

Zeynep ÖZDOĞAN

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DENİZLİ-2025

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**ABALOPARATİD'İN POST-MENAPOZAL
SIÇANLARIN KALVARİYUMLARINDA
OLUŞTURULAN KRİTİK KEMİK DEFEKTLERİNDE
YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

Zeynep ÖZDOĞAN

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Alper KIZILDAĞ

DENİZLİ-2025

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

ABALOPARATİD'İN POST-MENAPOZAL
SIÇANLARIN KALVARİYUMLARINDA
OLUŞTURULAN KRİTİK KEMİK DEFEKTLERİNDE
YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ

Zeynep ÖZDOĞAN

PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Alper KIZILDAĞ

DENİZLİ-2025

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2023DİŞF010)

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Zeynep ÖZDOĞAN

İmza

TEŐEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca tecrübelerinden her zaman faydalandığım, çalışma disipliniyle bana yön veren, bilgisini paylaşmaktan kaçınmayan ve yol göstericiliğini esirgemeyen değerli tez danışman hocam sayın *Doç. Dr. Alper KIZILDAĞ*'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olan, bilgi ve deneyimleriyle her an desteğini hissettiren, yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, adaletini ve özverisini örnek aldığım hocam sayın *Doç. Dr. Aysan LEKTEMÜR ALPAN*'a

Bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan kaçınmayan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda sabrı ve hoşgörüsüyle bizleri her zaman anlayan hocam sayın *Doç. Dr. Gizem TORUMTAY CİN*'e,

Tez çalışmamda histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmelerde yardımlarından dolayı *Prof. Dr. Özlem ÖZMEN*'e

Tez çalışmamı 2023DİŞF010 BAP proje numarası ile destekleyen *Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (PAÜ BAP)*'na,

Birlikte çalışmaktan hep keyif aldığım, uzmanlık hayatımız süresince yan yana yürüdüğümüz ve bu zorlu süreci beraber sırtladığımız değerli eşkıdemlim *Arş. Gör. Necati ZAVRAK*'a

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, desteğini her zaman hissettiğim ve beraber güzel anılar paylaştığım sevgili arkadaşım *Arş. Gör. Tuğçe CAN*'a

Birlikte çalışmaktan ve aynı eğitim ortamını paylaşmaktan mutluluk duyduğum, tez sürecinde bana destek olan ve moral veren sevgili çalışma arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde bana sonsuz destek olan, sevgilerini her zaman üzerimde hissettiğim ve çok sevdiğim canım annem *Kehribar Turan*'a, canım babam *Halil Turan*'a, biricik ablam *Hatice Tanrıöver*'e, mutluluk kaynağım olan sevgili yeğenlerim *Erim Ata Tanrıöver* ve *Demir Alp Tanrıöver*'e ve tüm aileme,

Aldığım her kararda beni destekleyen, güçlü kalmamı sağlayan sevgili hayat arkadaşım *Hüseyin Mert ÖZDOĞAN*'a,

En içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada lokal olarak uygulanan abaloparatid'in (ABL) postmenopozal sıçanlarda oluşturulan kritik boyutlu kalvaryal defektlerde, tek ajan olarak ve otojen greft ile kombine halinde yeni kemik oluşumu üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Yöntem: Ovariektomi yapılmış otuz iki dişi sıçan 4 eşit gruba ayrıldı: Kontrol (K), abaloparatid (ABL), otojen (O), abaloparatid +otojen (ABL+ O). Tüm sıçanlara trefan frez ile 8 mm çapında kalvaryal defekt oluşturuldu. 8 hafta sonra, kemik rejenerasyonu mikro-BT ve histolojik analizler kullanılarak değerlendirilmiştir. Alkalin fosfataz (ALP), beta-katenin (β -katenin), kemik morfogenetik protein-2 (KMP-2), kolajen 1, osteokalsin, osteonektin, osterix (OST), osteoprotegerin (OPG), nükleer faktör-kappa B için reseptör ligandı (RANKL), dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

Bulgular: ABL ve O uygulanan gruplarda kemik iyileşmesine ilişkin parametrelerde K grubuna kıyasla anlamlı iyileşmeler saptanmıştır. ABL+O grubu, total iyileşme alanı, defekt kapanma oranı ve yeni kemik oluşumu açısından en yüksek değerlere ulaşmıştır. Histomorfometrik analizlerde osteoblast sayısının en yüksek, osteoklast sayısının ise en düşük olduğu grup ABL+O grubu olarak bulunmuştur. İmmünohistokimyasal analizlerde ALP, β -katenin, KMP-2, kolajen-1, osteokalsin, osteonektin, OST, OPG, RUNX2, TGF- β ve VEGF ekspresyonlarının ABL+O grubunda belirgin şekilde arttığı, RANKL ekspresyonunun ise K grubunda en yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Mikro-BT analizi, ABL+O grubunun kemik yoğunluğu (BV/TV), trabeküler kalınlık (Tb.Th) ve trabeküler sayısı (Tb.N) açısından en iyi sonuçlara sahip olduğunu göstermiştir.

Sonuç: ABL+O, post-menopozal sıçanlarda kritik boyutlu kemik defektlerinin iyileşmesini optimize ederek kemik rejenerasyonu üzerinde yüksek bir terapötik potansiyel göstermiştir. Bu bulgular, ABL+O'nun klinik uygulamalarda etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kalvaryal defekt, Rat, Otojen greft, Abaloparatid

ABSTRACT

Objective: This study examined the effect of locally administered abaloparatide (ABL), alone or combined with autogenous graft, on new bone formation in critical-sized calvarial defects in postmenopausal rats.

Method: Thirty-two ovariectomised female rats were divided into 4 equal groups: Control (C), abaloparatide (ABL), autogenous (O), abaloparatide + autogenous (ABL+O). An 8 mm diameter calvarial defect was created with a trepan drill in all rats. After eight weeks, bone regeneration was evaluated using micro-CT and histologic analyses. Alkaline phosphatase (ALP), beta-catenin (β -catenin), bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), collagen 1, osteocalcin, osteonectin, osterix (OST), osteoprotegerin (OPG), receptor ligand for nuclear factor-kappa B (RANKL), transforming growth factor-beta (TGF- β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were evaluated immunohistochemically.

Result: Significant improvements were found in the parameters related to bone healing in the ABL and O groups compared to the K group. ABL+O group reached the highest values in terms of total healing area, defect closure rate and new bone formation. Histomorphometric analysis showed that the ABL+O group had the highest number of osteoblasts and the lowest number of osteoclasts. Immunohistochemical analysis showed that ALP, β -catenin, BMP-2, collagen-1, osteocalcin, osteonectin, OST, OPG, RUNX2, TGF- β and VEGF expressions were significantly increased in the ABL+O group, while RANKL expression was highest in the K group. Micro-CT analysis showed that the ABL+O group had the best results in terms of bone density (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th) and trabecular number (Tb.N).

Conclusion: ABL+O showed a high therapeutic potential on bone regeneration by optimizing the healing of critical-sized bone defects in post-menopausal rats. These findings suggest that ABL+O may be an effective treatment option in clinical applications.

Keywords: Calvarial defect, Rat, Autogenous graft, Abaloparatide

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	XIII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KEMİĞİN YAPISI	3
2.1.1 Kemik Dokusu	3
2.1.2 Kemiğin Kimyasal Yapısı	5
2.1.3 Makroskopik Yapı	5
2.1.4 Mikroskopik Yapı: Kemik Hücreleri	5
2.1.5 Matris	9
2.1.6 Kemik Zarları	11
2.1.7. Kemik kanalları (Havers ve Volkman Sistemleri)	12
2.1.8. Kemik lamelleri	12
2.1.9 Kemik Türleri	13
2.1.10 Kemik Oluşumu (Ossifikasyon, Osteogenezis)	14
2.1.11 Kemiğin Büyümesi (Modeling) ve Yeniden Şekillenmesi (Remodeling)	17
2.1.12 Kemik Homeostazı	18
2.2 PERİODONTAL REJENERASYON VE KEMİK GREFTLERİ	28
2.2.1 Kemik Greftleri	29
2.3 POST-MENOPOZAL SEMPTOMLAR	35

2.3.1 Merkezi Sinir Sistemiyle İlgili Semptomlar	35
2.3.2 Kilo ve Metabolik Değişiklikler	36
2.3.3 Kas- İskelet Sistemi Semptomları	37
2.3.4 Ürogenital Semptomlar	37
2.3.5 Cilt, Mukoza ve Saç Değişiklikleri	38
2.3.6 Cinsel İşlev Bozukluğu	39
2.3.7 Kardiyovasküler Değişiklikler	39
2.3.8. Osteoporoz	40
2.4. ABALOPARATİD	47
2.4.1 Etki mekanizması	49
2.4.2 Yan etkiler	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Etik Kurul Onayı	51
3.2 Deney Hayvanı Sayısı ve Deney Grupları	51
3.3 Cerrahi Prosedür	52
3.4 Sıçanların Bakımı ve Sakrifiye Edilmesi	58
3.5 Histopatolojik ve Histomorfometrik İnceleme	58
3.6 İmmunohistokimyasal İnceleme	60
3.7 Mikro-BT analizleri	62
3.8 Enzime Bağlı İmmünosorbent Tahlili (ELISA)	63
3.9 İstatistiksel Değerlendirmeler	63
4.BULGULAR	64
4.1 Klinik Bulgular	64
4.2 Serum CTX Bulguları	64
4.3 Histopatolojik ve Histomorfometrik Bulgular	65
4.4 İmmunohistokimyasal Bulgular	67

4.4.1 ALP İmmunohistokimyasal Bulguları	67
4.4.2 β -katenin İmmunohistokimyasal Bulguları	68
4.4.3 KMP-2 İmmunohistokimyasal Bulguları	69
4.4.4 Kolajen 1 İmmunohistokimyasal Bulguları	70
4.4.5 Osteokalsin İmmunohistokimyasal Bulguları	71
4.4.6 Osteonektin İmmunohistokimyasal Bulguları	72
4.4.7 OST İmmunohistokimyasal Bulguları	73
4.4.8 OPG İmmunohistokimyasal Bulguları	74
4.4.9 RANKL İmmunohistokimyasal Bulguları	75
4.4.10 RUNX2 İmmunohistokimyasal Bulguları	76
4.4.11 TGF- β İmmunohistokimyasal Bulguları	77
4.4.12 VEGF İmmunohistokimyasal Bulguları	78
4.5 Micro-BT Bulguları	79
5.TARTIŞMA	85
6.SONUÇ	106
KAYNAKLAR	108
EKLER	139
Ek 1. ETİK KURUL ONAY FORMU	139
Ek 2. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

β	: Beta
ABL	: Abaloparatid
ALP	: Alkalen Fosfataz
AMPK	: AMP aktin protein kinaz
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
cAMP/PKA	: siklik adenzin monofosfat/ Fosfokinaz A
CTX	: C terminal telopeptid
DAB	: 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride
DBB	: Deproteinize Sığır Kemiği
DBBM	: Deproteinize Sığır Kemiği Minerali
DLX5	: Distal-less homeobox 5
DXA	: Dual X-ray absorpsiyometri
EDTA	: Etilenediamintetraasetik Asit
ELISA	: Enzime Bağlı İmmünosorbent Tahlili
EMA	: European Medicines Agency
ER	: Östrojen reseptörü
FDA	: Food and Drug Administration
FGF	: Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü

FMP	: Son Menstrual Periyot
FZD	: Frizzled
GPCR	: G-protein-bağlı reseptör
GSK-3β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
JAK/STAT	: Janus kinaz/ Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivasyonu
KMP	: Kemik Morfojenik Proteini
KMY	: Kemik Mineral Yoğunluğu
LGR4	: Lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein-bağlantılı reseptör 4
LRP	: Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili protein
MAPK	: Mitogenle aktive olan protein kinaz
M-CSF	: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MK-4	: Menaquinone-4
NFATc1	: Aktif T Hücresi c1'in Nükleer Faktörü
NF-κB	: Nükleer Kappa B
NTX	: N-telopeptid
OPG	: Osteoprotegerin
OST	: Osterix
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PG	: Prostaglandin
PI3K/AKT	: fosfoinozimid 3-kinaz /AKT
PINP	: Prokolajen Tip I N propeptid
PKA	: Protein Kinaz A
PTH	: Paratiroid Hormon
PTH1R	: Paratiroid Hormonu Reseptörü 1
PTHrP	: İnsan Paratiroid Hormonu ile İlişkili Protein
RANK	: Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B
RANKL	: Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B-Ligand
RUNX2	: Runt-bağlantılı Transkripsiyon Faktör 2
SERM	: Seçici östrojen reseptör modülatörleri
Sr	: Stronsiyum
TAK1	: TGF- β ile Aktive Edilen Kinaz 1
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TPTD	: Teriparatid
TRAF6	: TNF Reseptörüyle İlişkili Faktör 6
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 Kemik dokusunda bulunan hücre tipleri, şekil ve lokalizasyonları	5
Şekil 2.2 Kemik kanalları ve lamelleri	13
Şekil 2.3 İntramembranöz kemikleşme mekanizmasının şematik olarak gösterilmesi. a. Mezenşimal hücre agregasyonu. b. Ossifikasyon merkezinin oluşumu. c. Osteoblastlar tarafından osteoid oluşumu. d. Osteoidin kalsifikasyonu ve osteoblastların osteosite dönüşümü	15
Şekil 2.4 Endokondral kemikleşme mekanizmasının şematik olarak gösterilmesi a. Osteoprojenitör hücre agregasyonu. b. Hyalin kıkırdak kalıbının oluşumu. c. Primer ossifikasyon merkezinin oluşumu. d. Kan damarlarının penetrasyonu. e. Sekonder ossifikasyon merkezlerinin oluşumu. f. Gelişmiş tam bir kemik yapı.	16
Şekil 2.5 Kemik homeostazında RANKL/RANK/OPG sinyal sistemi.(1) Osteoblastlar tarafından üretilen RANKL, osteoklast progenitörlerindeki reseptörü RANK'a bağlanarak TRAF6 aracılığıyla MAPK, NF-κB ve PI3K/AKT sinyal yolu gibi hücre içi sinyal kaskadlarını başlatır ve NFATc1 ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanır. (2) RANKL'ın LGR4 ile bağlanması, GSK-3β yollarıyla NFATc1'i baskılar. (3) RANK'a bağlandıktan sonra RANKL, PI3K/AKT/mTOR yolunu aktive eder ve osteoblastta RUNX2'nin nükleer translokasyonunu teşvik eder. (4) OPG, RANKL için bir tuzak reseptördür ve RANK-RANKL bağlanmasını engeller.	22
Şekil 2.6 Wnt, KMP ve TGF-β sinyal yollarına genel bakış	26
Şekil 2.7 Abaloparatid'in aminoasit dizisi	49
Şekil 3.1 Sıçanların kalvaryumu tıraş edildi ve povidon-iyot solüsyonu uygulandı.	54
Şekil 3.2 Kesi atıldı ve ekartör ile yeterli görüş sağlandı.	55
Şekil 3.3 Trepan uçla frezleme sırasında serum fizyolojik ile soğutuldu.	55
	IX

Şekil 3.4 Defekt bölgesindeki kemik duramatere zarar verilmemeye özen gösterilerek çıkarıldı.	55
Şekil 3.5 Otojen kemik, dental kemik öğütücüsü ile öğütüldü.	56
Şekil 3.6 Otojen greft partikül haline getirildi. O ve ABL+O gruplarında kullanıldı	56
Şekil 3.7 Sol tarafta spongostana emdirilmiş (ABL grubu), Sağ tarafta otojen greftle karıştırılmış ABL	56
Şekil 3.8 Periostun 4/0 glikolid bazlı emilebilir suture ile dikildi.	57
Şekil 3.9 Kafa derisi basit suture tekniğinde 4/0 ipek suture ile dikildi.	57
Şekil 3.10 ABL dozları, 100µl (0,1 ml) hacim ayarlı otomatik pipet ile ayarlandı.	57
Şekil 3.11 Bruker SkyScan 1272 Mikro-BT Tarama Cihazı	62
Şekil 4.1 Gruplara ait histopatolojik görüntüler A: K grubunda defekt alanının görünümü (ok), yaygın bağ doku artışı, B: O grubunda defekt alanının görünümü (oklar), greft materyalleri, C: ABL grubunda defekt alanının görünümü (ok), belirgin bağ doku artışı ve rezidüel materyalleri, D: ABL+O grubunda defekt alanının görünümü (ok), bağ doku ve yeni kemik oluşumları ile rezorbe olmamış greft materyalleri, HE, Bar=100µm.	65
Şekil 4.2 Gruplara göre ALP ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde hafif ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde belirgin ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.	67
Şekil 4.3 Gruplara göre β-katenin ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde tüm hücrelerde ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda immunoekspresyonlarda (ok) artış, C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda artmış pozitif immunoekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.	68

Şekil 4.4 Gruplara göre KMP-2 ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar, B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 69

Şekil 4.5 Gruplara göre kolajen-1 ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 70

Şekil 4.6 Gruplara göre osteokalsin ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde çok hafif ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde hafifçe artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 71

Şekil 4.7 Gruplara göre osteonektin ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar, B: O grubunda defekt bölgesinde hafifçe artmış ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 72

Şekil 4.8 Gruplara göre OST ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde immunoekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 73

Şekil 4.9 Gruplara göre OPG ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde hafifçe artmış ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış

ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 74

Şekil 4.10 Gruplara göre RANKL ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde hafif şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 75

Şekil 4.11 Gruplara göre RUNX2 ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 76

Şekil 4.12 Gruplara göre TGF-β ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 77

Şekil 4.13 Gruplara göre VEGF ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm. 78

Şekil 4.14 K grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü 80

Şekil 4.15 O grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü 80

Şekil 4.16 ABL grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü 81

Şekil 4.17 ABL+O grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü 81

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1 Kemik dokusunun organik ve inorganik bileşenleri	10
Tablo 2.2 Büyüme faktörleri ve etki mekanizması	27
Tablo 2.3 ABL, Abaloparatid; TPTD, teriparatid; PTHrP(1–36), insan paratiroid hormonuyla ilişkili protein ve (PTH) (1–84 insan paratiroid hormonu)'nun birincil amino asit dizisi.	48
Tablo 3.1 Kontrol ve deney gruplarındaki hayvan sayıları	52
Tablo 4.1 CTX-I değerleri istatistiksel verileri	64
Tablo 4.2 Histomorfometrik verilerin istatistik analiz sonuçları	66
Tablo 4.3 İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları	79
Tablo 4.4 Mikro-BT istatistiksel analiz sonuçları	82

1. GİRİŞ

Diş kaybı, sinüs pnömatizasyonu, periodontal hastalıklar, maksillofasial travma ve ağız boşluğundaki çeşitli kist ve tümörler, kemik defektlerine yol açabilmektedir.¹ Oral cerrahinin önemli araştırma alanlarından biri, yaralanmış veya kaybolmuş kemik dokusunun rekonstrüksiyonudur; bu süreçte, ortaya çıkan kemik defektlerinin normal anatomik çerçeveyi koruyarak, boş alanı tamamlamak, estetik restorasyonları ve dental implantları mümkün kılmak için yeniden yapılandırılması gerekmektedir. Bu amaçla farklı greft materyalleri kullanılmakla birlikte, osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle otojen greftler “altın standart” olarak kabul edilmektedir.^{2, 3} Ancak donör saha morbiditesi ve rezorpsiyon riski, otojen greftlerin kullanımını sınırlandırabilmektedir.³⁻⁵

Kemik kaybının oranı ve miktarı, cinsiyet, hormonlar ve metabolizmadan etkilenmektedir. Özellikle menopoz sonrası dönemde azalan östrojen düzeyleri, kadınları kemik kaybı ve osteoporozla karşı daha duyarlı hâle getirmektedir.⁶ Postmenopozal dönemdeki kadınlarda osteoporoz, yaygın bir kemik kaybı hastalığıdır ve kemik kırılma riskini artırmaktadır; erkeklerde ise testosteron seviyesindeki azalma benzer olumsuz etkilere neden olabilmektedir.^{7, 8} Hormonların, kemik metabolizması üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Paratiroid hormonu (PTH) ve kalsitonin gibi hormonlar, kalsiyum dengesini düzenleyerek kemik dokusunun sürekli yenilenmesini sağlamaktadır. PTH'nin yüksek seviyeleri, kemik yıkımını hızlandırabilmekte ve bu da osteoporoz gibi kemik hastalıklarına yol açabilmektedir. Öte yandan, büyüme hormonu ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), kemik oluşumunu desteklediği ve kemik yoğunluğunu artırdığı görülmüştür; hormon dengesizlikleri, bu süreçlerin bozulmasına ve kemik kaybının artmasına yol açabilmektedir. Diyabet gibi kronik metabolik hastalıklar da kemik kalitesini ve yoğunluğunu bozarak kırık riskini arttırabilmektedir.^{9, 10}

Osteoporoz, sistemik bir metabolik kemik hastalığı olup kemik kütlelerinde azalma, kırılma riskinde artış ve mikroyapı hasarıyla karakterizedir.¹¹ Postmenopozal osteoporoz, östrojen eksikliği nedeniyle ortaya çıkarken, senil osteoporoz, enflamatuar süreçler, artmış PTH seviyeleri, kalsiyum ve D vitamini eksikliği veya osteoblast

disfonksiyonu gibi yaşlanma süreçleriyle ilişkilendirilmektedir.¹² Araştırmalar sistemik kemik kaybının diş kaybına yol açtığını göstermiştir. 60 yaş üzerindeki tüm bireylerin en az %40'ının osteoporozla ilişkili diş kaybı yaşadığı rapor edilmiştir. Ayrıca, yaş ilerledikçe mandibulada kortikal porozitenin arttığı, alveolar prosteze rezorpsiyonun daha aktif olduğu bulunmuştur. Ek olarak osteoporotik çene kemikleri ince, belirsiz trabeküllü olup, korteksin incelendiği görülmüştür. Senil ve postmenapozal osteoporozda lamina dura incelmış olarak gözlenmektedir.¹³

Bozulan kemik yapısı neticesinde, oral bölgede fonksiyon ve estetik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Bu fonksiyon ve estetik ihtiyacın karşılanabilmesi için yeni kemik yapımı gereksinim duyulmuş olup; bunun için lokal ve sistemik etkili ilaçlar ve materyaller kullanılmıştır.^{14, 15} Kemik defektlerinin daha iyi ve hızlı iyileşmesi için yapılan çalışmalarda, osteoporoz tedavisinde kullanılan ilaçlar, kemik morfojenik proteini (KMP), kök hücre, lazer ve ultrason uygulamaları gibi yöntemler kullanılmaktadır.¹⁶⁻¹⁹ Osteoporoz tedavileri, anti-resorptif ve osteoanabolik (teriparatid, abaloparatid, romosozumab) ajanları içermektedir.²⁰ Abaloparatid (ABL), menopoz sonrası osteoporoz tedavisi için yakın zamanda onaylanan insan paratiroid hormonu ile ilişkili proteinin (PTHrP) bir analogudur. ABL, osteoanabolik ilaç olan teriparatid (TPTD) benzeri bir kemik oluşumu uyarıcısıdır.²¹ ABL'in kemik üzerindeki etki mekanizmaları tam olarak anlaşılammıştır ancak PTH ve PTHrP dahil diğer ligandlara göre paratiroid hormonu reseptörü 1 (PTH1R)'e doğrudan-seçici bağlanması ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir.²² Etki mekanizmasının bir sonucu olarak, ABL'nin TPTD'e göre kemik rezorpsiyonunu arttırmadan, kemik oluşumunu, kemik kütleini ve kemik sertliğini arttırdığı düşünülmektedir.²³

Kritik boyutlu kalvaryal defekt modeli, kemik rejenerasyonu çalışmalarında yaygın kullanılan ve öngörülebilir sonuçlar sunan bir *in vivo* yöntem olarak tanımlanmaktadır.²⁴⁻²⁶ Bu çalışmanın amacı, lokal olarak uygulanan ABL'in postmenopozal sıçanlarda oluşturulan kritik boyutlu kalvaryal defektlerde, tek başına veya otojen greft ile kombine kullanımının yeni kemik oluşumuna etkisini immunohistokimyasal, histopatolojik ve radyografik açıdan araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİĞİN YAPISI

2.1.1 Kemik Dokusu

İskeletin en önemli yapısal bileşenlerinden biri olan kemik, insan vücudundaki en sert dokulardan biri olup ve kırıkdağın ardından darbelere karşı en dayanıklı doku olarak öne çıkmaktadır. Yumuşak dokulardan oluşan yapıları destekleyerek, yetişkin iskeletin temel bir parçası olarak işlev görmektedir.^{27, 28}

Kemik dokusunun organizmadaki başlıca görevleri şunlardır;

- *Mineral dengesinin korunması:* Kemikler, vücutta bulunan iyonların, özellikle kalsiyum (Ca++) ve fosforun (P-) depolandığı bir rezervuar görevi görerek, bu iyonların depolanmasını ve gerektiğinde kan dolaşımına düzenli bir şekilde salınımını sağlamaktadır.
- *Büyüme Faktörleri ve Sitokin Depolama:* IGF, Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF-β) ve KMP gibi çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin depolanması ve salınımı esasen kemik dokusu tarafından sağlanmaktadır. Bu maddeler, ihtiyaç duyulduğunda kan dolaşımına salınmaktadır.
- *Koruma:* Bazı kemikler, vücut içindeki hayati organları koruma işlevini üstlenmektedir. Kostalar ve kalvaryum kemikleri, bu hayati organları koruyan iskelet yapılarının örneklerindedir.
- *Hematopoez:* Kan üretimi ya da hematopoez, esas olarak kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücreler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca, koloni uyarıcı faktörler gibi hematopoietik büyüme faktörleri ile interlökinler ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi çeşitli sitokinler, hematopoietik hücrelerin eritrositler, lökositler ve trombositler gibi farklı kan hücre türlerine farklılaşmasını yönlendirmede önemli bir rol oynamaktadır.
- *Hareket:* Ekstremitelerde bulunan kemikler sayesinde vücudun hareket etmesi sağlanmaktadır.^{29, 30}

Kemik özelleşmiş bir bağ dokusu olarak tanımlanmaktadır. Diğer konnektif dokular gibi hücreler ve ekstraselüler matris içermektedir. Kemik, ekstraselüler matrisinin kalsifiye yapısıyla diğer bağ dokularından ayrılmaktadır.³¹ Mineralizasyon, kalsiyum fosfat bileşenlerinden oluşan hidroksiapatit kristallerinin oluşumu yoluyla gerçekleşmektedir.²⁷

Kemiğin yapısında önemli bir yer tutan kalsiyum fosfat minerali, kemiğe sertlik kazandırmakta iken, kolajen proteini ise kemiğin kırılmalara karşı elastik olmasını sağlamaktadır. Kemiğin baskı kuvvetlerine karşı dayanıklılığı 170 MPa seviyesindeyken, çekme kuvvetlerine karşı direnci 104-121 MPa arasında değişmekte olup, bu değerlerin daha düşük olduğu gözlemlenmektedir. Kırılma kuvvetlerine karşı direnç ise 51,6 MPa ile oldukça az olduğu belirtilmektedir.³²

Kemik; hücre içi kalsifiye materyal olan kemik matriksi ve 4 tip hücre tarafından oluşturulmaktadır. Osteoprogenitör hücreler; Osteositler (Greek. *Osteon*, kemik, + *kytos*, hücre) matriksin içindeki kavite (lakuna) içinde bulunmaktadır; osteoblastlar (*osteon* + Greek. *blastos*, jerm) matriksin organik yapılarını sentezlemektedir; osteoklastların (*osteon* + Greek. *klastos*, bozulmuş) ise kemik dokusunun rezorpsiyon ve yeniden yapılanmasında görev alan çok çekirdekli dev hücreler olduğu bilinmektedir (Şekil 2.1).³³ Metabolitler, kalsifiye dokudan difüze olamadıkları için, osteosit ve kan damarları arası alışveriş; matriksi perforasyon eden ince, silindirik aralıklar olan canaliculi (*L.canalis*, kanal) aracılığı ile gerçekleşmektedir. Tüm kemikler; osteojenik hücreler içeren, endosteum (iç yüzeydeki doku katmanları) ve periosteum (dış yüzeydeki doku katmanları) ile kaplıdır.³⁰

Sert bir doku olmasından dolayı kemikten mikrotom ile kesit alınmasının oldukça zor olduğu ve özel teknikler gerektirdiği gözlemlenmektedir. Hücre ve organik matriksin incelenebilmesi için yaygın olarak kullanılan teknik; standart fiksatiflerle kemiğin dekalsifiye edilmesi, kalsiyum şelasyonu yapan bir solüsyonla, örneğin etilenediamintetraasetik asit (EDTA) kullanılarak minerallerin ayrıştırılması ve bu dekalsifiye dokudan kesit alınıp boyanmasından oluşmaktadır.³⁰

2.1.4.1 Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler, periosteumun iç tabakası, haversian kanalları ve endosteumda bulunan embriyonik mezenşimden türeyen kaynak hücreler olarak tanımlanmaktadır. Yoğun kemik büyümesi dönemlerinde, bu hücrelerin mitoz yoluyla sayılarının arttığı ve osteoblastlara dönüşüm gösterdikleri gözlemlenmektedir. Ayrıca, mezenşim dışındaki kan doku monositlerinden de köken alarak osteoklastların öncüsü olma özellikleri olduğu belirlenmiştir. Kemik gelişimi sürecinde son derece aktif bir rol üstlendiği saptanmıştır. Düşük oksijen basıncı koşulları, osteoprogenitör hücrelerin kıkırdak oluşumuna katılacak hücreler olarak farklılaşmalarını tetikleyebilmektedir.^{28,}

35, 36

2.1.4.2 Osteoblastlar

Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşması sonucu ortaya çıkan, kübikten silindiriğe benzer görümlü ve küresel çekirdeğe sahip olan, kemik yapımında görevli temel hücreler olarak tanımlanmaktadır. Kemiğin tip 1 kollojen liflerini ve matriks proteinlerini sentezleyip salgılayarak, henüz kalsifiye olmamış olan osteoid dokuyu oluşturmaktadırlar. Osteoblastlar endoplazmik retikulum, golgi ve salgı veziküllerine sahiptirler ve kalsiyum bağlayan osteokalsin ve osteonektin, glikozaminoglikanlar, glikoproteinleri ve alkalin fosfataz (ALP) salgılamaktadırlar. ALP osteoblastların aktif olduklarını gösteren önemli bir enzimdir. Sitoplazmaları ALP enziminden zengin olup bu enzim, kalsiyumun kalsiyum fosfat halinde matrikste çökmesini sağlayarak matriksin kalsifikasyonunda görev almaktadır.^{28, 31, 37} Yeni kemik oluşumunun gerçekleştiği alanlarda, yüzeyde tek sıra halinde konumlanırlar. Hücre zarlarında yüksek düzeyde ALP aktivitesi mevcuttur. Osteoblastların kana bol miktarda ALP salgılaması, serumdaki bu enzimin seviyesini artırarak kemik oluşumu üzerinde önemli bir etki yaratmaktadır. Osteoblastlar tarafından yeni sentezlenmiş ve henüz kalsifiye olmamış kemik matriksine osteoid adı verilmektedir. Osteoblastlar, salgıladıkları bu osteoid doku içinde gömülü kalırlar ve matriks kalsifiye olunca faaliyetlerini azaltıp basıklaşarak birer osteosit haline dönüşürler. Osteoblastın ve osteositlerin, bölünme yeteneği olmayan hücreler olduğu bilinmektedir.

Bu hücreler, kemik matriksinin organik bileşenlerini (Tip I kolajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) üretmenin yanı sıra, PTH'ye bağlanan reseptörleri de sentezlemekte ve kemik dokusunun mineralizasyonuna katkıda bulunmaktadır. Ayrıca, komşu osteoblastlarla etkileşim kurabilmelerini sağlayan sitoplazmik uzantılara sahiptirler. Osteoblastların sentezledikleri matriks, hücreyi çevrelemeye başladığı anda bu uzantılar daha belirgin hale gelmektedir. Matriks üretimi sırasında bu hücreler, yoğun protein sentezi ve salgılama yapan hücrelere özgü ultrastrüktürel özellikler göstermektedirler. Osteoblastların kutuplaşmış hücreler olmaları, matriks salgısının daha önce oluşmuş kemik matriksiyle temas eden yüzeyden gerçekleşmesine olanak tanımaktadır. Böylece, yeni üretilmiş ancak henüz kalsifiye olmamış kemik matriksi, osteoblastlar ile daha eski kemik matriksi arasında bir katman oluşturmaktadır. Bu sürece "kemik apozisyonu" adı verilmektedir ve kalsiyum tuzlarının birikmesiyle süreç tamamlanmaktadır.^{27, 28, 38}

2.1.4.3 Osteositler

Osteoblastlardan türeyen osteositler, matriks lamelleri arasında yer alan lakunalar içinde konumlanmışlardır. Her bir lakunada tek bir osteosit bulunmaktadır. Osteositlerin sitoplazmik uzantıları, ince silindirik kanalcıklarla çevrelenmiştir. Komşu osteositler, sitoplazmik uzantıları aracılığıyla birbirleriyle hücresel bağlantılar kurarak iletişim sağlar ve besin maddelerinin hücreler arasında geçişini mümkün kılarlar. Osteositler ile kan damarları arasında gerçekleşen bazı moleküler değişimler, osteositler ile kemik matriksi arasında bulunan az miktardaki ekstraselüler madde aracılığıyla da gerçekleşmektedir. Bu değişim süreci, yaklaşık 15 hücrelik bir osteosit zincirine destek sağlamaktadır.²⁷

Osteositlerin varlığı, çevresindeki kemik matriks yapısının sürekliliği açısından son derece kritik bir öneme sahiptir. Kemiğin kimyasal ve mekanik çevresindeki değişikliklere hızlı bir şekilde yanıt verebilen bu hücrelerin, bu özellikleri sayesinde kemiğin çevresel değişkenlere uyum sağlamasında belirleyici bir rol oynadığı belirlenmiştir.

İn-vivo araştırmalar, mekanik stres uygulanan kemik dokusundaki osteositlerin glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesinin arttığını, buna karşın kemiğin kullanılmadığı, yani mekanik stresten yoksun kaldığı durumlarda kollejenaz aktivitesinin yükseldiğini göstermiştir. Osteositlerin ölümü, çevresindeki kemik matriksinin rezorpsiyonu için gerekli süreçlerin başlamasına neden olmaktadır.^{27, 39}

2.1.4.4 Osteoklastlar

Önceleri yalnızca kandan türetilen monositlerin birkaçının birleşimiyle meydana geldikleri ifade edilen bu hücrelerin, günümüzde kemik iliğinden kaynaklanan granülosit-makrofaj progenitör hücre tiplerinden olduğu belirtilmektedir.²⁸

Osteoklastlar polinükleer dev hücreleri olan bir tür makrofajdır. Bu hücrelerin boyutları 20 ile 100 mikrometre arasında değişirken, içerdii çekirdek sayısı 2 ile 50 arasında farklılık göstermektedir. Osteoklastlar, kemik yüzeyine yakın olan Howship lakunaları adı verilen sığ boşluklarda yer almaktadır.^{28, 40} Kemik matriksi, osteoblastlar tarafından sentezlenirken, osteoklastlar bu matrisi rezorbe etme işlevini üstlenmektedir.⁴⁰

Hücre sitoplazmasında, bazıları lizozomal özellikler gösteren karakteristik vakuoller bulunmaktadır. Bu sitoplazma, köpüklü, granüler ve hafif bazofilik bir görünüm sergilemektedir. Bu granüller, lizozomal enzimlerin bir belirteci olan asit fosfataz ile boyanabilmektedir. Elektron mikroskobu kullanılarak yapılan çalışmalar, osteoklastların kemik matrisine bakan hücre membranlarında birçok sitoplazmik uzantı ve mikrovillusun bulunduğunu ortaya koymuş ve bu duruma "dalgalı yüzey" tanımı getirilmiştir. Bu dalgalı yüzeyin hemen üzerinde, hücrenin kemik yüzeyine yapışmasını kolaylaştıran aktin filamentleri açısından zengin bir bölge yer almaktadır. Osteoklastlar, kemik protein matrisini rezorbe eden ve kalsifiye temel substansı serbest bırakan kolajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgılamaktadır. Sonuç olarak, osteoklastlarla temas halindeki kemik yüzeyleri kısmi olarak demineralize olma eğilimi gösterebilmektedir. Rezorpsiyon süreci tamamlandıktan sonra, osteoklastlar ya apoptoza uğrar ya da köken aldıkları öncül hücrelere dönüşerek ortadan

kaybolmaktadır.⁴⁰ Bu hücrelerin aktivitesi, PTH'den önemli ölçüde etkilenmektedir. Osteoblastların hücre zarlarında bulunan PTH reseptörleri bu hormonu bağladığında, osteoblastlar osteoprotegerin ligandını salgılar; bu ligand da osteoklast dönüşümünde etkili olarak rezorbsiyon yönünde bu hücreleri uyarmaktadır. PTH'nin salgılanmasındaki bir artış, osteoklastların aktivitesini artırarak kemik yoğunluğunda azalmaya yol açar; bu durum osteoporoz olarak tanımlanır. Öte yandan, tiroid hormonu olan kalsitonin, bu hücrelerin aktivitesini azaltma işlevi göstermektedir.²⁸

2.1.4.5 Kemik Yüzeyini Döşeyen Hücreler

Kemik yüzeyinde düzleşmiş ve uzamış bir biçimde bulunan, kemik yapımına katılmayan osteoblastlar, kemik yüzeyini kaplayan hücreler olarak tanımlanmaktadır.⁴¹ Bu hücreler, komşu hücrelerle ve osteositlerle sürekli bir iletişim içindedir. Yaş ilerledikçe, bu işçi hücrelerin sayısında bir azalma gözlemlenmektedir. Kemik yüzeyindeki bu pasif hücrelerin her zaman aktif osteoblastlara dönüşme potansiyeli olduğu bilinmektedir. Bu hücre tabakası, kemik içine çevre sıvılardan kalsiyum ve fosfatın giriş ve çıkışını düzenleyerek mineral dengesinin sağlanmasında önemli bir rol oynamakta ve uygun mikro ortamı koruyarak kemik kristallerinin büyümesini kontrol etmektedir.³³

2.1.5 Matris

Kemikte bulunan hücreler arası matriks, kemik dokusunun %98'lik önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Kemik matriksinde; su protein, mineral, tuz gibi birçok organik ve inorganik madde yer almaktadır. Kemik matriksi genellikle mineralize veya demineralize formlarda bulunmaktadır (Tablo 2.1).⁴²

Tablo 2.1 Kemik dokusunun organik ve inorganik bileşenleri⁴²

Kemik Dokusu Bileşeni	İçerik	Miktar
İnorganik Komponent (Kuru Kemik Ağırlığının %60'ı)	Hidroksiapatit [Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂]	%99
	Kalsiyum Fosfat	
Organik Komponent (Kuru kemik ağırlığının %40'ı)	Kolajen (Tip 1)	%90
	Non Kolajen matriks proteinleri	%10
	Büyüme Faktörleri ve sitokinler Proteoglikanlar	

Kemik matriksi, içerdiği kalsiyum ve fosfat ile kan kalsiyum seviyelerinin hemostatik regülasyonunu sağlamaktadır. Matriksin majör yapısal bileşenleri tip I kolajen ve daha az oranda tip V kolajenden oluşmaktadır. Bu kolajenler, kemik matriksinin yaklaşık %90'ını oluştururlar. Matriks ayrıca glikozaminoglikan formunda esas maddeler, osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi küçük glikoproteinler ve çeşitli sialoproteinler içermektedir. Glikoproteinler ve sialoproteinler, mineralizasyon sürecinde kalsiyumun bağlanmasında rol oynamaktadırlar.³¹ Matrikste bulunan glikoproteinlerden osteokalsin ve osteopontin, hidroksiapatitlere bağlanmakta ve ayrıca sialoproteinler gibi osteoblast ve osteositlerin matriks ile ilişkisini sağlamaya yardımcı olmaktadır. Hidroksiapatit kristalleri ile kolajenin birlikteliği, kemiğin sertliğini sağlamaktadır. Bu bileşenlerden birinin eksikliği durumunda, kemik kolay kırılabilir hale gelmektedir.

