

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**K1 VİTAMİNİ
VE
İSKELETSEL FLOROZİS**

115931

Dt. Bilge ÇADIR

115931

DOKTORA TEZİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KÜRKÇÜ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
SBE2002D33 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

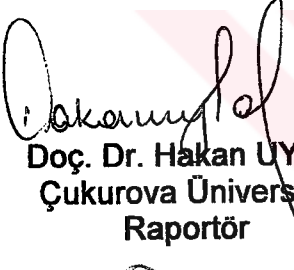
ADANA -2002

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan K1 Vitamini ve İskeletsel Florozis adlı çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/ 11/2002


Yrd. Doç. Dr. Mehmet KÜRKÇÜ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı

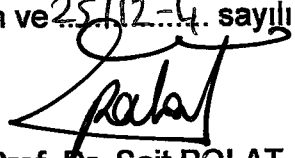

Doç. Dr. Hakan UYSAL
Çukurova Üniversitesi
Raportör


Prof. Dr. Orhan GÜVEN
Ankara Üniversitesi
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Önder KIVANÇ
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi


Yrd. Doç. Dr. Serdar TOROĞLU
Çukurova Üniversitesi
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun 3 / 12/2002 tarih ve 25/12-4. sayılı
kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Sait POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleşmesinde katkıları olan, Sayın Prof. Dr. Suna Solmaz, Prof. Dr. Abdullah Tuli, Doç. Dr. Hakan Uysal, Doç. Dr. Emin Esen, Yrd. Doç. Dr. Mehmet K rk , Araş. Gör. Cem Kircelli, Sağlık Teknisyeni Adile Sarıcalı'ya ve Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin değerli personeline teŗekk r ederim.

ukurova  niversitesi'ne gelmem ve bu projeyi Çukurova  niversitesi'nde gerçekleştirmemde rol oynayan Sayın Prof. Dr. Fatih Köksal, Prof. Dr. İlter Uzel, Prof. Dr. Sait Polat'a ve doktoramı tamamlama sürecinde, ben ve ailem için çok kritik noktalarda desteğini esirgemeyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. M. L tf  akmakı'ya teŗekk r ederim.

Tüm sıkıntıları en az benim kadar hisseden çok değerli aileme ve

Babam ve Annemin Anısına,

Mehmet Nevzat ÇADIR
1938-1997

Sezer ÇADIR
1938-1997

**Bu proje, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
SBE2002D33 nolu proje olarak desteklenmiŗtir (EK-1).**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİ	3
2.1 İskeletsel Florozis	3
2.2 İskeletsel Florozise Yönelik Tedavi Yaklaşımları	10
2.3 K1 Vitamini	11
2.3.1 K1 Vitamini ve Kemik	11
2.3.2 K Vitaminine Bağlı Karboksilasyon Reaksiyonu	12
2.3.3 K Vitaminine Bağımlı Proteinler	13
2.3.4 Kemik ve Kan Dolaşımında K Vitamini	15
2.3.5 K Vitamini Kaynağı ve İhtiyacı	17
2.3.6 K Vitamini Eksikliği	17
2.3.7 K Vitamini Emilimi ve Taşınması	18
2.3.8 K Vitamini Döngüsü	18
2.3.9 K Vitamini Yıkımı ve Atılımı	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1 Çalışma Planı	20
3.1.1 Deney Hayvanları	20
3.1.2 Deney Hayvanlarından Kemik Örneği Elde Edilişi	24
3.2 Yöntemler	24
3.2.1 Morfometrik Değerlendirme	25
3.2.2 Biyomekanik Değerlendirme	29
3.2.3 Histolojik Değerlendirme	34
3.2.3.1 Doku Takibi	34
3.2.3.2 Dehidratasyon ve Bloklama İşlemi	34
3.2.3.3 Goldner'in Trikrom Boyama Yöntemi	35
3.2.3.4 Mikroskopik İnceleme	36
3.3 İstatistiksel Değerlendirme	36
4.BULGULAR	37
4.1 Morfolojik Ölçüm Bulguları	37
4.1.1 Femur ve Tibiae Uzunlukları	37
4.1.2 Kortikal Kemik Kalınlıkları	39
4.1.2.1 Ortalama Femur ve Tibiae Kortikal Kemik Kalınlıkları	39

4.1.2.2 Antero-Posterior Femur ve Tibiae Kortikal Kemik Kalınlıkları	41
4.1.2.3 Medio-Lateral Femur ve Tibiae Kortikal Kemik Kalınlıkları	43
4.1.2.4 Femur ve Tibiae Toplam Kortikal Kemik Kalınlıkları	45
4.1.3 Ortalama Wistar Sıçan Ağırlıkları	47
4.1.4 Kesit Çap Değişimleri	48
4.1.4.1 Antero-Posterior Femur ve Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri	48
4.1.4.1.1 Antero-Posterior Femur Dış ve İç Çap Değişimleri	48
4.1.4.1.2 Antero-Posterior Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri	50
4.1.4.2 Medio-Lateral Femur ve Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri	52
4.1.4.2.1 Medio-Lateral Femur Dış ve İç Çap Değişimleri	52
4.1.4.2.2 Medio-Lateral Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri	54
4.2 Biyomekanik Test Bulguları	56
4.2.1 Femur ve Tibiae'ya Ait Alan Eylemsizlik Momenleri	56
4.2.2. Femur ve Tibiae'ya Ait Elastisite Modülü Değerleri	58
4.2.3 Femur ve Tibiae'ya Ait Kırmaya Dayanım Büyüklüğü	60
4.3 Histolojik Bulgular	62
4.3.1 Kontrol Grubuna Ait Histolojik Değerlendirmeler	62
4.3.2 NaF Grubuna Ait Histolojik Değerlendirmeler	66
4.3.3 K1 Vitamini Grubuna Ait Histolojik Değerlendirmeler	70
5.TARTIŞMA	74
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	96
7.KAYNAKLAR	99
EKLER	114
EK –1 T.C., Çukurova Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Onay Belgesi.	114
EK –2 TAVAŞ Sıçan Yemi Protokolü.	115
EK –3 T.C., Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tez Projesi Onay Belgesi.	116
EK –4 T.C., Çukurova Üniversitesi, Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi, Etik Kurul Onay Belgesi.	117
ÖZGEÇMİŞ	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 K vitaminine bağımlı karboksilasyon reaksiyonu.	13
Şekil 3.1 K1 vitamini (Phylloquinone), gavaj yönteminde kullanılan sonda ve K1 vitamininin gavaj yöntemi ile verilmesinde kullanılan mikropipet.	22
Şekil 3.2 K1 vitamininin mikropipet ve sonda kullanarak gavaj yöntemi ile deney hayvanlarına verilmesi.	23
Şekil 3.3 Morfometrik ölçümler için kullanılan dijital kompas.	25
Şekil 3.4 Üç-nokta eğme testi sonucu kırık kemik hattındaki kesitte, ölçümü yapılan antero-posterior ve medio-lateral dış ve iç çaplar.	26
Şekil 3.5 Üç-nokta eğme testi sonucu oluşan kırık kemik hattındaki kesitte kortikal kemik kalınlığı ölçümü yapılan bölgeler.	27
Şekil 3.6 Testometric M500 25kN (Rochdale, UK) cihazı.	29
Şekil 3.7 Tibiae kemiğinde üç-nokta eğme testi uygulanışı.	30
Şekil 3.8 Üç-nokta eğme testi sonucu elde edilen yük-deformasyon eğrisi.	31
Şekil 4.1 Femur uzunluğu.	37
Şekil 4.2 Tibiae uzunluğu.	37
Şekil 4.3 Ortalama femur KKK.	39
Şekil 4.4 Ortalama tibiae KKK.	39
Şekil 4.5 Antero-posterior femur KKK.	41
Şekil 4.6 Antero-posterior tibiae KKK.	41
Şekil 4.7 Medio-lateral femur KKK.	43
Şekil 4.8 Medio-lateral tibiae KKK.	43
Şekil 4.9 Femur toplam KKK.	45
Şekil 4.10 Tibiae toplam KKK.	45
Şekil 4.11 Ortalama Wistar türü sıçan ağırlığı.	47
Şekil 4.12 Antero-posterior femur dış çap değişimi.	48
Şekil 4.13 Antero-posterior femur iç çap değişimi.	48

Şekil 4.14 Antero-posterior tibiae dış çap değişimi.	50
Şekil 4.15 Antero-posterior tibiae iç çap değişimi.	50
Şekil 4.16 Medio-lateral femur dış çap değişimi.	52
Şekil 4.17 Medio-lateral femur iç çap değişimi.	52
Şekil 4.18 Medio-lateral tibiae dış çap değişimi.	54
Şekil 4.19 Medio-lateral tibiae iç çap değişimi.	54
Şekil 4.20 Femura ait AEM değerleri.	56
Şekil 4.21 Tibiae'ya ait AEM değerleri.	56
Şekil 4.22 Femura ait EM değerleri.	58
Şekil 4.23 Tibiae'ya ait EM değerleri.	58
Şekil 4.24 Femura ait KDB değerleri.	60
Şekil 4.25 Tibiae'ya ait KDB değerleri.	60
Şekil 4.26 Kontrol grubuna ait vertebra kesitleri.	62
Şekil 4.27 Kontrol grubuna ait femur kesitleri.	64
Şekil 4.28 NaF grubuna ait vertebra kesitleri.	66
Şekil 4.29 NaF grubuna ait femur kesitleri.	68
Şekil 4.30 K1 vitamini grubuna ait vertebra kesitleri.	70
Şekil 4.31 K1 vitamini grubuna ait femur kesitleri.	72
Şekil 5.1 Femur ve tibiae kemiklerine ait KKK ve çap değişimleri.	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Deney grupları.	20
Çizelge 4.1 Femur ve tibiae uzunlukları.	38
Çizelge 4.2 Ortalama femur ve tibiae KKK.	40
Çizelge 4.3 Antero-posterior femur ve tibiae KKK.	42
Çizelge 4.4 Medio-lateral femur ve tibiae KKK.	44
Çizelge 4.5 Femur ve tibiae toplam KKK.	46
Çizelge 4.6 Ortalama Wistar türü sıçan ağırlığı.	47
Çizelge 4.7 Antero-posterior femur dış ve iç çap değişimleri.	49
Çizelge 4.8 Antero-posterior tibiae dış ve iç çap değişimleri.	51
Çizelge 4.9 Medio-lateral femur dış ve iç çap değişimleri.	53
Çizelge 4.10 Medio-lateral tibiae dış ve iç çap değişimleri.	55
Çizelge 4.11 Femur ve tibiae'ya ait AEM değerleri.	57
Çizelge 4.12 Femur ve tibiae'ya ait EM değerleri.	59
Çizelge 4.13 Femur ve tibiae'ya ait KDB değerleri.	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DKS	Doğal kaynak suyu
OC	Osteokalsin
MGP	Matrik Gla proteini
KMI	Kemik mineral içeriği
KMD	Kemik mineral densitesi
Ca	Kalsyum
OH-apatit	Hidroksiapatit
OH-Pr	Hidroksiprolin
KKK	Kortikal kemik kalınlığı
TIBDAM	Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi
NaF	Sodyum florür
L1	Lumbar birinci vertebrae
a	Medio-lateral dış çap
b	Antero-posterior dış çap
a'	Medio-lateral iç çap
b'	Antero-posterior iç çap
t	Ortalama kortikal kemik kalınlığı
1	Birinci bölgeye ait kortikal kemik kalınlığı
2	İkinci bölgeye ait kortikal kemik kalınlığı
3	Üçüncü bölgeye ait kortikal kemik kalınlığı
4	Dördüncü bölgeye ait kortikal kemik kalınlığı
L	Destek barları arası mesafe
KDB	Kırmaya dayanım büyüklüğü
AEM	Alan eylemsizlik momenti
π	pi sayısı
EM	Elastisite modülü
F/d	Yük-deformasyon eğrisine ait eğim
M	Moment
c	Kırılmanın gerçekleştiği kesitte antero-posterior kemik genişliğinin yarısı
p	İstatistiksel anlamlılık
IM	İntra musküler
IP	İntra peritoneal
f_1	Destek barlarından bir tanesinde oluşan kuvvet
d_1	Destek barı ile kırılma noktası arası mesafe

ÖZET

K1 Vitamini ve İskeletsel Florozis

İskeletsel florozis, kemik miktarının artışına rağmen kemiğin mekanik dayanıklılığının azalması ile karakterizedir. Bu, osteoid hacmi ve kemik mineral boyutunun artmasını takip eden, mineralizasyon defekti sonucu oluşur. Diğer yandan, yakın zamanlarda yapılan çalışmalar, K1 vitamininin kemik yeniden şekillenmesini, kemik mineral oluşumunu ve hacmini düzenleyebildiğini göstermiştir.

Bu bilgilere dayanarak, bu çalışmanın amacı K1 vitamininin florotik uzun kemik morfolojisi, mekanik dayanıklılığı ve femur ile vertebra histolojisi üzerindeki etkisini araştırmaktır.

Bu nedenle, 4 haftalık erkek Wistar sıçanlar (n= 40) rastgele üç gruba dağıtıldılar. Oniki hafta süresince, kontrol grubu (n= 14) doğal kaynak suyu (DKS) aldı, sodyum florür (NaF) grubu (n= 13), 125 ppm NaF içeren DKS aldı ve K1 vitamini grubu (n= 13) 125 ppm NaF içeren DKS ile birlikte 0.2 mg/gr/gün K1 vitaminini gavaj ile aldı. Sıçanların yem ve su alımları serbest bırakıldı. Onaltı haftalık sıçanların hayatlarına servikal dislokasyon yöntemi ile son verildi. Sol femur ve tibiae, sağ femur ve lomber 1. (L-1) vertebra elde edildi. Kemik örnekleri üzerinde, morfolojik ölçümler, biyomekanik test ve histolojik değerlendirmeler yapıldı.

Bu çalışmanın sonuçları, K1 vitamininin, NaF'ün neden olduğu iskeletsel floroze özgü morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişiklikleri önlediğini ortaya çıkarmıştır.

Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçları, K1 vitamininin iskeletsel florozis üzerinde tedavi edici etkisi olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: K1 vitamini, Sodyum florür, İskeletsel florozis, Hayvan çalışması, Biyomekanik.

ABSTRACT

Vitamin K1 and Skeletal Fluorosis

Skeletal fluorosis is characterized with decreased bone mechanical strength despite of increased bone mass. This occurs result of mineralization defect following increased osteoid volume and bone mineral size. On the other hand, recent studies demonstrated that vitamin K1 may regulate bone remodeling, bone mineral formation and size.

On the basis of these data, the aim of this study was to investigate the effect of vitamin K1 on fluorotic long bone morphology, mechanical strength, and on femoral and vertebral histology.

Therefore, 4 weeks old male Wistar rats (n= 40) randomly divided into three groups. The control group (n= 14) received bottled water, the sodium fluoride (NaF) group (n= 13) received bottled water contained 125 ppm NaF and the vitamin K1 group (n= 13) received bottled water contained 125 ppm NaF together with 0.2 mg/g/day vitamin K1 via gavaj for 12 weeks. The rats were allowed to have food and water ad libitum. Sixteen weeks old rats were eutenized with cervical dislocation. The left femur and the tibiae, the right femur and lumbar-1 (L-1) vertebra were removed. Morphological measurements, biomechanical test and histological evaluations were performed on bone specimens.

The results of this study revealed that vitamin K1 prevents NaF-induced morphological, biomechanical and histological changes which are typical for skeletal fluorosis.

Therefore, the results of this study showed that vitamin K1 may have a therapeutic effect on skeletal fluorosis.

Key Words: Vitamin K1, Sodium fluoride, Skeletal fluorosis, Animal study, Biomechanics.

1.GİRİŞ

Yapılan alışmalar, K1 vitamininin sadece antihemorajik etkiye sahip olmadığını, bunun yanısıra menapoz sonrası osteoporöz tedavisinde ve kırık kemik iyileşmesinde terapötik etkisinin de olduğunu ortaya koymuştur^{1,2,3,4}.

K vitamini vücutta çeşitli dokularda, glutamil rezidüelinin gamma-karboksiglutamik asite dönüştürölmesi reaksiyonu olan karboksilasyon reaksiyonunda enzim için ko-faktördür^{5,6,7}. Yapılan alışmalar kemikte, karboksilasyon reaksiyonuna ihtiyaç duyan en az 3 protein olduğunu göstermiřtir⁸⁻¹³. Bu proteinler, osteokalsin (OC), matriks gla proteini (MGP) ve protein S'dir^{8,9,13}. Bu 3 protein ancak, K vitamini tarafından tam olarak karboksile edildiğinde kemik kollojen matriksi içerisinde kalsyuma sıkıca bağlanabilir.

Florozis ise, endemik bir bölgeye ait su ve ya nadiren yiyecek yolu ile aşırı miktarda florun vücuda alınması sonucu meydana gelir¹⁴. Florun, endüstriyel anlamda kullanımı sırasında solunum yolu ile alınmasının da bu merkezlerde çalışan işçilerde floroze neden olduğu bildirilmiřtir¹⁵⁻²⁰. Diş ve kemik dokularının mineralizasyonu için faydalı olduğu bilinen flor, aşırı miktarda vücuda alındığında, diş ve kemik gibi sert dokular üzerinde flor toksisitesine neden olur²¹. Dişlerin etkilenmesi sonucu meydana gelen dental florozis, aslında kozmetik bir problem olmanın ötesinde tüm vücudun kronik olarak düşük doz ve uzun dönemde birikmiş olan aşırı miktardaki flor nedeniyle toksifikasyona uğradığına dair ilk görünür bulgudur^{22,23}. İskelet sisteminin etkilenmesi sonucu meydana gelen iskeletsel florozis ise günümüzde tedavisi olmayan kronik metabolik, kemik ve eklem hastalıėıdır²⁴.

Aşırı miktarda vücuda alınan flor, iskelet sisteminde kemik yapım ve yıkımı arasındaki dengeyi bozar, kemik mineral metabolizmasını ve matriksin kollojen komponentini modifiye eder^{25,26}. Bütün bunlara bağlı olarak kemik

kalitesi bozulur, kemik morfolojisi değişir ve kemiğin kırılabilirliği artar²⁷⁻³⁰. Bu yönüyle iskeletsel florozis, dünyanın çeşitli endemik bölgelerinde hala insan sağlığını tehdit eden ve tedavisi olmayan, engellilik oluşturan bir hastalıktır.

Bu çalışmada, kemik dokusu üzerinde olumlu etkisi olduğu bilinen K1 vitamininin iskeletsel florozis üzerindeki etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1 İskeletsel Florozis

Sindirim ve solunum yolu ile vücuda aşırı miktarda alınan flor, ulaştığı dokunun metabolik fonksiyonunu etkiler³¹⁻³⁴. Vücutta böbrek, endokrin bezler, kas ve nadiren sinirleri de içine alan hemen hemen tüm organlarda zararlı etkiler gösteren aşırı miktardaki florun, özellikle diş ve iskelet sistemi üzerindeki etkisi daha belirgindir³⁵⁻³⁹.

Klinik olarak sert dokularda oluşan florozis iki grupta incelenir:

- 1) Dental florozis^{23,40}
- 2) İskeletsel florozis⁴¹.

Florun, dental yapılar üzerindeki olumsuz etkileri, ilk olarak belirli endemik bölgelerde dişlerin kahverengi lekelenmeleriyle dikkat çekmiştir. Daha sonra bu lekeli dişlerin, ilginç bir şekilde çürüğe dayanıklı oldukları gözlenmiştir⁴². Dişlerde oluşan bu lekelenmelerin içme suyunda bulunan flor konsantrasyonu ile doğrudan ilgili olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar, içme suyunda optimal konsantrasyonda flor bulunmasının (0.7-1.2 ppm) dişlerde leke oluşturmada, dişleri çürüğe karşı koruduğunu göstermiştir⁴³.

Florun hem çocuk hem de yetişkinlerde dental dokuları çürüğe karşı korumada çok önemli rolü vardır. Ağız sağlığı için florun topikal ve sistemik kullanımı diş çürüğü ve bununla ilgili komplikasyonlarda azalmaya neden olmuştur. Bu anlamda pek çok ülke içme sularının florlanması ile diş çürüklerinin önlenmesi konusunda önemli yol katetmiştir. İçme sularına optimal düzeyde flor katılan pek çok insana yönelik uzun dönem araştırma sonuçları, florun dental çürük prevalansını düşürmede etkin ve güvenli olduğunu ve

bununla birlikte toplum sağlığını koruma üzerinde olumlu etkisi bulunduğunu göstermiştir. Flor topikal olarak dişlere uygulandığında, demineralize diş yzeylerinin remineralizasyonunu artırır⁴⁴⁻⁴⁷.

Dişlerin minelerinin geliştiği dönemde, dişin yksek oranda flor ile karşılaşması durumunda ise dental florozis meydana gelir. Dental florozis, ameloblastların difüz, simetrik hipomineralizasyonudur ve geriye dñuřu olmayan bir durumdur. Dental florozis gelişen dişler, porozlú, opak, ktú beyaz tebeşir rengindedir. Minenin prizma yapısı defektli olduğu iin ışığı yansıtma özelliği büyük ölçüde azalmıştır. Bulanık, çizgili mine, dişler üzerindeki beyaz benekler veya lekeler, sarımsı kahverengi noktalar veya kahverengi çukurcuklar dental florozinin karakteristik özellikleridir. Daha şiddetli formlarında diş, yapısal olarak zayıf, kırılgan, erozyona ve kırılmaya müsaittir. Bununla birlikte, daha hafif formlarında bile artan mine atrizyonu söz konusudur. Minede görülen bu lezyonlar, sadece mineye özgü değildir, bunun yanısıra dentinde de görülebilir. Florun, dentin dışında dişlerin kökleri üzerinde ve dişin pulpa odasını daraltacak şekilde pulpa odasında birikerek dişin beslenmesini olumsuz yönde etkilediği de bildirilmiřtir⁴⁸. Bu tablo, kronik olarak, düşük doz ve uzun dönemde flor alımının toksik tablosudur. Dental florozis, tüm vücudun aşırı miktarda flor ile toksifiye olduğuna dair ilk görünür tablodur.

Florun, aynı şekilde kemikte de iki yönlü etkisi söz konusudur. Gelişmekte olan ülkelerde, yaşa bağlı olarak gelişen osteoporöz hastalığının tedavisinde, flor kullanımı çeşitli bilimadamları tarafından rapor edilmiřtir⁴⁹⁻⁵¹. Florun osteoporoz hastalarında kemik kütlesi ve densitesinin artışına neden olarak, menapoz sonrası osteoporotik kırıkları önlediğine dair iddiaları destekleyen bazı çalışmalar yayınlandıysa da, bu iddialar şu ana kadar ikna edici bir noktaya ulařmamıřtır⁴⁹⁻⁵³. Flor, kemik yapım hücresi (osteoblast) proliferasyonunu artıran ve trabeküler kemikte yeni mineral depozisyonunu artıran bilinen birkaç maddeden biridir^{54,55}. Bu nedenle bilimadamları, insanlar üzerinde uygulanmak üzere prospektif olarak planlanan çalışmalarda, florun osteoporöz tedavisinde etkinliği üzerinde yoğun bir şekilde çalışmaktadırlar^{50,53,55}. Flor tedavisi ile, sağlıklı floroapatit kristali formasyonunu

en iyi düzeyde oluşturabilmek, kemik mineral içeriği (KMI) ve kemik mineral densitesini (KMD) artırabilmek için florun uygun miktarda kalsyum (Ca) ve D-Vitamini ile kombine edilebilmesinin de söz konusu olabileceği vurgulanmıştır^{56,57}. Bazı araştırma raporları, florun insan iskelet dokusundaki olumlu etkileri üzerinde kanıtlar rapor etmiş ise de bu tedavinin uzun dönemdeki etkinliğinin ne olacağı şu anda bilinmemektedir. Bu nedenle florun osteoporöz üzerindeki etkisi şu an için deneysel çalışmalar çerçevesinde düşünülmelidir.

Florun aşırı miktarda vücuda alınımı, dişte olduğu gibi kemikte de, iskeletsel florozis olarak adlandırılan sistemik bir hastalığa neden olur. Endemik bir hastalık olan iskeletsel florozis, malesef hala dünyanın çeşitli endemik bölgelerinde insan sağlığını tehdit etmektedir. Global anlamda endüstriyel florozis ise artmaktadır. ABD, Çin, İsviçre, Fransa, Norveç, Fas, Danimarka, Japonya, Hindistan, Polonya, eski doğu bloku ülkeleri ve Çekoslovakya endüstriyel florozisin rapor edildiği ülkeler arasındadır⁵⁸⁻⁷⁴.

İskeletsel florozisin doğası ve klinik seyri ile ilgili ilk bilgiler, 1940'larda yapılan geniş çaplı epidemiyolojik çalışmalardan elde edilmeye başlanmıştır⁷⁵⁻⁷⁹. Bunu ise hastalığın metabolik ve biyokimyasal yapısı ile ilgili tatmin edici çalışmaların yapıldığı dönem takip etmiştir. Yetmişli yıllarda ise hastalığın yeni bulgularının farkına varılmıştır. Klinik olarak bu hastalığın, yeni kemik yapımı, artraljinin takib ettiği kas iskelet disfonksiyonu, artirit, fixed flexion deformiteleri, periferik nöropati ve inkapasitasyon ile karakterize olduğu rapor edilmiştir⁸⁰⁻⁸³. Klinik olarak yavaş ilerleyen bir hastalık olan iskeletsel florozisin ilk tedavi girişimleri de bu dönemlerde olmuştur^{84,85}.

İskeletsel florozis evreleri aşağıdaki şekildedir:

- 1) Asemptomatik dönem,
- 2) Erken semptomatik dönem,
- 3) Komplikasyonlar dönemi,
- 4) Sakatlayıcı florozis,
- 5) İnkapasitasyon dönemi.

Aksiyal iskelet ve kol, bacak eklemlerinin immobilizasyonu ile karakterize olan hastalığın prognozunu belirleyen en büyük ve önemli faktör, vücuda alınan florun miktarıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, günde 20-80 mg flor arasında flor tüketen kişilerde iskeletsel florozis artırı gibi pre-klinik semptomları gelişebilir⁸⁶. Klinik seyirdeki çeşitlilik, flor toksisitesinin karakteristik özelliğidir. Flor intoksikasyonunda görülen kemik değişikliklerinin türünü genel olarak pek çok faktörün etkilediği düşünülür. Sonucu belirleyen faktörler arasında, vücuda alınan florun miktarı ve alınış süresinin yanısıra, beslenme durumu, hormonal cevaplar, yaş ve cinsiyet, kemiğin kortikal veya trabeküler oluşu, diyet alışkanlıkları sayılabilir.

İnsanda, kronik iskeletsel floroziste görülen kemik değişiklikleri şu şekilde gruplandırılabilir:

- 1) Osteosikleroz,
- 2) Osteomalazi,
- 3) İkincil hiperparatiroidizm,
- 4) Osteoporöz.

Ancak bunların dışında osteosikleroz, osteomalazi, ikincil hiperparatiroidizm ve osteoporozün değişik derecelerdeki kombinasyonları da meydana gelebilir²⁴. Roholm²⁴, düşük dozda, uzun dönemde alınan florun osteosikleroza, fazla dozda akut olarak alınan florun ise osteomalaziye ve osteoporöze neden olduğunu bildirmiştir. Bunlardan hangisi veya ne tür bir kombinasyonun meydana geleceği, muhtemelen yine alınan florun dozu, alınış süresi, kalsyum ile beslenme durumu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yapılan çalışmalar, florun yanısıra kalsyum miktarının önemli ölçüde floroziste görülen değişikliklerin türünü belirlediğini göstermiştir²⁷⁻²⁹. Bu çalışmalar, düşük miktarda kalsyum alımına paralel flor alımının, kemiğin kırılmaya dayanıklılığını azalttığı yönündedir. Bu bulgu düşük miktarda kalsyum alımı ile birlikte, doğal yollarla büyük miktarda flor alımının kemik deformitesine neden olduğu şeklindeki bulgularla uyumludur^{82,87}. Teotia ve ark.⁸⁸, insanda osteosikleroz, hipermineralizasyon, trabeküllerin osteoklastik rezorpsiyonu ve meydana gelen

diğer değişikliklerin, paratiroid-tirokalsitonin arasındaki etkileşimlerden meydana geldiğini öne sürmüşlerdir.

Yapılan çalışmalar, iskeletsel florozisin şiddetli ve sakatlayıcı olan formunun pediatrik yaş grubunda da görülebileceğine işaret etmektedir^{85,89,90}. Büyüme ve gelişmesini tamamlamış olan yetişkinlerle, büyüyen çocuklar karşılaştırıldığında, büyüyen çocukların yüksek dozda flor alımına cevaplarının farklı olduğu gözlenmiştir^{85,90}. İskeletsel florozisin osteoporotik formu, kalsyumun vücutta yüksek miktarda tutulması ile pediatrik yaş grubunda yaygın iken, osteosiklerotik tablo kalsyum alımının normal olduğu uzun bir periyotta, az dozda florun alınması durumunda mümkündür. Çocuklarda, düşük kalsyum içeren diyet ile beslenme ise, kemikte raşitik ve osteomalatik tabloya neden olmaktadır⁹⁰. Bu nedenle, flor intoksikasyonunda, düşük kalsyum ile beslenen çocuklarda birincil lezyonlar osteomalazi olabilir.

Kemik dokusunun yapım ve yıkımını etkileyebilen birikebilen bir toksin olan florun, kemik yapısında geriye dönüşü olmayacak şekilde yer aldığına dair sadece birkaç literatür vardır^{25,91,92}. Florun, kronik olarak vücutta birikmesine paralel olarak, kemiğin mineral metabolizması hemostazı etkilenir. Kemiğin artan metabolik yapım ve yıkımı, kemik kollojen sentezinin bozulması ve kalsyuma olan afinitenin artışı, flor toksisitesinin özellikleri arasındadır.

İskeletsel floroziste, inorganik flor kemiğe ulaştığında, kemikte major mineral fazı olan hidroksiapatitin (OH-apatit) kristal yapısına yerleşir⁹³. Flor bu yapıda, (OH)⁻ iyonunun yerini alarak kalsyumfloroapatit olarak adlandırılan yeni kemik yapısının oluşmasına neden olur. Meydana gelen bu düzensiz mineralizasyona sahip yeni kemik yapımı, iskeletsel florozisin en önemli özelliğidir ve bu yapısal değişiklik nedeni ile kemik mikro kırıklara daha yatkın olur. Dolayısıyla kemik kalitesi, normal üzeri flor alımında bozulur. Flor bu yapıda yerleştiği pozisyonu ömür boyunca işgal eder. Bu nedenle, flor birkez kemik kristaline yerleştiğinde nadiren bu yapıdan elimine edilir.

Büyük miktarda flor alımına bağlı histolojik değişikliklerin "kalsifiye olmamış osteoid" ile karakterize osteomalazi'ye neden olduğu bildirilmiştir²⁴. Bugün dahi Roholm'un bu izlenimi doğrudur. Pandit ve Rao⁹⁴ ise yüksek

miktarda flor alımının maymunlarda yeni kemik yapımı ve kemiğin hipermineralizasyonuna neden olduğunu bildirilmiştir. Teotia ve ark.⁸⁸ ise, iskeletsel floroza kemiğin kalsifiye trabekülleri arasında osteoid dokunun düzensiz dağılımını tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar tarafından tanımlanan bir başka özellik ise, ikincil hiperparatiroidizmi düşündüren kemik yapısındaki periostesitik osteolizistir. Aynı zamanda bu çalışmada, osteoid ile kaplı trabeküler kemik yüzdesinde artış ve rezorpsiyon lakünalalarıyla kaplı total kemik yüzey oranında artış gözlenmiştir. Bu bulgular florun, iskeletin büyümeye ilişkili kemik yapımı kadar kemik yeniden yapılanmasını da etkilediğini göstermiştir. Kemik yeniden yapılanması sırasında, rezorpsiyon ve formasyon arasındaki dengenin bozulması sonucu kemik miktarı ve osteoid doku artarken, bu bulgulara bozulan mineralizasyon da eşlik eder. Yakın zamanlarda yapılan bir çalışma, yüksek oranda flor verilen tavşanlarda kemik yapımındaki artış sonucu kemiğin kalınlığının artmasına rağmen kemiğin kırmaya dayanıklılık gibi fiziksel özelliklerinin zayıfladığını göstermiştir³⁰. Bu bulgular, doğal ve yapay florlama bölgelerinde kalça kırığında artışa işaret eden epidemiyolojik çalışmalarca da desteklenmiştir. Öyleki, bu tür kalça kırıklarının, popülasyonda yaşlanmaya bağlı olarak görülen kalça kırıklarından daha fazla olduğu bildirilmiştir⁹⁵. Bu ve benzeri çalışmalar, inkar edilemez bir şekilde florun kemik üzerindeki etkilerinin yıkıcı olduğunu göstermektedir^{82,87}.

Literatürde, kemiğin zengin kollojen yapısı üzerinde toksik miktarda alınan florun etkisi tartışmalıdır. Yapılan bazı çalışmalar, iskeletsel florozinin yeni kemik yapımı ile karakterize olan osteosklerotik tipinde, idrarda kollojen yıkım ürünü olan hidroksiprolin (OH-Pr) düzeyinin değişmediğini göstermiştir^{96,97}. Başka bir çalışma ise, flor ile beslenen tavşanların kemik matriksi kollojen sentezinin, flor tarafından modifiye edilmediğini veya etkilenmediğini bildirmiştir⁸⁷. Bunun aksine, iskeletsel florozinin endemik genu valgum tipinde ise, ikincil hiperparatiroidizm sonucu olduğu düşünülen idrar OH-Pr düzeyinde artma görülmüştür^{98,99}. İdrarda artan OH-Pr düzeyinin muhtemelen, osteoporotik formdaki kemik yıkımına bağlı olarak oluştuğu bildirilmiştir⁸⁹. Bu sonucu, tavşanlarda yapılan bir başka çalışma

desteklemiştir²⁶. Bu çalışma, flor verilen tavşanlarda kemik kollojen içeriğinin azaldığı ve biyosentezinin olumsuz yönde etkilendiğini göstermiştir²⁶. Yapılan bu çalışmalar, kesin olmamakla beraber, aşırı miktarda flor alımının sadece kemiğin mineral metabolizmasını değil, aynı zamanda kemik matriksinin kollojen komponentini de modifiye edebileceğine işaret etmektedir.

Kemik densitesi ölçümü, erken dönemlerdeki iskeletsel florozisi teşhis etmek için bir araçtır. Morfometri, kortikal kemik kalınlığı (KKK) ölçümü, kemik mineral analizi ve kemik densitesi ölçümü değişik faydaları olan benzer deneysel çalışmalardır. Basit morfometrik ölçümler anlamında Czerwinski'nin¹⁹, insan otopsisinde radius ve tibiae kemiklerinde gerçekleştirdiği ölçümler, alüminyum endüstri işçilerinden oluşan grup ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermiştir. Runge ve ark.¹⁰⁰ ise kemik mineral içeriği ölçümü kullanarak, kemikteki flor miktarının birinci derecede yüksek miktarda flora maruz kalan endüstri işçilerinde, ikinci derecede az miktarda flora maruz kalan endüstri işçilerinde ve en az ise florunu sadece içme suyu ile alan kişilerde olduğunu göstermiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalar, kemik flor konsantrasyonunun vücuda alınan flor miktarı ile doğru orantı gösterdiğini ortaya koymuştur¹⁰¹⁻¹⁰⁴. Bununla birlikte serum parametreleri ise teşhise nadiren yardımcı olmuştur. Flor, ağız yolu ile vücuda alındıktan sonra mide ve ince bağırsağın proksimal kısmından absorbe edilerek önce kana, oradan da sindirimi takip eden kısa süre içerisinde çeşitli dokulara taşınır. Sağlıklı kişilerde eser miktarda serum düzeyi olan flor, iskeletsel florozisin geliştiği hastalarda belirgin derecede artar¹⁰⁵. Yapılan çeşitli çalışmalar, kronik florozise maruz kalmış kişilerde ve içme suyunda normal miktarda flor bulunduran bölgelerde yaşayan sağlıklı bireylerde, ilerleyen yaşa bağlı olarak serum flor miktarının artış gösterdiğini bildirmiştir^{26,80,101,102,105,106}. Bu nedenle, sadece serum ve ya plazma flor konsantrasyonu tek başına kronik olarak vücutta biriken florun boyutlarını göstermeye yeterli değildir.

