteinlere bağlanarak sağlarlar. Amino asit yapıda olanlar hidrofiliktir, suda çözünen özellik göstererek işlevlerini sağlamaktadır. Sekonder habercilerle görevlerini meydana getirmektedirler. Ancak steroid yapıda olanlar yağda çözünen özellik göstererek çekirdekte hareketi sağlamak için plazma membranını geçmektedir (285).

D vitamini steroid yapısına sahip bir hormon olarak addedilebilirken fosfat, kalsiyum ve kemik metabolizmasının ana düzenleyicilerinden biridir. Plazma içindeki kalsiyum seviyesinin stabil olmasında PTH ile birlikte sinerjizm gösterir. Paratroid bezde, böbrekte, bağırsakta ve kemik üstündeki etkileriyle fosfat, kemik ve kalsiyum metabolizmasını derlemektedir (431). Kalsiyum seviyesinin kontrolü, üretimi ve yer değişimi dolayısıyla kalsiyum dengesi; bağırsak, kemik dokusu ve renal organına etkisi olan paratroid hormonu, kalsitonin hormonu ve D vitamini aktif metaboliti ile kontrol altındadır. Plazma kalsiyum seviyesi azaldığında PTH, kemik dokuda fosfor ve kalsiyum mobilizasyonunu uyarır, distal böbrek tübüllerinden kalsiyum geri emilimini artırır ve böbrek doku hücrelerinde aktif D vitamini yapımını stimüle eder. Aktif D vitamini; fosfor ve kalsiyumun intestinal sistemden geri emilim oranını yükseltir ve PTH ile birlikte kemiğin döngüsünü regüle eder. Kalsitonin de kemik yıkımını önlemek amacıyla osteoklastlar üzerinde etki göstererek kalsiyum dengesinde görev almaktadır (114).

D vitamini bir çok fonksiyon üzerinde rolü olan bir hormondur. Optimal değerlerinden farklı bir seviyede bulunması bir çok faaliyeti etkilemektedir ve bu özellik sebebiyle olması gereken seviyesi ile ilgili bir çok çalışma için güç oluşturmıştır. Gün ışığı maruziyeti sonucunda organizmada yaklaşık 10.000 ünite D vitamini üretilmektedir. Tek bir günlük süreçte organizmanın ihtiyacı olan D vitamini miktarı 200-600 ünite arasındadır (225). 25(OH)D'nin plazma seviyesi incelendiğinde 20 ng/ml - 50 nmol/l altındaki değerler yetersizlik, 20-32 ng/ml - 50-80 nmol/l arası değerler eksiklik, 54-90 ng/ml 135-225 nmol/l arası değerler normal (güneşli ülkelerde) 100 ng/ml 250 nmol/l'den yüksek değerlerde fazlalık 150 ng/ml - 325 nmol/l'den fazla değerler de intoksikasyon nitelendirilir (5).

Optimum sağlıklı kemiğin normal fizyolojik sürecinde D vitamini önemli bir yer edinmektedir. D vitamini seviyesinin azalmasına bağlı olarak serum fosfat ve kalsiyum değerlerinde de azalmalarla karşılaşılabilir. Mineralizasyonu destekleme sürecinde ve kalsifikasyonda D vitamininin ana fonksiyonu; serum fosfor ve serum kalsiyum değerlerini süpersatürasyon oluşacak derecede yükseltmektir. Bu işleve ek olarak kalsiyumun kemikten hareket etmesini sağlamak ve bunun sonucunda parathormon katılımını uyarmak da vardır (177). Organizmadaki D vitamininin kemik, kalsiyum ve fosfat metabolizması üzerindeki etkisinin yanı sıra genel sağlık durumunun devamı bozulması üzerine de yadsınamaz bir etkisi mevcuttur. Akut ve kronik çeşitli rahatsızlıklar incelendiğinde D vitamini seviyesinin az olması ile bir korelasyonları tespit edilmiş olup günümüzde kemik metabolizması ile ilgili etkisi çözülerek rikets neredeyse tamamen elimine edilmiştir. Organizma üzerindeki rolü hakkında D vitamini ile ilgili bir çok çalışma yapılmaya devam etmektedir. Bu çalışmalarda hemen hemen her dokuda, hücrelerde özellikle kromozomlara bağlı D vitamini reseptörlerinin mevcut bulunduğu tespit edilmiştir (1, 320). Bu reseptörler sadece osteoblastlarda, distal renal tübüllerde, eritrositlerde değil cilt keratinositlerinde, lenfositlerde, hipofiz bezi hücrelerinde, premyelositlerde, paratiroid bezi hücrelerinde ve overlerde de yer almaktadır. D vitamininin kemik metabolizması dışı etkilerinin de barındığı tespit edilmekle beraber yapılan bazı çalışmalarda kardiyovasküler sistem hastalıklarında D vitamini ile ilişki tespit de sağlanmıştır. Olası eksiklikte myokard enfarktüsü sonrasındaki mortalite artabilmektedir ve D vitamini seviyesinin normal seyrinde arterlerde kolesterol birikiminin de engelleneceğini ortaya koymuş araştırmalar mevcuttur. Böbreğin kendi normal fizyolojik fonksiyonundan ayrı olarak albumin

atılımını azaltarak böbrekler üzerine koruyucu etkisi olduğu ve kan basıncının kontrol altında seyretmesini sağladığı da belirlenmiştir. Ek olarak böbrek, göğüs, kolon ve prostat kanserlerinde metastaza karşıt bir rol üstlenmekte olduğu da keşfedilmiştir (431).

Multifonksiyonel hormon olarak nitelendirilen D vitamininin kemik metabolizması ve genel sağlık durumu üzerinde olduğu kadar ağız ve diş sağlığı üzerine yapmış olduğu etkileri de önemlidir. Süt ve süt ürünlerinin ve D vitamininin periodontal dokularda ve bu dokuların en ciddi rahatsızlığı periodontitis karşısında önleyici ve koruyucu etkileri olduğu öne sürülmektedir. Aynı zamanda D vitamini ile ilgili kritik reseptörlerden olan VDR'nin (D vitamini reseptörü) kendi yapısında oluşabilecek polimorfizmlerin periodontitis hastalığını duyarlılıkla ilişkili olabileceği nakledilmiştir. Tükürük sıvısı içindeki fosfat ve kalsiyum seviyesi ve fosfat ve kalsiyumun tükürükte bulunması dişlerin üzerinde biyofilm oluşmasının önüne geçebilirken kalsiyum alımının yüksek oluşu kemik kaybının önüne geçmektedir. Kemik kaybının önüne geçilmesi diş dizisinin kayıp olmadan devamına imkan tanımaktadır. Kalsiyumun absorbe edilmesinde ve kemiğin fizyolojik mekanizması ile birlikte doğuştan gelen immun sistemi üzerindeki etkilerle birlikte ağız sağlığının optimal devamını sağlamakta D vitamini mutlaka alınması gerekli bir hormon olarak karşımıza çıkar. Aynı süreç içerisinde periodontal tedavi basamaklarında vitamin D₂ kemiğin oluşumu remodelling ve rezorpsiyon süreçlerinin düzgün devamı ve ideal immun fonksiyon özelliğinin gösterilmesi adına da gerekli olmaktadır (1, 107, 155).

Bağışıklık hücrelerinin D vitaminine duyarlı olmaları içlerindeki D vitamini reseptörlerinin tespiti sonrasında ortaya konmuş olup bu buluş D vitamininin bağışıklık sisteminde rol alabildiği düşüncesini doğurmuştur. D vitamininin eksik veya yetersiz olması immun cevabın da yeterli olamaması sonucu antimikrobiyal peptit salgılanmasında azalmanın görülmesine ve bu da agresif periodontitis için risk oluşmasına sebep olmakta ve hastalık riskini yükseltmektedir (8).

Patolojik aşırı duyarlılık reaksiyonları tiplerinin içinde sayılan tip I ve tip II diyabetes mellitus hastalıklarında da belli bir takım çalışmalar sonucu D vitamini eksikliği olduğu gösterilmiştir. Otoimmun hastalıklar olarak nitelendirilen multipl skleroz ve romatoid artrit hastalıklarının patojenezinde yine D vitamini eksikliği tespit edilmiş ve bu durumlarda D vitamini eksikliği ile ilişkide bisfosfonat kaynaklı çene

kemiği osteonekrozu - BRONJ oluşma ihtimalinin yüksek olduğu vurgulanmıştır. D vitamini seviyesinin eksikliği ile birlikte otoimmün rahatsızlıklar, alerjik hastalıklar, kardiyovasküler sistem hastalıkları üzerinde yeterli antienflamatuvar etki olamayacağı gibi intraoral rahatsızlık olarak görülen periodontitiste de aynı etki karşımıza çıkmaktadır. Aynı bağlamlarla beraber periodontal rahatsızlıklarla çeşitli sistemik hastalıklar arasında iki yönlü bir bağlam olduğu ortaya konmuş olup D vitaminine bağlı kemik erimesinin sistemik olarak görülmesi ile osteoporozun dental kayıplara yol açtığı ve özellikle bu durumla açıklanabilmektedir. Yine bu sebeple postmenapozal kadınlarda periodontal hastalık daha sık görülmektedir (409, 431).

Gebelik periyodunda optimal düzeyde D vitamini olamaması bebeğin dental dokularının kalsifikasyon ve mineralizasyon sürecinde etki gösterebileceği gibi, erken dönem çocukluk çağı çürükleri ve mine hipoplazisi gelişme olasılığını arttıran faktör olarak görülmektedir. Çalışmalar maternal periodontal rahatsızlıklar ile erken doğum arasında bir korelasyon olduğunu da göstermektedir.

Periodontal hastalıklarda görülen mikroorganizmaların vasküler yol ile uterusu ulaşarak prematüre doğuma ve olması gerekenden daha az ağırlıkta bebek doğumuna sebebiyet verebileceği, çalışmalarla gösterilmiş olup enflamasyon sürecindeki periodontal dokular vasıtası ile salınan proenflamatuvar sitokinlerin hem anne hem bebeğe etkileri olabileceği dile getirilebilmektedir.

Bununla birlikte, hamilelik süresince yetersiz D vitamini düzeyleri, bebeğin diş kalsifikasyonu üzerine etkili olabileceği gibi; erken çocukluk çağı çürükleri ve mine hipoplazisinde predispozan faktör olarak etki edebilmektedir. Aynı zamanda çalışmalar maternal periodontal hastalıklar ile prematüre doğum arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Periodontal dokuların yüksek düzeylerde ürettiği proinflamatuvar sitokinlerin anne ve bebeğe sistemik etkilerinin olabileceği nakledilmektedir. Ayrıca, periodontal hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların kan yoluyla uterusu ulaşarak erken doğumu ve düşük doğum ağırlığı olasılığını arttırdığı da yine nakledilmiş idi. Periodontal hastalıklarda yetersiz D vitamininin rolü olduğu rapor edilmiştir ve hamilelik esnasında D vitamin takviyeleri olumsuz hamilelik sonuçlarını ve maternal enfeksiyon riskinde azalmayı sağlamaktadır (410). Günlük periyotta 50,000 IU'den fazla alınan D vitamini, 25(OH)D düzeyini 150 ng/ml seviyesinin üzerine çıkartmaktadır. Bu da hiperkalsemi ve hiperfosfateminin direkt sebebi olarak görülmektedir. Poliüri,

polidipsi, kusma, ensefalopati ve azotemi durumlarında D vitamini doz yüksekliği gözden kaçırılmamalıdır (225). $1,25(\text{OH})_2$ vitamin D, fibroblast büyüme faktörü 23 ve paratroid hormonu (PTH) ile birlikte plazma içindeki kalsiyum ve fosfat seviyelerini ve bununla beraber mineralizasyonu da kontrol etmektedir. Hipokalsemi, PTH'ın üretimini ve serbestlenmesini stimüle ederken hiperkalsemi ters etki oluşturur. PTH salgısının yapılabilmesi aynı zamanda magnezyum ve katekolaminler ile de ilgilidir. Düşük magnezemi, salgılanmasını uyarmaktayken uzun süreli magnezyum seviye azlığı, baskılanmaya sebep olur. Aynı zamanda aktif D vitamini PTH'ın üretimini inhibe etmektedir. Negatif geri bildirim PTH ve D vitamini arasında görülen bir mekanizmadır. Yüksek PTH kemik katabolik hücreleri olan osteoklastlar vasıtasıyla kemik yıkımına sebebiyet verir. Kemik dokudan fosfat ve kalsiyum salımı uyarılır. Rezorpsiyon artışı ile osteoblast aktivitesi yeniden şekillenmenin devamı için gerçekleşir bu da süreç devinimi artırır.

Hidroksilasyonu azaltıp katabolik sürecini hızlandıran FGF23; fosfat ve kalsiyumun absorpsiyonunu ve yeniden emilimini kısıtlayarak dolaylı; $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'yi antagonize ederek de direkt etkisini sunmaktadır. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ osteosit hücreleri içindeki FGF23 ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ arasında geri bildirim mekanizması vardır. FGF23 salınması ile gerçekleşebilen reaksiyonlardan PTH uyarımının artışı; fosfat ve kalsiyum düzenlemesinin böbrek ve paratroid arasındaki devinimini engeller. Ancak FGF23, $1,25$ dihidroksivitamin D ve PTH'ın birbirleri ve sistemler ile etkileşimleri halen net olarak anlaşılamamıştır. Renal 1α hidroksilaz aktivasyonunu stimüle eden PTH, eylemi sonunda 25OH vitamin D'nin aktif metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye dönüştürür. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ de kalsiyum plazma oranlarını yükseltebilmek adına bağırsaklardan geri emilim, renal bazda kalsiyum deposunu fazlalaştırma ve iskelet kalsiyum serbestlenme işlemlerini teşvik eder.

Osteoporotik yaşlılarda D vitaminin metaboliti olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin üretiminde yetersizlik olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir takım araştırmada $25(\text{OH})\text{D}$ seviyesi ile PTH plazma düzeylerinde bir negatif korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Günümüzde organizmanın metabolizmasında kalsiyumun normal döngüde kullanılmasını sağlayabilmek ve PTH düzeyini koruyabilmek amacıyla $25(\text{OH})\text{D}$ plazma düzeyinin en az 28ng/ml olması gerektiği tespit edilmiştir. Bunlara bağlı olarak

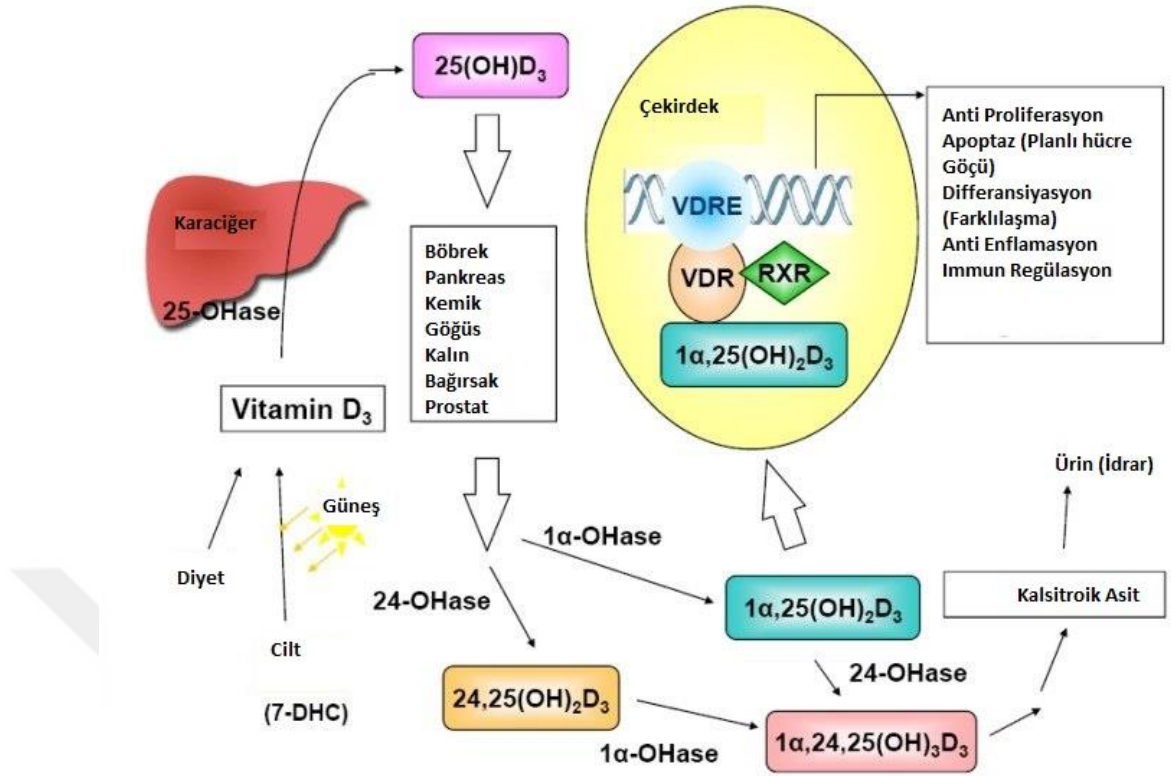
D vitamini seviyesinin düşük olması kemiğin sağlık durumunu negatif etkileyebilecek yıkıcı PTH düzeyine sebebiyet verebilmektedir (79).

D vitamininin yapısal olarak vitamin D₂ ve vitamin D₃ olarak iki formu mevcuttur. Vitamin D₂ mantar hücresinin hücre duvarı strüktürü olan ergosterolden meydana gelen 28 karbon içeren bir molekül iken, streoid yapısında bir prohormon olan vitamin D₃ ise yapı olarak son derece sabit ve yağda çözünebilen özellik gösteren 27 karbon içeren bir hormondur. 37 ana metaboliti tanımlanan vitamin D₃'ün erime ısısı yaklaşık 84°C olup yapısal olarak 3 çift bağa sahiptir. Hayvansal hücrelerin oluşturduğu dokularda yer alan kolekalsiferol ve bitkisel hücrelerin oluşturduğu dokularda yer alan ergokalsiferol, D vitamininin ana kaynaklarıdır. Kolekalsiferolden farklı olarak yapısında 4 çift bağ barındıran ergokalsiferolün erime ısısı 121°C derecedir. UV emilimi olarak 265nm olan her iki bileşikten vitamin D₃'ün durağan halinden aktif yapısına dönüş yapabilmesi için karaciğerde 25(OH)D₃'e metabolizasyonu şarttır (431). 1,25(OH)₂D₃'e metabolize olması böbrek içinde gerçekleşir (88).

2.16.1. D Vitamini Metabolizması

Vitamin D₃'ün üretimindeki ilk adım ultraviyole veya güneş ışınlarının etkisi sonucu cilt üzerinde bulunan provitamin D'nin kolekalsiferole farklılaşmasıdır. Daha sonra bağlanma işleminde görev alan D vitamini bağlayan proteinler rol üstlenir (DBP). Bağlanma aşamasındaki hedef D vitamininin gitmesi gereken, organlardır. Daha sonra D vitamini bağlayan proteinlere (DBP) bağlanarak hedef organlara taşınırlar (309). Diğer ismi kolekalsiferol olan vitamin D₃ standart koşullarda ciltte güneş ışını ultraviyole bileşeni sonucunda gerçekleşen bir fotokimyasal reaksiyonun ardından 7-hidrokokolesterolde meydana gelmektedir. Normal şartlarda inaktif olan D₃ vitamini renal ve hepatik organlardaki enzimler vasıtasıyla bağırsakta kalsiyumun absorpsiyonunu artırır ve kemik dokuda ve böbrekte aktif 1,25 dihidrokolekalsiferole dönüştürürler (309). Güneşin ciltteki etkileşimi sonucu sentez edilen vitamin D₃ insandaki D vitamini gereksiniminin yaklaşık %90-95'ini karşılayabilir (171). Vitamin D₃ kendi yolunu hücre zarından hücreler arası matrikse doğru dışarı çıktıktan sonra dermal dokuların içindeki kapil ağından kendi yolağını oluşturarak sağlamakta en son da D vitamini bağlayıcı proteinlere bağlanarak tamamlamaktadır. Cildin üzerindeki vitamin D₃ ve gıda tüketimini kaynak alan vitamin D₂, hepar hücrelerinde 25(OH)D'ye

metabolize olarak D vitamini için ana döngüyü oluşturmaktadır (Şekil 2-15). Bu materyal; plazma içindeki D vitamini seviyesi için klinisyenlerin ölçtüğü ve seviye tespitinde kullanılan bir materyaldir. Ancak bu madde biyolojik olarak etkinlik gösteremeyen bir metabolittir. Renal organlarda bir ek hidroksile olmaya gerek duyan bu madde, bu aşamadan sonra $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye dönüşmektedir (171). D vitaminin ortaya çıkmasında kritik roldeki 1α hidroksilaz enziminin etkinliğinin kontrolü parathormon, fosfor, fibroblast büyüme (growth) faktör 23 ve kalsiyumun görev aldığı bir birliktelik ile olur (307, 414). FGF 23 kemikten salınımı gerçekleşen renal organda ve bağırsakta Na-PO_4 kotransportuna sebebiyet vermekte $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ üretimini inhibe etmekte ve 24 hidroksilaz enzimini aktif hale çevirerek $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin pasif hale çevrilmesine sebebiyet vermektedir (307). $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ renal organda, bağırsakta ve diğer dokuların bünyesinde yer alan D vitamini reseptörleri üzerine etkimektedir (Tablo 2-1). İnce bağırsaktan kalsiyum emilim oranını yükselterek renal organlardan kalsiyumun kaybedilmesinin önüne geçmektedir (307). Genel görevi serum kalsiyum seviyesinin belirli miktarda olmasını sağlamaktır. Aynı zamanda $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin hücre çoğalmasını engelleyici, son basamak farklılaşmayı uyarıcı, yeni damar ağı oluşumunu engelleyici, insülin sentezini arttırıcı ve renin oluşturulmasını engelleyici biyolojik görevleri mevcuttur (172, 307). D vitamini ve D vitamininin tüm metabolitleri reseptörler gibi bir çok dokuda kendine yer bulmuş 24 hidroksilaz vasıtası ile aktivasyonunu kaybederek safra yoluyla atılmaktadır (42, 414). Bu madde duodenumdan kalsiyum, ileumdan ise fosfor absorpsiyon oranını yükseltir. D vitamini bulunmadığında gıda tüketimi sonrası kalsiyumun ancak yaklaşık %10-15'i ve fosforun yaklaşık %60'ı emilebilir.



Şekil 2-15: D vitamininin üretimi (68)

1,25(OH)₂D kemiğin yıkımını artırır, PTH'in üretiminin ve ortama salınmasının azaltılması, reninin üretiminin inhibisyonu, insülinin üretiminin stimülasyonu, kardiyak kas kasılmasının artırılması gibi görevleri üstlenmektedir. Rezorpsiyonun arttığı yerde yapım da mevcut olduğundan yeniden şekillenmeye de katkı vermektedir. Tüm bunlara ek olarak bağışıklık sistemi bazında T lenfositlerini aktif hale sokmak ve bununla beraber sitokin salınımını yükseltmek, B lenfositlerini aktif hale sokarak da Ig oluşumunun artması görevini üstlenen katekolamin üretimini sağlayarak bağışıklık sistemini düzenleyici rolünü de alır (139). Vasküler düz kas, kardiyomyosit ve endotel hücrelerini içine alan şekilde dağılım gösteren vitamin D reseptörleri vasıtasıyla 25(OH)D'nin endotel hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde 1,25(OH)₂D'ye dönüşümü görülebilmektedir. Dolaşım halindeki 1,25(OH)₂D membrandan ve sitoplazmadan geçmekte, hangi vitamin D reseptörüne bağlanacaksa onun nükleusuna ulaşmakta ve daha sonrasında 1,25(OH)₂D ve vitamin D reseptörü birlikteliği retinoik asit reseptörüne bağlanarak protein sentezini uyaran nükleer transkripsiyon faktörü olarak davranmaya başlar. 1,25(OH)₂D direkt veya dolaylı olarak renal organda reninin sentezini, pankreasta insülinin sentezini,

lenfositlerden sitokinin deşarjını, kardiyomyosit ve vasküler düz kas hücrelerinin çoğalması ve büyümesini sağlayan genlerin düzenlenmesini sağlamakta onları regüle etmektedir (42).

Tablo 2-1: D vitamininin prekürsörleri ve metabolitlerinin terminolojisi

Genel Ad	Klinik Ad	Kısaltma	Açıklama
7- Dehidrokolesterol	Pro vitamin D ₃	7DHC	Hücre membranlarında lipittir.
Kolekalsiferol	Pre vitamin D ₃		Ciltte diyetle veya güneş ışınlarıyla elde edilir.
Ergokalsiferol	Pre vitamin D ₂		Diyetten elde edilir.
Kalsidiol	25- Hidroksivitamin D	25(OH)D	D vitamini durumunu yansıtır.
Kalsitriol	1,25 Dihidroksivitamin D	1,25(OH) ₂ D	D vitaminin aktif formudur.

1,25(OH)₂D, vitamin D₂' nin ana hormonal formu olup biyolojik faaliyetlerde görevi olan bir metabolittir. 1,25(OH)₂D'nin üretilmesi böbrekte sıkı bir kontrol mekanizması altında olup paratroid hormonu ile üretimi uyarılmaktadır. Kalsiyum, fosfat ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) ile üretimi de baskılanmaktadır. 1,25(OH)₂D'nin böbrek harici keratinositlerde, makrofajlarda ve osteoblastlarda farklı bir kontrol mekanizması ile üretimi görülmektedir. Ana yapı olarak tümör nekrotizan faktor α , interferon γ ve interlökin 1 (IL-1) β ile uyarımı sağlanmaktadır (27, 411).

Kolekalsiferol, süt ürünleri ve balık yağları gibi diyetel olarak organizma içine dahil edilebilen veya dermal dokularda (ciltte) ultraviyole ışınlarıyla 7 dehidrokolesterol ile sentezlenen bir ön hormondur. Kolekalsiferolün sentezlenmesi enlemlere bağlı olarak etkinliği değişen ultraviyole ışınlarının yoğunluğuna ve mevsimlere bağlıdır. Giysilerin ve güneş kremlerinin 7 dehidroksikolestörün kolekalsiferol çevrimini

önlediği de bildirilen durumlardandır. D vitaminin aktif metabolitine çevrilebilmesi kanser hücre gelişim ve çoğalmasını inhibe etmek ve bazı bağışıklık sistemi rahatsızlıklarından organizmanın korunabilmesi için gereklidir (72). Sitokrom P450'ye bağımlı olan 25-hidroksilasyon, 1 α hidroksilasyon ve 24 hidroksilasyon olmak üzere D vitamini metabolizmasının 3 ana adımı mevcuttur. Sitokrom P450 oksidazları, enzimleri organeller olarak hem mitokondride hem de endoplazmik retikulumda yer almaktadır. Elektron vericisi olarak endoplazmik retikulumda P450 redüktaz, mitokondride ferrodoksin redüktazdır (28).

Ciltte meydana getirilen; D vitamininin naturel hali olan vitamin D₃'ün biyolojik olarak sabit olduğu; optimal düzeyde D vitamini alımında bile görülebilen riketse yol açabilen genetik defektler tarafından ortaya konmuştur. Sabit olarak alınan D vitaminin ardından genetik defektler sebebiyle rikets ile karşılabilmektedir. D vitamininin kendi aktif formuna çevrildiği, 1967 yılına kadar düşünülen bir durum iken 1969 yılında ise D vitamininin dolaşım halideki formunun elde edimi sağlanmış bu form kimyasal olarak belirlenmiş ve üretilmiştir. Bu belirlenen birleşen 25(OH)D₃ olarak karşımıza çıkmış olup metabolik olarak aktif değildir. 1971 yılında ise D vitamini kaynaklı, kendisinden elde edilen son aktif hormon elde edilmiştir bu 1,25(OH)₂D₃' tür. Bugüne kadar D vitamini kökenli birden fazla hormonal birleşim ve D vitamininin yaklaşık 33 metaboliti tanımlanmıştır. 24,25(OH)₂D₃, 24(R)-(OH)₂D₃, 25-(OH)₃D₃ bu metabolitlerin en önemli olanlarıdır. Metabolitlerin üretimi sitokrom P450 tarafından gerçekleştirilmektedir.

D vitamini; iskelet sistemi dışında, sayısız temel fonksiyonu olan çok fonksiyonlu bir hormondur. İntestinal kalsiyum ve fosfat absorpsiyonunda, RAS'ın (retiküler aktivatör sistem) düzenlenmesinde, ağız sağlığının korunmasında, doğal immünitinin artırılmasında, renal kalsiyum ve fosfat geri alımında, iskelet mineralizasyonunda, tümör hücre büyümesinin inhibe edilmesinde ve PTH sentezinin baskılanmasında rol oynamaktadır.

2.16.2. D Vitamini ile Kemik Metabolizması Arasındaki İlişki

Kemik mineral dansitesinin sayısal olarak azalmasının düzenlenmesi kalsiyumun ve D vitamininin etkide olması, serum, fosfor ve kalsiyum yoğunluğunun regüle edilmesiyle ilişkidir (188).

Direkt veya indirekt yol ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ – D vitamini reseptörü yolunun devamı kemik anabolik ve kemik katabolik ana hücrelerinin formasyonuna ve erişkin hale dönmesine yardımcı olarak kemiğin yeniden şekillenme sürecini etkileyebilmektedir. Kemik yapım ana hücreleri yani osteoblastlardaki $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ – D vitamini reseptörü yolunun aktiflenmesi alkalen fosfataz, osteopontin, tip I kollajen ve osteokalsini kodlayanlar başta olmak üzere bir takım genlerin yapımını ve sentez edilmesini artırarak yeni kemik oluşumuna katkı verir. Bununla beraber dış etkenlerle D vitamini reseptörünün farklılaşmasının kronik periodontal hastalıkların ve diğer inflamatuvar proseslerin gelişimi ile bağlantılı olabileceği sonuçları gösterilmiştir (213).

Periodonsiyum dokuları arasında kendine yer bulan kemik dokusu, intraoral düzeyde mandibular kemik ile ilişkilidir. Gerek yaşlanmada post menapozal süreçte gerek ise de bir hastalık olarak karşımıza çıkan osteoporozdan direkt etkilenen, kemik dokusudur. Kalsiyum seviyesinin ve serum D vitamini seviyesinin olması gereken düzeyden daha az oluşu ters bir kalsiyum denge sürecinin oluşmasına, kemiğin kalsifikasyon ve mineral çökmesi periyotlarının bozulmasına ve kemiğin yapısal olarak kayıp yaşamasına sebebiyet vermektedir. D vitamini eksikliği erişkinlerde osteoporoz ve normal kuvvetler karşısında fraktürlere veya patolojik kırıklara yol açabilirken çocuklarda ise raşitizm olarak görülen hastalığa sebebiyet vermektedir (188).

D vitamini takviyesiyle total D vitamini seviyesinin artırılmasında alveolar kemik rezidüel yüksekliğini koruduğu, cep derinliğini azalttığı, periodontal ataşman miktarı kaybını azalttığı ve sonunda daha iyi bir diş çevresi doku sağlığı ile devam ettiğini ortaya koyan bir çalışmada; oral sert doku cerrahisinden önce yetersiz kan D vitamini seviyesinin yükseltilmesi önerilmiştir (386).

Bir başka çalışmada ise D vitamini takviyesi ile normal seviyede ve normalden fazla olan D vitamini seviyesiyle yaşlılarda diş kaybının önüne geçilebildiği nakledilmiştir (227). Sitokin gibi kemoaktranların düzeysel artışı vücudun en zayıf bölgesinde inflamatuvar prosesi başlatması ile devam etmektedir. Katabolik

reaksiyonların biri de kemik yıkımını arttırması ile kemik mineral seviyesini azaltmasıdır. D vitamini seviyesinin yükselmesi direkt olarak kemik mineral seviyesindeki yükselmeyi tetiklemekte, indirekt olarak sitokin salınımının önüne geçerek vücut içindeki enflamasyon görülen süreçlerin oluşmasını ve vücudun aşırı tepki vererek zarar verici boyutta yıkım sürecine girmesinin önüne geçmektedir (431).

Kullanılan antirezorptif, antianjiyojenik ilaçlar günümüzde kanser, tümör ve bunlara bağlı olarak gelişen metastazları önlemektedir. Bu ilaç kullanılırken antianjiyojenik özellikleri ve yıkımı engellemesi normal kemik yeniden şekillenme sürecini inhibe etmekte yıkım gerçekleştiği zaman yapımın önüne geçmesi antianjiyojenik özelliği ile yara yüzeylerinin kapanmasını engellemesi ile birlikte gerçekleşen intraoral veya mukozal zedelenme durumunda çene kemiği osteonekrozuna sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarla osteonekroz gelişimi sonrasındaki vücut serum D vitamini seviyesinin yükseltmeye çalışılması veya yeterli seviyeye çekilmesinin iyileşmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. D vitamini değerlerindeki pozitivite makroskopik osteonekrozun eliminasyonuna yardımcıdır.

Büyük bir yoğunluğu kan içerisinde D vitamini reseptörü ile taşınan D vitamini; serbest şekilde dolaşımının etkilerinden de sorumludur. Kendi reseptörleri midede, timusta, böbrekte, deride, overda, hipofizde, pankreasta ve paratroid bezlerinde tespit edilmiştir. Steroid reseptör ailesinde olan D vitamini reseptörünün nükleer formunun aktiflenmesi ile $1,25(OH)_2D$ 'nin etkilerinin görülmesi mümkün hale gelir.

Daha önce bahsedildiği üzere fosfat ve kalsiyum metabolizması üzerine önemli etkisi olan D vitamini bu iki mineral materyalinin metabolizma fonksiyonlarında ve kemiğin mineralizasyonunda olması gereken düzeylerde, referans aralığında olmasını sağlamaktadır. VDR-Retinoid X reseptörü ile etkileşimde bulunan $1,25(OH)_2D$, bağırsak sisteminde kalsiyumun geri emilimini yaklaşık seviye %10-15 arasından yine yaklaşık seviye %30-40'lara çıkarmakla birlikte epitel kökenli kalsiyum kanalı ve kalsiyum bağlanma proteininin üretimine destek vermektedir. PTH seviyesinin düzenlenmesini sağlayarak fosfat ve kalsiyumunun metabolizmasına dolaylı yoldan etki eden D vitamininin bir etkisi de bu yolda karşımıza çıkmaktadır. Paratroid bezleri ise $25(OH)D$ 'yi kullanarak (bu substrat PTH yapımını önleyen bir substrat olarak karşımıza çıkmaktadır) sitokrom P27B1 etkinliği özelliği gösterip $1,25(OH)_2D$ 'nin lokal üretimini

sağlamaktadır. Önemli bir reseptör olarak görülen D vitamini reseptörünü aktif hale getirerek embriyonel dönemde 3. ve 4. faringeal arklardan oluşan paratroid bezlerden salgılanan PTH'nin düzenlenmesini baskılayabilmektedir. D vitamininin eksikliği PTH'ı arttırır, plazmadaki iyonize formdaki kalsiyumun düşük seviyeleri ile bağlantıdadır.

Yüksek 25(OH)D seviyelerine bağlı olan kalsiyum düzeyi PTH salgılanmasını baskılar. PTH böbrek tubuluslarından kalsiyumun yeniden absorbe edilmesi oranını yükseltmekte renal fosforun yeniden absorpsiyon mekanizmasına dahil olmasını azaltmaktadır. Paratroid hormon bütün bu fonksiyonlarına ek olarak fosforun ve kalsiyumun dengesi üzerlerine etkisiyle birlikte 1,25(OH)D'nin yapımını uyarmaktadır. Paratroid hormonun bir etkisi de iskelet sistemi kemiklerinden kalsiyum depolarının hareketi için osteoblast hücrelerini uyarmaktır. D vitamini seviyesinin azlığı (PTH'nin yüksekliği) ile sekonder hiperparatroidizm ile ilişkilendirilmektedir (63).

D vitamini durumu, sadece D vitamini eksikliği olan bireylerde değil, aynı zamanda D vitamin yetersizliği olan bireylerde de kemik mineral yoğunluğuyla (BMD) (bone mineral density) (KMY) (kemik mineral yoğunluğu) ilişkilidir. Kesitsel çalışmalarda, serum 25(OH)D ile kalçanın kemik mineral yoğunluğu arasındaki ilişkiler gözlenmiştir. Amsterdam D Vitamini Çalışması (Amsterdam Vitamin D Study) serum 25(OH)D ile femur boynunun kemik mineral yoğunluğu arasında serum 25(OH)D ile 30 nmol/l arasında bir ilişki göstermiştir (301). NHANES III çalışmasında (NHANES III Study) serum 25(OH)D – KMY (kemik mineral yoğunluğu) arasındaki ilişki Longitudinal Aging Study Amsterdam'da (LASA) 25(OH)D ve KMY genç (20-49 yaş) ve yaşlı erişkinlerde (≥ 50 yaş) 90 nmol/l.5 eşiğine kadar gözlemlenmiştir (29). Kalçadaki ve trokanterdeki KMY, 50 nmol/l'lik bir serum 25(OH)D seviyesinin yükselmiş olduğu ve daha sonra seviyelendiği tespit edilmiştir (230). 7441 menopoz sonrası kadında D vitamini durumu ve KMY ile ilgili bir çalışmada; osteoporoz kalçadaki trokanterik alanda serum 25(OH)D ile KMY arasında 50 nmol/l'nin altında bir eşik ile anlamlı pozitif ilişki göstermiştir. Bununla birlikte, kemik mineral yoğunluğu 50 nmol/l.7 üzerinde bir artış göstermiştir. D vitamininin KMY üzerindeki etkisini incelemek için birçok randomize plasebo-kontrollü klinik çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedir. Bunların birkaçı, D vitaminin kırık insidansı üzerindeki etkisini incelemek için daha büyük çalışmaların bir parçası olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların çoğunda kalsiyum; D vitamini ile birlikte 500 mg ila 1200 mg / gün

dozlarında verilmiştir (231). KMY artışı genellikle femur boynunda veya kalçada, bazen de toplam vücut kalsiyumunda gözlenmiştir. Çalışmaların çoğunda, KMY artışı birinci yılda %1-2 iken, ikinci yılda ise çok azdır. Orta derecede yaşlı ve ortalama 84 yaşında olan ve ciddi bakımdan yoksun olan huzurevinde yaşayan hastalarda yapılan ilk çalışmada D vitamin takviyesiyle, KMY'nin %7'lik bir artış gösterdiği görülmüştür (64).

