

**KEMİK DEFEKTİ OLUŞTURULMUŞ OSTEOPOROTİK
RATLARDA BOR NİTRÜR VE/VEYA HİDROKSİAPATİT
BİLEŞİKLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Atilla TOPÇU

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Zekai HALICI**

Doktora Tezi-2015

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

**KEMİK DEFECTİ OLUŞTURULMUŞ OSTEOPOROTİK
RATLARDA BOR NİTRÜR VE/VEYA HİDROKSİAPATİT
BİLEŞİKLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Atilla TOPÇU

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zekai HALICI**

ERZURUM

2015

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**KEMİK DEFECTİ OLUŞTURULMUŞ OSTEOPOROTİK
RATLARDA BOR NİTRÜR VE/VEYA HİDROKSİAPATİT
BİLEŞİKLERİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Atilla TOPÇU

Tez Savunma Tarihi : 23.03.2015

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Zekai HALICI (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. İsmail MALKOÇ (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Selçuk İLHAN (Fırat Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Fatih İLKAYA (Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM

Enstitü Müdürü

Doktora Tezi

ERZURUM - 2015

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
TABLolar DİZİNİ	XVI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Dokusu	4
2.2. Kemik Hücreleri	5
2.3. Matriks	5
2.4. Kırık İyileşmesi.....	6
2.4.1. İnflamasyon Fazı.....	7
2.4.2. Tamir Fazı.....	7
2.4.3. Remodeling Fazı	7
2.5. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler	8
2.6. Osteoporoz	9
2.6.1. Osteoporozun Temel Fizyopatolojisi	10
2.6.2. Osteoporoz Tanısı	11
2.6.3. Osteoporotik Risk Faktörleri	12
2.6.4. Osteoporoz Tedavisi	13
2.7. Kemik Defektlerinde Graft Uygulamaları	15
2.8. Bor Mineralinin Genel Özellikleri ve Sağlık Alanda Minerallerin Kullanılması.....	19
2.8.1. Kemik Kırık ve Defektlerinde Kullanılan Metaller	20
2.8.2. Bor Minerali.....	23
2.8.3. Bor Mineralinin Kemik Doku Üzerine Etkisi	24
2.9. Kemik Defektinin İyileşmesini Etkileyen Hücrel Faktörler.....	25
2.9.1. TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü- α)	28

2.9.2. Osteopontin.....	29
2.9.3. BMP (Kemik Morfogenetik Peptid)	30
2.9.4. Runx2.....	30
2.9.5.Kollojen	31
2.9.6. TRAP (Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant).....	31
2.9.7. Kemik Alkalen Fosfataz	32
3. MATERYAL VE METOT.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.2. Deney Hayvanları	34
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
3.2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	36
3.3. Metot.....	37
3.3.1.Deney Planı.....	37
3.3.3. Bilateral Ovariectomi için Cerrahi Uygulama.....	38
3.3.4. Osteoporotik Ratlarda Kemik Defektinin Oluşturulması	39
3.3.5. Scaffold İmalatı.....	42
3.3.6. Sol-Jel Yöntemiyle HA Üretimi	42
3.3.6.1. HA Üretiminde Yapıya Yönelik Karakterizasyonu.....	43
3.3.7. Trikalsiyumfosfat (TcP)–Hekzagonal Bor Nitrür Kompozitlerinin Hazırlanması ..	46
3.3.8. Bor Nitrür ve Hidroksiapatit Emdirilmiş Scaffold Malzeme Karakterizasyonu	47
3.3.9. Radyolojik Çalışmalar	48
3.3.9.1. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Analizi	48
3.3.9.2. Dual Enerji X-ray Absorptiometre (DEXA) Analizi	48
3.3.10. Histopatolojik Analizler.....	49
3.3.10.1.Rutin Histolojik ve Hematoksilen Eozin Prosedürü:	49
3.3.10.2.Leica TP 1050 Cihazı Takip Basamakları:	49
3.3.11. Moleküler Çalışmalar	50
3.3.11.1. Gerçek Zamanlı PCR Analizi	50
3.3.11.2. RNA İzolasyonu	50
3.3.11.3.Reverse Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi	51
3.3.12. İstatistiksel Analiz.....	53
4. BULGULAR.....	54

4.1. Raman Spektroskopisi İle Yapısal Karakterizasyon Analizi	59
4.2. Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Morfolojik Karakterizasyon	65
4.2. Dual Enerji X-ray Absorptiometre (DEXA) Bulguları.....	75
4.3. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Bulguları.....	75
4.4. Histopatolojik Bulgular.....	82
4.5. Moleküler Bulgular.....	88
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	116
KAYNAKLAR	118
EKLER	160
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	160
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	161

TEŞEKKÜR

Doktora Eğitimim boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, beni ileriki meslek yaşantıma eksiksiz olarak hazırlamak için büyük uğraş veren, bilgi, deneyim ve enerjisi ile her zaman yanımda olan öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, danışmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Zekai HALICI'ya tez çalışmam boyunca sağladığı sonsuz destek için teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, Anabilim Dalı öğretim üyeleri kıymetli hocalarım Doç. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK'a, Doç. Dr. Elif ÇADIRCI ve Yrd. Doç. Dr. Erol AKPINAR'a tezimin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Beyzagül POLAT'a, Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ali AYDIN'a tez çalışmalarım esnasında aradığım her an yanımda olan hocalarım Doç. Dr. Emre KARAKUŞ'a, Doç. Dr. Yasin BAYIR ve beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, katkılarından dolayı Prof. Dr. Cemal GÜNDOĞDU'ya, Yrd. Doç. Dr. Arif Kürşat AYAN'a ve Yrd. Doç. Dr. Adem KARAMAN'a, Prof.Dr. Nuran AY, Dr. Feray BAKAN ve Selami DEMİRCİ'ye, bu çalışmayı **112M495** proje numarası ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a ve son olarak yaşamı boyunca her zaman yanımda olan rahmetli babaanneme, hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen kıymetli anneme, babama, eşime ve biricik kızıma çok teşekkür ederim.

Atilla TOPÇU

ÖZET

Kemik Defekti Oluşturulmuş Osteoporotik Ratlarda Bor Nitrür Ve/Veya Hidroksiapatit Bileşiklerinin Etkisinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmanın amacı farklı konsantrasyonlarda BN ve/veya hidroksiapatit içeren PLGA scaffoldlarının osteoporotik sıçanlardaki kemik defekti üzerinde etkilerini araştırmaktır.

Materyal ve Metot: Çalışma 10 dişi sıçan grubu üzerinde gerçekleştirildi. Bu gruplardan 9 tanesine osteoporoz indüklenmesi amacıyla ovariectomi yapıldı. Sağlıklı hayvanlar kontrol grubu olarak kullanıldı (Grup 1). Ovariectomi operasyonundan 12 hafta sonra tüm osteoporotik sıçan femurlarında standart-kritik derecede olmayan defekt (3 mm çapında) oluşturuldu. Farklı konsantrasyonlarda BN-HA içeren PLGA scaffoldlar defektli alana yerleştirildi ve cerrahi alan kapatıldı. Bir grupta defekt oluşturuldu ancak PLGA uygulaması yapılmadı (Grup 2). Operasyondan sonraki 1, 2 ve 4. haftalarda BT görüntüleri çekilen gruplardan doku örnekleri toplandı. PLGA scaffoldları hiç BN-HA içermeyen (Grup 3), %10 HA içeren (Grup 4), % 2.5 BN + % 10 HA, % 5 BN + % 10 HA veya % 10 BN + % 10 HA içeren (Grup 5, 6 ve 7), ve sadece % 2.5, % 5 veya % 10 BN içeren gruplar (Grup 8, 9, 10) olarak sınıflandırıldı.

Bulgular: Operasyondan sonraki 1. ve 2. haftalarda herhangi bir iyileşme izlenmedi. Ancak 4. haftada % 10 HA, % 2.5 BN + % 10 HA, % 2.5 BN ve % 5 BN içeren gruplarda ve özellikle % 2.5 BN + % 10 HA grubunda iyileşme bulguları mevcuttu. Real Time PCR analizlerinde osteopontin ve kemiğe spesifik alkalaen fosfataz gibi bazı kemik iyileşme parametreleri incelendi. BN içeren PLGA scaffoldları sadece PLGA gruplarında daha iyi bulgular verdi. Histopatolojik incelemeler de BT bulgularını ve Real Time PCR bulgularını destekler nitelikte idi.

Sonuç: Bu çalışma BN ve/veya HA içeren PLGA scaffoldlarının osteoporotik sıçanlarda kemik iyileşmesini artırdığını göstermiştir. Ayrıca çalışma osteoporotik kemik defektlerinin tedavisinde doktorlar ve mühendisler için BN'yi yeni bir hedef olarak ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bor Nitrür, Hidroksiapatit, Kemik Defekti, Osteoporoz, PLGA, Rat

ABSTRACT

Effects of Boron Nitride and/or Hydroxyapatite Compounds on Bone Defect in Osteoporotic Rats

Aim: This study investigated PLGA scaffolds including different concentrations of BN and/or HA on bone defect in osteoporotic rats.

Methods: This study performed in 10 female rats groups, nine of them underwent ovariectomy to induce osteoporosis. Healthy ones were control rats (Group 1). Twelve weeks after ovariectomy a standard non-critical size defect (3 mm diameter) induced in osteoporotic rats' femurs. PLGA scaffolds containing different concentrations of BN+HA located in defected area. In one group defect induced but no PLGA applied (Group 2). At the 1st, 2nd and 4th week after operation, CT images obtained and tissue samples collected. PLGA scaffolds classified as the ones with no BN + HA (Group 3), only 10 % HA (Group 4), with 2.5 % BN + 10 % HA, 5 % BN + 10 % HA or 10 % BN + 10 % HA (Groups 5, 6 and 7) and only 2.5 %, 5 % or 10 % BN (Groups 8, 9 and 10).

Results: In 1st and 2nd weeks after operation any healing could not recognized. At the 4th week healing observed in groups treated with PLGA scaffolds containing 10 % HA, 2.5 % BN + 10 % HA, 2.5 % BN and 5 % BN, especially in 2.5 % BN + 10 % HA. In Real Time PCR analyses osteopontin and bone specific alkaline phosphatase investigated. PLGA scaffolds containing BN exerted better results than only PLGA groups. In addition, histopathological analyses were supporting our CT and Real Time PCR results.

Conclusions: This study showed that PLGA scaffolds containing BN and/or HA significantly increased bone healing in osteoporotic rats. This study suggested BN as a new target for treating osteoporotic bone defects for medics and engineers.

Key words: bone defect, boron nitride, hydroxyapatite, osteoporosis, PLGA, rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BMD : Kemik Mineral Yoğunluğu (Bone Mineral Density)

BMP-2: Kemik Morfojenik Protein (Bone Morphogenetic Proteins)

BN : Bor Nitrür

cDNA :Komplementer Deoksiribonükleik Asit (Complementary Deoxyribonucleic Acid)

BT : Bilgisayarlı Tomografi

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

DPA : Çift Foton Absorpsiyometri (Dual Photon Absorptiometry)

DXA : Dual Enerji X-Ray Absorptiometre (Dual-Energy X-Ray Absorptiometry)

FBS : Fetal Sığır Serumı (Fetal Bovine Serum)

FDA : Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)

HE : Hematoxylin and Eosin Boyama

HA : Hidroksiapatit

Hap : Hidroksiapatit

IFN : Interferon

IGF : İnsülin benzeri büyüme faktör

IL : İnterlökin

OC : Osteocalcin

OP DEF: Osteoporosis Defekt

OP : Osteopontin

PBS : Fosfat Tamponu (Phosphate buffered saline)

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PDGF : Trombosit türevli büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor)

PLGA : poly(lactic-co-glycolic) acid

PQCT : Periferal QCT

PTH : Teraparatid

QCT : Kantitatif Bilgisayarlı Tomografi (Quantitative Computed Tomography)

QUS : Kantitatif Ultrason (Quantitative Ultrasound)

RANKL: Nükleer Faktör kappa B ligandının reseptör aktivatörü (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)

RNA : Ribonükleik asit (Ribonucleic acid)

SERM: Selektif Östrojen Reseptör Modülatörü

SR : Stronsiyum Ranelat

SPA : Tekli foton absorpsiyometrisi (Single Photon Absorptiometry)

SXA : Tek Enerji X-Ray Absorptiometre (Single-Energy X-Ray Absorptiometry)

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor)

Th : T yardımcı hücreler (T helper cells)

TNF : Tümör Nekroz Faktörü (Tumor necrosis factors)

TRAP : Tartarat Dirençli Asit Fosfataz (Tartarate Resistant Acid Phosphatase)

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

WHO : Dünya Sağlık Örgütü (The World Health Organization)

β -ME : β -merkaptöetanol (β -mercaptoethanol)

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Kırık İyileşme Dönemleri	6
Şekil 2.2.	Normal kemik ve osteoporotik kemik mikroskopik yapıları	10
Şekil 2.3.	Metalik aygıtların ve metalik biyomalzemelerin insan vücudundaki kullanım yerleri	23
Şekil 3.1.	Bilateral Ovariectomi için Cerrahi Uygulama	39
Şekil 3.2.	Osteoporotik Ratlarda Kemik Defektinin Oluşturulması	41
Şekil 3.3.	BN/HA emdirilmiş PLGA scaffoldların hazırlanması	42
Şekil 3.4.	48 saat yaşlandırma süresi sonucu üretilen 750°C’de sinterlenmiş numunenin XRD spektrumu	45
Şekil 3.5.	Thermal cyclers koşulları	52
Şekil 3.6.	Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon ısı ve süreleri	53
Şekil 4.1.	Sentezlenen HAp numunesine ait FTIR spektrumu	54
Şekil 4.2.	HAp örneğine ait raman spektrumu	56
Şekil 4.3.	Sinterleme öncesi ve sonrası HAp örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	57
Şekil 4.4.	Üretilen HAp numunesine ait EDS spektrumu	57
Şekil 4.5.	Üretilen HAp’nin TEM görüntüsü	59
Şekil 4.6.	PLGA örneğine ait Raman spektrumu	59
Şekil 4.7.	%10 HAp içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu	60
Şekil 4.8.	%10 HAp ve %2.5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu	61
Şekil 4.9.	%10 HAp ve %5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu	61
Şekil 4.10.	%10 HAp ve %10 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu	62
Şekil 4.11.	%2.5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu	63
Şekil 4.12.	%5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu	63

Şekil 4.13.	%10 BN içeren PLGA numunelerine ait Raman spektrumları	64
Şekil 4.14.	Katkısız PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	65
Şekil 4.15.	Katkısız PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	66
Şekil 4.16.	%10 HAp içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	67
Şekil 4.17.	%10 HAp ve %2.5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	68
Şekil 4.18.	%10 HAp ve %5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	69
Şekil 4.19.	%10 HAp ve %10 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	70
Şekil 4.20.	Farklı oranlarda BN içeren %10 HAp-PLGA örneklerine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	71
Şekil 4.21.	%2.5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	71
Şekil 4.22.	HAp içeren ve içermeyen %2.5 BN- PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	72
Şekil 4.23.	%5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	72
Şekil 4.24.	HAp içeren ve içermeyen %5 BN- PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	73
Şekil 4.25.	%10 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü	73
Şekil 4.26.	HAp içeren ve içermeyen %10 BN- PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	74
Şekil 4.27.	Farklı oranlarda BN içeren PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri	74
Şekil 4.28.	Kontrol, defekt ve deney gruplarında 4. hafta BMD düzeyleri	75
Şekil 4.29.	Grupların 1. Hafta BT görüntüleri	76
Şekil 4.30.	Grupların 2. Hafta BT görüntüleri	77
Şekil 4.31.	Grupların 4. Hafta BT görüntüleri	78
Şekil 4.32.	Grupların 1. Hafta BT defekt çap ölçümleri	79
Şekil 4.33.	Grupların 2. Hafta BT defekt çap ölçümleri	79
Şekil 4.34.	Grupların 4. Hafta BT defekt çap ölçümleri	80
Şekil 4.35.	Grupların 4. Hafta BT defekt Hounsfield units (HU) ölçümleri	81

Şekil 4.36.	Defekt grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	82
Şekil 4.37.	PLGA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	82
Şekil 4.38.	Defekt + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	83
Şekil 4.39.	Defekt + %2,5 BN + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	83
Şekil 4.40.	Defekt + %5 BN + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	83
Şekil 4.41.	Defekt + %10 BN + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	84
Şekil 4.42.	Defekt + %2,5 BN grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görü	84
Şekil 4.43.	Defekt + %5 BN grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	84
Şekil 4.44.	Defekt + %10 BN grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri	85
Şekil 4.45.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Yabancı Cisim Bulguları	85
Şekil 4.46.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Primer Kemik Oluşum Bulguları	86
Şekil 4.47.	Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Fibrosis Bulguları	87
Şekil 4.48.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta TNF- α mRNA ekspresyonları	88
Şekil 4.49.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Osteopontin mRNA ekspresyonları	90
Şekil 4.50.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta BMP-2 mRNA ekspresyonları	91
Şekil 4.51.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta RUNX-2 mRNA ekspresyonları	92
Şekil 4.52.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta TRAP mRNA ekspresyonları	93
Şekil 4.53.	Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta ALP mRNA ekspresyonları	94

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1.	Deney Planı	38
Tablo 3.2.	Hidroksiapatit üretiminde incelenen deneysel parametreler	43
Tablo 3.3.	Sentezlenen HAp'ye ait kafes parametreleri ve kristal çapları	45
Tablo 3.4.	cDNA sentezi için kullanılan mix içeriği	51
Tablo 3.5.	Rölatif Gen Ekspresyonu Primer/Prob Dizilimleri	52
Tablo 4.1.	HAp örneğine ait elementel analiz verileri	58

1. GİRİŞ

Kemik çeşitli kısımlardan oluşan ve çok iyi organize olmuş kalsifiye bir destek dokudur. Destek doku olması gereği; kemiğin mekanik, koruma ve metabolik olmak üzere üç (3) temel görevi vardır.

Çağımızda ortopedik patolojiler içerisinde yer alan kemik mineral dokusunda meydana gelen azalma ve buna bağlı olarak kemik kütlesinin azalması sonucunda kemik kırılabilirliği artmaktadır. Bunun sonucunda oluşan osteoporoz, hayat kalitesine etki eden bir kemik hastalığıdır. Bilindiği üzere kemik oldukça sert bir yapıya sahip olmakla beraber oldukça da aktif bir dokudur. Osteoporoz oluşumu ve onun tedavisi kemiğin, birçok hormonal, biyokimyasal ve hücrel etkinliği gibi çeşitli biyofaktörlere bağlıdır.¹

Osteoporoz tedavisinde ilk amaç azalan kemik mineralizasyonunu yeniden kazanmaktır. Bu amaçla osteoporozun tedavisinde birçok farmasötik aktif madde geliştirilmektedir. Bu farmakolojik ajanlar içerisinde başlıcaları kalsiyum, D vitamini, selektif östrojen reseptör modölatörleri (SERM), bifosfonatlar, stronsiyum ranelat (SR), paratiroid hormon, kalsitonin sayılabilir.² Osteoporoz tedavisinde en yaygın olarak kullanılanı ise osteoklast aktivitesini engelleyen bisfosfanatlardır.³

Bilindiği üzere osteoporozun en önemli klinik özelliği kemik mineralizasyonunun azalması ve buna bağlı gelişen kemiklerde kırık ve defektlerin meydana gelmesidir. Geleneksel farmakolojik ajanlar dışında, oluşan kemik defektlerinin yeni tedavileri arasında özel greftlerin yerleştirilmesi giderek önem arz etmektedir.

Araştırmalar; en ideal biyomateryal seçimi yapılırken, oluşabilecek komplikasyonları minimuma indirmeyi amaçlar. Ortopedik biyomateryallere bağlı komplikasyonların oluşumunda konağın durumu ve lokal dokuların durumunun yanı

sıra biyomateryallerin mekanik ve biyolojik özellikleri, uygulama şekli ve tekniği de çok önemlidir.

Doku mühendisliği alanında kemiğin yeniden rejenerasyonu için kullanılan biyoaktif camlar ile yapılan son çalışmalar arasında bor mineralinin kullanılmasının kemik gelişimini desteklediği tesbit edilmiş ve borun kemik oluşumu için faydalı olduğu yönünde destekleyici kanıtlar ortaya çıkmıştır.⁴⁻⁸ Yapılan çalışmalarda bor elementinin kemik sağlığında oldukça önemli olduğu gösterilmiştir.⁹ Aynı zamanda yapılan başka bir çalışmada ise karboronun osteoporoz tedavisinde önemli olabileceği gösterilmiştir.¹⁰ Literatüre baktığımızda bu çalışmalardan ayrı olarak bor ve türevlerinin osteoporozu önlemede ve kemik sağlığında olan rollerini gösteren çalışmaları genişletmemizin mümkün olduğunu görmekteyiz.

Günümüzde artan iş temposu ve trafik kazaları sonucunda; kemik kırıklarıyla daha sık karşılaşabilmekte aynı zamanda beklenen yaşam sürelerinin artması ile osteoporaza bağlı kemik kırıkları da artmaktadır. Rutinde kemik iyileşmesini hızlandırmak için uygulanan ve böylece hastaneye yatış süresini kısaltan birçok cerrahi yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemleri, kısaca sıralayacak olursak; başlıca çeşitli plaklar ve vidalama yöntemleri ile intramedüller çivileme yöntemi bu cerrahi girişimler arasında yer almaktadır. Ortopedide en fazla kullanılan malzemeler (çoğunluğu metalik implantlar) mekanik dayanıklılıkları nedeniyle tercih edilmektedir.

Doku mühendisliği ile geliştirilen bor taşıyıcılı greftlerin kemik defektinin gelişmesine katkı sağladığı, borun bu ilişkiden dolayı osteoindüktif ve osteokondüktif bir potansiyele sahip olduğu ve de klinik bakımından da uygulanabilir.⁵ olduğunu gösteren çalışmalar bu alana olan ilgimizi arttırmıştır. Osteoporozu ve ona bağlı gelişebilecek kemik kırıklarını bir arada düşündüğümüzde aynı anda iki patolojiyi

düzeltilmede özellikle osteoporotik kırıkların iyileşmesini hızlandırmada bor elementin önemli olabileceğini görmekteyiz.

Çalışmamızın amacı deneysel olarak ratlarda oluşturulan osteoporozis zemininde femur kemik defektinde scaffoldta farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış bor nitrür ve/veya hidroksiapatit bileşiklerinin etkisinin araştırılması ve böylelikle osteoporozun ve osteoporoza bağlı oluşan kemik defektlerinin tedavisinde bor nitrürün etkilerinin incelemesi ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik doku; temelde kas yapılarını desteklemekle beraber merkezi sinir sistemi ve organların etrafını sararak koruma görevi üstlenmektedir. Bununla birlikte başta kalsiyum, fosfat gibi iyonların deposu olarak da görev almaktadır.¹¹ Ayrıca hematolojik ve endokrinolojik gibi birçok metabolik özelliği olan aktif bir dokudur.¹²

Kemik doku; organik ve inorganik olmak üzere iki farklı özellikteki yapıdan oluşmaktadır. Kemiğin organik kısımlarından başka inorganik kısımlarını oluşturan matriks yapı bileşenleri kemiğe yapısal katkılar sağlamaktadır.¹³

Kemik, korteks alanı olarak isimlendirilen yoğun kemik iliği ile çevrili kısımdan ve trabeküler bölge olarak isimlendirilen, ağımsı bir yapı ile çevrili oluşumlardan meydana gelir. Korteksin dış yüzeyini periosteum iç yüzeyini ise endosteum olarak isimlendirilen zarlar ile çevrilidir.

Periosteum fibröz bir dokudur ve osteoblast, osteoklast, sinir lifleri ve kan damarlarını içerir. Bu yapılar kemiğin beslenmesini sağlar ve en önemlisi kemik kırıklarının yeniden tamirine olanak sağlamaktadırlar. Endosteum ise korteksin iç yüzeyini kaplayan tek tabakalı bir hücre diziliminden meydana gelmiş ve kan damarlarını ihtiva eden membranöz bir tabakadır. Kemiğin trabeküler alanı ağımsı bir yapıya sahiptir ve endosteum ile beslenir. Yenidoğan ve kırık iyileşmelerinde gerçekleşen remodellingde önemli rol oynarlar.¹⁴

Yetişkin iskelet sistemi olgunlaştıktan sonra remodeling olarak isimlendirilen kemiğin yeniden şekillendirilmesi sürecinde hücresel yapılar görev almaktadır.¹⁵ Bu hücresel faaliyetler, kemik oluşumu ve bozulması arasında ince ayarlı bir dengeye dayalı bir süreçtir. Bu süreç başlıca osteoblast ve osteoklast olarak isimlendirilen fonksiyonel olarak birbirlerine zıt iki hücre grubu tarafından gerçekleştirilmektedir.¹⁶

2.2. Kemik Hücreleri

Osteoblastlar; mezenşimal kök hücrelerden köken alırlar ve kemik matriksinin oluşumu ve kemiğin mineralizasyonundan sorumludurlar.¹⁴ Kemikte bulunan hücrelerin % 4-6'sını oluşturmaktadır.¹⁷ Osteoblastlar, kemik oluşumunun yanında sitokinlerin salgılanmasını ve hücreye doğrudan temas ile osteoklastların farklılaşmasını düzenleyen hücrelerdir.¹⁸. Osteoblastlardan sentezlenen IGF-I (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1), kemik dokusunda potansiyel bir kemokin olup osteoblastların kemik dokuyu oluşturmaları sırasında önemli bir rol oynamaktadır.¹⁹ Kemik rezorbsiyonunda osteoblastlar, osteoklastlar ile birlikte görev almaktadır.¹⁸

Osteoklastlar; hematopoietik türevli hücreler olup monosit ve makrofaj türü hücreler ile bağlantılıdır.²⁰ Kemik rezorbe etme kabiliyetine sahip bu hücre tipi, kemiklerden mineral çözünmesini kolaylaştırır.²¹

Osteositler; destek yapı ve kemik metabolizması içinde osteoblastları farklılaşmış şekilde temsil ederler.¹⁴ Osteositler kendilerinden çıkan sitoplazmik bir ağ ile hem diğer osteositler ile hemde kemik yüzeyini döşeyen hücreler ile bağlantılı haldedirler.^{22, 23} Osteositler östrojen eksikliği ve glukokortikoid tedavisi sırasında zarar görmekte ve kemik yapısını bozmaktadır.^{24, 25}

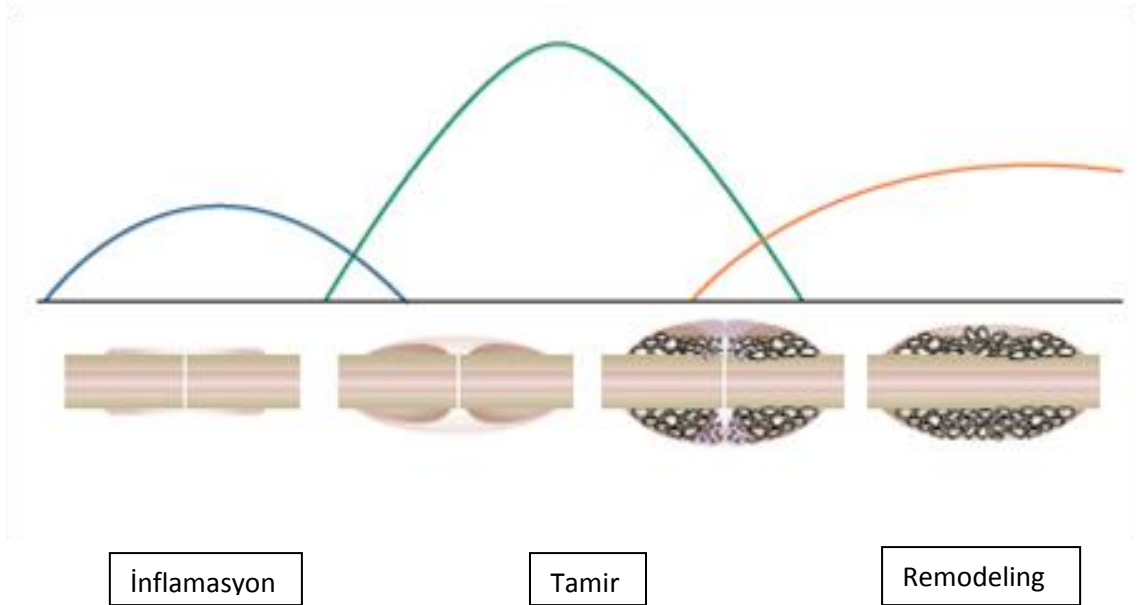
2.3. Matriks

Kemik, hücresel yapıların yanında hücresel olmayan organik ve inorganik komponentlerden de oluşmaktadır. Kemik matriksinin % 69'unu oluşturan inorganik kısım ki; bunun % 99'u hidroksiapatittir. Organik kısım ise kemik matriksinin % 22'sini meydana getirmekle beraber % 90 gibi büyük bir kısmı kollejen molekülünden oluşmaktadır. Bunun dışında kollejen olmayan proteoglikan, sialoprotein ve glikoproteinlerden oluşmaktadır.¹⁴

2.4. Kırık İyileşmesi

Kemik kırıkları, düşme, trafik ve spor kazaları ve benzeri durumlarda çok yaygın karşılaşılabilecek çok önemli ortopedik vakalardır.²⁶

Kemik kırıklarının iyileşmesi, yeni kemik dokunun tekrar eski halini alması, birbirini içerisine geçmiş birçok karmaşık fizyopatolojik olaylar zincirinin tamamlanmasıyla gerçekleşir. İyileşmede kemik medullası ile birlikte yumuşak doku çevresinde periosteumu da kapsayan kompleks ve karışık işlemler önemli rol oynar.²⁷⁻²⁹ Sözü edilen bu fazlar; inflamasyon fazı, tamir fazı ve remodeling fazlarıdır.²⁹⁻³²



Şekil 2.1: Kırık iyileşme Dönemleri: Sırası ile İnflamasyon, Tamir ve Remodeling.³²

İnflamasyon fazı kemik kırığı oluşumundan kısa bir süre sonra ortaya çıkar ve bir hafta süre ile devam eder. İnflamasyon sonucunda kırık bölgede granülasyon dokusu ortaya çıkar. Tamir fazı ise reaktif dönem olan inflamasyondan hemen sonra başlar ve kallusun oluşumu ile ilişkilidir. Kırık iyileşmesinin son safhası ise iki ayda gelişen yeniden şekillenme (remodeling) aşamasıdır.²⁶

2.4.1. İnflamasyon Fazı

Kemiğin kırılması ile kemik içinde ve damarlarda kopmalar olmakla beraber yumuşak dokuda da hasar oluşur. Bu hasar sonucunda inflamatuvar kaskad devreye girer.³³ Kırığı çevreleyen yumuşak dokuda vazodilatasyon sonucu akut inflamasyonla beraber lökosit ve plazmadan oluşan eksüda belirir.^{34, 35} Kırık kemiklerin uç bölgesinde travmanın derecesine göre kırık boşluğunda fibrinojen fibrine dönüşerek hematoma formasyonunu geliştirir. Bu hematoma hipoksi ve düşük pH ile karakterizedir ve anjiyogenezin de meydana gelişi kırık noktasındaki kalıntıların temizlenmesi için hücre ve mediatörlerin ortamda toplanmasını sağlamaktadır.³² Endotel hücreleri, önceden mevcut olan periost damarları ile kırık kemik ucuna göç eder ve hematoma içerisinde yeni kan damarlarını oluştururlar.³⁶ Bu inflamasyon reaksiyonları çeşitli moleküler faktörleri ve yerleşik doku ve hücrelerini uyarak onarım akışını başlatır.³⁷⁻³⁹

2.4.2. Tamir Fazı

Tamir fazı, kırık iyileşme bölgesinde kırığın anatomik konumuna ve mekanik koşullara bağlıdır.³² Bu faz kırık iyileşmesinde en önemli kısım olup, kırık oluşumu sırasında etkisi başlar ancak asıl etkisi daha sonraki günlerde ortaya çıkar. Burada onarımda rol oynayan en önemli hücreler mezenşimal kökenli hücrelerdir. İlk farklılaşan hücre fibroblast hücreler olup, bunu sonra kondroblastik hücreler ve osteoblastlar hücreleri takip eder. Sırası ile fibroblastlar kollejen, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlarlar.⁴⁰

2.4.3. Remodeling Fazı

Kırık boşluğu yeni kemik yapıları ile doldurulduktan sonra primer kemik iyileşmesi benzeri osteon oluşumu başlar ve lamelli kemik tamir edilir.³² IL-1, TNF gibi bazı sitokinler ve BMP-2 seviyeleri hala yüksek olmakla beraber birçok sitokin miktarı

azalmaya başlar.^{28, 37} Hipervaskülarizasyon azalarak kırılma öncesi seviyelerine geri gelir.⁴¹ Nihai olarak kemik yeniden eski halini alır.

2.5. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik iyileşmesinin de; kemik minerilizasyon homeostazı, kemik remodelizasyon ve kemik matriksini meydana getiren yapılar etkili olmaktadır. Kemiklerde osteoidler kemiğin optimum olarak dayanıklılığını sağlamakla beraber diğer yandan kalsiyum ve fosfat metabolizmaları da kemik homeostazında önemli görevler üstlenmektedir.⁴²

Kemik mineralizasyonunda D vitamini seviyesinin olağandan düşük ve yetersiz oluşu kalsiyum absorpsiyonunu azaltmaktadır. Bu sebeple kemiklerde osteoid matriks minerilizasyonu da azalmaktadır. Bununla birlikte paratiroid hormonunun fazla sentezlenmesi, hipogonadizm ve hipertiroidizm gibi durumlarda kemik mineral homeostazını etkilemektedir.⁴³⁻⁴⁷

Kollajenik kemik matriksi kemik iyileşmesini etkileyen faktörlerden biridir ve kollejen tip I kemik matriksinin %90-95'ini oluşturur. Kollejen tip I kemikte yapısal olarak kemik bütünlüğünü sağlar ve birçok nedenden oluşabilecek olan gerilim kuvvetine karşı kemiği korur. Kollajen üretimi kırık iyileşmesini etkilemekle beraber kemik kırılmasını da etkilemektedir. Kollajen üretimi, genetik mutasyonlar ve marfan sendromu gibi elastin üretiminin olmadığı durumlarda azalmakta ve kemik gelişimi doğrudan etkilenmektedir.⁴²

Osteoporoz kemik kırılmalarının en önemli sebeplerinden bir tanesidir. Erkek ve kadınlarda kemik kırığının % 20'si osteoporozun neden olduğu mineral kayıplarından oluşmaktadır.⁴³ Bu koşullar altında kırılma yapının uygun bir tedavi ile ortadan

kaldırılması hem osteoporoz hemde kemik kırıklarının tedavisinde önemini bir kat daha arttırmaktadır.

2.6. Osteoporoz

Osteoporoz gözenekli kemik anlamına gelen (porous bone) kemik mineral yoğunluğunun azalması ile karakterize bir kemik hastalığıdır.⁴⁸ Dünya genelinde osteoporoz kırıkları büyük morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir.⁴⁹ Özellikle postmenapozal kadınlarda etkilerini gösteren ve de dünya genelinde sık rastlanan bir halk sağlığı sorunudur. Dünya çapında gözlenen osteoporozun en dramatik sonuçlarından biri kemik kırıklarıdır. Üç kadından biri ve elli yaş üstü beş erkekten birinin osteoporotik kırıktan yakındıkları tesbit edilmiştir. Avrupa'da tahmini olarak yirmi iki milyon kadın ve beş buçuk milyon erkek osteoporozlu birey olduğu var sayılmaktadır. Osteoporoz kırıklarında başta kalça kırıkları olmak üzere sırası ile omurga, ön kol, pelvis, kaburga ve femur kırıkları oldukça fazla karşılaşılan ortopedik patolojilerdir.⁴⁸

Osteoporoz uzun zaman süren, aşamalı ve ağrısız bir şekilde gelişen, genellikle belirti göstermeden seyredebilen önemli bir halk sağlık sorunudur.

Osteoporoz gelişmesi birçok faktöre bağlı olabilir. Bu faktörleri sabit ve değişken faktörler olmak üzere iki ana gruba ayırabiliriz. Değişmeyen faktörler; yaş, cinsiyet, ailede osteoporoz öyküsü, önceki kırık geçmişi, menapoz veya histerektomi, uzun dönem glukokortikoid tedavisi, diğer romatizmal hastalıkların varlığı ve erkek bireylerde hipogonadizmdir.⁵⁰⁻⁵³

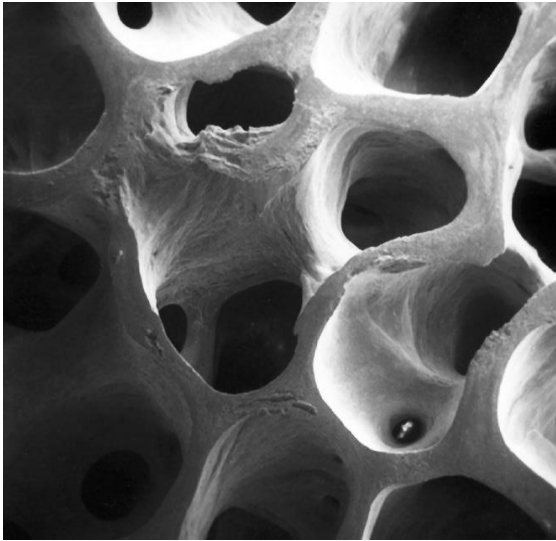
Değişken faktörler arasında ise alkol ve sigara kullanımı, düşük vücut kütle endeksi, zayıf, yetersiz beslenme ve buna bağlı olabilecek D vitamin yetersizliği, yine kalsiyum alımında yetersizlik, hareketsiz bir yaşam tarzı ve sık düşme yer almaktadır.^{54, 55}

Osteoporoz riskini azaltmak için ilk strateji eğitim yolu ile kemik sağlığının geliştirilmesi olmalıdır.⁵⁶ Belirlenmiş genetik faktörler dışında bireyin diyet, hareketli bir yaşam tarzı osteoporoz oluşum riskini azaltmaktadır.

