

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**



**RATLARDA KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ
DURUMUNDA DENTAL PULPADAKİ
KALSİFİKASYONUN MİKRO BİLGİSAYARLI
TOMOGRAFİ VE HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

Tarık TOPCU

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Neslihan ŞİMŞEK**

Uzmanlık Tezi – 2024

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**RATLARDA KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ DURUMUNDA DENTAL
PULPADAKİ KALSİFİKASYONUN MİKRO BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ
VE HİSTOPATOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Tarık TOPCU

**Endodonti Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Neslihan ŞİMŞEK**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi tarafından TDH-2023-3267 proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2024**

UZMANLIK TEZİ TUTANAĞI



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dental Pulpa.....	3
2.2. Kronik Böbrek Hastalığı.....	3
2.3. Tip I Kollajen.....	5
2.4. Osteopontin.....	6
2.5. Bone Sialoprotein	8
2.6. Dentin Matriks Protein 1.....	8
2.7. Adenin.....	9
2.8. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Görüntüleme Tekniği	9
3. MATERYAL METOT	11
3.1. Deney Hayvanları	11
3.2. Hayvanlarda Kronik Böbrek Yetmezliği Oluşturulması	11
3.3. Biyokimyasal Analizler	17
3.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Değerlendirmesi	17
3.6. Histolojik Analizler.....	21
3.6. İstatistiksel Analiz.....	22
4. BULGULAR.....	24
4.1. Biyokimyasal Analiz Bulguları	24
4.2. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Bulguları.....	27
4.3. Histolojik Analiz Bulguları.....	29
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR	60

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bütün akademik faaliyetlerimde ve eğitimim süresince yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen, bana her zaman arkamda olduğunu hissettiren danışmanım Prof. Dr. Neslihan ŞİMŞEK'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca klinik içinde ve dışında desteklerini ve yardımlarını asla esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Elçin TEKİN BULUT'a ve Dr. Öğr. Üyesi Levent AKINCI'ya;

Tezimin deney aşamasında bana yardımcı olan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Onural ÖZHAN'a;

Tezimin histolojik inceleme aşamasında bana yardımcı olan İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜL'e;

Uzmanlık eğitimimin her aşamasında büyük bir özveri ve içtenlikle bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma;

Yaşamımın her anında olduğu gibi uzmanlık eğitimim sırasında da sevgi ve desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili aileme;

TEŞEKKÜR EDERİM

Tarık TOPCU

ÖZET

Ratlarda Kronik Böbrek Yetmezliği Durumunda Dental Pulpadaki Kalsifikasyonun Mikro Bilgisayarlı Tomografi ve Histopatolojik Yöntemlerle İncelenmesi

Amaç: Bu çalışma ile kronik böbrek yetmezliğinin diş ve kemik dokularında kalsifikasyona etkisinin olup olmadığını ve sürece bağlı olarak bu etkinin ne ölçüde gerçekleştiğini mikro bilgisayarlı tomografi ve histolojik analizler yardımıyla değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda erkek yetişkin wistar albino ırkı 3 aylık erişkin ratlar kullanılmıştır. Proje için 3 sağlıklı kontrol grubu ve böbrek yetmezliğinin gelişiminden sonra geçen zamana göre 3 kronik böbrek yetmezliği grubu olmak üzere 6 grup oluşturulmuştur. Hayvanlarda böbrek yetmezliği oluşturabilmek için 80 mg/kg adenin, taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik karboksi metil selülozda çözünerek 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla per os uygulanmıştır. Bu süreçte kontrol gruplarına taşıt çözücü olarak kullanılan %1 karboksi metil selüloz verilmiştir. Hayvanlar bulundukları gruba göre böbrek yetmezliğinin üzerinden geçen 1. 20. ve 40. günlerde 1.2 g/kg intraperitoneal etil karbamat türevi üretan anestezisi yardımıyla sakrifiye edilmişlerdir. Hayvanların alt çenelerinden molar dişleri içerecek şekilde kemik blokları edilmiştir. Elde edilen bloklar mikro bilgisayarlı tomografi yardımıyla dentin ve kemik yoğunluğu açısından incelenmiştir. Daha sonra histolojik inceleme için kemik bloklar kimyasal dekalsifikasyon işlemine alınmıştır. Dekalsifiye dokulardan hazırlanan histolojik kesitlerde diş pulpa alanları mikroskop ve görüntü analiz sistemi ile ölçülmüştür. Ayrıca pulpa alanlarındaki histolojik yapı ve histokimyasal değişiklikler değerlendirilmiştir.

Bulgular: Kemik ve dentin yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Histolojik incelemelerde deney gruplarında kontrol gruplarına göre pulpa çapı diş çapına göre daha düşük bulunmuştur. Osteopontin, bone sialoprotein, dentin matriks protein ve tip 1 kollajen ölçümlerinde ise tüm deney gruplarında kontrol gruplarına göre daha yüksek değerler elde edilmiştir.

Sonuçlar: Kronik böbrek yetmezliği dentin ve kemik yoğunluğuna planlanan deney süresince etki etmezken, pulpa çapında daralmaya neden olabilir. Ayrıca sert doku yapım süreci ile ilişkili proteinler kronik böbrek yetmezliğinde artma eğilimindedir.

Anahtar Kelimeler: Kronik Böbrek Yetmezliği, Kalsifikasyon, Pulpa, Dentin, İmmünohistokimya



ABSTRACT

Investigation of Calcification in Dental Pulp after Development of Chronic Renal Failure in Rats by Micro-Computed Tomography and Histopathological Methods

Aim: This study aims to evaluate whether chronic renal failure has an effect on calcification in tooth and bone tissues and to what extent this effect occurs depending on the process, using microcomputed tomography and histological analysis.

Material and Method: In our study, 3-month-old adult male Wistar albino rats were used. For the project, 6 groups were formed, 3 healthy control groups and 3 chronic renal failure groups according to the time elapsed after the development of renal failure. In order to create renal failure in animals, 80 mg/kg adenine was dissolved in 1% carboxy methyl cellulose used as a vehicle solvent and administered per os via orogastric gavage once a day for 28 days. During this process, 1% carboxy methyl cellulose used as a vehicle solvent was given to control groups. Animals were sacrificed with the help of 1.2 g/kg intraperitoneal ethyl carbamate derivative urethane anesthesia on the 1st, 20th and 40th days after renal failure, depending on their group. Bone blocks were prepared from the lower jaws of the animals to include the molar teeth. The blocks obtained were examined in terms of dentin and bone density with the help of microcomputed tomography. Then, the bone blocks were subjected to chemical decalcification for histological examination. The dental pulp areas were measured in histological sections prepared from decalcified tissues using a microscope and image analysis system. In addition, the histological structure and histochemical changes in the pulp areas were evaluated.

Results: No significant difference was found between the groups in terms of bone and dentin density. In histological examinations, pulp diameter was found to be lower in the experimental groups compared to the control groups compared to the tooth diameter. In osteopontin, bone sialoprotein, dentin matrix protein and type 1 collagen measurements, higher values were obtained in all experimental groups compared to the control groups.

Conclusion: While chronic renal failure does not affect dentin and bone density during the planned experiment period, it may cause pulp diameter narrowing. In addition,

proteins associated with the hard tissue formation process tend to increase in chronic renal failure.

Keywords: Chronic Renal Failure, Calcification, Pulp, Dentin, Immunohistochemistry



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
Al	: Alüminyum
BSP	: Bone Sialoprotein
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
BUN	: Kan Üre Azotu
Cu	: Bakır
Da	: Dalton
dk	: Dakika
DMP-1	: Dentin Matriks Protein-1
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DSPP	: Dentin Sialofosfoprotein
ECM	: Hücre Dışı Matriks
FGF23	: Fibroblast Büyüme Faktörü 23
g	: Gram
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
HA	: Hidroksiapatit
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
kg	: Kilogram
kv	: Kilovolt
MEPE	: Matris Hücre Dışı Fosfoglikoprotein
OPN	: Osteopontin
RNA	: Ribonükleik Asit
SIBLING	: Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein
TNFα	: Tümör Nekroz Faktör
μm	: Mikron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 3.1. Adenin(Merck KGaA, Almanya)	13
Şekil 3.2. Karboksi metil selüloz (Sigma-Aldrich, ABD)	13
Şekil 3.3. Kontrol grubuna orogastrik gavaj yoluyla karboksi metil selüloz verilmesi .	14
Şekil 3.4. İntraperitoneal anestezi uygulaması	15
Şekil 3.5. Anestezi altında intrakardiyak kan alınması	15
Şekil 3.6. Böbrek numunelerinin hassas terazi yardımıyla ağırlıklarının belirlenmesi..	16
Şekil 3.7. Alt çenelerden elde edilen molar dişleri içeren kemik bloklar.....	16
Şekil 3.8. Örneklerin DataViewer programı yardımıyla hizalanması	18
Şekil 3.9. Örneklerde incelenecek alanın ROI içine alınması	19
Şekil 3.10. Sagital kesitlerde pulpanın son görüldüğü kesit.....	19
Şekil 3.11. Yoğunluk incelemesi için dentin kısmının seçilmesi	20
Şekil 3.12. Trabeküler kemikte inceleme için ROI içine alınan alan	20
Şekil 4.1. Kontrol 1(solda) ve KBY 1(sağda) grubu deneklerinin böbreklerinin makroskopik görüntüsü.....	29
Şekil 4.2. Kontrol 1 grubunda normal histolojik görünümde böbrek parankimi (yıldız) ve glomerül (G). H&E, X10.....	30
Şekil 4.3. Kontrol 2 grubunda normal histolojik görünümde böbrek parankimi (yıldız) ve glomerül (G). H&E, X10.....	30
Şekil 4.4. Kontrol 3 grubunda normal histolojik görünümde böbrek parankimi (yıldız) ve glomerül (G). H&E, X10.....	31
Şekil 4.5. KBY 1 grubunda böbrek parankiminde yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), glomerüler sklerozis (ok), renal tubül lümeninde eritrositler (ok başı). H&E, X10	31
Şekil 4.6. KBY 2 grubunda böbrek parankiminde yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), glomerüler sklerozis (ok), renal tubül lümeninde eritrositler (ok başı). H&E, X10	32
Şekil 4.7. KBY 3 grubunda böbrek parankiminde yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), glomerüler sklerozis (ok), renal tubül lümeninde eritrositler (ok başı). H&E, X10	32

Şekil 4.8. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20	33
Şekil 4.9. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20.....	34
Şekil 4.10. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20.....	34
Şekil 4.11. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20.....	34
Şekil 4.12. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20.....	35
Şekil 4.13. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20	35
Şekil 4.14. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20.....	35
Şekil 4.15. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20.....	36
Şekil 4.16. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20.....	36
Şekil 4.17. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20.....	36
Şekil 4.18. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20	37
Şekil 4.19. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20.....	37

Şekil 4.20. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20.....	37
Şekil 4.21. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20.....	38
Şekil 4.22. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20.....	38
Şekil 4.23. KBY 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20	38
Şekil 4.24. KBY 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20.....	39
Şekil 4.25. KBY 2 grubunda diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20.....	39
Şekil 4.26. KBY 2 grubunda diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20.....	39
Şekil 4.27. KBY 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20.....	40
Şekil 4.28. Kontrol 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20	40
Şekil 4.29. Kontrol 3 grubunun: Diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20.....	40
Şekil 4.30. Kontrol 3 grubunda diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20.....	41
Şekil 4.31. Kontrol 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20.....	41

Şekil 4.32. Kontrol 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20.....	41
Şekil 4.33. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20.....	42
Şekil 4.34. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20.....	42
Şekil 4.35. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20.....	42
Şekil 4.36. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20.....	43
Şekil 4.37. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20.....	43

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Glomerüler filtrasyon hızına göre kronik böbrek hastalığının sınıflandırması	4
Tablo 2.2. Albüminüri derecesine göre kronik böbrek hastalığının sınıflandırılması	5
Tablo 3.1. Mikro bilgisayarlı tomografi cihazının tarama parametreleri	17
Tablo 4.1. Kontrol ve KBY grupları arasında biyokimyasal test sonuçlarının karşılaştırılması	25
Tablo 4.2. KBY gruplarının biyokimyasal testlerinin kendi aralarında karşılaştırılması	26
Tablo 4.3. Kontrol ve KBY gruplarının dentin ve kemik yoğunluklarının karşılaştırılması	28
Tablo 4.4. KBY gruplarının kemik ve dentin yoğunluklarının kendi aralarında karşılaştırılması	29
Tablo 4.5. Osteopontinin dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması	44
Tablo 4.6. Bone sialoprotein dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması	46
Tablo 4.7. Tip 1 kollajenin dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması	48
Tablo 4.8. Dentin matriks protein-1 dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması ..	50
Tablo 4.9. Pulpa çapı ve diş çapı ölçümlerinin gruplar arasında karşılaştırılması	52
Tablo 4.10. KBY grupları arasında histolojik ölçümlerinin karşılaştırılması	53

1. GİRİŞ

Endodontik tedavinin amacı, kök kanal sistemini temizleyerek, şekillendirerek ve doldurarak apikal periodontitisi önlemek veya ortadan kaldırmaktır. Mekanik enstürmantasyon, kök kanallarının temizlenmesi için en önemli uygulamalardan biridir. Endodontik tedavi yapılırken kök kanallarında organik doku ve mikroorganizma miktarının en aza indirilmesi hedeflenmektedir. Bu da ancak kanalın bütün bölgelerine ulaşılabilmesiyle mümkün olabilmektedir.

Endodontik tedavi sırasında bunu zorlaştıran bazı faktörler olabilir. Bunlardan biri pulpada kalsifikasyonların varlığıdır. Kalsifik birikimlerin kanallara erişimi engellediği dişlerde, kök kanalı tedavisi çabaları sekteye uğrayabilir. Pulpa taşı olan veya kök kanal obliterasyonu gösteren dişler endodontik açıdan hem teşhis hem de tedavi bakımından daha fazla zorluk barındırır [1]. Kök kanalının yerini belirleme çabası fazla miktarda dentin kaldırılmasına, dişin yapısal olarak çok fazla zayıflatılmasına ve hatta kök perforasyonlarına neden olabilir [2, 3].

Pulpa taşı oluşumunun kesin nedeni bilinmemekle birlikte gelişiminde rol oynayan bazı faktörler arasında pulpa kalsifikasyonu, yaşlanma, ortodontik diş hareketi, periodontal hastalık, çeşitli sistemik hastalıklar, genetik yatkınlık, bakteriyel enfeksiyon, derin çürükler ve restorasyonlar yer alır [4]. Pulpa taşlarının ve pulpa odası kalsifikasyonlarının oluşumunun bazı sistemik hastalıklardan etkilenebileceği çeşitli çalışmalarda ortaya konmuştur. Pulpa kalsifikasyonunun patofizyolojik olarak arterlerdeki kalsifiye aterom ile benzer olabileceği düşünülmüş ve bazı çalışmalarda pulpa kalsifikasyonu ile kardiyovasküler hastalıklar arasında pozitif korelasyon bulunmuştur [5-7]. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise tip 2 diyabeti olan ratlarda intrapulpal kalsifikasyonun arttığı gözlenmiş ve bu hayvanların diş pulpalarında ileri glikasyon son ürünlerinden pentosidin ve bu ürünlere yönelik reseptörlerin arttığı tespit edilmiştir [8].

Pulpa kalsifikasyonunu tetiklediği düşünülen bir başka sistemik hastalık da kronik böbrek yetmezliğidir. Kronik böbrek yetmezliği (KBY), glomerüler filtrasyon hızının azalması veya proteinüri ile tanımlanır [9]. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kalsiyum, fosfor gibi minerallerin metabolizmasındaki bozukluklara bağlı olarak çeşitli organlarda patolojik kalsifikasyonlar meydana gelmektedir [10-12].

Literatürde kronik böbrek yetmezliği ve pulpal kalsifikasyon arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok retrospektif çalışma mevcuttur [13-17]. Ancak yapılan kapsamlı literatür taraması sonucunda kronik böbrek yetmezliği ile pulpal kalsifikasyon arasındaki ilişkiyi araştıran prospektif bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada amacımız ratlarda kronik böbrek yetmezliği ve pulpal kalsifikasyon arasındaki ilişkiyi göstermek ve daha ileri çalışmalar için bir model oluşturmaktır.

Yapılan literatür incelemelerine dayanarak, planladığımız çalışmanın doğrultusunda kronik böbrek yetmezliğinin pulpa kalsifikasyonunu artıracak hipotezi kurulmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dental Pulpa

Dental pulpa kendisini mikrobiyal açıdan zengin olan ağız ortamından koruyan dentin, mine ve sement ile çevrili çeşitli hücreler, ana yapı ve fibriller içeren bir bağ dokusudur [18]. Pulpa embriyonik olarak ektomezenşimdeki nöral krest hücrelerinden köken alır. Bu hücrelerin çoğalması ve yoğunlaşması sonucu ileride dental pulpaya dönüşecek olan dental papilla meydana gelir.

Olgun pulpa histolojik olarak kabaca dört bölgeye ayrılabilir. Bunlardan birincisi ve en merkezde bulunanı santral pulpadır. Bu bölgede gevşek bağ dokusu ve büyük damar ve sinirler bulunur. Santral pulpanın etrafında ise ikinci tabaka olan hücreden zengin tabaka bulunur. Bu bölgede fibroblastlar ve diferansiye olmamış mezenşim hücreleri vardır. Bu hücreler sayesinde harabiyete uğramış odontoblastların yerine yenileri yapılır. Bu tabakanın dışında ise üçüncü tabaka olarak hücreden fakir tabaka veya subodontoblastik tabaka bulunur. Bu bölgenin varlığı dentin oluşumuna bağlı olarak zamanla azalabilir ve kaybolabilir. Pulpanın dördüncü ve en dış tabakası ise odontoblastik tabakadır. Bu tabakada bulunan odontoblast hücreleri pulpanın yüksek derecede diferansiye hücreleridir ve ana fonksiyonları dentin yapımıdır. Odontoblastlar dentin matriksini salgılar ve pulpa merkezine doğru çekilirler. Odontoblastlar, dentin oluşumundaki rollerinin yanı sıra duyuşal iletimde de rol oynayabilir [18]. Odontoblastlar arasında sıkı bağlantılar, desmozomlar ve boşluklu bağlantılar birbirleriyle olan iletişimi sağlar. Odontoblastlar ile sinir lifleri arasında da boşluklu bağlantı bulunur ve bu bağlantı düşük elektrik direncine sahip bir yol oluşturur [19].

Pulpada bulunan başlıca hücreler fibroblastlar, odontoblastlar, rezerv hücreler, histiyositler, lenfositler, plazma hücreleri, perisitler ve dendritik hücrelerdir. Fibroblastlar pulpada en fazla bulunan hücrelerdir ve temel işlevi kollajen ve pulpa matriksinin oluşturulmasıdır. Fibroblastlar mikroskop altında fusiform veya yıldızsı şekilde gözlemlenebilirler. Rezerv hücreler, diferansiye olmamış mezenşimal hücrelerdir ve pulpanın ihtiyacı doğrultusunda çeşitli hücre tiplerine diferansiye olma özellikleri vardır.

2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği böbrek fonksiyonlarının ilerleyici ve geri dönüşümsüz şekilde kaybı ile kendini gösteren klinik durumdur. Kronik böbrek yetmezliği dünya

apında giderek artan bir halk sağlığı sorunudur ve prevalansının dünya çapında %8-16 olduğu tahmin edilmektedir [20]. 2010 Küresel hastalık yükü çalışmasına göre kronik böbrek yetmezliği, 1990 yılında küresel ölümlerin nedenleri listesinde 27. sırada yer alırken, 2010'da 18. sıraya yükselmiştir. 2010 yılındaki liste 1990 yılındaki ile kıyasladığında listede en fazla yükselen ikinci hastalık, HIV ve AIDS in ardından kronik böbrek yetmezliğidir [20]. Kronik böbrek yetmezliğinin tanımı ve sınıflandırması zaman içinde gelişmiştir. Ancak mevcut uluslararası kılavuzlar kronik böbrek yetmezliğini, altta yatan nedene bakılmaksızın en az 3 ay süreli, 1.73 m²'de 60 ml/dk'dan daha az glomerüler filtrasyon hızı (GFR) ile böbrek fonksiyonunda azalma veya böbrek hasarı belirteçleri veya her ikisi olarak tanımlamaktadır [21].

Kronik böbrek yetmezliğinin ana nedenleri arasında diyabet, hipertansiyon, kronik glomerülonefrit, kronik piyelonefrit, obstrüktif üropati, hipoplastik veya displastik böbrekler, antiinflamatuvar ilaçların kronik kullanımı, otoimmün hastalıklar, polikistik böbrek hastalığı, Alport hastalığı, konjenital malformasyonlar ve uzun süreli akut böbrek hastalığı yer alır [22]. Progresif hiperperfüzyon ve hiperfiltrasyon, artan glomerüler hasara ve daha fazla böbrek hasarına neden olur [23].

KBY, aşağıdaki tablolarda gösterildiği gibi, GFR değerine göre beş dereceye ve albüminüri şiddetine göre üç dereceye kategorize edilir [24]:

Tablo 2.1. Glomerüler filtrasyon hızına göre kronik böbrek hastalığının sınıflandırması

Derece	GFR değeri ml/ min/1.73m ²	Sınıflandırma
I	>90	Normal veya yüksek
II	60-89	Hafif yetmezlik
IIIA	45-59	Hafif ila orta derece yetmezlik
IIIB	30-44	Orta ila şiddetli derece yetmezlik
IV	15-29	Ciddi derecede yetmezlik
V	<15	Böbrek yetmezliği

Tablo 2.2. Albüminüri derecesine göre kronik böbrek hastalığının sınıflandırılması

Kategori	24 saatlik albüminüri mg/24 saat	Albümin/kreatinin oranı Mg/g	Sınıflandırma
A1	<30	<30	Normalden sapsmış
A2	30-300	30-300	Orta
A3	>300	>300	Şiddetli

Kronik böbrek yetmezliği, spesifik bir semptomu olmadığından çoğu zaman fark edilmez ve tanı konulamaz veya ileri evrede tanı konulur [25]. Kronik böbrek yetmezliğinin yönetimi böbrek hasarının ilerlemesini geciktirmeyi ve böbrek fonksiyon bozukluğuna bağlı komplikasyonların tedavisini amaçlamaktadır. İlerlemeyi geciktirmek için önerilen önlemler arasında protein kısıtlaması, hipertansiyonun sıkı kontrolü, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin kullanımı ve hiperlipidemisinin kontrolü yer alır. Çocuklarda şiddetli kronik böbrek yetmezliği genellikle gelişme geriliği, büyüme geriliği, asidoz, anemi ve renal osteodistrofiye neden olur. Rekombinant eritropoietin, kalsitriol ve insan büyüme hormonunun mevcudiyeti bu hastaların yönetimini önemli ölçüde iyileştirmiştir.