Tüm bunların yanında PTH, kemik erimesinin terapötik tedavisinde kullanılan yapım esaslı ilaçların içine rekombinant olarak katılmaktadır ve bu ilaçlar ile kemiğin anabolik reaksiyonu desteklenmektedir. Bunun yapılabilmesi için günümüzde parathormona ait rekombinant yapılar PTH 1-34 (teriparatide) ve PTH 1-84 kullanılmaktadır. Bu medikamentler osteoblastların sayısını veya olgun hücreler olan osteositlerin görevlerinin yerine getirilmesini sağlayan sinyal mekanizmasını doğrudan hedeflemektedir ve etkisini bu yönde göstermektedir (391, 249). Bir çok eksperimental çalışmada parathormonun çeşitli doz aralıklarında uygulanması kemiğin yapım yıkım reaksiyonlarında ve şekillenmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Yapım tedavisinde kullanılan anabolik etkili bir ilaç olup, kemik yapımını doğrudan uyararak etki göstermektedir. Bu amaçla günümüzde insan parathormonunun rekombinant formları olan PTH 1-34 (teriparatide) ve PTH1-84 kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, osteoblast sayısını veya olgun hücrelerin fonksiyonlarını arttıran sinyal mekanizmasını hedef alarak etki gösterirler (249, 391). Parathormonun aralıklı olarak uygulanmasının kemik rejenerasyonunda etkili olduğu pek çok hayvan çalışmasında da gösterilmiş fakat doz miktarı, defekt ve kırık modelasyonunda etkinliği ve kullanım şekli henüz tam olarak kesinleştirilememiştir (123, 140). Kemiğin anabolik faaliyetlerinde olduğu gibi katabolik faaliyetlerinde de etkinliği olması PTH tedavisinin ana handikapı olarak karşımıza çıkmaktadır ancak bu etki türe, organizmaya, dozaja, uygulamanın yöntemi gibi bir çok parametreye bağlı olarak değişmektedir. PTH ile yapılan kemik erimesi (osteoporoz) tedavisinin sona ermesi, olması gerekenden fazla miktarda kemiği katabolik sürece sokmasıyla sonuçlanabileceğinden bu ilacı kullanan hastalar bifosfonat türevi ilaçlar ile terapiye devam etmek zorundadırlar. PTH analog medikamentlerinin osteoporoz tedavisinde parenteral olarak uygulanmasının zorluğu, hiperkalsüriye ve hiperkalsemiye sebep olması dezavantajlar olarak karşımıza çıkmaktadır (249).

Orta çağda Avrupa'da endüstriyel gelişimle birlikte meydana gelen hava kirliliği sonucunda özellikle kuzey bölgede yaşamını sürdüren bir çok çocukta ekstremiteler

deformiteleri, göğüs kafesi bozuklukları, omurgadaki kemiklerde açı değişimleri, büyüme gerilikleri, zayıf kas gerilmeleri ve rikets hastalıkları görülmüştür. 1900'lü yıllarda tutulan kayıtlar incelenip otopsi sonuçları yeniden değerlendirildiğinde rikets şiddetinin %80-90 arasında olduğu kayıtlara geçilmiştir (171, 329).

Bu zamana kadar yapılan çalışmaların bir kısmında kırıkların eliminasyonu ve D vitamini düzeylerinin depolarının yükseltilmesi arasında bir korelasyon olduğu, içlerinde doz - cevap ilişkisi bulunduğu ilişki ortaya konmuştur. Kemik erimesinin dolayısıyla osteoporozun ve travmalara veya patolojiye bağlı kırıkların önlenmesinde D vitamini seviyeleri bağlantısı hakkında tartışmalar devam etmektedir. D vitamini reseptörü ve CYP27B1 (sitokrom P27B1) eksikliği rikets hastalığı ile bağlantılıdır. Organizma içine fosfat ve kalsiyum girişi veya kalsiyumun yeniden emiliminin yükseltilmesi için kalsiyum ve laktoz alımının artırılması ile sağlanılabilir. D vitamini dolayısıyla rikets, kırıklar ve kemik erimesinin engellenebilmesi maksadıyla dolaylı etkileri barındırır (328). 25(OH)D'nin seviyesindeki azalma osteoklastogeneze bağlı sekonder hiperparatroidizme ve rezorpsiyona sebebiyet verdiğinden osteoporoz veya osteopeni tablosuna yol açabilmektedir. Kemik erimesi - osteoporoz hastalığı 60 ila 70 yaş arası kadınların üçte birinde, 80 ve daha üst yaşlı kadınların ise üçte ikisinde görülmektedir. Osteoporoz ile ilişkilendirilen kırık 50 yaş üstü erkeklerde ise yaklaşık 8'de 1 oranda görülmektedir. D vitamini referans aralıklarında bulunan PTH seviyesinin bulunduğu düzeyi sabit tutmakta, osteoblastların metabolik görevlerinin yapılmasını uyarmakta, mineralizasyonu desteklemekte ve bu da düşme sonrasında kırık ihtimali yaşanmasını azaltmakta ve sağlık durumunun korunmasını sağlamaktadır (171).

Kırık riskinin azalmasını araştıran bazı çalışmalarda kırık riski ile D vitamininin takviyesinin sonuçlarının değerlendirilmesi üzerine bir takım bulgular elde edilmiştir. Bu çalışmaların birinden söz edecek olunursa kalça fraktürü ihtimalinin yaklaşık %43 vertebra harici kırıkları ihtimalinin %32 azaldığını Vitamin D₃ ve kalsiyum takviyesiyle kanıtlamıştır (64).

2.16.3. D Vitamininin Osteoblast ve Osteoklastlar Üzerindeki Etkileri

Organizmanın bütününde D vitamini düzeyinin seviyesinin yetersizliği plazmada iyonize haldeki kalsiyumun konsantrasyonunda kısa süreli bir düşüş sonucuyla gelen bağırsak hücrelerinden kalsiyumun geri emiliminde de azalmaya

sebebiyet vermektedir. Paratiroid bezindeki reseptörler bu azalışı kalsiyum bazı reseptörleriyle farkeder ve sonrasında paratiroid hormonunun uyarılmasıyla salgılamasını, üretimini sağlayabilmek için bir sinyal mekanizmasının aktive olmasını sağlamaktadır (46).

Parathormon böbrek metabolizmasında tübüler kalsiyumun absorpsiyonunu yükseltir. Aynı zamanda bağırsağa ulaşan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ üretimini arttırarak renal organı uarması sonucunda intestinal kalsiyumun absorpsiyonu ile birlikte D vitamini reseptörleri ile etkileşime girmesini sağlar. PTH ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ osteoblast ile reaksiyona girebilmesi için de NFkV (RANK) ligandının reseptörünün aktivasyonu sonucunda salgılanmasını sağlamaktadır.

Olgun osteoklastların oluşumuna, RANKL'ın monositlerde RANK ile etkileşmesi sebebiyet vermektedir. Osteoklastlar, yıkımı kalsiyum hidroksiapatitin çözülmesi için matriks yıkıcı kollejenazlar salgılatarak oluşturur. Bu metabolik faaliyet organizmada osteopeniyi ve osteoporozu arttıran veya mevcut durumunun şiddetini yükselten, kemik ağırlığının mevcut kütlesi azaltan duruma sebebiyet vermektedir. Renal organlarda fosfatın absorpsiyonunu düşüren PTH; plazma fosfor düzeyinde de azalmaya sebep olur. Ekstrasellüler ortamda eksik kalsiyum ve eksik fosfor stoğuna neden olan bu durum kollajen matriksinde mineralizasyon problemine yol açmaktadır. Bu durumda yetişkinlerde karşılaşılmayan ancak küçük çocuklar ve bebeklerde epifiz plaklarının genişlemesine sebebiyet veren kondrositlerin olgunlaşmasında bozulma görülmektedir. Zaten hali hazırda bebek ve küçük çocuklarda iskelet sistemi içinde az mineral bulunmasından mütevellit ayakta dururken yer çekimi kuvveti, bacakların içeriye ve dışarıya doğru eğilmesine sebep verir. Az olan mineral sebebiyle kas gerilmesi, kollarda da düz bir şekil oluşmasının önüne geçerek eğilmeye yol açabilir. D vitamininin eksikliği yetişkinlerde osteomalaziye yol açan defekte sebep verirken, PTH'nin artmış düzeyi kemiğin mineral seviyesinde de düşme ile sonuçlanmaktadır. Radyografide bu durumda da dansitometrisel bulgularda aynı görüntü oluşmasına neden olur (175). Kemik metabolizmasında anlatıldığı gibi kemiğin içindeki her hücre mezenkimal prekürsör hücrelerden köken almaktadır. Bunlardan biri de osteoblastlar olarak görülmekte daha farklı olarak da bu kök hücreler adipositlere myositlere, osteositlere ve myositlere farklılaşabilme özelliği göstermektedirler. Bu kök hücrelerin osteoblast ve doku içinde gömülü kalan osteositlere differansiye olmaları hormonlar ve

ekstrasellüler kollajene bağlıdır. Kemğin modelasyonunda; osteoblastlar osteositler içinde gömülmekte ve osteosit çeşitleri olarak karşımıza çıkan osteoblastik osteositler ve osteoidler; ekstrasellüler matriks içinde yer alır. Matriks içinde daha sonra bu maddeler olgun osteositlere dönerler. Parakrin ve otokrin hormonal yollar vasıtası ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ iliğın stromal hücrelerinin osteoblastogenezisini düzenler. D vitamini reseptörlerinin ve IGF1'lerin aktivasyonunu uyaran $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sonrasında mezenkimal hücrelerin osteoblastogenesize uğramasına sebebiyet verir, kök hücelerde yine aynı bileşim, osteokalsinin sentezlenmesini uyarıp arttırmakta ve osteoblastların osteositlere dönüşümüne imkan tanıyan RUNX2'nin ve alkale fosfat üretilmesinin önüne geçmektedir ve alkale fosfat seviyesini azaltmaktadır. Bu basamakta RANKL serbest bırakılmaktadır (179). Ana hücresi makrofaj olan osteoklastların üzerine D vitamininin RANK/RANKL sinyali ile indirekt etkisi vardır. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün direk etkisi de osteoklast prekürsör hücreler üzerine olduğu düşünölmektedir. İleriki basamaklarda membrana bağı osteoklast farklılaşma faktörünün seviyesini yükselterek osteoklast değışimini uyarmaktadır. RANKL aktivasyonu osteoklast döngüsünü kırar ve kemik iliğinden kana osteoklast salgılanması ile sonuçlanan bir durumun oluşmasına sebebiyet verir. Bundan D vitamini alımı ile, RANK/RANKL sinyalinin engellenmesi ile rezorpsiyon azalmasıyla kemik kütesinin artması etkisi sonucu elde edilmektedir (179).

Direk veya indirek olarak kemik yapım ve kemik yıkım hücreleri olan osteoblastların ve osteoklastların formasyonu katkısıyla kemik dokusunun yeniden şekillenmesi, plazma parathormon, kalsiyum ve D vitamini arasındaki korelasyon, kemik yıkımının etkinliğinde ekstrasellüler matriks protein yapımındaki göreviyle D vitaminin implant uygulamalarındaki başarı kriterlerinden biri olarak görölmesini oluşturur (191).

Uzun dönemde başarıda bulunması hedeflenen; diğ eksikliklerinin tedavisinde kullanılan, faydalanılan implantlar bu başarılarını kemik içinde osteointegre bir şekilde kalması ile göstermektedirler. Bu bağlamda uygulanan alandaki kemğin hacmi ve yoğunluğu başarı kriterinin oluşmasında etkilidir. İmplantların büyük oranda başarısızlık oranları osteointegrasyon sürecinde görölmekle beraber bu lokal ve sistemik aynı zamanda cerrahi şartlara ve iyatrojeniteye bağı olarak değışmektedir. Erken dönemdeki kayıplar asepsis, antiseptik kurallara uyulmaması, sigara kullanımı, diabet,

yabancı cisim reaksiyonları, irrigasyon proseslerine uyulmaması sonucu nekroz ile ilişkilendirilebilir (125).

Osteointegrasyon her şeyden önce alandaki kemik, kemik yapımında görevli hücreler ve implantın yüzeyi ile ilişkilidir. Kemik metabolizmasını etkileyen faktörlerden biri olan D vitamininin iyileşme seviyesi ve implant yüzeyinde yeni kemik oluşumunu etkileyebileceğine yönelik araştırmalar da yapılmıştır. (259). Osteointegrasyon prosesi ve sonrasındaki kayıplar erken dönem implant kaybı ve geç dönem implant kaybı olarak nitelendirilebilir. Yapılan araştırmada erken dönem implant kaybı görülen hastalar incelenip sistemik sağlık durumu ve sigara gibi etmenler devre dışı bırakıldığında kayıp yaşanan hastaların o dönemki D vitamin seviyesinin yetersizliği ortaya çıkmıştır (259).

Düşük D vitamini düzeyi görüldüğünde iyileşme sürecini hızlandırmak adına preoperatif ve postoperatif D vitamini takviyesi önerilmektedir (259).

İdeal seviyede D vitamini tüketimi ve plazmada istenen seviyede D vitaminin korunması sadece fosfor ve kalsiyum; dolayısıyla kemik metabolizması için değil organizmanın genel sağlığı için de kritiktir. Dünyada sağlık durumu bozulmalarının son dönemlerde yaygınlaşması genel olarak D vitamini eksikliğinin, yetersizliğinin geniş yelpazedeki akut ve kronik hastalıklar için bir faktör olduğu ve düşünülmektedir (320). Son dönemlerde yalnızca kalsiyum yolağı ve kemik metabolizması ile değil bir çok hücre ve doku fonksiyonunun devamını sağlamada D vitamini üzerinde çalışmalar yapılmakta D vitamininin bu fonksiyonları nasıl etkilediği, etkileyebildiği hakkında araştırmalar yapılmaktadır (309). Mekanizmasal faaliyette D vitamini hepatositlerde 25 hidroksilaz enzimi ile hidroksile olmakta ve $25(OH)_2$ açığa çıkmaktadır. Renal dokularda ise 25 OHD, $1,25(OH)_2D$ 'ye çevrilmektedir. $1,25(OH)_2D$; D vitamininin aktif formudur. $1,25(OH)_2D$ ve D vitamininin sentez edilmesi parathormon düzeyini, plazma fosfor seviyesini ve kalsiyum dengesini düzenlemektedir.

Hipokalsemi durumunda plazmadaki PTH seviyesi yükselir, kalsiyumun renal dokularda tübüler absorpsiyonu artar ve bununla beraber $\alpha 1$ hidroksilaz faaliyetinde yükseliş karşımıza çıkar. Bütün bunlar hep beraber $1,25(OH)_2D$ üretiminin artması ve intestinal kalsiyumun absorpsiyonunun artması ile sonlanır (173, 309).

Vitamin D₂ diğer adıyla ergokalsiferol; ergosterol maddesinin ultraviole ışının ürünü olarak bitkisel kaynaklarda yer almaktadır. D vitamini kaynağı olarak karşımıza

gıdalar çıkmakla birlikte diyet ile alınımlarının ardından eritrositlerden emilerek taşınma yolu olarak şilomikronlarla transfer edilmektedir. D₂ vitamini yapı olarak D₃'e benzemekte ancak sterol D halkasına bağlı zincir farklılığı bulunmaktadır (102, 173, 309). Dehidrokolesterolden kaynak alan vitamin D₃'ün ön halinin ki bu previtamin D₃ olarak adlandırılır. Bu, içinden ultraviyole ışınının geçmesinin ardından oluşan maddedir.

Vitamin D₃ ise dehidrokolesteolden kaynaklanır ve previtamin D₃ içinden UVB (ultraviyole b) ışını geçtikten sonra oluşan üründür. Epidermiste sentezlenme potansiyeli barındıran Vitamin D₃ bunun haricinde zenginleştirilmiş besinler veya balık yağı gibi ürünlerden alınır (307).

2.17. D Vitamini ve Ağız Sağlığı

Organizmada dişlerin intraoral olarak yerini almaya başlamasıyla birlikte lokal olarak diş macunlarıyla sistemik olarak doğada yer alan besinlerin içerisinde yer alan floridlerle birlikte dişlerin teması başlamaktadır. Florid tabletler, florlu şekerler veya pastiller dental olarak risk barındıran popülasyonlarda yüksek oranda ve dikkatle uygulanması önerilen D vitamini ile birlikte kombine edilen ürünler olarak karşımıza çıkmaktadır (54, 137, 168, 169, 180, 181, 260, 337).

Bu florid takviyesinin veya besin-içecek veya lokal uygulama sonrası destek alınan bu süreçte ağız ortamında yer almaya başlayan ilk dentisyon döneminde ve kalıcı dentisyonunda yer alacak dişler için de florid mineralizasyonun başladığı bu dönemlerde oldukça faydalıdır. Şiddetle tavsiye edilen; pastil türevi ürünlerin olabildiğinde ağız içinde tutulması ve floridli tablet desteğinin aşağı yukarı 1 yıl daha sürdürülmesidir (419). D vitamini takviye ve desteğine erken başlamak florid tabletlerde olduğu gibi çürükten koruyuculukta özellikle hayatın ilk ve ikinci 6 aylık döneminde kritik olduğu sonucu görülmüştür. Tablet desteğinin ve sıklığının az olduğu çocuklarda çürük insidansının yüksek olduğu tespit edilmiştir (22, 419).

Sert dokuların gelişimi D vitamininin ameloblast ve odontoblast üzerindeki etkileri ile takip edilebilmektedir. Bunlar D vitamininin hedef hücreleri olarak karşımıza çıkmaktadır (22). Öne sürülen bir görüş D vitamininin aktif metabolitleri kalsiyumun bağlanması ve plazma içerisindeki fosfor ve kalsiyum düzeylerini ve amelogenin

üretimini kontrol altında tuttuğudur (22, 311). Yükselmiş D vitamini düzeyi ile birlikte derideki güneş ışığı ve güneş ışığı destekli ultraviyole ışınlarıyla sentez seviyesinin yükselmesi çürük ile ilgili koruyucu etkileri erişkin ve çocuklarda birçok çalışmada belirtilmiştir (181, 237, 353, 352). Kemik erimesi ve bunun hastalığı olan osteoporoz kemik yoğunluğunun ve hacminin azalması sonucunda ortaya çıkabilen diş kayıplarında periodontal hastalıklar akla gelmektedir, kemik ile ilgili değişimlerin en önemli sebeplerinden D vitamini eksikliği görülebilir ancak D vitamini kemik ve periodontal dokuların etrafındaki oluşumları etkilemekte ancak tek etki bu yönde olmamakta ağız içi bakteriyal ekosisteme yönelik antimikrobiyal peptidler üzerindeki etkileri de yadsınamamaktadır. D vitaminin artışı kemik kaybının önüne geçmekte antimikrobiyal peptid oluşturarak doku etraflarını sarmaktadır (234, 332, 415, 433). 2827 çocuk üzerinde yapılan bir çalışmada D vitamininin çürüğe karşı profilaktik olduğu ve çürük görülmesinin azalttığı ortaya konmuştur. Eksik ve yetersiz D vitamini düzeyi aynı zamanda dental dokuların gelişimi sırasında mine ve dentinde defektlere sebebiyet vermektedir (205).

2.18. K Vitamini

Klasik olarak D vitamininin asıl etkisinin kemik ve kemik metabolizması üzerine olduğu geçmişten beri bilinmektedir. Günümüzde özellikle son dekatta çalışmalarda araştırmacılar optimum D vitamini düzeyini sağlamanın insanlardaki kansere yakalanmama ve kanser gelişimi riskini azaltmasında da fayda sağladığı ve bunlara etki ettiği, metabolik faaliyetlerde iltihabi prosesin gelişimini önlediği, antimikrobiyal süreci devam ettirdiği ve bir takım kronik hastalıkları engellediği de görülmüştür.

D vitamini seviyesinin çok üst düzeye erişmesi (günlük 40,000 IU takviyesi) kişinin sağlığı için risk oluşturmaktadır. Zehirlenme hiperkalsemi diye de bilinen yüksek düzey kalsiyumdan dolayı oluşmaktadır. D vitamininin alımının sonuçsal faydasını arttırmak ve zehirlenmeyi minimize etmek için K vitamini desteğinin D vitamini için ek şekilde alınması gerektiği araştırmacılar tarafından açıklanmıştır. Kalsiyum; olması tercih edilen alanlara, olması tercih edilmeyen alanlardan uzağa gönderilmektedir (arterlerden kemik dokuya). Bu şekilde K vitamini desteği vasıtasıyla hiperkalsemi yaşanması ihtimalinin azalması beklenmektedir. Bazı gıdaların kendi iç yapılarında yer alan ve yağda çözünebilen K vitamini 4-naftokinon ve 2-metilin

kimyasal yapısını barındırır (33). K₁ (fillokinon) ve K₂ (menakinon) kendi alt sınıflarıdır. Menakinonlar 4'ten 13'e kadar alt sınıfa sahip, bakteriyel orjinli olup mayalanmış veya hayvan kaynaklı gıdalarda bulunurken phyloquinone ise birincil olarak yeşil yapraklı sebzelerde yer edinir (33, 108, 115, 183). K vitaminine bağımlı olan karboksilaz için koenzim olup aynı zamanda pıhtılaşma, çeşitli fizyolojik mekanizma ve kemik metabolizması için gerekli proteinlerin üretimi için gerekli bir vitamindir (383). II numaralı pıhtılaşma faktörü K vitaminine bağımlıdır. Coumadin – warfarin ve son zamanlarda kullanılan bazı antikoagülanlardır bunlar protrombin aktivitesini bundan önce K vitamini aktivitesini tetiklemektedir (76). Antikoagülan kullanımında vitamin K takviyesine devam edilmesi çok önem arz eder (76).

Yine K vitamini (K₂) ile ilişkilendirilen matrix gla proteini fazla ve çok miktardaki kalsifikasyonunun oluşmasını azaltmaktadır ve kendine kıkırdakta, vasküler düz kaslarda ve kemikte yer bulur. Kemik gelişiminde ve özellikle mineralizasyonda kendine yer bulan osteokalsin de K vitaminine bağlı bir proteindir (383).

Matriks gla ve osteokalsinin düzgün çalışabilmesi için ve bu süreçlerle birlikte karboksilasyon reaksiyonu için K vitaminine ihtiyaç duyulur. Sistemik dolaşımda K vitamininin düzeyinin az oluşu bu proteinlerin karboksile edilememesine sebebiyet verir bu durum da kardiyovasküler hastalıklara ve düşük kemik mineral yoğunluğuna ve osteoporoza sebebiyet verebilir (241). Tüm erişkin bireyler günde 70 µg K₁ vitamini almalıdır (403). Bu oran yalnızca hemostaz mekanizmasının devamı için yeterli olup K vitamini ile ilişkili diğer mekanizmaların devamını sağlayamayabilir (32).

2.19. D Vitamini ile Genel Sağlık Arasındaki İlişki

Diyetle birlikte fosfor alımı da çürük insidansını D vitamininden ayrı bir şekilde etkileyebilmektedir (147). Yağlı yiyeceklerin, kalorili besinlerin alımının obeziteye, obezite sonrasında da periodontal hastalıklara sebebiyet verdiğini gösteren araştırmalar mevcuttur fakat bu hastalık döneminde veya sağlıklı düzende liften, kalsiyumdan, riboflavinden ve özellikle D vitamininden zengin gıda alımı gingivitisi azaltmaktadır (316, 317). 25(OH)D plazma seviyesi ile periodontal hastalıklar arasında bir korelasyon olduğu Hill kriterlerine göre açıkça ortaya konmuştur. Koyu tenli kişilerde beyaz tenli kişilere göre daha yaygın periodontal problem mevcuttur bu da D vitamininin absorpsiyonu ile ilişkilendirilebilir (148).

Tüm kemikler için olduğu gibi D vitamininin eksikliği veya yetersiz oluşu çene kemiklerini de etkilemektedir (6). Günlük yeterli seviyede D vitamini alan 562 kişinin katılmış olduğu bir çalışmada periodontal hastalıktaki cebin derinliği, ataşman kaybı, kemiğin seviyesi kriterleri incelemeye dahil edilmiş, D vitamini seviyesinin yeterli miktarda alımının olduğu hasta gruplarında periodontal hastalıkların ilerlemesinde yavaşlama ile karşılaşılmıştır. Benzer şekilde kalsiyum takviyesi de periodontal hastalığın ortadan kalkması, azalması, yavaşlaması, antienflamatuvar sebeple gingivitisin bitmesi yapılan periodontal cerrahinin başarısının yükselmesi ve hemorajinin sona ermesi sonucunu beraberinde getirmektedir (84, 92 166). Periodontal sağlık durumu ile iskeletin diğer kemiklerindeki kemiğin yoğunluğu mevcut intraoral alana uygulanan implant tedavisinde başarının yakalanması arasında ilişki tespit edilmiştir (18, 20). İnsan çalışmalarında ve eksperimental deneylerde eksik D vitamini düzeyleri ile oral kanserler arasında bir ilişki tespit edilmiştir (219). Oral squamoz hücreli karsinoma malignitelerinde 25(OH)'ın antineoplastik etkisi de belirlenmiştir (31, 304).

Tip II diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar, prematüre doğumlar gibi sistemik durumlar ve hastalıklar ile periodontal hastalıklar arasında bir ilişki kurulmaktadır. D vitamini ve kalsiyum takviyesiyle bu hastalıklar arası ilişki kesilebilmektedirler (31, 61, 189). D vitamini seviyesinin immun defans gücünü arttırarak periodontal hastalığı kesebildiği de nakledilmektedir. Düşük D vitamininin; diş kaybı, klinik ataşman kaybı, cep derinliğine bağlı kayıplar, hamilelik sürecinde çok daha agresif periodontal hastalıklara sebebiyet verebileceği bildirilmiştir (19, 61, 202). D vitamininin yükselmesi de immun defansı arttırarak periodontal kayıpların önüne geçer. Aslında düşük D vitamini seviyesi gingival enflamasyon, diş kaybı, ataşman kaybı hamilelik sürecinde daha fazla periodontal probleme yol açmaktadır (19, 61, 202).

2.20. D Vitamini Eksikliği Önleme ve Tedavi Yaklaşımı

Standart şartlarda insan organizmasında bulunan D vitamininin %90-95'i güneş ışınları vasıtasıyla ciltte üretilmektedir. Özellikle kendi içlerine eklenmedikçe gıdalarla alınan D vitaminin çok büyük önem ve etkisi yoktur. Temel kaynak olarak nitelendirilen güneş ışığından yeteri kadar maruziyet sonrasında ilave D vitamini alınmasına ihtiyaç duyulmaz. Yapılan araştırmalarda Kuzey Doğu Amerika'da Massachusetts bölgesinde

haftada 2-3 kez yüzü elleri ve kolları 5-15 dk güneşe maruz bırakmanın organizmanın D vitamini ihtiyacını karşılamada yeterli olduğu belirtilmiştir (3, 174). Buna ek olarak güneş ışınlarının yoğunluğu tipi ve açısı ile D vitamininin sentezi arasında farklılık oluşabileceği de unutulmamalıdır. Ekvator hattından 33° enlemlerin kuzeyinde ve güneyindeki alanlarda D vitamininin sentezlenmesi yok denecek kadar az oranlıdır. Yaşın ilerlemesi cilde sürülen güneş koruyucu kremler fazla pigmentasyon ciltteki üretimi bloke etmektedir (174). Otuz faktör güneş koruyucusu D vitamini sentezlenmesini neredeyse %98 azaltır. Sadece 8 SPF (güneş koruma faktörü) kremler bile bunu yüzde %87 azaltmaktadır. 15 SPF'de bu oran %93'lere kadar çıkar. 30 yaş altı genç bireylere göre yaşlılarda D vitamini üretim kabiliyeti beşte bir oranında düşmektedir. Havanın bulutlu veya parçalı olması, havadaki kirliliğin derecesi, içinde bulunulan sezon, gün içi saat, derideki mevcut farklılıklar, ozonun durumu D vitaminin üretimi için güneşten faydalanmayı ciddi şekilde zorlaştırır (401). Amerikan Kanseri Birliği cilt dokusunun ışıklardan korunmasının kanserden korunmada önemli olduğunu belirtmiştir ve D vitamininin gıda tüketimiyle alınabileceği de savunmaktadır (7, 134, 408).

D vitamininin yetersiz seviyelerden kurtulabilmesi için Endokrin Topluluğu bir eylem planı oluşturmuş bunu rehber haline getirmiştir. Buna göre yenidoğanlarda ilk bir yılda 400-1000 IU günlük alım; 1 yıldan 18 yaş arası 600-1000 IU günlük alım, 18 yaşından büyük yetişkinler için 1500-2000 IU günlük alım tavsiye edilmiştir. Obezlerde malabsorbsiyon sendromunda antiepileptik ilaç alanlarda ve glikokortikoid kullananlarda dozajlar olası enzim indüksiyonu sebeple yüksek olabilir.

Eksikliklerde;

0-1 yaş arası: 2000 IU / 7 gün veya 50,000 IU/ hafta vitamin D₃ veya vitamin D₂ (6 hafta boyunca) plazma 25(OH)D seviyesinin 30ng/mg üstü olabilmesi için 400-1000 IU/gün idame,

1-18 yaş arası: 2000 IU/gün ya da 50,000 IU/hafta vitamin D₃ veya vitamin D₂ (6 hafta boyunca) plazma 25(OH)D seviyesinin 30 ng/mL üstü olabilmesi için 600-1000 IU/gün idame,

Tüm erişkinlerde; 6000 IU/gün ya da 50,000 IU/hafta vitamin D₃ veya vitamin D₂ (8 hafta boyunca), plazma 25(OH)D seviyesinin 30 ng/mL üstü olabilmesi için 1500-2000 IU/gün idame,

Obezlerde, malabsorbsiyon sendromunda ve D vitamini metabolizmasını etkileyen ilaç kullanımı olanlarda yüksek doz 6000-10,000 IU/gün D vitamini tedavisi ve 3000-6000 IU/gün idame şeklinde bir plan oluşturulmuştur.

İki haftalık bazda ayda iki kez 50,000 IU D vitamini takviyesinin yapılması 6 yıla kadar uzayan süreçte toksisiteye sebep vermeksizin D vitaminine bağlı yetersizlik veya eksiklikte terapiyi sağlamakta ve yetersizlik eksiklik yaşanmasının önüne geçmektedir. Günümüzde gerçekleşen bir çalışmada erişkin kişilere 6 yıllık bir süreçte haftada tek doz 50,000 IU veya eşdeğer 3000 UI/gün takviyesi toksisiteye sebep vermeksizin plazma 25 (OH)D seviyesini 40-60 ng/ml arasında tuttuğunu ortaya konmaktadır. D vitamini takviyesinin granülamatöz hastalıklardan ayrı olarak bir zararı görülmemiştir. D vitamini enzim polimorfizmi durumunda granülamotöz hastalıklarda ve genetik rahatsızlıklarda D vitaminine bağlı zehirlenme riski artabilir (176) .

D vitamini yetersizliği veya eksikliği her yaş grubunda görülebilecek bir sekeldir.

Kemiğin hacim yoğunluk ve kütle artışında görev alan en önemli hormonlardan biri olan D vitamini iltihabi sürecin aktivitesini azaltmada organizmanın olağan bağışıklık metabolizmasını yükseltmeye yardımcı olmaktadır. Eksikliği veya yetersizliği güneşten faydalanmasının az olmasına da bağlı olabilmektedir, gıda tüketiminin yetersi olması ile de ilişkilendirilebilir. Bu tip hastalıklarda D vitamininin eksikliği veya yetersizliği yıkıma yönelik kemik döngüsünü azaltmasıyla kemik erimesine yönelik osteoporotik kırıkların olması ile ilişkilendirilebilir. Eksiklik ve yetersizliği kırıkların iyileşmesi ile bağlantıdadır. Bunun sonuçları kemiğin yeniden şekillenmesinin ve yapımının sürecinin kısılması ile karşımıza çıkmaktadır. İntraoral bölgeye uygulanan implantların osteointegrasyonunun, kemiğin rejenerasyonu ile de ilişkili olmasına bağlı olarak D vitamini yetersizliği veya eksikliği olan sıçanlarda periimplanter kemiğin formasyonunda sıkıntılar görülmüştür. D vitamininin takviye olarak verilmesi kemiğin rejenerasyonu da dahil D vitamini yetersizliği bulunan kişilerde kemiğin döngüsel sürecinde de fayda getirdiğini ortaya koymaktadır. Dvorak ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada kortikal periimplant kemiğin oluşumunu yumurtalıkları alınmış sıçanlarda incelemişler ve yumurtalığın alınması ile risk faktörü artan bu grupta D vitaminin takviyesininin gıdasal olarak sağlanılabileceği belirtmişlerdir. Diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi bir çok durumun

etyolojisinde D vitamini eksikliği ile karşılaşılabilir. Tip II, III ve IV immün defans reaksiyonlarında D vitamininin eksikliği ortaya konmuştur. D vitamininin plazma seviyeleri LDL'ye bağlı kolesterol bazında, allerjik, yüksek tansiyonel vaka olarak zor olarak derecelendirilen implant cerrahisi hastalarının ve direkt cerrahi uygulanacak hastalarda kontrollü bir şekilde değerlendirilmesi tavsiye olunur. Aynı zamanda bu araştırma bazı anomalileri de ortaya çıkartabilir. Bir sürü çalışmada kolesterol - D vitamini düzeyi arasında korelasyon tespit edebilmek için implant cerrahisi sırasında araştırma devam etmektedir (70, 104). İntraoral kemik içerisindeki kortikal poroziteler dental implant uygulamalarında implantın mekanik olarak stabilitesini etkileyebilmektedir. Çalışmalarda kemik erimesinin dolayısıyla osteoporozun kemiğin yoğunluğunu, kemik hacmini hali hazırda kemiğin kalitesini olumsuz etkileyebildiği ve bunun aksiyel vertikal ve horizontal kuvvetlere karşı baskı ve makas kuvvetlerine ilişkin direncini azalttığı ve fraktür / defekt riski oluşumunu arttırabildiği belirtilmiştir (70, 104). Dental implant terapisinde birincil hedef ömür boyunca devam edecek osseointegrasyonun implant yüzeyleri bazında devamlı olmasıdır. Buna rağmen belirli faktörler varlığında osseointegrasyon süreci riske girmekte ve başarısızlıkla sonuçlanabilir. Tütün kullanımı, partikül dağılması, yabancı cisim reaksiyonu kemiğin implant için drillenmesi sırasında uyulması gereken irrigasyon, tur, kuvvet, asepsi koşullarına uyulmaması, lokal veya sistemik bir takım enflamasyonlar, diyabet rahatsızlığı, kemiğin metabolizmasını etkileyen bir takım ilaçların kullanılması erken dönemde implant başarısızlıkları ile sonuçlanabilmektedir. Sistematik çalışmalar sonucu elde edilen bilgilerden biri implant cerrahisinin ardından antibiyoterapi yapılmasının erken implant enfeksiyonunu ve implanta yönelik başarısızlığı önemli ölçüde azalttığı bilgisine erişim sağlanılmıştır. Eksperimental çalışmalarda D vitamininin periimplanter dokuda kemiğin rejenere olmasını formasyonunu yükselttiği belirlenmiştir (293). Osteoporoz sonrasında şiddetli doku resesyonu ile korelasyon kurucu; osteoporoz sonrasında azalan mineral konsantrasyonu sebebiyle alveolar kemik yıkımı, periodontitis ile ilişkide olan sistemik ve lokal kemik remodelling faktörlerinin sonucunda sitokin ve mediatörlerin artışı, osteoporoza yatkınlık ve periodontal yıkım ve bunlardan bağımsız sigara kullanımı sınıflamasıyla 4 yol vardır (60).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, 52 adet 250-350 g ağırlığında 10-12 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanlar kullanılarak, kalvaryal kritik defekt alanına D vitamini metaboliti kalsitriol, PRP ve biyoyumlu taşıyıcı olan kitozanın kemik defekti üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Denek hayvanları 6 adet gruba ayrılmıştır. Her bir gruptaki denekler 1., 2., 4. ve 8. haftada sakrifiye edilmiştir. 4 denek ise PRP elde edilmesi için ilgili gruptaki deney gerçekleştirilmeden önce kan alımında kullanılarak sakrifiye edilmiştir.

Kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan kritik boyuttaki bir kemik defektine biyoyumlu bir taşıyıcı ile yerleştirilecek materyalin insan üzerinde uygulanması söz konusu olmadığından hayvan modeli kullanılması zorunluluğu vardır. Sıçanla yapılan çalışmalarda insan ile yapılan çalışmalara göre daha kısa sürede sonuç alınmaktadır. Çalışmaların patolojik araştırmasının yapılabilmesi amacıyla, hastadan biyopsi alınması opere edilmesini gerektirdiği için ve bu doku kesitleri elde edilmesi insan ile yapılan çalışmalarda zor, hatta imkansız olmaktadır.

3.1. Kemik Defekti Oluşturulması ve Kalsitriol, PRP ve Kitozanın Defekt Alanına Uygulanması

Hayvan çalışması, İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni (Tarih ve Sayı: 13/12/2017 – 466879 ; 35980450-050.01.04-) ile İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Araştırma Birimi'nde (EDEHAB) gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanları EDEHAB'da 22 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı sağlayacak şekilde otomatize edilmiş odada ve standart kafeslerde tutulmuştur. Deney süresince standart laboratuvar yemi ve çeşme suyu ile beslenmişlerdir. Yem ve su ad libitum verilmiştir.

Kemik defekti oluşturulmadan önce sıçanlar rastgele 6 gruba ayrılmıştır.

Çalışmamız, 6 ana grup ve sakrifikasyon dönemleri baz alınarak oluşturulan 1., 2., 4. ve 8. haftalara göre düzenlenmiş alt grup içermektedir. Ayrıca PRP elde etmek için 4 adet sıçan kullanılmıştır. PRP elde etmek için deneyin başında intrakardiyak elde

edilen 10-15 ml kan santrifüj cihazı ile uygun devir ve süre sonunda elde edilmiş PRP materyali, kalsitriol, kitozan ilgili gruplarda kullanılarak cerrahi prosedür tamamlandıktan sonra, periost, cilt altı dokular ve cilt sütüre edilerek primer olarak kapatılmıştır.

I. grup (kontrol grubu): Defekt alanı herhangi bir biyomateryal ile muamele edilmeden kapatılmıştır.

II. grup: Defekt alanı taşıyıcı materyal olan kitozan konulduktan sonra kapatılmıştır.

III. grup: Defekt alanına kitozan + PRP formülasyonu uygulanmış ve alan kapatılmıştır.

IV. grup: Defekt alanına yalnızca PRP uygulanmış ve alan kapatılmıştır.

V. grup: Kalsitriol + kitozan formülasyonu defekt alanına konulmuş ve defekt kapatılmıştır.

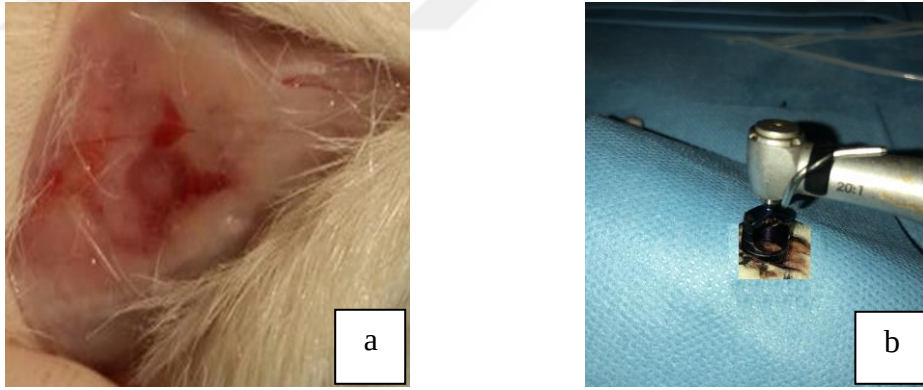
VI. grup: Kalsitriolün kitozan ve PRP kullanılarak hazırlanmış topikal formülasyonu defekt alanına uygulanmış ve alan kapatılmıştır.