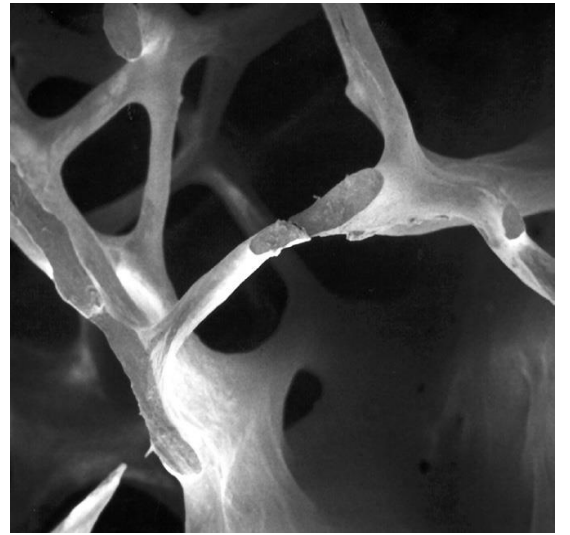
2.6.1. Osteoporozun Temel Fizyopatolojisi

Yetişkin bireylerde kemik kütle miktarları ve buna bağlı olarak kemiğin mineral kayıp miktarları hemen hemen birbirleri ile benzer olmaktadır. Bu yapılar başta genetik faktörler ile belirlenirken bunun yanında beslenme, hareketli bir yaşama tarzı, hormonal durum ve genel sağlık durumu gibi faktörler bireyin kemik yapısına etkilidir.⁵⁷

Normal şartlar altında kemik doku devamlı kendini yenilerken bu dengenin osteoporoz ile bozulması ile kemik kayıpları oluşmaya başlar. Bu durum ilerleyen yaş ve kadınlarda menapoz ile artarak devam eder. Bu durum iskelet sisteminde düzensiz bir kemik yapısının oluşmasına ve buna bağlı olarak kırılma risklerinin artmasında önemli rol oynar.⁵⁸



Normal Kemik Yapısı



Osteoporotik Kemik Yapısı

şekil 2.2. Normal kemik ve osteoporotik kemik mikroskobik yapıları.⁵⁹

2.6.2. Osteoporoz Tanısı

Osteoporoz oluşma riski altmış yaş üzeri erkek ve bayanlarda oldukça fazladır. Bununla beraber genç kimselerde de kemik kütle endeksinin düşük olması ve kemik ile ilgili diğerk patolojik durumlarda osteoporoz riskini oldukça arttırmaktadır.

Osteoporozun gelişimi çoğuz zaman fark edilemezken bu patolojinin belirlenmesinde birçok görüntüleme tanı tekniğeri ve biyokimyasal laboratuvar testleri kullanılmaktadır. En başta bireyin duruş şeklinin değışmesi ve boy kısalığının belirlenmesi gibi fiziksel muayenelerin yapılması osteoporoz değeriendirilmesi için esas olabilmektedir. Bununla birlikte osteoporozun ikincil nedenleri laboratuvar testleri ile belirlenebilir. Kırık riskinin belirlenmesi, önlenmesi ve osteoporozun tanısında en yaygın kullanılan tanı yöntemi BMD (Bone Mineral Density) ölçümleridir.⁶⁰

Bir çok çeşidi olan BMD testinin en yaygın olarak kullanılanı DXA (dual-energy X-ray absorptiometry) dır. DXA az miktardaki kemik kayıplarını tesbit edebilen ve düşük radyasyon yayan bir x ışınıdır. Başta omurga ve kalça kemiklerinin yoğunluğunu ölçebildiğeri gibi tüm iskelet yapısının kemik yoğunluğunu da belirleyebilmektedir.⁶¹

DXA'nın birçok çeşidi bulunmaktadır.

Bunlar; DXA (periferik DXA) önkol, parmak ve topuk kemik kütlesini, SXA (tek-enerji X-ışını soğurma) topuk ya da bileğeri, DPA (dual foton absorpsiyometre) omurga, kalça ya da toplam vücudu, PQBT (periferik QCT) önkol ölçümü yapar ve KUS (Sayısal Ultrason) topuk veya parmak için ses dalgalarını kullanarak ölçümü gerçekleştirir.

Dünya sağık örgütü osteoporozun belirlenmesinde t-skoru olarak adlandırılan bir dizi tanımlamıştır. T skoru genç yetişkin kimselerin ortalama kemik yoğunluğuz alınarak standartlaşmıştır.⁶²

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) t-skoru için dört temel tanı kategorisi saptamıştır.⁶³ Bunlar;

Normal: 0-0.99

Osteopeni: -1- (-2.49)

Osteoporoz: < -2.5

Şiddetli osteoporoz: < -2.5 kırık ile.

Uluslararası Osteoporoz Federasyonu -1.5 veya daha altındaki t- skorunu osteoporoz risk faktörü olarak belirlemiştir.⁴⁸

Ayrıca kemik gelişimi ve yeniden şekillenmesi kan serumunda veya idrarda bazı belirteçler ile de tesbit edilebilir. Bunların başlıcaları kan serumunda kemik spesifik alkalen fosfataz, osteokalsin; idrarda ise piridinolin, deoksipiridinolindir. Yine serum ve idrarda tesbit edilen yüksek seviyede kollojen Tip 1 ve N telopeptidler osteoporozun biyokimyasal birer belirteci olabilmektedir. Ancak bu belirteçlerdeki değişiklikler tamamen kemik kırık riskini ve kemik mineral kayıplarını tam olarak göstermeyebilir .^{25, 64} Bazı özel şartlarda kemik biyopsisi yapılarak osteoporoz tanısı belirlenebilir, ancak çok yaygın olarak rutinde kullanılan bir tanı yöntemi değildir.⁶⁴

2.6.3. Osteoporotik Risk Faktörleri

Osteoporoz daha öncede belirttiğimiz gibi elli yaş altı bireyleri de etkileyen, herhangi bir komplikasyon göstermeden ilerleyen ve hayat tarzını olumsuz yönde etkileyen önemli halk sağlığı sorunlarından biridir.

Kemik rejenerasyonu hücre içi ve dışı birçok fizyolojik ve biyokimyasal olay ile hücre ve moleküllerin denetiminde gerçekleşen bir olaydır. Birçok neden kemik rejenerasyonunu gerektirebilir. Bunların başlıcaları çeşitli travmalar, enfeksiyon ve tümörün neden olduğu kemik defektleri ve osteoporozdur.⁶⁵

Osteoporoz tedavisinde birçok evrensel yöntem bulunmaktadır. Tedavideki amaç başta kemik mineral kaybının en aza indirilmesini sağlamak ve kemiğin minerilizasyonu arttırmakla olmalıdır.

Özellikle postmenapozal dönemde ve yetişkin erkeklerde de yaşa bağlı gelişen kemik mineral kayıplarının yanında genç bireylerde de ilaçların indüklediği osteoporotik vakalar ortaya çıkmaktadır. Buna neden olan farmakolojik ajanların başında glukokortikoidler gelmektedir ve yaygın olarak da osteoporoza neden olmaktadır. Bunun dışında proton pompa inhibitörleri, seçici serotonin geri alım inhibitörleri, tiazolidindionlar, antikonvülzanlar, kalsinörin inhibitörleri, antikuagülanlar ve kemoterapotikler de osteoporoza neden olabilmektedir.⁶⁶ Dolayısı ile osteoporozdan korunmak için bu ilaçların olumsuz yönlerinden kaçınmak gerekir.

2.6.4. Osteoporoz Tedavisi

Osteoporoz tedavisi için evrensel öneriler öne sürülmüştür. Bu önerilerin ilki osteoporoz ile ilgili eğitimin yanında beslenme ve hareketli bir yaşam tarzı önem arz etmektedir.⁶⁴ Ayrıca güçlü bir kemik yapısı için yeterli miktarda kalsiyum ve D vitamininin gıdalar veya takviyeler ile alınması esastır.

Oral veya parenteral olarak kullanılan birçok kalsiyum preparatı da bulunmaktadır. Başlıcaları kalsiyum karbonat, kalsiyum sitrat, kalsiyum glukonat, kalsiyum laktat, kalsiyum glubionat, ergokalsiferol, kolekalsiferol, kalsitriol, dihidrotaksisteroldür. Belirgin ölçüde düşük olarak belirlenen D vitamini ve kalsiyum bu preparatlar ile serumda normal durumuna getirilebilir.⁶⁴ Ancak yapılan araştırmalarda uzun dönem kalsiyum kullanımı kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkilendirilmesine rağmen bu alanda araştırmalar devam etmektedir.⁶⁷

Kalsiyum ve D vitamini yanı sıra kemik minerilizasyonunu arttıran terapötik ajanlar da bulunmaktadır. Bu ilaçlar özellikle osteoblast sayısını arttırmak, var olan

osteoblastları olgunlaştırmak ve yaşam süresini arttırmak amacı ile kullanılmaktadır.⁶⁴ Osteoporoz tedavisinde ana terapötik ajan bifosfonatlardır.⁶⁸ ve en çok kullanılanları alendronat, ibandronat, rizendronat ve zolendronik asittir.⁶⁴ Osteoporozun neden olduğu vertebra kırıklarının tedavisinde ve önlenmesinde ilk tercih edilen ilaç grubudur.⁶⁹⁻⁷¹

Antirezorbtif olan bifosfanatlar iyi tolere edilebilen güvenli ilaçlardır.⁶⁸ Bifosfanatların dışında FDA tarafından onaylanmış ve osteoporoz tedavisinde kullanılmakta olan başlıca terapötik ajanlar; östrojen, östrojen reseptör analogları raloksifen, bazedoksifen, kalsitonin, teraparatif (PTH), ve nükleer faktör kapa-B ligand inhibitörü denosumabdır.⁶⁴

Menapoz belirtilerini tedavi etmek için kullanılan östrojenin kemik tamiri için etkili olduğu pek çok çalışmada ortaya konulmuştur. Ancak tek başına kullanılan östrojenin kırıkları önlemesinin yanında olası meme kanser riskini de arttırabileceği belirlenmiştir.^{64, 72}

Selektif östrojen reseptör modölatörleri (SÖRM) başlıca glukokortikoidlerin indüklediği osteoporoz tedavisinde kullanılırlar.⁷³ Östrojen reseptör modölatörlerinden raloksifenin ayrıca tamoksifen benzeri olarak meme kanseri insidansını azalttığı ve kanserin önlenmesinde de etkisi olduğu da gösterilmiştir.⁷⁴ Ancak raloksifen derin ven trombozu ve felç riskini arttırırken, postmenaposal vazomotor belirtileride şiddetlendirmektedir.^{75, 76}

Kalsitonin ise, FDA tarafından özellikle kalça kırıkları için onaylansa da uzun dönem kullanımı tavsiye edilmemektedir.⁷⁷

Osteoporoz tedavisinde güncel olan bir diğer yaklaşım ise monoklonal antikorların kullanılmasıdır. Nükleer faktör kapa-B ligand inhibitörü olan denosumab bir monoklonal antikor olup Nükleer faktör kapa-B ligandı RANKL'yı nötröle ederek kemik mineral kayıplarını ve osteoklastogenesi engeller.^{78, 79}

Denosumab, bir bifosfonat olan zolendronik asid gibi osteoporozun tedavisinde en önemli potansiyel farmakolojik ajanlardan biridir.

Teraparitid (1–34 PTH) tedavisi bifosfanat tedavinin ardından başlanması sonucunda kemik minerilizasyonu iyileştirici etkileri gözlemlenmiştir.⁸⁰ Ancak ilaç başlandıktan sonra hiperkalsemi görülebilmektedir. Osteoporoz tedavinin başlangıcında bifosfonat terapisi ardından başlayacak teriparatidin etkisini azalttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır.⁸¹

2.7. Kemik Defektlerinde Greft Uygulamaları

Osteoporozun geleneksel tedavisinin yanı sıra kombine ilaç uygulamaları ile de kemik mineral yoğunluğunun ve gücünün artırılması yönünde yeni çalışmalar giderek artmaktadır.

Oluşan kemik defektlerinin tedavisinde sistemik ilaç kullanımının yanı sıra kemiğin yerini tutacak veya kemik yapımını arttıracak olan maddeler de kullanılmaktadır.⁸² Kemik greftleri olarak otogreftler ve allogreftler başta sık kullanılmakla beraber, bunların dışında doğal ve sentetik seramik yapılar, demineralize kemik matriksleri, otolog kemik iliği, büyüme faktörleri, kemik morfojenik protein, ve çeşitli kompozit greftler de kullanılmaktadır.⁸³

Kemik iyileşmesinde kemik greftlerinin dört ana etkeni oluşturması gerekmektedir. Bunlar; osteointegrasyon, osteokondüksiyon, osteoindüksiyon ve osteogenezdır.⁸⁴ Kısacası osteointegrasyon; fibröz dokunun kemik yüzeyine kimyasal yapılar aracılığı ile bağlanması, osteokondüksiyon; kemiğin tüm yüzeyinde kemik büyümesini destekleyen yapıları oluşturması, osteoindüksiyon; pluripotent kök hücrelerin osteoblast hücrelerine dönüşmesi indüklenirken, osteogenesiste ise kemik yapı oluşmaya başlar bunun için yeterince kemik yapısını oluşturacak olan hücrelerin ortamda bulunması gerekmektedir.⁸⁵

Bu temel yapıların yanı sıra iyileşmeyi arttırmak amacı ile kullanılan greft metaryalinin; dayanıklılığı, iyileşme bölgelerinin damarlaşması ve ayrıca kemikleşmeyi bloklayan ilaçların kullanılmaması kemik gelişimini etkilemektedir.⁸⁶

Ortopedik cerrahide genellikle otograft ve allograft kemik yapıları kullanılmakta iken günümüzde bilimin gelişmesi ile birlikte ve bu alanda ihtiyaçtan dolayı kemik gelişimini arttıran biyometaryallerin kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır.⁸³

Temel olarak greftlerin birçok çeşidi bulunmaktadır. Bunların başlıcaları; otolog ve allogreftlerdir. Otolog kemik greftleri; kansellöz otogreftler, damarlı yani vaskülarize olan kortikal ve vaskülarize olmayan kortikal greftler ve kemik iliği şeklinde gruplara ayrılmaktadır.⁸³

Klinik tedavi stratejileri arasında kemik rejenerasyonunu geliştirmek için altın standart otolog kemik greftlerinin kullanılmasıdır. Otolog kemik greftleri kemiğin büyüme ve gelişimini sağlayan osteojenik hücrelere, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahiptirler.⁸⁷

Otolog kansellöz kemik greftleri içerisine kemik ve kemik iliği hücreleri nakledilir ve sonucunda osteojenik hücreler osteoblast hücrelere dönüşerek kemik iyileşmesini gerçekleştirir.⁸⁸

Kortikal kemik greftleri ise kemiğe porozitesinin az olması ve damarlaşmanın meydana gelmesinin yavaş oluşu ve bu nedenden dolayı biyolojik uyumun yetersiz olması nedeniyle otolog kansellöz kemik greftlerine göre daha az tercih edilmektedir.⁸⁶

Vaskülarize greftler ise bu alanda cerrahi tekniklerin ilerlemesi ile çok daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Damar yapılarının greft ile nakledilmesi osteositlerin çoğunun hayatta kalmasını sağlamakta ve kemiğin kaynamasını arttırmaktadır.⁸⁹

Otojenik greftler ayrıca greftin kişinin kendisinden olması yönünden ve implant maliyetinin olmayışı açısından önemli faydaları bulunmaktadır.

Kemik greftlerinin yanı sıra ideal bir greft olabilecek biyoyumlu sentetik greft çeşitleri geliştirilmiştir. Bu tür greftler alloplast greftler olarak adlandırılmaktadır ve hidroksiapatit kristalleri, biyoaktif camlar, trikalsiyum fosfat bu biyomateryellerin başlıcalarıdır. Alloplast greftler osteokondüktif etki ile kemik iyileşmesine katkı sağlamaktadır.⁹⁰

Alloplastik greftlerin kemik mineral ve kimyasal yapısına benzer olması ayrıca inflamatuvar olmayışı, emilebilir olması ve toksisite oluşturmamaları bu greftlerin kullanımını arttıran nedenler arasında yer almaktadır.^{91, 92}

Hidroksiapatit kristalleri ve trikalsiyum fosfat en çok tercih edilen biyomateryallerdir bu yapılar üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır.⁹³

Apatitler çok geniş bir yelpazede farklı iyonlardan meydana gelmekte, doğal ve sentetik olarak da oluşmaktadır. Apatitlere farklı iyonlar eklenebilir bu nedenle apatit terimi aynı kompozisyona sahip olması gerekmeyen fakat benzer yapılara sahip bileşimler ailesi olarak tanımlanmaktadır. Apatitler, kendilerine eklenebilen çeşitli iyonlar sayesinde geniş çapta uygulama alanı bulurlar.⁹⁴

Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat mineral kombinasyonlarından oluşan bifazik kalsiyum fosfat kemiğin yeniden oluşmasını sağlayan en önemli biyoseramikler arasında yer almaktadır. Bifazik kalsiyum fosfat implantolojide kemiğin yeniden tamirinde oldukça fazla tercih edilen greftler arasında yer alır.⁹⁵

Kalsiyum fosfat seramikler osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu tür maddeler kemik iyileşme sırasında bazen kemiğin mekanik özelliklerine uymuyor olabilir.⁹⁶

Bir diğer alloplastik greft olan biyoaktif camlar kemik yapısı ile kimyasal bağ oluşturabilme özelliğine sahiptir ve önemli biyoyum sağlayan materyallerdir. Ayrıca yapısal dayanıklılık bakımında hidroksiapatit bileşiğinden daha etkili bir implant olduğu

dental cerrahi araştırmalarında tesbit edilmiştir.⁸⁴ Etkilerini büyüme faktörleri ve kollojene bağlanarak ve de kemik hücrelerinin ilerlemesini kolaylaştırarak yaparlar.⁹⁷

Günümüzde  alışmalar scaffold olarak adlandırılan 3D yapısındaki özel porus olarak bilinen boşluklar içeren ve bir iskele benzeri yapısı olan, ayrıca anatomik olarak uygun ve de biyokimyasal olayların meydana geldiği doku uyumlu greftlerin geliştirilmesine yoğunlaşmıştır.⁶⁵

İdeal bir scaffold geliştirilmesinde göz ardı edilmemesi gereken fiziksel ve biyolojik şartlar vardır. Bunların başlıcaları; scaffold greftler uygulanan yerde mekanik destek sağlamalı, damarlaşma için uygun ortam oluşturmalı ve damarlaşmayı kolaylaştırmalıdır. Scaffold greft içerisine kemik hücre gücünü sağlamalı, osteoindüksiyon ve osteointegrasyon için hücreleri teşvik etmeli, toksik olmamalı, inflamatuvar yanıtı uyarmamalı, sterilizasyon yeteneğine sahip olmalı ve büyüme faktörlerini aktifleştirmeli ve iyileşmeyi hızlandırmalıdır.⁹⁸

Ayrıca bu iskele yapısının içerisine yüklenebilecek yeterli tedavi konsantrasyonu içeren büyüme faktörleri gibi birçok biyomolek l n de taşınabileceği düşüncesi doku mühendisliğinin bu alanda önemli uygulamalarından biri haline gelmesini sağlayacaktır.⁹⁹

3D biyoaktif scaffoldlar çeşitli biyoyumlu metaryellerden imal edilebilir. Özellikle biyoseramikler; hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve biyocamlar, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, doğal veya sentetik kollojen, fibrin moleküller scaffoldların oluşturulması için potansiyel birer biyometaryallerdir.⁶⁵

Kemik defektlerinin veya kırıklarının tedavisinde kırık iyileşmesini hızlandırmak amacı ile bu iskele yapısına integre olabilecek protein veya büyüme faktörleri eklenebilmektedir. Bu biyomoleküllerin başında transforming growth factors- s (TGF- s), kemik morfojenik protein (BMPs), insülin benzeri büyüme faktörü (IGFs),

trombosit türevli büyüme faktörleri (PDGFs), vazküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF) yer almaktadır.¹⁰⁰

Kemik doku mühendisliğinde sentetik veya doğal scaffoldlar genellikle çeşitli polimer, biyoaktif camlar ve seramikler ile hazırlanmıştır.⁸⁷ FDA (U.S. Food and Drug Administration) scaffoldlar arasında poli-laktit ko-glycolideasid (PLGA) kullanımını da onaylamıştır. PLGA, sentetik bir polimer materyal olup, yapılmış olan in vivo ve in vitro kemik iyileşmesi çalışmalarında biyouyumluluk ve mekaniksel bakımdan çeşitli oranlarda arzu edilen iskele yapısını oluşturduğu tesbit edilmiştir.¹⁰¹⁻¹⁰³ Ancak PLGA'nın laktik ve glikolik asit oluşumu gibi yan tesirleri meydana gelebileceği gibi bununla birlikte kemik iyileşmesinde uyumluluk ve biyogüvenilirliği bakımından deneysel ve klinik çalışmalarda yapılmıştır.¹⁰⁴

PLGA iskelet yapısı, osteoblast veya mezenkimal kök hücre implantasyonu yapılarak kemik iyileşmesini teşvik eden önemli greft adayları arasındadır. Ayrıca PLGA scaffoldlar, uygun bir kök hücre kaynağı kullanılarak kemik iyileşme süresini kısaltmak ve doku miktarını arttırmada kullanılabilecek önemli potansiyel greftler içerisinde yer almaktadır.⁵

Bu bilgiler ışığında kemik doku rejenerasyonları için yeni biyouyumlu greftlerin geliştirilmesi önem arz etmekte olup bu alanda kullanılacak iskele yapısına integre olabilecek yeni kimyasal materyallerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır.

2.8. Bor Mineralinin Genel Özellikleri ve Sağlık Alanda Minerallerin

Kullanılması

Bor yüz yıldan daha uzun süredir bitkiler için temel minerallerden biri olduğu bilinmekteydi. Henüz aydınlatılamamış olsa da insanların beslenme ve metabolizmalarında borun varlığını gösteren kanıtlar giderek artmaktadır.¹⁰⁵ Borun aynı zamanda beyin gelişimi ve fonksiyonlarında.¹⁰⁶ hormon metabolizmasında inflamasyon

kontrolü ve cevabında, kemik ve diş gelişiminde önemli rolleri olduğu tesbit edilmiştir.^{107, 108}

Bor nitrür (BN) oksit olmayan seramiklerdir. Düşük yoğunlukta ve kimyasal kararlılığı çok iyi olan ısıl dayanımı kendine özgü olan birçok alanda kullanıldığı gibi mekanik alanda da tercih edilen bir maddedir.¹⁰⁹

Bor madeninin ülkemizde oldukça yoğun bulunmasına rağmen şu ana kadar sağlık alanında kullanılmamıştır. İnsanlık ve sağlık alanında elmastan sonra en sağlam maden olan, yağlayıcı özelliği olan ve toksik olmayan Bor Nitrür (BN)'ün kemik defektlerinde tek başına veya hidroksiapatit (HA) kombinasyonu ile, çeşitli ebatlarda bir taşıyıcı sistem ile, plaklar halinde veya toz şeklinde defekt ve/veya bölgesine internal ve eksternal implantasyonu ile ayrıca bu maddenin ortopedi cerrahisinde kullanılan tüm malzemelere (protez, çivi, plak, vida) uygulanarak/kaplanarak kırık veya defekt iyileşmesi ve kırık sonrası oluşan enfeksiyon ve protez enfeksiyonlarının önlenmesinde kullanılması önem kazanmaktadır. Araştırmalar en ideal biyomateryal seçimi yapılırken oluşabilecek komplikasyonları minimuma indirmeyi amaçlar.

2.8.1. Kemik Kırık ve Defektlerinde Kullanılan Metaller

Ortopedik cerrahide kullanılan materyallerin temel grubunu dayanıklılık nedeniyle metaller oluşturmaktadır. Eklem artroplastilerinde polietilen üzerine metal yüzey kullanımı en yaygın artroplastisi tipi olmakla birlikte teorik olarak bu tip kombinasyonlardaki muhtemel polietilen aşınmasına bağlı debris hastalığının önüne geçmek ve osteoliz insidansını düşürmek amacı ile metal üzerine metal kombinasyonu 1990'lı yıllardan itibaren iyileştirilmiş metalurjik ve tasarım özellikleri ile tekrar yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.^{110, 111}

Ancak bu kombinasyonun kullanımı da komplikasyonları tamamen ortadan kaldıramamıştır. Metal üzerine metal kombinasyonu kullanılan artroplastilerdeki

başarısızlığın muhtemel nedeni olarak hastanın metal hipersensitivitesine yatkınlığı gösterilebilir.¹¹² Hastanın metal hipersensitivitesine yatkınlığı aseptik gevşemeye neden olabileceği gibi metal, debris ile komşu dokular arasında etkileşime de neden olabilir.¹¹¹ Metal yapıdaki biyomateryallerin kullanılması, cerrahi operasyon gerçekleştirildikten sonra oluşturduğu en ciddi durumlar arasında serumda metal düzeyinde artış ve metallozistir. Metallozis; periprostetik kemik ve yumuşak dokuya metalik aşınma debrislerinin infiltrasyonu olarak tanımlanır Bunun sonucunda oluşabilecek sistemik ve lokal olumsuzluklar hayatı tehlikeye atacak boyutta önem arz etmektedir. Metallozisin kesin insidansı kliniğin ve radyolojik bulguların farklılıklar göstermesine bağlı olduğu tam net olarak bilinmemektedir.^{113, 114}

Artmış serum metal düzeyleri ve metallozisin nedeni metalurjik yetersizlik, üretim ve sterilizasyon yöntemleri, implantların yerleştirilme şekli, hatalı dizilim, implantla kemik arasındaki sıkışma, modüler protezlerde prostetik parçalar arasındaki sürtünme, metalik implant ile kemik ya da çimento arasındaki mikrohareketler, üçüncü cisim aşınması, artmış fiziksel aktivite olabilir.¹¹⁵ Birçok çalışmada metal üzerine metal kombinasyonu kullanılan artroplastili hastalarda normal bireylere göre artmış serum ve idrar krom, kobalt, molibden ve titanyum düzeyleri saptanmıştır.¹¹⁶ Açığa çıkan serbest metal iyonları metal-protein kompleksleri oluşturarak immün sistem aktivasyonu ya da inhibisyonu ile hipersensitivite yanıtları, sitotoksik etkiler ve olası lösemi gibi onkojenik etkiler ortaya çıkarabilmektedir.^{115, 116}

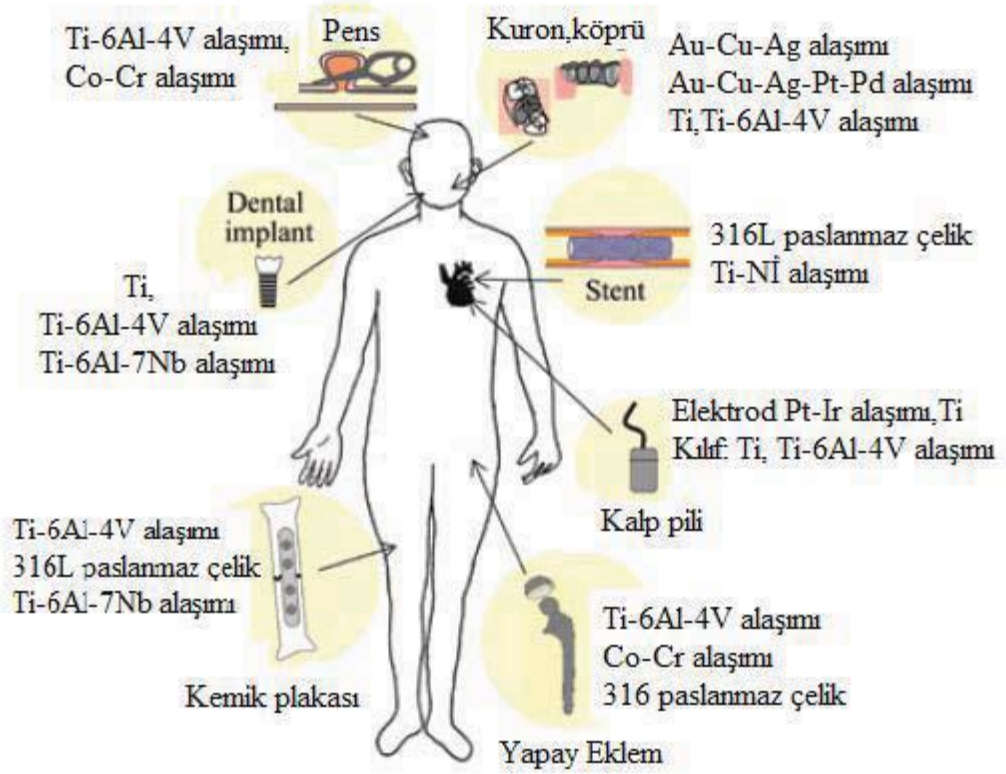
Sistemik yüksek kobalt düzeyinin tiroid disfonksiyonu, kardiyomiyopati ve karsinojenik özelliğe sahip olduğu, yüksek krom ve vanadyum düzeyinin kardiyak ve renal fonksiyon bozukluğunun yanı sıra psikoza neden olduğu, titanyum toksisitesinin pulmoner ve trombosit disfonksiyonuna ve kemik iliği baskılanmasına neden olduğu gösterilmiştir.¹¹⁷ Sistemik dolaşıma geçmeyen, lokal biriken metal partiküller

metallozise neden olur. Metallozisin klinik bulguları çok değişken olabilmektedir. Ağrı, eklem efüzyonu, granülo formasyonuna bağlı ekstraartiküler şişlik, fistül, hipersensitivite benzeri immünolojik yanıt ve sistemik semptomlar görülebilir.^{116, 118}

Aseptik gevşeme olan olgularda ağrı ve instabilite olabilir.¹¹⁸ Makroskopik olarak metallozis olan olgularda fistülizasyon, koyu renkli akıntı, siyah benzeri koyu renge boyanmış periprotetik kemik, yumuşak doku ve cilt altı yapılar belirgin şekilde gözlenir.^{119, 120}

Histolojik olarak metal debris etrafında yaygın lenfositik ve plazmositik infiltrasyon olduğu histiosit ve yabancı cisim dev hücrelerinin varlığı gösterilmiştir. Metal partiküller, ekstraselüler metal depozitler ya da histiosit ve dev hücrelerin içinde intrastoplazmik debris olarak gözlenir. Sinovyal doku ve periprotetik dokuda yaygın nekroz, endotelyal ödem, lokalize kanama, fibrin eksudasyonu olabilir.¹¹⁶ Oluşan enflamasyon ve immünolojik reaksiyona bağlı osteoliz ve aseptik gevşeme olabilmekle beraber her metallozis olgusunda aseptik gevşeme ve osteoliz olmamaktadır.¹¹⁹

Radyolojik yöntemler ile incelendiğinde metalik debris materyallerinden meydana gelmiş olan “bubble sign” olarak da bilinen radyodens çizgiler gözleendiği gibi periprotetik osteoliz de bazı olgularda görülebilir. Ayrıca radyolojik olarak BT ve MR görüntüleme yöntemlerinde komşu dokularda metalik debrisler gösterilebilir.¹²⁰



Şekil 2.3. Metalik aygıtların ve metalik biyomalzemelerin insan vücudundaki kullanım yerleri.¹²¹

2.8.2. Bor Minerali

Bor madeninden birçok malzeme üretilmiş olup konumuzla ilgili en önemli ve en destekleyici malzeme ise nanoteknoloji ile üretilmiş BN'dir. BN'ün birden fazla özelliği mevcut olup birçok alanda kullanılabilecek önemli endüstriyel malzeme arasında yer alır. BN; zehirli olmayan, sert bir materyaldir ve fazla reaktif değildir. Şekillendirilip üretilabilir olması BN'ün birçok alanda kullanım imkanını arttırmaktadır.

BN birçok alanda denenmesine rağmen sağlık alanına yeni yeni girmektedir. Konumuzla ilgili olarak Lahiri D ve ark.¹²² yılında yaptığı bir çalışmada BN ve hidroksiapatitin in-vitro ortamda osteoblastların biyokompatitesinde önemli rollerinin olduğunu göstermiştir.

Özet olarak boru mineralinin birçok ciddi hastalıkta; artrit, osteoporoz, kemik kırıklarının iyileşmesinde kanser ve bozulmuş merkezi sinir sistem fonksiyon risklerinin etkileyebilecek faydaları bulunmaktadır ve bu olağan mekanizmaları kanıtlayan çalışmaların sayısı da gittikçe artmaktadır.⁴

2.8.3. Bor Mineralinin Kemik Doku Üzerine Etkisi

Bor minerali bitkiler için gerekli olan mineraller arasında yer almaktadır.¹²³ İnsanlar dahil olmak üzere çeşitli hayvan modellerinde de bor mineralinin kemik mineral dengesini etkilediğine dair deliller bulunmaktadır.^{124, 125} Ayrıca başta bor; embriyogenesis, kemik büyümesi ve bakım, bağışıklık fonksiyonu ve psikomotor becerileri de dahil olmak üzere birçok yaşam süreçlerinde önemli bir rol oynayan insan vücudunda iz elementlerden de biridir.¹²⁶

Postmenapozal kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda da bor minerali ile 17 β -estradiol arasında ilişki olduğu bulunmuştur.¹²⁵ Bilindiği üzere menapozal dönemde östrojen hormonu düzeyi hızlı bir şekilde gittikçe azalmaktadır.^{127, 128} Menapoz sonrası kemik mineral kayıp ve risklerinin östrojen konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{129, 130} Bu etkiyle osteoklast aktivitesi artarak kemik mineral yoğunluğunun kaybı söz konusu olmaktadır.¹³⁰ Özellikle, menopoz sonrası dönem içindeki kadınlarda, bor östrojen üretimini uyararak östrojenin etkilerini taklit eden, hormonların sentezini de teşvik etmektedir.¹²⁵

Bor mineralinin leptin desteği ile kemik immobilizasyonunu azaltan ve kemik gelişimini teşvik eden ve yeniden oluşumunu sağlayan etkileri olduğu bilinmektedir.¹³¹

Doku mühendisliği alanında bugüne kadar hasarlı ve ya kırık kemik dokularının onarımı için; malzeme bilimi, hücre biyolojisi, biyoteknoloji gibi multidisipliner alanlar yeni bir dayanıklı biyoyumlu biyometaryallerin geliştirilmesi hususunda büyük ölçüde

çalışmalar yapmışlardır.^{132, 133} Geliştirilen bu biyomateryaller içerisinde yer alan MBG olarak da kısaltılan mezogözenekli biyoaktif camlar gözenekli yapısı nedeniyle osteoblastların tutunması ve farklılaşmasına izin veren özelliği dolayısı ile kemik yedek malzemesi olarakta yaygın olarak kullanılmaktadır.^{134, 135}

Önceki yapılan çalışmalarda da bor mineralinin kemik büyümesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.^{134, 136} Bor mineralinin osteoindüktif büyüme faktörleri ve birçok sitokin salgılanmasını kolaylaştıran, yara iyileşmesini teşvik eden ve hücre dışı matrisi artırma yeteneği olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.^{134, 136, 137} Yapılan bir çalışmada da bor kaplı MBG iskelesinin bor kaplı olmayan iskele ile kemik iyileşme aşamaları karşılaştırıldığında bor kaplı MBG iskelesinin önemli ölçüde osteojenik özelliklerinin olduğu ve mükemmel bir biyometaryal olduğu gösterilmiştir.¹³⁴

Bu amaçla, kemik dokusu için biyomalzeme olarak geleneksel bor içeren iskele yapıları son on yıl içinde geliştirilmekte ve denenmektedir.

2.9. Kemik Defektinin İyileşmesini Etkileyen Hücresel Faktörler

Menopoz sonrası osteoporoz birim hacim başına kemik kütlesindeki bir azalma ile karakterize edilen sessiz progresif ve sistemik bir hastalıktır. İnflamasyon ise doku onarım sürecinde önemli bir düzenleyicidir. Bu açıdan kemik iyileşmesinde sitokinlerin rolü oldukça önem arz etmektedir.¹³⁸

Postmenapozal dönemde östrojen eksikliği, kemik iliği ve kemik hücrelerinden proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını arttırarak kemik kaybına katkı sağladığı gösterilmiştir. Yapılan klinik araştırmalarda postmenapozal aktivitesi hızlandırılmış deneklerde östrojenin kontrolünde çeşitli sitokinlerin kemik döngüsü üzerine düzenleyici etkileri olduğu da belirlenmiştir. Östrojen eksikliğine bağlı olarak başta IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ve TGF- β gibi sitokinlerin kemik minerilizasyon kaybında rolleri

olduğu bulunmaktadır.^{139, 140} Tüm bu sitokinler osteoporoz zemininde oluşabilecek kemik kırıklarının iyileşmesinde negatif yönde rol oynamaktadırlar.

Lökositler başta olmak üzere diğer hücrelerde de üretilen sitokinler protein veya glikoprotein yapısında olup, bir hücreden diğerine bilgi ve sinyal ileten kimyasal haberci moleküllerdir. Sitokinler, inflamatuvar ve immün yanıtın gelişimi ve düzenlenmesinde hematopoietik hücrelere aracılık ederler. Özellikle immün yanıt ve inflamasyonda önemli rolleri bulunmaktadır.¹⁴¹⁻¹⁴³

Osteoporoz etyolojisinde; endokrin, metabolik ve mekanik sistemleri ilgilendiren birçok faktör yer almaktadır.¹⁴⁴ Postmenapozal osteoporozda T hücrelerinin otoimmün ve inflamatuvar süreçte önemli rol oynadığı yönünde de birçok hipotez bulunmaktadır. Bu hücreler içerisinde Th1 hücreleri IL-2, IFN- γ , TNF- α , Th2 hücreleri IL-6, IL-4 ve IL-10 ve Th17 hücreleri tarafından da salgılanan IL-17 osteoklastogenesis ile ilişkili sitokinler olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁵

Postmenapozal osteoporoz etyopatogenezinde kemiğin yeniden şekillenme süreci içerisinde inflamasyon mekanizmaların etkili olduğu gösterilmiştir.¹⁴⁶ Pro-inflamatuvar sitokinler postmenapozal dönemde östrojen eksikliğine bağlı osteoporozun düzenlenmesi açısından önem arz etmektedir. Bu proinflamatuvar sitokinler doğrudan veya dolaylı olarak kemik formasyonunu ve erimesi üzerine etkilerinin olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur.¹⁴⁷

Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), önemli temel düzenleyici sitokinler içerisinde yer alır ve benzersiz birçok etkisi söz konusudur. TGF- β ligandları arasında kemik morfojenik proteinler (BMP) gibi birçok protein yapılı bileşik bulunmaktadır.¹⁴⁸ TGF- β osteoklastogenesisi uyaran önemli bir modulatördür.¹⁴⁹ TGF- β öncelikle osteoblastlar tarafından üretilmektedir. Kemik oluşumu sırasında latent formda

bulunurken sonrasında salınır ve aktifleşir, sonucunda ise osteoklastlar ile matriks proteazlarınca inaktif hale getirilir.¹⁵⁰

Postmenapozal dönemde östrojen hormonunun azalması kemik iliği, stromal hücreler ve osteoblastlardan salgılanan başta IL-1 β ve IL-6 gibi osteolitik sitokinlerin artmasına neden olur.^{151, 152}

IL-1 β , çok geniş bir yelpazeye sahip olup birçok doku ve hücrede düzenleyici olarak görev alan proinflamatuvar bir sitokindir.¹⁵³ TNF- α gibi çeşitli sitokinler ile kemik resorpsiyonunu stimule etmektedirler.¹⁵⁴ Romatolojik hastalıklarda ve osteoporozda da IL-1 β 'nın etkisi olduğu gösterilmiştir.