İskeletsel floroziste, kemik metabolizması ile ilgili bazı enzim ve minerallerde de değişiklikler olur^{80,107-109}. Kemik metabolizmasındaki bu değişiklikler bir ölçüde kan tablosuna da yansır. Bunların içerisinde, kemik

metabolizmasında meydana gelen değişikliklere en hassas olan alkalen fosfatazdır. Yine de bu enzimin serum düzeyi, dokudaki miktarını gösteren gerçek belirleyici değildir. Örneğin, iskeletsel florozisin osteosiklerotik formunda bu enzimin serum düzeyi belirgin derecede artarken, osteomalatik formunda ise değişmez. Yine serum kalsyum değeri, hastalığın değişik aşamalarında paratiroid-tirikalsitonin mekanizması nedeni ile gerçeği yansıtmayabilir. İdrarda artan flor ve kemik flor içeriği artışının ise, flor toksisitesine işaret eden güvenilir belirleyiciler olduğu bildirilmiştir¹¹⁰.

Yapılan çeşitli çalışmalar, iskeletsel floroziste flor kemik yapısına daha önce yerleşmiş olduğu için, flor alım kaynağı yok edilmiş bile olsa, idrarda flor atılımının birkaç yıl devam edebileceğini göstermiştir¹¹¹⁻¹¹³. Florun atılımında birincil organ böbreklerdir. Flor, hemen hemen tamamiyle böbrek yoluyla vücuttan atılır. Flor atılımı, elementin günlük alım miktarı ve süresi, renal etkinliğin derecesi, yaş, cinsiyet, fizyolojik durum, flor ile diğer bağlayıcılar arasındaki etkileşim, diyetle kalsyum alımı, gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Buna rağmen genel olarak, flor alımı ile vücuttan atılımı arasında doğru orantı görüldüğü ve idrar flor düzeyinin, vücuda alınan flor miktarını gösteren en iyi belirleyici olduğu bildirilmiştir^{110,114}.

2.2 İskeletsel Florozise Yönelik Tedavi Yaklaşımları

Günümüzde florozisin etkin tedavisi mümkün değildir. Deneysel olarak flora maruz kalan maymunlarda, askorbik asitin koruyucu etkisinin olduğu uzun süre önce bildirilmesine rağmen, bu konudaki çalışmalar sonuçsuz kalmıştır^{94,115,116}. Bu nedenle, askorbik asitin iskeletsel florozisin tedavisinde terapötik kullanımı hala söz konusu değildir. İnsanlarda yapılan bir başka çalışma, terapötik dozda C vitamininin, iskeletsel florozisi olan kişilerde, idrarda flor atılımı üzerine bir etkisi olmamakla beraber klinik olarak hastalığın seyrinde olumlu etkileri olduğunu göstermiştir¹¹⁶. Gupta ve ark.⁸⁵ ise, C vitamininin yanısıra Ca ve D vitamininin ayrı ayrı veya birlikte verilmesinin, florun

toksisitesini önlemede etkili olduğunu bildirmiştir. Özellikle C vitamini, Ca ve D vitaminin birlikte, iskeletsel florozisli çocuklara verilmesi sonucu, hastalığın seyrinde düzelme olduğunun tespit edilmesi, literatüre florozisin en azından çocuklarda geriye dönüşü olabileceğine dair yeni bir tartışma getirmiştir.

Rao ve ark.¹¹⁷ ise, insanlarda serpentinin sadece iskeletsel florozisin semptomlarını azaltmadığını, aynı zamanda florozise bağlı eklem hareketlerindeki sınırlamanın geriye çevirildiğini rapor etmiştir. Bu çalışmadaki en önemli gözlem ise, serpentini tedavisini takiben idrarda flor atılımının artması olmuştur. Bununla birlikte serpentinin bu etkileri gösterme mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır. Yapılan bir başka çalışmada ise, serpentini verilen hastalarda, servikal radikülopatinin klinik anlamda olumlu yönde ilerlediği, ligamentlerdeki flor miktarının azaldığı kaydedilmiştir¹¹⁷. Bu çalışmada kullanılan protokolü ve dozu uygulayan Teotia ve ark.¹¹⁸, serpentini kullanımı takiben, feçeste flor miktarının arttığını; fakat idrarda ise istatistiksel olarak anlamlı derecede flor miktarında azalma olduğunu göstermiştir. Serpentini kullanımının kesilmesini takiben ise, hastalığın tekrar eski seyrine dönme eğilimi gösterdiğini saptamışlardır. Serpentini bu etkisi, sindirim sisteminde, flor emilimini inhibe ederek olduğu gibi aynı zamanda florun kemikten ekstrakte edebilmesine de bağlanmaktadır. Yapılan bu iki çalışma çok önemlidir. Aynı grup tarafından yapılan kısa süreli, in vitro çalışmalar, serpentini, ortamdan floru uzaklaştırma etkisini onaylamıştır⁸⁸.

2.3 K1 Vitamini

2.3.1 K1 Vitamini ve Kemik

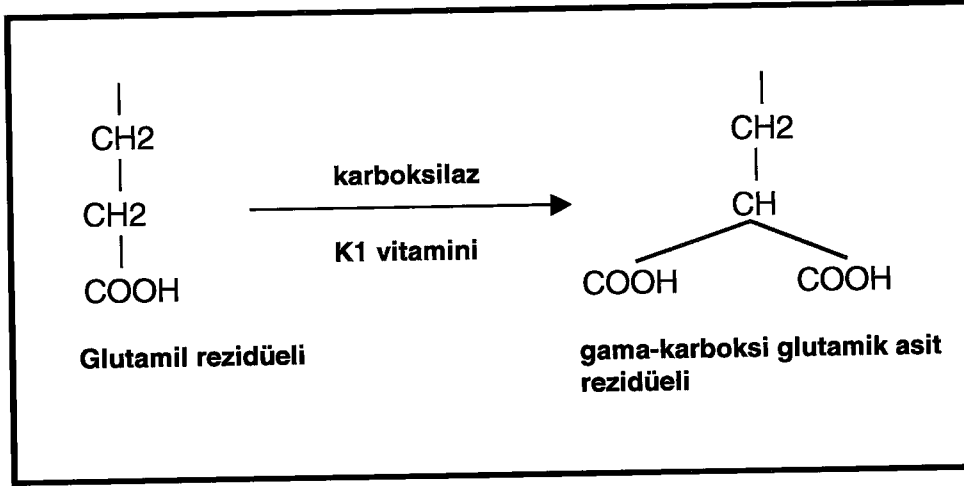
Bu tez kapsamında ise, K1 vitamininin iskeletsel florozis üzerindeki etkisi araştırılmıştır. K vitamininin kemik metabolizmasındaki rolü son zamanlarda bilimadamlarının dikkatini çok çekmiştir. Çünkü K vitamini, koagülasyon sisteminde olduğu kadar kalsiyum hamostazı gibi kemik metabolizmasının çeşitli aşamalarında da etkiye sahiptir^{119,120}. K vitamininin sadece kan

pıhtılaşmasında rol aldığı düşünülürken, Hauschka ve ark.'nin¹²¹ K vitamininin kemik formasyonunda da büyük rol oynadığına yönelik buluşu bu inancı değiştirmiştir. Kırık kemik iyileşmesinin yönetilmesindeki metabolik etkileri henüz tam olarak tanımlanamamakla beraber, yapılan çalışmalar K vitamininin, insanda ve hayvanda kırık kemik iyileşmesini hızlandırıldığını göstermiştir^{3,4,122}.

K vitamininin en geniş terapötik kullanımı, yeni doğanın hemorajik hastalığını önlemede koruyucu fonksiyonu için olmuştur. Bununla birlikte, kasten veya kaza ile meydana gelebilen kumarin zehirlenmesinde de kullanılır. Bouchaert ve Said¹²², K vitamini verilisinin, tavşanlarda kırık kemik iyileşmesini hızlandırıldığını, buna karşın Dodds ve ark.¹²³ ise, K vitamini aktivitesi inhibitörü dikumarolun hayvan modelinde kırık iyileşmesini inhibe ettiğini göstermiştir. K1 vitamininin insanlarda kırık iyileşmesini hızlandırıldığını dair ilk bulgular ise Çadır ve ark. tarafından ortaya konmuştur^{3,4}. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada, şu ana kadar osteoporöz ve kırık kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilen K1 vitaminin, iskeletsel florozis üzerindeki etkisi incelenmiştir^{3,4,122}.

2.3.2 K Vitaminine Bağlı Karboksilasyon Reaksiyonu

Yağda çözünen bir vitamin olan K vitamini, 1935'de Hendrik Dam tarafından bulunmuştur^{124,125}. "Antihemorajik faktör" olarak rapor edilen bu vitamin, Almquist ve Stokstad^{126,127} ile Doisy'nin¹²⁸ farklı çalışmalarında aynı maddeyi izole etmeleri ile tam olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte K Vitamininin fonksiyonlarını ortaya çıkarmak ise bir kırk yılı daha almıştır^{129,130}. K vitamininin moleküler rolü artık bilinmektedir. K vitamini, insan ve hayvan vücudunun çeşitli dokularında bulunan spesifik glutamil rezidüelinin, gama-karboksiglutamik asit rezidüeline dönüşmesi reaksiyonu olan karboksilasyon reaksiyonunda enzim için ko-faktör rolü oynar^{129,131} (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 K vitaminine bağımlı karboksilasyon reaksiyonu.

2.3.3 K Vitaminine Bağımlı Proteinler

Bu reaksiyon birkaç hepatik ve extra-hepatik proteinde meydana gelir¹³². Örneğin, K vitaminine bağımlı pıhtılaşma faktörleri olarak anılan prothrombin (Faktör II), Faktör VII, Faktör IX ve Faktör X gibi birkaç kan pıhtılaşma proteini, daha güçlü kalsiyum bağlanması için takip ettiği spesifik glutamil rezidüelinin karboksilasyonu için K vitaminine gereksinim duyar. Bu nedenle K vitamininin koagülasyon için ortamda bulunması elzemdir. Aynı özelliği gösteren bu amino asit daha sonra kemikte de bulunmuştur^{133,134}. Kemikte aynı amino asiti içeren protein OC veya kemik Gla proteini olarak isimlendirilmiştir^{10,12,135}. Bu protein ancak, K vitamini tarafından tam olarak karboksile edildiğinde, kemik matriksi içerisinde kalsiyuma daha sıkı bağlanır¹³⁶. Şu anda ise kemikte, K vitaminine bağımlı en az üç protein olduğu biliniyor. Bunlar, OC, MGP ve protein-S'dir^{13,133,137}. Dolayısıyla karaciğerden sonra kemik matriksi de, en az bu üç kollojen olmayan proteinin glutamil rezidüellerinin gama-karboksilasyonu için hedef bölgedir.

Knapen ve ark.¹³⁸, karboksile olmamış serum OC'inin, yeni menapoza girmiş kadınlarda kısmen; fakat yaşlı kadınlarda ise belirgin derecede arttığını göstermiştir. Bu çalışma daha sonra Plantalech ve ark.¹³⁹ tarafından

onaylanmıştır. Szulc ve ark.¹⁴⁰ ise kalça kırığı sıklığının karboksile olmuş OC ile ters orantı gösterdiğini rapor etmiştir. Yapılan bu çalışma, tam olarak karboksile olmamış OC düzeyinin kalça kırığına maruz kalan kadınlarda, kalça kırığı olmayan gruba göre daha fazla olduğunu ve yaşlı kadınlarda muhtemel kalça kırığı oluşumunun bir göstergesi olduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bu bulgu, araştırmacılar tarafından yaşlılığa bağlı vitamin eksikliği şeklinde değerlendirilmiştir.

Kemiğin, K vitamininden zengin oluşu ve kemikte K vitaminine bağımlı proteinlerin bolluğu, K vitaminin bu dokuda önemli rolü olduğunu akla getirmekle birlikte, K vitaminin iskelet sağlığındaki rolünün ne olduğu halen tam olarak bilinmemektedir. Bununla beraber bu vitaminin kemik mineralizasyonunda yer aldığı düşünülmektedir^{13,141-143}. Çünkü bu proteinlerin gama-karboksilasyonu, Ca ve OH-apatite olan afiniteyi artırır¹³². Yapılan çalışmalar, kemik kalsifikasyonunun da, OC'de olduğu gibi glutamil rezidüelinin gama- karboksilasyonunu ve K vitamini döngüsünü gerektirdiğine dair önemli bulgular rapor etmiştir^{133-135,144}. K vitamini döngüsünde K vitamini, osteoblastlarda meydana gelen indirgeyici NAD(P)H'ı taşıyıcı olarak görev alır. Bu bulgular, K vitamininin kemik mineralizasyonunda yer aldığına dair önemli bilgilerdir.

Osteoblastlar tarafından üretilen K vitaminine bağımlı 3 kemik proteini içinde, araştırmacılar çoğunlukla osteoblasta özgü olarak üretilen OC'nin üzerinde yoğun bir şekilde araştırma yapmışlardır¹⁴³. OC'nin kalsifikasyondaki rolü bilinmemekle beraber, OH-apatit kristallerinin büyümesini düzenleyebileceğine dikkat çekilmiştir¹³³. Sadece K vitaminine bağlı karboksilasyon ile gama-karboksilasyonu oluşan OC'nin, OH-apatit kristaline bağlandığı ve böylece kemik kalsifikasyonunu hızlandırdığı düşünülmektedir^{141,142}. Bunun ötesinde, OC yapısındaki glutamil rezidüelinin OH-apatit kristallerine bağlanabileceği ve böylece kristalin büyümesini düzenleyebileceği de ileri sürülmüştür¹³³.

2.3.4 Kemik ve Kan Dolaşımında K Vitamini

Kemiğin, K vitaminine bağımlı proteinler üretmesinin yanı sıra, karaciğer gibi önemli bir K vitamini kaynağı olabileceğine dair bulgular da elde edilmiştir¹⁴⁵. Hodges ve ark.¹⁴⁵ kalça implant cerrahisi için hastaneye kabul edilen yaşlı hastalarda, kemiğin zengin K vitamini kaynağı olduğunu gösterdi. Yaşlı hastalardan elde edilen kemiklerin, zengin K vitamini kaynağı olmasının yanı sıra yaşlı kadınların kan dolaşımında yetersiz düzeyde gama-karboksilasyonuna sahip OC olduğuna dair açık bir paradoksu görmek ilginçtir^{138,139}. Araştırmacılar bunun K vitamini döngüsü sonucu, K vitamininin biyoyararlanımı ile açıklanabileceğine işaret etmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalar, K1 vitamini serum düzeyinin osteoporözü olan normal hastalarda, menapoz sonrası femur boynu kırığı ve vertebral sıkışma kırığı olan yaşlı kadın hastalarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiğini bildirilmiştir¹⁴⁶⁻¹⁴⁸. Hodges ve ark.^{5,145} kan dolaşımındaki K vitamininin belirgin derecede azalmasının büyük bir ihtimalle kalça kırığından önce var olduğunu ileri sürmüştür. Kalça kırığı olan yaşlı hastalarda, kötü ve düşük kalori ile beslenme yaygın bulgulardır¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Özellikle de kötü beslenme, kan dolaşımındaki düşük K1 vitamini düzeyinin nedeni olabilir. Diyetle K1 vitamini ihtiyacı günde 1 µg/kg olarak tahmin edilir ve diyetle alımının orta düzeyde sınırlandırılması, örneğin günde 0.5 µg/kg miktarında alınması, azalan serum K1 vitamini, idrar Gla atılımı ve fonksiyonel pıhtılaşma ölçümlerindeki değişikliklerin nedeni olabilir¹⁵². K vitamini eksikliğin, genel beslenme eksikliğin bir göstergesi olup olmadığı henüz bilinmemekle beraber, kemik metabolizmasının bir parçası olarak, kalça kırığı oluşabilecek hastalarda kırılabilirliğe eğilim anlamında bir bulgu olup olamayacağı da hala bilinmemektedir. Çünkü kemikte bulunan Gla içeren proteinlerin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir ve kemikte K vitamini eksikliğini neyin takip edebileceği hala tahminler dahilindedir.

Bunun ötesinde genç kırık hastalarında kan dolaşımındaki K1 vitamini düzeyinin kırık şiddetiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁴⁷. Bitensky ve ark.¹⁴⁷ ayak

bileği ve humerus kırığı gibi küçük kemik kırıklarında kan dolaşımında K1 vitamininin oldukça çabuk normal düzeye ulaştığını; bununla birlikte büyük kemik kırığı olan hastalarda, kan dolaşımındaki K vitamini düzeyinin ise kazadan sonraki 300. güne kadar normal düzeyine dönmediğini göstermiştir. Bitensky ve ark.¹⁴⁷ kan dolaşımındaki K1 vitamininin kazadan hemen sonra baskılandığına işaret etmiştir. Araştırmacılar tarafından bu sonuçlar, bu vitamin grubunun özel kemik proteinlerinin glutamil rezidüellerinin, gama-karboksi glutamik asite dönüştürülmesinde gerekli olduğuna ve böylece bu vitaminin kırık bölgesinde kullanılmak üzere kan dolaşımından alındığına işaret etmiştir. Bu görüş, K vitamininin tekrar kan dolaşımındaki normal düzeyinin oluşmasının, kırığın şiddeti veya kallusun miktarı, dolayısı ile de yeni oluşmak zorunda olan kemik miktarı ile de ilgili olabileceğine dair bulgular ile destek kazanmıştır^{123,153}.

Petursson ve ark.¹⁵⁴ ortognatik cerrahi öncesi kan dolaşımındaki K vitamini düzeyinin ameliyat sonrası yaklaşık olarak %3 ila %25 oranında, dikkati çekecek şekilde düştüğünü göstermiştir. Bununla birlikte K vitamini operasyon öncesi düzeyine 3-4 hafta içerisinde tekrar ulaşmıştır. Araştırmacılar, azalan K1 vitamini düzeyinin nedenini, kemik bütünlüğü için gereken hücre dışı matriks yapılarını üretmek için, iyileşen kemiğin K vitaminine ihtiyacı şeklinde yorumlamışlardır. Bu nedenle iyileşme süreci tamamlanana kadar, iyileşen kemiğin kan dolaşımındaki K vitaminini aldığı kabul edilmiştir. Bu sonuçlar, kan dolaşımındaki K1 vitamini düzeyinin, kemik iyileşmesinin potansiyel göstergesi olabileceğini akla getirmektedir. Yine aynı araştırmacılar, genç yetişkin bireylerin kemik örneklerinin, yaşlılardan alınan kemik örneklerindeki kadar çok daha az K1 vitamini içerdiğini göstermiştir (1.63 ± 1.09 ng/g'e karşı 4.75 ± 1.79 ng/g)¹⁵⁵. Genç bireylerde K1 vitamini düzeyinin neden az olduğu hala bilinmemektedir. Bu nedenle kemikte K vitamini ile K vitaminine bağımlı kemik proteinlerinin gama-karboksilasyonu arasındaki ilgiyi incelemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bunun ötesinde, yaşlılarda kemiğin karaciğer gibi K vitamini deposu olduğunun gösterilmesi, belki bunun kırık iyileşmesi sırasında aktive edilebileceğine işaret etmiştir^{6,153}. Bu bilgiler, bu vitamin ailesinin kemik iyileşmesinin sürdürülmesinde önemli olduğunu, kemik iyileşmesi göstergesi

olarak değerli olabileceğini ve kemik iyileşmesini hızlandırmak için terapötik bir madde gibi fonksiyon görebileceğine işaret etmektedir.

Nitekim bu noktadan hareket ederek Çadır ve ark.'nın^{3,4} ortognatik cerrahi geçiren hastalarda oluşturulan kırık iyileşmesi üzerine etkisini gözlemlemek için hastalarına K1 vitaminini terapötik madde olarak verişleri, bu hastalarda kırık iyileşmesinin hızlandığını ortaya koymuştur. Bu sonuç, K1 vitamininin kırık vakalarında terapötik amaçlı kullanımı endikasyonuna işaret etmesi anlamında çok önemlidir.

2.3.5 K Vitamini Kaynağı ve İhtiyacı

K1 vitamini, gıdalardan sağlanır. Genel olarak yeşil ve yapraklı sebzeler K1 vitamininden zengindir. Et ve süt ürünleri orta; meyve ise düşük miktarda K1 vitamini içerir. Sağlıklı bir bireyde normal pıhtılaşma faktörlerinin sentezinin devamı için gereken K vitamini ihtiyacı 0.5-1.0 µg/kg kadar düşük bir miktardır^{156,157}. Bu nedenle komplike edici bir neden olmadığı takdirde, basit düzeyde beslenme bozukluğu nedeni ile K vitamini eksikliğinin gelişmesi ihtimali azdır. Dolayısıyla normal sağlıklı bir bireyde K vitamini eksikliği nadirdir.

2.3.6 K Vitamini Eksikliği

K vitamini eksikliği nedenleri büyük ölçüde bir hastalığa, ilaç tedavisine, koagülan toksisitesine veya K vitamini sentezini inhibe edebilen kimyasalların alınmasına ikincil olarak gelişir¹⁵⁸⁻¹⁶¹. Hamileliğin ilk üç ayındaki eksikliğinin ise maksilonasal hipoplaziye neden olduğu bildirilmiştir^{160,162}. Yine K vitamini eksikliğinin kemikteki glutamil rezidüeli içeren proteinlerin gama-karboksilasyonunu olumsuz yönde etkileyerek menapoz sonrası kemik kaybında rol oynadığı düşünülmektedir^{138,140,148}.

K vitamini, kanda düşük düzeyde bulunması gereken bir yapıtaşıdır^{146,163}. Bununla birlikte diğer vücut dokularında da dağılımı vardır¹⁶⁴. Örneğin, K vitamini deposu olarak bilinen karaciğer gibi, kemiğin de K vitamininden zengin olduğu gösterilmiştir⁶.

2.3.7 K Vitamini Emilimi ve Taşınması

K vitamini, ince bağırsaklardan alınarak lenfatik sisteme absorbe edilir¹⁶⁵. Bu olay en üst düzeyde etki için safra tuzlarının ve pankreatik sıvının bulunmasını gerektirir¹⁶⁶. Absorbe olan K1 vitamininin taşınmasındaki ana yol lenfatik sistemdir ve bu olayın şilomikronlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir¹⁶⁵. K1 vitamini, ince bağırsağın proksimal kısmından enerjiye bağımlı olarak absorbe edilir¹⁶⁷. Plazmada K vitaminini taşıyan özel bir plazma proteini bulunmamakla beraber, radyoaktif K1 vitamininin plazmadan alınımının izlenilmesine dayanarak, radyoaktif K1 vitamininin iki aşamada belirgin azalma gösterdiği bildirilmiştir^{168,169}. Birinci aşamanın, yarı ömrü 20-30 dakika; ikinci aşamanın yarı ömrü ise 120-165 dakikadır. Bu vitaminin, vücuttaki dolaşımı hızlı ve vücutta toplam depo edilme miktarı azdır.

2.3.8 K Vitamini Döngüsü

K vitaminin bir kısmı karaciğerde geriye dönüştürülür. K vitamini döngüsü, günlük ihtiyacın çok düşük olduğu bu vitamin için bir korunma döngüsüdür ve dokularda sadece nanomolar düzeylerinde mevcuttur. Vitamin vücutta tamamen yıkılmadan önce birkaç bin defa bu döngü oluşur. Böylece vitamin yıkılmadan önce tekrar tekrar aktif vitamin olabilen epoksit'e çevrilir. Bu döngü, karboksilaz aktivitesinin eşlik ettiği KH₂'nin KO'ya (epoksidaz aktivitesi) dönüşmesi ile başlar. KO daha sonra, epoksit redüktaz tarafından quinone'a indirgenir. Oluşan K vitamini, redüktaz aktivitesi ile tekrar Vitamin K

hidroquinone'a indirgenir. Bu biyokimyasal olayın sadece karaciğerde mi, yoksa kemik gibi başka dokularda da oluşup oluşmadığı bilinmemektedir.

2.3.9 K Vitamini Yıkımı ve Atılımı

K1 vitamini, hızlı bir şekilde karaciğerde konsantre olur; fakat yarılanma ömrü nispeten kısadır. Sıçan karaciğerinde en yüksek konsantrasyon, serumdaki en yüksek konsantrasyon oluşumunun 1.5-3 saat kadar sonrasında oluşur. Daha sonra 10 saat civarındaki yarılanma ömrü ile hızlı bir şekilde azalır¹⁷⁰. Bu K1 vitamininin uzun dönem karaciğerde depo edildiğini gösterir. K1 vitamininin yıkılma metabolizması yavaştır. Vücuda alınan K vitamini, idrar ve feçes ile vücuttan atılır^{168,171,172}.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışma Planı

3.1.1 Deney Hayvanları

Prospektif olarak planlanan bu çalışmada kullanılan deney hayvanlarının üretilmesi için donör olarak saptanan yetişkin Wistar sıçanlar Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (TIBDAM, Çukurova Üniversitesi, Adana, Türkiye), 4 dişi ve 1 erkek olmak üzere kafeslere yerleştirildi. Donörlerden üretilen yavruardan, sadece erkek olanları bu çalışmaya dahil edildi. Erkek yavru Wistar sıçanlar, sütten kesilinceye kadar donör ile aynı kafeste barındırıldı. Yaklaşık olarak 4 haftalık iken, 40-50 gr ağırlığına ulaşan erkek yavruar, her grupta 15 sıçan yer alacak şekilde, rastgele 3 gruba dağıtıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Deney grupları. (+) Normal su ve/veya yem alımını simgelemektedir. (-) K1 Vitamini alınmadığını simgelemektedir.

	GRUPLAR	HAYVAN SAYISI	SU	YEM	K1 VİTAMİNİ (Phylloquinone)
GRUP I	Kontrol Grubu	15	+	+	-
GRUP II	NaF Grubu	15	Florlu Su	+	-
GRUP III	K1 Vitamini Grubu	15	Florlu Su	+	K1 Vitamini

Kontrol grubunu oluşturan birinci grupta yer alan deney hayvanları, şişe suyu (Aytaç Su, Adapazarı, Türkiye) ve pelet formundaki bazal sıçan yemi (TAVAŞ, Adana, Türkiye) (EK 2) ile beslendi. İkinci grupta yer alan sıçanlar, 125 ppm sodyum florür (NaF) (Merck, Almanya) içeren şişe suyu ve bazal sıçan yemi olarak iskeletsel florozis oluşturulan deney hayvanlarından oluşan NaF grubunu oluşturdu. K1 vitamini grubu olarak adlandırılan üçüncü gruba ait sıçanlara ise, 125 ppm NaF içeren şişe suyu ve bazal sıçan yemi alımına ilaveten, deney hayvanının ağırlığına göre hesaplanacak şekilde her gün, 0.2 mg/g miktarında K1 vitamini (Sigma, Almanya) verildi. Deney hayvanları, ait oldukları grubun beslenme protokolüne uygun şekilde 12 hafta süre ile beslendi.

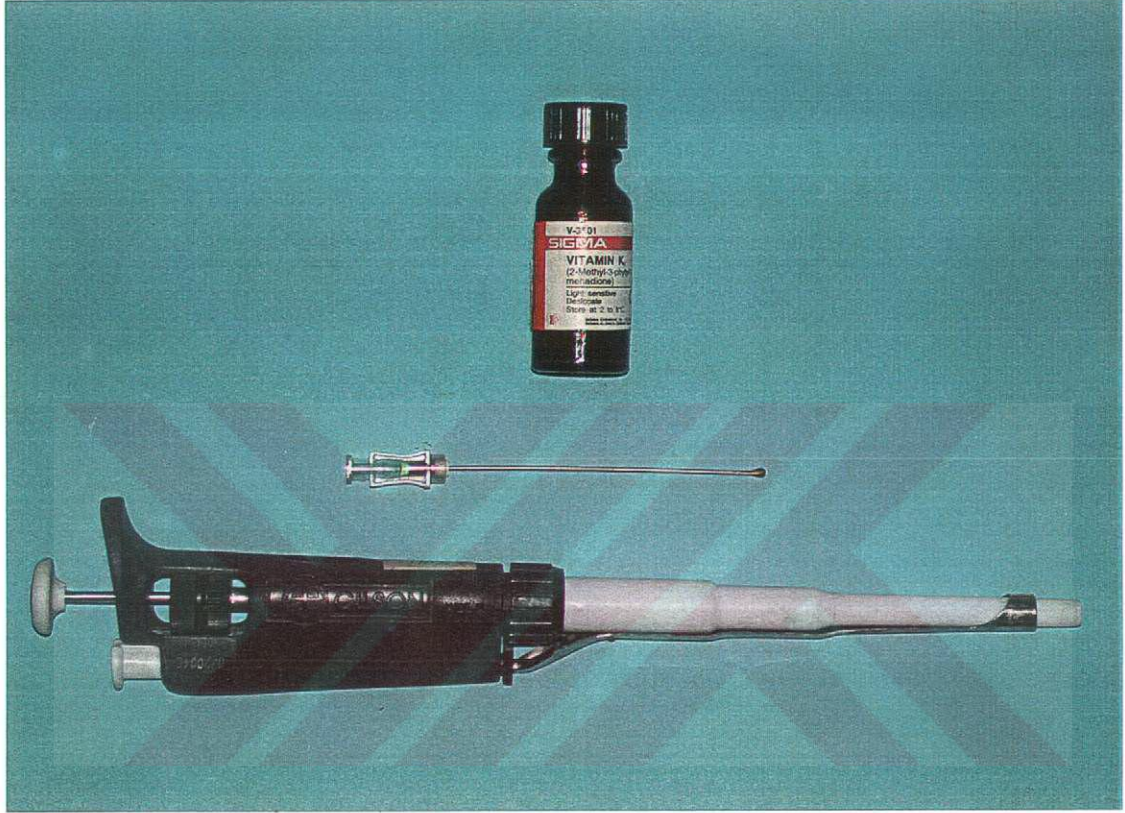
Oniki haftalık beslenme programı süresince, deney hayvanlarının ad libitum olarak ihtiyaçları oranında, istedikleri zaman su ve yem alabilmelerine müsaade edildi. Deney hayvanları bütün bir beslenme süresi boyunca, üstü tel, 45 cm boyunda, 31 cm genişliğinde, 16 cm yüksekliğinde, tabanı talaş ile kaplı metal kafeslere, herbirinde ortalama 6 sıçan olacak şekilde yerleştirildi. Deney hayvanları çalışma sonlandırılana kadar 12:12 saat ışık siklusu, 19-21°C oda ısı ve %45-60 oranında nem ortamı olan özel odalarda bulunduruldu.

Bu araştırmada, içme suyunda 125 ppm NaF oluşturmak için önce, 1 litre şişe suyuna 11,0511 gr NaF karıştırılarak 5000 ppm NaF içeren su hazırlanmıştır. Daha sonra ise, bu karışımdan 122 ml alınarak 5 litre şişe suyu içerisinde tekrar karıştırılarak, 125 ppm NaF içeren su elde edilmiştir. NaF içeren su şişeleri, hazırlanmalarından, deney hayvanları tarafından tüketilmelerine kadar, ışık etkisinden korumak için aliminyum folyo ile sarılı olarak oda ısısında tutulmuştur.

K1 vitamini ise, bağırsaklardaki emiliminin artırılması amacıyla, trigliserid yağ (Sırma mısır özü yağı, Ayvalık, Türkiye) içerisinde çözeltisi hazırlanarak deney hayvanlarına verilmiştir. Bu çözelti, 1 ml yağda 40 mg K1 vitamini olacak şekilde hazırlanmıştır.

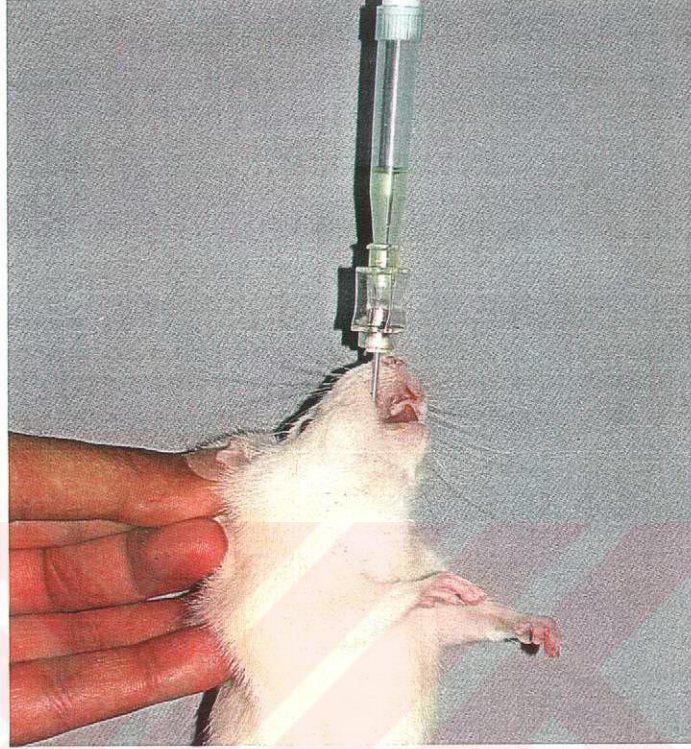
K1 vitamini, ışığa ve ısı artışına duyarlı olduğu için, koyu renk bir şişe içerisinde ve aliminyum folyo ile sarılı olarak buz dolabında muhafaza

edilmiştir (Şekil 3.1). K1 vitamini çözeltisinin, hayvanlara verilmeden 30 dakika önce buz dolabından çıkarılarak oda ısısına gelmesi sağlanmıştır.



Şekil 3.1 K1 vitamini (Phylloquinone), gavaj yönteminde kullanılan sonda ve K1 vitamininin gavaj yöntemi ile verilmesinde kullanılan mikropipet.

K1 vitamini grubunda yer alan deney hayvanlarına, K1 vitamini gavaj yöntemi ile verilmiştir (Şekil 3.2). Sıçan tutma tekniği ile bir elde sabit tutulan sıçanın ağzından, mideye kadar ulaşacak şekilde bir sonda yerleştirilerek, deney hayvanı ağırlığına göre saptanan K1 vitamini miktarı, mikropipet ile ölçülerek deney hayvanlarına verilmiştir. K1 vitamininin ilk kez verilisinde, kanda yeterli konsantrasyona ulaşmasının sağlanması için, K1 vitamini deney hayvanlarına, NaF içeren su verilmesinden 1 gün önce verilmeye başlanılmıştır.



Şekil 3.2 K1 vitamininin mikropipet ve sonda kullanılarak gavaj yöntemi ile deney hayvanlarına verilışı.

Çalışma süresi içerisinde, kontrol grubundan 1 ve NaF grubundan 1 deney hayvanı pelet formundaki sıçan yemini almaya yönelik yeni beslenme şartlarına uyum sağlayamadığı için hızlı kilo kaybı sonucu ölmüştür. NaF grubundan 1 ve K1 vitamini grubundan 2 deney hayvanı ise, boğaz bölgesinde gelişen apse formasyonu sonucu ölmüştür. Sonuç itibari ile bu çalışma, kontrol grubunda ondört 14, NaF grubunda 13 ve K1 vitamini grubunda ise 13 olmak üzere, toplam 40 deney hayvanı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.2 Deney Hayvanlarından Kemik Örneği Elde Edilişı

On altı haftalık erken yetişkin erkek Wistar sıçanların hayatlarına, dekapitasyon yöntemi (servikal dislokasyon) ile son verilmeden önce tartılarak, 12 haftalık beslenme dönemi sonundaki vücut ağırlıkları kaydedildi.

Kemik üzerinde yapılacak deneysel çalışmaları için kullanılacak sol ve sağ femur ile sol tibiae kemiklerine medial parapatellar insizyonla yaklaşım sağlanarak diseksiyonla alındı. Lomber 1. vertebra (L1) ise karın bölgesinin longitudinal insizyonunu takiben bölgedeki organların uzaklaştırılması ile yaklaşım sağlanarak alındı. Elde edilen kemik örnekleri, yumuşak dokulardan tamamen temizlenmiş ve biyomekanik çalışmalarda kullanılacak olan kemik örnekleri serum fizyolojik içerisinde, histolojik inceleme için kullanılacak kemik örnekleri ise %10'luk formalin (Merck, Almanya) ve/veya bouin sıvısı (Merck, Almanya) içerisinde muhafaza edildi. Örneklerin içerisinde bulunduğu kaplar üzerindeki etiketlere, içerisindeki örneğin türü, hangi gruba ait olduğu ve kaçınıcı deney hayvanından elde edildiği kaydedildi. Serum fizyolojik içinde bulunan ve biyomekanik testler için kullanılacak olan kemik örnekleri, elde edilmelerini takip eden saat içerisinde -40°C derin dondurucuya, deneylerin uygulanacağı döneme kadar saklanmak üzere yerleştirilirken, histolojik değerlendirme için %10'luk formalin ve bouin sıvısı içerisinde alınan örnekler ise zaman geçirilmeden laboratuvarında deney protokolüne tabi tutuldu.