Kronik böbrek yetmezliğinde (KBY) kalsiyum, fosfor ve magnezyum gibi minerallerin ve D vitamininin homeostazisi değişir. Bu değişiklikler kronik böbrek yetmezliği sırasında erken dönemde gelişir ve sonunda çoğu hastayı hastalıklarının seyri sırasında etkiler [26]. Artan paratiroid hormonu (PTH) sekresyonu, kemikten kana kalsiyum akışını, renal kalsiyum yeniden emilimini ve fosfat atılımını artırarak serum kalsiyumunu normal tutar. Benzer şekilde, KBY'de renal fosfat atılımı, fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23) ve PTH'nin artan salgılanmasıyla sağlanır. Kısmen 1,25 dihidroksivitamin D düzeylerinin azalmasına bağlı olarak da KBY'de bağırsaktan fosfat emilimi azalır. Kalsiyum ve fosforun aksine, magnezyum bir hormon tarafından düzenlenmez, ancak KBY ilerledikçe magnezyum atılımı artar [27]. Hücre kültüründen ve hayvan modellerinden elde edilen veriler, mineral metabolizma bozukluklarının vasküler kalsifikasyon, arteriyel sertlik ve ventriküler hipertrofinin gelişiminde nedensel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir [28-30].

2.3. Tip I Kollajen

Kollajen, insan ve diğer memelilerin hücre dışı matrisinde oldukça bol bulunan bir proteindir ve vücudun yapısal bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynar.

Literatürde tanımlanmış 28 tip kollajen vardır. Bununla birlikte, insan kollajeninin %90'ından fazlasını temsil eden kollajen sınıfı tip I, II, III, V ve XI'i içeren fibriller oluşturabilen kollajenlerdir [31]. Tip I kollajen en yaygın kollajen türüdür ve çeşitli dokuların yapısal bütünlüğü için gereklidir. Tip I kollajen mineralizasyonun yapısal çerçevesini sağlamaktan sorumlu olan ve kemiğin organik matriksini oluşturan birincil proteindir. Kemik dokuları, %90 tip I ve az miktarda tip V kollajenden oluşan iskelet tarafından sabitlenmiş hidroksiapatit kristallerine sahiptir [31]. Ayrıca osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler dâhil olmak üzere kemik hücresi aktivitesinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar [32]. Tip I kollajen üzerine yapılan çalışmalar, bu proteini kodlayan genlerdeki mutasyonların kırılğan kemiklerle karakterize olan osteogenezis imperfekta da dâhil olmak üzere çeşitli kemik hastalıklarına neden olabileceğini göstermiştir [33]. Kemikte olduğu gibi dentin ve sement de hidroksiapatit ile mineralize olmuş ağırlıklı olarak tip I kollajen bir yapıdır. Bu mineralize yapı, pulpa bölgesinin yakınında iğne benzeriyken mineye yakın bölgelerde plaka şeklindedir [34].

G-X-Y üçlü sarmal yapısından dolayı Tip I kollajen genellikle üçlü sarmal yapı olarak tanımlanır. Burada glisin (G) temel bileşen olmak üzere X ve Y bileşenleri değişkendir ve genellikle prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerinden oluşur [35]. Bu üç kısmın sonsuz tekrarı ve glisin aminoasidinin sabit konumu sayesinde sarmal şekil gelişmektedir [36]. Kollajen türleri, prolin ve lizin kalıntılarının translasyon sonrası enzimler tarafından hidroksillenme derecesine göre farklılık gösterir [37]. Kimyasal formülüne göre Tip I kollajenin kütlesi 300.000 Da veya 300.000 g/mol'dür.

Kollajen sentezi çok adımlı bir süreçtir. Tip I kollajen hem hücrelerin içinde hem de dışında sentezlenir. Çekirdekdeki transkripsiyondan sonra, pre-prokollajen zincirleri adı verilen tek polipeptit zincirleri, membrana bağlı ribozomlarda dönüştürülür. Zincirin üç ana alanı vardır: α -zinciri, amino-terminal peptidi ve karboksi-terminal peptidi. Çekirdeğin dışında granüllü endoplazmik retikulumda (GER), üç pro- α zinciri birbirine bağlanır ve üçlü sarmal yapıya sahip bir prokollajen molekülüne haline gelir.

2.4. Osteopontin

Kemik ve dentinin hücre dışı matrisi (ECM) birkaç kollajen olmayan protein içerir. Kollajen olmayan proteinlerden oluşan bir protein kategorisi olan SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein) ailesi osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP), dentin matriks proteini 1 (DMP-1), dentin sialofosfoprotein (DSPP) ve matris hücre dışı fosfoglikoprotein (MEPE) olmak üzere beş proteinden oluşur. Bu

polianyonik SIBLING proteinlerinin kemik ve dentinin mineralizasyonunda önemli biyolojik roller oynadığına inanılmaktadır [38].

Osteopontin (OPN), asidik özelliklere sahip ve aspartik asit açısından zengin, yüksek oranda fosforile edilmiş bir glikofosfoproteindir. Franzén ve arkadaşları [39] tarafından kemik dokusunda tanımlanan ilk hücre dışı matris proteini olan OPN, moleküler ağırlığı 44 ila 75 kDa arasında değişen yaklaşık 314 amino asitten oluşan yüksek oranda fosforile edilmiş bir glikoproteindir. Çok fonksiyonlu bir protein olan OPN, kalp-damar hastalıkları, kanser, diyabet ve böbrek taşı hastalıkları ile inflamasyon, biyomineralizasyon, hücre canlılığı ve yara iyileşmesi sürecinde önemli işlevlere sahiptir [40]. Osteopontin tükürük, süt, safra, dişin dentin tabakası, böbrek, beyin, kemik iliği, endotel hücresi, düz kas hücreleri, iskelet kası hücresi, meme bezi hücreleri, koryon villusu, desidua tabakası, rahim, iç kulaktaki ganglionlar, tükürük ve ter bezleri, safra ve pankreas yolları gibi çok sayıda dokuda bulunur [41, 42]. Kemik dokusunda bulunan OPN, kemik yapılanmasında görev alan osteoblast ve osteoklastlardan salgınır. Bununla birlikte, osteoklastlardan eksprese edilen OPN'nin hidroksiapatiti inhibe ettiği bilinmektedir, bu da OPN'nin kemik yıkımı ile ilişkili olduğunu göstermektedir [41, 43]. Geçmişte yapılmış birçok çalışmada osteopontinin inflamasyon durumunda makrofajları ve T hücrelerini arttırdığı gösterilmiştir [41, 44]. Ayrıca osteopontinin ektopik kalsifikasyonu ve aşırı mineralizasyonu baskıladığı, yara iyileşmesinde ve böbrek taşı oluşumunun önlenmesinde aktif rol oynadığını öne süren çalışmalar da vardır [45-47]. Kemik ve dişlerde aşırı mineralizasyonu engellemesi sebebiyle osteopontinin bu dokularda kırık meydana gelme riskini azalttığı da söylenebilir [40].

Osteopontin salgınının modülasyon mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, farklı hücre tiplerinde salgınım düzeylerinin farklı olduğu bildirilmektedir [48]. Yapılan bazı çalışmalar, D vitamini, interferon uyarıcı elementler, glukokortikoidler ve pürinden zengin hizalanmanın OPN salgınımını uyarabileceğini bildirmektedir. Ayrıca makrofajlar, tümör nekroz faktörü- α (TNF α) ve interlökin-1 β (IL-1 β), OPN genlerinin transkripsiyonunu ve salgınmasını uyarır [41, 48]. Hücresel düzeyde yapılan bir başka çalışmada ise tümör hücrelerinde OPN salgınının arttığı tespit edilmiştir [49].

Daha önce de belirtildiği gibi OPN, kemikler ve dişler dâhil olmak üzere mineralize dokularda salgınır ve osteoklastik ile osteoblastik hücreler tarafından yüksek seviyelerde üretilir [50, 51]. Osteopontin sentezinin uyarılması kemik yıkımının tetikleyicisi olarak bilinen kalsitriyol tarafından gerçekleştirilirken, salgınan osteopontin

osteoklastların kemik yüzeyine bağlanmasına yardımcı olur [52]. Belirtilen bu etkilerden dolayı, osteopontinin biyomineralizasyon aşamasında kemik hücrelerinin yapışmasının modülasyonu, osteoklastik fonksiyonun modülasyonu ve matris mineralizasyonunun modülasyonu dâhil olmak üzere 3 ana işlevi olduğu söylenebilir.

2.5. Bone Sialoprotein

Bone sialoprotein (BSP) bir diğer SIBLINGS ailesi kollajen olmayan proteindir ve ilk olarak 1972 yılında sığır kortikal kemiğinden elde edilmiştir [38]. Bone sialoprotein (BSP), mineralize dokularda yüksek seviyelerde eksprese edilen, tip I kollajeni bağlayabilen ve hidroksiapatit çekirdeği oluşturabilen asidik bir fosfoproteindir [53]. BSP'de yüksek düzeyde bulunan poli-glutamat dizileri hidroksiapatit (HA) çekirdeklenme aktivitesi için kritik öneme sahiptir [54]. Osteopontinden farklı olarak, BSP'nin doku dağılımı sınırlıdır ve neredeyse yalnızca kemik, dentin, mineralize kıkırdak ve sement gibi mineralize dokularda bulunur [55]. BSP'nin ayrıca hücre yüzeyi integrinleri ile etkileşime girerek osteoklastların aktivitesine de katkıda bulunabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [56, 57].

2.6. Dentin Matriks Protein 1

Dentin matriks protein 1 (DMP-1), hücre bağlanmasını ve farklılaşmasını düzenleyen, SIBLINGS protein kategorisinin önde gelen bir üyesi olan çok işlevli bir proteindir [58-60]. DMP-1 ilk olarak sıçan dentininden izole edilmiş ve sadece dentin için spesifik olduğu düşünülmüştür [61]. Daha sonra yapılan çeşitli araştırmalar kemikte DMP-1 ekspresyonunun dentinde olduğundan çok daha yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir [62-64]. Bunun dışında mineralize olmayan beyin, tükürük bezleri ve epitel kökenli bazı tümörlerde de DMP-1 varlığına rastlanmıştır [65-67]. DMP-1 dişlerde ağırlıklı olarak pulpa hücrelei, odontoblastlar, peritübüler dentin ve sementositlerde bulunur [68]. İskelette ise DMP-1, embriyonik gelişim sırasında birincil hipertrofik kondrositlerde ve osteoblastlarda yüksek düzeyde eksprese edilirken doğum sonrası osteositlerde yoğun olarak bulunur [69, 70].

George ve ark. [61] DMP-1'i cDNA klonlama yoluyla tanımlamış ve bunun mezenkimal hücrelerin odontoblastlara farklılaşmasını indüklediğini ve mineralizasyonu desteklediğini göstermiştir. DMP-1'in bu fonksiyonunun, hem çekirdeği hedef alan bir transkripsiyon faktörü olması hem de mineralizasyonu başlatan hücre dışı matriks

proteini olması olmak üzere iki yönlü işleve sahip olduğu geçmişte yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür [71, 72].

2.7. Adenin

Adenin DNA ve RNA'da bulunan dört ana azotlu bazdan birisidir. Kronik böbrek yetmezliği modeli gelişimi için cerrahi olmayan bir seçenek olarak adenin diyeti geçmişte sıçanlar üzerinde denenerek geliştirilmiştir [73-76]. Adenine bağlı böbrek patolojisi, böbrek tübülleri içinde kristalleşen ve böbrek parankiminde yaralanma, iltihaplanma, tübüler atrofi ve fibrozise neden olan bir adenin metaboliti olan 2,8-dihidroksiadenin oluşumundan kaynaklanır [77]. Küçük boyutlu kristaller idrar ile atılabilirken, büyük boyutlu kristallerin gelişen böbrek hasarının sorumlusu olduğu gösterilmiştir [77]. Geçmişte yapılan çalışmalarda uygulanan adenin dozu ile gelişen nefropatinin şiddetinin doğru orantılı olduğu görülmüştür [78, 79].

2.8. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Görüntüleme Tekniği

Roentgen'in 1895'te X-ışınlarını icat etmesinden bu yana, tıbbi teşhis alanında bir devrime yol açtı ve vücudun iç işleyişini invaziv olmayan bir şekilde görüntülemeyi mümkün hale getirdi [80]. Bilgisayar destekli tomografi (BT) görüntüleme sistemleri ilk olarak 1970'lerin başında kullanılmaya başlanmıştır ve çok sayıda düzlemden toplanan görüntüler, farklı dokuların üç boyutlu görüntülerini oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır [81].

Geleneksel bilgisayarlı tomografinin düşük çözünürlüğü, dişler veya kök kanalları gibi küçük nesnelerin yeterli şekilde görüntülenmesi için yetersizdir. Yüksek çözünürlüklü mikro bilgisayarlı tomografi (mikro-BT), diş hekimliğinin farklı alanlarında birçok uygulamaya sahip nispeten yeni ortaya çıkan bir teknolojidir [82]. Klinik BT tarayıcıları yaygın olarak 1 mm³ hacimli voksellerden oluşan görüntüler üretirken, 1980'lerin başında geliştirilen X-ışınlı mikrobilgisayarlı tomografi (Mikro-BT) sistemleri çok daha yüksek çözünürlüğe sahiptir ve 5-50 µm aralığında veya BT voksellerinden yaklaşık 1.000.000 kat daha küçük hacimli vokseller üretir [83]. Mikro bilgisayarlı tomografide tarayıcının obje etrafında hareketi ile çok sayıda görüntü oluşturulabilir. Bu görüntüler 'X ray charge coupled device' kamera ve bunun bilgisayara aktarılması ile elde edilir. Programlar yardımıyla çok sayıda kesit elde edilir ve birleştirilir. Böylece üç boyutlu görüntü oluşturulur. Mikro bilgisayarlı tomografi ve bilgisayarlı X ışınlı tomografide temel prensipler aynıdır [84]. Mikro bilgisayarlı tomografi görüntüleme

süreci tahribatsız gerçekleştiğinden, aynı numunenin iç özellikleri birçok kez incelenebilir ve numuneler ek biyolojik ve mekanik testler için tarandıktan sonra kullanılabilir [83].

Bu çalışmada amaç kronik böbrek yetmezliğinin dental dokularda kalsifikasyona etkisinin olup olmadığının, eğer etkili ise bu etkinin ne kadar sürede ve hangi muhtemel mekanizmalarla gerçekleştiğinin incelenmesidir. Çalışmamız bu konu ile ilgili gelecekte yapılması muhtemel daha ileri çalışmalar için prospektif bir hayvan deneyi modeli oluşturacaktır. Araştırmamızda *wistar albino* ırkı ratlar kullanılarak, kemik ve sert dokulardaki mineralizasyon miktarı mikro-BT yardımıyla incelenecektir. Mineralizasyonun yanı sıra sert doku metabolizmasıyla ilişkileri yukarıda anlatılan osteopontin, bone sialoprotein, dentin matriks protein 1 ve tip 1 kollajen gibi proteinlerin kemik ve diş dokularındaki seviyeleri ölçülecektir. Planladığımız çalışma doğrultusunda “Kronik böbrek yetmezliği geçen zamana bağlı olarak dental dokulardada kalsifikasyon artırır” hipotezi kurulmuştur.

3. MATERYAL METOT

Bu tez çalışması; İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezi ve İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na ait laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24/03/2023 tarih ve 2022/4-2 protokol numaralı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda *Wistar albino* ırkı 3 aylık erişkin erkek ratlar kullanılmıştır. Proje için 3 sağlıklı kontrol grubu ve böbrek yetmezliğinin gelişiminden sonra geçen zamana göre 3 kronik böbrek yetmezliği grubu olmak üzere 6 grup planlanmıştır. Yapılan power analizinde böbrek yetmezliği olan grubun kontrol grubu ile %95 güven düzeyinde ($\alpha=0,05$) ve %80 güç ($\beta=0,20$) ile karşılaştırılabilmesi için etki büyüklüğü 1,96 olarak öngörüldüğünde grup başına alınması gereken minimum örneklem genişliği 6 olarak hesaplanmıştır. Mortalite oranının yüksek olması ihtimaline karşı kontrol gruplarındaki hayvan sayısı 6, kronik böbrek yetmezliği oluşturulan gruplarda ise sürenin uzunluğu ile orantılı olarak sırasıyla 9, 10 ve 11 olarak planlanmıştır. Hayvanlar sabit bir 12 saat aydınlık: 12 saat karanlık döngüsü ile 23 °C sıcaklık kontrollü bir odada tutulup standart pellet laboratuvar yemi ve su ile *ad libitum* olarak beslenmiştir. Deney grupları oluşturulurken sıçanlar gruplara basit randomize olarak dağıtılmıştır. Deneyin başı ve sonunda sıçanların vücut ağırlıkları ölçülmüştür.

3.2. Hayvanlarda Kronik Böbrek Yetmezliği Oluşturulması

Hayvanlarda böbrek yetmezliği oluşturabilmek için 80 mg/kg adenin (CAS numarası: 73-24-5; Thermo Fisher Scientific MA, ABD; Şekil 3.1), taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik karboksi metil selüloz (CMC)'de (Şekil 3.2) çözünerek 28 gün boyunca, her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla *per os* (p.o.) uygulanmıştır. Bu süreçte kontrol gruplarına taşıt çözücü olarak kullanılan %1 CMC uygulanmıştır (Şekil 3.3). Buna göre deney grupları aşağıdaki gibidir:

1. Kontrol grubu: Taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik CMC 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla p.o. uygulanmıştır. 29. gün ratlar sakrifiye edilmiştir.

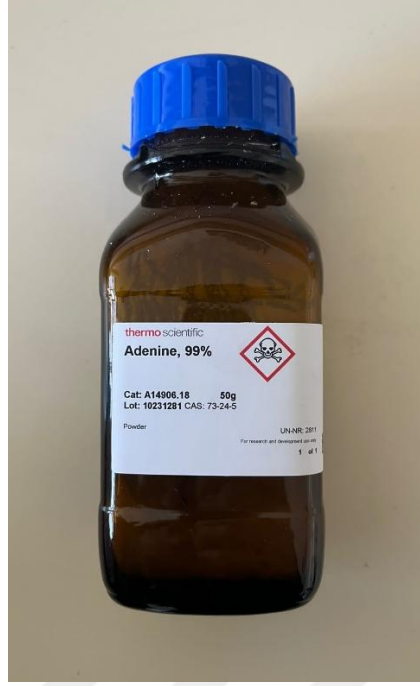
2. Kontrol grubu: Taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik CMC 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla p.o. uygulanmıştır. 49. gün ratlar sakrifiye edilmiştir.

3. Kontrol grubu: Taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik CMC 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla p.o. uygulanmıştır. 69. gün ratlar sakrifiye edilmiştir.

1. KBY grubu: 80 mg/kg adenin, taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik CMC'de çözünerek 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla p.o. uygulanmıştır. 29. gün ratlar sakrifiye edilmiştir. Bu KBY'nin 1'inci günü olarak kaydedilmiştir.

2. KBY grubu: 80 mg/kg adenin, taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik CMC'de çözünerek 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla p.o. uygulanmıştır. 49. gün ratlar sakrifiye edilmiştir. Bu KBY'nin 21'inci günü olarak kaydedilmiştir.

3. KBY grubu: 80 mg/kg adenin, taşıt çözücü olarak kullanılan %1'lik CMC'de çözünerek 28 gün boyunca her gün günde tek sefer orogastrik gavaj yoluyla p.o. uygulanmıştır. 69. gün ratlar sakrifiye edilmiştir. Bu KBY'nin 41'inci günü olarak kaydedilmiştir.