IL-6 osteoklast farklılaşması ve işlevleri hakkında önemli etkileri olan bir pleiotropik sitokindir. Yapılan çalışmalarda östrojen yokluğu durumunda oluşan osteopeninin IL-6 aracılığı ile meydana geldiği bildirilmiştir.¹⁵⁵ Ayrıca osteoporozlu bireylerde IL-6 ekspresyonunun oldukça fazla arttığı da gösterilmiştir.¹⁵⁶

Menapozal dönemin sonunda Th2 immun hücreleri tarafından salgılanan IL-4 sadece direkt olarak osteoklastların inhibisyonu üzerine etkisinin yanı sıra potansiyel olarak RANKL ekspresyonunu da inhibe etmektedir.^{157, 158} IL-4 hem in vivo hem de in vitro şartlarda kemik mineral kaybını da önlemektedir.¹⁵⁹

Uzun kemiklerin doğum sonrası büyümesinde endokondral kemikleşme bu sürecin ana elemanını oluşturmaktadır. Daha sonra kıkırdak iskeleti yerini kemik minerilizasyonuna bırakır.¹⁶⁰

Kalsifikasyon, osteoblast benzeri hücrelerin çeşitli etkenler tarafından tetiklenmesi sonucu kemik formasyonuna dönüşmesi ile oluşur. İn vitro olarak yapılan çalışmalarda osteoblastik hücreler hidroksiapatit mineralleri etkisi ile kemik oluşumunu meydana getirmektedir.¹⁶¹ Osteoblast hücrelerinin başta BMP, RANKL ve inflamasyon gibi çeşitli faktörler ile kemik hücrelerine dönüşümü teşvik edilmektedir.¹⁶²

Bu etkenler arasında yer alan osteopontin kalsiyum ve hidroksiapatitin bağlandığı kemik dokusunun matriksinde yer alan ve hücre dışında biriken bir glikoproteindir. Bunun dışında aterosklerotik damarlarda kalsifikasyonla ilgili olduğu bilinmektedir.¹⁶¹

Osteokalsin osteoblast hücreler tarafından salgılanan ve kemik formasyonunun belirleyicilerinden biridir. Kemik oluşturma amacı ile menarilizasyonu teşvik eden ve 49 aminoasidden oluşan kollejen olmayan bir proteindir.¹⁶³ Kemik metabolizması için biyokimyasal aktiviteye sahiptir.¹⁶⁴

2.9.1.TNF- α (Tümör Nekroz Faktörü- α)

Kemiğin yeniden şekillenme sürecinde inflamatuvar faktörler kritik önem arz etmektedir. Postmenapozal osteoporozun etyopatolojisine baktığımızda mineral kaybına bağlı olarak gelişen defektlerin gelişiminde bu inflamatuvar markerlar ile bağlantılı olduğu yönünde birçok delil vardır.^{146, 165} Başta TNF- α olmak üzere birçok proinflamatuvar sitokin menapoz sonrası östrojen eksikliği ile bağlantılı olduğu ve bu sitokinin kemik erimesinin düzenlenmesi açısından çok önemli olduğu bulunmuştur. Bu proinflamtuvar kaynaklar kemik mineral kaybını doğrudan veya dolaylı olarak arttırmakla beraber önleyici etkileri de bulunmaktadır.^{166, 167} Klasik TNF- α kemik homeostazının düzenlenmesinde osteoklastogenezi uyarması ve osteoblast aktivitesini önleyerek gerçekleştirirler.¹⁶⁷

Kemik hücreleri üzerine in vitro yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın osteoblast hücrelerinin farklılaşması üzerine inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu bloke edici etkisi, insülin benzeri büyüme faktörleri-1 gibi çeşitli faktörlerin inhibisyonu sonucu olduğu gösterilmiştir.^{168, 169} Ayrıca TNF- α 'nın östrojen eksikliğinde osteositlerin apoptozisini de indüklediği yönünde çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁶⁷

TNF- α ; bir transkrip faktörleri olan NF- κ B etkileyerek de osteoklastogenez üzerinde etkisini göstermektedir.^{170, 171}

TNF- α bu süreçte düşük doz halinde osteoblast proliferasyonunu sağlarken yüksek dozlar, in vitro ve in vivo kemik oluşumunu inhibe edebilir.^{39, 172} TNF- α yalnız direkt etkisi ile östrojen eksikliğine bağlı matur osteoklast aktivitesini geliştirmesinin yanında aynı zamanda indirekt olarak stromal hücrelerde ve osteoblast hücreler yolu ile RANKL sekresyonunu sağlayarak osteoklast aktiviteyi stimüle eder.^{173, 174}

2.9.2. Osteopontin

Osteopontin integrin bağlayıcı bir protein olarak görev yapmaktadır. Fizyolojik olarak osteoblastların farklılaşması ve kemik formasyonunda da önemli görevler üstlenmektedir.¹⁷⁵ Osteopontin ayrıca secreted phosphoprotein 1 (SPP1), 44 kDa kemik fosfoprotein olarak da bilinmektedir.¹⁷⁶

Osteopontin kollojen olmayan ekstrasellüler kemik matriks proteinlerinden biridir. Osteopontin kemik doku dışında enflamasyon dahil olmak üzere bağışıklık, anjiyogenez, yara iyileşmesi, tümör oluşumu, metastaz, hücrel yaşam ve göç gibi biyolojik süreçlerde ve kemiğin yeniden şekillendirilmesinde yer almaktadır. Osteopontin başta kemik dokuda tesbit edilmiş olup, kemik iyileşmelerinde kemiğin yeniden oluşum ve minerilizasyonda önemli rol üstlenmektedir.^{177, 178} Osteopontin kemik minerilizasyonunu inhibe eden önemli proteinlerden biridir.^{178, 179} Benzer olarak yapılan çalışmalarda Osteopontinin hidroksiapatite bağlanması ile minerilizasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir.¹⁷⁹ Osteopontin, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını ve adhezyonunu da teşvik etmektedir.¹⁸⁰

Osteopontin normal kemik dokusunun oluşumu ve gelişiminde tek başına etkili olmasada kemiğin yeniden düzenlenmesinde önemli bir bileşen olarak görev

almaktadır.¹⁸¹ Osteopontinin osteoklastlar üzerinde yaşamsal etkisi ise de tam olarak anlaşılmış değildir.¹⁸²

2.9.3. BMP (Kemik Morfogenetik Peptid)

Kemik metabolizmasını kontrol eden faktörler arasında BMP (bone morphogenetic peptide) de yer almaktadır. TGF- β süper ailesinin çok fonksiyonlu büyüme faktörlerinin bir üyesidir. Bu faktörler doğum sonrası iskeletin embriyonik gelişimde kemik oluşumunu da düzenlemektedirler. BMP hücre içi sinyal yollarını harekete geçirerek Runx2 molekülü ile etkileşime girerek kemik oluşumunu da teşvik etmektedirler.¹⁸³

BMP-2 kırık onarımı sırasında da çeşitli hücrelerin farklılaşma süreçlerinde ve düzenlenmelerinde yer alırlar.¹⁸⁴ Çok güçlü bir osteoindüktif özelliğe sahip olan BMP-2' nin kemik rejenerasyonunda önemli etkin moleküllerinden biri olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir.¹⁸⁵ Ayrıca BMP-2 gibi çeşitli büyüme faktörü emdirilebilen biyomalzemelerin kemik gelişimi üzerine etkilerini gösteren in vivo çalışmalarla BMP-2'nin kemik gelişimine olan etkileri tesbit edilmiştir.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

2.9.4. Runx2

Runx2, kemik gelişiminde görev alan önemli bir transkrip faktörüdür. Ayrıca hücrenin çekirdeğine bağlanan faktör alfa (CBFA1) ve osteoblast sipesifik faktör (OSF2) olarakta bilinir.¹⁸⁹ Osteoblastik hücrelerde ve bu hücrelerden köken alan yapılarda sentezlenmektedir.¹⁹⁰

İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda osteoblast farklılaşmasında ve dolayısı ile kemik oluşumu sırasında ve de minerilizasyonunda Runx2'nin gerekli bir transkrip faktörü olduğu gösterilmiştir.¹⁹⁰ Runx2, kolajen tip I, osteopontin, osteokalsin (OC) dahil olmak üzere birçok osteoblastik genlerin ekspresyonunu düzenlemektedir.¹⁹¹

Runx2' nin ayrıca BMP-2 ekspresyonu üzerinde sinyal arttırıcı etkisi söz konusudur.¹⁹²

2.9.5.Kollojen

Tip 10 kollojen (COL10A1) özellikle hipertrofik kondrositlerde ekspresyon edilmektedir. Kemikleşmenin gerekli olduğu yerlerde tip 10 kollojen ekspresyonu olarak uygun ortamın oluşmasını sağlar.¹⁹³ Kemik ile ilgili hastalıklarda veya iskelet sisteminin gelişimi aşamasında kollojen 10'un klinik öneminin olduğu gösterilmiştir. Osteoartritli kıkırdak hipertrofisinde COL10A1 ekspresyonu arttığı rapor edilmiştir.¹⁹⁴

Osteoblastlar tarafından üretilen TGF- β aynı zamanda kollojen sentezini de aktive etmektedir.^{195, 196}

Kemik yapı kollojen olarak adlandırılan yumuşak bir organik matriksden ve apatit bileşiklerinin kombinasyonu ile oluşur. Kollojen kemik dokunun bir tamamlayıcısı olan proteindir.¹⁹⁷ Kemik matriks proteinlerinin yaklaşık % 80'ini kapsamaktadır. Bu açıdan kollojen miktar değişikliği kemik mineral artışı ve kemiğin kırılabilirliğini etkileyebilir. Kollojeni oluşturan genetik yapıların mutasyonu kişilerde kemik kırılabilirliğini ve de dolayısı ile kemik yeniden oluşumunu etkileyebilmektedir.¹⁹⁷

Osteoporoz da kemik kırılabilirliğini arttıran bir patofizyolojik durum olup kollojen yapımı ile ilgili genlerde mutasyonların meydana gelişi kırılabilirliğin oldukça artabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

2.9.6. TRAP (Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant)

Tartarat-dirençli asit fosfataz (TRAP, ACP5, EC 3.1.3.2), ayrıca mor asit fosfataz, uteroferrin veya tip 5 asit fosfotaz olarak da bilinir.¹⁹⁸ Yarım asrı aşkın süredir kemik reabsorpsiyonu ve osteoklast hücre aktivasyonu için bir biyobelirteç olarak belirlenmiştir. TRAP daha çok inaktifproenzim şeklinde sentezlenir çeşitli proteazlar tarafından katalitik aktivitesi arttırılır.¹⁹⁹ TRAP osteoklastik olarak TRAP şeklinde

sentezlenirken serumda TRAP 5b izoformu bulunur.²⁰⁰ ve başlıca osteopontin gibi kemik matriks proteinlerinin defosforilasyonundan sorumludur.^{201, 202}

Osteoklastlardan salgılanan TRAP diğer kemik hücrelerinde de mevcut olmakla beraber kemik erimesi ve kemik oluşumunu sağlayan bir faktör olarak belirlenmiştir.²⁰³

Halleen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada serumda TRAP 5b aktivitesinin osteoporoz ve kemik mineralizasyonunu olumsuz etkileyen bir belirteç olarak göstermişlerdir.²⁰⁴ Yine in vivo yapılan eksperimental çalışmalarda TRAP proteinin baskılanması kemikleşmeyi engellediği ve osteoporotik bir fenotipin oluşmasına neden olmuştur.²⁰⁵

Osteoklast hücrelerinin dışında inrtakortikal kemiklerin yeniden düzenlendiği yerlerde, kemik yüzeyine yakın yerlerde, osteosit ve osteoblast hücrelerinde de TRAP varlığı belirlenmiştir.²⁰⁶

Kadınlarda postmenapozal dönemi taklit eden östrojen eksikliğine bağlı kemik mineral miktarının azalmasını ovariektomi ile indüklenmiş deneysel osteoporoz modelinde TRAP ekspresyonunun değiştiği deneysel olarak gösterilmiştir.²⁰⁷

Hematopoietik hücrelerden köken almış olan osteoklast hücreleri kemik minerilizasyonunun azalmasında önemli rol oynamaktadırlar. Tartarat dirençli asit fosfataz yani TRAP (ACP5) olarak da bilinen molekül osteoklastların farklılaşmasını indükleyen faktörler arasında yer almaktadır. Ayrıca kemik rezorbsiyonunun önemli bir belirtecidir.^{208, 209}

2.9.7. Kemik Alkalen Fosfataz

Osteoprogenitör hücreler farklılaşarak osteoblastik fenotipi birkaç aşamada gerçekleştirirler. İlk aşamada hiç veya çok düşük kemik alkalen fosfataz aktivitesi göstermekle beraber minerilizasyon aktivitesi göstermezler. İkinci aşamada ise kemik ektraseüler matriksin olgunlaşması ile kemik alkalen fosfataz ve collojen tip 1 gibi

genler aktif hale gelirler. Böylelikle yüksek kemik alkalen fosfat aktivitesi oluşur ancak kemik minerilizasyonu düşük olur. Üçüncü aşama ise farklılaşma aşaması olmakta ve ekstraselüler matriks minerilizasyonu artmaktadır Osteoblastlarda kemik alkalen fosfataz aktivitesi orta seviyededir ve minerilizasyon ve matriks proteinleri ise yüksek aktivite gösterir.^{18, 210, 211}

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kemik spesifik alkalen fosfataz postmenapozal dönemde osteoporoza bağlı risklerin belirlenmesi aşamasında önemli bir biyomarker haline gelmiştir.²¹²

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Araştırma Laboratuvarı, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı İmmünohistokimya Laboratuvarında, Nükleer Tıp Anabilim Dalı ve Radyoloji Anabilim Dalı ile Yeditepe Üniversitesi Biyomühendislik ve Genetik Anabilim Dalında ve Sabancı Üniversitesi (SUNUM)'da ve de Anadolu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalurji Mühendisliği Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM) bünyesindeki deneysel hayvan laboratuvarından temin edilen toplam 280 adet ve ağırlıkları 230-250 gram arasında değişen Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Deney süresince, sıçanlara yeteri kadar (ad libitum) su ve pellet yem verildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22°C) barındırıldı ve beslendi. Çalışmamızın bütün aşamalarının etik kurallara uygun olduğu “Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK)” tarafından verilen 25 Temmuz 2014 tarihli ve 366389-127 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

3.2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tiopental Sodyum (Pental Sodyum IV flakon) İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. İstanbul, Türkiye: Çalışmada intraperitoneal (i.p.) olarak anestesi için 25 mg/kg ve ötenazi için 50 mg/kg olarak verildi.

Metamizol Sodyum (Novalgin 1 g/2 ml IM/IV ampul) Sanofi Aventis İlaçları Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye: Cerrahi girişim sonrası ağrı kesici olarak 25 mg/kg intramüsküler verildi.

Sefazolin Sodyum (İESPOR 1 g IM Flakon) İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. İstanbul, Türkiye: Postoperatif dönemde 25 mg/kg intramüsküler uygulandı.

%10 Povidon İodine Antiseptik Solüsyon: Cerrahi insizyon alanlarının dezenfeksiyonu ve operasyon sonrası pansuman için kullanıldı.

Hidroksiapatit (HA) Nanotech İleri Teknoloji San. ve Tic. Ltd. Eskişehir, Türkiye: Yüksek biyouyumluluğu sayesinde HA yapay kemik uygulamalarında vücudun farklı bölgelerinde meydana gelen hasarların giderilmesi, tamamen işlevini yitiren kemiğin yerine kullanılan protez uygulamaları ve mekanik yük altında dayanım gerektiren durumlarda kullanılan metalik implantların kaplanması için kullanılmaktadır.

Bor Nitrür (BN) Bor Teknolojileri ve Mekatronik AŞ. Eskişehir, Türkiye: Bor nitrür uygulamalarının temel görevlerinden biri de mekanik özellikleri iyileştirmesi olup hidroksiapatit (HA) ve bor nitrür (BN) kompozit bileşiği kemik iyileşmesi alanında kullanılmaktadır.

PLGA veya poly(lactic-co-glycolic acid) (50/50 lactide:glycolide, Mw 30,000-60,000): Taşıyıcı iskenin (Scaffold) yapımında kullanıldı.

Cyclohexane, 1,4-dioxane, methanol, n-hexane, Gelatin, powder, parafin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS): Taşıyıcı iskenin (Scaffold) yapımında kullanıldı.

3.2.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
TissueLyser II	QIAGEN, Hilden, Germany
QIAcube	QIAGEN, Hilden, Germany
Thermal Cycler Veriti	Applied Biosystems, CA, USA
Epoch spectrophotometer	Biotek, Highland Park, USA
Real-Time PCR	Applied Biosystems, CA, USA
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
pH Metre	SCHOTT Instruments Lab 850, Germany
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Hassas Terazî	Shimadzu ATX224, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Ultra Derin Dondurucu (-86°C)	Nuaire NU-9483E, USA
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus
Cerrahi set	F.S.T. Germany
Otoklav Wac47	DAIHAN, Güney Kore
Dewar transport vessels	LLG, Germany
Kafes	Tecniplast, Italy

3.3. Metot

3.3.1. Deney Planı

Çalışmada 9 deney grubu ve bir kontrol grubu olmak üzere 10 gruptan oluşturuldu. İlk grup sağlıklı kontrol grubu olarak 10 diğer gruplar ise 30 adet sıçan olmak üzere 280 adet dişi sıçan kullanıldı. Osteoporozun indüklenmesi amacıyla dişi ratlara bilateral ovariectomi yapıldı.

Deney grupları aşağıdaki gibi planlandı.

Grup I: Sağlıklı

Grup II: Osteoporoz + Defekt

Grup III: Osteoporoz + Defekt + PLGA

Grup IV: Osteoporoz + Defekt % 10 HA

Grup V: Osteoporoz + Defekt +% 2,5 BN + % 10 HA

Grup VI: Osteoporoz + Defekt +% 5 BN + % 10 HA

Grup VII: Osteoporoz + Defekt +% 10 BN + % 10 HA

Grup VIII: Osteoporoz + Defekt +% 2,5 BN

Grup IX: Osteoporoz + Defekt +% 5 BN

Grup X: Osteoporoz + Defekt +% 10 BN

Tablo 3.1. Deney Planı

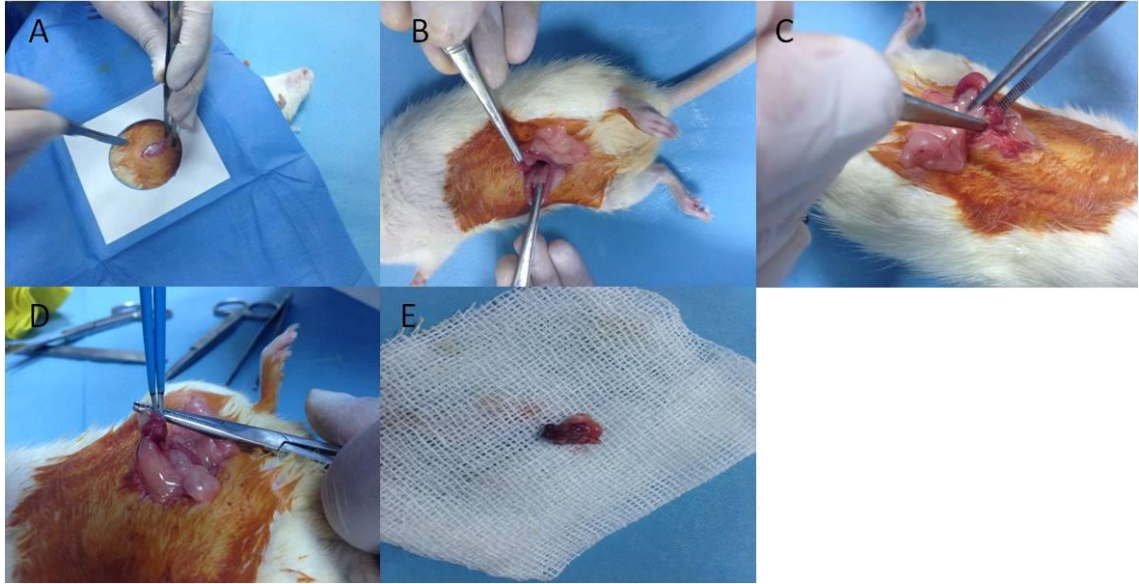
<i>Sakrifikasyon Periyodları ve Rat sayıları</i>						
GRUPLAR	1.- 84.Gün	85.Gün	92.Gün	99.Gün	113.Gün	
	Osteoporoz Periodu	Defekt Operasyonu	Defekt sonrası 1. Hafta	Defekt sonrası 2. Hafta	Defekt sonrası 4. Hafta	
1	SAĞLIKLI KONTROL	-	-	-	-	10
2	OP + DEF	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
3	OP + DEF PLGA	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
4	OP + DEF %10 HA	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
5	OP + DEF %2,5 BN %10 HA	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
6	OP + DEF %5 BN %10 HA	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
7	OP + DEF %10 BN %10 HA	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
8	OP + DEF %2,5 BN	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
9	OP + DEF %5 BN	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10
10	OP + DEF %10 BN	Ovariectomi Operasyonu	Defekt Operasyonu	10	10	10

OP: Osteoporoz, **DEF:** Femur Defekti, **BN:** Bor Nitür, **HA:** Hidroksiapatit

3.3.3. Bilateral Ovariectomi için Cerrahi Uygulama

Dişi sıçanlar 25 mg/kg dozda tiopental sodyum ile anestezi altına alındı. Standart postüre getirilip sabitlenen deneklerin arcus costalar ve inguinal bölgelerle sınırlı alandaki tüyler tıraşlanıp, bölge povidon iyot çözeltisi ile temizlendikten sonra 2 cm'lik bir insizyon yapıldı. Abdominal kaviteyi çevreleyen kaslar açıldıktan sonra, omentum ekarte edilerek ovaryuma ulaşıldı. Proksimalde mesoovaryumdan, distalde ise cornu

uterustan dişli porteküler ile sıkıştırılarak koter yardımıyla overler bilateral ekzisyonla alındı. Kanama kontrolü yapılarak m.obliques externus abdominis ile m.obliques internus abdominis ve cilt altı dokular 4/0 poly (glycolide-co-lactide) emilebilen dikiş (SMI Surgicryl polyglactine) ile suture edildi. Operasyon steril şartlarda yapılmış olup tekrar steril şartlarda 3/0 SMI Daclon Nylon suture ile kapatıldı. Sıçanlar operasyon sonrası uygun ortamda barındırıldı. İlk 2 gün metamizol sodyum ve sefazolin sodyum 25 mg/kg günde 2 kez verilerek analjezi ve enfeksiyon riskinin azaltılması sağlandı. Bir hafta boyunca her gün sıçanlarda cerrahi bölge povidon iyot çözeltisi ile pansuman edildi.



Şekil 3.1. Bilateral Ovariectomi için Cerrahi Uygulama

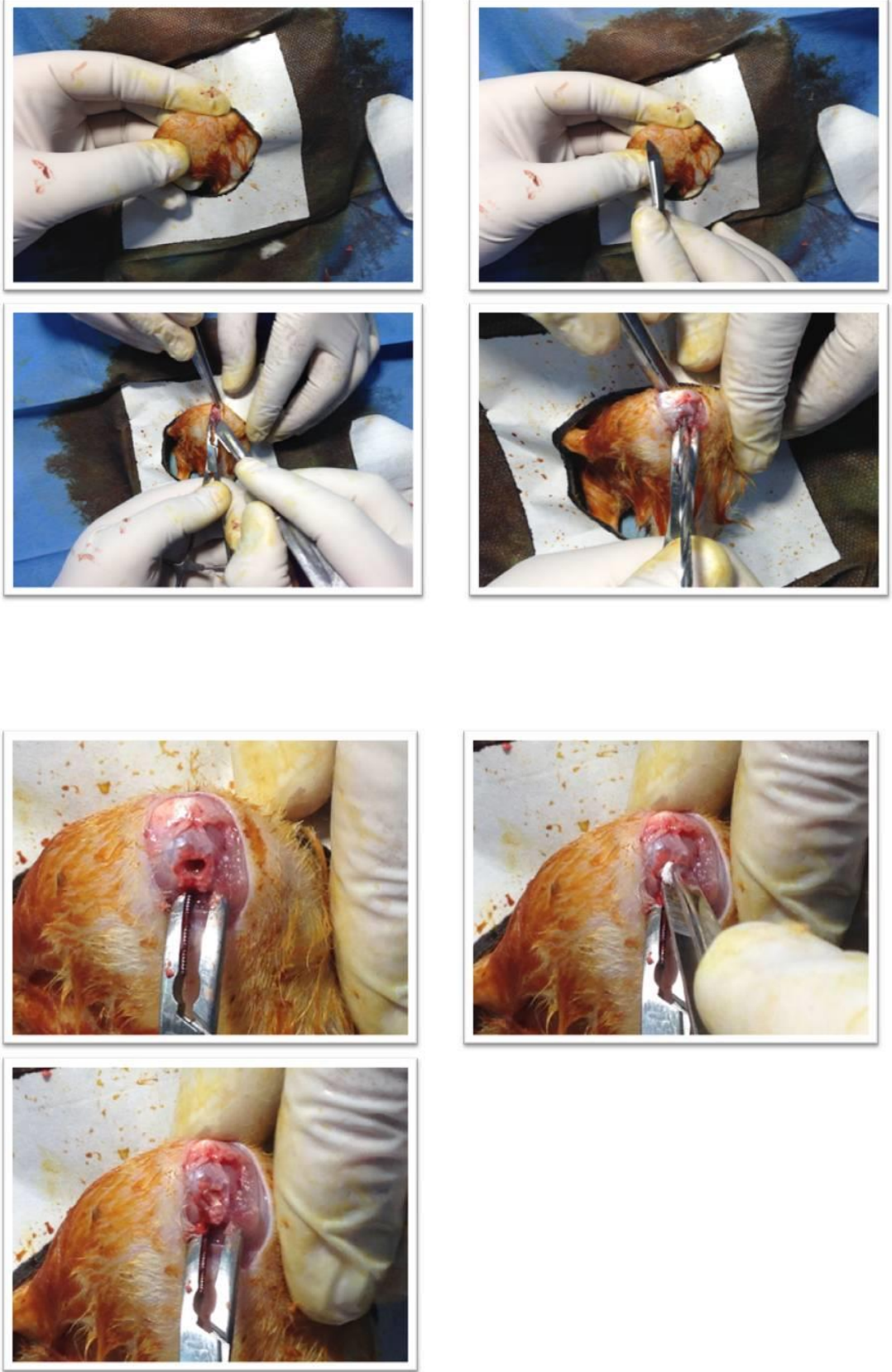
3.3.4. Osteoporotik Ratlarda Kemik Defektinin Oluşturulması

Ovariectomi yapıldıktan 12 hafta sonra gruplardaki tüm hayvanlar Sağlıklı kontrol (n=10), ovariectomi ile indüklenen osteoporozlu sadece kemik defekti yapılan ve material yerleştirilmemiş (n=30) ve ovariectomi ile indüklenen osteoporoz grupları (n=240) vücut ağırlıklarına göre rastgele gruplara ayrıldı.

Sağlıklı kontrol grupları dışında çalışmaya alınacak tüm sıçanlara intraperitoneal 25 mg/kg Thiopental Sodium verilerek genel anestezi uygulandı. Anestezi uygulanan

ratların sağ bacakları tıraşlandı. Povidon iyot çözeltisi ile silinip, femur distalinden longitudinal 2 cm'lik insizyon yapıldı. Kaslar künt diseke edilerek femur şaftına ulaşıldı ve tur motoruna bağlı piyasemene takılan 3 mm çapındaki yuvarlak uçlu paslanmaz elik frezle, steril serum fizyolojik çözeltisi irrigasyonu altında 3 mm genişliğinde, kemiğin korteks ve medulla tabakalarını içine alan kemik defektleri olusturuldu. Sonra defekt ara kısmına Bor-Hidroksiapatit/PLGA karışımları koyuldu. Defekt hattında stabilitenin kontrolü yapıldıktan sonra 4/0 Wicril ile kas fasyası, 4/0 keskin ipek sütün ile de cilt kapaması yapıldı. İlk 2 gүн metamizol sodyum ve sefazolin sodyum 25 mg/kg günde 2 kez verilerek analjezi ve enfeksiyon riskinin azaltılması sağlandı. Bir hafta boyunca her gүн sıçanlarda cerrahi bölge povidon iyot çözeltisi ile pansuman edildi.

Sağlıklı kontrol grubu dışında tüm gruplardaki ratlar kemik iyileşmesinin safhalarını araştırmak için sırasıyla 1. (n=10) 2. (n=10) ve 4. (n=10) haftalarda intraperitoneal 50 mg/Kg Thiopental Sodyum ile ötenazi uygulanarak sakrifiye edildi. Tüm gruplardan her hafta için sakrifiye edilen toplam rat femurların yarısı (n=5) histopatolojik çalışma için % 10'luk nötral formaldehit çözeltisine konularak tespit edildi. Herbir grup için kalan rat femurları (n=5) moleküler çalışmalar için -80°C dondurucuda muhafaza edildi. Formalin için ayrılan herbir grup için toplam 5 adet rat femuru histopatolojik çalışma öncesinde tomografi ve DEXA çalışmasına alınmıştır.



Şekil 3.2. Osteoporotik Ratlarda Kemik Defektinin Oluşturulması

3.3.5. Scaffold İmalatı

3.3.5.1. PLGA (poly-(lactide-co-glycolide) İskelesinin (Taşıyıcı) Yapımı

PLGA taşıyıcı iskeleleri daha önce Dan Li, ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada göstermiş oldukları metoda küçük modifikasyonlar yapılarak hazırlandı.²¹³ Kısaca, 212 ve 425 µm çapında olacak şekilde sodyum klorür (NaCl) parçacıkları elekler yardımıyla elde edildi. %12 PLGA/ 1,4-dioksan çözeltisi gruplarda belirlenen oranlarda hazırlanan Bor Nitrür ve Hidroksiapatit oranında karıştırılarak 1 saat boyunca 45°C’ de sonikasyon yapıldı. Hazırlanan çözeltiler 1: 10 oranında PLGA/NaCl olacak şekilde tuz ile karıştırıldıktan teflon kalıplar içerisine dökülerek -20°C de 1 saat inkübe edildi.

Daha sonra örnekler 2 gün süre ile freeze-dry yapıldıktan sonra saf su içerisine atılarak tuzun çözünmesi sağlandı. Her 6 saatte bir suyu değiştirilen örnekler 2 gün sonra -80°C de dondurulduktan sonra 2 gün daha freeze-dry edildi. Deney numuneleri -80°C’ de deney gününe kadar saklandı.



Şekil 3.3. BN/HA emdirilmiş PLGA scaffoldların hazırlanması

3.3.6. Sol-Jel Yöntemiyle HA Üretimi

Deneysel çalışmalarda kalsiyum ve fosfor bileşenleri olarak kalsiyum nitrat tetra hidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Merck, %99) ve amonyum dihidrojen fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Sigma Aldrich, %99) seçilmiş olup solüsyonda pH ayarı için amonyak (NH_3 , Merck)

kullanılmıştır. Kalsiyum öncü bileşeni etil alkolle (C_2H_5OH , Merck) hazırlanırken fosfor bileşeninin hazırlanmasında ultra saf su kullanılmıştır.

Uygulanan yöntemde amonyum dihidrojen fosfat ($NH_4H_2PO_4$) ve kalsiyum nitrat tetra hidratın ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$) başlangıç çözeltileri $Ca/P = 1.67$ olacak şekilde hazırlanarak her bir çözeltinin pH'sı NH_3 ile 10'a ayarlandıktan sonra kalsiyum çözeltisi fosfat çözeltisine bir peristaltik pompa ile $3 \text{ mL} \cdot \text{dk}^{-1}$ lık hızla ilave edilirken, süspansiyon bir mekanik karıştırıcı ile 600 rpm'de karıştırılarak homojenlik sağlanmıştır. Yaşlandırma süresi sonunda ortamda bulunan NO_3^- ve NH_4^+ iyonlarını uzaklaştırmak için santrifüjleme sonrası ultra saf su ile yıkama yapılmış olup süzme işlemini takiben yapılan kurutma sonucu nano boyutlu HA üretilmiştir. Deneysel parametreler Tablo 3.2'deki gibidir.

Tablo 3.2. Hidroksiapatit üretiminde incelenen deneysel parametreler

Reaksiyon Sıcaklığı ($^{\circ}C$)	Oda sıcaklığı
Yaşlandırma zamanı (h)	48
Kurutma sıcaklığı ($^{\circ}C$)	80
Kurutma süresi (h)	12
Sinterleme sıcaklığı ($^{\circ}C$)	750
Sinterleme süresi (h)	3

3.3.6.1. HA Üretiminde Yapıya Yönelik Karakterizasyonu

Sentezlenen HA örneklerinin yapılarını belirlemek için XRD (Bruker D8 Advance) FTIR (Perkin Elmer Pyris 1 FTIR), Raman (Renisaw InVia Raman) ve TG/DTA (NETZSCH STA 409 PC Luxx) analizleri yapılmıştır.

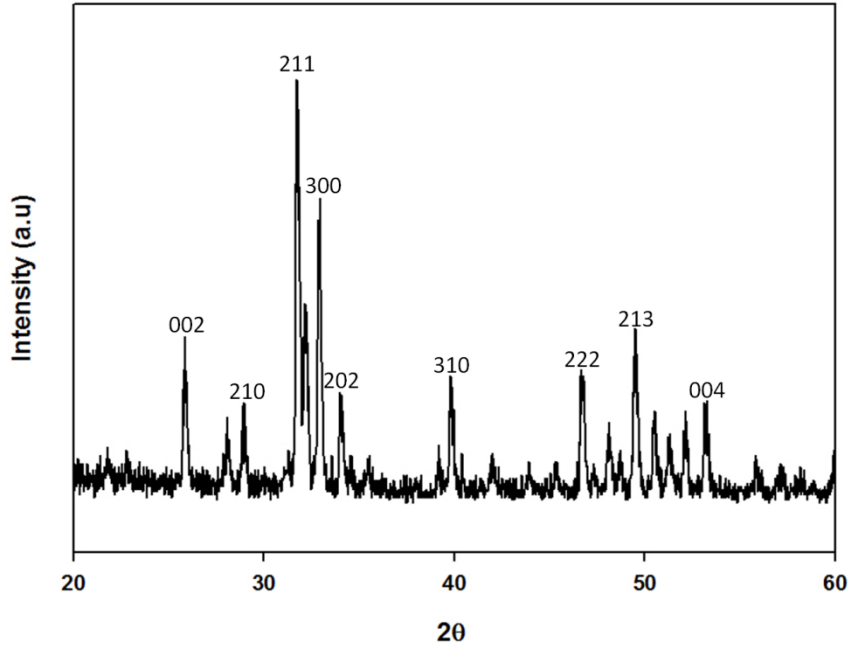
X-ışını difraksiyonu (XRD), malzemelerin kristalografik özelliklerinin ve içerdikleri fazların belirlenmesini sağlayan analiz yöntemidir XRD, her bir kristal fazın

kendine özgü atomik dizilimlerine bağlı olarak üzerine gönderilen X-ışınlarını karakteristik bir düzen içerisinde kırması esasına dayanır. Her bir kristalin faz için bu kırınım profilleri bir nevi parmak izi gibi o kristali tanımlar. X-ışını difraksiyonu sonucu kristal yapısının yanı sıra, tane boyutu ve tercihli yönlenme gibi özellikler belirlenebilir. Aynı zamanda, içerdiği fazlar hakkında bilgi sahibi olunmayan numunelerin analizi sonucunda elde edilen verilerin ilgili veri tabanı ile karşılaştırılması sonucu numunenin içerdiği fazlar belirlenebilir. XRD analizlerinde Bruker D8 Advance XRD cihazı (adım aralığı $0.02^\circ 2\theta$, $10^\circ 2\theta/\text{min}$ artış hızı) kullanılmış olup kristal çapları (002) ve (300) düzlemlerinden yansıyan ışınlardan yararlanarak Sherrer eşitliği ile hesaplanmıştır.

Sherrer eşitliği;

$$d = k \lambda / b \cos \theta \quad .^{214}$$

olup bu eşitlikte d = kristal çapı ($\text{\AA}$), k = şekil faktörü (~ 0.9), λ = dalga boyu ($\text{\AA}$), θ Bragg derecesi ve b maksimum pikin yarı yükseklikteki radyan olarak genişliğidir.²¹⁴ Sherrer eşitliği ile kristal çapının hesaplanmasını gösteren örnek hesaplama EK 1’de verilmiştir. XRD analiz sonuçları ICDD referans difraktogramlarla kıyaslama yapılarak elde edilen ürün karakterize edilmiştir. Tablo 3.3’deki kafes parametreleri MDI Jade 5.0 XRD yazılım programıyla hesaplanmış olup kristal çapları ise Debye-Sherrer eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. 48 saat yaşlandırma süresi sonucu üretilen 750°C’de sinterlenmiş numunenin XRD spektrumu

Tablo 3.3. Sentezlenen HAp’ye ait kafes parametreleri ve kristal çapları

Kafes parametreleri		Birim hücre hacmi	Kristal çapları (nm)	
a_0 (Å)	c_0 (Å)	(Å) ³	d [002]	d [300]
9.423	6.885	529.44	22.97	19.86

FTIR analizi moleküllerin IR ışığını (0,78–1000 μm dalga boylu veya 12800–10 cm^{-1} dalga sayılı) absorpsiyonuyla titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanır. Moleküler maddeler için infrared absorpsiyon emisyon ve yansıma spektrumları; spektrumların, moleküllerin bir titreşim veya dönme enerji seviyesinden ötekine geçişleriyle sağlanan enerjideki çeşitli değişimlerden kaynaklandığı varsayımıyla açıklanabilir. Genellikle 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} arasında kalan orta IR bölgesi kullanılır. Uzak IR bölgesi metal ametal bağlarını içerdiği için özellikle anorganik bileşiklerin (koordinasyon bileşikleri) yapılarının aydınlatılması açısından

önemlidir. Dalga sayısı ($1/\lambda$), hem enerji hem de frekansla doğru orantılı olduğundan, infrared spektroskopide genellikle doğrusal bir dalga sayısı ölçeği kullanılmaktadır. Titreşim frekansını kullanmak sayısal olarak ölçeklenmeye uygun olmadığından dalga sayısının kullanılması tercih edilmektedir. FTIR analizlerinde $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında çalışan Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) kullanılmıştır. Analiz numuneleri KBr ile 100:3 (KBr:HA) oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.3.7. Trikalsiyumfosfat (Tcp)–Hekzagonal Bor Nitrür Kompozitlerinin

Hazırlanması

Uygun bileşimdeki kompozit reçetelerinin hazırlanmasında TCP(tri kalsiyum fosfat) tozları kullanılmıştır. Yapılan çalışmada tozlar agat havanda uygun tane boyutuna getirildikten sonra plastik değirmende zirkonya bilya kullanılarak sulu ortamda karıştırılmıştır. Denemelerde porozite oluşturmak amacıyla farklı oranlarda PVA(polyvinilalkol) kullanılmıştır. Standart TCP ve TCP-hBN kompozit kompozisyonları bilyalı değirmende hazırlanmıştır. Hazırlanan çamurlar etüvde 24 saat kurutulduktan sonra halkalı değirmende 3 dakika süre ile öğütülmüştür. Tozların ısı özellikleri DSC cihazında belirlenmiştir. Tozların şekillendirilmesinde tek eksenli el presi kullanılmıştır. Tozlar 17 mm çapa sahip çelik kalıplar kullanılarak 500 psi yük altında pelet haline getirilmiştir. Şekillendirilen numuneler, etüvde 24 saat bekletildikten sonra 600°C 'de bağlayıcı uzaklaştırma işlemine tabi tutulmuştur.