Her bir grup kendi altında 4 gruba daha ayrılmış olup alt gruplarda 2'şer denek olacak şekilde tutulmuştur. 1., 2., 4. ve 8. haftalarda defektlerdeki kemik yarası iyileşmesini tespit etmek için rasgele seçilen 2'şer denek sakrifiye edilmiştir. PRP elde etmek için 4 hayvandan oluşan bir grup sakrifiye edilmiş ve sıçanlardan elde edilmiş PRP; III., IV. ve VI. deney grubundaki hayvanlarda kullanılmıştır. Daha sonrasında oluşturulan defekt bölgesinin kemikleşmesi immunohistokimyasal analiz ile D vitamini reseptörü (VDR), RANK, FGF 23 antikörlerinin incelenmesi ve mikrotomografi analizi ile tayin edilmiştir.

Deney öncesinde her sıçanın ağırlıkları ölçülmüş kendi grubuna ait kafeslerde muhafaza edilerek bazal seviyedeki D vitamini ve PTH seviyesinin tespiti için 2 ml hacmindeki orbital kanları EDTA içeren özelleşmiş 25(OH) ve PTH seviye ölçümü için tüplere alınmıştır. Bu tüpler, kan alımıyla birlikte İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'na teslim edilmiştir.

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Araştırma Birimi'nde sıçanların cerrahi işlem yapılacak olan kalvaryal alanlarına subkütan olarak

2 (mg/kg) lidokain enjeksiyonu yapılmıştır. Bu işlem sonrasında traşlama işleminin ardından antiseptik solüsyon olan polivinilprolidon ile muamele edilerek alanın asepsisi sağlanmıştır. İntraperitoneal ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezisi yapılan sıçanların kalvaryal alanına subkütan olarak 2 (mg/kg) lidokain uygulanmıştır. Kraniyal alanda kranyumun orta hattında sagittal yönde insizyon yapılarak tam kalınlıklı flap kaldırılmıştır. Midsagittal suturen sağ tarafında kalan alanda 5 mm çaplı yaklaşık 1-1,5 mm kalınlığındaki kemik defekti oluşturabilmek adına bu kemik kesisi 5 mm dış çaplı ‘trephan çelik frez’ ile (Meisinger, 229 RA L/040, ABD) duramater üzerinde bir hasar oluşturmayacak şekilde dikkatli bir manüplasyon ile sürekli serum irrigasyonu (izotonik sodyum klorür) hazırlanmıştır (Şekil 3-1). Oluşturulan tam yuvarlak, 5 mm çapındaki kemik fenestrasyonu duramater üzerinde herhangi bir hasar veya perforasyon oluşturulmayacak şekilde kaldırılarak, PRP hazırlanması için donör olarak kullanılacak 4 sıçan hariç her sıçanda orta sagittal sutürün sağ tarafında standart 5 mm çaplı ve literatürlerde “kritik defekt” olarak belirtilen kemik defekti oluşturulmuştur (217, 413).

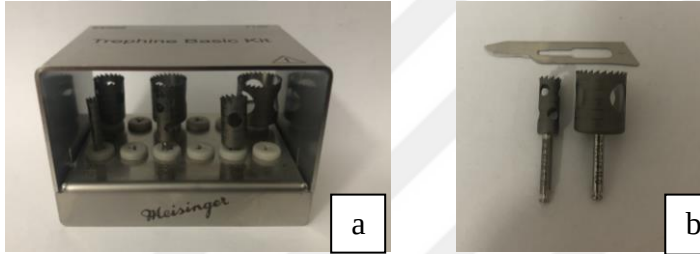


Şekil 3-1: Cerrahi alana bakış; kalvaryal tam kalınlıklı flap kaldırılmasının ardından karşılaşılan cerrahi alan (a), cerrahi alanın steril örtü ile örtülmesinin ardından trephan frez ile defekt oluşturulması (b)

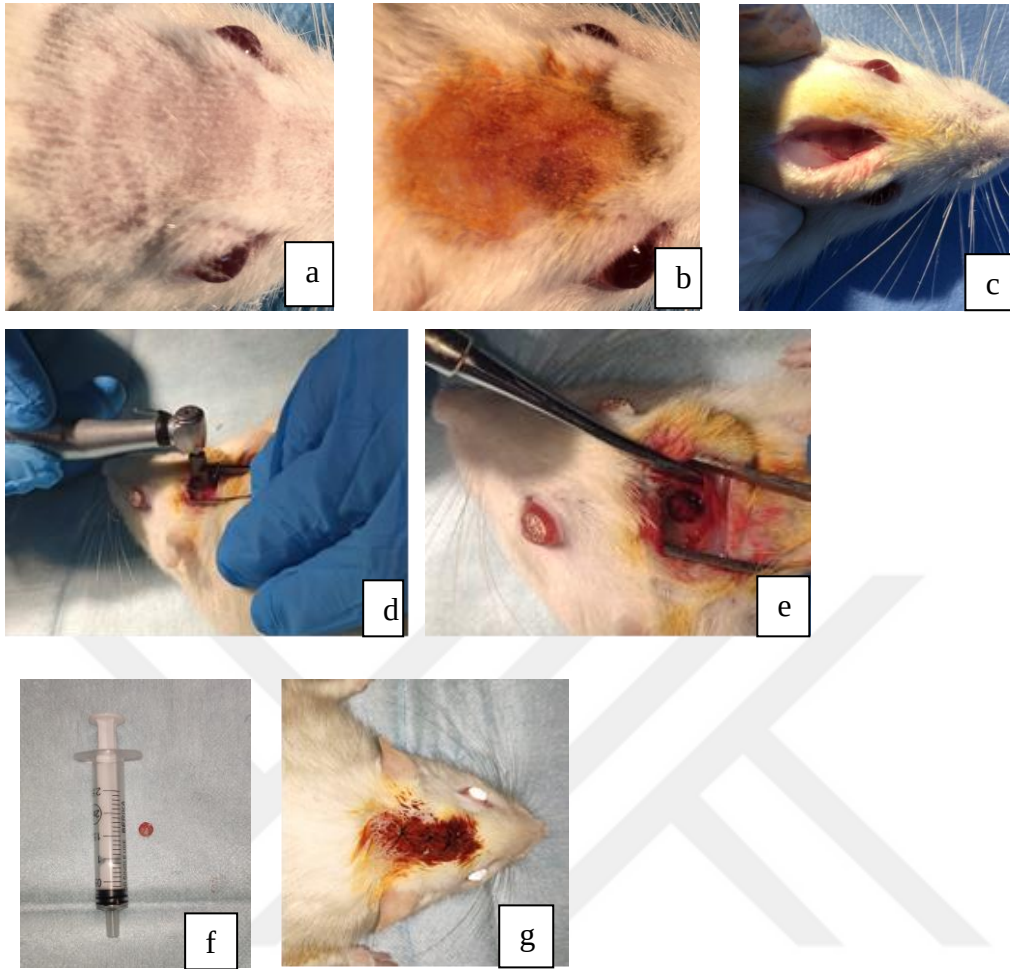
Anestezi altında uygulanan prosedürler şu şekilde sıralanabilir;

10-12 haftalık Sprague Dawley soyu erkek sıçanlara intramüsküler (i.m.) yoldan ketamin (40 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) uygulanarak genel anestezi oluşturulmuştur. Sıçanların cerrahi işlem yapılacak alanları tıraşlanmış ve sonrasında bölgeye antiseptik bir ajan olan polivinilpirolidon iyot uygulanmıştır. Subkütan olarak

lidokain (2 mg/kg) uygulanmasının ardından kranyumun orta hattında sagittal yönde insizyon yapılmış ve tam kalınlıklı flep kaldırılmıştır. Orta sagittal suturen sağ tarafında 5 mm çapında kemik kesisi, 5 mm dış çaplı trefan frez (Meisinger, 229 RA L/040, ABD) kullanılarak, dura matere zarar vermeyecek şekilde ve devamlı serum fizyolojik (izotonik sodyum klorür) irrigasyonu altında hazırlanmıştır (Şekil 3-2). Oluşturulan dairesel kemik defekti duramatere zarar vermeden kaldırılmış, her sıçanda orta sagittal suturen sağ tarafında standart 5 mm çaplı kritik kemik defekti oluşturulduktan sonra tüm insizyonlar 3,0 poliglikolaktid içerikli emilebilir suture materyali kullanılarak primer olarak kapatılmıştır. Yara alanını yine polivinilpirolidon iyot ile muamele edilmiş ve postoperatif süreçte analjezik ve antibiyotik uygulamaları ile deney hayvanları postoperatif gözlemde takip edilmiştir (Şekil 3-3).



Şekil 3-2: Frezler; cerrahi işlem sırasında kullanılan meisinger trephan frez seti (a), 5 ve 10 mm ‘lik meisinger trephan frezler (b)



Şekil 3-3: Denek hayvanlarında defekt oluştururken uygulanan işlemler; cerrahi alanın traşlanması (a), cerrahi alana işlem öncesinde antiseptik ajanın tatbiki (b), tam kalınlıklı flap kaldırılması (c), 5 mm’lik Meisigner trephan frezle kemik defekti oluşturulması (d), kalvaryal kemikte defekt alanı (e), 5 mm’lik kalvaryal kemik defekti (f), cerrahi alanın anatomik olarak primer kapatılmasının ve antiseptik ajan tatbik edilmesinden sonraki görüntüsü (g)

Kritik kemik defekti dışarıdan herhangi bir müdahalede bulunulmadan spontan bir şekilde ‘iyileşme özelliği olmayan’ bir kemik defekti olarak tanımlanabilmektedir. Kritik kemik defekt boyutu, kendi kendine iyileşme özelliği göstermeyen en küçük boyut olarak nitelendirilebilir. Trefanize edilerek oluşturulmuş 5 mm çapındaki kalvaryal defekt 6 – 12 aylık süreçte kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan bir defektir. Kalvaryal pariyetal kemik ise üzerine herhangi bir kuvvet gelmediği, oluşturulan defekt alanı sabit bir şekilde kaldığı sıçan modelinde oluşturulduğu için anatomik olarak sıçan ekstremitelerinin erişebileceği alan dışında olması ve pozisyon itibarı ile herhangi bir yere temas etmesinin mümkün olmaması, defekt alanına konulan materyallerin etkisinin direkt olarak görülebildiği bir deney modeli oluşu ve bu

materyallerin kemik dokusu ile direkt temasına olanak sunması deneysel sıçan kalvaryalı modeli seçilmesi kararını oluşturmuştur.

Kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan kritik boyuttaki bir kemik defektine biyouyumlu bir taşıyıcı ile yerleştirilecek materyalin insan üzerinde uygulanması söz konusu olmadığından hayvan modeli kullanılması zorunluluğu vardır. Sıçanla yapılan çalışmalarda insan ile yapılan çalışmalara göre daha kısa sürede sonuç alınmaktadır. Yapılan çalışmaların patolojik araştırmasının yapılabilmesi için, hastadan biyopsi alınması gerekebilir ve bu da hastanın tekrar opere edilmesini gerektirir. Doku kesitlerinden elde ettiğimiz sonuçları ise bir insan için yorumlamak zor olmaktadır.

Deneylerimizde 10-12 haftalık, 250-350 g aralığında ± 20 g ağırlığında erkek Sprague Dawley soyu sıçanlar kullanılmıştır. Geçmişte yapılmış kranyal defekt modellerinde bu sıçan soyu başarı ile kullanılmıştır. Bu soy ile kranyal kemik defekti oluşumu ve çeşitli biyomateryal uygulamalarının bu defektlerdeki iyileşme etkinliğinin belirlenmesi mümkün olmuştur. Bu sebeple oluşturacağımız kritik boyuttaki kemik defektlerinin içerisine eklenecek biyomateryallerin iyileşmeye etkisini tespit edebilmemiz için Sprague Dawley soyu sıçanlar kullanılmıştır. Kemik iyileşmesi, cinsiyet hormonları tarafından etkilenebileceğinden çalışmada erkek sıçan kullanılması gerekmektedir. Ayrıca kemik iyileşmesinin incelenmesi erişkin sıçanlarda (matür) yapılmalıdır.

Yaklaşık 25 yıllık döngüde büyük ölçekli kalvaryal defekt; kemik replasman materyallerini ve kemik rejeneratif tedavileri test edebilmek adına bir model olarak kullanılmıştır (178, 281). Standart deneysel kemirgen modellerinde kritik kalvaryal defektler sıçanlar için 8 mm; veya fareler için 5 mm tam yuvarlak kemik defektidir (228, 350, 351). Kalvaryal defekt incelenmesinin bir avantajı da ortotropik kemik alanlarının onarımını da içermesidir. Mevcut kassal dokular ve ektopik bölgelerden ziyade direkt kemik doku iyileşmesini daha anlamlı kılmaktadır (418).

3.1.1. PRP Elde Edilmesi

Çalışma grubuna dahil ettiğimiz sıçanlardan rastgele seçilen 4 sıçana intraperitoneal ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezisi yapılmıştır. Yaklaşık 10'ar ml kardiyak kanları PRP hazırlanması için tüplere konulmuştur, kan elde edimi sonrasında servikal dislokasyon yapılarak sakrifiye edilmişlerdir. Bahsedilmiş PRP hazırlama yöntemlerinden manuel olarak karıştırma esasına göre değil içinde heparinin bulunduğu tüp kullanılmıştır. Santrifüj cihazına yerleştirilen tüpler karşılıklı olarak simetrik şekilde konmuştur. İlk santrifüj işleminde 3600 RPM 15 dk seçenekleri seçilip santrifüj yapılmıştır. Tüp içerisinde sıvı formda olan dibe çökelmemiş plazma sıvısı alınarak ikinci santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. İkinci santrifüjde ise 2400 RPM 10 dk'lık özellikler seçildikten sonra işlem tamamlanmış ve PRP eldesi sağlanmıştır.

3.1.2. Kitozan ve Kalsitriol Hazırlanması ve Seçilmesi

Bu çalışmada farklı oranlarda kitozan (Aldrich – chitosan medium molecular weight) ve poloxamer F 407 (kollipor p 407) içeren 6 jel formülasyonları hazırlanmıştır. Öncelikle %5 (w/v) ve % 10 (w/v) oranında kitozan çözeltileri hazırlanmıştır.

%5 kitozan çözeltisi için 1 g kitozan; %10'luk kitozan çözeltisi hazırlamak için ise 2g kitozan tartılmıştır ve üzerlerine 20 ml ultra saf su eklenmiştir. İyiye karıştırılarak uygun jel kıvamına gelinceye kadar damla damla %10'luk asetik asit çözeltisi eklenmiştir. %5'lik kitozan çözeltisine 2,5ml %10'luk asetik asit çözeltisi; %10'luk kitozan çözeltisi için 5 ml'lik %10'luk asetik asit çözeltisi eklenmiştir. İyiye karıştırıldıktan sonra %5'lik formülde jelleşme olmuş ve ölçülen pH'nın yaklaşık 4 ile 5 arasında olduğu tespit edilmiştir. %10'luk kitozan formülünde ise jelleşme tespit edilmiştir ancak çok yoğun bir kıvama sahip olduğu görülmüştür. PH değeri ölçüldüğünde yine 4 ile 5 arasında bulunduğu görülmüştür.

%15'lik poloxamer F407 çözeltisi hazırlamak için 3 g poloxamer tartılmıştır, üzerine ultra saf soğuk su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırıldıktan sonra 1 saat buzdolabında bekletilmiştir. PH değerinin yaklaşık 6 olduğu tespit edilmiştir.

(1:1), (2:1), (3:1) oranlarında %5 kitozan ve %15 poloxamer F 407 içeren jellerin hazırlanması için flakonlara tartım alınmıştır. İyiye karıştırıldıktan sonra hava

almayacak şekilde kapatılmıştır ve 1 gece süresince oda sıcaklığında bekletilmiştir. Alınan tartımlar;

%5 Kitozan / % 15 poloxamer F 407 (1.0486: 1091)

%5 Kitozan / % 15 poloxamer F 407 (2,0343: 1. 0194)

%5 Kitozan / % 15 poloxamer F 407 (3,0550: 1,0226)

şeklinde ölçülmüştür.

(1:1), (2:1), (3:1) oranlarında %10 kitozan ve %15 poloxamer F 407 içeren jellerin hazırlanması için flakonlara tartım alınmıştır. İyice karıştırıldıktan sonra hava almayacak şekilde kapatılmıştır ve bir gece süresince oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Alınan tartımlar;

%10 kitozan / % 15 poloxamer F 407 (1,0558: 1,0698),

%10 kitozan / % 15 poloxamer F 407 (2,0192: 1,0284),

%10 kitozan / % 15 poloxamer F 407 (3,0675: 1,0351)'dir.

Hazırlanan kitozan poloxamer F 407 jel formülasyonlarının daha berrak hale geldiği gözlenmiştir. Yaklaşık 37 °C'de su banyosu hazırlanmış ve bu jel formülasyonları 35 dk su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosunda bekletilen jel formüllerinin diğerine göre daha yoğun bir kıvam aldığı gözlenmiştir.

%5 (w/v) kitozan; %15 poloxamer f 407 (3:1) oranındaki jel formülü çalışma için uygun bulunmuştur.

%5 kitozan (aldrich – chitosan medium molecular weight) ve %15 poloxamer f 407 (kolliphor 407) (3:1) oranında jel formülleri hazırlanmıştır. 1 g kitozan (aldrich – chitosan medium molecular weight) tartılıp ultra saf su eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra damla damla 3 ml % 10'luk asetik asit çözeltisi eklenmiştir. 45 dk beklemeye bırakılmıştır. %15'lik poloxamer f 407 hazırlamak için 3 g poloxamer tartılmıştır ve üzerine ultra saf soğuk su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırıldıktan sonra 50 dk buzdolabında bekletilmiştir. (3:1) oranında %5 kitozan ve %15 poloxamer f 407 içeren jellerin hazırlanması için flakona tartım alınmıştır.

25 mg (3:1) %5 kitozan ve %15 poloxamer karışımında 100 µg Calcitriol EP/USP (C0044 – B00127) olacak şekilde ayrı ayrı 3 formül hazırlanmıştır. 100 µg /

200 µg / 500 µg tartılan kalsitriolü çözmek için üzerine 20 µl etanol eklenmiştir. 25 mg (3:1) oranında %5 kitozan ve % 15 poloxamer içeren jel formülü tartıldıktan sonra üzerine 20 µl etanolde çözünen kalsitriol mikropipet ile eklenip karıştırılmıştır. Bu şekilde 3 numune hazırlanmıştır.

Bu çalışmalar sonucunda belirlenen doz 100 µl'lik taşıyıcı içinde 200 ng/ kg'dir. Kitozan ve PRP için ise hacim 450 µl'dir. Her bir denek için hazırlanan karışım 1 gr'dır. 50 mg da 50 µg etkin madde (kalsitriol) 10 µl etanolde çözülmüştür.

1.grup: Kontrol grubu (n=8, 2/2/2/2)

2.grup: Kitozan grubu (n=8, 2/2/2/2)

3.grup: PRP ve kitozan grubu (n=8, 2/2/2/2)

4. grup: PRP grubu (n=8, 2/2/2/2)

5. grup: Kalsitriol ve kitozan grubu (n=8, 2/2/2/2)

6. grup: Kalsitriol, kitozan ve PRP grubu (n=8, 2/2/2/2)

(N = Gruptaki deney hayvanı sayısı / Her bir haftada 1., 2., 4., ve 8. haftada 2'şer sakrifikasyon yapılmıştır. Deney hayvanları bu algoritmaya bağlı olarak alt birimlere ayrılmıştır. Her grupta her haftada sakrifikasyon günlerine bağlı olarak 2'şer denek hayvanı vardır.)

Yaşa ve zamana bağlı olarak ciddi bir fark oluşmaması adına deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nden belirli ve aralıklı periyotlar ile alınıp İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Araştırma Birimi'ne nakledilmiş ve karantina ve ortama alışma süreçleri tamamlandıktan sonra herhangi bir problemi tespit edilmeyen denekler deneylere dahil edilip başlanmıştır.

Kemik defekti oluşturulmadan önce sıçanlar rastgele 6 gruba ayrılmıştır:

1.grup: Kontrol grubu (n=8, 2/2/2/2)

2.grup: Kitozan grubu (n=8, 2/2/2/2)

3.grup: PRP ve kitozan grubu (n=8, 2/2/2/2)

4. grup: PRP Grubu (n=8, 2/2/2/2)

5. grup: Kalsitriol ve kitozan grubu (n=8, 2/2/2/2)

6. grup: Kalsitriol, kitozan ve PRP grubu (n=8, 2/2/2/2)

(N = Gruptaki deney hayvanı sayısı / Her bir haftada 1., 2., 4., ve 8. haftada 2'şer sakrifikasyon yapılmıştır. Deney hayvanları bu algoritmaya bağlı olarak alt birimlere ayrılmıştır. Her grupta her haftada sakrifikasyon günlerine bağlı olarak 2'şer denek hayvanı vardır.)

1. gruptaki (kontrol grubu) denek sayısı 8 olan sıçana kemik defekti oluşturulması harici herhangi bir uygulama yapılmamıştır. 1., 2., 4. ve 8. hafta grubunda 2'şer denek olacak şekilde sınıflandırılmışlardır. Defektlere herhangi bir madde yerleştirilmemiş defektler boş bırakılmıştır. Defekt alanı intakt halde bırakılıp emilebilir poliglikolaktid özellikli dikiş materyali ile primer kapatılmıştır.

2. gruptaki denek sayısı 8 olan sıçana kemik defekti oluşturulmasını takiben mevcut kemik kavitesi kitozan ile doldurulmuştur. 1., 2., 4. ve 8. hafta grubunda 2'şer denek olacak şekilde sınıflandırılmışlardır. Defekt alanı emilebilir poliglikolaktid özellikli dikiş materyali ile primer kapatılmıştır.

3. gruptaki denek sayısı 8 olan sıçana kemik defekti oluşturulmasını takiben mevcut kemik kavitesi PRP ve kitozan karışımı ile doldurulmuştur. 1., 2., 4. ve 8. hafta grubunda 2'şer denek olacak şekilde sınıflandırılmışlardır. Defekt alanı emilebilir poliglikolaktid özellikli dikiş materyali ile primer kapatılmıştır.

4. gruptaki denek sayısı 8 olan sıçana kemik defekti oluşturulmasını takiben mevcut kemik kavitesi PRP ile doldurulmuştur. 1., 2., 4. ve 8. hafta grubunda 2'şer denek olacak şekilde sınıflandırılmışlardır. Defekt alanı emilebilir poliglikolaktid özellikli dikiş materyali ile primer kapatılmıştır.

5. gruptaki denek sayısı 8 olan sıçana kemik defekti oluşturulmasını takiben mevcut kemik kavitesi kalsitriol ve kitozan karışımı ile doldurulmuştur. 1., 2., 4. ve 8. hafta grubunda 2'şer denek olacak şekilde sınıflandırılmışlardır. Defekt alanı emilebilir poliglikolaktid özellikli dikiş materyali ile primer kapatılmıştır.

6. gruptaki denek sayısı 8 olan sıçana kemik defekti oluşturulmasını takiben mevcut kemik kavitesi kalsitriol, kitozan ve PRP karışımı ile doldurulmuştur. 1., 2., 4. ve 8. hafta grubunda 2'şer denek olacak şekilde sınıflandırılmışlardır. Defekt alanı emilebilir poliglikolaktid özellikli dikiş materyali ile primer kapatılmıştır.

Her bir grupta sakrifikasyon süreleri 1, 2 , 4 ve 8 olarak belirlenmiştir. Bunun belirlenmesinin sebebi sıçan metabolizması ile insan metabolizmasının karşılaştırıldığı çalışmalardır. İnsanda kemik ve yumuşak doku iyileşmesinin 3. gününde epitelizasyonunun başlamasını takiben sitokinlerin mediyatörlerin ve reseptörlerin buradaki aktivasyonu arttırması planlı hücre göçüyle anında iyileşmenin başlamasını sağlamaktadır yara alanına önce yumuşak sonra da sert kallusu oluşturmak adına gelen osteblastların kemik yapımını takiben doku içerisinde osteositlere dönüşmesi periyotları 1, 2, 3 ve 6 ay, 1 yıl ve 2 yıl takibi ile görülmektedir ve bunlar sıçan metabolizmasında 1. ve 2. haftalarda kısa dönemde, uzun dönemde 4. ve 8. haftaya gelen dönemi kapsamaktadır (313, 360, 325).

Laboratuvar sıçanları ortalama 2-3,5 yıl yaşamaktadır. Bu insan yaşamı sürecinde yaklaşık 80 yıla tekabül etmektedir (313, 325, 359, 360). Adolesan dönemde ise 1 insan yılı 10,5 sıçan güne eşitir (313, 325, 359, 360, 361). Adolesan dönem sonrasında ise 1 sıçan günü yaklaşık 34 insan gününe denk gelmektedir (Tablo 3-1) (Tablo 3-2).

Tablo 3-1: İnsan yılı ile değişik gelişim dönemindeki sıçan günlerinin karşılaştırılması (361)

İnsan Yılı ile Değişik Gelişim Dönemindeki Sıçan Günlerinin Karşılaştırılması		
Genel Yaşam Döngüsü	13,2 Sıçan Günü	1 İnsan Yılı
Gençlik Dönemi	11,8 Sıçan Günü	1 İnsan Yılı
Ortalama	16,4 Sıçan Günü	1 İnsan Yılı

Tablo 3-2: Sıçan yaşı vs insan yaşı: sosyal olgunluk dönemi (361)

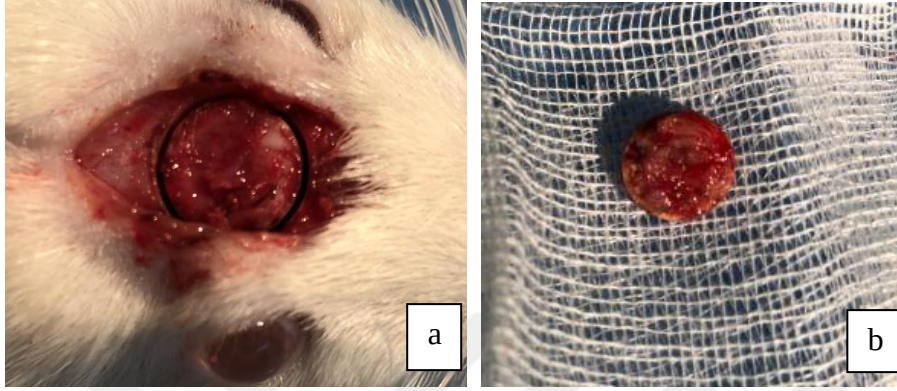
Sıçan Yaşı vs İnsan Yaşı: Sosyal Olgunluk Dönemi	
Sıçan Yaşı (Yıl)	İnsan Yaşı (Yıl)
6 ay (0,5)	18
12 ay (1,0)	30
18 ay (1,5)	45
24 ay (2,0)	60
30 ay (2,5)	75

Cerrahi işlemin bitmesini takiben yara yüzeyleri 3,0 ipek emilebilir poliglikolaktid içerikli suture materyali ile primer kapatılmıştır. Postoperatif enfeksiyonun önlenmesi ve ağrı şokunun ortadan kalkması amacıyla yara yüzeyleri yine povinilprolidon antiseptik solüsyonla silinmiş işlem sonrası iki günlük süreyle ikişer kez tramadol (2 mg/kg) ve sefazolin (50 mg/ kg) enjeksiyon desteği sağlanmıştır. İşlem sonrasında; önceden 2 ml orbital kan alındığı ve işlem sırasındaki öngörülemeyen, farkedilen ve olası farkedilemeyen hemorajiler için 1 ml serum fizyolojik subkutan olarak verilmiştir. Deney yapılmış sıçanlar birbirlerine ve yara yüzeylerine hasar vermemeleri için kafeslere tek tek konulmuş ve takipleri yapılmıştır.

3.2. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Örneklerin Temini

Deneyler grup grup sistematik olarak gittiğinden dolayı cerrahi defekti oluşturulan denek hayvanlarından rastgele olarak 1. haftada, 2. haftada 4. haftada ve 8. haftada 2'şer sakrifikasyon yapılmıştır. Sakrifikasyon günlerinde sıçanların ağırlıkları ölçülmüş intraperitoneal ketamin hidroklorür (50 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anestezisi yapıldıktan hemen sonra yaklaşık 10 ml kardiyak kanları alınıp servikal dislokasyon işlemleri tamamlanmıştır. 10 ml kandan 2 ml'si yine D vitamini ölçümünün ve PTH seviye tespiti yapılabilmesi amacıyla EDTA'lı tüplere konmuş ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarına 25(OH) ölçümleri için nakledilmiştir. Midsagittal sutürdeki mevcut insizyon tekrarlanmış, flap tam kalınlıklı kaldırılmıştır. Bu sefer 10 mm iç çaplı trefan frez (Meisinger 229 RAL/100, ABD) kullanılarak 5 mm kritik defekt alanı tam ortada kalacak şekilde ve etrafından sağlam kemik dokusu olacak şekilde kalvaryal kemik dokusu devamlı serum irrigasyonu altında alınmıştır (Şekil 3-4). Her bir gruptaki sakrifiye edilen 2 deneğe ait sakrifikasyon sonrası elde edilen 10 mm iç çaplı kemik bloğundan makroskopik olarak daha iyi olan bir tanesi özelleşmiş tüp içinde formol ile İstanbul Üniversitesi Teknoloji Transfer Merkezi - 3 Boyutlu Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarına (TETLAB) mikrotomografik ölçümlerin yapılabilmesi amacıyla götürülmüştür. Diğer deneğe ait olan kemik bloğu histolojik ve immunohistokimyasal analiz amacıyla formol içinde İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel Bilimler Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na bırakılmıştır. İstanbul Üniversitesi Teknoloji Transfer Merkezi'nde mikrotomografi için taramaları maksimum 3 gün içinde tamamlanan örnekler de yine

histolojik ve immunohistokimyasal analiz yapılabilmesi amacıyla İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel Bilimler Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'na götürülmüştür.



Şekil 3-4: Sakrifikasyon sonrası kalvaryal kemik alanı: 10 mm çaplı trephan frez uygulamasının ardından kalvaryal kemikte elde edilen defekt hattı (a), 10 mm çaplı trephan frez uygulamasının ardından kalvaryal kemikten çıkarılmış defekt (b)

Her bir grupta 8 denek hayvanı mevcuttur (Tablo 3-3). Her bir haftada 1., 2., 4., ve 8. haftada 2'şer sakrifikasyon yapılmıştır. Deney hayvanları bu algoritmaya bağlı olarak alt birimlere ayrılmıştır. Her grupta her haftada sakrifikasyon günlerine bağlı olarak 2'şer denek hayvanı vardır.

Tablo 3-3: Çalışma grupları-sıçan sayısı

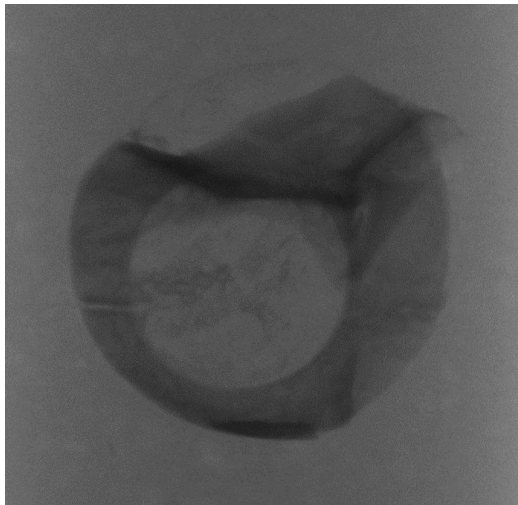
Çalışma grupları	Sıçan sayısı(n)
1 Grup – Kontrol Grubu	8
2. Grup Kitozan Grubu	8
3. Grup PRP ve kitozan Grubu	8
4. Grup PRP Grubu	8
5. Grup Kalsitriol ve kitozan Grubu	8
6. Grup Kalsitriol, kitozan ve PRP Grubu	8

3.3. Mikrotomografilerin Alınması

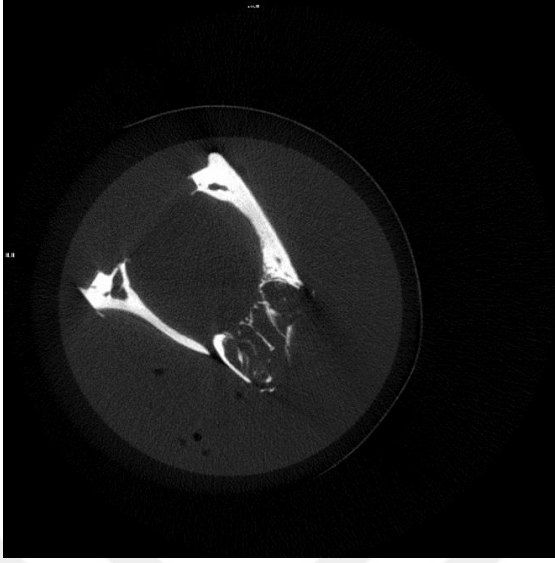
Her bir araştırma grubunu temsilen elde edilen birer kemik bloğundan makroskopik olarak daha iyi görüneni mikrotomografi için özelleşmiş tüpler içerisine %10 formol ile birlikte konulup İstanbul Üniversitesi Teknoloji Transfer Merkezi – 3 Boyutlu Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarı Birimi'ne teslim edilmiştir. Maksimum 3 iş gününde taramalar tamamlanmıştır.

Kemik defektlerinden elde edilen örneklerin mikrotomografi görüntülenmesi, İstanbul Üniversitesi Teknoloji Transfer Merkezi – 3 Boyutlu Tıbbi ve Endüstriyel Tasarım Laboratuvarları Birimi'nde gerçekleştirilmiştir.

Falcon tüp içerisine sabitlenen numuneler SkyScan 1174v2 (Kontich- Belgium) bilgisayarlı tomografi cihazında taranmak üzere hazırlanmıştır. Tarama haznesi içine sabitlenen her bir örneğin tarama işlemi 50 kVp voltaj, 800 μ A akım ve 40 W güç değerlerinde 0.50 mm'lik Al filtre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tarama değerleri optimize edilerek 3500 ms pozlama süresi (exposure time), 1024x1304 çözünürlük ve 19.98 μ m yakınlaştırma faktörü kullanılmıştır. Her bir örnek yaklaşık 57 dakikada 0.80 derecelik rotasyon ile 360 derece taranmıştır. Tarama sonrası elde edilen TIFF formatındaki 451 ham görüntü NRecon (Ver. 1.6.10.2) programı ile yeniden yapılandırılarak BMP formatında yaklaşık 686 adet yatay kesit elde edilmiştir. Defekt alanının mikrotomografik görüntüsü elde edilmiştir (Şekil 3-5). Defekt alanının kesitsel görüntüsü alınmıştır (Şekil 3-6).



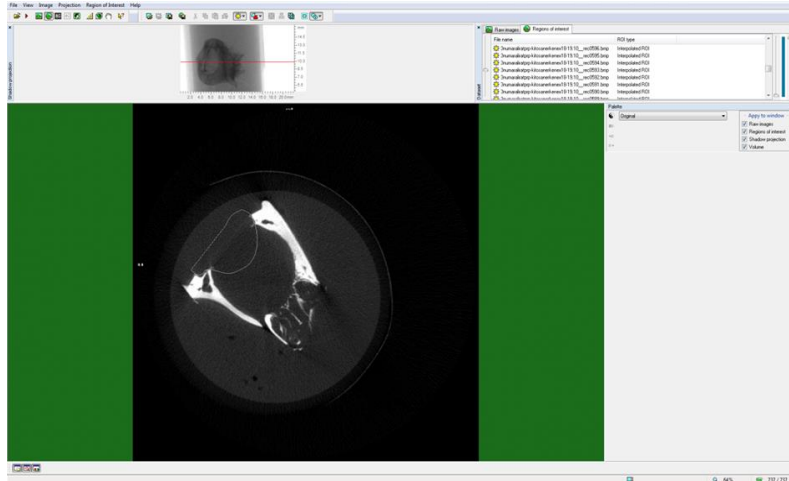
Şekil 3-5: Defekt alanının mikrotomografik görüntüsü



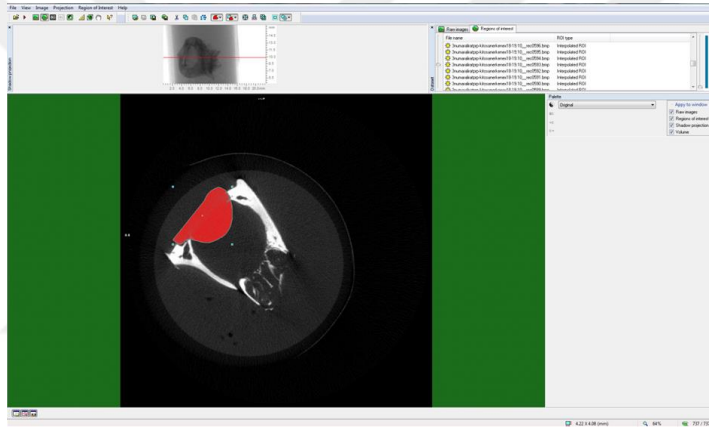
Şekil 3-6: Defekt alanının kesit görüntüsü

Kemik mineral yoğunluğu (KMY) kalibrasyonları ilk olarak veri kümesine uygulanmıştır. KMY analizleri kalsiyum yoğunlukları $0,25 \text{ g/mm}^3$ ve $0,75 \text{ g/mm}^3$ CaHA kalibrasyon çubuğu (fantom) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Rekonstrüksiyon sonucu elde edilen görüntüler BMP formatında kaydedilmiştir. Bu kesitler; kantitatif parametreler ve görsel modeller oluşturmak amacıyla kullanılan, densitometrik ve morfometrik ölçümlere olanak sağlayan CTAn (Ver. 1.16.4.1+) programına aktarılmıştır. Ölçüm yapılacak alanın sınırlarını belirlemek amacıyla; kesitler üzerinde yatay düzlemde yarı-otomatik olarak dairesel ilgili alan (Region of Interest; ilgi bölgesi- ROI) çizilmiştir (Şekil 3-7). İncelenecek örneğe ait olan vokseller ile çevresinde bulunan havanın voksellerini ayırmak için histogramda bir eşik değeri belirlenmiştir. Siyah vokselin 0 ile belirtilip minimum yoğunluğu ifade ettiği, beyaz vokselin ise 255 ile belirtilip maksimum yoğunluğu gösterdiği histogram üzerinde eşik değeri belirlenmiştir. Belirlenen ROI'lar (ilgi bölgesi) ve eşik değeri verileriyle hacimsel oranlar ayrı ayrı hesaplanmıştır (Şekil 3-8). Örneklere ait veriler CTVol (Ver. 2.3.2.0) programına aktarılmıştır ve örneklere ait üç boyutlu modelleme görüntüleri elde edilmiştir.