Şekil 3.1. Adenin, %99



Şekil 3.2. Karboksi metil selüloz (CMC)



Şekil 3.3. Kontrol grubuna orogastrik gavaj yoluyla ilaç uygulanması

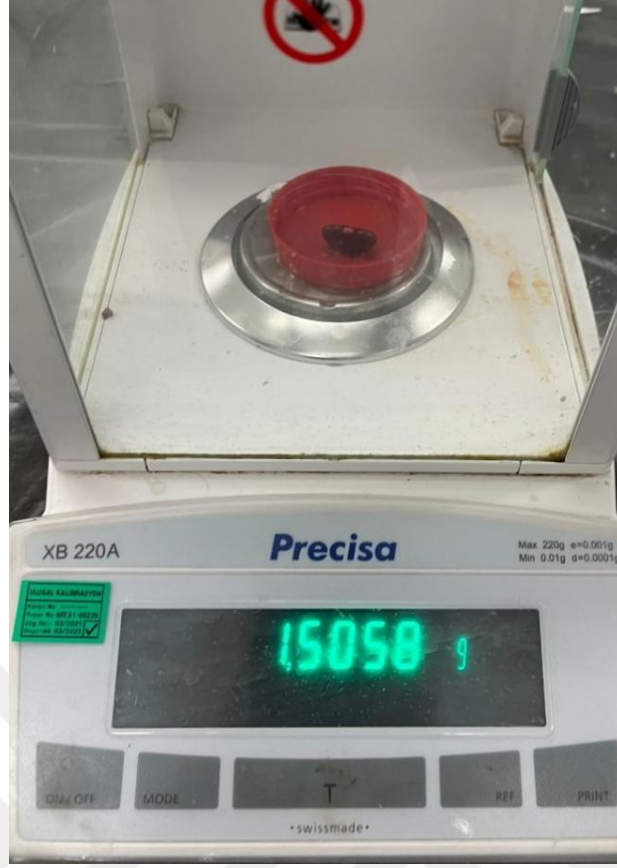
Hayvanlar yukarıda belirtildiği günlerde ağırlıkları ölçüldükten sonra 1.2 g/kg intraperitoneal etil karbamat türevi üretan (Urethane®, Sigma-Aldrich ABD; CAS numarası: 51-79-6) anestezisi ile dokular toplandıktan sonra kansız bırakma yöntemiyle ötanazi uygulanarak kurbanıye edilmişlerdir (Şekil 3.4). Anestezi uygulamasını takiben tüm hayvanların kan numuneleri alınmıştır (Şekil 3.5). Daha sonra hayvanların öldüğünden emin olduktan sonra böbrekleri, meydana gelen hasarın histolojik olarak incelenmesi amacıyla alınmıştır. Alınan böbrekler, ağırlıkları hassas terazi yardımıyla ölçüldükten sonra histolojik incelemeler yapılana kadar saklanmak üzere formaldehit solüsyonuna konulmuştur (Şekil 3.6). Alt çenede molar dişleri içerecek şekilde şeklinde kemik blokları elde edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.4. İntraperitoneal anestezi uygulaması



Şekil 3.5. Anestezi altında intrakardiyak kan alınması



Şekil 3.6. Böbrek numunelerinin hassas terazi yardımıyla ağırlıklarının belirlenmesi



Şekil 3.7. Alt çenelerden elde edilen molar dişleri içeren kemik bloklar

3.3. Biyokimyasal Analizler

Bütün gruplarda deney protokolünün tamamlanmasını takiben KBY gelişimini doğrulamak ve şiddetini ölçmek amacıyla anestezi altında intrakardiyak kan alınmıştır. Alınan kan örneklerinde kan üre azotu (BUN), kreatinin, albümin, kalsiyum, fosfor ve D3 vitamini seviyeleri İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi Merkezi, Merkez Laboratuvarı'nda hizmet alımı yapılarak ölçülmüştür.

3.4. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Değerlendirmesi

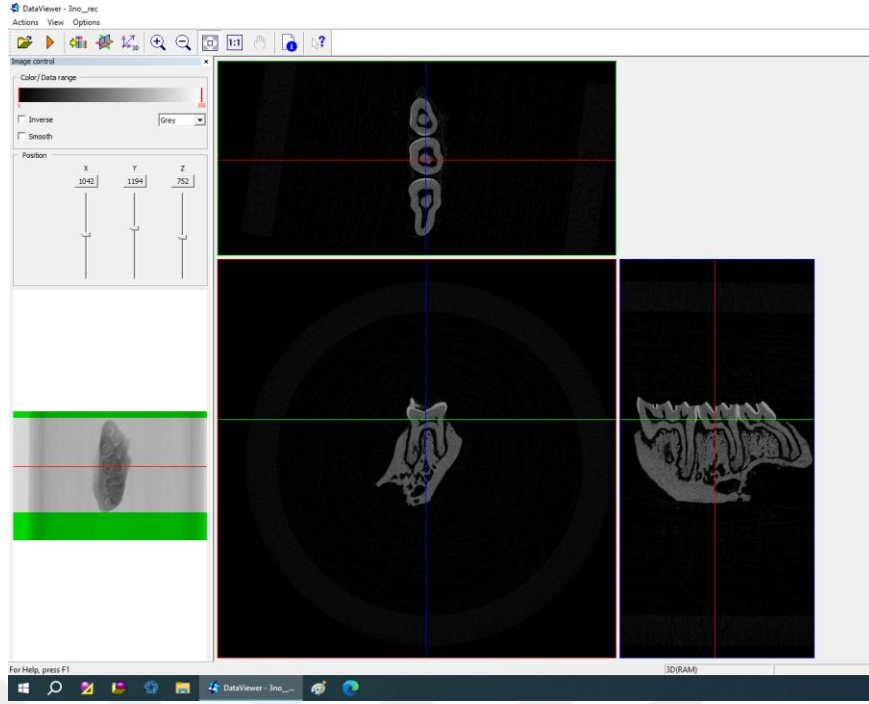
Sakrifiye edilen hayvanlardan elde edilen molar dişleri içeren kemik blokları tarama için SkyScan 1172 Micro-CT (Kontich, Belçika) cihazının numune tutucusuna yerleştirildi. Daha sonra cihazın kapağı kapatıldı ve cihazın içinde bulunan kamera yardımı ile örneğin konumu kontrol edildi.

Tablo 3.1. Mikro bilgisayarlı tomografi cihazının tarama parametreleri

Kv :	85
Amper:	118
Çözünürlük (µm):	9.98
Dönme adımı :	0.400
Işınlama zamanı (dk.) :	1:03:27
Frame averaging :	3
Filtre :	Al+Cu

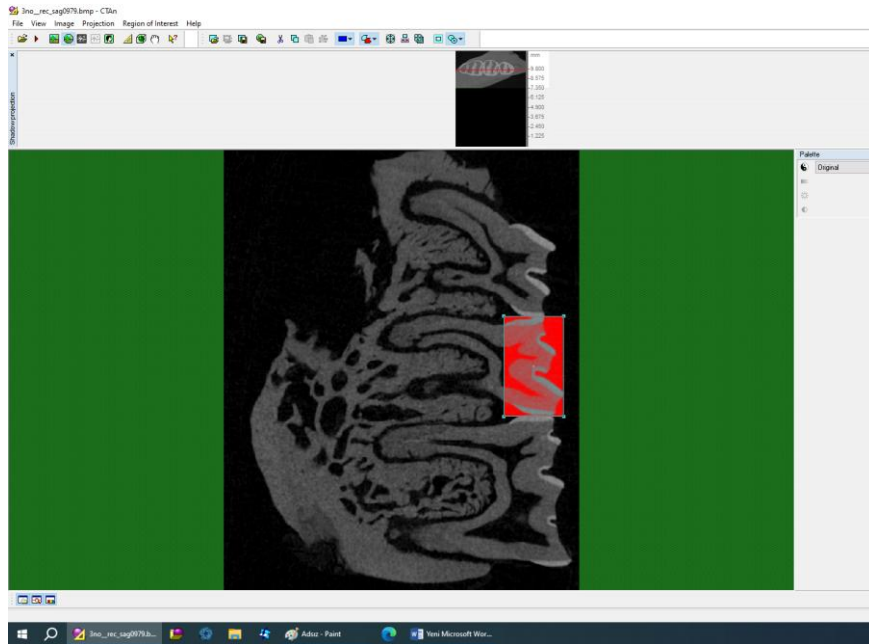
Elde edilen görüntüler TIFF (Tagged Image File Formatı) formatıyla kaydedildi. Bu görüntüler NRecon rekonstrüksiyon yazılımı (v.1.6.10.6. Skyscan, Kontich, Belçika) kullanılarak 250-300 kesit oluşturulacak şekilde rekonstrükte edildi. NRecon programında ilgi alanı (ROI) daire seçildi ve örneğin tamamı ilgi alanı içerisinde kaldı. Seçilen görüntüler TIFF formatından BMP formatına çevrildi.

3B görüntüleme ve analiz için örnekler DataViewer programı (v.1.5.2.7.;Skyscan, Kontich, Belçika) yardımı ile üç düzlemde hizalandı (Şekil 3.8).



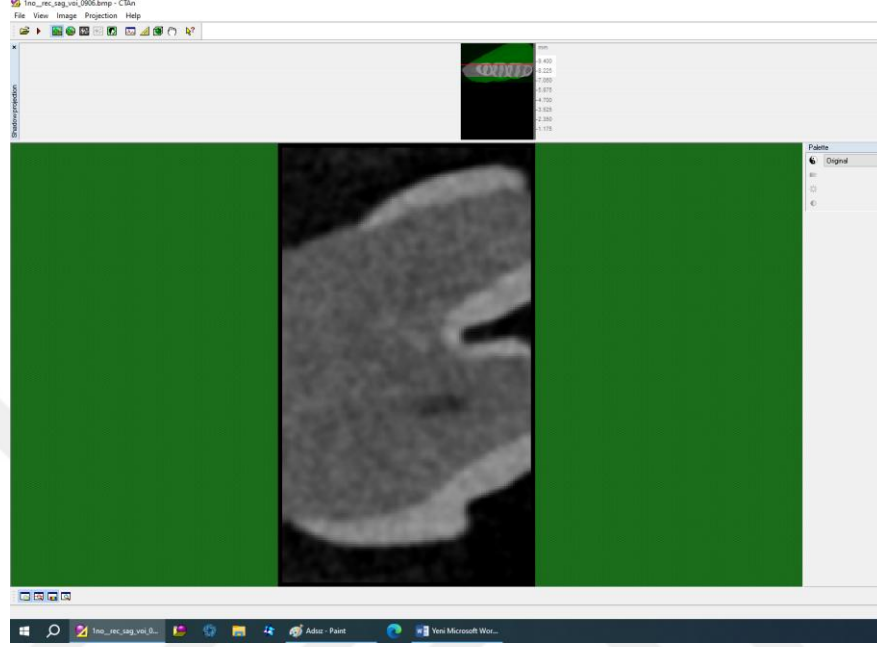
Şekil 3.8. Örneklerin DataViewer programı yardımıyla hizalanması

Daha sonra kaydedilen bu görüntüler CT analyser (CTAn;v.1.16.4.1.;Skyscan, Kontich, Belçika) programında açıldı. CTAn programında açılan ham görüntü sayfasında kesitler üzerinde hesaplama için her örnek üzerinde ikinci molar dişin mine sement sınırının koronalinde kalan bölüm seçilerek ROI (region of interest) içine alındı (Şekil 3.9).



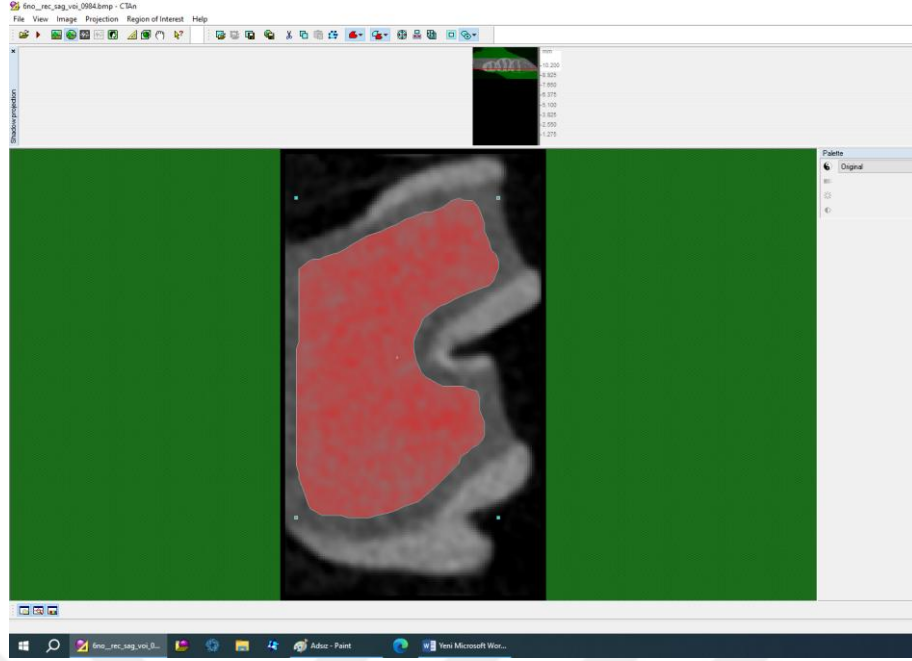
Şekil 3.9. Örneklerde incelenecek alanın ROI içine alınması

Daha sonra aynı düzlemde kesitler izlenerek pulpanın en son görüldüğü kesitten sonraki 10 kesit yoğunluk incelemesi için seçildi (Şekil 3.10).



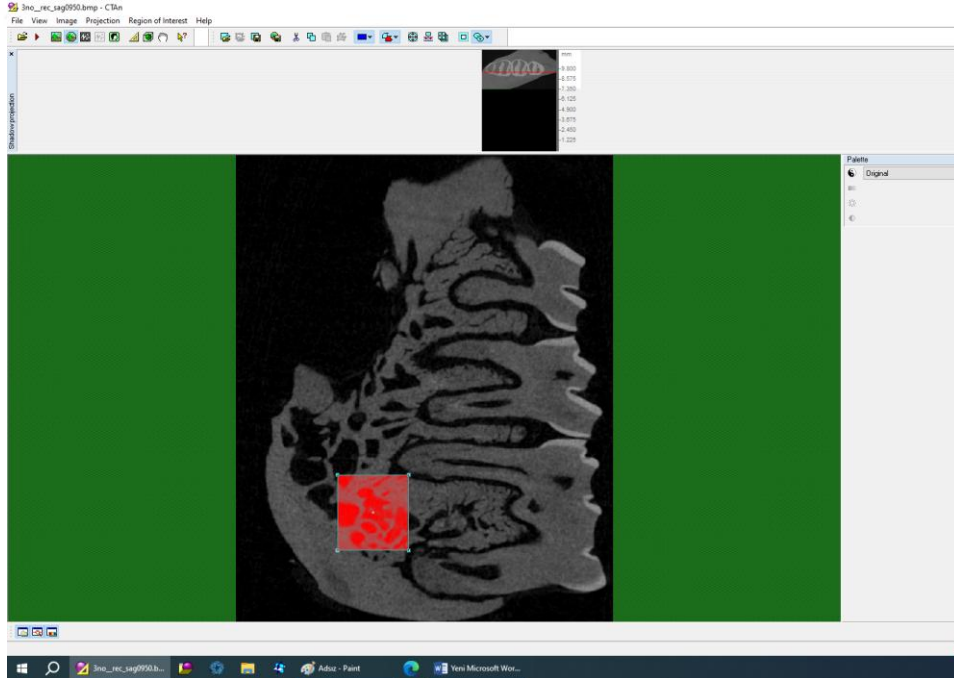
Şekil 3.10. Sagittal kesitlerde pulpanın son görüldüğü kesit

Seçilen kesitlerde yoğunluk incelemesi için dentin bölgeleri ROI içine alındı (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Yoğunluk incelemesi için dentin kısmının seçilmesi

Aynı işlemler trabeküler kemik yoğunluğunun hesaplanabilmesi için en son molar dişin apikalinde yer alan trabeküler kemik için de uygulandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Trabeküler kemikte inceleme için ROI içine alınan alan

Daha sonra CTAn programında görüntülerin 3B analizi yapılması için gerekli bölümler açıldı. Ölçüm yapılabilmesi için değerlendirilecek yapının doğru tresholding değerleri girildi. Bu değerlere göre ölçüm yapıldı.

Yoğunluk hesaplamasında 0.25 ve 0.75 yoğunluk değerlerine sahip 2 farklı fantom çubuğu Mikro-BT cihazının içinde örnekler ile aynı parametrelerde su dolu numune tutucu içerisinde tarandı. Her bir fantom çubuğu ayrı ayrı ilgi alanı içine alınarak yoğunluk değerleri kaydedildi. Çıkan bu değerler 0.25 ve 0.75 kalibrasyon değerleri olarak girildi ve kaydedildi. Daha sonra taranan örnekler CTAn programında tekrar açıldı ve yoğunluk değerleri hesaplandı.

3.6. Histolojik Analizler

Böbrek ve molar dişleri içeren kemik doku örnekleri çıkarıldı ve %10 nötral tamponlu formaldehit içinde 4 gün süreyle tespit edildi. Tespit işleminin ardından kemik bloklar gün aşırı değiştirilerek yenilenen %10 Formik asit çözeltisi içinde 6 gün boyunca dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu. Dekalsifikasyon işlemi tamamlanan kemik bloklar ve böbrek doku örnekleri histolojik doku takip prosedürüne alınarak artan derecelerdeki etil alkol (%50, %70, %80, %96, ve %99,9) serilerinden, ksilen serilerinden ve erimiş parafin (62 °C) serilerinden geçirilerek parafin bloklar içerisine gömüldü. Böbrek dokusu parafin bloklarından mikrotom ile 5-6 µm, kemik bloklardan 6 µm ve 4 µm kalınlığında kesitler alınarak lamalar üzerine monte edildi. Histolojik inceleme için böbrek kesitleri ve 6 µm kalınlığındaki kemik blok kesitleri hematoksilin-eozin (H&E) ile boyandı. 4 µm kalınlığındaki doku kesitlerinde immunohistokimyasal (IHC) yöntemle Osteopontin/ OPN/SPP1 Antibody (AKm2A1): (Sc-21742), (Santa Cruz, Oregon, ABD) ve BSP1 Antibody (LFMb-25): (Sc-73630), (Santa Cruz, Oregon, ABD) ve DMP-1 Antibody (LFMb-31): (Sc-73633) (Santa Cruz, Oregon, ABD) ve COL1A1 Antibody (3G3): sc-293182 (Sc-293182) (Santa Cruz, Oregon, ABD) antikorların immunreaktiviteleri belirlendi. İmmünohistokimyasal (IHC) analiz için antikorlar 1/100 oranında dilüe edilerek kullanıldı. Antikorlar için immünohistokimyasal boyama prosedürü BOND-MAX Tam Otomatik IHC Boyama Sistemi (Leica-microsystems, Buffalo Grove, ABD) ile protokole göre uygulandı. İnkübasyondan önce Bond Max üzerinde Epitope Retrieval 2 solüsyonu kullanılarak 30 dakika boyunca antijen geri kazanımı gerçekleştirildi. Kesitler, primer antikor (OPN, BSP1, DMP-1 ve COL1A1) (60 dakika, 37°C) sekonder antikor (30 dakika, 37°C) ve kromojen ile inkübe edildikten sonra hematoksilin ile zıt

boyama uygulandı. Boyama işlemi tamamlanan kesitler etanol ile dehidrate edildikten sonra ksilenden geçirilerek lamel ile kapatıldı[85, 86].

H&E ve IHC ile boyanmış tüm kesitler Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi3 mikroskop kamerası ve Nikon NIS-Elements Documentation 5.02 görüntü analiz programı (Nikon Corporation, Tokyo, Japonya) ile incelendi. H&E ile boyanmış olan kesitlerde pulpa çapı ölçüldü. Pulpa çapı ölçümü en geniş ve en dar eksenlerde yapılan ölçümlerin ortalaması hesaplanarak belirlendi. Ayrıca aynı kesitler üzerinde diş çapı da aynı yöntemle hesaplandı. Hesaplanan bu değerler birbirine oranlandı.

İmmünohistokimyasal boyama yapılan kesitlerde OPN, BSPIL, DMP-1 ve COL1A1 immunreaktivitelerini belirlemek için preparatlar x10 objektif büyütme ile taranarak incelendi ve her bir antikör için her kesitteki pulpa, dentin, periodontal ligament ve alveol kemik doku alanlarında immunreaktivite H Skoru belirlendi.

H Skoru; Boyanma yoğunluğunu (i); (i değerleri 0 (boyanma yok), 1 (zayıf boyanma), 2 (orta yoğunlukta boyanma) ve 3 (kuvvetli boyanma) olarak belirlenmiştir) ve boyanmış hücrelerin yüzdesini (Pi); (Pi değerleri %0 ile %100 arasında değişmektedir) içeren histokimyasal skorlama (H-skoru) değerlendirmesine dayanmaktadır. Nihai H-skoru, aşağıda gösterilen denklemde olduğu gibi i ile Pi'nin çarpımının toplamından elde edilmektedir. Dolayısıyla bu skor 0 ila 300 aralığındadır.

$$H\text{-score} = (0 \times P_0) + (1 \times P_1) + (2 \times P_2) + (3 \times P_3)$$

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) ile yapıldı.

Tüm gruplar için denek sayısı az ($N < 15$) olduğu için parametrik olmayan karşılaştırma yöntemleri kullanılmıştır. Buna göre kontrol ve deney gruplarının hem histolojik verilerin hem de yoğunluk ölçümlerinin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U analiz yöntemi kullanılmıştır. Kontrol gruplarının ve KBY gruplarının kendi içinde karşılaştırılması için Kruskal Wallis analiz yöntemi kullanılmıştır. Anlamlı çıkan Kruskal Wallis analiz sonuçları için farkın hangi gruplar arasında olduğu ise ikili olarak Mann-

Whitney U analiz yöntemi ile karşılaştırılmıştır. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Deney gruplarında kronik böbrek yetmezliği oluşumunu ve şiddetini biyokimyasal verilerle doğrulamak için tüm deneklerden alınan kan örneklerinde albümin, BUN, fosfor, kalsiyum, kreatinin, vitamin D3 ve seviyelerine bakılmıştır.



Tablo 4.1. Kontrol ve KBY grupları arasında biyokimyasal test sonuçlarının karşılaştırılması

Ölçüm	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Albümin	3,13±0,18	3,16±0,19	0,941	3,08±0,26	3,13±0,15	0,894	3,15±0,08	3,31±0,2	0,07
BUN	25,15±2,28	64,35±17,04	0,003*	23,13±1,67	27,22±1,34	0,002*	22,51±1,9	27,9±4,78	0,039*
Fosfor	7,52±0,66	8,23±1,62	0,389	7,73±0,81	7,7±1,34	1	9,25±0,76	9,17±1,78	0,55
Kalsiyum	10,08±0,59	10,91±1,38	0,25	10,3±0,53	10,35±0,21	0,844	10,12±0,26	10,29±0,83	0,784
Kreatinin	0,45±0,08	0,9±0,23	0,003*	0,45±0,08	0,49±0,08	0,529	0,52±0,04	0,51±0,07	0,9
Vit D3	18,02±6,68	30,62±10,44	0,039*	21,37±5,72	28,79±9,3	0,071	24,85±2,75	27,8±10,03	0,828

***p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.**

Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol 1 ve KBY 1 gruplarındaki deneklerin BUN ($p=0,003$), kreatinin ($p=0,003$) ve vitamin D3 ($p=0,039$) ölçümleri arasında farklılık saptanmıştır. KBY 1 grubundaki deneklerin BUN, kreatinin ve vitamin D3 ölçüm ortalamaları kontrol 1 grubundakilerden daha yüksektir. Bu farklılıklar KBY 1 grubunun böbrek yetmezliğine girdiğini destekleyici veriler olarak kabul edilmiştir. Kontrol 1 ve KBY 1 gruplarındaki deneklerin albümin, fosfor ve kalsiyum ölçümleri arasında ise farklılık yoktur.