Numunelerin ısı işlemleri $900\text{--}1000\text{--}1100\text{--}1200^{\circ}\text{C}$ 'de olmak üzere dört ayrı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Numunelerin boyut küçülmeleri hesaplanmış, yoğunlukları Archimedes prensibine göre ölçülmüş ve görünür poroziteleri hesaplanmıştır. Numunelerin görüntü analizleri SEM (taramalı elektron mikroskobu) cihazında gerçekleştirilmiştir. XRD analizleri numuneler öğütüldükten sonra Rigaku

Rint 2000 x- ışınları difraktometresinde 2°/dk hız ile 10-70° 2θ açıları arasında CuKα x-ışını ile gerçekleştirilmiştir.

Numunelerin karakterizasyonu sonrasında elde edilen porozite miktarlarına ve yoğunluk değerlerine göre en uygun reçete ve ısıtma işlem sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.3.8. Bor Nitrür ve Hidroksiapatit Emdirilmiş Scaffold Malzeme

Karakterizasyonu

Kompozit malzemeler yapısal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Yapısal karakterizasyonda Raman Spektroskopisi tekniği kullanılırken, morfolojik incelemede ise Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniğinden yararlanılmıştır.

3.3.8.1. Raman Spektroskopisi İle Yapısal Karakterizasyon

Raman spektroskopisi, molekül ve kristal örgülerdeki bağlı atomların elektron bulutlarının, gelen ışıkla etkileşerek titreşmesi sonucunda meydana gelen Raman saçılma sürecine dayanmaktadır. Raman spektrumundan organik ve inorganik maddelerin bağları hakkında kalitatif ve kantitatif bilgilerin yanı sıra madde veya malzeme yapısını meydana getiren ilgili fonksiyonel gruplar hakkında da bilgi edinilebilmektedir. Raman Spektroskopi Analizlerinde Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan, 532 nm yeşil lazer eklentisine sahip Renishaw Raman InVia cihazı kullanılmıştır.

3.3.8.2. Morfolojik Karakterizasyon

Taramalı elektron mikroskobunda (SEM), yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına

aktarılmasıyla görüntü elde edilir. SEM analizlerinde Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan SEM (JEOL MultiBeam 4601F) cihazı kullanılmıştır. SEM'de numunelerin yüzeylerinde kullanılan enerji ve akım değerlerine bağlı olarak yüksek büyütmelelere çıkılabilirken, görüntülerin çözünürlük kalitesi malzemeye de bağlıdır. Örneğin elektriksel olarak yüklenen örnekler SEM içerisinde görüntü distorsiyonuna neden olacağı için, işlem öncesi iletken ince filmlerle kaplanmalıdırlar. Bu çalışmadaki tüm örnekler tek kullanımlık bir bıçak ile dikine kesilerek iç kesitleri elde edilmiş ve SEM öncesi ince Pt/Pd filmler ile kaplanmıştır. Bunu takiben, görüntüleme için SEM'de düşük voltajlar (3-5 keV) kullanılmıştır.

3.3.9. Radyolojik Çalışmalar

3.3.9.1. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Analizi

Tüm sıçanların sağ alt ekstremitte tiyopental sodyum ile ötenazi sonrası çıkarıldı. BT analizi 256-kesitli helikal BT kullanılarak yapıldı (SOMATOM Definition Flash CT, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany). Femurlarda hem defekt hemde defekt olmayan bölgelerden ROI ölçümleri Hounsfield Unit (HU) olarak belirlendi. ROI(Region Of Interest) ölçüm alanı 0.469- 0.760 mm² olarak kullanıldı. Defekt olmayan alan, defektli alana bölünmesi ile normalleştirilmesi gerçekleştirildi. Defekt çapları milimetrik olarak ölçüldü. Buna ek olarak, 3-D (VRT volumetric rendering techniques) görüntüler rekonstrüksiyon tekniği kullanılarak resimlendirildi.

3.3.9.2. Dual Enerji X-ray Absorptiometre (DEXA) Analizi

Tüm sıçanların sağ alt ekstremitte tiyopental sodyum ile ötenazi sonrası çıkarıldıktan sonra in vitro olarak değerlendirildi. Kemik mineral yoğunluğu ölçümü (BMD g/cm²) küçük hayvanlarda kemik mineral yoğunluğu değerlendirilmesi için

uygun olan bir yazılım ile donatılmış Discovery Wi (Hologic Inc., Bedford, MA, U.S.A.) kullanılarak DEXA yöntemi ile analiz edilmiştir.

3.3.10. Histopatolojik Analizler

3.3.10.1. Rutin Histolojik ve Hematoksilen Eozin Prosedürü:

Fiksatif içinde bulunan sert doku örnekleri %10'luk nitrik asit içerisine atıldı. Her gün solüsyon değiştirilerek, iğne yardımıyla doku yumuşaması takip edildi. 2-10 günlük süre boyunca dokularda dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra bir gece boyunca yıkamaya alınan dokulara devamında artan alkol serilerinde dehidratasyon, ksilende şeffaflaştırma ve parafinde infiltrasyon işlemleri yapılarak bloklar haline getirildi.

3.3.10.2. Leica TP 1050 Cihazı Takip Basamakları:

%10' luk tamponlanmış formalin (1 saat 15 dakika), %70' lik alkol (1 saat), %80'lik alkol (1 saat), %90'lık alkol (1 saat), saf alkol (1 saat), saf alkol (1 saat), saf alkol (1 saat 15 dakika), ksilol (1 saat), ksilol (1 saat), ksilol (1 saat 15 dakika), parafin (1 saat), parafin (1 saat), parafin (1 saat 15 dakika) şeklindedir.

Cihaz, formalin, alkol, ksilen basamaklarında 40°C, parafin basamağında 65°C'de çalışmaktadır. Takip sonrası elde edilen dokular, Leica EG1160 bloklama cihazında 67°C sıcaklıkta eriyik parafin ile bloklandı. Bloklanan dokular -4°C'de soğutuldu. Leica RM 2145 mikrotom cihazı ile her bir bloktan 5'er mikron kalınlığında 2'şer kesit su banyosuna alındı. Bu 2 kesitin 1 tanesi HE için normal lama, diğeri immunohistokimya için polilizinli şarjlı lama alındı. Rutin histopatolojik inceleme için lam üzerine alınan kesitler, 30 dakika, 70°C sıcaklıkta, EN 055 Etüvde deparafinize edildikten sonra; 10 dakika ksilolde bekletildi.

Leica Autostainer XL otomatik boyama ve kapama cihazında HE boyaması otomatik prosedür ile yapıldı. Prosedür; ksilol (2 basamak) - absolü etil alkol (3 basamak) basamakları ardından yıkama safhasını takip ederek hematoksilin ile 5 dakika yıkama ve ardından asit alkole daldırıp çıkarma, tekrar yıkama, amonyak yıkama basamakları ardından eozin ve yıkama solüsyonuna daldırılıp çıkarma işlemi ve absolü etil alkol (3 basamak), ksilol (2 basamak) şeklindedir.

Otomatik boyama ve kapama cihazında son basamak entellan damlatılarak kapatılması olup preparatların incelemeye hazır hale getirildi.

3.3.11. Moleküler Çalışmalar

3.3.11.1. Gerçek Zamanlı PCR Analizi

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Moleküler Farmakoloji Laboratuvarlarında moleküler analiz işlemlerinin tümü gerçekleştirildi.

3.3.11.2. RNA İzolasyonu

1., 2. ve 4. hafta alınan femurlar kaslardan tamamen ayrılarak defekt bölgesi moleküler analizler için diseke edildi ve eppendorf tüp içerisine konuldu, tüm dokuyu kaplayacak şekilde RNA Later RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra 20°C’de muhafaza edildi.

Dokular RNA Later içerisinden çıkartılarak çelik jarların içerisine konularak sıvı azot ile mikroskopik parçalama yapıldı. Soğuk zincir korunarak her gruptan 20 mg femur dokusu alınarak 600 µl Buffer RLT + 6 µl β-mercaptoethanol (β-ME) solüsyonu ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye bulunan plastik tüplere konuldu ve Tissue Lyser II (Qiagen) homojenizasyon cihazı ile 5 dk 30 Hz olacak şekilde homojenize

edildi. Homojenizasyon işleminden sonra yeni bir eppendorf tüp içerisine alındı ve 3 dk 13.000 RPM’de santrifüj edildi.

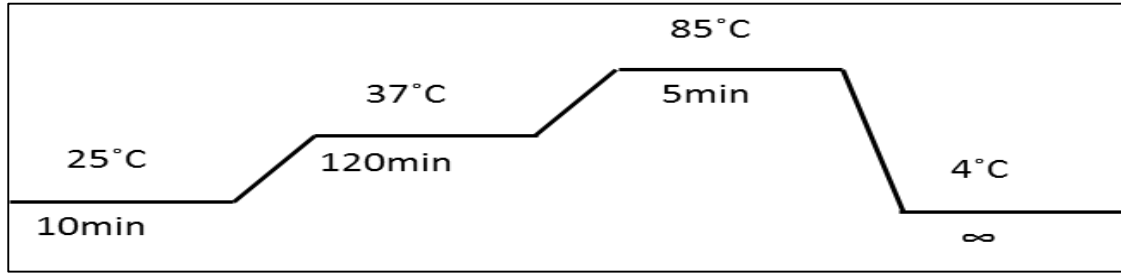
Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve RNeasy Mini Kit (cat no: 74106)’in protokolüne göre total RNA izolasyonu QIAcube (QIAGEN) yapıldı. Eppendorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80°C’de muhafaza edildi.

3.3.11.3.Reverse Transkriptaz Reaksiyonu ve cDNA Sentezi

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enzimi kullanımı ile total RNA’dan cDNA sentezi yapıldı. Her reaksiyon Tablo 3.4’de gösterildiği gibi toplam hacim 10µl RNA olacak şekilde hazırlandı ve cDNA sentezi Şekil 3.5.’deki sıcaklık değerlerine göre Veriti 96 Well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) ile sağlandı. cDNA miktarı nano-drop spektrofotometri (EPOCH Take3 Plate, Biotek) ile ölçüm belirlendi ve -20°C’de saklandı.

Tablo 3.4. cDNA sentezi için kullanılan mix içeriği

PCR Master mix içeriği	Mix Miktar(µl)
10X Buffer RT	2
25 X dNTPs mix	0,8
10 X RT Random Primers	2
MultiScribe Reverse Transcriptase	1
DEPC-H₂O	4,2
RNA	10
Toplam	20



Şekil 3.5. Thermal cycler koşulları

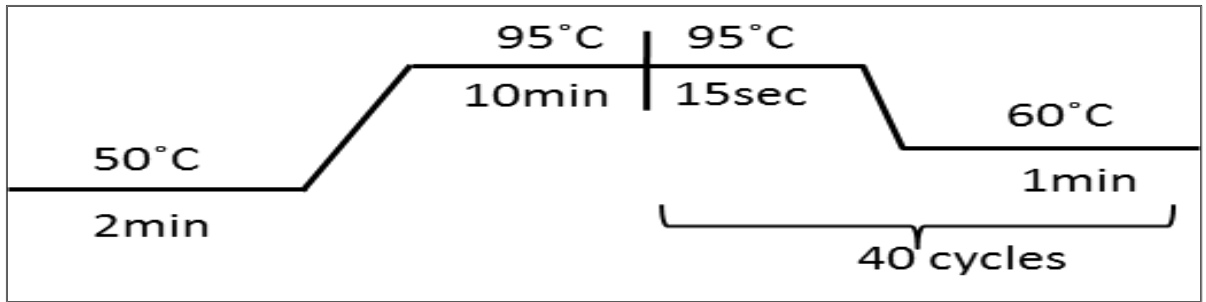
Tablo 3.5. Rölatif Gene Ekspresyonu Primer/Prob Dizilimleri

OP	İleri Primer	CTC TTC CAA GCA ACT CCA ATG A
	Geri primer	GTT CAC AGA ATC CTC GCT CTC
ALP	İleri primer	CGCAACAACGCAATCTATGAC
	Geri primer	GGACAGCAATGGGGGTTCT
TRAP5B	İleri primer	CGCAACAACGCAATCTATGAC
	Geri primer	GGACAGCAATGGGGGTTCT
BMP-2	İleri primer	GTC CTT TTC CCC TGG CTG AT
	Geri primer	TCT AGG TAC AAC ATG GAG ATTGC
Runx-2	İleri primer	TTCCAGACCAGCAGCACTC
	Geri primer	GGGGACCAATTGGGAAGTGA
TNF-α	İleri primer	GCT CCC TCT CAT CAG TTC CA
	Geri primer	CTC CTC TGC TTG GTG GTT TG
ACTB	İleri primer	TGG TGG GTA TGG GTC AGA AG
	Geri primer	GAC AAT GCC GTG TTC AAT GG

3.3.11.4. Gerçek Zamanlı PCR Primerleri ve Çalışma Prensipleri

Rölatif TNF-α, OP, BMP-2, RUNX-2, ALP ve TRAP5B mRNA ekspresyonları rat femur dokularında StepOne Plus Real Time PCR System technology (Applied Biosystem) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. TaqMan bazlı ilgili genlerin primer

probları Primer Design Ltd. firmasında dizayn ettirilip temin edildi (Southampton, UK). İlgili gen sekanslar dizilimleri Tablo 3.5.'de verilmiştir. Sonuçlar kontrol grubuna göre kat-değişim (fold change) olarak değerlendirildi. Endojen kontrol gen olarak β -actin kullanıldı ve her bir cDNA örneği için üç tekrar uygulandı. Real Time PCR reaksiyonu 96 kuyucuklu plaklarda 9 μ l cDNA (100 ng), 1 μ l Primer Perfect Probe miks ve 10 μ l QuantiTect Probe PCR Master miks (Qiagen, Hilden, Germany) olacak şekilde toplam reaksiyon volumü her bir kuyucukta 20 μ l'ye tamamlandı. qPCR Hazırlanan reaksiyon plağı 2 dk 50°C, 10 dk 95 °C'de bir siklüs ve 15 sn 94 °C, 60 sn 60 °C'de 40 siklüs olacak şekilde yürütüldü (Şekil 3.6). Tüm veriler kontrol grubuyla karşılaştırmalı şekilde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna göre hesaplandı.²¹⁵



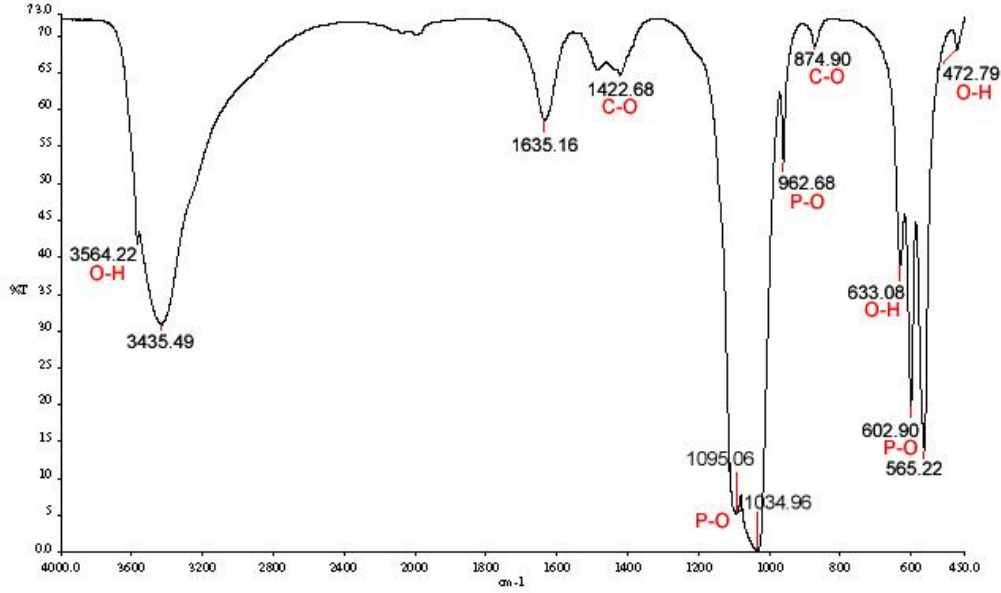
Şekil 3. 6. Gerçek Zamanlı PCR Reaksiyon ısı ve süreleri

3.3.12. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile ve post-hoc testlerinden “Tukey” tekniği kullanılarak belirlendi. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Her bir farklı harf diğer gruptan istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir. Aynı harfler anlamsız olduğunu göstermektedir.

4. BULGULAR

HA Üretimide Yapıya Yönelik Karakterizasyon Analizleri

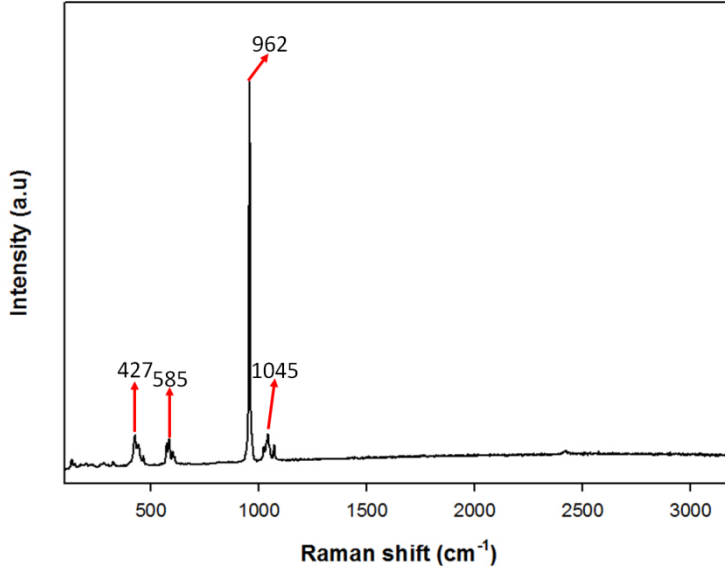


Şekil 4.1. Sentezlenen HAp numunesine ait FTIR spektrumu

Yapıda hidroksiapatit varlığının ilk belirtisi 1000-1100 cm⁻¹ aralığındaki geniş FTIR bandıdır.²¹⁴ Ayrıca 633 cm⁻¹ ve 3568 cm⁻¹'deki pikler stokiometrik HA'nın karakteristik pikleridir.²¹⁶ Bu piklerin varlığı ve XRD sonuçları bize saf stokiometrik HA'nın elde edildiğini doğrulamaktadır. 962 cm⁻¹'de görülen pik, PO₄³⁻ iyonundaki P-O arasındaki v1 tipi simetrik gerilme titreşimine aittir. Fosfat grubunun en büyük ve şiddetli piki olan v3 piki; 1095 cm⁻¹'de gözlenmiştir. 565-603 cm⁻¹ arasındaki band kristal kafeste iki siteyi kaplayan v4 tipi fosfat grubu eğilme titreşim moduna aittir. Bu aralıkta spektrumda belirgin olarak görülen iki pik; moleküllerin düşük site simetrisi gösterdiğini ve HAp kristal kafesinde birden daha fazla sitenin varlığını gösterir.²¹⁷ 473 cm⁻¹, 633 cm⁻¹ ve 3564 cm⁻¹'de görülen pikler HA'daki OH⁻ grubuna ait olup 3564 cm⁻¹ piki serbest O-H gerilme titreşimidir. 1635 cm⁻¹'deki pik ise bağlı suyun eğilme titreşimine aittir.²¹⁸ HAp kristalizasyonu bazik (pH=10) ortamda gerçekleştiğinden CO₃²⁻ oluşmasına sebep olan atmosferik CO₂'in çözünmesi FTIR spektrumlarımızda 875

cm^{-1} ve 1423 cm^{-1} 'de görünen inorganik karbonata ait pikler literatüre uyumlu olarak.²¹⁸ karşımıza çıkmaktadır. Spektrumlarımızda 875 cm^{-1} 'de görünen pik; $\nu_2 \text{ CO}_3^{-2}$ piki olup HAp yapısındaki PO_4^{-3} 'ın A veya B tipi karbonat yer değiştirmesine işaret etmektedir. A tipi karbonat bandları $1550, 1457$ ve 880 cm^{-1} 'de tespit edildiğinden ve daha önce yapılan benzer çalışmalardaki sonuçlar da göz önünde bulundurulduğunda karbonat yer değiştirmesinin B tipi olduğu düşünülmektedir. IR spektrumundaki en güçlü CO_3^{-2} piki ise 1423 cm^{-1} 'deki ν_3 modu olup genellikle iki bandan oluşur. Spektrumlarımızdaki ν_3 modunun şekli ve 700 cm^{-1} 'de C-O adsorpsiyon bandının olmayışı HAp ile birleşmiş kalsit yapısının olmadığını ve CO_3^{-2} 'ın apatit yapısındaki PO_4^{-3} ile yer değiştirmek suretiyle yapıya katıldığını gösterir. Kemik ağırlıkça %4-6 oranında karbonat içerdiğinden sentezlenen HA yapısındaki CO_3^{-2} varlığının biyoaktiviteyi artıracığı düşünülmektedir.²¹⁹

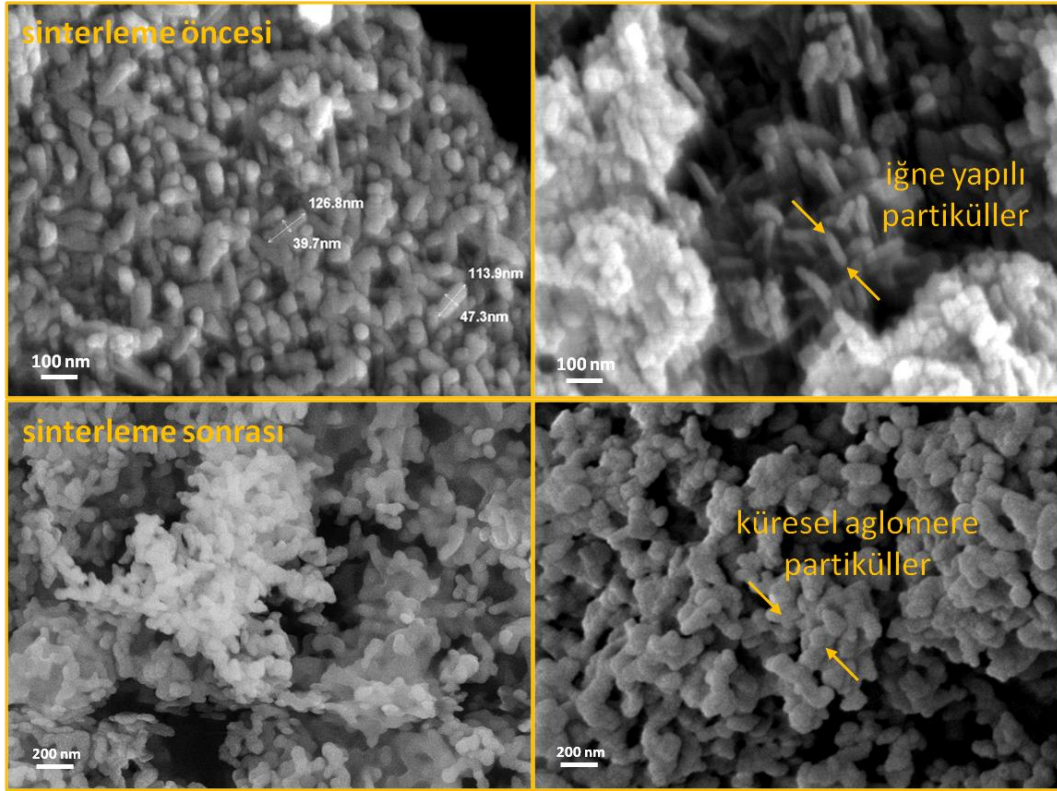
Şekil 4.2'de katkısız HAp numunesine ait Raman spektrumu görülmektedir. Spektrumda 962 cm^{-1} 'de görülen karakteristik pik, tetrahedral PO_4 grubunun (P-O bağı) tamamen simetrik gerilme modundan (ν_1) kaynaklanmaktadır.²²⁰⁻²²² PO_4 grubundaki üçlü dejenere (P-O-P bağı) bükülme modu (ν_4) spektrumumuzda 585 cm^{-1} 'de görülmektedir.^{221, 223} 1045 cm^{-1} 'de görülen orta şiddetteki pik, PO_4 grubunun (P-O bağı) üçlü dejenere asimetric gerilme moduna (ν_3) aittir. Son olarak spektrumunda 427 cm^{-1} 'de görülen zayıf pik ise PO_4 grubundaki çiftli dejenere (P-O-P bağı) bükülme modunu (ν_2) göstermektedir.^{221, 224}



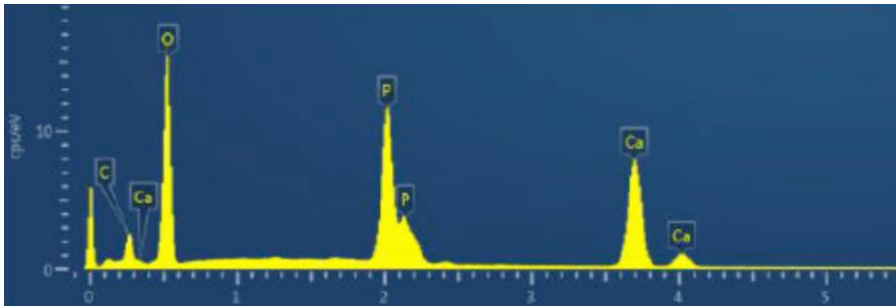
Şekil 4.2. HAp örneğine ait raman spektrumu

HA Üretimde Morfolojiye Yönelik Karakterizasyon Analizleri

Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) görüntüyü yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskopunun kullanım alanını genişletmektedir. Elektron mikroskobu ile birlikte kullanılan X-ışını Spektrometresi, ^4Be , ^{92}U arasındaki elementleri K-L serileri arasında analizlemek için gerekli dalga boyu aralığını kapsar. SEM-EDS analizlerinde Sabancı Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan SEM (JEOL MultiBeam 4601F)- EDS (Oxford Instruments) cihazları kullanılmıştır. Numunelerin yüzeyi iletken olmadığından elektron mikroskopi incelemeleri esnasında yüzeylerin yüklenmemesi için örnekler altın ile kaplanmıştır.



Şekil 4.3: Sinterleme öncesi ve sonrası HAp örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri

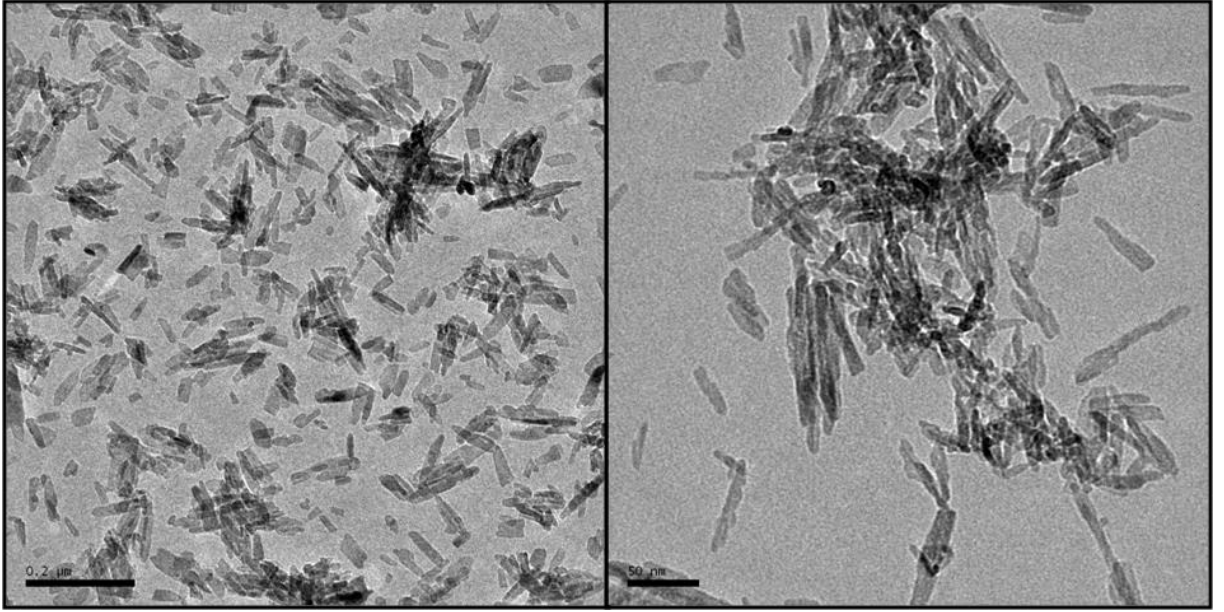


Şekil 4.4: Üretilen HAP numunesine ait EDS spektrumu

Tablo 4.1. HAp örneğine ait elementel analiz verileri

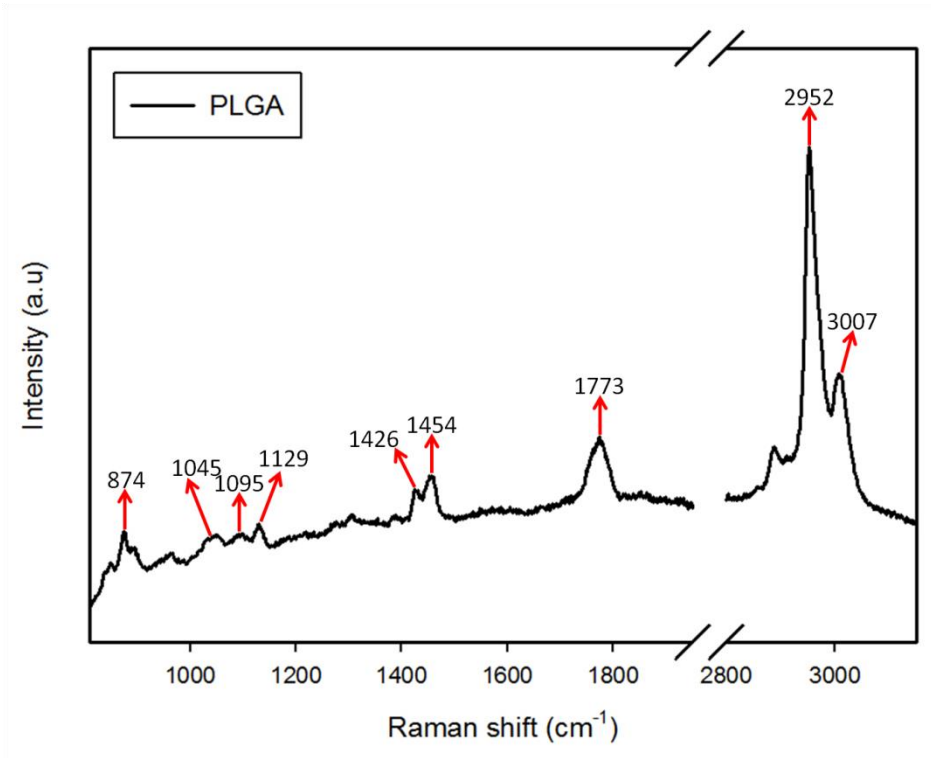
Element	% Ağırlık	%M(mol)
Ca	35.35	0.18
P	16.79	0.11
O	33.01	0.17
Au	14.85	0.28
Toplam	100	

Geçirimli Elektron Mikroskobu veya TEM (Transmission Electron Microscope) temelde optik mikroskoplara benzemesine rağmen cismin içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanır. Max Knoll ve Ernst Ruska tarafından 1930’larda yapılan çalışmaların sonucu ortaya çıkan geçirimli elektron mikroskobu, ışık yerine elektronları kullandığından görüntüleme ışığın dalga boyundan bağımsız olduğu için optik mikroskoplarla kıyaslandığında çok daha küçük ayrıntıları yüksek çözünürlükte görmeye olanak tanır. TEM analizleri, 200 kV’da çalışan (LaB₆ filament) JEOL JEM 2100 HRTEM marka geçirimli elektron mikroskobu ile incelenmiş olup, görüntüler Gatan Model 694 Slow Scan CCD kamera ile elde edilmiştir.