Şekil 3-7: Defekt bölgesinde yeni oluşan doku etrafında ROI (region of interest) belirlenmesi



Şekil 3-8: Defekt bölgesinde yeni oluşan doku etrafında belirlenmiş ROI (region of interest)

Numuneler üzerinde oluşturulan defekt bölgesinde oluşan yeni dokuya ait BMD (g/cm^3) analizi ve oluşan yeni dokunun hacmi (mm^3) ölçümleri CTAn (Ver. 1.16.4.1+) yazılımı ile hesaplanmıştır.

3.4. Histolojik ve İmmunhistokimyasal Çalışma ve Değerlendirme

3.4.1. Doku Preperasyonu

Çalışmamızda alınan dokusal numunelerin histolojik değerlendirilmesi İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Kemik numuneleri %10 tamponlu formaldehitte oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Kalsifikasyon özelliğinin eliminasyonu için %5 formik asitte 2 gün bekletilmiştir. Dokunun sıvısal bütünlüğünün kaldırılması için yoğunluğu artan alkol serilerinin (%70, %90, %96, %100) hepsinde 24'er saat kalacak şekilde dehidratasyon işlemi yapılmıştır. %100 alkol içerisinde 30 dakika daha tutulmasının ardından şeffaf hale getirebilmek amacıyla 15 dk'lık sürelerde 2 kez daha toluolde (sigma-aldrich, 32249) tutulmuştur. 56 °C'deki etüv (heraeus) içerisinde saf parafinde 3 kere 1 saat bekletilmiştir ve paraffin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom ile 2,5 µm kalınlıkta alınan kesitler pozitif şarjlı lamlara alınmıştır.

3.4.2. İmmunhistokimya Çalışması ve Değerlendirme

İmmunhistokimya çalışması için kesitler 56 °C'de etüvde 1 gece bekletildikten sonra deparafinizasyon için 30 dakika toluol ile muamele edilmiştir. Dehidratasyon için yükselen alkol (%70, 90, 96, 100) serilerinden geçirilerek kesitler distile suya alınmıştır. Fosfat tamponu ile 5 dakika yıkanan kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %5'lik hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika karanlıkta bekletildikten sonra yine fosfat tampon ile yıkamaya alınmıştır. Antijen geri dönüşümü için 30 dakika EDTA içerisinde inkübe edilen kesitler 20 dakika bekletilip oda ısısına gelmesi sağlandıktan sonra fosfat tampon ile yıkanmıştır. Ultra V blok ile 5 dakika inkübasyon sonrası kesitler 1/200 oranında dilüe edilen FGF23 (AVIVA / OABF01602), 1/200 oranında dilüe edilen RANK (THERMO/PIERCE / MA5-16153) ve 1/100 oranında dilüe edilen VDR (SANTA CRUZ / sc-13133) primer antikorları ile 1 saat inkübe edilmiştir. Kesitler sırasıyla sekonder antikor ve streptavidin biyotin solüsyonu ve AEC kromojeni ile 10'ar dakika inkübasyona alınmıştır (Sekonder kit: ROCHE/Ventana / R 05269806001). Arka plan boyaması mayer hematoksilen ile yapılan kesitler su bazlı kapatıcı ile lam lamel arası preperat haline getirilmiştir. Olympus araştırma mikroskobu (BX40F4) ile 10'luk objektif kullanılarak alanın boyanma niceliği ve reaksiyon yoğunluğu açısından değerlendirilmiştir. Reaksiyon yoğunluğu için reaksiyon yok (-),

zayıf reaksiyon (+), orta reaksiyon (++) ve güçlü reaksiyon (+++) olarak skorlama yapılmıştır.

3.5. Biyokimyasal Analiz

Her denekten defekt oluşturulmadan önce orbital sinüsten ve sakrifikasyonlarının öncesinde kalpten alınan kan örnekleri EDTA barındıran özelleşmiş tüpe konularak İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı'na getirilmiştir. Örnekler HPLC cihazında HPLC yöntemi ile incelenmiştir. Jelli kan örneği oda ısısında pıhtılaşmaya kadar bekletilmiştir. Tüplerin 3000 RPM'de 5 dk santrifüj edilmesiyle ayrılan serum 1,5 ml'lik kapaklı ependorf tüplerine porsiyonlanmış ve çalışılncaya kadar -80 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

D vitamini ve parathormon için 5 cc jelli, kuru tüpe kan örneği alınmıştır. D vitamini, Roche Diagnostic İntegra cihazında kolorimetrik yöntem ile, PTH, Roche / Kobas 8000 e 602 (Hitachi, Tokyo, Japan) otoanalizöründe elektrokemilüminesans yöntemi ile çalışılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlenmesinde ele alınan ölçütler ortalama, standart sapma, frekans ve yüzde değerleri ile tanımlanmıştır. Normal dağılıma sahip değişken ortalamalarının karşılaştırılması için - ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılmasında “Tek yönlü Varyans Analizi” (One-Way ANOVA), ANOVA ile anlamlı fark bulunan değişkenlerde altgrupların arasındaki farkların yorumlanması için altgrupların ikili kıyaslamalarında da post-hoc “Dunnet” ve “Bonferroni” testi (p'den sonraki sütunda altgrupların ilişkileri yazılmıştır) kullanılmıştır. Bağımlı örneklemelerde üç veya daha çok kesit içeren deney kurgularında “Tekrarlı ölçümlerde ANOVA” (Repeated measures ANOVA) yöntemi kullanılarak gözlenen farkların anlamlılığı denetlenmiştir. Anlamlı fark bulunduğu durumlarda kesitler arasındaki farkların yorumlanması için ikili kıyaslamaları da post-hoc “Bonferroni veya LSD (Least Significant Difference)” testi kullanılarak test edilmiştir. Yorumlamalarda anlamlılık

sınırı $p=0,05$ alınmıştır. Biyoistatistiksel analizlerde SPSS (Sürüm:21) paket programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Mikrotomografi Bulguları

Her bir gruptaki sakrifikasyon dönemleri 1., 2., 4. ve 8. haftalara ait her gruptan ait iki denekten elde edilen kemik bloğundan makroskopik özelliği değerlendirilip birinden bilgisayarlı mikrotomografi görüntüsü alınmış ve defekt bölgesindeki kemik mineral yoğunluğu (Tablo 4-1), defekt alanındaki kemik hacimleri ölçülmüş (Tablo 4-2), doku alanı hesaplanmış (Tablo 4-3), kemikleşme miktarı (Tablo 4-4) ve trabeküler kalınlık ölçülmüştür (Tablo 4-5). Kesişim yüzeyi hesaplanmıştır (Tablo 4-6).

Sonuçlar tablolarda özetlenmiştir.

Tablo 4-1: Gruplara ait kemik mineral yoğunluğu sayısal değerleri

KMY Gruplar	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta	P
Kontrol	3,3 ± 0,01	3,35 ± 0,63	2,78 ± 0,53	0,31	p>0,05
Kitozan	3,41 ± 0,16	2,14 ± 1,50	2,82 ± 0,73	3,11	p>0,05
Kitozan + PRP	3,39 ± 0,02	3,57 ± 0,11	3,01 ± 0,48	3,12 ± 0,18	p>0,05
PRP	3,30 ± 0,01	2,54 ± 0,64	2,74 ± 0,78	3,28 ± 0,14	p>0,05
Kalsitriol + Kitozan	2,45 ± 1,31	3,02 ± 0,53	1,37 ± 0,59	2,99	p<0,05
Kalsitriol+ Kitozan + PRP	3,30	2,82	3,48	3,20	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p<0,05	
Değerler g/mm ³ bazındadır					

Tablo 4-2: Gruplara ait kemik hacmi sayısal değerleri

Kemik Hacmi Gruplar	1. hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta	P
Kontrol	0,82 ± 0,30	1,16 ± 0,55	0,55 ± 0,59	1,02	p>0,05
Kitozan	0,75 ± 0,04	1,48 ± 0,79	3,34 ± 1,87	1,22	p>0,05
Kitozan + PRP	1,44 ± 0,12	0,58 ± 0,11	0,45 ± 0,16	0,68 ± 0,32	p>0,05
PRP	1,29 ± 0,09	2,30 ± 1,29	9,86 ± 0,81	0,51 ± 0,24	p>0,05
Kalsitriol + Kitozan	2,80 ± 1,51	2,07 ± 0,03	4,89 ± 1,40	4,00	p<0,05
Kalsitriol+ Kitozan + PRP	1,17	3,13	3,46	3,91	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	
Değerler mm ³ bazındadır					

Tablo 4-3: Gruplara ait doku alanı sayısal değerleri

Doku Alanı Gruplar	1. hafta	2. hafta	4. Hafta	8. Hafta	p
Kontrol	37,74 ± 3,77	30,23 ± 2,66	39,77 ± 18,11	36,69	p>0,05
Kitozan	37,00 ±25,20	47,74 ± 16,82	72,90 ± 11,50	37,99	p>0,05
Kitozan + PRP	57,06 ± 8,07	22,57 ± 14,76	13,07 ± 2,12	17,08 ± 2,94	p>0,05
PRP	45,97 ± 1,51	45,66 ± 23,13	63,99 ± 10,79	20,02 ± 5,72	p>0,05
Kalsitriol + Kitozan	53,00 ± 2,94	52,35 ± 12,86	50,73 ± 9,37	26,47	p>0,05
Kalsitriol+ Kitozan + PRP	42,35	67,23	102,85	124,77	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	
Değerler mm ² bazındadır					

Tablo 4-4: Gruplara ait kemikleşme miktarı sayısal değerleri

Kemikleşme Yüzdesi Gruplar	1 .Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta	P
Kontrol	2,14 ± 0,58	3,78 ± 1,48	3,06 ± 0,73	2,77	p>0,05
Kitozan	2,68 ± 1,92	3,00 ± 0,60	4,84 ± 3,32	3,21	p>0,05
Kitozan + PRP	2,57 ± 0,57	3,10 ± 1,56	3,38 ± 0,71	3,87 ± 1,18	p>0,05
PRP	2,80 ± 0,10	4,96 ± 0,32	15,53 ± 1,35	2,48 ± 0,47	p>0,05
Kalsitriol + Kitozan	5,05 ± 2,33	4,07 ± 0,95	9,54 ± 1,00	15,11	p<0,05
Kalsitriol+ Kitozan + PRP	2,77	4,65	3,36	3,14	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p<0,05	
Değerler % bazındadır					

Tablo 4-5: Gruplara ait trabeküler kalınlık sayısal değerleri

Trabeküler Kalınlık Gruplar	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta	P
Kontrol	0,12 ± 0	0,20 ± 0,06	0,16 ± 0,04	0,16	p>0,05
Kitozan	0,15 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,27 ± 0,19	0,15	p>0,05
Kitozan + PRP	2,57 ± 0,57	0,16 ± 0,06	0,16 ± 0,05	0,22 ± 0,07	p>0,05
PRP	0,16 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,53 ± 0,12	0,15 ± 0,03	p>0,05
Kalsitriol + Kitozan	0,26 ± 0,14	0,22 ± 0,00	0,45 ± 0,02	0,31	p<0,05
Kalsitriol+ Kitozan + PRP	0,12	0,14	0,17	0,19	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
Değerler mm bazındadır					

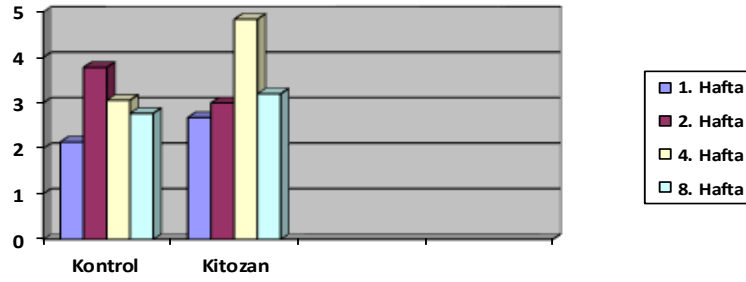
Tablo 4-6: Gruplara ait kesişim yüzeyi sayısal değerleri

Kesişim Yüzeyi Gruplar	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta	p
Kontrol	8,52 ± 0,90	8,81 ± 0,03	4,92 ± 3,12	16,11	p>0,05
Kitozan	7,16 ± 3,65	12,21 ± 2,37	15,15 ± 2,11	14,78	p>0,05
Kitozan + PRP	15,48 ± 2,01	4,93 ± 0,18	5,31 ± 1,04	5,49 ± 0,99	p>0,05
PRP	11,75 ± 3,32	14,89 ± 4,81	15,98 ± 2,50	5,56 ± 1,27	p>0,05
Kalsitriol + Kitozan	16,41 ± 0,19	14,65 ± 0,73	12,90 ± 1,14	10,24	p>0,05
Kalsitriol+ Kitozan + PRP	14,74	23,01	15,51	16,77	p>0,05
P	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	
Değerler mm ² bazındadır					

Kontrol ve kitozan grupları kemikleşme yüzdesi çerçevesinde değerlendirildiğinde 1., 4. ve 8. haftalarda kitozan grubunda kemikleşme yüzde değeri artmış olmasına rağmen bu değer istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir (Tablo 4-7). Yaptığımız histolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde tespit ettiğimiz durum; mikrotomografisel olarak gri skala ve threshold değeri olarak fark oluşturan, yeni ve eski kemik ayrımının granülasyon dokusu olarak nitelendirilebildiğidir. Grafiğe dökülmüştür (Şekil 4-1). Histolojik ve immunohistokimyasal farkta kitozan grubunda kontrol grubuna göre daha fazla granülasyon dokusu ve fibröz yapı tespit edilmiştir. Ancak kemik yapımı ile ilgili bir hücresel tespit gerçekleştirilememiştir. 1. ve 2. haftalarda FGF 23 antikor boyama ve şiddeti kitozan grubunda kontrol grubundan daha yoğun ve hacim olarak daha fazla iken 4. ve 8. haftalarda bu oran kontrol grubunda daha yoğun ve alansal olarak daha fazladır. Fibroblast yapısının daha fazla tespit edilmesi defekt alanına kemik yapımını artırması beklenen herhangi bir destek materyali konulmadığı için uzun dönemde kemik yapımını sağlayacağı ile ilgili bir veri oluşturmamıştır.

Tablo 4-7: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemikleşme yüzdesi değerlerinin karşılaştırılması

Kemikleşme Yüzdesi (%)	Kontrol	Kitozan	P
1. Hafta	2,14 ± 0,58	2,68 ± 1,92	p>0,05
2. Hafta	3,78 ± 1,48	3,00 ± 0,60	p>0,05
4. Hafta	3,06 ± 0,73	4,84 ± 3,32	p>0,05
8. Hafta	2,77	3,21	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	

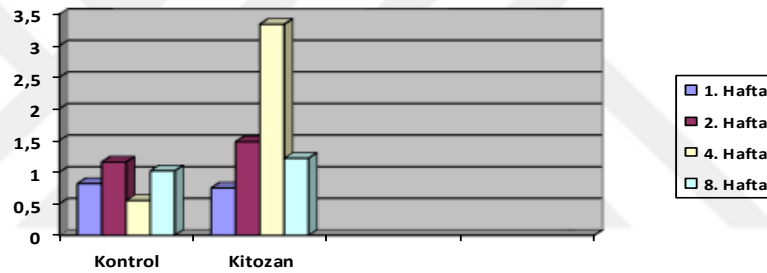


Şekil 4-1: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemikleşme yüzdelerinin karşılaştırılması (%)

Kemik hacim değerlerine bakıldığında kitozan grubunun 2., 4. ve 8. haftalarındaki hacim değerlerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İlk hafta grubunda kontrol grubunda daha fazla hacim bulunmasının sebebini bireysel farklılık olarak düşünmekteyiz (Tablo 4-8). 1. ve 2. haftadaki kemikleşme değerleri istatistiksel olarak anlamsızdır. 4. ve 8. haftalardaki kemik hacim değişiklikleri anlamlı olmakla beraber ikili grup kıyaslamalarında kitozan grubunun kemik hacmi değeri kontrol grubuna göre 4. ve 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde fazladır (Şekil 4-2). Histolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde kontrol ve kitozan gruplarında kemiği ifade edici bir hücre tespit edilememiştir. Mikrotomografisel incelemede gri skala ve threshold değeri kemik hacmi, eski yeni kemik ayrımı olarak nitelendirilirken histolojik ve immunohistokimyasal incelemelerde bu alanların granülasyon dokusu ve fibröz yapılar olduğu görülmüştür. Fibroblastların kitozan grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4-8: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemik hacmi değerlerinin karşılaştırılması

Kemik Hacmi (mm ³)	Kontrol	Kitozan	P
1. Hafta	0,82 ± 0,30	0,75 ± 0,04	p>0,05
2. Hafta	1,16 ± 0,55	1,48 ± 0,79	p>0,05
4. Hafta	0,55 ± 0,59	3,34 ± 1,87	p<0,05
8. Hafta	1,02	1,22	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	

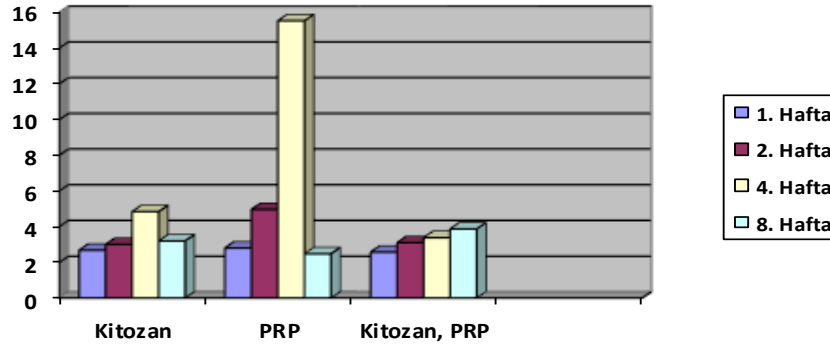
**Şekil 4-2: Kontrol ve kitozan gruplarına ait kemik hacim değerlerinin karşılaştırılması**

Kitozan ve kitozan + PRP grupları kendi aralarında kitozan değişkeni ile karşılaştırıldığında 1. 2. 4. haftada kemikleşme değerleri PRP grubunda daha yüksek değerlerdedir. 8. haftada kitozan + PRP grubundaki kemikleşme yüzdesi PRP grubundan daha fazladır. PRP, kitozan + PRP ve kitozan grupları karşılaştırıldığında ise 8. haftada en çok kemikleşme yüzdesi ile karşılaşılan grubun kitozan + PRP olduğu görülmüştür. Bu 3 grup içindeki değerlendirmelerde sadece PRP + kitozan grubunda 1. haftadan 8. haftaya kadar olan süreçte kemikleşme değerleri yükselmiş; kitozanın ve PRP'nin tek başına olduğu iki grupta 4. haftaya kadar kemikleşme yüzdesi artarken 8. haftada azalma görülmüştür (Tablo 4-9). Kemik mineral yoğunluğu, kemikleşme yüzdesi ve kemik hacim değerleri 4. 8. haftalar çerçevesinde istatistiksel anlamlı olup (ikili grup kıyaslamalarında 4. haftada PRP grubunun kemikleşme yüzdesinin kitozan + PRP grubundan fazla olması; yine 4. haftada kemikleşme yüzdesi değerinin PRP

grubunda kitozan grubuna göre fazla olması istatistiksel olarak anlamlıdır) diğer haftalarda (1. ve 2.) ölçülmüş değerler istatistiksel olarak anlamlı olmasa da histolojik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular bizlere gruplar arası ve grup içi kemik hücreleri tespitleriyle immunohistokimyasal incelemelerde ise antikor boyanma alanı ve şiddeti doğrultusunda yorumlama fırsatı oluşturmuştur (Şekil 4-3).

Tablo 4-9: Kitozan, PRP ve kitozan + PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdesi değerlerinin karşılaştırılması

Kemikleşme Yüzdesi (%)	Kitozan	PRP	Kitozan, PRP	P
1. Hafta	2,68 ± 1,92	2,80 ± 0,10	2,57 ± 0,57	p>0,05
2. Hafta	3,00 ± 0,60	4,96 ± 0,32	3,10 ± 1,56	p>0,05
4. Hafta	4,84 ± 3,32	15,53 ± 1,35	3,38 ± 0,71	p>0,05
8. Hafta	3,21	2,48 ± 0,47	3,87 ± 1,18	p<0,05
p	p>0,05	p>0,05	p>0,05	



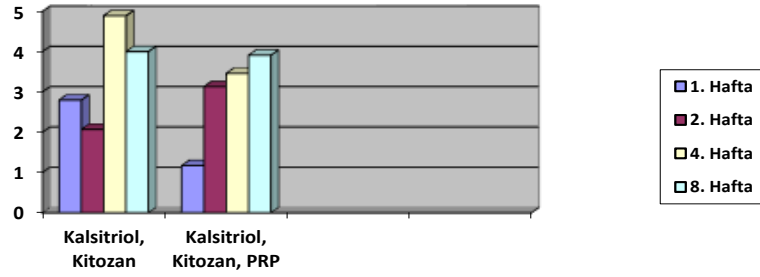
Şekil 4-3: Kitozan, PRP ve kitozan + PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdelerinin karşılaştırılması (%)

Kalsitriol materyalinin eklenmiş olduğu kalsitriol + kitozan + PRP ve kalsitriol + kitozan gruplarında kemiksel hacim değerleri kalsitriol + kitozan grubu 2. haftada 1. haftaya göre düşüş göstermesine rağmen her iki grupta da 8. hafta değerleri 1. hafta değerlerinden fazladır (Tablo 4-10). Tüm gruplar içerisinde 1. haftadan 8. haftaya kadar olan süreçte kemik hacim değerleri en çok kalsitriolün materyal olarak eklendiği gruplarda tespit edilmiştir. 4. ve 8. haftalardaki kemikleşme yüzdeleri değişimi istatistiksel olarak da anlamlıdır. 1. ve 2. haftalarda elde edilmiş veriler istatistiksel olarak anlamsızdır. Radyolojik değerler histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda 1. ve 8. haftalar arası değerlendirme gerçekleştirilmiştir. 4. ve 8. hafta kıyaslamalarında kalsitriol + kitozan grubunun ve kalsitriol + kitozan + PRP grubunun birbiri ile kıyası anlamlıdır ve kalsitriol + kitozan grubunda kemik hacim değeri mikrotomografik olarak fazla ölçülmüştür. Grafikselleştirme de sunulmuştur (Şekil 4-4). Buna bir sebep; PRP'nin ortamdan eliminasyonu olarak görülebilir iken immunohistokimyasal değerlendirmede de fibroblast yapımı ile ilişkilendirilebilen ve sonrasında farklılaşarak ve migrasyon ile kemik yapımına zemin hazırlayan bu FGF23 antikör boyamasında da ilk haftalarda kalsitriol + kitozan + PRP grubunda boyama alanı ve şiddeti fazla görülmüş son haftada alan ve şiddetsel boyama kalsitriol + kitozan + PRP grubu lehine geçmiştir. İstatistiki veride de bundan dolayı PRP + kitozan grubu 1. ve 8. haftada daha fazla kemik hacmi göstermiş ancak bu 8. haftada anlamlı olarak nitelendirilmiştir (Tablo 4-11). Grafiğe nakledilmiştir (Şekil 4-5). Kemik yapım - yıkım metabolizmasının aktivitesi ile ilişkilendirilebilen RANK boyamasında ise son haftalarda kalsitriol + kitozan + PRP grubunda alan boyaması ve

şiddeti kalsitriol + kitozan grubuna göre daha fazladır. Histolojik değerlendirmede de kalsitriol + kitozan + PRP grubunda daha fazla hücre görülmüş makroskopik değerlendirmede defekt alanının daha fazla küçüldüğü defektin daha net olduğu tespit edilmiş ve histolojik inceleme için parafin bloklama işlemlerinde de kalsitriol + kitozan + PRP grubuna ait örneklerin mikrotom ile kesilmesinde kalsitriol + kitozan grubuna göre daha fazla zorluk çekilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı fark sunulamasa da boyama alan şiddeti ve 1. haftalardan farklı olarak histolojik düzeyde hücrelerin görülmesi bu yorumu oluşturmuştur.

Tablo 4-10: Kalsitriol + kitozan, kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemik hacim değerlerinin karşılaştırılması

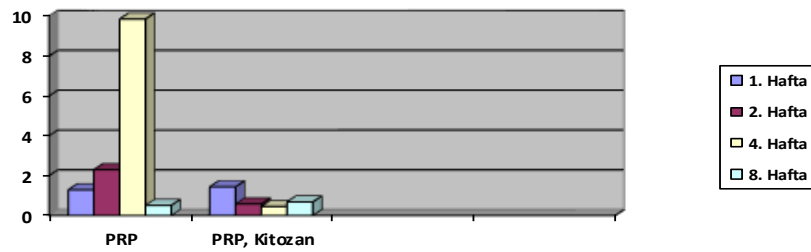
Kemik Hacim Değerleri (mm ³)	Kalsitriol, Kitozan	Kalsitriol, Kitozan, PRP	P
1. Hafta	2,80 ± 1,51	1,17	p>0,05
2. Hafta	2,07 ± 0,03	3,13	p>0,05
4. Hafta	4,89 ± 1,40	3,46	p<0,05
8. Hafta	4,00	3,91	p<0,05
P	p<0,05	p<0,05	p<0,05



Şekil 4-4: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemik hacimlerinin karşılaştırılması

Tablo 4-11: PRP ve PRP + kitozan gruplarının kemik hacmi değerlerinin karşılaştırılması

Kemik Hacmi (mm ³)	PRP	PRP, Kitozan	P
1. Hafta	1,29 ± 0,09	1,44 ± 0,12	p>0,05
2. Hafta	2,30 ± 1,29	0,58 ± 0,11	p>0,05
4. Hafta	9,86 ± 0,81	0,45 ± 0,16	p<0,05
8. Hafta	0,51 ± 0,24	0,68 ± 0,32	p<0,05
P	p>0,05	p>0,05	

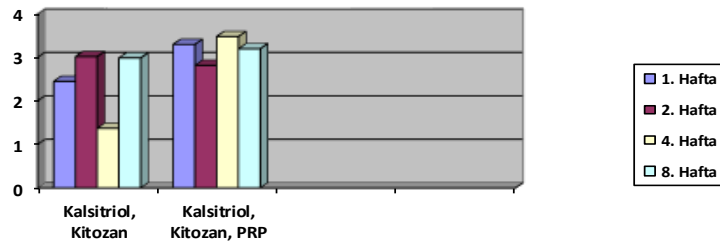


Şekil 4-5: PRP ve kitozan, PRP gruplarına ait kemik hacim değerlerinin karşılaştırılması

Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP grupları kemik mineral yoğunlukları açısından değerlendirildiklerinde 1., 4. ve 8. haftada kalsitriol + kitozan + PRP grubunun değerleri kalsitriol + kitozan grubuna göre daha yüksek ölçülmüştür (Tablo 4-12). İstatistiksel bu fark 8. haftada anlamlandırılmışken histolojik ve immunhistokimyasal değerlendirmelerde tüm haftalarda kemiğe yönelik doku görünümü kalsitriol + kitozan + PRP grubu lehinedir, bu iki grubun kendine özel değerlendirmesinde 1. haftalardan 8. haftalara kadar olan değişim istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuçlar grafiğe dökülmüştür (Şekil: 4-6).

Tablo 4-12: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarının kemik mineral yoğunluğu değerlerinin karşılaştırılması

Kemik Mineral Yoğunluğu (g/mm ³)	Kalsitriol, Kitozan	Kalsitriol, Kitozan, PRP	p
1. Hafta	2,45 ± 1,31	3,30	p>0,05
2. Hafta	3,02 ± 0,53	2,82	p>0,05
4. Hafta	1,37 ± 0,59	3,48	p>0,05
8. Hafta	2,99	3,20	p<0,05
P	p<0,05	p<0,05	

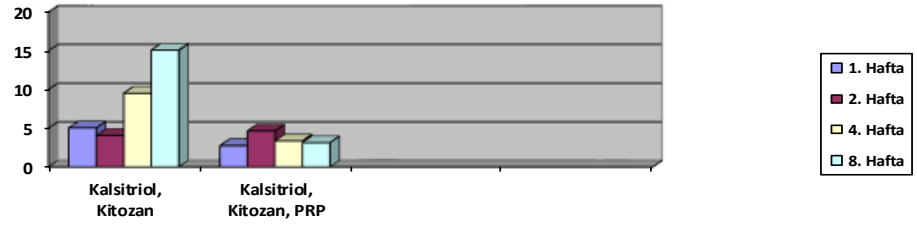


Şekil 4-6: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemik mineral yoğunluklarının karşılaştırılması

Kemikleşme yüzdesi incelendiğinde kalsitriolün eklenmiş olduğu gruplarda yüksek değerlerde olduğu görülmekle beraber PRP'nin eklenmiş olduğu kalsitriol, kitozan, PRP grubunda Kalsitriol, kitozan grubuna göre kemikleşme değerleri ilgili haftalarda daha az ölçülmüştür. Bu yine PRP'nin ortamdan erken eliminasyonu ile ilişkilendirilebildiği gibi mikrotomografi cihazlarında gri skala tespiti ve threshold değerlerinin kemik olarak nitelendirilmesi ancak histolojik olarak bunun karşılığının olmaması ile açıklanabilir (Tablo 4-13). Kitozan grubu 4. hafta kemikleşme değeri ve PRP grubu 4. hafta kemikleşme değerinin yüksek olduğu tespit edilse de bu bireysel farklılık ile açıklanabilmektedir. 4. ve 8. haftalardaki kemikleşme yüzdesi, kemik hacmi ve kemik mineral yoğunluğu değerlendirmeleri istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4-7).

Tablo 4-13: Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdesi değerlerinin karşılaştırılması

Kemikleşme Yüzdeleri (%)	Kalsitriol, Kitozan	Kalsitriol, Kitozan, PRP	p
1. Hafta	5,05 ± 2,33	2,76	p>0,05
2. Hafta	4,07 ± 0,95	4,65	p>0,05
4. Hafta	9,54 ± 1,00	3,36	p<0,05
8. Hafta	15,11	3,14	p<0,05
P	p<0,05	p<0,05	



Şekil 4-7: Kalsitriol, kitozan ve kalsitriol, kitozan, PRP gruplarına ait kemikleşme yüzdelerinin karşılaştırılması

Bunun nedeni olarak PRP'nin belli bir süre sonra rezorpsiyonu olduğu düşünülmektedir. Ancak makroskopik olarak incelendiğinde kemikleşme yüzdesi hariç kemiğin trabeküler kalınlığı kemiğin hacimsel boyutu kalsitriol, kitozan, PRP grubunda daha yüksek olarak görülmüş olup, kemikleşme yüzdesinin yanında oluşmuş olan kemiğin mineral yoğunluğu en yüksek değerde kalsitriol + kitozan + PRP grubunda ölçülmüştür. 4. ve 8. haftalar çerçevesinde kemikleşme yüzdelerinin değişimi istatistiksel olarak anlamlıdır.

4.2. Histolojik ve İmmunhistokimyasal Bulgular

4.2.1. Histolojik Değerlendirme Bulguları

Deney hayvanlarından, elde edilen doku örnekleri dekalsifikasyon işleminden sonra kemik örneklerinden elde edilen histolojik kesitler ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

Kontrol grubunda yapılan incelemelerde defekt alanının 4. hafta ve 8. haftada; 8. haftada daha bariz olmak kaydıyla ağırlıklı olarak düzensiz ve sert bağ dokusu ile kapatıldığı görülmektedir. Kontrol grubu 1. haftada düzensiz epitel dokuları seçilmiştir. Kitozan grubunda yapılan incelemelerde defekt alanının 4. hafta ve 8. haftada; 8. haftada daha bariz olmak kaydıyla ağırlıklı olarak düzensiz ve sert bir bağ dokusu ile kapatıldığı görülmektedir. Kitozan grubu 1. haftada düzensiz epitel dokuları seçilmiştir.

PRP ve kitozan, PRP grubunda yapılan incelemelerde defekt alanının 8. haftalarda ağırlıklı olarak düzenli ve tıkHz bir baē dokusu ile kapatıldıēı görülmektedir.

Kalsitriol + kitozan ve kalsitriol, kitozan, PRP gruplarında ise 4. haftadan itibaren etraftaki kalvaryal kemik dokusuna göre daha ince ancak diēer gruplarda görülemeyen yer yer düzensiz kemik dokusu ile kaplı olduēu görülmektedir.

Kalsitriol + kitozan + PRP ve kalsitriol + kitozan gruplarında 8. hafta gruplarında etraftaki kalvaryal dokulara yakın kalınlıkta ve benzer karakterde kemik dokusu tespit edilmiştir. İnce bir sutür yapısı da belirlenmiştir.

4.2.2. İmmunhistokimyasal Analiz Bulguları

FGF 23, RANK ve VDR antikorları ile gerçekleştirilen immunhistokimyasal incelemede gözlemlenmiş boyama miktarları yarı niceliksel olarak  l  mlendirilmiş ve görevleriyle birlikte tabloya nakledilerek gösterilmiştir (Tablo 4-14).

Tablo 4-14: RANK, FGF23 ve VDR antikorlarının görevleri ( zet)

	Görevi
RANK	Osteoklast farklılaşmasını saēlayarak kemiēin remodellingi ve tamiri için bir işaretleyicisidir.
FGF 23	Osteogenez sürecinde önemli düzenleyici rolü bulunan ve fibroblast hücrelerinin proliferasyonuna imkan tanıyarak hızlı bir baē dokusunun yanında kemik anabolik hücrelerinin uyarılmasına üzerlerinde mitojenik etki oluşturarak �oēalmalarına ve böylece kemik yapımı için kritik rolü üstlenen ve kalsitriole yanıt verilmesinde D vitamini metabolizmasında görev almaktadır.
VDR	Kalsiyumla etkileşime girme, 1,25 (OH) ₂ D D vitamini metabolitinin de osteoblastlar ile aktivasyona girmesini saēlama görevlerini üstlenen, kemik yapımında özellikle osteoblast, kıkırdak kondroblast ve kemik iliēi monosit hücrelerinde kendine yer bulmaktadır.

Osteoklast farklılaşmasını sağlayarak kemiğin yeniden şekillenme ve ve tamiri için bir işaretleyici olan RANK; osteoprotegerin yolunun bir parçası olarak karşımıza çıkar. Yeni kemik yapımı ve osteoblastik aktivite için bir gösterici olan RANK incelendiğinde;

Kontrol grubu 1. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %10-%25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kitozan grubu 1. haftada %75-%90 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada % 10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kitozan, PRP grubu 1. haftada % 50 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

PRP grubu 1. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kalsitriol, kitozan grubu 1. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu,, 4. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kalsitriol + kitozan + PRP grubu 1. haftada %90 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu,, 4. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kemik yıkım metabolizması ile ilgili bir belirteç olan RANK'ın ortamdaki fazlalığı yıkımın fazlalığını göstermekle birlikte metabolizmada bahsedilen yıkım ile birlikte yeni kemik yapımını işaret etmektedir. Kemiğin yeniden şekillenmesi ile de

dolaylı bir bağlantıyı işaret eden RANK özellikle 4. haftalarda boyanma alan ve şiddette fazlalık göstermiştir. Kararlılığını Kalsitriol + kitozan + PRP grubunda 8. haftaya geçişte de koruyan bu antikör; kemik hacmi, kemik yoğunluğu fazlalığını ve kemikleşme yüzdesinin özellikle kalsitriol gruplarındaki fazlalığını desteklemektedir (Tablo 4-15).

Tablo 4-15: RANK antikörünün immunohistokimyasal bulguları

RANK	Kontrol	Kitozan	Kitozan, PRP	PRP	Kalsitriol, Kitozan	Kalsitriol, Kitozan, PRP
1. Hafta	%75 +++	%75-%90 +++	%50 +++	%75 +++	%75 ++	%90 +++
2. Hafta	%50 ++	%75 +++	%75 +++	%75 +++	%75 +++	%75 +++
4. Hafta	%50 ++	%50 +	%50 ++	%50 +++	%75 +++	%75 +++
8. Hafta	%10-%25 +	% 10 +	%50 ++	% 50 ++	%25 +	%75 +++

Osteogenez sürecinde önemli düzenleyici rolü bulunan ve fibroblast hücrelerinin proliferasyonuna imkan tanıyarak hızlı bir bağ dokusunun yanında kemik anabolik hücrelerinin uyarılmasına üzerlerinde mitojenik etki oluşturarak çoğalmalarına ve böylece kemik yapımı için kritik rol üstlenen ve kalsitriole yanıt verilmesinde D vitamini metabolizmasında görev alan FGF23'ün immun boyanması incelendiğinde;

Kontrol grubunda 1. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kitozan grubunda 1. haftada %75-%90 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %90 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kitozan + PRP grubunda 1. haftada %90 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

PRP grubunda 1. haftada %90 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50-%75 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kalsitriol + kitozan grubunda 1. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %25 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kalsitriol + kitozan + PRP grubunda 1. haftada %90 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Özellikle 1. ve 2. haftalardaki boyanma alanı ve boyanma yoğunluğu FGF23 için kararlıdır, bu da ilk iki haftada daha çok görülen tıkız bir bağ dokusu haliyle ilişkilendirilebilir. Sonraki haftalarda boyanma yoğunluğu ve şiddetinin azalması tıkız bağ dokusunun daha sağlam ve daha yoğun bağ dokusuna dönmesi ve özellikle kalsitriolün eklenmiş olduğu gruplarda kemik dokusunun takibinin görülmesi ile desteklenmiştir. Bağ dokusu hücreleri ve bağ dokusu yapımı için gerekli olan fibroblastlar fibroblast büyüme faktörü ile aktive olmaktadır ancak daha sonrasında kemik dokuya formasyon ile ortamda FGF 23 antikorunun etkinliği görülmektedir (Tablo 4-16).