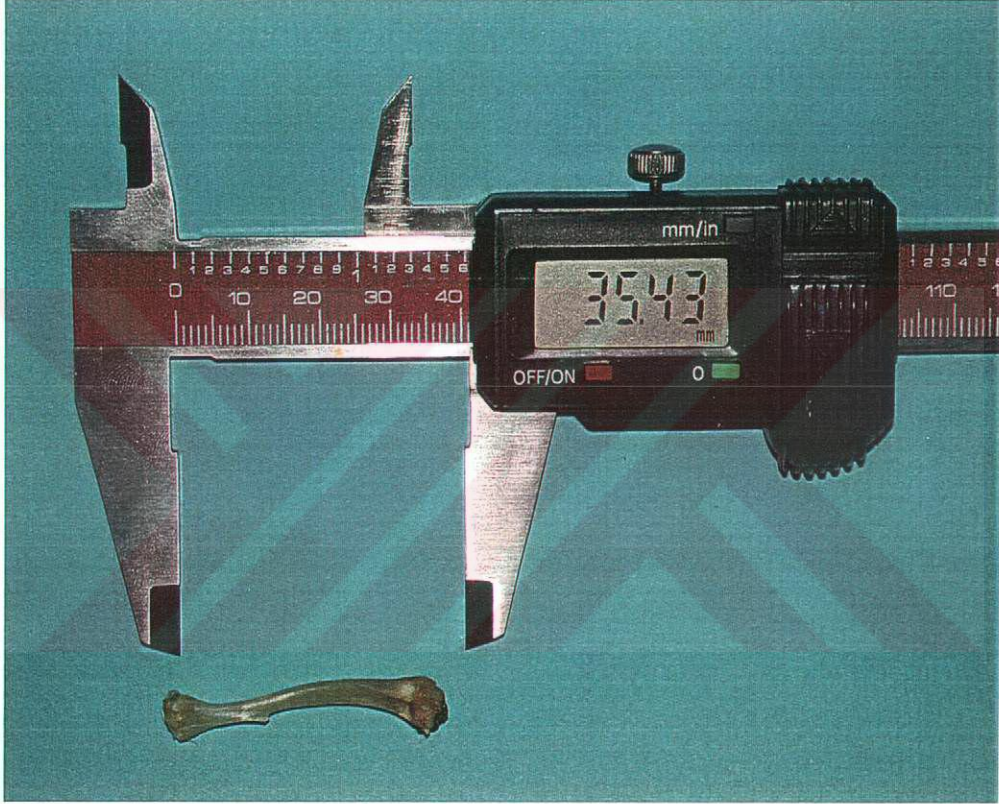
3.2 Yöntemler

K1 vitamininin iskeletsel florozis üzerindeki etkisini araştıran bu çalışmada,

1. Morfometrik değerlendirme,
2. Biyomekanik değerlendirme ve
3. Histolojik değerlendirme uygulanmıştır.

3.2.1 Morfometrik Değerlendirme

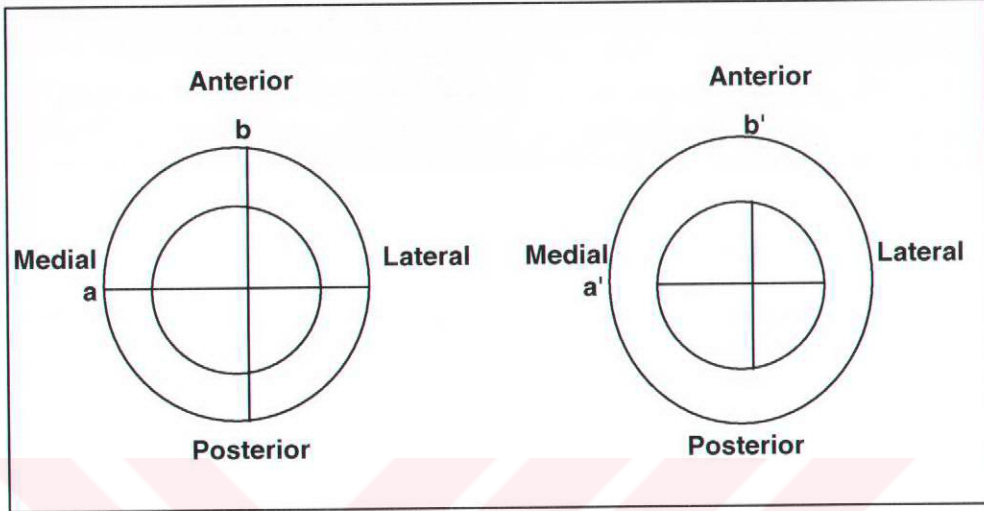
Femur ve tibiae kemikleri, biyomekanik teste tabi tutulmadan önce, her iki kemiğin uzunlukları, iki eklem başı arası mesafenin dijital kompas ile ölçülmesi ile tespit edilmiştir (Şekil 3.3). Bunu takiben, femur ve tibiae kemikleri



Şekil 3.3 Morfometrik ölçümler için kullanılan dijital kompas.

üzerinde üç-nokta eğme testi sonucu oluşan kırılma hattındaki kesit üzerinde, yine dijital kompas ile antero-posterior ve medio-lateral yönlerde, periosteal yüzeyler arasındaki dış çaplar (a = medio-lateral dış çap; b = antero-posterior dış çap) ve endosteal yüzeyler arasındaki iç çaplar (a' = medio-lateral iç çap; b' = antero-posterior iç çap) ölçülmüştür (Şekil 3.4). Bu ölçümler, üç-nokta eğme

testinde kırmayı gerçekleştiren üstteki basınç barı'nın, kemiklere değme noktası referans alınarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4 Üç-nokta eğme testi sonucu kırık kemik hattındaki kesitte ölçümü yapılan antero-posterior ve medio-lateral dış ve iç çaplar.

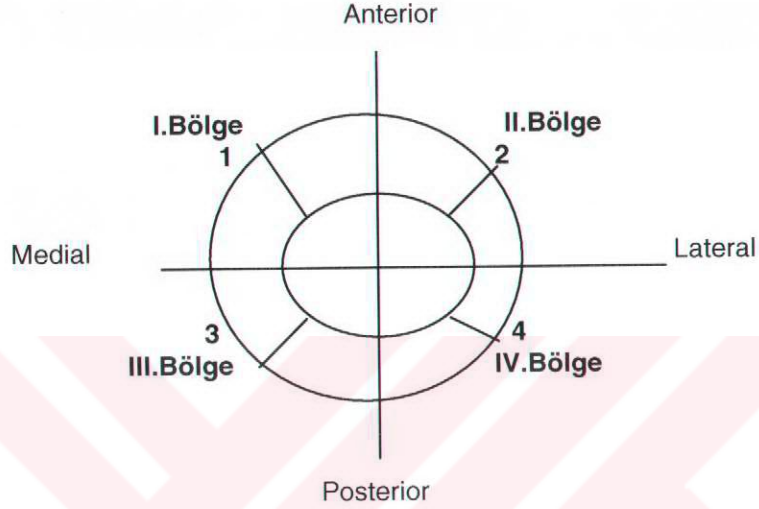
Benzer şekilde aynı kesitte, dijital kumpas ile antero-posterior vertikal ve medio-lateral horizontal çizgilerle dört bölgeye ayrılan femur ve tibiae kesitleri üzerinde, KKK değişimini tespit etmeye yönelik ölçümler gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Bu ölçümlerden, ortalama KKK, toplam KKK, antero-posterior KKK ve medio-lateral KKK hesaplandı.

Ortalama KKK,

$$t = \frac{1+2+3+4}{4}$$

eşitliği ile hesaplanmıştır.

Bu eşitlikte, "t", ortalama KKK; "1", birinci bölgede ölçülen KKK; "2", ikinci bölgede ölçülen KKK; "3", üçüncü bölgede ölçülen KKK ve "4", dördüncü bölgede ölçülen KKK'dır.



Şekil 3.5 Üç-nokta eğme testi sonucu oluşan kırık kemik hattındaki kesitte KKK ölçümü yapılan bölgeler.

Medio-lateral KKK, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Medio-lateral KKK} = a - a'$$

Bu eşitlikte, "a", medio-lateral dış çap, "a' ", medio-lateral iç çap uzunluklarıdır.

Antero-posterior KKK, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Antero-posterior KKK} = b - b'$$

Bu eşitlikte, "b", antero-posterior dış çap; "b' ", antero-posterior iç çap uzunluklarıdır.

Toplam KKK ise, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Toplam KKK} = (a - a') + (b - b')$$

Bu eşitlikte, "a", medio-lateral dış çap; "a' ", medio-lateral iç çap; "b", antero-posterior dış çap ve "b' " antero-posterior iç çap uzunluklarıdır.

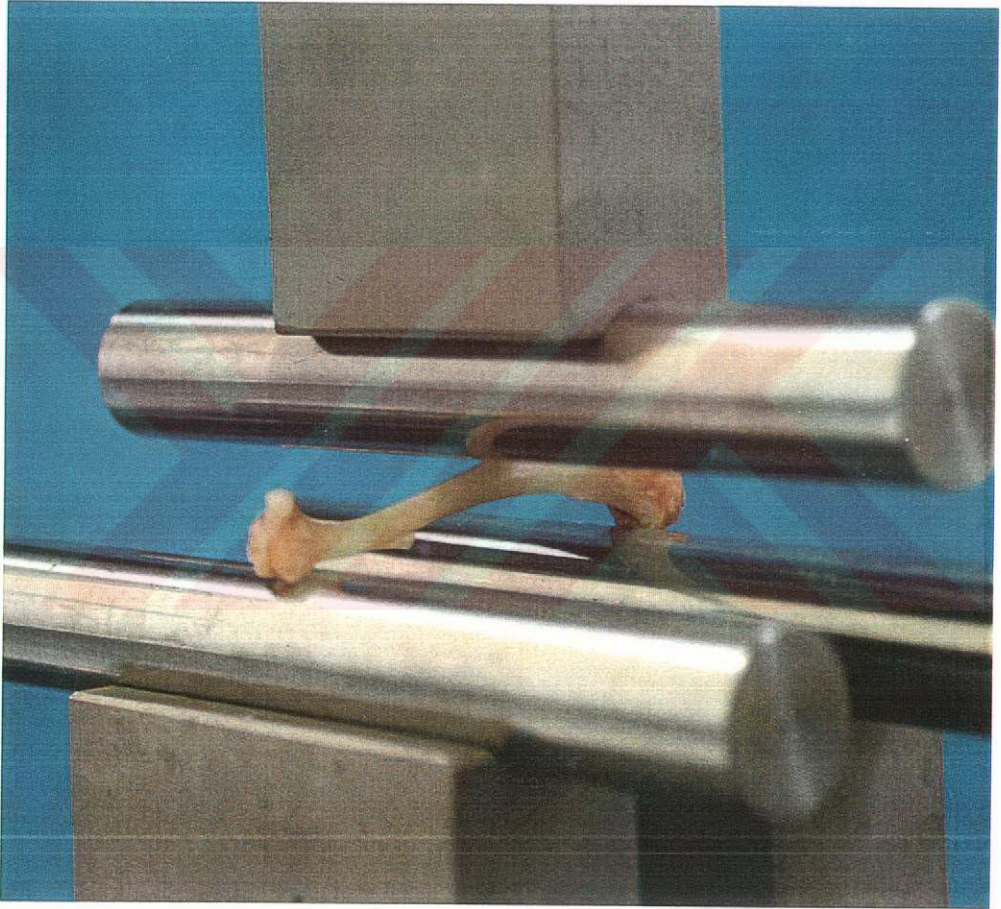
3.2.2 Biyomekanik Değerlendirme

Femur ve tibiae kemiklerinin mekanik özellikleri, Testometric M500 25kN (Rochdale, UK) cihazında üç-nokta eğme testi sonucu değerlendirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Testometric M500 25kN (Rochdale, UK) cihazı.

Test öncesi -40°C 'da bekletilen sol femur ve sol tibiae kemikleri, yavaşça oda ısısına gelecek şekilde, içinde bulundukları cam şişelerde doğal olarak çözölmeye bırakılmıştır. Çözölen kemik örnekleri, daha sonra, içerisinde oda ısısında serum fizyolojik bulunan ayrı bir kaba konulmuştur. Örnekler, test süresi ve test tamamlanıncaya kadar bu ortamda bulundurulmuştur.

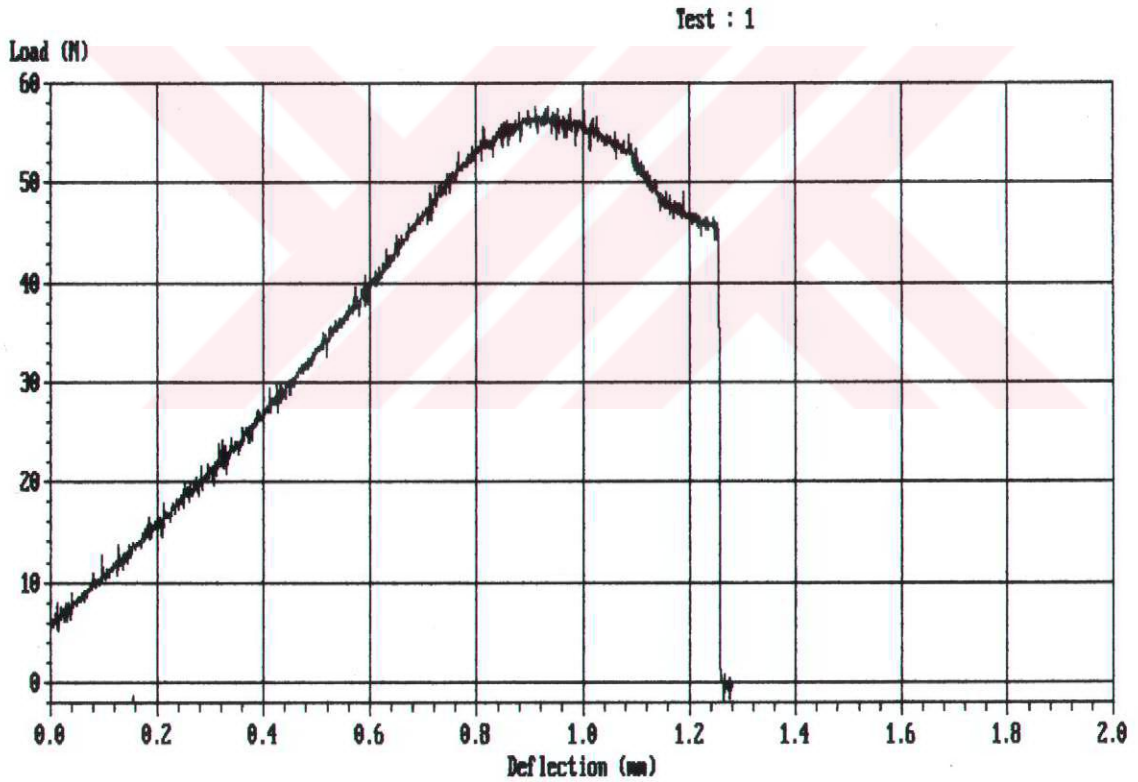


Şekil 3.7 Tibiae kemiğinde üç-nokta eğme testi uygulanışı.

Kemik örnekleri, aralarındaki mesafe 26mm (L) olan iki yuvarlak destek bar üzerinde antero-posterior yönü basınç uygulanacak yukarıdaki üçüncü bara bakacak şekilde test için uygun pozisyonda sabitlenmiştir (Şekil 3.7). Bu basınç

barının uyguladığı yükün, kemiğin anterior kısmından uygulanmasını sağlamıştır. Böylece her bir kemik örneğinin test makinasında aynı pozisyonda yerleştirilmesi ile test standardize edilmiştir. Yukarıdaki basınç uygulayacak olan bar, kemik örneğine hafifçe dokundurulduktan sonra, dakikada 1 mm sabit hızla kemiğe basınç uygulamaya başlamış ve kemiklerin orta noktasında kırık oluşuncaya kadar hareketine devam etmesi sağlanmıştır.

Kırma işleminin gerçekleşmesine kadar geçen süre içerisinde, kemiğe uygulanan yük ve buna bağlı oluşan deformasyon, bilgisayarda yük-deformasyon eğrisi olarak kaydedilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Üç-nokta eğme testi sonucu elde edilen yük-deformasyon eğrisi.

Bilgisayar kaydı ile elde edilen yük-deformasyon eğrisinde, kemik örneğinin biyomekanik kırılmasına neden olan kuvvet değeri hesaplamalarda

kullanılmak üzere kaydedildi. Morfometrik ölçüm ve üç-nokta eğme testine ait veriler kullanılarak, kırık bölgesine ait alan eylemsizlik momenti, elastisite modülü ve kırmaya dayanım büyüklüğü aşağıda belirtilen eşitlikler yardımı ile hesaplandı.

Kemiklerin kırmaya dayanım büyüklüğünün (KDB) hesaplanmasında kullanılan alan eylemsizlik momenti (AEM), aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$AEM = (\pi/64) [ab^3 - (a - 2t) (b - 2t)^3]$$

Bu eşitlikte, "AEM", alan eylemsizlik momenti; " π ", pi sayısı, "a", kırılmanın gerçekleştiği noktadaki kemik kesitinin medio-lateral yöndeki genişliği; "b", aynı kesitteki antero-posterior yöndeki genişlik ve "t" ise ortalama KKK'dır.

Kemik örneklerinin elastisite modülleri (EM), aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$EM = (F/d) \frac{L^3}{48 (AEM)}$$

Bu eşitlikte, "EM" elastisite modülü; "F/d" yük deformasyon eğrisine ait eğim; "L" destek barları arasındaki mesafe ve "AEM" ise alan eylemsizlik momentidir.

Kemik örneklerinin kırmaya dayanım büyüklüğünün hesaplanmasında ise aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$KDB = \frac{Mc}{AEM}$$

Bu eşitlikte, "KDB" kırmaya dayanım büyüklüğü; "M" kırığın olduğu kesitteki eğme momenti; "c" kırılmanın gerçekleştiği kesitte antero-posterior yöndeki kemik genişliğinin yarısı olarak hesaplanan, kırık noktasındaki kesitin merkezinden periosteal yüzeye kadar olan uzaklığı ve "AEM" ise alan eylemsizlik momentidir.

Kırığın olduğu kesitteki eğme momenti ise aşağıdaki eşitlik yardımı ile hesaplanmıştır:

$$M = f_1 \times d_1$$

Bu eşitlikte, " f₁" destek barlarından bir tanesinde oluşan kuvvet; " d₁" ise aynı destek barının kemiğe temas ettiği nokta ile kırılmanın gerçekleştiği nokta arasındaki mesafedir.

3.2.3 Histolojik Değerlendirme

3.2.3.1 Doku Takibi

Kemik örnekleri üzerinde histolojik kesit hazırlama protokolü uygulanmadan önce, sağ femur ve L1 vertebra kemiklerinden standart örnekler temin etmek için, dental karbon separe yardımı ile 3-4 mm kalınlığında büyük kesitler hazırlanarak her bir kemik türünden elde edilen kesitler iki ayrı sabitleme işlemine tabi tutuldular. Bunlar:

1. %10'luk formalin içerisinde, 48 saat sabitleme işlemi ve
2. Bouin sıvısında, 4-12 saat sabitleme işlemidir.

Sabitleme işleminden sonra, dokular üzerinde dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Bu amaçla, 2 hafta süreyle, günlük olarak değiştirilen %5'lik nitrik asit solüsyonu (Merck, Almanya) içerisinde bekletilen örnekler, işlem sonunda 30 dakika süreyle akar suda yıkandı.

%10'luk formalin içerisinde sabitlenen örnekler, %10'luk formalin; bouin sıvısında sabitlenen örnekler ise, bouin sıvısında 5 saat bekletildikten sonra 1 gece akar suda yıkandı.

3.2.3.2 Dehidratasyon ve Bloklama İşlemi

Dehidratasyon işlemi için örnekler sırasıyla:

1. 2 kez %80'lik alkol (Merck, Almanya) içerisinde 1'er saat,
2. 2 kez %95'lik alkol içerisinde 1'er saat,
3. 3 kez %100'lük alkol içerisinde 1'er saat,
4. Eşit oranda olacak şekilde, Ksilol (Merck, Almanya) / alkol içerisinde 1 saat,
5. 1 kez sedir yağı (Merck, Almanya) içerisinde 1 gece,
6. 1 kez sedir yağı içerisinde 2 saat,
7. 1 kez parafin (Merck, Almanya) içerisinde 2 saat,
8. 4 kez parafin içerisinde 1'er saat bekletilerek,
9. bloklama yapıldı.

10. Kızaklı mikrotomda (Reichert Austria) 4 μ kalınlığında kesitler alınarak,
11. Lamel üzerine ikili kesitler şeklinde taşındı.

3.2.3.3 Goldner'in Trikrom Boyama Yöntemi

Kemik dokularından elde edilen kesitler, Goldner'in trikrom boyama yöntemine tabi tutuldu. Bunun için:

1. Kesitler parafinden kurtarılarak,
2. Ksilol ve alkolden sonra su ile yıkama aşamasına getirilip,
3. Distile suda yıkandı.
4. 15 dakika Weigert demir hematoksilen (Merck, Almanya) ile çekirdek boyandıktan sonra
5. Distile suda yıkandı,
6. Scott'un suyunda (Merck, Almanya) mavi renk alması sağlandı.
7. 15 dakika akar suda, sonra ise
8. Distile suda yıkandı.
9. 45 dakika ponceau (Sigma, Almanya)/ Asid fuksin (Merck, Almanya) sıvısında boyanan kesitler,
10. 2 kez %1'lik asetik asit (Merck, Almanya) sıvısında yıkandı.
11. 2 dakika fosfotungistik asit (Merck, Almanya) / oranj G sıvısında (Merck, Almanya) boyandıktan sonra,
12. 2 kez %1'lik asetik asit sıvısında yıkanıp,
13. 15 dakika Light green sıvısında (Merck, Almanya) boyandı.
14. 2 kez %1'lik asetik asit sıvısında yıkandıktan sonra ise,
15. 2 kez %100'lük absolut alkolde yıkanıp,
16. 3 kez 1'er dakika ksilol'de yıkandı ve
17. Entellan (Merck, Almanya) ile kapatıldı.

3.2.3.4 Mikroskopik İnceleme

Boyama yöntemlerine tabi tutulan kemik dokusu kesitleri, ışık mikroskopunda (Optiphot, Nikon, Japonya) incelendi. Bu değerlendirmede:

Ossifikasyon Merkezleri	Mavi veya mavi-siyah
Sitoplazma ve osteiod	Kırmızı
Kemikler ve kollojen	Yeşil
Eritrositler	Turuncu
Çekirdekler	Mavi Siyah
Adale, fibrin	Kırmızı
Bağ Dokusu	Mavi

olduğu gözönünde bulundurularak inceleme yapıldı.

3.3 İstatistiksel Değerlendirme

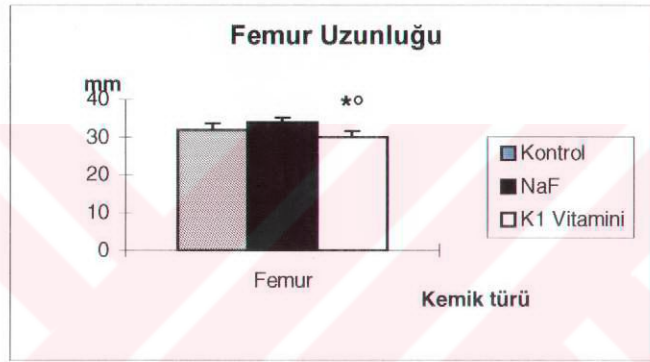
Bu tez kapsamındaki morfometrik veriler, parametrik iki-uçlu Student's *t*-testi ile biyomekanik test sonuçları ise, non-parametrik Mann-Whitney U Testi ile SPSS yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir¹⁷³. Sunulan tezde, istatistiksel değerlendirme sonuçları, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

Bu Doktora Tezi'ne konu olan proje, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından (EK - 3) ve Çukurova Üniversitesi TIBDAM ve Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (EK - 4).

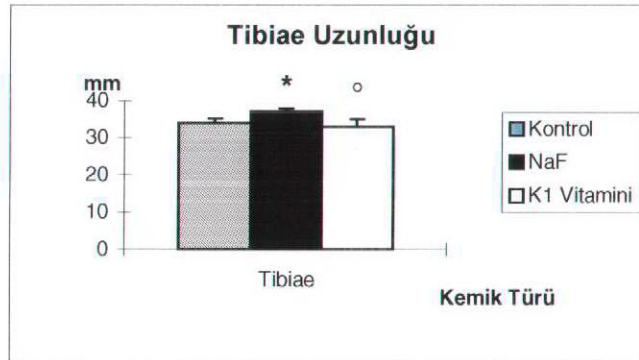
4.BULGULAR

4.1.Morfolojik Ölçüm Bulguları

4.1.1.Femur ve Tibiae Uzunlukları



Şekil 4.1 Femur uzunluğu (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.2 Tibiae uzunluğu (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.1 Femur ve tibiae uzunlukları (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ♦ = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$).

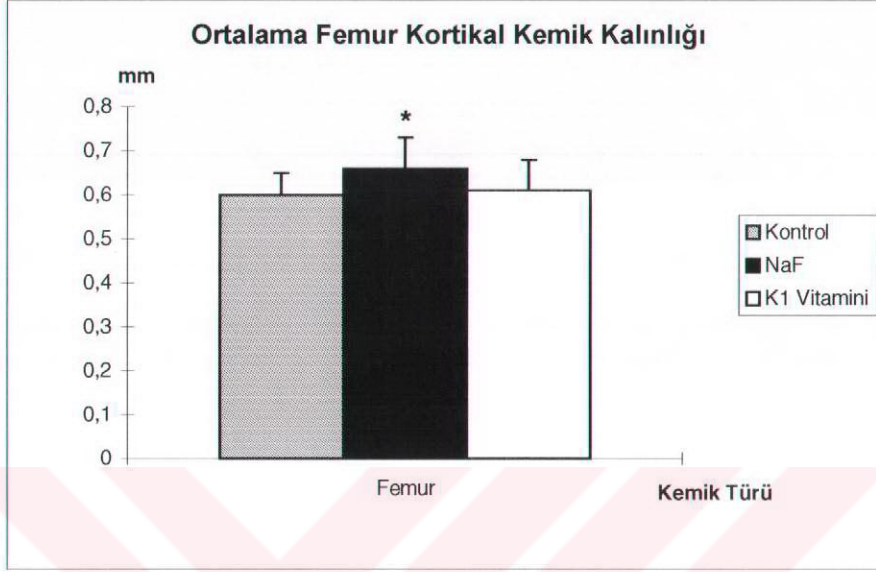
GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	32.1±1,57	34.1±1,23
NaF	34.2±1,05 (p♦=0.06)	37.1±0,89 (p*=0.01)
K1 Vitamini	29.6±1,55 (p*=0.01) (p°=0.00000001)	33.1±2,02 (p°=0.0000005)

NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında femur uzunluğu açısından anlamlı fark gözlenmedi ($p=0.06$). Bununla beraber, femur uzunluğunda artış olduğu saptandı. K1 vitamini grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında femur uzunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.01$). K1 vitamini grubu, NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise femur uzunluğunda yine anlamlı azalma olduğu görüldü ($p=0.00000001$).

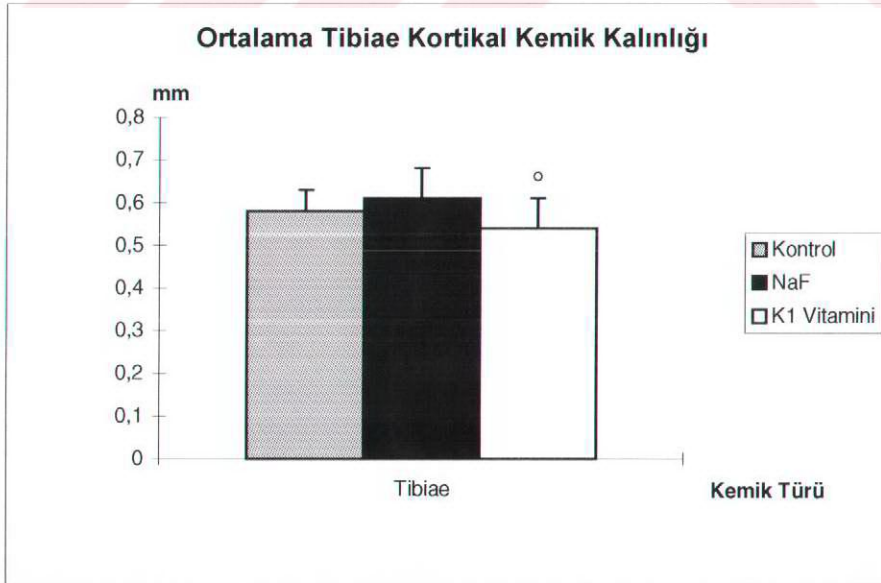
NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tibiae uzunluğunda istatistiksel olarak anlamlı artış görülürken ($p=0.01$), K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak fark saptanmadı. NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise K1 vitamini grubunda tibiae uzunluğunda istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.0000005$).

4.1.2. Kortikal Kemik Kalınlıkları

4.1.2.1. Ortalama Femur ve Tibiae Kortikal Kemik Kalınlıkları



Şekil 4.3 Ortalama femur KKK (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.4 Ortalama tibiae KKK (mm). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

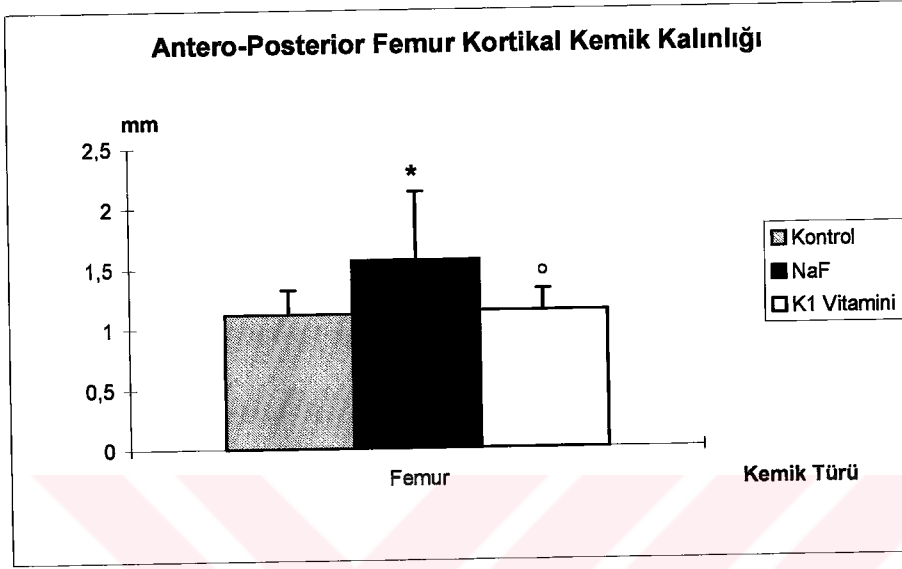
Çizelge 4.2 Ortalama femur ve tibiae KKK (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). • = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$).

GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	0,60±0,05	0,58±0,07
NaF	0,66±0,07 (p*=0.03)	0,61±0,06
K1 Vitamini	0,61±0,07 (p• =0.08)	0,55±0,07 (p°=0.014)

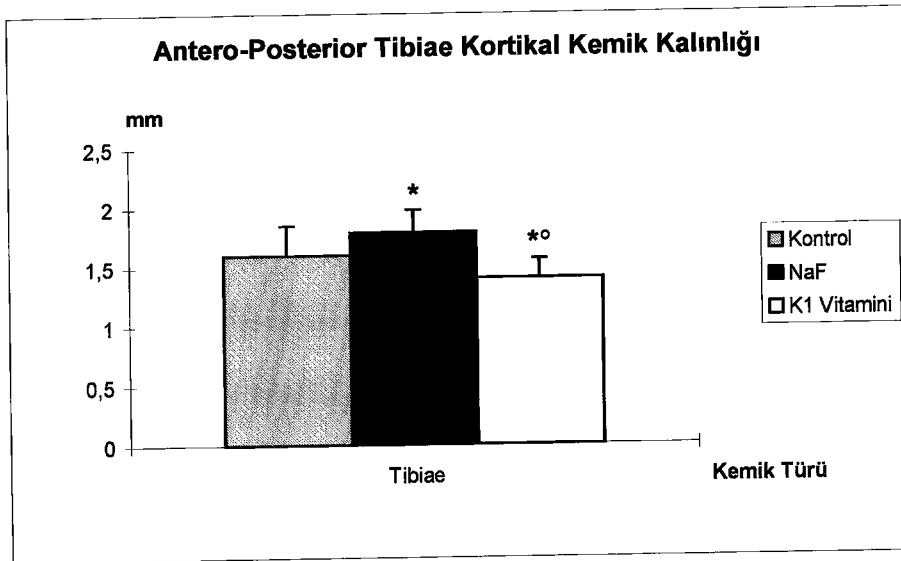
NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, femur kemiği ortalama KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0.03$). Bununla birlikte, K1 vitamini grubunda bir fark görülmedi. NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, K1 vitamini grubunda femur uzunluğu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0.08$); fakat azalma olduğu dikkati çekti.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubu ve K1 vitamini grubunda tibiae'ya ait ortalama KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Bununla beraber, NaF grubu ile karşılaştırıldığında, K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.014$).

4.1.2.2. Antero-Posterior Femur ve Tibiae Kortikal Kemik Kalınlıkları



Şekil 4.5 Antero-posterior femur KKK (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.6 Antero-posterior tibiae KKK (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

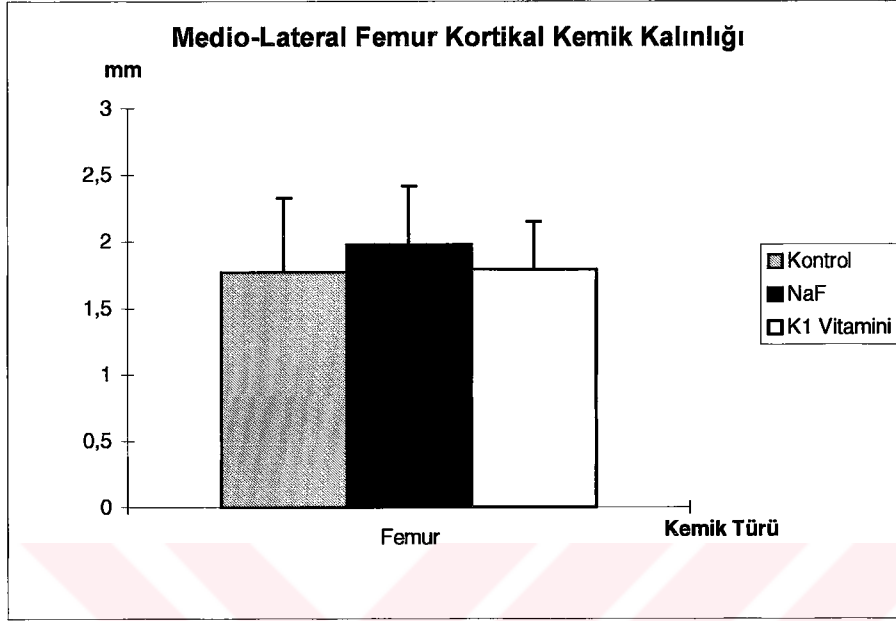
Çizelge 4.3 Antero-posterior femur ve tibiae KKK (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	1.12±0,2	1.6±0,25
NaF	1.56±0.57 (p* =0.02)	1.79±0.19 (p* =0.04)
K1 Vitamini	1.14±0.18 (p°=0.023)	1.4±0,16 (p* =0.02) (p°=0.00001)

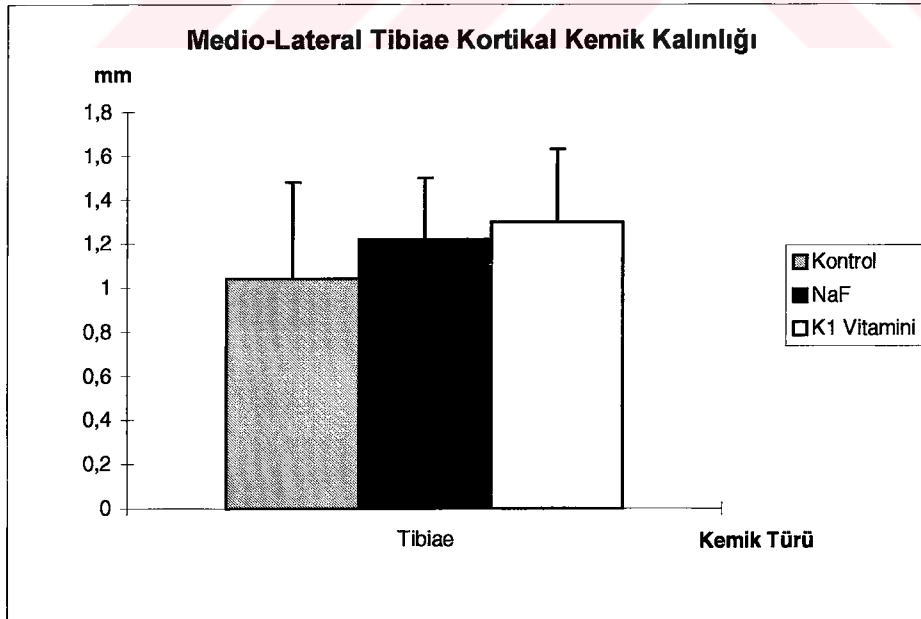
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubunda femura ait antero-posterior KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p=0.02$). Buna karşın, K1 vitamini grubunda bir değişiklik gözlenmedi. K1 vitamini grubu, NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, femura ait antero-posterior KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu kaydedildi ($p=0.023$).