Şekil 4.5. Üretilen HAp'nin TEM görüntüsü

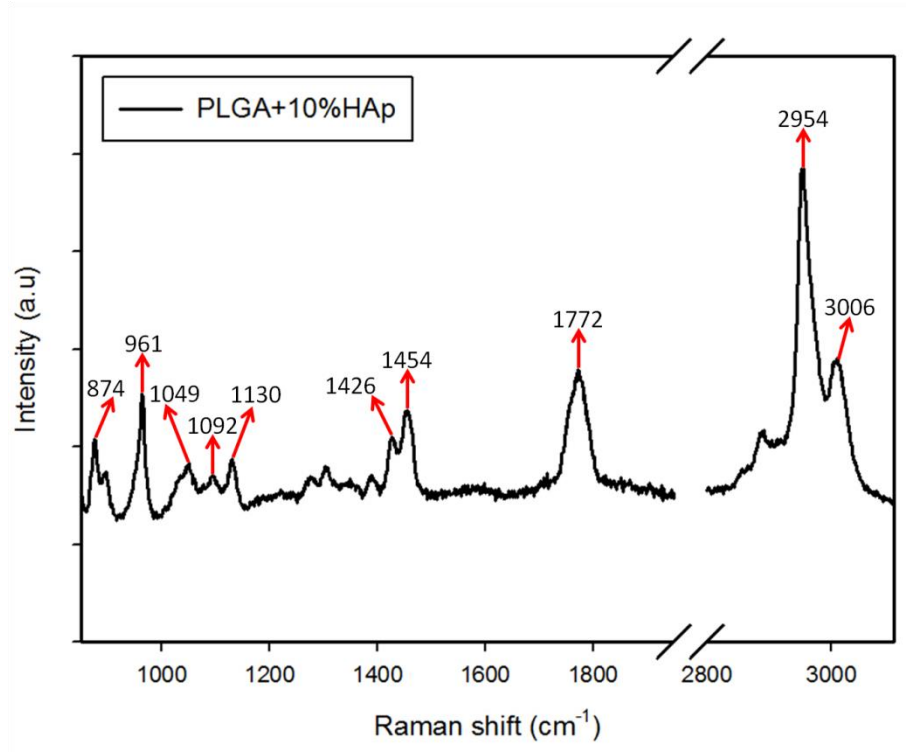
4.1. Raman Spektroskopisi İle Yapısal Karakterizasyon Analizi



Şekil 4.6. PLGA örneğine ait Raman spektrumu

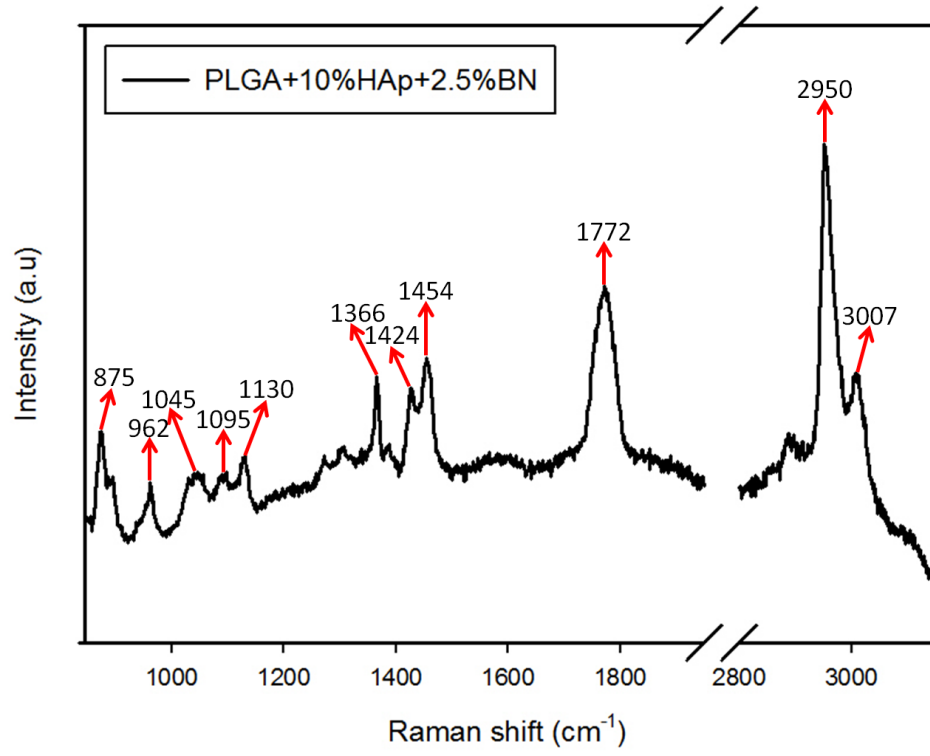
Şekil 4.6.'de katkısız PLGA numunesine ait Raman spektrumu görülmektedir. Spektrumda 874 cm^{-1} 'de görülen karakteristik pik glikolik asit birimindeki C-COO grubundaki gerilme moduna aittir.²²⁵ 1045 cm^{-1} 'de görülen orta şiddetli pik, laktik asit

grubundaki C-CH₃ gerilme moduna aitken, 1129 cm⁻¹'de görülen orta şiddetli pik ise yine laktik asit grubundaki sallanma moduna aittir.²²⁵⁻²²⁷ Spektrumda 1454 cm⁻¹'de görülen orta şiddetli pik, laktik asit birimindeki CH₃'ün asimetric bükülme moduna aittir.²²⁷ Glikolik asit birimindeki CH₂ gerilme moduna ait pik ise spektrumda 1426 cm⁻¹'de görülmektedir.²²⁵ Spektrumda 1095 cm⁻¹'de görülen orta şiddetli pik, laktik asit birimindeki COC simetric gerilme moduna aittir.²²⁵ 1773 cm⁻¹'de görülen karakteristik pik, ester grubunun C=O gerilme moduna aittir.²²⁸ Glikolik asit birimindeki CH₂ simetric gerilme moduna ait pik 2952 cm⁻¹'de, asimetric gerilme modu ise 3007 cm⁻¹'de görülmektedir.²²⁵

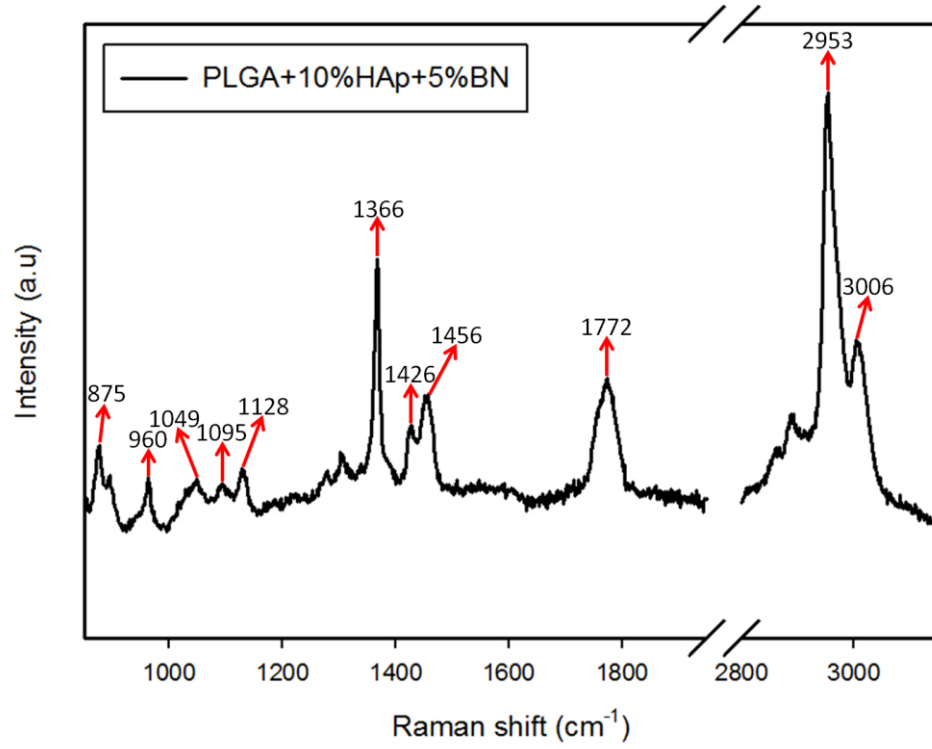


Şekil 4.7. %10 HAp içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu

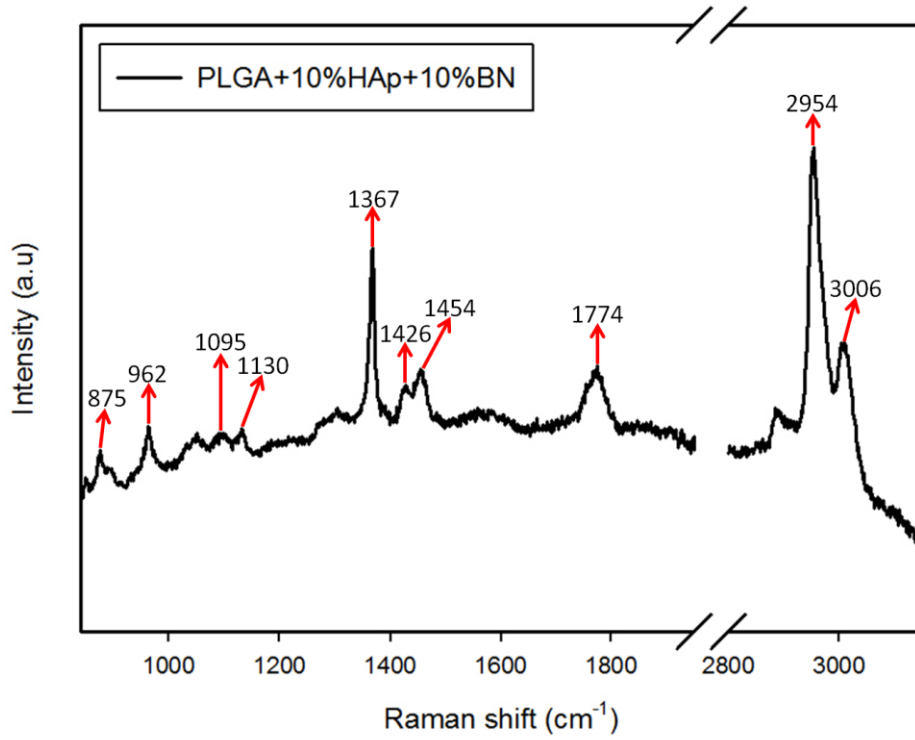
Şekil 4.7'de %10 HAp içeren PLGA numunesine ait Raman spektrumu görülmektedir. Spektrumda katkısız PLGA örneğine ait piklere ilaveten 961 cm⁻¹ civarında görülen karakteristik pik, hidroksiapatitteki tetrahedral PO₄ grubunun (P-O bağı) tamamen simetric gerilme modundan (v₁) kaynaklanmaktadır.^{220, 229, 230}



Şekil 4.8. %10 HAp ve %2.5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu

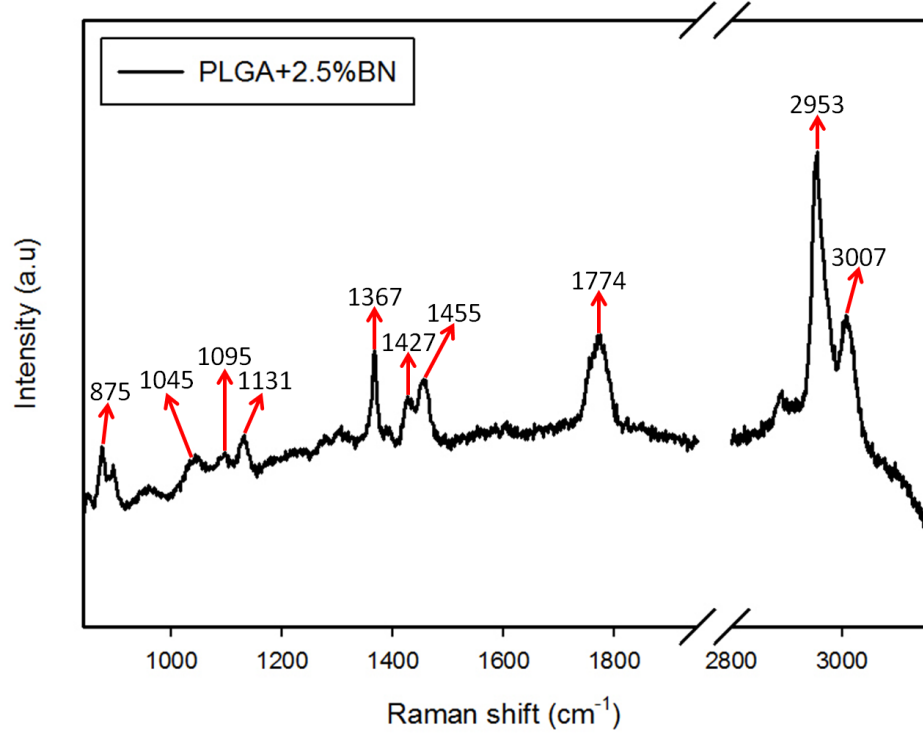


Şekil 4.9. %10 HAp ve %5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu

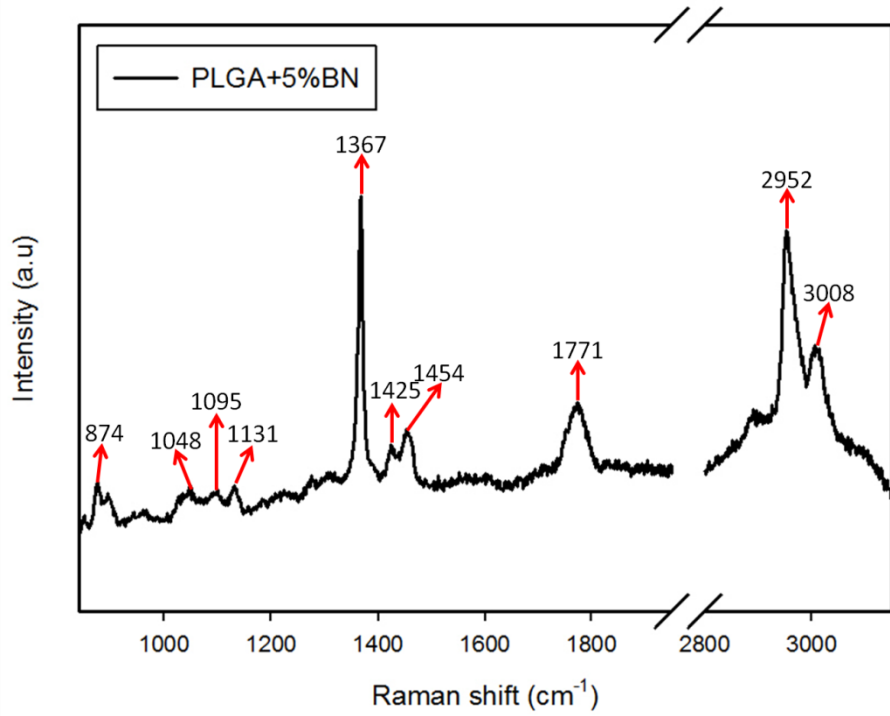


Şekil 4.10. %10 HAp ve %10 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu

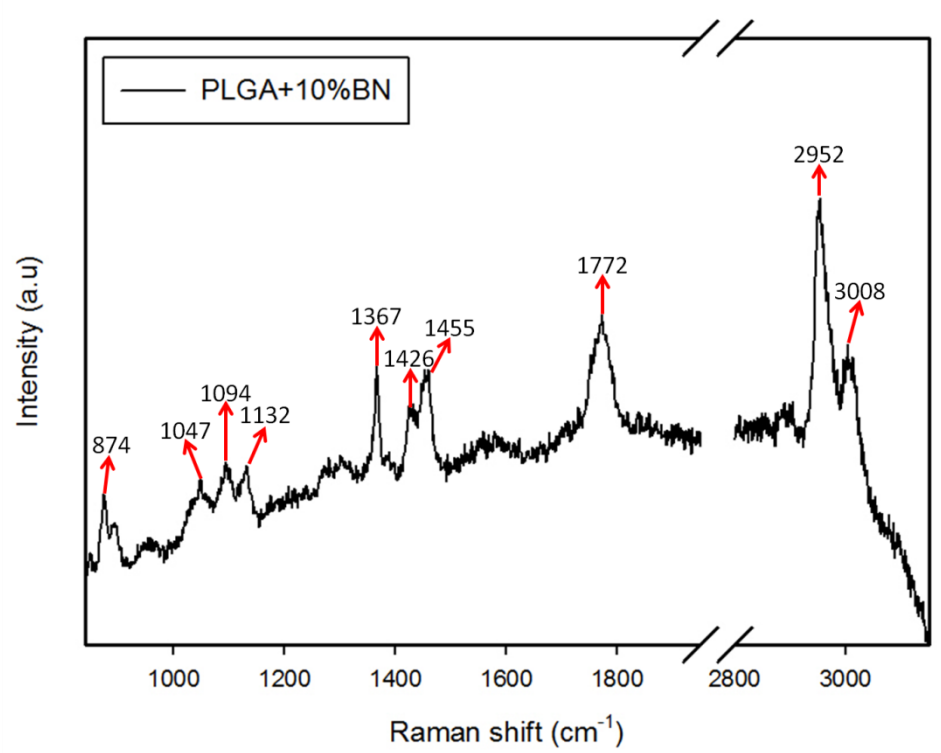
Şekil 4.8, 4.9 ve 4.10’da %2.5-10 arasında BN içeren PLGA+%10HAp numunelerine ait Raman spektrumları görülmektedir. Spektrumlarda katkısız PLGA örneğine ait piklere ilaveten 960 cm^{-1} civarında görülen karakteristik pik, hidroksiapatitteki tetrahedral PO_4 grubunun (P-O bağı) tamamen simetrik gerilme modundan (ν_1) kaynaklanırken.^{220, 221, 230} 1370 cm^{-1} civarında görülen pik ise, düzlem içerisindeki B-N E_{2g} titreşim moduna ait olup BN karakteristik pikidir.²³¹⁻²³³



Şekil 4.11. %2.5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu

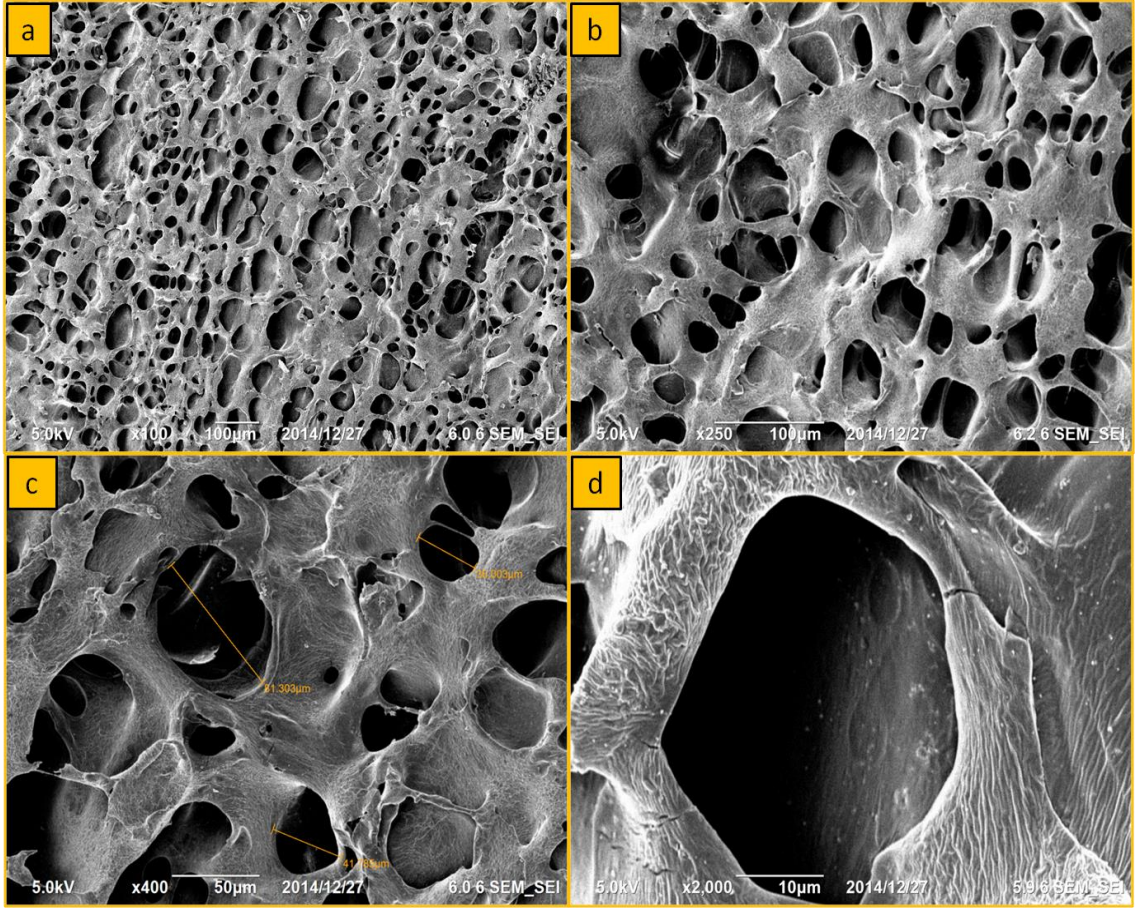


Şekil 4.12. %5 BN içeren PLGA örneğine ait Raman spektrumu



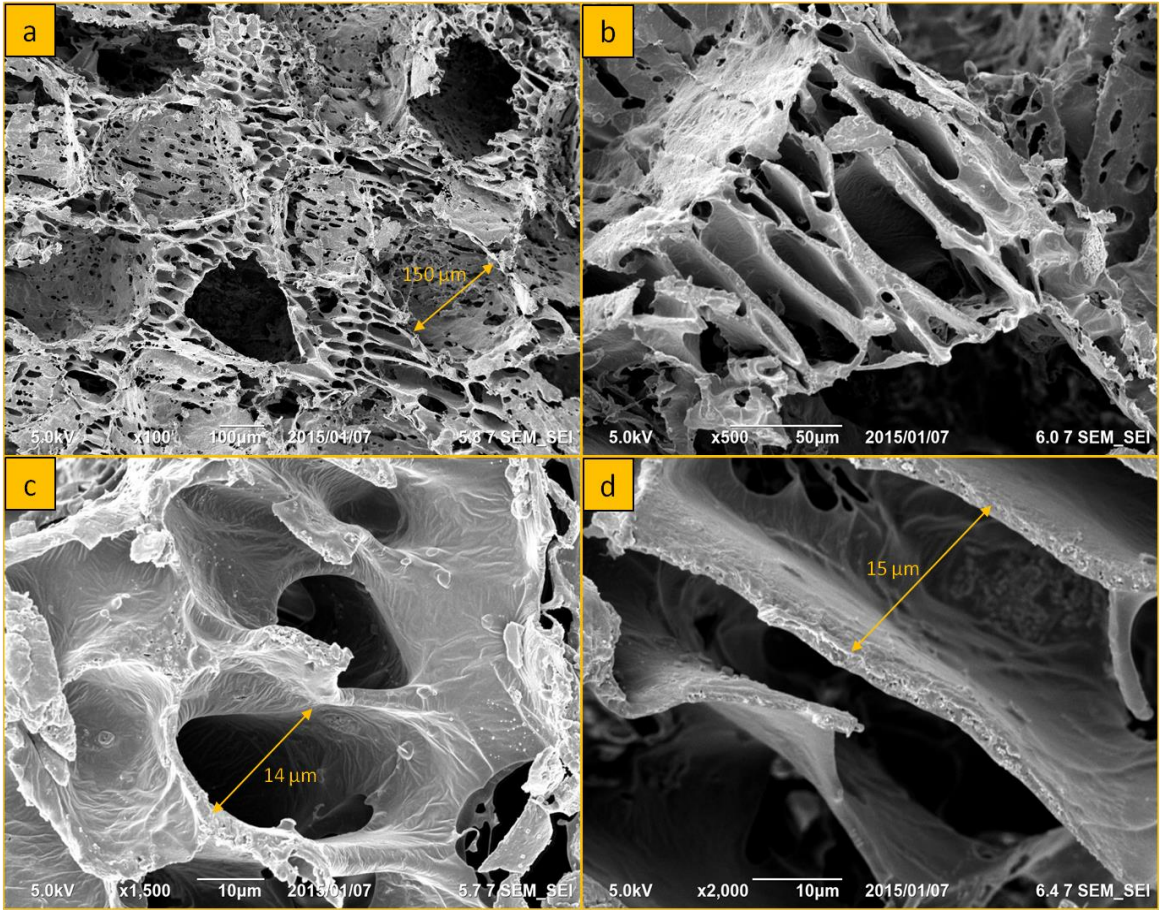
Şekil 4.13. %10'a BN içeren PLGA numunelerine ait Raman spektrumları görülmektedir. Spektrumlarda katkısız PLGA örneğine ait piklere ilaveten 1367 cm⁻¹'de görülen pik, düzlem içerisindeki B-N E_{2g} titreşim moduna ait olup BN karakteristik pikidir .²³¹⁻²³³

4.2. Taramalı Elektron Mikroskopunda (SEM) Morfolojik Karakterizasyon

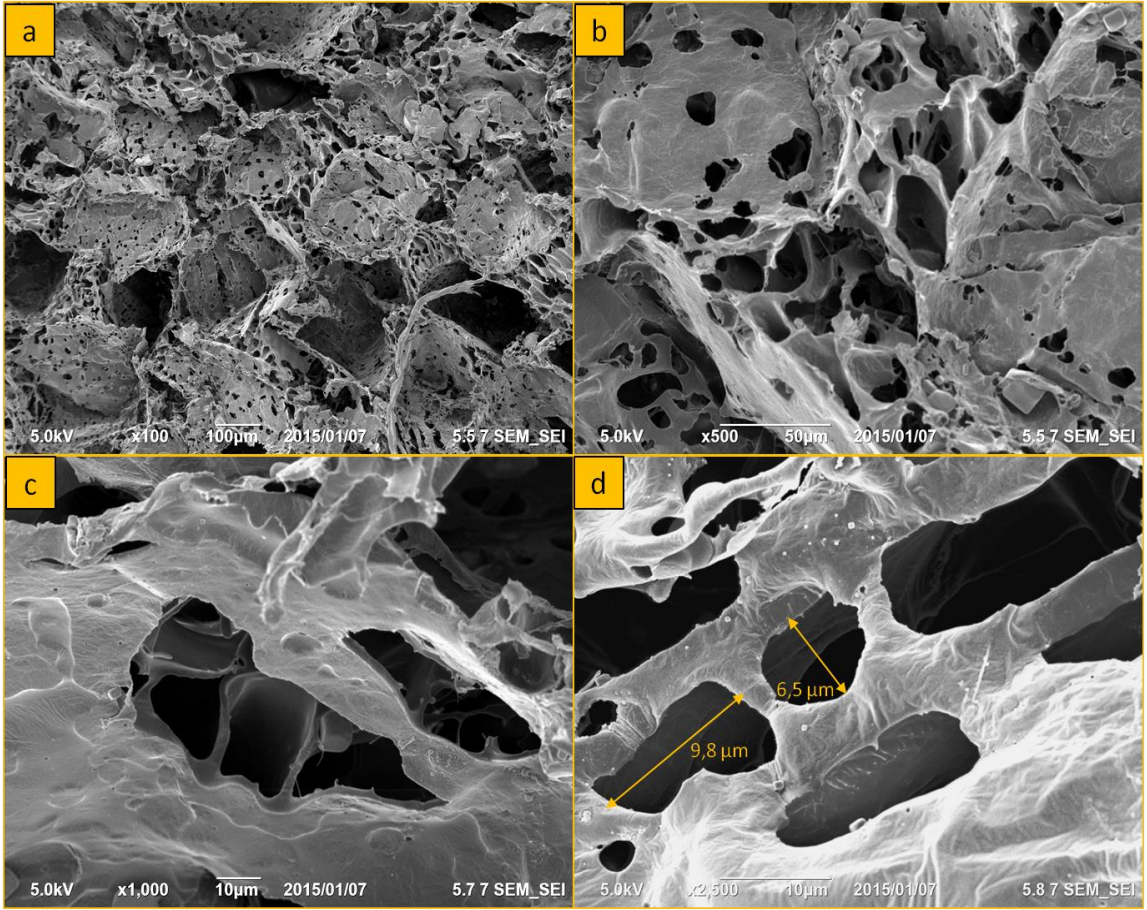


Şekil 4.14. Katkısız PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.14'deki katkısız PLGA iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere üç boyutlu ve homojen mikroporozite mevcuttur. Por çapları yaklaşık olarak büyük porlarda 100 µm, küçük porlarda ise 30 µm aralığında değişmektedir. Malzeme yüzeyi düz olmayıp pürüzlüdür.

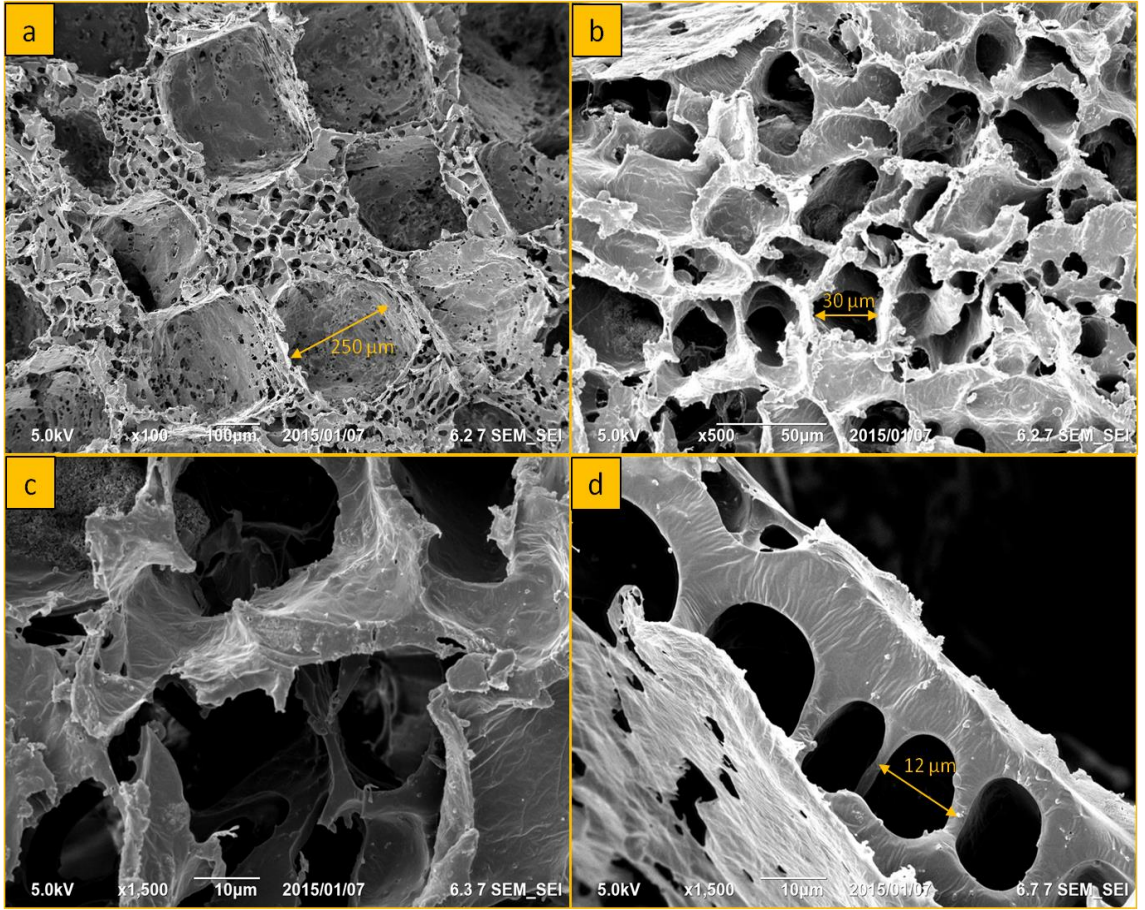


Şekil 4.15. Katkısız PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü



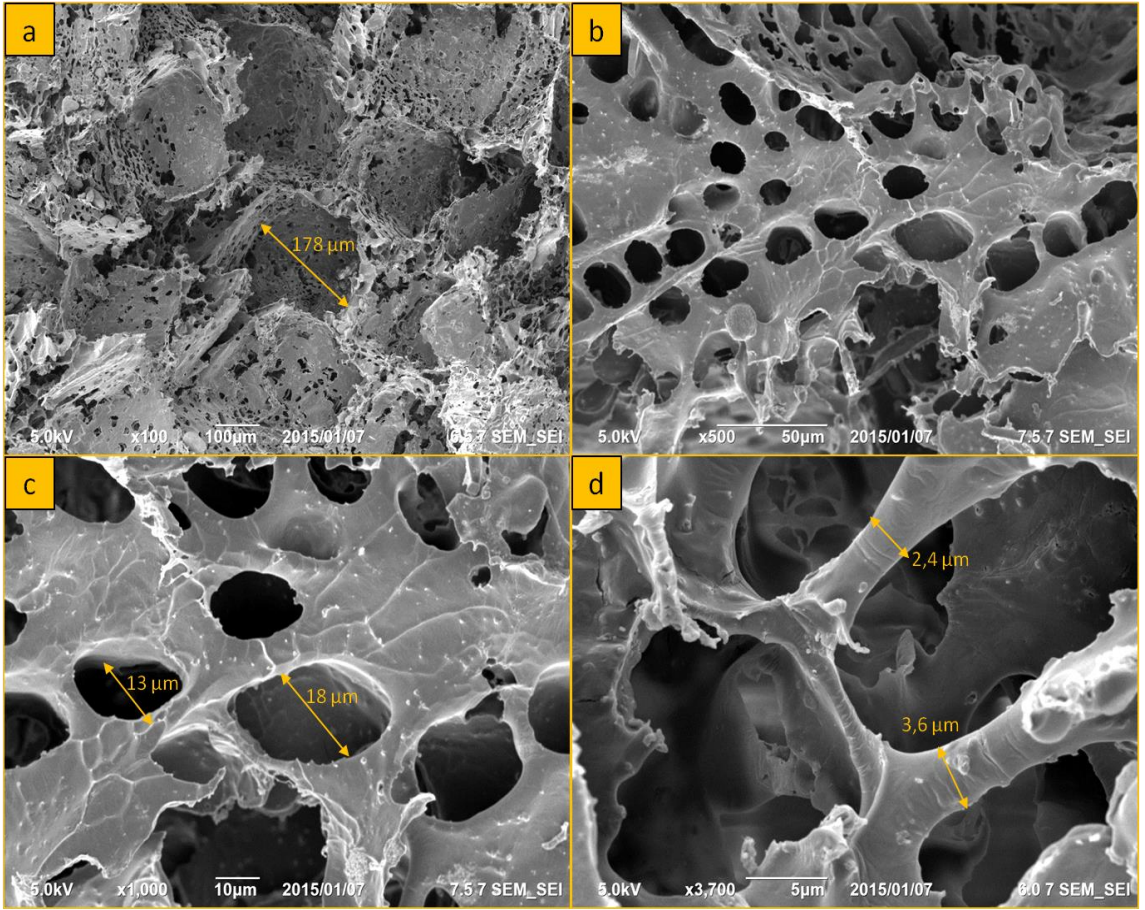
Şekil 4.16. %10 HAp içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.16’da %10 HAp içeren PLGA iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntüleri verilmektedir. Burada yine katkısız örnekte olduğu gibi üç boyutlu fakat daha heterojen mikroporozite mevcuttur. Por çapları yaklaşık olarak büyük porlarda 100 µm, küçük porlarda ise ortalama 10 µm aralığında değişmektedir. Malzeme yüzeyi düz olmayıp pürüzlüdür.



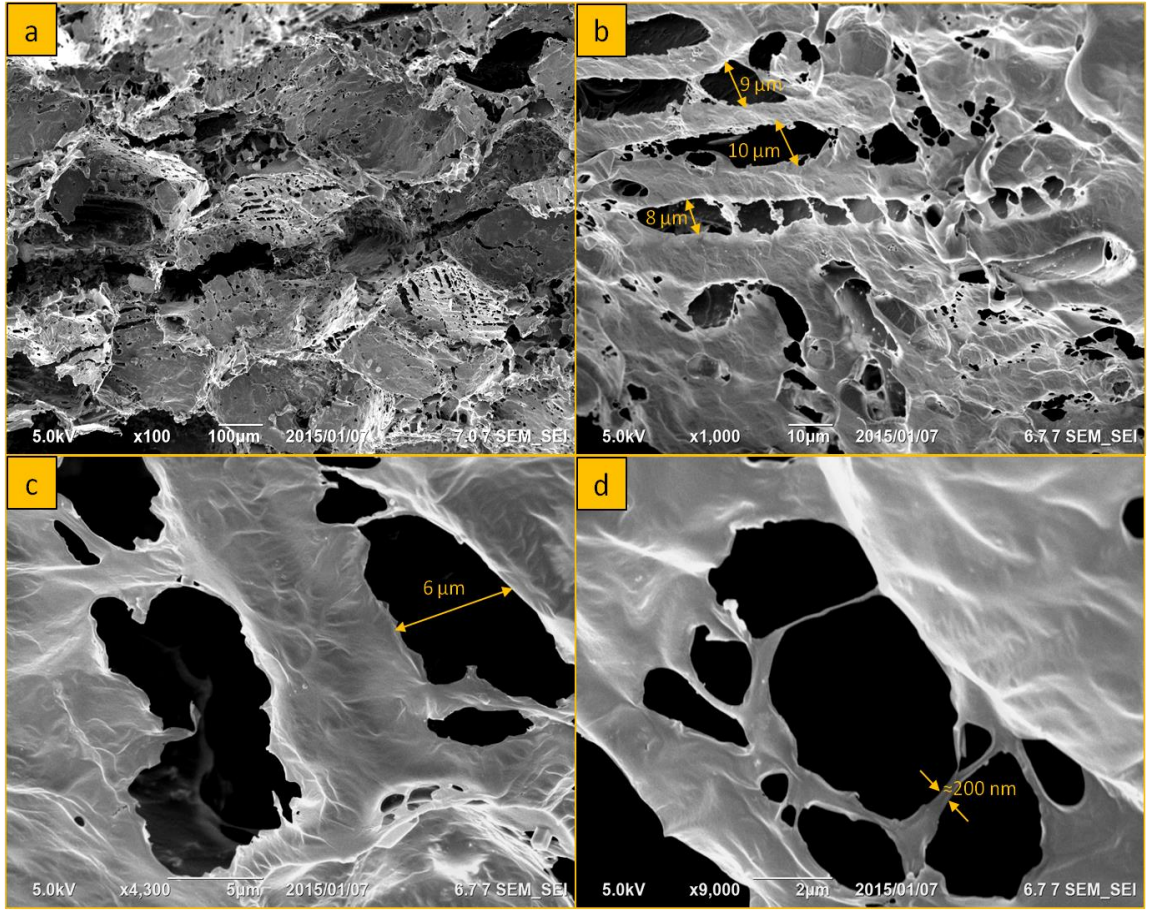
Şekil 4.17: %10 HAp ve %2.5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.17’de %10 HAp ve % 2.5 BN içeren PLGA örneğinin iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntüleri verilmektedir. Burada boyutları yaklaşık 250 μm civarında olan odacıklı bir yapı görülmektedir. Üç boyutlu porozite mevcut olup özellikle bu odacıkları oluşturan çukurların birleşme noktalarında daha yoğundur. Bu bölgelerdeki por çapları yaklaşık olarak 10-30 μm aralığında değişmektedir. Malzeme yüzeyi düz olmayıp dalgalıdır.



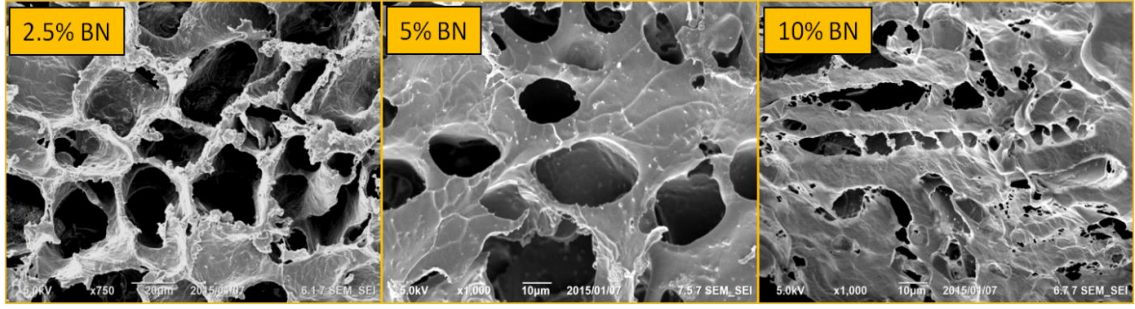
Şekil 4.18. %10 HAp ve %5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.18'deki %10 HAp ve % 5 BN içeren PLGA örneğinin iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntülerinden de anlaşılacağı üzere odacıklı yapı mevcuttur fakat boyutları yaklaşık olarak 170 μm 'dir. Odacıklar homojen olmayıp, içe çökme eğilimi göstermektedir ve burada daha heterojen üç boyutlu porozite mevcuttur. Por çapları yaklaşık olarak 10-30 μm aralığında olup por duvarının kalınlığı 3 μm civarındadır. Malzeme yüzeyi düz olmayıp dalgalıdır.



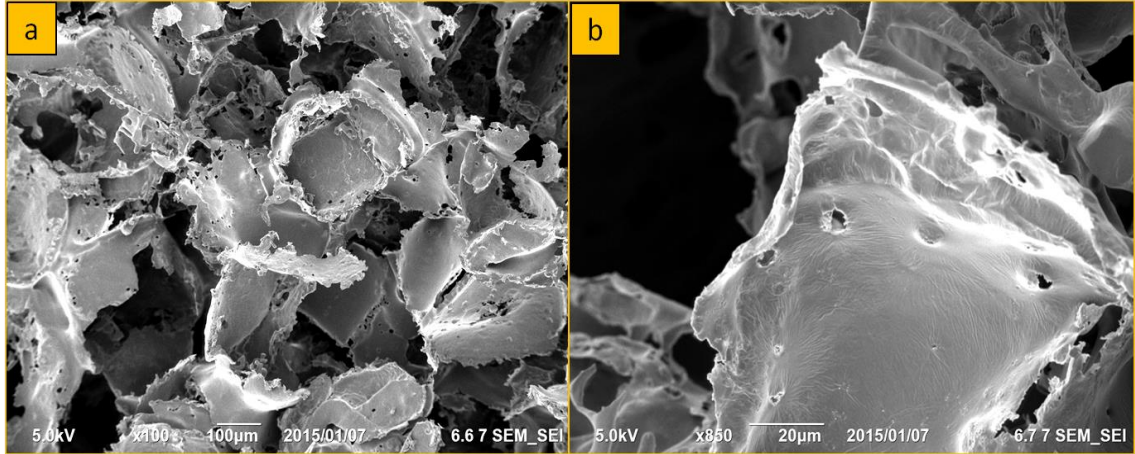
Şekil 4.19: %10 HAp ve %10 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.19’da %10 HAp ve % 10 BN içeren PLGA örneğinin iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntüleri verilmektedir. Kompozit içerisinde BN miktarının artmasıyla yapıda oldukça belirgin farklılıklar meydana gelmiştir. Burada odacıklı yapının bozulduğu daha heterojen üç boyutlu porozite mevcuttur. Eş boyutlu ve sıralı porlardan oluşan laminar yapılar görülmektedir ve bu yapılardaki por çapları 10 μm ’den küçüktür. Ayrıca bu porlarda por duvarının kalınlığı 200 nm civarındadır. Malzeme yüzeyi diğer örneklerle kıyaslandığında nispeten daha düzdür.