Tablo 4-16: FGF23 antikorunun immunhistokimyasal bulguları

FGF 23	Kontrol	Kitozan	Kitozan,PRP	PRP	Kalsitriol, Kitozan	Kalsitriol, Kitozan, PRP
1. Hafta	%75 +++	%75-%90 ++	%90 ++	%90 +++	%75 +++	%90 ++
2. Hafta	%75 +++	%90 +++	%75 +++	%75 ++	%75 +++	%75 +
4. Hafta	%75 +++	%10 +	%75 +++	%50-%75 ++	%75 +++	%50 +
8. Hafta	%75 +++	%10 +	%25 +	%50 ++	%25 ++	%50 ++

Kalsiyumla etkileşime girme, 1,25 (OH)₂D D vitamini metabolitinin de osteoblastlar ile aktivasyona girmesini sağlama görevlerini üstlenen, kemik yapımında özellikle osteoblast, kıkırdak kondroblast ve kemik iliği monosit hücrelerinde kendine yer bulan VDR, kemiğin hem yapım hücrelerinin uyarılmasını hem de osteoblast hücrelerinin olgun osteositlere dönüşmesini böylelikle kemik yapısının daha matür hale erişmesine yardımcı olmaktadır. Mineral yapının artması için D vitaminini tanıyan bu reseptörün boyanması incelendiğinde;

Kontrol grubunda 1. haftada %0-%10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 2. haftada %0-%10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 4. haftada %0-%10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %75 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu göstermiştir. 8. haftaya doğru 4. haftadan itibaren VDR'nin boyanması ve yoğunluğu artmıştır %10'dan %75'e artış boyama yoğunluğu olarak iki katına çıkmıştır.

Kitozan grubunda 1. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %0-%10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 4. haftada %10 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %0 boyanma alanı - boyanma yoğunluğu göstermiştir. 8. haftaya doğru kitozan grubunda VDR boyanması ve yoğunluğu

azalmıştır. Kemikleşmenin histolojik olarak görülmediği inceleme ile bağdaşmaktadır.

Kitozan + PRP grubunda 1. haftada %25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 2. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %0-%25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

PRP grubunda 1. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %50-%75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 8. haftada %25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kalsitriol + kitozan grubunda 1. haftada %75 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %50 boyanma alanı ++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Kalsitriol + kitozan + PRP grubunda 1. haftada %90 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 2. haftada %75 boyanma alanı +++ boyanma yoğunluğu, 4. haftada %50 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu, 8. haftada %25 boyanma alanı + boyanma yoğunluğu göstermiştir.

Bu durum D vitamini reseptörünün ortamda ilk haftalarda yerini aldığı ancak daha sonraki haftalarda hem yoğunluk hem boyanma alanı bazında azalmasının da ortamdan elimine olduğu sonucunu bizlere göstermiştir. Reseptörün ortamdan gittiği döneme kadar bir takım mediyatörlerin alana gelmesi sonucunda kemik yapımı, kemik hacmi ve kemikleşme yüzdelerinin artışı ile sonuçlanmıştır (Tablo 4-17).

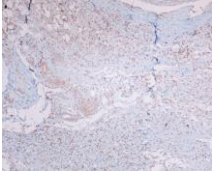
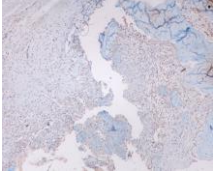
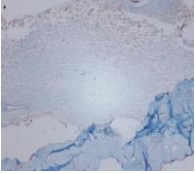
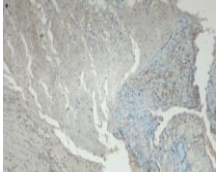
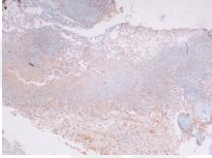
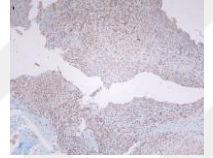
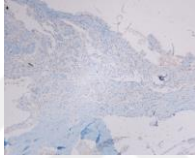
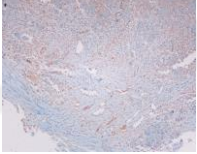
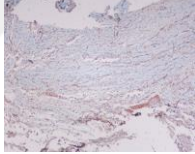
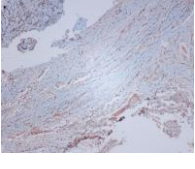
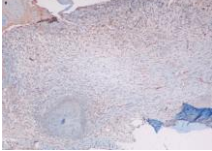
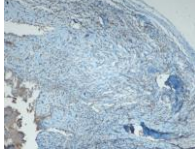
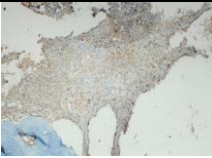
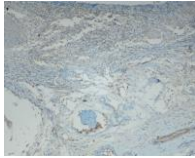
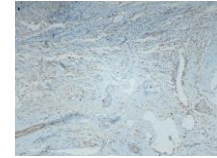
Tablo 4-17: VDR antikorunun immunohistokimyasal bulguları

VDR	Kontrol	Kitozan	Kitozan,PRP	PRP	Kalsitriol, Kitozan	Kalsitriol, Kitozan, PRP
1. Hafta	%0-%10 +	%50 ++	%25 +	%75 +++	%75 ++	%90 +++
2. Hafta	%0-%10 +	%0-%10 +	%50 ++	%50-%75 +++	%50 ++	%75 +++
4. Hafta	%0-%10 +	%10 +	%25 +	%50 ++	%50 +	%50 +
8. Hafta	%75 ++	%0 -	%0-%25 +	%25 +	%25 +	%25 +

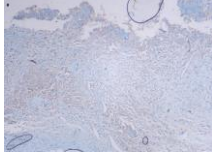
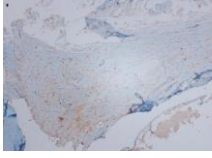
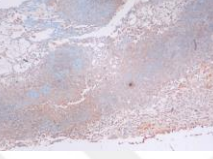
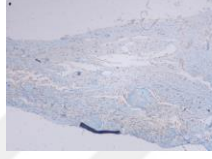
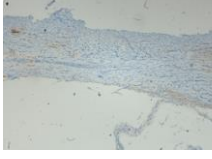
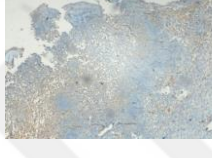
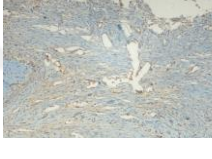
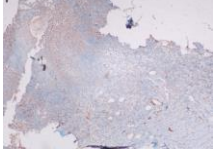
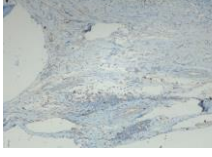
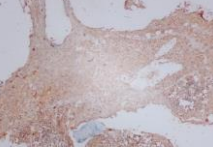
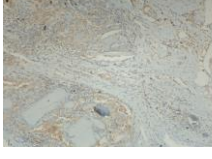
Yaptığımız çalışmada kontrol ve kitozan gruplarını karşılaştırdığımızda kitozan grubunda 4. hafta ve 8. haftadaki kemikleşme miktarı kontrol grubundaki 4. ve 8. haftadaki kemikleşme miktarından daha fazladır. Immunohistokimyasal parametrede antikor boyamalarında FGF 23, VDR ve RANK boyamalarında kitozan grubu; kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ve daha yoğun boyama göstermiştir.

FGF 23 antikorunun histolojik boyamaları (Tablo 4-18), RANK antikorunun histolojik boyamaları (Tablo 4-19), VDR antikorunun histolojik boyamaları tabloya nakledilmiştir (Tablo 4-20).

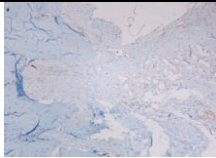
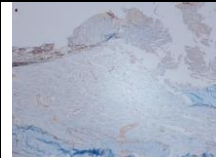
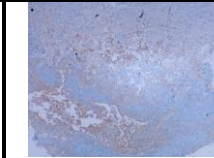
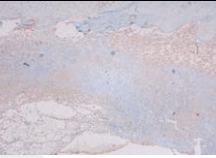
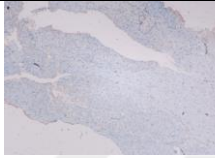
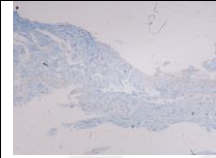
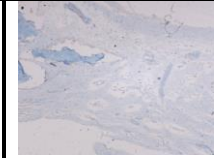
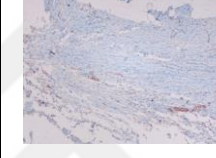
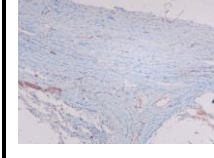
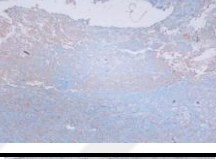
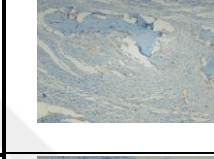
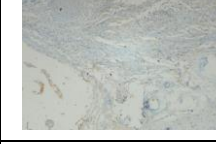
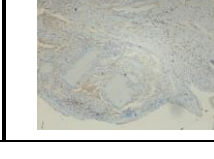
Tablo 4-18: FGF23 antikoruna ait immunhistokimyasal boyamalar

	FGF23 Antikoruna ait İmmunohistokimyasal Boyamalar			
	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta
Kontrol Grubu				
Kitozan Grubu				
Kitozan , PRP Grubu				
PRP Grubu				
Kalsitri ol, Kitozan Grubu				
Kalsitri ol, Kitozan , PRP Grubu				

Tablo 4-19: RANK antikoruna ait immunhistokimyasal boyamalar

	RANK Antikoruna ait İmmunohistokimyasal Boyamalar			
	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta
Kontrol Grubu				
Kitozan Grubu				
Kitozan, PRP Grubu				
PRP Grubu				
Kalsitriol, Kitozan Grubu				
Kalsitriol, Kitozan, PRP Grubu				

Tablo 4-20: VDR antikoruna ait immunhistokimyasal boyamalar

	VDR Antikoruna ait İmmunohistokimyasal Boyamalar			
	1. Hafta	2. Hafta	4. Hafta	8. Hafta
Kontrol Grubu				
Kitozan Grubu				
Kitozan, PRP Grubu				
PRP Grubu				
Kalsitriol, Kitozan Grubu				
Kalsitriol, Kitozan, PRP Grubu				

4.3. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Gruplara ait defekt oluşturulmadan önceki toplam D vitamini değerleri, ortalama değerleri ve deney sürelerini tamamlayan deneklerin sakrifikasyonundan önce toplam D vitamini değerleri, ortalama değerleri karşılaştırıldığında sadece kalsitriol, kitozan ve PRP grubunda sakrifikasyon sonrası değerler önceki değerlerden hem toplam hem de ortalama değer bazında yükselmiş bulunmuştur.

Kontrol grubu hariç her gruba ait 1. haftalarda; kontrol ve kitozan grubu hariç tüm gruplarda da 2. haftalarda D vitamini değerlerinin düşmüş olduğu görülmüştür. 8. haftalarda sadece PRP ve kalsitriol + kitozan+ PRP grubunda D vitamini değerinin yükselmiş olduğu tespit edilmiştir. Kalsitriol + kitozan + PRP grubunda deneklerde D vitamini seviyesinin 4. ve 8. haftalar bazında yükseldiği belirlenmiştir.

Parathormon seviyelerinde ise gerek defekt oluşturulmasından önce gerek sakrifikasyondan önce yapılan ölçümlerde tüm deneklerde deney öncesinde çıkan sonucun aynı olduğu, deney sonrasında ise 2 denek hariç tüm değerlerin deney öncesinde olduğu gibi çıktığı tespit edilmiştir. Bu 2 denek için bireysel farklılık sebepli değişiklik olduğu düşünülürken istatistiksel olarak hiç bir sonucu etkilememiş ve parathormon ile ilgili yapılacak yorumlamayı değiştirmemiştir.

Ağırlık takipleri incelendiğinde grupların başlangıç ve deney sonrasındaki ortalama ve toplam değerlerinde kalsitriol + kitozan + PRP grubu hariç tüm gruplarda deney sonunda ağırlıkların yükselmiş olduğu görülmüştür. Grup içi defekt oluşturulmadan önce ve sakrifikasyondan önceki toplam ağırlıklar / ortalama ağırlıklar karşılaştırıldığında sadece kalsitriol + kitozan + PRP grubunda sakrifikasyon öncesi toplam ağırlığın defekt oluşturulmadan önceki ağırlığa göre düşmüş olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4-21).

Deney hayvanları aynı yaş ve ortalama olarak aynı kilo ağırlığında olmuş olsa bile genetik, fizyolojik, anatomik ve metabolik olarak denek hayvanlarının cerrahi işlemlere verdiği reaksiyonun farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu; bireysel farklılıkla açıklanabildiği gibi deneylerin sürelerinin farklı dönemlerde gerçekleştirilmesinin bunda bir etken olabildiği, farklı dönemlerde doğum yapmış deneklerin ve farklı dönemlerde alınan hayvanların bu belirteçlerde farklı şekilde tepki oluşturabildiği düşünülmekte aynı zamanda genetik olarak hayvanlar birbirlerinin aynısı bile olsa tek batındaki doğum miktarları birbirlerinden farklı olduğu da unutulmamalıdır. Benzer

ölçütlere sahip denek hayvanlarından doğum sırasındaki elde edilen yavru sayılarının farklılığı hayvanların ağırlık değişimlerinin de farklı olabileceği sonucunu doğrulamaktadır. Bu durum her denek hayvanının optimal D vitamini değerlerine sahip olması beklenirken farklı D vitamini değerlerinin tespit edilmesi ile de ilişkilendirilebilir.

Başlangıçtaki ve deney sonundaki toplam D vitamini değerleri / ortalama D vitamini değerleri birbirleriyle kıyaslandığında kalsitriol + kitozan + PRP grubunda deney sonu toplam D vitamini değeri / ortalama D vitamini değeri; başlangıçtaki toplam D vitamini / ortalama D vitamini değerine göre artış göstermekteyken kontrol grubunda, kitozan grubunda, PRP grubunda, kitozan, PRP grubunda ve kalsitriol, kitozan grubunda deney sonu toplam D vitamini değeri / ortalama D vitamini değeri, başlangıç toplam D vitamini değeri / ortalama D vitamini değerine göre azalma göstermiştir (Şekil 4-8).

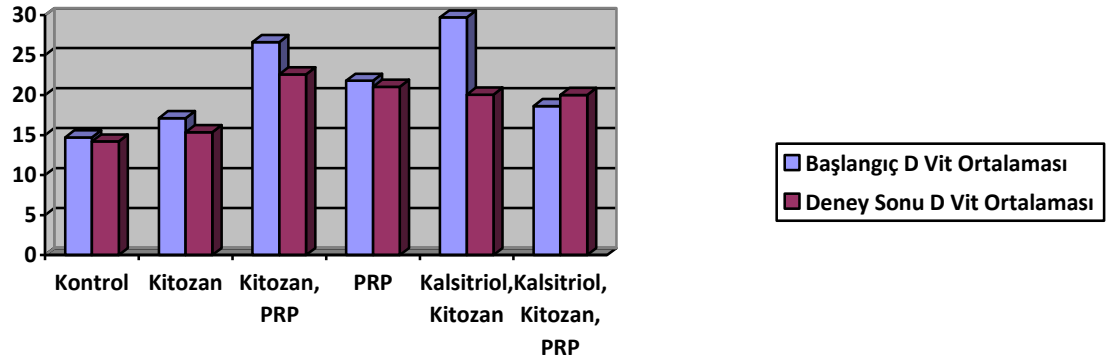
Başlangıçtaki ve deney sonundaki toplam ağırlık değeri /ortalama ağırlık değeri değişimleri incelendiğinde ise kalsitriol + kitozan + PRP grubunda deney sonu toplam ağırlık değeri / ortalama ağırlık değeri başlangıç toplam ağırlık / ortalama ağırlık miktarında göre azalış göstermekteyken kontrol grubunda, kitozan grubunda, PRP grubunda, kitozan, PRP grubunda ve kalsitriol, kitozan grubunda deney sonu toplam/ortalama ağırlık miktarı başlangıç toplam ağırlık /ortalama ağırlık miktarına göre artış göstermiştir (Şekil 4-9).

Deney sonucunda başlangıçtakine göre toplam D vitamini değerinin / ortalama D vitamini değerinin yükselmesi deney sonucunda başlangıçtakine göre toplam ağırlık değerinde / ortalama ağırlık değerinde düşme ile devam etmiştir.

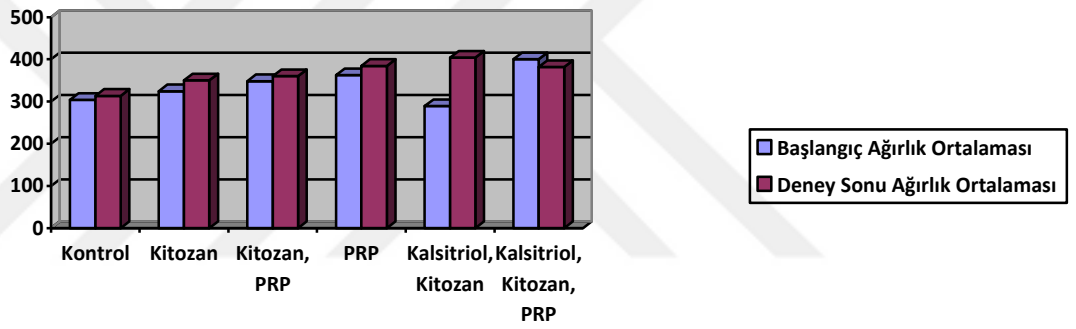
Deney sonucunda başlangıçtakine göre toplam D vitamini değerinin / ortalama D vitamini değerinin düşmesi deney sonucunda başlangıçtakine göre toplam ağırlık değerinde / ortalama ağırlık değerinde artma ile devam etmiştir. Bu incelemeler istatistiksel olarak anlam ifade etmemektedir.

Tablo 4-21: D vitamini ve ağırlık ortalama değerleri

D Vitamini (25(OH) –ng/ml) ve Ağırlık Ortalama Değerleri (g) Tablosu						
	D Vitamini Ortalama Değerleri		P	Ağırlık Ortalama Değerleri		P
	Başlangıç Ortalama	Deney Sonu Ortalama		Başlangıç Ortalama	Deney Sonu Ortalama	
Kontrol Grubu	14,750	14,205	p>0,05	303,75	313,50	p>0,05
Kitozan Grubu	17,122	15,3675	p>0,05	324,25	350,25	p>0,05
PRP Grubu	21,785	21,042	p>0,05	362,45	384,325	p>0,05
PRP, Kitozan Grubu	26,6275	22,59	p>0,05	348,325	360,075	p>0,05
Kalsitriol, Kitozan Grubu	29,70705	20,0475	p>0,05	389,125	404,125	p>0,05
Kalsitriol, Kitozan, PRP Grubu	18,635	20,015	p>0,05	400,175	381,68	p>0,05
P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05



Şekil 4-8: Başlangıç ve deney sonu D vitamini ortalama değerleri



Şekil 4-9: Başlangıç ve deney sonu ortalama ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

Başlangıç ve deney sonu toplam ve ortalama D vitamini değerleri ve başlangıç ve deney sonu toplam ve ortalama ağırlıklar karşılaştırıldığında kalsitriol + kitozan + PRP grubunda D vitamini değerleri artmış iken ağırlık azalışla takip edilmiştir. Kontrol, kitozan, kitozan + PRP, PRP ve kalsitriol + kitozan gruplarında D vitamini değerleri düşmüş iken ağırlık artış ile takip edilmiştir. Elde edilen veriler 1. ve 2. haftalarda ve gruplara özel olarak istatistiki olarak da değerlendirilmiştir (Tablo 4-22). Elde edilen veriler 4. ve 8. haftalarda ve gruplara özel olarak istatistiki olarak da değerlendirilmiştir (Tablo 4-23).

Tablo 4-22: Grupların 1. ve 2. haftalardaki başlangıç ve deney sonu D vitamini, PTH ve ağırlık değerleri

		Başlangıç D Vitamini	Bitiş D Vitamini	P	Başlangıç PTH Değeri	Bitiş PTH Değeri	P	Başlangıç Ağırlık Değeri	Bitiş Ağırlık Değeri	P
1. hafta	Kontrol	7,34±2,16	11,82±1,60	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	270±28,2	260,5±28,9	p>0,05
	Kitozan	19,14±18,48	17,02±7,72	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	312,5±10,6	341,5±72,8	p>0,05
	Kitozan + PRP	24,38±2,73	11,52±3,83	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	349,3±30,9	322,3±22,5	p>0,05
	PRP	23,76 ±0,18	17,97±14,30	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	393,3±75,7	381,3±66,7	p>0,05
	Kalsitri ol+ Kitozan	28,21±13,69	22,11±5,29	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	415±63,6	382,5±82,7	p>0,05
	Kalsitri ol+ Kitozan + PRP	21,63 ±7,33	17,20±9,95	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	359,5±53,5	300,25±13,2	p>0,05
	P	p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05	
2. hafta	Kontrol	7,18±4,38	8,55±3,52	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	285±12,7	293±25,4	p>0,05
	Kitozan	12,61±1,61	14,24±0,39	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	267,5±24,7	267±46,6	p>0,05
	Kitozan + PRP	25,62±6,15	23,88±6,78	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	341,5±47,3	353,5±47,3	p>0,05
	PRP	27,94±14,46	24,49±16,52	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	323±1,4	332±14,1	p>0,05
	Kalsitri ol+ Kitozan	29,27 ±7,37	16,39±1,52	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	375±63,6	380±56,5	p>0,05
	Kalsitri ol+ Kitozan +PRP	18,40±4,72	17,03±8,63	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	373,7±69,6	355±63,7	p>0,05
	P	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05	

Tablo 4-23: Grupların 4. ve 8. haftalardaki başlangıç ve deney sonu D vitamini, PTH ve ağırlık değerleri

		Başlangıç D Vitamini	Bitiş D Vitamini	P	Başlangıç PTH Değeri	Bitiş PTH Değeri		Başlangıç Ağırlık Değeri	Bitiş Ağırlık Değeri	P
4. Hafta	Kontrol	18,42 ±4,40	18,22±6,58	p>0,05	2,77	1,20	p>0,05	293,5±30,4	321,5±12	p>0,05
	Kitozan	17,28 ±5,94	17,98±3,81	p>0,05	4,61	1,20	p>0,05	315±14,1	348,5±16,2	p>0,05
	Kitozan PRP	23,65±12,49	21,59±,819	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	352±46,2	383±24,5	p>0,05
	PRP	13,94 ± 0,58	17,43±1,79	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	384±8,4	416,5±26,1	p>0,05
	Kalsitriol, Kitozan	31,51±11,48	22,66±8,83	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	416,5±23,3	417,5±24,7	p>0,05
	Kalsitriol Kitozan PRP	14,46±1,18	15,30±2,87	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	414±15,5	402,5±31,8	p>0,05
	P	p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05		P<0,05	p>0,05	
8. Hafta	Kontrol	26,06 ± 0,49	18,21±2,81	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	366,5±174,6	379±182,4	p>0,05
	Kitozan	19,46 ±5,13	12,23±0,44	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	402±39,5	444±28,2	p>0,05
	Kitozan PRP	32,86±2,32	33,37±0,82	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	350,5±95,4	381,5±86,9	p>0,05
	PRP	21,50±8,77	24,31±3,72	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	349,5±21,9	407,5±38,8	p>0,05
	Kalsitriol, Kitozan	29,82±16,97	19,03±4,87	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	350±94,7	436,5±94	p>0,05
	Kalsitriol Kitozan PRP	20,05±6,09	30,53±12,69	p>0,05	1,20	1,20	p>0,05	454±50,9	469±36,7	p>0,05
	P	p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05		p>0,05	p>0,05	

4.4. İstatistiksel Bulgular

52 adet 10-12 haftalık 250-350 g ağırlığında erkek Sprague Dawley sıçanlarda oluşturulan kalvaryal kritik defekt alanında D vitamini metaboliti kalsitriol, PRP ve biyouyumlu taşıyıcı olan kitozanın defekt üzerindeki etkisi mikrotomografik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir. G power adlı istatistik programında 6 grubun kıyaslaması için kullanılacak tek yönlü ANOVA yöntemi için, “Tip-1 hata olasılığını” (anlamlılık düzeyi) 0.05, testin gücünün en az % 95 (Tip-2 hatanın en fazla %20) olması kabulüne göre denek sayısı 48 olması gerektiği hesaplanmıştır.

Kemikleşme yüzdelerinin, kemik hacimlerinin ve kemik mineral yoğunluklarının 4. ve 8. hafta karşılaştırılmaları ve grup içi karşılaştırılmaları istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu analizlerden elde edilen incelemelerde özellikle 4. ve 8. haftalara ait değerlendirmeler istatistiksel olarak anlamlı olmak ile birlikte istatistiksel anlamlı olarak değerlendirilemeyen 1. ve 2. haftalara ait olan ve istatistiksel anlamlı olarak değerlendirilen 4. ve 8. haftalara ait kemikleşme yüzdeleri, kemik hacim ölçümleri, kemik mineral yoğunluğu değişimleri değerleri elimizdeki histolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal analizlerin bulguları sonucundaki verilerin sonuçlarıyla histolojik immunhistokimyasal ve biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Yorumlamalarda anlamlılık sınırı $p=0,05$ alınmıştır.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, kalsitriol materyalinin uygun oranlarda PRP ve kitozan ile karışımının maksillofasiyal bölgedeki kemik defektlerinin onarımında kemik yapımını desteklemesi ve iyileşme süresine etkilerinin tespiti amaçlanmıştır. Kullanılan materyallerin kemik defektinin tamirinde ve erken dönemde kemik oluşumunu sağlamaları ve böylece defektin erken dönemde onarımı hedeflenmektedir.

Sıçanların kalvaryasında oluşturulan defektlerde PRP ve biyomateriyallerin bilinen olumlu etkilerini, kemik gelişimini hızlandırıcı etkisi olan D vitamini ekleyerek histopatolojik ve biyokimyasal olarak karşılaştırmalı bir şekilde araştırmayı planladığımız bu çalışmada; düşüncemiz kemik defektinin iyileşmesinin görülebileceği bir deney yaparak, klinik uygulamayı rutin haline getirip iyileşme hızlandırılmasına katkıda bulunmak, erken fonksiyon ve estetiği sağlamaktır.

Organizma dahilinde meydana gelen kemik bütünlüğünü değiştiren herhangi bir işlem sonrasında, metabolizma reaksiyonları sonucunda kemik bütünlüğünün devamının sağlanması, mevcut defekt alanının onarımının sağlanması yönünde devam etmektedir. Kemik yapımında ve defekt alanının onarımında kritik steroid hormonlardan biri olan D vitaminin kemik defekt alanına eklenmesi sonucunda vücuttaki D vitamini rezervinin kemik yapımı için harcanması, organizmanın normal reaksiyonel sürecinde D vitaminin metabolize edilmesinin sürece kısalması hedeflenmiştir.

Çalışmamız D vitaminin lokal uygulanmasının PRP ve kitozan ile desteklenmesinin kemik yapımı üzerindeki etkisini incelemek amacıyla oluşturulmuş ve çalışmamızda sıçanların kalvaryasında oluşturulan 5 mm çaplı kritik kemik defekt bölgesindeki kemik yapımı değerlendirilmiştir. Kritik kemik defekti; dışarıdan herhangi bir müdahale gerçekleşmeden kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan ortotopik bir defekt olarak nitelendirilmektedir. Kritik kemik defektinde kritik boyut olarak tanımlanan en küçük alandır (378, 392). Kritik kemik defektinde normal metabolik faaliyetler sonucunda tam ve istenilen sert doku ile doldurulamayan kemik alanı mevcuttur.

Çalışmamızda D vitamininin ve çeşitli biyomateriyaller ile farmasötik karışımlarının kemik defektlerindeki iyileşmeye etkileri Sprague Dawley sıçanlar

üzerinde incelenmiştir. Deneysel çalışmalar; standardizasyonların sağlanabilmesi, deneylerin gerektiği düzeyde tekrarlanabilmesi, zamandan ve yerden bağımsız olması, takip periyotlarının kolay yapılabilmesi ve gerekli analizlerin patolojik ve histolojik olarak incelenebilmesi avantajlarını barındırmaktadır. Deneylerde uygulanan yöntemlerin dokular üzerindeki etkisini incelemek amacıyla biyopsi yapılması gerekliliği, dokuların elde edilmesi öncesinde sakrifikasyon yapılması şartı, deneydeki süreç boyunca kan, tükürük gibi örneklerin toplanılabilmesi, doku mühendisliğinde kemirgen modellerinin çalışmalarda insan organizmasına genetik benzerliği sebebiyle daha fayda getirdiğinin ortaya konmuş olması, beklenen sonuçların metabolik hızdan dolayı daha çabuk gözlemlenebilmesi, deney için yeni yöntemlerin oluşmasına katkı sağlamaları eksperimental çalışma yapılmasının kararını oluşturmaktadır. Deneyler sonrasında elde edilen bilgiler, daha sonrasında insanlar üzerindeki uygulamalara rehber oluşturmakta morbiditenin azalmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada sıçan kalvaryasında 5 mm çapında kemik defekti oluşturulmuş kitozan taşıyıcı ile D vitamininin aktif metaboliti olan kalsitriolün PRP ile karıştırılması ile elde edilen materyalin uygulamasının kemik oluşumu ve defekt iyileşmesi üzerindeki etkisi incelenmiş ve kemik yapımındaki etkinliği değerlendirilmiştir.

Kritik kemik defekti dışarıdan herhangi bir müdahalede bulunulmadan spontan bir şekilde iyileşmeyen bir kemik defekt olarak tanımlanabilmektedir. Kritik kemik defekti boyutu kendi kendine iyileşme özelliği göstermeyen en küçük boyut olarak nitelendirilebilir. Trefan frezlerle oluşturulmuş 5 mm çapındaki kalvaryal defekt 6 – 12 aylık süreçte kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan bir defektir. Kalvaryal pariyetal kemik ise üzerine herhangi bir kuvvet gelmediği, oluşturulan defekt alanı sabit bir şekilde kaldığı sıçan modelinde oluşturulduğu için anatomik olarak sıçan ekstremitelerinin erişebileceği alan dışında olması ve pozisyon itibarı ile herhangi bir yere temas etmesinin mümkün olmaması, defekt alanına konulan materyallerin etkisinin direkt olarak görülebildiği bir deney modeli oluşu ve bu materyallerin kemik dokusu ile direkt temasına olanak sunması deneysel kalvaryal modeli seçilmesi kararını oluşturmuştur.

Kendi kendine iyileşme potansiyeli olmayan kritik boyuttaki bir kemik defektine biyouyumlu bir taşıyıcı ile yerleştirilecek materyalin deney modeli olarak insan üzerinde uygulanması söz konusu olmadığından hayvan modeli kullanılması

zorunluluğu vardır. Sıçanla yapılan çalışmalarda insan ile yapılan çalışmalara göre daha kısa sürede sonuç alınmaktadır. Ayrıca insanla yapılan çalışmaların patolojik araştırmasının yapılabilmesi için, hastadan biyopsi alınması gerekebilir ve bu da hastanın tekrar opere edilmesini gerektirir.

Kritik kemik defekt alanı hayvanın türü, boyutu, cinsiyeti, yaşı, ağırlığı ve nerede olduğuyla değişebilmektedir. Bazı çalışmalarda sıçan kalvaryal defektlerinde 8 mm'lik defekt alanı kritik kemik defekti olarak kabul edilmiştir. Bununla beraber daha küçük çapta aynı alanda iki defekt oluşumu da kritik olarak nitelendirilmekle birlikte Bosch ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada 5 mm'lik kemik defektinin de yeterli olduğunu belirtmiştir (217). Bu kritik defektte cerrahi müdahale olmaksızın 12 aylık süreçte sağlam kemik sınırlarının olduğu çevrede minör formasyon haricinde kendi kendine iyileşemeyeceğini bildirmiştir (34, 144). 5 mm'lik kemik defektinin en büyük avantajı orta sagittal sutura dokunulmadığı için morbidite riskinin azaltılmasıdır. Bu defekt kendi kendine iyileşmeyen bir defektir (413). Çalışmamızda 5 mm'lik defektin seçilmesinin sebebi, bu defekt alanının literatürde yeterli bulunması ve komplikasyonlara bağlı hayvan kayıplarının önlenilmesidir (413). Çalışmamızda da bu defekt alanının kendi kendine iyileşemediği kanıtlanmıştır.

Çalışmamızda lokal olarak bölgeye uygulanan kalsitriolün; PRP ve kitozan ile birlikte yeni kemik oluşumuna makroskopik olarak ve hücresel düzeyde aynı zamanda radyolojik olarak olumlu katkıda bulunduğu belirlenmiştir.

Deney işlemleri sırasında sıçan kaybı yaşanmamakla birlikte kalsitriol, kitozan veya PRP'nin aynı zamanda bunların karışımının sıçanlar üzerinde herhangi bir yan etki, toksisite, alerjik reaksiyon veya anomaliye yol açmadığı da görülmüştür. İn vivo uygulamalarda da bu materyallerin uygulanmasının güvenilir olduğu da belirlenmiştir. Postoperatif süreçte cerrahi işlemin ağırlığı, uygulanan anestezi materyalin dozu analjezik ve antibiyotik yüklemesi sonucunda metabolik faaliyetlerde baskılanma ile denek kayıpları yaşanmış olup kayıp olarak karşılaşılan her denek için deney tekrarlanmıştır.

Farklı materyallerin bir yüzeye uygulanması taşıyıcı özellikteki bir takım ürünler vasıtasıyla olmaktadır. Biz çalışmamızda biyouyumlu özelliği bulunan metabolik olarak herhangi bir artık veya toksik ürün oluşturmada yıkılabilen, dokunun üzerine yapışabilme niteliği mevcut, uygulayacağımız alan için istenilen viskozite kıvamına

getirilebilen, aynı zamanda da birlikte uygulandığı materyallerin geçirgenliğine imkan tanınması sebebiyle kitozanı seçmiş bulunmaktayız. (85, 170, 223).

Kitozan kabuklu canlıların dış isleketinde ve mantarların hücre duvarında bulunan kitinin farklı seviyelerde deasetilizasyona uğraması ve polimerizasyonunu kaybetmesi ile elde edilen bir üründür, Kitozan / 'kartösæn /, rasgele dağılmış β - (1 → 4) bağlı D-glukozamin (deasetilasyonlu birim) ve N-asetil-D-glukozaminden (asetile edilmiş birim) oluşan doğrusal bir polisakkarittir. Karides ve diğer kabukluların kitin kabuklarına sodyum hidroksit gibi bir alkalın madde ile işlenerek yapılır. Geniş bir alanda ticari ve biyomedikal kullanımı olan kitozan tarım sanayisinde, endüstride ve tıpta kendine yer bulmakla beraber son zamanlarda mukozal yolla ilaç verilmesinde taşıyıcı olarak kullanılmaya başlanmış ve kullanılmaya devam edilen bir doğal üründür (363).

Çalışmamızda da bu bilgiler ışığında doğal olması, alana kolayca taşınabilmesi, yapısı içindeki boşluklara yeni doku girişine imkan tanınması, 3 boyutlu kemik yapımı için bir iskele oluşturabilme özelliği, biyouyumluluğu ve kolayca rezorbe olması, adezyona ve proliferasyona imkan tanınması ve antibakteriyel özellikleri sebebiyle taşıyıcı materyal olarak kitozan tercih edilmiştir.

Chen ve arkadaşları kitozanların erkek Wistar sıçanların kalvaryasındaki 5 mm'lik kemik defektlerindeki iyileşmeye etkisi üzerine yapmış oldukları çalışmada, 3. ve 4. haftadaki sakrifikasyonları takiben radyolojik ve histolojik incelemelerde kontrol grubunda sadece 4. hafta sakrifikasyonu gerçekleştirilen deneklerin defektlerinde çok az seviyede bir yeni kemik yapımı görüldüğünü, kitozanın defekt alanına konulduğu gruplarda hem 3. hafta hem de 4. haftaya ait sonuçlarda elde edilen kemik defektindeki kemik alanının duramaterden başlayacak şekilde etrafıca iyileştiğini ve osteokondüktif etkisini tespit etmişlerdir (65).

Biz de kitozanı taşıyıcı olarak kullandığımız çalışmamızda sadece kitozan uyguladığımız 5 mm'lik kalvaryaya defektlerinde radyolojik ve histopatolojik incelemeleri 1-2-4 ve 8 haftalarda yaptık. 4.ve 8. hafta sonuçlarında kitozan grubunda kontrol grubuna göre kemikleşme miktarını hem histolojik hem de radyolojik kontrollerde kemik yapımının daha fazla miktarda ve kemik yoğunluğu ile ilişkilendirilebilecek bulguların daha fazla olduğunu tespit ettik ancak bu değerler diğer gruplara göre (kitozan + PRP, PRP, kalsitriol + kitozan, kalsitriol + kitozan + PRP

grupları) daha azdır. 1. ve 2. haftalardaki kemikleşme yüzdeleri, kemik hacimleri ve kemik mineral yoğunlukları değişimi istatistiksel olarak anlamsız iken histolojik ve immunohistokimyasal olarak tespit edilen hücreler bazında bir değerlendirme sonucuna erişilmiştir. 4. ve 8. haftalar bazında gruplar arası ve grup içi kemikleşme yüzdeleri, kemik hacim ve kemik mineral yoğunlukları değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber eldeki veriler histolojik ve immunohistokimyasal olarak elde edilen bulgular ile korelasyon içindedir.

Yaptığımız çalışmada kontrol ve kitozan gruplarını karşılaştırdığımızda kitozan grubunda 4. hafta ve 8. haftalardaki kemikleşme miktarı kontrol grubundaki 4. ve 8. haftadaki kemikleşme miktarındaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. İmmunohistokimyasal parametrede antikor boyamalarında, FGF 23, VDR ve RANK boyamalarında kitozan grubu; kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ve daha yoğun boyama göstermiştir. Ancak boyamalar diğer gruplarda ilk haftalarda aynı ve daha fazla olmakla beraber 8. haftaya kadar olan dönemlerde antikor boyamaları kitozan + PRP, PRP, kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP grubunda daha yüksektir.

Chen ve arkadaşları kalsiyum fosfat / hibrit kitozan membranların Sprague Dawley sıçanların kalvaryasındaki 4'er mm'lik 2 defekt üzerindeki yönlendirilmiş kemik rejenerasyonundaki aktivitesinin değerlendirildiği çalışmalarında 3. haftadaki sakrifikasyonları takiben radyolojik ve histolojik incelemelerde BCP (bifazik kalsiyum fosfat) ve TCP (β trikalsiyum fosfat) kitozanı membranlarının CDHA (kalsiyum barındırmayan hidroksiapatit) kitozana göre daha fazla kemik rejenerasyonu oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Kitozan ve boş grup karşılaşmasında da bu etkinin kitozan lehine daha fazla rejenerasyon olduğunu göstermişlerdir. 7. günde osteoblastların yapışmasının ve farklılaşmasının TCP ve BCP kitozan gruplarında fazla olduğu ortaya koymuşlardır. Burada kullanılan kitozanın moleküler ağırlığı 509 kDa ve deasetilasyon oranı viskometri ile ölçülerek %85 olarak ayarlanmıştır (66).