NaF grubunda tibiae'da ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında antero-posterior KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken ($p=0.04$), K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p=0.02$). K1 vitamini grubu NaF grubu ile karşılaştırıldığında, yine anlamlı azalma olduğu saptandı ($p=0.00001$).

4.1.2.3. Medio-Lateral Femur ve Tibiae Kortikal Kemik Kalınlıkları



Şekil 4.7 Medio-lateral femur KKK (mm).



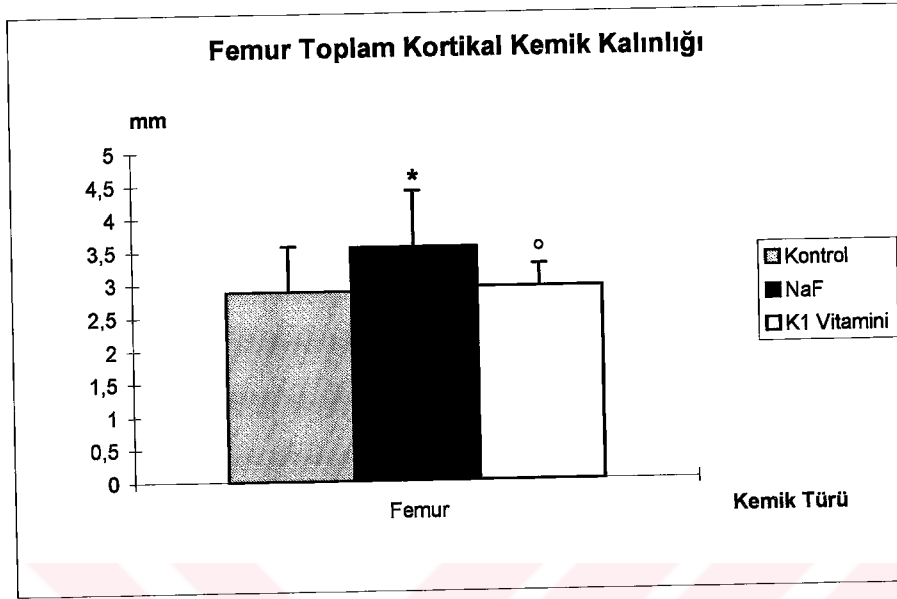
Şekil 4.8 Medio-lateral tibiae KKK (mm).

Çizelge 4.4 Medio-lateral femur ve tibiae KKK (mm). ♦= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p>0.05$).

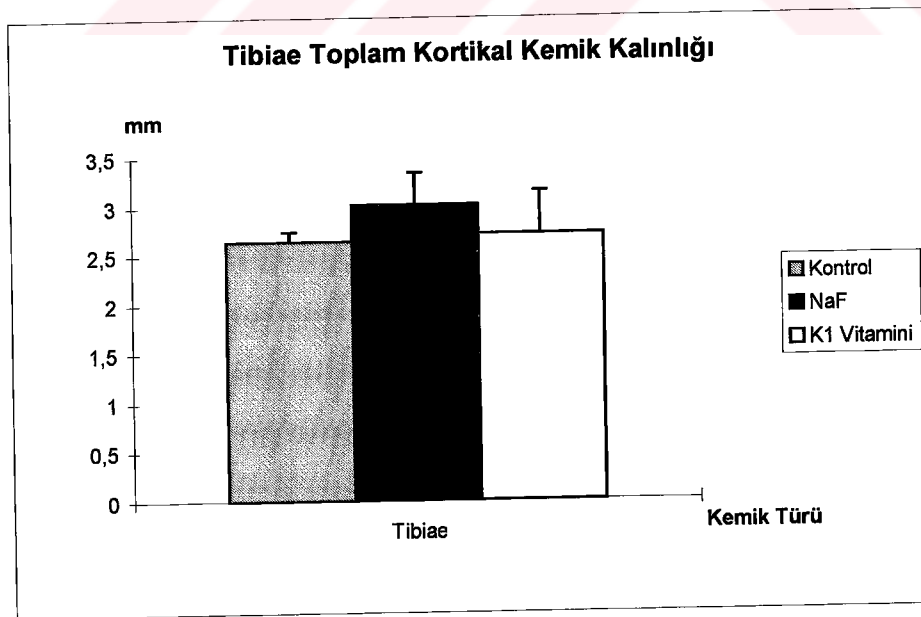
GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	1.77±0,56	1.04±0,44
NaF	1.98±0.44	1.22±0.28
K1 Vitamini	1.79±0.36	1.3±0,33 (p♦=0.09)

NaF grubu ve K1 vitamini grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, medio-lateral KKK'nda, femur ve tibiae'da istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Ancak, K1 vitamini grubunda tibiae'da artış olduğu dikkati çekti ($p=0.09$).

4.1.2.4. Femur ve Tibiae Toplam Kortikal Kemik Kalınlıkları



Şekil 4.9 Femur toplam KKK (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.10 Tibiae toplam KKK.

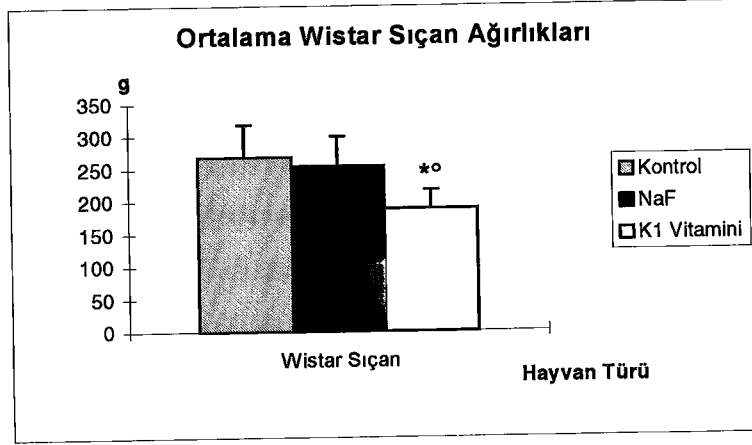
Çizelge 4.5 Femur ve tibiae toplam KKK (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ♦= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$). •= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$).

GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	2.88±0,69	2.64±0,65
NaF	3.55±0.85 (p* =0.04)	3.01±0.33 (p♦ =0.07)
K1 Vitamini	2.94±0.34 (p° =0.03)	2.71±0,44 (p• =0.067)

NaF grubu kontrol karşılaştırıldığında, femura ait toplam KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedildi ($p=0.04$). K1 vitamini grubunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark gözlenmezken, NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0.03$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubunda tibiae'ya ait toplam KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemekle beraber, artış olduğu dikkati çekti ($p=0.07$). K1 vitamini grubu kontrol grubu karşılaştırıldığında ise, bu grupta yine anlamlı fark kaydedilmedi. K1 vitamini grubu NaF grubu ile karşılaştırıldığında, tibiae'ya ait KKK'nda azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlam taşımamaktaydı ($p=0.067$).

4.1.3. Ortalama Wistar Sıçan Ağırlıkları



Şekil 4.11 Ortalama Wistar türü sıçan ağırlıkları (g). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.6 Ortalama Wistar türü sıçan ağırlığı (g). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

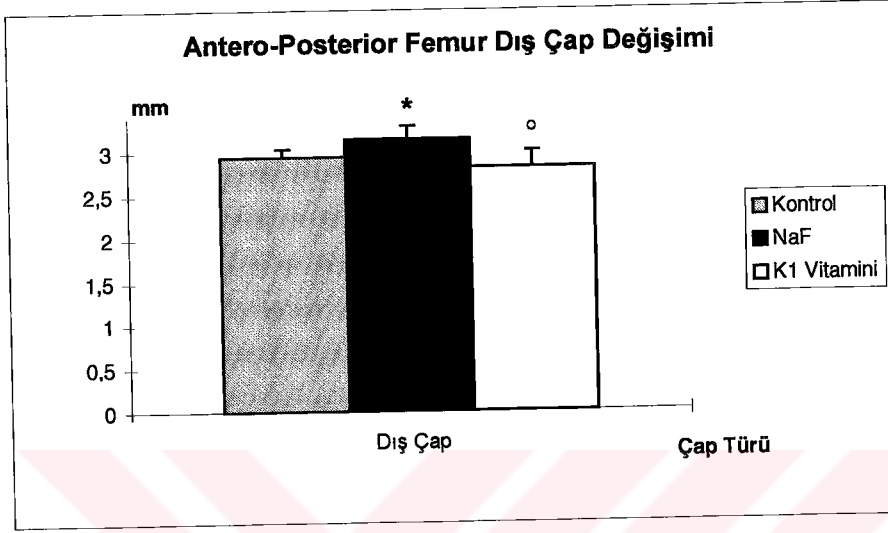
GRUPLAR	AĞIRLIK
Kontrol	268±16
NaF	254±45
K1 Vitamini	188±29 (p* =0.00000001) (p°=0.0007)

On iki haftalık beslenme dönemi sonunda, NaF grubuna ait ortalama Wistar sıçan ağırlığı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.00000001$). NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0.0007$).

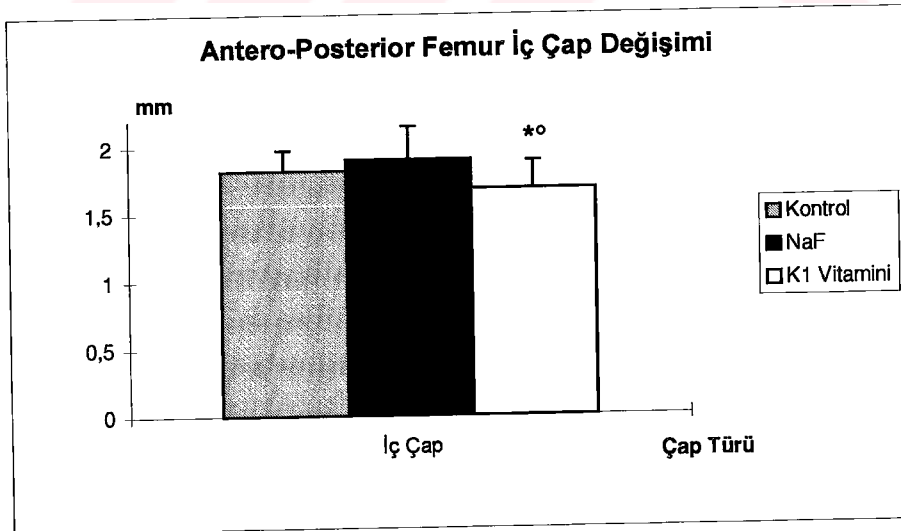
4.1.4. Kesit Çap Değişimleri

4.1.4.1. Antero-Posterior Femur ve Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri

4.1.4.1.1. Antero-Posterior Femur Dış ve İç Çap Değişimleri



Şekil 4.12 Antero-posterior femur dış çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



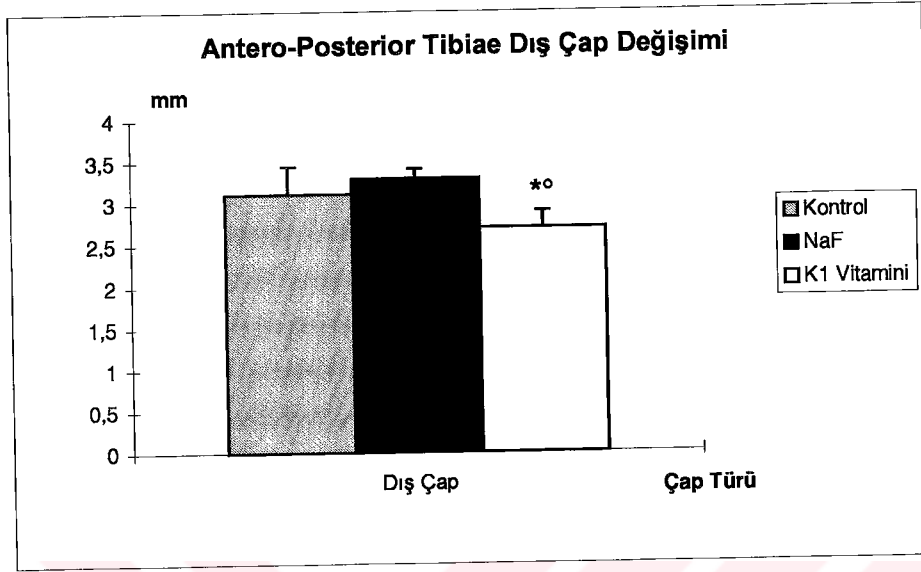
Şekil 4.13 Antero-posterior femur iç çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.7 Antero-posterior femur dış ve iç çap değişimleri (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ♦ = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$).

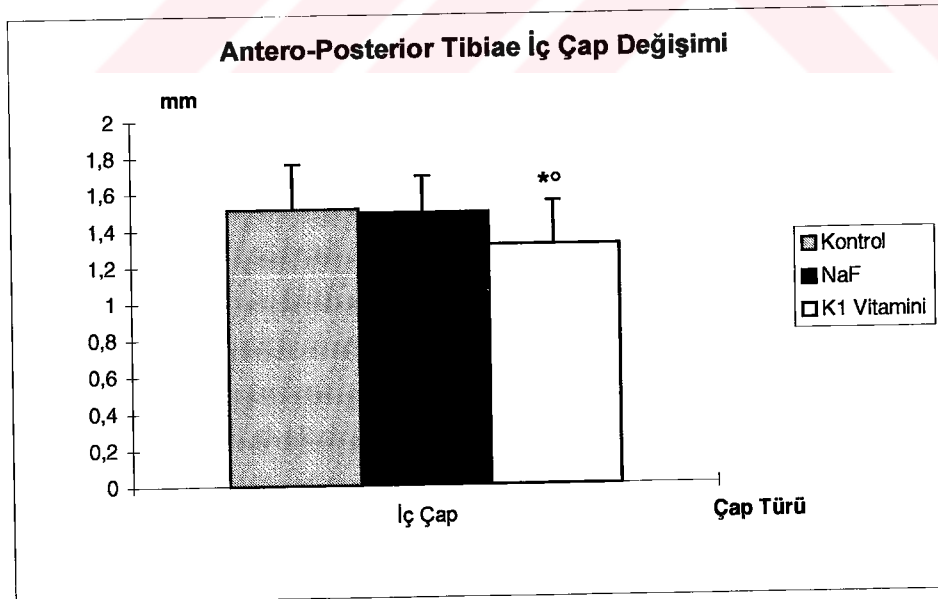
GRUPLAR	Dış Çap	İç Çap
Kontrol	2,94±0,1	1,82±0,15
NaF	3,15±0,15 (p* =0.0001)	1,90±0,25
K1 Vitamini	2,82±0,19 (p♦ =0.07) (p° =0.0001)	1,68±0,21 (p* =0.05) (p° =0.02)

NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında femura ait antero-posterior dış çap genişliğinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0.0001$). Yine aynı grupta iç çapta ise anlamlı fark bulunamadı. K1 vitamini grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle beraber, dış çap genişliğinde azalma dikkati çekti ($p=0.07$). K1 vitamini grubu NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, antero-posterior dış çap genişliğinin istatistiksel olarak anlamlı azaldığı kaydedildi ($p=0.0001$). K1 vitamini grubu, kontrol ($p=0.05$) ve NaF grubu ($p=0.02$) ile karşılaştırıldığında ise, iç çapta istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi.

4.1.4.1.2. Antero-Posterior Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri



Şekil 4.14 Antero-posterior tibiae dış çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.15 Antero-posterior tibiae iç çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

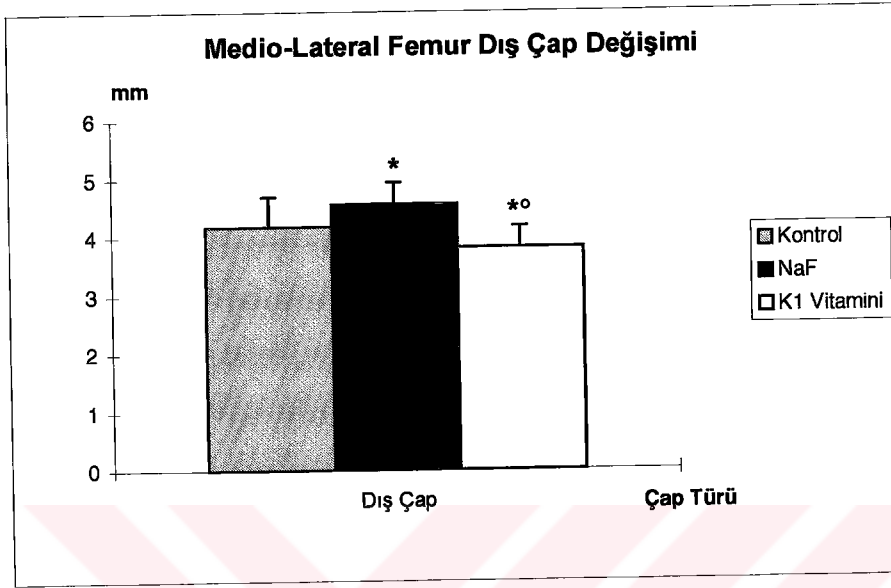
Çizelge 4.8 Antero-posterior tibiae dış ve iç çap değişimleri (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ♦ = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi.

GRUPLAR	Dış Çap	İç Çap
Kontrol	3,11±0,34	1,51±0,25
NaF	3,29±0,12 (p♦ =0.09)	1,49±0,2
K1 Vitamini	2,7±0,2 (p* =0.001) (p°=0.0000001)	1,31±0,24 (p* =0.05) (p°=0.05)

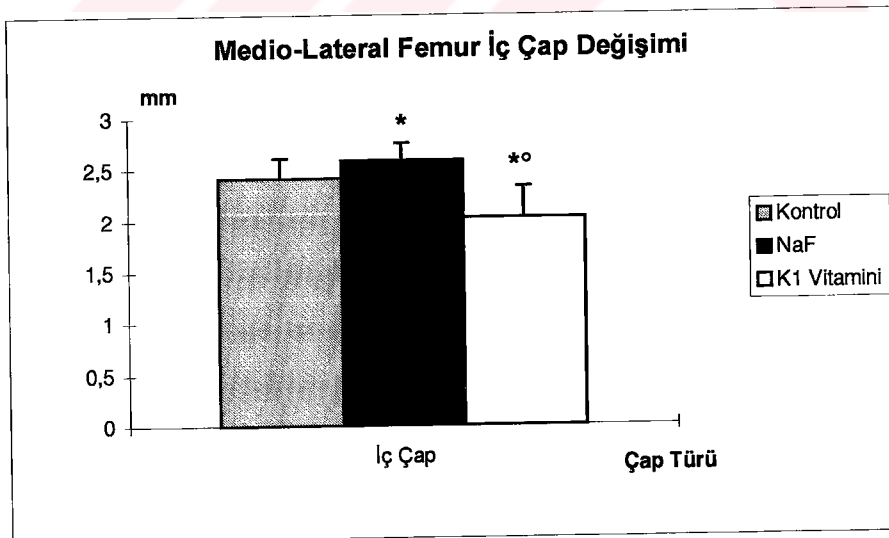
NaF grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tibiae'ya ait antero-posterior dış çap genişliğinde fark görülmemekle beraber, artış olduğu dikkati çekti ($p=0.09$). Aynı grupta, iç çapta ise bir fark görülmedi. K1 vitamini grubunda ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dış ($p=0.001$) ve iç ($p=0.05$) çap genişliklerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. Yine aynı grupta, NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, dış ($p=0.0000001$) ve iç ($p=0.05$) çaplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi.

4.1.4.2. Medio-Lateral Femur ve Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri

4.1.4.2.1. Medio-Lateral Femur Dış ve İç Çap Değişimleri



Şekil 4.16 Medio-lateral femur dış çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



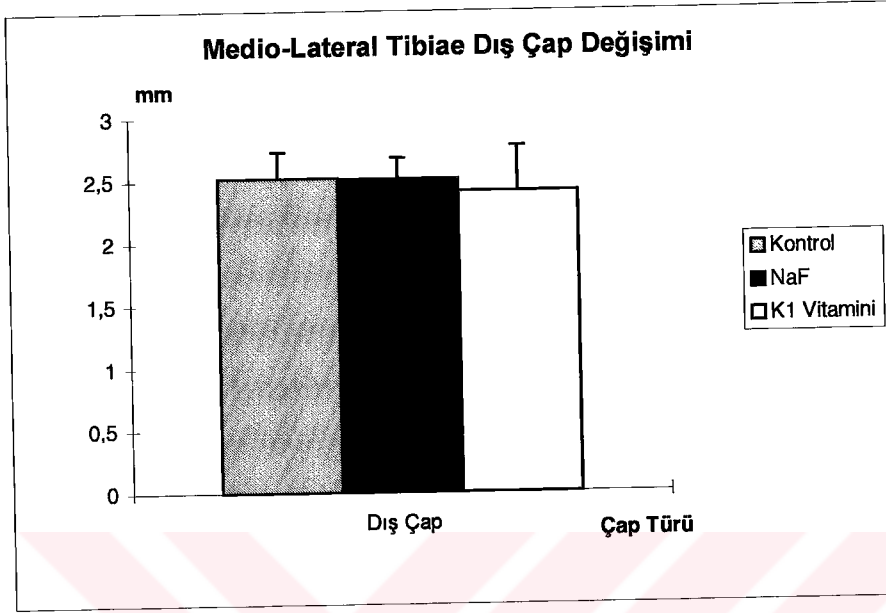
Şekil 4.17 Medio-lateral femur iç çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.9 Medio-lateral femur dış ve iç çap değişimi (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

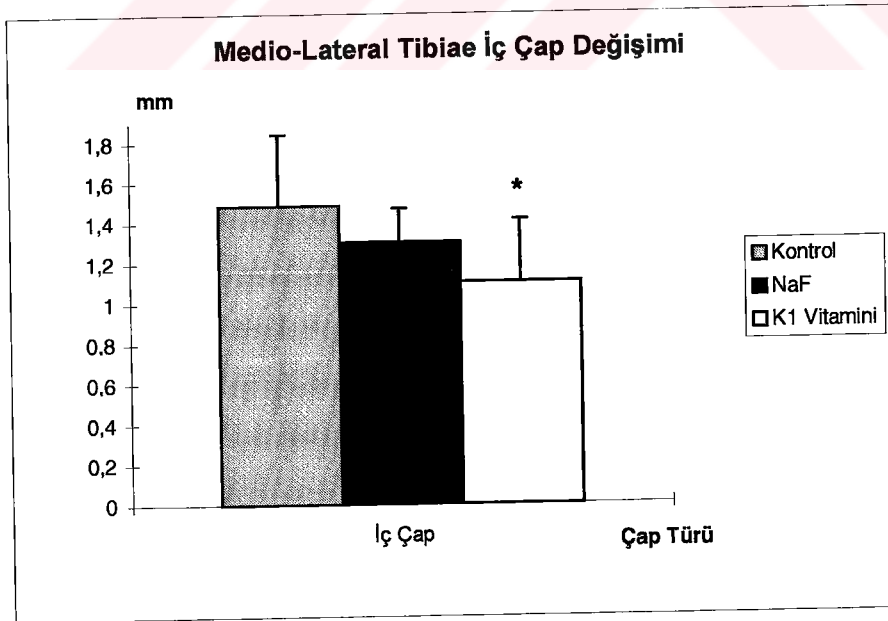
GRUPLAR	Dış Çap	İç Çap
Kontrol	4,18±0,51	2,41±0,2
NaF	4,56±0,37 (p* =0.03)	2,58±0,17 (p* =0.03)
K1 Vitamini	3,81±0,37 (p* =0.04) (p°=0.00002)	2,02±0,31 (p* =0.0009) (p°=0.00002)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubunda femura ait medio-lateral dış ($p=0.03$) ve iç ($p=0.03$) çap genişliklerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. K1 vitamini grubunda ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında dış ($p=0.04$) ve iç ($p=0.0009$) çap genişliklerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi. K1 Vitamini grubu, NaF grubu ile karşılaştırıldığında yine medio-lateral dış ($p=0.00002$) ve iç ($p=0.00002$) çaplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü.

4.1.4.2.2. Medio-Lateral Tibiae Dış ve İç Çap Değişimleri



Şekil 4.18 Medio-lateral tibiae dış çap değişimi (mm).



Şekil 4.19 Medio-lateral tibiae iç çap değişimi (mm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

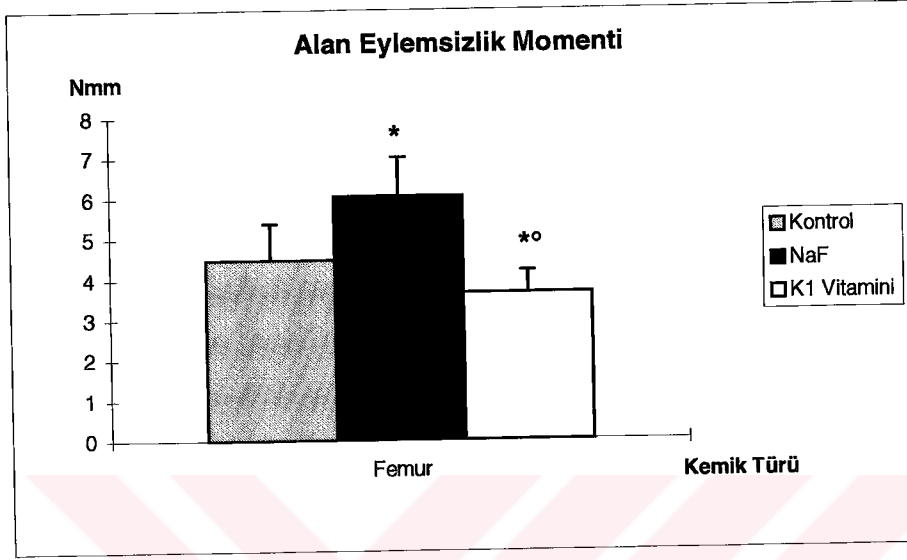
Çizelge 4.10 Medio-lateral tibiae dış ve iç çap değişimleri (mm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). • = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$).

GRUPLAR	Dış Çap	İç Çap
Kontrol	2,52±0,21	1,48±0,36
NaF	2,51±0,17	1,3±0,17
K1 Vitamini	2,41±0,36	1,1±0,31 (p* =0.01) (p• =0.07)

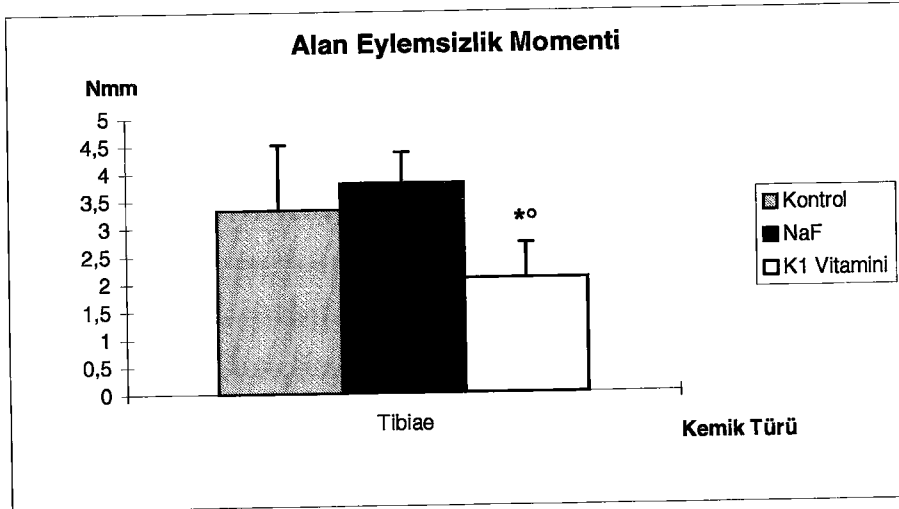
NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tibiae'ya ait medio-lateral dış ve iç çap genişliklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. K1 vitamini grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, dış çap genişliğinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle beraber, iç çap genişliğinde anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.01$). K1 vitamini grubu NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, iç çap genişliğinde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemekle beraber azalma olduğu saptandı ($p=0.07$).

4.2. Biyomekanik Test Bulguları

4.2.1. Femur ve Tibiae'ya Ait Alan Eylemsizlik Momentleri



Şekil 4.20 Femura ait AEM değerleri (Nmm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.21 Tibiae'ya ait AEM değerleri (Nmm). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

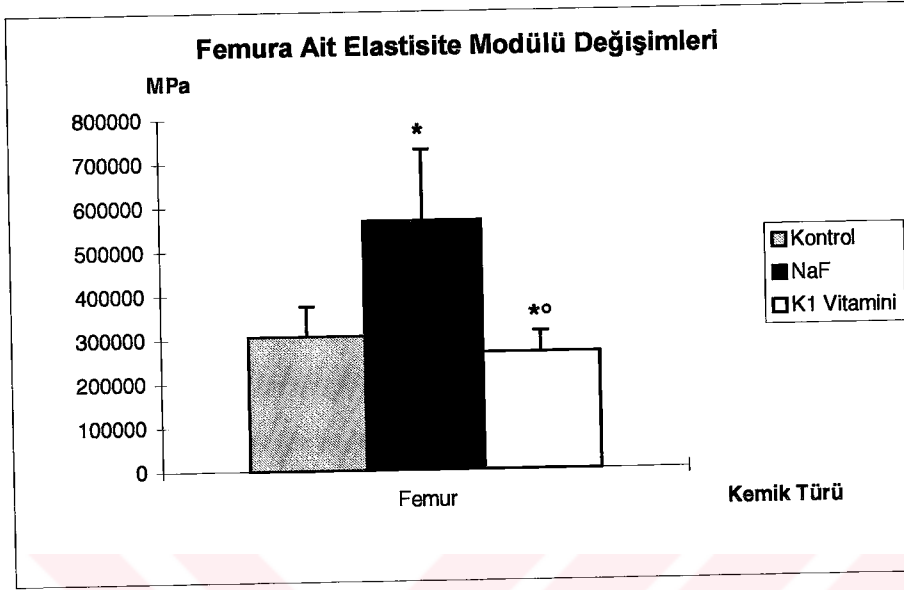
Çizelge 4.11 Femur ve tibiae'ya ait AEM değerleri (Nmm). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ♦ = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yok fakat değişim gözlemlendi ($p > 0.05$).

GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	4,47±0,89	3,33±1,18
NaF	6,05±0,96 (p* =0.001)	3,81±0,55 (p♦ =0.07)
K1 Vitamini	3,65±0,54 (p* =0.007) (p°=0.0001)	2,08±0,63 (p* =0.02) (p°=0.0001)

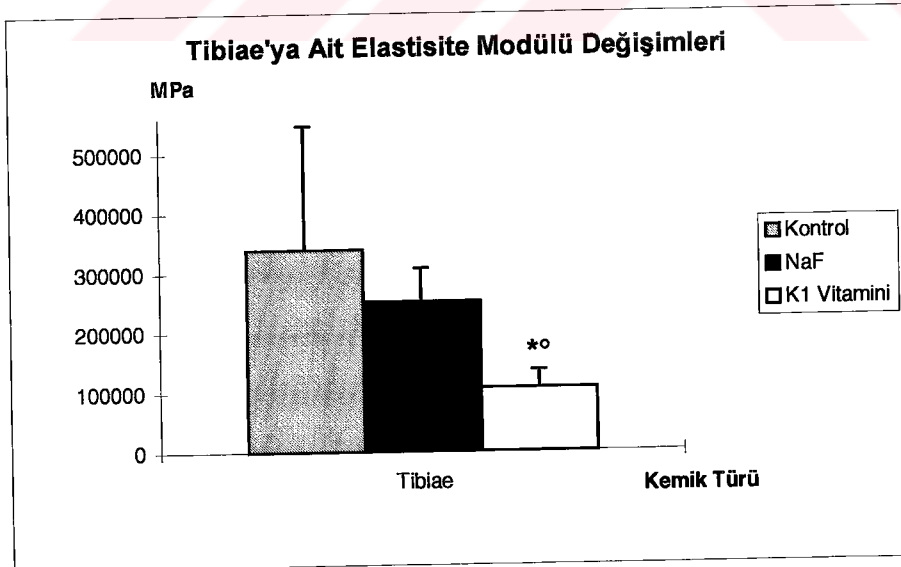
NaF grubunda, femura ait AEM değeri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilirken ($p=0.001$), K1 vitamini grubunda anlamlı azalma görüldü ($p=0.007$). K1 vitamini grubu, NaF grubu ile karşılaştırıldığında, yine istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0.0001$).

NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tibiae'ya ait AEM değerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmamakla beraber, artış olduğu dikkati çekti ($p=0.07$). K1 vitamini grubunda tibiae'ya ait AEM değerinde ise, kontrol grubu ($p=0.02$) ve NaF grubu ile ($p=0.0001$) karşılaştırıldığında anlamlı azalma olduğu saptandı.

4.2.2. Femur ve Tibiae'ya Ait Elastisite Modülü Değerleri



Şekil 4.22 Femura ait EM değerleri (MPa). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.23 Tibiae'ya ait EM değerleri (MPa). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

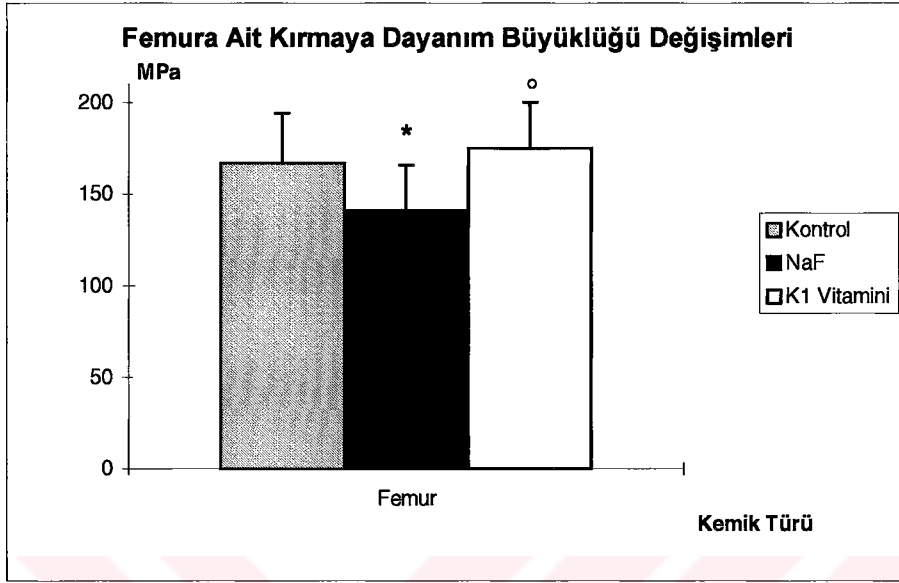
Çizelge 4.12 Femur ve tibiae'ya ait EM değerleri (MPa). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	306100±67988	338610±207419
NaF	566997±160693 (p=0.0001)	250633±57108
K1 Vitamini	266132±48173 (p* =0.048) (p°=0.0001)	105537±30318 (p* =0.0001) (p°=0.0001)

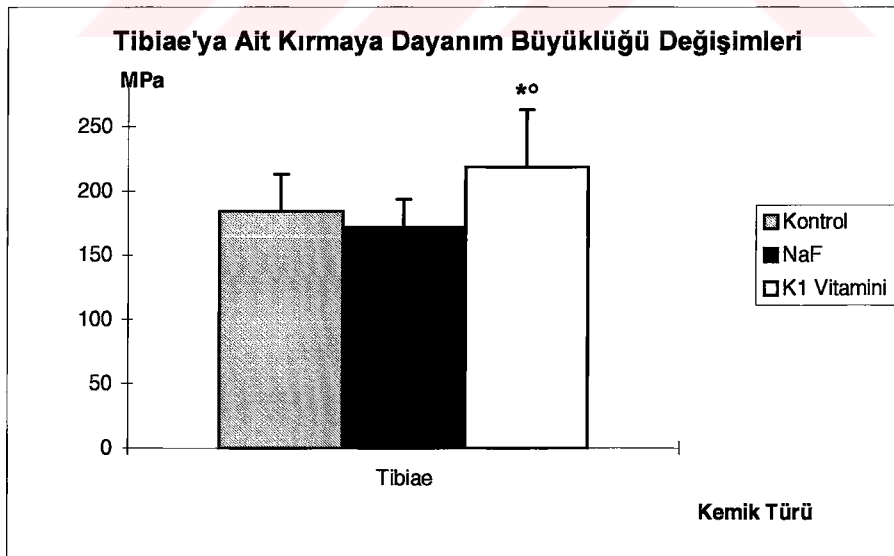
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NaF grubunda femura ait EM değerinde istatistiksel olarak anlamlı artış ($p=0.0001$) ve K1 vitamini grubunda ise anlamlı azalma ($p=0.048$) saptandı. NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, K1 vitamini grubunda ise anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.0001$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubunda tibiae'ya ait EM değerinde anlamlı fark gözlenmezken, K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.0001$). Yine NaF grubu ile karşılaştırıldığında, K1 vitamini grubunda tibiae'ya ait EM değerinde anlamlı azalma olduğu saptandı ($p=0.0001$).