Osteokalsin, kemikte en fazla bulunan non-kolajen proteindir. Osteokalsin, PTH tarafından inhibe edilirken ve 1,25 dihidroksivitamin D tarafından stimüle edilen bir proteindir. Serum ve idrarda ölçülen osteokalsin düzeyleri, kemik döngüsünün (*turn-over*) önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir. Aynı zamanda Paget hastalığı, renal osteodistrofi ve hiperparatroidizm gözlemlenen olgularda, osteokalsin düzeyinin de arttığı görülmüştür.^{43, 44}

Osteonektin, kemikteki non-kolajen proteindir ve gelişmekte olan kemikteki toplam proteinin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Osteonektinin osteoblast büyümesini ve/veya proliferasyonunu ve matriks mineralizasyonunu etkilediği düşünülmektedir.⁴³

Bütün kemikler iç yüzeylerde endosteum ve dış yüzeylerde de periosteum adı verilen osteojenik hücrelere sahip zarlar ile örtülüdür.^{27, 45}

2.1.6 Kemik Zarları

Kemiğin iç ve dış yüzeylerini kaplayan, bağ doku iplikleri ve hücrelerinden oluşan örtü şeklindeki kemik zarlarıdır.⁴⁶

Periosteum (Periost); kemiği dıştan saran kalın bir tabaka olarak tanımlanmaktadır. Dış fibröz tabaka kolajen fibrilleri ve fibroblastları içerirken, hücre açısından zengin olan iç tabaka da ise osteoprojenitör hücreleri sahiptir. Sharpey fibrilleri olarak isimlendirilen periosteal kolajen fibriller, kemik matriksi içine nüfuz ederek periosteumun kemiğe sıkıca bağlanmasını sağlamaktadır. Periosteumda, kan damarları, lenf damarları ve sinir tellerinden oluşan yoğun bir ağ bulunmaktadır. Periosteum, osteojenik özelliكتedir.⁴⁶⁻⁴⁸

Endosteum (Endost) tabakası; periosteum tabakasından daha ince olup, kemiğin içindeki bütün boşlukları örtmektedir. Tek katlı yassı ya da kübik osteoprogenitör hücreleri ile az miktarda retiküler bağ dokusundan oluşmaktadır. Kemikte bulunan tüm boşluklar Havers kanalları, Volkman kanalları ve süngerimsi kemiğin ilik boşlukları da tamamen endosteum ile örtülmüştür.^{37, 46, 47}

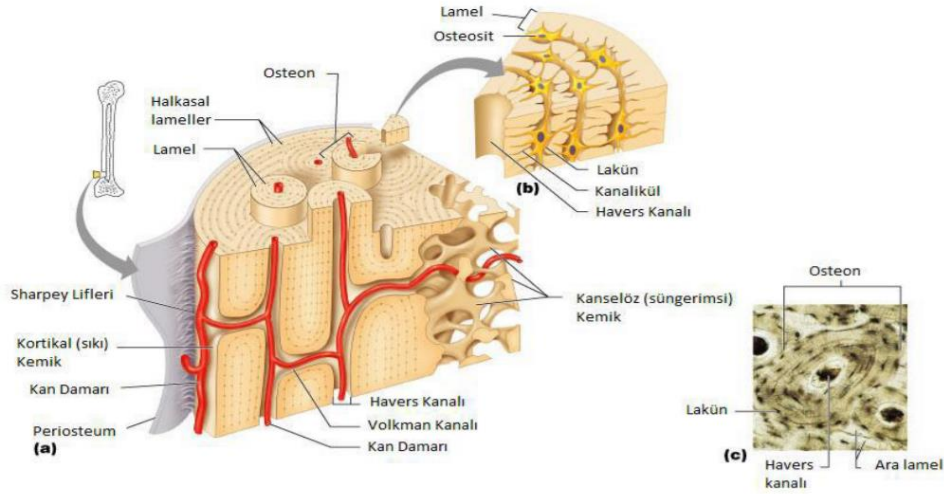
Periosteum ve endosteum, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarılabilmesi için gereklidir. Kemik doku için osteoprogenitör hücre ve osteoblast kaynağı olarak hizmet etmektedir.⁴⁶

2.1.7. Kemik kanalları (Havers ve Volkman Sistemleri)

Havers ve Volkmann kanalları, yalnızca sert kemikte bulunan iki farklı kanaldır. Havers kanalları, sert kemiğin uzun eksenine paralel bir düzenleme sergilemekte ve çapları 20-110 mikron arasında değişiklik göstermektedir. Bu kanalların içinde genellikle bir veya iki adet damar bulunmaktadır; bu damarlar çoğunlukla kapiller ve postkapiller venüllerden oluşurken, nadiren arterioller de yer alabilmektedir. Havers kanalları, enine kesitlerde yuvarlak, boyuna kesitlerde ise uzun borucuklar şeklinde görünmekte ve Volkmann kanalları aracılığıyla birbirleriyle sürekli bir ilişki içerisindedirler. Volkmann kanalları, kemiğin periosteumundan endosteumuna kadar uzanarak, kemiğe giren damarlar ve sinirlerin iç kemik dokusuyla bağlantı kurmasını sağlamaktadır (Şekil 2.2). Kemik hücreleri, bu kanallar içinde bulunan damarların sağladığı besin maddeleriyle beslenmektedir. Havers kanallarının etrafında iç içe geçmiş kemik lamelleri bulunurken, Volkmann kanallarının etrafında bu lameller mevcut değildir.²⁷

2.1.8. Kemik lamelleri

Havers Lamelleri: Havers kanalları etrafında iç içe yerleşmiş ve birbirine paralel kemik lamelleri oluşturan, yan yana duran silindirik birimler olan Havers sistemi veya osteonları oluşturur. Genişlik olarak 4 ile 20 lamelden oluşabilirler. Enine kesitlerde Havers kanalı etrafında iç içe yerleşmiş halkalar, uzunlamasına kesitlerde ise damar kanallarına paralel aralıklı bantlar şeklinde görünmektedirler. İnterstisyel (ara) Lameller: Havers sistemleri arasında farklı büyüklükte ve düzensiz şekilli lameller bulunmaktadır. Sirkumferensiyal (halkasal) Lameller: Sert kemikler periosteumun ve endosteumun altında; kemiğin gövdesinin dışında ve içinde iç içe daireler şeklinde lamellerle çevrilidir. Bu lamellere dış ve iç sirkumferensiyal lameller adı verilmektedir(Şekil 2.2).^{27, 49}



Şekil 2.2 Kemik kanalları ve lamelleri³⁷

2.1.9 Kemik Türleri

Kemik dokusu kesitleri makroskopik olarak incelendiğinde, kavitesiz yoğun sahalar (kompakt kemik) ve çok sayıda birbiri ile ilişkili süngerimsi görünümde boşluklar (süngerimsi kemik) görülmektedir. Oysa mikroskopik olarak gerek kompakt kemiğin gerekse süngerimsi kemiğin kavitelerini birbirinden ayıran trabekuların histolojik yapısı aynıdır. Kemik dokusu mikroskopik olarak incelendiğinde ise birincil (olgunlaşmamış) ve ikincil (olgunlaşmış) kemik olarak ikiye ayrılmaktadır.²⁷

2.1.9.1 Birincil (Olgunlaşmamış) Kemik Dokusu

İlk olarak ortaya çıkan kemik dokusu birincil kemik olarak adlandırılmaktadır. Bu doku geçici bir yapıdadır ve yetişkin bireylerde, kafadaki yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe bağlandığı bölgeler gibi sınırlı alanlar dışında, ikincil kemik ile yer değiştirmektedir. Diş soketlerinde bu birincil kemik dokusunun varlığı, ortodontik tedavi süreçlerinde dişlerin hareket ettirilmesine olanak tanımaktadır. Birincil kemik dokusu, ikincil kemik dokusuna kıyasla daha az mineral içermekte ve düzensiz bir şekilde dağılmış kolajen lifleri barındırmaktadır; ayrıca, sekonder kemik dokusuna göre daha fazla osteosit içermektedir.^{28, 31}

2.1.9.2 İkincil (Olgunlaşmış) Kemik Dokusu

İkincil kemik dokusu çeşitlidir ve genellikle yetişkinlerde bulunur. Kolajen lifler birbirine paralel veya vasküler bir kanal etrafında dairesel olarak yerleşmiş lameller şeklinde düzenlenmiştir. Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe havers sistemi veya osteon denilmektedir. Osteositleri içeren lakunalar, lameller arasında ve nadiren de içinde bulunmaktadır. Her havers sisteminin etrafı, birkaç kolajen lif ve mineralize amorf matriksten oluşan yapıştırıcı madde ile çevrelenmektedir.

Kompakt kemik lamelleri Havers sistemi, dış dairesel lameller, iç dairesel lamelcikler ve ara lamellerden oluşmaktadır.

Havers sistemi, diyafizin uzun eksenine paralel olarak konumlanmakta olup, sistemin ortasında bir merkez kanal bulunmaktadır. Bu merkez kanalın etrafı 4-20 arasında dairesel lamelciklerle sarılmıştır. Havers kanalları kemik iliği boşluğu ve Volkman kanalları ile bağlantılıdır. Volkman kanalları, Havers kanallarını birbirine bağlamaktadır. Volkman kanalları, Havers kanallarında olduğu gibi dairesel lameller içermemektedir.^{27, 31}

2.1.10 Kemik Oluşumu (Ossifikasyon, Osteogenezis)

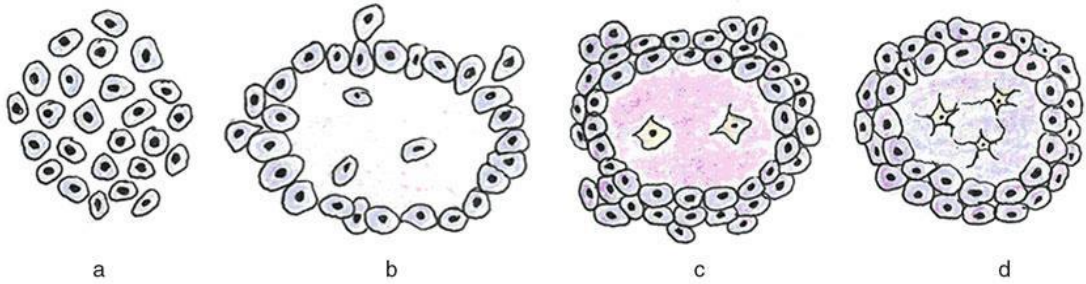
Ossifikasyon, osteoblastlar tarafından kemiğin şekillendirilmesi işlemidir. Diğer bir deyişle ossifikasyon, osteoblastlar tarafından salgılanan osteoid doku matriksinde kalsiyum, fosfor ve diğer mineral maddelerin birikmesiyle gerçek kemik oluşumudur. Kalsifikasyon ise bazı dokularda kalsiyum tuzlarının birikimi olarak tanımlanmaktadır.⁵⁰⁻⁵² Temel olarak üç tip ossifikasyon çeşidi vardır.⁵¹

2.1.10.1 İntramembranöz (Mezenkimal) Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme genellikle kafatası iskeletinde yer alan yassı kemiklerde görülmektedir. Ayrıca maksilla ve mandibulanın önemli bir bölümünde ve klavikulada da intramembranöz kemikleşme görülebilmektedir.⁵³ İntramembranöz kemikleşme, kırık iyileşmesinin gerçekleşmesinde de önemli rol oynamaktadır.

İntramembranöz kemikleşmede kemik, direkt olarak mezenkimal bağ dokudan farklılaşmaktadır (Şekil 2.3). Kemikleşme merkezlerinin oluşmasında mezenkimal kök hücreler ve süturalar başta olmak üzere primer kemikleşme merkezleri önemli rol oynamaktadır. İntramembranöz kemikleşmede gerçekleşen olaylar aşağıda sıralanmıştır:

- 1) Ossifikasyon merkezinin oluşması (Primer kemikleşme merkezi)
- 2) Mezenkimal hücrelerin osteoprogenitör hücrelere farklılaşması
- 3) Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması
- 4) Osteoblastların matriksi sentezlemesi ve osteoid oluşumu
- 5) Osteoidlerde kalsifikasyonun gerçekleşmesi
- 6) Trabeküllerin oluşması ve kemik büyümesi
- 7) Periostun gelişmesi
- 8) Sırasıyla immatur (olgunlaşmamış) kemik ve lameller kemiğin oluşması



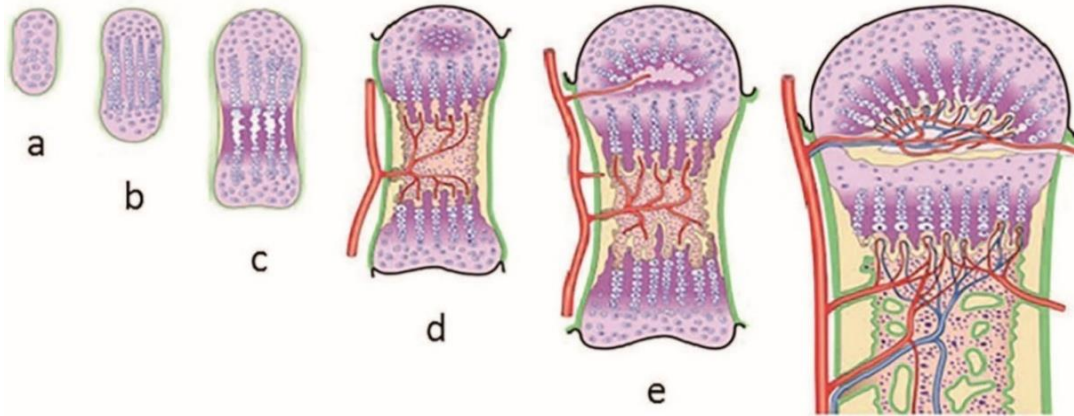
Şekil 2.3 İntramembranöz kemikleşme mekanizmasının şematik olarak gösterilmesi⁵³. a. Mezenşimal hücre agregasyonu. b. Ossifikasyon merkezinin oluşumu. c. Osteoblastlar tarafından osteoid oluşumu. d. Osteoidin kalsifikasyonu ve osteoblastların osteosite dönüşümü

2.1.10.2 İntrakartilajenöz (Endokondral) Kemikleşme

Endokondral kemikleşmede, kıkırdak dokunun kemik doku ile yer değiştirmesi söz konusudur. Endokondral kemikleşmeye genellikle uzun kemiklerde rastlanmaktadır (Şekil 2.4).⁵⁴

Endokondral kemikleşme, aşağıdaki sıralamada gerçekleşmektedir:

- 1) Osteoprojenitör hücrelerin bir araya gelmesi (Kondrositler)
- 2) Kıkırdak modelin (Hyalin kıkırdak) gelişmesi
- 3) Kıkırdak modelin büyümesi (Kondrositlerin hipertrofisi)
- 4) Primer kemikleşme merkezinin gelişmesi
- 5) Sekonder kemikleşme merkezinin gelişmesi
- 6) Artiküler kartilaj ve epifizyal plağın şekillenmesi
- 7) Kıkırdak dokunun kalsifikasyonu ve vasküler invazyon
- 8) Osteoid sentezi ve osteoidlerde kalsifikasyonun gerçekleşmesi
- 9) Sırasıyla immatur kemik ve lameller kemiğin oluşması



Şekil 2.4 Endokondral kemikleşme mekanizmasının şematik olarak gösterilmesi⁵⁵ a. Osteoprojenitör hücre agregasyonu. b. Hyalin kıkırdak kalıbının oluşumu. c. Primer ossifikasyon merkezinin oluşumu. d. Kan damarlarının penetrasyonu. e. Sekonder ossifikasyon merkezlerinin oluşumu. f. Gelişmiş tam bir kemik yapı.

2.1.10.3 Heteroplastik Kemikleşme

Heteroplastik ossifikasyon, iskelet sistemi dışında herhangi bir doku içinde gerçekleşen kemikleşmedir. Bu tür kemikleşmeye bazı hayvanlardaki os penis ve sığır kalbindeki ossa cordis oluşumu örnek teşkil etmektedir.^{53, 54}

2.1.11 Kemiğin Büyümesi (Modeling) ve Yeniden Şekillenmesi (Remodeling)

Modeling kısaca; rezorbsiyon ve yeni kemik oluşumu mekanizmaları sayesinde kemiklerin büyümesi, şekillenmesi, direnç ve anatomik özelliklerinin oluşmasıdır. Kortikal tabakanın kalınlığını artarken, kemik iliğinin bulunduğu boşluğun çapı genişlemekte, uzun kemiklerin uç kısımları ve kafatası konturları şekillenmektedir. Büyüme sırasında yeni kemik oluşumu, kemik yıkımından daha fazladır. Erişkinlik dönemi ile beraber modeling dönemi sona ermektedir.⁵⁶⁻⁵⁸

Kemiğin remodelingi metabolik ve biyomekanik olarak çevre şartlarında varlığını sürdürebilmesi için gerekli bir olaydır. Sürekli yenilenme; iskelet yapının dayanıklılığını, kemik dokudaki hasarların onarımını, kan hücrelerinin üretilmesindeki devamlılığı ve kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesini sağlamaktadır. Kemik turn-over (kendini yenileme) olayı: Kemik remodeling aktif süreci sonucu, belli bir süre içinde rezorbe olup yeniden oluşan kemik hacmidir. Erişkin bir bireye ait kortikal kemiğin turnover hızı 20 yıl iken, kansellöz kemiğin 1- 4 yıldır.⁵⁶⁻⁵⁸

Kemik dokusunun yeniden şekillenmesi beş aşamalı bir süreçtir.

1. Aktivasyon: Bu aşamada, yeniden şekillendirme yapılacak bölgedeki hücreler aktive edilir. İlk olarak, osteoklastlar devreye girer. Osteoklastlar, belirlenen miktardaki kemik hacmini rezorbe etmek amacıyla bu bölgeye yönlendirilirler.

2. Rezorpsiyon: Aktive olan osteoklastların kemik dokusunu yıktığı aşamadır. Osteoklastlar, içerdikleri organeller aracılığıyla kemik bölgesine tutunur ve salgıladıkları proteolitik enzimler sayesinde kemik dokusunu parçalarlar.

3. Geri dönüşüm: Osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen yıkım sonrasında, bölgede monosit/makrofaj serisinden mononükleer hücreler ortaya çıkar. Bu hücreler, glikoprotein açısından zengin bir protein salgılayarak bölgede bir sement tabakası oluşturur. Ardından osteoblastlar bu alana gelir ve osteopontin gibi adezyon molekülleri ile bu tabakaya bağlanırlar.

4. Şekillenme: Bu aşamada etkin olan hücreler osteoblastlardır. Osteoblastlar, preosteoblastların uyarılması sonucu oluşur ve bir kısmı osteosit haline dönüşür. Osteoblastların formasyon aşamasındaki aktivitesi ortalama 2-3 ay sürer. Bu süreçte oluşan osteoid dokunun mineralizasyonu gerçekleşir.

5. Dinlenme: Bu aşamada, yeniden şekillendirme alanında oluşan kemik dokusu, yeni bir remodelling döngüsüne kadar sakin bir şekilde kalmaya devam eder.⁵⁹

2.1.12 Kemik Homeostazı

Son yıllarda, kemik homeostazının korunmasında birçok sinyal yolunun önemli katkılar sağladığı ortaya konmuştur. Kemik homeostazının düzenlenmesi, reseptör aktivatör nükleer faktör-kappa B (NF- κ B) ligandı (RANKL)/ Reseptör aktivatör NF- κ B (RANK)/osteoprotegerin (OPG) sinyal sistemi, büyüme faktörleri, PTH, fosfoinozid 3-kinaz AKT (PI3K/AKT), Janus kinaz/sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivasyonu (JAK/STAT), mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK), AMP-aktif protein kinaz (AMPK), Hedgehog ve Notch gibi çeşitli sinyal yolları tarafından karmaşık bir şekilde yönetilmektedir. Bu sinyal yolları birbirleriyle etkileşime girerek, kemik homeostazını korumak için geniş ve karmaşık bir ağ oluşturur.⁶⁰

Kemik homeostazının sürdürülmesi, osteoblastlar ve osteoklastların farklılaşması ile işlevlerinin senkronizasyonu yoluyla sağlanır; bu süreç yetişkin iskeletin bakımında kritik öneme sahiptir.⁶¹ Osteoblastların gelişimi ve farklılaşması bir dizi sinyal yolu ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile düzenlenir.⁶² RUNX2 (Runt-bağlantılı transkripsiyon faktör 2), osteoblast farklılaşmasının “master” genidir. Kemik oluşumunda merkezi bir rol oynar. Osterix (OST), Özel AT-zengin bağlanma proteinlerindedir. KMP ve IGF-1 tarafından aktive edilir, nükleer matriks bağlantı bölgelerine bağlanarak transkripsiyon ve kemik yeniden

şekillenmesinde (remodelling) rol oynar. DLX5 (distal-less homeobox 5), KMP tarafından uyarılır ve iskelet gelişimi ile iyileşme süreçlerinde yüksek düzeyde salgılanır.^{60, 63} Osteokalsin, ALP salgısı ve mineralizasyon basamaklarını düzenleyen transkripsiyon faktörüdür. Kolajen 1, kemik matriksinin ana yapısal bileşeni olarak kemik dokusunun dayanıklılığını sağlar. ALP, osteoblast aktivitesinin bir göstergesi olarak kemik mineralizasyonunda önemli bir enzimdir. Osteonektin, kemik matriksine kalsiyum bağlanmasını kolaylaştıran ve kemik metabolizmasını düzenleyen bir ekstraselüler proteindir. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden türeyen osteoblastlar, RUNX2, OST ve DLX5 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile osteokondroprogenitör hücreye bağlanır; bu bağlanma, ALP ve kolajen 1 gibi ilk osteojenik genlerin ekspresyonu yoluyla preosteoblasttan osteoprogenitör hücreye dönüşümle sonuçlanır ve bu genlerin ekspresyonu olgun osteoblastların ömrü boyunca sürdürülür.^{60, 64} Olgun osteoblastlar, kolajen 1, osteokalsin, kemik sialoprotein ve osteopontin gibi ekstraselüler proteinler salgılar ve mineralize olmayan osteoid matriksi, kalsiyum fosfat birikimi ile hidroksiapatit oluşturacak şekilde mineralize olur.⁶⁵ Osteoklastogenez ise hematopoietik progenitörlerden kaynaklanan osteoklastların RANKL ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) sinyalleri ile aktive edilmesi ve aktif T hücreci c1'in nükleer faktörü (NFATc1) gibi faktörlerin rol almasıyla kemik rezorpsiyonunu sağlar. NFATc1, osteoklast farklılaşmasını düzenleyen ana transkripsiyon faktörlerinden biridir.^{60, 66, 67} Osteositler, kemik dokusunu koruyarak osteoblast ve osteoklast aktivitelerini düzenler ve mekanik sinyalleri algılayarak kemik homeostazını destekler.⁶⁸

Bu etkileşimler sayesinde kemik dokusu, sürekli olarak yeniden yapılandırılır ve çevresel değişikliklere uyum sağlar. Ancak, bu sinyal yollarından sadece birini engellemek, kemik homeostazında bozukluk yaşayan tüm hastalarda kalıcı bir iyileşme sağlamayabilir. Bunun nedeni, sinyal yollarının birbirine bağlı ve birbirini düzenleyen yapısıdır. Dolayısıyla, tek bir yolun inhibisyonu, diğer yolların dengeleyici etkileri nedeniyle beklenen tedavi sonucunu vermeyebilir. Bu nedenle, kemik homeostazını etkileyen sinyal yollarının karşılıklı ilişkilerini ve etkileşimlerini kapsamlı bir şekilde araştırmak büyük önem taşımaktadır.⁶⁰

2.1.12.1 Sinyal Yolakları ve Moleküller

2.1.12.1.1 RANKL/RANK/OPG sinyalizasyon sistemi

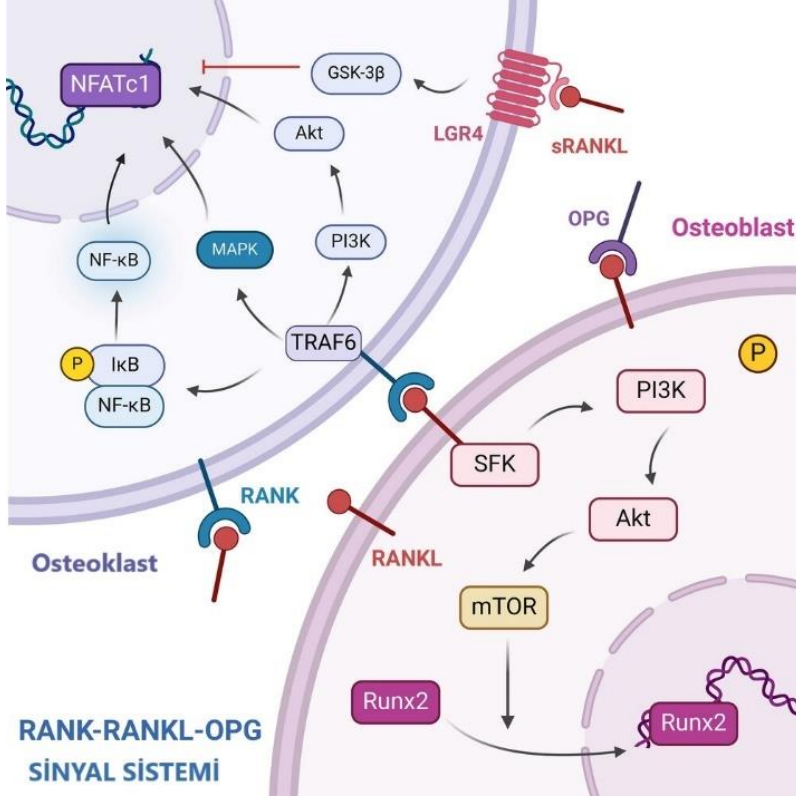
RANKL/RANK/OPG sinyalizasyon sistemi, kemik homeostazının temel molekülleri olarak kritik bir rol oynar.⁶⁶ Bu sistemde, osteositler, osteoblastlar ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri tarafından üretilen RANKL, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesinin bir üyesi olup trimerik bir transmembran protein olarak karakterize edilir.⁶⁹ Osteoklast progenitörlerinde ve olgun osteoklastlarda bulunan tip I transmembran proteini RANK, RANKL ile etkileşime girerek MAPK, NF- κ B ve PI3K yollarını aktive eden TNF reseptörüyle ilişkili faktör 6 (TRAF6) aracılığıyla bir dizi hücre içi sinyali tetikler.⁶⁶ Bu sinyal kaskadı, NFATc1 ekspresyonunu artırarak osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunu teşvik eder.⁶⁶

Luo ve arkadaşlarının araştırması, lösin açısından zengin tekrar içeren G-protein-bağımlı reseptör 4'ün (LGR4) RANKL için alternatif bir reseptör olduğunu ortaya koymuş ve bu reseptörün RANK ile rekabet ederek osteoklast farklılaşmasını engellediğini göstermiştir.⁷⁰ Bu bulgu, RANK'ın geleneksel olarak RANKL için özel bir reseptör olarak kabul edilmesine rağmen, LGR4'ün de RANKL bağlanmasına aracılık ederek osteoklastogenez üzerinde inhibe edici bir etki oluşturduğunu göstermektedir. RANKL'ın LGR4 ile etkileşimi, G protein alt birimi alfa Q ve glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK-3 β) yollarını uyarır ve sonuç olarak NFATc1 ekspresyonunu ve işlevini azaltır.⁷⁰

Osteoblastlarda, RANKL'ın RANK ile bağlanması sadece osteoklastogenez üzerinde değil, aynı zamanda osteoblast farklılaşması ve mineralizasyonu üzerinde de etkili olur. RANK-RANKL etkileşimi, hücre içi "ters" sinyal yolunu aktive ederek PI3K/AKT/mTOR yolunu harekete geçirir ve bu da RUNX2'nin çekirdeğe girmesine ve erken farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunun artmasına yol açar. Böylece, osteoblastların mineralizasyon kapasitesi artırılır.⁷⁰

Öte yandan, OPG osteoblastlar tarafından üretilen bir tuzak reseptörü olarak işlev görür ve RANKL ile RANK arasındaki etkileşimi bloke ederek osteoklastların oluşumunu ve kemik yıkımını önler.^{70, 71} Östrojen gibi faktörler, osteoblastlar tarafından OPG üretimini artırarak postmenopozal osteoporoz gelişimine karşı koruma sağlar.⁷¹

RANK/RANKL/OPG sinyalizasyon sistemi, çeşitli sitokinler ve moleküller tarafından da düzenlenir. Östrojenin yanı sıra IL-1 β , IL-11, TNF- α , 1 α ,25-dihidroksivitamin D3, PTH ve prostaglandin (PG) gibi faktörler, hücre zarındaki RANKL ekspresyonunu destekleyerek kemik rezorpsiyonunu uyarır ve böylece kemik metabolizmasında dolaylı roller oynarlar.⁷² Osteositler, RANKL'ı zarla çevrili ve muhtemelen çözünür formda üreterek dendritik projeksiyonları aracılığıyla kemik matrisinde RANKL sinyallerini iletirler. Bu sinyaller, kemik iliği ve periosteal bölgelerdeki osteoklast öncülleriyle iletişim kurarak osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini teşvik eder.⁷³ Ayrıca, mekanik stres osteoblastlarda NF- κ B yolunu kullanarak RANKL ekspresyonunu artırır ve PTH de osteoblastlarda RANKL ekspresyonunu yukarı düzenler.⁷⁴ Osteositler aynı zamanda OPG salgılayarak osteoklastogenezi ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eder, böylece kemikteki osteoklast aktivitesini hem doğrudan RANKL aracılığıyla hem de dolaylı olarak OPG aracılığıyla düzenlerler. Ayrıca, osteositler kemikteki mikro hasarı tespit eder ve sinyalleme yoluyla kemik yeniden şekillenmesini başlatırlar. Hasarlı bölgedeki apoptotik osteositler, yakındaki sağlıklı osteositlerden RANKL salınımını aktive eden ATP sinyalleri salgılar ve bu süreç, yeniden şekillendirmenin aktivasyonunu içerir (Şekil 2.5).⁷⁵



Şekil 2.5 Kemik homeostazında RANKL/RANK/OPG sinyal sistemi. (1) Osteoblastlar tarafından üretilen RANKL, osteoklast progenitörlerindeki reseptörü RANK'a bağlanarak TRAF6 aracılığıyla MAPK, NF-κB ve PI3K/AKT sinyal yolu gibi hücre içi sinyal kaskadlarını başlatır ve NFATc1 ekspresyonunun artmasıyla sonuçlanır. (2) RANKL'ın LGR4 ile bağlanması, GSK-3β yollarıyla NFATc1'i baskılar. (3) RANK'a bağlandıktan sonra RANKL, PI3K/AKT/mTOR yolunu aktive eder ve osteoblastta RUNX2'nin nükleer translokasyonunu teşvik eder. (4) OPG, RANKL için bir tuzak reseptördür ve RANK-RANKL bağlanmasını engeller.⁶⁰

2.1.12.1.2 Hormon ve büyüme faktörü sinyal yolları

PTH sinyal yolu

PTH, kalsiyum ve fosfor metabolizmasını düzenleyen ana salgı hormonudur ve osteoblastların ile osteoklastların aktivitelerini etkileyerek kemik homeostazını düzenlemede önemlidir.⁷⁶ PTH'nin PTH1R bağlanması, osteoblast soyu hücrelerde ikinci haberci olarak işlev gören ve protein kinaz A'yı (PKA) aktive eden G proteinine bağlı reseptör (GPCR) sinyal yolunu aktive eder. Siklik adenozin monofosfat/ Fosfokinaz A (cAMP/PKA) sinyal yolu, RUNX2 ve OST aktivitesini ve ekspresyonunu artırarak osteoblastların farklılaşmasını ve olgunlaşmasını teşvik ederken, KMP aktivitesini koordine ederek kemik oluşumunu destekler.⁷⁷ Özellikle, PTH ile PTH1R arasındaki etkileşim, PTH1R-düşük yoğunluklu lipoprotein

reseptörüyle ilişkili protein 6 (LRP6) kompleksinin endositozunu tetikler ve bu da KMP/SMAD1 sinyalinin artmasına yol açarak kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasını destekler.⁷⁸

Ayrıca, PTH dolaylı olarak Wnt sinyal yolunu aktive ederek β -katenin stabilitesini ve intranükleer agregasyonunu artırır, osteoblast farklılaşmasını teşvik eder; bu Wnt sinyalini inhibe eden SOST proteininin ifadesinin baskılanması yoluyla gerçekleştirilir. PTH, osteoblastlar ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri RANKL salınımını artırırken, osteoklastların hayatta kalmasını ve farklılaşmasını teşvik eden OPG salınımını azaltır; bu durum osteoklast aktivitelerini artırır ve dolaylı olarak kemik rezorpsiyonuna yol açar.⁷⁹ PTH'nin IGF-1 ile ilişkili olduğu ve bu faktörün olgun osteoblastlarda PTH tarafından indüklenerek RANKL ve M-CSF üretimini sağlayarak osteoklastogenezi desteklediği gösterilmiştir.⁸⁰ PTH'nin kemik oluşumu ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki çift etkisi, eylem şekline bağlı olarak değişir; sürekli yüksek dozda PTH verildiğinde, osteoklast aktivitesi osteoblastların aktivitesini aşar ve sonuçta kemik oluşumundan daha fazla kemik kaybına yol açar.^{81, 82}

Osteoblastlar ve osteoklastlara ek olarak, PTH osteositler üzerinde de önemli etkiler gösterir. PTH, SOST ve RANKL gibi önemli genlerin ekspresyonunu düzenlemek için osteositleri hedef alır. Kemik oluşumunun inhibitörü olan SOST'un ifadesi PTH tarafından aşağı düzenlenir ve bu da kemik oluşumunun artmasına neden olur. Ayrıca, PTH osteositlerde RANKL ifadesini yukarı düzenleyerek osteoklast aktivitesini teşvik eder ve kemik rezorpsiyonu için gereklidir.⁸³ Bu detaylı PTH sinyal yolu, kemik dokusunun sürekli yenilenmesi ve onarımını sağlayarak kemik homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynar.

KMP sinyal yolları

KMP'ler, TGF- β süper ailesinin üyeleri olarak kemik oluşumu, embriyonik gelişim ve çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli roller oynar ve insanlarda 20'den fazla KMP ailesi üyesi bulunmakta olup hücrel süreçleri düzenlemede çeşitli işlevlere sahiptirler.^{84, 85} KMP sinyalleme, SMAD'ye bağımlı ve SMAD'den bağımsız yollara ayrılır.⁸⁵ SMAD-bağımlı yolda, fosforile SMAD1, SMAD5 veya SMAD8, SMAD4 ile

kompleks oluşturarak osteojenik genlerin (RUNX2, DLX5) ekspresyonunu düzenler ve pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturur.⁸⁶ SMAD'den bağımsız yolda ise, aktive edilmiş TGF- β ile aktive edilmiş kinaz (TAK1), MAPK kaskadını tetikleyerek RUNX2, DLX5 ve OST gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu artırır.⁸⁷

KMP'ler arasında KMP-2, KMP-4, KMP-5, KMP-6 ve KMP-7 önemli osteojenik özellikler gösterirken, KMP-3 SMAD2/3 aktivasyonunu tetikleyerek osteojenik etkileri baskılar.⁸⁸ Ayrıca, KMP sinyalleme Wnt yolunu etkileyerek β -katenin stabilitesini artırır ve osteoblast farklılaşmasını teşvik eder; KMP-2, LRP-5 seviyelerini artırarak β -katenin'in stabilizasyonunu sağlar ve kanonik Wnt yolunun aktivasyonunu destekler.⁸⁹ KMP sinyalleme, KMP reseptörü tip II'nin RANK ile etkileşime girerek p-SMAD1/5/8 ve NF- κ B sinyallemesini aktive etmesi yoluyla osteoklast farklılaşmasını destekler ve RANKL/OPG oranını artırarak osteoklast oluşumunu teşvik eder. Sonuç olarak, KMP sinyalleme osteoblast ve osteoklast diferansiyasyonunu doğrudan ve dolaylı yollarla destekleyerek kemik homeostazının korunmasında merkezi bir rol oynar.^{90, 91}

TGF- β sinyal yolu

TGF- β , osteoklastlar ve osteoblastların işlevlerini karmaşık bir şekilde düzenleyerek kemik metabolizmasında önemli bir rol oynar. TGF- β süper ailesi, aktivin, TGF- β ve KMP olmak üzere üç alt aileye ayrılır ve kemik yeniden şekillenmesinde kritik transkripsiyon faktörlerini düzenleyen SMAD bağımlı ve bağımsız sinyal yollarını aktive eder.^{92, 93} Klasik TGF- β sinyal yolunda, TGF- β spesifik reseptörler aracılığıyla SMAD2 ve SMAD3 proteinleri fosforile edilir ve SMAD4 ile kompleks oluşturarak çekirdeğe taşınır. Çekirdekte bu kompleks, osteoblastların erken aşamalarında RUNX2 gibi osteojenik genlerin ifadesini artırarak osteoprogenitör hücrelerin çoğalmasını ve osteoblast farklılaşmasını teşvik eder.^{94, 95} Ancak, olgunlaşmanın ilerleyen aşamalarında TGF- β , osteoblast olgunlaşmasını, mineralizasyonunu ve osteositlere dönüşümünü inhibe eder.⁹⁶ Ayrıca, TGF- β , Hedgehog ve Wnt sinyal yolları gibi diğer önemli yollarla etkileşime girerek osteoblast fonksiyonlarını düzenler ve kemik oluşumu için karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturur.⁹⁷

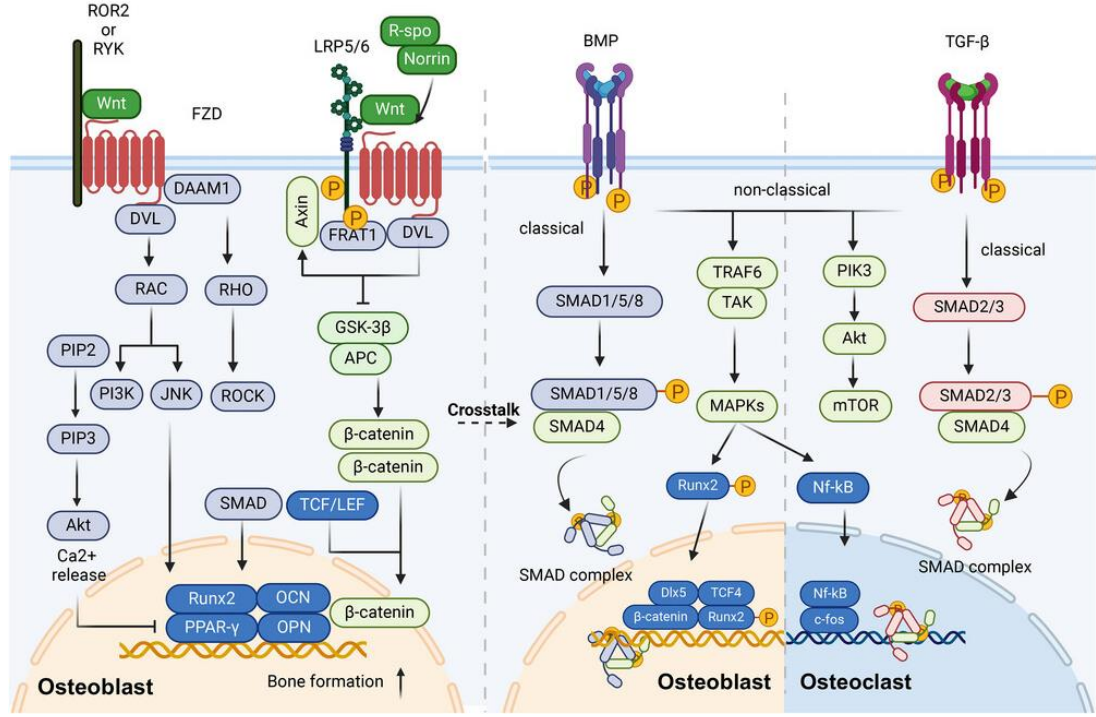
Osteoklastlar üzerinde ise TGF- β , RANKL ve OPG ekspresyonunu düzenleyerek osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini dolaylı olarak etkiler. Bu modülasyon, osteoblastlar ve stromal hücrelerdeki TGF- β etkileri yoluyla RANKL ve OPG dengesi üzerinden gerçekleşir.⁹⁸ Sürekli yüksek düzeyde TGF- β ise RANK ekspresyonunu azaltarak osteoklast oluşumunu engeller.⁹⁹ Sonuç olarak, TGF- β sinyal yolu, SMAD bağımlı mekanizmalar aracılığıyla RUNX2 gibi önemli transkripsiyon faktörlerini kontrol ederek kemik oluşumu ve rezorpsiyonunu dengeleyen karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturur. Bu sayede, TGF- β hem osteoblastların ve osteoklastların erken farklılaşmasını desteklerken, geç olgunlaşmalarını sınırlayarak kemik homeostazını korur.¹⁰⁰

2.1.12.1.3 Wnt sinyal yolu

Wnt sinyal yolu, evrimsel olarak korunmuş olup doku homeostazının sürdürülmesinde kritik bir rol oynar. Bu yol iki ana dala ayrılır: β -katenin bağımlı kanonik yol ve β -katenin bağımsız kanonik olmayan yollar (Wnt/PCP ve Wnt/Ca²⁺ yolları).¹⁰¹ Kanonik Wnt/ β -katenin yolu, Wnt ligandlarının Frizzled (FZD) reseptörlerine ve LRP5/6'ya bağlanmasıyla başlar. Bu etkileşim, hücre içinde β -katenin'in yıkımını engeller ve β -katenin çekirdeğe taşınarak genlerin aktivasyonunu sağlar.¹⁰² Bu süreç, osteoblast farklılaşması, kemik gelişimi ve kemik yenilenmesi için hayati öneme sahiptir. Özellikle Wnt-1, Wnt-10a ve Wnt-10b gibi ligandlar, Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin osteoblastlara farklılaşmasını teşvik ederken, yağ hücresi oluşumunu baskılar.¹⁰³

KMP-2 ile olan etkileşimde, kanonik Wnt yolu KMP-2'nin transkripsiyonunu artırır ve bu da osteoblastların kemik oluşturma kapasitesini destekler. KMP-2, aynı zamanda Wnt sinyal yoluyla osteoblast farklılaşmasını güçlendirir ve kemik oluşumunu optimize eder.¹⁰⁴ Kanonik olmayan yollar ise osteosit göçü ve osteoblast farklılaşmasında önemli roller oynar; bu yolla Wnt-5a, SMAD bağımsız yollar aracılığıyla osteoblast farklılaşmasını teşvik eder.¹⁰⁵ Ayrıca, Wnt/ β -katenin yolu osteoklast oluşumunu düzenleyerek kemik rezorpsiyonunu dengelemeye yardımcı olur.¹⁰⁶ Bu sinyal yolu, KMP, TGF- β ve diğer önemli sinyal yollarıyla etkileşime girerek kemik metabolizmasında kompleks bir düzenleyici ağ oluşturur.¹⁰⁷

Sonuç olarak, Wnt sinyal yolu, osteoblast ve osteoklast aktivitelerini koordine ederek kemik yapısının ve yoğunluğunun korunmasını sağlar, böylece sağlıklı kemik homeostazını destekler.



Şekil 2.6 Wnt, BMP ve TGF-β sinyal yollarına genel bakış⁶⁰

2.1.12.2. Kemik metabolizmasını etkileyen büyüme faktörleri

Kemik dokusu, çok sayıda büyüme faktörü içermektedir. Polipeptit yapıya sahip bu büyüme faktörleri, bazen kemik hücrelerinde, bazen de çevre dokularda üretilmektedir. Büyüme faktörleri, kemikte gerçekleşen hücre fonksiyonlarında, kemiğin büyümesini ve kemik hücrelerinin farklılaşmasını içeren birçok fizyolojik olayda görev almaktadır.¹⁰⁸ Büyüme faktörleri sadece kemik remodelingi üzerinde değil, aynı zamanda iskelet dokuların gelişmesi ve kemiklerin tamiri gibi birçok olayda da önemli roller üstlenmektedir.¹⁰⁹ Kemik dokuda yer alan başlıca büyüme faktörleri, bu faktörlerin kaynakları ve etki mekanizmaları Tablo 2.5’te özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Büyüme faktörleri ve etki mekanizması¹⁰⁹

Büyüme Faktörü	Kaynak	Etki Mekanizması
KMP	Kemik matriksi, periost ve ostiumdan elde edilen osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar, proliferen kondrositler	Mezenkimal hücrelerin osteoblastların içerisine diferansiye olması, matriks depozisyonu
PDGF	Plateletler, keratinositler, makrofajlar	Makrofaj ve fibroblastların kemotaksisi ve aktivasyonu, matriks depozisyonu, osteoblastların, sementoblastların ve periodontal ligamentlerin proliferasyonu ve migrasyonu,
VEGF	Keratinositler, makrofajlar	Neovaskülarizasyon ve anjiyogenezis, indirekt olarak osteoprogenitör hücre diferansiasyonu
TGF- β	Makrofaj, platelet, keratinositler	Keratinositlerin migrasyonu, proliferasyonu, remodeling, kondrojenesis
IGF-1	Plazma, plateletler	Epitelial hücre ve fibroblast proliferasyonu Ayrıca, kemikte en fazla bulunan büyüme faktörüdür ¹¹⁰ .
FGF	Makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler	Anjiyogenezis, fibroblast proliferasyonu

KMP, Kemik morfojenetik proteini; PDGF, Platelet kaynaklı büyüme faktörü; VEGF, Vasküler endotelial büyüme faktörü; TGF- β , Dönüştürücü büyüme faktörü-beta; IGF-1, İnsülin benzeri büyüme faktörü-1; FGF, Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü

2.2 PERİODONTAL REJENERASYON VE KEMİK GREFTLERİ

Hastalık nedeniyle zarar görmüş diş destek dokularının, sağlıklı bir yapıya benzer şekilde rekonstrüksiyonu ve rejenerasyonu, periodontal tedavinin en önemli hedeflerinden biridir. Periodontal rejenerasyon, yara iyileşme sürecinde gerekli hücrelerin yeniden çoğalması ve düzenlenmesi aracılığıyla yeni sement, yeni periodontal ligament ve yeni alveol kemiği içeren sağlıklı bir periodonsiyumun oluşturulması ile, yeni dokular arasındaki fonksiyonel ve yapısal uyumun yeniden sağlanmasını ifade eder.¹¹¹

Periodontal rejenerasyonun etkin bir şekilde gerçekleşebilmesi için yara iyileşmesi sürecinde çeşitli hücresel ve moleküler olayların meydana gelmesi gerekmektedir.¹¹² Periodontal yara iyileşmesinde gözlemlenen bu olaylar, periodonsiyumun hem yumuşak hem de sert dokuları kapsayan bir yapı olmasından ötürü, vücudun diğer bölgelerindeki süreçlerden farklılık göstermektedir.^{112, 113}

Periodontal rejenerasyonun biyolojik yönünün daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, gelişen teknolojiler sayesinde çeşitli teknikler ve materyaller rejenerasyon amacıyla kullanılmaya başlanmış ve doku mühendisliği alanında önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Doku mühendisliği, hasar görmüş dokuların yerine yeni dokular inşa etmeyi hedefleyen, hücre biyolojisi, gelişim biyolojisi ve biyomateryal kullanımı gibi alanlara dayanan biyomedikal bir bilim dalıdır. Bir dokunun yeniden inşa edilebilmesi için uygun düzeyde ve düzenli sinyallere, yeterli sayıda progenitor hücreye, uygun bir ekstrasellüler matriks veya taşıyıcı bir iskelete ve yeterli kan akışına ihtiyaç duyulmaktadır.¹¹⁴ Bu bağlamda, kemik ve kemik benzeri materyallerin osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerinden faydalanılmaktadır.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Defekt bölgelerinde hücre yönlendirici membranların kullanımıyla yönlendirilmiş doku rejenerasyonu prensipleri uygulanmaktadır.¹¹⁹⁻¹²¹ Biyolojik mediyatörlerin etki mekanizmalarına dayanan hücre-hücre etkileşimlerinin düzenlendiği (örneğin, trombositten zengin plazma, KMP'ler) ve diş oluşumunu taklit eden tekniklerin (örneğin, mine matriks türevleri) uygulamasına başlanılmıştır¹²²⁻¹²⁶

2.2.1 Kemik Greftleri

Greft uygulamalarında transplante edilen materyaller immünolojik kaynaklarına göre sınıflandırılmıştır. Bu sınıflama uygulanan materyale karşı konak cevabı gelişmesini önlemek açısından önemlidir.