Kontrol 2 ve KBY 2 gruplarındaki deneklerin BUN ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,002$). KBY 2 grubundaki deneklerin BUN ölçüm ortalamaları kontrol 2 grubundakilerden daha yüksek saptanmıştır ($p=0,002$). Ancak Kontrol 2 ve KBY 2 gruplarındaki deneklerin albümin, fosfor, kalsiyum, kreatinin ve vitamin D3 ölçümleri arasında ise anlamlı farklılık bulunmadı.

Kontrol 3 ve KBY 3 gruplarındaki deneklerin BUN ölçümleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,039$). KBY 3 grubundaki deneklerin BUN ölçüm ortalamaları kontrol 3 grubundakilerden daha yüksektir ($p=0,039$). Ancak Kontrol 3 ve KBY 3 gruplarındaki deneklerin albümin, fosfor, kalsiyum, kreatinin, ve vitamin D3 ölçümleri arasında ise anlamlı farklılık yoktur. KBY 1 grubunun kreatinin seviyesi kontrol grubuyla kıyasla yüksekken, KBY 2 ve KBY 3 gruplarında böyle bir farklılık görülmemiştir. Kreatin seviyesinin tek başına KBY göstergesi olamayacağını belirten çalışmalar ışığında histopatolojik incelemeler ile KBY gelişimi kesinleştirildi [87].

Tablo 4.2. KBY gruplarının biyokimyasal testlerinin kendi aralarında karşılaştırılması

Ölçüm	^A KBY 1	^B KBY 2	^C KBY 3	p	Fark
	Ort±ss	Ort±ss	Ort±ss		
Albümin	3,16±0,19	3,13±0,15	3,31±0,2	0,157	
BUN	64,35±17,04	27,22±1,34	27,9±4,78	0,001*	A>B,C
Fosfor	8,23±1,62	7,7±1,34	9,17±1,78	0,204	
Kalsiyum	10,91±1,38	10,35±0,21	10,29±0,83	0,328	
Kreatinin	0,9±0,23	0,49±0,08	0,51±0,07	0,001*	A>B,C
Vit D3	30,62±10,44	28,79±9,3	27,8±10,03	0,732	

* $p<0,05$; Kruskal Wallis Testi kullanıldı.

Dikey sütunlar birbirleriyle karşılaştırılmış olup $p<0,05$ değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

KBY 1, KBY 2 ve KBY 3 gruplarına göre deneklerin BUN ve kreatinin ölçümleri arasında farklılık saptanmıştır. KBY 1 grubundaki denekler ile KBY 2 ve KBY 3 grubundaki deneklerin BUN ve kreatinin ölçümleri bakımından anlamlı farklılık

saptanmıştır ($p=0,001$). KBY 2 ve KBY 3 grubundaki deneklerin ise BUN ve kreatinin ölçümleri arasında anlamlı farklılık yoktur. Bu sonuçlar KBY gelişiminin ardından hastalığın şiddetinin nispeten sabit seyrettiğini göstermektedir. Son olarak KBY 1, KBY 2 ve KBY 3 gruplarına göre deneklerin albümin, fosfor, kalsiyum ve vitamin D3 ölçümleri arasında ise farklılık yoktur.

4.2. Mikro Bilgisayarlı Tomografi Bulguları

Kontrol grubu ile deney grupları arasındaki kıyaslama, dentin ve kemik yoğunluğu dikkate alınarak yapıldı. Her üç deney grubu kendi kontrol gruplarıyla ve birbirleri arasında karşılaştırıldı.



Tablo 4.3. Kontrol ve KBY gruplarının gr/cm³ cinsinden dentin ve kemik yoğunluklarının karşılaştırılması

Ölçüm	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Dentin yoğunluğu	1,27±0,02	1,32±0,06	0,071	1,47±0,05	1,38±0,06	0,009*	1,39±0,04	1,38±0,04	0,664
Kemik yoğunluğu	0,84±0,16	0,77±0,13	0,245	0,81±0,14	0,8±0,11	0,828	0,76±0,13	0,76±0,13	1

***p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.**

Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol 1 ve KBY 1 gruplarındaki deneklerin dentin yoğunluğu ve kemik yoğunluğu, ölçümleri arasında anlamlı farklılık yoktur. KBY 2 grubundaki deneklerin dentin yoğunluğu, kontrol 2 grubundakilerden daha düşük iken($p=0,009$) kemik yoğunluğu ölçümleri arasında fark saptanmamıştır. Kontrol 3 ve KBY 3 gruplarındaki deneklerin kemik yoğunluğu ve dentin yoğunluğu arasında da fark bulunmadı.

Tablo 4.4. KBY gruplarının gr/cm^3 cinsinden kemik ve dentin yoğunluklarının kendi aralarında karşılaştırılması

Ölçüm	KBY 1	KBY 2	KBY 3	p	Fark
	Ort $\pm$ ss	Ort $\pm$ ss	Ort $\pm$ ss		
Dentin yoğunluğu	1,32 $\pm$ 0,06	1,38 $\pm$ 0,06	1,38 $\pm$ 0,04	0,074	
Kemik yoğunluğu	0,77 $\pm$ 0,13	0,8 $\pm$ 0,11	0,76 $\pm$ 0,13	0,772	

* $p<0.05$; Kruskal Wallis Testi kullanıldı.

Dikey sütunlar birbirleriyle karşılaştırılmış olup $p<0.05$ değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

KBY 1, KBY 2 ve KBY 3 gruplarına göre deneklerin dentin yoğunluğu ve kemik yoğunluğu arasında farklılık bulunmadı.

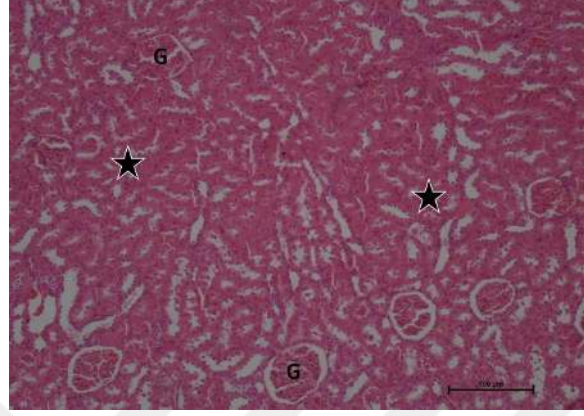
4.3. Histolojik Analiz Bulguları

Tüm gruplara ait böbrek örnekleri makroskopik olarak incelendi ve deney gruplarındaki doku hasarı saptandı (Şekil 4.1). KBY gruplarındaki böbrek örneklerinin kontrol gruplarına göre daha açık renkli, boyut ve ağırlık olarak da daha büyük olduğu gözlemlendi.

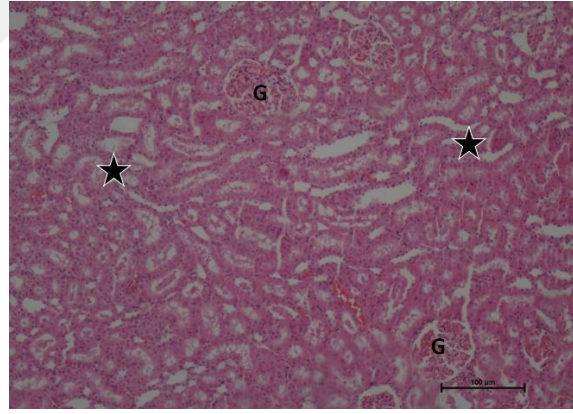


Şekil 4.1. Kontrol 1(solda) ve KBY 1(sağda) grubu deneklerinin böbreklerinin makroskopik görüntüsü

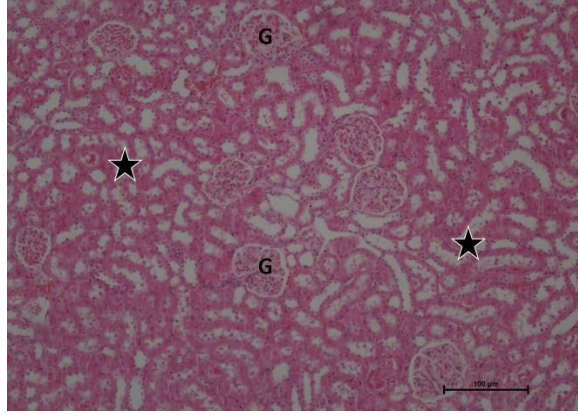
Kontrol gruplarına (Kontrol-1, Kontrol-2 ve Kontrol-3) ait H&E ile boyanmış böbrek kesitlerinde her üç grupta benzer şekilde histopatolojik değişiklik ve oluşum saptanmadı. Renal tubüller, glomeruler ve interstisyel doku alanları normal histolojik yapıda değerlendirildi(Şekil 4.2, 4.3, 4.4).



Şekil 4.2. Kontrol 1 grubunda normal histolojik görünümde böbrek parankimi (yıldız) ve glomerül (G). H&E, X10

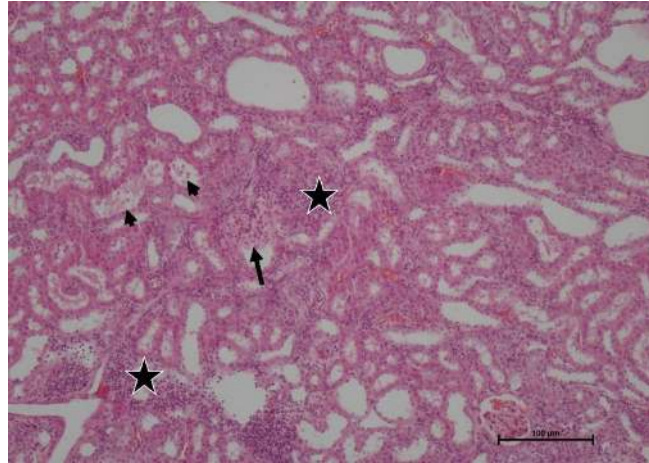


Şekil 4.3. Kontrol 2 grubunda normal histolojik görünümde böbrek parankimi (yıldız) ve glomerül (G). H&E, X10

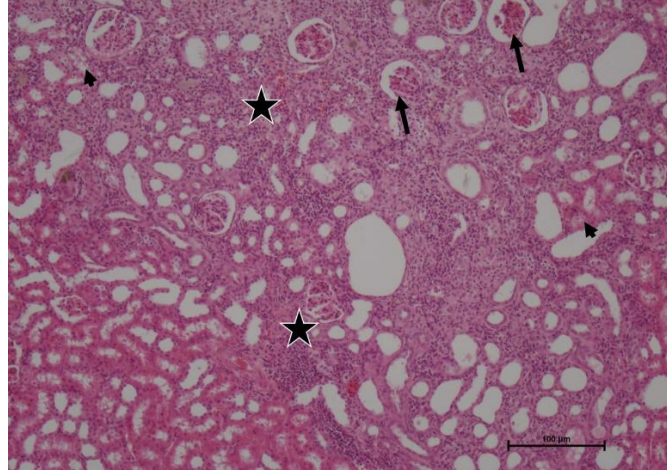


Şekil 4.4. Kontrol 3 grubunda normal histolojik görünümde böbrek parankimi (yıldız) ve glomerül (G). H&E, X10

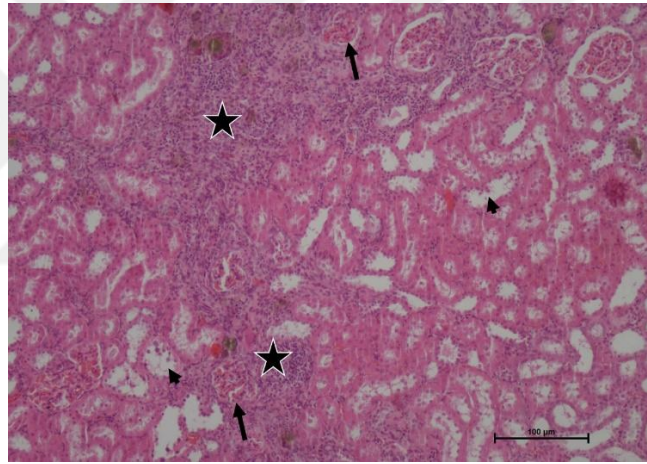
Adenin gruplarına (KBY-1, KBY-2 ve KBY-3) ait H&E ile boyanmış böbrek kesitlerinde parankimal alanlarda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, renal tubüllerde epitel hasarı ve yer yer tubüler dejenerasyon ile tubül lümeninde eritrositler saptandı. Glomerullerde yaygın olarak kollaps ve yer yer sklerotik değişiklikler izlendi (Şekil 4.5, 4.6, 4.7). Bu gruptaki böbrek kesitlerinde izlenen histopatolojik değişiklikler KBY yönünde değerlendirildi.



Şekil 4.5. KBY 1 grubunda böbrek parankiminde yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), glomerüler sklerozis (ok), renal tubül lümeninde eritrositler (ok başı). H&E, X10



Şekil 4.6. KBY 2 grubunda böbrek parankiminde yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), glomerüler sklerozis (ok), renal tubül lümeninde eritrositler (ok başı). H&E, X10



Şekil 4.7. KBY 3 grubunda böbrek parankiminde yaygın inflamatuvar hücre infiltrasyonu (yıldız), glomerüler sklerozis (ok), renal tubül lümeninde eritrositler (ok başı). H&E, X10

Kontrol gruplarına (Kontrol-1, Kontrol-2 ve kontrol-3) ait H&E ile boyanmış diş içeren kemik doku kesitlerinde her üç grupta benzer şekilde alveolar kemik dokusu, periodontal ligament, dentin ve pulpa alanları normal histolojik ve histomorfometrik yapıda değerlendirildi.

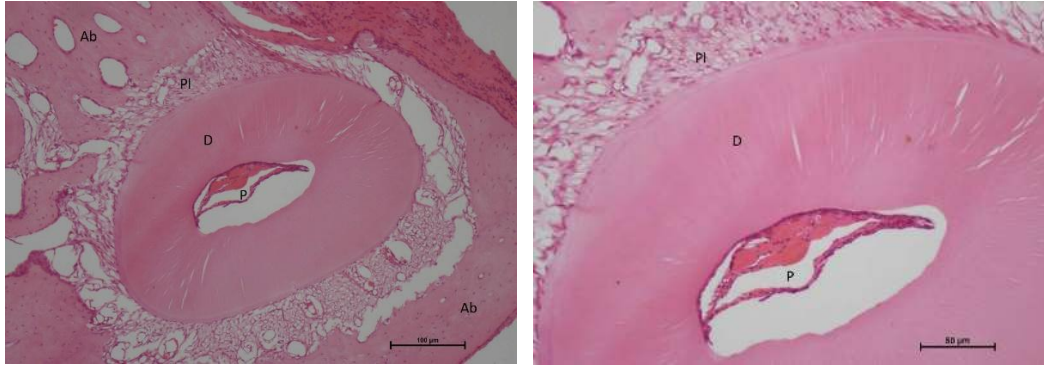
Dentin dokusu, odontoblast hücreleri ile tubüler ve intertubüler dentin yapılarını içermekte olup normal histolojik yapıda değerlendirildi. Alveolar kemik dokusu matür yapıda olup izlenen alanlarda periosteum, endosteum ve trabeküler kemik dokusu olağan

histolojik yapıda izlendi. Diş pulpa alanları içerisinde mezankimal bağ doku olağan yapı ve yoğunlukta izlendi(Şekil 3.20, 3.30, 3.40).

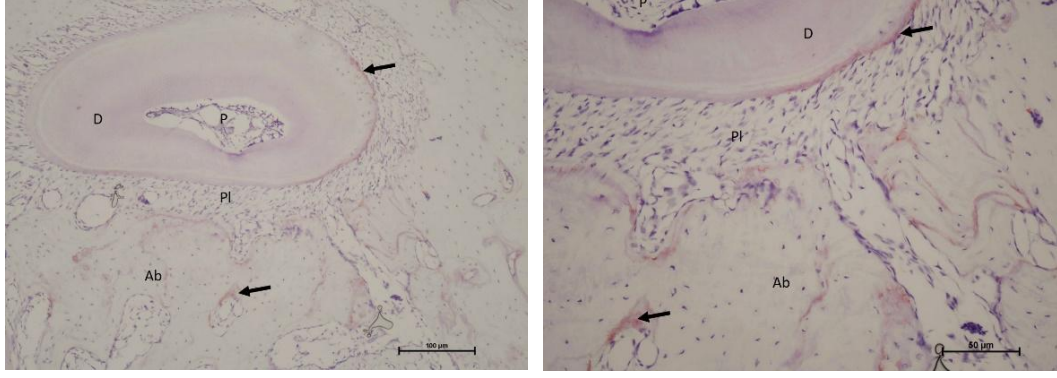
Kontrol gruplarına ait immunohistokimyasal boyama yapılan diş içeren kemik doku kesitlerinde OPN, BSP, DMP-1 ve COL1A1 pozitif immunreaktivite alveolar kemik dokusu, periodontal ligament, dentin ve pulpa alanlarında değişen tonlarda kırmızı-kahverenkte boyanma şeklinde izlendi(Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19).

KBY gruplarına (KBY-1, KBY-2 ve KBY-3) ait H&E ile boyanmış olan diş içeren kemik doku kesitlerinde her üç grupta benzer şekilde alveolar kemik dokusu, periodontal ligament, dentin ve pulpa alanlarında belirgin patoloji saptanmadı. Ancak pulpa alanlarında mezankimal bağ doku yoğunluğunda kontrol gruplarındakine göre nisbi artış dikkati çekti. Her üç adenin grubunda da mezankimal bağ doku, pulpa kavitesinin büyük kısmını dolduracak şekilde izlendi (Şekil 4.13, 4.23, 4.33).

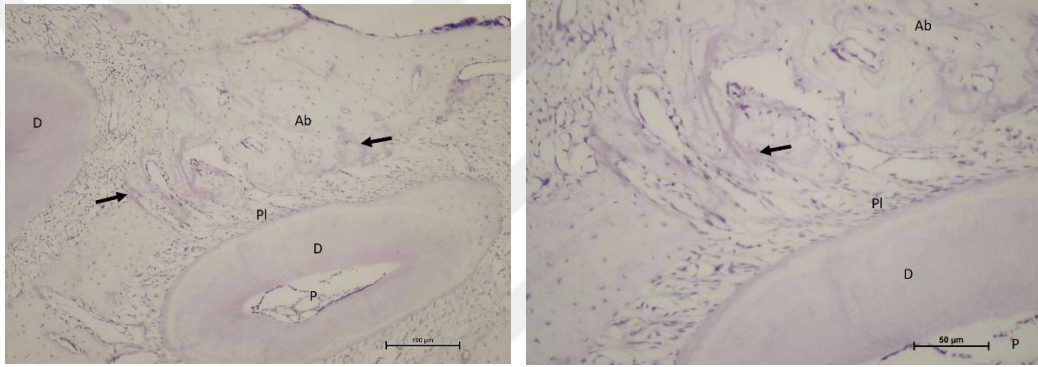
Adenin gruplarına ait immunohistokimyasal boyama yapılan diş içeren kemik doku kesitlerinde OPN, BSP, DMP-1 ve COL1A1 pozitif immunreaktivite alveolar kemik dokusu, periodontal ligament, dentin ve pulpa alanlarında değişen tonlarda, kırmızı-kahverenkte boyanma şeklinde izlendi(Şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.13, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37).