4.2.3. Femur ve Tibiae'ya Ait Kırmaya Dayanım Büyüklüğü



Şekil 4.24 Femura ait KDB değerleri (MPa). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).



Şekil 4.25 Tibiae'ya ait KDB değerleri (MPa). *= Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). °= NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.13 Femur ve tibiae'ya ait KDB değerleri (MPa). * = Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$). ° = NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p \leq 0.05$).

GRUPLAR	Femur	Tibiae
Kontrol	166.7±27.38	183.90±29.08
NaF	141.07±24.72 (p* =0.015)	171.44±21.78
K1 Vitamini	174.71±25.32 (p°=0.001)	218.34±44.66 (p* =0.016) (p°=0.011)

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubunda femura ait KDB'nde istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedildi ($p=0.015$). K1 vitamini grubunun ise kontrolden farklı olmadığı görüldü. K1 Vitamini grubu, NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, KDB açısından istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu kaydedildi ($p=0.001$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, NaF grubunda tibiae'ya ait KDB'nde fark görülmezken, K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu kaydedildi ($p=0.016$). Yine K1 vitamini grubunda NaF grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı ($p=0.011$).

4.3 Histolojik Bulgular

4.3.1 Kontrol Grubuna Ait Histolojik Değerlendirmeler



Şekil 4.26 Kontrol grubuna ait vertebra kesitleri.

A. Trabeküler kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi (k), osteosit içeren lakünalar (ol), trabeküler kemik (tk), interkonnekte boşluklar (ikb), vertebral foramen (vf) ve medulla spinalis (ms). (Goldner Trikrom, x75)

B. Trabeküler kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi (k), osteosit içeren lakünalar (ol), trabeküler kemik (tk). (Goldner Trikrom, x150)

Hem vertebra, hem de femur kemiklerinden hazırlanan dekalsifiye kesitlere uygulanan özel Goldner'in trikrom boyama yöntemi ile, mineralize kemiğin dekalsifiye formunu temsil eden kemik matriksinin, yeşil renkte boyandığı izlendi.

Vertebra kemiğine ait gövde ve uzantılarında hazırlanan kesitlerde, trabeküler kemiği oluşturan trabekülaların endosteum ile döşeli olduğu ve trabekülalar arasında kalan interkonnekte boşluklarda, kemik iliğinin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.26a, b). Bu hemopoetik doku içerisinde, yer yer adipozitler görüldü. Vertebral foramende medulla spinalisin bulunduğu, vertebra gövdesi periferinde ise bölgesel kas liflerinin yer aldığı dikkati çekti (Şekil 4.26a). Bununla birlikte, olgun kemik dokusuna ait osteosit içeren lakünalar bulunmaktaydı (Şekil 4.26a, b).





B

Şekil 4.27 Kontrol grubuna ait femur kesitleri.

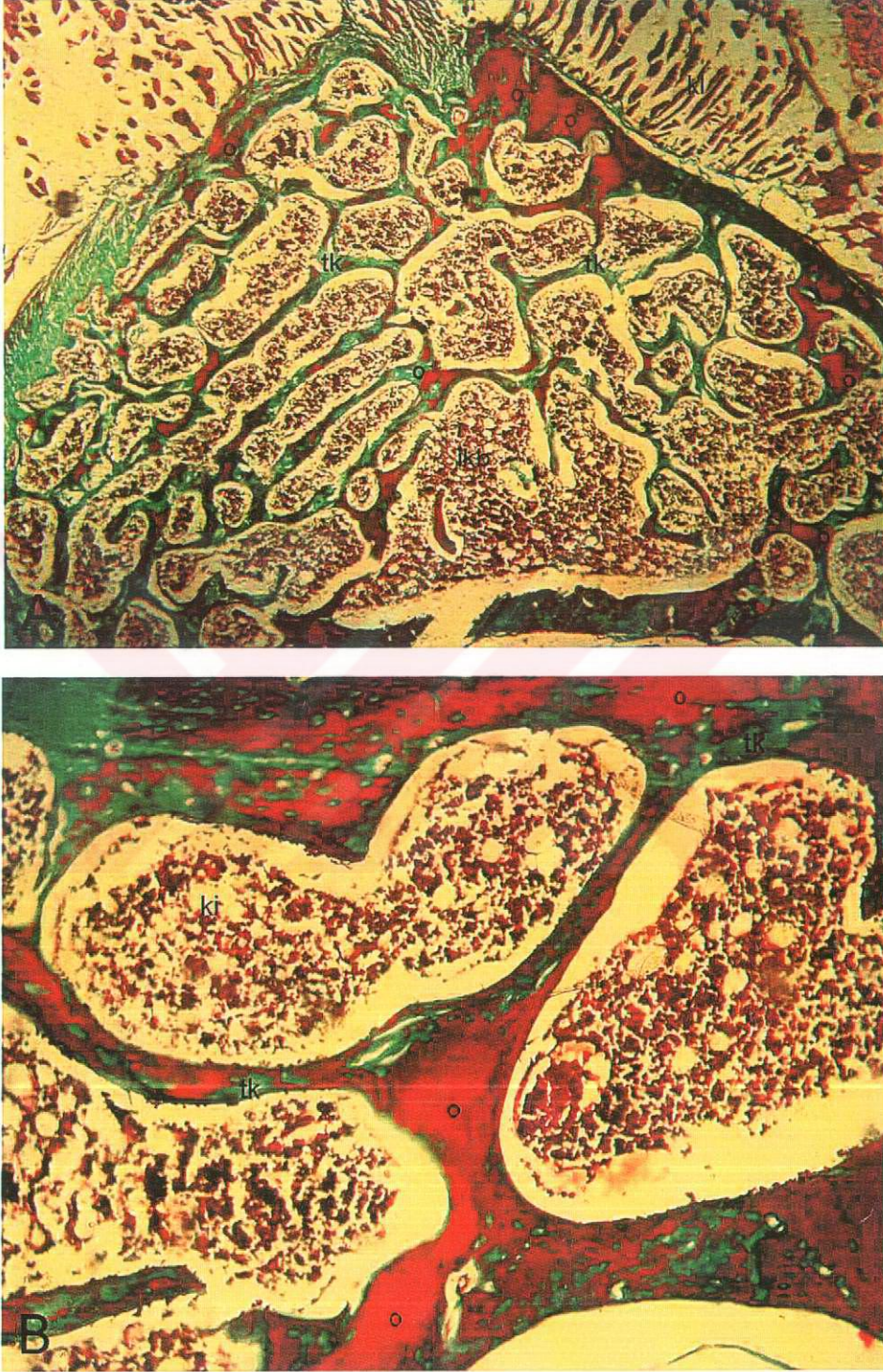
A. Kortikal kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi (k), osteosit içeren lakünalar (ol), nöro-vasküler yapı içeren havers kanalları (h), endosteum (e). (Goldner Trikrom, x150)

B. Kortikal kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi (k), osteosit içeren lakünalar (ol), nöro-vasküler yapı içeren havers kanalları (h), endosteum (e), periosteum (p). (Goldner Trikrom, x150)

Femur kemiğinin diafiz bölgesinde hazırlanan kesitlerde, kortikal kemiğe ait bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi zemininde, kemikteki nöro-vasküler kanalları simgeleyen havers kanalları ile çevrelerinde konsentrik dizilmiş kemik lamellerinin oluşturduğu havers sistemleri izlendi (Şekil 4.27a, b). Yer yer havers kanallarının çaplarının daraldığı ve osteositlerin lakünalar içerisinde yerleştiği gözlemlendi. Kemiğin merkezinde aktif hemopoetik doku içeren medullar kavitenin özelleşmiş ince bağ dokusu niteliğindeki endosteum ile döşeli olduğu saptandı. Bir başka alanda ise, kortikal kemiğin bir yüzünün periosteum, diğer yüzünün ise endosteum ile döşeli olduğu görüldü (Şekil 4.27b).



4.3.2 NaF Grubuna Ait Histolojik Değerlendirmeler



Şekil 4.28 NaF grubuna ait vertebra kesitleri.

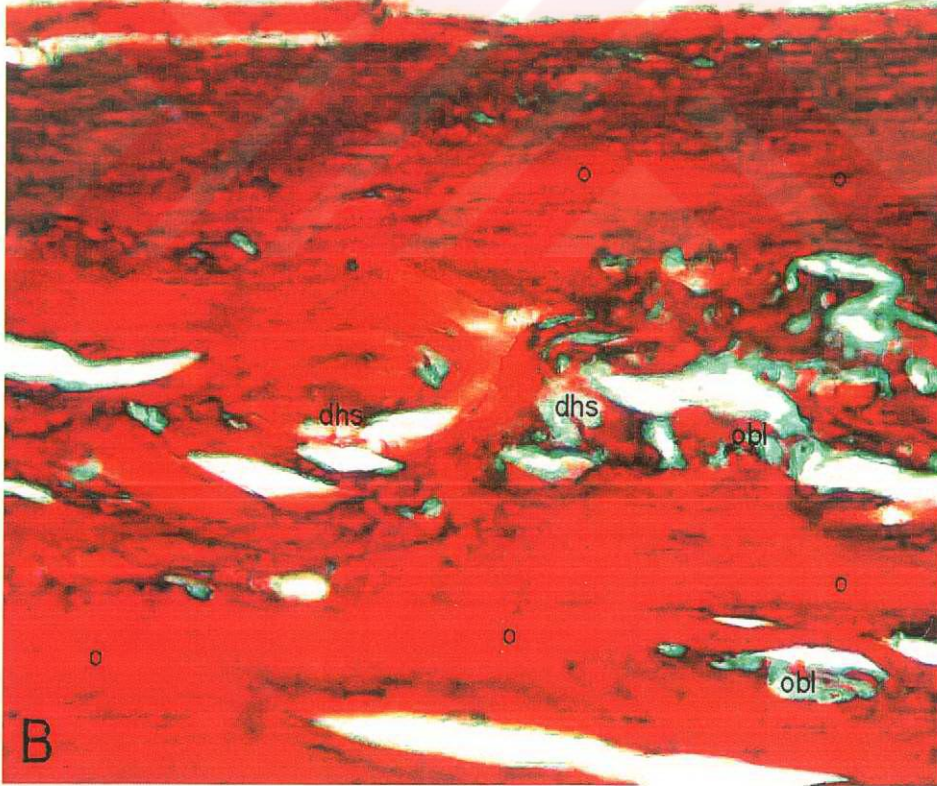
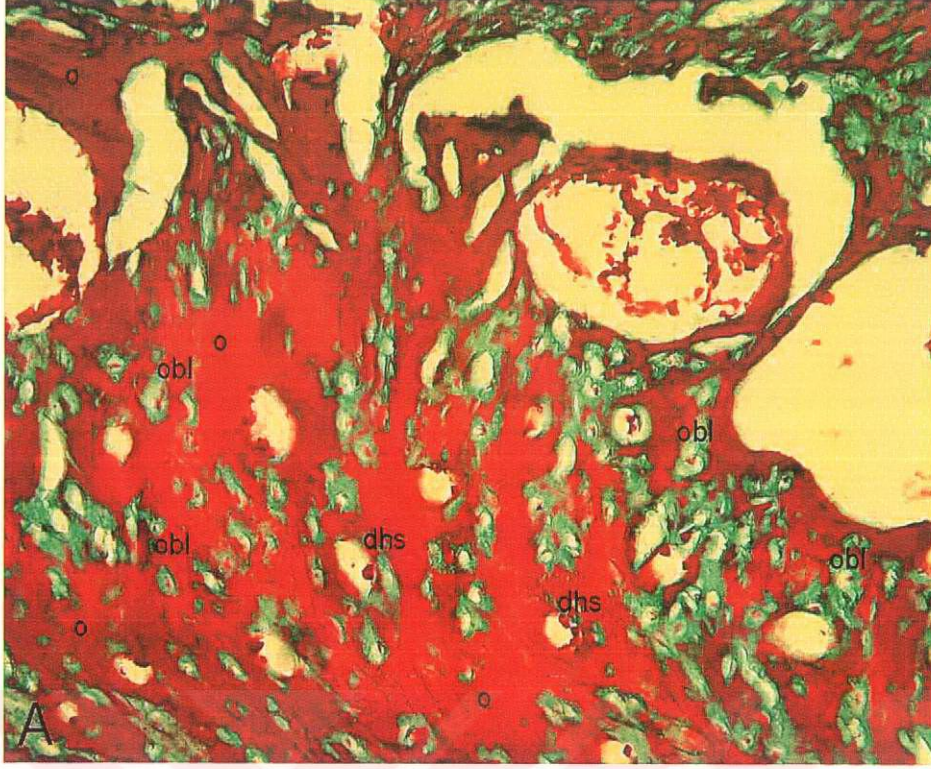
A. Trabeküler kemikte düzensiz yeni kemik yapımını simgeleyen osteoid alanları (o), çevre kas lifleri (kl), trabeküler kemik (tk), interkonnekte boşluklar (ikb). (Goldner Trikrom, x75)

B. Trabeküler kemikte düzensiz yeni kemik yapımını simgeleyen osteoid alanları (o), osteosit içeren trabeküler kemik (otk), kemik iliği (ki). (Goldner Trikrom, x150)

Vertebra kemiğinde hazırlanan dekalsifiye kesitlere uygulanan özel Goldner'in trikrom boyama yöntemi ile, mineralizasyon bozukluğu olan kemiğin dekalsifiye formunu temsil eden kemik matriksinin kırmızı renkte boyandığı dikkati çekti (Şekil 4.28a, b).

Vertebra kemiğine ait gövde ve uzantılarda hazırlanan kesitlerde, ilik boşluklarını döşeyen osteoprojenitör hücreler daha aktif hal almışlardı (Şekil 4.28a, b). Kontrol kesitleri ile karşılaştırıldığında, kemik trabekülalarına ait matrikste, lakünalar daha geniş izlendi. Osteosit içeren kemik trabekülleri ve bu kemik trabekülleri arasında düzensiz, mineralizasyon bozukluğu olan yeni kemik yapımını simgeleyen kırmızı ile boyanan yaygın osteoid alanları tespit edildi (Şekil 4.28b).





Şekil 4.29 NaF grubuna ait femur kesitleri.

A. Kortikal kemikte düzensiz yeni kemik yapımını simgeleyen osteoid alanları (o), bol osteoblastlar ile lakünalar (obl), düzensiz havers sistemleri (dhs). (Goldner Trikrom, x400)

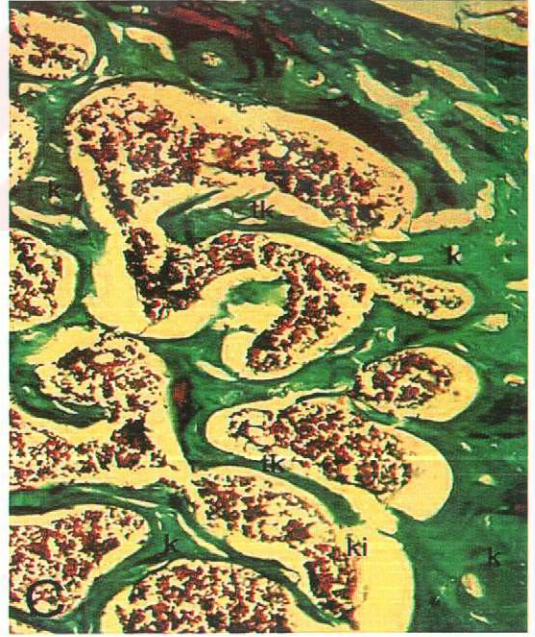
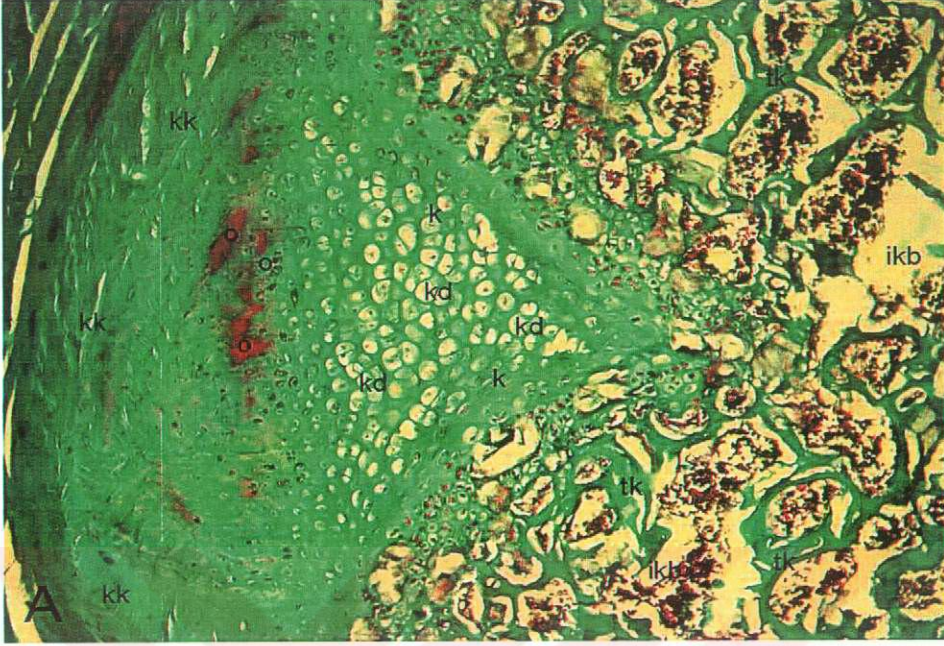
B. Kortikal kemikte düzensiz yeni kemik yapımını simgeleyen osteoid alanları (o), osteoblastlar ile lakünalar (obl), düzensiz havers sistemleri (dhs). (Goldner Trikrom, x400)

Femur kemiğinin diafiz bölgesinde hazırlanan kesitlerde, mineralizasyon bozukluğunun yanısıra, yeni düzensiz kemik yapımını simgeleyen lameller arasında kırmızı ile boyanan yaygın osteoid alanları ve lakünalar içerisinde osteoblastlar izlendi (Şekil 4.29a). Düzensiz lameller kemik gelişimi, düzensiz şekillenmiş havers sistemleri ile belirlenen kemik matriksi zemini saptandı (Şekil 4.29a, b).

Genel olarak, NaF grubuna ait kesitler, kontrol grubuna ait kesitlerle karşılaştırıldığında, yeşil renkte boyanan, mineralize kemiğe ait bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksinin yerini, kırmızı renkte boyanan, mineralizasyon bozukluğu olan yeni kemik yapımını simgeleyen yaygın osteoid alanlarının aldığı izlendi.



4.3.3 K1 Vitamini Grubuna Ait Histolojik Değerlendirmeler



Şekil 4.30 K1 vitamini grubuna ait vertebra kesitleri.

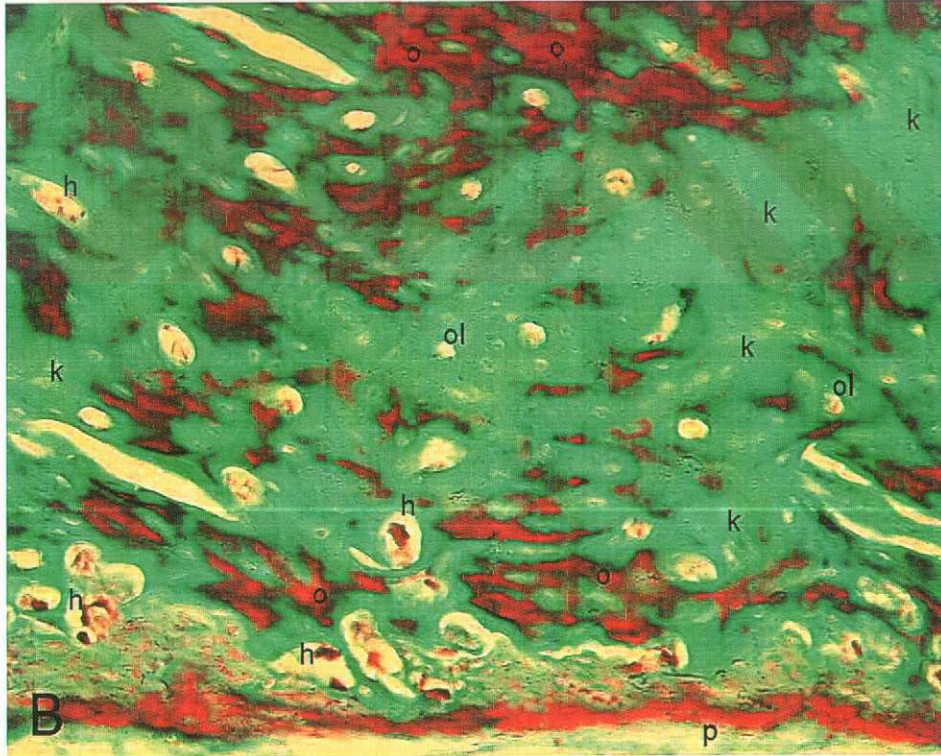
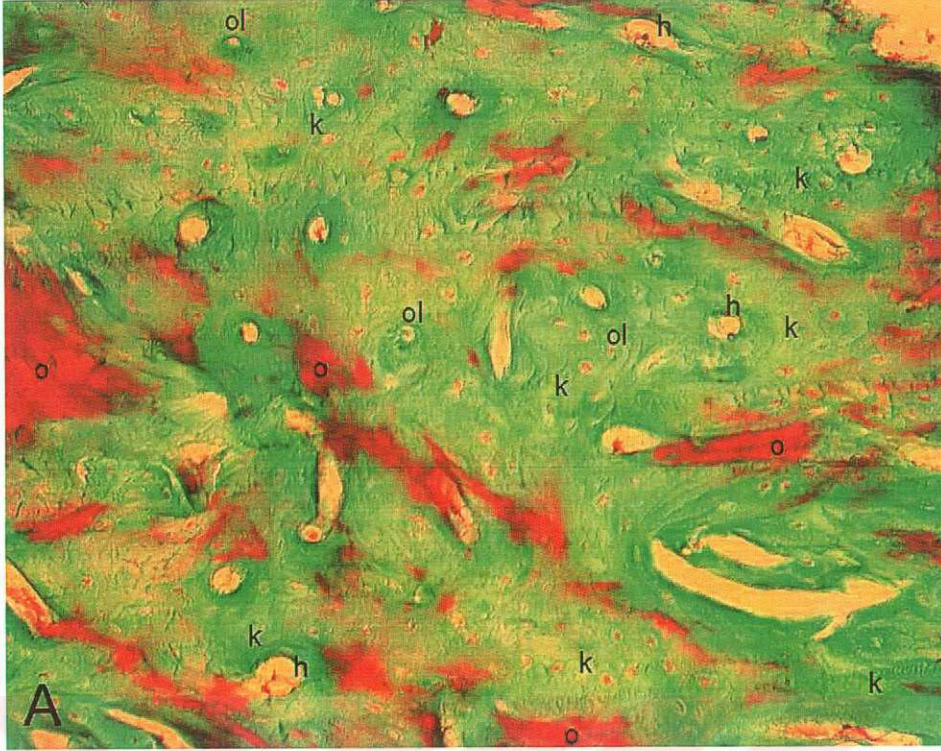
A. Trabeküler kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matrisi (k), trabeküler kemikte yeni kemik yapımına dikkat çeken osteoidler (o), endokondral kemikleşme bölgesi (e), kondrositler (kd), kortikal kemik (kk), trabeküler kemik (tk), interkonnekte boşluklar (ikb). (Goldner Trikrom, x150)

B. Trabeküler kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matrisi (k), trabeküler kemik (tk), kemik iliği (ki). (Goldner Trikrom, x75)

C. Trabeküler kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matrisi (k), trabeküler kemik (tk), kemik iliği (ki). (Goldner Trikrom, x150)

Diyetlerinde, NaF ve K1 vitaminini birlikte alan bu grupta, vertebra gövdesine ve uzantılarına ait kesitlerde, endokondral kemikleşme bölgesinin yanısıra trabeküler yapıdaki kemik alanları izlendi (Şekil 4.30a). Endokondral kemikleşme bölgesi, yeşil renkle boyanan dekalsifiye kemik matriksi ile çevrili vakuollü kondrositlerden oluşmaktaydı. Bu bölgenin periferinde, sınırlı bölgede kırmızı renk ile belirlenen osteoid alanları seçildi. NaF grubu ile karşılaştırıldığında ise, trabeküler kemiği oluşturan matriks zemininde, yeşil renkte boyanan bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi oluşumunun, NaF grubunda gözlenen ve kırmızı renkte boyanan mineralizasyon bozukluğunu simgeleyen yaygın, düzensiz osteoid alanlarının yerini aldığı tespit edildi (Şekil 4.30a, b, c).





Şekil 4.31 K1 vitamini grubuna ait femur kesitleri.

A. Kortikal kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi (k), osteosit içeren lakünalar (ol), osteoid kalıntıları (o), nöro-vasküler yapı içeren havers kanalları (h). (Goldner Trikrom, x150)

B. Kortikal kemikte bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksi (k), osteosit içeren lakünalar (ol), osteoid kalıntıları (o), nöro-vasküler yapı içeren havers kanalları (h), periosteum (p). (Goldner Trikrom, x400)

Femur kemiğinin diafiz bölgesinde hazırlanan kemik kesitleri, NaF grubuna ait kemik kesitleri ile karşılaştırıldığında, K1 vitamini grubuna ait femur kesitlerinde, kemik matriksi zemininde lakünalar ve havers kanalları çevresindeki kemik lamellerinin çok daha az yoğunluklu kırmızı renk ile boyanan osteoid alanları içerdiği görüldü (Şekil 4.31a, b). Bu grupta tekrar osteosit içeren geniş lakünalar görüldü (Şekil 4.31a, b). Ayrıca, periosteumu oluşturan ince bağ dokusuna ait osteoprojenitör hücreler izlendi.

Diyetlerinde, NaF'e ilaveten K1 vitamini alan bu grupta elde edilen kemik kesitleri, genel olarak NaF grubunda elde edilen kemik kesitleri ile karşılaştırıldığında, kemikte mineralizasyonun arttığını simgeleyen yeşil renkte boyanan bol kollojen içeren dekalsifiye kemik matriksinin arttığı ve kırmızı renkte boyanan mineralizasyon bozukluğu ve düzensiz yeni kemik yapımını simgeleyen osteoid alanların ise kalıntılar halinde kaldığı izlendi.



5.TARTIŞMA

Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları, daha önce belirtildiği gibi rastgele 3 gruba dağıtılmıştır. Oniki haftalık beslenme süresi boyunca, NaF ve K1 vitamini almayan ilk grup, kontrol grubunu oluşturmuştur. Bu grup, NaF ve K1 vitamini gruplarındaki deney hayvanlarından elde edilen verilerin karşılaştırılması için gereken referans grubunu teşkil etmiştir. İkinci grup olan NaF grubu ise, terapötik etkinliği araştırılacak olan K1 vitamininin etkinliğinin inceleneceği iskeletsel florozisin oluşturulduğu grup olmuştur. İskeletsel florozis oluşturmak amacıyla verilen 125 ppm NaF'ün hastalığı oluşturmadaki başarısı, bu grupta iskeletsel florozise özgü morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişikliklerin, kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu saptanmıştır. İncelenen parametrelerdeki değişiklikler, NaF grubunda, iskeletsel florozise özgü morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişikliklerin oluşturulmasında, başarılı olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar, iskeletsel florozis gelişen uzun kemiklerde, KKK'ndaki artışa rağmen kemik kırılabilirliğinin arttığını göstermiştir^{30,176,177}. Literatürde, aynı dozu kullandıklarını bildiren bir başka araştırma, 125 ppm NaF'ün sadece 2 ay süreyle kullanılmasına rağmen, deney hayvanlarında iskeletsel florozise özgü değişiklikleri oluşturabildiğini bildirmiştir. Deney hayvanlarında intoksikasyon ve ölümün gerçekleşmediğini bildiren çalışma, bu dozun güvenli ve etkin doz olduğunu bildirmiştir¹⁷⁸. Bu bilgiler, sunulan çalışmada elde edilen bulgularla uyumludur. 125 ppm NaF, sunulan çalışmada deney hayvanları tarafından iyi tolere edilmiş ve doza bağlı ölüm gerçekleşmemiştir.

Üçüncü grup olan K1 vitamini grubunda yer alan deney hayvanlarına, iskeletsel florozis oluşturmak için verilen 125 ppm NaF'ün yanısıra, K1 vitamini verilmiş ve iskeletsel florozise özgü tipik bulgularda meydana gelebilecek

değişiklikler takip edilmiştir. Bu gruptaki deney hayvanlarından elde edilen veriler kontrol ve NaF grupları ile karşılaştırılarak, K1 vitamininin muhtemel terapötik etkinliği değerlendirilmiştir. İskeletsel florozise karşı koruyucu ve ya terapötik etkisi incelenen K1 vitamininin bu çalışmada veriliş dozu, günde 0.2 mg/g'dır. K1 vitamininin günde 0.1-0.3 mg/g miktarında verildiği taktirde kemikte terapötik etki gösterebilecek konsantrasyona ulaştığı literatürde bildirilmiştir¹⁷⁹.

K1 vitamini, bağırsaklardaki emiliminin artması için deney hayvanlarına yağda çözülerek verilmiştir. Yağ içerisinde çözündürülmüş K1 vitamininin, 12 hafta süresince deney hayvanlarına veriliş sırasında gastrointestinal probleme rastlanmamıştır. K1 vitamininin, yağ ile birlikte bağırsaklardan yeterince emildiğini gösteren bu gözlem, 4 hafta kadar erken bir dönemde dahi, erkek Wistar türü sıçanlarda bağırsak adaptasyonunun geliştiğine işaret etmektedir. Bununla beraber, dört haftalık yeni sütten kesilmiş yavru sıçanların, pelet formundaki sıçan yemi ile beslenmeye geçiş döneminde, bir tanesi kontrol, bir tanesi NaF grubundan olmak üzere, iki deney hayvanı yeni beslenme şartlarına adapte olamadığı için hızla vücut ağırlığı kaybına uğrayarak ölmüştür. Nedeni kesin olarak bilinmemekle beraber, NaF grubunda yer alan iki ve K1 vitamini grubunda yer alan beş deney hayvanının boğaz bölgesinde apse formasyonu gelişmiştir. Kontrol grubunda bu sorunla karşılaşmamakla beraber, apse formasyonu gelişen deney hayvanlarından NaF grubunda yer alan bir ve K1 vitamini grubunda yer alan iki sıçan ölmüştür. NaF grubunda yer alan bir ve K1 vitamini grubunda yer alan diğer üç sıçan ise gerekli tıbbi müdahalenin yapılması sonrası iyileşmiştir.

Bu tür apse formasyonlarının çeşitli nedenleri olabilir. Bunlar içerisinde en ihtimal dahilinde olan kafesteki hayvanların birbirlerine zarar vermiş olmasıdır. Gavaj yöntemi uygulanmayan NaF grubunda da apse formasyonu gelişen deney hayvanlarının oluşu, hayvanların birbirlerine verdikleri zarar ihtimalini güçlendirmektedir.

Gavaj yönteminin apse formasyonu gelişmesinde etken olma ihtimali az olmakla birlikte, K1 vitamini grubunda yer alan deney hayvanlarının ağırlıklarının, kontrol ve NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak

anlamalı azalma göstermesi, 12 hafta süresince hergün gavaj yöntemi uygulanışının, K1 vitamini grubundaki sıçanların boğazında travma oluşması sonucu beslenmenin olumsuz yönde etkilenmesi ihtimalini akla getirmektedir. Bununla birlikte, bu gruptaki deney hayvanlarının ağırlıklarındaki azalmanın, K1 vitaminin yağda çözünmüş formunun deney hayvanlarının iştah durumunu olumsuz yönde etkilemesi ve dolayısıyla aldıkları besin miktarının azalması sonucu meydana gelebileceğini de belirtmek gerekir. Bu anlamda, K1 vitamininin aqua formunun kullanımı yağda çözünmüş formuna göre daha avantajlı olacaktır.

K1 vitamini, insan veya hayvanlara gavaj yöntemi dışında, intramusküler (IM) ve intraperitoneal (IP) olarak da verilebilir. Bununla beraber yapılan çalışmalar, K1 vitamininin IM veya IP olarak verilmesi durumunda, vitamin metabolizmasının birkaç saat kadar kısa olduğunu göstermiştir^{180,181}. Dolayısıyla K1 vitamininin dolaşım sisteminde, kemiğin ihtiyacını karşılayacak şekilde sürekli olarak belirli bir düzeyde bulunması için, IM veya IP enjeksiyonun günde en az 4-6 kez uygulanması gerekir. Bu yöntemlerin, belirtilen sıklıkta dört ay kadar uzun bir süre uygulanışı, hayvanlar üzerinde ağrı gibi olumsuz etkilerin oluşmasına neden olabileceği gibi pratik de olmayacaktır. Bu nedenle genel olarak K1 vitamininin ağızdan deney hayvanlarına verilmesi bir avantajdır; fakat beraberinde deney hayvanlarına verilmesi gereken dozun ayarlanması sıkıntısını getirir. Gavaj yöntemi ise, verilmek istenen ilacın, tam olarak istenen dozda ve istendiği zaman verilmesi avantajına sahiptir. Bu nedenle sunulan çalışmada, K1 vitaminine yönelik ileride yapılacak çalışmalarda, bu vitaminin özellikle aqua formunun gavaj yöntemi ile verilisinin diğer yöntemlere göre avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu teze konu olan orijinal çalışmada, Wistar türü sıçanlarda K1 vitamininin, NaF ile oluşturulan iskeletsel florozis üzerindeki etkisi daha önce de belirtildiği gibi morfometrik, biyomekanik ve histolojik olarak incelenmiştir. Morfolojik anlamda gerçekleştirilen ölçümler, iskeletsel florozise özgü KKK ve kortikal kemik çap değişimlerini tespit etmek ve K1 vitamini verilisinin, morfolojik anlamda meydana gelen bu değişiklikleri ne şekilde etkilediğini gözlemlemek üzere uygulanmıştır. Sonuçlar, NaF grubunda femura ait

ortalama ve toplam KKK'nın, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil 5.1). Femurda, ortalama ve toplam KKK'na yansıyan bu artış, aslında medio-lateral KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı artış olmaması nedeni ile, tamamen antero-posterior KKK'nın istatistiksel olarak anlamlı artışına bağlı olarak gerçekleşmiştir. Bu grupta femurda, antero-posterior iç çapta bir değişiklik olmaksızın, dış çapta istatistiksel olarak anlamlı artış olması ise, NaF'ün femurda antero-posterior yönde kemik yapım-yıkım dengesini, periosteal yüzeylerde kemik yapımı lehine bozduğunu, antero-posterior endosteal yüzeylerde ise, kemik yapım-yıkım dengesinin NaF'den etkilenmediği ve normal dengesini koruduğunu göstermektedir. NaF'ün femurda, antero-posterior yöndeki kemik yapım-yıkım dengesini bu şekilde değiştirmesi, antero-posterior KKK ve dış çap artışını açıklamaktadır.