- Ototrefler: Aynı canlıdan alınan greftler
- İzogreftler: Alıcı ile aynı kalıtsal yapıya sahip bireylerden alınan greftler
- Allogreftler: Aynı tür içinde tamamen farklı genetik özellikler taşıyan bireylerden alınan greftler
- Ksenogreftler: Farklı türdeki bir canlıdan elde edilen greftler
- Alloplastlar: Biyolojik olarak canlı dokuya uyumlu sentetik greftler¹²⁷

Greft materyalleri 3 farklı şekilde kemik iyileşmesine katkıda bulunur.

1. Osteogenezis

Kemik greft materyallerinin doğrudan osteoblastlar aracılığıyla kemik oluşturma yeteneğidir. Osteogenezisin sağlanabilmesi için, defekt alanına yerleştirilecek greft materyalinin canlı veya prekürsör osteoblastlar ile donatılması gerekmektedir. Bu yöntemle kemik oluşum merkezleri oluşturulabilir. Otojen greftlerin uygulanması bazı cerrahi ve teknik zorluklar içerse de immünolojik tepkimeler ve doku reddi gibi sorunlar yaşanmaz. Osteojenik özellik taşıyan tek greft materyali otojen kemiktir. Mezenşimal kök hücrelerin osteoblastlara dönüşebilmesi nedeniyle, kemik iliği veya trabeküler kemik transplantları en yüksek osteojenik potansiyele sahip greftlerdir. Oral ve maksillofasiyel bölgedeki kemiklerin rekonstrüksiyonunda başarılı sonuçlar elde edebilmek için, alıcı yataktaki kan akışı ve fibroblastik proliferasyonun yanı sıra, transplante edilen kemiğin osteojenik kalitesi de büyük önem taşımaktadır.

Kemik greftlerinin osteogenezisini artırması, osteoblastları veya osteoblastlara dönüşme potansiyeline sahip hücreleri koruyarak ve alıcı dokuda osteoblast sayısını artırıcı bir şekilde indükleyerek mümkün olmaktadır.^{36, 127, 128}

2. Osteoindüksiyon

Osteoindüksiyon, doku içerisindeki farklılaşmamış mezenşim hücrelerini osteoblastlara dönüştürme yeteneğine sahip bir etki mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın etkinliği, greft içerisinde bulunan büyüme faktörlerine bağlıdır. KMP ve demineralize kemik matriksi, ana osteoindüktif materyaller olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca, otogreft ve allogreftler de belirli bir osteoindüktif özellik sergilemektedir. Kemik oluşumunu teşvik eden ajanlar aracılığıyla, işlenmemiş bağ dokusu hücrelerinin farklılaşması sağlanarak yeni kemik dokusu oluşturulmaktadır.

3. Osteokondüksiyon

Osteokondüksiyon, greft materyalinin kemik gelişiminde iskelet yapısı işlevi görmesi sürecini ifade eder. Defekt çevresindeki osteoblastlar, kemik oluşumunu gerçekleştirir ve mevcut kemik ile defekt arasında köprüler kurarak bu süreci destekler. Yumuşak dokulara yerleştirilen osteokondüktif greftler, kendi başlarına kemik oluşturma yeteneğine sahip değildir. Kemik oluşumu için, osteokondüktif greftlerin yüzeyinde mevcut kemik dokusu veya farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin varlığı gereklidir. Kansellöz otogreftler ve allogreftler, demineralize edilmiş kemik matriksi, hidroksiapatit, kolajen ve kalsiyum fosfat gibi bileşenler osteokondüktif özellikler taşımaktadır. Sentetik materyallerden üretilen alloplastlar yalnızca osteokondüktif özellik gösterirken, allogreftler aynı zamanda osteoindüktif özellikler de sergilemektedir.^{129, 130}

2.2.1.1 Otogreftler

Altın standart olarak kabul edilen otojen kemik greftleri, hastadan elde edilen ve en ideal materyal olarak tanımlanan greftlerdir.¹³¹ Taze otojen greftler, osteojenik özellikte hücreler içermesi ve immünolojik reaksiyonlara yol açmaması nedeniyle en avantajlı greft materyali olarak değerlendirilmektedir. Ancak, verici bölgede ikinci bir cerrahi müdahale gerekliliği, morbidite, postoperatif ağrı yönetimi, uzayan postoperatif bakım süresi ve öngörülemeyen rezorpsiyon süreleri bu materyalin dezavantajları arasında yer almaktadır.³

Otojen greft elde etme sürecinde en yaygın olarak tercih edilen dış kaynak iliak kemiktir. Ağız içinden ise mandibular simfiz, ramus, maksiller tüber veya ekzostozlar kullanılmaktadır. Uygun donör alanı, alınacak greftin miktarına ve vakanın gerektirdiği rejenerasyon türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir.¹³² Partikül formundaki greftlerin osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon potansiyeli daha yüksektir; zira bu tür greftler, büyüme faktörlerinin salınımı için daha geniş bir yüzeye sahiptir.¹³³

İskelet sistemindeki birçok kemik endokondral kökenlidir. Alveoler kemikte, maksilla ve mandibulada intramembranöz kemik oluşumu gözlemlenmektedir. Membranöz kaynaklı kemiklerin, endokondral kemiklere göre daha az rezorpsiyon gösterdiği bilinmektedir.¹³⁴ Serbest otojen kemik grefti, yerleştirildikten sonraki ilk iki hafta içinde osteojenik etki sergilemektedir. Greftlemeden 2-6 hafta sonra osteoindüktif etkisi başlar ve bu etki yaklaşık altı ay sürer. Nihayetinde, osteokondüktif etki ile apozisyonel kemik oluşumu gerçekleşir. Greftin organik bileşeni olan kolajen, grefte esneklik, dayanıklılık ve stabilite kazandırırken; inorganik bileşen olan hidroksiapatit, greftin rijitliğini artırmaktadır.¹³⁵

Otojen greftin periodontal cerrahi alanındaki uygulamaları arasında periodontal cep tedavisi, alveoler kemik ogmentasyonları, sinüs lift prosedürleri, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu ve implant cerrahisi yer almaktadır.

Literatürde yapılan çalışmalarda, posterior mandibular bölgede vertikal kemik ogmentasyonu için otojen blok ve partikül greftlerin karşılaştırıldığı görülmektedir. Otojen blok greftlerin partikül greftlere kıyasla daha fazla kemik kazancı ve kemik implant kontağı sağladığı belirtilmiştir.¹³³ Ancak otojen greftlerdeki rezorpsiyonun tedavi başarısını olumsuz etkileyebileceği ifade edilmektedir.

Maksiller sinüs ogmentasyonu üzerine yapılan çalışmalarda, otojen greftlerin yanı sıra beta-trikalsiyum fosfat gibi sentetik materyallerin kullanıldığı ve otojen kemik greftlerinin %45.7 oranında en yüksek rezorpsiyonu gösterdiği rapor edilmiştir.¹³⁶

Ayrıca, otojen greftlerin uzun dönem sonuçlarında ksenogreftlerle benzer implant sağkalım oranları sunduğu, ancak rezorpsiyon oranlarının %47.8 ile daha yüksek olduğu vurgulanmıştır.^{137, 138}

Otojen greft kullanılması ile her ne kadar öngörülebilir sonuçlar elde edilse de greft rezorpsiyonu başarıyı etkileyebilmektedir. Otojen kemik greftlerinin biyolojik aktivitesini artırmak ve rezorpsiyonu azaltmak amacıyla mine matriks türevleri, düşük doz lazer uygulamaları, trombosit zengin plazma ve fibrin gibi yöntemlerin kombinasyonlarının denenmekte olduğu belirtilmektedir.¹³⁹⁻¹⁴² Diş hekimliğinde, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ve kemik ogmentasyonları için birçok ajan lokal olarak uygulanmakta ve bu ajanların etkinliği üzerine araştırmalar sürmektedir.¹⁴³⁻¹⁴⁷

2.2.1.2 Allogreftler

Alıcı ile aynı kökene sahip, ancak farklı genetik özellikler taşıyan bireylerden elde edilen kemik dokuları, üç ana alt grupta incelenebilir: taze dondurulmuş kemik, dondurulmuş kurutulmuş kemik ve demineralize kemik matriksi. Farklı genetik kökenlerden elde edilmeleri nedeniyle, allogreftlerin immün yanıtları ve enfeksiyon hastalıklarını önlemek amacıyla son yıllarda kriyobiolojik yöntemler (dondurma ve dondurup kurutma) ya da irradyasyon teknikleri geliştirilmiştir. Allogreftler, uygulandıkları alanlarda osteoindüktif etki gösterdiğinden, mikroçevredeki damar yapılarının iyi yanıt vermesi durumunda otojen greftlerden beklenen kadar iyi sonuç vermektedir.^{148, 149}

2.2.1.3 Ksenogreftler

Donör ve alıcı gruplarının farklı türlere ait olduğu kemik greftleridir. Genellikle memeli hayvanlar, özellikle at, sığır ve domuz, donör olarak tercih edilmektedir. Bu hayvanlardan elde edilen kemik materyali, organik bileşenlerinden arındırmak amacıyla organik çözücüler (örneğin etilen diamin) içinde bekletilir ve geriye kalan inorganik matris sterilize edilerek kullanılmak üzere hazırlanır. Sığır kökenli ksenogreftler, biyolojik aktivitelerini artırmak için ince bir nano-kristal film kalınlığında kalsiyum fosfat tabakası ile kaplanmaktadır.¹⁵⁰

2.2.1.4 Alloplastlar

Alloplastlar, sentetik olarak üretilen greft materyalleridir. Otogreftlerin yeterli miktarda temin edilememesi, allogreft ve ksenogreftlerin immün yanıt ve enfeksiyon riski taşımaları nedeniyle son yıllarda sentetik materyaller, kemik defektlerinin onarımında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Çeşitli materyaller sentetik alloplast olarak tasarlandığından, ideal bir alloplast materyali için aranan belirli özellikler bulunmaktadır. Bu materyaller, immün sistemi tetiklememeli, deride alerjik reaksiyonlara yol açmamalı ve hücrelere zarar vermemelidir. Ayrıca, dış çevreden gelebilecek fiziksel ve mekanik etkilere karşı dayanıklı olmalı ve deformasyona uğramamalıdır. Ek olarak, maliyet açısından uygun, kolay erişilebilir, hidrofilik, kullanımı pratik ve şekillendirilebilir olmalıdır. Osteokondüktif ve osteoindüktif özellikler de taşınmalıdır. Alloplastların en önemli avantajı, bir donör gerektirmemeleridir. İstenilen boyut ve miktarda üretilibilmeleri, ek cerrahi alan ihtiyacı doğurmamaları ve ilave anestezi süreleri gerektirmemeleri diğer avantajları arasında yer almaktadır.^{151, 152}

Alloplastik materyallerin başarısı veya başarısızlığı, kimyasal bileşimi, biyostabilitesi, fiziksel formu, mekanik özellikleri ve implantın yerleştirileceği alan gibi birçok faktöre bağlıdır. Vücutta doğal olarak bulunan maddelerin alloplastların kimyasal yapısında yer alması, implantın başarı oranını artırmaktadır. İskelet sistemi esasen kalsiyumdan, yumuşak dokular ise hidrokarbonlardan oluşmaktadır. Genellikle alloplastlar, bu iki yapının temel bileşenleri olan karbon ve kalsiyumdan elde edilmektedir.^{151, 153}

2.2.1.5 Kalvaryal Defekt Modeli

Hayvan modellerinde kemik dokusunun beş biyolojik aktivitesi incelenebilir: osteogenez, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon, kütle transferi ve biyofiziksel etki. Kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen araştırmalar, kemik doku rejenerasyonu konusundaki çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir.¹⁵⁴

Kalvaryaya, insan vücudunun önemli bir bileşenini teşkil etmektedir. Çeşitli ve genellikle çift simetrik kemiklerden oluşan bu yapı, diğer vücut kemikleriyle

kıyaslandığında biyolojik olarak inert bir özellik taşımaktadır. Bu durum, yetersiz kan akışı ve azalmış kemik iliği miktarı ile ilişkilidir. Kalvaryanın kanlanma yapısı da kendine özgü bir düzen göstermektedir. Deneysel hayvanlarda kalvaryal defektlerin rejeneratif yetenekleri, insanlardakine göre daha üstündür. Kalvaryanın gelişimi, morfolojik ve embriyolojik olarak membran süreci aracılığıyla gerçekleşir; bu nedenle çene ve yüz bölgesindeki membranöz kemiklerle benzerlik arz etmektedir. Anatomik açıdan kalvaryaya, iki kortikal tabaka içermekte olup, bu yönüyle mandibulaya benzerlik göstermektedir. Fizyolojik olarak, kalvaryal kortikal kemik de atrofik bir mandibulaya benzerlik taşımaktadır.²⁴

Kalvaryal defekt modeli, araştırmacılar arasında kalvaryanın kemik yapısının sağladığı avantajlar nedeniyle oldukça yaygındır. Standart defektlerin tek tip ve tekrarlanabilir bir şekilde oluşturulabilmesi, bu defektlerin histolojik ve radyografik analizlerinin kolaylığı, cerrahi işlem için gerekli anatomik lokasyonun erişilebilirliği, ameliyat sırasında işlem kolaylığı, duranın ve alttaki cilt yapısının implant materyali için yeterli desteği sağlaması ve greftlenmiş alanların kontrol ile karşılaştırılabilmesi gibi nedenler, bu modelin tercih edilmesinde etkili olmaktadır.^{24, 155, 156}

Schmitz ve Hollinger¹⁵⁷ kritik boyutlu defekti, bir hayvanda herhangi bir osteopromotif bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı (dolumu) ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlamıştır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibröz bağ dokusuyla iyileşme eğilimi göstermektedirler. Literatürde, kemik rejenerasyonu açısından biyomateryal uygulanan birçok çalışmada 5 veya 8mm çapındaki defektler kritik boyutta defekt olarak adlandırılmıştır.^{25, 158-162} Literatürde sıçan kalvaryal kritik boyut defekti, kemik rejenerasyonu alanında en öngörülebilir ve yaygın olarak kullanılan *in vivo* modellerden biri olarak kabul edilmiş, çok çeşitli rejeneratif materyallerin ve tekniklerin geliştirilmesinde ve oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmıştır.²⁶ Ek olarak diş hekimliğinde yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ve kemik ogmentasyonları için çeşitli ajanlar lokal olarak uygulanmaktadır.¹⁴³⁻¹⁴⁷

2.3 POST-MENOPOZAL SEMPTOMLAR

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre Postmenopoz, bir kadının menopozdan sonraki yaşam evresidir. Menopoz, yumurtalık aktivitesinin durması sonucu adet döngüsünün kalıcı olarak sonlanmasıdır. Postmenopoz, bir kadının son adet döneminden bir yıl sonra başladığı kabul edilir ve yaşamın geri kalan kısmını kapsamaktadır.¹⁶³

Postmenopoz döneminde östrojen eksikliğine bağlı hormonal değişiklikler birçok biyolojik sistemi etkiler. Buna göre, menopozun belirti ve semptomları arasında merkezi sinir sistemiyle ilgili bozukluklar; metabolik, kilo ve kas-iskelet sistemi değişiklikleri; ürogenital ve cilt atrofisi; cinsel işlev bozukluğu yer alır. Uzun vadede ise kardiyovasküler hastalıklar ve osteoporoz görülme riskinde artış gözlenmektedir.^{164, 165}

2.3.1 Merkezi Sinir Sistemiyle İlgili Semptomlar

Merkezi sinir sistemi ile ilişkili semptomlar, over yetmezliği sonrası oluşan nörobiyokimyasal değişiklikler sonucu ortaya çıkan vazomotor semptomlar, uyku bozuklukları, anksiyete ve depresyon, migren ve bilişsel performans değişiklikleri gibi semptomlardır.

Vazomotor Semptomlar: Menopozun karakteristik özelliklerindedir ve genellikle ateş basması ve terleme şeklinde kendini gösterir.¹⁶⁶ Bu semptomlar menopoz öncesinde başlayabilir, menopozun ilk yıllarında zirveye ulaşabilir ve bazı kadınlarda 11-12 yıl sonrasına kadar devam edebilir.^{167, 168} Gece yaşanan semptomlar uyku kalitesini olumsuz etkiler ve sık uyanmalara neden olur.¹⁶⁹

Uyku Bozuklukları: Menopoz döneminde kadınların %40-60'ında görülen önemli bir şikayettir.¹⁷⁰ Bu dönemde, sıcak basmaları ve depresif belirtiler uyku düzenini bozar ve özellikle menopoz sonrası dönemde bilişsel gerileme riskini artırabilir.¹⁷¹ Ayrıca, menopoz sonrası dönemde obstrüktif uyku apnesi riski menopoz öncesine kıyasla daha yüksektir.¹⁷²

Depresyon ve Anksiyete: Menopoz geçişinde ve erken postmenopozal dönemde yaygın olup, özellikle kişisel depresyon öyküsü olan kadınlarda bu risk

artar.¹⁷³ Anksiyete düzeyi yüksek olan kadınlarda menopoz sürecinde bu semptomların daha da kötüleşebileceği gözlemlenmiştir.¹⁷⁴

Bilişsel Değişiklikler: Menopoz sürecinde hafıza ve konsantrasyonda azalmaya yol açar ve perimenopozal aşamada belirginleşir.¹⁷⁵ Cerrahi menopoz ise bilişsel fonksiyonlar üzerinde daha ciddi etkiler yaratabilir.¹⁷⁶ Vazomotor semptomların ve uyku düzensizliğinin bilişsel gerilemeyi artırdığı düşünülmektedir.¹⁷⁷

Migren: Menopoz sürecinde sık görülen bir başka semptomdur. Perimenopozal dönemde migrenin sıklığı artarken, menopoz sonrası bu sıklık azalabilir. Ancak yüksek frekanslı baş ağrıları menopoz geçişinde daha yaygındır.¹⁷⁸

2.3.2 Kilo ve Metabolik Değişiklikler

Orta yaş dönemindeki kadınların en sık şikayetlerinden biri kilo artışıdır. Menopoz sonrası kadınlarda obezite oranı, premenopozal kadınlara göre daha yüksektir. Ancak, kilo artışının menopozdan ziyade yaşlanma süreciyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.¹⁷⁹ 40-55 yaş arasındaki kadınlarda, 3 yıl içinde ortalama kilo artışı 2,1 kilogram olarak rapor edilmiştir.¹⁸⁰

Menopozla ilişkili olan temel değişiklik, vücut yağının yeniden dağılımıdır. Bu süreçte, genellikle gövde bölgesinde visseral yağ birikimi artar, bel çevresi genişler ve vücut şekli belirgin bir şekilde değişir.¹⁸⁰ Dual enerji X-ray absorpsiyometrisi (DXA), BT ve MRI gibi tekniklerle yapılan çalışmalar, menopoz sonrası kadınlarda karın bölgesindeki visseral yağ birikiminin premenopozal döneme göre arttığını doğrulamıştır.¹⁸¹ Visseral yağ dokusu, subkutan yağla kıyasla daha yüksek bir sağlık riski oluşturur ve bağımsız bir kardiyovasküler hastalık nedeni olarak kabul edilir. Bunun başlıca nedeni, insülin direncinin artması ve buna bağlı olarak diyabet ve metabolik sendrom gelişme riskidir.¹⁸² Ayrıca, yapılan kesitsel ve uzunlamasına çalışmalar, menopoz döneminde yumurtalık fonksiyon kaybının visseral yağ birikimine neden olduğunu göstermiştir.^{183, 184}

Cerrahi menopozun, yumurtalıkların korunarak yapılan histerektomiye veya doğal menopoza kıyasla kilo alımını hızlandırdığı da belirtilmiştir.¹⁸⁵

2.3.3 Kas- İskelet Sistemi Semptomları

Menopoz sonrası dönemde kadınlar için en büyük endişelerden biri kemik sağlığındaki bozulmadır. Postmenopozal osteoporoz, kemik mineral yoğunluğunda (KMY) azalma ve kemik yapısında bozulmalarla (korteksin incilmesi, gözenekliliğin artması, trabeküler bağlantıların azalması) karakterize dejeneratif bir kemik hastalığıdır. Osteoporoz, omurga, kalça ve bilek kırıkları riskini artırır ve uzun vadede sakatlıkla sonuçlanabilir.¹⁸⁶ Premenopoz veya erken perimenopoz dönemlerinde KMY’de minimal değişiklikler görülürken, geç peri-menopozda KMY hızla düşer. Menopoz sonrası yıllık kemik kaybı oranları, omurgada %1,8–2,3 ve kalçada %1,0–1,4 olarak tahmin edilmektedir.¹⁸⁷ Menopoz sonrası dönemin ilk 3–5 yılında trabeküler kemik dokusu hızla kaybedilirken, sonraki 10–20 yılda hem trabeküler hem de kortikal kemik etkilenir.¹⁸⁶

Orta yaş döneminde kadınlarda vücut kompozisyonundaki değişiklikler, yağ kütlesinin artışıyla birlikte kas kütlesinde azalma (sarkopeni) ile de ilişkilidir. Sarkopeni, doğrudan menopoza atfedilmese de, yaşlanan kadınlarda erkeklere göre daha belirgindir ve menopozdan sonra daha hızlı ilerlediği görülmektedir¹⁸⁸. Direnç egzersizleri ve yeterli protein alımı, kas kütlesinin korunmasında, hareketliliğin sürdürülmesinde ve düşme ile kırık riskinin azaltılmasında önemli yaşam tarzı faktörleridir.^{189, 190}

Osteoartrit de menopoz sonrası dönemde yaygın olarak görülmektedir. Özellikle, perimenopoz döneminde elin distal interfalangeal eklemleri ve başparmak kökünü etkileyen ağrı sıkça bildirilmektedir.¹⁹¹ Perimenopozdaki el osteoartriti genellikle 2–3 yıl içinde azalır, ancak ilerleyen dönemde diz ve omurga gibi diğer eklemlerde osteoartrit gelişiminin habercisi olabilir.¹⁹² Diz osteoartriti semptomları genellikle perimenopoz sırasında veya son menstrual periyottan (FMP) sonraki 5 yıl içinde başlar ve kadınlar tarafından sıkça rapor edilmektedir.¹⁹³

2.3.4 Ürogenital Semptomlar

Menopoz sonrası dönemde sık rapor edilmese de ürogenital semptomlar yaygın olarak görülür. Bu semptomlar arasında vajinal kuruluk, disparoni (ilişki sırasında

ağrı), vulvar kaşıntı ve yanma, dizüri (ağrılı idrara çıkma), sık idrara çıkma, idrar aciliyeti ve tekrarlayan alt idrar yolu enfeksiyonları bulunmaktadır¹⁹⁴. Uluslararası VIVA (Vaginal Health: Insights, Views and Attitudes) alışması, vajinal rahatsızlık yaşayan kadınların %83'ünde vajinal kuruluk, %42'sinde ilişki sırasında ağrı, %30'unda istemsiz idrar kaçırma, %27'sinde hassasiyet, %26'sında kaşıntı, %14'ünde yanma ve %11'inde dokunma sırasında ağrı olduğunu rapor etmiştir. Aynı çalışmada, vajinal rahatsızlık yaşayan kadınların %62'si semptomlarının orta veya şiddetli olduğunu belirtmiştir.¹⁹⁵

Uzunlamasına alışmalar, menopozla birlikte idrar kaçırma semptomlarında bir artış olduğunu göstermektedir. Ancak, bu değişikliğin menopoz geçişine mi yoksa bu dönemde sıklıkla görülen kilo artışına mı bağlı olduğu belirsizdir.¹⁹⁶ Vücut ağrılığındaki 1 kg'lık bir artışın orta yaşlı kadınlarda idrar kaçırma insidansını artırdığı gösterilmiştir.¹⁹⁰ Kesitsel alışmalar, menopozun tek başına idrar kaçırma belirleyicisi olmadığını, stres tipi idrar kaçırma riskinin obezite ve doğum sayısıyla, ani sıkışma tipi idrar kaçırma riskinin ise yaşla arttığını ortaya koymuştur.¹⁹⁷

2.3.5 Cilt, Mukoza ve Sa Değişiklikleri

Menopoz, cilt kalınlığını, elastikiyetini ve nemini azaltarak kırıklıkların artmasına neden olur.¹⁹⁸ Bu yapısal değişiklikler, özellikle dermiste meydana gelir ve kolajen üreten dermal fibroblastların kaybı, elastin ve proteoglikan içeriğinde azalma ile su tutulumunun düşmesiyle karakterizedir.¹⁹⁹ Benzer değişiklikler orogastrointestinal ve üriner sistem mukozasında da gözlenir ve bu bölgeler daha kırılgan hale gelir. Östrojen eksikliğine bağlı olarak mukozanın geçirgenliği artar, bu da patojenlere karşı duyarlılığı artırır ve mukozal iyileşmeyi geciktirir. Bunun temel nedenleri arasında zayıflamış humoral ve hücrenel bağışıklık yanıtı yer alır.²⁰⁰

Sa dağılımında da menopozla birlikte değişiklikler meydana gelir. Yüzde terminal kılların belirmesi ve vücut ile saçlı derideki kıllarda azalma sıkça görülür. Perimenopozal dönemde sa kaybı, genellikle saçların merkez ve alın bölgelerinde seyrelmesiyle ortaya çıkar; parietal ve oksipital bölgelerde de sa kaybı yaşanabilir.²⁰¹

2.3.6 Cinsel İşlev Bozukluğu

Uzunlamasına ve kesitsel çalışmalar, menopoz geçişinin yaşlanmadan bağımsız olarak cinsel istekte azalmayla ilişkili olduğunu göstermektedir.²⁰² Menopoz dönemi, hormon kaynaklı cinsel istek değişiklikleriyle karakterizedir. Özellikle perimenopozal dönemde cinsel işlevdeki en büyük düşüş, FMP'den 20 ay önce başlayıp 1 yıl sonrasına kadar devam etmektedir.²⁰³ Bu dönemde kadınlarda cinsel istekte azalma ve geç perimenopozda ağrılı cinsel ilişki (disparoni) sıklığında artış görülmektedir.²⁰² İlginç bir şekilde, erken perimenopozda mastürbasyon geçici olarak artarken, postmenopoz döneminde bu davranış azalma göstermektedir.²⁰²

Cinsel aktivite, vajinal kuruluk, kayganlaştırıcı kullanımı veya duygu durum bozukluklarından bağımsız olarak, FMP'den sonraki 5 yıl boyunca azalmaya devam etmektedir.²⁰³ Vulvovajinal semptomlar, cinsel işlev bozukluğunu artırarak sosyal, kişilerarası ve psikolojik iyi oluşu olumsuz etkileyebilir. Disparoni, partnerle cinsel yakınlıktan kaçınmaya neden olabilir.¹⁹¹ Avrupa REVIVE çalışması, ilişki sırasında yaşanan ağrının cinsel tatmin üzerinde önemli bir olumsuz etkisi olduğunu rapor etmiştir.²⁰⁴ Menopoz sonrası dönemde genel özsaygı ve yaşam kalitesindeki düşüş de partnerle cinsel yakınlığın azalmasına katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, uzun süreli bir ilişki içinde olmak, ileri menopoz dönemindeki kadınlarda bile tatmin edici bir cinsel yaşamın korunmasına yardımcı olabilir.¹⁹¹

2.3.7 Kardiyovasküler Değişiklikler

Menopoz sonrası dönemde kadınlarda ateroskleroz ve kardiyovasküler olumsuz olay riski artar. Bu durum, visseral yağ dokusunda üretilen pro-inflamatuar sitokinler ve adipokinlerin etkisine bağlı olabilir.²⁰⁵ Menopoz sonrası kadınlarda artan visseral yağ birikimi, kalp gibi diğer visseral dokularda yağ birikimi ile ilişkilidir.²⁰⁶ Geç perimenopozal ve postmenopozal kadınlarda, yaş, ırk ve obeziteden bağımsız olarak kalp yağı hacminin premenopozal kadınlara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.²⁰⁷

Menopozdan sonraki bir yıl içinde kan lipid profilleri daha aterojenik hale gelir; toplam kolesterol, LDL kolesterol ve apolipoprotein B (APOB) seviyelerinde belirgin

artışlar gözlenir. Ayrıca, menopoz geçişi sırasında HDL kolesterolün anti-aterojenik etkisi kaybolur; bu dönemde HDL seviyelerindeki artış, karotis intima-media kalınlığının ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir.^{208, 209} Östrojen seviyelerindeki belirgin azalma, endotel hücre büyümesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilir ve kadın cinsiyet hormonlarının damar düz kas hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını engelleyici etkisini azaltabilir.²¹⁰

Premenopozal kadınlarda erkeklere kıyasla daha düşük olan kan basıncı seviyeleri, menopoz döneminde bu avantajını kaybeder ve kadınların kan basıncı seviyeleri erkeklerle benzer hale gelir. Menopoz sonrası kadınlarda tuz duyarlılığı da artar; cerrahi menopozdan sonraki 4 ay gibi erken bir dönemde bile iki katına çıkarak hipertansiyon riskini artırır.²¹¹

Tüm bu kardiyovasküler değişiklikler, menopoz sonrası dönemde kardiyovasküler olumsuz olay riskini artırır. Özellikle 45 yaşından önce erken menopoz geçiren kadınlarda bu risk daha yüksektir.²¹²

2.3.8. Osteoporoz

2.3.8.1 Tanımı ve Epidemiyolojisi

Osteoporoz, kemik kütlesinde azalma ve mikroyapısal bozulmalar sonucu kemik kırılabilirliğinin artmasıyla fraktür riskini yükselten sistemik bir iskelet hastalığıdır.^{6, 213} Hastalığın adı, Yunanca kökenli “osteon” (kemik) ve “poros” (küçük delik) kelimelerinin birleşiminden türetilmiştir.²¹⁴ Düşük kemik yoğunluğu ile karakterize edilen osteoporozda, birim hacimdeki kemik kütlesi azalır ve buna bağlı olarak kemik mekanik açıdan yetersiz hale gelir.^{215, 216} Bu durum, özellikle omurga, radius ve kalça kemiklerinde kırık riskinin artmasıyla kendini gösterir.²¹⁷

Tüm dünyada insan ömrünün uzaması ve yaşlı nüfusun artışı, osteoporozun giderek önemli bir sağlık sorunu haline gelmesine neden olmuştur. Günümüzde, dünya genelinde 200 milyondan fazla bireyin osteoporotik olduğu tahmin edilmektedir.²¹⁸ Türkiye’de de toplumun yaşlanmasıyla birlikte osteoporoz, sağlık alanında öne çıkan bir sorun olarak dikkat çekmektedir. 2010 yılında gerçekleştirilen FRAKTÜRK

Tip II osteoporoz ise senil osteoporoz olarak adlandırılır ve 75 yaş üzerindeki kadın ve erkekleri eşit oranda etkiler. Bu osteoporoz türünün başlıca nedeni, yaşlanmaya bağlı olarak kemik oluşumunun azalmasıdır. Senil osteoporozda, trabeküler ve kortikal kemik kaybı orantılı şekilde gerçekleşir. Bu tip osteoporoz, genellikle 75 yaş ve üzerindeki bireylerde proksimal femur, proksimal humerus, proksimal tibia, pubik rami ve sakral alae bölgelerinde görülen kırıklarla ilişkilidir.²²⁵

Sekonder Osteoporoz

Sekonder osteoporoz, çeşitli endokrin bozukluklar (Cushing sendromu, diabetes mellitus, hiperparatiroidizm, hipertiroidizm), gastrointestinal sorunlar (subtotal gastrektomi, malabsorpsiyon, kronik obstrüktif sarılık), bağ dokusu hastalıkları (romatoid artrit, Ehler-Danlos sendromu, Marfan sendromu), diyetle ilgili bozukluklar (yetersiz kalsiyum alımı, artmış protein tüketimi), immobilizasyon, malign hastalıklar (lenfoma, lösemi, multiple myeloma) ve ilaç kullanımı (glukokortikoidler, heparin, antikonvülsanlar, metotreksat) gibi nedenlere bağlı olarak gelişen bir durumdur. Ayrıca alkol bağımlılığı, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, skorbüt ve sigara kullanımı gibi diğer faktörler de sekonder osteoporoz gelişimine katkıda bulunabilir. Tanısında tam kan sayımı ve çeşitli laboratuvar testleri gibi tetkikler yol gösterici olmaktadır.²²⁶

2.3.8.3 Osteoporozun Tanısı

Osteoporoz tanısı, genellikle KMY ölçümü veya düşük travmalı bir kırığın varlığı ile konmaktadır. Tanı sürecinde detaylı bir anamnez alınması, fizik muayene yapılması, KMY ölçümleri ve vertebral kırıkların değerlendirilmesi için görüntüleme yöntemlerinin kullanılması önemlidir. Osteoporoz tanısında geniş bir yaklaşım benimsenmelidir. Bu kapsamda, ayrıntılı hasta öyküsü ve fizik muayenenin yanı sıra, kemik yoğunluğunun ölçülmesi, vertebral kırıkların tespiti için görüntüleme yapılması ve kırık riskinin değerlendirilmesi gerektiğinde uygulanmalıdır.²²⁷

Osteoporoz tanısında en yaygın olarak önerilen yöntem, KMY'nin DXA tekniği ile ölçülmesidir. Ancak absorpsiyon yöntemleri dışındaki kantitatif ultrasonografi, konvansiyonel bilgisayarlı tomografi gibi tekniklerin iskelet durumunu değerlendirme

açısından yeterli geçerliliğe sahip olmadığı için bu yöntemlerin kullanılması önerilmemektedir.²²⁸

2.3.8.4 Osteoporozda Biyokimyasal Kemik Döngü Belirteçleri

Kemiğin rezorpsiyon (yıkım) ve formasyon (yapım) süreçlerinde, kanda ve idrarda bazı maddelerin miktarlarında değişiklikler meydana gelir. Bu maddeler, biyokimyasal kemik döngü belirteçleri olarak adlandırılır ve kemikteki yıkım ya da yapım süreçleri hakkında bilgi edinmek için kullanılabilir. Ancak bu belirteçler, osteoporozun tanısında doğrudan bir role sahip değildir.^{229, 230}

Biyokimyasal kemik döngü belirteçleri, KMY'den bağımsız olarak, tedavi edilmemiş hastalarda kırık riskinin belirlenmesi, kemik kaybı hızının değerlendirilmesi, tedavi sürecinde hastanın tedaviye uyumunun ve ilacın doğru kullanılıp kullanılmadığının izlenmesi gibi alanlarda kullanılabilir. Bu belirteçler, tedavinin üçüncü ve altıncı aylarında tekrarlanarak, tedavi öncesi ve sonrası KMY değişikliklerini değerlendirmek ve ilaç kullanımına ara verme veya yeniden başlama zamanını belirlemek amacıyla da faydalı olabilir.^{231, 232}

Kemik Yıkım Belirteçleri: Serum Tip I kolajen C terminal telopeptid (s-CTX) ve idrar N telopeptid (NTX).

Kemik Yapım Belirteçleri: Kemik spesifik ALP, osteokalsin ve serum prokolajen Tip I N propeptid (s-PINP).

Uluslararası Osteoporoz Vakfı ve Enternasyonal Klinik Kimyagerler Federasyonu, tedavi etkinliğini değerlendirme ve kırık riskini belirleme amacıyla, standardize yöntemler kullanılarak kemik yapım belirteci olarak serum PINP ve kemik yıkım belirteci olarak serum CTX ölçümünü önermektedir.^{231, 232}

Postmenopozal hastalarda kemik histomorfometri ile ölçülen kemik rezorpsiyonu ile tip 1 kolajen telopeptid seviyesinin yüksek korelasyonu saptanmıştır.²³³

Menopoz sonrası osteoporoz hastalarında üriner immunoassay yöntemi ile ölçülen NTX ve CTX seviyelerinin total ve serbest pridinolinlere ve diğer yıkım parametrelerine göre daha belirgin yükseldiği antirezorptif tedavilerle belirgin şekilde baskılandığı gösterilmiştir.²³⁴

Kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerinin non-invaziv olması, kolay tekrarlanabilmesi, tüm kemik döngüsü hakkında fikir vermesi, kemik metabolizmasındaki akut değişiklikleri hemen gösterebilmesi, hızlı kemik kaybını belirleyebilmesi ve tedavi prognozu hakkında erken bilgi vermesi gibi avantajlarının yanında, sadece kemik yapım ve yıkımdaki net değişimleri yansıtmaları, trabeküler ve kortikal kemik gibi özel iskelet bölgelerindeki döngü değişikliklerini ayırt edememeleri ve dolaşımdaki belirteçlerin başka metabolik fonksiyonlardan da etkilenebilmeleri gibi önemli dezavantajları vardır.^{235, 236}

Birçok çalışmada osteoporotik kırıkların sadece düşük KMY nedeniyle değil aynı zamanda hızlı kemik döngüsünün neden olduğu negatif mikromimari değişiklik sonucunda oluştuğu bildirilmektedir. Genel olarak kadınlar menopoz döneminde ve sonrasında her yıl ortalama spinal kemik yoğunluklarının %1'ini kaybederler. Bununla birlikte kadınların %35'i geç menopoz döneminde %3-5'e varan hızlı kemik kaybına uğrar. Hızlı kemik yoğunluk kaybını yaşayan grup biyokimyasal belirteçlerle belirlenebilmektedir.²³⁷ 20 yıldan uzun bir süre için osteoporoz hastası olan 653 hastayla yapılan bir çalışmada ölçülen en yüksek NTX, CTX, Osteokalsin, ve ALP değerlerinin en düşük KMY ölçümleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.²³⁸

Sonuç olarak biyokimyasal belirteçler, osteoporozun tanısında birincil önemi taşımamakla birlikte, hızlı kemik kaybının erken dönemde belirlenmesinde, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde ve monitörizasyonunda, kırık riski yüksek hastaların belirlenmesinde diğer klinik ve dansitometrik tanı yöntemlerine yardımcı değerli göstergelerdir.

2.3.8.5 Osteoporozun Tedavisi

Osteoporozda farmakolojik olmayan tedavi yöntemlerine (egzersiz, diyet , yaşam tarzı değişikliği) ek olarak hasta özellikleri, ilaç etkileri ve yan etkiler göz önünde bulundurularak bifosfonatlar, denosumab gibi anti-rezortif tedavi ajanları veya TPTD, ABL, romosuzumab gibi anabolik tedavi ajanları arasından uygun olan ajan seçilerek uygulanmaktadır.²³⁹

Osteoporoz tedavisinde kullanılacak ilacın kırık azaltıcı etkisinin gösterilmiş olması gerekir. Bu etkisi randomize kontrollü çalışma ile gösterilmiş olan ve bu nedenle FDA (Food and Drug Administration) ve EMA (European Medicines Agency) onaylanmış ilaçlar şunlardır:^{227, 240}

1. Bisfosfonatlar (alendronat, alendronat ve D3 kombinasyonu, ibandronat, risedronat ve zoledronik asit)
2. Denosumab (RANKL inhibitörü)
3. Kalsitonin
4. Raloksifen (östrojen agonist/antagonisti)
5. Doku selektif östrojen kompleks (konjuge östrojenler/bazedoksifene)
6. Teriparatid ve Abaloparatid (Parathormon ilişkili protein analogu)
7. Östrojenler (östrojen ve/veya hormon tedavisi)
8. Romosozumab (Monoklonal anti-sclerostin analogu)

Osteoporoz için en yaygın birinci basamak tedaviler bifosfonatlardır. Alendronat veya alendronik asit, kemik yüzeylerine bağlanan ve osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunu engelleyen, muhtemelen mevalonat yolunu inhibe eden azot içeren bir bifosfonattır. Kortikosteroid kaynaklı osteoporozu olan kadın veya erkeklerin tedavisinde ve menopoz sonrası kadınlarda osteoporozun önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir.²⁴¹

Osteoporoz tedavisinde kullanılan bir diğer popüler ilaç, RANKL'yi hedef alan bir insan monoklonal antikoru olan denosumab'dır. RANKL, osteoklast oluşumu, farklılaşması ve hayatta kalması için gerekli bir proteindir ve kemik rezorpsiyonunun temel aracıdır. Denosumab, bifosfonat ilaçlardan daha etkili bir şekilde kemik yoğunluğunu ve gücünü iyileştirir, ancak bifosfonat ilaçların aksine kemiğe dahil edilmez, bu nedenle tedavi durdurulduğunda etkisi sona ermektedir.²⁴²

Kalsitonin, böbrekte, hipotalamusta ve osteoklastların zarlarında ifade edilen kalsitonin reseptörüne bağlanan bir tiroid hormonudur. Kalsitonin, osteoklastları inhibe ederek ve kemik rezorpsiyon yeteneğini azaltarak çalışmaktadır. Ek olarak, görünüşe göre merkezi sinir sistemindeki nosisepsiyonun düzenlenmesi yoluyla kırıkla ilişkili ağrıyı azaltabilir. Postmenopozal osteoporotik kadınlarda vertebral kırıkları azaltmada olumlu bir etkiye sahiptir. Ancak, kalsitonin tedavisi yıllar içinde azalmıştır çünkü hormon tedavisinin kullanımı kardiyovasküler komplikasyonlar ve meme kanseri riskini artırmaktadır.²⁴³

En sık incelenen antiresorptif ilaçlar arasında raloksifen ve azedoksifen içeren seçici östrojen reseptör modülatörleri (SERM) yer almaktadır. Raloksifen, klimakterik semptomları hafifletme, kemik kaybını önleme ve kemik mineral yoğunluğunu artırma yeteneğine sahiptir. Diğer SERM'ler gibi, Raloksifen de hedef dokuya bağlı olarak agonistik veya antagonistik bir şekilde östrojen reseptörüne (ER) bağlanabildiği bilinmektedir.²⁴⁴ Bazedoksifen, hücresel düzeyde hem ER α hem de ER β 'ye bağlanmakta ve 17 β -estradiole bağlanmasını inhibe ederek kemik üzerinde agonistik aktivite uygulamaktadır.²⁴⁵

PTH analogları gibi anabolik ajanlar da osteoporoz tedavisinde kullanılmaktadır; ancak kullanım oranları daha sınırlıdır ve genellikle antiresorptif tedaviler etkili olmadığında tercih edilmektedir. Şu anda osteoporoz tedavisi için sadece iki osteoanabolik ilaç mevcuttur: TPTD ve ABL. TPTD veya insan PTH (1-34) hormonu, memelilerde kalsiyum oluşumunun ve kemik metabolizmasının ana düzenleyicisi olan PTH (1-84) zincirinden türetilen bir kemik oluşumu promotörüdür. TPTD'in birincil dizisi, mineral homeostazının aktif fazına karşılık gelen tam uzunluktaki PTH'nin (1-84) 34 amino asidiyle aynıdır. TPTD osteoblastogenezi teşvik

etmekte ve osteoblastik apoptozu önlemektedir.^{246, 247} Öte yandan ABL, ilk 20 amino asitteki PTH peptidiyle aynı olan PTH'nin 34 amino asitlik sentetik bir analogu olduğu bilinmektedir.²⁴⁸ ABL ile ilgili genel bilgiler ilerleyen bölümlerde detaylı olarak anlatılmıştır. (Bkz. 2. 4.Abaloparatid)

Ayrıca, kemik rezorpsiyonunda azalmaya neden olarak kemiği koruduğu gösterilen katepsin K inhibitörleri veya osteoblastik aktiviteyi inhibe ederek apoptozunu destekleyen SOST geninin ürünleri olan antisklerostin terapileri gibi osteoporoz tedavisi için yeni hedefler araştırılmaktadır. Ek olarak, LRP5/6 ko-reseptörlerine bağlanarak Wnt sinyal yolunu inhibe ederek kemik oluşumunu inhibe eden osteosit tarafından salgılanan bir protein olan sklerostine karşı antikorlar klinik olarak geliştirilmektedir. Romosozumab, hem antirezorptif hem de osteoanabolik işlevlerle etki edebilen, kırık riski yüksek postmenopozal kadınlarda osteoporoz tedavisi için FDA tarafından onaylanmış bir sklerostin inhibitörüdür.²⁴⁹

2.4. ABALOPARATİD

Daha önce BA058 olarak bilinen Abaloparatid (ABL), PTHrP'in ilk 34 amino asidinin sentetik bir peptit analogu olarak tanımlanmaktadır ve %76 dizi homolojisi paylaşmaktadır. İnsan PTH (1–34) veya rekombinant karşılığı TPTD ile karşılaştırıldığında, ABL %42 homoloji sağlayan 20 amino asit değişikliği gerçeğeleşmektedir (Tablo 2.3)(Şekil 2.7).^{250, 251}

Tablo 2.3 ABL, Abaloparatid; TPTD, teriparatid; PTHrP(1–36), insan paratiroid hormonuyla ilişkili protein ve (PTH) (1–84 insan paratiroid hormonu)'nun birincil amino asit dizisi.