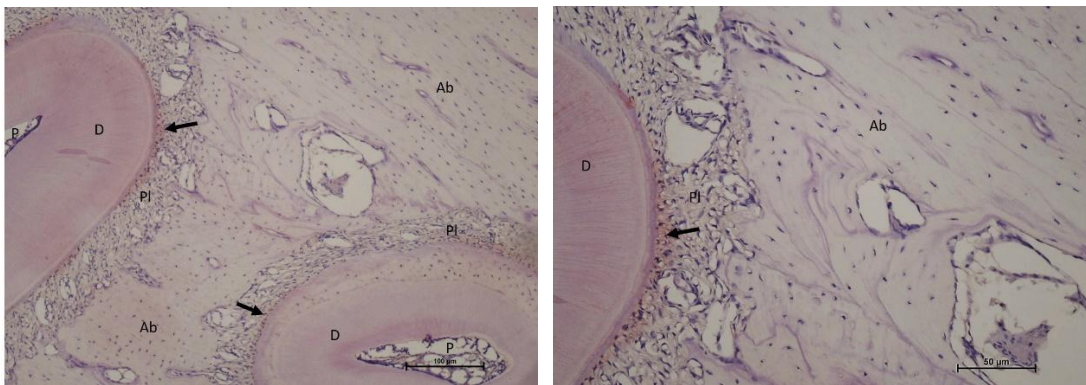
Şekil 4.8. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodontal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20



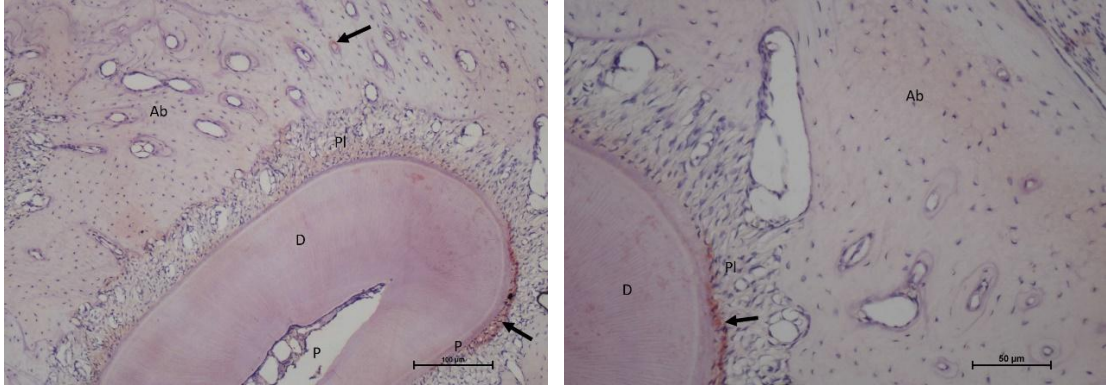
Şekil 4.9. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20



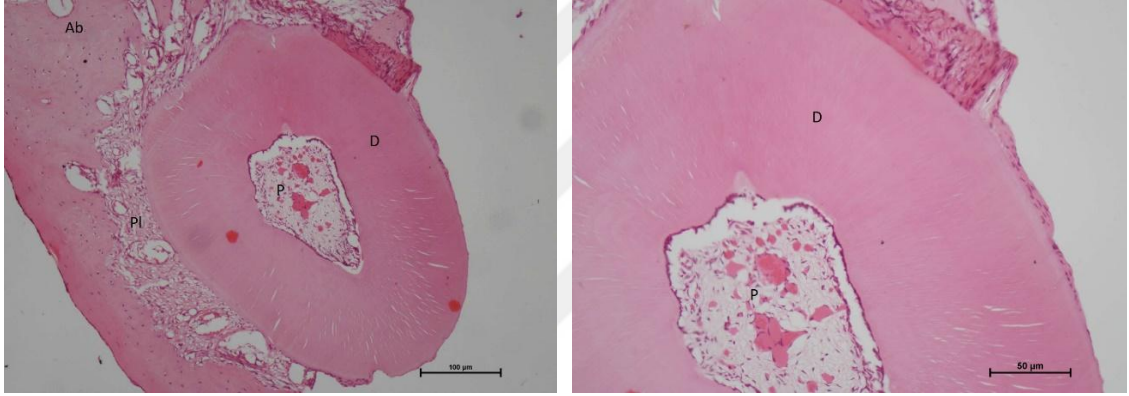
Şekil 4.10. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20



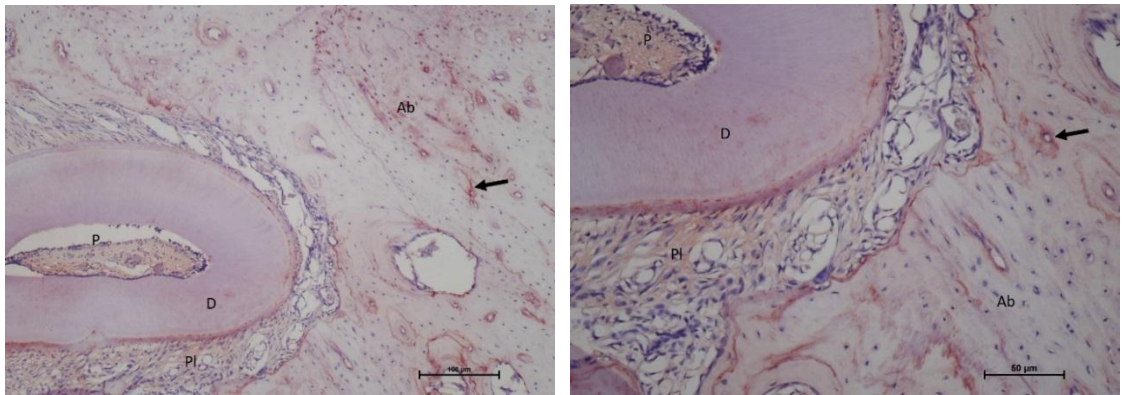
Şekil 4.11. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20



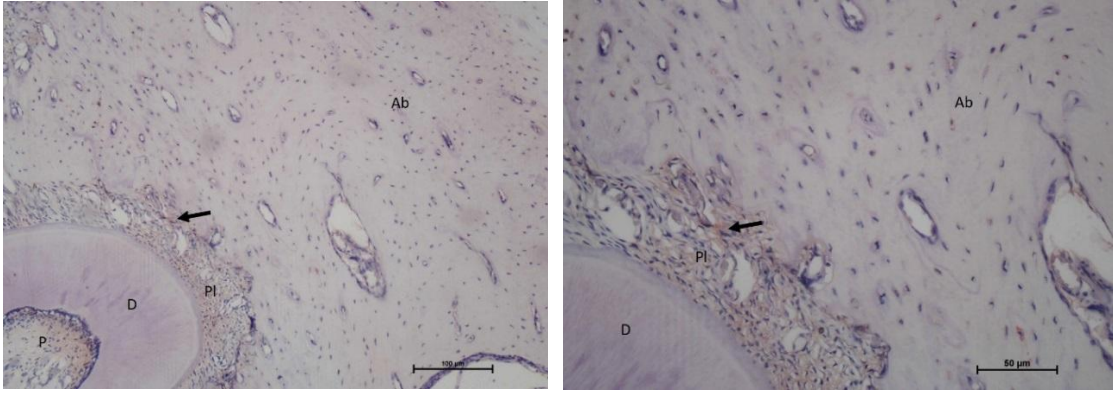
Şekil 4.12. Kontrol 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20



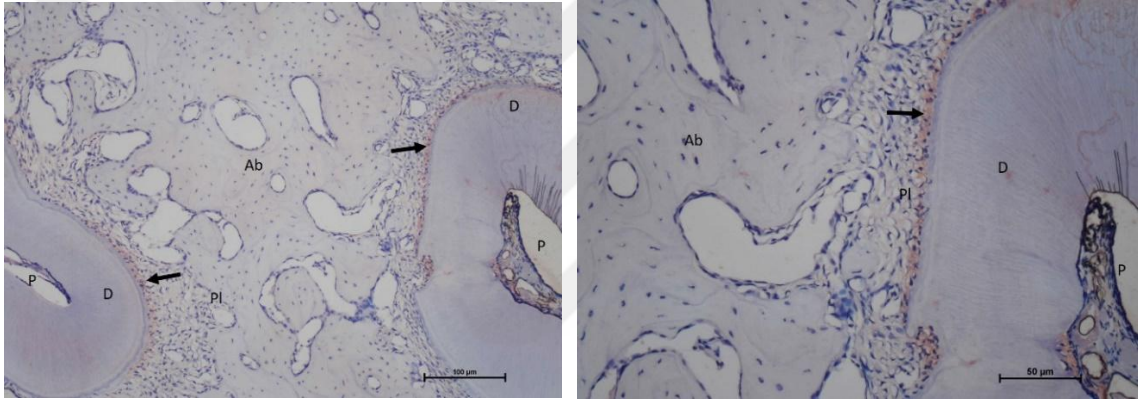
Şekil 4.13. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20



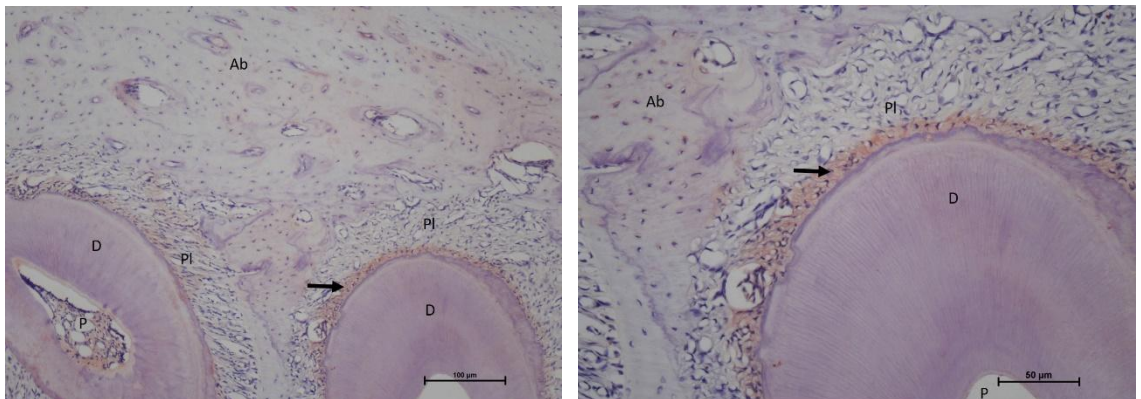
Şekil 4.14. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20



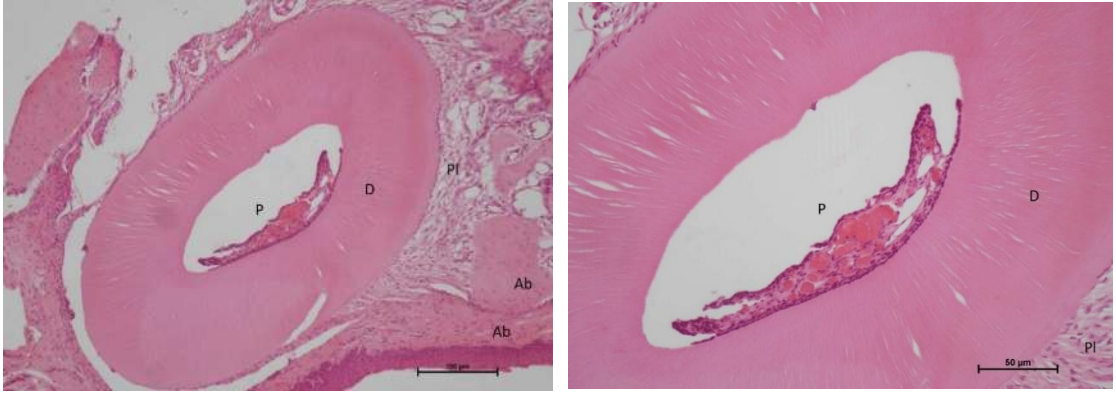
Şekil 4.15. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20



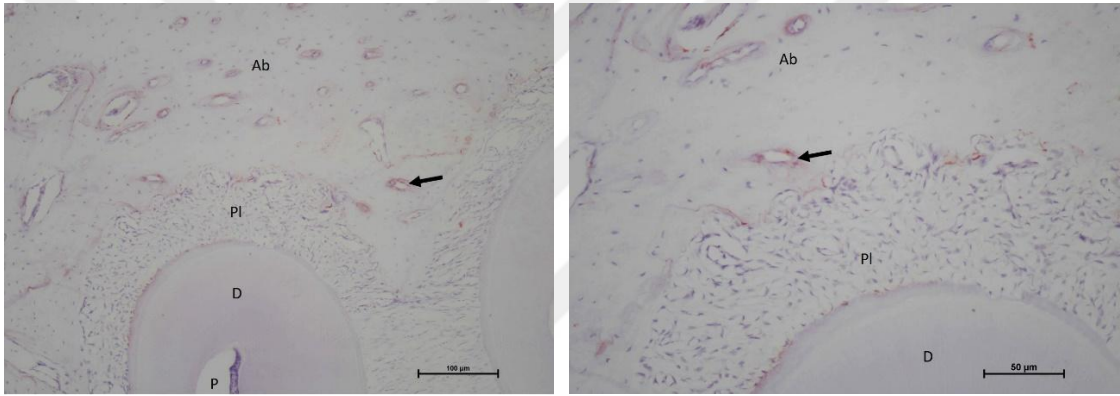
Şekil 4.16. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20



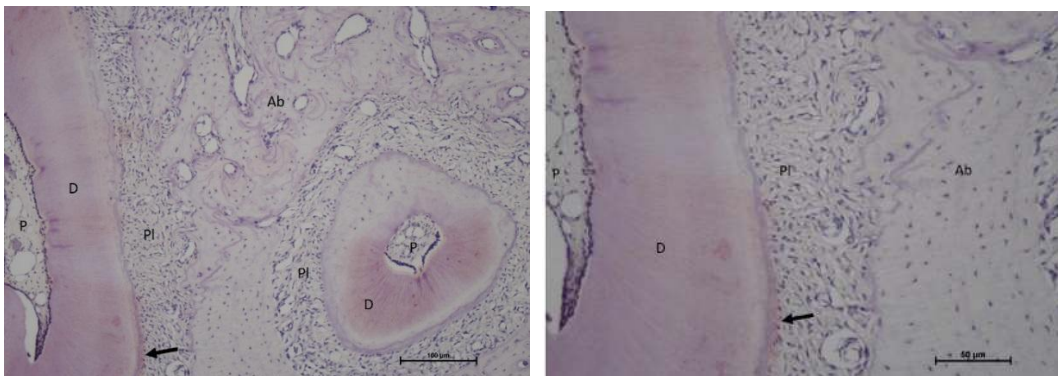
Şekil 4.17. KBY 1 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20



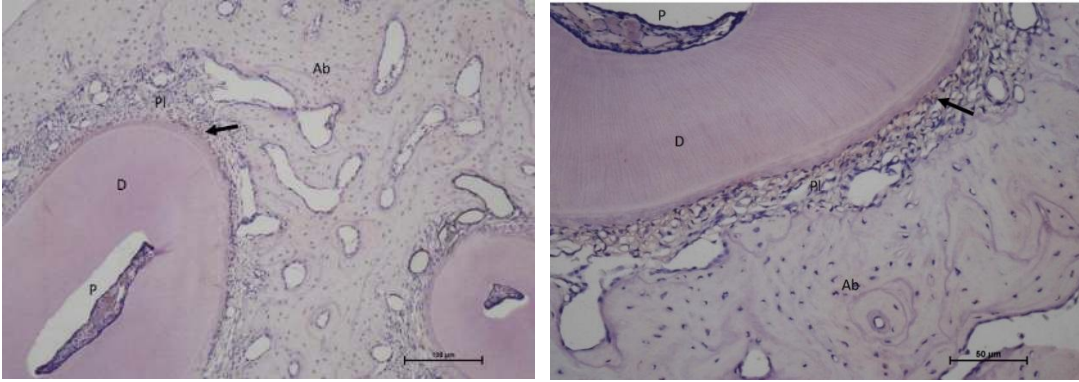
Şekil 4.18. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20



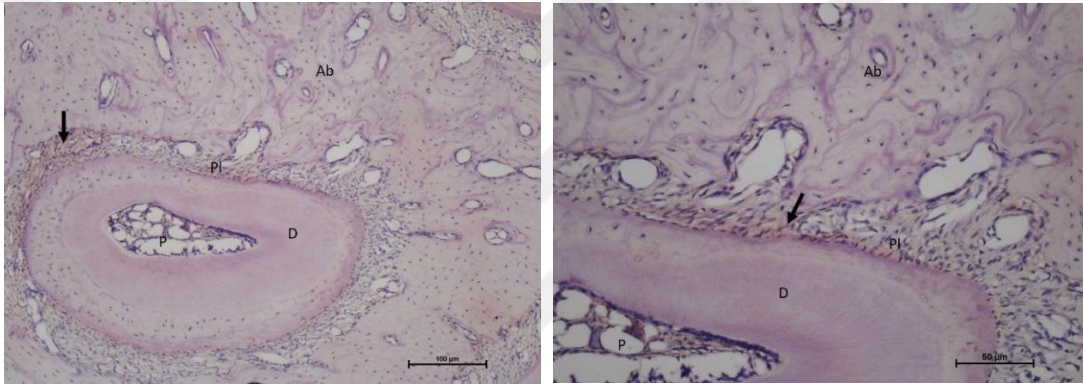
Şekil 4.19. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20



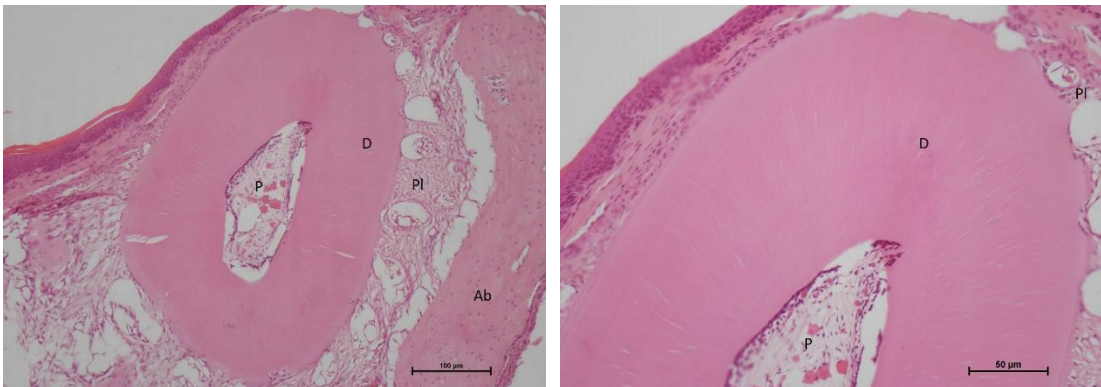
Şekil 4.20. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSP1I, IHC, x10 ve x20



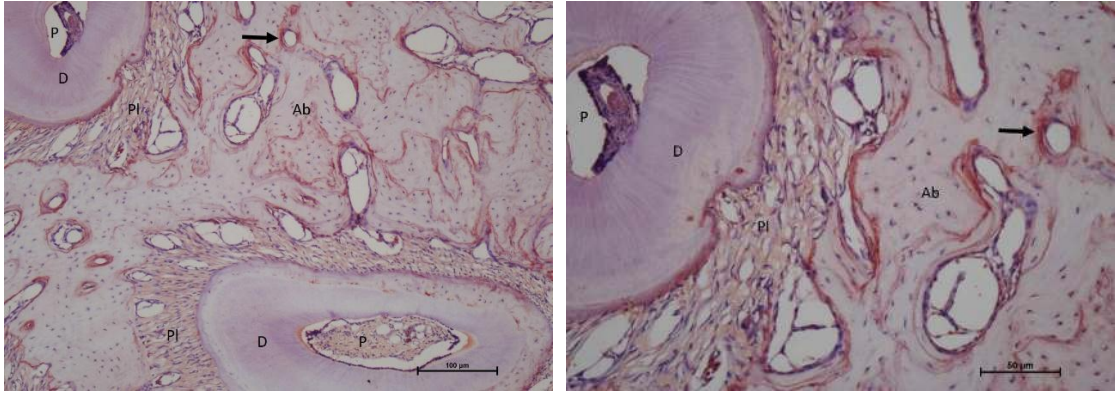
Şekil 4.21. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20



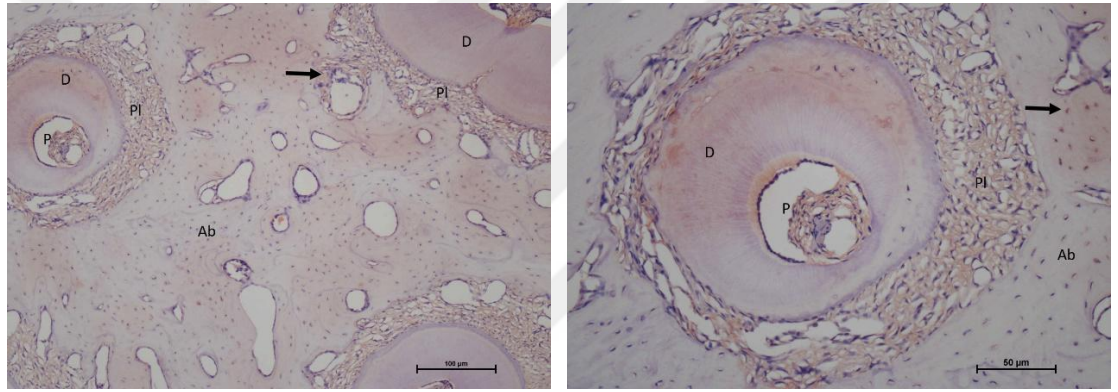
Şekil 4.22. Kontrol 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20



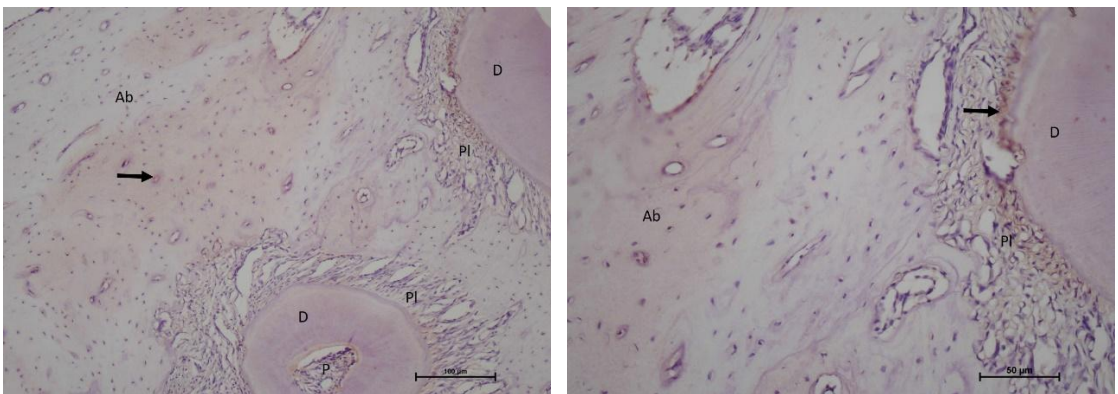
Şekil 4.23. KBY 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20