Yine femurda, medio-lateral yönde KKK'nda bir değişiklik olmaksızın, bu yöndeki dış ve iç çaplarda artış gözlenmesi ise, hem periosteal ve hem de endosteal yüzeylerde kemik yapım-yıkım dengesinde bir değişiklik olmadan kemik yapım-yıkım hızının arttığına, bu nedenle KKK'nda değişiklik meydana gelmeden, etkinin sadece çaplarda artış şeklinde ortaya çıktığını göstermektedir. NaF grubunda, femur kemiğine ait bu sonuçlara genel olarak bakıldığında, NaF'ün femurda, KKK ve femur çapının artışına dolayısı ile aynı zamanda medullar alanın genişlemesine neden olduğu anlaşılmaktadır.

NaF grubunda, femurda gözlenen bu sonuçlar, iskeletsel florozis gelişen uzun kemikler için tipik bulgudur. Bu bilgiler, literatürde NaF'ün osteoporoz tedavisinde kullanımı veya normal kemik yapısı üzerindeki etkilerini inceleyen diğer çalışmalar ile uyumludur^{30,177,182-188}. Lafage ve ark.¹⁸⁸, domuzlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, florun deney hayvanlarının vertebral trabeküler kemik hacminin artışına neden olduğunu bildirmiştir. Aynı şekilde, Jiang ve ark.¹⁷⁷, florun sıçanlarda, L1 vertebra ve femurda kemik miktarı artışı ve genişlemesine neden olduğunu göstermiştir. Turner ve ark.³⁰ ise, bu çalışmalarla uyumlu olan, tavşanlarda gözledikleri kemik miktarı artışının, florun kemik yapım-yıkım dengesini bozması sonucu meydana geldiğini rapor etmiştir. Literatürdeki bu bilgiler ile birlikte, sunulan çalışmada elde edilen bulgular, florun direkt olarak

kemik yapımını uyardığını ve kemiğin yeniden yapılanma oranını periosteal yüzeylerde kemik yapımı ve endosteal yüzeylerde kemik yıkımı lehine bozacak şekilde artırdığını göstermektedir^{30,177,185}.

NaF grubunda tibiae'da ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, ortalama ve toplam KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Tibiae'da gözlenen tek farklılık, antero-posterior yönde, KKK'nda istatistiksel olarak anlamlı olan artıştır. Aynı şekilde, antero-posterior ve medio-lateral dış ve iç çap büyüklüklerinde de herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. NaF grubunda tibiae'da, antero-posterior yönde, dış ve iç çaplarda anlamlı farkın olmayışı, antero-posterior KKK artışı bulgusu ile birlikte değerlendirilecek olursa, KKK'ndaki artışın iki yönlü olarak periosteal ve endosteal yüzeylerde kemik yapımı lehine bozulduğunu; fakat bu iki yönlü değişimin, antero-posterior dış ve iç çaplara tek yönüyle yansması nedeniyle, dış ve iç çaplarda istatistiksel olarak anlamlı fark görülmediğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, antero-posterior KKK'nda görülen bu artış, yine ortalama ve toplam KKK'nı etkileyecek büyüklükte olmamıştır. Bu nedenle, medullar alan genişliği de tibiae'da NaF verilisinden etkilenmemiştir.

NaF grubunda femur ve tibiae kemiklerinde gözlenen KKK ve çap değişiklikleri gözönünde bulundurularak, genel bir değerlendirme yapıldığında bulgular, femur ve tibiae'da kemik yapım-yıkım dengesinin bozulduğunu; fakat bunun, femurda tibiae'ya oranla daha belirgin şekilde gözlendiğini ortaya koymuştur. Buna bağlı olarak, femurda KKK ve çap artışı gözlenirken, tibiae'da antero-posterior KKK artışı dışında önemli bir değişim meydana gelmemiştir.

K1 vitamini grubu ile NaF grubu karşılaştırıldığında ise, NaF'ün femur ve tibiae'da meydana getirdiği KKK artışının, K1 vitamini tarafından tamamen önlendiği ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. Öyleki, K1 vitamini grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, femura ait antero-posterior, ortalama ve toplam KKK'nda, istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. K1 vitamini grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tibiae'ya ait antero-posterior KKK'nda ise, istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu saptanmıştır.

Gruplar	Femur	Tibiae
NaF Grubu (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)		
K1 Vitamini Grubu (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)		
K1 Vitamini Grubu (NaF grubu ile karşılaştırıldığında)		

Şekil 5.1 Femur ve tibiae kemiklerine ait KKK ve çap değişimleri. ↔ İstatistiksel olarak anlamlı artışı, — istatistiksel olarak anlamlı azalmayı simgelemektedir.

Çap değişiklikleri anlamında, K1 vitamini grubu ile NaF grubu karşılaştırıldığında, K1 vitamininin femurda, NaF'ün neden olduğu antero-posterior dış, medio-lateral dış ve iç çaplardaki artışları tamamen önlediği görülmüştür (Şekil 5.1). Öyleki, NaF grubunda antero-posterior iç çapta anlamlı bir fark olmadığı halde, K1 vitamini grubunda bu uzunlukta istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. Aynı şekilde, K1 vitamini grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, femura ait antero-posterior dış çapta, istatistiksel olarak anlamlı fark olmayışı ve antero-posterior iç ve medio-lateral dış ve iç çapta istatistiksel olarak anlamlı azalma oluşu, K1 vitamininin femurda genel olarak periosteal yüzeylerde kemik yapımını, endosteal yüzeylerde ise kemik yıkımını

baskıladığını göstermektedir. Bu bulgular, K1 vitamininin femurda, NaF'ün neden olduğu çap artışını önleyebildiğini göstermiştir.

K1 vitamini grubunda tibiae, kontrol grubu ve NaF grubu ile karşılaştırıldığında, antero-posterior dış ve iç çapta istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu ve antero-posterior yönde tibiae kalınlığının azaldığı görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, buna ilaveten medio-lateral iç çapta da istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedilmiştir. Tibiae'ya ait bu sonuçlar, femurda olduğu gibi, K1 vitamininin periosteal yüzeylerde kemik yapımını, endosteal yüzeylerde ise kemik yıkımını önlediğini göstermektedir. Bununla birlikte tibiae'da, antero-posterior yönde çap azalışının, KKK'nda azalma ile birlikte görülmesi, buradaki periosteal kemik yapımının femura oranla daha fazla baskılandığını göstermektedir. K1 vitamininin, femur ve tibiae çaplarında meydana getirdiği azalma yönündeki değişiklikler, bu iki uzun kemiğin medullar alanının küçülmesi şeklinde ikincil bir etkiye de neden olmuştur.

K1 vitamininin, femur ve tibiae üzerinde, KKK ve çap genişliği anlamında yaptığı etki, birlikte değerlendirilecek olursa, K1 vitamininin, NaF'ün meydana getirdiği tüm morfolojik değişiklikleri önlemeyi başardığı görülmektedir. Sonuçlar, K1 vitamininin bu etkiyi, NaF'ün kemikte meydana getirdiği artan kemik yapım-yıkım dengesini ve hızını kontrol altına alarak müdahale ettiğini göstermektedir.

Morfolojik değerlendirmeden elde edilen bulgular, NaF ve K1 vitamininin, kemik kalitesi üzerinde olumlu veya olumsuz yönde ne tür etkileri olduğu konusunda bilgi vermemektedir. Morfolojik değerlendirme sonuçlarına bakıldığında, ilk izlenim, NaF grubunda gözlenen KKK ve çap artışlarına bağlı olarak, femurda NaF'ün olumlu etkileri olduğu ve K1 vitaminini alan grupta ise, femur ve tibiae'da çapların azalması ve özellikle tibiae'da KKK'nin incelmeye ile kemiğin olumsuz yönde etkilendiği şeklinde olabilir.

K1 vitamininin, üzerindeki terapotik etkinliği incelenen iskeletsel florozis, vücuttaki kemik miktarı artışına rağmen, bu kemiklerin kırılabilirliğinin da artışı ile karakterizedir^{30,53,184,188,189}. Çeşitli çalışmalar, kemik üzerinde etkileri incelenen NaF'ün neden olduğu kemik miktarındaki artışın, kemiğin

kalitesindeki değişiklikler hakkında tek başına bilgi vermediğini bildirmiştir^{177,184,186,187,190}. Bu anlamda, iskeletsel florozisin tedavi edilebilirliği konusunda yapılan çalışmalarda, etkinliği incelenen maddenin klinik anlamdaki tedavi başarısının belirlenmesindeki son belirleyici, kemik kalitesinin bozulmasına bağlı olarak gelişen kırık oluşumunu önleyebilecek kalitede, yeni kemik yapımının sağlanması olmalıdır⁵³. Kemik kalitesinin belirlenmesinde rol oynayan temel yapıtaşları, kemiği oluşturan kollojen ve mineral bileşimidir⁵³. Bu yapıda meydana gelen olumsuz değişiklikler, iskeletsel floroziste olduğu gibi kemik kırılabilirliğinin artışı şeklinde ortaya çıkar⁵³. Kemik kalitesinin bozulmasına bağlı olarak meydana gelen kırığın temelindeki neden, kemiğin mekanik dayanıklılığının azalmasıdır¹⁹¹⁻¹⁹³. Buna bağlı olarak sunulan çalışmada, NaF ve K1 vitamininin kemikte meydana getirdikleri morfolojik değişikliklerin yanısıra, kemik kalitesi ve biyomekanik bütünlüğü üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesine yönelik olarak, biyomekanik test de uygulanmıştır.

Kemiklerin kırmaya dayanım büyüklüğü, uzun zamandır kortikal kemik dayanıklılığının bir göstergesi olarak kullanılmıştır¹⁹⁴⁻¹⁹⁷. Bu nedenle de kemiğin, mekanik davranışını incelemek için pek çok çalışma, üç-nokta eğme testi kullanmıştır^{28,174,176,189}. Hiç şüphe yok ki biyomekanik değerlendirme, kemiğin kuvvete dayanımındaki değişikliği kanıtlamada en önemli değerlendirme metodudur. Çünkü, kemik kırığı oluşumunun temel nedeni mekanik dayanıklılığın azalmasıdır¹⁹¹⁻¹⁹³. Buna bağlı olarak KDB'nün artışı, terapötik etkinliğe yönelik en önemli belirleyicidir ve terapötik kullanımı düşünülen bir madde için, klinik öncesi mutlaka araştırılması gerekir.

Üç-nokta eğme testi, kırık hattı üzerinde biriken stres konsantrasyonunu ölçme avantajına sahiptir¹⁹⁸. Böylece, çevre kortikal kemiğin kaydedilen mekanik veriye etkisi en aza indirilir. Dejavantajı ise, test örneğinde aynı zamanda sıkışma ve gerilme kuvvetlerinin de oluşmasıdır¹⁹⁹. Bu kuvvetler, biyomekanik davranışı incelenen test edilen dokunun, daha komplike olmasına neden olur¹⁹⁹. Bunun ötesinde AEM, EM ve KDB'nün hesaplanması için vazgeçilmez olan, kırık hattındaki kemik kesitinin tam boyut ve geometrisinin belirlenmesi zordur ve komplike analizler yapılmaksızın elde edilemeyebilir²⁰⁰.

Bunun temelinde ise, küçük deney hayvanlarında biyolojik test dokularının, mekanik olarak zarar görme ihtimali veya mekanik test sonucunu etkileyebilecek olan, örneklerin kuruması gibi problemler gerçekleşmeksizin, tam geometri ve kompozisyonunun belirlenmesindeki zorluklar yatar^{200,201}. Kemik kesit şeklindeki küçük değişiklikler, AEM, EM ve KDB'lerini, istatistiksel olarak anlamlı derecede etkiler²⁰⁰. Bu nedenle sunulan çalışmada kullanılan biyomekanik değerlendirmelerde, morfolojik değişiklikleri kaydetmede hassas dijital kumpas kullanılmıştır. Test öncesi ve sonrası, kemik örnekleri oda ısısındaki serum fizyolojik içerisinde bekletilmiş ve örneklerde hasar olmamasına özen gösterilmiştir. Yapılan hesaplamalarda ise, kırık kemik kesitinde üç-nokta eğme testinde uygulanan kuvvete paralel ve dikey yöndeki çapların elips şekline uygunluğunu tespit edildikten sonra, sıçan modelini kullanan pek çok diğer çalışma gibi, sıçan uzun kemik kesiti elips olarak kabul edilerek, buna uygun formüller kullanılmıştır^{30,175,177}.

Sunulan çalışmada elde edilen biyomekanik test bulguları değerlendirildiğinde;

NaF grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında femurda, KDB'nde istatistiksel olarak anlamlı azalma, buna karşın AEM ve EM'nde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Bu bulgu, NaF grubundaki deney hayvanlarına 125 ppm NaF verilisinin, femurda kırılabilirliği artırdığını göstermiştir. Sıçan kemiğinin mekanik davranışını incelemek için hesaplanan AEM, incelenen kesitin konfigürasyonu veya merkezden itibaren mevcut kemik miktarının dağılımını tanımlar^{202,203}. Dolayısıyla, iki kemiğin kesit alanları aynı olsa dahi, kemik dağılımının farklı oluşu AEM'ni etkiler^{204,205}. Buna bağlı olarak bu çalışmada, NaF grubunda femura ait AEM'nde görülen artış, açık bir şekilde kemik yapılanmasına bağlı olarak periosteal yüzeyde kemik miktarının arttığını göstermektedir. Nitekim, NaF grubunda elde edilen femura ait KKK ve çap artışları, periosteal yüzeylerde kemik yapımının arttığını doğrulamaktadır. Burada önemli olan nokta ise, ilerleyen morfolojik özelliklere rağmen, NaF grubunda femurun kırılabilirliğinin artışıdır. Bu bulgu, sıçanlarda kemik mekanik davranışında, geometrik değişikliklerin materyal değişikliklerinden daha etkin rol oynadığına dair açıklamalara ters düşmektedir^{206,207}. NaF grubunda femurda,

AEM'nin artışı şeklinde kendini gösteren, artan kemik miktarı ve geometrisine rağmen KDB'nün azalması yönündeki bu bulgu, literatürde NaF verilen deney hayvanlarından elde edilen diğer çalışma sonuçları ile uyumludur^{30,177,204,205}. Turner ve ark.³⁰, sıçanlarda 50 ppm NaF verilmesini takiben, kemik miktarında artış olduğunu; fakat kemiğin KDB'nün ise azaldığını bildirmiştir. Deneysel anlamda NaF'ün sıçan kemiğinin mekanik özellikleri üzerindeki etkisini inceleyen bu çalışmaların yanısıra, florun osteoporöz tedavisinde insanlarda kullanımına yönelik bir çalışma da benzer sonuçları rapor etmiştir⁵⁵. Bayley ve ark.⁵⁵, Ca ve D vitaminine ilaveten, günde 40-50 mg flor verilen osteoporoz hastalarında, hızlı ve belirgin kemik artışına rağmen, gördükleri yaygın kalça ve femur kırığı bulgularının nedeninin, verilen flor olabileceğini bildirmişlerdir. Femurda, yeni kemik miktarının artışına ve çapının genişlemesine rağmen kırılabilirliğinin artışı, bu çalışma için temel bulgulardan biridir. Çünkü kemik miktarının artışına rağmen kırılabilirliğin artışı iskeletsel florozis gelişen kemikler için tipik bulgudur. Bu anlamda, daha önce tartışılan morfometrik bulguların yanısıra, elde edilen biyomekanik değerlendirme sonuçları, NaF grubunda femur kemiğinde, iskeletsel florozis oluşturulmasında başarılı olduğu düşüncesini desteklemektedir. Sunulan çalışmada elde edilen bulgular, Trozilli ve ark.²⁰⁶ ile Keller ve ark.'nin²⁰⁷ ileri sürdüğü gibi, sıçan kemiğine ait mekanik davranışta, geometrik yapıların gelişmiş olmasının değil; materyal yapısındaki değişikliğin büyük rol oynadığını göstermektedir.

Florun, kemiğin temel mineral fazı olan, kalsyum-(OH)-apatitin, (OH)-grubunun, inorganik flor ile yer değiştirmesi sonucu, kalsyum-floro-apatit yapısını oluşturduğu bilinmekle beraber, kemikte KDB'nün azalması şeklinde ortaya çıkan kemik kalitesinin bozulmasını sağlayan mekanizma henüz bilinmemektedir⁹³.

Yapılan çalışmalar florun, birbirine bağımlı ve belli bir düzen içinde seyreden kemik yapım-yıkım dengesini bozduğunu ve kemiğin yeniden yapılanma hızını artırdığını göstermiştir^{184,205,208,209}. Einhorn ve ark.^{204,205}, florun neden olduğu yüksek kemik yapım-yıkım hızının, kemik mekanik yapısını olumsuz yönde etkilediğini göstermiştir. Sunulan çalışma da, NaF grubundaki deney hayvanlarına verilen, 125 ppm NaF'ün, kemik yapım-yıkım dengesini

kemik yapımı lehine bozarak femura ait KKK'nın artışına ve kemik yapım-yıkım hızını artırarak ise çap genişliğinin artışına neden olduğunu göstererek, yapılan bu çalışmaları desteklemektedir.

Kemiğin mekanik özelliğinin, inorganik ve organik kısımlarının moleküler yapısı ile yakından ilgili olduğu gözönünde bulundurulduğunda, yapım-yıkım oranının bozulmasının, kemiğin bu iki bileşeni üzerinde de etki yapacağı açıktır²¹⁰.

Sunulan çalışma, NaF'ün bu gruptaki deney hayvanlarının femur kemiğinde, aynı zamanda EM'nün artışına neden olduğunu gösterdi. Burstein ve ark.²¹¹, kemik elastik yapısının, kemik mekanik özellikleri üzerinde büyük etkisi olan kemik kollojen yapısının değişimine bağlı olarak gerçekleştiğini bildirmiştir. Oxlund ve ark.'nın²¹⁰, kemiğin mekanik yapısında, kollojen çapraz bağı konsantrasyonunun da etkili olduğunu bildiren çalışmaları, bu çalışmayı desteklemektedir. Bu çalışmada, NaF grubuna ait histolojik kesitlerde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yeşil ile boyanan kemik ve kollojen yapıları simgeleyen alanların yerini, hemen hemen tamamıyla kırmızı ile boyanan ve mineralizasyon defekti olduğunu gösteren, düzensiz yeni kemik yapımını simgeleyen osteoid alanlara bıraktığı gözlemlendi. Bu, kollojen yapının değişiminin ne oranda olduğu bilinmemekle beraber, femura ait EM'nde görülen artışta, NaF'ün hem kemik hem de kollojen yapısında seçici değişiklikler yaptığına işaret etmektedir. Kemiğin inorganik yapısı ile EM arasındaki ilişki tam olarak bilinmemekle beraber, NaF'ün kemiğin inorganik yapısı üzerinde de olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir²¹². Aaron ve ark.²¹², NaF'ün yeni yapılan florotik kemikte mineralizasyon defekti oluşturduğu ve bunun üzerinde yer yer aşırı mineralizasyon odaklarının bulunduğunu bildirmiştir. Nitekim, sunulan çalışmada, NaF grubuna ait histolojik kesitlerde gözlenen, belirtilen değişiklikler bunu desteklemektedir.

Araştırmacılar, mineralizasyon defekti olan bölgeleri, iki mekanizma ile açıklamaktadırlar. Bunlardan birincisi, aşırı miktarda florun, ikincil paratiroidizm neden olarak Ca yetmezliğine neden olması ve buna bağlı olarak mineralizasyon defektinin gerçekleşmiş olmasıdır²¹³. İkinci teori ise, florun, mineralize alanlarda alkalin fosfataz enzimini inhibe edebileceği ve böylece Ca

yetmezliği oluşturarak mineralizasyon defektine neden olabileceğidir²¹⁴. Literatürde, florun çeşitli enzimleri inhibe edebildiğinin bildirilmesi bu teoriyi güçlendirmektedir²¹⁵. Mineralizasyon defektinin meydana geliş nedeni ne olursa olsun, sunulan çalışmada, NaF grubuna ait histolojik kesitlerde de gösterildiği gibi, sonuç yaygın osteoid alanlarının kemik ve kollojen yapısının yerini aldığıdır. Bu bulgu, NaF verilmesini takiben kemikte osteoid miktarı ve hacminin arttığını bildiren diğer çalışmalar ile uyumludur^{176,184}. Mosekilde ve ark.¹⁸⁴, flora bağlı olarak oluşan kemik miktarı artışının, artan osteoid miktarı sonucu gerçekleştiğini rapor etmiştir. Turner ve ark.¹⁷⁶ ise, flor verilmesine bağlı olarak, osteoid hacminin normalden 20-kat daha fazla arttığını bildirmiştir. Bu, sunulan çalışmada NaF grubuna ait femurda, KKK'nda görülen artışı açıklamaktadır.

Araştırmacılar, bozulan mineralizasyon sonucu meydana geldiğini ileri sürdükleri osteoid hacmi artışının, belirtildiği şekilde kemik miktarının artışına neden olurken, mineralizasyondaki defekt nedeni ile kemiğin KDB'nün azalmasına neden olduğunu bildirmiştir^{176,184}.

Florotik kemikte olduğu saptanan bu yapıların yanısıra, gözlemlendiği bildirilen bir diğer yapı ise, aşırı mineralize odaklardır²¹⁶⁻²¹⁹. Aaron ve ark.²¹² bu odakların, kollojen fibrillerin kendilerinin mineralizasyonuna ilaveten, fibril dışındaki aralıklarda depo edilen büyük kristallerin düzensiz mineralizasyonundan kaynaklandığını ileri sürmüştür. Bu teoriye göre, fibril içerisindeki küçük kristaller flordan etkilenmezler ve aşırı mineral odakları, yeni oluşan minerallerin fibril dışı depolanması sonucu oluşur^{218,220}.

Çeşitli çalışmalar, kemik kalitesinin bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinde görülen artışta, belirtilen mineralizasyon odaklarının da yer aldığını bildirmiştir^{30,208}. Turner ve ark.³⁰, aşırı mineralizasyon odaklarında saptadıkları kemik mineral boyutu artışının, kemik kalitesinin bozulmasında rol oynadığını ve kemik mineral boyutu artışının ise, KDB ile ters orantılı olduğunu rapor etmiştir. Araştırmacılar, aşırı mineralizasyon odaklarında fibril dışı depolanan minerallerin, florotik kemiğe ait boyutu artmış olan bu mineraller olduğunu belirterek, bunların mineralden yoğun sert dokuyu oluştururken, aynı zamanda homojen olmadıkları için kemiğin daha kırılabilir olmasına neden olduklarını bildirmişlerdir^{30,208,212}. Bu bilgiler, NaF grubunda femur kemiğine ait

KKK, ap genişliği, AEM ve EM artışı ile KDB'nn azalması nedenlerini açıklamaktadır. Sunulan alışmada, NaF grubunda femurda, KKK artışı oluşmasına rağmen KDB'nn azalmış olması yapılan diğer çalışmalarla uyumludur^{221,222}.

NaF grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tibiae'da ise, antero-posterior KKK'ndaki istatistiksel olarak anlamlı artış dışında incelenen diğer parametrelerde değişiklik görülmemiştir. Aynı grupta yer alan femurda, iskeletsel floroze özgü değişiklikler gerçekleşirken, tibiae'da benzer değişikliklerin oluşmaması şaşırtıcıdır. Florun, trabeküler kemik yapısına sahip vertebra ile kortikal kemik yapısına sahip uzun kemikler üzerinde farklı şekilde etki gösterdiği literatürde bildirilmiřtir²²³⁻²²⁵. Bununla birlikte, femur ve tibiae gibi kortikal kemik yapısına sahip iki farklı kemikte, değişik etki gösterdiği bilgimiz dahilinde bildirilmemiştir. Araştırıcılar, trabeküler ve kortikal kemiklerin, flora verdikleri farklı cevabı, bu iki kemik türündeki farklı kemik yapım-yıkım oranı ve hızı ile aıklamıřlardır²²³⁻²²⁵. Florun, kemik dokusu üzerinde etki gösterebilmesi için, yeni kemik yapımına ihtiyaç vardır⁵³. İskeletsel floroze özgü değişiklikler ancak, normal yapıdaki eski kemiğin yerini, yeniden yapılanmaya bağlı olarak mekanik anlamda daha zayıf olan yeni florotik kemiğin alması durumunda gerçekleşir. Fratzl ve ark.⁵³, bunun özellikle kemik yapım-yıkım oranının fazla olduğu durumlarda daha şiddetli ortaya çıkacağını bildirmiştir. Femur ve tibiae'nin, fizyolojik denge içerisinde, farklı kemik yapım-yıkım oranına sahip olduğu bilinmemekle birlikte, anatomik olarak farklı vaskülarizasyona sahip oluşlarının, flora verdikleri farklı cevabı açıklayabilecek ikinci bir neden olabileceği vurgulanmalıdır.

Yapılan alışmalar, plazma flor düzeyi ile kemik flor düzeyi arasında doğru orantı olduğunu gstermiştir^{30,176}. Turner ve ark.³⁰ inceledikleri kemik örneklerinde, serum flor düzeyinin artışına bağlı olarak, mineralizasyon bozukluğu olduğunu ve KKK'nda artış gözlenirken KDB'nde azalma kaydettiklerini bildirmiştir. Stein ve ark.²²⁶ ise, yüksek oranda flor bulunduran kemiklerin, daha düşük oranda flor bulunduran kemiklere göre daha kalın olduğunu, bununla birlikte daha düşük KDB'nn meydana geldiğini bildirmiştir.

Kemikteki düşük flor düzeyinin mineralizasyonda bozukluğa neden olmadığı bildirilirken¹⁷⁶, bunun aksine florun kemikte belirli bir konsantrasyona ulaşması durumunda ise patolojik mineralizasyona bağlı olarak KDB'nün azaldığı gösterilmiştir⁵³. Sunulan bu çalışmada, NaF grubunda femurda, florotik kemiğe özgü değişikliklerin saptanması, aslında plazma flor konsantrasyonunun gözlenen değişiklikleri yapabilecek yeterli düzeye ulaşmış olduğunu göstermektedir. Bu çıkarım, femurda gözlenen değişikliklerin tibiae'da meydana gelmeyişinde, florun tibiae'da kemik yapım-yıkım dengesini, femurda olduğu kadar etkileyebilecek düzeye ulaşamamasından kaynaklanabileceğine işaret etmektedir. Femur ve tibiae'da farklı miktarlarda flor bulunuşu, iki kemiğin belirtildiği gibi farklı vaskülarizasyona sahip olmaları ile açıklanabilir²²⁷. Femur kemiği üç ayrı arter ile, tibiae ise bir arter ile beslenmektedir. Buna bağlı olarak, 12 hafta süre ile 125 ppm NaF verilışı, femurda florotik kemik oluşturacak, plazma ve kemik konsantrasyonuna ulaşılmasını sağlarken, basit bir öngörü ile tibiae için, plasmada yeterli konsantrasyon mevcutken kemikte femur ile karşılaştırıldığında 1/3 oranında kemik flor konsantrasyonu oluşacağını ileri sürmek yanlış olmayacaktır. Chavassieux²²⁸, kemikteki flor miktarının, florun verilış dozu ve verilış süresine bağlı olduğunu bildirmiştir. Sunulan bu çalışma ise, femur ve tibiae'da elde edilen farklı bulgulara dayanarak, kemik vaskülarizasyonunun da kemik flor düzeyinde bir belirleyici olabileceğine dikkat çekmektedir.

Elde edilen bulgular gözönünde bulundurularak, NaF grubu genel anlamda değerlendirilirse, NaF'ün kemik yapım-yıkım dengesini bu grupta kemik yapımı lehine bozarak ve kemik yapım-yıkım hızını artırarak, femurda KKK ve çap genişlemesine, tibiae'da ise sadece antero-posterior KKK artışına neden olduğu saptandı. Literatürde, aynı bulguları gözlemlediklerini rapor eden çalışmalardan farklı olarak bu çalışma, NaF grubundaki deney hayvanlarının ağırlıklarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış olmadığını gösterdi^{176,177}. Genel anlamda, KKK ve çap genişlemesine bağlı olarak vücut ağırlığı artışı gözlemlediklerini bildiren çalışmalar, bunda florotik kemiğin aynı zamanda daha fazla Ca bağlamasının etken olduğunu bildirmiştir^{176,177}. Sunulan bu çalışmada, kemik Ca miktarı ve densitesi ölçümü yapılmadığı için, literatürde bildirilen bu

bulgu tartışılmamaktadır. NaF grubundaki deney hayvanlarının ağırlıklarına yönelik olan bu bulgu aynı zamanda literatürde deney hayvanlarına 100 ppm üzerinde NaF uygulamasını takiben gelişim geriliği oluştuğunu bildiren çalışmalar ile de uyumlu değildir²²⁹. Elde edilen bulgular, sunulan çalışmada deney hayvanlarına verilen 125 ppm NaF'ün iskeletsel florozis oluşturulmasında yeterli doz olmakla birlikte, gelişim geriliğine neden olacak kadar da fazla olmayan kritik bir düzey olduğunu gösterdi. Bu grupta vurgulanması gereken bir diğer önemli nokta ise, tibiae'da saptanan tek farklılığın antero-posterior KKK'nda artış oluşundan yola çıkarak, NaF'ün uzun kemiklerde oluşturduğu ilk etkinin, sahip olduğu anabolik etkiye bağlı olarak, kemik yapım-yıkım dengesini kemik yapımı lehine bozmak olduğudur.

K1 vitamini grubunda femura ve tibiae'ya ait AEM ve EM değerlerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı. NaF grubu ile karşılaştırıldığında, KDB değerinde istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilen femur kontrol grubundan farksızdı. Bu grupta, tibiae'ya ait KDB değerinde ise kontrol ve NaF grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Literatürde, K1 vitamininin iskeletsel florozis üzerindeki etkisini araştıran bir başka çalışmanın olmayışı, sunulan bu çalışmadan elde edilen sonuçların ilk defa tartışılmasına neden olmakta ve referans çalışma gösterimesini önlemektedir. Aynı şekilde, K1 vitamininin, incelenen kemik örneklerinde, NaF'ün neden olduğu morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişiklikleri önlemeye yönelik etki mekanizması da bu nedenle bilinmemektedir.

K1 vitamini grubunda, femur ve tibiae'ya ait AEM değerlerinin azalması, bu grupta incelenen kemik örneklerine ait çap genişliklerinin azalması ile uyumludur. Öyleki, NaF grubunda, kemik yapım-yıkım hızının artışına bağlı olarak meydana gelen KKK'ndaki artış, K1 vitamini grubunda önlenmiştir. Çok daha vurgulayıcı olarak, NaF grubunda tibiae'ya ait KKK'nda değişiklik gözlenmezken, K1 vitamini grubunda vitaminin etkisi ile antero-posterior KKK'nda azalma görülmüştür. K1 vitamini grubunda KKK'nin kontrol grubundan farksız oluşu, K1 vitamininin kemik yapım-yıkım oranının kontrol edebilmesi sonucu kemik yapım-yıkım dengesinin normal dengesine ulaşabildiğini

göstermiştir. NaF grubunda, tibiae'ya ait çap genişliğinde değişiklik gözlenmezken ve sadece antero-posterior KKK artışı görülürken, K1 vitamini grubunda çap genişliğinin azalması ve antero-posterior KKK'nın azalması, K1 vitamininin aynı şekilde kemik yapım-yıkım hızını baskıladığını ve buna bağlı olarak KKK'nın azaldığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, KKK'nda görülen değişikliklerin antero-posterior yönde sınırlı kalışı, Jones ve ark.²³⁰ ve Suziki ve ark.'nın²³¹ ileri sürdüğü gibi kemiğin kendi yapısı içerisindeki homojen olmayan vaskülarizasyon sonucu, NaF ve K1 vitamininin kemiğin diğer bölgelerine oranla antero-posterior bölgede daha fazla yoğunlaşmış olması ile açıklanabilir.

Sunulan çalışmada elde edilen bulgular, K1 vitamininin, kemik yapılanmasında etkisi olan etkili bir madde olduğunu göstermektedir. Yapılan bazı çalışmalar, K vitamininin kemiğin yeniden yapılanması olayında rol oynadığına işaret etmiştir^{232,233}. Pastoureau ve ark.²³², özellikle K vitaminine bağımlı bir protein olan OC'nin normal kemik miktarının devam ettirilmesinde ve yeniden yapılanmasında önemli olabileceğine dair bulgular elde etmiştir. Sunulan bu çalışmada elde edilen bulgular, K vitamininin kemiğin yeniden yapılanması olayındaki önemini belirten bu çalışmalar ile uyumludur.

K1 vitamininin, NaF'ün neden olduğu iskeletsel florozise özgü morfolojik değişiklikleri önlemedeki etki mekanizması ne olursa olsun, sadece NaF grubu ile değil, aynı zamanda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemik morfolojisinin küçülmesi, K1 vitamininin büyüyen canlılarda olası yan etkisine işaret etmek açısından çok önemlidir.

K1 vitamini grubunda femur ve tibiae çap genişliklerinde görülen azalmanın, büyüyen sıçanlarda kemik yapılanma süreci içerisinde, kemik çap genişliğinin, kontrol grubuna göre normal kabul edilen çap genişliğine ulaşmadan, K1 vitamini etkisiyle erken mineralize olmasına bağlanabilir. Literatürde, K vitamininin mineralizasyonda rol oynadığını bildiren çalışmalar mevcuttur^{234,235}. Lian ve ark.²³⁴ tarafından iskelet dışı mineralize dokularda yapılan bir çalışmada, K vitaminine bağımlı gama-karboksiglutamik asit ve OC'nin bu dokularda tespit edilmesi, K vitamininin sert doku mineralizasyonunda yer aldığı fikrini ileri sürmelerine neden olmuştur. Galli ve ark.'nın²³⁵, K vitaminine bağımlı OC'nin kemikte, mineral olgunlaşma

döneminde OH-apatit kristallerine bağlandığını göstermesi, K vitamininin kemik mineralizasyonunda önemli olduğu hipotezini desteklemiştir.

Sunulan bu çalışmada K1 vitamini, deney hayvanlarına kemik hacminin en hızlı artış gösterdiği ve kemik matriksi ile büyüme plaklarında en hızlı mineralizasyon gerçekleşen ilk üç ayı içine alan büyüme döneminde verilmiştir^{236,237}. K1 vitamininin büyüme döneminde deney hayvanlarına verilmiş olması, ileri sürüldüğü gibi kemik, gelişim sürecinde diagonal ve longitudinal olarak büyürken oluşturulan, yeni kemik matriksinin normal genişliğe ve uzunluğa ulaşmadan erken mineralize olmasına ve büyüme plaklarının erken kapanmasına neden olmuş görünmektedir.

Akesson²³⁸ tarafından yapılan bir çalışmada, K vitamini antagonisti warfarini doğumlarından itibaren alan sıçanlarda, warfarinin büyüme plakları üzerindeki olumsuz etkisi sonucu, epifiz büyüme segmentini içine alan anomaliler gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu bulgu, warfarin verilen koyunların büyüme hızının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nispeten daha yavaş olduğunu bildiren bir başka çalışma tarafından desteklenmiştir²³². İnsanlarda ise, hamilelik döneminde warfarin verilen annelerin çocuklarında iskeletsel anomaliler olduğu rapor edilmiştir²³⁸. Araştırmacılar bu anomalilerin, kemik üzerinde direkt toksik etkisi olmayan warfarin tedavisinin, kemik dokusundaki K vitaminine bağımlı proteinlerin azalmasına neden olması ile açıklamaktadırlar. Yapılan bu çalışmalar, büyüyen deney hayvanlarının ve insanların, K vitaminini olumsuz etkileyen faktörlere ve K vitamini eksikliğine duyarlı olduklarına işaret etmektedir. Bu çalışmalar, sunulan tez kapsamında, K1 vitamini grubunda elde edilen sonuçlar ile ilişkilidir. K1 vitamini grubunda, femur ve tibiae kemiklerine ait çap genişliğinin azalması, femur uzunluğunun ve deney hayvanlarının ağırlıklarının azalması, K1 vitamininin büyüyen sıçanlara terapötik dozda verilmesinin büyüme ve gelişme geriliğine neden olduğunu gösterdi. Bu, önemle araştırılması gereken bir bulgudur. Literatürde, K1 vitamininin büyüme ve gelişimi olumsuz yönde etkilediği veya kemik üzerinde toksik etkisi olduğu şeklinde bilgi bulunmamaktadır. Buna dayanarak, sunulan çalışmaya ait bu bulgular, K1 vitamininin büyüme ve gelişim dönemindeki deney hayvanlarına terapötik dozda verilmesi sonucu aşırı doz oluştuğunu ve kemiğin erken

mineralize olmasına ve büyüme plaklarının erken kapanmasına neden olduğunu akla getirmektedir. Nitekim, NaF grubunda femur ve tibiae'nin NaF'e verdiği cevaplar farklıken, K1 vitamini grubunda benzer cevaplar vermiş olmaları, vaskülarizasyon farklılıkları göz önünde bulundurulduğunda, K1 vitamininin tibiae'da da etki gösterebilecek kadar fazla miktarda verildiğini göstermektedir. Bu, K1 vitamini grubunda büyüme ve gelişme geriliğine yönelik bulguların nedenini açıklamaktadır.