İsim	Amino asit dizisi	Dizi homolojisi
ABL	<u>A</u> VSE <u>H</u> QL <u>L</u> H <u>DK</u> GK <u>SIQDLR</u> R <u>R</u> E <u>L</u> L <u>E</u> KLL <u>XKL</u> H <u>TA</u>	%100
TPTD (1-34)	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF	%42
PTHrP (1-36)	AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHTAEY	%76
PTH (1-84)	SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFQRPRKK EDNVLVESHEKSLGEADKADVNVLTKAKSQ	%42

ABL'in dizi farklılıkları kalın ve altı çizili olarak gösterilmiştir. 29. pozisyondaki amino asit X, proteinojenik olmayan amino asit 2-metilalanindir. Diğer harfler normalde oluşan proteinojenik amino asitleri ifade eder. Dizi homolojisi, ABL'in ilgili peptitlerin ilk 34 amino asit pozisyonuyla karşılaştırıldığında homolojisini gösterir.

PTHrP, PTH ile benzer N-terminal homolojisi olan ayrı bir gen ürünüdür. PTH kalsiyum hemoastazında endokrin regülatör olarak görev yaparken, PTHrP endokondral kemik gelişiminde rol oynamaktadır. ABL FDA tarafından Nisan 2017'de osteoporotik kırık öyküsü olan ya da kırık riski yüksek osteoporozlu postmenapozal kadınların tedavisinde kullanımı onaylanmıştır.²⁵²

Hem ABL hem de TPTD, kemik oluşumunu başlatmak için osteoblastlardaki PTH1R ile etkileşime girme yeteneğini paylaşmaktadır. ABL, PTH1R'in RG konformasyonuna seçici olarak bağlanan bir peptittir.²⁵³

PTH1R, günlük kan kalsiyum seviyelerini kontrol eden bir endokrin hormon olan PTH ve gelişmekte olan kemik ve diğer dokularda hücre çoğalması ve farklılaşma programlarını düzenleyen parakrin etkili bir morfojenik faktör olan PTHrP olmak üzere iki ayrı endojen polipeptit ligandının eylemlerini aracılık ederek kemik biyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır.²⁵³

Ala-Val-Ser-Glu-His-Gln-Leu-Leu-His-
Asp-Lys-Gly-Lys-Ser-Ile-Gln-Asp-Leu-
Arg-Arg-Arg-Glu-Leu-Leu-Glu-Lys-Leu-
Leu-{Aib}-Lys-Leu-His-Thr-Ala-NH₂

Şekil 2.7 Abaloparatid'in aminoasit dizisi

2.4.1 Etki mekanizması

ABL, kemik oluşumu ve kemik döngüsünün yanı sıra mineral iyon homeostazını düzenleyen bir G-protein-bağlı reseptör (GPCR) olan PTH1R'inde bir agonisttir.²⁵⁴ PTH1R, cAMP/PKA sinyal kaskadını aktive eden adenilil siklazı (AC) ve IP/PKC sinyal kaskadını aktive eden fosfolipaz C'yi (PLC) uyaran Gs ve Gq ile birleşir.^{21, 254} Bir agonist olarak ABL, osteoblastlardaki PTH1R üzerindeki anabolik aktivite, osteoblast aktivitesini artırmak için PLC'yi ve protein kinaz A'yı (PKA) aktive eden Gs-protein aracılı siklik adenozin monofosfat (cAMP) yolunu uyarır. ABL, osteoblastlar tarafından kemik oluşumunu desteklemek için kemik yeniden şekillenmesinin dengesini değiştirir ve osteoklast kemik rezorpsiyonunda minimal bir artış sağlar. Bu, periosteal, trabeküler ve endokortikal yüzeylerde kemik oluşumunda artışlara yol açar.²⁵⁵

PTH1R, farklı ligand bağlanma profillerine sahip iki konformasyona sahiptir. R0 konformasyonu, G proteininden bağımsız yüksek afiniteli bir konformasyondur ve bağlandıktan sonra ligand, cAMP'yi kademeli olarak artıran daha uzun süreli bir sinyal yanıtına neden olur. Uzun süreli sinyal yanıtı nedeniyle, R0 konformasyonuna seçici olarak bağlanan ligandlar, artmış kalsiyum mobilizasyonu ve hiperkalsemi riski ile ilişkilidir.²⁵³ Tersine, RG konformasyonu G-proteinine bağımlıdır (GTP γ S-duyarlı) ve daha kısa bir sinyal yanıtı verir.^{21, 253} ABL, RG konformasyonuna daha büyük bir seçicilikle bağlanır, daha geçici sinyal yanıtlarına neden olur ve kemik rezorpsiyonu yerine net kemik oluşumunu destekler.^{253, 256} İlacın TPTD'ye kıyasla hiperkalsemi ve osteoklast rezorpsiyonu açısından nispeten düşük risk taşıması, ABL'nin RG konformasyonuna seçici olarak bağlanmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.²⁵⁶

257

Yapılan bir çalışmada, ABL'nin iki yüksek afiniteli PTH1R konformasyonuna bağlanma kapasitesi, radyoligand rekabet yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. ABL'nin, R0 konformasyonuna zayıf bağlanması ile RG konformasyonu için daha fazla seçicilik gösterdiği bulunmuştur. ABL'nin anabolik etkileri, düşük osteoklast rezorpsiyonunu korurken, cAMP sinyallemede hızlı ve seri bir artışa yol açan RG için daha fazla afiniteye sahip olması ile açıklanabilmektedir.²⁵³

ABL ayrıca testis ve epididim gibi hedef hücrelerde endikasyon dışı hedefler olarak PTH1R'nin aşağı akışında Gq ve β -arrestin-1 yolunu aktive etmektedir. Bu da anti-enflamatuar etkiler oluşturmakta ve epididimit ve orşit semptomlarının hafifletilmesi ile ilişkilendirilmektedir.^{21, 256, 258}

2.4.2 Yan etkiler

Klinik denemelere katılan deneklerin %2'sinden fazlası tarafından bildirilen en yaygın yan etkiler arasında hiperkalsüri, baş dönmesi, mide bulantısı, baş ağrısı, çarpıntı, yorgunluk, üst karın ağrısı ve vertigo bulunmaktadır.²⁵⁹

Klinik öncesi çalışmalar, ABL'nin sistemik günlük uygulamasının kemirgenlerde osteosarkom insidansında doz ve zamana bağlı bir artışa yol açtığını ortaya koymuştur.²⁶⁰ ABL'nin insanlarda osteosarkoma neden olup olmayacağı bilinmemektedir.²⁵⁹

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (PAÜBAP) tarafından desteklenen 2023DİŞF010 kodlu bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmamızın yürütülebilmesi için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneysel Etik Kurul Başkanlığı'ndan 27.07.2023 tarihli ve 2023/05 sayılı karar ile etik kurul onayı alındı (Ek.1). Bu karar sonucunda PAUHADYEK 2023DİŞF010 nolu çalışmamızda "Hayvan Deneysel Etiği" ne uygun olarak çalışıldı.

3.2 Deneysel Hayvan Sayısı ve Deneysel Grupları

Çalışmanın deneysel kısmı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmamızda her grup için örneklem büyüklüğü, 0.40'lık bir etki boyutuyla önemli farklılıkları saptamak üzere %90 güç elde etmek için 0.05'lik bir alfa anlamlılık düzeyi temelinde hesaplandı.²⁶¹ Bu analiz ışığında çalışmamızda veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen 20-22 aylık, 250-300 g ağırlığında 32 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı.

Bu çalışma için kullanılacak olan sıçanlar, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Denekler, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık siklusu sağlanacak şekilde tutuldu, serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Oda ısı 22 ± 2 °C' de sabit tutuldu. Buldukları odanın nispi nem oranı %30-45 arasında tutularak, odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenildi. Sıçanlar kafeslerde tek olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı.

Tablo 3.1 Kontrol ve deney gruplarındaki hayvan sayıları

Grup 1: Kontrol Grubu (K)	8 adet
Grup 2: Otojen Greft (O)	8 adet
Grup 3: Abaloparatid (ABL)	8 adet
Grup 4: Abaloparatid+ Otojen Greft (ABL+O)	8 adet
Kullanılan toplam hayvan sayısı	32 adet

3.3 Cerrahi Prosedür

Çalışmamız esnasında yapılacak tüm işlemler steril ortamda gerçekleştirildi. Tüm sıçanlara genel anestezi amacıyla 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve ile 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun 2%, Bayer, İstanbul, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Sıçanlar sabitlenip, arcus costalar ve inguinal bölgelerdeki tüyler alındı. Ameliyat bölgesi povidon-iyot solüsyonu (Poviodex, Kimpur, Türkiye) ile temizlendikten sonra 3 cm'lik bir insizyon yapıldı. Abdominal kaslar ve periton açılarak omentum kaldırıldı ve overler mesoovaryum ve uterus kornu üzerinden 4/0 glikolid bazlı emilebilir sütür (Vicryl, Ethicon, Brüksel, Belçika) malzemesi ile bağlandı ve çıkarıldı. Kanama kontrolü yapıldıktan sonra kaslar ve cilt altı dokular yine 4/0 glikolid bazlı emilebilir sütür (Vicryl, Ethicon, Brüksel, Belçika) ile suture edildi, cilt ise 4/0 ipek (Doğsan, İstanbul, Türkiye) sütür ile kapatıldı. Ameliyat sonrası enfeksiyon riskini azaltmak için sıçanlara antibiyotik ve analjezik uygulaması yapıldı. Sıçanlar kontrol edilip yara bakımı yapıldıktan sonra kafeslerine yerleştirildi. Tüm sıçanlara bilateral overiektomiden sonraki 8 hafta boyunca herhangi bir müdahale yapılmadı.

Ovariectomiden 8 hafta sonra deney hayvanlarının anestezisi intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun 2%, Bayer, İstanbul, Türkiye) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) kullanılarak sağlandı.

Genel anestezi altındaki sıçanlardan serum osteoklastik faaliyeti gösteren bir biyomarker olan serum CTX-I aracılığı ile kalvaryal operasyonlarından önce artmış kemik turnoverını ortaya koymak amacıyla, kuyruk ucundan kan alındı. Alınan ortalama 2 ml kan örnekleri, serum ayırma tüplerinde (BD Vacutainer® SST T™ II Advance) toplandı ve 15 dakika süre ile 2000 rpm devirle santrifüj edilerek serum örnekleri kan plazması üzerinde toplandı. Elde edilen serum örnekleri eppendorf tüpe koyuldu. Serum CTX-I ELISA Kit (BT LAB, Şanghay, Çin) aracılığıyla serum örneklerinin CTX-I değerleri tespit edildi. Serum CTX-I seviyeleri, postmenopozal osteoporoz etkilerini ortaya koymak için analiz edilmiştir.

Sıçanlara uygun genel anestezi sağlandıktan sonra kalvaryum tıraş edildi. Antisepsi sağlamak için povidon-iyot solüsyonu (Poviodex, Kimpur, Türkiye) uygulandı (Şekil 3.1). Sonrasında açılacak alana 1:100.000 epinefrin ile %2 lidokain uygulanarak lokal anestezi sağlandı. Cerrahi alan steril ameliyat örtüleri ile izole edildi. Kalvaryal alanda parietal kemikleri ortaya çıkarmak için orta hat boyunca 2 cm uzunluğunda bir kesi yapıldı. Ekartörler kullanılarak cerrahi alanda yeterli görüş sağlandı (Şekil 3.2). Kafatası kemiğinin ortasında 8 mm çapında trefan frez (Ocean Dental, İstanbul, Türkiye) ile hem dış hem de iç kortikal çıkarılıp dura mater korunarak 8 mm çapında kafatası defekti oluşturuldu [8]. Dental drill (NSK Surgic AP, Nakanishi Inc., Tokyo, Japonya) dakikada 10.000 devire (RPM) ayarlandı ve trepan ucu frezleme işlemi sırasında serum fizyolojik ile soğutuldu. Defekt bölgesindeki kemik duramatere zarar verilmemeye özen gösterilerek çıkarıldı. (Şekil 3.3-4-5)

Kontrol grubunda oluşturulan defekte herhangi bir biyometaryal uygulanmayıp boş bırakıldı. O grubunda kemik defekti oluşturulurken elde edilen otojen kemik, dental kemik öğütücüsü (Schwert, Seitingen/Oberflacht, Almanya) ile öğütüldü. Partikül boyutuna getirilen otojen greftler, greft taşıyıcısı (Queen Dental, İstanbul, Türkiye) ile defekt bölgesine yerleştirildi. ABL grubunda kemik defekti

oluşturulduktan sonra Fosfat Tamponlu Salin (PBS) içinde çözülmüş 40ug/kg ABL, jelatin spongostana emdirilerek defekt bölgesine uygulandı. ABL+O grubunda kemik defekti oluşturulurken elde edilen otojen kemik, dental kemik öğütücüsü (Schwert, Seitingen/Oberflacht, Almanya) ile öğütülüp partikül haline getirildi. Defektlere otojen kemik partikülleri ile PBS içinde çözülmüş 40ug/kg ABL karıştırılarak greft taşıyıcısı (Queen Dental, İstanbul, Türkiye) ile uygulandı.

Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra 4/0 glikolid bazlı emilebilir suture (Vicryl, Ethicon, Brüksel, Belçika) ile periosteum, daha sonra basit bir dikiş tekniği ile 4/0 ipek suture (Doğsan, İstanbul, Türkiye) ile deri dokusu dikildi ve cerrahi alan kapatıldı. Sıçanların tamamı gün aşırı yara temizliği için muayene edildi.

ABL ve ABL+O gruplarında kullanılan ABL (MedChemExpress, ABD) (Katalog numarası: HY-108742A) Alfagen laboratuvar malzemelerinden temin edildi. Protokolünde belirtildiği şekilde PBS ile çözdürüldü. 40 ug/kg ABL; 100µl (0,1 ml) hacim ayarlı otomatik pipet (ISOLAB, İstanbul Türkiye) ile ayarlanarak eppendorf tüplerine taze olarak hazırlandı (Şekil3.10).



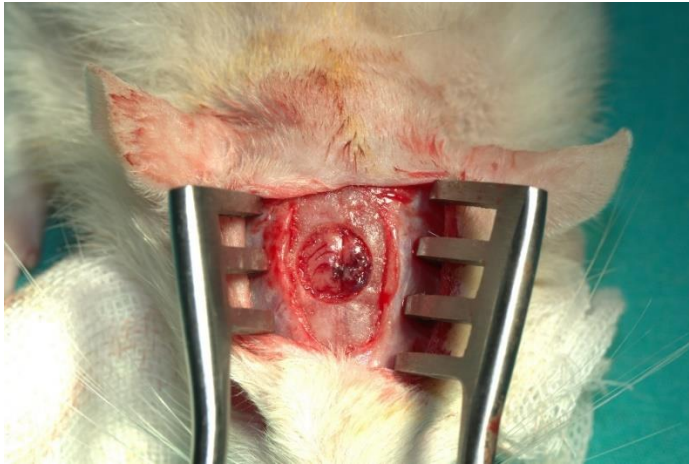
Şekil 3.1 Sıçanların kalvaryumu tıraş edildi ve povidon-iyot solüsyonu uygulandı.



Şekil 3.2 Kesi atıldı ve ekartör ile yeterli görüş sağlandı.



Şekil 3.3 Trepan uçla frezleme sırasında serum fizyolojik ile soğutuldu.



Şekil 3.4 Defekt bölgesindeki kemik duramatere zarar verilmemeye özen gösterilerek çıkarıldı.



Şekil 3.5 Otojen kemik, dental kemik öğütücüsü ile öğütüldü.



Şekil 3.6 Otojen greft partikül haline getirildi. O ve ABL+O gruplarında kullanıldı.



Şekil 3.7 Sol tarafta spongostana emdirilmiş (ABL grubu), Sağ tarafta otojen grefile karıştırılmış ABL (ABL+O grubu) gösterilmektedir.



Şekil 3.8 Periostun 4/0 glikolid bazlı emilebilir sütün ile dikildi.



Şekil 3.9 Kafa derisi basit sütün tekniğinde 4/0 ipek sütün ile dikildi.



Şekil 3.10 ABL dozları, 100µl (0,1 ml) hacim ayarlı otomatik pipet ile ayarlandı.

3.4 Sıçanların Bakımı ve Sakrifiye Edilmesi

Postoperatif olarak deney hayvanlarına Seftriakson 25 mg/kg (Yavuz İlaç, İstanbul, Türkiye) ve Rimadyl 4 mg/kg (Pfizer, Newyork, NY, ABD) flakon 3 gün süre ile subkutan olarak verildi.

Deney hayvanları kalvaryal defekt oluşturulduktan 8 hafta sonra anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi. Hayvanların kalvaryumları alınarak %10'luk formaldehit içinde saklandı. Geriye kalan hayvan atıkları plastik torba içinde toplanıp, hastane tıbbi atıklarına atıldı.

3.5 Histopatolojik ve Histomorfometrik İnceleme

Tez çalışmanın deneysel aşamasının süresinin bitiminden sonra tüm sıçanlara yüksek anestezi uygulaması ve ardından servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandı. Nekropsi sırasında kafa derisi yüzüldükten ve yumuşak dokular uzaklaştırıldıktan sonra kafatasındaki defekt bölgesi defekt alanı tam ortada kalacak şekilde çevresindeki kemiklerden dikkatlice ayrıldı ve defekt bölgesi örnekleri toplandı. Takiben tüm örnekler tüm örnekler %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içine atılarak tespit edildi. Defekt bölgesini içeren örnekler 1 hafta kadar formaldehit solüsyonunda tespit için bekletildi. Bu aşamadan sonra tüm örnekler dekalsifikasyon aşamasına alındı ve (10% EDTA Decalcification Solution (E-IR-R112), Elabscience USA) solüsyonu içinde 2 hafta boyunca bekletildi. Bu aşama sırasında her 3 günde bir kemiklerin yumuşama miktarları kontrol edildi ve solüsyonları değiştirildi. Bu işlem tüm kemikler yumuşayana ve kesilebilecek hale gelene kadar devam ettirildi. Bu aşamada defekt çevresindeki fazla dokular da uzaklaştırıldı ve defekt alanı tamamen kesit alınabilecek hale gelene kadar bu işleme devam edildi. Yumuşayan kemik örnekleri defekt alanı tam ortada kalacak şekilde dikkatlice trimlenerek doku takip kasetlerine içine yerleştirildi. Tüm kemik örnekleri akan su altında yıkandıktan sonra rutin doku takip aşamasına geçildi. Bu işlem için tam otomatik doku takip cihazı (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) günlük takip programına ayarlanarak kullanıldı. İçlerinde kemik dokusu örneklerinin bulunduğu kasetler gece boyunca %80'lik alkolden başlanarak %100'lük alkollere kadar dereceleri artan alkol serileri

ile hemen ardından iki adet ksilol sersinden geçirildi. Böylece önce kemik örneklerinin dehidratasyonları ve hemen ardından da dokulardaki yağların uzaklaştırılması sağlandı. Su ve yağları alınana kemik dokusu örneklerinin bulunduğu kasetler hemen ardından sıcak parafine alındı ve böylelikle doku boşluklarına parafinin yerleşmesi sağlandı. Tüm gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere geçirilen ve takiben ksilolde bekletilen kemik dokusu örnekleri ertesi gün blokaj işlemine tabi tutuldu. Blokaj aşaması için cihaz içinde oku takipleri biten kemik dokusu örnekleri bu cihazdan çıkarılıp doku blokaj cihazına (Leica Histocore Arcadia H) (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yerleştirildi. Blokaj cihazında önceden ısıtılmış özel metal doku blokaj kalıplarına yerleştirilen kemik örnekleri defekt bölgeleri metal yüzeye gelecek şekilde dikine olarak metallere dikkatlice yerleştirilerek üstlerine sıcak parafin takviyesi yapıldı. Karışıklıkları önlemek için takip aşamasında kullanılan ve üzerlerine hayvan numarası ve çalışma grupları yazılı olan kasetleri ile kapatıldı ve parafin bloklar oluşturulmuş oldu. Bu aşamanın ardından parafinin donarak sertleşmesi amacıyla tüm bloklar blokaj ünitesindeki soğuk tablalı bölüme yerleştirildi. Metal kalıplar bu tablanın üstünde soğuyarak parafin bloklar kalıplardan ayrıldı. Tüm örneklerin bulunduğu parafin bloklar kesit işlemine kadar +4°C'lik buzdolabında tutuldu. Buzdolabı içinden çıkarılan parafin bloklar kesit işlemi için soğuk tabla üzerine yerleştirildi. Ardından tam otomatik rotary mikrotomla (Leica 2155) tüm parafin bloklardan 5 µm kalınlıkta 13'er seri kesit alındı. Kesitlerden bir serisi normal lamlara çekildi ve histopatolojik incelemeler için hematoksilin eozin ile boyamaya alındı. Diğer 12 seri kesit polilizinli lamlara çekildi ve immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı.

Rutin histopatolojik değerlendirme için normal lamlar üzerine alınan kesitler boyama köprülerine yerleştirilerek 60°C'ye ayarlanarak ısıtılmış olan etüvde 1 saat kadar tutularak tamamen kurumaları ve kesitlerin lamlar üzerine daha iyi yapışması sağlandı. Ayrıca bu ısıtma işlemi parafinin erimesini ve kesitler üzerinden uzaklaşmasını sağlamış oldu. Etüvden alınan soğutulan kesitler rutin hematoksilin-eozin boyaması aşamasına alındı. Bu aşamada ilk olarak tüm kemik kesitleri 30'ar dakikalık sürelerle 3 ayrı ksilol serisinden dikkatlice geçirildi ve kesitler üzerindeki kalmış olan parafin artıklarının eritilerek uzaklaştırılması sağlandı. Deparafinize olan

kesitler sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik alkoller olacak şekilde yüksek dereceli alkollerden başlanarak düşük dereceli alkollere doğru geçirildi ve dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi. Hemen ardından tüm kemik kesitleri Harris hematoksilenle (15 dakika) ve ardından eozinle (3 dakika) boyandı. Bu işlem tamamlanınca bu kez sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollere düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere geçirilerek dehidrasyonları gerçekleştirildi. Hemen ardından tüm kesitler parlatma için 3 ayrı ksilol serisinden geçirildi. Takiben kesitlerin üzerlerine özel yapıştırıcı olan entellan damlatıldı ve lamel ile kapatıldı. Bu şekilde 1 gün süre ile oda ısında kurumaya bırakıldı. Kuruması tamamlanan kemik kesitleri Olympus CX21 model ışık mikroskobunda incelendi. Olympus DP26 model kamera ile histopatolojik dijital fotoğraflar çekildi ve yazım aşamasında kullanılmak üzere bilgisayar ortamına aktarıldı.

Kemik iyileşme durumları histomorfometrik parametrelere göre hesaplandı. Buna göre total iyileşme alanı (mm^2), defekt kapanma oranı (%), yeni şekillenmiş kemik alanı (mm^2) ve rezidüel materyal alanı (mm^2) x400 objektif altında değerlendirildi.²⁶² Ayrıca defekt bölgesinde osteoblast ve osteoklast sayıları 1.23mm^2 lik alanda (x400 büyütmede) sayıldı.²⁶³ Tüm defekt alanı iki boyutlu olarak ve 5 ayrı sahada değerlendirildi. Histomorfometrik analizler için Database Manual CellSens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) programı ile Image J 1.48 versiyon (National Institutes of Health, Bethesda MD) programı kullanıldı.

3.6 İmmunohistokimyasal İnceleme

İmmunperoksidaz incelemeler için polilizinli lamlara alınarak hazırlanan seri kesitler streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemine göre boyandı. B-catenin (beta Catenin Antibody - #AF6266), KMP-2 (KMP2 Antibody - #AF5163), OPG (Osteoprotegerin Antibody - #DF6824), OST (osterix Antibody - #DF7731), RANKL (RANKL Antibody - #AF0313) ve RUNX (RUNX2 Antibody - #AF5186), Osteonektin-Sparc (SPARC Antibody - #DF6503), TGF-B (TGF beta 1 Mouse monoclonal Antibody - #BF8012), Kolajen-1 (Collagen I Antibody- #AF7001), Osteokalsin (Osteocalcin Antibody - #DF12303), ALP, (Alkaline Phosphatase

Antibody - #DF6225), VEGF (VEGFA Antibody - #AF5131) antikorları ile boyandı. IHC için Affinity Bioscience, (Canada) firmasının primer antikorları 1/100 dilüsyonda kullanıldı. Boyamalar için sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) ve kromojen olarak 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Abcam, UK) kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü için histopatolojik boyama yönteminde ayrıntıları verilen şekilde kesitler 3 ayrı ksilol serisinden geçirilerek deparafinize hemen ardından dereceli azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidre edildi. Bu aşamadan sonra tüm kesitler 10 dakikalık bir süre ile distile suda içinde yıkandı. İmmunohistokimyasal boyama metodunun bundan sonraki tüm aşamaları nemli kamaralar içinde yapıldı. İlk olarak kesitlerde bulunan endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için tüm kesitler metanol içinde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Bu aşamanın ardından 10 dakikalık sürelerle iki kez PBS (pH 7,2) içinde yıkandı. Takiben, non-spesifik antijenik boyanmaları önlemek için 20 dakikalık bir süreyle bloking serumda bekletildi. Bunun ardından kesitler üzerindeki fazla serum atıldı ve yıkama yapılmadan kesitler üzerine primer antikorlar damlatıldı. Primer serumlar ile kesitler bir gece boyunca +4°C'de buzdolabında inkübe edildi. Ertesi gün tüm kesitler aynı şekil ve sürelerde PBS ile yıkandı. Takiben 30 dakikalık bir süreyle streptavidin ile inkübe edildi. Ardından tüm kesitler iki defa 10'ar dakika sürelerle PBS içinde yıkandı. Bu aşamanın ardından tüm kesitler 20 dakikalık bir süre ile biotinli serum ile inkübe edildi ve ardından aynı şekil ve süreyle PBS içinde yıkandı. Bu aşamadan sonra yeni hazırlanan DAB substrat ile 5-10 dk'lık sürelerle inkübasyona bırakıldı. Ardından harris hematoksilen ile zemin boyaması yapılarak boyama işlemi tamamlandı. Takiben dereceleri artan alkol serilerinden geçirilen tüm kesitlerin dehidre edilmesi sağlandı. Bu aşamanın ardından ksilol ile şeffaflaştırılarak özel yapıştırıcı (Entellan- Merck) ile lamel kapatılarak ışık mikroskopunda (Olympus CX41) incelendi. Negatif kontroller için primer serum aşamasında onların yerine antikor sulandırma sıvıları damlatılarak aynı prosedürler tekrarlandı. Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak mikrofotografi ve morfometrik inceleme yapıldı. İmmunohistokimyasal boyanma şiddeti 0 ile 3 arasında semikantitatif olarak skorlandı, 0= negatif, 1= hafif ekspresyon, 2= orta ekspresyon ve 3= şiddetli ekspresyon olarak değerlendirildi. Skorlara istatistik analiz yapılarak

gruplar arasındaki fark değerlendirildi. Immunohistokimyasal skorlamalar için Image J 1.48 (National Institutes of Health, Bethesda MD) programı kullanıldı.

3.7 Mikro-BT analizleri

Taramalar Erciyes Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Mikro-BT (Bilgisayarlı Tomografi) taramaları ve analizlerinde kontrol ve deney gruplarındaki her bir numune için aynı konumda, standart çekim prosedürü ve tarama yöntemi kullanıldı. Mikro-BT cihazının gerekli kalibrasyonları, taranmış kemik örneklerinin hacimsel segmentasyonu ve ölçümleri yapıldıktan sonra görüntülerin analizleri tamamlanmıştır.

Taramalar SkyScan-1272 (Bruker, Kontich, Belçika) cihazı kullanılarak yapıldı. Cihazın özellikleri bir X-ışını kaynağı; 40-100 kV, 10 W (4 W'da <5 µm spot boyutu), X-ışını kamerası; 16 MP, maksimum büyütmede 4096 × 4096 piksel boyutu idi. İfade, 16 MP kamera için <0,35 µm idi. Taranan örneklerden elde edilen verileri dönüştürmek için NRecon v.1.6.3 yazılımı (Bruker, micro-CT, Belçika) kullanılırken, analiz CTAn v.1.12 yazılımı (Bruker, micro-CT, Belçika) üzerinde gerçekleştirildi. Doku hacmi (TV, mm³), kemik hacmi (BV, mm³), kemik yüzeyi (BS, mm²), kemik yüzeyin hacmine oranı (BS/BV; kemik yüzeyi/kemik hacmi, mm⁻¹), kemik yüzey yoğunluğu (BS/TV; kemik yüzeyi/doku hacmi, mm⁻¹), kemik hacim yüzdesi (BV/TV; kemik hacmi/doku hacmi, %), trabeküler kalınlık (Tb.Th, mm), trabeküler sayı (Tb.N, mm⁻¹) ve traküler ayrılma (Tb.Sp, mm) mikro-BT'de ölçüldü.



Şekil 3.11 Bruker SkyScan 1272 Mikro-BT Tarama Cihazı

3.8 Enzime Bağlı İmmünosorbent Tahlili (ELISA)

Sıçan çapraz bağlı CTX-I kolajen ELISA kiti (Cat.No E1146Ra), 0.5-150 ng/ml standart eğri aralığı ve 0.27 ng/ml duyarlılığı ile sıçan serumunda CTX-I seviyeleri tespit edildi. Tüm reaktifler, standart çözeltiler ve numuneler talimatlara uygun olarak hazırlandı ve 2-8°C'den çıkarılarak 30 dakika boyunca oda sıcaklığına getirildi. Önceden kaplanmış ELISA plakasına standart kuyucuklarına 50 µL standart çözeltisi eklendi; biyotinleştirilmiş antikor eklenmedi çünkü standart çözeltisi zaten biyotinleştirilmiş antikor içeriyor. Numune kuyucuklarına 40 µL numune ve 10 µL anti-CTX-1 antikor eklenildi, ardından hem numune hem de standart kuyucuklarına (boş kontrol kuyucukları hariç) 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Kuyucuklar iyice karıştırıldı, plaka kapak ile kapatıldı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnküasyon tamamlandıktan sonra plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı; her yıkamada 300 µL tampon eklendi ve 30 saniye ile 1 dakika süreyle yıkandı. Yıkama sonrası her kuyucuğa 50 µL substrat çözeltisi A ve ardından 50 µL substrat çözeltisi B eklendi, plaka yeni bir kapak ile kapatılarak 37°C'de karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. Standart kuyucuklarında mavi gradyan gözlemlendiğinde, her kuyucuğa 50 µL sonlandırma solüsyonu eklendi ve renk anında sarıya dönüştü. Absorbans değerleri, sonlandırma solüsyonunun eklenmesinden sonraki 10 dakika içinde 450 nm'de bir mikrolaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar, oluşturulan standart eğriye göre konsantre olarak hesaplandı.

3.9 İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmanın istatistik analizi IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corp., Armonk, NY) paket programda yapıldı. Dört grup arasındaki CTX-I sonuçlarının değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi uygulandı. Histopatolojik, immünohistokimyasal ve mikro-BT verilerinde gruplar arası farklılığın değerlendirilmesi için non-parametrik test olarak Kruskal Wallis, gruplar arası ikili karşılaşma için Bonferroni düzeltmesi ile post hoc Mann-Whitney U kullanıldı. p-değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Klinik Bulgular

Deneyisel çalışma süresince sıçanların uygulanan cerrahi işlemleri iyi tolere ettiği, beslenmeleri konusunda herhangi bir olumsuzluk yaşanmadığı, operasyonlar sebebiyle herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlendi.

4.2 Serum CTX Bulguları

Tüm deney sıçanlarına ovariektomi uygulanmış olup, 8 hafta sonrasında serum CTX-I değerleri ölçülmüştür. Bu ortalama değerler, kullanılan ELISA kitinin standart eğrisi (0.5-150 ng/ml) göz önüne alındığında yüksek seviyelerdeki kemik rezorpsiyonunu işaret etmektedir. İstatistiksel analiz sonucunda, dört grup arasında serum CTX-I değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0,715$). Bu bulgular, ovariektomi yapılan sıçanlarda postmenopozal osteoporozun başarıyla gerçekleştiğini ve gruplar arasında kemik turnoverında anlamlı bir farklılık olmadığını göstermektedir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 CTX-I değerleri istatistiksel verileri

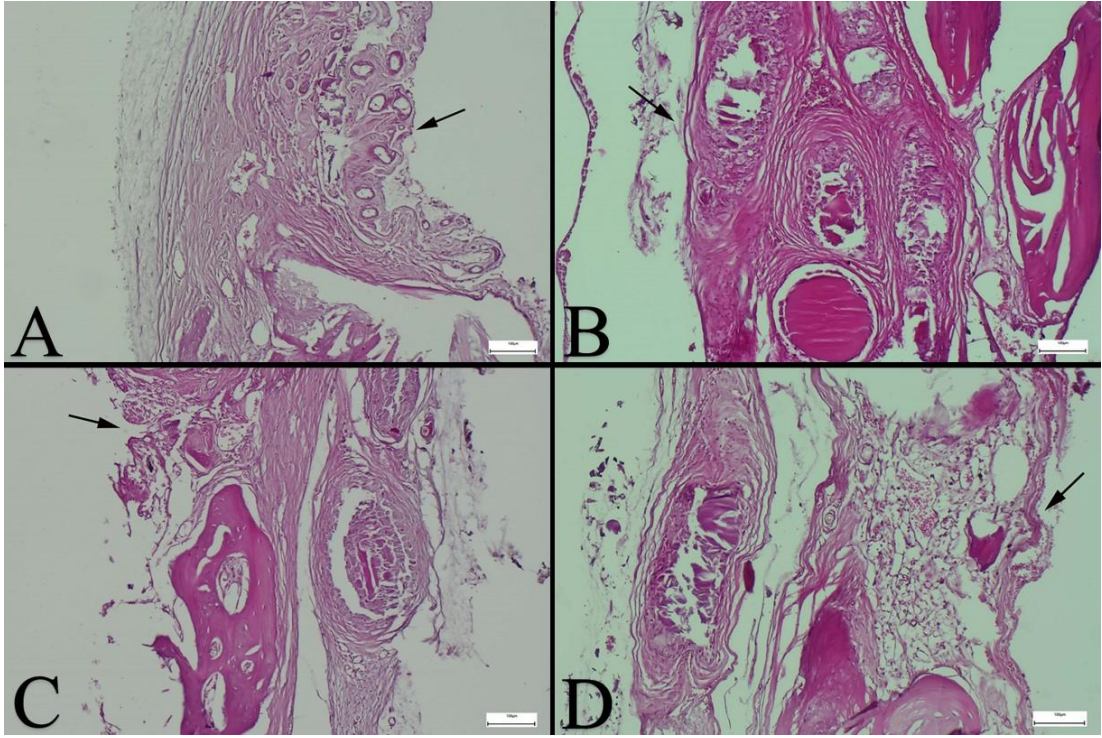
Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Min	Max	p-değeri
K	8	138,62	19,68	110,95	165,06	
O	8	129,81	19,47	105,82	170,68	
ABL	8	129,89	9,36	117,60	141,77	0,715
ABL+O	8	135,23	21,22	106,48	160,22	

İstatistiksel analizde tek yönlü ANOVA testi kullanıldı.

$p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.3 Histopatolojik ve Histomorfometrik Bulgular

Gruplara göre defekt alanları incelendiğinde K grubunda defekt alanında greft materyali gözlenmedi, belirgin bir bağ doku artışı gözlemlendi. Defekt kenarlarında yeni kemikleşme alanları çok hafif şekilde görüldü. O grubunda greft bölgesindeki materyalin büyük bir kısmı rezorbe oldu, bağ doku ve kemik oluşumlarında artış dikkati çekti. ABL grubunda bağ doku artışı ve yeni kemik oluşumlarının şekillendiği ancak rezidüel materyalin bir bölümünün defekt alanında olduğu görüldü. ABL+O grubunda belirgin bağ doku artışı ve kemikleşme dikkati çekti. Graft materyallerinin bir kısmı defekt alanında gözlemlendi. En iyi iyileşmeye bu grupta rastlandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Gruplara ait histopatolojik görüntüler A: K grubunda defekt alanının görünümü (ok), yaygın bağ doku artışı, B: O grubunda defekt alanının görünümü (oklar), greft materyalleri, C: ABL grubunda defekt alanının görünümü (ok), belirgin bağ doku artışı, D: ABL+O grubunda defekt alanının görünümü (ok), bağ doku ve yeni kemik oluşumları ile rezorbe olmamış greft materyalleri, HE, Bar=100µm.

Gruplar arasında total iyileşme alanı, defekt kapanma oranı, yeni kemik alanı, rezidüel material alanı ile osteoklast ve osteoblast sayılarının istatistik analiz sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 Histomorfometrik verilerin istatistik analiz sonuçları

Histomorfometrik Veriler	Gruplar				p değeri
	K	O	ABL	ABL+O	
Total iyileşme alanı (mm²)	2,40±0,15 ^a	9,67±0,44 ^{b,c}	5,88±0,26 ^{a,c}	13,74±0,31 ^b	<,001
Defekt kapanma oranı (%)	20,70±0,37 ^a	47,26±0,79 ^{b,c}	35,48±1,18 ^{a,c}	58,01±1,12 ^b	<,001
Yeni kemik alanı (mm²)	2,82±0,19 ^a	3,54±0,21 ^{b,c}	2,90±0,22 ^{a,c}	4,32±0,17 ^b	<,001
Rezidüel material alanı (mm²)	0,00±0,00 ^a	27,75±0,88 ^b	25,50±0,23 ^{b,c}	22,75±3,20 ^{a,c}	<,001
Osteoklast sayısı	12,40±1,17 ^a	9,70±0,82 ^{b,c}	10,70±0,82 ^{a,c}	7,63±0,80 ^b	<,001
Osteoblast sayısı	9,80±0,91 ^{a,c}	11,40±0,96 ^{b,c}	9,20±0,78 ^a	13,45±0,52 ^b	<,001

* Veriler ortalama±standart sapma (SS) olarak verildi. İstatistiksel analizlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmada Mann-Whitney U ve Dunn-Bonferroni düzeltilmesi kullanıldı.

** Farklı harften üst simgeli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

***p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

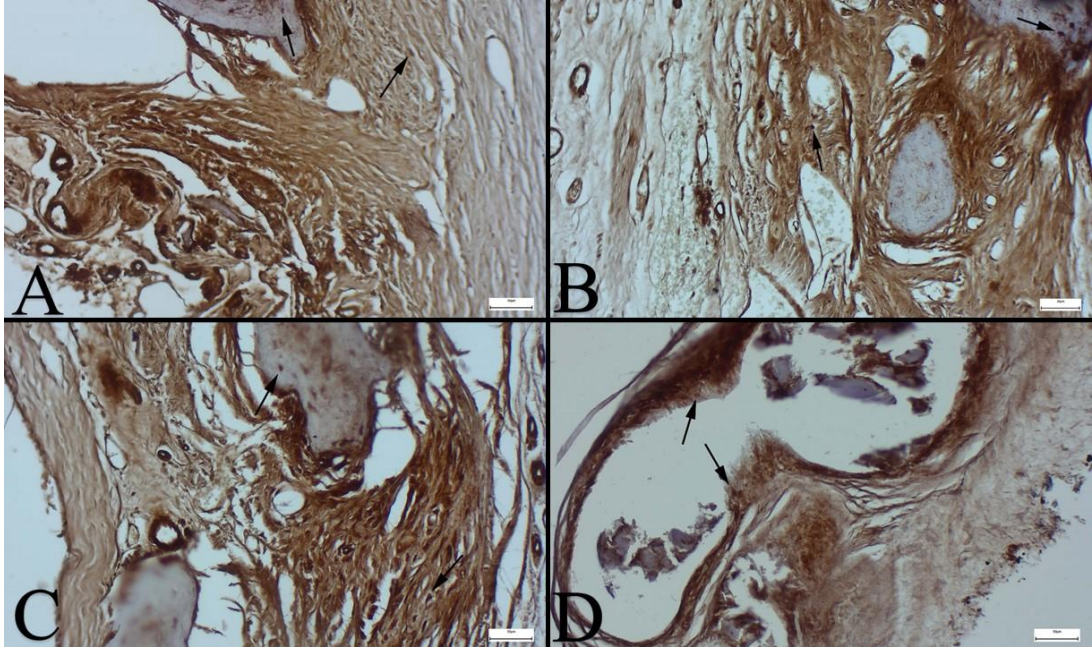
Histomorfometrik incelemede, total iyileşme alanının ABL+O (13,74±0,31) grubunda en yüksek, K (2,40±0,15) grubunda ise en düşük olduğu görüldü. ABL+O grubu, K (2,40±0,15) ve ABL (5,88±0,26) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). Defekt kapanma oranı yine ABL+O (58,01±1,12) grubunda en yüksek, K (20,70±0,37) grubunda en düşük oranda saptandı (p<0,05). Yeni kemik alanı bakımından ABL+O (4,32±0,17) grubu en yüksek değere ulaşırken, K (2,82±0,19) ve ABL (2,90±0,22) gruplarında daha düşük değerler izlendi (p<0,05). Rezidüel materyal alanı O (27,75±0,88) ve ABL (25,50±0,23) gruplarında yüksek, K (0,00±0,00) ve ABL+O (22,75±3,20) gruplarında düşük bulundu (p<0,05). Osteoklast sayısı en fazla K (12,40±1,17) grubunda, en az ABL+O (7,63±0,80) grubunda tespit edilirken (p<0,05), osteoblast sayısı ABL+O (13,45±0,52) grubunda en yüksek, ABL (9,20±0,78) grubunda ise en düşük düzeyde bulundu (p<0,05).