Şekil 4.20. Farklı oranlarda BN içeren %10 HAp-PLGA örneklerine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri

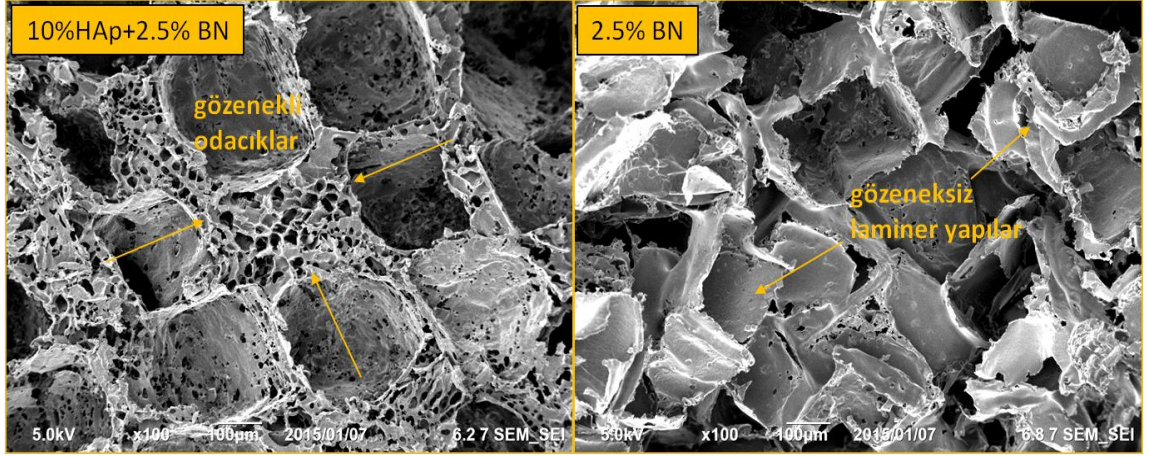
Şekil 4.20’ de %10 HAp içeren PLGA örneğine farklı oranlarda BN ilavesinin morfolojiye olan etkisi mukayeseli olarak görülmektedir. Aynı büyütmeye alınan görüntülerde BN miktarının artmasıyla üç boyutlu yapının gözenekli laminar tabakalar şeklinde oluştuğu ve bu tabakalarda por çeper kalınlığının oldukça ince (≈ 200 nm) olduğu görülmektedir. Malzeme yüzeyindeki dalgalanma da kompozit içerisinde BN miktarının artmasıyla azalmaktadır.



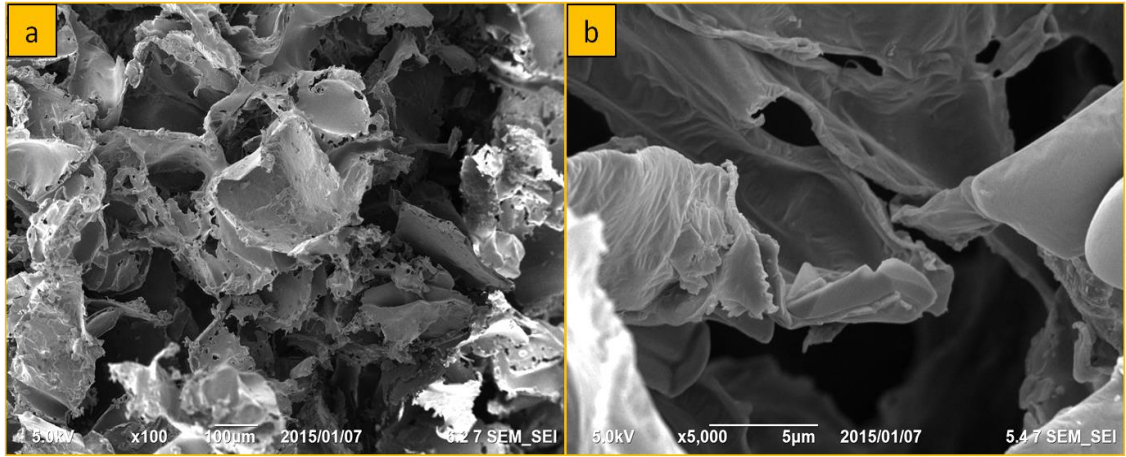
Şekil 4.21. %2.5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.21’de %2.5 BN içeren PLGA örneğinin iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntüleri verilmektedir. Burada oldukça belirgin morfolojik farklılıklar mevcuttur. Homojen üç boyutlu yapı mevcut olmayıp, kıvrılmış laminar bir yapı görülmektedir. Bu yapılar aynı miktarda BN içeren %10HAp-PLGA örneğindeki odacıklı yapının stabil olamaması sebebiyle çökme veya ayrılma sonucu meydana

gelmiştir ve bu laminer yapılardaki mikro gözeneklilik yok denecek kadar azdır (Şekil 4.22). Ayrıca bu yapıda kompozitin mekanik direncini azaltacağı düşünülmektedir.

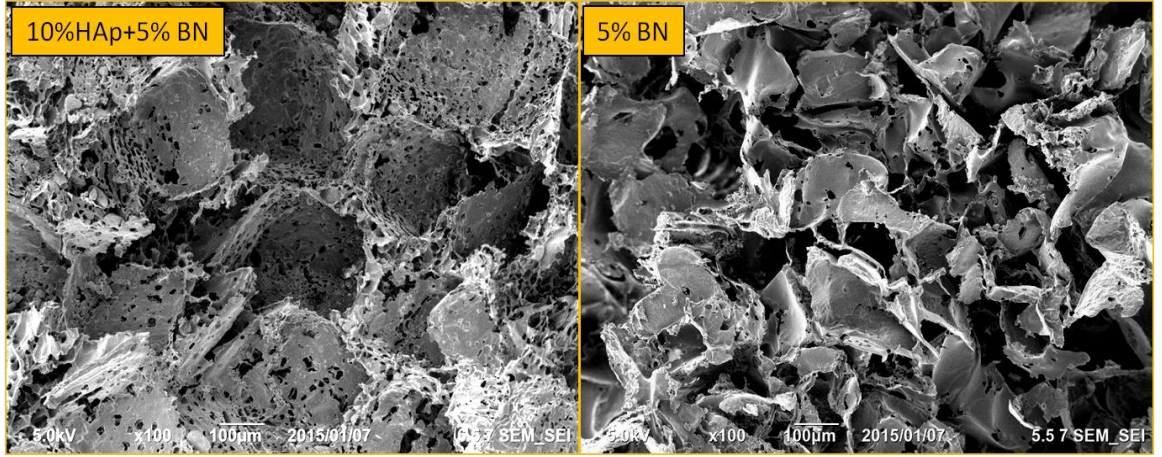


Şekil 4.22. HAp içeren ve içermeyen %2.5 BN- PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri

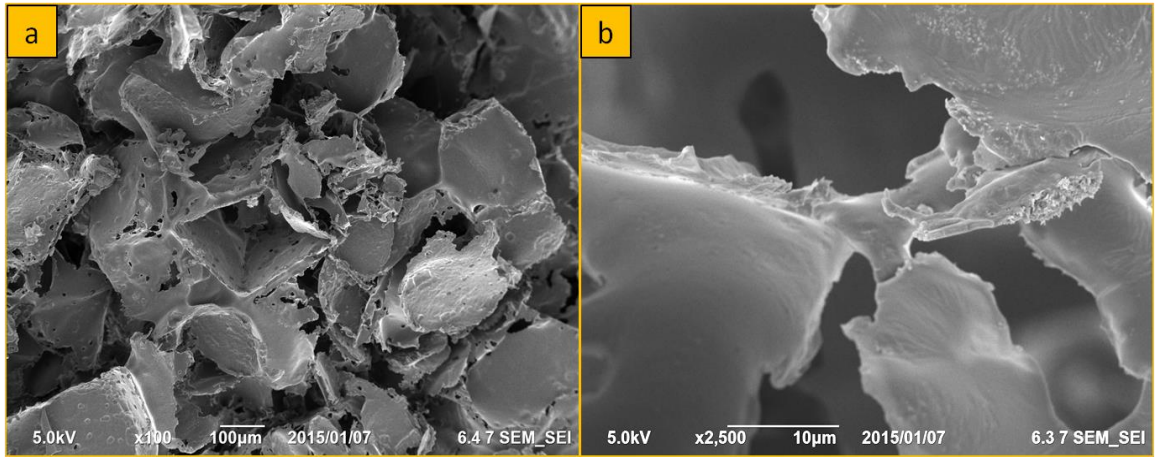


Şekil 4.23: %5 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 4.23’da %5 BN içeren PLGA örneğinin iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntülerinde de benzer şekilde oldukça belirgin morfolojik farklılıklar mevcuttur. Homojen üç boyutlu yapı mevcut olmayıp, kıvrılmış laminer bir yapı görülmektedir. Bu yapılar aynı miktarda BN içeren %10HAp-PLGA örneğindeki odacıklı yapının stabil olamaması sebebiyle çökme veya ayrılma sonucu meydana gelmiştir ve bu laminer yapılardaki mikro gözeneklilik yok denecek kadar azdır (Şekil 4.24).

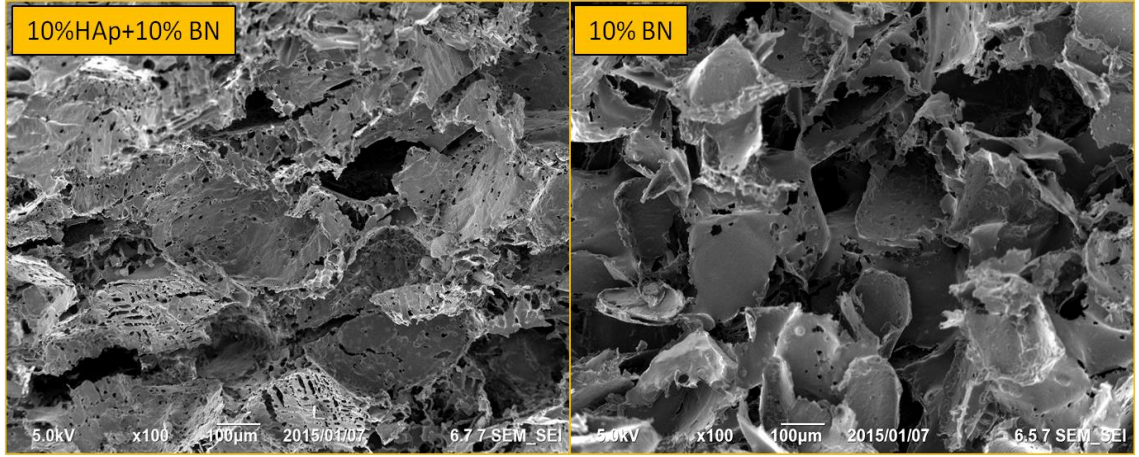


Şekil 4.24. HAp içeren ve içermeyen %5 BN- PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri

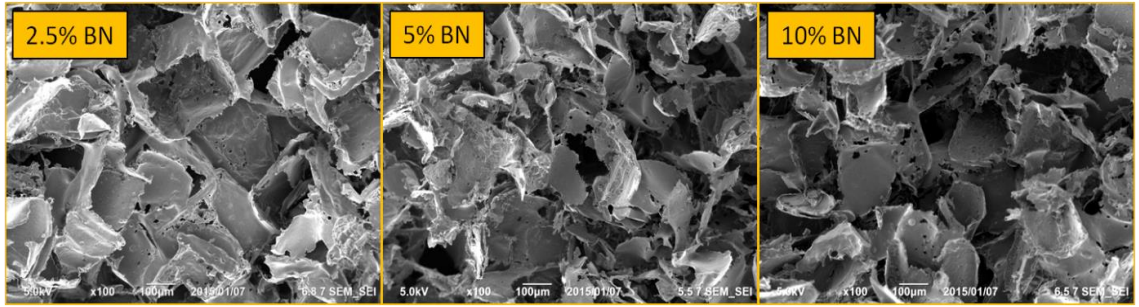


Şekil 4.25. %10 BN içeren PLGA örneğine ait ikincil elektron (SE) SEM görüntüsü

Şekil 11.12’de %10 BN içeren PLGA örneğinin iç kesit yüzeyine ait ikincil elektron SEM görüntülerinde de %5 BN içeren örnekteki benzer, heterojen üç boyutlu yapı mevcut olup, parçalanmış laminer bir yapı görülmektedir. Bu yapılar aynı miktarda BN içeren %10HAp-PLGA örneğindeki yapının stabil olamaması sebebiyle çökme veya ayrılma sonucu meydana gelmiştir ve bu laminer yapılardaki mikro gözeneklilik de yok denecek kadar azdır (Şekil 4.26).



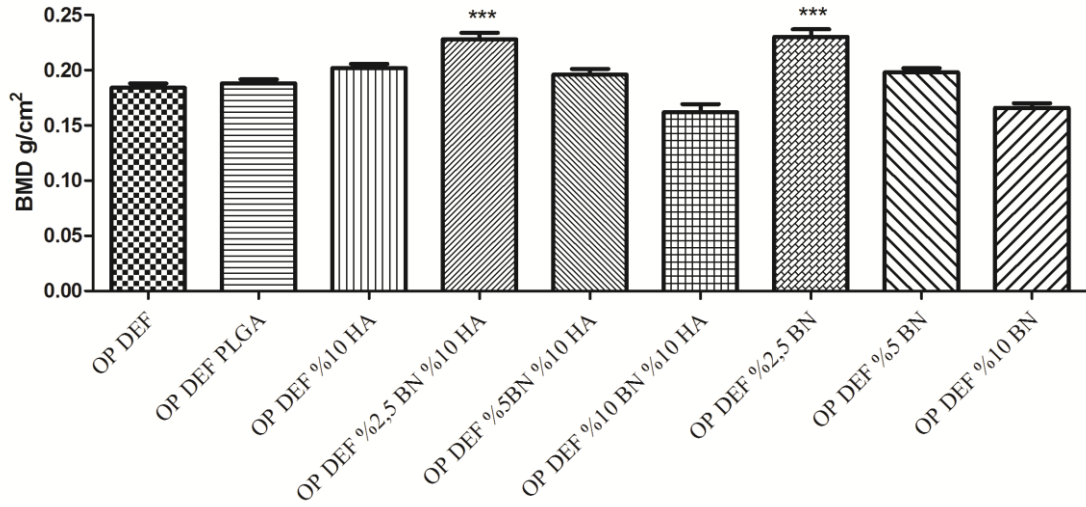
Şekil 4.26: HAp içeren ve içermeyen %10 BN- PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri



Şekil 4.27. Farklı oranlarda BN içeren PLGA örneklerine ait mukayeseli ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri

Şekil 4.27’de farklı oranlarda BN içeren PLGA örneklerine ait aynı büyütmadaki ikincil elektron (SE) SEM görüntüleri verilmektedir. Görüntülerden de anlaşılacağı üzere kompozit içerisinde BN miktarının artması yapının bozulmasına ve dolayısıyla mekanik direncin azalmasına sebep olmaktadır. Aynı miktarda BN içeren PLGA numunelerinde, HAp içerenlerde daha homojen üç boyutlu yapı olduğundan bu numunelerde mekanik direncin daha fazla olması beklenmektedir.

4.2. Dual Enerji X-ray Absorptiometre (DEXA) Bulguları



Şekil 4.28. (* Kontrol defekt grubuna göre $p < 0.0001$ oranında anlamlı).

Çalışmamızın 4. haftası sonunda defekt alanında primer kemik rejenerasyonunu dual enerji x-ray absorptiometre (DEXA) ile belirledik (Şekil 4.28). İyileşme sürecinin takip edildiği 4. haftada OP DEF grubunun BMD düzeylerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Doku iskelesi olarak kullandığımız PLGA' nın yalnız kullanıldığı grupta OP DEF grubuna yakın değerler belirlenmiştir.

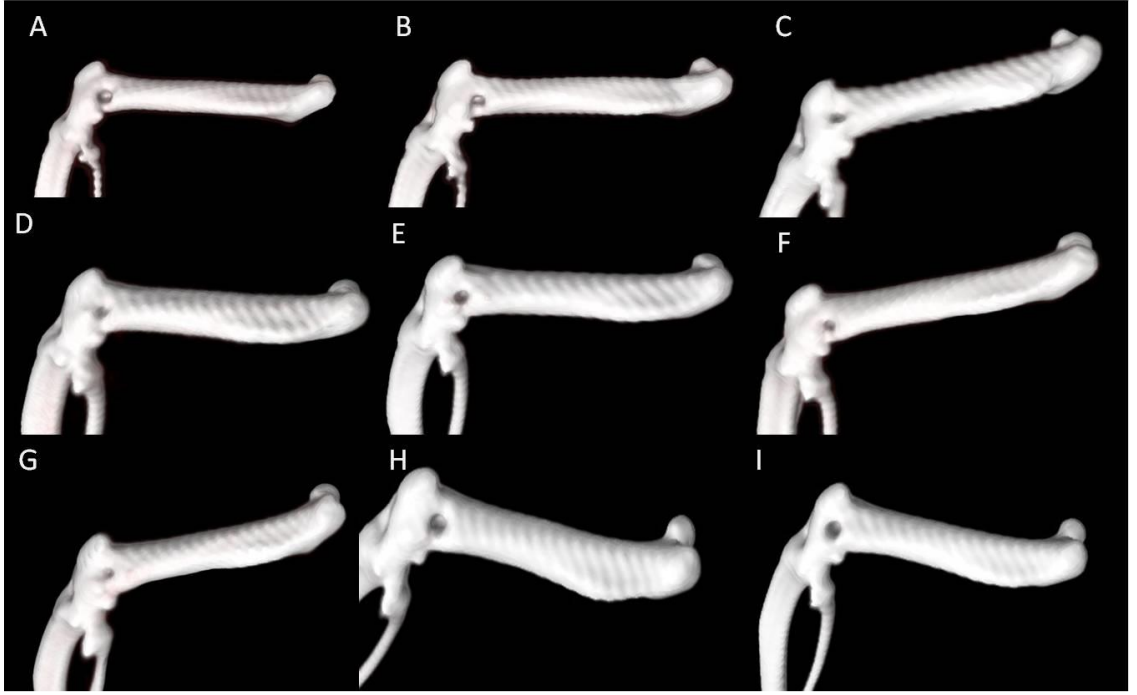
Kemik matriksinin oluşumunda önemli bir yapı taşı olan HA' nın %10'luk konsantrasyonunun uygulandığı grupta ise BMD değerlerinin hafif olarak arttığı görülmektedir. Tedavi gruplarımız içerisinde BMD değerlerini OP DEF grubu ile karşılaştırdığımızda OP DEF %2.5 BN %10 HA ve yalnız OP DEF %2.5 BN gruplarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p < 0.0001$). OP DEF %5 BN %10 HA, OP DEF %10 BN %10 HA, OP DEF %5 BN ve OP DEF %10 BN gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme görülmemiştir.

4.3. BT (Bilgisayarlı Tomografi) Bulguları

Deney hayvanları defekt operasyonundan sonraki 1. 2. ve 4. haftada her grup için 10 rat yüksek doz genel anestezi Tiopental Sodyum (50 mg/Kg) (İE ULAGAY,

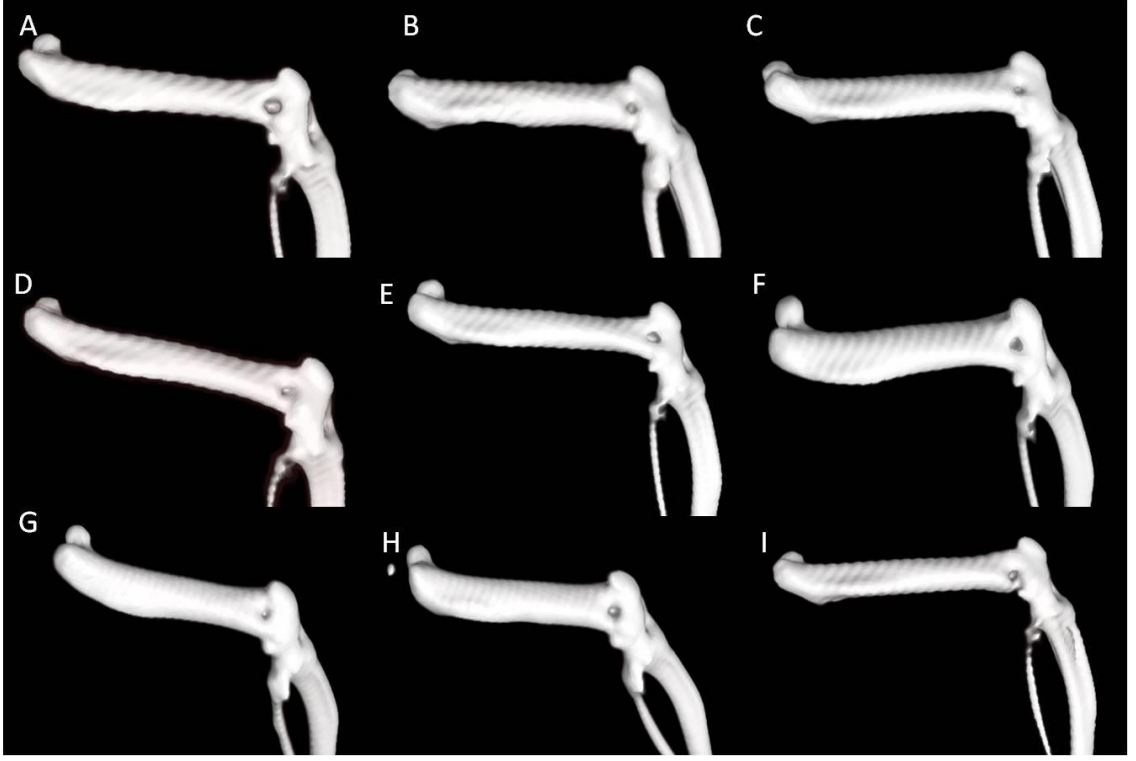
İstanbul) ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen ratlardan her grup için 5 rat BT çekimi için femurları ayrılarak BT görüntüleri Radyoloji Anabilim Dalı'nda görüntülendi ve değerlendirildi.

Şekil 4.29, 4.30. ve 4.31.'de her bir deney grubundan her hayvana ait BT görüntüleri VRT formatında farklı haftalara göre sunulmuştur.



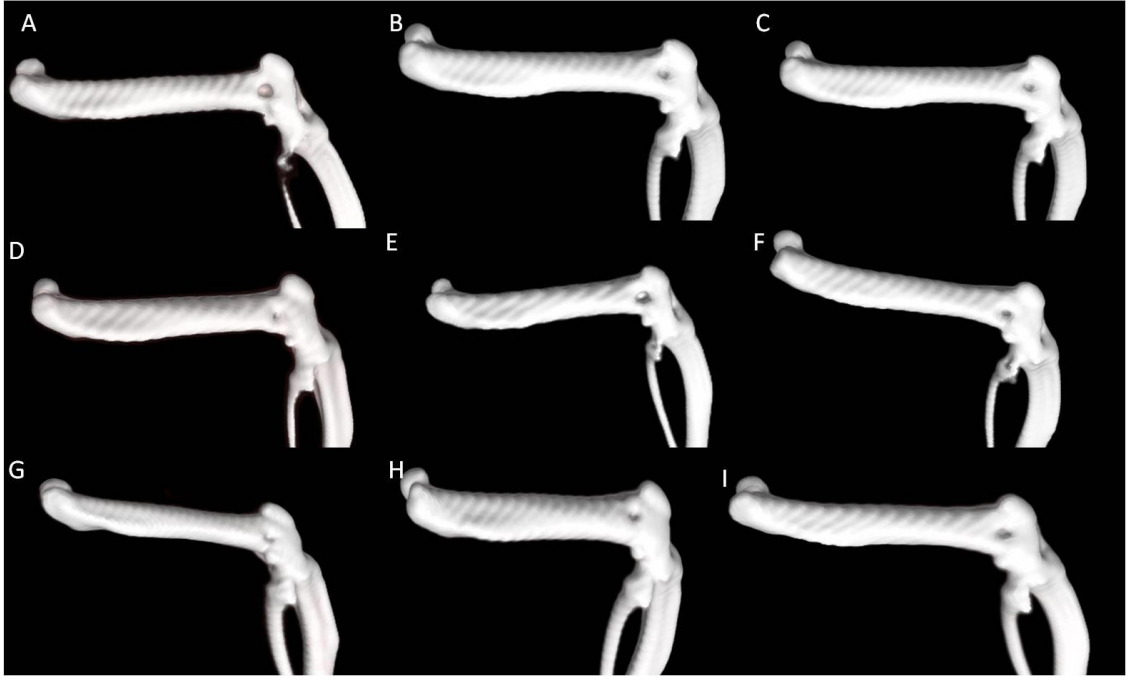
Şekil 4.29. Grupların 1. Hafta BT görüntüleri. **(A)** OP + Def., **(B)** OP + Def. + PLGA, **(C)** OP + Def. + %10 HA, **(D)** OP + Def. + %2.5 BN + %10 HA, **(E)** OP + Def. + %5 BN + %10 HA, **(F)** OP + Def. + %10 BN + %10 HA, **(G)** OP + Def. + %2.5 BN, **(H)** OP + Def. + %5 BN, **(I)** OP + Def. + %10 BN.

1. Hafta BT görüntülerinde OP + Def. (A) grubu hariç, diğer grupların femur distal metafizinde oluşturulan defektif kemik bölgesinde minimal kemikleşme mevcut olduğu BT analizinde izlenmektedir (Şekil 4.29).



Şekil 4.30: Grupların 2. Hafta BT görüntüleri. **(A)** OP + Def., **(B)** OP + Def. + PLGA, **(C)** OP + Def. + %10 HA, **(D)** OP + Def. + %2.5 BN + %10 HA, **(E)** OP + Def. + %5 BN + %10 HA, **(F)** OP + Def. + %10 BN + %10 HA, **(G)** OP + Def. + %2.5 BN, **(H)** OP + Def. + %5 BN, **(I)** OP + Def. + %10 BN.

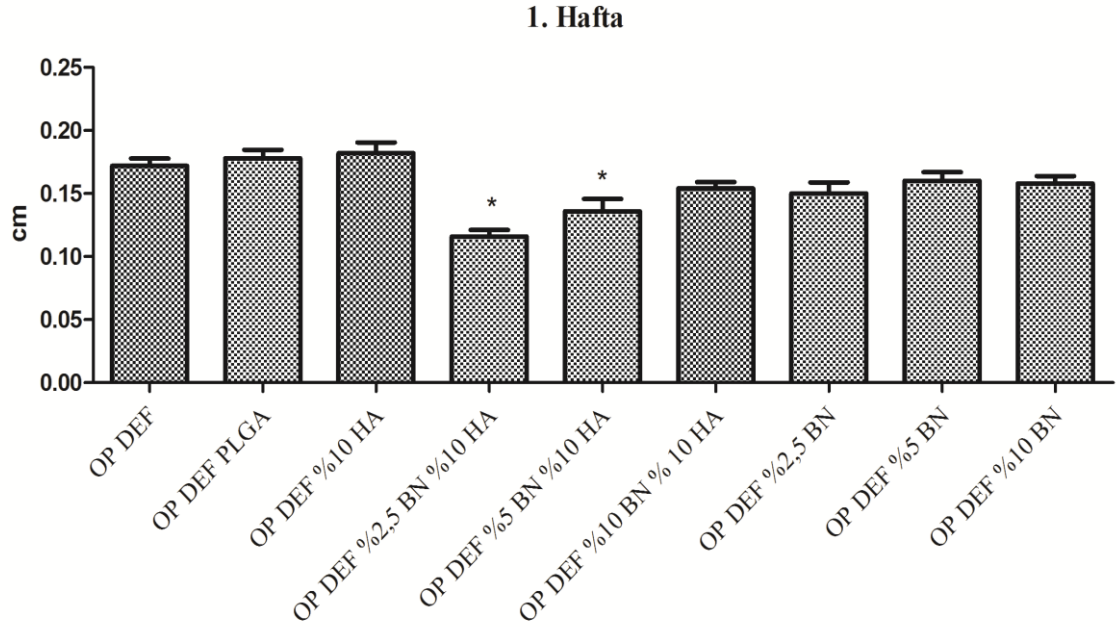
2. Hafta BT görüntülerinde OP + Def. (A) grubu hariç, diğer grupların femur distal metafizinde oluşturulan defektif kemik bölgesinde orta kemikleşme mevcut olduğu BT analizinde izlenmektedir (Şekil 4.30).



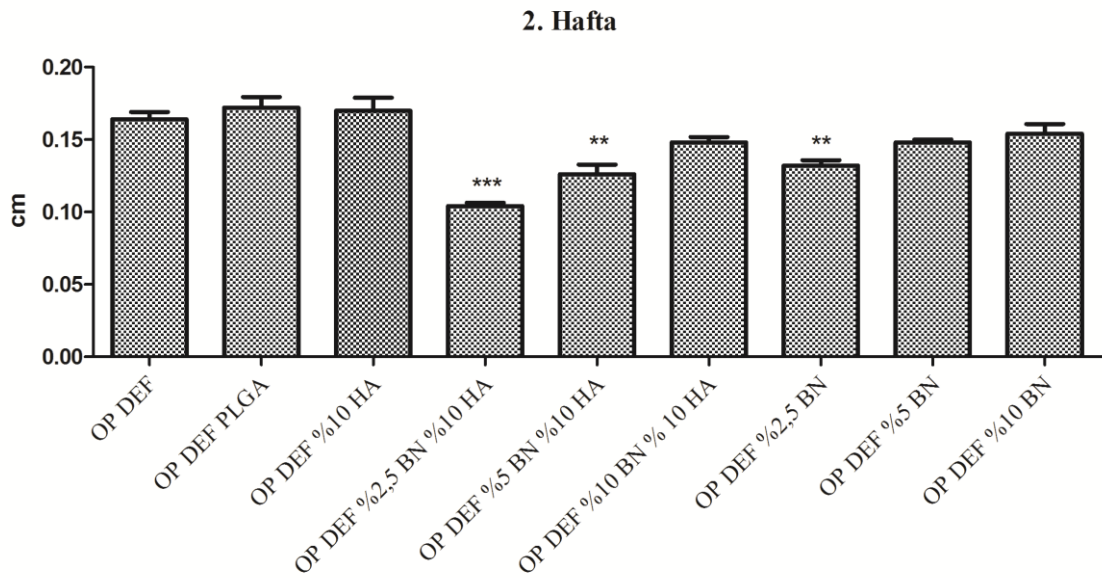
Şekil 4.31: Grupların 4. Hafta BT görüntüleri. **(A)** OP + Def., **(B)** OP + Def. + PLGA, **(C)** OP + Def. + %10 HA, **(D)** OP + Def. + %2.5 BN + %10 HA, **(E)** OP + Def. + %5 BN + %10 HA, **(F)** OP + Def. + %10 BN + %10 HA, **(G)** OP + Def. + %2.5 BN, **(H)** OP + Def. + %5 BN, **(I)** OP + Def. + %10 BN

4. Hafta BT görüntülerinde OP + Def. (A) grubu hariç tüm grupların femur distal metafizinde oluşturulan defektif kemik bölgesinde iyileşme mevcut, özellikle (D) OP + Def. + %2.5 BN + %10 HA, (G) OP + Def. + %2.5 BN gruplarda daha fazla bir iyileşme BT analizinde izlenmektedir (Şekil 4.31).

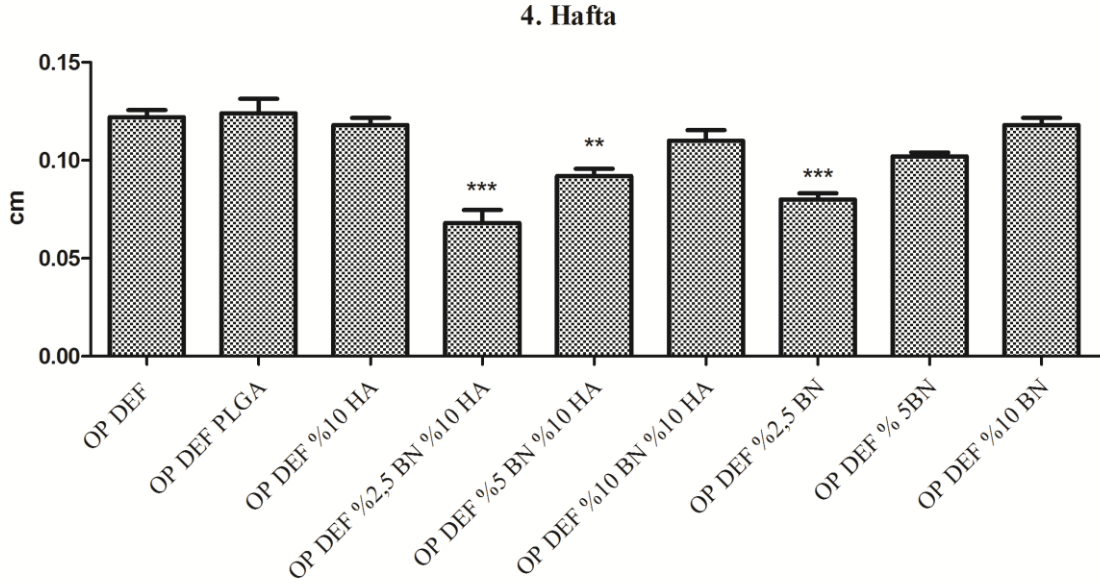
Defekt aplarının BT analiz Bulguları



Şekil 4.32. Grupların 1. Hafta BT defekt çap ölçümleri (* Kontrol defekt grubuna göre $p<0.05$ oranında anlamlı).

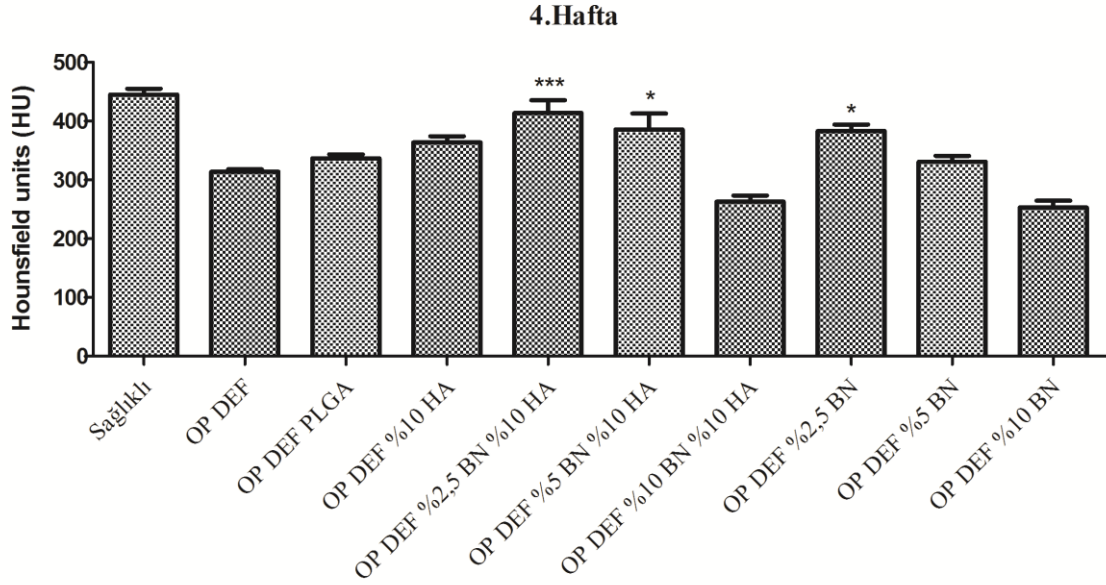


Şekil 4.33. Grupların 2. Hafta BT defekt çap ölçümleri (*** Kontrol defekt grubuna göre $p<0.001$ oranında anlamlı).



Şekil 4.34. Grupların 4. Hafta BT defekt çap ölçümleri (***) Kontrol defekt grubuna göre $p<0.001$ oranında anlamlı).

BT bulguları defekt alanında kemik rejenerasyonu değerlendirmek için kullanıldı. İyileşme sürecinin izlendiği defekt cerrahi presedürü uygulamasından sonraki ilk hafta defekt çap oranlarına göre karşılaştırdığımızda kontrol defekt grubuna göre OP DEF %2.5 BN %10 HA ve OP DEF % 2.5 BN gruplarında anlamlı olarak defekt çaplarında küçülme gözlenmiştir ($p<0.001$). (Şekil: 4.32). Daha sonraki süreçler olan 2. ve çalışmamızı tamamladığımız 4. hafta da aynı gruplar dahilinde defekt kontrol grubuna göre çap boyutları küçülmekte ve primer kemik oluşumları gözlemlenmekle beraber primer kemik oluşumları defekt bölgelerinde düzgün olmayan normal kemiğe göre düşük yoğunluklu HU dansiteleri ile karakterize edilmektedir (Şekil:4.33; 4.34). Yalnız OP DEF %2.5 BN %10 HA, OP DEF %5 BN %10 HA ve OP DEF % 2.5 BN gruplarında hem 2. Hem de 4. Hafta da anlamlı olarak defekt çaplarında küçülme gözlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil: 4.33, 4.34).



Şekil 4.35. Grupların 4. Hafta BT defekt Hounsfield units (HU) ölçümleri (***) Kontrol defekt grubuna göre $p<0.001$ oranında anlamlı).

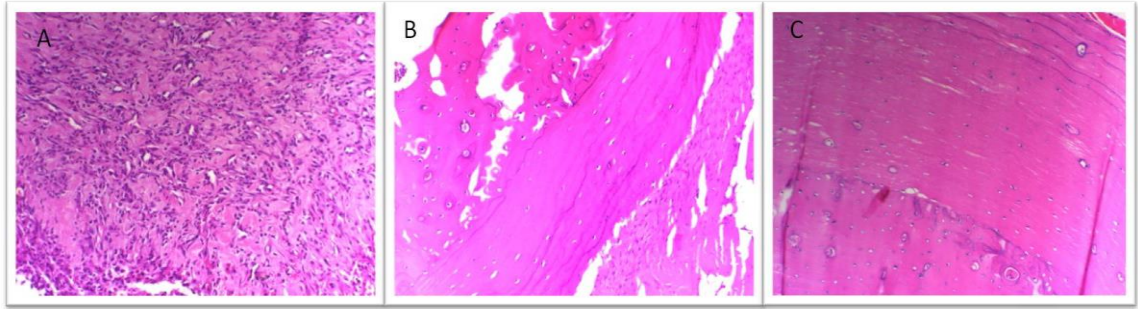
Çalışmamızın 4. haftası sonunda defekt alanında primer kemik rejenerasyonunu BT ile belirledik. İyileşme sürecinin takip edildiği 4. Hafta da OP DEF grubunun Hounsfield Units (HU) düzeylerinin oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Doku iskelesi olarak kullandığımız PLGA ve yalnız % 10 HA kullanıldığımız gruplarda OP DEF grubuna yakın değerler belirlenmiştir.