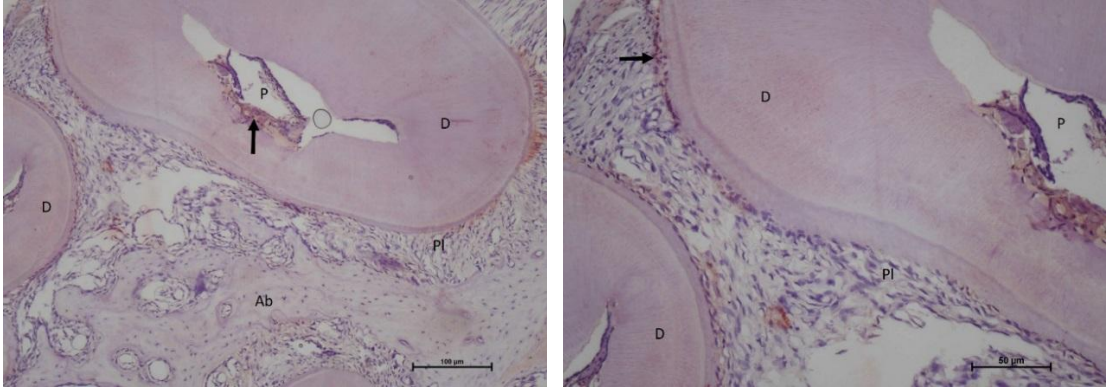
Şekil 4.24. KBY 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20



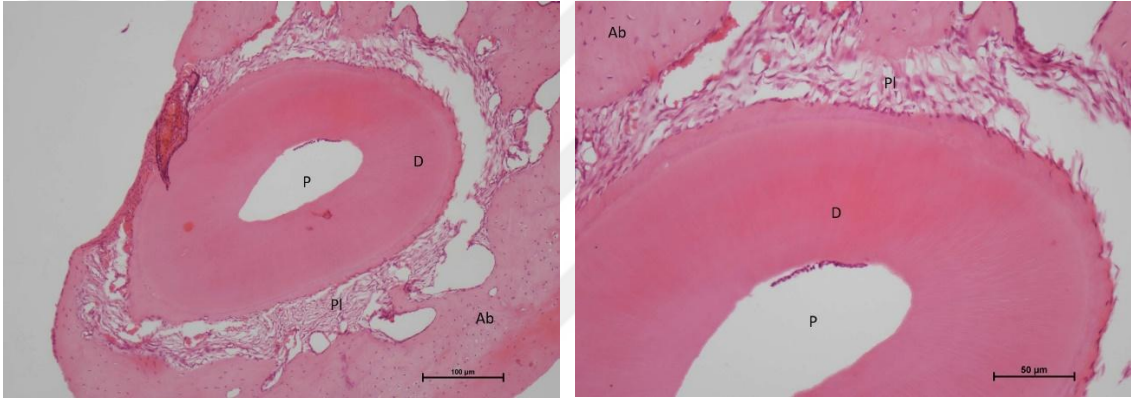
Şekil 4.25. KBY 2 grubunda diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20



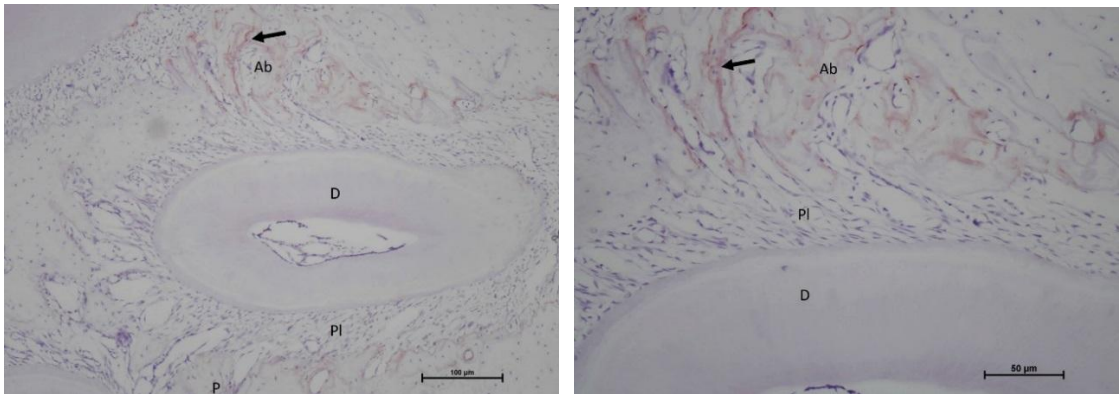
Şekil 4.26. KBY 2 grubunda diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20



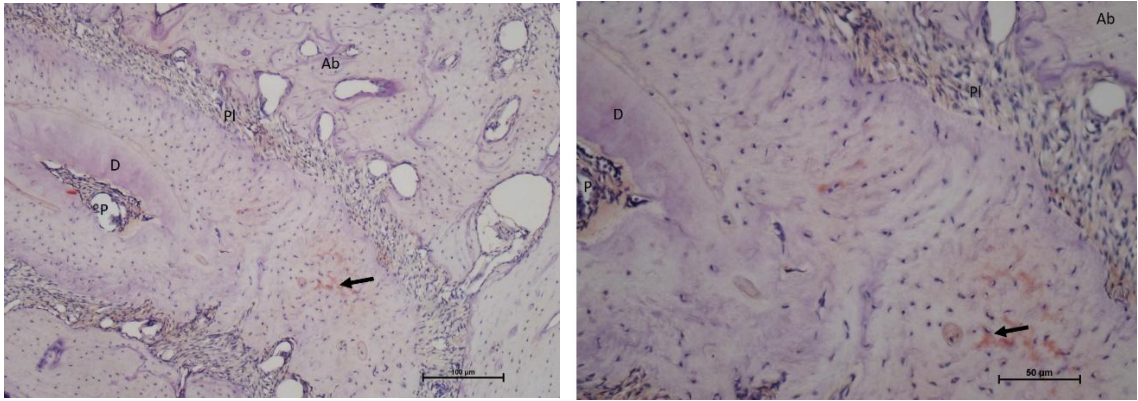
Şekil 4.27. KBY 2 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20



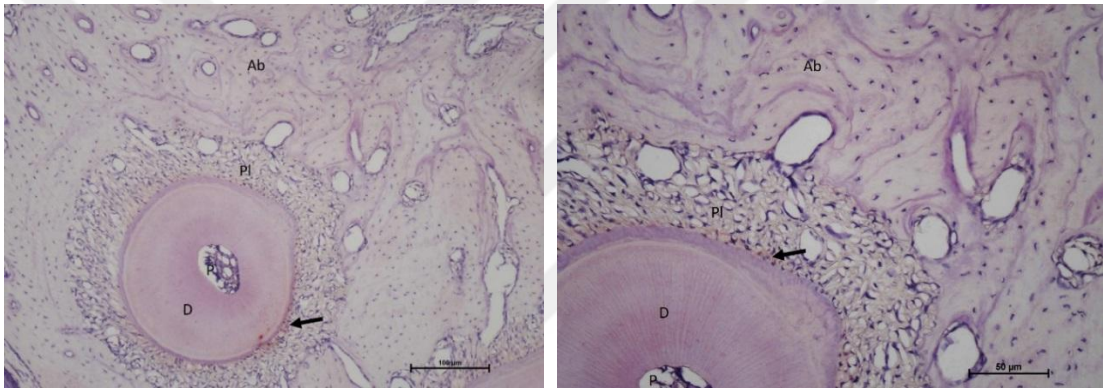
Şekil 4.28. Kontrol 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20



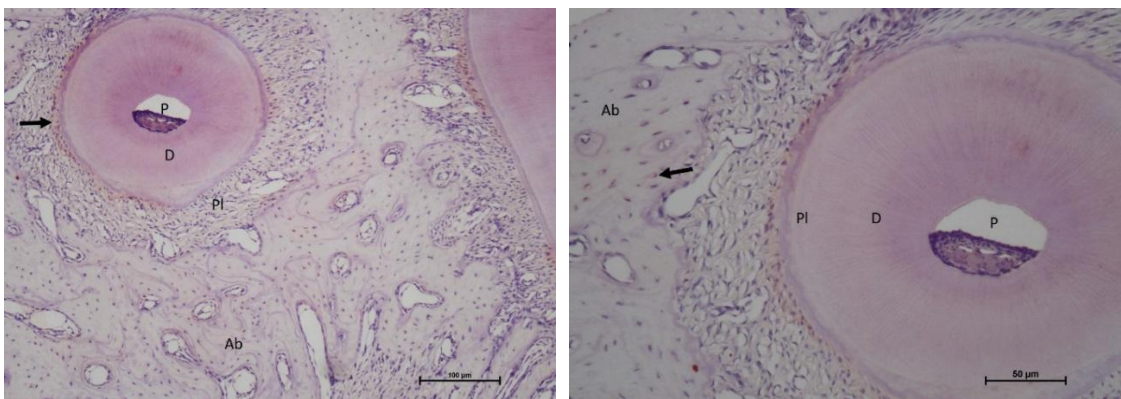
Şekil 4.29. Kontrol 3 grubunun: Diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20



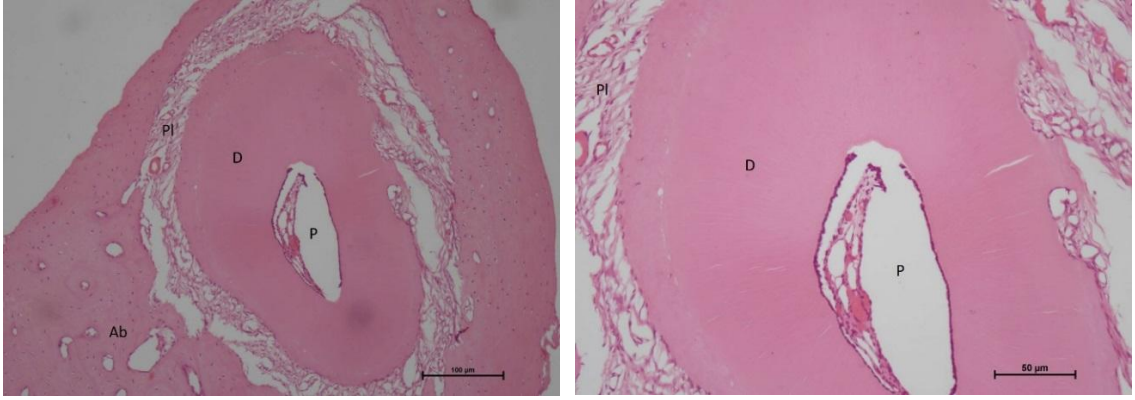
Şekil 4.30. Kontrol 3 grubunda diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20



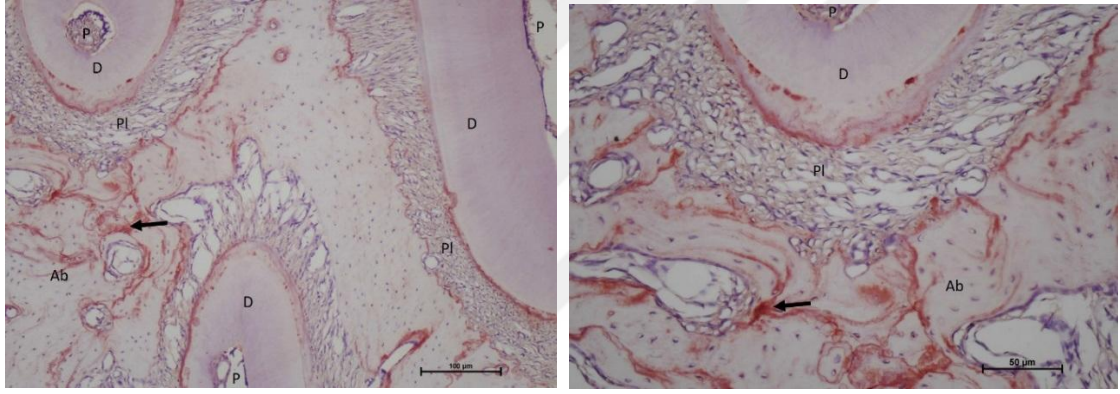
Şekil 4.31. Kontrol 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20



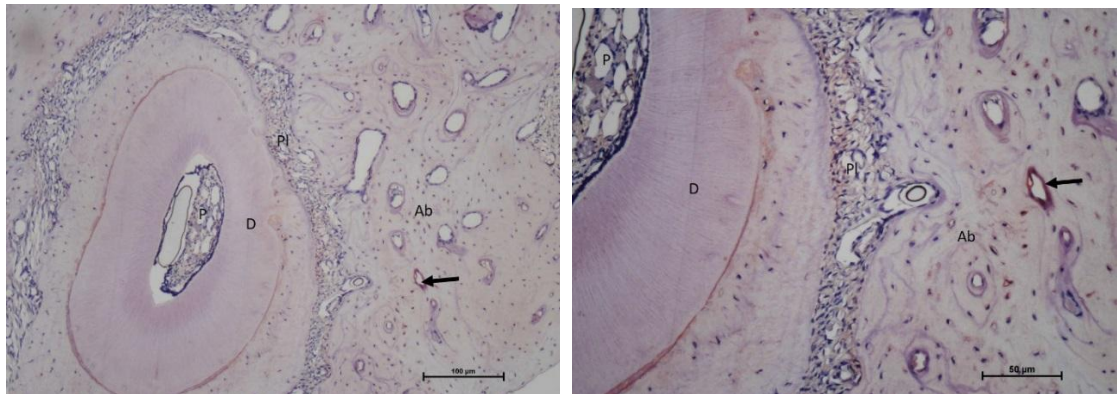
Şekil 4.32. Kontrol 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20



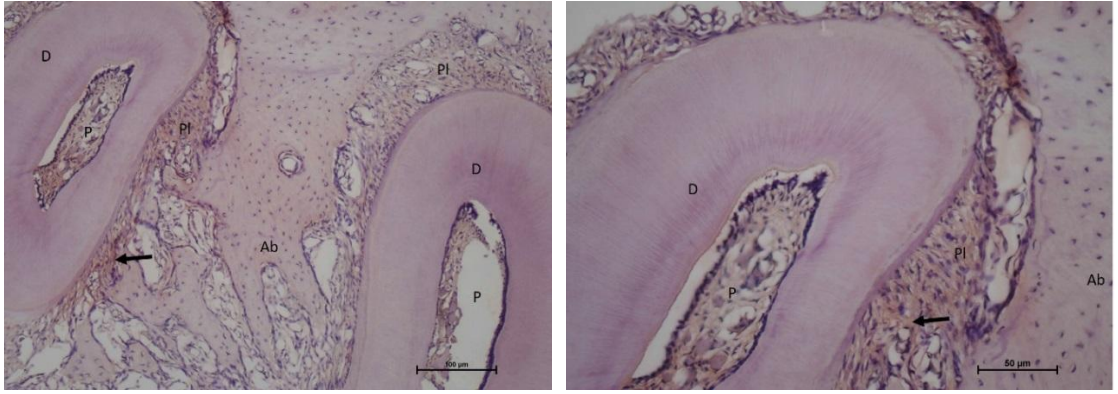
Şekil 4.33. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab). H&E, x10 ve x20



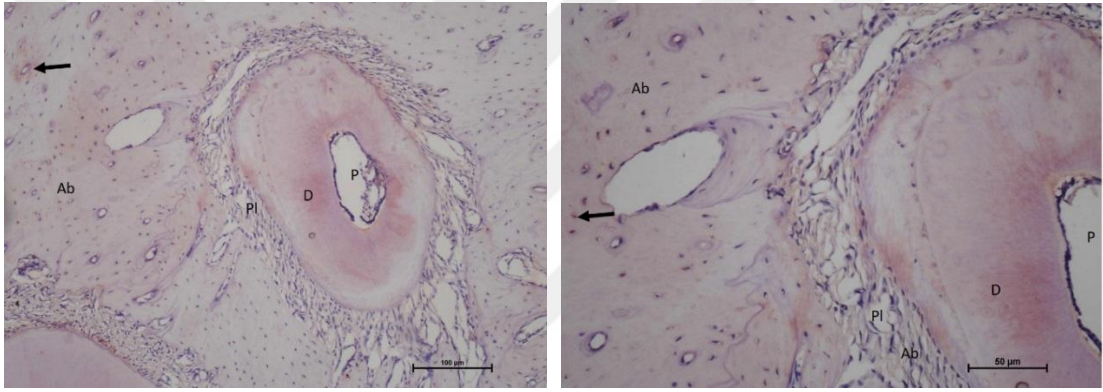
Şekil 4.34. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-OPN, IHC, x10 ve x20



Şekil 4.35. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-BSPII, IHC, x10 ve x20



Şekil 4.36. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-DMP-1, IHC, x10 ve x20



Şekil 4.37. KBY 3 grubunun diş pulpası (P), dentin (d), periodantal ligament (Pl), alveol kemiği (Ab), pozitif immunreaktivite (ok). Anti-COL1A1, IHC, x10 ve x20

Kontrol gruplarıyla deney grupları arasındaki kıyaslama osteopontin, bone sialoprotein, dentin matriks protein 1 ve tip 1 kollajen dağılımı ve yoğunluğu ölçülerek yapıldı. Bu dört proteinin pulpa, dentin, periodontal ligament ve kemikteki dağılımları ölçülerek karşılaştırmalar yapıldı. Ayrıca histolojik kesitlerde kök çapı ile pulpa çapı ve bu ikisinin birbirine oranı gruplar arasında karşılaştırıldı.

Tablo 4.5. Osteopontinin dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması

OPN	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Pulpa	1,6±1,84	58,64±22,81	,000*	0,6±0,52	94±18,97	,000*	1,33±1,41	84±12,65	,000*
Dentin	9±4,59	4,91±3,73	0,039*	2,4±2,27	13,5±5,8	,000*	2,78±2,11	14±5,16	,000*
Periodontal Lig.	75±23,69	59,09±18,14	0,166	52±15,49	110±21,6	,000*	35,56±11,3	108±19,32	,000*
Alveol Kemik	32±12,29	50±14,14	0,006*	24±9,66	113±41,65	0,002*	26,67±7,07	124±20,66	,000*
Toplam	117,6±31,02	172,64±42,38	0,003*	79±16,18	330,5±43,87	,000*	61,89±9,83	330±36,51	,000*

***p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.**

Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol grupları ile KBY gruplarının osteopontin dağılımı açısından karşılaştırılması Tablo 4.5'teki gibidir. Buna göre kontrol 1 ve KBY 1 gruplarındaki deneklerde pulpa, dentin, alveol kemik ve toplam ölçümlerde osteopontin için anlamlı farklılıklar görüldü. KBY 1 grubunda pulpa ($p=0,000$), alveol kemiği ($p=0,006$) ve toplam ($p=0,003$) değerlerde osteopontin kontrol 1 grubuna göre daha yüksek bulunurken; dentinde osteopontin miktarı KBY 1 grubunda kontrol 1 grubuna göre daha düşük bulundu ($p=0,039$). Periodontal ligamentte ise KBY 1 ve kontrol 1 grupları arasında osteopontin dağılımı açısından fark bulunmadı.

Kontrol 2 ve KBY 2 gruplarındaki deneklerde pulpa, dentin, peridontal lig, alveol kemik ve toplam ölçümlerde osteopontin için anlamlı farklılık saptandı. KBY 2 grubundaki deneklerde osteopontin miktarı pulpa ($p=0,000$), dentin ($p=0,000$), peridontal lig ($p=0,000$), alveol kemik ($p=0,002$) ve toplam ($p=0,000$) ölçümlerde kontrol 2 grubundakilerden daha yüksek bulundu. KBY 3 grubundaki deneklerde de pulpa ($p=0,000$), dentin ($p=0,000$), peridontal ligament ($p=0,000$), alveol kemik ($p=0,000$) ve toplam ($p=0,000$) ölçümlerde osteopontin miktarı kontrol 3 grubundakilerden daha yüksek bulundu.

Tablo 4.6. Bone sialoproteininin dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması

BSP	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Pulpa	1,6±1,84	15±12,45	,000*	2,1±3,11	46±12,65	,000*	2,89±3,18	39±12,87	,000*
Dentin	2,6±2,07	3,82±4,14	0,745	3,5±3,84	48±11,35	,000*	3,78±3,07	43±9,49	,000*
Periodontal Lig.	2,6±2,07	13,18±5,6	,000*	2,3±2,98	76±15,78	,000*	2,44±3,13	110±23,57	,000*
Alveol Kemik	15±5,27	13,64±5,05	0,538	16±6,99	44±11,74	,000*	12,22±4,41	59±12,87	,000*
Toplam	21,8±6,22	45,64±11,33	,000*	23,9±8,01	214±23,19	,000*	21,33±6,84	251±24,7	,000*

*p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.

Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol grupları ile KBY gruplarının bone sialoprotein dağılımı açısından karşılaştırılması Tablo 4.6'daki gibidir. KBY 1 grubunun kontrol 1 grubuna göre pulpada ($p=0,000$), periodontal ligamentte ($p=0,000$) ve genel toplamda ($p=0,000$) daha fazla bone sialoprotein içerdiği tespit edildi. Dentin ve alveol kemikte ise bu iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı. KBY 2 grubunda ise tüm bölgelerde ve genel toplamda bone sialoprotein miktarı, kontrol 2 grubuna göre anlamlı ölçüde fazla bulundu ($p=0,000$). KBY 3 grubunda da aynı şekilde tüm bölgeler için sonuçlar kontrol 3 grubundan yüksek bulundu ($p=0,000$).



Tablo 4.7. Tip 1 kollajenin dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması

Tip 1	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
Kollajen	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Pulpa	2,2±1,93	37,73±13,67	,000*	4±3,65	47±11,6	,000*	4,89±4,17	41±9,94	,000*
Dentin	15±5,27	20±6,33	0,072	15±5,27	22±6,33	0,021*	15,56±5,27	39±11,97	,000*
Periodontal Lig.	20±8,17	28,18±11,68	0,105	21±7,38	30±9,43	0,045*	20±7,07	32±9,19	0,011*
Alveol Kemik	14±5,16	18,18±6,03	0,111	19±7,38	21±7,38	0,538	14,44±5,27	40±11,55	,000*
Toplam	51,2±10,04	104,09±24,17	0,001*	59±11,11	120±20	,000*	54,89±12,24	152±16,87	,000*

***p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.**

Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol grupları ile KBY gruplarının tip 1 kollajen dağılımı açısından karşılaştırılması Tablo 4.7'deki gibidir. Tip 1 kollajen miktarı KYB 1 grubunda kontrol 1 grubuna göre pulpada ($p=0,000$) ve genel toplamda ($p=0,001$) daha yüksek bulundu. KYB 2 grubunda ise pulpada ($p=0,000$), dentinde ($p=0,0021$), periodontal ligamentte ($p=0,0045$) ve genel toplamda ($p=0,000$) kontrol grubuna göre yüksek bulundu ($p<.05$). KYB 3 grubunda ise tüm bölgelerde ve genel toplamda tip 1 kollajen miktarı kontrol 1 grubuna göre yüksek bulundu ($p=0,000$).