Sunulan bu çalışmanın planlanması aşamasında, K1 vitamininin iskeletsel florozis olgularında kullanımına yönelik literatürde çalışma olmadığı için referans kaynak kullanılamamıştır. Bu nedenle, K1 vitamininin kemikte depolanabilmesi için yeterli olduğu bildirilen 0.1-0.3 mg/g terapötik doz sınırları içerisinde, K1 vitamini günde 0.2 mg/g oranında verilmiştir¹⁷⁹. Elde edilen bulgular, günde 0.2 mg/g K1 vitamini kullanımının aşırı doz olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, ileride planlanacak çalışmalarda, K1 vitamininin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, morfolojik olarak istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmayan; fakat iskeletsel florozise özgü bulguları önleyebilecek miktarının belirlenmesine yönelik doz-cevap çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte, K1 vitamini grubundaki deney hayvanlarında görülen kilo kaybı üzerinde, gelişim geriliğinin yanısıra, daha önce de değinildiği gibi, gavaj yönteminin travmatik etkisine bağlı olarak veya K1 vitamininin içinde çözündürülerek verildiği yağın, deney hayvanlarının iştahını olumsuz yönde etkileyerek, alınan besin miktarının azalmasına neden olabileceği hatırlanmalıdır.

Sunulan bu çalışmada, elde edilen önemli bulgulardan birisi de, K1 vitamini grubunda femur ve tibiae'nin morfolojik özelliklerinin, kırılganlıklarını artıracak şekilde değişmesine rağmen, KDB'nün artmış olmasıdır. Elde edilen bulgular, K1 vitamininin neden olduğu mekanik dayanıklılığın, kemiğin geometrik yapılarının gelişmesine bağlı olarak değil, tamamen materyal yapısındaki gelişmeye yani kemiğin kalitesinin artışına bağlı olarak meydana geldiğine işaret etmektedir. Bu, K1 vitamininin, kemik mineralizasyonu yapısında önemli rol oynadığını bildiren literatürdeki çalışmalarla açıklanabilir^{234,235}. Bununla birlikte, K1 vitamininin sadece kemik

mineralizasyonunda değil, aynı zamanda kemik kollojen matriksinin devamlılığının sürdürülmesinde de önemli olduğu bildirilmiştir²³⁹. Barone ve ark.²³⁹, kemikte hücre dışı matriks gelişimi sırasında, K vitaminine bağımlı MGP mRNA yapımı ile ağırlıklı olarak kemik kollojen yapısını oluşturan tip I kollojen mRNA'nın aynı zamanda ve en üst düzeyde sentezlenerek kemik matriksinde birikmeye başladığını göstermiştir. Araştırmacılar bu bulgularını, K vitamininin sadece kemik mineralizasyonunda değil aynı zamanda kemik kollojen yapımında da önemli rol oynayabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Kemik kollojen yapısının EM üzerinde temel belirleyici olduğu literatürde bildirilmiştir²¹¹. Sunulan bu çalışmada, elde edilen histolojik bulgular, K1 vitamininin kemik mineral ve kollojen yapısı üzerindeki olası etkisini desteklemektedir. K1 vitamini grubunda vertebra ve femur kemiklerine ait kesitler, NaF grubuna ait kesitlerle karşılaştırıldığında, NaF grubunda kırmızı ile boyanan ve mineralizasyon bozukluğunu simgeleyen yaygın osteoid alanların yerini, K1 vitamini grubunda yeşil ile boyanan, sağlıklı kemiği simgeleyen kemik ve kollojen alanlarına bıraktığı saptandı. Bu bulgular vertebrada, femur kemiğine oranla daha belirgin şekilde gözlemlendi. Femurda, kalıntılar halinde izlenen osteoid alanlarının görülmesine rağmen, bu grupta KDB'nün artışı sağlayacak ölçüde sağlıklı doku oluştuğu anlaşılmaktadır. Roschger ve ark.²⁴⁰, belirli bir doygunluğa ulaşıncaya kadar, kemik mineralinin homojen olarak artışının, kemik yapım-yıkım oranının azalması sonucu gerçekleştiğini, bunu ise mineralizasyon hızının artışının ve erken mineralizasyonun takip ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada histolojik anlamda elde edilen bulgular, K1 vitamininin, NaF'ün neden olduğu mineralizasyon bozukluğunu simgeleyen yapıların oluşumunu önlediğini ve kemik mineralizasyonu yapılanması ve kollojen sentezi üzerinde önemli rol oynadığını göstererek, benzer bulguları rapor eden diğer çalışmaları desteklemektedir. Bu, aynı zamanda K1 vitamini grubuna ait kemik örneklerinin EM değerlerinin, neden kontrol ve NaF grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği ve KDB'nün ise arttığını açıklamaktadır. Sunulan bu çalışmada, K1 vitamininin femur ve tibiae'da KDB'nü artırdığına ilişkin bulgular, K1 vitamininin sıçan femur

kemiğinin biyomekanik yapısını geliştirdiğini bildiren bir başka çalışma ile uyumludur²⁴¹.

K1 vitamininin, iskeletsel florozis üzerindeki terapötik etkinliğine ait mekanizma bilinmemekle birlikte, bu etki kemiğin KDB'nün artışına neden olan iyi kalitedeki yeni kemik yapımının gerçekleşmesi sonucu meydana gelmiştir. Bu anlamda, bu etkinin, floru ortamdan uzaklaştırarak mı, yoksa florun da yeni kemik yapımı sırasında kullanıldığı daha iyi kalitedeki kemik yapımına bağlı olarak mı gerçekleştiğinin araştırılması, K1 vitamininin etki mekanizmasının anlaşılmasında faydalı olacaktır.

K1 vitamininin, iskeletsel florozis üzerinde önleyici veya tedavi edici etkinliğinin araştırıldığı sunulan çalışmada, ulaşılan çıkarımlardan bir diğeri de, florotik kemiğin henüz nedeni bilinmemekle beraber, K1 vitaminine ihtiyaç duyduğudur. Öykeki, K1 vitamini grubunda 12 hafta süresince, günde 0.2 mg/g oranında verilen K1 vitamini, kandan kemik dokusuna alınarak, NaF'ün neden olduğu morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişikliklerin oluşumunu önlemiştir. Şu an için, florotik kemiğin neden K1 vitaminine gereksinim duyduğunu açıklamak mümkün değildir; fakat NaF ve K1 vitamini gruplarından elde edilen histolojik bulgular göz önünde bulundurulduğunda, K1 vitamininin kemik yapım-yıkım hızının kontrolünde, mineral metabolizması ve kollojen sentezinde yer alarak matriks kompozisyonunun devam ettirilmesinde önemli rol oynamasından kaynaklanabileceği ileri sürülebilir.

Sunulan çalışma, iskeletsel florozisin K1 vitamini ile önlenmesine yönelik yapılan ilk çalışmadır. Bu anlamda, aynı konuyu ileride değişik yönleriyle inceleyecek diğer çalışmalar için temel oluşturmaktadır. Kullanılan maddelerin etkilerinin oluşturulması için seçilen büyüyen erkek Wistar türü sıçan modeli, izlenen değişikliklerin üç ay kadar kısa bir sürede oluşturulmasına imkan sağlamıştır. Bulgular, yetişkin sıçanlarla karşılaştırıldığında, büyüyen sıçanlarda gözlenen hızlı kemik yapım-yıkım oranından faydalanılarak, kullanılan NaF ve K1 vitamininin yeni yapılan kemik yapısındaki etkilerinin nispeten daha kısa sürede gözlenebilmesine imkan sağlamıştır. Bununla birlikte, K1 vitamininin iskeletsel florozisi önlemede terapötik madde olarak kullanılabileceğine yönelik bu ilk bulgular, kullanılan büyüyen sıçan modeli nedeniyle sadece büyüme

dönemi ile sınırlıdır. Saptanan etkinliğin, çok daha yavaş kemik yapım-yıkım oranına sahip yetişkin sıçanlarda da oluşup oluşmadığının araştırılması gereklidir. Aynı şekilde, deney hayvanları ile insanlar arasında görülen kemik yapılanması farklılığı gözönünde bulundurularak, sunulan çalışmadan elde edilen bulguların insanlarda da gözlenip gözlenmeyeceği araştırılmalıdır²⁴²⁻²⁴⁴. Yapılan bu çalışmalar, trabeküler ve kortikal kemiklerde hayat boyu yeniden yapılanmaya sahip olduğu bilinen sıçanlarla karşılaştırıldığında, insanlarda görülen kemik yeniden yapılanmasının nispeten daha yavaş olduğunu göstermiştir. Az kemik yeniden yapılanmasına sahip insanlarla karşılaştırıldığında, sıçanlarda sadece trabeküler ve kortikal kemik iç yüzeylerinin benzerlik gösterdiği bilinmektedir²⁴⁴. Araştırmacılar bunun, deney hayvanlarında etkisi incelenen bir maddeye verilen olumlu cevabın insanlarda elde edilememesi nedeni olabileceğini bildirmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, sunulan çalışmada elde edilen olumlu cevaba dayanarak, K1 vitamininin insanlarda kullanımı öncesi, insan kemiğinin yeniden yapılanma modeline benzerlik gösterdiği bildirilen vertebral kemiklere ait trabeküler kemik yapısı üzerindeki etkisinin, sadece histolojik olarak değil aynı zamanda morfolojik ve özellikle biyomekanik testlerle incelenmesi gerekmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sunulan çalışma, K1 vitamininin büyüyen sıçanlarda NaF ile oluşturulan iskeletsel florozise özgü bulguların oluşmasını önleyebildiğini göstermiştir. NaF'ün yanısıra günde 0.2 mg/g K1 vitamininin, 12 hafta süresiyle deney hayvanlarına verilmesi, NaF grubunda görülen iskeletsel florozise özgü morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişikliklerin oluşmasını önlemiştir. Bu sonuçlar, K1 vitamininin iskeletsel florozis tedavisinde veya iskeletsel florozis oluşumunun önlenmesinde, önemli bir terapotik madde olabileceğine işaret etmektedir. Bu noktada, K1 vitamininin bu etkiyi, floru kemikten uzaklaştırarak mı, yoksa florun da kemik yapısında kullanıldığı daha iyi kalitede kemik dokusunun oluşturulması ile mi sağladığının araştırılması, K1 vitamininin etki mekanizmasını aydınlatmak açısından faydalı olacaktır.

2. K1 vitamininin iskeletsel florozisi olan insanlarda klinik anlamda kullanımı öncesi, deney hayvanlarında ve klinik öncesi çalışmalarla insanlarda, daha detaylı çalışılmasına ihtiyaç vardır. K1 vitamininin kortikal kemiğin yanısıra, bu çalışmada fazla açıklık getirilemeyen trabeküler kemik üzerindeki biyomekanik etkilerinin çok detaylı incelenmesi gerekmektedir. K1 vitamininin, bunu takiben iskeletsel florozisi olan hastalarda klinik anlamda kullanılması daha güvenilir olacaktır.

3. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, K1 vitamini grubunda görülen femur boyu kısılması, femur ve tibiae çap genişliklerinin ve AEM'lerinin azalmış olması, K1 vitamininin büyüyen sıçanlarda büyüme ve gelişimi nispeten olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Bu etki, muhtemelen, K1 vitamininin neden olduğu erken mineralizasyondan kaynaklanmıştır. Bu nedenle, K1 vitamininin çocuklarda kullanımı öncesi, deney hayvanlarında büyüme ve

gelişme üzerindeki etkisi ve doz-cevap çalışması anlamında yapılacak çalışmaların büyük önemi olacaktır.

4. Bu çalışmada ulaşılan sonuçlardan bir diğeri ise, büyüyen Wistar türü erkek sıçanlara, 12 hafta süre ile 125 ppm NaF verilisinin, deney hayvanlarının kemik dokularında gerekli flor konsantrasyonu sağlayarak iskeletsel florozis oluşturulmasında yeterli oluşudur. Bulgular, 125 ppm NaF'ün, ağırlıklı olarak trabeküler kemik yapısına sahip olan vertebrada, iskeletsel florozise özgü histolojik değişiklikleri ve ağırlıklı olarak kortikal kemik yapısına sahip olan femurda, iskeletsel florozise özgü morfolojik, biyomekanik ve histolojik değişiklikleri oluşturabildiğini göstermiştir.

5. Varılan diğör önemli çıkarım ise, NaF'ün kemikte oluşturduğu biyomekanik zayıflama ve K1 vitaminin neden olduğu biyomekanik güçlenmenin, kemiğin geometrik yapısıyla ilgili olmayışdır. NaF grubunda, femurun gelişen geometrik yapısına rağmen kemiğin KDB azalmış, K1 vitamini grubunda ise gerileyen kemik geometrik yapısına rağmen femur ve tibiae'nın KDB'leri artmıştır. Bu bulgular, NaF grubunda kemik kalitesinin azaldığı ve K1 vitamini grubunda ise kemik kalitesinin arttığını göstermektedir. NaF ve K1 vitamininin, kemik dokusu üzerinde güçlü etkileri olan iki madde olduğunu ortaya koyan bu bulgular, heriki maddenin KDB'lerine yansıyan kemik kalitesi üzerindeki etkilerinin, kemiğin geometrik özellikleri üzerinde yaptıkları değişikliklere bağılı olarak değil, yapısal özellikleri üzerindeki etkilerine bağılı olarak oluşturduklarına işaret etmektedir. Bu çıkarım, histolojik değerlendirme sonuçları tarafından da desteklenmiştir.

6. NaF grubunda incelenen femurda, KKK, çap ve AEM'nde izlenen artış, NaF'ün kemik yapım-yıkım dengesini ve hızını bozduğunu göstermiştir. K1 vitamini alımı ile, NaF grubunda gözlenen bu bulguların önlenmesi ve KDB'nün artmış olması, K1 vitamininin kemik yapım-yıkım dengesini düzenlemeye ve kemik kalitesini artırmaya yönelik etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu anlamda, bugün dahi kemik yapım-yıkım dengesinin bozulması ve hızının artışının neden olduğu çeşitli kemik hastalıklarında, K1 vitamininin kemik yapım-yıkım dengesini kontrol altına alma özelliğı çok önemlidir.

7. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, temelde, NaF'ün anabolik etkisine bağılı olarak gerçekleştiğı bilinen kemik miktarındaki artışın, bu gruptaki deney

hayvanlarının ağırlıklarına yansımadağı gürüldü. Bu, NaF grubunda kemik miktarı artarken, mineralizasyonun buna eşlik etmediğı izlenimini oluşturmuştur. Dolayısıyla bu grupta, kemik yapımı sırasında artan kemik matriksi yapımına paralel olarak, mineralizasyonda artış meydana gelmemiş olma ihtimali fazladır.

8. NaF'ün, kortikal kemik yapısına sahip femur ve tibiae'da farklı etki yapması ise ilginçtir. NaF verilışı sonrası, tibiae'da femura benzer değışikliklerin gözlenmeyiş nedeni, farklı damarlanma yapıları veya farklı kemik yapım-yıkım oranı ile açıklanabilir. Bu bulgu, iskeletsel florozis üzerinde etkinliğı araştırılan, profilaktik veya terapötik ilaç olabileceğı düşünölen maddelerin etkilerinin değeriendirilmesinde, 125 ppm NaF kullanılarak iskeletsel florozis oluşturulmasının kritik ve uygulanması yararlı olabilecek bir doz olduğunu göstermiştir.

9. Son olarak, sunulan bu çalışma, kemiğe yönelik yapılan araştırmalarda, kemik kalitesi anlamında güvenilir bilgiye ulaşmak için çok sayıda farklı parametrenin incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Kemiğın mekanik dayanıklılığındaki azalma ile kendini belli eden kemik kalitesindeki azalma, çeşitli biyokimyasallar, kemik geometrisi değışiklikleri ve kollojen miktarı gibi birden fazla faktörden etkilenebileceğı için, terapötik etkinliğı araştırılan meddelerin etkinliğinin değeriendirilmesinde tek parametre kullanılması yanıltıcı olabilir. Bu nedenle, yapılan bu çalışmada kemik morfolojisi, kemik mekanik özelliğı ve kemik histolojisinin birlikte değeriendirilmesi, NaF ve K1 vitamininin kemik kalitesi üzerindeki etkileri hakkında önemli ve güvenilir sonuçlar vermiştir.

KAYNAKLAR

1. **Zhao X, Zhao X, Cui W, Ren.** Preventive effect of vitamin K1 and calcium on osteoporosis in ovariectomized rat. *Wei Sheng Yan Jiu*, **1999**; 28(6):367-9.
2. **Schaafsma A, Muskiet FA, Storm H, Hofstede GJ, Pakan I, Van der Veer E.** Vitamin D(3) and vitamin K(1) supplementation of Dutch postmenopausal women with normal and low bone mineral densities: effects on serum 25-hydroxyvitamin D and carboxylated osteocalcin. *Eur J Clin Nutr*, **2000**; 54(8):626-31.
3. **Cadir B, Meghji S, Hodges S, Harris M.** Aprotinin (Trasylol) and vitamin-K1(Phylloquinone) reduce tenderness in healing bone. *J Dent Res*, **1998**; 77: 775(abs).
4. **Cadir B, Heys TD, Hodges S, Harris M, Meghji S.** The effect of Vitamin-K1 and aprotinin on bone healing. *J Dent Res*, **2000**; 79: 624(abs).
5. **Hodges, S.J., Akesson K, Vergnaud, P., Obrant, K., Delmas, P.D.** Circulating levels of vitamin K₁ and K₂ are decreased in elderly women with hip fracture. *J. Bone. Miner. Res*, **1993a**; 8: 1241-45.
6. **Hodges, S.J., Bejui, J., Leciercq, M., Delmas, P.D.** Detection and measurement of vitamin K₁ and K₂ in human cortical and trabecular bone. *J. Bone Miner. Res*, **1993b**; 8: 1005-9.
7. **Shearer MJ, Bach A, Kohlmeier M.** Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *J Nutr*, **1996**; 126(4 Suppl):1181S-6S. Review.
8. **Price, P.A., Otsuka, A.S., Poser, J.W., Kristaponis, J. Raman, N.** Characterisation of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **1976a**; 73: 1447-1451.
9. **Price P.A., Poser J.W., Raman, N.** Primary structure of the γ - carboxyglutamic acid containing protein from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1976b**; 73: 3374-3375.
10. **Hauschka PV, Gallop PM.** Purification and calcium binding properties of osteocalcin, the γ -carboxyglutamate-containing protein of bone. In: Calcium binding proteins and calcium function (Ed. Wasserman) (Elsevier/Nort-Holland, Amsterdam), **1977**; pp, 338-47.
11. **Price PA, Baukol SA.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteocarcinoma cells. *J Biol Chem*, **1980a**; 11660-63.
12. **Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ.** A new biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest*, **1980b**; 66:878-83.
13. **Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Decharanne M, Delmas PD.** Protein S, a vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology*, **1992**; 130: 1599-604.

14. **Huo D.** X-ray analysis of 34 cases of foodborne skeletal fluorosis. *Fluoride*, **1981**; 14:51-55.
15. **Moller PF, Gudjonsson SV.** Masive fluorosis of bones and ligaments. *Acta. Radiol*, **1932**; 13:269-94.
16. **Bishop PA.** Bone changes in chronic fluorine intoxication. A roentgenographic study. *Amer J Roentgenol Radium Ther*, **1936**; 35: 577-85.
17. **Wilkie J.** Two cases of fluoride osteosclerosis. *Br. J. Radiol*, **1940**; 13:213-17.
18. **Czerwinski E, Lankosz W.** Fluoride-induced changes in 60 retired aluminum workers. *Fluoride*, **1977**; 10:125-37.
19. **Czerwinski E, Lankosz W.** Skeletal changes in industrial and endemic fluorosis. *Fluoride*, **1978**; 11:29-33.
20. **Sankaram B, Gadekar BG.** *Skeletal fluorosis*. In: Blackwood, HSS ed. Proceedings of First European symposium. London. Oxford press. **1964**; 357-62.
21. **Winston AE, Bhaskar SN.** Caries prevention in the 21th century. *J Am Dent Assoc*, **1998**; 129(11):1579-87.
22. **Dean HT.** Classification of mottled enamel diagnosis. *J Am Dent Assoc*, **1934**; 21:1421-26.
23. **Dean HT.** In: Mouttom, R, ed. *Fluoride and dental health*. Washington DC American Association for advancement of Science. **1942a**; 6-12.
24. **Roholm K.** *Fluoride intoxication: a clinical hygienic study*. Copenhagen: Nordisk Forlog, Arnold Busck, **1937**.
25. **Alhava EM, Oikkonen H, Kauranen P, Kari T.** The effect of drinking water fluoridation on the fluoride content, strength and mineral density of human bone. *Acta Orthop Scand*, **1980**; 51(3):413-420.
26. **Susheela AK, Mukherjee D.** Fluoride poisoning and the effect of collagen biosynthesis of osseous and nonosseous tissues of rabbit. *European Res*, **1981**; 111:99-104.
27. **Chan MM, Rucker RB, Zeman F, Riggins RS.** Effect of fluoride on bone formation and strength in Japanese quail. *J.Nutrition*, **1973**; 103:1431-40.
28. **Riggins RS, Zeman F, Moon D.** The effects of sodium fluoride on bone breaking strength. *Calcif.Tissue Res*, . **1974**; 14:283-89.
29. **Chan MM, Rucker RB, Riggins RS.** The relationship of fluoride to bone strength and related biochemical properties. *Fluoride*, **1975**; 8:163.
30. **Turner CH, Garetto LP, Dunipace AJ, Zhang W, Wilson ME, Grynepas MD, Chachra D, McClintock R, Peacock M, Stookey GK.** Fluoride treatment increased serum IGF-1, bone turnover and bone mass but not bone strength in rabbits. *Calcif Tissue Int*. **1997**; 61:77-83.
31. **Simpson E, Rao LG, Evans RM, Wilkie W, Rodger JC, Lakhani A.** Calcium metabolism in a fatal case of fluoride poisoning. *Ann Clin Biochem*, **1980**; 17(1): 10-4.

32. **Baltazar RF, Mower MM, Reider R, Funk M, Salomen J.** Acute fluoride poisoning leading to fatal hyperkalemia. *Chest*, **1980**; 78(4): 660-3.
33. **Wathen RL, Burcham CW Jr.** Understanding the dangers of fluoride during dialysis. *Nephrol News Issues*. **1993**; 7(9): 32-6.
34. **Boink AB, Wemer J, Meulenbelt J, Vaessen HA, de Wildt DJ.** The mechanism of fluoride-induced hypocalcemia. *Hum Exp Toxicol*, **1994**; 13(3): 149-55.
35. **Ruzicka JA, Mrklas L, Rokytova K.** Influence of water intake on the fluoride incorporation into the bones and incisors and incisor fluorosis in mice. *Caries Res*, **1972**; 6(1): 89.
36. **Wenzel A, Thylstrup A, Melsen B.** Skeletal development and dental fluorosis in 12-14-year-old Danish girls from a fluoride and a non-fluoride community. *Scand J Dent Res*, **1982a**; 90(2): 83-8.
37. **Wenzel A, Thylstrup A, Melsen B, Fejerskov O.** The relationship between water-borne fluoride, dental fluorosis and skeletal development in 11-15 year old Tanzanian girls. *Arch Oral Biol*, **1982b**; 27(12): 1007-11.
38. **Moudgil A, Srivastava RN, Vasudev A, Bagga A, Gupta A.** Fluorosis with crippling skeletal deformities. *Indian Pediatr*, **1986**; 23: 767-773.
39. **Opinya GN, Imalingat B.** Skeletal and dental fluorosis: two case reports. *East Afr Med*, **1991**; 68(4): 304-11.
40. **Dean HT.** *The investigation of physiological effects by the epidemiological method.* In : Fluoride and Dental Health (Moulton, F, R., ed) pp. 23-31. American Association for Advanced of Science. Washington, DC. **1942**
41. **Jolly SS, Singh BM, Mathur OC, Malhotra KC.** Epidemiological, clinical and biochemical study of endemic dental and skeletal fluorosis in Punjab. *Br. Med. J*, **1968**; 4:427-29.
42. **Leatherwood EC, Burnett GW, Chandravejjsmam R, Sirikaya P.** Dental caries and dental fluorosis in Thailand. *Am J Public Health Nations Health*, **1965**; 55(11): 1792-9.
43. **Diefenbach VL, Nevitt GA, Frankel JM.** Fluoridation and the appearance of teeth. *J Am Dent Assoc*, **1965**; 71(5): 1129-37.
44. **Konig KG, Schait A, Muhlemann HR.** The effects of topical application of phosphate and fluoride solutions on caries incidence and molar surface solubility in Osborne-Mendel rats. *Helv Odontol Acta*, **1966**; 10(1): 19-28.
45. **Wagner MJ, Weil TM.** Reduction of enamel acid solubility with electrophoretic fluoride applications. *J Dent Res*, **1966**; 45(5): 1563.
46. **Reed AJ, Bibby BG.** Preliminary report on effect of topical applications of titanium tetrafluoride on dental caries. *J Dent Res*, **1976**; 55(3): 357-8.
47. **Green E.** A clinical evaluation of two methods of caries prevention in newly-erupted first permanent molars. *Aust Dent J*, **1989**; 34(5): 407-9.
48. **Hosoya Y, Aritomi K, Goto G.** Pulpal response to diammine silver fluoride. (2). Application on exposed pulps. *Shoni Shikagaku Zasshi*, **1990**; 28(2):327-37.

49. **Kuczynski HJ, Rogers ML.** A retrospective study: osteoporosis and hormone replacement therapy. *Curationis*, **1989**; 12(1-2): 9-12.
50. **Meunier P, Sebert J-L, Reginster J-Y, et al.** Fluoride salts are no better at preventing new vertebral fractures than calcium-vitamin D in postmenopausal osteoporosis: The FAVO Study. *Osteoporosis Int*, **1998**; 8:4-12.
51. **Miller P, Lukert B, Broy S, Civitelli R, Fleischmann R, Gagel R, Khosla S, Lucas M, Maricic M, Pacifici R, Recker R, Sarran HS, Short B, Short MJ.** Management of postmenopausal osteoporosis for primary care. *Menopause*, **1998**; 5(2):123-31.
52. **Lafage MH, Balene R, Battle M, Guy J, Shea M, Hayes WC, Rodan GA.** Comparison of aldronate and sodium fluoride effects in minipigs: one year study. *Calcif Tissue Int*, **1993**; 52(Suppl. 1):S96.
53. **Fratzl P, Roschger P, Eschberger J, Abendroth B and Klaushofer K.** Abnormal bone mineralization after fluoride treatment in osteoporosis: A small-angle x-ray scattering study. *J Bone Min Res*, **1994**; 9: (10) 1541-9.
54. **Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ.** Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science*, **1983**; 227:330-332.
55. **Bayley TA, Harrison JE, Murray TM, Jasse RG, Sturtridge W, Pritzker KP, Strauss A, Vieth R, Goodwin S.** Fluoride-induced fractures: relation to osteogenic effect. *J Bone Mineral Research*, **1990**; 5Suppl 1: S217-S222.
56. **Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride.** Institute of Medicine, National Academy of Sciences, Food and Nutrition Board Washington DC: National Academy Press, **1997**.
57. **Reginster JY, Meurmans L, Zegels B, Rovati LC, Minne HW, Giacobelli G, Taquet AN, Setnikar I, Collette J, Gosset C.** The effect of sodium monofluorophosphate plus calcium on vertebral fracture rate in postmenopausal women with moderate osteoporosis. *Ann Int Med*, **1998**; 129:1-8.
58. **Goldman SM, Sievers ML, Templin DW.** Radiculomyopathy in a southwestern Indian due to skeletal fluorosis. *Ariz Med*, **1971**; 28(9):675-7.
59. **Waldbott GL.** Pre-skeletal neighborhood fluorosis: an epidemic near an Ohio enamel smelter. *Vet Hum Toxicol*, **1979**; 21 Suppl: 140-4.
60. **Grandjean P.** Occupational fluorosis through 50 years: clinical and epidemiological experiences. *Am J Ind Med*, **1982**; 3(2):227-36.
61. **Boivin G, Chavassieux P, Chapuy MC, Baud CA, Meunier PJ.** Histomorphometric profile of bone fluorosis induced by prolonged ingestion of Vichy Saint-Yorre water. Comparison with bone fluorine levels. *Pathol Biol*, **1986**; 34(1): 33-9.
62. **Czerwinski E, Novak J, Dabrowska D, Skolarczyk A, Kita B, Ksiezzyk M.** Bone and joint pathology in fluoride-exposed workers. *Arch Environ Health*, **1988**; 43(5): 340-3.
63. **Runge H.** Changed manifestation of fluorosis as an occupational disease within the past 15 years. *Z Gesamte Hyg*, **1988**; 34(7):396-8.
64. **Steinegger AF, Schlatter C.** Evaluation of fluoride exposure in aluminium smelters: state of the art. *Med Lav*, **1992**; 83(5): 489-98.

65. **Chen Y, Lin M, He Z, Xie X, Liu Y, Xiao Y, Zhou J, Fan Y, Xiao X, Xu F.** Air pollution-type fluorosis in the region of Pingxiang, Jiangxi, Peoples' Republic of China. *Arch Environ Health*, **1993**; 48(4):246-9.
66. **Abdennebi EH, Fandi R, Lamnaouer D.** Human fluorosis in Morocco: analytical and clinical investigations. *Vet Hum Toxicol*, **1995**; 37(5): 465-8.
67. **Gupta SK, Gupta RC, Seth AK, Chaturvedi CS.** Increased incidence of spina bifida occulta in fluorosis prone areas. *Acta Paediatr Jpn*, **1995**; 37(4): 503-6.
68. **Polzik EV, Valova GA, Zinger VE, Sysoeva LA.** The problems of the biomedical prevention of occupational fluorosis. *Med Tr Prom Ekol*, **1995**; (5):44-7.
69. **Vikoren T, Stuve G.** Fluoride exposure in cervids inhabiting areas adjacent to aluminum smelters in Norway. II. Fluorosis. *J Wildl Dis*, **1996**; 32(2): 181-9.
70. **Watanabe T, Kondo T, Asanuma S, Sakurai S, Tamura K, Ando M.** Endemic fluorosis in southern China: radiological findings. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi*, **1997**; 57(7): 425-6.
71. **Patra RC, Dwivedi SK, Bhardwaj B, Swarup D.** Industrial fluorosis in cattle and buffalo around Udaipur, India. *Sci Total Environ*, **2000**; 15; 253(1-3): 145-50.
72. **Ando M, Tadano M, Asanuma S, Tamura K, Matsushima S, Watanabe T, Kondo T, Sakurai S, Ji R, Liang C, Cao S.** Health effects of indoor fluoride pollution from coal burning in China. *Environ Health Perspect*, **1998**; 106(5): 239-44.
73. **Ando M, Tadano M, Yamamoto S, Tamura K, Asanuma S, Watanabe T, Kondo T, Sakurai S, Ji R, Liang C, Chen X, Hong Z, Cao S.** Health effects of fluoride pollution caused by coal burning. *Sci Total Environ*, **2001**; 23; 271(1-3): 107-16.
74. **Choubisa SL.** Some observations on endemic fluorosis in domestic animals in Southern Rajasthan (India). *Vet Res Commun*, **1999**; 23(7): 457-65.
75. **Shortt HM, McRobert GR, Bernard TW, Nayar ASM.** Endemic fluorosis in Madras Presidency. *Indian Med Gez*, **1937**; 72:396-398.
76. **Siddiqui AH.** Fluorosis in Nalgonda district, Hyderabad, Deccan. *Br.Med.J*, **1955**; 2:1408.
77. **Shourie KL.** A detail survey in Ajmer, Marwar. Indian. *J Med Res*, **1947**; 35:215-225.
78. **Singh A, Jolly SS.** Endemic fluorosis. *Quart J. Med*, **1961**; 30:357.
79. **Teotia SPS, Kanwar KC, Teotia M.** Metabolic studies on skeletal fluorosis with a new approach to its treatment. (Preliminary report). *Fluoride*, **1969**; 2:142.
80. **Srikantia SG, Siddiqui AH.** Metabolic studies in skeletal fluorosis. *Clin Sci*, **1965**; 28:477.
81. **Dasarathy S, Das TK, Gupta IP, Susheela AK, Tandon RK.** Gastroduodenal manifestations in patients with skeletal fluorosis. *J Gastroenterol*, **1996**; 31(3): 333-7.
82. **Teotia M, Teotia SP, Singh KP.** Endemic chronic fluoride toxicity and dietary calcium deficiency interaction syndromes of metabolic bone disease and deformities in India: year 2000. *Indian J Pediatr*, **1998**; 65(3):371-81.

83. **Savas S, Cetin M, Akdogan M, Heybeli N.** Endemic fluorosis in Turkish patients: relationship with knee osteoarthritis. *Rheumatol Int*, **2001**; 21(1): 30-5.
84. **Sang-Guan CM.** Effect of fu-ning in treating skeletal fluorosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **1986**; 66(11): 665-7.
85. **Gupta SK, Gupta RC, Seth AK, Gupta A.** Reversal of fluorosis in children. *Acta Paediatr Jpn*, **1996**; 38(5): 513-9.
86. **WHO Fluoride, and Fluorine and Fluorides**, **1984**.
87. **Srirangareddy G, Srikantia SG, Narasingarao BS.** Effect of dietary calcium vitamin C and protein in development of experimental skeletal fluorosis. II. Calcium turnover with Ca45, calcium and phosphorus balance. *Metabolism*, **1971**; 20:642-650.
88. **Teotia SPS, Teotia M, Teotia NPS.** Skeletal fluorosis: Roentgenological and histopathological study. *Fluoride*, **1976b**; 9:91.
89. **Narasingarao BS, Krishnamachari KAVR, Vijayasathay C.** Ca47 turnover in endemic fluorosis and endemic genu valgum. *Br. J Nutr*, **1979**; 41:7-14.
90. **Pettifor JM, Schnitzler CM, Ross FP, Moodley GP.** Endemic skeletal fluorosis in children: hypocalcemia and the presence of renal resistance to parathyroid hormone. *Bone Miner*, **1989**; 7(3): 275-88.
91. **Savchuck WB, Armstrong WD.** Metabolic turnover of fluoride by the skeleton of the rat. *J Biol Chem*, **1951**; 193:575-85.
92. **Hodge HC.** The significance of the skeletal deposition of fluoride. In: Reifenstein EC jr ed. Metabolic interrelations with special reference to calcium. Transactions of the fourth conference, New York. *Josiah Macy jr Foundation*, 250, **1952**.
93. **Joyston-Bechal S, Duckworth R, Braden M.** The role of iso-ionic exchange in the uptake of 18F labelled fluoride by hydroxyapatite and enamel. *Arch Oral Biol*, **1967**; 12(10): 1097-105.
94. **Pandit CG, Rao DN** Endemic fluorosis in south India. Experimental production of chronic intoxication in monkeys. *Indian J. Med. Res*, **1940**; 28:559.
95. **Sowers MFR, Clark MK, Jannausch ML, Wallace RB.** A prospective study of bone mineral content and fracture in communities with differential fluoride exposure. *American Journal of Epidemiology*, **1991**; 133: 649-60.
96. **Anasuya A, Narasingarao BS.** Hydroxyproline peptides in urine in fluorosis. *Clin Chim Acta*, **1974**; 56:121.
97. **Rao SR, Murthy KJR, Murthy TVSD.** Urinary hydroxyproline in endemic fluorosis. *Fluoride*, **1978**; 12: 120-24.
98. **Krishnamachari KAVR.** Further observation on the syndrome of endemic genu valgum of south India. *Indian J. Med. Res*, **1976**; 64:284.
99. **Krishnamachari KAVR, Sivakumar B.** Endemic genu valgum: A new dimension to the fluorosis problem in India. *Fluoride*, **1976**; 9:185-200.
100. **Runge H, Franke J, Theuring.** Measuring of cortical thickness. A means for controlled diagnosis of fluoride exposed people. *Fluoride*, **1979**; 12:91-99.