Biz de kitozanı taşıyıcı olarak kullandığımız ve eklediğimiz materyaller ve yeni oluşacak kemik dokusunun girişine müsaade edici porozite özelliğinden de faydalandığımız çalışmamızda 5 mm'lik defekt alanına eklediğimiz materyallerin kemik üzerine etkisini radyolojik ve histolojik olarak 1. 2. 4. ve 8. haftalarda takip etmiş bulunmaktayız. Çalışmamızda kitozan grubunun 2. 4. ve 8. haftalarında kemik hacim değerlerinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu tespit ettik. İstatistiksel olarak

anlamalı olmayan ancak 1. hafta kemik hacim değerinin kontrol grubunda kitozan grubundan fazla olarak ölçülen radyolojik değerlendirmeyi histolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirdiğimizde ölçülen hacmin büyük ölçüde granülasyon dokusu ve fibröz doku olarak tespit etmiş bulunmakla birlikte radyolojik değerlerin 2. 4. ve 8. haftadakine benzer ancak 1. haftadakinden farklı olarak kitozan grubunda kontrol grubuna göre daha fazla fibroz doku hacmi ve granülasyon doku hacmi fazlalığı tespit etmiş durumdayız.

1. ve 2. haftalardaki kemikleşme yüzdeleri, kemik hacimleri ve kemik mineral yoğunlukları değişimi kontrol ve kitozan grupları arasında ve grup içi çerçevesinde istatistiksel olarak anlamsız iken histolojik ve immunohistokimyasal olarak tespit edilen hücreler bazında bir değerlendirme sonucuna erişilmiştir. 4. ve 8. haftalar bazında gruplar arası ve grup içi kemikleşme yüzdeleri, kemik hacim ve kemik mineral yoğunlukları değişimleri istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber elde edilen veriler histolojik ve immunohistokimyasal olarak elde edilen bulgular ile uyumludur.

Munhoz ve arkadaşları hidroksiapatit ile mineralize edilmiş kollajen/kitozan süngerlerin, polimer yapıların 5 mm çap – 1 mm yükseklikteki Wistar sıçanların kalvaryasındaki defektin iyileşme sürecindeki etkisini 3., ve 8. haftada radyolojik ve histolojik olarak değerlendirmiş ve 3 haftalık sakrifikasyon sürecinde greft eklenen gruplarda kitozan ile kapatılanlara göre daha fazla kemik hacmi elde ettiklerini ancak 8. haftada ise kollajen-kitozan gruplarında diğer gruplara göre yeni kemik oluşumunun az olması ile birlikte yeni kemiğin defekt alanındaki hacminin daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Kollajen kitozan süngerlerde diğer gruplardan farklı olarak defekt alanının mineralizasyonunu tespit etmişlerdir (287).

Biz de çalışmamızda etken madde olarak seçmiş olduğumuz kalsitriolün içinde yer aldığı kalsitriol + kitozan grubunda; kalsitriolün yer almadığı kitozan grubuna göre kemikleşme yüzdesini ve hacmini daha yüksek tespit ettik. Yine histolojik incelemede kitozan grubunda sert bir bağ dokusu – belirli belirsiz kemik yapım hücreleri görülmesine rağmen özellikle kalsitriolün olduğu gruplarda kemik doku hücrelerini ve de kemik köprüsünü tespit ettik. 1. ve 2. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı olarak nitelendiremeyen bulgular histolojik immunohistokimyasal ve makroskopik veriler ile değerlendirilmiştir. 4. 8. haftalardaki kemikleşme yüzdesi, kemik hacmi ve kemik mineral yoğunluğu değişimleri istatistiksel olarak anlamlıdır ve de makroskopik,

histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda elde edilen veriler ile uyumludur.

Song ve arkadaşları kitozan/fibroin-hidroksiapatit ve kollajen membranların sıçan kalvaryasındaki 8 mm’lik defekt üzerine yönlendirilmiş doku rejenerasyonundaki etkisini 2, 4 ve 8 haftalık sakrifikasyon süreçlerinde radyolojik ve histolojik olarak değerlendirmiştir. Sakrifikasyonların ikinci haftalarında kemik kalvaryal sınırlardan itibaren yeni kemik oluşumu görüldüğü ancak negatif kontrol grubunda bunun kanıtlanamadığı 8 haftalık sakrifikasyon döneminde ise ilerlemiş bir kalsifikasyonla birlikte defekt alanının neredeyse tamamen kemikleştiği tespit edilmiştir. Kitozan içeriği olan hidroksiapatit membran materyalinin kullanıldığı gruplarda diğer gruplara göre doku hacmi, kemik hacmi ve kemik mineral yoğunlukları değerleri yüksek bulmuşlardır (375).

Biz de kontrol grubuna göre kitozan grubunda 1, 4, ve 8. haftalarda kemikleşme miktarının yüzdesel olarak fazla olduğunu tespit etmiş bulunmaktayız. Kemik hacim değerleri de ilk hafta grubu haricinde 2. 4. ve 8. haftalarda kitozan grubunda kontrol grubuna göre daha fazladır. İlk hafta grubunda kontrol grubunda daha fazla hacim bulunmasının sebebini bireysel farklılık olarak düşünmekteyiz. Ancak aradaki fark çok yakındır. 4. ve 8. haftalardaki grup içi ve gruplar arası radyolojik değerler istatistiksel olarak anlamlıdır.

Kitozan, kitozan + PRP ve PRP grupları da kendi aralarında kitozan değişkeni ile karşılaştırıldığında 1. 2. ve 4. haftalarda kemikleşme değerleri PRP’nin bulunduğu grupta daha yüksek değerlerdedir. PRP + kitozan, PRP grubu karşılaştırıldığında ise 1. 2. ve 4. haftalarda PRP grubunda; 8. haftada ise PRP + kitozan grubunda kemikleşme değeri yüksek bulunmuştur. İmmunohistokimyasal incelemede kitozan + PRP grubunda ve PRP grubunda kemikleşmenin ilk basamağı olarak başlayan fibroblast hücreleriyle bağ dokusu oluşumu FGF23 antikoruyla eşit alanda eşit şiddette boyama ile başlamıştır. İlerleyen 2., 4. ve 8. haftalarda kitozan + PRP grubunda daha fazla şiddetle daha fazla alanda boyama görülmüş, her iki grupta da 8. haftaya doğru alan ve şiddette bir azalma görülmüştür, aynı gruplarda ilerleyen haftalarda kemik yıkımı ile dolaylı kemik yapımının antikoru olarak tespit edilmiş RANK antikorusunun boyamasının ve yoğunluğunun fazla olması FGF23’ün bağ dokusal işlevinin kemik yapım-yıkım

metabolizmasına dönmesi, ortamda kemikleşme faaliyetlerinin başlaması ile açıklanabilmektedir.

Bu çalışmada ayrıca mevcut defekt alanının kemikleşmesinin kemik hacmi, kemik hacmi / doku hacmi yüzdesi ve kemik mineral yoğunlukları ile değerlendirilmiş olması da kitozan ile ilgili verilerin çalışmamızla paralellik göstermesi yapmış olduğumuz çalışmayı desteklemektedir.

Florczyk ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada 3 boyutlu poröz kitozan-aljinat iskelet yapısının Sprague Dawley sıçanların 5 mm'lik kalvaryal defektlerinde kemik tamiri üzerine etkilerini 4 ve 16 haftalık sakrifikasyon döneminde mikrotomografik ve histolojik olarak incelemişler ve 4 haftadan 16 haftaya kadar olan süreçte kontrol grubu haricinde tüm gruplarda osteoid ve osteoide bağlı olarak kemik trabekül yapının oluştuğunu, 16 haftada ise osteokalsin ve osteopontin miktarının daha fazla salgılanması - üretimi tespit edilmiştir. Kontrol grubunda sadece fibroz bağ dokusu tespit edilebilmiştir. Yine 16 haftalık sakrifikasyon grubunda intramembranöz kemikleşmeye de rastlanılmıştır (120).

Biz de çalışmamızda her grupta ilerleyen haftalarda kemik defekt alanının kalsitriol etken maddesinin eklenmiş olduğu gruplarda, defektlerin daha fazla miktarda küçüldüğünü tespit ettik ve bu durumun erken dönemde yani 1.ve 2. haftalarda düzensiz bağ dokusu ve granülasyon dokusu artışına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Fakat PRP, kalsitriol + kitozan, kalsitriol + kitozan + PRP gruplarında ilerleyen haftalarda, yani 4. ve 8. haftalarda kemik hacmi ölçüm değerinin fazla olduğu; kitozanın; kontrol grubundan 2. 4. ve 8. haftalarda daha fazla hacme sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum 4. ve 8. haftalardaki grup içi ve gruplar arası radyolojik değerler istatistiksel olarak anlamlıdır.

Zhou ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada poröz hidroksiapatit/kitozan ve whitlockite/kitozan karışımlarının Sprague Dawley sıçan kalvaryal 5 mm'lik defektlerdeki kemik tamiri üzerine etkisini 8 haftalık sakrifikasyon süreci döneminde mikrotomografik ve histolojik olarak incelemişler ve WH/Kitozan (wh: whitlockite – özel kalsiyum fosfat seramik) kompozit membranın diğer gruplara göre daha biyoyumlu olduğunu, proliferasyonu arttırdığını, insan mezenkimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını uyarak kemik rejenerasyonunu fazlalaştırdığını tespit etmişlerdir (436).

Kitozanı taşıyıcı olarak kullanmış olduğumuz çalışmamızda kitozan ve kontrol gruplarında 1. haftadan 8. haftaya kadar olan süreçte kitozan grubunda defekt alanının granülasyon dokusu ve fibröz bağ dokusu ile dolduğunu histolojik, immunohistokimyasal analiz ve mikrotomografik incelemeler tespit ettik.

Mariano ve arkadaşları diabetik sıçanlarda PRP'nin cerrahi olarak kalvaryada hazırlanmış 5 mm çapındaki kritik kemik defekti üzerindeki kemik iyileşmesine etkisini 30 günlük sakrifikasyon sürecinde histolojik ve histomorfometrik olarak incelemiş ve kontrol grubunda limitli bir kemik iyileşmesi görmüş iken sadece az sayıda osteoblast hücreleri tespit etmiştir. Az hacimde bağ dokusu görüldüğünü belirtip PRP grubunda yeni kemik oluşum alanlarının kontrol grubuna göre çok daha fazla olduğunu, çok sayıda osteoblast hücresi bulunduğunu, oluşan kemik alanının defektin bir tarafından diğerine ulaşan köprü halinde iyileştiğini belirlemiştir. Örgü kemik ve howship lakünalarının da tespit edildiği bu çalışmada PRP hazırlanması; venöz sistemden alınan kan ile gerçekleştirilip cerrahi alana tatbik edilmiştir (261).

Çalışmamızda PRP' yi dahil ettiğimiz grupta kemik hacmi, kemikleşme yüzdesi artışının kontrol ve kitozan gruplarına göre daha fazla olduğunu 1. 2. ve 4. Haftalarda, kemik mineral yoğunluğu fazlalığını ise 8. haftada tespit ettik. Ayrıca PRP ve kalsitriolü birlikte kullandığımız gruplarda ise kemikleşme yüzdesi değerlerini kitozan grubuna göre 1. ve 2. Haftalarda, kontrol grubuna göre 1. 2. 4. ve 8. Haftalarda, PRP grubuna göre 8. haftada fazla olarak tespit etmiş durumdayız. Kalsitriol + kitozan grubunda PRP + kalsitriol + kitozan grubuna göre kemikleşme yüzdesi ve kemik hacim değerleri 4. ve 8. haftalarda daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Dunnet istatistik analiz sonucuna göre gruplar arası değerlendirmede kitozan + kontrol ve PRP gruplarında 4. ve 8. haftalarda kemik mineral yoğunluğu kemik hacmi ve kemikleşme değerlerinin karşılaştırılmaları anlamlı olarak nitelendirilmiştir. Makroskopik incelemede de tüm PRP gruplarına ait defekt alanlarının kontrol ve kitozan gruplarına göre daha azaldığı ve 4. haftadan sonra defekt alanının daha fazla kapandığı görülmüştür. PRP eklenen gruplarda FGF23, VDR ve RANK antikörlerinin boyanma ve şiddetinin kontrol ve kitozan gruplarına göre daha arttığı ve kalsitriolün ilave edildiği gruplarda ise bu artışın daha da fazla olduğu tespit edilmiştir.

Nagata ve arkadaşları belirli oranlarda otojen kemik greftleri ve PRP karışımının Sprague Dawley sıçanlarda 5 mm'lik kritik kemik defektleri üzerindeki etkilerini

histolojik olarak 30 günlük sakrifikasyon sürecinin ardından değerlendirmişler ve otojen kemik kullanılan gruplarda histolojik olarak greft materyallerinin kalıntılarını tespit ettiklerini ancak belirli oranda PRP eklenmiş olan otojen greft kullanılmış grupta ise defekt alanının neredeyse tamamen yeni kemik alanı ile dolduğunu, yoğun fibroblast yapısının yanında kemik yapımı hücreleri olan osteoblast tespit ettiklerini belirtmişlerdir. PRP'nin yapıya kazandırdığı kemotaksis (çeşitli mediatörlerle planlı hücre göçü), hücre proliferasyonu ve büyüme faktörlerinin uyarılma özelliklerinin olduğunu belirtmişlerdir (291).

Bizler PRP eklemiş olduğumuz gruplarda diğer gruplara göre 4. ve 8. haftalarda kemikleşme yüzdeleri, kemik hacim ve mineral yoğunlukları çerçevesinde istatistiksel olarak anlamlı farklar elde etmiş bulunmakla birlikte kalsitriol eklediğimiz gruplardan kalsitriol + kitozan + PRP gruplarında 4. ve 8. haftalardaki kemik hacmi, kemik mineral yoğunluğu sonuçlarının PRP + kitozan grubuna göre daha fazla olduğunu tespit ettik. 1. ve 2. haftalarda ve diğer değerlerde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber histolojik, makroskopik ve immunohistokimyasal olarak kemik yapımı açısından Nagata ve arkadaşlarının otojen kemik grefti kullanılan gruba göre benzer sonuçları elde ettik.

4. ve 8. hafta dönemlerinde PRP + kitozan grubunda kitozan grubuna göre daha az kemik hacmi ve 4. haftada daha az kemikleşme yüzdesi ile ve 1. 4. ve 8. hafta dönemlerinde kalsitriol + kitozan + PRP grubunda kalsitriol + kitozan grubuna göre daha az kemik hacmi ile karşılaştırılmasının nedeni olarak ortamdan PRP materyalinin erken eliminasyonu – erken salınımı ile hedeflenen büyüme faktörleri, kemotaksis işlemleri için yeterli aktivasyon barındıramamasını düşünmekteyiz.

Hacimsel değişikliklerde ise kalsitriol + kitozan grubu 4. ve 8. haftalarda kalsitriol + kitozan + PRP grubuna göre daha fazla kemik hacmi göstermekle beraber histolojik olarak hücrelerin görülmesi sert bağ dokusunu takiben formasyon, kemik mineral yoğunluğu miktarı, immunohistokimyasal boyamaların şiddeti ve alansal fazlalığı ve makroskopik olarak defekt alanının küçülmesi kalsitriol + kitozan + PRP grubu lehinedir.

Plachokova ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada osteokondüktif materyal ile PRP kombinasyonunun Fisher sıçan kalvaryal 6,2 mm'lik defektlerindeki etkisini 1. ve 2. hafta sakrifikasyon süreciyle araştırmışlar, venöz kandan hazırladıkları PRP'yi

osteokondüktif özelliği olan yoğun bifazik hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat ile karıştırarak kemik rejenerasyonu etkisini mikrotomografik ve histolojik olarak değerlendirmişlerdir. Kemik greft materyallerinin üretilmesindeki hedef doğal kemikle karşılaştırılabilecek veya onunla yarışabilecek özellikleri barındırmasıdır, kemik greft materyallerine rekombinant büyüme faktörleri veya büyüme faktörlerini kendisinde doğal olarak barındıran PRP katılarak cerrahi alanda kemik iyileşmesine katkı sağlaması hedeflenmektedir. Kontrol grubunda boş bırakılan defektler bazı deneklerde PRP ile birlikte hidroksiapatit, beta trikalsiyum fosfatla ve sadece hidroksiapatit/beta trikalsiyum fosfat ile doldurulmuştur. İlk hafta sonuçlarında gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamakta ancak hidroksiapatit/beta trikalsiyum fosfat eklenen gruplarda fibroz doku temeli tespit edilmiş tüm gruplarda yeni oluşan kemik dokusu az da olsa örgü kemiğe ait oluşumlar tespit edilmiş ama kollajen fiberler belirlenmemiştir. İki haftalık sonuçlarda ise sadece hidroksiapatit/beta trikalsiyum partiküllerinin konulmuş olduğu defektlerde kemik köprülerine rastlanılmış ve boş defektlerdeki yeni oluşmuş kemik kalınlığının diğer gruplara göre az olduğu da görülmüştür. Radyolojik analizde ilk haftada tüm gruplarda belirli bir miktar kemik oluşumu tespit etmiştir. İki haftalık takip gruplarında da bazı defektlerde tamamen iyileşme görülmüştür. Bu çalışmada PRP'nin diğer tüm çalışmaların aksine kemik ve yara iyileşmesinde histolojik ve mikrotomografik olarak herhangi anlamlı bir fark bulunamamıştır (319).

Biz PRP'nin eklenmiş olduğu gruplarda kontrol ve kitozan gruplarına göre histolojik olarak daha fazla hücre alanı, immunohistokimyasal boyamalarda yoğun ve daha fazla alanda boyama görülmesi tespit etmiş durumdayız ancak 1. ve 2. haftalarda karşılaşılan kemik hacim, kemik mineral yoğunluğu ve kemikleşme yüzde değerleri istatistik olarak anlamlı değildir. 4. ve 8. haftalarda karşılaştığımız kemik hacim değerleri PRP eklenmediği gruplarda PRP'li gruplara göre daha yüksektir. Kalsitriol + kitozan grubunda 4. ve 8. haftalarında kemik hacim ve kemikleşme yüzdesi kalsitriol + kitozan + PRP grubuna göre daha yüksektir. Bunun nedeni olarak da ortamdan PRP materyalinin erken eliminasyonu, erken salınımı ile hedeflenen büyüme faktörleri, kemotaksis işlemleri için yeterli aktivasyon barındıramamasını düşünmekteyiz. Ancak histolojik olarak hücrelerin görülmesi sert bağ dokusunu takiben formasyon kemik mineral yoğunluğu miktarı, immunohistokimyasal boyamaların şiddeti ve alansal fazlalığı ve makroskopik olarak defekt alanının küçülmesi kalsitriol + kitozan + PRP grubu lehinedir. Kemik mineral yoğunluğuna bakıldığında defekt alanındaki materyalin

yoğunluk olarak kalsitriol + kitozan + PRP grubunda daha yüksek olduğu da görülmekle beraber, histolojik, immunohistokimyasal ve makroskopik incelemelerde kalsitriol + kitozan + PRP grubunda diğer gruplara göre daha fazla yeni hücre, defekt alanının daha küçülmesi, sınırlarının daha belirginsiz olması da tespit edilmiştir.

Bununla birlikte PRP'nin otojen olarak barındırdığı kemotaksi etkisi, hücre proliferasyonu, büyüme faktörleri ile kemik iyileşmesini etkisini sinerjik olarak arttıracakı düşünülen materyaller farklı çalışmalarda kullanılmıştır. Taze dondurulmuş allogreftleri PRP'li veya PRP'siz olarak Wistar sıçan kalvaryasındaki 5 mm'lik defektlerde kullanan ve etkiyi histolojik olarak değerlendiren Messori ve arkadaşlarının çalışması ile PRP'nin ve simvastatinin 8 mm'lik sıçan kalvaryal kemik defektlerindeki kemik iyileşmesine olan etkisini histolojik ve radyolojik olarak değerlendiren Seyhan ve arkadaşlarının çalışması buna örnek verilebilir (274, 362). Taze dondurulmuş kemik greft materyalinin üzerine PRP ekleyen Messori ve arkadaşları yaptıkları incelemede taze dondurulmuş kemik grefti ve PRP ile defekt alanının yeni kemik dokusu ile dolduğunu, osteoblast sayısının fazlalığını ve daha aktif olduklarını, osteoid matriks yapısının görüldüğünü sadece PRP ve sadece taze dondurulmuş kemik grefti konan gruplardan farkı olarak tespit etmişlerdir (274).

Kemiğin formasyonunu arttıran simvastatin ve yine aynı etkiye sahip olan PRP'nin kritik 8 mm'lik kalvaryal kemik üzerindeki kemik iyileşmesine etkisini radyolojik olarak 8. ve 16. haftada ve histolojik olarak ise 16 haftalık sakrifikasyon süreci sonrasında değerlendiren Seyhan ve arkadaşları simvastatin ve PRP konan gruplarda PRP ve kontrol gruplarına göre daha fazla kemikleşme, daha çok ve aktif kemik hücresi bulunduğunu tespit etmiştir. Ancak tek başına simvastatin eklenen ve tek başına PRP eklenen gruplar arası anlamlı bir fark bulunamayan bu çalışmada Simvastatin ve PRP'nin kemik iyileşmesini sağladığı ve büyüme faktörlerinin kemotaksisi ve hücre formasyonu ile alanda daha fazla kemikleşmeye sebep olduğunu nakletmişlerdir (362).

Bizim çalışmamızda da PRP kendi içerisinde özellikle 4. haftaya kadar olan dönemlerde kemikleşme yüzdesini ve kemik hacmini artırmış, daha sonrasında bir azalma ile karşılaşmıştır. Bu durumda belli bir süre sonra PRP'nin rezorpsiyonu, ortamdan eliminasyonu ile aktif bu durumun devam ettirilemediği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Kontrol grubundan farklı olarak defekt alanının PRP ile doldurulduğu grupta

1., 2. ve 4. haftada kemik hacim değerleri, 8. hafta kemik mineral yoğunluğu değeri kontrol grubuna göre fazla ölçülmüş, kitozan ile doldurulduğu grupta 1. 4. ve 8. haftada kemik mineral yoğunluğu değeri 2. 4. ve 8. haftada kemik hacim değerleri kontrol grubuna göre fazla ölçülmüştür. Kemik mineral yoğunluğu değerinin 8. haftada kitozan + PRP ve PRP grubunda kontrol ve kitozan gruplarına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlıdır. Defektin kalsitriol + kitozan ile doldurulduğu gruplarda her haftada defekt alanının küçülmesi, kemik hacmi değerleri ve 8. haftada kemik mineral yoğunluğu değerleri kontrol grubuna göre fazla olarak ölçülmüştür. Kalsitriol + kitozan + PRP grubu ile hedeflenen; tek başlarına kemik mineral yoğunluğu kemik hacmi ve kemikleşme yoğunluklarını kontrol grubuna göre yükselten kitozan, PRP ve kalsitriolün uygun oranlarda karışımlarında bir sinerjistik etki oluşturması düşüncesidir. İmmunohistokimyasal olarak bakıldığında VDR ve FGF23 bazında PRP barındıran gruplarda PRP eklenmemiş gruplara göre daha fazla boyanma alanı ve şiddeti görülmekle birlikte makroskopik olarak defekt alanının küçülmesi ve histolojik değerlendirmede hücrelerin görülmesi ve defekt alanının daha fazla miktarda iyileşmesi kalsitriol + kitozan + PRP grubu lehinedir. İlk haftalarda bağ dokusu proliferasyonu görülmesi ve ortamda D vitamini reseptörünün bulunması dolayısıyla, görülen bu bağ dokusu alanlarının ileri haftalarda oluşacak yeni kemik dokusunu işaret ettiğini düşünmekteyiz.

PRP'nin kemik iyileşmesine etkisinin tavşan kritik kemik defektleri üzerine etkilerinin tek başlarına ve/veya iyileşmenin etkisinin artmasının beklendiği materyallerle karıştırılarak incelendiği çalışmalardan birinde Cheng ve arkadaşları venöz kandan elde ettikleri PRP'yi kemik iliği kaynaklı stromal hücrelere karıştırmış ve bu karışımın 12 mm'lik kritik kemik defektindeki etkisini radyolojik, histolojik ve mekanik olarak değerlendirmiş ve kemik iliği kaynaklı stromal hücre/PRP grubunda yeni kemik oluşumunu tespit etmişlerdir. Histolojik olarak trabeküler kemiği gösteren bu çalışmada PRP grubunda ilgili sürede fibroz doku görüldüğü belirtilmiş; diğer çalışmada Kim ve arkadaşları PRP'yi PRF ve konsantre büyüme faktör ile karşılaştırarak 10 mm ve 15 mm'lik iki kalvaryal defektteki 6 ve 12 haftalık sakrifikasyon sürecindeki kemik iyileşmesine olan etkisini histolojik, radyolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirmiş ve istatistiksel olarak anlamsız olarak PRP grubunda PRF ve konsantre büyüme faktörü grubuna göre daha az oranda yeni kemik oluşumu alanı tespit ettiklerini nakletmişlerdir (67, 218).

Kemik iyileşmesini ve bu iyileşmenin hızını arttırabilmek adına kullanılan materyallerin kalvaryal defekte konulmasını değerlendiren bir çalışmada policaprolaktone - trikalsiyum fosfat iskelenin kraniyal kemik iyileşmesinde iskeletsel yapıya olan etkisini Berner ve arkadaşları 5 mm'lik kalvaryal defektlerde 12 haftalık sakrifikasyon döneminde radyolojik ve histolojik olarak incelemiş ve olabilecek olan iyileşmeyi mekanik olarak değerlendirmişlerdir. Radyolojik olarak kemik hacmini değerlendiren Berner ve arkadaşları kullandıkları materyalin kalvaryada oluşturdukları 2'şer defekt üzerindeki etkisini görmek istemiş ve sonuçlardan elde ettikleri bulguları kemik defektlerinde kullanmayı hedeflemişler boş defektlere göre tüm gruplarda yeni kemik oluşumunun görüldüğü diğer deney gruplarında mineralize yapıları tespit ettiklerini boş defekte herhangi bir mineralize yapı görmedikleri için 5 mm'lik defektin aynı zamanda kritik olmasını desteklediğini tespit etmişlerdir (23).

Çalışmamızda PRP grubunda kontrol ve kitozan gruplarına göre makroskopik olarak daha sert kemik alanı tespit etmiş olmakla beraber mikrotomografik değerlendirmelerde kemikleşme yüzdeleri ve kemik mineral yoğunlukları değerlerinde 8. haftalarda bu farkı istatistiksel olarak anlamlı şekilde görmüş bulunmaktayız. İmmunohistokimyasal değerlendirmelerde VDR ve FGF23 antikoruna ait boyamalarda PRP grubu kontrol grubuna ve kitozan grubuna göre ilk haftalarda daha çok alanda ve daha çok şiddette boyama göstermiş sonradan ortamdan eliminasyona, rezorpsiyona bağlı olarak boyama alan ve şiddeti düşme göstermiştir. Bunun etkisini kalsitriol + kitozan + PRP grubunda kalsitriol + kitozan grubuna göre de görmekle beraber mikrotomografik değerlendirmeler kalsitriol + kitozan grubu lehine olsa da elimizdeki histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme sonuçları ve makroskopik incelemelerde kalsitriol + kitozan ve PRP grubunda defekt alanının daha net bir şekilde küçüldüğü, hücre sayısı ve doku alanı ile boyama alan ve şiddetinin fazlalığı kalsitriol + kitozan grubundan fazladır. Kontrol grubunda ölçülmüş doku hacim alanını ve kemik mineral yoğunluğu miktarı daha çok ortamı dolduran granülasyon dokusu ve fibrotik dokular olması sebebiyle kontrol grubunda yeni bir kemik alanı veya kemik dokusu olmasından söz edilememiştir.

Bizler de yapmış olduğumuz çalışmada kemik hacim ölçümlerini incelediğimizde özellikle anlamlı çıkan 4. ve 8. haftalar bazında kemik iyileşmesini uyardığını ve sağladığını umduğumuz kalsitriol eklenen gruplarda görmüş

bulunmaktayız. Özellikle kalsitriol eklenen gruplarda diğer gruplara göre mineralize kemik alanları ile birlikte kemik yapım hücrelerini tespit ettik, kontrol ve kitozan grubu bazında yeni mineralize alan görülmediği gibi kemikleşme yüzdeleri de düşük görülmüştür. Radyolojik inceleme değişik yöntemlerle yapılabilmekle beraber defekt alanındaki gri skalanın farklılığı (gray value), ilgili alanın seçimi - roi olarak isimlendirilir ve kemik olarak nakledilen yerlerin eşik değeri farklılaşmaları (threshold) cihaz tarafından yeni kemik alanı ile defektteki kemiksiz alanın ayrımını oluşturmaktadır. Ancak radyolojik olarak yeni kemik alanı olarak tespit edilen alanlar histolojik incelemede genelde fibroz doku, granülasyon alanı olarak görülebilmektedir. Histolojik ve radyolojik açıdan ana farkı oluşturan budur. Özellikle etken maddenin eklenmediği gruplarda kemikleşme yüzdesi ve kemik hacmi değişimi olarak nitelendirilen alanlarda histolojik olarak mineralize alanlar görülememiştir ancak bu durum kalsitriolün eklenmiş olduğu gruplarda karşımıza çıkmıştır.

Sıçan kalvaryal defektlerinde defekt alanı kemik iyileşmesini defekt alanına konulan çeşitli materyaller ile radyolojik, histolojik ve immunohistokimyasal olarak inceleyen çalışmalardan; Fabris ve arkadaşları sıçan kalvaryal 5 mm'lik defekt alanına osteokondüktif potansiyeli bulunan boneceramic – kemik seramik - bioseramik materyalini yerleştirmişlerdir. Wistar sıçanların 14 ve 28 günlük sakrifikasyonların ardından kalvaryal alanda kullandıkları osteokondüktif özelliklerinden faydalanmak adına sentetik kemik değişkeni barındıran morfolojik yapıyı oluşturup canlı kemiğe dönmesini uyaran kalsiyum fosfat bazlı biyomateryali hidroksiapatit ve bifazik kalsiyum fosfat içeriğinden faydalanarak defekt alanına yerleştirmişlerdir. Bu çalışma sonunda elde edilen bilgileri dentoalveolar travma, travmatik diş çekimleri, konjenital diş eksiklikleri veya maksillomandibular sistemde mevcut bulunan diğer hastalıklar sebebiyle eksiklik yaşayan hastalarda kullanmayı hedeflemişlerdir. Yaptıkları değerlendirmede bioseramik ile kapatılan defektlerde defekt alanının biomateryal ve yeni kemik ile dolduğunu tespit eden Da Silva Fabris ve arkadaşları 14 günlük takipte otojen kemik grefti koymuş oldukları grupta sadece pıhtı tespit ettiklerini, kontrol grubuna göre daha fazla kemik ile karşılaştıklarını ve diğer deney gruplarında da sonucun benzer olduğunu nakletmiş 28 günlük takipte ise boneseramik grubunda diğer gruplara göre daha tercih edilebilir kemik formasyonu olduğunu 14-28 günlük süreç aralıklarında kemik dokusu formasyonunun kullanılan tüm materyaller bazında arttığını tespit etmişlerdir. Bağ dokusu çerçevesinde bioseramik grubunu daha etkin

bulmalarının yanısıra otojen kemik greft grubunda görülen kemik alanı diğer gruplardan fazla olduğunu radyolojik ve RUNX₂, TRAP, VEGF ve osteokalsin immunhistokimyasal boyamalarıyla tespit etmişlerdir (81).

İmmunohistokimyasal olarak deneysel gruplarda otojen kemik grefti ve bioseramik gruplarında kemik yapım antikorları olarak bilinen osteokalsin boyamaları orta yoğunlukta olmasına karşın otojen kemik grefti grubunda alan daha fazla olup mineralize kemiği işaret etmektedir. Preosteoblast ve osteoblast ve osteosit ile ilişkilendirilen RUNX₂ antikor boyamada otojen ve boneseramik gruplarında kendine yer bulmuş veya otojen grubunda daha şiddetli olarak görülmüştür. TRAP boneseramik için VEGF otojen kemik greftinin daha şiddetli ve fazladır. Radyolojik olarak otojen grupta 14. günde KMY (kemik mineral yoğunluğu) daha düşük 28. günden fazla olduğu tespit edilmiş 14-28 ve 14-42. günler arasında hem otojen hem biyoseramik gruplarında değer artışı ile karşılaşmıştır. En çok yeni kemik dokusu öncelikle otojen kemik greftinde sonrasında biyoseramik ve pıhtı grubunda görülmüştür (81).

Bir başka çalışmada Stephan ve arkadaşları sıçan kalvaryasındaki 8 mm'lik defekt alanına enjeksiyon yöntemi ile kitozan jel/mezenkimal kök hücre eklenmiş jel/BMP₂ eklenmiş jel/BMP₂ ve mezenkimal kök hücre eklenmiş jel uygulamışlar, 4 haftalık dönemde in vivo radyolojik ve 8 haftalık dönemde yine radyolojik, histolojik ve immunohistokimyasal olarak kemik iyileşmesini minimal invaziv yolla değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Sadece kitozan jel grubunda küçük bir kemik formasyonu tespit eden Stephan ve arkadaşları jelin büyük oranda muhafaza edildiğini belirtmiş ancak diğer gruplarda bu jelin rezorbe olduğunu ve rezorbe jel alanlarının fibrin ve kan dokusu ile dolduğunu belirtmişlerdir. Jel yapısına katılmış olan BMP₂ ve mezenkimal kök hücre gruplarında gelişmiş kemiğin interfaz aşamasında olduğunu nakletmişlerdir. Radyolojik olarak yeni gelişen kemik miktarının en çok BMP₂/mezenkimal kök hücre – jel grubunda olduğunu sonrasında mezenkimal kök hücre- jel, jel ve kontrol grubu sıralamasıyla olduğunu, bu bulguların da histolojik bulgularla örtüştüğünü gözlemlemişlerdir (379).

Kenan ve arkadaşları Semaphorin 3A'nın deneysel olarak oluşturulan 5 mm'lik Wistar sıçan kalvaryasındaki yeni kemik formasyonuna etkisini 4 ve 8 haftalık takip periyotlarıyla araştırmışlar, kollajen ve semaphorin kullanılan grupta kollajen ve kontrol grubuna göre kemikleşme yüzdesi – yeni kemik hacmini 8. haftalık sakrifikasyon

süreleri çerçevesinde daha fazla tespit etmişler; RANK, RANKL, RUNX2 OPG başta olmak üzere SP7(osterix), B catenin ve ATF4 (aktive edici transkripsiyon faktörü 4) antikorları ile yapılan immunohistokimyasal değerlendirme, histolojik incelemede radyolojik bulgulara paralel olarak kollajen ve semaphorin uygulanan gruplarda kemik yapım hücrelerini – lamellar kemik alanını sert bağ dokusu yapısını görmüş ve gelişen kemiğin kalitesini ve mineralizasyonunu arttırdığını tespit etmişler (211).

Liu ve arkadaşları osteokondüktif ve osteojenik etkilerinden faydalanmak istedikleri BMP₂ geni ile modifiye edilmiş mezenkimal kök hücrelerinin nanokalsiyum sülfat/PRP jel iskele ile kombinasyonunun Sprague Dawley sıçanlardaki 8 mm'lik kritik kalvaryal defektlerdeki iyileşmesine etkisini 8 haftalık sakrifikasyon sürecinde radyolojik ve histolojik olarak incelemişler; venöz kandan elde edilen PRP'nin dahil edildiği gruplarda kemik mineral yoğunluğunun daha fazla olduğu tespit edilmiş olup nanokalsiyum sülfat grubunda ve nanokalsiyum sülfat ile PRP'nin karıştırıldığı grupta ise kemik mineral yoğunluğu açısından birbirlerine yakın değerlerle karşılaştığını belirlemişler ancak immunohistokimyasal ve radyolojik incelemelerde nanokalsiyum sülfat BMP₂/mezenkimal kaynaklı kök hücre ve PRP karışımının kullanılmış olduğu gruplarda alkalen fosfataz antikorlarının fazla ve yoğun boyanmasını görmüşler; yeni kemik hacminin ve kemik mineral yoğunluğu değerlerini diğer gruplardan yüksek olarak ölçmüşler ve bu grupta kemik oluşumunun yeni kemik dokusunun diğer tüm gruplardan daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (251).

Son ve arkadaşları kardiyak kandan elde ettikleri PRP ile hyaluronik asit/ BCP hidrojel ve BCP süngerlerin kemik rejenerasyonuna etkisini 5 mm'lik Sprague Dawley sıçan kalvaryal kritik defektlerinde 4-8 haftalık sakrifikasyon sürecinde radyolojik ve histolojik olarak incelemişler ve BCP iskelenin kemik rejenerasyonunu sağladığı hidrojel ve BCP iskele karışımı ile elde edilen HGB'nin (hidrojelin yüklü olduğu BCP sünger iskele) kemikte baskı kuvvetlerine karşı direnci arttırdığını bu yapılara PRP'nin katılmasının ise osteojenik hücre proliferasyonunu yükselttiği sonucunu tespit etmişlerdir (374).

Biz de 5 mm'lik kemik kalvaryal defekt alanını kontrol grubundan farklı olarak PRP, kalsitriol ve kitozan materyalleri ile doldurmamız sonucunda kemik iyileşmesini ve kemik iyileşmesinin kontrol ve materyallerin tek başlarına konan gruplardan daha fazla olmasını beklediğimiz çalışmamızda özellikle 4. ve 8. haftalık uzun dönem

takiplerde kemikleşme miktarını kemik mineral yoğunluğu değerini ve kemik hacmini kontrol ve materyallerin tek başına konuldukları gruplardan farklı olarak belirli oranda karışımlarının eklenmiş olduğu kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP gruplarında daha yüksek olarak ölçmüş; immunohistokimyasal, histolojik incelemeler ve makroskopik değerlendirmelerde de bu iki gruptaki mevcut bulguların desteklendiğini tespit etmiş durumdayız. Makroskopik incelemede defekt alanı kontrol, kitozan, PRP ve kitozan + PRP grubuna göre kalsitriol + kitozan ve kalsitriol + kitozan + PRP grubunda defektin taşınması, histolojik ve mikrotomografik değerlendirilmesinde ve histolojik kesit hazırlanması sırasında daha sert olduğu ve kuvvetleri daha tolere edebildiği görülmüştür. Özellikle son iki grupta (kalsitriol + kitozan, kalsitriol + kitozan + PRP) dehidratasyon işleminin ardından histolojik preparat hazırlanabilmesi için kesilmesinde diğer gruplara göre biraz daha zorlanıldığı da bulgular arasında yer almaktadır.