Tablo 4.8. Dentin matriks protein-1 dokular arasındaki dağılımının karşılaştırılması

DMP-1	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Pulpa	7±2,58	38,18±13,28	,000*	4,8±3,29	38±10,33	,000*	3,33±3,16	61±11,01	,000*
Dentin	14±5,16	18,18±8,74	0,233	13±4,83	20±6,67	0,019*	14,44±5,27	26±6,99	0,002*
Periodontal Lig.	15±5,27	20±8,94	0,184	20±6,67	19±7,38	0,737	17,78±4,41	47±9,49	,000*
Alveol Kemik	2,2±1,93	31,91±16,43	,000*	2,2±1,93	36±11,74	,000*	2,33±2	40±13,33	,000*
Toplam	38,2±6,32	108,27±32,26	0,001*	40±8,12	113±17,03	,000*	37,89±7,22	176±16,47	,000*

***p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.**

Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol grupları ile KBY gruplarının dentin matriks protein-1 dağılımı açısından karşılaştırılması Tablo 4.8'deki gibidir. DMP-1 dağılımı KBY 1 grubunda kontrol 1 grubuna göre pulpada ($p=0,000$), alveol kemikte ($p=0,000$) ve genel toplamda ($p=0,001$) daha yüksek bulundu. KBY 2 grubunda ise kontrol 2 grubuna göre periodontal ligament bölgesi hariç olmak üzere tüm bölgelerde DMP-1 daha yüksek bulundu ($p=0,000$). KBY 3 grubunda ise tüm bölgelerde DMP-1 kontrol 3 grubuna göre daha yüksek bulundu ($p=0,000$).



Tablo 4.9. Pulpa çapı ve diş çapı ölçümlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Ölçüm	Kontrol 1	KBY 1	p	Kontrol 2	KBY 2	p	Kontrol 3	KBY 3	p
	Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss		Ort±ss	Ort±ss	
Pulpa Çapı	169,65±8,79	176,48±7,53	0,067	172,24±14,62	161,9±6,47	0,086	173,58±7,39	154,74±6,78	0,001*
Diş Çapı	402,99±9,22	404,67±8,87	0,65	415,01±16,74	410,34±9,63	0,683	400,1±10,01	407,99±8,78	0,121
Oran	2,38±0,13	2,29±0,09	0,181	2,42±0,16	2,54±0,1	0,034*	2,31±0,06	2,64±0,09	,000*

*p<.05; Mann-Whitney U Testi kullanıldı.

Dikey Dikey sütunlarda deney grupları sadece kendi kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. p<0.05 değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kontrol 1 ve KBY 1 gruplarındaki deneklerin diş çapı, pulpa çapı ve bunların birbirine oranlarında arasındaki ilişki Tablo 4.9’da gösterilmiştir. Kontrol 1 ve KBY 1 gruplarındaki deneklerin diş çapı, pulpa çapı ve bunların birbirine oranlarında arasında farklılık yoktur ($p=0,067$, $p=0,65$, $p=0,181$). Kontrol 2 ve KBY 2 gruplarındaki deneklerin diş çapı ve pulpa çapı ölçümleri arasında da farklılık yoktur ($p=0,086$, $p=0,683$). Ancak bu değerlerin birbirine oranında KBY 2 grubu daha yüksek bulunmuştur($p=0,034$). KBY 3 grubunda ise diş çapında kontrol 3 grubu ile fark bulunmazken ($p=0,121$), pulpa çapı daha düşük bulunmuştur ($p=0,001$). Diş çapının pulpa çapına oranı da KBY 3 grubunda kontrol 3 grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p=0,000$).

Tablo 4.10. KBY grupları arasında histolojik ölçümlerinin karşılaştırılması

Ölçüm	^A KBY 1	^B KBY 2	^C KBY 3	p	Fark
	Ort±ss	Ort±ss	Ort±ss		
Pulpa Çapı	176,48±7,53	161,9±6,47	154,74±6,78	,000*	A>B>C
Diş Çapı	404,67±8,87	410,34±9,63	407,99±8,78	0,358	
Oran	2,29±0,09	2,54±0,1	2,64±0,09	,000*	C>B>A
OPN					
Pulpa	58,64±22,81	94±18,97	84±12,65	0,001*	B,C>A
Dentin	4,91±3,73	13,5±5,8	14±5,16	0,001*	B,C>A
Periodontal Lig.	59,09±18,14	110±21,6	108±19,32	,000*	B,C>A
Alveol Kemik	50±14,14	113±41,65	124±20,66	,000*	B,C>A
Toplam	172,64±42,38	330,5±43,87	330±36,51	,000*	B,C>A
BSP					
Pulpa	15±12,45	46±12,65	39±12,87	,000*	B,C>A
Dentin	3,82±4,14	48±11,35	43±9,49	,000*	B,C>A
Periodontal Lig.	13,18±5,6	76±15,78	110±23,57	,000*	C>B>A
Alveol Kemik	13,64±5,05	44±11,74	59±12,87	,000*	C>B>A
Toplam	45,64±11,33	214±23,19	251±24,7	,000*	C>B>A
Tip 1 kollajen					
Pulpa	37,73±13,67	47±11,6	41±9,94	0,261	
Dentin	20±6,33	22±6,33	39±11,97	0,001*	C>A,B
Periodontal Lig.	28,18±11,68	30±9,43	32±9,19	0,66	
Alveol Kemik	18,18±6,03	21±7,38	40±11,55	,000*	C>A,B
Toplam	104,09±24,17	120±20	152±16,87	,000*	C>A,B
DMP-1					
Pulpa	38,18±13,28	38±10,33	61±11,01	,000*	C>A,B
Dentin	18,18±8,74	20±6,67	26±6,99	0,042*	C>A,B
Periodontal Lig.	20±8,94	19±7,38	47±9,49	,000*	C>A,B
Alveol Kemik	31,91±16,43	36±11,74	40±13,33	0,513	
Toplam	108,27±32,26	113±17,03	176±16,47	,000*	C>A,B

* $p<0.05$; Kruskal Wallis Testi kullanıldı.

Dikey sütunlar birbirleriyle karşılaştırılmış olup $p<0.05$ değerleri istatistiksel farklılığı göstermektedir

KBY gruplarının tüm parametreler için kendi aralarında karşılaştırılması Tablo 4.10'da verilmiştir. KBY grupları arasında deneklerin diş çapı ölçüm ortalamaları bakımından anlamlı farklılık yoktur. KBY 1 grubundaki deneklerin pulpa çapı ölçüm ortalaması KBY 2 grubundan, KBY 2 grubundaki pulpa çapı ölçümleri ise KBY 3 grubundakilerden daha yüksektir($p=0,000$). Diş çapının pulpa çapına oranında da yine KBY 3 grubu KBY 2 grubundan, KBY 2 grubu da KBY 1 grubundan daha yüksektir ($p=0,000$).

Deney grupları arasında osteopontin dağılımları karşılaştırıldığında tüm bölgeler ve genel toplamda KBY 1 grubu KBY 2 ve KBY 3 gruplarından daha düşük bulundu($p=0,001$). KBY 2 ve KBY 3 grupları arasında ise anlamlı bir fark yoktur.

Bone sialoprotein dağılımı deney grupları arasında karşılaştırıldığında pulpa ve dentin bölgesi için KBY 1 grubu KBY 2 ve KBY 3 gruplarından daha düşük bulundu($p=0,000$). KBY 2 ve KBY 3 grupları arasında ise benzer sonuçlar görüldü. Periodontal ligament, alveol kemik ve genel toplamda bone sialoprotein dağılımına bakıldığında ise KBY 3 grubu KBY 2 grubundan, KBY 2 grubu da KBY 1 grubundan yüksek bulundu ($p=0,000$).

Tip 1 kollajenin dokulardaki dağılımına bakıldığında pulpa ve periodontal ligament bölgeleri için deney grupları arasında fark bulunmadı. Dentinde ($p=0,001$), alveol kemikte ($p=0,000$) ve genel toplamda ($p=0,000$) tip 1 kollajen değerleri ise KBY 3 grubunda KBY 2 ve KBY 1 grubuna göre yüksek bulunurken, KBY 2 ve KBY 1 grupları arasında fark görülmedi.

Dentin matriks protein 1 dağılımı karşılaştırıldığında alveol kemik bölgesi için üç deney grubu arasında fark görülmedi. Pulpada ($p=0,000$), dentinde ($p=0,042$), periodontal ligamentte ($p=0,000$) ve genel toplamdaki ($p=0,000$) değerlere bakıldığında ise KBY 3 grubu KBY 2 ve KBY 1 gruplarından yüksek bulundu. KBY 2 ve KBY 1 grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi.

5. TARTIŞMA

Kronik böbrek yetmezliği böbreklerin işlevlerini sürdürememesi sonucu ortaya çıkan ve birçok organ sistemini etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. KBY vücutta mineral dengesizliklerine, özellikle de kalsiyum ve fosfor düzeylerinde anormal değişikliklere yol açar [12]. Bu durum da kemik ve diş dokularında kalsifikasyon süreçlerini etkileyebilir. Bu bağlamda KBY'nin diş dokuları ve iskelet sistemindeki olası kalsifikasyon süreci ile olan ilişkisini incelemek bu durumun patofizyolojik mekanizmalarını ortaya koymak için gereklidir. Ratlarda böbrek patolojileri insanlardakine benzer şekilde seyrettiğinden KBY araştırmalarında rat türleri sıklıkla kullanılmaktadır[88-90]. Çalışmamızda da hem uygun doku, boyut ve anatomiye sahip olması nedeniyle hem de filogenetik skaladaki sıralamasının düşük olması nedeniyle *wistar albino* türü ratların kullanılması tercih edilmiştir.

KBY'nin patolojik mekanizmalarını açıklamak için nefrektomi, diyabetik nefropati, hipertansiyon kaynaklı böbrek hasarı ve primer glomerüler nefropati gibi çok sayıda hayvan modeli geliştirilmiş ve kullanılmıştır [91-98]. Bunların dışında yaygın olarak kullanılan bir başka yöntem de adenin uygulaması ile KBY oluşturulmasıdır [73, 95, 99, 100]. Adenin indüksiyonu yöntemi, adenin dozajı ve uygulama süresine göre değişen, stabil bir hastalık seyri ve yüksek bir başarı oranına sahip hafif, orta ve şiddetli kronik böbrek modellerinin üretilmesine olanak tanır [73, 100]. Ayrıca nefrektomi gibi yöntemlerin aksine, cerrahi olmayan ve hayvan dostu olan basit bir gavaj veya diyetle uygulanabilir. Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda KBY oluşumu için adenin uygulaması seçilmiş ve 80 mg/kg adenin 28 gün boyunca her gün günde bir defa orogastrik gavaj yoluyla uygulanmıştır [101].

Çalışmamızda elde edilen kemik bloklarında kemik ve dentin yoğunluklarının ölçümü için mikro-BT kullanılmıştır. Mikro-BT sistemi, X-ışını kaynakları ve yüksek çözünürlüklü dedektörler kullanarak, numunelerin 3B olarak yeniden yapılandırılmış görüntülerini üretmek için projeksiyonların birden fazla görüntüleme yönü boyunca döndürülmesine olanak tanır [83]. Görüntüleme süreci tahribatsız olduğundan, aynı numunenin iç özellikleri birçok kez incelenebilir ve numuneler ek biyolojik ve mekanik testler için taramadan sonra da kullanılabilir kalır. Çalışmamızda da bu sebeplerden dolayı görüntüleme yöntemi olarak mikro-BT seçilmiştir. Bunun yanında mikro BT

incelemesi dokularda hücresele düzeyde meydana gelen değışiklikleri göstermede yetersiz olduğundan, dokulardaki incelemeler immünohistokimyasal olarak da yapılmıştır.

Çalışmamızda KBY'nin diş dokuları ve trabeküler kemikteki mineralizasyon ile arasındaki ilişki zamana bağılı olarak üç grupta incelenmiştir. KBY oluşturulan deney gruplarında kontrol gruplarına göre kemik ve dentin yoğunlukları üzerine yapılan incelemelerde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Diğer taraftan literatürde [102-105] kalsifikasyon süreçleri ile ilişkili olduğu sıklıkla gösterilen osteopontin, bone sialoprotein, dentin matriks protein 1 ve tip 1 kollajen gibi markerlar deney gruplarındaki incelemelerde kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek oranda tespit edilmiştir. Ayrıca histolojik kesitlerden elde edilen diş çapı ve pulpa çapının birbirine oranında da kontrol gruplarıyla kıyaslandığında deney gruplarında daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar KBY gruplarında pulpa çevresinde dentin formasyonunu ve sert dokularda mineralizasyon artışının altyapısının oluşturulduğunu gösterir niteliktedir. Bu yönüyle çalışmamızın sonuçları Mohamed ve ark. [106] fareler üzerinde mineral metabolizması üzerine yaptığı çalışmayla uyumludur. Çalışmamızda KBY gruplarında pulpa çapında görece bir azalma tespit edilirken, dentin yoğunluğunda bir artış saptanmamıştır. Bunun nedeni çalışmamızda incelenen dentin bölgelerinin koronal bölgede olması ve bu bölgedeki dentinin ağız içi streslerden daha fazla etkilenmesiyle ilgili olabilir. Bunun yanında çalışmamızda KBY üzerinden geçen 40 günlük sürede koronal dentinin mineralizasyon açısından etkilenmediği söylenebilir.

Osteopontin (OPN), kemik mineralizasyonu, bağışıklık düzenlemesi ve yara iyileşmesi gibi çok çeşitli süreçlerde fizyolojik etkileri olan, yaygın olarak ifade edilen bir proteindir. Osteopontinin, inflamasyonu ve fibrozisi teşvik etmesinin yanı sıra kalsiyum ve fosfat metabolizmasını etkileyerek çeşitli kronik böbrek yetmezliğinin çeşitli formlarının patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir [107]. Osteopontin seviyesinin KBY şiddeti ile paralel olarak artış gösterdiği ve bu proteinin KBY için önemli bir marker olduğu kabul edilmektedir [108].

Kemik dokusundaki OPN, kemik yapılanmasında rol oynayan osteoblastlar ve osteoklastlardan salınır. Osteoklastlardan salınan OPN'nin hidroksiapatiti inhibe ettiği bilinmektedir, bu da OPN'nin kemik yıkımıyla ilişkili olduğunu gösterir [41, 43]. Ancak, OPN'den yoksun sıçanlar üzerinde yürütölen bazı çalışmalarda sıçanların kemik ve diş gelişim süreçlerinde herhangi bir anormallik görülmemiştir [109, 110]. Bu çalışmalar, osseöz sialoprotein veya fibroneksiyon gibi diğer kemik matris proteinlerinin osseöz hücreler için gerekli yapışma ve sinyal işlevlerini yerine getirebileceğini göstermiştir

[45]. Çalışmamızda da OPN deney gruplarında, kontrol gruplarına göre yüksek olmasına rağmen kemik yoğunluklarında bir değişim saptanmamıştır. Dentin yoğunluklarına bakıldığında ise KBY 2 grubunun, kontrol 2 grubundan daha düşük yoğunlukta dentine sahip olduğu görülmüştür. KBY 2 grubunda kontrol 2 grubuna göre OPN proteininde görülen artış bu proteinin mineralizasyonu inhibe etme özelliği ile ilgili olabilir [111, 112]. Çalışmamız sonucu elde edilen osteopontin değerleri KBY gelişimi ve seyri ile ilgili yapılmış çok sayıdaki çalışmanın verileri ile uyumludur [113-116].

Çalışmamızda tip 1 kollajen, bone sialoprotein ve dentin matriks protein-1 dağılımları, KBY gruplarında kontrol grupları ile kıyaslandığında genel olarak daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca deney grupları arasında da KBY olduğu andan itibaren zamana bağlı olarak bu proteinlerin sert dokularda artış eğiliminde olduğu görülmüştür (Tablo 4.10). Bu proteinlerin artışı sert doku formasyonunu tetikleyerek bu dokuların daha kırılğan hale gelmelerine neden olabilir [117, 118].

Tip I kollajen, vücutta çeşitli dokuların ekstraselüler matrisinde bulunan ve organik matrisin yaklaşık %90'ını oluşturan başlıca yapısal proteindir [32, 119]. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, tip 1 kollajenin düzenli mineral birikimi için dinamik ve 3 boyutlu bir iskelet oluşturduğunu göstermiştir [120-122]. Hidroksiapatit (HA) ve kollajen fibrilleri, doğal kemik ve dentinin temel yapı taşlarını oluştururlar. Kollajen fibrillerinin mineralizasyonu, kemik ve dentin gibi sert dokuların yapısal ve mekanik işlevlerini sağlamada önemli bir rol oynar [123]. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre tip 1 kollajen KBY oluşturulduktan sonra sert dokularda ağırlıklı olarak artma eğilimindedir (Tablo 4.7). Bu artış deney gruplarımızdan sonuncusu olan KBY 3 grubunda daha bariz bir şekilde görülmektedir (Tablo 4.7). Tip 1 kollajendeki bu artış, bu dokularda meydana gelecek olan olası sert doku formasyonunun göstergesi olabilir. Dentin yoğunluğu bakımından KBY gruplarında bir artış söz konusu olmasa da, diş çapının pulpa çapına oranı KBY 2 ve KBY 3 gruplarında daha yüksektir. Bu orandaki artışın Mohamed ve ark. [106] çalışmasında gösterildiği gibi dentin formasyonu oluşumu sonucu gerçekleştiği görüldü.

Dentin matriks protein-1 (DMP1) ve bone sialoprotein de çalışmamızda incelenen ve KBY gruplarında artış gözlemlenen proteinlerdir. Bone sialoprotein(BSP), özellikle kemik ve sement olmak üzere mineralize dokularla ilişkili bir ekstraselüler matris (ECM) proteindir [124]. Bazı çalışmalar BSP eksikliği durumunda alveolar kemik hipomineralizasyonu ve periodontal yıkıma da katkıda bulunan hücresel olmayan sement hipoplazisi geliştiğini göstermiştir [125-128]. Dentin matriks proteini 1, dentin gibi

mineralize dokuların oluşumunda bilinen bir role sahip kollajen olmayan bir matriks proteinidir [58]. Dentin matriks protein 1'in (DMP1) dentin oluşumundaki rolü geçmişte birçok çalışmada gösterilmiştir [129-131].

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre osteopontin ve tip 1 kollajenin yanı sıra bone sialoprotein ve dentin matriks 1 proteinlerinde de deney gruplarında kemik ve diş dokularında anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Bu proteinlerdeki artış, deney gruplarındaki pulpa çapının diş çapına göre olan görece azalması ile birlikte değerlendirildiğinde dentin yapısının devam etmesi ile ilgili olabilir.

Bu sonuçlar kronik böbrek yetmezliğinde dental pulpadaki değişiklikleri inceleyen çok sayıdaki klinik çalışma ile uyumludur [13, 15, 16, 106]. KBY gelişen farelerde dentoalveolar değişiklikleri inceleyen bir çalışmada dentin miktarında artış ile beraber kemik düzensizlikleri saptanmıştır [106]. Son dönem böbrek hastaları üzerinde yapılan bir çalışmada ise premolar ve molar dişlerinde böbrek hastalığının kronikliği ile pulpa daralması arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur [16]. Dental radyolojik görüntüleme yöntemleri kullanılarak KBY hastalarında pulpal kalsifikasyonun araştırıldığı bir başka çalışmada sürece bağlı olarak kalsifikasyon artışı tespit edilmiştir [15]. Bunun yanında pulpa daralması ile KBY arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemeyen çalışmalar da mevcuttur [13, 14].

Ratlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda insan fizyolojisi ile karşılaştırıldığında yetişkin ratlardaki 1 günlük yaşam süresinin insandaki 30 günlük süreye denk geldiği belirtilmiştir [132-134]. Çalışmamızda kullanılan ratlar üzerinde yapılan KBY oluşturma protokolü düşünüldüğünde son deney grubunda (KBY 3) hastalık gelişiminden sonraki 40. gün sakrifikasyon işlemi yapılmıştır. Bu da insan fizyolojisine uyarlandığı zaman yaklaşık 3 senelik bir süreye denk gelmektedir. Bu süre içerisinde sert dokularda yoğunluk artışı gözlemlenmezken araştırılan proteinlerde anlamlı değişimler saptanmıştır. Hastalığın daha ileri evrelerinde kemik ve dentin gibi sert dokularda yoğunluk ve hacim artışının daha da şiddetlenmesi muhtemeldir [106, 135, 136].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kronik böbrek yetmezliğinin diş ve kemik dokuları üzerine zamana bağlı etkilerinin incelendiği bu hayvan deneyi çalışmasının sınırlamaları dâhilinde şu sonuçlara varılmıştır:

- Kronik böbrek yetmezliği hastalığının ilk evrelerinde kemik ve dentin yoğunluğu üzerinde anlamlı bir değişime sebep olmaz. Ancak odontoblastik aktivite artışı ile dentin formasyonunun üzerinde bir artış sağlayabilir.
- Kronik böbrek hastalığı kemik ve diş dokularında sert doku yapımı ile ilgili proteinlerden olan tip 1 kollajen, osteopontin, bone sialoprotein ve dentin matriks protein-1 seviyelerinde artışa neden olabilir. Bunun sonucu olarak dental dokular daha kırılgan hale gelebilir.
- KBY hastalarında yapılacak endodontik işlemler daha fazla zorluk ve başarısızlık riski içerdiğinden bu hasta grubunda daha sık diş hekimi kontrolleri yapılmalıdır.
- KBY hastalarında yapılacak endodontik işlemler kanalların daralmasına bağlı olarak daha fazla işlemsel hata riski barındırdığından, bu hastalarda daha kontrollü davranılmalı ve gerekirse ileri tekniklerin uygulanabilmesi için endodonti alanında uzman desteği alınmalıdır.
- KBY hastalarında endodontik yaklaşımlarda daha radikal tedavi tercihleri de göz önünde bulundurulmalıdır.
- Diş hekimleri hastaların ağız içi ve radyolojik dental muayeneleri sonucu henüz teşhis edilmemiş KBY şüphesi gördüğü durumlarda ilgili bölümlere hastayı yönlendirmelidirler.
- Bu çalışma KBY oluşturma protokolü, bekleme süresi, inceleme yöntemleri gibi parametreleri göz önünde bulundurularak daha ileri çalışmalara rehber olacaktır.