Tedavi gruplarımız içerisinde kemik oluşumunu OP DEF grubu ile karşılaştırdığımızda OP DEF %2.5 BN %10 HA ($p<0.001$), yalnız OP DEF %2.5 BN ve OP DEF %5 BN %10 HA gruplarının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). OP DEF %10 BN %10 HA, ve OP DEF %10 BN gruplarının ise OP DEF grubuna göre azaldığı görülürken OP DEF %5 BN gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişme görülmemiştir ($p<0.001$).

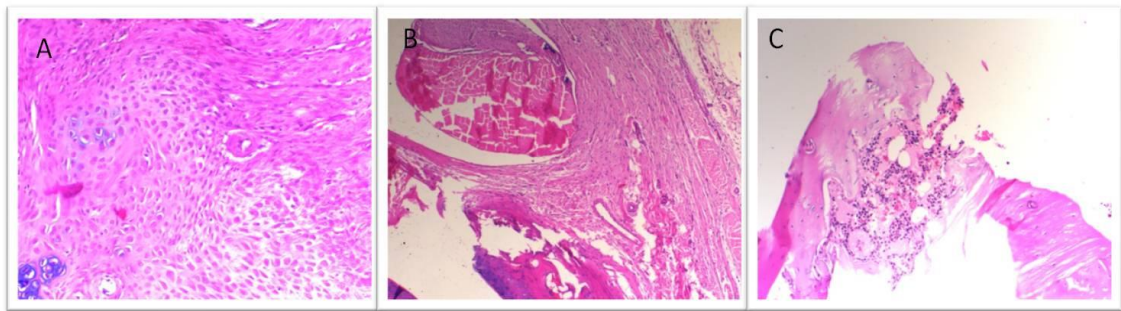
4.4. Histopatolojik Bulgular

Bu çalışmada BN/HA minerallerinin farklı yüzde oranlarıyla emdirilmiş PLGA doku iskelesinin ovariectomi ile indüklenmiş osteoporozda oluşturulan kemik defekti üzerine olan etki veya etkilerini histopatolojik yönden de inceledik. Tüm iyileşme süreçleri arasında osteoporoz defekt kontrol (OP DEF) grupları ile BN/HA uygulanan osteoporoz defekt grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında farklılıklar olmasına karşın yeni kemik oluşumları histopatolojik olarak gözlemlenmiştir.

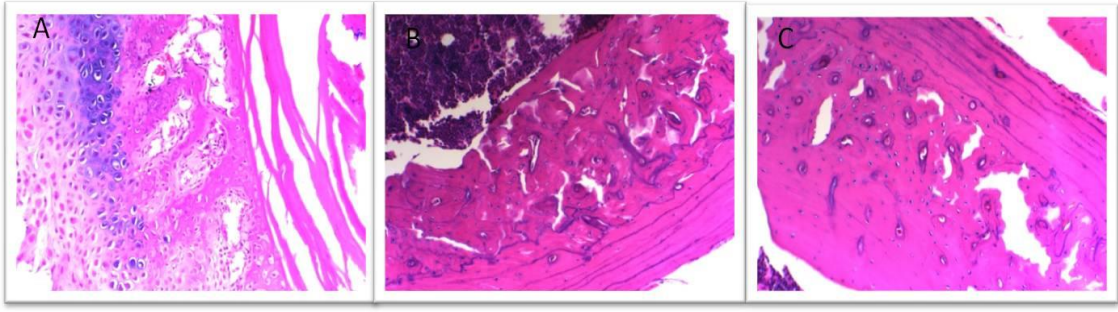
Hematoxylin ve Eosin (H&E), boyama yapılan gruplar arasında fibrosis, yabancı cisim ve primer kemik oluşumu histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.



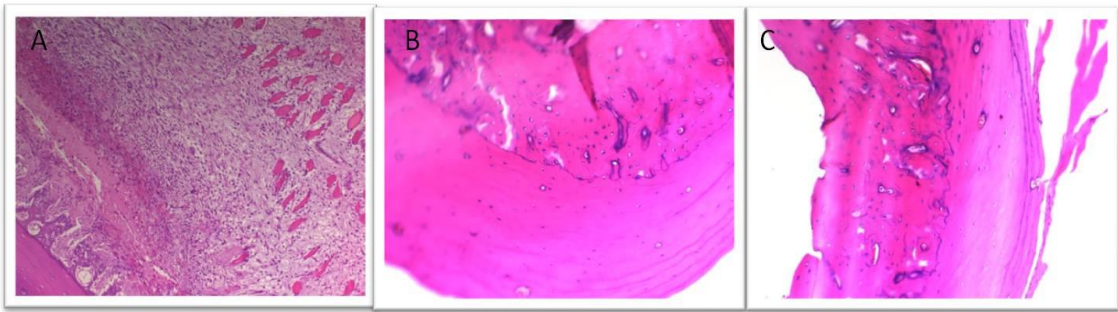
Şekil 4.36. Defekt grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.



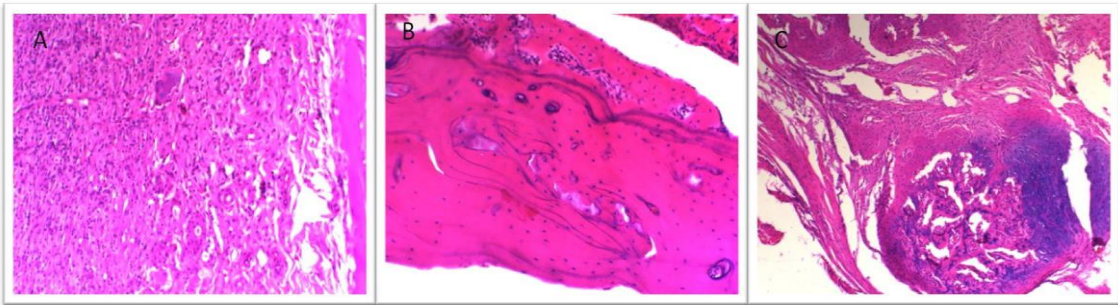
Şekil 4.37. PLGA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.



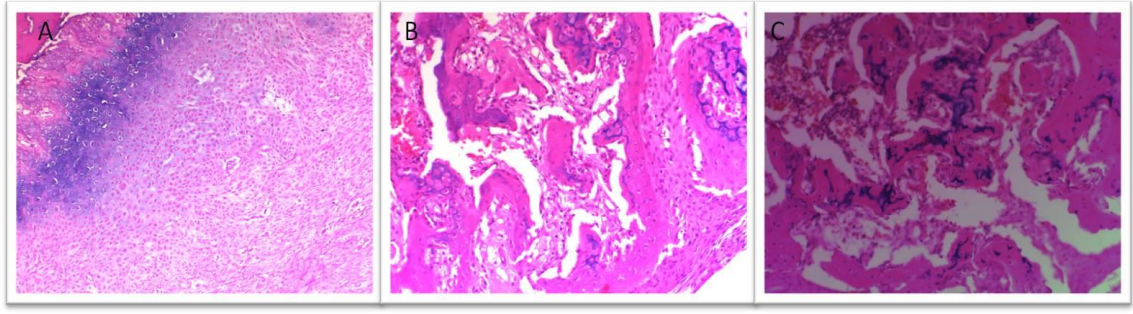
Şekil 4.38. Defekt + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.



Şekil 4.39. Defekt + %2.5 BN + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.

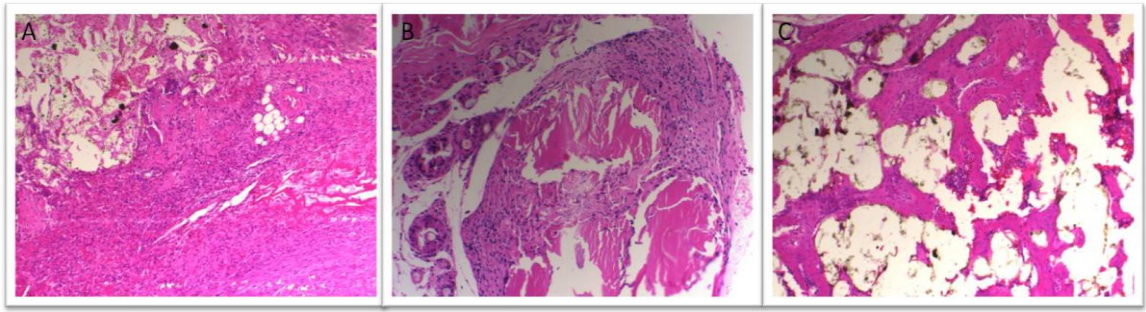


Şekil 4.40. Defekt + %5 BN + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.



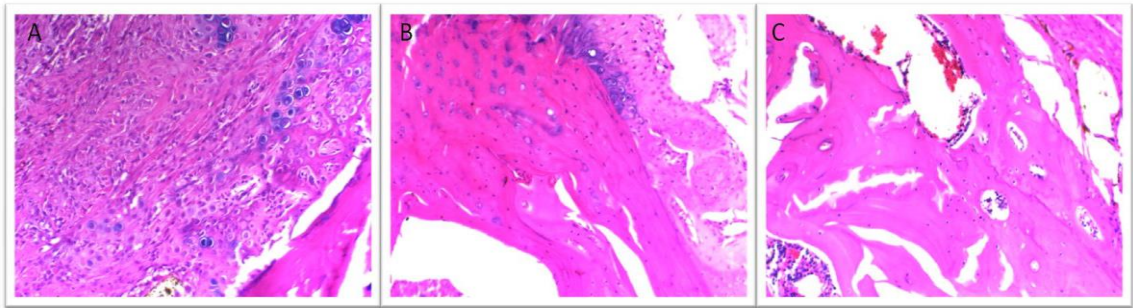
Şekil 4.41. Defekt + %10 BN + % 10 HA grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri.

Boya: Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.



Şekil 4.42. Defekt + %2.5 BN grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya:

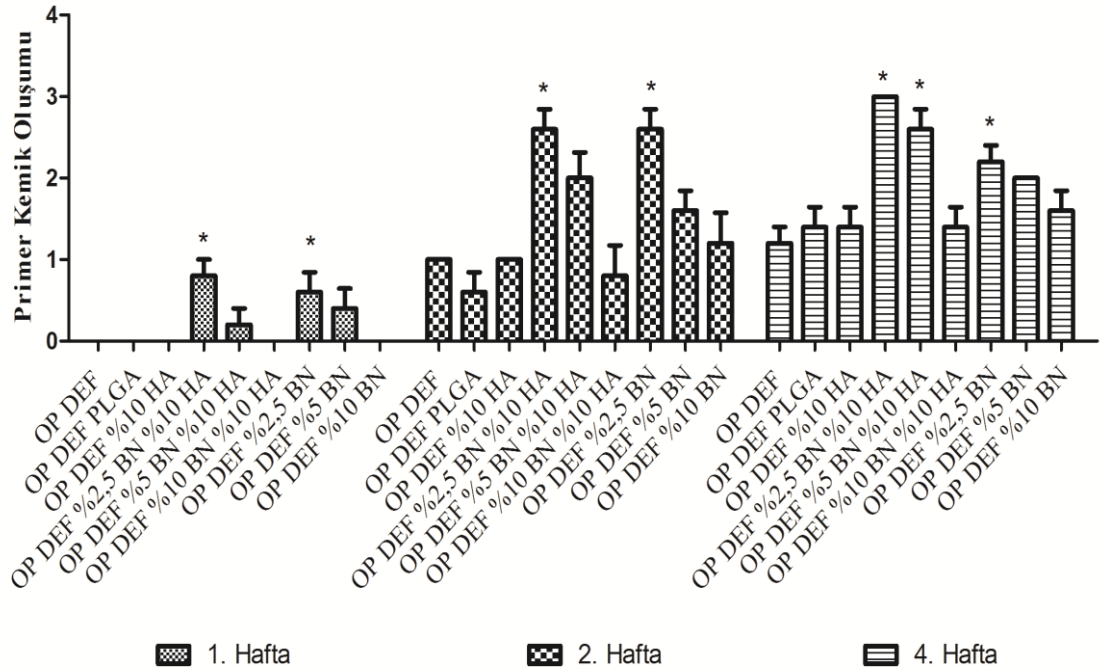
Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.



Şekil 4.43. Defekt + %5 BN grubunun 1. 2. ve 4. hafta kesit görüntüleri. Boya:

Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama. A: 1. Hafta, B: 2. Hafta, C: 4. Hafta.

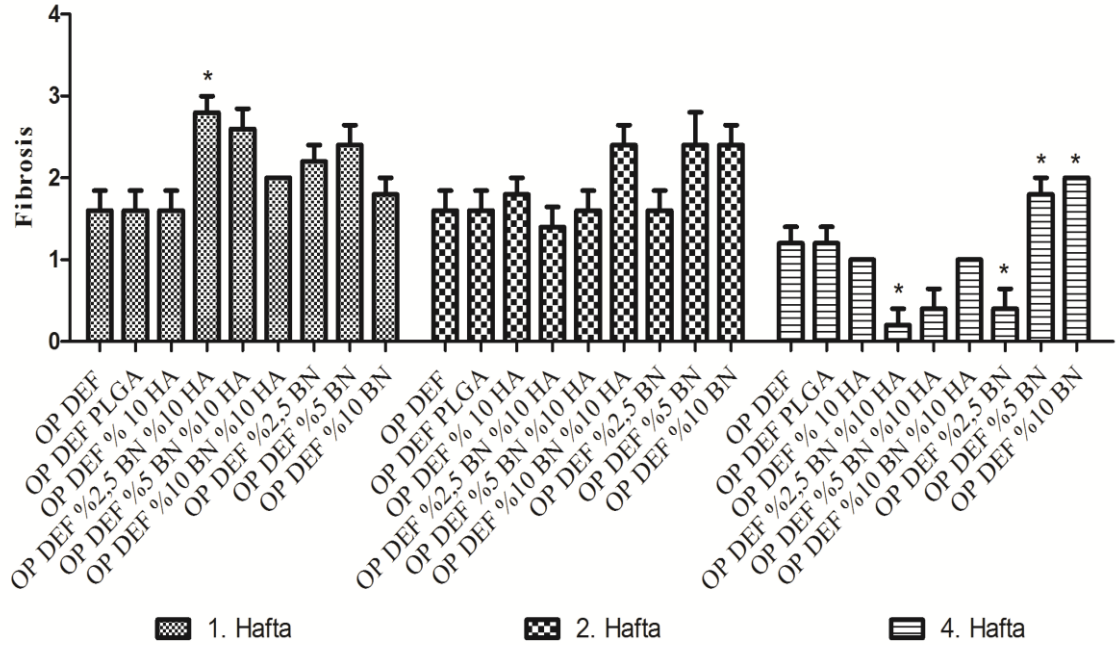
parametresi üzerinden değerlendirildiğinde ise OP DEF %2.5BN %10 HA, OP DEF %10BN %10HA ve OP DEF %10 BN gruplarında OP DEF grubuna göre anlamlı artış görüldü ($P<0.05$). Çalışmamızdaki diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark yoktur ($P<0.05$). Deney gruplarımızda dördüncü hafta yabancı cisim parametrelerine baktığımızda ise OP DEF, OP DEF PLGA, OP DEF %10 BN %10 HA ve sadece OP DEF %10 BN gruplarında yabancı cisim reaksiyonu devam ederken diğer gruplarda yabancı cisim reaksiyonuna rastlanılmamıştır. OP DEF %10BN %10HA ve sadece OP DEF %10 BN gruplarındaki yabancı cisim reaksiyonu OP DEF ve OP DEF PLGA gruplarına göre daha da yükselmiş olarak görülmüştür.



Şekil 4.46. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Primer Kemik Oluşum Bulguları

Histopatolojik bulgularımızda birinci haftada primer kemik oluşumunu incelediğimizde ise OP DEF %2.5BN %10HA, OP DEF %5BN %10HA, OP DEF %2.5BN ve OP DEF %5BN de primer kemik oluşumu hafif derecede başlamış ancak diğer gruplarda histopatolojik kesitlerimizde primer kemik oluşumuna rastlanmamıştır.

İkinci haftaya baktığımızda ise primer kemik oluşumu açısından histopatolojik bulgulara tüm gruplarda primer kemik oluşumu görülmektedir. Yalnız OP EF %2.5BN %10HA ve OP DEF %2.5BN de istatistiksel olarak anlamlı primer kemik oluşumu görülmüştür ($P<0.05$). Dördüncü haftaya baktığımızda ise tüm gruplarda primer kemik oluşumu 1. ve 2. haftalara göre oldukça yükselmiş olup OP DEF %2.5BN %10HA, OP DEF %5BN %10HA, ve OP DEF %2.5BN de primer kemik oluşumu diğer tüm gruplara göre anlamlı şekilde yükselmiştir ($P<0.05$).

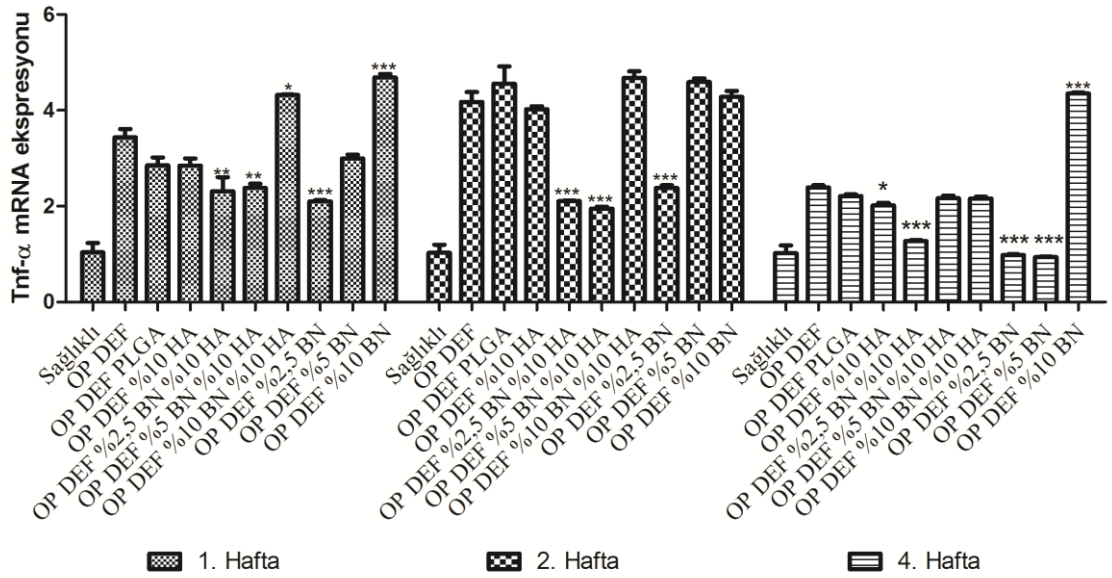


Şekil 4.47. Defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Fibrosis Bulguları

Histopatolojik çalışmamızda baktığımız son parametre olan fibrozis kemik iyileşmesinde son derece önemlidir. Birinci haftada tüm gruplarda fibrozis görülürken OP DEF %2.5BN %10HA’ da OP DEF grubuna göre anlamlı derecede yüksek fibrozis olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). Aynı zamanda OP DEF %5BN %10HA, OP DEF %10BN %10HA, OP DEF %2.5BN, OP DEF %5BN ve OP DEF %10BN gruplarında

fibrozis OP DEF grubuna göre artış gösterirken bu gruplardaki fark anlamlı bulunmamıştır ($P<0.05$). İkinci hafta bulgularımıza baktığımızda tüm gruplarda fibrozis devam etmekte olup OP DEF %2.5BN %10HA, OP DEF %5BN %10HA gruplarında birinci haftaya göre fibrozisin azaldığı görülmüştür. Dördüncü haftaya baktığımızda ise OP DEF %2.5BN %10HA ve OP DEF %2.5BN gruplarında fibrozis OP DEF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($P<0.05$). Diğer gruplarda ise fibrozis devam etmektedir. Aynı zamanda OP DEF %5BN ve OP DEF %10BN’ de fibrozis OP DEF grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek görülmüştür ($P<0.05$).

4.5. Moleküler Bulgular



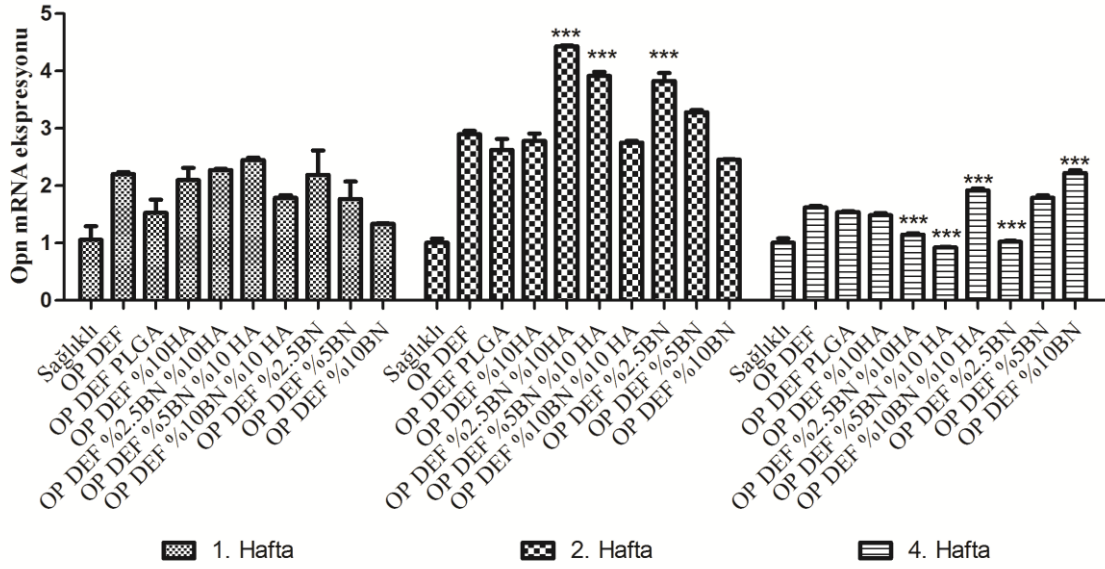
Şekil 4.48. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta TNF- α mRNA ekspresyonları

Çalışmamızın ilk moleküler bulgularından biri olan TNF- α rat femur dokularında 1. 2. ve 4. hafta RT-PCR analizi ile gen ekspresyon düzeyinde incelenmiştir (Şekil 4.48). Primer kemik oluşum süreçleri içerisinde 1. hafta sonuçlarını incelediğimizde OP DEF, OP DEF PLGA, OP DEF % 10 HA ve OP DEF % 5 BN gruplarımızda TNF- α seviyesinin sağlıklı gruba göre arttığını gözlemledik. Genel olarak

tüm gruplarımızla sağlıklı grubu karşılaştırdığımızda TNF- α mRNA ekspresyonlarının tüm gruplarımızda arttığını gördük. OP DEF grubuna göre OP DEF % 10 BN % 10 HA, OP DEF % 10 HA grubu ve OP DEF % 10 BN grubunda ki TNF- α mRNA artışı istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($P<0.01$). Yalnız OP DEF grubu ile OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN grubundaki TNF- α mRNA ekspresyonları istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($P<0.01$).

Kemik iyileşmesini takip ettiğimiz 2. hafta ise TNF- α mRNA ekspresyonları bulgularımıza baktığımız zaman yalnız defekt gerçekleştirilmiş olan OP DEF grubuna göre OP DEF PLGA, OP DEF % 10 HA, OP DEF % 10 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN ve OP DEF % 10 BN'de ki TNF- α seviyeleri benzerdi ve birbirleri arasında istatistiksel bir fark yoktu ($P<0.05$). Yalnız OP DEF grubuna göre OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN gruplarındaki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($P<0.001$).

Kemik defekti iyileşmesini takip ettiğimiz son hafta olan 4. haftaya baktığımızda ise OP DEF grubuna göre OP DEF PLGA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN % 10 HA gruplarında TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri benzer şekilde bulunmuş birbirleri arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($P<0.05$). OP DEF % 10 BN grubundaki TNF- α mRNA ekspresyon seviyeleri ise yalnız defekt oluşturduğumuz OP DEF grubu TNF- α miktarları arasında istatistiksel bir fark olup TNF- α mRNA ekspresyonu oldukça yüksek olarak tesbit edilmiştir ($P<0.001$). Diğer yandan yalnız OP DEF grubuna göre OP DEF % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN gruplarında TNF- α miktarları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu görülmüştür ($P<0.001$).



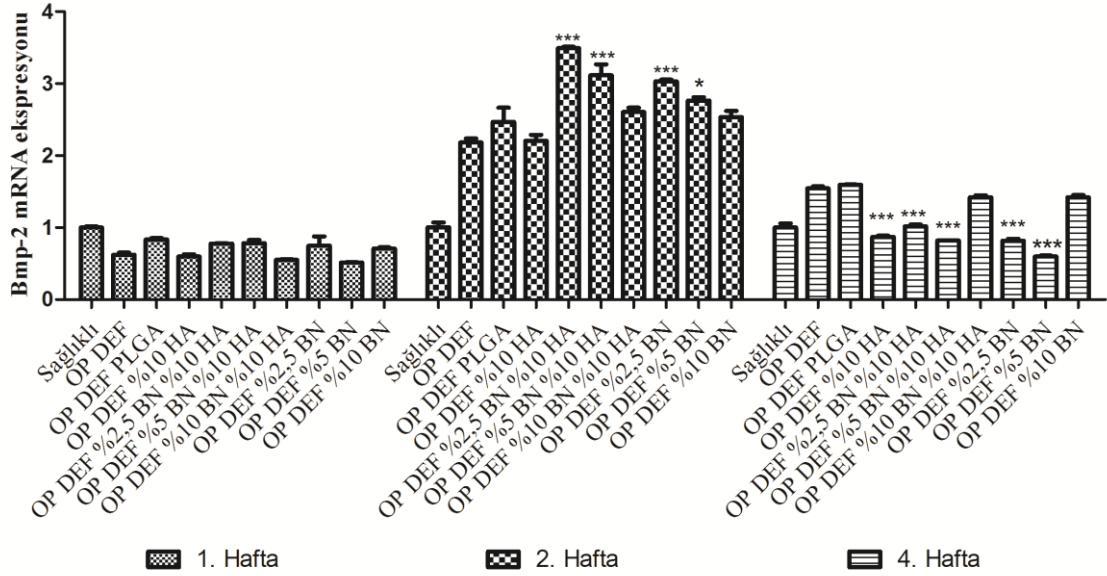
Şekil 4.49. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Osteopontin mRNA ekspresyonları. (* Kontrol defekt grubuna göre $p < 0.05$ oranında anlamlı)

Çalışmamızın ikinci moleküler bulgusu olan Opn mRNA ekspresyonları değerlerini incelediğimizde ise kemik defekti oluşturduğumuzdan sonraki ilk hafta sağlıklı grubu göre tüm gruplarda Opn mRNA ekspresyonlar değerlerini yükseldiği görülmekte olup (Şekil 4.49) gruplar arasında istatistiksel bir anlam bulunmamıştır.

İkinci hafta da ise osteopontin seviyeleri tüm gruplarda yükselmiş olup OP DEF % 2,5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN de daha yüksek görülmektedir.

Yalnız 4. haftada osteopontin seviyeleri bu gruplarda diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu da bize osteopontinin kemiğin yeniden şekillendirilmesinde görevi bittiğini, osteoklastik aktivitenin azaldığını ve kemik maturitesinin tamamlanmak üzere olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda OP DEF %

10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarındaki OPN seviyeleri anlamlı şekilde yüksek kalmıştır.



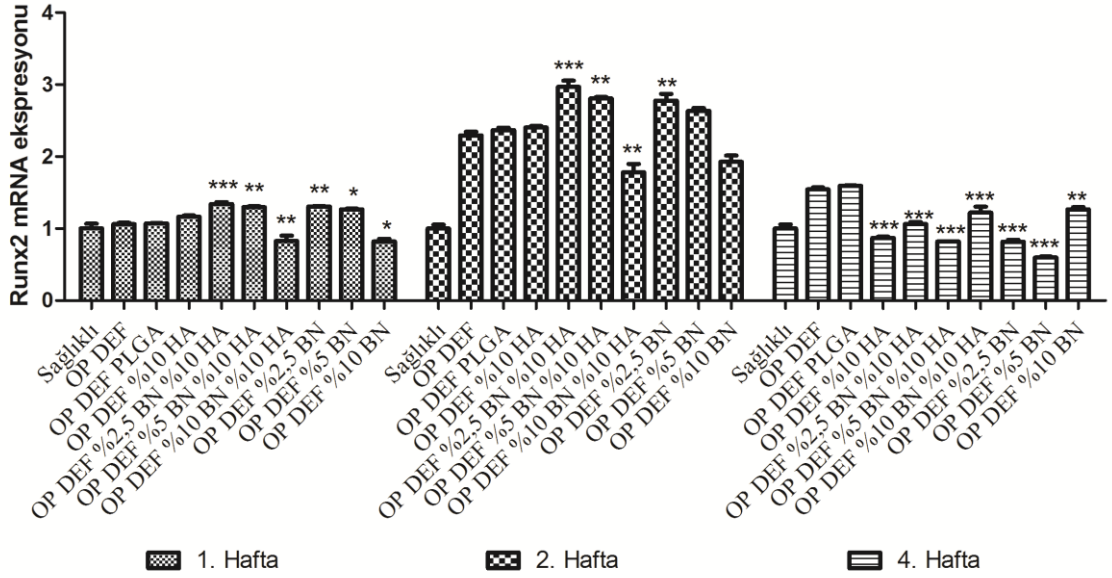
Şekil 4.50. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta BMP-2 mRNA ekspresyonları (* Kontrol defekt grubuna göre $p<0.05$ oranında anlamlı).

Kemik defekt iyileşme süreçlerini takip ettiğimiz kemik moleküler belirteçlerinden biride Bmp-2 dir (Şekil 4.50). 1. hafta gruplarımızı sağlıklı grup ile karşılaştırdığımızda Bmp-2 mRNA ekspresyon miktarlarının düştüğünü görmekteyiz.

İkinci hafta bulgularımıza baktığımızda ise OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN, OP DEF %5 BN %10 HA ($p<0.001$) ve OP DEF %5 BN Bmp-2 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş saptanmıştır ($p<0.05$).

Son hafta olan iyileşmeyi takip ettiğimiz dördüncü hafta ise OP DEF grubuna göre OP DEF PLGA ve OP DEF % 10 BN % 10 HA gruplarında Bmp-2 miktarlarının birbirlerine benzer olduğu ve aralarında istatistiksel bir farkın olmadığı görülmüştür ($p<0.05$). Yalnız OP DEF grubuna göre Bmp-2 mRNA ekspresyon miktarlarının OP

DEF % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN ($p<0.001$) gruplarında anlamlı bir derecede azalmış olduğu OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN grubunda ise diğer tedavi gruplarına göre yükselişin devam ettiği görülmüştür.



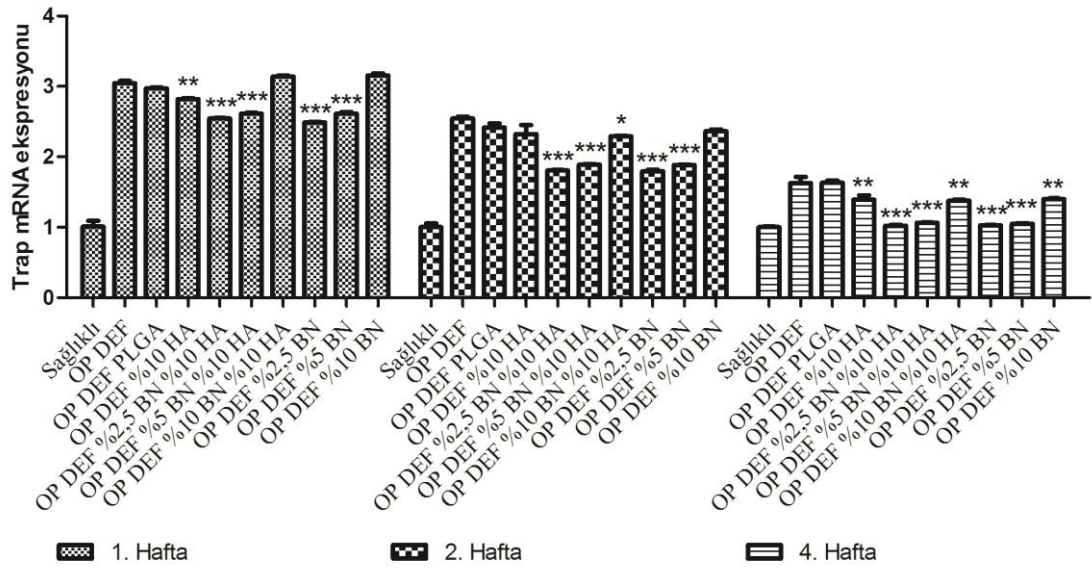
Şekil 4.51. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta Runx-2 mRNA ekspresyonları (* Kontrol defekt grubuna göre $p<0.05$ oranında anlamlı).

Çalışmamızda bir diğer kemik biyobelirteçlerinden biri olan Runx2'nin mRNA ekspresyonlarını ölçtük (Şekil 4.51).

İlk hafta tüm gruplarımızda Runx2 mRNA ekspresyonu sağlıklı kontrole göre arttığı bu artışlar içerisinde özellikle OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarında OP DEF grubuna göre anlamlı derecede bir artış meydana gelmişken ($p<0.01$) buna karşılık OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında OP DEF grubuna göre anlamlı derecede düşüş görülmüştür ($p<0.01$).

İkinci hafta ise sağlıklı gruba göre Runx2 mRNA ekspresyonunda genel olarak bir artış meydana gelirken OP DEF grubuna göre OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tesbit edilirken bunun aksine OP DEF % 10 BN % 10 HA grubunda ise istatistiksel olarak azalış meydana gelmiştir ($p<0.05$).

Son hafta olan iyileşmeyi takip ettiğimiz dördüncü hafta ise diğer iki haftaya göre Runx2 mRNA ekspresyonunda azalış meydana gelmiş olup OP DEF grubuna göre OP DEF % 10 HA, OP DEF % 2,5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN, OP DE % 5 BN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş şeklinde görülmüştür ($p<0.001$). Bu düşüş OP DEF % 10BN % 10HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında da gerçekleşmiş olup diğer gruplar kadar fazla olmamıştır.

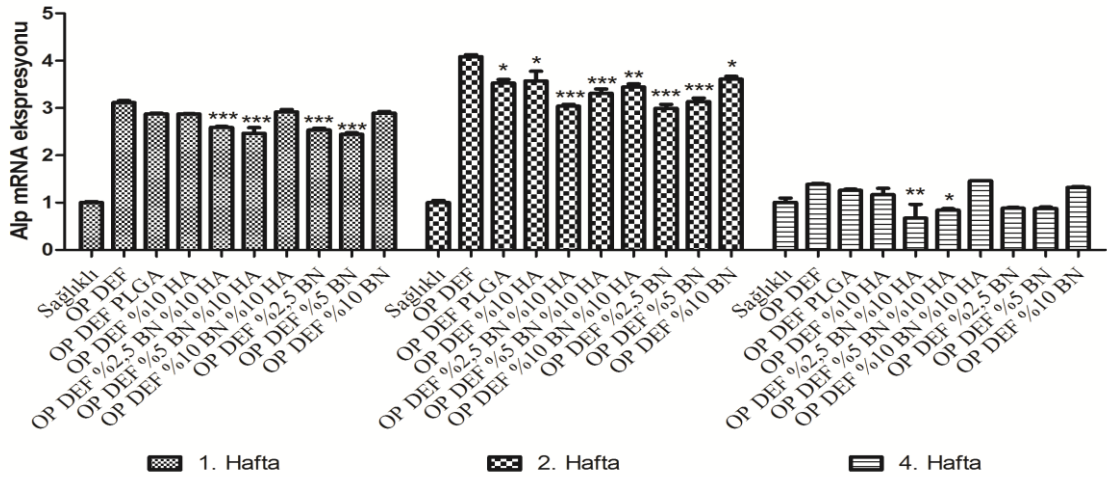


Şekil 4.52. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta TRAP mRNA ekspresyonları (* Kontrol defekt grubuna göre $p<0.05$ oranında anlamlı).

Çalışmamızın 1. 2. ve 4 hafta TRAP mRNA ekspresyonları incelenmiştir (Şekil 4.52). Kemik oluşum süreçlerini takip etmeye başladığımız ilk hafta sağlıklı grubu göre tüm gruplarda TRAP mRNA ekspresyonu arttığı görülmüştür.

İkinci hafta OP DEF grubuna OP DEF % 10 HA ve OP DEF % 10 BN grupları dışında tüm tedavi gruplarımızda anlamlı bir derecede düşüş mevcuttur ($p<0.001$). Yalnız OP DEF PLGA, OP DEF % 10 HA, OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında TRAP değerleri benzer olup diğer tedavi gruplarına göre yüksek olduğu görülmüştür.

4. haftayı incelediğimizde ise OP DEF grubuna göre OP DEF PLGA' dahil olmak üzere tüm tedavi gruplarımızda TRAP mRNA ekspresyon değerlerinde anlamlı bir düşüş gözlenirken ($p<0.01$), bu düşüş OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 HA % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarında anlamlı olarak daha belirgin şekilde olduğu bulunmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.53. Sağlıklı ve defekt kontrol grupları ile PLGA scaffold implante edilen grupların 1., 2. ve 4. hafta ALP mRNA ekspresyonları (* Kontrol defekt grubuna göre $p<0.05$ oranında anlamlı).

Çalışmamızda son olarak ALP mRNA ekspresyon miktarlarını inceledik (Şekil 4.53). İlk haftamızda sağlıklı gruba göre tüm gruplarda Alp mRNA ekspresyonlarının yüksek olduğunu bulunmuştur.

2. hafta ise gruplarımıza baktığımızda ise tüm tedavi gruplarında Alp mRNA ekspresyon miktarlarının ilk haftaya göre artmış olduğunu ve OP DEF grubu ile tüm tedavi gruplarımızı karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görmekteyiz ve özellikle OP DEF % 2.5 HA % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarında Alp seviyeleri benzer şekilde daha fazla oranda bir düşüş tesbit edilmiştir ($p<0.001$). Ayrıca OP DEF grubu ile karşılaştırdığımızda OP DEF PLGA, OP DEF % 10 HA, OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gerçekleşmiş olmasına rağmen bu azalış diğer tedavi gruplarına göre daha az miktarda oluşmuştur ($p<0.05$).

4. haftaya baktığımızda ise OP DEF grubuna göre OP DEF % 2.5 BN %10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarında Alp mRNA ekspresyon seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde düşmüş olduğu ve diğer gruplarda ise düşüşün anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p<0.01$).