Çalışmamız yapılan taramalarda D vitamini metabolitinin defekt alanına kitozan ve PRP ile uygulanmasını içeren ilk çalışmadır. Çalışmamızın sonuçlarında D vitamini metaboliti olan kalsitriolün kemik iyileşmesine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. D vitamininin PRP ve biyouyumlu taşıyıcı olan kitozan ile uygun formülasyonda karışımının kemik defektleri üzerindeki kemik yapımı etkisi histopatolojik, mikrotomografik, immunhistokimyasal, biyokimyasal ve makroskopik olarak değerlendirilmiş ve D vitamini içermeyen durumlara göre bu yapının kemikteki anabolik etkisi belirlenmiş kemik hacmi ve kemik mineral yoğunluğu ile birlikte kemikleşme yüzdesindeki artışı da ortaya konmuştur.

Sonuç olarak D vitamini aktif metaboliti kalsitriolün tek başına veya PRP ile birlikte kullanılması, alana taşıyıcı ile nakledilmesi, kist, tümör cerrahisi veya travma sonrasında oluşan defektlerin – kırıkların, kemik boşluklarının hızlı bir şekilde iyileşmesinde, rekonstrüksiyonunda kullanılabilecek kaybedilmiş estetiğin ve fonksiyonun kısa sürede kazanılmasına yardımcı olabilecek bir preparasyon olarak görülmektedir.

Mevcut defekt alanına PRP'nin ve D vitamininin ilavesi ile mediatörlerin, kemoaktranların alana migrasyonunu, alanda bulunan kök hücrelerin önce bağ dokusu hücrelerine ve daha sonrasında kemik yapım hücrelerine formasyonunu uyarmakta,

PRP'nin kendi içinde barındırdığı büyüme faktörleri de bu aktivasyona bir pozitif etki oluşturarak yara ve kemik iyileşmesini hızlandırmaktadır.

Günümüzde insanların yaşam sürelerinin uzaması, çevresel olarak maruz kalınan kimyasal maddeler ve maruz kalış sürelerinin uzaması, genetik aktarımlar, genetiği bozulmuş besinler, virütik, bakteriyel bulaşlar, kötü alışkanlıklar ve yaşam koşulları gibi bir çok etmen başta kanser gibi değişik hastalıkların ortaya çıkmasına, metabolik faaliyetlerin düzeninin bozulmasına sebebiyet vermektedir. Hemen hemen her hastalıkta organizmanın yaşamış olduğu D vitamini düzey düşüklüğü maksillofasiyal cerrahi işlemlerin ardından yara ve kemik dokusunun iyileşme gecikmelerine ve komplikasyonlarına yol açabilmektedir.

Bizim çalışmamızda maksillofasiyal cerrahi işlemlerin ardından D vitamini eksikliğinin telafisini ve kemik kavitelerinde erken iyileşmeyi sağlaması amacıyla geliştirilen bu preparasyon, kemik defektlerinin daha erken iyileşmesine yardımcı olabilecek ve gelişebilecek komplikasyonların önüne geçmesi açısından fayda sağlayabilecektir.

Alınan kan örneğinden elde edilen PRP'nin aynı organizmada kullanılması ile elde edilecek sonuçların ve etkilerinin daha iyi olabileceği, bu karışıma kemik oluşumunu hedefleyen otojen greftler başta olmak çeşitli greft materyalleri eklenmesi sonucunda etki artışının görülebileceğini düşünmekteyiz.

Cerrahi işlemler öncesinde D vitamini eksikliğinin ortadan kaldırılması açısından D vitamini takviyesi yapılması sonrasında bu karışımın kemik defekti alanına uygulanması ile etkisinin artabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Adegboye ARA, Boucher BJ, Johanne K, Fiehn NE, Christensen LB, Heitmann BL. Calcium, vitamin D, casein and whey protein intakes and periodontitis among Danish adults. *Public Health Nutrition* 2016; **19**(3): 503-510.
2. Akeda K, An HS, Okuma M, Attawia M, Miyamoto K, Thonar EJ ve ark. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; **14**(12): 1272–1280.
3. Akpınar P, İçağasıoğlu A. The relation between vitamin D and quality of life. *Türk Osteoporoz Dergisi* 2012; **18**: 13-8.
4. Alissa R, Esposito M, Horner K, Oliver R. The influence of platelet rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial. *Eur J Oral Implantol.* 2010; **3**: 121–134.
5. Alshahrani F, Aljohani N. Vitamin D: Deficiency, Sufficiency and Toxicity. *Nutrients* 2013; **5**: 3605-3616.
6. Alshouibi EN, Kaye EK, Cabral HJ, Leone CW, Garcia RI. Vitamin D and periodontal health in older men, *J Dent Res* 2013; **92**: 689-693.
7. American Cancer Society: Skin cancer facts. Accessed at: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/sunanduvexposure/skin-cancer-facts>. Erişim tarihi (12.04.2020) (last revision 4 April 2015).
8. Anbarcioglu E, Kirtiloglu T, Ozturk A, Kolbakir F, Acikgoz G, Colak R. Vitamin D deficiency in patients with aggressive periodontitis. *Oral disease* 2019; **25**(1): 242-249.
9. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G ve ark. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008; **84**: 415–421.
10. Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M ve ark. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res* 2005; **23**(2): 281–286.

11. Archer W.H. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 5th edition. Philadelphia: WB Saunders Comp; 1975. p. 1512-1515.
12. Arnoczky SP, Sheibani-Rad S. The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med Arthrosc* 2013; **21**:180-5.
13. Arora NS, Ramanayake T, RenYF, Romanos GE. Platelet –rich plasma:a literature review. *Implant Dent* 2009; **18**: 303-10.
14. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin Orthop* 1996; **329**: 300-9.
15. Balcı V. Alt Ekstremitte Kırıklarının Plak İle Biyolojik Tespiti. Uzmanlık Tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği. 2005.
16. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma* 2019; **4**: 203-213.
17. Barrère F, van Blitterswijk CA, de Groot K, Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine*. 2006; **1**(3): 317 32.
18. Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM ve ark. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *N Engl J Med* 2010; **363**: 2396-2405.
19. Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM ve ark. The impact of vitamin D status on periodontal surgery outcomes. *J Dent Res* 2011; **90**(8): 1007–1012.
20. Bashutski JD, Wang HL. Periodontal and endodontic regeneration. *J Endod* 2009; **35**(3): 321–328.
21. Baylink W, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research* 1993; **8**: 565-572.
22. Berdal A, Papagerakis P, Hotton D, Bailleul-Forestier I, Davideau JL. Ameloblasts and odontoblasts, target-cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃: a review. *Int J Dev Biol* 1995; **39**: 257–262.

23. Berner A, Woodruff MA, Lam CX, Arafat MT, Saifzadeh S, Steck R ve ark. Effects of scaffold architecture on cranial bone healing. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014; **43**(4): 506-13.
24. Bhandari M, Guyatt GH, Swiontkowski MF, Tornetta P 3rd, Sprague S, Schemitsch EH. A lack of consensus in the assessment of fracture healing among orthopaedic surgeons. *J Orthop Trauma* 2002; **16**(8): 562-6.
25. Bielecki T, Cieslik-Bielecka A, Żelawski M, ve ark. A side-effect induced by the combination of a demineralized freeze-dried bone allograft and leucocyte and platelet-rich plasma during treatment for large bone cysts: a 4-year follow-up clinical study. *Transfus Apher Sci* 2012; **47**: 133–8.
26. Biga LM, Dawson S, Harwell A, Hopkins R, Kaufmann J, LeMaster M ve ark. *Anatomy & Physiology* 1st Edition. Oregon: Open educational Resources Oreon State University Pressbooks; 2020.
27. Bikle DD. Extrarenal synthesis of 1,25 dihydroxyvitamin D and its Health Implications. *Clin Rev in Bone and Min Metab.* 2009; **7**: 114–125.
28. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & Biology* 2014; **21**: 319-329.
29. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *American Journal of Medicine* 2004; **116**(9): 634-639.
30. Blair HC. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 1998; **20**: 837-46.
31. Boggess KA, Espinola JA, Moss K, Beck J, Offenbacher S, Camargo CA Jr. Vitamin D status and periodontal disease among pregnant women. *J Periodontol* 2011; **82**(2): 195–200.
32. Booth SL, Dallal G, Shea MK, Gundberg C, Peterson JW, Dawson-Hughes B. Effect of vitamin K supplementation on bone loss in elderly men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008; **93**: 1217-1223.
33. Booth SL. Vitamin K: food composition and dietary intakes. *Food Nutr Res* 2012; **56**.
34. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; **9**: 310–16.

35. Boskey AL. Organic and inorganic matrices. İçinde Wnek G, Bowlin GL, editors. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*. London: Dekker Encyclopedias, Taylor & Francis Books; 2006. pp. 1–15.
36. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *J Dent Res* 2010; **89**(12): 1333- 48.
37. Boskey AL, Posner AS. Bone structure, composition and mineralization. *Orthop Clin North Am* 1984; **15**: 597-612.
38. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep* 2013; **2**:447.
39. Boyce BF, Xiu Y, Li J, Xing L, Yao Z. NF-κB-mediated regulation of osteoclastogenesis. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2015; **30**(1): 35-44.
40. Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res* 2013; **92**(10): 860-7.
41. Boyne PJ. Tissue Transplantations İçinde Kruger GO, editor. *Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery*. 6th ed. St Louis: CV Mosby; 1984. pp.296-332.
42. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease. İçinde Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 16th edition. New York: MCGraw-Hill Companies; 2005. pp. 2238-86.
43. Brinker MR, O'Connor DP. Exchange nailing of ununited fractures. *J Bone Joint Surg Am* 2007; **89**: 177-88.
44. Brond AR, Rubin TC. Fracture healing. Surgery of the musculoskeletal system. 2nd edition. New York: Churchill Livingstone; 1990; **1**: 93- 114.
45. Bronner F, Farach-Carson MC, Roach HI. *Bone-Metabolic Functions and Modulators* London: Springer; 2012.
46. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Klfor O. Cloning and characterization of an extracellular ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; **366**: 575-580.
47. Brown JH, DeLuca SA, Growth plate injuries: Salter-Harris classification. *Am Fam Physician* 1992; **46**(4): 1180-4.
48. Broxmeyer HE, Cooper S, Li ZH, Lu L, Song HY, Kwon BS ve ark. Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. *Int J Hematol*. 1995; **62**: 203–215.

49. Buckwalter JA, Einhorn AT, Bolander EM, Cruess LR. Healing of the musculoskeletal tissues. İçinde Rockwood AC, Gren PD, Bucholz WR, Heckman DJ, editors. *Rockwood and Gren's Fractures in Adults*. 4th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
50. Burnouf T, Lee CY, Luo CW, Kuo YP, Chou ML, Wu YW ve ark. Human blood derived fibrin releasates: composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. *Biologicals* 2012; **40**: 21–30.
51. Burr, D.B., Akkus, O. Bone morphology and organisation. İçinde Burr, D.B., Allen, M.R, editors. *Basic and Applied Bone Biology*. New York: Academic Press.; 2004. pp. 3–26.
52. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft autograft of cancellous bone. An analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 1964; **46**: 110-40.
53. Buser D, Dahlin C, Schenk RK. *Guided Tissue Regeneration in Implant Dentistry*. Chicago: Quintessence; 1994.
54. Buzalaf MAR, Whitford GM. Fluoride metabolism. Fluoride and the oral environment. *Monogr Oral Sci* 2011; **22**: 20–36.
55. Calmar EA, V. R. The anatomy and physiology of bone fracture and healing. *Clinical Pediatric Emergency Medicine* 2002; **3**(2): 85-93.
56. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *J Periodontal Res* 2002; **37**: 300-306.
57. Canalis E. New treatment modalities in osteoporosis. *Endocr Pract* 2010; **16**(5): 855-863.
58. Cawood JI, Howell RA. Reconstructive preprosthetic surgery. I. Anatomical considerations *Int J Oral Maxillofac Surg* 1991; **20**(2): 75-82.
59. Centrella M, McCarthy TL, Kusmik WF, Canalis E. Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast enriched cultures from fetal rat bone. *J Cell Physiol*.1991; **147**: 420-426.

60. Chambrone L. Current status of the influence of osteoporosis on periodontology and implant dentistry. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 2016; **23**: 435-439.
61. Chambrone L, Pannuti CM, Guglielmetti MR, Chambrone LA. Evidence grade associating periodontitis with preterm birth and/or low birth weight: II: a systematic review of randomized trials evaluating the effects of periodontal treatment. *J Clin Periodonto.* 2011; **38**(10): 902–914.
62. Chang KM, Lehrhaupt N, Lin LM, Feng J, Wu-Wang CY, Wang SL. Epidermal growth factor in gingival crevicular fluid and its binding capacity in inflamed and non-inflamed human gingiva. *Arch Oral Biol* 1996; **41**(7): 719-724.
63. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - the missing vitamin in humans. *Pediatr Neonatol* 2019; 60(3): 237-244.
64. Chapuy MC, Arlot ME, Duboeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S ve ark. Vitamin D₃ and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *The New England Journal of Medicine* 1992; **327**(23): 1637-1642.
65. Chen CK, Chang NJ, Wu YT, Fu E, Shen EC, Feng CW ve ark. Bone formation using cross-linked chitosan scaffolds in rat calvarial defects. *Implant Dentistry* 2018; **27**(1): 15–21.
66. Chen YH, Tai HY, Fu E, Don TM. Guided bone regeneration activity of different calcium phosphate/chitosan hybrid membranes. *Int J Biol Macromol.* 2019; **126**: 159–169.
67. Cheng X, Lei D, Mao T, Yang S, Chen F, Wu W. Repair of critical bone defects with injectable platelet rich plasma/bone marrow-derived stromal cells composite: experimental study in rabbits. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2008; **14**(2): 87-95.
68. Chiang K, Yeh C, Chen T. Vitamin D and Pancreatic Cancer—An Update *Cancers (Basel).* 2011; **3**(1): 213–226.
69. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; **17**(3): 513–20.
70. Choukroun, J, Khoury G, Khoury F, Russe P, Testori T, Komiyama Y ve ark. Two neglected biologic risk factors in bone grafting and implantology:

- high low-density lipoprotein cholesterol and low serum vitamin D. *Journal of Oral Implantology* 2014; **40**(1): 110–114.
71. Choy MHV, Wong RMY, Chow SKH, Li MC, Chim YN, Li TK ve ark How much do we know about the role of osteocytes in different phases of fracture healing? A systematic review. *J Orthop Translat.* 2019; **21**: 111-121.
 72. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: Metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics* 2010; **39**: 243-253.
 73. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**(3): 131-139.
 74. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC ve ark. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med.* 1990; **172**: 1535–1545.
 75. Compston J, Bowring C, Cooper A, Cooper C, Davies C, Francis R ve ark. National Osteoporosis Guideline Group. Diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and older men in the UK: National Osteoporosis Guideline Group (NOGG) update 2013. *Maturitas* 2013; **75**(4): 392- 6.
 76. Conly JM, Stein K, Worobetz L, Rutledge-Harding S. The contribution of vitamin K2 (menaquinones) produced by the intestinal microflora to human nutritional requirements for vitamin K. *Am J Gastroenterol* 1994; **89**: 915-23.
 77. Cornell CN, Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 1999; **30**(4): 591-8.
 78. Corrales LA, Morshed S, Bhandari M, Miclau T 3rd. Variability in the assessment of fracture-healing in orthopaedic trauma studies. *J Bone Joint Surg Am* 2008 ;**90**(9): 1862-8.
 79. Cosman F, Dawson-Hughes B, Wan X, Krege JH. Changes in Vitamin D Metabolites During Teriparatide Treatment. *Bone* 2012; **50**: 1368-1372.
 80. Cruess RL. *Healing of Bone, Tendon and Ligament* 2. Edition. Philadelphia: Lippincott Co.;1984.
 81. Da Silva Fabris AL, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Tárík Ocon Braga Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okatomo R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci* 2018; **26**: e20160531.

82. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology* 2008; **61**: 577-587.
83. Davis BJ, Roberts PJ, Moorcroft CI, Brown MF, Thomas PB, Wade RH. Reliability of radiographs in defining union of internally fixed fractures. *Injury* 2004; **35**: 557-61.
84. Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med*. 1997; **337**(10): 670–676.
85. De Campos A, Sanchez A, Alonso M. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics* 2001; **224**: 159- 168.
86. De Carlo AA, Whitelock JM. The role of eparin sulfate and perlecan in bone-regenerative procedures. *J Dent Res* 2006; **85**: 122-132.
87. De Long JM, Beitzel K, Mazzocca AD, Shepard D, Roller BL, Hanypsiak BT et al. Update on platelet-rich plasma. *Curr Orthop Pract* 2011; **22**: 514-22.
88. De Luca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D1-4. *The American journal of clinical nutrition* 2004; **80**(6): 1689-1696.
89. Dhillon RS Schwarz EM, Maloney MD. Platelet-rich plasma therapy - future or trend? *Arthritis Res Ther* 2012; **14**: 219.
90. Dhurat R, Sukesh M.J Principles and Methods of Preparation of Platelet- Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg* 2014; **7**: 189-97.
91. Di Matteo B, Filardo G, Lo Presti M, Kon E, Marcaci M. Chronic anti-platelet therapy: a contraindication for platelet-rich plasma intra-articular injections? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; **18**: 55-9.
92. Dietrich T, Nunn M, Dawson-Hughes B, Bischoff-Ferrari HA. Association between serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and gingival inflammation, *Am J Clin Nutr* 2005; **82**: 575-580.
93. Dikbaş O. Bone as an Endocrine Organ *Turkiye Klinikleri J Endocrin-Special Topics*. 2017; **10**(2): 57-60.
94. Diss A, Dohan DM, Mouhyi J, Mahler P. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: one year prospective pilot

- study with microthreaded implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; **105**(5): 572-579.
95. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin- PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014; **4**(1): 3-9.
 96. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J ve ark. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate, part I: technological concept and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 101:37–44.
 97. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part II: platelet related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(3): e45-50.
 98. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J ve ark. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; **101**: 51–55.
 99. Dohan DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol* 2010; **81**(4): 546-555.
 100. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (LPRF). *Trends Biotechnol.* 2009; **27**: 158–167.
 101. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; **31**: 615–619.
 102. Dunn PM. Francis Glisson (1597-1677) and the "discovery" of rickets. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; **78**: F154–F155.
 103. Duwelius PJ, Schmidt AH, Rubinstein RA, Green JM. Nonreamed interlocked intramedullary tibial nailing. One community's experience. *Clin Orthop Relat Res* 1995; **315**: 104-13.

104. Dvorak G, Reich KM, Tangl S, Goldhahn J, Haas R, Gruber R. Cortical Porosity of the Mandible in an Osteoporotic Sheep Model. *Clinical Oral Implants Research* 2010; **22**: 500-505.
105. Egol KA, Gruson K, Spitzer AB, Walsh M, Tejwani NC. Do Successful Surgical Results after Operative Treatment of Long-bone Nonunions Correlate with Outcomes? *Clin Orthop Relat Res* 2009; **467**(11): 2979-85.
106. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; **355**: 7–21.
107. Eken BF, Sercan C, Gezmiş H, Moufti Chousen Ö, Kırac D, Akyüz S, Ulucan K. D vitamini reseptörü rs1544410 polimorfizminin diş çürüğü oluşumuna etkisi. *European Journal of Research in Dentistry* 2018; **2**(1): 1-5.
108. Elder SJ, Haytowitz DB, Howe J, Peterson JW, Booth SL. Vitamin K contents of meat, dairy, and fast food in the U.S. diet. *J Agric Food Chem* 2006; **54**: 463-7.
109. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M ve ark. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. *J Periodontol* 2007; **78**(4): 661-669.
110. Erimoğlu C. *İnsan Anatomisi*. İstanbul: İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi; 1990.
111. Eroschenko VP. *diFiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle*. 10.baskı. Ankara: Palme Yayınevi, 2008.
112. Esterhai J, Alavi A, Mandell GA, Brown J. Sequential technetium-99m/gallium-67 scintigraphic evaluation of subclinical osteomyelitis complicating fracture nonunion. *J Orthop Res* 1985; **3**(2): 219-25.
113. Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. 2. Baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2016.
114. Faine M.P. Dietary Factors Related to Preservation of Oral and Skeletal Bone Mass in Women. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1995; **73**(1): 65-72.
115. Ferland G. Vitamin K. İçinde Erdman JW, Macdonald IA, Zeisel SH, editors. *Present Knowledge in Nutrition*. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell; 2012. pp. 230-47.
116. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I1, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration II.

- The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; **11**(2): E151-7.
117. Ferreira FC, Gomez MCC, Filho JS, Granjeiro JM, Simoes CMO, Magini RS. Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res* 2005; **16**: 456-60.
 118. Fidan F, Alkan BM, Tosun A. Çağın pandemisi: D vitamini eksikliği ve yetersizliği. *Türk Osteoporoz Dergisi* 2014; **20**: 71-4.
 119. Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000; **31**: 357-74.
 120. Florczyk SJ, Leung M, Li Z, Huang JI, Hopper RA, Zhang M., Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications. *J Biomed Mater Res A* 2013; **101**(10): 2974-83.
 121. Fonseca RJ, Walker RV. *Oral and Maxillofacial Trauma*. First edition. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
 122. Fonseca RJ. *Oral and Maxillofacial Trauma*. Elsevier Saunders.; 2005.
 123. Fox J, Miller MA, Newman MK, Metcalfe AF, Turner CH, Recker RR ve ark. Daily treatment of aged ovariectomized rats with human parathyroid hormone (1- 84) for 12 months reverses bone loss and enhances trabecular and cortical bone strength. *Calcif Tissue Int* 2006; **79**(4): 262-72.
 124. Freson K, Labarque V, Thys C, Wittevrongel C, Geet CV. What's new in using platelet research? To unravel thrombopathies and other human disorders. *Eur J Pediatr*. 2007; **166**(12): 1203-10.
 125. Fretwurst T, Grunert S, Woelber J.P., Nelson K., Semper-Hogg W. Vitamin D deficiency in early implant failure: two case reports. *Int J Implant Dent*. 2016; **2**: 24.
 126. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF ve ark. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2001; **83**- A Suppl 1(Pt 2): 151-8.
 127. Frost HM. In vivo osteocyte death. *J Bone Joint Surg* 1960; **42A**: 138-43.
 128. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 1989; **248**: 283-293.

129. Fufa D, Shealy B, Jacobson M, Kevy S, Murray MM. Activation of platelet-rich plasma using soluble type I collagen. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; **66**: 684–690.
130. Fujita T, Shiba H, Van Dyke TE, Kurihara H. Differential effects of growth factors and cytokines on the synthesis of SPARC, DNA, fibronectin and alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int* 2004; **28**: 281-286.
131. Garbutt A.C., 2012. What Are Vitamines? Erişim 08.04.2020, New Medical Life Sciences: <https://www.news-medical.net/news/20120608/What-are-vitamins.aspx>.
132. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 2015; **81**: 112-21.
133. Garg AK. *Bone Biology, Harvesting, and Grafting for Dental Implants: Rationale and Clinical Applications*. Amerika: Quintessence Publishing Company; 2004.
134. Garland CF, Garland FC, Gorham ED. Epidemiologic evidence for different roles of ultraviolet A and B radiation in melanoma mortality rates. *Ann Epidemiol* 2003; **13**: 395–404.
135. Gershuni DH, Skyhar MJ, Thompson B, Resnick D, Donald G, Akeson WH. comparison of conventional radiography and computed tomography in the evaluation of spiral fractures of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* 1985; **67**(9): 1388-95.
136. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; **88**(5): 873–84.
137. Geurtsen W, Hellwig E, Klimek J. S2k-Guideline "Caries prevention in permanent teethbasic recommendations. *Oralprophylaxe und Kinderzahnheilkunde* 2007; 39(2): 88-91.
138. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996; **19** 1: 23–37.
139. Glimcher MJ. *Handbook of Physiology: Endocrinology*. Baltimore: The Williams and Wilkins Company; 1976. pp. 25-116.

140. Goldhahn J, Mitlak B, Aspenberg P, Kanis JA, Rizzoli R, Reginster JY. Critical issues in translational and clinical research for the study of new technologies to enhance bone repair. *The journal of bone and joint surgery* 2008; **90**: 43-7.
141. Goldhahn J, Scheele WH, Mitlak BH, Abadie E, Aspenberg P, Augat P ve ark. Clinical evaluation of medicinal products for acceleration of fracture healing in patients with osteoporosis. *Bone* 2008; **43**(2): 343-7.
142. Goldhahn J. What counts: Outcome assessment after distal radius fractures in aged patients. *Journal of orthopaedic trauma* 2008; **22**: 126-30.
143. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* 2015; **29**: 153-62.
144. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 2011; **45**(1): 14-24.
145. Gong T, Xia J, Zhang T, Lin S, Lin Y. Nanomaterials and bone regeneration. *Bone Res* 2015; **3**: 15029.
146. Gonshor A. Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. *Int. J. Periodontics Restorative Dent* 2002; **22**: 547-557.
147. Goodson JM, Shi P, Mumena CH, Haq A, Razzaque MS. Dietary phosphorus burden increases cariogenesis independent of vitamin D uptake, *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016; **167**: 33-38.
148. Grant WB, Boucher BJ. Are Hill's criteria for causality satisfied for vitamin D and periodontal disease? *Dermatoendocrinol* 2010; **2**: 30-36.
149. Graves DT, Cochran DL. Mesenchymal cells growth factors. *Critical Review of Oral and Biological Medicine* 1990; **1**: 17-36.
150. Graziani F, Ivanovski S, Cei S, Ducci F, Tonetti M, Gabriele M. The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clin Oral Implants Res.* 2006; **17**(2): 212–219.
151. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; **83**-A: 98-103.
152. Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A ve ark. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia

- due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am J Hum Genet* 2008; **83**(1): 64-76.
153. Gurbuzer B, Pikdoken L, Urhan M, Küçükodacı Z, Ercan F. Scintigraphic evaluation of early osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; **68**(5): 980-9.
 154. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 11. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2007. pp. 980-981.
 155. Gümüş P, Öztürk VÖ, Bozkurt E, Emingil G. Evaluation of the gingival inflammation in pregnancy and postpartum via 25-hydroxy-vitamin D3, prostaglandin E2 and TNF- α levels in saliva. *Arch Oral Biol*. 2016; 63:1-6.
 156. Habenicht AJR, Salbach P, Janben-Timmen U, Blattner C, Schettler G. Platelet-derived growth factor-a growth factor with an expanding role in health and disease. *Klin Wochenschr* 1990; **68**: 53-9.
 157. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1092**: 385-96.
 158. Halliwell B. Current status review . Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Path* 1989; **70**: 737-57.
 159. Ham AW, Cormack DH. *Histophysiology of Cartilage, Bones and Joints*. Philadelphia: JB Lippincott; 1979.
 160. Hannink M, Donoghue DJ. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochim Biophys. Acta* 1989; **989**: 1-10.
 161. Hanson SR, Slichter SJ. Platelet kinetics in patients with bone marrow hypoplasia: evidence for a fixed platelet requirement. *Blood* 1985; **66**: 1105-1109.
 162. Hara Y, Steiner M, Baldini MG. Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells. *Cancer research* 1980; **40**: 1212-6.
 163. Harre U, Schett G. Bone research in 2012: the ups and downs of bone in health and rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2013; **9**(2): 67-8.
 164. Hauschka PV, Mavrakos AE, Isafrati MD, Doleman SE, Klagsburn M. Growth factors in bone matrix isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-septanose. *J Biol Chem* 1986; **261**: 12665-12674.

165. Hayashi M, Nakashima T, Taniguchi M, Kodama T, Kumanogoh A, Takayanagi H. Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* 2012; **485**: 69–74.
166. Heaney RP, Guidelines for optimizing design and analysis of clinical studies of nutrient effects. *Nutr Rev* 2014; **72**: 48-54.
167. Heldin C H , Westermarck B. Platelet-derived growth factors: a family of isoforms that bind to two distinct receptors. *Br Med Bull* 1989; **45**: 453-64.
168. Hennon DK, Stookey GK, Beiswanger BB. Fluoride-vitamin supplements: effects on dental caries and fluorosis when used in areas with suboptimum fluoride in the water supply. *J Am Dent Assoc* 1977; **95**: 965–971.
169. Hennon DK, Stookey GK, Muhler JC. The clinical anticariogenic effectiveness of supplementary fluoride-vitamin preparations: results at the end of three years. *J Dent Child* 1966; **33**: 3–12.
170. Hirano S, Seino H, Akiyama I, Nonaka I. Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration. İçinde Gebelein GG, Dunn RL, editor. *Progress in Biomedical Polymers*. New York: Plenum Press; 1990. pp. 283-289.
171. Holick MF. Vitamin D: its role in cancer prevention and treatment. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; **92**(1) :49-59.
172. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon MC, Hanley DA, Heaney RP ve ark. Evaluation ,Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: 1911-30.
173. Holick MF, Krane SM, Potts JT. Calcium, phosphorus, and bone metabolism: Calcium-regulation hormones. İçinde Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 14th ed. New York: McGraw-Hill; 1995.
174. Holick MF. Vitamin D and bone health. *J Nutr* 1996; **126**: 1159-64.
175. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; **357**: 266–81.
176. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Rheum Dis Clin North Am* 2012; **38**: 141-60.
177. Holick M.F, DeLuca HF. Vitamin D metabolism. *Annual Review of Medicine* 1974; **25**: 349-367.

178. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; **1**: 60–68.
179. Hou YC, Wu CC, Liao MT, Shyu JF, Hung CF, Yen TH ve ark. Role of nutritional vitamin D in osteoporosis treatment. *Clinica Chimica Acta* 2018; **484**: 179-191.
180. Hu D, Wan H, Li S. The caries-inhibiting effect of a fluoride drop program: a 3-year study on Chinese kindergarten children. *Chinese J Dent Res* 1998; **1**: 17–20.
181. Hujoel PP. Vitamin D and dental caries in controlled clinical trials: systematic review and meta-analysis. *Nutr Rev* 2013; **71**: 88–97.
182. Hupp JR, Ellis III E, Tucker MR. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery. Sixth Edition. Amerika: Elsevier Mosby; 2014.
183. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
184. Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB ve ark. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *JAMA* 2004; **292**(17): 2105-14.
185. Iseki S, Wilkie AO, Morriss-Kay. FGFr1 and FGFr2 have distinct differentiation- and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development* 1999; **126**: 5611–620.
186. J.S. Price, B.O. Oyajobi and R.G.G. Russell The cell biology of bone growth
İnternet Web Sayfası. Erişim 08.03 .2020.
<http://archive.unu.edu/unupress/food2/UID06E/UID06E0U.HTM>
187. Jablanski S. Illustrated Dictionary of Dentistry. Philadelphi: WB Saunders Company; 1982.
188. Jagelaviciene E, Vaitkeviciene I, Silingaite D, Daugelaite G. The relationship between Vitamin D and Periodontal Pathology. *Medicina* 2018; **54**(3): 45.
189. Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; **95**(5): 559–569.

190. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta 1 to the bone. *Endocrine Reviews* 2006; **26**: 743-774.
191. Javed F, Malmstrom H, Kellesarian SV, Al-Kheraif AA, Vohra F, Romanos GE. Efficacy of Vitamin D₃ supplementation on osseointegration of implants. *Implant Dent* 2016; **25**(2): 281-7.
192. Jee WSS, Yao W. Animal models of bone diseases J. *Musculoskel. Neuron. Interact* 2001; **3**: 183-184
193. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. İçinde Cowin SC, editor. *Bone Mechanics Handboook*. Florida: CRC Press; 2001. pp. 1-68.
194. Jee WSS. Principles in bone physiology. *J. Musculoskeletal Interactions1* 2000 9-11
195. Jeon JS. Scrapbook anatomy. Bone. Erişim 12.07.2016, <http://www.nvo.com/jin/scrapbookanatomy/view.nhtml?profile=scrapbookanatomy&UID=10157>.
196. Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontology* 2000; **55**(1): 167-188.
197. Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS. Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their lifespan and reduce bone density. *Endocrinol* 2006; **147**: 5592-9.
198. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas S. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *T Clin Invest* 1999; **104**: 439-46.
199. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. 10. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi, 2003.
200. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology text&atlas*. 10. Baskı. Amerika: International Yayıncılık; 2013.
201. Kahn RA, Cossette I, Friedman LI. Optimum centrifugation conditions for the preparation of platelet and plasma products. *Transfusion* 1976; **16**: 162-165.
202. Kamen DL, Cooper GS, Bouali H, Shaftman SR, Hollis BW, Gilkeson GS. Vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2006; **5**(2): 114-117.

203. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 2008; **15**: 100–14.
204. Kane D. Chronic wound healing and chronic wound management. İçinde Krasner D, Rodeheaver GT, Sibbald RG, editors. *Chronic Wound Care: A Clinical Source Book for Healthcare Professionals*. 4th ed. Wayne, PA: Health Management Publications; 2006. pp. 11-24.
205. Karasik D, Rivadeneira F, Johnson ML. The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2016; **12**(6): 323-34.
206. Kawabata M, Miyazono K. Bone morphogenetic proteins. İçinde Canalis MDE editor. *Skeletal growth factors*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. pp 269 90.
207. Keating JF, O'Brien PJ, Blachut PA, Meek RN, Broekhuysen HM. Locking intramedullary nailing with and without reaming for open fractures of the tibial shaft. A prospective, randomized study. *J Bone Joint Surg Am* 1997; **79**(3): 334-41.
208. Kececi Y, Ozsu S, Bilgir O. A cost-effective method for obtaining standard platelet-rich plasma. *WOUNDS*. 2014; **26**: 232–238.
209. Kelly PJ, Montgomery RJ, Bronk JT. Reaction of the circulatory system to injury and regeneration. *Clin Orthop* 1990; **254**: 275-288.
210. Kemik Bilimi. <http://acikders.ankara.edu.tr/mod/resource/view.php?id=740&redirect=1> erişim: 06.04.2020
211. Kenan S, Onur ÖD, Solakoğlu S, Kotil T, Ramazanoğlu M, Çelik HH ve ark. Investigation of the effects of semaphorin 3A on new bone formation in a rat calvarial defect model. *J Craniomaxillofac Surg* 2019; **47**(3): 473-483.
212. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem*. 2018; **55**(3): 308 327
213. Khammisa RAG, Ballyram R, Jadwad Y, Fourie J, Lemmer J, Feller L. Vitamin D Deficiency as It Relates to Oral Immunity and Chronic Periodontitis. *International Journal of Dentistry*. 2018; **2018**: 1-10. <http://doi.org/10.1155/2018/7315797>.
214. Khan SN. Bone growth factors. *Orthop. Clin North Am* 2000; **31**: 375-388.
215. Khurana J, Jasvir S. *Bone Pathology*. Boston: Springer; 2009. pp.1-50.

216. Kılıçoğlu SS. Mikroskopi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2002; **55**: 143-150.
217. Kim KS, Lee Jy, Kang YM, Kim ES, Kim GH, Rhee SD ve ark. Small intestine submucosa sponge for in vivo support of tissue-engineered bone formation in the presence of rat bone marrow stem cells. *Biomater* 2010; **31**: 1104–1113.
218. Kim TH, Kim SH, Sándor GK, Kim YD. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol* 2014; **59**(5): 550-8.
219. Kingsley K, O'Malley S, Ditmyer M, Chino M. Analysis of oral cancer epidemiology in the US reveals state-specific trends: implications for oral cancer prevention. *BMC Public Health* 2008; **8**:87.
220. Kitase Y, Lee S, Gluhak-Heinrich J, Johnson ML, Harris SE, Bonewald LF. CCL7 is a protective factor secreted by mechanically loaded osteocytes. *J Dent Res*. 2014; **93**(11): 1108-15.
221. Kitchens CS, Weiss L. Ultrastructural changes of endothelium associated with thrombocytopenia. *Blood*. 1975; **46**:567-578.
222. Kiviranta R, Morko J, Alatalo SL, NicAmhlaoibh R, Risteli J, Laitala-Leinonen T ve ark. Impaired bone resorption in cathepsin K-deficient mice is partially compensated for by enhanced osteoclastogenesis and increased expression of other proteases via an increased RANKL/OPG ratio. *Bone* 2005; **36**(1): 159-72.
223. Knapczyk J, Krówczyński L, Krzck J, Brzeski M, Nirnberg E, Schenk D. ve ark. Requirements of chitosan for pharmaceutical and biomedical applications. İçinde Skak-Braek G, Anthonsen T, Sandford T, editor. *Chitin and Chitosan: Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*, Elsevier, London: Elsevier; 1989. pp. 657-663.
224. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D ve ark. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001; **16**(6): 1004–14.
225. Koul PA, Ahmad SH, Ahmad F, Jan RA, Shah SU, Khan UM. Vitamin D Toxicity in Adults: A Case Series from an Area with Endemic Hypovitaminosis D. *Oman Medical Journal* 2011; **26**(3): 201-204.

226. Kovacs K, Velich N, Huszar T, Szabo G., Semjen G, Reiczigel J ve ark. Comperative study of β -tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus β -tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry. *Acta Veterineria Hungarica* 2003; **51**: 475-484.
227. Krall EA, Wehler C, Garcia RI, Harris SS, Dawson – Hudhes B. Calcium and Vitamin D supplements reduce tooth loss in the elderly. *Am J Med* 2001; **111**: 452-6.
228. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation* 1998; **66**: 1272–1278.
229. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003; **423**: 332–6.
230. Kuchuk NO, Pluijm SM, van Schoor NM, Looman CWN, Smit JH, Lips P. Relationships of serum 25 hydroxyvitamin D to bone mineral density and serum parathyroid hormone and markers of bone turnover in older persons. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009; **94**(4): 1244-1250.
231. Kuchuk NO, van Schoor NM, Pluijm SM, Chines A, Lips P. Vitamin D status, parathyroid function, bone turnover, and BMD in postmenopausal women with osteoporosis: global perspective. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009; **24**(4): 693-701.
232. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry* 2012; **45**: 863–873.
233. Kume K, Satomura K, Nishisho S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S, Nagayama M. Potential Role of Leptin in Endochondral Ossification. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2012; **50**(2): 159–169.
234. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health* 2008; **122**(4): 417-433.
235. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Changes in transforming growth factor-beta1 in gingival crevicular fluid following periodontal surgery. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 527-533.