4.4 İmmunohistokimyasal Bulgular

4.4.1 ALP İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplar arasında ALP immunohistokimyasal bulguları incelendiğinde K grubunda hafif olan ekspresyonların diğer gruplarda arttığı ve belirginleştiği dikkati çektii (Şekil 4.2).

K grubunda en düşük ortalama ($1,40 \pm 0,51$) saptanırken, ABL+O grubunda ($2,63 \pm 0,50$) en yüksek ortalama elde edildi. O ($1,90 \pm 0,56$) ve ABL ($1,70 \pm 0,48$) grupları ise K ile ABL+O arasında bir düzey gösterdi. İstatistiksel değerlendirmede, özellikle ABL+O grubunun diğer gruplara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu dikkat çektii ($p < 0,05$) (Tablo 4.3).

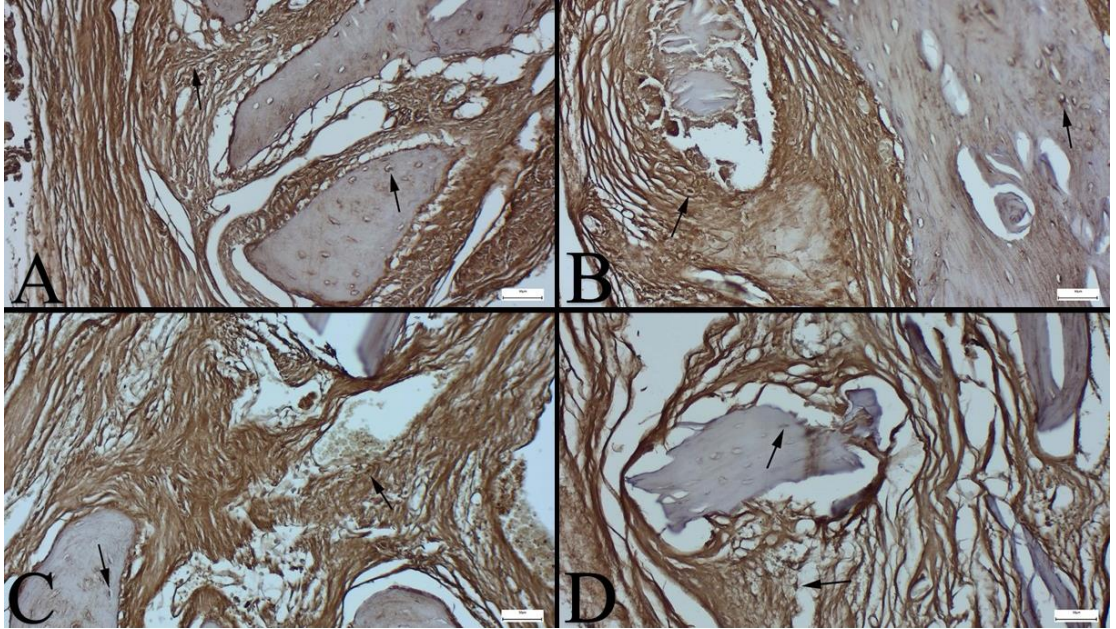


Şekil 4.2 Gruplara göre ALP ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde hafif ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde belirgin ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

4.4.2 β -katenin İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplar arasında β -katenin bulguları incelendiğinde tüm gruplarda ekspresyonlar gözlemlendi. En şiddetli ekspresyonlar Grup 4'te saptandı. Ekspresyonlara tüm mezenkimal hücrelerde rastlandı (Şekil 4.3).

β -katenin açısından bakıldığında, K ($1,40 \pm 0,51$) ve ABL ($1,60 \pm 0,51$) gruplarının ortalama değerleri istatistiksel olarak benzer bulundu. Buna karşın O ($2,50 \pm 0,52$) ve ABL+O ($2,72 \pm 0,46$) grupları K ve ABL gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek düzeyde β -katenin ekspresyonu gösterdi ($p < 0,05$) (Tablo 4.3).

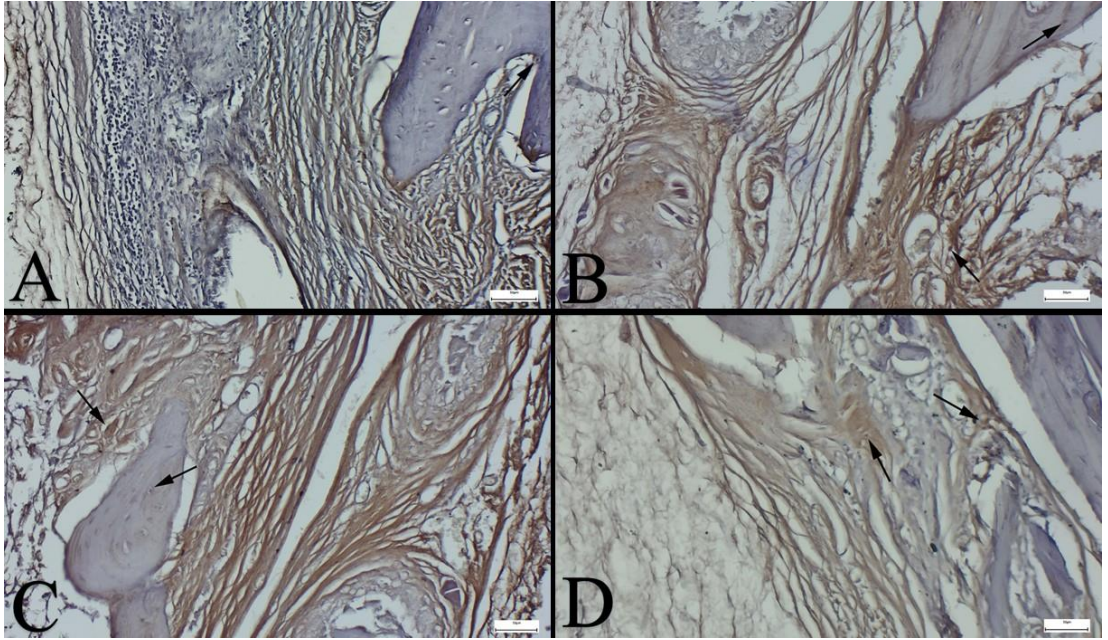


Şekil 4.3 Gruplara göre β -katenin ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde tüm hücrelerde ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda immunoekspresyonlarda (ok) artış, C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda artmış pozitif immunoekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

4.4.3 KMP-2 İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplar arasında KMP-2 ekspresyonları değerlendirildiğinde K grubunda negatif veya hafif olan ekspresyonların diğer gruplarda arttığı saptandı. Ekspresyonlara endotel, fibroblast, osteoblast, osteoklast ve osteosit gibi tüm mezenkimal hücrelerde rastlandı (Şekil 4.4).

KMP-2 sonuçlarında, K ($1,50\pm 0,52$) ile ABL ($1,70\pm 0,48$) grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, O ($2,30\pm 0,48$) ve özellikle ABL+O ($2,54\pm 0,52$) gruplarında KMP-2 ekspresyonunun belirgin şekilde daha yüksek olduğu saptandı (Tablo 4.3).

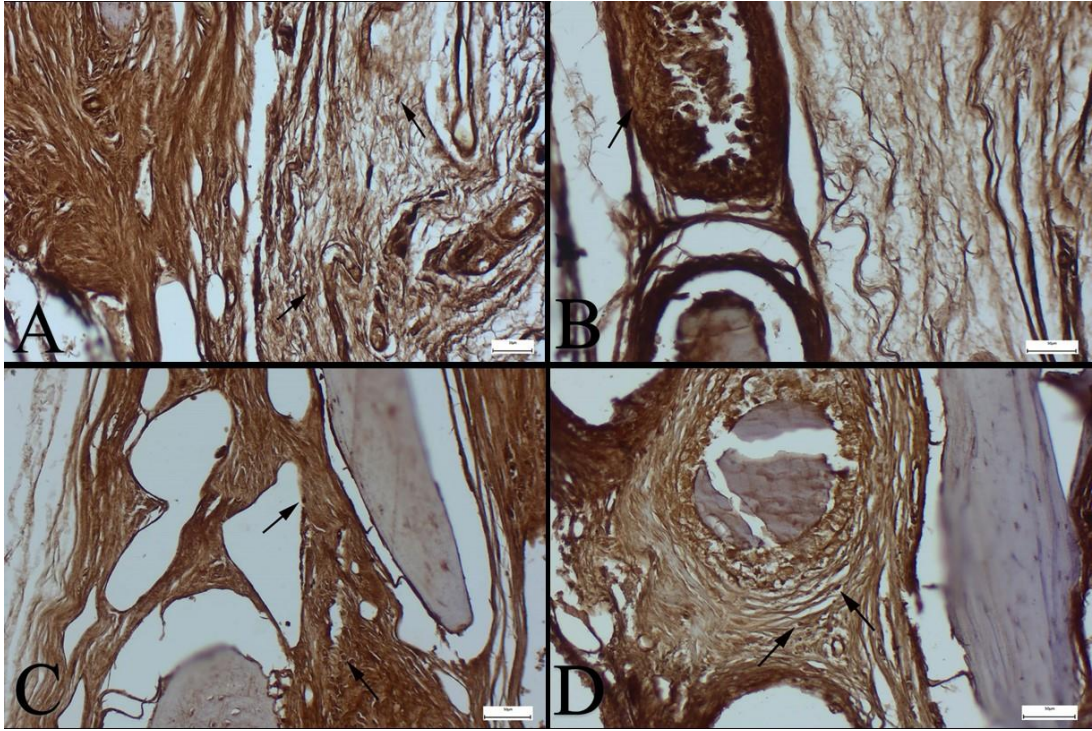


Şekil 4.4 Gruplara göre KMP-2 ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar, B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

4.4.4 Kolajen-1 İmmunohistokimyasal Bulguları

Defekt bölgeleri kolajen-1 ekspresyonları açısından incelendiğinde tüm gruplarda yeni şekillenen ve önceden bulunan bağ dokuda ekspresyonlara rastlandı. Ekspresyonlar yeni oluşan bağ dokuda ve K'de hafif diğer gruplarda ise belirgindi. En şiddetli ekspresyona ABL+O grubunda rastlandı (Şekil 4.5).

Kolajen-1 değerlendirmesinde en düşük ortalama değer K grubunda ($1,60\pm 0,51$) olduğu, bunu sırasıyla ABL ($2,30\pm 0,48$), O ($2,40\pm 0,51$) ve ABL+O ($2,54\pm 0,52$) gruplarının izlediği tespit edildi. O, ABL ve ABL+O gruplarının tümü, K grubuna kıyasla anlamlı biçimde daha yüksek kolajen-1 ekspresyonu sağladı ($p<0,05$) (Tablo 4.3).

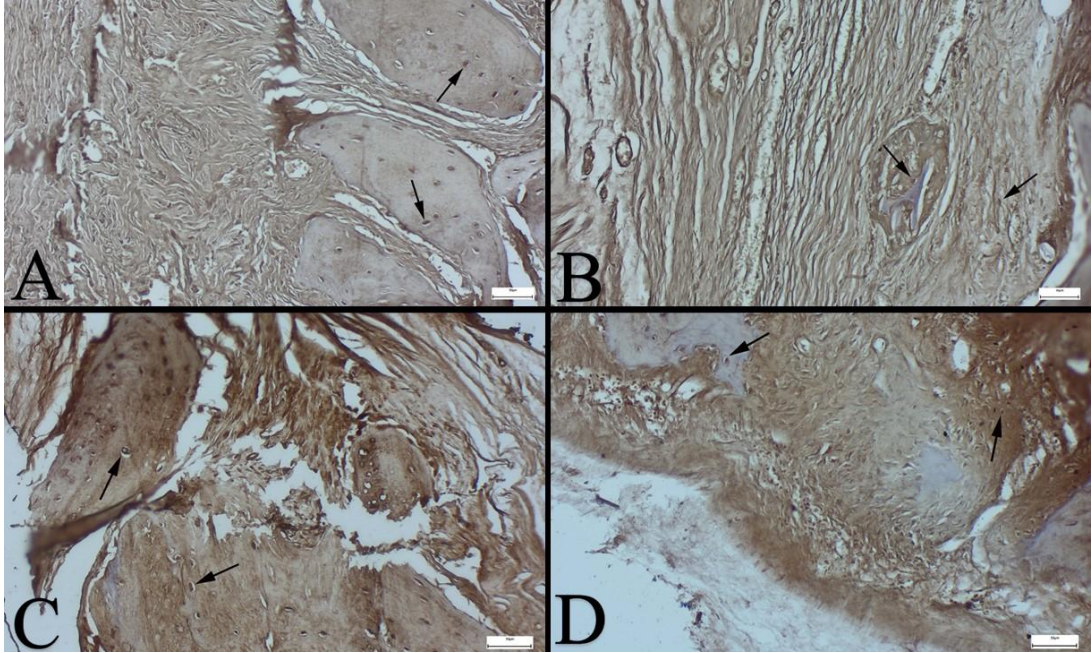


Şekil 4.5 Gruplara göre kolajen-1 ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

4.4.5 Osteokalsin İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara göre defekt bölgeleri osteokalsin ekspresyonlarına göre incelendiğinde K grubunda hafif olan ekspresyonların diğer gruplarda belirgin şekilde arttığı görüldü. En belirgin artış ABL+O grubunda rastlandı (Şekil 4.6).

Osteokalsin ekspresyonu için K ($1,40\pm 0,51$), ABL ($2,10\pm 0,31$), O ($2,30\pm 0,48$) ve ABL+O ($2,36\pm 0,50$) gruplarında elde edilen ortalamalar incelendiğinde; K grubunun en düşük düzeye, ABL+O grubunun ise en yüksek değere ulaştığı tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 4.3).

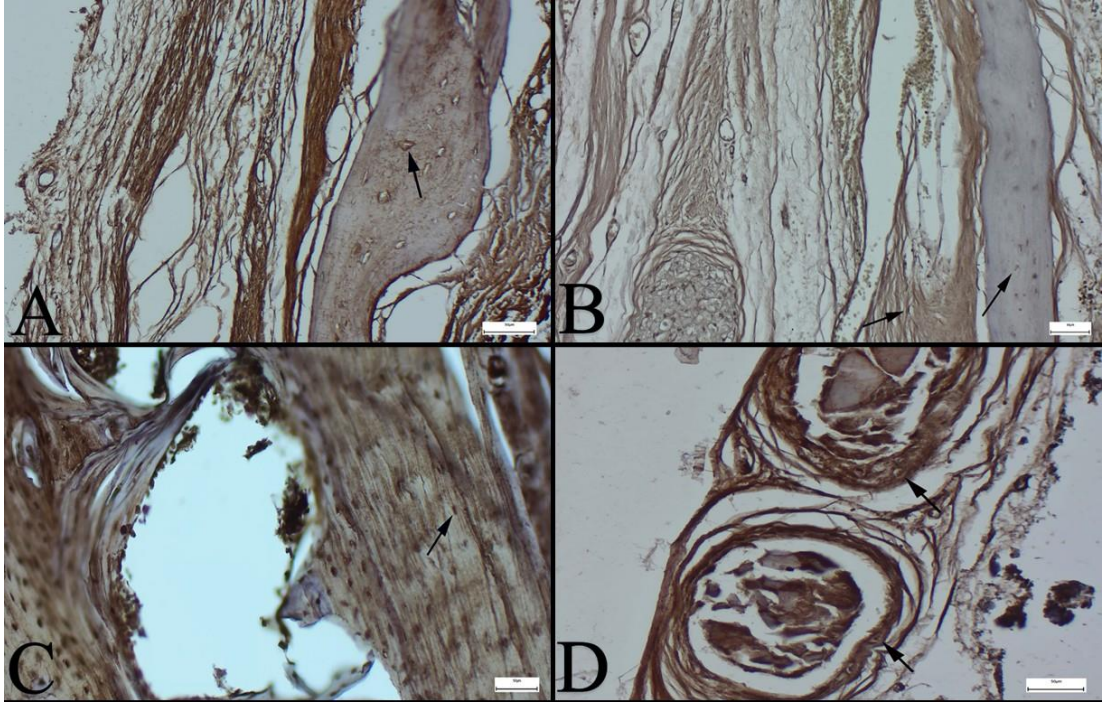


Şekil 4.6 Gruplara göre osteokalsin ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde çok hafif ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde hafifçe artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar= $50\mu\text{m}$.

4.4.6 Osteonektin İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplar arasında defekt bölgeleri osteonektin ekspresyonlarına göre incelendiğinde K grubunda negatif veya hafif olan ekspresyonların diğer gruplarda belirgin şekilde arttığı dikkati çekti. En belirgin artışın ABL+O grubunda olduğu görüldü (Şekil 4.7).

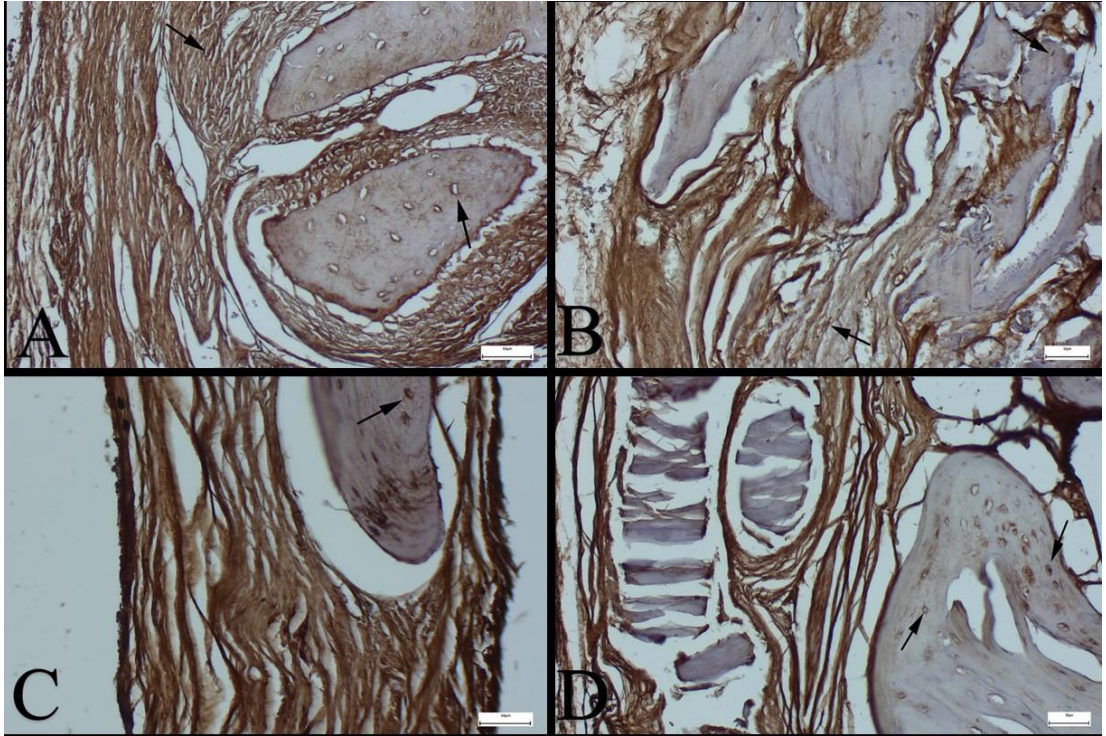
Osteonektin değerlerinde K ($0,70\pm 0,48$) ve ABL ($1,40\pm 0,51$) grupları en düşük ortalamaları paylaşıırken, O ($2,50\pm 0,52$) ve ABL+O ($2,63\pm 0,50$) gruplarında osteonektin anlamlı ölçüde daha yüksek bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.3).



Şekil 4.7 Gruplara göre osteonektin ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde negatif ekspresyonlar, B: O grubunda defekt bölgesinde hafifçe artmış ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

4.4.7 OST İmmunohistokimyasal Bulguları

OST ekspresyonu incelemesinde, ABL+O ($2,54\pm 0,52$) grubu, K ($0,70\pm 0,48$) ve ABL ($1,40\pm 0,51$) grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Ek olarak, O ($1,90\pm 0,56$) grubu ile ABL ve ABL+O grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. ($p>0,05$) (Şekil 4.9) (Tablo 4.3).

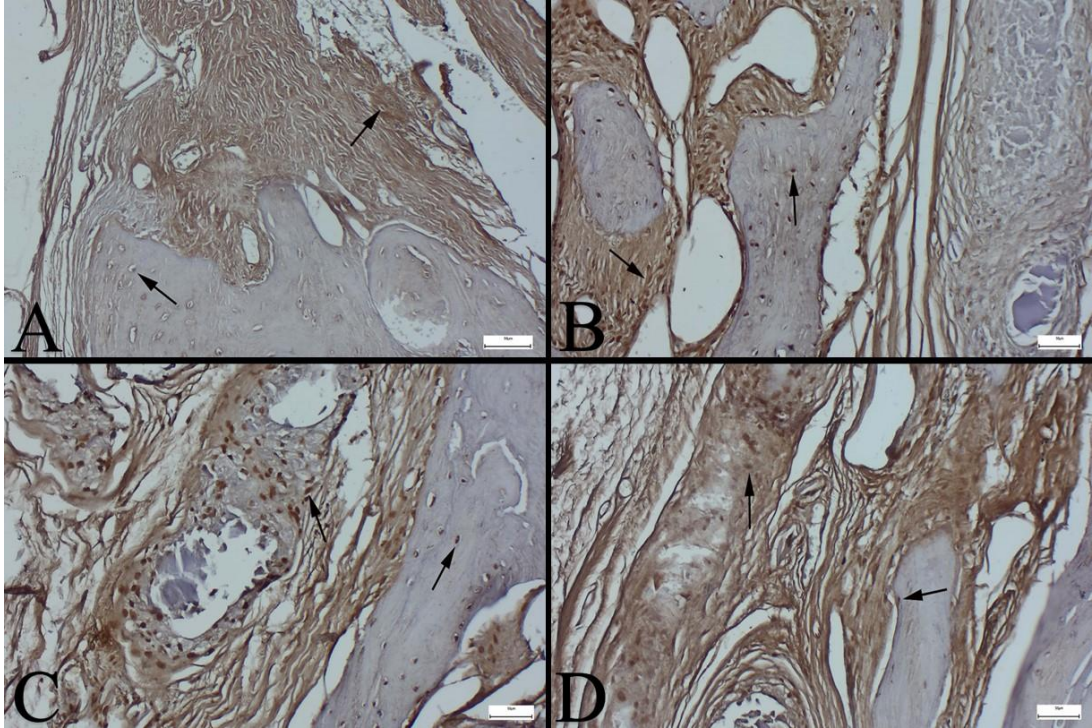


Şekil 4.8 Gruplara göre OST ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde immunoekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

4.4.8 OPG İmmunohistokimyasal Bulguları

Grupların defekt bölgeleri OPG ekspresyonları açısından incelendiğinde greft uygulaması ile ABL uygulamalarının endotel, fibroblast, osteoblast, osteoklast ve osteositlerin ekspresyonlarında artışa sebep olduğu saptandı (Şekil 4.8).

OPG düzeyi açısından K ($0,40\pm 0,51$) grubu en düşük ortalama değere sahip olurken, ABL+O ($2,36\pm 0,50$) grubu en yüksek ortalamaya sahipti. ABL+O grubundaki OPG seviyesi, K ve ABL gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4.3).

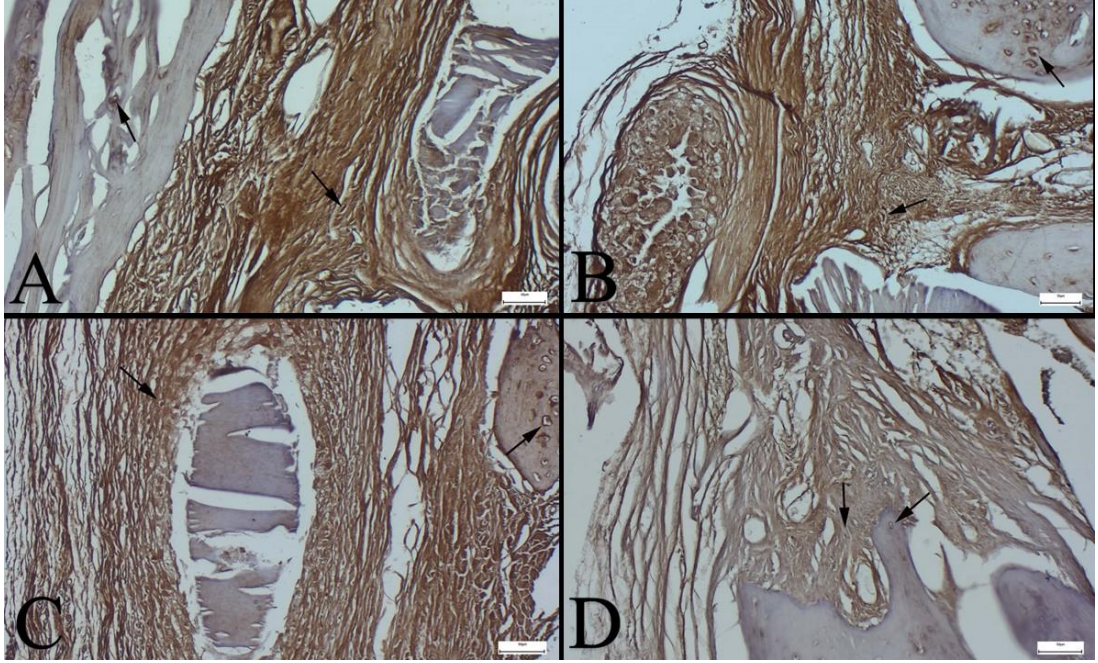


Şekil 4.9 Gruplara göre OPG ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde hafifçe artmış ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50 μ m.

4.4.9 RANKL İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplar arasında RANKL ekspresyon bulguları incelendiğinde K grubunda hafif olan ekspresyonların diğer gruplarda artış gösterdiği saptandı. Ekspresyonları endotel, fibroblast, osteoblast, osteoklast ve osteositlerde gözlemlendi (Şekil 4.10).

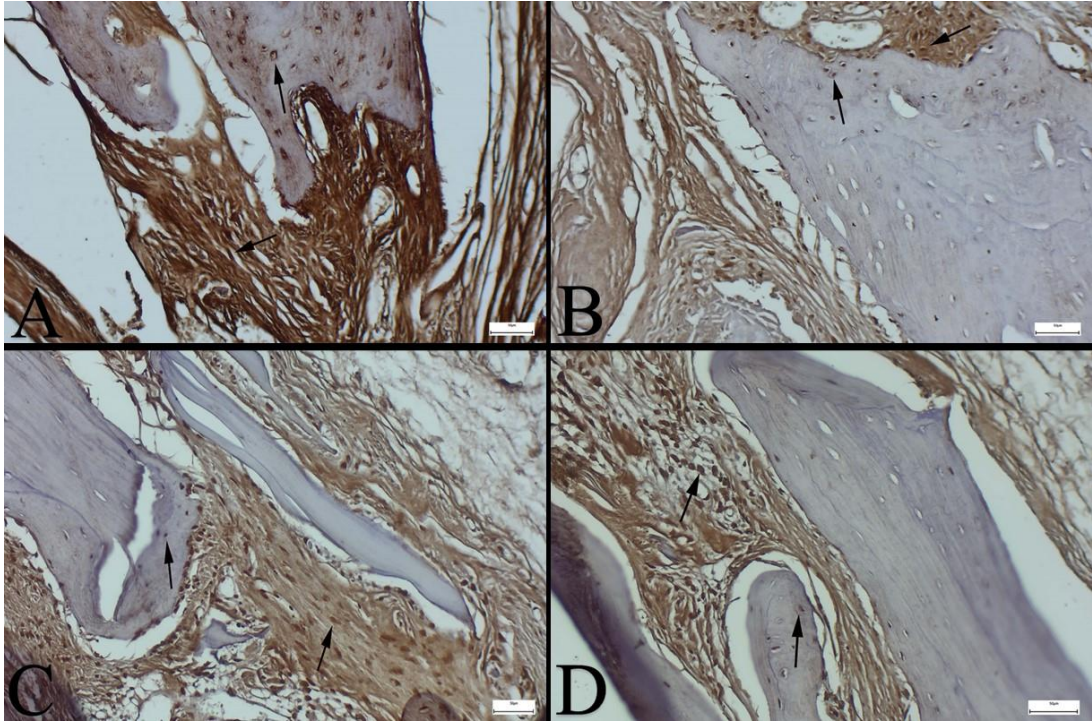
RANKL ekspresyonu açısından ABL+O ($1,10\pm 0,56$), O ($1,60\pm 0,69$) ve ABL ($1,30\pm 0,48$) grupları birbirine yakın değerler göstermiş olsa da, K ($2,45\pm 0,52$) grubu en yüksek ortalamaya sahipti. Ayrıca K grubu, ABL ve ABL+O gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklıdır ($p<0,05$) (Tablo 4.3).



Şekil 4.10 Gruplara göre RANKL ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde hafif şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

4.4.10 RUNX2 İmmunohistokimyasal Bulguları

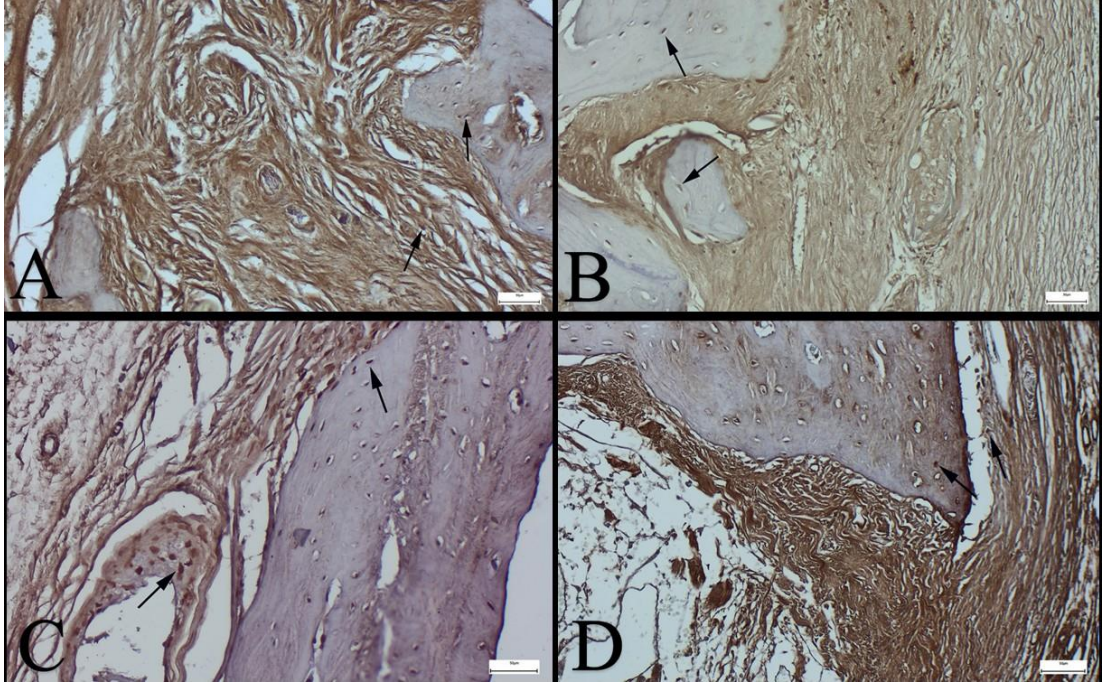
RUNX2 ekspresyonuna göre, K ($1,60\pm 0,51$) ve ABL ($1,80\pm 0,63$) grupları benzer düzeylerde kalırken, O ($2,50\pm 0,52$) ve özellikle ABL+O ($2,63\pm 0,50$) gruplarında belirgin biçimde daha yüksek RUNX2 seviyesi saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.11) (Tablo 4.3).



Şekil 4.11 Gruplara göre RUNX2 ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar= $50\mu\text{m}$.

4.4.11 TGF- β İmmunohistokimyasal Bulguları

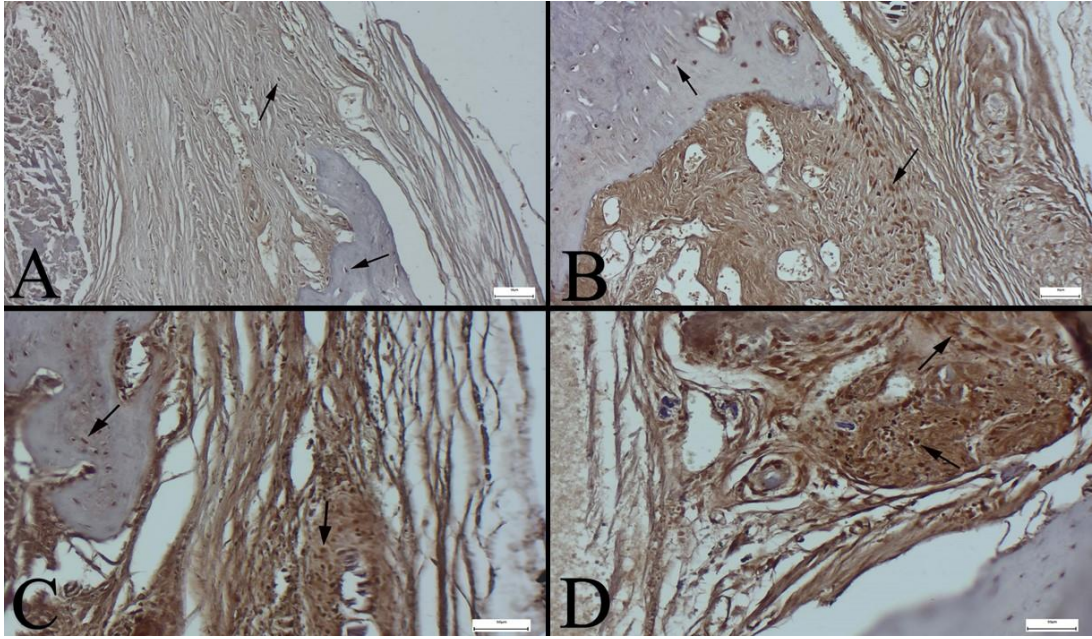
TGF- β ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak incelenmesi sonucu, K ($0,90\pm 0,56$) grubunun en düşük, ABL+O ($2,27\pm 0,46$) grubunun en yüksek değere sahip olduğu görüldü. O ($1,90\pm 0,73$) ve ABL ($1,70\pm 0,48$) gruplarında, TGF- β değerleri açısından K grubuna göre yükselmiş olsa da ABL+O grubuna göre daha düşük ortalama gösterdi. Gruplar arasındaki bu farklılık $p<0,05$ düzeyinde anlamlı bulundu (Şekil 4.12) (Tablo 4.3).



Şekil 4.12 Gruplara göre TGF- β ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (oklar), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar= $50\mu\text{m}$.

4.4.12 VEGF İmmunohistokimyasal Bulguları

VEGF parametresi incelendiğinde, K ($1,50\pm 0,52$) grubunun en düşük düzeye sahip olduğu, ABL ($1,80\pm 0,63$) grubunda ise K grubuna göre biraz daha yüksek bir düzeye ulaştığı gözlemlendi. Ancak, O ($2,40\pm 0,51$) ve ABL+O ($2,45\pm 0,52$) gruplarında, K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha yüksek VEGF ekspresyonu saptandı ($p<0,05$) (Şekil 4.13) (Tablo 4.3).



Şekil 4.13 Gruplara göre VEGF ekspresyonlarının görünümü. A: K grubunda defekt bölgesinde ekspresyonlar (ok), B: O grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), C: ABL grubunda defekt bölgesinde artmış ekspresyonlar (ok), D: ABL+O grubunda defekt bölgesinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (ok), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Tablo 4.3 İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları

Antikorlar	Gruplar				p değeri
	K	O	ABL	ABL+O	
ALP	1,40±0,51 ^a	1,90±0,56 ^{a,c}	1,70±0,48 ^a	2,63±0,50 ^{b,c}	<,001
β-katenin	1,40±0,51 ^a	2,50±0,52 ^b	1,60±0,51 ^a	2,72±0,46 ^b	<,001
KMP-2	1,50±0,52 ^a	2,30±0,48 ^{b,c}	1,70±0,48 ^{a,c}	2,54±0,52 ^b	<,001
Kolajen-1	1,60±0,51 ^{a,c}	2,40±0,51 ^b	2,30±0,48 ^{b,c}	2,54±0,52 ^b	<,001
Osteokalsin	1,40±0,51 ^a	2,30±0,48 ^{b,c}	2,10±0,31 ^{a,c}	2,36±0,50 ^{b,c}	<,001
Osteonektin	0,70±0,48 ^a	2,50±0,52 ^b	1,40±0,51 ^a	2,63±0,50 ^b	<,001
OST	0,70±0,48 ^a	1,90±0,56 ^{b,c}	1,40±0,51 ^{a,c}	2,54±0,52 ^b	<,001
OPG	0,40±0,51 ^a	2,00±0,47 ^{b,c}	1,40±0,51 ^{a,c}	2,36±0,50 ^b	<,001
RANKL	2,45±0,52 ^{a,b}	1,60±0,69 ^{a,c}	1,30±0,48 ^c	1,10±0,56 ^c	<,001
RUNX2	1,60±0,51 ^a	2,50±0,52 ^{b,c}	1,80±0,63 ^{a,c}	2,63±0,50 ^b	<,001
TGF-β	0,90±0,56 ^a	1,90±0,73 ^{b,c}	1,70±0,48 ^{a,c}	2,27±0,46 ^c	<,001
VEGF	1,50±0,52 ^a	2,40±0,51 ^b	1,80±0,63 ^{a,b}	2,45±0,52 ^b	<,001

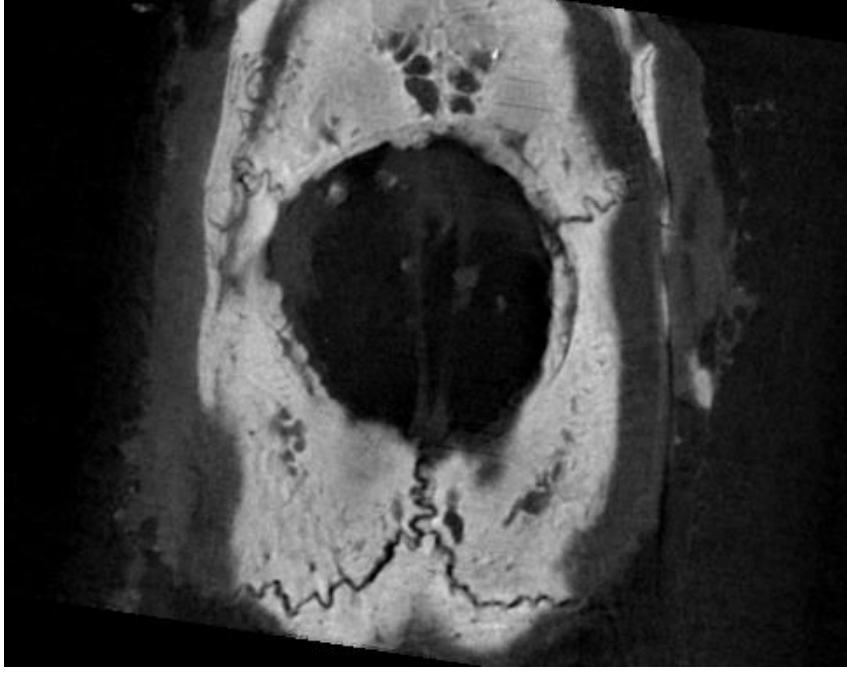
* Veriler ortalama±standart sapma (SS) olarak verildi. İstatistiksel analizlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmada post hoc Mann-Whitney U ve Dunn-Bonferroni düzeltmesi kullanıldı.

** Farklı harften üst simgeli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

***p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.5 Micro-BT Bulguları

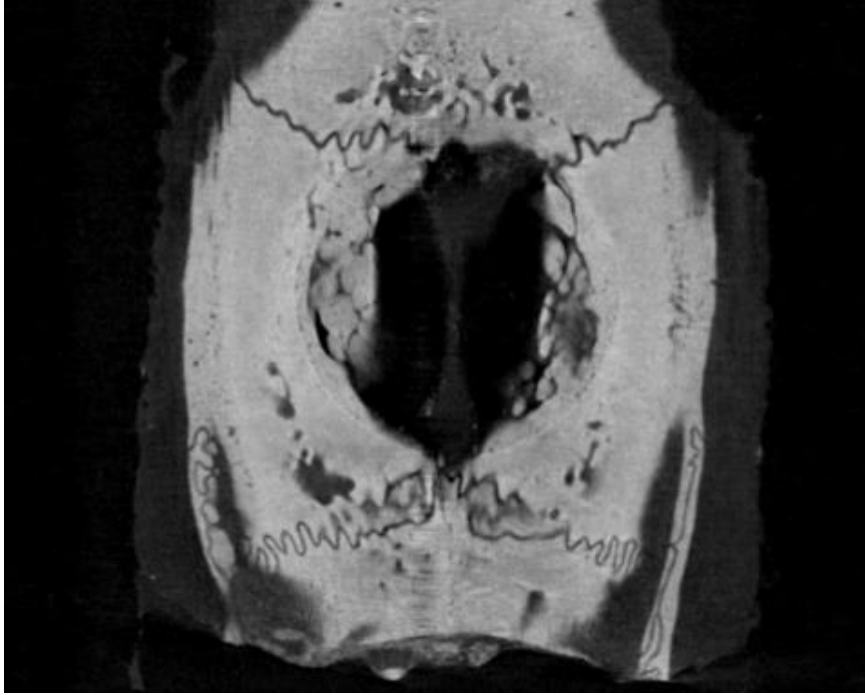
Deney hayvanlarından alınan biyopsi örnekleri mikro-BT cihazında tarandı ve tüm gruplara ait mikro-BT görüntüleri incelenerek gruplar arası karşılaştırmalar yapıldı (Şekil 4.14, 4.15, 4.16, 4.17). Bu tarama sonuçlarına göre radyolojik analizler gerçekleştirildi ve elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 26 (IBM Corp., Armonk, NY) programına aktarıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi uygulandı, istatistiksel olarak farklılık görülen gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U ve Dunn-Bonferroni düzeltmesi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi p<0,05 olarak kabul edildi. Radyolojik ve istatistiksel sonuçlar Tablo 4.4'te özetlendi.