101. **Singh A. and Jolly SS.** Endemic fluorosis. *QS Med*, **1961**; 120: 357-372.
102. **Jolly SS, Prasad S, Sharma R, and Rai B.** Human fluoride intoxication in Punjab. *Fluoride*, **1971**; 4:94-95.
103. **Franke J, Rath F, Runge F, Fengler F, Auermann E, Lenart G.** Industrial fluorosis. *Fluoride*, **1975**; 8: 58-61.
104. **Eble DM, Deaton TG, Wilson FC Jr, Bawden JW.** Fluoride concentrations in human and rat bone. *J Public Health Dent*, **1992**; 52(5):288-9.
105. **Hanhijarvi H.** Comparison of free ionized fluoride concentrations of plasma and renal clearance in patients of artificially fluoridated and non-fluoridated drinking water areas. *Proc Finn Dent Soc.* **1974**;70 Suppl 1-3:3-67.
106. **Husdan H, Vogl, R, Oreopoulos D, Gryfe C, Rapoport A.** Serum ionic fluoride: Normal range and relationship to age and sex. *Fluoride*, **1977**; 10:146.
107. **Teotia SPS, Teotia M.** Secondary hyperthyroidism in patients with endemic skeletal fluorosis. *Br Med J*, **1973**; 1: 637-640.
108. **Jolly SS.** *Endemic skeletal fluorosis.* In: Rao KV, ed. Proceeding of the symposium. Hyderabad, **1974**.
109. **Rao SR.** *Studies in endemic fluorosis.* In: Rao, KV, ed. Proceeding of the symposium. Hyderabad, **1974**.
110. **Hodge HC, Smith FA, Gedalia I.** In: *Fluorides and human health*, Geneva, W.H.O. Technical report series. **1970**; 59:146.
111. **Largent EJ, Heyroth FF.** The absorption and excretion of fluorides III. Further observations on metabolism of fluorides at high levels of intake. *J Indust. Hyg. Toxicol*, **1949**; 31:134-8.
112. **Likins RC, McClure FJ, Steere AC.** Urinary excretion of fluoride following defluoridation of a water supply. *Public.Hlth.Rep*, **1956**; 71:217-20.
113. **Bagga OP, Mehta SP, Prakash V, Raizada A, Singh KN, Sankhyan KA, Gupta R, Sood B.** Urinary fluoride excretion in endemic fluorosis. *Fluoride*, **1979**;12:72-75.
114. **Rao SR, Murthy KJR, Murthy RVSD.** Urinary fluoride excretion in endemic fluorosis. *Fluoride*, **1979**; 12:188-94.
115. **Reddy GS and Srikantia ST** Effect of dietary calcium, vitamin C and protein development of experimental skeletal fluorosis. *Metabolism*, **1971**; 20: 642-49.
116. **Krishnamachari KAVR, Lakshmiah N.** Lack of effect of massive dose of vitamin C on fluoride excretion in fluorosis during a short clinical trial. *Am J Clin Nutr*, **1975**; 28:1234.
117. **Rao SR, Muthy KJR, Murthy TVSD.** Treatment of fluorosis in humans. **1975**; 8: 1-57.
118. **Teotia SPS, Teotia M, Singh RK.** Treatment of endemic fluorosis in human beings: An experimental study. *Fluoride*, **1976a**; 9:98.
119. **Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV.** Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med*, **1980**; 302(26): 1460-6.

120. **Uotila L.** The metabolic functions and mechanism of action of vitamin K. *Scand J Clin Lab Invest* **1990**; Suppl. 201: 109-17.
121. **Hauschka PV, Reid ML.** Timed appearance of a calcium-binding protein containing γ -carboxyglutamic acid developing chick bone. *Devl. Biol*, **1978a**; 65:426-34.
122. **Bouchaert ve Said** Bouchaert, J.H., Said, A.H. Fracture healing by vitamin K. *Nature*, **1960**; 185: 849-54.
123. **Dodds RA. Catterall A. Bitensky L. Chayen J.** Effects on fracture healing of an antagonist of the vitamin K cycle. *Calcified Tissue International*, **1984**; 36(2):233-8.
124. **Dam H.** The antihaemorrhagic vitamin of the chick: Occurrence and chemical nature. *Nature*, **1935a**; 135:652-59.
125. **Dam H.** The antihaemorrhagic vitamin of the chick: *Biochem J*, **1935b**; 29:1273-80.
126. **Almquist A., Stokstad J.** Dietary haemorrhagic disease in chicks. *Nature*, **1935a**; 136: 31-36.
127. **Almquist A., Stokstad J.** Haemorrhagic chick disease of dietary origin. *J Biol Chem*, **1935b**; 111: 105-110.
128. **Doisy Jnr. EA.** In: *Symposium proceedings on the Biochemistry, Assay and Nutritional value of Vitamin K and related compound* (Ass Vitamin Chemists, Chicago). P.79, **1970**.
129. **Stenflo, J., Fernland, P., Egan, W., Roepstorff, P.** Vitamin K dependant modifications of glutamic acid residues in prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1974**; 71: 2730-2734.
130. **Nelstestuen, G.L., Zytovicz, T.H., Howard, J.B.** The mode of action of vitamin K: Identification of γ -carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J. Biol. Chem* **1974**; 249: 6347-6350.
131. **Olson RE, Suttie JW.** Vitamin K and γ -carboxyglutamate biosynthesis. *Vitam, Horm.* **1977**; 35:59-108.
132. **Vermeer C.** γ -Carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J*, **1990**; 266: 625-636, Review.
133. **Hauschka, P.V., Lian, J.B., Gallop P.M.** Direct identification of the calcium-binding amino acid γ -carboxyglutamate in mineralised tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci, (USA)* **1975**; 72: 3925-3929.
134. **Price PA, Otsuka AS, Poser JW, Kristapanis J and Raman N.** Characterization of a γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc.Natl. Acad Sci, U.S.A.* **1976a**; 73: 1447.
135. **Price PA, Poser JW and Raman N.** Primary structure of the γ -carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.* **1976b**; 73: 3374.
136. **Hauschka, P.V., Carr, S.A.** Calcium-dependent α -helical structure in osteocalcin. *Biochemistry*, **1982a**; 21: 2538-47.
137. **Prince CW, Navia JM.** Glycosaminoglycan alterations in rat bone due to growth and fluorosis. *J Nutr*, **1983**; 113: 1576-82.

138. **Knapen, M.H.J., Hamulyak, K., Vermeer, C.** The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (Bone Gla protein) and urinary calcium excretion. *Ann. Int. Med*, **1989**; 111: 1001 -05.
139. **Plantalech, L, Guillaumont, M., Vergnaud, P., Leclercq, M., Delmas, P.D.** Impairment of γ -carboxylation of circulating osteocalcin (bone gla-protein) in elderly women. *J. Bone Miner. Res*, **1991**; 6: 1211-16.
140. **Szulc, P., Chapuy, M.C., Meunier, P.J., Delmas, P.D.** Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J. Clin. Invest*, **1993**; 91: 1769-74.
141. **Hauschka PV** *Osteocalcin: the vitamin K-dependent calcium binding protein of bone matrix*. In: Akeson, Bornstein, Glimcher, Heritable disorders of connective tissue (Mosby, St. Louis, 1982) pp.195-207, **1982**.
142. **Price PA.** Gla-containing proteins of bone. *Connect Tissue Res*, **1989**; 21(1-4): 51-7, discussion 57-60, Review.
143. **Brown, J.P., Delmas, P.D., Malaval, L., Edouard, C., Chapuy, M-C., Meunier J. P.** Serum bone gla-protein: a specific marker for bone formation in post menopausal osteoporosis. *Lancet*, **1984**; 1: 1091-1093.
144. **Hauschka PV, Reid ML.** Vitamin K-dependence of a calcium binding protein containing γ -carboxyglutamic acid in chick bone. *J Biol. Chem*, **1978b**; 253:9063-68.
145. **Hodges SJ, Pilkington MJ, Stanp TC, Catterall A, Shearer MJ, Bitensky L, Chayen J.** Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck. *Bone*, **1993b**; 12: 387-89.
146. **Hart, J.P., Shearer M.J., Klenerman, L., Catterall, A., Reeve, J., Sambrook, P.N., Dodds, R.A., Bitensky, L. and Chayen, J.** Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K₁ in osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1985**; 60: 1268-1269.
147. **Bitensky L., Hart J.P., Catterall A., Hodges S.T., Pilkington M.J., Chayen J.** Circulating vitamin K levels in patients with fractures. *J of Bone and Joint Surgery, British Volume*, **1988**; 70(4):663-4.
148. **Hodges, S.J., Pilkington, M., Stamp, T.C.B., Catterall, A., Shearer, M.J. Bitensky., L., Chayen, J.** Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck. *Bone*, **1991**; 12: 387-389.
149. **Young GA, Chem C, Hill GL.** Assessment of protein-caloric malnutrition in surgical patients from plasma proteins and anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr.* **1978**; 31: 429-35.
150. **Wootton, R., Brereton, P.J., Clark M.B., Hesp R., Hodgkinson H.M., Klenerman L., Reeve, J., Slavin, G., Tellez-Yudilevich M.** Fractured neck of femur in the elderly. An attempt to identify patients at risk. *Clin. Sci.* **1979**; 57: 93-101.
151. **Older MWL, Delyth E, Dickerson JWT.** A nutrient survey in elderly women with femoral neck fracture. *Br. J. Surg*, **1980**; 67:884-886.
152. **Suttie JW, Mumma-Schiendel LL, Shah DV, Lyle BJ, Greger JL.** Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restrictions in humans. *Am J Clin Nutr*, **1988b**; 47: 475-80.

153. **Einhorn, T.A., Gundberg, C.M., Devlin, V.J., Warman, J.** Fracture healing and osteocalcin metabolism in vitamin K-deficiency. *Clin. Ortho. Rel. Res*, **1988**; 237: 219-25.
154. **Petursson S, Harrington D, Shearer M, Hoper C, Hodges SS.** Circulating levels of phylloquinone (Vitamin K1) in patients, following orthognathic surgery. *J Dent Res*, **1994a**; 72(4):689 (abs).
155. **Petursson S, Hodges SS, Harrington D, Hoper C, Henderson B, Harris M.** Phylloquinone (Vitamin K1) content of young adults jaw bone. *J Dent Res*, **1994**; 73(4): 831(abs).
156. **O'Reilly RA.** Vitamin K in hereditary resistance to oral anticoagulant drugs. *Am. J. Physiol*, **1971**; 221:1327-31.
157. **Barkhan P, Shearer MJ.** Metabolism of vitamin K1 in man. *Proc. Roy. Soc. Med*, **1977**; 70:93-96.
158. **Hathaway WE.** Vitamin K deficiency. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **1993**; 24 Suppl 1:5-9.
159. **Astedt B.** Antenatal drugs affecting vitamin K status of fetus and the newborn. *Semin Thromb Hemost*, **1995**; 21(4): 364-70, Review.
160. **Howe AM, Lipson AH, Sheffield LJ, Haan EA, Halliday JL, Jenson F, David DJ, Webster WS.** Prenatal exposure to phenytoin, facial development, and a possible role for vitamin K. *Am J Med Genet*, **1995**; 11;58(3):238-44.
161. **Haffa A, Krueger D, Bruner J, Engelke J, Gundberg C, Akhter M, Binkley N.** Diet- or warfarin-induced vitamin K insufficiency elevates circulating undercarboxylated osteocalcin without altering skeletal status in growing female rats. *J Bone Miner Res*, **2000**; 15(5):872-8.
162. **Howe AM, Webster WS, Lipson AH, Halliday JL, Sheffield LJ.** Binder's syndrome due to prenatal vitamin K deficiency: a theory of pathogenesis. *Aust Dent J*, **1992**.
163. **Hodges S.J., Pilkington, M.J., Shearer, M.J. Bitensky, L., Chayen J.** Age-related changes in the circulating levels of congeners of vitamin K₁, menaquinone-7 and menaquinone-8. *Clin. Sci*, **1990**; 78: 63-66.
164. **Konishi T, Baba S, Sone H.** Whole body autoradiographic study of vitamin K distribution in rat. *Chem. Pharm. Bull*, **1973**; 21:220-24.
165. **Blomstrand R, Forsgren L.** Vitamin K1-3H in man: Its absorption and transport in the thoracic duct lymph. *Int. Z. Vit. Forsch*, **1968**; 38:45-64.
166. **Mann JD, Mann FD, Bellman JL.** Hypoprothrombinemia due to loss of intestinal lymph. *Am. J. Physiol*, **1949**; 158:311-14.
167. **Hollander D.** Vitamin K1 absorption by everted intestinal sacs of the rat. *Am J Physiol*, **1973**; 225:360-68.
168. **Shearer MJ, Mallinson CN, Webster GR, Barkhan P.** Clearance from plasma and excretion in urine, faeces and bile of an intravenous dose of titrated vitamin K1 in man. *Br. J Haematol*, **1972**; 22:579-88.

169. **Bjornsson TD, Mettin PJ, Swezey SE, Blaschke TF.** *Disposition and turnover of vitamin K1 in man.* In: Vitamin K metabolism and vitamin K-dependent proteins (Suttie JW ed.) (Baltimore: University Park Press) pp 328-32, **1980**.
170. **Kindberg CG, Suttie JW.** Effect of various intakes of phylloquinone on vitamin K deficiency and serum and liver phylloquinone concentrations in rats. *J Nutr*, **1989**; 119:175-80.
171. **Shearer MJ, Barkhan P, Webster GR.** Absorption and excretion of an oral dose of titrated vitamin K1 in man. *Brit. J Haematol*, **1970**; 18:297-308.
172. **Shearer MJ and Barkhan P.** Studies on the metabolites of phylloquinone (vitamin K1) in the urine of man. *Biochem Biophys. Acta*, **1973**; 297:300-5.
173. **SPSS Inc.** *SPSS for Windows.* Version 10.0, Chicago: SPSS Inc., **1999**
174. **Wolinsky I, Simkin A, Gusgenheim K.** Effects of fluoride on metabolism and mechanical properties of rat bone. *Am J Physiol*, **1972**; 223:46-50.
175. **Turner CH, Hasegawa K, Zhang W, Wilson M, Li Y and Dunipace AJ.** Fluoride reduced bone strength in older rats. *J Dent Res*, **1995**; 74: 1475-81.
176. **Turner CH, Owan I, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME and Dunipace AJ.** High fluoride intake causes osteomalacia and diminished bone strength in rats with renal deficiency. *Bone*, **1996a**; 19: 595-601.
177. **Jiang Y, Zhao J, Van Audekercke R, Dequeker J and Geusens P.** Effect of low-dose long-term NaF preventive treatment on rat bone mass and biomechanical properties. *Calcif Tissue Int*, **1996**; 58: 30-39.
178. **Prince CW, Navia JM.** Glycosaminoglycan alterations in rat bone due to growth and fluorosis. *J Nutr*. **1983**; 111(8):1576-82.
179. **Ronden JE, Thijssen HHW, Vermeer Cees.** Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1998**; 1379:16-22.
180. **Sakamoto N, Kimura M, Hiraiki and Itokawa Y.** Changes of phylloquinone and menaquinone-4 concentrations in rat liver after oral, intravenous and intraperitoneal administration. *Internal J Vit. Nutr. Res.* **1996**; 66: 322-28.
181. **Webster WS, Vaghef H, Ryan B, Dencker L and Hellman B.** Measurement of DNA damage by the comet assay in rat Embryos grown in media containing high concentration of Vitamin K1. *Toxicology in Vitro*. **2000**;14: 95-99.
182. **Jowsey J, Riggs BL, Kelly PJ, Hoffman DL.** Effect of combined therapy with sodium fluoride, vitamin D and calcium in osteoporosis. *Am J Med*, **1972**; 53: 43-49.
183. **Briancon D and Meunier PI.** Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium and vitamin D. *Orthop Clin North Am.* **1981**; 12: 629-48.
184. **Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A.** Compressive strength, ash weight and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int*, **1987**; 40: 318-322.
185. **Turner R, Vandersteenboven J and Bell N.** The effects of ovariectomy and 17 β -estradiol on cortical bone histomorphometry in growing rats. *J Bone Miner Res*, **1987**; 2: 115-122.

186. **Riggs BL, Hodgston SF, O'Fallon WM, Chao EYS, Wahner HW, Juhs JM, Cedel SL, Melton LS III.** Effects of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, **1990**; 322: 802-9.
187. **Riggs BL.** A new option for treating osteoporosis. *N Engl J Med*, **1990**; 323: 124-125.
188. **Lafage MH, Balena R, Battle MA, Shea M, Seedor JG, Klein H, Hayes WC and Rodan GA.** Comparison of alendronate and sodium fluoride effects on cancellous and cortical bone in minipigs. *J Clin Invest*, **1995**; 95: 2127-33.
189. **Riggins RS, Rucker RC, Chan MM, et al.** The effect of fluoride supplementation on the strength of osteoporotic bone. *Clin Orthop*, **1976**; 114: 352-57.
190. **Kleerekoper M, Peterson E, Philips E.** Continuous sodium fluoride therapy does not reduce vertebral fracture rate in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Min Res*, **1989**; 4: S376.
191. **Melton LJ III, Wahner HW, Richelson LS, O'Fallon WM, Riggs BL.** Osteoporosis and the risk of hip fracture. *Am J Epidemiol*, **1986**; 124: 254-61.
192. **Alho A, Husby T, Hoiseth A.** Bone mineral content and mechanical strength. An ex vivo study on human femora at autopsy. *Clin Orthop*, **1988**; 227:292-7.
193. **Lotz JC, Hayes WC.** The use of quantitative computed tomography to estimate risk of fracture of hip from falls. *J Bone Joint Surg*, **1990**; 72A: 689-700.
194. **Saville PD.** Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc*, **1969**; 17: 155-66.
195. **Stromberg L, Dalen N.** Experimental measurement of maximal torque capacity of long bones. *Acta Orthop Scand*, **1976**; 47: 257-263.
196. **Paavolainen P.** Studies on mechanical strength of bone: I. Torsional strength of normal rabbit tibio-fibular bone. *Acta Orthop Scand*, **1978**; 49: 497-505.
197. **Danielsen CC, Mosekilde L, Andreassen T.** Long-term effect of orchidectomy on cortical bone from rat femur: bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int*, **1992**; 50: 169-74.
198. **Burstein AH and Frankel VH.** A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech*, **1971**; 4: 155-58.
199. **Burstein AH, Currey JD, Frankel VH, Reilly DT.** The ultimate properties of bone tissue. The effects of yielding. *J Biomech*. **1972**; 5: 35-44.
200. **Currey JD.** The effect of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone. *J Biomech*, **1988**; 21: 439-441.
201. **Sedlin ED and Hirsch C.** Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop. Scand*, **1966**; 37: 29-46.
202. **Ruff CB, Hayes WC.** Cross- sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae- a biomechanical investigation: I. Method and general patterns of variation. *Am J Phys Anthropol*, **1983**; 60(3):359-81.

203. **Ruff CB, Hayes WC.** Cross-sectional geometry of Pecos Pueblo femora and tibiae--a biomechanical investigation: II. Sex, age, side differences. *Am J Phys Anthropol*, **1983**; 60(3):383-400.
204. **Einhorn TA.** Bone strength: the bottom line. *Calcif Tissue Int*, **1992a**; 51: 333-39.
205. **Einhorn TA, Wakley GK, Linkhart S, Rush EB, Maloney S, Faierman E, Baylink DJ.** Incorporation of sodium fluoride into cortical bone does not impair the mechanical properties of the appendicular skeleton in rats. *Calcif. Tissue Int*, **1992b**; 51: 127-131.
206. **Trozilli P, Takebe K, Burstein A, Zika J, Keiple K.** The material properties of immature bone. *J Biomech Eng*, **1982**; 104: 12-20.
207. **Keller T, Spengler D and Carter D.** Geometric, elastic and structural properties of maturing rat femora. *J Orthop Res*, **1986**; 4: 57-67.
208. **Carter DR, Beaupre GS.** Effects of fluoride treatment on bone strength. *J Bone Miner Res*, **1990**; Suppl 1, S177-S184.
209. **Riggs BL, O'Falon WM, Lane A, Hodgson SF, Wahner HW, Muhs J, Chao E, Melton LJ III.** Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: extended observations and additional analysis. *J Bone Miner Res*, **1994**; 9: 2275.
210. **Oxlund H, Barcman M, Ortoft G, Andreassen TT.** Reduced concentration of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. *Bone*, **1995**; 17: 3665-3715.
211. **Burstein AH, Zika JM, Heiple KG, Klein L.** Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. *J Bone Joint Surg*, **1975**; 57A: 956-61.
212. **Aaron A., De Vernejoul MG, Kanis JA.** The effect of sodium fluoride in trabecular architecture. *Bone*, **1991**; 12: 307-10.
213. **Dure-Smith BA, Farley SM, Linkhart SG, Farley JR, Baylink DJ.** Calcium deficiency in fluoride-treated osteoporotic patients despite calcium supplementation. *J Clin Endocrinol Metab.* **1996**; 81(1): 269-75.
214. **Turner SD, Chan JT, Wybomy LE, Hutchins MO.** The use of fluoride absorption and secretion to demonstrate gastrointestinal physiology. *J Dent Educ*, **1994**; 58(10): 782-4.
215. **Marquis RE.** Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. *Can J Microbiol*, **1995**; 41: 955-64.
216. **Grynpas MD, Pritzker KPH, Hancock RV, Harrison JE.** *Is fluoridated bone different from non-fluoridated bone?* In: Yousuf SA(ed). Cell Mediated Calcification and Matrix Vesicles. Elsevier, New York. pp.409-414, **1986**.
217. **Boivin G, Chavassieux P, Chapuy MC, Baud CA, Meunier PJ.** Skeletal fluorosis: histomorphometric analysis of bone changes and bone fluoride content in 29 patients. *Bone*, **1989**; 10(2): 89-99.
218. **Grynpas MD.** Fluoride effects on bone crystals. *J Bone Miner Res*, **1990**; 5: Suppl 1, S169-175.
219. **Lundy MW, Russel JE, Auery J, Wergedal JE, Baylink DJ.** Effect of sodium fluoride on bone density in chickens. *Calcif Tissue Int*, **1992**; 50: 420-426.
220. **Grynpas MD and Rey C.** The effect of fluoride treatment on bone mineral crystals in the rat. *Bone*, **1992**; 13: 423-29.

221. **Eriksen EF, Mosekilde LE, Melsen F.** Effects of sodium fluoride, phosphate, and vitamin D2 on trabecular bone balance and remodelling in osteoporotics. *Bone*, **1985**; 6: 381-89.
222. **Turner CH, Akhter MP, Heaney RP.** The effects of fluoridated water on bone strength. *J Orthop Res*, **1992**; 10: 581-87.
223. **Mamelle N, Dusan R, Martin JL, Prost A, Meunier PJ et al.** Risk benefit of sodium fluoride treatment in vertebral osteoporosis. *Lancet*, **1988**; II: 361-5.
224. **Pak CYC, Sakhae E, Pizak V, Petersen RD et al.** Slow-release sodium fluoride in the management of postmenopausal osteoporosis. *Annals of Int Med*, **1994**; 120: 625-32.
225. **Kobayashi S, Shimizu T, Mehdi R, Nawata M, Kojima S, Tsutsumimoto T, Iorio R, Takaoka K.** Advantages of current use of anabolic and antiresorptive agents over single use of these agents in increasing trabecular bone volume, connectivity, and biomechanical competence of rat vertebrae. *Bone*, **1999**; 25(6): 703-12.
226. **Stein ID, Granik G.** Human vertebral bone: relation of strength, porosity and mineralization to fluoride content. *Calcif Tissue Int*, **1980**; 32: 189-94.
227. **Okuba M, Kinoshita T, et al.** Experimental study of measurement of regional bone blood flow in the adult mongrel dog using radioactive microspheres. *Clin Orthop*, **1979**; 138: 263-70.
228. **Chavassieux P.** Bone effects of fluoride in animal models in vivo. A review and a recent study. *J Bone Miner Res*. **1990**; 5: S95- S99.
229. **Smith FA., Hodge HC.** In: *Fluoride and dental health*. London. Staples press, **1960**.
230. **Jones LC, Niv AI, Davis RF, Hunger fold DS.** Bone blood flow in the femora of anesthetized and conscious dogs a chronic preparation: using the radioactive tracer microsphere method. *Clin Orthop*. 170: 286-95, **1982**
231. **Suzuki H, Nakai M, et al.** Measurement of regional blood flow in atrophied rat femur using radiolabeled microsphere method. *Autonom Nerv Sys*. **1994**; 31: 705-709.
232. **Pastoureau P, Vergnaud P, Meunier PJ, and Delmas PD.** Osteopenia and bone-remodeling abnormalities in warfarin-treated lambs. *J of Bone and Min Res*, **1993**; 8(12): 1417-26.
233. **Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zambonin G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ.** Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol*, **1994**; 127(6): 1149-58.
234. **Lian JB, Boivin G, Patterson-Allen P, Grynpas M, Walzer C.** Calcery and calciphyllaxis: timed appearance of gamma-carboxyglutamic acid and osteocalcin in mineral deposits. *Calcif Tissue Int*, **1983**; 35(4-5): 555-61.
235. **Galli M, Caniggia M.** Osteocalcin. *Minerva Med*, **1984**; 3;75(42):2489-501.
236. **Kalu DN.** Evaluation of the pathogenesis of skeletal changes in ovariectomised rats. *Endocrinol*, **1984**; 115: 507-512.
237. **Mosekilde L, Danielsen C, Knudsen U.** The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone*, **1993**; 14: 1-6.

238. **Akesson K.** Fracture and Biochemical Markers of Bone Metabolism. Ed. Grahn's Boktryckeri AB, Lund. **1995**
239. **Barone LM, Owen TA, Tassinari MS, Bortell R, Stein GS, Lian JB.** Developmental expression and hormonal regulation of the rat matrix Gla protein (MGP) gene in chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem*, **1991**; 46(4):351-65.
240. **Rosolger P, Fratzl P, Klaishofer K and Rodan G.** Mineralization of cancellous bone after alendronate and sodium fluoride treatment: A quantitative backscattered electron imaging study on minipig ribs. *Bone*. **1997**; 20(5): 393-397.
241. **Huang DW, Wan YM, Xie LQ, Ma YJ, Liang WB, Shi ZZ.** Effects of vitamin K on bone metabolism in tail-suspended rats. *Space Med Med Eng*, **2001**; 14(5): 346-9.
242. **Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M.** Long term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*, **1989**; 45: 360-6.
243. **Jee WSS, Mori S, Li XJ and Chan S.** Prostaglandin E2 enhances cortical bone mass and activates intracortical bone remodeling in intact and ovariectomized female rats. *Bone*, **1990a**; 11: 253-266.
244. **Mosekilde L.** Assessing bone quality-animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone*, **1995**; 17: S343- S352.

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
DESTEKLEME PROTOKOLÜ**

Proje No : SBE2002D33
 Proje Yöneticisi : Yrd.Doç.Dr. Mehmet KÜRKÇÜ
 Yöneticinin Adresi : Diş Hekimliği Fakültesi
 Proje Başlığı : K1 Vitamini (Phylloquinone) ve İskeletsel Florozis

Proje Bütçesi (TL) : 3.960.000.000
 Proje süresi (ay) : 24 Ay

Taraflar

1-Bu protokol, "Ç.Ü.Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi" gereğince Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü ile yukarıda adı,soyadı ve adresi belirtilen Proje Yöneticisi arasında imzalanmıştır.

Konu

2-Protokolün konusu,yukarıda başlığı verilen Bilimsel Araştırma Projesinin,Üniversite tarafından desteklenmesidir.

Destek Miktarı ve Süre

3-Bütçe ayrıntıları,Bilimsel Araştırma Projeleri Öneri Formunda,Uzmanlık Grubu Proje Değerlendirme Formunda ve BAPKOM'un ilgili kararında gösterilen yukarıda başlığı yazılı proje,belirtilen miktardaki bütçe ile desteklenecektir.Bu protokol,imza tarihinden itibaren yukarıda verilen Proje Süresince yürürlüktedir.Bu sürenin uzaması,Proje Yöneticisinin süre bitiminden en az **iki ay** önce başvuruda bulunması ve bu başvurunun BAPKOM'ca uygun görülmesine ve Rektörün onayına bağlıdır.

Proje Yöneticisinin Görev ve Sorumlulukları

4-Projenin,öneri formunda belirtilen program ve koşullar ile bu protokol hükümlerine uygun olarak yürütülmesinden ve sonuçlandırılmasından Proje Yöneticisi sorumludur.Proje Yöneticisi,proje ile ilgili olarak, "Ç.Ü.Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi"nin 11.maddesinde yer alan hususlara uymak zorundadır.

Proje Yöneticisi;ayrıca,proje çalışmalarında,kazaları önleme ve sağlık koşulları bakımından,iş kanunu ve diğer kanun,tüzük ve yönetmeliklere göre gerekli her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından sorumludur.

Ödemelerin Kesilmesi

5-Protokol uyarınca yapılacak ödemelerin,proje amaç ve programına uygun olarak kullanılmadığı;protokol hükümlerine uyulmadığı;gelişme raporlarından,istenilen ayrıntılı bilgilerden,yapılan incelemelerden veya başka şekillerde anlaşılan projelerin ödemeleri durdurulur ve verilmiş olan malzeme,demirbaş ve makine-teçhizat geri alınır.

Yetkili Merciler

6-Anlaşmazlık halinde yetkili merciler Adana Mahkemeleri ve İcra Daireleridir.

26.08.2002

Proje Yöneticisi
Yrd.Doç.Dr. Mehmet KÜRKÇÜ

Rektör Yardımcısı
Prof.Dr. Şinasi AKDEMİR



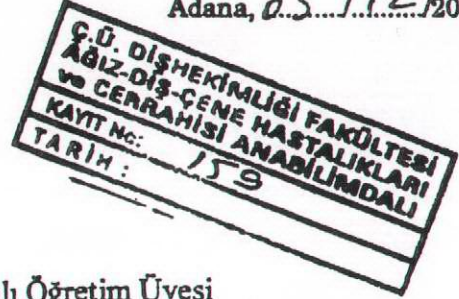

TAVAŞ Yem San. ve Tic. A.Ş.		ÜRÜN STANDARTLARI		
Ürün Grup Adı		: FARE YEMİ (Pellet)		
Ürün Kodu		4172211		
Ürün Adı		010 Fare Yemi Pellet		
Etilet Kodu		1443060		
Ambalaj Kodu		1441001		
TEKNİK SPEKLER	Birim	Min	Max	
Nem	%		13	
H. Protein(HP)	%	24		
H. Selüloz	%		8	
H. Kül	%		8	
Kalsiyum	%	1	2	
Fosfor	%	0.7		
Sodyum	%	0.15	0.4	
M. Enerji	kcal/kg	2600		
Vit A	IU/KG	300		
Vit D3	IU/KG	1000		
Mangan	MG	10		
Çinko	MG	4		
Elek Analizi	Pellet Yemler İçin:	Birim	Min	Max
	1 mm Elek Altı	%		90
	1 mm Elek Üstü	%	5	16
	2 mm Elek Üstü	%	1,5	5
	Tüm Tane	%		<0,5
Kontrol Şekli	: Mamül Test ve Kontrol Prosedürü doğrultusunda yapılır.			
Ambalajlama Şekli ve Bilgileri	: Ürünler polipropilen kuvalarda net 50kg olarak ambalajlanır. Ambalajda Firma adı ve Adresi yer al			
Etiler Bilgileri	: Teknik spekler, tesdi tarihi venosu, kullanım şekli, içarideni, üretim yeri ve adresi, muhafaza şekli			
Muhafaza Şekli	: Serin ve kuru yerde muhafaza edilir.			
Raf Ömrü	: Normal şartlarda 3 aydır.			
*** Nem + 1 tolerans sınırları içerisindedir. Diğer kriterler hammaddenin cinsine yetiştği ortam a bağılı olarak değışkenlik göstermesi, fakri gözönünde bulundurularak +/- %3 tolerans sınırları içerisindedir.				
DAĞITIM	REVİZYON SEBEBİ : Döküman tanımlaması ve format değıştirildi. Dönm kontrolü kaldırıldı. Tolerans sınırı +/- %3 olarak değıştirildi.			HAZIRLAYAN İSerhan SERİN Üretim Müdürü



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

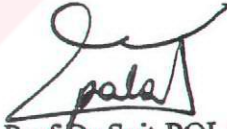
Sayı : B.30.2.ÇKO.O.AL.00.00/09-2378
Konu :

Adana, 03.11.2001



Sayın Yard.Doç.Dr.Mehmet KÜRKÇÜ
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Enstitü Yönetim Kurulunun 28.11.2001 tarih ve 28/2 ve 4 nolu kararları aşağıya çıkartılmıştır.
Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Sait POLAT
Müdür

Eki : 1 Adet Tez Önerisi

Karar No: 2- Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığının 23.11.2001 tarih ve 27.100.2001 tarih ve 69, 72 ve 73 sayılı yazıları görüşüldü;

Doktora öğrencileri Bilge Çadır, Ebru Deniz Karşı ve İ. Atilla Öz'ün, Tez İzleme Komitelerinin aşağıda belirtilen Öğretim üyelerinden oluşmasına oybirliği ile karar verildi.

Tez İzleme Komitesi

Yard.Doç.Dr.Mehmet Kürkçü

Doç.Dr.Hakan Uysal

Yard.Doç.Dr.Haluk Öztunç

Yedek

Yrd.Doç.Dr.Serdar Toroğlu

Yrd.Doç.Dr.M.Cenk Haytaç

Karar No: 4- Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığının 19.11.2001 tarih ve 66 sayılı yazısı görüşüldü;

Doktora öğrencisi Bilge Çadır'ın "K1 vitamini ve iskeletsel florozis" konulu tez önerisinin kabulüne ve "Tez Önerisi Savunması"nın 6.12.2001 tarihinde yapılarak sonucunun Enstitümüze iletilmesine oybirliği ile karar verildi.

- 4) Elde edilen biyolojik deney materyallerinin elde edilmesinden sonra hemen -70°C derin dondurucuya gereksinim, bakılacak materyalin ısıdan etkilenmemesi için şart. Bu nedenle -70°C derin dondurucuya gereksinim duyulacak.
- 5) Elde edilecek kandan serum ve plazma temini için ötenazi yapılacak ortamda bir santrifüj bulunması gerekmektedir.
- 6) Hayvanlara verilecek florun ve özellikle de K Vitamini içeren yemin buz dolabında bulundurulması gerekmektedir.
- Hafta sonları hayvanların bakımı Dr. Bilge Çadır tarafından yapılacaktır.

N. N. Sorumlu Araştırmacının Sertifikası:

Sorumlu Araştırmacı: İmza

Tarih

Dr. Bilge Çadır

05.11.01

O. O. Onay:

Araştırmacının projesi incelenmiş ve bilimsel esaslara uygun olduğu tespit edilmiştir.

Etik Kurul Başkanı İmza

Tarih

Prof. Dr. Ayşe Değen

16.11.2001

Tarih

16.11.2001

Etik Kurul Üyesi İmza

Tarih

16.11.2001

Etik Kurul Üyesi İmza

Tarih

16.11.2001

Etik Kurul Üyesi İmza

Tarih

Etik Kurul Üyesi İmza

Tarih

Etik Kurul Üyesi İmza

P. P. Final Onay

Projenin tümü TIBDAM Etik Kurulunun belirlediği esaslara göre uygulanmıştır.

Etik Kurul Başkanı İmza

Tarih

Prof. Dr. Ayşe Değen

16.9.2002

Not: Form bilgisayarda veya daktiloyla doldurulmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

12.02.1969'da Adıyaman'da doğan Bilge Çadır, ilköğrenimini Ankara'da Seyranbağları İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimini Ankara Kocatepe Mimar Kemal Lisesi'nde tamamladı. 1987- 1992 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi'nde lisans eğitimini tamamladı. 1993 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından Türkiye genelinde merkezi sistemle yapılan Yüksek Lisans Sınavını, diş hekimliği alanında kazanan dört kişiden biri olarak, Yükseköğrenim Kurulu tarafından Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi, Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi kadrosuna atanarak, yurtdışında yüksek lisans eğitimi yapmak üzere burs verildi. 1994 yılında The Cambridge Centre for Languages Sawston Hall'da ingilizce eğitimi gördükten sonra, 1995 yılında University of London'a bağlı The London Hospital Medical Collage Dental School'da Master of Philosophy (MPhil) yaptı. Aynı yıl, University Collage London'a bağlı The Eastman Dental Institute'de Philosophy of Doctor Degree (PhD) eğitimine başlayan Bilge Çadır, halen Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dişhekimliği Fakültesi'nde doktora eğitimine devam etmektedir. Kemik iyileşmesi üzerinde araştırmalar yapan Bilge Çadır'ın İngiltere, Fransa, Amerika Birleşik Devletleri ve Türkiye'de sunulmuş çeşitli bildiri ve posterleri mevcuttur. Halen Amerika Birleşik Devletleri ve İsveç'te sunulmak üzere gönderilen bildirileri ve Science Citation Index'te yer alan çeşitli dergilerde yayınlanmak üzere gönderilmiş makaleleri mevcuttur.