236. Kuyucu U, Alpağat Ş, Bender OM, İlkerli E, Köstem Şİ, Güler NT. Kemik Yapısı ve Kemik Metabolizmasında Osteoprotegerin, Rankl ve Rank İlişkisi [internetten erişim] Erişim Tarihi (06.04.2020) <http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/464/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmmpzsnm16/16.9.pdf>
237. Kühnisch J, Thiering E, Kratzsch J, Heinrich-Weltzien R, Hickel R, Heinrich J ve ark. Elevated serum 25(OH)-vitamin D levels are negatively correlated with MIH. *J Dent Res* 2015; 94: 381–387.
238. Landén NX, Li D, Ståhle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(20): 3861–3885.
239. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987; 18: 213- 25.
240. Langer R ,Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
241. Lanham-New SA. Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. *The Proceedings of the Nutrition Society* 2008; 67(2): 163-176.
242. Latalski M, Walczyk A, Fatyga M, Rutz E, Szponder T, Bielecki and Danielewicz A. Allergic reaction to platelet-rich plasma (PRP) *Medicine (Baltimore)* 2019; 98(10): e14702.
243. Laurell L, Falk H, Fornell J, Johard G, Gottlow J. Clinical use of a bioresorbable matrix barrier in guided tissue regeneration therapy. Case series. *J Periodontol* 1994; 65(10): 967-75.
244. Laurin N, Brown JP, Morissette J, Raymond V. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in paget disease of bone. *Am J Hum Genet* 2002; 70(6): 1582-8.
245. Lee UL, Jeon SH, Park JY, Choung PH. Effect of platelet-rich plasma on dental stem cells derived from human impacted third molars. *Regen Med.* 2011; 6: 67–79.
246. Leeson CR, Leeson TS. *Histology* 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1976. pp. 139-156.
247. Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S ve ark. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of

- specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone* 2005; **36**(2): 300–10.
248. Li Z, Kong K, Qi W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; **343**(2): 345–50.
 249. Lim V, Clarke BL. New therapeutic targets for osteoporosis: Beyond denosumab. *Maturitas* 2012; **73**(3): 269–272.
 250. Lindhe J. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. İçinde Lang N.P., Karring T., editors. *Anatomy of the Periodontium*. Fourth Edition. Copenhagen: Blackwell Munksgaard, Blackwell Publishing company; 2003. pp. 3–48.
 251. Liu Z, Yuan X, Fernandes G, Dziak R, Ionita CN, Li C, Wang C, Yang S. The combination of nano-calcium sulfate/platelet rich plasma gel scaffold with BMP2 gene-modified mesenchymal stem cells promotes bone regeneration in rat critical-sized calvarial defects. *Stem Cell Res Ther* 2017; **8**(1): 122.
 252. Lucarelli, E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM ve ark. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; **24**(18): 3095–100.
 253. Lumachi F, Camozzi V, Tombolan V, Luisetto G. Bone mineral density, osteocalcin, and bone-specific alkaline phosphatase in patients with insulin dependent diabetes mellitus, *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173 Suppl 1: E64–7.
 254. Lundquist R, Dziegiel MH, Agren MS. Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen* 2008; **16**: 356–363.
 255. Lyon T, Scheele W, Bhandari M, Koval KJ, Sanchez EG, Christensen J ve ark. Efficacy and safety of recombinant human bone morphogenetic protein-2/calcium phosphate matrix for closed tibial diaphyseal fracture: a double-blind, randomized, controlled phase-II/III trial. *J Bone Joint Surg Am* 2013; **95**(23): 2088–96.
 256. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Investig*. 1985; **76**: 1536–8.

257. MacLeod J. *Davidson's Principles and Practice of Medicine*. 13th ed. UK: Edinburgh; 1981. pp. 590-592.
258. Mandair G.S, Morris MD. Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *Bonekey Rep* 2015; **4**:620.
259. Mangano F, Mortellaro C, Mangano N, Mangano C. Is low serum Vitamin D associated with early dental implant failure? A retrospective evaluation on 1625 implants placed in 822 patients *Mediators Inflamm* 2016; **2016**: 5319718.
260. Mann J, Horesh E, Ran F, Gedalia I. The effect of fluoride drop administration on dental caries increment: a longitudinal study. *Isr J Dent Sci* 1989; **2**: 148–152.
261. Mariano R, Messori M, de Moraes A, Nagata M, Furlaneto F, Avelino C ve ark. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; **109**(1): 72–78.
262. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *The American Journal of Anatomy* 1988; **183**: 1-44.
263. Marlovits S, Mousavi M, Gabler C, Erdös J, Vécsei V. A newsimplified technique for producing platelet-rich plasma: A short technical note. *Eur Spine J* 2004; **13**: 102–06.
264. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; **42**(6): 551–5.
265. Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal A, Sola I, Bolibar I, Angel Exposito J, Rodriguez L ve ark. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion* 2009; **49**: 44-56.
266. Marx RE, Kline SN, Johnson RP, Malinin TI, Matthews JG, Gambil V. The use of free dried allogenic bone in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Surg* 1981; **39**: 264 274.
267. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent* 2001; **10**: 225-8.

268. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; **62**: 489–496.
269. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992; **63**: 515-525.
270. McCauley LK, Somerman MJ. Biologic modifiers in periodontal regeneration. *Dental Clinics of North America* 1998; **42 part I**: 361-386.
271. McNicol A. Platelet preparation and estimation of functional responses. İçinde Watson SP, Authi KS. *Platelets–A Practical Approach*. Oxford: University Press; 1996. pp. 1–26.
272. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008; **22**: 432-8.
273. Mescher Al. *Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap*. İstanbul: Nobel Yayınevi; 2009
274. Messori M, Braga L, Oliveira G, Oliveira LF, Milagres R, Kawata L ve ark. Healing of fresh frozen bone allograft with or without platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rats. *Clin Implant Dent Relat Res* 2013; **15**(3): 438-47.
275. Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WS. Characterization of endosteal bone lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 1980; **198**: 163-173.
276. Miller MR, Kashara M. Observations on the innervation of human long bones. *Anat Rec* 1963; **145**: 13-23.
277. Mishra A, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; **13**: 1185-95.
278. Moed BR, Watson JT, Goldschmidt P, van Holsbeeck M. Ultrasound for the early diagnosis of fracture healing after interlocking nailing of the tibia without reaming. *Clin Orthop Relat Res* 1995; **310**: 137-44.
279. Moldauer I, Velez I, Kuttler S. Upregulation of basic fibroblast growth factor in human periapical lesions. *J Endod.* 2006; **32**(5): 408-11.
280. Monoli A. *Maxillofacial Trauma*, Baltimore: The Williams and Wilkins; 1984.
281. Mooney MP, Siegel MI. Animal models for bone tissue engineering of critical-sized defects (CSDs), bone pathologies, and orthopedic disease states. İçinde

- Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C editors. *Bone Tissue Engineering*. Boca Raton, FL: C.R.C. Press; 2005. p. 217-244.
282. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; **71**: 354-61.
 283. More RC, Kody MH, Kabo JM, Dorey FJ, Meals RA. The effects of two nonsteroidal antiinflammatory drugs on limb swelling, joint stiffness, and bone torsional strength following fracture in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res*. 1989 ;**247**: 306-12.
 284. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; **505**(7483): 327-334.
 285. Mounika B., Kumar PP. Hormones. *International Journal of Advancement in Engineering Technology, Management and Applied Science* 2017; **4**(2): 54-62.
 286. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; **14**(2): 179–86.
 287. Munhoz MAS, Hirata HH, Plepis AMG, Martins VCA, Cunha MR. Use of collagen/chitosan sponges mineralized with hydroxyapatite for the repair of cranial defects in rats. *Injury* 2018; **49**(12): 2154–2160.
 288. Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T et al. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res* 1999; **34**: 425-430.
 289. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, et al Recombinant human basic fibroblast growth factor stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res* 2003; **38**: 97-103.
 290. Nachman RL, Rafii S. Platelets, petechiae, and preservation of the vascular wall. *The New England journal of medicine* 2008; **359**: 1261-1270.
 291. Nagata M, Messori M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone* 2009; **45**(2): 339-45.

292. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ ve ark. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011; **17**(10): 1231-4.
293. Natri L, Moretti A, Migliaccio S, Paoletta M, Annunziata M, Liguori S ve ark. Do Dietary Supplements and Nutraceuticals Have Effects on Dental Implant Osseointegration? A Scoping Review. *Nutrients* 2020; **12**(1): 268.
294. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cholecalciferol, CID=5280795, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholecalciferol> (accessed on Apr. 3, 2020).
295. Neale SD, Smith R, Wass JA, Athanasou NA. Osteoclast differentiation from circulating mononuclear precursors in Paget's disease is hypersensitive to 1,25- dihydroxyvitamin D(3) and RANKL. *Bone* 2000; **27**(3): 409-16.
296. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and semaphorins. *Bonekey Rep* 2012; **1**:183.
297. Neligan PC. Plastic Surgery. İçinde Seitz IA, Teven CM, Reid RR, editors. *Repair and Grafting of Bone*. Amerika: Elsevier Saunders Publishing; 2013. pp. 425-463.
298. Niedźwiedzki T, Filipowska J. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *J Mol Endocrinol* 2015; **55**(2): 23-36
299. Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosey JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; C934-C943.
300. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA ve ark. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinol* 2004; **145**: 1835–41.
301. Ooms ME, Lips P, Van Lingen A, Valkenburg HA. Determinants of bone mineral density and risk factors for osteoporosis in healthy elderly women. *Journal of Bone and Mineral Research* 1993; **8**: 669-675.

302. Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* 2002; **16**: 1446–65.
303. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2004; **9**: 18
304. Osafi J, Hejazi A, Stutz DD, Keiserman MA, Bergman CJ, Kingsley K. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on oral squamous cell carcinomas in vitro. *Journal of Dietary Supplements*. 2014; **11**(2): 145-154.
305. Owen Helen C. The cellular and molecular mechanisms of glucocorticoid-induced growth retardation. PhD thesis. University of Glasgow. 2008.
306. Ozaki A. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats. Interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000; **5**: 64-70.
307. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2008; **6**: 23-31.
308. Özer A. Kemik Dokusu. İçinde E. H, editor. *Histoloji*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Yayınevi; 2001. Pp. 237-262.
309. Özkan B, Döneray H. D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011; **54**(2): 99-119.
310. Panjabi MM, Walter SD, Karuda M, White AA, Lawson JP. Correlations of radiographic analysis of healing fractures with strength: a statistical analysis of experimental osteotomies. *J Orthop Res* 1985; **3**(2): 212-8.
311. Papagerakis P, MacDougall M, Hotton MD, Bailleul-Forestier I, Oboeuf M, Berdal A. Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone* 2003; **32**: 228–240.
312. Parker MH, Kuru L, Giouzei M, Olsen I. Expression of growth-factor receptors in normal and regenerating human periodontal cells. *Arch Oral Biol* 2001; **46**: 275-284.
313. Pass D, Freeth G. The rat. *Anzccart News*. 1993; **6**: 1–4.
314. Paul F. *Calcium Metabolism of Bone* 2nd ed. Oxford, Edinburgh: Blackwell Scientific; 1968.

315. Perren SM, Claes L. Kırık tedavisinde biyoloji ve biyomekanik. İçinde Rüedi TP, Murphy WM, Colton CL, Dell Oca AF, Holz U, Kellam JF ve ark. editörler. *Kırık Tedavisinde AO Kuralları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006. pp. 7–30.
316. Petti S, Cairella G, Tarsitani G. Nutritional variables related to gingival health in adolescent girls. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000; **28**: 407-413.
317. Petti S, Cairella G, Tarsitani G. Rampant early childhood dental decay: an example from Italy. *J Public Health Dent* 2000; **60**: 159-166.
318. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. 2005; **36**: 5-7.
319. Plachokova AS, van den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. *Clin Oral Implants Res* 2007; **18**(2): 244-51.
320. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner C, Hollis BW, Grant WB ve ark. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-A review of recent evidence. *Autoimmunity Reviews* 2013; **12**(10): 976-989.
321. Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol* 1983; **54**(3): 141-7.
322. Polson AM. *Periodontal Regeneration. Current Status and Directions*. Chicago: Quintessence; 1994.
323. Prockop DJ, Kivirikko K.I, Tuderman L, and Guzman NA. The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med* 1979; **301**: 13-23.
324. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 2008; **118**: 3820-8
325. Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition* 2005; **21**: 775–7.
326. Rahn, BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. İçinde Fackelman GE, editor. *Bone in Clinical Orthopedics*. Stuttgart,. New York: Thieme; 2002. pp.287 326.
327. Rai R, Raval R, Khandeparker RV, Chidrawar SK, Khan AA, Ganpat MS. Tissue Engineering: Step Ahead in Maxillofacial Reconstruction. *J Int Oral Health* 2015; **7**(9): 138-42.

328. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem* 1999; **45**: 1353-1358.
329. Rajakumar K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: A historical perspective. *Pediatrics* 2003; **112**: 132-135.
330. Ralston SH, Uitterlinden AG, Brandi ML, Balcells S, Langdahl BL, Lips P ve ark. Large-scale evidence for the effect of the COL1A1 Sp1 polymorphism on osteoporosis outcomes: the GENOMOS study. *PLoS Med* 2006; **3**(4): e90
331. Reed LK, Mormino MA. Functional outcome after blade plate reconstruction of distal tibia metaphyseal nonunions: a study of 11 cases. *J Orthop Trauma* 2004 ;**18** :81-6.
332. Renvert S. Destructive periodontal disease in relation to diabetes mellitus, cardiovascular diseases, osteoporosis and respiratory diseases. *Oral Health Prev Dent* 2003; **1**(1): 341- 357.
333. Retrieved from https://www.biology-online.org/dictionary/Haversian_system
334. Ribba L, Parisi M, D'Accorso N, Goyanes S. Electrospun nanofibrous mats: from vascular repair to osteointegration. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2014; **10**: 3508-3535.
335. Richard WH. Youmans Neurological Surgery. İçinde Lebow R, Yao T, Stevenson CB, Cheng JS, editors. Bone Graft Options, Bone Graft Substitutes, and Bone Harvest Techniques. Amerika: Elsevier Saunders Publishing; 2011. pp. 2992-2998.
336. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV ve ark. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med* 2009; **151**(8): 528-37.
337. Robinson C, Connell S, Kirkham J, Brookes SJ, Shore RC, Smith AM. The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Res* 2004; **38**: 268–276.
338. Roffi A, Di Matteo B, Krishnakumar, G.S, Kon E, Filardo G. Platelet-rich plasma for the treatment of bone defects: from pre-clinical rational to evidence in the clinical practice. A systematic review. *International Orthopaedics (SICOT)* 2017; **41**: 221–237.

339. Rutherford RB, Trailsmith MD, Ryan ME, Charette MF. Synergistic effects of dexamethasone on platelet derived growth factor mitogenesis in vitro. *Arch Oral Biol* 1992; **37**: 139-145
340. Rutkowski JL, Johnson DA, Radio NM, Fennell JW. Platelet rich plasma to facilitate wound healing following tooth extraction. *J Oral Implantol* 2010; **36**: 11–23.
341. Safadi FF, Barbe MF Abdelmagid S, Rico M, Aswad RA, Litvin J ve ark Bone Structure, Development and Bone Biology. In Khurana J.S, editor. Bone Pathology. Boston: Springer; 2010. pp. 2-51.
342. Sağlam M, Özer A, Aştı RN. *Genel Histoloji*. 6. Baskı. Ankara: Yorum Yayınevi, 2008.
343. Sambrook PN, Hughes DR, Nelsen AE, Robinson BG, Mason RS. Osteocyte viability with glucocorticoid treatment: relation to histomorphometry. *Ann Rheum Dis* 2003; **62**: 1215–7.
344. Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries: a review. *Curr Rev Musculoskelet Med* 2008; **1**: 165-74.
345. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol* 2008; **26**(5): 910-3.
346. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* 2007;**35**(2): 245-51.
347. Sarmiento A, Sobol PA, Sew Hoy AL, Ross SD, Racette WL, Tarr RR. Prefabricated functional braces for the treatment of fractures of the tibial diaphysis. *J Bone Joint Surg Am* 1984; **66**(9): 1328-39.
348. Schenk RK. Bone Regeneration: Biological Basis. İçinde Buser D, Dahlin C, Schenk RK, editors. *Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry*. Hong Kong: Quintessence publishing; 1994. pp. 49–100.
349. Schenk RK. Histophysiology of bone remodeling and bone repair. İçinde Lin OCC, Chao EVS, editors. *Perspectives on Biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1986. pp. 75-94.

350. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop* 1986; **205**: 299–308.
351. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)* 1990; **138**: 185–192.
352. Schroth RJ, Lavelle C, Tate R, Bruce S, Billings RJ, Moffatt ME. *Prenatal vitamin D and dental caries in infants. Pediatrics* 2014; **133**: 1277–1284.
353. Schroth RJ, Levi JA, Sellers EA, Friel J, Kliewer E, Moffatt ME. Vitamin D status of children with severe early childhood caries: a case-control study. *BMC Pediatr* 2013; **13**:174.
354. Schüppbach P, Gaberthüel T, Lutz F, Guggenheim B. Periodontal repair or regeneration: structures of different types of new attachment. *J Periodontal Res* 1993; **28**: 281-293.
355. Sclafani AP. Platelet-rich fibrin matrix for improvement of deep nasolabial folds. *J Cosmet Dermatol* 2010; **9**: 66-71.
356. SEER - U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (<http://training.seer.cancer.gov/index.html>) Exact adress <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html> Erişim.18.03.2020.
357. Senet P, Bon FX, Benbunan M, Bussel A, Traineau R, Calvo F ve ark. Randomized trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers. *J Vasc Surg* 2003; **38**: 1342–8.
358. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; **219**: 983–985.
359. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: how old is it in comparison with human age? *Biomed Int* 2012; **2**:81–9.
360. Sengupta P. Challenge of infertility: How protective the yoga therapy is? *Anc Sci Life* 2012; **32**: 61–2.
361. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med.* 2013; **4**(6): 624-30.

362. Seyhan N, Keskin S, Aktan M, Avunduk MC, Sengelen M, Savaci N. Comparison of the effect of platelet-rich plasma and simvastatin on healing of critical-size calvarial bone defects. *J Craniofac Surg* 2016; **27**(5): 1367-70.
363. Shahidi F, Synowiecki J. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1991; **39**(8): 1527–32.
364. Shapiro F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am* 1988; **70**(7): 1067–81.
365. Shimoaka T, Ogasawara T, Yonamine A, Chikazu D, Kawano H, Nakamura K ve ark. Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem* 2002; **277**: 7493–500.
366. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001; **22**: 2581-2593.
367. Silva RF, Silva Sasso GR, Cerri ES, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International* 2015; **2015**: 421746. Article ID 421746: 17
368. Simmons DJ. Fracture healing. İçinde Urist MR, editor. *Fundamental and Clinical Bone Physiology*. Philadelphia; JB Lippincott; 1980. pp. 283-330.
369. Skoog A, Söderqvist A, Törnkvist H, Ponzer S. One-year outcome after tibial shaft fractures: results of a prospective fracture registry. *J Orthop Trauma* 2001; **15**: 210- 5.
370. Smith MA, Jones EA, Strachan RK, Nicoll JJ, Best JJ, Tothill P ve ark. Prediction of fracture healing in the tibia by quantitative radionuclide imaging. *J Bone Joint Surg Br* 1987; **69**(3): 441-7.
371. Smrke D, Gubina B, Damanovic D, Rozman P. Allogeneic platelet gel with autologous cancellous bone graft for the treatment of a large bone defect. *Eur Surg Res* 2007; **39**: 170–174.

372. Sobacchi C, Frattini A, Guerrini MM, Abinun M, Pangrazio A, Susani L ve ark. Osteoclast-poor human osteopetrosis due to mutations in the gene encoding RANKL. *Nat Genet* 2007; **39**(8): 960-2.
373. Sobacchi C, Frattini A, Orchard P, Porras O, Tezcan I, Andolina M ve ark. The mutational spectrum of human malignant autosomal recessive osteopetrosis. *Hum Mol Genet* 2001; **10**(17): 1767-73.
374. Son SR, Sarkar SK, Nguyen-Thuy BL, Padalhin AR, Kim BR, Jung HI ve ark. Platelet-rich plasma encapsulation in hyaluronic acid/gelatin-BCP hydrogel for growth factor delivery in BCP sponge scaffold for bone regeneration. *J Biomater Appl* 2015; **29**(7): 988-1002.
375. Song JM, Shin SH, Kim YD, Lee JY, Baek YJ, Yoon SY ve ark. Comparative study of chitosan/fibroin-hydroxyapatite and collagen membranes for guided bone regeneration in rat calvarial defects: micro-computed tomography analysis. *Int J Oral Sci* 2014; **6**(2): 87–93..
376. Sonleitner D, Huemer P, Sullivan DY. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000; **15**: 879-882.
377. Soydan N. *Genel Histoloji*. İstanbul: İstanbul İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi; 1985.
378. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012; **7**(10): 1918–1929.
379. Stephan SJ, Tholpady SS, Gross B, Petrie-Aronin CE, Botchway EA, Nair LS, Ogle RC, Park SS. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope* 2010; **120**(5): 895-901.
380. Stevens MM. Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *Materials Today* 2008; **11**: 18-25.
381. Su CY, Kuo YP, Nieh HL, Tseng YH, Burnouf T. Quantitative assessment of the kinetics of growth factors release from platelet gel. *Transfusion* 2008; **48**: 2414–2420.
382. Sussman C, Bates-Jensen BM. Wound healing physiology: Acute and chronic. İçinde Sussman C, Bates-Jensen BM, editors. *Wound Care: A Collaborative*

- Practice Manual for Health Professionals, 3rd edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams and Wilkins; 2007. pp. 21-51.
383. Suttie JW. Vitamin K. İçinde Coates PM, Betz JM, Blackman MR, ve ark. editors *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 2nd ed. London and New York: Informa Healthcare; 2010. pp. 851-60.
 384. Suttie JW. Vitamin K. İçinde Ross AC, Caballero B, Cousins RJ, Tucker KL, Ziegler TR, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 11th ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2014. pp. 305-16.
 385. Swenson CL, Arnoczky SP. Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am* 2003; **85-A**(2): 323-32.
 386. Syed N, Chiu GA, Korczak P. Should patients take Vitamin D before mandibular operations? *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2017; **55**(8): 841-843.
 387. Sykaras N, Opperman LA. Bonemorphogenetic proteins (BMPs): How do they function and what can they offer the clinician? *Journal of Oral Science* 2003; **45**: 57-73.
 388. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate- based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002; **25**(5): 601-9.
 389. Şahin M, Demirağ NG. Osteoporoz: tanı ve tedavide yenilikler. *TOTBİD* 2004; **3**(1-2): 1-10.
 390. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik Greftler ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. *TOTBİD Dergisi* 2004; **3**: 3-4.
 391. Tabatabaei-Malazy O, Salari P, Khashayar P, Larijani B. New horizons in treatment of osteoporosis. *Daru* 2017; **25**(1): 2-16.
 392. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg* 1982; **196**: 100–109.
 393. Ten Cate AR. *Oral Histology Development, Structure and Function*. ABD: Mosby; 1994.
 394. Terranova VP, Odziemiec C, Tweden KS, Spadone DP. Repopulation of dentin surfaces by periodontal ligament cells and endothelial cells. Effect of basic fibroblast growth factor. *J Periodontol* 1989; **60**: 293-301.

395. Thibodeau GA, Patton KT. *Anatomy and Physiology- Text and Laboratory Manual Package*. Amerika: Elsevier Science Health Science Division; 2006.
396. Thomas-Valdés S, Tostes MDGV, Anunciação P.C, da Silva B.P, Sant'Ana, H.M.P. Association Between Vitamin Deficiency and Metabolic Disorders Related to Obesity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2016; **57**(15): 3332–3343.
397. Toosi S, Behravan, J. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides. *BioFactors* 2019; 1–15. <https://doi.org/10.1002/biof.1598>
398. Topaloğlu U, Ketani MA, Saruhan BG. Kemik Doku ve Kemikleşme Çeşitleri, *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2017; **10**(1): 62-71.
399. Tower SS, Beals RK, Duwelius PJ. Resonant frequency analysis of the tibia as a measure of fracture healing. *J Orthop Trauma* 1993; **7**: 552-7.
400. Tsai CH, Shen SY, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *J Dent Sci* 2009; **4**: 130–135.
401. Tsiaras WG, Weinstock MA. Commentary: ultraviolet irradiation and oral ingestion as sources of optimal vitamin D. *J Am Acad Dermatol* 2010; **62**: 935-6.
402. Tunçay Ekin Ö. (2013) Biyomimetik Yöntemle Bor Katkılı Doku İskelelerinin Geliştirilmesi ve Kemik Doku Mühendisliğindeki Etkinliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. S. 4-7, Ankara.
403. Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather- Tait S, Heinonen M ve ark. EFSA panel on dietetic products, nutrition and allergies. Dietary reference values for vitamin K. *EFSA Journal* 2017; **15**: 4780.
404. Tükenmez M, Tezeren G. The treatment of adult segmented tibial shaft fractures with Ilizarov circular external fixator. *Türkiye Klinikleri J Medical Sci* 2007; **27**: 379-85.
405. Tweden KS, Spadone DP, Terranova VP. Neovascularization of surface demineralized dentin. *J Periodontol* 1989; **60**: 460-466.
406. Uitterlinden AG, Ralston SH, Brandi ML, Carey AH, Grinberg D, Langdahl BL, Lips P ve ark. The association between common vitamin D receptor gene

- variations and osteoporosis: a participant-level meta-analysis. *Ann Intern Med* 2006; **145**(4): 255- 64
407. Umeno Y, Okuda A, Kimura G. Proliferative behaviour of fibroblasts in plasma-rich culture medium. *Journal of cell science*. 1989; **94**(Pt 3): 567-575.
 408. US Department of Health and Human Services. *The Surgeon General's Call to Action to Prevent Skin Cancer*. 2014.
 409. Uwitonze AM, Murererehe J, Ineza MC, Harelimana EI, Nsabimana U, Uwambaye P ve ark. Effects of vitamin D status on oral health. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2016; **175**: 190-194.
 410. Uwitonze AM, Uwambaye P, Isyagi M, Mumena CH, Hudder A, Haq A ve ark. Periodontal diseases and adverse pregnancy outcomes: Is there a role for vitamin D? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2018; **180**: 65-72.
 411. Van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, Hweison M, Chiaba H, Uitterlinden AG ve ark. Evidence for auto/ paracrine actions of vitamin D in bone: 1alpha-hydroxylase expression and activity in human bone cells. *Faseb J* 2006; **20**: 2417– 2419.
 412. Van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, Balcells S, Brandi ML, Brixen K, Kiel DP ve ark. Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA* 2008; **299**(11): 1277-90.
 413. Viateau V, Logeart-Avramoglou D, Guillemain G, Petite H. Animal models for bone tissue engineering purposes. İçinde Conn P, editor. *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press; 2008.
 414. Wacker M, Holick MF. Vitamin D-Effects on Skeletal and Extraskkeletal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients* 2013; **5**: 111-48.
 415. Wactawski-Wende J, Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms, *Ann Periodontol* 2001; **6**(1): 197-208.
 416. Wahl LM, Wahl SM. Inflammation. İçinde Cohen IK, Diegelman RF, Lindblad WJ, editors. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1992. pp. 40-62.
 417. Walsh S, Jefferiss CM, Stewart K, Beresford JN. IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone* 2003; **33**: 80–9.

418. Wang J, Glimcher MJ. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: I. Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. *Calcif Tissue Int* 1999; **65**: 156–165.
419. Wang NJ, Riordan PJ. Fluoride supplements and caries in a non-fluoridated child population. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; **27**:117–123.
420. Ware J Jr, Kosinski M, Keller SD. A 12-Item Short-Form Health Survey: construction of scales and preliminary tests of reliability and validity. *Med Care* 1996; **34**(3): 220–33.
421. Waters JH, Roberts KC. Database review of possible factors influencing point-of-care platelet gel manufacture. *J Extra Corpor Technol* 2004; **36**: 250–4.
422. Watson SP, Authi KS. editors. *Platelet preparation and estimation of functional responses, in Platelets—A Practical Approach*. Oxford: University Press; 1996. pp. 1–26.
423. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; **34**(4): 665–671.
424. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002; **30**: 97–102.
425. Weiner S, Wagner H.D. The Material bone: structure-mechanical function relations annual review of materials. *Science* 1998; **28**: 271–298.
426. Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T et al. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1041–8.
427. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids: potential mechanisms of the deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 1998; **102**: 274–82.
428. Wheeler PR, Burkitt H.G, Daniels V.G *Functional Histology*. New York: Churchill Livingstone; 1987

429. Whyte MP. The long and the short of bone therapy. *N Engl J Med* 2006; **354**: 860-863.
430. Yang YQ, Tan YY2, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. (2012) The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Ossification. *International Journal of Oral Science* 2012; **4**: 64–68.
431. Yanık S, Keskinrüzğar, A, Aras, M, Çetiner, S. Vitamin D'nin biyolojik önemi ve diş hekimliği ile olan ilişkisi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2015; **25**: 128-134.
432. Yılmaz B, Kesikburun S. Plateletten Zengin Plazma Uygulamaları. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2013; **59**: 338-44.
433. Youssef DA, Miller CW, El-Abbassi AM, Cutchins DC, C. Cutchins C, Grant, WB, Peiris AN. Antimicrobial implications of vitamin D, *Dermatoendocrinol* 2011; **3**(4): 220-229.
434. Yu-Yahiro JA, Michael RH, Dubin NH, Fox KM, Sachs M, Hawkes WG ve ark. Serum and urine markers of bone metabolism during the year after hip fracture. *J Am Geriatr Soc* 2001; **49**(7): 877–83.
435. Zhang X, Siclari VA, Lan S, Zhu J, Koyama E, Dupuis HL ve ark. The Critical Role of the Epidermal Growth Factor Receptor in Endochondral Ossification. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001; **26**(11): 2622–2633.
436. Zhou D, Qi C, Chen YX, Zhu YJ, Sun TW, Chen F ve ark. Comparative study of porous hydroxyapatite/chitosan and whitlockite/chitosan scaffolds for bone regeneration in calvarial defects. *Int J Nanomedicine* 2017; **12**: 2673–2687.
437. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J ve ark. Different preparation methods to obtain platelet component as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001; **41**: 1217-24.
438. Zohar R, Tenenbaum HC. How predictable are periodontal regenerative procedures. *J Can Dent Assoc* 2005; **71**: 675-680.

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 13/12/2017-466879



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı



Sayı :35980450-050.01.04-
Konu :Prof.Dr. Mehmet YALTIRIK'a ait
Etik Kurul Onayı.

Sayın Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK

İlgi :23.11.2017 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, "Vitamin D ve PRP İçeren Biyouyumlu Taşıyıcıların
Sıçan Kalvaryasında Oluşturulan Kemik Defektleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması"
başlıklı projeniz Etik Kurul'muzun 30.11.2017 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, Etik
Kurul Onayı ilişkide gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Fatma Alev KAYMAZ
Başkan

Doğrulamak için: <http://194.27.128.66/envision.Sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENNAU4T3>

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Canan SÖNMEZTÜRK

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlığı
nolu oda Avcılar/İSTANBUL

Tel : (212) 473 7070 Faks : (212) 440 03 77

e-posta : hadyek@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbul.edu.tr





T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayın Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Başvuru : 23.11.2017

Toplantı Tarihi : 30.11.2017

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen "Vitamin D ve PRP İçeren Biyouyumlu Taşıyıcıların Sıçan Kalvaryasında Oluşturulan Kemik Defektleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Sıçan
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	52
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	05/12/2017 - 31/12/2018	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Prof. Dr. Ufuk ÇAKATAY
Üye

Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL
Üye

Doç. Dr. Alper OKYAR
Üye

Doç. Dr. Aygül EKİCİ
Üye

Doç. Dr. Uğur AKSU
Üye

Yard. Doç. Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Yrd. Doç. Dr. Aydın ÇEVİK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Dr. Burak OLGUN
Mak.Ynk. Müh
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

D VİTAMİNİ VE PRP İÇEREN BİYUYUMLU TAŞIYICILARIN SIÇAN KALVARYASINDA OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**6**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%**4**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%**2**

2

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

3

www.slideserve.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

www.biyologlar.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

tede.pucrs.br

İnternet Kaynağı

<%**1**

6

Cevat Tuğrul TURGUT, Alen PALANCIOĞLU,
Mehmet YALTIRIK. "Vitamin D and It's
Importance in Oral Healt", Türkiye Klinikleri
Journal of Dental Sciences, 2018

Yayın

<%**1**

7

dergipark.ulakbim.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Cevat Tuğrul	Soyadı	Turgut
Doğ.Yeri	Fatih	Doğ.Tar.	20.06.1990
Email	ctugrulturgut61@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Doktora Programı, Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı	2020
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	2013
Lise	Büyükşehir Hüseyin Yıldız Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi		60

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	78,84983	78,11988	64,80599
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	Orta

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Elektro Cerrahinin Diş Hekimliğinde Kullanımı – İstanbul Diş Hekimleri Odası – Dergi 2013/Sayı 150/Syf 54

Oral Antikoagülanların Değişen Yüzü The Changing Face of Oral Anticoagulants - Dicle Diş Hekimliği Dergisi, 2016; Cilt 17, Sayı: 1, 178-183.

Bimaksiller Hiperatrofisi Olan Hastanın İlyak Krest Kemik Grefti İle Rekonstrüksiyonu – Vaka Raporu; Reconstruction of Bimaxillary Alveolar Atrophy with Iliac Crest Bone Graft: A Case Report Oral Implantoloji Dergisi Cilt 16, Sayı 2, Kasım 2015 Sayfa 26-29

Periimplantitisin Tedavisindeki Güncel Yaklaşımlar - İstanbul Diş Hekimleri Odası Dergisi Sayı 164; Sayfa 42-47

İki Farklı İmplant Üstü Lokatör Protez Bağlantı Sisteminin Hayatta Kalış Süresi Ve Başarı Oranlarının Karşılaştırılması ve Literatür Derlenmesi Türkiye Klinikleri Dergisi 2016-51718 Rejenerasyon Teknikleri Özel Sayısı

Zimmer Tek Parça (One-Piece) İmplantların İki Yıllık Takip Sonuçlarının Retrospektif Olarak Değerlendirilmesi Ve Literatür Taraması Türkiye Klinikleri Dergisi 2016-51736 Rejenerasyon Teknikleri Özel Sayısı

Temporomandibular eklem bozuklukları ve teşhisi Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 7tepe Klinik Dergisi, vol.13, pp.43-50, 2017

Temporomandibular bozuklukların tedavileri Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 7tepe Klinik Dergisi, vol.13, pp.44-50, 2017

The Effects of Intraarticular Injections of Botulinum Toxin A on Experimentally Temporomandibular Joint Osteoarthritis Models Clinical and Experimental Health Sciences, vol.1, pp.21-24, 2017

Biomaterial Used in Trauma Patients Intechopen, London, ss.1-12, 2018 DOI: 10.5772/intechopen.81004

Trauma in Dentistry Biomaterial Used in Trauma Patients Intechopen, Londra, ss.41-52, 2018 DOI: 10.5772/intechopen.81004

Maksiller Sinüste Taşkın Dolgu ve Kök TAOMS 2016, Muğla, Türkiye, ss.78

Maksillo Fasiyal Bölgenin Kistleri TAOMS 2016 Bodrum Türk Oral ve Maksillo Fasiyal Cerrahi Derneği 24. Uluslararası Bilimsel Kongresi Oral Presentation

Travma Sonucu Kaybedilen Santral Diş Bölgesinin Restorasyonu ve Estetik Sonuçları
TAOMS 2016 Bodrum Türk Oral ve Maksillo Fasiyal Cerrahi Derneği 24. Uluslararası
Bilimsel Kongresi

Rare Occurrence of Inverted Second and Third Molar Impactions and Possible Surgical
Protocols: Report of 4 Cases TAOMS 2017, Muğla, Türkiye, ss.196

Odontogenic keratocyst treatment and following up-A case report FDI World Dental
Congress, Buenos Aires, Arjantin, 2 - 04 September 2018, ss.62

Odontoma oluşumuna bağlı olarak gömülü kalmış dişin cerrahi sonrası sürdürülmesi
Turkish Association of Oral and Maxillofacial Surgery 25th International Scientific
Congress, Girne, Kıbrıs (KKTC), 13 - 17 May 2018, ss.40

Maksiller sağ ön bölgesinde ekspansif kist: Vaka sunumu. Turkish Association of Oral
and Maxillofacial Surgery 25th International Scientific Congress, Girne, Kıbrıs
(KKTC), 13 - 17 May 2018, ss.44

The Treatment of Inflammattory Large Odontogenic Cyst. IAOM-ACBID Joint
Congress in Conjunction with ACBID 12th Congress, Antalya, Türkiye, 9 - 13 May
2018, ss.25

D Vitamini ve Diş Sağlığındaki Önemi Vitamin D and It's Importance in Oral Health
Türkiye Klinikleri J Dental Sci. 2018;24(3):239-47 doi: 10.5336/dentalsci.2017-56463

Survival and Success Rate of Implant Supported Overdentures with Different
Attachment Systems FC124 Oral Presentation FDI 2018 Buenos Aires

Büyük İnflamatuvar Odontojenik Kistin Tedavisi; Olgu Sunumu The Treatment of
Inflammatory Large Odontogenic Cyst; A Case Report TDB 2018 Ankara

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Akıl Notları Maksiller Sinüs ve Hastalıkları Akıl Notları
Bölüm-12 In book: Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Akıl Notları Publisher: Güneş Tıp
Kitabevleri 201-222

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Akıl Notları Dental İmplant Uygulamaları Akıl Notları
Bölüm-13 In book: Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Akıl Notları Publisher: Güneş Tıp
Kitabevleri 223-240

Alternative Strategies For The Management Of Postoperative Complications In Patients
With Orthognathic Surgery - Ortognatik Cerrahi Uygulanan Hastalarda Postoperatif
Komplikasyonların Yönetiminde Alternatif Stratejiler Dental and Medical Journal –
Review e-ISSN 2667-7288 Vol 2, Issue 1, (2020)

Kongre – Kurslar

FDI 2013 Istanbul 101st Annual World Dental Congress (2013)

The 60th IADS&YDW Annual World Dental Congress (2013)

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 6. Uluslararası Bilimsel Kongresi – Ağız & Diş Sağlığında Güncel Durum (2013)

İÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Deney Hayvanları Kullanım Kursu, Mayıs 2015

Türk Oral ve MaksilloFasiyal Cerrahi Derneği 23. Uluslararası Bilimsel Kongresi TAOMS Bodrum 2015

Türk Oral ve MaksilloFasiyal Cerrahi Derneği Uluslararası Bilimsel Sempozyumu TAOMS Trabzon 2015

Türk Oral ve MaksilloFasiyal Cerrahi Derneği 24. Uluslararası Bilimsel Kongresi TAOMS Bodrum 2016

Advanced ALL-ON-TRI Porto 2017

Türk Oral ve MaksilloFasiyal Cerrahi Derneği 26. Uluslararası Bilimsel Kongresi TAOMS Girne 2018

Ağız ve Çene-Yüz Cerrahisi Birliği Derneği 12. Uluslararası Bilimsel Kongresi IAOMS-ACBİD Antalya 2018

FDI 2018 Buenos Aires Annual World Dental Congress (2018) Argentina

Türk Diş Hekimleri Birliği 24. Uluslararası Kongresi TDB 2018 Ankara