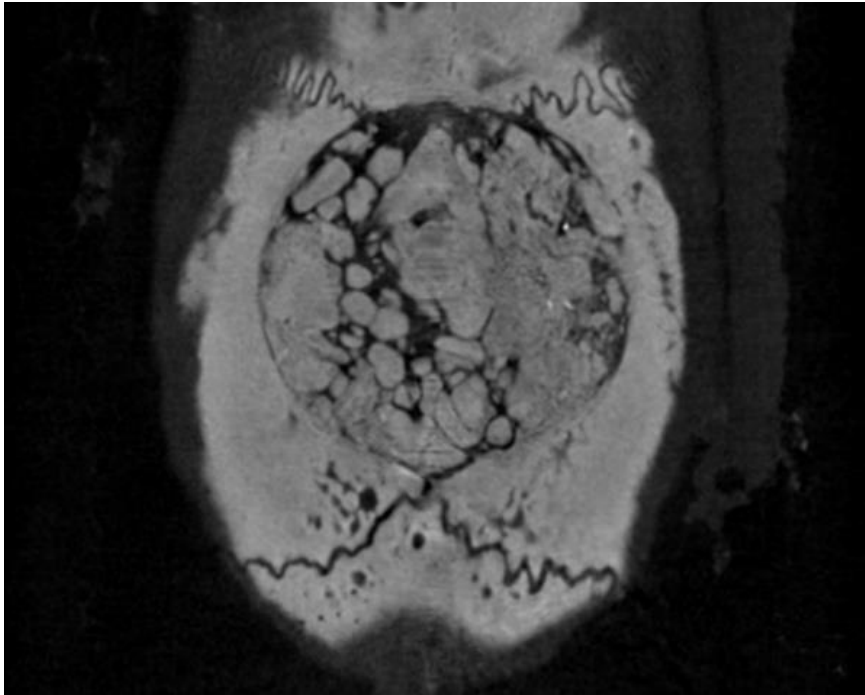
Şekil 4.14 K grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü



Şekil 4.15 O grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü



Şekil 4.16 ABL grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü



Şekil 4.17 ABL+O grubuna ait defekt bölgesinin mikro-BT görüntüsü

Tablo 4. 4 Mikro-BT istatistiksel analiz sonuçları

Parametreler	Gruplar				p değeri
	K	O	ABL	ABL+O	
TV (mm³)	68,64±15,24 ^a	83,28±1,00 ^{a,b}	72,33±2,75 ^a	88,50±3,53 ^b	<0,001
BV (mm³)	4,83±0,57 ^a	23,07±0,31 ^{b,c}	15,26±1,70 ^{a,c}	29,18±5,36 ^b	<0,001
BS (mm²)	58,71±9,00 ^a	170,71±5,48 ^{b,c}	104,06±3,99 ^{a,c}	240,75±33,72 ^b	<0,001
BS/BV (mm⁻¹)	12,12±0,69 ^a	7,39±0,15 ^{b,c}	6,86±0,53 ^b	8,31±0,51 ^{a,c}	<0,001
BS/TV (mm⁻¹)	0,88±0,20 ^a	2,05±0,07 ^{b,c}	1,44±0,09 ^{a,c}	2,71±0,28 ^b	<0,001
BV/TV (%)	7,28±1,55 ^a	27,71±0,55 ^{b,c}	21,16±2,74 ^{a,c}	32,82±4,89 ^b	<0,001
Tb.Th (mm)	0,35±0,01 ^a	0,52±0,01 ^{b,c}	0,51±0,02 ^{a,c}	0,55±0,04 ^{b,c}	<0,001
Tb.N (mm⁻¹)	0,19±0,05 ^a	0,68±0,05 ^b	0,39±0,00 ^{a,b}	0,68±0,09 ^b	<0,001
Tb.Sp (mm)	1,32±0,34 ^a	0,49±0,01 ^b	0,99±0,02 ^{a,c}	0,59±0,05 ^{b,c}	<0,001

TV (Tissue Volume): Doku hacmi, BV (Bone Volume): Kemik hacmi, BS (Bone Surface): Kemik yüzeyi, BS/BV (Bone Surface/Bone Volume Ratio): Kemik yüzeyinin kemik hacmine oranı, BS/TV (Bone Surface Density): Kemik yüzey yoğunluğu, BV/TV (Bone Volume Fraction): Kemik hacim yüzdesi, Tb.N (Trabecular Number): Trabekül sayısı, Tb.Th (Trabecular Thickness): Trabekül kalınlığı, Tb.Sp (Trabecular Separation): Trabekül aralığı

* Veriler ortalama±standart sapma (SS) olarak verildi. İstatistiksel analizlerde gruplar arası çoklu karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi, ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U ve Dunn-Bonferroni düzeltmesi kullanıldı.

** Farklı harften üst simgeli gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır, p<0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TV: En yüksek doku hacmi ABL+O grubunda ($88,50\pm 3,53$) belirlendi. O grubunda ($83,28\pm 1,00$) da buna yakın bir ortalama saptandı. K ($68,64\pm 15,24$) ve ABL ($72,33\pm 2,75$) gruplarında ise daha düşük değerler gözlemlendi bu değerler ABL+O grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

BV: Kemik hacminin en yüksek olduğu grup ABL+O ($29,18\pm 5,36$) olarak tespit edildi. Bunu O ($23,07\pm 0,31$) ve ABL ($15,26\pm 1,70$) grupları takip etti. En düşük ortalama ise K grubunda ($4,83\pm 0,57$) bulundu. ABL+O grubu ile K ve ABL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

BS: Kemik yüzeyinin en yüksek olduğu grup ABL+O ($240,75\pm 33,72$), onu O grubu ($170,71\pm 5,48$) takip etti. ABL ($104,06\pm 3,99$) ve özellikle K ($58,71\pm 9,00$) gruplarının ortalamaları daha düşük bulundu ($p<0,05$). ABL+O grubu ile K ve ABL grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

BS/BV: En yüksek K grubunda ($12,12\pm 0,69$), en düşük ise ABL grubunda ($6,86\pm 0,53$) saptandı. O ($7,39\pm 0,15$) ve ABL+O ($8,31\pm 0,51$) grupları bu iki uç değer arasında konumlandı ($p<0,05$). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

BS/TV: Kemik yüzey yoğunluğu bakımından en yüksek değer ABL+O ($2,71\pm 0,28$) grubunda ölçülürken, O ($2,05\pm 0,07$) grubu bunu izledi. K ($0,88\pm 0,20$) ve ABL ($1,44\pm 0,09$) gruplarında ise daha düşük düzeyde bulundu. ABL+O grubu ile K ve ABL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

BV/TV: ABL+O ($32,82\pm 4,89$) grubunun diğer gruplara göre en yüksek orana sahip olduğu görüldü. O ($27,71\pm 0,55$) ve ABL ($21,16\pm 2,74$) grupları orta düzeyde kalmış, K ($7,28\pm 1,55$) grubu ise en düşük orana sahip olmuştur. ABL+O grubu ile K ve ABL grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

Tb.Th: Trabeküler kalınlık en yüksek ABL+O (0,55±0,04) grubunda belirlendi. ABL+O ve O (0,52±0,01) grupları da K grubuna (0,35±0,01) göre anlamlı biçimde daha yüksek Tb.Th değeri gösterdi (p<0,05). ABL+O, O ve ABL (0,51±0,02) grupları arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunamadı.

Tb.N: Trabekül sayısı, O (0,68±0,05) ve ABL+O (0,68±0,09) gruplarında en yüksek düzeylerde gözlendi. ABL+O, O ve ABL (0,39±0,00) grupları arasında istatistiksel olarak bir anlam bulunamadı. ABL+O ve O gruplarında Tb.N değerleri K (0,19±0,05) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,05). O grubu ve ABL grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

Tb.Sp: Trabeküler aralık, K (1,32±0,34) grubunda en yüksek, O (0,49±0,01) grubunda ise en düşük değerde bulundu. O grubu ve ABL (0,99±0,02) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulundu (p<0,05). O grubu ve ABL+O (0,59±0,05) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamadı.

5.TARTIŞMA

İskelet sistemi, mekanik yükleme, kırık onarımı ve mikroyapısal hasarlardan kaynaklanan fonksiyonel uyarılara yanıt vermek için yeniden şekillenerek yaşam boyunca kendini sürekli olarak yenilemektedir.²⁶⁴ Yeniden yapılanma süreci, osteoklastlar ve osteoblastlar arasında titizlikle planlanmış bir etkileşimi içermektedir. Osteoklastların mineralize kemiği rezorpsiyon yoluyla uzaklaştırdığı ve osteoblastların daha sonra mineralize hale gelen yeni kemik matrisini oluşturduğu öne sürülmektedir.²⁶⁵ Sağlıklı bir iskeleti korumak için kemik emiliminin ve kemik oluşumunun dikkatli bir şekilde düzenlenmesi gerekmektedir. Osteoklastik rezorpsiyon, osteoblastik formasyondan daha fazla arttığında net bir kemik kaybı meydana gelmektedir. Kemik kütlesi 20-30 yaş civarında zirveye ulaşmaktadır ve menopozdan sonra kadınlarda kemik kütlesinde yaşa bağlı doğal bir azalma ortaya çıkmaktadır.²⁶⁶ Kemik kütlesindeki azalma, kemik gücünün zayıflamasına ve buna bağlı olarak frajilite kırıkları ile belirgin osteoporoz riskinin önemli ölçüde artmasına neden olabilmektedir. Normal yaşlanmaya bağlı primer osteoporoz ve menopoz sonrası östrojen eksikliği, endokrin bozuklukları, glukokortikoid tedavisi, felç veya hareketsizlik gibi sekonder osteoporoz nedenlerinden daha yaygındır. Osteoporozun yaygınlığı oldukça yüksektir. Nitekim yaşamları boyunca neredeyse her üç kadından birinin ve 50 yaşın üzerindeki her beş erkekten birinin osteoporotik bir kırık yaşadığı raporlanmıştır.²⁶⁷⁻²⁷⁰ Etkili anti-osteoporotik tedavilere büyük bir ihtiyaç vardır ve çeşitli klinik çalışmalar, elde edilen kemik kazanımını korumak ve böylece tedavi etkinliğini artırmak için osteoanabolik ajanlarla bir dizi tedavinin ardından antirezorptif tedaviyi önermektedir.²⁷¹ Bu çalışmanın amacı, osteoanabolik tedavide kullanılan ABL'nin lokal uygulamasının, postmenopozal sıçanlarda oluşturulan kritik boyutlu kalvaryal defektlerde otojen greft ile birlikte yeni kemik oluşumuna etkisini histopatolojik, histomorfometrik, immunohistokimyasal ve mikro-BT analizleri ile araştırmaktır.

Menopoz sonrası osteoporoz tedavisinin temel dayanağı olan antirezorptif ajanlar bifosfonatlar ve denosumab, kemik rezorpsiyonunu baskılayarak kırık riskini azaltmaktadır.^{21, 272} Ancak, kayıp kemiği yeniden oluşturamadıkları için etkinlikleri

sınırlı kalmakta ve uzun süreli kullanım, nadir ancak ciddi yan etkiler nedeniyle sekteye uğramaktadır. Bu tedavi açığı, daha önce azalma gösteren kalça kırığı oranlarında tedaviye uyumun bozulması sonucu, optimal olmayan tedaviye ve tedavi sürecinde bir plato oluşmasına yol açmaktadır.²⁷³⁻²⁷⁵

Buna karşılık, anabolik ajanlar yeni kemik oluşumunu teşvik ederek bozulmuş kemik mikro mimarisini onarmaktadır. ABL, şiddetli osteoporozun tedavisi için kullanılan anabolik bir ajandır. Osteoporozu olan postmenopozal kadınlarda yapılan bir faz 2 çalışması, ABL'in 80 µg/gün subkutan enjeksiyonun lomber omurga, femur boynu ve total kalçada KMY'yi önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.²⁵¹ Şiddetli osteoporozu olan 2436 postmenopozal kadın ile yapılan bir faz 3 çalışmada, 18 aylık takip ile ABL (80 µg/gün), TPTD (20 µg/gün) ve plasebo etkileri karşılaştırılmıştır. ABL tedavisinin, yeni morfometrik vertebra kırıklarının, vertebra dışı kırıkların, tüm klinik kırıkların (travmatik kırıklar dahil) ve majör osteoporotik kırıkların (üst kol, el bileği, kalça kırıkları ve klinik omurga kırıkları) insidansının plaseboya kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu ve kırık olayının ortaya çıkma zamanlaması açısından üstünlük gösterdiği bildirilmiştir.²³ Miller ve ark., ABL ile tedavi edilen hastaların TPTD ile tedavi edilen hastalara kıyasla KMY kazanımlarının (>%3) anlamlı derece fazla olduğunu göstermişlerdir.²⁷⁶

Winzenrieth ve ark.²⁷⁷, yaptıkları çalışmada iki anabolik tedaviyi kemik belirteçleri üzerinden karşılaştırmışlar ve tedaviler arasında kemik oluşum belirteçlerinin benzer sonuçlar verdiğini fakat kemik rezorptif belirteçlerindeki artışın ABL grubunda daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Winzenrieth ve ark.²⁷⁸, yaptıkları başka bir çalışmada plaseboya veya TPTD'ye kıyasla ABL'nin total kalça, femur boynu, trokanter ve femur diyafizinin kortikal volümetrik KMY'sinde daha fazla artışa sebep olduğunu belirtmişlerdir. Hong ve ark.²⁷⁹, yayınladıkları meta-analizde ABL'in TPTD'ye kıyasla KMY'yi iyileştirmedeki etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirilmiştir. Meta-analize dört RKÇ dahil edilmiş ve lomber omurga için 24.haftadaki tüm KMY parametreleri ABL grubundan yana önemli avantajlar göstermiştir. Ciddi advers olay insidansında herhangi bir farklılık gözlenmemesine rağmen, ABL grubunda hiperkalsemi insidansı TPTD'ye kıyasla %51 daha düşük olduğu belirtilmiştir.²⁷⁹ Lanske ve ark.²⁸⁰, ABL'nin kapalı femur kırığı olan sıçanlarda

kırık iyileşmesinin erken ve orta aşamalarında kallus gelişimini, osteogenezi, kırık hattında köprü oluşumunu ve biyomekanik iyileşmeyi artırdığını bildirmiştir. ABL kullanılması vücuttaki kemiklerde KMY'yi arttırdığı literatür tarafından kanıtlanmış olup, periodontolojide kemik rejenerasyon prosedürlerinde klinik başarıyı arttıracığı öngörülerek bu anabolik ajan tercih edilmiştir.

Post-menapozal osteoporozun patogenezi ve kemik rezorpsiyonu ile kemik oluşumu arasındaki dengesizliğe sebep olduğu göz önüne alındığında, terapötik tedavi için kullanılan ilaçların kemik iyileşmesini farklı düzeylerde olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir.²⁸¹ Literatürde osteoporoz oluşturulmuş deney hayvanlarından elde edilen bilgiler doğrultusunda, osteoporozun kemiğin mekanik özelliklerini bozabileceğine ve kemikte oluşan kırığın^{282, 283}, çekim socketinin^{284, 285} ve sub-kritik boyuttaki defektlerin^{286, 287} iyileşmesini geciktirebileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Ayrıca greftlenmiş kemik defektlerinde²⁸⁸, kritik boyutlu kalvaryal defektlerin yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu ve kemik greftleri ile tedavisinde^{289, 290} ve distraksiyon osteogenezi^{291, 292} sırasında azalmış kemik oluşumuna sebep olduğu ve elde edilmiş kemiğin kalitesinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Bu bilgiler ışığında, post-menopozal osteoporozun kemik iyileşmesi üzerindeki negatif etkilerini daha iyi anlamak ve ABL'nin bu süreçteki etkinliğini değerlendirebilmek amacıyla, bu çalışmada post-menopozal sıçan modeli tercih edilmiştir.

Andersen ve ark. yaptıkları çalışmada overiektomize sıçanlardaki kartilaj dejenerasyonu, osteoartrit bulguları ile CTX seviyelerinin arasında paralellik olduğu gösterilmiştir. CTX testleri, osteoporoz araştırmalarında, artmış osteoklastik aktivite belirteci olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.²⁹³ Ayrıca invaziv bir yöntem olan CTX testleri osteoporoz indikatörü olarak, deneysel hayvan çalışmalarında non-invaziv yöntemlere göre daha güvenilir olduğu, birçok araştırmacı tarafından kabul edilmiştir.²⁹³

Kritik boyutlu defekt “hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşmeyecek olan belirli bir kemik ve türdeki en küçük boyutlu kemik içi yara” olarak tanımlanmaktadır.¹⁵⁷ Kritik boyutlu defektler bir organizmanın doğal rejenerasyon yeteneğinden daha büyük defektler olduğundan dolayı, yeni rejeneratif

teknikleri/malzemeleri/materyalleri test etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kritik boyutlu defektler farklı hayvan türleri, soyları, yaşları ve iskelet bölgeleri arasında değişiklik göstermektedir. Kalvaryal kritik boyutlu defektler literatürde kullanılan en popüler kritik boyutlu defektler arasındadır, çünkü kafatasının inertliği²⁹⁴, cerrahi erişimin kolay olması ve kemik rejenerasyonu için kullanılan biyomateryallere yeterli düzeyde destek sağlayabilmesi gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır.^{154, 295} Kalvaryal kritik boyutlu defektlerde, intramembranöz kemik oluşumu yalnızca defekt marjinlerinden başlar ve orijinal defekti kademeli olarak doldurmak için merkeze doğru ilerlemektedir. Kemik içi veya alveolar defektlerde, defekti çevreleyen tüm kemik yüzeylerinin rejenerasyon sürecini kolaylaştırabilmesi ve osteoprogenitör hücreler için rezervuar görevi görebilmesi nedeniyle, kalvaryal kritik boyutlu defektler daha zorlu olarak kabul edilmektedir.²⁹⁶ Bu sebeplerle çalışmamızda kritik boyutlu kalvaryal defekt modeli tercih edilmiştir.

Sıçanlarda kalvaryal kritik boyutlu defektler en sık kullanılan prelinik modeller arasında yer almasına rağmen, kritik olarak kabul edilen defekt çapı konusunda tartışmalar halen devam etmektedir.²⁹⁵ Literatürde farklı defekt boyutlarının kritik olduğu bildirilmiş olup, en yaygın olarak 5 ve 8 mm çapında defektler uygulanmıştır. Yetişkin sıçan kalvaryumlarının boyutları genellikle parietal kemiklerde bu boyutta iki defekt oluşturulmasına izin verdiği için, 5 mm çapındaki defektin ana avantajı, kontrol ve deney alanlarının aynı hayvanda standart bir şekilde gerçekleştirilebilmesidir.²⁹⁷⁻²⁹⁹ Vajgel ve ark.²⁹⁵, yaptıkları sistematik incelemede 5 mm'lik defektlerin çok düşük bir yüzdesinin (%1,6) yeni oluşan kemikle tamamen iyileştiği, 8 mm'lik toplam 251 defekt bölgesinin hiçbirinde ise tam kapanmanın görülmediğini bildirmiştir.²⁹⁵ 5 mm'lik defektlerin aksine, yetişkin sıçan kalvaryasında, genellikle iki parietal kemik arasında merkezi bir konumda, midsagittal sütürü içeren 8 mm çapında yalnızca bir defekt gerçekleştirilebilmektedir.³⁰⁰⁻³⁰² Bu iki farklı boyuttaki defekt karşılaştırıldığında, 5 mm'lik defektlerin bazı dezavantajları olduğu bildirilmiştir: bilateral defektlere lokal olarak uygulanan biyomateryaller/büyüme faktörleri/kemoterapötikler, jeller veya sıvılar gibi düşük viskoziteli taşıyıcılarda uygulandığında, kontrol bölgesi defektlerin yakınlığı nedeniyle “kontamine” olabilmektedir.²⁹⁵ Bu durum da çalışmanın sonucunu

etkileyebilecek önemli bir dezavantaj olarak görülmektedir. Çalışmamızda ABL'nin lokal etkilerini değerlendirmeyi amaçladığımız için kontaminasyona sebep olabileceği riskini göz ardı edemedik ve bu sebeple 8 mm çapında tek defekt oluşturmayı tercih ettik.

Vajgel ve ark.²⁹⁵, sistemik analizlerinde kritik boyutlu defektlerin rejenerasyonun sonuçlarının sıçanın yaşından etkilendiğini vurgulamıştır. 9,0 mm'lik defektlerin kullanıldığı çalışmalarda çoğunlukla daha genç yetişkin sıçanlar (3 aylık) kullanılmış^{303, 304} olup daha düşük çaplı diğer defekt modellerinin kullanıldığı çalışmaların çoğunda daha olgun hayvanlar (4 aylık ve üzeri) tercih edilmiştir.^{305, 306} Büyük kemik defektlerinde dahi spontan yeni kemik dolumu potansiyelinin yüksek olması nedeniyle daha genç sıçanların bazı deneysel modellerde kullanılmaması gerektiği savunulmuştur.^{307, 308} Bu sebeplerden ötürü çalışmamızda 20-22 aylık wistar cinsi sıçanlar tercih edilmiştir.

Yaşın yanı sıra, cerrahi teknik ve operatörle ilgili sorunlar da iyileşme sürecini etkileyebilmektedir. Yeterli soğutma kullanılmazsa defektin kenarlarında bir miktar kemik nekrozu görülebilir, bu da defektin spontan onarımını engelleyebilmektedir.³⁰⁹ Cooper ve ark.³¹⁰, yaptıkları çalışmada dura materin kasıtlı olarak yırtılmasının kemik iyileşmesi açısından istatistiksel olarak bir farka sebep olmadığını gözlemlemişlerdir. Fakat kalvaryumun orta hattında hazırlanan defektlerin anatomik konumuyla ilgili olarak defekt hazırlığı sırasında (dura materin trefan frez ile yırtıldığında veya frezlenmiş defekt bölgesinin kalvaryadan ayrılması sırasında hasar gördüğünde) sagittal sinüsten gelen kan pıhtısının birincil kemik iyileşmesi üzerine tepkisini değiştirebileceğinden, kemik iyileşmesini artırılabilirliğini öne sürülmüştür.³⁰⁷ Çalışmamızda kalvaryal defektlerin hazırlanması aşamasında yeterli soğutma olmasına ve drillenen kemiğin bölgeden uzaklaştırılması aşamasında dura matere ve sagittal sinüse bir zarar verilmemesine özen gösterilmiştir.

Literatürde sıçan kalvaryum modelinde kemik iyileşmesinin değerlendirilmesi için histolojik, histomorfometrik^{300, 311}, immunohistokimyasal^{312, 313}, mikro-BT^{306, 314} ve radyografik tekniklerin²⁵ kullanıldığı görülmektedir. Histolojik analiz ve histomorfometrik incelemeler sıçan kalvaryum modellerinde yeni kemik oluşumunu

niceliksel ve niteliksel olarak değerlendirmek ve kemik hücrelerini ve hücrelerin aktiviteleri *in situ* olarak değerlendirmek için altın standart olarak kullanılan tekniklerdir.³¹⁵ Bununla birlikte, geleneksel histolojik ve histomorfometrik yöntemler, iki boyutlu özelliği nedeniyle tüm numunenin hacimsel değişikliklerini doğru bir şekilde elde edememektedir.³¹⁶ Bu nedenle, yeni oluşan kemik hacminin değerlendirilmesinde doğruluk hedeflendiğinde ve kemiğin üç boyutlu mikromimarisinin değerlendirilmesi gerektiğinde, histolojik/planimetrik bir yöntem olan stereometri³¹⁷ veya mikro-BT gibi daha doğru bir nicel yöntemin kullanılması tercih edilmektedir. Radyografik analizin düşük maliyetli ve daha az zaman alıcı olması gibi bazı avantajları vardır; ancak sıçan kalvaryal defekti modellerinde kemik mineralizasyonundaki değişiklikler üzerinde doğruluk düzeyinin düşük olduğu bildirilmiştir^{318, 319}. Ayrıca Pryor ve ark.,^{320, 321} yaptıkları 2 çalışmada radyografik ve histolojik analiz yaptıklarında bu değerlendirme sonuçlarının birbirini ile çeliştiğini gözlemlemişlerdir. Radyografik analiz sonucuna göre tam kapanma gösteren altı bölge varken, histolojik analiz yapıldığında bu altı bölgeden yalnızca üçünde tam kapanma görülmüştür. Literatürdeki başka çalışmalarda da radyografik ve histolojik analiz sonucunda tartışmalı sonuçlar bildirmiştir.^{319, 322} Benzer şekilde, Honma ve ark.,²⁵ radyografik analiz kullanarak 8,8 mm'lik bir defektin 4 haftalık iyileşme sonrasında yeni kemik oluşum oranını %30,9 buldular fakat aynı defekt büyüklüğüne sahip ve aynı değerlendirme periyodundaki histolojik analiz kullanan diğer tüm çalışmalarla karşılaştırıldığında yeni kemik oluşumunun yüksek olduğunu, diğer çalışmalarda yeni kemik oluşum oranının %4,93-%11,65 aralığında olduğunu bildirmişler. Erken iyileşme döneminde olduğu gibi sınırlı veya kısmi kemik oluşumu olduğunda, radyografik analiz yeni kemik oluşum oranını olduğundan fazla gösterme eğilimindedir. Aksine, histolojik analizde defekt bölgelerinin tamamen kapandığı gözlemlendiğinde radyografik analiz kemik dolumunu olduğundan düşük gösterebilmektedir.³¹⁸ Bu nedenle, geleneksel radyografik analiz sıçan kalvaryumlarında kemik iyileşmesinin değerlendirilmesinde tek yöntem olarak kullanılmamalıdır.³¹⁹ Bu sebeple çalışmamızda histolojik, histomorfometrik, immunohistokimyasal ve mikro-BT analizlerini kullandık.

Sıçanların kalvaryal defektleriyle ilgili olarak, toplam kemik oluşumunun en büyük oranının 4. haftada gerçekleştiği, daha sonra zaman içerisinde azaldığı ve 24 hafta içinde durduğu görülmektedir.²⁵ Ma ve ark., Kholy ve ark., Jiang ve ark., sıçanlar üzerine yaptıkları kalvaryal defekt çalışmalarında değerlendirme sürelerini 8 hafta olarak belirlemişlerdir.³²³⁻³²⁵ Literatür çalışmaları referans alınarak kalvaryal defekt bölgesindeki iyileşmenin değerlendirilmesi için süreyi 8 hafta olarak belirledik. Çalışmadaki analizlerin sonucunda, ABL+O grubunda $4,32\pm 0,17$ mm², O grubunda $3,54\pm 0,21$ mm² ve ABL grubunda $2,90\pm 0,22$ mm² yeni kemik oluşumu gösterdiği görüldü. Ayrıca defekt kapanma oranı (%) ABL+O grubunda $58,01\pm 1,12$, O grubunda $47,26\pm 0,79$ ve ABL grubunda $35,48\pm 1,18$ olarak tespit edildi.

Geçtiğimiz yıllarda geliştirilen çeşitli greft biyomateryallerine rağmen, kritik büyüklükteki defektlerin tedavisinde otojen kemik hala şiddetle tavsiye edilmektedir.^{326, 327} Otojen kemik grefti kemik rejenerasyonu için altın standart greft olarak kabul edilmektedir.³²⁸ Bunun nedeni, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon özelliklerinin, greftteki canlı osteojenik hücreleri teşvik etmesidir.³²⁹ Lucateli ve ark., sıçanların kalvaryumunda kritik boyutlu defektlerin onarımında doksisisiklin ve otojen kemiğin ilişkisi değerlendirmişler.³³⁰ 8 haftalık iyileşme dönemi sonucunda defekt bölgesine sadece otojen kemik grefti uygulanan grup ve otojen kemik grefti ve doksisisiklin jel uygulanan grup en fazla yeni kemik oluşumu gösteren gruplar olduğu görülmüştür (Sırasıyla %43,46 ve %47,86). Ayrıca yeni kemik oluşum yüzdesi açısından kontrol grubu ve sadece otojen kemik grefti uygulanan grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Sırasıyla %18,80 ve %43,46). Almeida ve ark., yaptıkları çalışmada sıçan kalvaryasındaki kritik boyutlu defektlerin tedavisinde düşük dozda lazer uygulamasının otojen kemik grefti ile kemik iyileşme süreci üzerindeki etkisini değerlendirmiştir.¹⁴¹ Kontrol grubu ve sadece otojen kemik grefti uygulanan grup arasında yeni kemik oluşum yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (Sırasıyla %9,96 ve %30,98) Otojen kemiğin diğer kemik greft materyallerine kıyasla daha başarılı olması sebebiyle çalışmamızda otojen kemik grefti kullanmayı tercih ettik. Ayrıca O grubundaki yeni kemik alanı $3,54\pm 0,21$, kontrol grubunda $2,82\pm 0,19$ olarak bulundu ve bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,05$).

Literatürde kritik boyutlu defektler oluşturulurken fissür, rond veya trefan frezlerin kullanıldığı görülmektedir.³³¹ Trefan frezler diğer frezlere göre kullanım kolaylığı, donör bölge komplikasyonunun düşük olması, defektlerin ve alınacak greftlerin standardizasyonun sağlanması açısından çok daha avantajlıdır.³³¹ Fissür ve rond frez ile defekt sadece aşındırma yöntemi ile oluşturulabilmektedir. Trefan frez ise blok halinde otojen kemik grefti toplanmasını mümkün kılmaktadır.^{331, 332} Trefan frez ile elde edilen blok greftler partikül haline getirilirken kemik eziciler, kemik değirmenleri ve kemik öğütücüler kullanılmaktadır. Çalışmamızda ABL ve otojen kemik greftinin iyileşmesi değerlendirileceği için trefan frez kullanılması tercih edilmiştir.

ABL'nin kemik metabolizması ve KMY üzerindeki etkileri, osteoporozu olan postmenopozal kadınlar üzerinde ABD, Hindistan, Arjantin ve İngiltere'deki 30 merkezde gerçekleştirilen randomize, çift kör, plasebo kontrollü, doz belirleyici, faz 2 bir çalışmada değerlendirilmiştir.²⁵¹ Bu çalışmada 222 kadın; plasebo, ABL 20 µg, 40 µg veya 80 µg veya TPTD 20 µg günlük subkutan enjeksiyonlarla 24 haftalık tedavi almak üzere randomize edilmiştir. Kemik döngüsü belirteçleri ile ilgili olarak hem ABL hem de TPTD gruplarında kemik oluşumunun belirteci olan PINP 1. haftadan itibaren artmaya başlamıştır. 24 hafta sonra, PINP ortalaması 40µg ABL grubunda %55, 80 µg ABL grubunda %52 ve TPTD grubunda %98 oranında artmıştır. 24. haftada, ABL ve TPTD lomber omurgada KMY'yi benzer şekilde artırmıştır (ABL 40 µg, ABL 80 µg ve TPTD için sırasıyla %5,2, 6,7 ve 5,5). Femur boynu KMY'si ABL, 20, 40 ve 80 µg gruplarında sırasıyla %2,7, 2,2 ve 3,1 oranında, TPTD grubunda ise %1,1 oranında artmıştır. Total kalça KMY'si ABL, 20, 40 ve 80 µg gruplarında sırasıyla %1,4, 2,0 ve 2,6 oranında artmıştır. 40 ve 80 µg ABL gruplarındaki toplam kalça artışları hem plasebo (%0,4) hem de TPTDden (%0,5) daha fazla olmuştur. Sonuç olarak, ABL lomber omurgada KMY artışı ve vertebral kırık riskinin azaltılması açısından TPTD'ye benzer bir etki gösterirken, femoral bölgelerde ve distal radiusta KMY'de daha yüksek bir artış göstermiştir. ABL vertebra dışı kırıklarda TPTD'ye kıyasla daha yüksek bir azalma göstermiştir. Ayrıca ABL dozajı arttıkça KMY üzerine etkisinin arttığı görülmüştür. Sahbani ve ark., tarafından yapılan çalışmada, C57BL/6 fareler 30 gün boyunca 20-80 µg/kg/gün dozlarında ABL ve TPTD ile tedavi edilmiş

ve kemik mikro yapısını ölçmek için mikro-BT kullanılmıştır.³³³ ABL (20 µg/kg/gün) ile tedavi edilen farelerde sıçan kıyasla daha fazla femoral metafizyel trabeküler kalınlık ve femoral orta diyafizyel kortikal kalınlık bulmuşlardır. Şaşırtıcı bir şekilde, fareler daha yüksek doz olan 80 µg/kg/gün ile tedavi edildiğinde herhangi bir trabeküler veya kortikal mikroyapısal parametrede ABL ve TPTD arasında bir fark bulunmamıştır, bu da osteoanabolik etkinin daha yüksek dozlarda dengelenebileceğini düşündürmektedir. Arlt ve ark., yaptıkları çalışmada 8 haftalık 32 adet fareye steril salin, 10 µg/kg TPTD, 10 µg/kg ve 40 µg/kg ABL verilmiştir.²⁶¹ Kemik rezorpsiyon belirteci olan serum CTX düzeyi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ABL 40 µg/kg grubunda anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla diğer gruplar L5 ve proksimal tibiada trabeküler kemik oluşum oranını artırmış olup 40 µg/kg ABL grubunda daha yüksek veriler elde edilmiştir. Ayrıca tibia diyafizinde, periosteal kemik oluşum oranı ABL 40 µg/kg grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Jolette ve ark.²⁶⁰, ABL'nin karsinojenik potansiyelini belirlemek için yaptıkları çalışmada sıçanlara 0, 10, 25 ve 50 µg/kg dozlarında günlük ABL uygulamış ve 2 yıla kadar pozitif kontrol olarak da 30 µg /kg insan paratiroid hormonu (1-34) uygulamışlar. Hem erkek hem dişi sıçanlarda ABL dozajı arttıkça Osteofibröz displazi, osteoblastoma, primer osteosarkoma, metastatik osteosarkoma ve çok merkezli osteosarkoma görülme sıklığının arttığını bildirmiştir. Çalışmamızda uygulanan dozajın belirlenmesinde literatüre bakıldığında hayvan çalışmalarında ABL'nin doz veya doz aralığı konusunda tam bir görüş birliği bulunmamaktadır. Bu sebeple literatürde birkaç kez üzerinde çalışma yapılmış olan 40 µg/kg dozajı belirlenmiştir.

Koca ve ark.¹⁴⁶, TPTD'nin sıçan mandibulasında lokal uygulamasını inceledikleri çalışmada sıçan mandibulasında 3 mm çapında defektler oluşturmuş; 20 µg ve 40 µg olmak üzere iki farklı dozda TPTD'i lokal olarak uygulamış ve ek olarak herhangi bir greft materyali ya da taşıyıcı bir materyal kullanmamıştır. TPTD'in kemik iyileşmesi ve masseter kası üzerindeki etkilerini 4 haftalık iyileşme süreci için değerlendirmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, TPTD'in uygulandığı gruplarda kemik iyileşmesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığını bildirmiştir. Ayrıca lokal olarak uygulanan tek doz TPTD' in kemik doku üzerinde anabolik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Toker ve ark., 40 erkek wistar sıçan üzerinde yaptıkları çalışmada

kalvaryada oluşturdukları kritik boyutlu defekt üzerinde alendronatın otojen kemik grefti ile birlikte lokal veya sistemik olarak uygulandığında kemik oluşumunu 8 haftalık süreçte değerlendirmiştir.³³⁴ Alendronatın hem sistemik hem de lokal uygulaması, otojen greft grubuna kıyasla önemli ölçüde daha fazla katmanlı kemik oluşumuyla sonuçlanmıştır ($p<0,05$) ve iki farklı alendronat uygulama yolu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Alendronatın lokal uygulanması, tek başına otojen grefte kıyasla önemli ölçüde daha yüksek osteoblast sayılarıyla sonuçlanmıştır ($p<0,05$). Osteoblast sayısı açısından sistemik ve lokal uygulama arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). Alendronatın lokal uygulanması, tek başına greft uygulanan gruba kıyasla yeni kemik oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır ($p<0,05$). Sistemik alendronat uygulaması daha yüksek olmakla birlikte, tek başına greftle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı yeni kemik oluşturmadı ve lokal uygulamayla kıyaslandığında önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir ($p>0,05$). Literatürde görüldüğü üzere lokal uygulama aktif olarak kullanılmakta olup bizim seçtiğimiz ajanın sistemik uygulamasında ek yan etkilere sahip olmasından dolayı çalışmamızda lokal uygulama seçilmiştir.

Kemik rezorpsiyonunu düzenleyen faktörler arasında RANKL ve onun tuzak reseptörü OPG önemli bir faktördür; her ikisi de öncelikle osteoblast soy hücreleri tarafından üretilen önemli sitokinlerdir. RANKL'ın osteoklast progenitör hücrelerindeki reseptörüne (RANK) bağlanması osteoklast oluşumunu ve aktivasyonunu uyarır ve apoptozu inhibe ederek gelişmiş kemik rezorpsiyonuna yol açmaktadır. Bu nedenle, RANKL/OPG oranı olarak ifade edilen iki sitokin arasındaki denge kemik rezorpsiyon sürecini kontrol etmektedir.³³³

Vasconcelos ve ark.³³⁵, yaptıkları çalışmada, sıçanlarda kritik boyutlu kalvaryal defekt modelinde zirkonya/hidroksiapatit (80/20) greft kombinasyonunu kemik iyileşmesi açısından değerlendirmiştir. 48 erkek sıçan üzerinde 8mm'lik kritik boyutlu kalvaryal defektler oluşturulmuştur. Çalışma dört grup üzerinden planlanmıştır. Bunlar: G0 grubu pozitif kontrol; G1 grubu hidroksiapatit; G2 grubu Zirkonya; G3 grubu Zirkonya/hidroksiapatit kombinasyonudur. Kalvaryal defektin 90 günlük iyileşmesi mikro-BT, histolojik ve immunohistokimyasal analizler ile değerlendirilmiştir. G3 grubunda defektin onarımını, kemik yoğunluğunu, osteoblast

ve osteoklast hücre sayısının arttırdığını bildirmiştir. G3 grubunda RANKL için immün boyanmanın orta derecede ($p<0,5$), OPG için ise yoğun ($p<0,001$) olduğunu belirtmiştir. Kontrol grubundaki RANKL ekspresyonun diğer gruplara göre daha fazla olduğu görülmüştür. G1 ve G3 gruplarında sırasıyla zayıf ve orta derecede RANKL immunboyanması olan, G1 ve G3 gruplarında ise güçlü OPG immunboyanması olan lenfosit hücrelerinin varlığını göstermiştir. Bu sonuçlar, osteoblast hücrelerinin yaygınlığıyla birlikte defekt bölgesindeki metabolik kemik aktivitesini temsil etmektedir. İmmunohistokimya sonuçlarına paralel olan mikro-BT sonuçları göre G3 grubunda artmış kemik hacmi (BV/TV) ve KMY olduğunu bildirmiştir ($p<0,05$).

Henaff ve ark.³³⁶, yaptıkları çalışmada TPTD, PTHrP (1-36) ve ABL'nin erkek farelerde kemik yeniden şekillenmesi üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. Aralıklı olarak günlük 80 µg/kg/gün subkutan enjeksiyonlar 4 aylık C57Bl/6J erkek farelere 6 hafta boyunca uygulanmıştır. Doku örnekleri üzerinde, mikro-BT, histomorfometri ve RNA izolasyonu ve kantitatif RT-PCR analizleri yapılmıştır. TPTD ile karşılaştırıldığında, ABL'nin tüm bölgelerde KMY'de benzer bir artışa neden olduğunu, PTHrP (1-36) ile ise herhangi bir değişiklik bulunmadığını göstermiştir. Hem TPTD hem de ABL ile, mikro-BT ve histomorfometri analizleri, artan trabeküler kalınlıkla ilişkili kemik hacminde, PINP serum seviyesi ve in vivo çift etiketleme ile gösterilen kemik oluşum hızında ve CTX seviyeleri ve osteoklast sayısı ile gösterilen kemik rezorpsiyonunda benzer artışlar olduğunu ortaya koymuştur. Trabeküler ve kortikal kemiğin gen ekspresyon analizleri, TPTD ve ABL'nin farklı zaman noktalarında osteokalsin, RANKL ve OPG artışı ile osteoblast farklılaşması ve aktivitesinde farklı etkilere yol açtığını göstermiştir. Bu analiz sonuçlarına göre trabeküler kemikte RUNX2, ALP ve osteokalsin ekspresyonun son ABL enjeksiyonundan 4 saat sonra artmış olduğunu fakat TPTD'nin 18 saat sonrasında artış gösterdiğini, kolajen-1 ekspresyonu için hem TPTD hem de ABL'nin her iki zaman noktasında da uyarıcı etkileri olduğunu, hem TPTD hem de ABL'nin kolajen-1 ve ALP ekspresyonunu 4 saatte artırırken, ABL'nin bu üç belirtecin ekspresyonunu 18 saate kadar artırdığını ve bu zaman noktasında ABL'nin kolajen-1 ve ALP üzerindeki etkisinin daha fazla olduğunu bildirmiştir. Ayrıca ABL son enjeksiyondan 4 saat sonra

trabeküler kemikte RANKL/OPG oranını hızla artırmıştır. ABL kemik oluşumu üzerinde osteoanabolik bir ajan olarak TPTD kadar etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda bu çalışmalara uygun olarak RANKL ekspresyonu K grubunda diğer gruplara göre daha fazla olduğu görüldü. RANKL düzeylerinin deney gruplarında daha düşük görülme sebebi ABL'nin anabolik bir ajan olması ve osteoblast sayılarında artışa sebep olması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. ABL+O grubunda OPG değerleri en yüksek ekspresyona sahiptir. ABL ve otojen greftin beraber kullanılması RANKL/OPG dengesini OPG lehine kaydırarak kemik yıkımını azaltmaktadır ve kemik rejenerasyonunu teşvik etmektedir. Bu çalışmada BV/TV oranı ABL+O grubunda K ve ABL grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). O grubundan fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlam bulunamamıştır. Mikro-BT sonuçlarımız immunohistokimya sonuçlarına benzer şekilde bulunmuştur. Bu sonuçlar ABL'nin RANKL seviyelerini azaltarak ve OPG seviyelerini arttırarak kemik dolumunu arttırabileceğini gösterebilmektedir.