KAYNAKLAR

1. McCabe, P.S. and P.M. Dummer, *Pulp canal obliteration: an endodontic diagnosis and treatment challenge*. Int Endod J, 2012. **45**(2): p. 177-97.
2. Estrela, C., et al., *Root perforations: a review of diagnosis, prognosis and materials*. Braz Oral Res, 2018. **32**(suppl 1): p. e73.
3. Chaniotis, A. and R. Ordinola-Zapata, *Present status and future directions: Management of curved and calcified root canals*. 2022. **55 Suppl 3**: p. 656-684.
4. Goga, R., N.P. Chandler, and A.O. Oginni, *Pulp stones: a review*. Int Endod J, 2008. **41**(6): p. 457-68.
5. Loya, P.R. and P.P. Nikhade, *Correlation of Pulp Calcification and Cardiovascular Conditions: A Literature Review*. Cureus, 2023. **15**(10): p. e47258.
6. Parashar, S.R., et al., *ASSOCIATION OF PULP CALCIFICATIONS AND CARDIOVASCULAR DISEASE: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS*. J Evid Based Dent Pract, 2022. **22**(2): p. 101707.
7. Khojastepour, L., et al., *Can dental pulp calcification predict the risk of ischemic cardiovascular disease?* J Dent (Tehran), 2013. **10**(5): p. 456-60.
8. Takashima, A. and J. Miura, *Glycation promotes pulp calcification in Type 2 diabetes rat model*. 2024. **30**(2): p. 593-603.
9. Girndt, M., *[Diagnosis and treatment of chronic kidney disease]*. Internist (Berl), 2017. **58**(3): p. 243-256.
10. Brandenburg, V.M., A. Schuh, and R. Kramann, *Valvular Calcification in Chronic Kidney Disease*. Adv Chronic Kidney Dis, 2019. **26**(6): p. 464-471.
11. Hutcheson, J.D. and C. Goettsch, *Cardiovascular Calcification Heterogeneity in Chronic Kidney Disease*. 2023. **132**(8): p. 993-1012.
12. Cannata-Andía, J.B., et al., *Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorders: Pathogenesis and Management*. 2021. **108**(4): p. 410-422.
13. Çağlayan, F., S. Dağistan, and M. Keleş, *The osseous and dental changes of patients with chronic renal failure by CBCT*. Dentomaxillofac Radiol, 2015. **44**(5): p. 20140398.
14. Kansu, O., et al., *Can dental pulp calcification serve as a diagnostic marker for carotid artery calcification in patients with renal diseases?* Dentomaxillofac Radiol, 2009. **38**(8): p. 542-5.
15. Ganibegović, M., *Dental radiographic changes in chronic renal disease*. Med Arh, 2000. **54**(2): p. 115-8.
16. Galili, D., E. Berger, and E. Kaufman, *Pulp narrowing in renal end stage and transplanted patients*. J Endod, 1991. **17**(9): p. 442-3.
17. Kanjanabuch, P., et al., *Oral and radiographic findings in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis*. J Med Assoc Thai, 2011. **94 Suppl 4**: p. S106-12.
18. Yu, C. and P.V. Abbott, *An overview of the dental pulp: its functions and responses to injury*. Aust Dent J, 2007. **52**(1 Suppl): p. S4-16.
19. Sasaki, T. and P.R. Garant, *Structure and organization of odontoblasts*. Anat Rec, 1996. **245**(2): p. 235-49.
20. Jha, V., et al., *Chronic kidney disease: global dimension and perspectives*. Lancet, 2013. **382**(9888): p. 260-72.
21. Webster, A.C., et al., *Chronic Kidney Disease*. Lancet, 2017. **389**(10075): p. 1238-1252.
22. Ammirati, A.L., *Chronic Kidney Disease*. Rev Assoc Med Bras (1992), 2020. **66**Suppl 1(Suppl 1): p. s03-s09.
23. Moudgil, A. and A. Bagga, *Evaluation and treatment of chronic renal failure*. Indian J Pediatr, 1999. **66**(2): p. 241-53.

24. *KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney Int, 2024. **105**(4s): p. S117-s314.
25. *National Institute for Health and Care Excellence: Guidelines, in Chronic kidney disease in adults: assessment and management*. 2015, National Institute for Health and Care Excellence (NICE) Copyright © NICE 2020.: London.
26. Levin, A., et al., *Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease*. Kidney Int, 2007. **71**(1): p. 31-8.
27. Felsenfeld, A.J., B.S. Levine, and M. Rodriguez, *Pathophysiology of Calcium, Phosphorus, and Magnesium Dysregulation in Chronic Kidney Disease*. Semin Dial, 2015. **28**(6): p. 564-77.
28. Giachelli, C.M., *Vascular calcification: in vitro evidence for the role of inorganic phosphate*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(9 Suppl 4): p. S300-4.
29. Neunteufl, T., et al., *Impairment of endothelium-independent vasodilation in patients with hypercalcemia*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 396-401.
30. Li, Y.C., et al., *Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004. **89-90**(1-5): p. 387-92.
31. Amirrah, I.N. and Y. Lokanathan, *A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold*. 2022. **10**(9).
32. Selvaraj, V., et al., *Type 1 collagen: Synthesis, structure and key functions in bone mineralization*. Differentiation, 2024. **136**: p. 100757.
33. Vasikaran, S.D., et al., *Practical Considerations for the Clinical Application of Bone Turnover Markers in Osteoporosis*. Calcif Tissue Int, 2023. **112**(2): p. 148-157.
34. Oosterlaken, B.M., M.P. Vena, and G. de With, *In Vitro Mineralization of Collagen*. 2021. **33**(16): p. e2004418.
35. Naomi, R. and H. Bahari, *Natural-Based Biomaterial for Skin Wound Healing (Gelatin vs. Collagen): Expert Review*. 2021. **13**(14).
36. Boraschi-Diaz, I., et al., *Collagen type I as a ligand for receptor-mediated signaling*. Frontiers in Physics, 2017. **5**: p. 12.
37. Theocharis, A.D., et al., *Extracellular matrix structure*. Adv Drug Deliv Rev, 2016. **97**: p. 4-27.
38. Qin, C., O. Baba, and W.T. Butler, *Post-translational modifications of sibling proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis*. Crit Rev Oral Biol Med, 2004. **15**(3): p. 126-36.
39. Franzén, A. and D. Heinegård, *Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix*. Biochem J, 1985. **232**(3): p. 715-24.
40. Icer, M.A. and M. Gezmen-Karadag, *The multiple functions and mechanisms of osteopontin*. Clin Biochem, 2018. **59**: p. 17-24.
41. Mazzali, M., et al., *Osteopontin--a molecule for all seasons*. Qjm, 2002. **95**(1): p. 3-13.
42. Chen, Q., et al., *An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells*. Stem Cells, 2014. **32**(2): p. 327-37.
43. Yoshitake, H., et al., *Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 8156-60.
44. Ashkar, S., et al., *Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity*. Science, 2000. **287**(5454): p. 860-4.
45. Giachelli, C.M. and S. Steitz, *Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization*. Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 615-22.

46. Berezin, A.E. and A.A. Kremzer, *Circulating osteopontin as a marker of early coronary vascular calcification in type two diabetes mellitus patients with known asymptomatic coronary artery disease*. *Atherosclerosis*, 2013. **229**(2): p. 475-81.
47. Wesson, J.A., et al., *Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(1): p. 139-47.
48. Denhardt, D.T. and X. Guo, *Osteopontin: a protein with diverse functions*. *Faseb j*, 1993. **7**(15): p. 1475-82.
49. Coppola, D., et al., *Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 184-90.
50. Denhardt, D.T. and M. Noda, *Osteopontin expression and function: role in bone remodeling*. *J Cell Biochem Suppl*, 1998. **30-31**: p. 92-102.
51. Lenton, S., et al., *Dynamic footprint of sequestration in the molecular fluctuations of osteopontin*. 2015. **12**(110): p. 0506.
52. Reinholt, F.P., et al., *Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(12): p. 4473-5.
53. Baht, G.S., G.K. Hunter, and H.A. Goldberg, *Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation*. *Matrix Biol*, 2008. **27**(7): p. 600-8.
54. Holm, E., et al., *Loss of bone sialoprotein leads to impaired endochondral bone development and mineralization*. *Bone*, 2015. **71**: p. 145-54.
55. Somerman, M.J., et al., *Cell attachment activity of cementum: bone sialoprotein II identified in cementum*. *J Periodontal Res*, 1991. **26**(1): p. 10-6.
56. Ross, F.P., et al., *Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(13): p. 9901-7.
57. Razzouk, S., et al., *Osteopontin posttranslational modifications, possibly phosphorylation, are required for in vitro bone resorption but not osteoclast adhesion*. *Bone*, 2002. **30**(1): p. 40-7.
58. Orsini, G., et al., *Immunohistochemical localization of dentin matrix protein 1 in human dentin*. *Eur J Histochem*, 2008. **52**(4): p. 215-20.
59. Ye, L., et al., *Deletion of dentin matrix protein-1 leads to a partial failure of maturation of predentin into dentin, hypomineralization, and expanded cavities of pulp and root canal during postnatal tooth development*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 19141-8.
60. Qin, C., R. D'Souza, and J.Q. Feng, *Dentin matrix protein 1 (DMP1): new and important roles for biomineralization and phosphate homeostasis*. *J Dent Res*, 2007. **86**(12): p. 1134-41.
61. George, A., et al., *Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. Implications for induction of biomineralization*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(17): p. 12624-30.
62. D'Souza, R.N., et al., *Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo*. *J Bone Miner Res*, 1997. **12**(12): p. 2040-9.
63. Hirst, K.L., et al., *Cloning and expression analysis of the bovine dentin matrix acidic phosphoprotein gene*. *J Dent Res*, 1997. **76**(3): p. 754-60.
64. MacDougall, M., et al., *Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(2): p. 835-42.
65. Fisher, L.W., et al., *Small integrin binding ligand N-linked glycoprotein gene family expression in different cancers*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8501-11.
66. Terasawa, M., et al., *Expression of dentin matrix protein 1 (DMP1) in nonmineralized tissues*. *J Bone Miner Metab*, 2004. **22**(5): p. 430-8.
67. Ogbureke, K.U. and L.W. Fisher, *SIBLING expression patterns in duct epithelia reflect the degree of metabolic activity*. *J Histochem Cytochem*, 2007. **55**(4): p. 403-9.

68. Baba, O., et al., *Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(2): p. 163-70.
69. Toyosawa, S., et al., *Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(11): p. 2017-26.
70. Fen, J.Q., et al., *Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(10): p. 1822-31.
71. Narayanan, K., et al., *Dual functional roles of dentin matrix protein 1. Implications in biomineralization and gene transcription by activation of intracellular Ca²⁺ store*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17500-8.
72. Narayanan, K., et al., *Dentin matrix protein 1 regulates dentin sialophosphoprotein gene transcription during early odontoblast differentiation*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 19064-71.
73. Diwan, V., L. Brown, and G.C. Gobe, *Adenine-induced chronic kidney disease in rats*. Nephrology (Carlton), 2018. **23**(1): p. 5-11.
74. Diwan, V., et al., *Gender differences in adenine-induced chronic kidney disease and cardiovascular complications in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2014. **307**(11): p. F1169-78.
75. Yokozawa, T., H. Oura, and T. Okada, *Metabolic effects of dietary purine in rats*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 1982. **28**(5): p. 519-26.
76. Yokozawa, T., et al., *Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats*. Nephron, 1986. **44**(3): p. 230-4.
77. Klinkhammer, B.M., et al., *Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy*. 2020. **31**(4): p. 799-816.
78. Jia, T., et al., *A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice*. BMC Nephrol, 2013. **14**: p. 116.
79. Kieswich, J.E., et al., *A novel model of reno-cardiac syndrome in the C57BL/6 mouse strain*. BMC Nephrol, 2018. **19**(1): p. 346.
80. Dunn, P.M., *Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923), the discovery of x rays and perinatal diagnosis*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2001. **84**(2): p. F138-9.
81. Hounsfield, G.N., *Computerized transverse axial scanning (tomography). 1. Description of system*. Br J Radiol, 1973. **46**(552): p. 1016-22.
82. Jung, M., D. Lommel, and J. Klimek, *The imaging of root canal obturation using micro-CT*. Int Endod J, 2005. **38**(9): p. 617-26.
83. Swain, M.V. and J. Xue, *State of the art of Micro-CT applications in dental research*. Int J Oral Sci, 2009. **1**(4): p. 177-88.
84. Çivitçi, F. and A.M.M.D.H. Mikro, *Bt'nin Kullanım Alanları*. Dicle Dişhekimliği Dergisi, 2013. **14**(2): p. 279-284.
85. McCarty, K.S., Jr., et al., *Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies*. Arch Pathol Lab Med, 1985. **109**(8): p. 716-21.
86. Tadrous, P.J., *Diagnostic criteria handbook in histopathology: a surgical pathology vade mecum*. 2011: John Wiley & Sons.
87. Huynh-Do, U., M. Fiedler, and B. Vogt, *[Assessment of kidney function : Creatinine is not the whole story]*. Internist (Berl), 2018. **59**(1): p. 48-56.
88. Fernandes-Charpiot, I.M., et al., *Validation of an Experimental Model to Study Less Severe Chronic Renal Failure*. J Invest Surg, 2016. **29**(5): p. 309-15.
89. Li, F., et al., *Optimizing diabetic kidney disease animal models: Insights from a meta-analytic approach*. 2023. **6**(5): p. 433-451.
90. Yagil, Y., R. Levi-Varadi, and C. Yagil, *Genomic Research in Rat Models of Kidney Disease*. Methods Mol Biol, 2019. **2018**: p. 287-307.
91. Becker, G.J. and T.D. Hewitson, *Animal models of chronic kidney disease: useful but not perfect*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2013. **28**(10): p. 2432-2438.

92. Bao, Y.W., et al., *Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets*. Zool Res, 2018. **39**(2): p. 72-86.
93. Fu, Y., et al., *Rodent models of AKI-CKD transition*. Am J Physiol Renal Physiol, 2018. **315**(4): p. F1098-f1106.
94. Orlando, L.A., et al., *The chronic kidney disease model: a general purpose model of disease progression and treatment*. BMC Med Inform Decis Mak, 2011. **11**: p. 41.
95. Yang, Q., et al., *Adenine-induced animal model of chronic kidney disease: current applications and future perspectives*. Ren Fail, 2024. **46**(1): p. 2336128.
96. Singh, S., et al., *Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease*. Kidney Int, 2016. **90**(5): p. 985-996.
97. Alicic, R.Z., M.T. Rooney, and K.R. Tuttle, *Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities*. Clin J Am Soc Nephrol, 2017. **12**(12): p. 2032-2045.
98. Udani, S., I. Lazich, and G.L. Bakris, *Epidemiology of hypertensive kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(1): p. 11-21.
99. Patel, P., et al., *Roflumilast alleviates adenine-induced chronic kidney disease by regulating inflammatory biomarkers*. Eur J Pharmacol, 2023. **949**: p. 175731.
100. Claramunt, D., et al., *Animal models of pediatric chronic kidney disease. Is adenine intake an appropriate model?* Nefrologia, 2015. **35**(6): p. 517-22.
101. Guo, Y., et al., *Huangjinsan ameliorates adenine-induced chronic kidney disease by regulating metabolic profiling*. 2021. **44**(24): p. 4384-4394.
102. Foster, B.L., et al., *Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization*. Bone, 2018. **107**: p. 196-207.
103. Ritchie, H., *The functional significance of dentin sialoprotein-phosphophoryn and dentin sialoprotein*. Int J Oral Sci, 2018. **10**(4): p. 31.
104. Grawish, M.E., et al., *Demineralized Dentin Matrix for Dental and Alveolar Bone Tissues Regeneration: An Innovative Scope Review*. Tissue Eng Regen Med, 2022. **19**(4): p. 687-701.
105. Suzuki, S., et al., *Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues*. Arch Oral Biol, 2012. **57**(9): p. 1165-75.
106. Mohamed, F.F. and F. Amadeu de Oliveira, *Dentoalveolar Alterations in an Adenine-Induced Chronic Kidney Disease Mouse Model*. 2023. **38**(8): p. 1192-1207.
107. Sinha, S.K. and M. Mellody, *Osteopontin as a Biomarker in Chronic Kidney Disease*. 2023. **11**(5).
108. Kaleta, B., *The role of osteopontin in kidney diseases*. Inflamm Res, 2019. **68**(2): p. 93-102.
109. Liaw, L., et al., *Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1)*. J Clin Invest, 1998. **101**(7): p. 1468-78.
110. Rittling, S.R., et al., *Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(7): p. 1101-11.
111. Hoac, B., et al., *Mineralization-inhibiting effects of transglutaminase-crosslinked polymeric osteopontin*. Bone, 2017. **101**: p. 37-48.
112. Rodriguez, D.E., et al., *Multifunctional role of osteopontin in directing intrafibrillar mineralization of collagen and activation of osteoclasts*. Acta Biomater, 2014. **10**(1): p. 494-507.
113. de Borst, M.H. and J.J. Carrero, *Will osteopontin bridge the gap towards clinical application in chronic kidney disease?* Nephrol Dial Transplant, 2023. **38**(6): p. 1352-1354.
114. Vianello, E., et al., *Osteopontin: The Molecular Bridge between Fat and Cardiac-Renal Disorders*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(15).

115. Druck, A. and D. Patel, *Osteopontin Levels in Patients With Chronic Kidney Disease Stage 5 on Hemodialysis Directly Correlate With Intact Parathyroid Hormone and Alkaline Phosphatase*. 2019. **25**: p. 1076029619896621.
116. Schultheiss, U.T., *Nephrol Dial Transplant*.
117. Nickolas, T.L., M.B. Leonard, and E. Shane, *Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern*. *Kidney Int*, 2008. **74**(6): p. 721-31.
118. Iwasaki, Y., J.J. Kazama, and M. Fukagawa, *Molecular Abnormalities Underlying Bone Fragility in Chronic Kidney Disease*. 2017. **2017**: p. 3485785.
119. Roessler, P.P., et al., *Cartilage Regeneration with Cell-free Type 1 Collagen Matrix - Past, Present and Future (Part 1 - Clinical Aspects)*. 2021. **159**(6): p. 607-616.
120. Nudelman, F., et al., *The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors*. *Nat Mater*, 2010. **9**(12): p. 1004-9.
121. Wang, Y., et al., *The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite*. *Nat Mater*, 2012. **11**(8): p. 724-33.
122. Yao, S., et al., *A Biomimetic Model for Mineralization of Type-I Collagen Fibrils*. *Methods Mol Biol*, 2019. **1944**: p. 39-54.
123. Yu, L. and M. Wei, *Biomimetalization of Collagen-Based Materials for Hard Tissue Repair*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
124. Chavez, M.B., et al., *Bone Sialoprotein Is Critical for Alveolar Bone Healing in Mice*. 2023. **102**(2): p. 187-196.
125. Foster, B.L., et al., *Deficiency in acellular cementum and periodontal attachment in bsp null mice*. *J Dent Res*, 2013. **92**(2): p. 166-72.
126. Foster, B.L., et al., *Mineralization defects in cementum and craniofacial bone from loss of bone sialoprotein*. *Bone*, 2015. **78**: p. 150-64.
127. Soenjaya, Y., et al., *Mechanical Forces Exacerbate Periodontal Defects in Bsp-null Mice*. *J Dent Res*, 2015. **94**(9): p. 1276-85.
128. Ao, M., et al., *Overlapping functions of bone sialoprotein and pyrophosphate regulators in directing cementogenesis*. *Bone*, 2017. **105**: p. 134-147.
129. Moradian-Oldak, J. and A. George, *Biomimetalization of Enamel and Dentin Mediated by Matrix Proteins*. *J Dent Res*, 2021. **100**(10): p. 1020-1029.
130. He, G., et al., *Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1*. *Nat Mater*, 2003. **2**(8): p. 552-8.
131. Rangiani, A., et al., *Dentin matrix protein 1 and phosphate homeostasis are critical for postnatal pulp, dentin and enamel formation*. *Int J Oral Sci*, 2012. **4**(4): p. 189-95.
132. Gittes, R.F., *Carcinogenesis in ureterosigmoidostomy*. *Urol Clin North Am*, 1986. **13**(2): p. 201-5.
133. Klee, L.W., et al., *Long term effects of gastrectomy in rats*. *J Urol*, 1990. **144**(5): p. 1283-7.
134. Andreollo, N.A., et al., *Rat's age versus human's age: what is the relationship?* *Arq Bras Cir Dig*, 2012. **25**(1): p. 49-51.
135. Kanjevac, T., et al., *Impact of Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder on Jaw and Alveolar Bone Metabolism: A Narrative Review*. *Oral Health Prev Dent*, 2018. **16**(1): p. 79-85.
136. Iordanishvili, A.K., O.A. Belskikh, and O.L. Pikhur, *[Characteristics of dental hard tissues in chronic kidney disease: morphology, chemical composition, possibilities of remineralizing therapy]*. *Stomatologiya (Mosk)*, 2019. **98**(3): p. 25-30.