TGF- β , hücre büyümesi, farklılaşması, apoptozu ve doku homeostazını düzenleyen çok işlevli bir sitokindir. Hem normal gelişim süreçlerinde hem de doku bütünlüğünün korunmasında hayati bir rol oynamaktadır. Ayrıca osteoblastların ve osteoklastların erken farklılaşmasını desteklerken, geç olgunlaşmalarını sınırlayarak kemik homeostazını kormaktadır.¹⁰⁰ Osteokalsin, osteoblastlara özgü bir proteindir ve ona kalsiyum bağlama özelliği sağlayan üç karboksiglutamik asit kalıntısı içermektedir. Osteokalsinin hidroksiapatit kristal büyümesinin düzenlenmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür. Plazmadaki osteokalsin seviyeleri yeni kemik oluşumuna bağlıdır ve konsantrasyon, osteoblastların aktivitesinin bir göstergesidir.³³⁷

Aroni ve ark.³³⁸, yaptıkları çalışmada stronsiyum (Sr) yüklü deproteinize sığır kemiği (DBB) ile greftlemenin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için 42 dişi sıçanın kalvaryasına bilateral olarak 5mm'lik defektler açmıştır. Çalışmada planlanan gruplara göre kalvaryada her defektin birisi negatif kontrol olacak şekilde boş bırakılmış, grup 1 DBB ile, grup 2 19,6 $\mu\text{g/g}$ Sr (DBB/Sr1) yüklü DBB ve grup 3 98,1 $\mu\text{g/g}$ Sr (DBB/Sr2) yüklü DBB ile greftlenmiştir. Greftlenen bölgenin iyileşmesini mikro-BT, histolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal

analizler ile incelenmiştir. İmmünohistokimyasal analizlerde TGF-β'in hem yeni kemik dokusunda hem de defekt içinde gözlenen bağ dokusunda eksprese edildiğini, tüm defektlenmiş gruplarda DBB parçacıklarıyla bağlantılı olarak orta düzeyde TGF-β ekspresyonu olduğunu bildirmiştir. DBB grubu ile DBB/Sr1, DBB/Sr2 grupları arasında istatistiksel olarak anlam olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Osteokalsin öncelikli olarak kritik boyutlu kalvaryal defektlerin kenarlarında oluşan yeni kemikte eksprese edilmiş olup, DBB/Sr1 ve DBB/Sr2 gruplarındaki greft parçacıklarıyla bağlantılı olarak da orta derecede osteokalsin ekspresyonu olduğunu fakat osteokalsin ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Henaff ve ark.³³⁶, yaptıkları çalışmada trabeküler kemikte osteokalsin ekspresyonunun son ABL enjeksiyonundan 4 saat sonra artmış olduğunu fakat TPTD'nin 18 saat sonrasında artış gösterdiğini belirtmiştir. ABL gibi osteoanabolik bir ajan olan TPTD ile ilgili olarak Çamılı ve ark.³³⁹, yaptıkları çalışmada sıçanlarda premaksiller sütür genişletmesi sonrasında sistemik TPTD'nin sütür kemiği oluşumu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 8-10 haftalık 20 adet Wistar cinsi erkek sıçan rastgele iki gruba ayrılmıştır: kontrol (C, n=10) ve TPTD (T, n=10). Her iki grupta da yedi gün boyunca helisel yay kullanılarak maksiller kesici dişlere genişletme kuvveti uygulanmıştır. Sekizinci günde, tüm sıçanlar yedi günlük bir konsolidasyon periyodu boyunca tutulmuş; ardından T grubuna, yedi gün boyunca günde bir kez 60 µg/kg TPTD subkutan olarak verilmiştir. Midpalatal sütür alanı, histolojik ve immünohistokimyasal analizlerle incelenmiştir. Histolojik olarak, yeni kemik oluşumunun T grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Osteokalsin antikor seviyelerinin T grubunda, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,0001$). Buna karşın, TGF-β antikoru T grubunda yalnızca hafif bir reaksiyon göstermiş olup kontrol grubu ile istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Literatür taraması sonucunda, ABL'nin TGF-β antikorları ile birlikte incelendiği bir çalışmaya rastlanmadığı görülmüştür. Çalışmamızda TGF-β ve osteokalsin ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde ABL+O, O ve ABL grupları K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca en yüksek değerler ABL+O grubunda bulundu. ABL ve O'nun birlikte kullanılması, hücre

büyümesini ve farklılaşmasını teşvik eden TGF- β 'nin üretimini artırırken, osteokalsin gibi kemik oluşumunu destekleyen proteinlerin ekspresyonunu da maksimize etmektedir. Bu sinerjik etkiyle, kemik dokusunun daha hızlı ve etkili bir şekilde yenilenmesini sağlayarak kemik iyileşmesinde üstün performans göstereceği düşünülmektedir.

VEGF, ilk olarak vasküler endotel hücreleri için temel bir büyüme faktörü olarak tanımlanan güçlü bir anjiyojenik faktördür. Kemik metabolizması üzerindeki ayrıntılı etkileri henüz net olmasa da hücre dışı matris yeniden şekillenmesinde, anjiyogenezde ve kemik oluşumunda önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır.³⁴⁰ RUNX2, temel fibroblast büyüme faktörü, osteokalsin, kalsiyum karbonat kristalleri vb. gibi bir dizi kemik matrisi proteininin ifadesini kontrol ederek osteoblast farklılaşmasını ve işlevini destekleyen bir transkripsiyon faktörüdür.³⁴¹

Weng ve ark.³⁴², yaptıkları çalışmada PTH ve menaquinone-4 (MK-4) kombinasyonunun osteopenik sıçanlarda 4 mm'lik kalvaryal kemik defekti onarımı üzerindeki etkisini 8 haftalık süreçte değerlendirmiştir. Çalışma dört gruptan oluşmaktadır: grup 1 sham, grup 2 MK-4, grup 3 PTH ve grup 4 PTH+MK-4. Çalışmada kalvaryal kemik defektinde kemik oluşumu ve mineralizasyonunu değerlendirmek için serum γ -karboksile osteokalsin düzeyleri, histolojik ve immünofloresan etiketleme kullanılmıştır. Mikrofil perfüzyonu, immunohistokimyasal analiz ve mikro-BT sonuçları kalvaryal kemik iyileşmesinde artmış anjiyogenez ve kemik oluşumunun gerçekleştiğini göstermiştir. Anjiyojenik belirteçler olan VEGF ve CD31 için immunohistokimya boyaması, en belirgin pozitif boyanmanın grup 4'te olduğu göstermiştir ($p < 0,05$). Pozitif kahverengi boyanma MK-4 grubu ve PTH grubunda gözlenmiştir. Ancak, sham grubunda VEGF veya CD31 için neredeyse hiç pozitif boyanma tespit edilememiştir. Benzer eğilim osteojenik belirteçler olan RUNX2 ve osteokalsinde de gözlenmiştir. Grup 4'te RUNX2 ve osteokalsin belirteçleri grup 2 ve 3'e kıyasla yüksek oranda ifade edilirken, sham grubunda neredeyse hiç gözlenmemiştir ($p < 0,05$). Grup 2 ve 3 sham grubu ile kıyaslandığında ise kalvaryal kemik defektlerinde kemik oluşumunu ve damar oluşumunu desteklediği görülmüştür. Henaff ve ark.³³⁶, yaptıkları çalışmada RUNX2 ekspresyonunun ABL enjeksiyonundan 4 saat sonra arttığı, ancak TPTD

uygulamasında bu artışın 18 saat sonra gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu bulgu, ABL'nin RUNX2 ekspresyonunu daha erken artırabileceğini göstermektedir. RUNX2'nin artışı, osteoblast farklılaşmasının ve kemik oluşum sürecinin hızlanmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Li ve ark.³⁴³, yaptıkları çalışmada ABL ve TPTD'in deneysel periodontitiste alveolar kemiğin korunması üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. Çalışmada, 24 erkek Sprague-Dawley sıçanın sağ maksiller ikinci molar dişin etrafına ipek sütür yerleştirilmiştir (L grupları). Sol maksiller molar dişlere ise sütür bağlanmamış ve kontrol grubu olarak belirlenmiştir (nL grupları). Sıçanlar, rastgele olarak ABL, TPTD ve salin gruplarına ayrılmış ve 4 hafta boyunca günlük olarak ABL (80 µg/kg), TPTD (80 µg/kg) veya salin enjeksiyonu yapılmıştır. Mikro-BT, histolojik ve immünohistokimyasal analizlerle her iki taraftaki örnekler değerlendirilmiştir. Deneysel periodontitis yapılan bölgede ABL ve TPTD Tb.Th'yi artırmış olduğu fakat ABL'nin BV/TV'yi ve Tb. Sp'yi TPTD'den daha fazla düzeyde arttırdığını bildirmiştir. Böylece ABL trabeküler mimarinin korunması üzerinde TPTD'den daha iyi etkiler göstermiştir. ABL'nin, RUNX2 ve osteokalsin ekspresyonunu daha fazla arttırdığı, TPTD'ye göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Ayrıca ABL grubunun RUNX2 ekspresyonu TPTD ve salin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). Sütür bağlı olmayan bölgeler değerlendirildiğinde ABL'nin alveolar kemik kütlesini artırdığı gösterilmiş olup TPTD ile karşılaştırıldığında, nL+ABL grubunda BV/TV ve Tb.Th önemli ölçüde artmış, ancak Tb.Sp azalmıştır, bu da trabeküler mimarinin iyileştiğini göstermiştir. İmmünohistokimyasal açıdan hem ABL hem de TPTD'nin RUNX2 ekspresyonunu desteklediğini ve ABL tarafından yukarı regülasyonun anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermiştir. ABL gibi osteoanabolik bir ajan olan TPTD ile ilgili olarak Çamılı ve ark.³³⁹ yaptığı çalışmada ise, VEGF antikor seviyelerinin TPTD uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0,0001$). Elde edilen veriler, premaksiller sütür genişletilmesi sonrasında sistemik TPTD uygulamasının VEGF ekspresyonunu artırarak sıçanlarda kemik oluşumunu uyardığını göstermektedir.

Literatür taraması sonucunda, ABL ve VEGF antikoru birliktte incelendiği bir çalışmaya rastlanmadığı görülmüştür. Çalışmamızda anjiyogenez belirteci olarak kullandığımız VEGF ekspresyonları açısından değerlendirildiğinde ABL+O, O ve ABL grupları K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Ayrıca en yüksek değerler ABL+O grubunda bulundu. Literatür taraması sonucunda PTH ile kalvaryal defekt çalışması ve ABL ile TPTD'nin karşılaştırıldığı deneysel periodontitis çalışmasında RUNX2 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın kalvaryal defektte ABL ajanıyla çalışılan ilk çalışma olduğu görülmektedir. RUNX2 ekspresyonları, ABL ve K gruplarına kıyasla ABL+O grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiştir. ABL+O grubu en yüksek değere sahiptir ($p<0,05$). ABL+O grubunun RUNX2 ekspresyon değerleri O grubundan yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. ABL+O hem anjiyogenez hem de osteoblast farklılaşmasını destekleyen mekanizmaları sinerjik bir şekilde aktive etmiştir. Ayrıca kemik iyileşmesi sırasında hem damar oluşumunu hem de osteoblastların işlevselliğini maksimize ederek daha etkili bir kemik rejenerasyon süreci sağlamaktadır. Bu bağlamda, ABL+O kombinasyonunun sağladığı artmış VEGF ve RUNX2 ekspresyonları, kemik iyileşmesinde hem vasküler hem de osteojenik süreçlerin optimize edilmesine katkıda bulunarak, kemik defektlerinin daha hızlı ve sağlam bir şekilde iyileşmesini arttırabileceği düşünülmektedir.

OST osteoblastların farklılaşmasını ve olgunlaşmasını düzenleyen anahtar bir transkripsiyon faktörüdür. KMP sinyallemesinin etkisi altında OST, osteoblastlarda kemik matrisinin sentezini ve mineralizasyonunu destekleyerek kemik dokusunun yapısını ve işlevini korumaktadır.³⁴¹ ALP osteoblastların aktif olduğunu gösteren önemli bir kemik belirtecidir.³¹

Ghiacci ve ark.³⁴⁴, yaptıkları çalışmada farklı greft-konak arayüzlerinin biyolojik davranışlarını ve kemik iyileşme süreçlerini kritik boyutlu kalvaryal defektlere over-inlay cerrahi tekniği uygulayarak 8 erkek sıçan üzerinde araştırmıştır. Defektlere deproteinize sığır kemiği mineral (DBBM) blokları yerleştirilmiş, böylece bloğun bir kısmı kalvaryal kalınlık içinde yer alırken bir kısmı da kalvaryal yüksekliği aşacak şekilde planlanmıştır. Defekt bölgesinin iyileşmesi 1. ve 3. ayda doğal kemiğe bitişik alanlar, periosteal alan ve merkezi alan olmak üzere 3 farklı bölge olarak

histomorfometrik ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Anjiyogenezis ile oluşan kan damarlarının doğal kemik ile ara yüzeyden greftin merkez alanına doğru ilerleyen bir göç gösterdiği bildirilmiştir. OST dağılımının analizinde, 1 aylık iyileşme döneminde diğer bölgeler ile karşılaştırıldığında periosteal bölgede daha fazla OST pozitif hücre varlığı görüldüğünü ortaya çıkarmıştır. Periosteal bölgede gözlenen OST pozitif hücreler, periostun osteoprogenitör bileşenlerin kaynağı olduğunu kanıtlamaktadır. Erken kemik matriks belirteci olan ALP'nin 1. ayda bol miktarda eksprese edildiği ve periosteal bölgede daha yüksek olma eğilimi gösterdiği bulunmuştur. İncelenen tüm alanlarda zamanla ALP ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yaranın fizyolojik olgunlaşmasına ve stabilizasyonuna uygun olarak bir azalma olduğu gözlenmiştir.

Kaback ve ark.³⁴⁵, yaptıkları çalışmada TPTD'nin kırık hattındaki iyileşme sürecine olan etkilerini incelemiştir. Çalışmada, 7 gün boyunca günlük 40 µg/kg dozunda TPTD tedavisi uygulanan ve kontrol grubu olarak eşit dozda salin verilen fareler kullanılmıştır. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri kültüre alınarak, OST ve osteoblast fenotipik gen ekspresyonları gerçek zamanlı RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, kırık bölgesindeki OST ekspresyonunu incelemek için histolojik ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. TPTD tedavisi gören farelerin mezenkimal kök hücrelerinde OST gen ekspresyonunun anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur ($p < 0,05$). TPTD tedavisinin, kırık iyileşmesini hızlandırdığını ve kırık bölgesindeki OST ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir. Henaff ve ark.³³⁶'nın yaptığı çalışmada ALP ekspresyonunun hem TPTD hem de ABL tarafından 4 saatlik zaman diliminde artırıldığı bildirilmiştir. Ancak, ABL'nin ALP ekspresyonunu 18 saate kadar artırmaya devam ettiği ve bu zaman noktasında TPTD'ye kıyasla daha güçlü bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Henaff ve ark. yaptığı bu çalışma ABL ile ALP ekspresyonunun incelendiği ilk çalışma olduğu görülmüştür.

Mevcut literatür taramaları sonucunda, OST ve ABL'nin birlikte ele alındığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda ALP ve OST ekspresyonu değerlendirildiğinde ABL+O grubunda bu değerler ABL ve K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. ABL+O grubunda en yüksek değerler olmasına rağmen O grubundan istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Ayrıca Ghiacci ve ark., çalışmasına uyumlu olarak biz de çalışmamızda kalvaryal defektin iyileşme paternini defektin perifer bölgesinden merkezi bölgeye doğru gerçekleştiğini mikro-BT sonuçlarımız ile görüntüledik. Sınırlı sayıda bulunan ALP çalışmaları göz önüne alındığında, çalışmamız bu konudaki eksikliği doldurmayı hedefleyerek literatüre değerli veriler sunmaktadır.

Tip 1 kolajen, bağ dokusu için iskeletsel bir çerçeve oluşturur ve progenitor hücrelerden yeni kemik oluşumuna yol açan olaylar zincirinde merkezi bir rol oynamaktadır. Kemiğin organik matrisi, tip 1 kolajen, proteoglikan kütleleri ve birkaç spesifik yapısal glikoproteinden oluşmaktadır.³⁴⁶

Kim ve ark.³⁴⁷, yaptıkları çalışmalarında rhKMP-2 ve lokal olarak uygulanan bisfosfonatın bilateral 5 mm'lik kalvaryal kemik defektleri üzerinde sinerjik etkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçlamıştır. Çalışmaya 36 sıçan dahil edilmiş olup 4 gruba ayrılmıştır: grup 1 yalnızca Bio-Oss® (n=9), grup 2 rhKMP-2+Bio-Oss® (n=9), grup 3 rhKMP-2+1 mM alendronate+ Bio-Oss® (n=9) ve grup 4 rhKMP-2+10 mM alendronat+Bio-Oss® (n=9). Defektlerin 2., 4., ve 8. haftalık iyileşmeleri histolojik, histomorfometrik ve immunohistokimyasal analizler ile incelenmiştir. Grup 1,2,3'te kolajen tip I ile ilgili olarak yüksek ekspresyon bildirilmiş olup üç grup arasında fark bulunamamıştır. Ancak grup 4 diğer gruplara göre daha az kolajen tip I ekspresyonu göstermiştir. OPG ekspresyon analizinde, 2. ve 4. haftalarda orta düzeyde ekspresyon ve 8. haftada azalma olduğu görülmüştür. Kolajen tip I gibi, grup 1,2,3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Grup 4'te OPG'nin düzeyinin yüksek olduğu bildirilmiştir. RANKL ekspresyonu bakıldığında grup 4 hariç zamana bağlı olarak azalmıştır. Grup 3'te 2. ve 4. haftalarda ekspresyonun hafifçe azalmış olduğu görülmektedir. Grup 4'te ise orta düzeyde ekspresyon görülmeye devam etmektedir. Henaff ve ark.'nın yaptığı çalışmada, kolajen-1 ekspresyonunun hem TPTD hem de ABL tarafından her iki zaman noktasında (4 saat ve 18 saat) uyarıldığı bildirilmiştir. Ancak, ABL'nin 18 saate kadar kolajen-1 ekspresyonunu artırmaya devam ettiği ve bu zaman noktasında TPTD'ye kıyasla daha güçlü bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir.³³⁶

Literatür taraması sonucunda, çalışmamızın ABL ve kolajen-1 ilişkisini ele alan sınırlı sayıdaki çalışmalardan biri olduğu görülmüştür. Çalışmamızda kolajen-1 ekspresyonunun ABL+O ve O grubunda K grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). En yüksek kolajen-1 ekspresyonunun ABL+O grubuna ait olduğu görülmüştür. ABL, kemik matriksine yapısal destek sağlayarak hücrelerin uygun ortamda büyümesini ve farklılaşmasını teşvik ederken, otojen greftin sunduğu osteojenik hücreler ve büyüme faktörleri bu süreci daha da güçlendirmektedir. ABL+O kombinasyonu, kemik dokusunun yeniden yapılandırılmasında hem yapısal bütünlüğü artırmakta hem de moleküler düzeyde kolajen tip I ve diğer kemik oluşumunu destekleyen proteinlerin (RUNX2 ve VEGF) ekspresyonunu maksimize edeceği şeklinde yorumlanabilir.

Osteonektin, kolajen olmayan asidik özelliklere sahip hücre dışı bir matris glikoproteinidir ve mineralize kemik trabeküllerinde lokalize olduğu bilinmektedir.³⁴⁸ Matriksteki osteoblastlar tarafından kemik matriks hücrelerine göre daha yüksek seviyelerde sentezlenmektedir. Periodontal ligamentte, sementte, kemikte, fibroblastlarda ve osteoblast hücrelerinde bulunmaktadır. Osteonektin, kemik minerallerini ve kolajeni birbirine bağlayarak normal iskelet dokusunda aktif mineralizasyonu başlatabilmektedir.³⁴⁹ Ayrıca kemik mineralizasyon aşamasında kolajen fibrillerinin düzenlenmesinde osteoblastik aktiviteyi geliştirerek osteosit dönüşümünde işlev gördüğü düşünülmektedir.³⁵⁰

Lacin ve ark.³⁵⁰, antioksidan, antiinflamatuvar ve immünomodülatör aktivitelerinden dolayı kullanılan bir mantar türü olan *Ganoderma lucidum* uygulamasının, osteoindüktif reaksiyon ve yeni kemik oluşumunda rejeneratif bir ajan olarak kullanılıp kullanılmayacağına greft materyali ile kalvaryal kemik defektleri üzerindeki etkilerini immunohistokimyasal yöntemler kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada 30 adet Wistar erkek sıçan 3 gruba ayrılmıştır: grup 1 kontrol, grup 2 sadece greft ve grup 3 greft ve *G. lucidum*. *G. lucidum*, sıçanlara gavaj yoluyla günde 20 mL/kg oranında uygulanmıştır. Kalvaryal defekt sonrası kemik matriks yapısının bozulduğu ve bunun sonucunda osteoblast ve osteositlerde osteonektin ekspresyonunda azalma olduğu görülmüştür. Grup 2'de greft alanı içindeki küçük kemik trabeküllerinin periferindeki osteoblast ve osteosit hücrelerinde osteonektin

pozitif ekspresyonu gözlenmiştir. Grup 3'te ise osteoblast ve osteosit hücrelerinde osteonektin ekspresyonu pozitif, yeni kemik trabeküllerinde ise pozitif osteonektin ekspresyonu görülmüştür. Çamalı ve ark.³³⁹ yaptıkları çalışmada da osteonektin seviyelerinin TPTD uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunu belirtmiştir (p=0,0001). Bu bulgu, TPTD'nin osteonektin ekspresyonunu artırarak kemik oluşumunu uyardığını göstermektedir.

Güncel literatür incelendiğinde ABL ile osteonektin çalışmasıyla ilgili çalışmamız ilk verileri sunmaktadır. Çalışmamızda osteonektin ekspresyonu verileri ABL+O ve O grupları, ABL ve K gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca histomorfometrik değerlendirmede de ABL+O ve O gruplarında osteoblast sayıları K ve ABL grupları ile karşılaştırıldığında osteoblast sayılarının yüksek oluşu istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bu iki bulgu birlikte değerlendirildiğinde greft uygulamasıyla kemik matriksinin gelişmesi nedeniyle kemik trabeküllerinin gelişmeye başladığı osteoblast hücresi ve osteosit aktivitesinin belirginleştiği ve osteonektin ekspresyonunun pozitif reaksiyon göstermeye başladığı düşünülebilir.

KMP'ler, dönüştürücü büyüme faktörü- β 'nin (TGF- β) süperfamilya proteindir ve yetişkin doku homeostazının korunmasında önemli bir role sahiptir.^{351, 352} KMP'lerin kemik ve kıkırdak oluşumunda önemli rolleri vardır ve KMP-2, -4, -6 ve -7'nin osteoindüktif yeteneğe sahip olduğu bilinmektedir. KMP-2 güçlü osteoindüktif potansiyele sahiptir ve osteoindüktif büyüme faktörü olarak kullanılmıştır.³⁵³

Yu ve ark.³⁵⁴, icariin (ICA)/poröz magnezyum alaşımlı greftin osteoporotik kemik defektlerinin onarımındaki etkinliğini ve olası mekanizmasını araştırmak için ovariektomi yapılmış Sprague-Dawley sıçanlarının femurlarında silindirik bir kemik defekti oluşturulmuştur. Sıçanlar 4 gruba ayrılmıştır: 1.grup ICA/poröz magnezyum alaşımlı greft uygulanan grup (n = 16), grup 2 sadece poröz magnezyum greft grubu (n = 16), grup 3 defektin boş bırakıldığı kontrol grubu (n=16) ve grup 4 sıçanların sol femurlarının açığa çıkarılıp sham ameliyatı için dikildiği sham grubu (n=48). ICA/poröz magnezyum alaşımlı greft defekt bölgesine yerleştirilmiş ve iyileşmeyi 8. ve 12. haftalarda değerlendirmişlerdir. Defekt bölgesinin incelenmesi için histolojik,

histomorfometrik ve immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. Radyolojik inceleme ve analiz için ise mikro-BT kullanılmıştır. 8 haftalık iyileşmeden sonra 1.grubun Sirtuin 1, Wnt-5a, β -katenin, GSK3 β , ALP, RUNX2 ve KMP-2 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri 2.gruba ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Grup 1'in Osteokalsin ekspresyon seviyesi de kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Li ve ark.³⁴³, yaptıkları çalışmada lipopolisakkarit ile muamele edilen MC3T3 pre-osteoblast hücreleri kullanılarak in vitro deneyler de gerçekleştirmiştir. Bu deneyin immünohistokimyasal analizleri sonucu wnt sinyal yolu açısından, β -katenin ekspresyonunun LPS+ABL grubunda LPS+TPD grubundan önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda β -katenin ekspresyonu verileri ABL+O ve O grupları ABL ve K gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05$). KMP-2 ekspresyonu verileri sonucu ABL+O grubunun ABL ve K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). ABL+O uygulaması sonucu Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktive olduğu ve β -katenin, RUNX2 ve KMP-2 proteinlerinin ekspresyonunun hücrelerde hafifçe yukarı regüle olduğu ve sonuçta osteojenik farklılaşmayı artırdığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ABL'nin post-menopozal sıçanların kritik boyutlu kalvaryal defektlerinde kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi otojen kemik grefti kombinasyonu ile değerlendirilmiştir. Bulgular, ABL+O kombinasyonunun, kemik rejenerasyonuna olan olumlu etkilerini açıkça ortaya koymuştur.

Histopatolojik ve histomorfometrik analizlerde, K grubuna kıyasla ABL+O gruplarında anlamlı iyileşme gözlemlenmiştir. ABL+O grubu, total iyileşme alanı, defekt kapanma oranı ve yeni kemik oluşumu gibi parametrelerde en yüksek değerlere ulaşmıştır. Bu grupta rezidüel materyal miktarının en düşük, osteoblast sayısının ise en yüksek olması, ABL+O'nun kemik oluşumunu destekleyen anabolik etkisini göstermektedir. İmmünohistokimyasal analizlerde, kemik iyileşmesiyle ilişkili ALP, β -katenin, KMP-2, kolajen-1, osteokalsin, osteonektin, OST, OPG, RUNX2, TGF- β ve VEGF ekspresyonlarının ABL+O grubunda anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Buna karşılık, RANKL ekspresyonunun K grubunda en yüksek olması, osteoklastik aktivitenin bu grupta yoğun olduğunu ve iyileşme sürecinin yavaş olduğunu göstermektedir. Deney gruplarında RANKL ekspresyonunun azalması, osteoklast aktivitesinin baskılandığını ve kemik metabolizmasının dengeye ulaştığını ortaya koymaktadır. Mikro-BT analizleri, ABL+O grubunda radyolojik olarak da en iyi iyileşmenin sağlandığını göstermiştir. Tb.Th, BV, BV/TV ve Tb.N gibi parametreler ABL+O grubunda en yüksek değerlere ulaşmıştır. K grubunda daha düşük BV/TV ve daha geniş Tb.Sp gözlenmiştir, bu da K grubunda iyileşmenin sınırlı olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızın yalnızca post-menopozal yaşlı sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş olması ve elde edilen sonuçların sağlıklı genç sıçanlar üzerinde daha da etkili olabileceği düşüncesini bir genelleme olup bu konu üzerinde daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca çalışmamız sadece altın standart olarak kabul edilen otojen kemik grefti kullanılarak yapılmış olup farklı greft materyalleri/biyomateryaller vereceği sonuçlar bilinmemektedir. Bu sebeple daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç olarak, ABL uygulamasının post-menopozal osteoporoz modellerinde kalvaryal defektte kemik iyileşmesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırmasa da diğer gruplara kıyasla iyileşmeyi ve kemik oluşumunu desteklediği görülmüştür. İmmünohistokimyasal analizler, ABL+O kombinasyonunun kemik rejenerasyonuna katkıda bulunan moleküllerin ekspresyonunu artırdığını göstermiştir. Ayrıca, lokal olarak yalnızca tek sefer uygulanmasına rağmen elde edilen bu olumlu sonuçlar, ABL'nin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisini vurgulamaktadır. Bu bulguların literatüre önemli katkılar sunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tolstunov L, Hamrick JFE, Broumand V, Shilo D, Rachmiel A. Bone augmentation techniques for horizontal and vertical alveolar ridge deficiency in oral implantology. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2019; 31(2): 163-91.
2. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone* 2015; 81: 112-21.
3. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83(2): 98-103.
4. Jensen SS, Broggin N, Hjørting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(3): 237-43.
5. Mah J, Hung J, Wang J, Salih E. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. *Eur J Orthod* 2004; 26(5): 475-82.
6. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359(9319): 1761-7.
7. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, et al. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2(1): 1-16.
8. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2013; 24(1): 23-57.
9. Schwartz A. Diabetes mellitus: does it affect bone? *Calcif Tissue Int* 2003; 73: 515-9.
10. Vestergaard P, Mosekilde L. Hyperthyroidism, bone mineral, and fracture risk—a meta-analysis. *Thyroid* 2003; 13(6): 585-93.
11. Wang D, Zhang P, Mei X, Chen Z. Repair calvarial defect of osteoporotic rats by berberine functionalized porous calcium phosphate scaffold. *Regen Biomater* 2021; 8(3): rbab022.

12. Föger-Samwald U, Kersch-Schindl K, Butylina M, Pietschmann P. Age-related osteoporosis: targeting cellular senescence. *Int J Mol Sci* 2022; 23(5): 2701.
13. Oral R, Oral O. Dentistry and osteoporosis / Diş hekimliği ve osteoporoz. *Med Bull Haseki* 2010: 9-14.
14. Riggs BL, Melton III LJ. The prevention and treatment of osteoporosis. *N Engl J Med* 1992; 327(9): 620-7.
15. Albrektsson T, Dahl E, Enbom L, et al. Osseointegrated oral implants: a Swedish multicenter study of 8139 consecutively inserted Nobelpharma implants. *J Periodontol* 1988; 59(5): 287-96.
16. Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(5): 579-86.
17. Wang C-K, Ho M-L, Wang G-J, et al. Controlled-release of rhBMP-2 carriers in the regeneration of osteonecrotic bone. *Biomaterials* 2009; 30(25): 4178-86.
18. Ohbayashi Y, Miyake M, Sawai F, Minami Y, Iwasaki A, Matsui Y. Adjunct teriparatide therapy with monitoring of bone turnover markers and bone scintigraphy for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115(4): e31-e7.
19. Fávoro-Pípi E, Feitosa SM, Ribeiro DA, et al. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. *Lasers Med Sci* 2010; 25: 727-32.
20. McConnell M, Shieh A. Polypharmacy in osteoporosis treatment. *Clin Geriatr Med* 2022; 38(4): 715-26.
21. Bhattacharyya S, Pal S, Chattopadhyay N. Abaloparatide, the second-generation osteoanabolic drug: molecular mechanisms underlying its advantages over the first-in-class teriparatide. *Biochem Pharmacol* 2019; 166: 185-91.
22. Bahar H, Gallacher K, Downall J, Nelson CA, Shomali M, Hattersley G. Six weeks of daily abaloparatide treatment increased vertebral and femoral bone

- mineral density, microarchitecture and strength in ovariectomized osteopenic rats. *Calcif Tissue Int* 2016; 99: 489-99.
23. Miller PD, Hattersley G, Riis BJ, et al. Effect of abaloparatide vs placebo on new vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2016; 316(7): 722-33.
 24. Ozdemir H, Toker H, Balcı H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *J Periodontal Res* 2013; 48(6): 722-6.
 25. Honma T, Itagaki T, Nakamura M, et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Dis* 2008; 14(5): 457-64.
 26. Hudieb M, Haddad A, Bakeer M, et al. Influence of age on calvarial critical size defect dimensions: a radiographic and histological study. *J Craniofac Surg* 2021; 32(8): 2896-900.
 27. Junqueira LC, Carneiro J, Aytakin Y, Solakoğlu S, çeviri. *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.; 2006: 141-59.
 28. Öber A, İzzetoğlu GT. *Histoloji*. 1. baskı. Ankara: Nobel Akademik Yayıncılık; 2006: 11-123.
 29. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105(7): 2631-9.
 30. Junqueira LCU, Carneiro J. *Basic Histology: Text & Atlas*. McGraw-Hill; 2005.
 31. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: a text and atlas with cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
 32. Turner C, Wang T, Burr D. Shear strength and fatigue properties of human cortical bone determined from pure shear tests. *Calcif Tissue Int* 2001; 69(6).
 33. Eriksen EF, Axelrod DW, Melsen F. *Bone histomorphometry*. 1994.
 34. Bevelander G. *Essentials of Histology*. Mosby; 1970.
 35. Erdoğan D, Hatipoğlu M, Görgün M, Ilgaz C. *Genel Histoloji*. 2008; 3: 66-7.
 36. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 2001; 10(4): 1-4.
 37. Topaloğlu U, Ketani MA, Saruhan BG. Kemik doku ve kemikleşme çeşitleri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg* 2017; 10(1): 62-71.

38. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008; 15(53): e76.
39. Moreira CA, Dempster DW, Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone–histogenesis, growth and remodeling. In *Endotext* [Internet]. MDText.com. Inc. South Dartmouth, MA; 2019: 1-37.
40. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4(3): 325-8.
41. Cowin SC. *Bone mechanics handbook*. 2nd ed. CRC Press; 2001.
42. Miller MD, Thompson SR, Hart J. *Review of orthopaedics*. Elsevier Health Sciences; 2012.
43. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(Supp3): S131-S9.
44. Haas M, Leko-Mohr Z, Roschger P, et al. Osteoprotegerin and parathyroid hormone as markers of high-turnover osteodystrophy and decreased bone mineralization in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2002; 39(3): 580-6.
45. Cormack DH. *Essential histology*. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
46. Erdost H. Kemik Dokusu. *Temel Histoloji A Özer (editör)*. 2. baskı. Nobel Yayınları 2011; 1: 237-62.
47. Eşrefoğlu M. *Genel Histoloji*. 2. baskı; 2016.
48. Tunçay ÖE. Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması. H.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2013, Ankara (Danışman: Prof. Dr. Gümüşderelioğlu M).
49. Junqueira L, Aytekin Y, Solakoğlu S. *Histoloji*. İstanbul: Nobel Medical Bookstores; 2006: 158.
50. Akers R, Denbow DM, editors. *Anatomy and physiology of domestic animals*. 2008.
51. İnsal B, Pişkin İ. Kemik dokusunun fizyolojisi. *Etlık Vet Mikrobiyol Derg* 2017; 28(1): 28-32.

52. Rauch F, Schoenau E. Skeletal development in premature infants: a review of bone physiology beyond nutritional aspects. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2002; 86(2): F82-F5.
53. Kini U, Nandeesh B. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. *Radionuclide Hybrid Bone Imaging* 2012: 29-57.
54. Reece WO. Functional anatomy and physiology of domestic animals. Iowa State University Press; 2009.
55. Standring S. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. 41st ed. Philadelphia: Elsevier Ltd; 2016.
56. Junquera L, Carneiro J. Histochemistry & cytochemistry. *Basic Histology Text & Atlas* 2005; 11: 9-13.
57. Jee W. Integrated bone tissue physiology: anatomy and physiology. *Bone Mech Handb* 2001.
58. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Text/atlas of histology. 1988.
59. Çay HF, Sezer N. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme. *Fiziksel Tıp* 2002; 5(3): 177-84.
60. Wu Z, Li W, Jiang K, et al. Regulation of bone homeostasis: signaling pathways and therapeutic targets. *MedComm* 2024; 5(8): e657.
61. Zhang Y, Liang J, Liu P, Wang Q, Liu L, Zhao H. The RANK/RANKL/OPG system and tumor bone metastasis: potential mechanisms and therapeutic strategies. *Front Endocrinol* 2022; 13: 1063815.
62. Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS, et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11(5): 401-19.
63. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21(2): 115-37.
64. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 2014; 561: 3-12.
65. Marahleh A, Kitaura H, Ohori F, Noguchi T, Mizoguchi I. The osteocyte and its osteoclastogenic potential. *Front Endocrinol* 2023; 14: 1121727.

66. Xu H, Wang W, Liu X, et al. Targeting strategies for bone diseases: signaling pathways and clinical studies. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1): 202.
67. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) receptors. *J Exp Med* 1999; 190(12): 1741-54.
68. Chen D, Xie R, Shu B, et al. Wnt signaling in bone, kidney, intestine, and adipose tissue and interorgan interaction in aging. *Ann N Y Acad Sci* 2019; 1442(1): 48-60.
69. Nirala BK, Yamamichi T, Yustein JT. Deciphering the signaling mechanisms of osteosarcoma tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 2023; 24(14): 11367.
70. Luo J, Yang Z, Ma Y, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Nat Med* 2016; 22(5): 539-46.
71. LaCroix AZ, Jackson RD, Aragaki A, et al. OPG and sRANKL serum levels and incident hip fracture in postmenopausal Caucasian women in the Women's Health Initiative Observational Study. *Bone* 2013; 56(2): 474-81.
72. Marcadet L, Bouredji Z, Argaw A, Frenette J. The roles of RANK/RANKL/OPG in cardiac, skeletal, and smooth muscles in health and disease. *Front Cell Dev Biol* 2022; 10: 903657.
73. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, et al. RANKL subcellular trafficking and regulatory mechanisms in osteocytes. *J Bone Miner Res* 2013; 28(9): 1936-49.
74. Sakamoto M, Fukunaga T, Sasaki K, et al. Vibration enhances osteoclastogenesis by inducing RANKL expression via NF- κ B signaling in osteocytes. *Bone* 2019; 123: 56-66.
75. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 2014; 94: 25-34.
76. Shen F, Huang X, He G, Shi Y. The emerging studies on mesenchymal progenitors in the long bone. *Cell Biosci* 2023; 13(1): 105.
77. Martin TJ. PTH1R actions on bone using the cAMP/protein kinase A pathway. *Front Endocrinol* 2022; 12: 833221.

78. Xu X, Zheng L, Yuan Q, et al. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res* 2018; 6(1): 2.
79. Babey M, Wang Y, Kubota T, et al. Gender-specific differences in the skeletal response to continuous PTH in mice lacking the IGF1 receptor in mature osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2015; 30(6): 1064-76.
80. Oh Y-I, Kim J-H, Kang C-W. Protective effect of short-term treatment with parathyroid hormone 1-34 on oxidative stress is involved in insulin-like growth factor-I and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in rat bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Regul Pept* 2014; 189: 1-10.
81. Kim J-H, Kim AR, Choi YH, et al. Intermittent PTH administration improves alveolar bone formation in type 1 diabetic rats with periodontitis. *J Transl Med* 2018; 16: 1-7.
82. Cheng J, Lv Y, Zhang L, Liu Y. Construction and validation of a predictive model for hypocalcemia after parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. *Front Endocrinol* 2022; 13: 1040264.
83. Wein MN. Parathyroid hormone signaling in osteocytes. *J Bone Miner Res Plus* 2018; 2(1): 22-30.
84. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; 19(1): 71-88.
85. Zaidi M, Kim SM, Mathew M, et al. Bone circuitry and interorgan skeletal crosstalk. *eLife* 2023; 12: e83142.
86. Yu S, Guo J, Sun Z, et al. BMP2-dependent gene regulatory network analysis reveals Klf4 as a novel transcription factor of osteoblast differentiation. *Cell Death Dis* 2021; 12(2): 197.
87. Ma L, He X, Wu Q. The molecular regulatory mechanism in multipotency and differentiation of Wharton's jelly stem cells. *Int J Mol Sci* 2023; 24(16): 12909.
88. Wu M, Chen G, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 2016; 4(1): 1-21.
89. Yang J, Ueharu H, Mishina Y. Energy metabolism: a newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone* 2020; 138: 115467.

90. Wang CL, Wang H, Xiao F, et al. Cyclic compressive stress-induced scinderin regulates progress of developmental dysplasia of the hip. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485(2): 400-8.
91. Wang S, Wu W, Lin X, et al. Predictive and prognostic biomarkers of bone metastasis in breast cancer: current status and future directions. *Cell Biosci* 2023; 13(1): 224.
92. Zou ML, Chen ZH, Teng YY, et al. The Smad dependent TGF- β and BMP signaling pathway in bone remodeling and therapies. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 593310.
93. Lu Y, Chen S, Yang N. Expression and methylation of FGF2, TGF- β and their downstream mediators during different developmental stages of leg muscles in chicken. *PLoS One* 2013; 8(11): e79495.
94. Loh HY, Norman BP, Lai KS, et al. Post-transcriptional regulatory crosstalk between MicroRNAs and canonical TGF- β /BMP signalling cascades on osteoblast lineage: a comprehensive review. *Int J Mol Sci* 2023; 24(7): 6423.
95. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 2012; 8(2): 272.
96. Usategui-Martín R, Rigual R, Ruiz-Mambrilla M, Fernández-Gómez JM, Dueñas A, Pérez-Castrillón JL. Molecular mechanisms involved in hypoxia-induced alterations in bone remodeling. *Int J Mol Sci* 2022; 23(6): 3233.
97. Vlashi R, Zhang X, Wu M, Chen G. Wnt signaling: essential roles in osteoblast differentiation, bone metabolism and therapeutic implications for bone and skeletal disorders. *Genes Dis* 2023; 10(4): 1291-317.
98. Jura-Póltorak A, Szeremeta A, Olczyk K, Zoń-Giebel A, Komosińska-Vassev K. Bone metabolism and RANKL/OPG ratio in rheumatoid arthritis women treated with TNF- α inhibitors. *J Clin Med* 2021; 10(13): 2905.
99. Houde N, Chamoux E, Bisson M, Roux S. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) induces human osteoclast apoptosis by up-regulating Bim. *J Biol Chem* 2009; 284(35): 23397-404.
100. Tominaga K, Suzuki HI. TGF- β signaling in cellular senescence and aging-related pathology. *Int J Mol Sci* 2019; 20(20): 5002.

101. Oliveira LF, Predes D, Borges HL, Abreu JG. Therapeutic potential of naturally occurring small molecules to target the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Cancers* 2022; 14(2): 403.
102. Yao Q, Wu X, Tao C, et al. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8(1): 56.
103. Maeda K, Yoshida K, Nishizawa T, et al. Inflammation and bone metabolism in rheumatoid arthritis: molecular mechanisms of joint destruction and pharmacological treatments. *Int J Mol Sci* 2022; 23(5): 2871.
104. Zhang R, Oyajobi BO, Harris SE, et al. Wnt/ β -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone* 2013; 52(1): 145-56.
105. Iolascon G, Liguori S, Paoletta M, Toro G, Moretti A. Anti-sclerostin antibodies: a new frontier in fragility fractures treatment. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2023; 15: 1759720X231197094.
106. Gebetsberger J, Schirmer M, Wurzer WJ, Streif W. Low bone mineral density in hemophiliacs. *Front Med* 2022; 9: 794456.
107. Weivoda MM, Ruan M, Hachfeld CM, et al. Erratum: Wnt signaling inhibits osteoclast differentiation by activating canonical and noncanonical cAMP/PKA pathways. 2019.
108. Kukoschke K, Mayer H. The importance of protein growth factors for the local regulation of bone growth. *Dtsch Med Wochenschr* 1990; 115(50): 1921-6.
109. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov* 2008; 92: 161-8.
110. Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ. Insulin-like growth factors and bone: the osteoporosis connection. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206(2): 83-102.
111. Ağralı ÖB, Kuru B, Kuru L. Periodontal kemik içi defektlerin tedavisinde mine matriks proteini ve otojen kemik grefti kombinasyonu kullanımı. *Clin Exp Health Sci* 2013; 3(1): 48-54.
112. MacNeil RL, Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol 2000* 1999; 19(1): 8-20.
113. Becker W, Becker BE. Periodontal regeneration: a contemporary re-evaluation. *Periodontol 2000* 1999; 19(1): 104-14.

114. Slavkin HC, Bartold PM. Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontol 2000* 2006; 41(1).
115. Froum SJ, Weinberg MA, Tarnow D. Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects: a clinical study. *J Periodontol* 1998; 69: 698-709.
116. Froum SJ, Gomez C, Breault MR. Current concepts of periodontal regeneration: a review of the literature. *N Y State Dent J* 2002; 68(9): 14.
117. Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonnell HT, Cochran DL. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol* 1999; 26(7): 421-8.
118. Movin S, Borring-Møller G. Regeneration of infrabony periodontal defects in humans after implantation of allogenic demineralized dentin. *J Clin Periodontol* 1982; 9(2): 141-7.
119. Vouros I, Aristodimou E, Konstantinidis A. Guided tissue regeneration in intrabony periodontal defects following treatment with two bioabsorbable membranes in combination with bovine bone mineral graft: a clinical and radiographic study. *J Clin Periodontol* 2004; 31(10): 908-17.
120. Stavropoulos A, Mardas N, Herrero F, Karring T. Smoking affects the outcome of guided tissue regeneration with bioresorbable membranes: a retrospective analysis of intrabony defects. *J Clin Periodontol* 2004; 31(11): 945-50.
121. Ehmke B, Rüdiger SG, Hommens A, Karch H, Flemmig TF. Guided tissue regeneration using a polylactic acid barrier. *J Clin Periodontol* 2003; 30(4): 368-74.
122. Gupta G. Clinical and radiographic evaluation of intra-bony defects in localized aggressive periodontitis patients with platelet rich plasma/hydroxyapatite graft: a comparative controlled clinical trial. *Contemp Clin Dent* 2014; 5(4): 445-51.
123. Sclar AG, Best SP. The combined use of rhBMP-2/ACS, autogenous bone graft, a bovine bone mineral biomaterial, platelet-rich plasma, and guided bone regeneration at nonsubmerged implant placement for supracrestal bone augmentation: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013; 28(5): e272-6.

124. Döri F, Arweiler N, Hüszer T, Gera I, Miron RJ, Sculean A. Five-year results evaluating the effects of platelet-rich plasma on the healing of intrabony defects treated with enamel matrix derivative and natural bone mineral. *J Periodontol* 2013; 84(11): 1546-55.
125. Mitani A, Takasu H, Horibe T, et al. Five-year clinical results for treatment of intrabony defects with EMD, guided tissue regeneration, and open-flap debridement: a case series. *J Periodontol Res* 2015; 50(1): 123-30.
126. Yilmaz S, Kuru B, Altuna-Kıraç E. Enamel matrix proteins in the treatment of periodontal sites with horizontal type of bone loss. *J Clin Periodontol* 2003; 30(3): 197-206.
127. Kökden A, Türker M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *Cumhuriyet Üniv Diş Hek Fak Derg* 1999; 2(2): 134-40.
128. Sigurdsson TJ, Hardwick R, Bogle GC, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: space provision by reinforced ePTFE membranes enhances bone and cementum regeneration in large supraalveolar defects. *J Periodontol* 1994; 65(4): 350-6.
129. Garg AK. *Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants: Rationale and Clinical Applications*. Quintessence Publishing; 2004.
130. Muschler GF, Lane JM, Dawson EG. The biology of spinal fusion. In: *Spinal Fusion: Science and Technique*. Springer; 1990: 9-21.
131. Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 117-35.
132. Alan H, Unlu G. Graft materials used in oral and maxillofacial surgery. *J Int Dent Med Res* 2011; 4(3): 150-4.
133. Rocchietta I, Simion M, Hoffmann M, Trisciuglio D, Benigni M, Dahlin C. Vertical bone augmentation with an autogenous block or particles in combination with guided bone regeneration: a clinical and histological preliminary study in humans. *Clin Implant Dent Relat Res* 2016; 18(1): 19-29.

134. Misch CM, Misch CE. Intraoral autogenous donor bone grafts for implant dentistry. In: Misch CE, ed. *Contemporary Implant Dentistry*. 2nd ed. Mosby; 1999: 497-508.
135. Albrektsson T, Sennerby L, Tjellström A. Advanced bone healing concepts in craniomaxillofacial reconstructive and corrective bone surgery. In: *Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery: Principles of Internal Fixation Using the AO/ASIF Technique*. Springer; 2002: 124-37.
136. Gorla LF de O, Spin-Neto R, Boos F, Pereira RS, Garcia-Junior I, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: a prospective, randomized, volumetric computed tomography study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44(12): 1486-91.
137. Donovan MG, Dickerson NC, Hanson LJ, Gustafson RB. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Branemark implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52(6): 588-94.
138. Van Steenberghe D, Naert I, Bossuyt M, et al. The rehabilitation of the severely resorbed maxilla by simultaneous placement of autogenous bone grafts and implants: a 10-year evaluation. *Clin Oral Investig* 1997; 1: 102-8.
139. Nakajima D, Tabata Y, Sato S. Periodontal tissue regeneration with PRP incorporated gelatin hydrogel sponges. *Biomed Mater* 2015; 10(5): 055016.
140. Agarwal A, Gupta ND, Jain A. Platelet-rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split-mouth clinical trial. *Acta Odontol Scand* 2016; 74(1): 36-43.
141. de Almeida AL, Medeiros IL, Cunha MJ, Sbrana MC, de Oliveira PG, Esper LA. The effect of low-level laser on bone healing in critical size defects treated with or without autogenous bone graft: an experimental study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25(10): 1131-6.
142. Sclar AG, Best SP. The combined use of rhBMP-2/ACS, autogenous bone graft, a bovine bone mineral biomaterial, platelet-rich plasma, and guided bone regeneration at nonsubmerged implant placement for supracrestal bone augmentation: a case report. *Oral Craniofac Tissue Eng* 2011; 1(1).

143. Alpan AL, Çalışır M, Kizildağ A, Özdede M, Özmen Ö. Effects of a glycogen synthase kinase 3 inhibitor tideglusib on bone regeneration with calvarial defects. *J Craniofac Surg* 2020; 31(5): 1477-82.
144. Ezirganli Ş, Kazancıoğlu HO, Acar AH, Özdemir H, Kuzu E, İnan DŞ. Effects of Ankaferd BloodStopper on bone healing in an ovariectomized osteoporotic rat model. *Exp Ther Med* 2017; 13(5): 1827-31.
145. Alrumaih S, Alshibani N, Alssum L, et al. The impact of Resolvin E1 on bone regeneration in critical-sized calvarial defects of rat model—A gene expression and micro-CT analysis. *J Periodontal Res* 2024; 59(1): 195-203.
146. Koca CG, Kösehasanoğulları M. Evaluation of single-dose applied teriparatide effect on bone healing with histomorphometric and micro-CT analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 2021; 49(2): 98-103.
147. Özerol NB, Yılmaz NA, Bodrumlu E. Diş hekimliğinde Emdogain. *Acta Odontol Turc* 2014; 31(1): 43-8.
148. Lynch SE. *Tissue Engineering: Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Pub.; 2008.
149. Fonseca RJ. *Oral and Maxillofacial Trauma*. Elsevier Saunders; 2005.
150. Malik NA. *Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery*. JP Medical Ltd; 2012.
151. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71(6): 354-61.
152. Szpalski M, Gunzburg R. Applications of calcium phosphate-based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002; 25(5): S601-S9.
153. Naini FB, Gill DS. *Orthognathic Surgery: Principles, Planning and Practice*. Wiley; 2017.
154. Gomes P, Fernandes M. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim* 2011; 45(1): 14-24.
155. An YH, Friedman RJ. Animal models of bone defect repair. In: *Animal Models in Orthopaedic Research*. CRC Press; 2020: 241-60.
156. Asutay F, Polat S, Gül M, Subaşı C, Kahraman SA, Karaöz E. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-

- computed tomography and histomorphometric analysis. *Arch Oral Biol* 2015; 60(12): 1729-35.
157. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 205: 299-308.
 158. Petridis X, Diamanti E, Trigas GC, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2015; 43(4): 483-90.
 159. Missana LR, Jammal MV. Critical size defect regeneration by rhPTH-collagen membrane as a new tissue engineering tool. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102(12): 4358-64.
 160. Laçın N, İzol BS, Özkorkmaz EG, Deveci B, Tuncer MC. The effect of graft application and allopurinol treatment on calvarial bone defect in rats. *Acta Cir Bras* 2019; 34(03): e201900306.
 161. Garcia VG, Sahyon AS, Longo M, et al. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *J Craniomaxillofac Surg* 2014; 42(7): 1196-202.
 162. Vo TN, Ekenseair AK, Spicer PP, et al. In vitro and in vivo evaluation of self-mineralization and biocompatibility of injectable, dual-gelling hydrogels for bone tissue engineering. *J Control Release* 2015; 205: 25-34.
 163. Dvornyk V. *Current Topics in Menopause*. Bentham Science Publishers; 2013.
 164. Sherman S. Defining the menopausal transition. *Am J Med* 2005; 118(12): 3-7.
 165. Ceylan B, Özerdoğan N. Menopausal symptoms and quality of life in Turkish women in the climacteric period. *Climacteric* 2014; 17(6): 705-12.
 166. Woods NF, Mitchell ES. Symptoms during the perimenopause: prevalence, severity, trajectory, and significance in women's lives. *Am J Med* 2005; 118(12): 14-24.
 167. Politi MC, Schleinitz MD, Col NF. Revisiting the duration of vasomotor symptoms of menopause: a meta-analysis. *J Gen Intern Med* 2008; 23: 1507-13.
 168. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Liu Z, Gracia CR. Duration of menopausal hot flushes and associated risk factors. *Obstet Gynecol* 2011; 117(5): 1095-104.

169. Kravitz HM, Zheng H, Bromberger JT, Buysse DJ, Owens J, Hall MH. An actigraphy study of sleep and pain in midlife women: the Study of Women's Health Across the Nation Sleep Study. *Menopause* 2015; 22(7): 710-8.
170. Joffe H, Massler A, Sharkey KM, editors. Evaluation and management of sleep disturbance during the menopause transition. *Semin Reprod Med* 2010; 28(5): 404-21.
171. Pien GW, Sammel MD, Freeman EW, Lin H, DeBlasis TL. Predictors of sleep quality in women in the menopausal transition. *Sleep* 2008; 31(7): 991-9.
172. Jordan AS, McSharry DG, Malhotra A. Adult obstructive sleep apnoea. *Lancet* 2014; 383(9918): 736-47.
173. Bromberger JT, Kravitz HM, Chang Y-F, Cyranowski JM, Brown C, Matthews KA. Major depression during and after the menopausal transition: Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Psychol Med* 2011; 41(9): 1879-88.
174. Bromberger JT, Kravitz HM, Chang Y, et al. Does risk for anxiety increase during the menopausal transition? Study of Women's Health Across the Nation. *Menopause* 2013; 20(5): 488-95.
175. Weber MT, Mapstone M, Staskiewicz J, Maki PM. Reconciling subjective memory complaints with objective memory performance in the menopausal transition. *Menopause* 2012; 19(7): 735-41.
176. Rocca W, Bower J, Maraganore D, et al. Increased risk of cognitive impairment or dementia in women who underwent oophorectomy before menopause. *Neurology* 2007; 69(11): 1074-83.
177. Medic G, Wille M, Hemels ME. Short-and long-term health consequences of sleep disruption. *Nat Sci Sleep* 2017; 9: 151-61.
178. Martin VT, Pavlovic J, Fanning KM, Buse DC, Reed ML, Lipton RB. Perimenopause and menopause are associated with high frequency headache in women with migraine: results of the American migraine prevalence and prevention study. *Headache* 2016; 56(2): 292-305.
179. Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, et al. Understanding weight gain at menopause. *Climacteric* 2012; 15(5): 419-29.

180. Sternfeld B, Wang H, Quesenberry CP, et al. Physical activity and changes in weight and waist circumference in midlife women: findings from the Study of Women's Health Across the Nation. *Am J Epidemiol* 2004; 160(9): 912-22.
181. Karvonen-Gutierrez C, Kim C, editors. Association of mid-life changes in body size, body composition and obesity status with the menopausal transition. *Healthcare* 2016; 4(3): 42.
182. Fuh JL, Wang SJ, Lee SJ, Lu SR, Juang KD. A longitudinal study of cognition change during early menopausal transition in a rural community. *Maturitas* 2006; 53(4): 447-53.
183. Kanaley J, Giannopoulou I, Tillapaugh-Fay G, Nappi J, Ploutz-Snyder L. Racial differences in subcutaneous and visceral fat distribution in postmenopausal black and white women. *Metabolism* 2003; 52(2): 186-91.
184. Lovejoy JC, Champagne C, De Jonge L, Xie H, Smith S. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. *Int J Obes* 2008; 32(6): 949-58.
185. Gibson CJ, Thurston RC, El Khoudary SR, Sutton-Tyrrell K, Matthews KA. Body mass index following natural menopause and hysterectomy with and without bilateral oophorectomy. *Int J Obes* 2013; 37(6): 809-13.
186. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9(12): 699-712.
187. Finkelstein JS, Brockwell SE, Mehta V, et al. Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(3): 861-8.
188. Maltais M, Desroches J, Dionne IJ. Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9(4): 186-97.
189. Asikainen TM, Kukkonen-Harjula K, Miilunpalo S. Exercise for health for early postmenopausal women: a systematic review of randomised controlled trials. *Sports Med* 2004; 34(11): 753-78.
190. Legendre G, Ringa V, Panjo H, Zins M, Fritel X. Incidence and remission of urinary incontinence at midlife: a cohort study. *BJOG* 2015; 122(6): 816-24.

191. Nappi RE, Cucinella L, Martella S, Rossi M, Tiranini L, Martini E. Female sexual dysfunction (FSD): prevalence and impact on quality of life (QoL). *Maturitas* 2016; 94: 87-91.
192. Felson DT. Developments in the clinical understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 203.
193. Nadkar M, Samant R, Vaidya S, Borges N. Relationship between osteoarthritis of knee and menopause. *J Assoc Physicians India* 1999; 47(12): 1161-3.
194. Robinson D, Cardozo LD. The role of estrogens in female lower urinary tract dysfunction. *Urology* 2003; 62(4): 45-51.
195. Nappi R, Kokot-Kierepa M. Vaginal Health: Insights, Views & Attitudes (VIVA)—results from an international survey. *Climacteric* 2012; 15(1): 36-44.
196. Waetjen LE, Feng WY, Ye J, et al. Factors associated with worsening and improving urinary incontinence across the menopausal transition. *Obstet Gynecol* 2008; 111(3): 667-77.
197. Botlero R, Davis SR, Urquhart DM, Shortreed S, Bell RJ. Age-specific prevalence of, and factors associated with, different types of urinary incontinence in community-dwelling Australian women assessed with a validated questionnaire. *Maturitas* 2009; 62(2): 134-9.
198. Calleja-Agius J, Brincat M. The effect of menopause on the skin and other connective tissues. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28(4): 273-7.
199. Archer DF. Postmenopausal skin and estrogen. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28(Suppl 2): 2-6.
200. Grishina I, Fenton A, Sankaran-Walters S. Gender differences, aging and hormonal status in mucosal injury and repair. *Aging Dis* 2014; 5(2): 160-9.
201. Herskovitz I, Tosti A. Female pattern hair loss. *Int J Endocrinol Metab* 2013; 11(4): 111-6.
202. Avis NE, Brockwell S, Randolph JF, et al. Longitudinal changes in sexual functioning as women transition through menopause: results from the Study of Women's Health Across the Nation. *Menopause* 2009; 16(3): 442-52.
203. Avis NE, Colvin A, Karlamangla AS, et al. Change in sexual functioning over the menopausal transition: results from the Study of Women's Health Across the Nation. *Menopause* 2017; 24(4): 379-90.

204. Nappi R, Palacios S, Panay N, Particco M, Krychman M. Vulvar and vaginal atrophy in four European countries: evidence from the European REVIVE Survey. *Climacteric* 2016; 19(2): 188-97.
205. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116(11): 1234-41.
206. Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967(1): 363-76.
207. El Khoudary SR, Shields KJ, Janssen I, et al. Cardiovascular fat, menopause, and sex hormones in women: the SWAN cardiovascular fat ancillary study. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(9): 3304-12.
208. Matthews KA, Crawford SL, Chae CU, et al. Are changes in cardiovascular disease risk factors in midlife women due to chronological aging or to the menopausal transition? *J Am Coll Cardiol* 2009; 54(25): 2366-73.
209. El Khoudary SR, Wang L, Brooks MM, et al. Increased HDL-C level over the menopausal transition is associated with greater atherosclerotic progression. *J Clin Lipidol* 2016; 10(4): 962-9.
210. Mendelsohn ME. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74(5): 337-43.
211. Taddei S. Blood pressure through aging and menopause. *Climacteric* 2009; 12(Suppl 1): 36-40.
212. Muka T, Oliver-Williams C, Kunutsor S, et al. Association of age at onset of menopause and time since onset of menopause with cardiovascular outcomes, intermediate vascular traits, and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Cardiol* 2016; 1(7): 767-76.
213. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367(9527): 2010-8.
214. Jergas M, Glüer CC, editors. Assessment of fracture risk by bone density measurements. *Semin Nucl Med* 1997; 27(3): 276-90.
215. von Wowern N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig* 2001; 5(2): 71-82.

216. Arslan AH. Postmenopozal osteoporozun mandibulaya etkilerinin dansitometrik açıdan incelenmesi ve osteoporozlu hastalarda implant uygulamaları. Marmara Univ Yay 2004.
217. Erdoğan F, Gür A. Normal ve osteoporotik kemiğin biyomekaniği. In: Göksoy T, ed. Osteoporozda Tanı ve Tedavi. 1st ed. Ankara: Akademi Yayıncılık; 2005: 33-43.
218. Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. Osteoporos Int 1992; 2(6): 285-9.
219. Tuzun S, Eskiuyurt N, Akarımak U, et al. Incidence of hip fracture and prevalence of osteoporosis in Turkey: the FRACTURK study. Osteoporos Int 2012; 23(3): 949-55.
220. El-Hajj Fuleihan G, Adib G, Nauroy L. The Middle East & Africa regional audit, epidemiology, costs & burden of osteoporosis in 2011. Int Osteoporos Found 2011: 59-62. Ş. Tüzün, Ü. Akarımak. Türkiye verileri: 59-62. www.iofbonehealth.org.
221. Arasil T. Osteoporoz epidemiyolojisi ve Türkiye verileri. Turkiye Klinikleri Phys Med Rehabil-Spec Top 2012; 5(3): 6-10.
222. Yavuz D, Akalın A, Alış M, et al. Osteoporoz ve Metabolik Kemik Hastalıkları Tanı ve Tedavi Kılavuzu. Turk Endokrinol Metab Derg 2017; 21(1): 1-15.
223. Ismail A, Silman A, Reeve J, Kaptoge S, O'Neill T. Rib fractures predict incident limb fractures: results from the European prospective osteoporosis study. Osteoporos Int 2006; 17(1): 41-5.
224. Üstündağ N, Korkmaz M, Öksüzkaya A, Balbaloğlu Ö, Eray İK. Osteoporozun sınıflandırılması, risk faktörlerinin belirlenmesi ve bir dakikalık osteoporoz risk testi. Eurasian J Fam Med 2013; 2(3): 107-14.
225. Marcus R, Feldman D, Dempster D, Luckey M, Cauley J. Osteoporosis. 4th ed. Academic Press; 2013.
226. Öğün H, Terlemez R. Sekonder osteoporoz ve ayırıcı tanı. Turkiye Klinikleri Phys Med Rehabil-Spec Top 2024; 17(3): 21-9.
227. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff M, et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. Osteoporos Int 2014; 25(10): 2359-81.

228. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2019; 30(1): 3-44.
229. Chesnut III CH, Bell NH, Clark GS, et al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: urinary N-telopeptide of type I collagen monitors therapeutic effect and predicts response of bone mineral density. *Am J Med* 1997; 102(1): 29-37.
230. Burch J, Rice S, Yang H, et al. Systematic review of the use of bone turnover markers for monitoring the response to osteoporosis treatment: the secondary prevention of fractures, and primary prevention of fractures in high-risk groups. *Health Technol Assess* 2014; 18(11): 1-180.
231. Vasikaran S, Cooper C, Eastell R, et al. International Osteoporosis Foundation and International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine position on bone marker standards in osteoporosis. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(8): 1271-4.
232. Vasikaran S, Eastell R, Bruyere O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int* 2011; 22(2): 391-420.
233. Risteli J, Elomaa I, Niemi S, Novamo A, Risteli L. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin Chem* 1993; 39(4): 635-40.
234. Biberoglu S. Primer osteoporozun tiplerinin klinik özellikleri, laboratuvar testleri, tanısal yaklaşım ve erkekte osteoporozun özellikleri. In: Göksoy T, ed. *Osteoporozda Tanı ve Tedavi*. 1st ed. Ankara: Akademi Yayıncılık; 1998: 47-76.
235. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2001; 313(1-2): 95-105.
236. Rosen CJ, Tenenhouse A. Biochemical markers of bone turnover: a look at laboratory tests that reflect bone status. *Postgrad Med* 1998; 104(4): 101-14.
237. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996; 11(3): 337-49.

238. Öntan MS, Mutlay F. Osteoporozun taranması ve tedavisi. *Turkiye Klinikleri Geriatr-Spec Top* 2023; 9(2): 61-7.
239. Camacho PM, Petak SM, Binkley N, et al. American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis—2020 update. *Endocr Pract* 2020; 26(Suppl 1): 1-46.
240. Sharpe M, Noble S, Spencer CM. Alendronate: an update of its use in osteoporosis. *Drugs* 2001; 61(7): 999-1039.
241. Sharpe M, Noble S, Spencer CM. Alendronate: an update of its use in osteoporosis. *Drugs* 2001; 61: 999-1039.
242. Deeks ED. Denosumab: a review in postmenopausal osteoporosis. *Drugs Aging* 2018; 35: 163-73.
243. Xie J, Guo J, Kanwal Z, et al. Calcitonin and bone physiology: in vitro, in vivo, and clinical investigations. *Int J Endocrinol* 2020; 2020(1): 3236828.
244. Seeman E. Raloxifene. *J Bone Miner Metab* 2001; 19: 65-75.
245. Yavropoulou MP, Makras P, Anastasilakis AD. Bazedoxifene for the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2019; 20(10): 1201-10.
246. Quattrocchi E, Kourlas H. Teriparatide: a review. *Clin Ther* 2004; 26(6): 841-54.
247. Stroup J, Kane MP, Abu-Baker AM. Teriparatide in the treatment of osteoporosis. *Am J Health Syst Pharm* 2008; 65(6): 532-9.
248. Leder BZ, Mitlak B, Hu M-y, Hattersley G, Bockman RS. Effect of abaloparatide vs alendronate on fracture risk reduction in postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105(3): 938-43.
249. Rachner TD, Hofbauer LC, Göbel A, Tsourdi E. Novel therapies in osteoporosis: PTH-related peptide analogs and inhibitors of sclerostin. *J Mol Endocrinol* 2019; 62(2): R145-R54.
250. Brent MB. Abaloparatide: a review of preclinical and clinical studies. *Eur J Pharmacol* 2021; 909: 174409.
251. Leder BZ, O'Dea LSL, Zanchetta JR, et al. Effects of abaloparatide, a human parathyroid hormone-related peptide analog, on bone mineral density in

- postmenopausal women with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(2): 697-706.
252. Aydın T. Osteoporozda medikal tedavi ve yeni seçenekler. *Klin Tıp Aile Hekim* 2019; 11(3): 108-13.
253. Hattersley G, Dean T, Corbin BA, Bahar H, Gardella TJ. Binding selectivity of abaloparatide for PTH-type-1-receptor conformations and effects on downstream signaling. *Endocrinology* 2016; 157(1): 141-9.
254. Bastepe M, Turan S, He Q. Heterotrimeric G proteins in the control of parathyroid hormone actions. *J Mol Endocrinol* 2017; 58(4): R203-R24.
255. Merlotti D, Falchetti A, Chiodini I, Gennari L. Efficacy and safety of abaloparatide for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2019; 20(7): 805-11.
256. Akel M, Parmar M. Abaloparatide. 2022.
257. Shirley M. Abaloparatide: first global approval. *Drugs* 2017; 77: 1363-8.
258. Wang MW, Yang Z, Chen X, et al. Activation of PTH1R alleviates epididymitis and orchitis through Gq and β -arrestin-1 pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021; 118(45): e2107363118.
259. Radius Pharmaceuticals. Tymlos prescribing information. 2025 Jan 20. <https://radiuspharm.com/wp-content/uploads/tymlos/tymlos-prescribing-information.pdf>
260. Jolette J, Attalla B, Varela A, et al. Comparing the incidence of bone tumors in rats chronically exposed to the selective PTH type 1 receptor agonist abaloparatide or PTH (1–34). *Regul Toxicol Pharmacol* 2017; 86: 356-65.
261. Arlt H, Mullarkey T, Hu D, et al. Effects of abaloparatide and teriparatide on bone resorption and bone formation in female mice. *Bone Rep* 2020; 13: 100291.
262. Jung IH, Lim HC, Lee EU, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Comparative analysis of carrier systems for delivering bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Implant Sci* 2015; 45(4): 136-44.
263. Araujo AS, Fernandes ABN, Maciel JVB, Netto JdNS, Bolognese AM. New methodology for evaluating osteoclastic activity induced by orthodontic load. *J Appl Oral Sci* 2015; 23: 19-25.

264. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092(1): 385-96.
265. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 2011; 124(7): 991-8.
266. Bonjour JP, Theintz G, Law F, Slosman D, Rizzoli R. Peak bone mass. *Osteoporos Int* 1994; 4: S7-S13.
267. Curtis EM, van der Velde R, Moon RJ, et al. Epidemiology of fractures in the United Kingdom 1988–2012: variation with age, sex, geography, ethnicity and socioeconomic status. *Bone* 2016; 87: 19-26.
268. Kanis J, Johnell O, Oden A, et al. Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporos Int* 2000; 11: 669-74.
269. Melton LJ III, Atkinson EJ, O'Connor MK, O'Fallon WM, Riggs BL. Bone density and fracture risk in men. *J Bone Miner Res* 1998; 13(12): 1915-23.
270. Melton LJ III, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL. Perspective how many women have osteoporosis? *J Bone Miner Res* 1992; 7(9): 1005-10.
271. Cosman F, Nieves JW, Dempster DW. Treatment sequence matters: anabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2017; 32(2): 198-202.
272. Inderjeeth CA, Inderjeeth DC. The use of anabolic agents in the treatment of osteoporosis: a clinical update. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2024; 10.1097.
273. Curtis EM, Reginster JY, Al-Daghri N, et al. Management of patients at very high risk of osteoporotic fractures through sequential treatments. *Aging Clin Exp Res* 2022; 34(4): 695-714.
274. Estell EG, Rosen CJ. Emerging insights into the comparative effectiveness of anabolic therapies for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17(1): 31-46.
275. Tai TW, Chen HY, Shih CA, et al. Asia-Pacific consensus on long-term and sequential therapy for osteoporosis. *Osteoporos Sarcopenia* 2024.
276. Miller P, Hattersley G, Lau E, et al. Bone mineral density response rates are greater in patients treated with abaloparatide compared with those treated with placebo or teriparatide: results from the ACTIVE phase 3 trial. *Bone* 2019; 120: 137-40.

277. Winzenrieth R, Ominsky M, Wang Y, Humbert L, Weiss R. Differential effects of abaloparatide and teriparatide on hip cortical volumetric BMD by DXA-based 3D modeling. *Osteoporos Int* 2021; 32: 575-83.
278. Winzenrieth R, Humbert L, Boxberger JI, Weiss RJ, Wang Y, Kostenuik P. Abaloparatide effects on cortical volumetric BMD and estimated strength indices of hip subregions by 3D-DXA in women with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Densitom* 2022; 25(3): 392-400.
279. Hong P, Liu R, Rai S, et al. Is abaloparatide more efficacious on increasing bone mineral density than teriparatide for women with postmenopausal osteoporosis? An updated meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2023; 18(1): 116.
280. Lanske B, Chandler H, Pierce A, et al. Abaloparatide, a PTH receptor agonist with homology to PTHrP, enhances callus bridging and biomechanical properties in rats with femoral fracture. *J Orthop Res* 2019; 37(4): 812-20.
281. Calciolari E, Donos N, Mardas N. Osteoporotic animal models of bone healing: advantages and pitfalls. *J Investig Surg* 2017; 30(5): 342-50.
282. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 2001; 28(1): 80-6.
283. Hao YJ, Zhang G, Wang YS, et al. Erratum to “Changes of microstructure and mineralized tissue in the middle and late phase of osteoporotic fracture healing in rats” [*Bone* 41 (2007) 631–638]. *Bone* 2008; 42(6): 1240.
284. Jahangiri L, Kim A, Nishimura I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. *J Prosthet Dent* 1997; 77(4): 435-43.
285. Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec* 2001; 262(2): 203-12.
286. Durão SF, Gomes PS, Silva-Marques JM, et al. Bone regeneration in osteoporotic conditions: healing of subcritical-size calvarial defects in the ovariectomized rat. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012; 27(6).
287. He YX, Zhang G, Pan XH, et al. Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: a drill-hole defect model. *Bone* 2011; 48(6): 1388-400.

288. Öberg S, Johansson C, Rosenquist J. Bone formation after implantation of autolysed antigen extracted allogeneic bone in ovariectomized rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32(6): 628-32.
289. Durão S, Gomes PS, Colaço B, et al. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. *Osteoporos Int* 2014; 25: 1535-45.
290. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Kostomitsopoulos N, Petrie A, Donos N. The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. *Clin Oral Implants Res* 2017; 28(9): e101-e10.
291. Bayar GR, Gunaydin Y, Ortakoglu K, Gunhan O, Aydintug YS, Sencimen M. Histomorphometric analysis of new bone obtained by osteogenic periosteal distraction in ovariectomized rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012; 113(4): 472-9.
292. Histing T, Garcia P, Holstein J, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011; 49(4): 591-9.
293. Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, et al. Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 1-12.
294. Prolo DJ, Gutierrez RV, DeVine JS, Oklund SA. Clinical utility of allogeneic skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery* 1984; 14(2): 183-6.
295. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25(8): 879-93.
296. Mardas N, Stavropoulos A, Karring T. Calvarial bone regeneration by a combination of natural anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix coupled with a synthetic cell-binding peptide (PepGen™): an experimental study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19(10): 1010-5.
297. Durmuşlar MC, Gülşen EA, Bayburt KA, et al. The effect of injectable platelet-rich fibrin in combination with autogenous bone grafts on bone healing in an ovariectomized osteoporotic rat model with critical-sized defects. *Saudi Med J* 2024; 45(8): 791.

298. Duman I, Tanrıverdi G, Öztürk Özener H. Effects of vitamin K2 administration on guided bone regeneration in diabetic rats. *J Periodontal Res* 2024.
299. Zhao N, Qin L, Liu Y, Zhai M, Li D. Improved new bone formation capacity of hyaluronic acid-bone substitute compound in rat calvarial critical size defect. *BMC Oral Health* 2024; 24(1): 994.
300. Baggio AMP, Bizelli VF, Delamura IF, et al. Systemic ozone therapy as an adjunctive treatment in guided bone regeneration: a histomorphometrical and immunohistochemical study in rats. *Clin Oral Investig* 2024; 28(10): 1-15.
301. Fekrazad S, Farzad-Mohajeri S, Mashhadiabbas F, Daghighi H, Arany PR, Fekrazad R. Bone regeneration of rat critical-sized calvarial defects by the combination of photobiomodulation and adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Lasers Med Sci* 2024; 15: e31.
302. Melo R, Martins A, Vieira G, et al. Selective inhibition of interleukin 6 receptor decreased inflammatory cytokines and increased proteases in an experimental model of critical calvarial defect. *Braz J Med Biol Res* 2024; 57: e13913.
303. Tanuma Y, Anada T, Honda Y, et al. Granule size–dependent bone regenerative capacity of octacalcium phosphate in collagen matrix. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(5-6): 546-57.
304. Gombotz WR, Pankey SC, Bouchard LS, Phan DH, Puolakkainen PA. Stimulation of bone healing by transforming growth factor-beta1 released from polymeric or ceramic implants. *J Appl Biomater* 1994; 5(2): 141-50.
305. Al Hezaimi K, Rotstein I, Katz J, Nevins M, Nevins M. Effect of selective serotonin reuptake inhibitor (Paroxetine) on newly formed bone volume: real-time in vivo micro–computed tomographic analysis. *J Endod* 2023; 49(11): 1495-500.
306. Al-Rasheed A, Al-Ahmari F, Ramalingam S, et al. Efficacy of mesenchymal stem cells as adjunct to guided bone regeneration in standardized calvarial defects in rats: an in vivo microcomputed tomographic and histologic analysis. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2016; 36.
307. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; 9(4): 310-6.

308. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with α -tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20(3): 280-7.
309. Sawyer A, Song S, Susanto E, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL–TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009; 30(13): 2479-88.
310. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg* 2010; 125(6): 1685-92.
311. Park JW, Jang JH, Bae SR, An CH, Suh JY. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res* 2009; 20(4): 372-8.
312. Lee YJ, Oh JH, Park S, et al. The application of L-serine-incorporated gelatin sponge into the calvarial defect of the ovariectomized rats. *Tissue Eng Regen Med* 2024: 1-14.
313. Einabadi M, Aghmiuni AI, Foroutani L, et al. Evaluation of the effect of co-transplantation of collagen-hydroxyapatite bio-scaffold containing nanolycopene and human endometrial mesenchymal stem cell-derived exosomes to regenerate bone in rat critical size calvarial defect. *Regen Ther* 2024; 26: 387-400.
314. Sun J, Chen X, Lin Y, Cai X. MicroRNA-29c-tetrahedral framework nucleic acids: towards osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and bone regeneration in critical-sized calvarial defects. *Cell Prolif* 2024; e13624.
315. Kulak CAM, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010; 54: 87-98.
316. Li X, Yao J, Wu L, et al. Osteogenic induction of adipose-derived stromal cells: not a requirement for bone formation in vivo. *Artif Organs* 2010; 34(1): 46-54.
317. Camilli AC, de Godoi MA, Costa VB, et al. Local application of a new chalconic derivative (Chalcone T4) reduces inflammation and oxidative stress in a periodontitis model in rats. *Antioxidants* 2024; 13(10): 1192.

318. Pryor ME, Susin C, Wikesjö UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodontol* 2006; 33(6): 455-60.
319. Lima CEVdC, Calixto JC, Anbinder AL. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res* 2011; 25: 42-8.
320. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol* 2005; 32(9): 966-72.
321. Pryor ME, Yang J, Polimeni G, et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. *J Periodontol* 2005; 76(8): 1287-92.
322. Whang K, Healy K, Elenz D, et al. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng* 1999; 5(1): 35-51.
323. Ma R, Wang M, Shi P, et al. Effect of lipoxin A4 on the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells under lipopolysaccharide-induced inflammatory conditions. *Eur J Oral Sci* 2023; 131(3): e12932.
324. El Kholy K, Freire M, Chen T, Van Dyke TE. Resolvin E1 promotes bone preservation under inflammatory conditions. *Front Immunol* 2018; 9: 1300.
325. Jiang X, Liu J, Li S, et al. The effect of resolvin D1 on bone regeneration in a rat calvarial defect model. *J Tissue Eng Regen Med* 2022; 16(11): 987-97.
326. Tatullo M, Marrelli M, Cassetta M, et al. Platelet rich fibrin (PRF) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. *Int J Med Sci* 2012; 9(10): 872.
327. Restoy-Lozano A, Dominguez-Mompell J, Infante-Cossio P, Lara-Chao J, Espin-Galvez F, Lopez-Pizarro V. Reconstruction of mandibular vertical defects for dental implants with autogenous bone block grafts using a tunnel approach: clinical study of 50 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44(11): 1416-22.
328. Block MS, Kent JN. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(11): 1281-6.

329. Oh KC, Cha JK, Kim CS, Choi SH, Chai JK, Jung UW. The influence of perforating the autogenous block bone and the recipient bed in dogs. Part I: a radiographic analysis. *Clin Oral Implants Res* 2011; 22(11): 1298-302.
330. Lucateli RL, Marciano MA, Ferreira S, Júnior IRG, Camilleri J, Mariano RC. Doxycycline and autogenous bone in repair of critical-size defects. *Implant Dent* 2018; 27(4): 461-6.
331. Raghoobar GM, Louwse C, Kalk WW, Vissink A. Morbidity of chin bone harvesting. *Clin Oral Implants Res* 2001; 12(5): 503-7.
332. Hernandez-Alfaro F, Garcia E, Corchero G, Arranz C. Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(5).
333. Sahbani K, Cardozo CP, Bauman WA, Tawfeek HA. Abaloparatide exhibits greater osteoanabolic response and higher cAMP stimulation and β -arrestin recruitment than teriparatide. *Physiol Rep* 2019; 7(19): e14225.
334. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol* 2012; 57(11): 1545-50.
335. Vasconcelos RC, Ferreira C, de Araújo EM, et al. Zirconia/hydroxyapatite (80/20) scaffold repair in critical size calvarial defect increased FGF-2, osteocalcin and OPG immunostaining and IL-10 levels. *Am J Transl Res* 2020; 12(6): 2439.
336. Le Henaff C, Ricarte F, Finnie B, et al. Abaloparatide at the same dose has the same effects on bone as PTH (1-34) in mice. *J Bone Miner Res* 2020; 35(4): 714-24.
337. Lowry J. Bone regeneration and repair: biology and clinical applications. The Royal College of Surgeons of England; 2006.
338. Aroni MAT, de Oliveira GJPL, Spolidório LC, et al. Loading deproteinized bovine bone with strontium enhances bone regeneration in rat calvarial critical size defects. *Clin Oral Investig* 2019; 23: 1605-14.
339. Çamili Y, Malkoç S, Taşlıdere A, Ileri Z, Guler OC. Effects of teriparatide on bone formation in rats with experimentally induced premaxillary expansion. *Dent Press J Orthod* 2022; 27: e2220370.

340. Canbeyli İD, Akgun RC, Sahin O, Terzi A, Tuncay İC. Platelet-rich plasma decreases fibroblastic activity and woven bone formation with no significant immunohistochemical effect on long-bone healing: an experimental animal study with radiological outcomes. *J Orthop Surg* 2018; 26(3): 2309499018802491.
341. Wang F, Tang L, Wang H, Zou J, Zhengxing Xie L. BMP signaling regulates osteoblast differentiation through Runx2 and Osterix proteins. *Arch Clin Psychiatry* 2023; 50(1).
342. Weng SJ, Xie ZJ, Wu ZY, et al. Effects of combined menaquinone-4 and PTH 1–34 treatment on osteogenesis and angiogenesis in calvarial defect in osteopenic rats. *Endocrine* 2019; 63: 376-84.
343. Li Y, Qian Y, Qiao H, Pan W, Xie L, Li Y. Abaloparatide outperforms teriparatide in protecting against alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol* 2023; 94(2): 244-55.
344. Ghiacci G, Graiani G, Ravanetti F, et al. “Over-inlay” block graft and differential morphometry: a novel block graft model to study bone regeneration and host-to-graft interfaces in rats. *J Periodontal Implant Sci* 2016; 46(4): 220-33.
345. Kaback LA, Soung DY, Naik A, et al. Teriparatide (1-34 human PTH) regulation of osterix during fracture repair. *J Cell Biochem* 2008; 105(1): 219-26.
346. Xu M, Li Y, Feng X, Zheng W, Zhao Z, Li Y. Parathyroid hormone promotes maxillary expansion and reduces relapse in the repeated activation maxillary expansion rat model by regulating Wnt/ β -catenin pathway. *Prog Orthod* 2022; 23: 1-12.
347. Kim HC, Song JM, Kim CJ, et al. Combined effect of bisphosphonate and recombinant human bone morphogenetic protein 2 on bone healing of rat calvarial defects. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2015; 37: 1-7.
348. Metsäranta M, Young MF, Sandberg M, Termine J, Vuorio E. Localization of osteonectin expression in human fetal skeletal tissues by in situ hybridization. *Calcif Tissue Int* 1989; 45: 146-52.

349. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26(1): 99-105.
350. Laçın N, İzol SB, İpek F, Tuncer MC. Ganoderma lucidum, a promising agent possessing antioxidant and anti-inflammatory effects for treating calvarial defects with graft application in rats. *Acta Cir Bras* 2019; 34: e201900904.
351. Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen J, Graninger W. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum* 2003; 48(9): 2501-8.
352. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 2006; 38(12): 1424-9.
353. Luu HH, Song WX, Luo X, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 2007; 25(5): 665-77.
354. Yu F, Zhang G, Weng J, et al. Repair of osteoporotic bone defects in rats via the Sirtuin 1-Wnt/ β -catenin signaling pathway by novel icariin/porous magnesium alloy scaffolds. *Biomater Res* 2024; 28: 0090.

EKLER

Ek 1. ETİK KURUL ONAY FORMU

Evrak Tarih ve Sayısı: 10.08.2023-E.402577



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-402577
Konu : Başvurunuz hk.

10.08.2023

Sayın Doç. Dr. Alper KIZILDAĞ

İlgi : 17/06/2023 tarihli dilekçeniz. *192.168.202.79*
35334
22.08.2023

"Abaloparatidin Post-Menopozal Sıçanların Kalvariyumlarında Oluşturulan Kritik Kemik Defektlerinde Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Etkisi" (PAUHDEK 2023-19) konulu çalışmanız 27.07.2023 tarih ve 2023/05 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 32 adet (Wistar Albino) dişi rat kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Habip ATALAY
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSUZDVK379 Pin Kodu :58652 Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/pau-ebys>
Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Kınıklı/Denizli
Telefon: 0 (025) 8 Faks: 0 (258) 296 17 65
e-Posta: hade@pau.edu.tr Elektronik Ağ: <http://www.pau.edu.tr>
Kep Adresi: paurektorluk@hs01.kep.tr

Bilgi için: Selda ERKİŞİ
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

1.TURAN ZEYNEP, LEKTEMÜR ALPAN AYSAN (2022). Periodontal Hastalıklar ve COVID-19 Arasındaki İlişki Mekanizmaları. INSAC New Trends in Health Sciences Chapter 35 (Kitap Bölümü). ISBN:978-625-430-540-5

2.TURAN ZEYNEP, TORUMTAY CİN GİZEM (2022). ORAL LİKEN PLANUS LEZYONUNA ENJEKTE EDİLEBİLEN TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN UYGULAMASI: OLGU RAPORU. İZDO 29. Bilimsel Kongre ve Sergisi (Poster)

3.ÖZDOĞAN ZEYNEP, KIZILDAG ALPER (2023) ESTETİK BÖLGEDEKİ TEK İMPLANTLARIN FASİYAL YÜZLERİNDE PERİ-İMLANT YUMUŞAK DOKU EKSİKLİKLERİNİN ETİYOLOJİ, SINIFLAMASI VE TEDAVİSİ. BİDGE yayınları Bölüm VI (Kitap Bölümü)

4. KIZILDAG ALPER, TORUMTAY CİN GİZEM, ÖZDOĞAN ZEYNEP (2024) DİŞ HEKİMLİĞİNDEKİ STAJYER ÖĞRENCİLERLE UZMANLIK ÖĞRENCİLERİ ARASINDAKİ PERİODONTAL FARKINDALIĞIN DEĞERLENDİRİLMESİ.MAKÜ 7. ULUSLARARASI SAĞLIK BİLİMLERİ VE YAŞAM KONGRESİ. (Sözlü Sunum)

5. ÖZDOĞAN ZEYNEP, CAN RAZİYE TUĞÇE, KIZILDAĞ ALPER (2024), GRAFEN VE DİŞ HEKİMLİĞİ, SAĞLIK&BİLİM 2024/ODONTOLOJİ-III, EFEAKADEMİ YAYINLARI (Kitap Bölümü), ISBN:978-625-392-294-8

6. NECATİ ZAVRAK, ZEYNEP ÖZDOĞAN, AYSAN LEKTEMÜR ALPAN, YAKUP GÜLNAHAR (2024), EVALUATION OF PATIENTS' KNOWLEDGE AND ATTITUDES TOWARDS DENTAL IMPLANT TREATMENT, AYDIN DENTAL JOURNAL (Özgün Makale), DOI:10.17932/IAU.DENTAL.2015.009/dental_v010i3004