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada kemik defekti oluşturulmuş osteoporotik ratlarda bor nitrür ve/veya hidroksiapatit bileşiklerinin etkileri deneysel olarak araştırılmıştır. Bu kapsamda önce overektomi uygulanan hayvanlar 3 ay boyunca bekletilerek osteoporoz oluşumu sağlanmış, daha sonra bu osteoporoz zemininde femoral kemik defekti oluşturularak hayvanlarda PLGA taşıyıcısına belirlenen oranlarda eklenmiş BN/HA bileşiklerinin etkileri incelenmiştir.

Osteoporoz günümüz dünyasında kemik mineral değişimi ve düşük kemik kütlesi ile karakterize edilen bir halk sağlığı sorunudur.²³⁵ Yapılan araştırmalarda Avrupa’da yaşayan yirmi iki milyon kadın ve beş buçuk milyon erkeğin osteoporoz ve osteoporozun neden olduğu başta kalça, vertebra ve kol gibi kemik kırıkları ile karşılaştığı tahmin edilmektedir.⁴⁸ Elli yaş üstü kadın ve erkeklerde osteoporoza bağlı kırıkların oluşumu sırası ile % 59.5 ve % 23.8’dir ve yine osteoporoza bağlı kalça kırıklarının oranı ise kadınlarda % 12.3 erkeklerde ise % 5.2’dir.²³⁶

Avrupa Birliği üyesi ülkeler arasında yapılan bir araştırmada kırıkların tedavisi için gerekli mali yükün ise otuz yedi milyar euro olduğu ve 2025 yılına kadar % 25’i kadar daha artacağı düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında osteoporoz zemininde oluşan kırıkların tedavi edilmesi ve/veya önlenmesi için sağlık politikalarının geliştirilmesi bu bağlamda da yeni tedavi imkanlarının araştırılması önem arz etmektedir.⁴⁸

Kırıkların tedavisinde ve osteoporozun neden olacağı kırık oluşum risklerini azaltmak için etkinliği kanıtlanmış farmakolojik ajanlar arasında bifosfanatlar başta olmak üzere SERM, teriparatid ve monoklonal antikordardan oluşturulmuş denosumab türü ilaçlar geleneksel tedavi yönünden oldukça tercih edilen ilaç gruplarıdır.²³⁷

Osteoporozun tedavisinde geleneksel farmakolojik ajanlar kullanırken kardiyovasküler ve serebrovasküler koşullar göz ardı edilmemeli ve tedavide iyi tolere edilen ilaçların seçimine dikkat edilmelidir.²³⁸

Osteoporozun neden olduğu en ciddi komplikasyon kemik kırıkları olup osteoporoz tedavisinde temel hedef yeni kırıkların oluşmasını engellemek olmalıdır. Osteoporozun altında yatan nedenlerin çok iyi bilinip hareketli bir yaşam tarzını benimsemek, kalsiyum ve D vitamini gibi takviyerin uygulanması kırık oluşma riskini azaltabileceği gibi antirezorptif ve anabolik ilaçların kullanılması; ayrıca da düşme ve çarpma türü fiziksel kazalardan kaçınılması osteoporoza bağlı kemik kırıklarının önlenmesinde primer katkı sağlamaktadır.²³⁹

Yalnız önleyici tedbirler ne kadar alınırса alınsın osteoporoza bağlı kırıklar gün geçtikçe artmaktadır. Bilinmesi gereken en önemli nokta ise osteoporoza bağlı kırıkların iyileşme sürelerinin normal kırıklara göre çok uzun olmasıdır. Hastaneye yatma sürelerinin artması ise hastane enfeksiyonları, emboli gibi birçok komplikasyonu beraberinde getirmektedir.

Kemik kırıklarının tedavisinde kırık bölgesine otolog veya allogenic greft uygulaması ortopedik cerrahilerde en sık tercih edilen prosedürler arasında yer almaktadır. Greftler kemik büyümesini indükleyen faktörleri, osteogenezisi oluşturacak osteoprogenitör hücreleri ve osteokodüksiyon olarak bilinen iskele yapı özelliklerini taşıması gerekir.²⁴⁰

Ancak donör kısıtlılığı, morbidite oranları, tedarigindeki zorluklar, greftin reddi, bulaşıcı hastalıkların alıcıya transferi ve yüksek maliyetten dolayı yeni biyolojik greftlerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır. Doku greftlerinin bu önemli özelliklerinden dolayı biyolojik olarak parçalanabilen biyouyumlu kemik greftlerinin

alternatiflerinin geliştirilmesi uluslararası araştırmalarda büyük ilgi odağı haline gelmiştir.²⁴¹

Doku mühendisliğı teknikleri kullanılarak büyük kemik defektlerinin tedavisinde iyi sonuçlar tesbit edilmiştir.²⁴² Ancak kemik defektlerinin cerrahi tedavisinde enfeksiyon riskleri de kaçınılmaz bir potansiyel oluşturabilmektedir.²⁴³

İdeal bir kemik grefti herhangi bir toksisite veya riski oluşturmaksızın kısa zaman içerisinde optimum kimyasal ve mekanik stabilite sağılamalı ve uygulanan kısımda iyice entegre olmalıdır. Ayrıca greft kullanıldığı alanda yerini yeni kemik dokuya ve tekrar remodellinge bırakması gerekir. Bu şekilde hazırlanacak olan biyomalzeme geliştirme çabaları son zamanlarda bilim adamları ve araştırmacıların hedefi haline gelmiştir.²⁴⁴

Daha önce de belirttiğimiz gibi kemik kırıklarına bağılı olarak gelişen defektlerin tedavisinde klinikte en sık kullanılan kemik greftleri; otogreft, allogreft ve çeşitli sentetik malzemelerdir. Ancak bunların içerisinde otogreftler kemik defektlerinin cerrahi tedavisinde altın standart olarak kabul edilmektedir. Kemik defektlerinin iyileşme süreçleri birbiri içerisinde geçmiş birden fazla farklı oluşum ile gerçekteşmektedir.²⁴⁵

Kemik gelişimini sağılamak ve minerilizasyonu önlemek amacı ile PLGA gibi biyo -bozunabilir ve biyo-uyumlu malzemeler son yıllarda uluslararası araştırmalarda büyük ilgi odağı olmuştur.²⁴¹ Bizde çalışmamızda FDA onaylı biyoyumlu ve değışen zamanlarda biyobozunur.¹⁰¹ özellikte olan PLGA taşıyıcı polimerini farklı konsantrasyonlarda BN/HA uygulayarak bu minerallerin osteoporoza bağılı kemik defektlerine etkisi veya etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda belirli konsantrasyonda hazırlanan hidroksiapatit ve bor minerallerinin osteoporoza bağlı kemik defektleri üzerine etkisi veya etkilerini araştırmak ve bor mineralinin sağlık alanında kullanılabilir olabileceğini hedefledik. Ülkemizde de bor madeninin sağlık alanında kullanılabileceğini gösteren birkaç çalışma olmasına rağmen, ne yazık ki bor madeninin sağlık alanındaki çalışmaları çoğunlukla yurtdışı kaynaklıdır.

Türkiye’deki sağlık sektörünün gelecek vaat eden bir unsuru olan bor, elmadan sonra en sağlam maden olan, yağlayıcı özelliği olan ve toksik olmayan BN’nin osteoporozun neden olduğu kemik defektlerinde tek başına veya hidroksiapatit kombinasyonu ile etkili olabileceği düşüncesi ile bor mineralinin bu çalışmada denenmesini uygun gördük. Böylece kemik mineralizasyonunu hızlandırmak, aynı zamanda kemik defektlerinin neden olabileceği kırığa bağlı ameliyat sonrası oluşabilecek komplikasyonlarını en aza indireceği düşüncesi ile bor mineralini bir taşıyıcıya yükleyerek etkisi veya etkilerini araştırdık.

Yapılan çalışmalarda yaşlanma ve buna bağlı olarak gelişen östrojen eksikliği arasında sıkı bir bağlantı olduğu tesbit edilmiştir. Postmenapozal dönemde östrojen eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan osteoporoz, ovariectomi ile indüklenen sıçan modellerinde benzer mekanizmalar ile östrojen sentezi baskılanmakta ve kliniğe uygun deneysel bir model ortaya çıkmaktadır.²⁴⁶⁻²⁴⁹ Bizde osteoporozu indüklemek için kliniğe uyumlu bu modeli tercih ettik.

Çalışmamızın BMD sonuçlarına baktığımızda; ovariectomi yapılmış ve 3 ay beklenmiş tüm gruplarımızda kemik yoğunluklarının azaldığını görmekteyiz. Bu sonuçlar bize ovariectomi ile indüklenen östrojen eksikliğine bağlı olarak yetersiz kemik gelişimi ve bununla birlikte kemik mineral kayıpları oluştuğunu göstermiştir. Bu osteoporotik ratlarda femur defekti oluşturduğumuzda ise femur defektlerinin 4.

haftadaki BMD bulguları özellikle OP DEF %2.5 BN %10 HA ile OP DEF %2.5 BN gruplarında anlamlı bir şekilde iyileştiğini görmekteyiz. Bu gruplardaki iyileşme sağlıklı gruplardaki BMD değerlerine çok yakındı. Çalışmamızda aynı zamanda BT yardımıyla HU değerlerine bakılmış olup bu değerlerde tomografik olarak kemik yoğunluğunu göstermektedir. Kemik dansitometresini gösteren HU değerlerini incelediğimizde ise DEXA sonuçlarımızla benzer sonuçlar aldığımızı görmekteyiz. Benzer şekilde OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ile OP DEF % 2.5 gruplarında HU değerleri diğer gruplara göre anlamlı derece yüksek görülmüştür. Kemik dansitometre sonuçlarını incelediğimizde OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ile OP DEF % 2.5 BN gruplarında defekt bölgesinde kemik yoğunluğunun artması BN'ün kemik iyileşmesini artırdığını göstermektedir. Aynı zamanda BN'ün düşük konsantrasyonlarının antiosteoporotik etki de göstermiş olabilir. Postmenapozal kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda da bor minerali ile 17 β -estradiol arasında ilişki olduğu bulunmuştur.¹²⁵ Bilindiği üzere menapozal dönemde östrojen hormonu düzeyi hızlı bir şekilde gittikçe azalmaktadır.^{127, 128} Menapoz sonrası kemik mineral kayıp ve risklerinin östrojen konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.^{129, 130} Bu etkiyle osteoklast aktivitesi artarak kemik mineral yoğunluğunun kaybı söz konusu olmaktadır.¹³⁰ Özellikle, menopoz sonrası dönem içindeki kadınlarda, bor östrojen üretimini uyararak östrojen etkilerini taklit eden, hormonların sentezini de teşvik etmektedir.¹²⁵

Bor mineralinin leptin desteği ile kemik immobilizasyonunu azaltan ve kemik gelişimini teşvik eden ve yeniden oluşumunu sağlayan etkileri olduğu bilinmektedir.¹³¹ Tüm bu bilgiler bizim BMD sonuçlarımızı desteklemektedir.

Deneyisel kemik defektleri ve osteoporozun değerlendirilmesinde BMD ve HU değerleri haricinde iyileşme süreçlerini göstermek için BT yardımıyla kemik çap ölçümleri, histopatolojik ve moleküler analizlerde yapılmaktadır.^{5, 26, 247, 250} Bizde bu

bağlamda yine literatüre uyarak kemik defektlerinde radyografi, histopatolojik ve moleküler analizler yaptık.

Kemik iyileşmesini; kırıldak kallus oluşumu, kalsifikasyon, kemiğin yeniden şekillenmesi ve hematoma oluşması gibi birçok farklı süreçler ve faktörler etkilemektedir. Hematom oluşumu, erken vasküler invazyon, inflamatuvar yanıt ve iyileşmeyi kolaylaştıracak olan mezenşimal kök hücrelerin göçü defekt iyileşmesi ile karakterizedir.²⁵¹

Defekt iyileşmesinin bir sonraki aşaması ise greft ile karakterize olan repair ve remodeling olarak da isimlendirilen yeniden şekillenme aşamalarıdır.²⁵²

Deney gruplarımızdaki BT sonuçlarına baktığımızda defekt sonrası 4. haftada OP DEF grubu çok az olmakla beraber hariç tüm grupların femur distal metafizinde oluşturulan defektif kemik bölgesinde iyileşme mevcut, özellikle OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 5 BN, gruplarda daha fazla bir iyileşme BT analizinde izlenmektedir. Tübitak projesi kapsamında yapmış olduğumuz daha önceki çalışmada PLGA iskelelerine emdirilmiş bor mineralinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin olduğunu tesbit etmiştik.⁵ Bu veriler ışığında bizim çalışmamızın BT analiz sonuçlarına baktığımızda da bor mineralinin kemik iyileşmesi üzerine etki/etkilerini olduğu gözlenmiş olup önceki yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmaktadır.

BT incelemelerimizde 1., 2., 4. haftalarda defekt çapları da hesaplanmıştır. Defekt çap sonuçlarımıza baktığımızda ilk hafta OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF. % 5 BN % 10 HA uygulanan ve defekt oluşturulan rat femur defekt çaplarının anlamlı derecede küçüldüğü yalnız diğer gruplarda anlamlı bir iyileşme olmadığı görülmektedir.

2. hafta kemik çaplarımızı incelediğimizde ise OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN uygulanan ve defekt oluşturulan rat

femur defekt aplarınınin anlamlı derecede kld yalnış diğery gruplarda anlamlı bir iyileşme olmadığı görülmektedir.

4. hafta kemik aplarımızı incelediğimizde ise OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN uygulanan ve defekt oluşturulan rat femur defekt aplarınınin anlamlı derecede kld yalnış diğery gruplarda da iyileşme olduğu fakat anlamlı bir iyileşme olmadığı görülmektedir.

Bu alışmada BN/HA minerallerinin farklı yüzde oranlarıyla emdirilmiş PLGA doku iskelesinin ovariektomi ile indüklenmiş osteoporozda oluşturulan kemik defekti üzerine olan etki veya etkilerini histopatolojik yönden de inceledik. Tüm iyileşme süreçleri arasında osteoporoz defekt kontrol (OP DEF) grupları ile BN/HA uygulanan osteoporoz defekt grupları BT analizi karşılaştırıldığında gruplar arasında farklılıklar olmasına karşın yeni kemik oluşumları histopatolojik olarak da gözlemledik.

Hematoksilen ve eosin (H&E), boyama yapılan gruplar arasında fibrosis, yabancı cisim ve primer kemik oluşumu histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

Kemik defekti oluşturulurken teknik işleme bağlı olarak özellikle zedelenen damar duvarından kanama olmaktadır. İyileşme sürecinde zamanla kanama rezorbe olur ve yerini oraya göç eden çeşitli inflamatuvar hücrelere ve fibröz dokuya bırakır.²⁸ Fibroziste kastedilen kronik enflamatuvar granülasyon dokusudur. Olaya fibroblastik proliferasyon, kapiller damar angiogenezi ve yine inflamatuvar mononükleer hücre infiltrasyonu eşlik eder. İyileşme sürecinin en önemli basamağıdır ve kaybolan doku açığını kapatır. Daha sonrada kemikleşme başlar.

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimizde ilk parametremiz yabancı cisim varlığı olmuştur. Vücut için yabancı cisim varlığı ve vücudun ona karşı oluşturduğu

yabancı cisim tipi dev hücre fibrosis ve inflamatuvar mononükleer hücre infiltrasyonunun bulunması ile skorlandı.

Çalışmamızın histopatolojik bölümünü değerlendirilmesinde ilk olarak yabancı cisim reaksiyonlarını 1., 2., ve 4. Hafta sonuçları incelenmiştir. İlk haftada OP DEF PLGA; OP DEF % 10 HA, OP DEF % 5 BN %10 HA ve OP DEF % 10 BN % 10HA gruplarında yabancı cisim reaksiyonlarının arttığı görülmekte olup yalnız bu artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Defekt iyileşmesinin 2. haftasında ise OP DEF grubu hariç tüm gruplarda yabancı cisim reaksiyonu artarken; OP DEF % 2.5 BN %10 HA ve OP DEF % 10 BN % 10 HA, OP DEF % 10 BN’ de istatistiksel olarak anlamlı artış görülmektedir. Yalnız 4. hafta incelememizde ise OP DEF, OP DEF PLGA, OP DEF % 10 BN % 10 HA VE OP DEF % 10 BN gruplarında yabancı cisim reaksiyonunun devam ettiği görülmektedir. Bu bulgu bizim daha önce tartıştığımız bulgularla örtüşmektedir. Radyografik ve DEXA ile tam kemik iyileşmesini tesbit ettiğimiz gruplarda yabancı cisim reaksiyonlarının kaybolduğu görülmektedir. Yalnız burada radyografik olarak özellikle OP DEF % 5 BN % 10 HA ile OP DEF % 5 BN gruplarında radyografik olarak tam iyileşme olmamasına rağmen histopatolojik olarak yabancı cisim reaksiyonların durması bu gruplarda da iyileşmenin olduğu yalnız tam kemikleşmenin olmadığı iyileşmenin biraz daha uzadığını göstermektedir.

Histopatolojik sonuçlarımızın 2. bulgusu kemik defekt iyileşmesindeki fibrozis gelişimiydi. Çalışmamızın 1. ve 2. haftalarına baktığımızda bor uygulanan tüm gruplarda fibrozisin artığının yalnız 4. haftada ise OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ile OP DEF % 2.5 BN gruplarında fibrozisin anlamlı derecede azaldığı yalnız OP DEF % 5 BN ve OP DEF % 10 BN gruplarında anlamlı olarak yüksek kaldığı bulunmuştur. Fibrozis bulgularımızda daha önce sunduğumuz bulgularla örtüşmektedir. Fibrozisin 4. haftada devam etmesi kemik iyileşmesinin devam ettiğini veya olmadığını göstermektedir. 1. ve

2. haftalarda gelişen fibrozis 4. haftada yerini primer kemik iyileşmesine bırakmalıdır. Çalışmamızda da OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 2.5 BN % 10 HA gruplarında fibrozis 4. haftada azalmış komple bir defekt iyileşmesi görülmüştür. Burada dikkat çekmemiz gereken diğer konu ise % 5BN % 10 HA grubunda da yabancı cisim reaksiyonunda olduğu gibi bir düzelmenin olduğu yalnız istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gösterilmiştir.

Gerçek iyileşme için asıl olması gereken reaksiyon ise primer kemik oluşumudur. İyi bir kemikleşme ve daha sonra sekonder kemik oluşumu, iyileşme süresinin tamamlandığını gösterir.

Histopatolojik incelememizin 3 ayağı ise primer kemik oluşumunun haftalara göre incelenmesidir. İlk hafta sonuçlarımıza baktığımızda OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 2.5 BN % 10 HA gruplarında OP DEF kontrol grubuna göre anlamlı derecede primer kemik oluşumunda artış görürken diğer gruplarda görülmemiştir. Yalnız OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OF DEF % 5 BN gruplarında primer kemik oluşumu başlamış olup OP DEF grubuna göre anlamlı bir artış olmamıştır. 2. hafta sonuçlarımıza baktığımızda tüm gruplarımızda primer kemik oluşumu başlamış olmakla beraber OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OF DEF % 2.5 BN gruplarında primer kemik oluşumu OP DEF grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği görülmüştür.

4. hafta sonuçlarımızda ise tüm gruplarda primer kemik oluşumunun devam ettiği yalnız OP DEF grubu ile karşılaştırdığımızda OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarındaki primer kemik oluşumunun anlamlı şekilde yüksek olarak bulunmuştur.

Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda kemik iyileşme süreçleri içerisinde farklı yüzdelerde BN/HA emdirilmiş PLGA' nın kemik rejenerasyonun arttırılmasında önemli rol oynadığı göstermektedir. Bu çalışmamız önceki yapılan bor kaplı doku

iskeleri ile kemik rejenerasyonu çalışmaları ile örtüşmektedir.⁵ Bu verilerimiz yaptığımız radyografik BT analizleri ile de örtüşmektedir. Bu veriler göz önüne alındığında bor mineralinin kemik oluşumuna teşvik edici özelliği olduğu söylenebilir.

Daha öncede bahsettiğimiz gibi kemik defekti iyileşme aşamaları çeşitli radyografi teknikleri ile kontrol edildiği ancak birçok deneysel çalışmada da farklı olarak defekt iyileşmesi moleküler düzeyde kemik belirteçlerinin gen ekspresyon düzeyinde de incelendiği görülmektedir.²⁵³⁻²⁵⁶ Bu incelemeler oldukça önemli olup herhangi bir maddenin kemik iyileşmesi üzerine olane etkisinin nedenlerini öğrenmek için gereklidir. Çalışmamız sonuçlarını bir araya getirdiğimizde OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN'nin önemli bir şekilde kemik defekt modelinde etkili olduğunu görmekteyiz. Yalnız BN'nin hangi mekanizmalarla etkisini gösterdiğini incelemek için kemik iyileşmesinde önemli olan çeşitli moleküllerin ekspresyonunu inceledik.

Osteoporozun zemininde oluşan kemik defekti veya sadece kemik defektlerinde anaormal seviyede bir TNF- α yükselmesi vardır ve bu nedenle osteoblastogenezde göreceli bir bozulma meydana gelmektedir.²⁵⁷ TNF- α kemik metabolizmasında olumsuz etkilere yol açan en önemli sitokinlerden biridir. Ankilozan spondilit ve çeşitli artritlerin patolojik süreçleri içerisinde de olumsuz katkıları vardır.²⁵⁸

TNF- α , BMP-2' ye benzer bir şekilde hücre içi sinyal yollarında MAPK situmülasyonu ile enflamatuar etki oluşturmaktadır.^{259, 260} Ancak TNF- α , BMP-2'nin kemik gelişimine pozitif katkısı aksine kemik kaybını teşvik eder, osteoklastogenezini aktive ederek ve osteoblastik farklılaşmayı inhibe ederek kemik mineral yoğunluğunun azalmasına katkıda bulunmaktadır.²⁶¹⁻²⁶³

Kemiğin yeniden oluşum aşamalarında TNF- α osteoblast ve osteoklastların modülasyonunda önemli rol oynar. Kemik defekti iyileşmesinde meydana gelen inflamatuvar fazda, TNF- α öncü sentezlenen sitokinler içinde yer alır ve kemik reabsorpsiyonu uyarır.²⁶⁴ Klasik TNF- α kemik homeostazının düzenlenmesinde osteoklastogenezi uyarması ve osteoblast aktivitesini önleyerek gerçekleştirirler.¹⁶⁷

Kemik hücreleri üzerine in vitro yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın osteoblast hücrelerinin farklılaşması üzerine inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu bloke edici etkisi, insülin benzeri büyüme faktörleri-1 gibi çeşitli faktörlerin inhibisyonu sonucu olduğu gösterilmiştir.^{168, 169} Ayrıca TNF- α 'nın östrojen eksikliğinde osteositlerin apoptozisini de indüklediği yönünde çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁶⁷

TNF- α ; bir transkrip faktörleri olan NF- κ B etkileyerek de osteoklastogenez üzerinde etkisini göstermektedir.^{170, 171}

TNF- α bu süreçte düşük doz halinde osteoblast proliferasyonunu sağlarken yüksek dozlar, in vitro ve in vivo kemik oluşumunu inhibe edebilir.^{39, 172} TNF- α yalnız direkt etkisi ile östrojen eksikliğine bağlı matur osteoklast aktivitesini geliştirmesinin yanında aynı zamanda indirekt olarak stromal hücrelerde ve osteoblast hücreler yolu ile RANKL sekresyonunu sağlayarak osteoklast aktiviteyi stimule eder.^{173, 174}

Önceki yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda yüksek seviyedeki TNF osteoblastogenesi, osteoblast fonksiyonlarını ve yanı sıra kemik oluşumunu ile onarımını da engellediği tesbit edilmiştir.^{172, 265} Ancak normal seviyelerdeki TNF- α 'nın sentezi kemik oluşumu için gereklidir.²⁶⁴

Cardemil ve ark.²⁶⁶ ve arkadaşlarının ovariektomi ile indüklenmiş ratlarda yapmış oldukları çalışmada, inflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α 'nın kemik iyileşme sürecinde inflamatuvar etki gösterdiği gen ekspresyon analizleri ile göstermişlerdir. Zhang ve ark.²⁶⁷ yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise kemik

rejenerasyonun başlangıcında TNF- α 'nın gen ifadesinin ilk haftalarda yükseldiği daha sonraları ise başlangıç seviyelerine dönmüş olduğu gözlemlenmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında çalışma gruplarımızdaki ilk hafta TNF- α ekspresyonlarına baktığımızda sağlıklı gruba göre tüm gruplarda TNF- α 'nın arttığı görülmektedir. Bu TNF- α 'nın artışı yukarıdaki bilgilerden de anlaşılacağı gibi iki nedenle olmuş olabilir. Bir tanesi östrojen eksikliğine bağlı oluşan osteoporozda TNF- α seviyelerinin yükselmesi, diğeri ise kemik iyileşmesinin inflamatuvar fazında TNF- α 'nın artışının iyileşme üzerine etkilerinden dolayı olduğu olarak düşünülebilir. Yalnız ilk hafta TNF- α bulgularımıza tekrar dönersek OP DEF % 10 BN ve OP DEF % 10 BN % 10 HA grubundaki artışın oldukça yüksek olduğu ve aksine OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarındaki artışın daha az olduğu görülmektedir. Gerek osteoporoz gerekse kırık iyileşmesinin ilk fazında TNF- α seviyelerinin yükselmesi beklenirken çok fazla yükselmesi osteoklastik aktivitenin arttığını göstermektedir. TNF- α 'nın ilk fazdaki etkisi modöراتör etki olup çok yükselmesi ise osteoklastik etki gösterirken az miktarda yükselmesi osteoblastları module etmektedir.

2. hafta TNF- α seviyelerine baktığımızda ise tüm gruplarda beklenir şekilde sağlıklı gruba göre bir TNF- α seviyelerinde artış görürken OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarındaki TNF- α seviyeleri oldukça düşük kalmıştır. Yalnız diğer çalışma gruplarımızdaki TNF- α seviyeleri ilk haftaya göre artış göstermektedir. Bu sonuçlar bize özellikle OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarında kemik iyileşme sürecinin ilk inflamatuvar fazının bittiğini ve 2. aşamaya geçtiğini gösterirken diğer gruplarda hala daha inflamatuvar sürecin devam ettiğini göstermektedir.

4. hafta sonuçlarımızı incelediğimizde ise OP DEF grubuna göre OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN gruplarında TNF- α seviyeleri anlamlı şekilde düşmüş olup sağlıklı gruba yaklaşmıştır.

TNF- α seviyelerine baktığımızda OP DEF % 2.5 BN, OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarında 4. hafta enflamatuvar faz bitmiş son faza geçirmiş olduğu görülmektedir. Diğer gruplarda ise hala daha inflamatuvar olaylar devam etmektedir. Histopatolojik incelemelerimize tekrar geri dönersek yabancı cisim reaksiyonu ile TNF- α seviyelerinin örtüştüğü görülmekte olup bu iki verimiz birbirini desteklemektedir.

Moleküler olarak kemik gelişiminde etkili matris dışı proteinlerden biri de osteopontindir. Bizde bu doğrultuda osteopontin ekspresyon seviyesini gen düzeyinde belirledik. Osteopontin SPP1 olarak bilinen SIBLING (small integrin-binding ligands N-linked glycoproteins) protein ailesinin bir üyesidir.¹⁶⁰ Kemik dokudaki osteoblast ve osteosit hücreleri bol miktarda osteopontin salgılamaktadır.²⁶⁸ Patolojik sınırlardaki kemik mineral kayıpları durumunda bu bölgelerde birikerek etki ederler.²⁶⁹

Xing ve ark.²⁷⁰ yapmış oldukları çalışmada hücre dışı matriks olgunlaşmasında osteopontin seviyelerinin arttığı gözlemlenmiş olup bizim çalışmalarımızda doğru orantılıdır. Yine başka bir çalışmada Casarin ve ark.²⁷¹ sıçanlarda yaptığı deneysel kemik defekti iyileşmesinde osteopontin gen seviyesinin arttığı ve kemik modülasyonunu da tamir ettiğini tesbit etmişlerdir.

Bizim çalışmamıza dönersek aslında iki önemli noktada osteopontin seviyelerini incelemeliyiz. Birincisi; çalışmamız ovariectomi ile indüklenen osteoporoz zemininde olduğundan osteoporoz osteopontin ilişkisi, ikincisi ise osteopontinin kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri olmalıdır. Yapılan çalışmalarda postmenopozal bayanlarda ve ovariectomi ile indüklenen osteoporotik sıçanlarda osteopontin ile kemik yoğunluğu

arasında negatif bir korrelasyon olduğu gösterilmiştir.²⁷²⁻²⁷⁴ Yapılan çalışmalarda RANKL'la indüklenen osteoklastogeneizde osteopontinin önemli bir anahtar regülatör olduğu gösterilmiştir.^{275, 276} Osteopontin osteoklastogeneizde ve matur osteoklastların rezorptif etkisinde potent bir stimülatör olduğu gösterilmiştir.²⁷⁷ Osteopontin eksikliği oluşturulmuş osteoporozlu sıçanlarda kemik kaybınının daha az olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.²⁷⁸⁻²⁸⁰ Bizim çalışmamız litratürdeki bu değerli bilgiler ile örtüşmektedir. Şöyleki 1. hafta ovariektomi yapılmış tüm gruplarda osteopontin seviyesi yüksek görülmüştür. Yalnız tüm gruplar arasında osteopontin seviyelerinde anlamlılık bulunamamıştır. Kemik iyileşmesinde ise osteopontin iskelet remodellemesinde ve yeniden şekillendirilmesinde önemli görevler alır.^{281, 282} Bu nedenle osteopontin kemik iyileşme sürecinin ikinci döneminde yüksek olması doğaldır. Bizim çalışmamızda da ikinci hafta da osteopontin seviyeleri tüm gruplarda yükselmiş olup OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN de daha yüksek görülmektedir.

Yalnız 4. haftada osteopontin seviyeleri bu gruplarda diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu da bize osteopontinin kemiğin yeniden şekillendirilmesinde görevi bittiğini, osteoklastik aktivitenin azaldığını ve kemik maturitesinin tamamlanmak üzere olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarındaki OPN seviyeleri anlamlı şekilde yüksek kalmıştır.

Kemik iyileşmesi bir çok faktörü içerisinde bulunduran kompleks yapıların etkisi ile oluşmaktadır. Bu yapıları meydana getiren ve iyileşme belirteçlerinden biri de kemik morfogenetik protein-2 (BMP-2)'dir. BMP-2 Transform edici büyüme faktörü olan TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. Kemotaksis ve mitoz, kıkırdak farklılaşması ve kıkırdak yapının kemiğe dönüştürme gibi kemik indüksiyonunda önemli üç adımı

yönetmektedir. Ayrıca hücre ölümü, hücre canlılığının sürdürülmesi, ekstraselüler matriks sentezi ve hematopoiezin düzenlenmesinde görev almaktadır.²⁸³ BMP-2, BMP tip 2 reseptörlerine bağlanarak aktivasyonu başlatmaktadır. BMP sinyali ise hücre içerisinde Smad1/5/8 fosforile ederek Smad4 ile kompleks oluşturur ve çekirdeğe taşınır böylece osteojenik genlerin transkripsiyonunu aktive veya inhibe eder.²⁸⁴ Ayrıca BMP ailesi bir transkrip faktörü olan core-binding factor a1 (Cbfa1)'in sentezini stimule ederek osteoblasta özgü genlerin de aktivasyonunda görev alırlar.²⁸⁵

Birçok çalışmada taşıyıcı implantlar, organik veya inorganik matrisler BMP-2 proteini ile kaplanarak kemik rejenerasyonunda etkisi araştırılmıştır. Kemik rejenerasyonuna yeterli etki konsantrasyonunu muhafaza eden biyomalzemeler için araştırmalar devam etmektedir.^{286, 287} Yüksek bağlama kapasitesi olan kollojen süngerlere ve hidrojellere BMP-2'nin emdirilerek trabeküler kemik üzerine yapılan kritik defektte kemik hacmini başarılı bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir.²⁸⁸ Konumuzla ilgili olarak östrojen BMP-2 ekspresyonunu arttırdığı ve kemik rejenerasyon yeteneğinde önemli katkılar sağladığı gösterilmiştir.²⁸⁹

BMP-2 ekspresyon seviyelerini incelediğimizde 1. Haftada osteoporoz oluşturulmuş tüm gruplarda BMP-2 ekspresyonlarının sağlıklı gruba göre azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar bize östrojenin BMP-2 üzerinde önemli etkilerinin olduğunu göstermektedir. 2. Hafta BMP-2 ekspresyonlarına baktığımızda ise tüm gruplarda sağlıklı gruba göre arttığını görmekteyiz. BMP-2 kemik iyileşmesinde önemli roller almaktadır. Kemik iyileşme fazlarında BMP-2 artması olağandır. Yalnız gruplarımız içinden OP DEF % 2.5BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarındaki BMP-2 ekspresyonları OP DEF grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç bize yukarıda belirttiğimiz gruplardaki kemik iyileşmesinin daha yüksek oranda olduğunu göstermektedir. 4. hafta bulgularımıza

baktığımızda ise OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarındaki BMP-2 seviyeleri 2. haftaya göre anlamlı derecede azaldığı görülmüş olup OP DEF grubuna göre 4. haftada anlamlı derecede düşük görülmüştür. Bu sonuçlar bize bu gruplarda iyileşmenin tama yakın olduğunu göstermektedir. Diğer gruplarda ise OP DEF grubuna göre BMP-2 seviyeleri istatistiksel olarak yüksek kalmıştır.

Runt-ilişkili transkrip faktör (Runx-2) osteoblast farklılaşmasında önemli bir transkripsiyon faktörüdür.²⁹⁰ STAT5'i uyararak hücre içi sinyal yolağını harekete geçirmektedir.²⁹¹ Runx-2 ekspresyonunun osteoblast farklılaşmasını arttırdığı yönünde çalışmalar yapılmıştır. Runx gen ailesine ait genler birden çok önemli rollere sahiptirler. Runx1 hematopoezde önemli roller oynarken Runx2 ile birlikte mezenkimal farklılaşmanın erken dönemlerinde göğüs kemiği gelişiminde katkı sağlamaktadır.^{292, 293}

Otto ve ark.²⁹⁴ Runx2 geni kapatılan fareler üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada; farelerde minerilizasyonun gelişmediği kıkırdak ve iskelet yapısının oluşmadığı tesbitinde bulunmuşlardır. Son yıllarda yapılan kemik defektleri çalışmalarında Runx2 ekspresyonunun defekt iyileşme aşamasında önemli derecede arttığı tesbit edilmiştir.²⁹⁵⁻²⁹⁷ Rat femurlarında Wojtowicz ve ark.²⁹⁸ yaptıkları kritik boyutta defekt çalışmasında da uzun kemiklerde Runx2 ekspresyonunu arttıracak tedaviler gelecekte klinik defekt iyileşmesinde Runx2'nin potansiyel bir yeri olacağını düşündürmektedir.²⁹⁷ Gen susturma modelleri ile yapılan çalışmalarda Runx-2'nin kemik oluşumu ile ilişkisi olduğu tesbit edilmiştir.²⁹⁹

Bu bilgiler doğrultusunda bizim çalışmamızda tüm haftalar boyunca Runx2 mRNA ekspresyonu artmış olmakla beraber deney gruplarımızda ilk hafta tüm gruplarımızda Runx2 mRNA ekspresyonu sağlıklı kontrole göre arttığı bu artışlar içerisinde özellikle OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP

DEF % 5 BN gruplarında OP DEF grubuna göre anlamlı derecede bir artış meydana gelmişken buna karşılık OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında OP DEF grubuna göre anlamlı derecede düşüş görülmüştür. İkinci hafta ise sağlıklı gruba göre Runx2 mRNA ekspresyonunda genel olarak bir artış meydana gelirken OP DEF grubuna göre OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tesbit edilirken bunun aksine OP DEF % 10 BN %10 HA grubunda ise istatistiksel olarak azalış meydana gelmiştir. Son hafta olan iyileşmeyi takip ettiğimiz dördüncü hafta ise diğer iki haftaya göre Runx2 mRNA ekspresyonunda düşme meydana gelmiş olup OP DEF grubuna göre OP DEF % 2,5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 BN % 10 HA ve OP DEF % 2.5 BN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş şeklinde görülmüştür. Bu doğrultuda femur distalinde oluşturulan defekte primer kemik oluşumunun en üst seviyede olduğunu söyleyebiliriz.

Hematopoietik hücrelerden köken almış olan osteoklast hücreleri kemik mineralizasyonunun azalmasında önemli rol oynamaktadırlar. Tartarat dirençli asit fosfataz yani TRAP (ACP5) olarak da bilinen molekül osteoklastların farklılaşmasını indükleyen faktörler arasında yer alır. Ayrıca kemik rezorbsiyonunun önemli bir belirteçidir.^{208, 209}

TRAP osteoklastik olarak TRAP şeklinde sentezlenirken serumda TRAP 5b izoformu bulunur.²⁰⁰ Başlıca osteopontin gibi kemik matriks proteinlerinin defosforilasyonundan sorumludur.^{201, 202} Osteoklastlardan salgılanan TRAP diğer kemik hücrelerinde de mevcut olmakla beraber kemik erimesi ve kemik oluşumunu sağlayan bir faktördür.²⁰³ Halleen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada serumda TRAP 5b aktivitesinin osteoporoz ve kemik mineralizasyonunu olumsuz etkileyen bir belirteç olarak göstermişlerdir.²⁰⁴ Buna karşılık yapılan in vivo çalışmalarda TRAP proteinin

baskılanması kemikleşmeyi engellediği ve osteoporotik bir fenotipin oluşmasına neden olduğu görülmüştür.²⁰⁵ Kadınlarda postmenapozal dönemi taklit eden östrojen eksikliğine bağlı kemik mineral miktarının azalmasını ovariektomi ile indüklenmiş deneysel osteoporoz modelinde TRAP ekspresyonunun değiştiği deneysel olarak gösterilmiştir.²⁰⁷

Da-wei Zhang, ve ark.³⁰⁰ ovariektomi ile indüklenen osteoporoz çalışmasında TRAP serum seviyelerini ölçmüşlerdir ve osteoporoz grubuna göre tedavi gruplarında serum düzeyinde TRAP miktarının azaldığını tesbit etmişlerdir. Yine benzer şekilde Xin-chen Xu ve ekibinin.³⁰¹ yapmış olduğu benzer bir çalışmada diğer ekibin sonuçlarını destekler nitelikte olmuştur. Bizde bu çalışmalar doğrultusunda osteoporoz zemininde oluşturduğumuz defektlerde iyileşme süreci içerisinde TRAP seviyesini gen düzeyinde belirledik. 1. hafta sağlıklı grubu göre tüm gruplarda TRAP mRNA ekspresyonu arttığı görülmüştür. Yalnız ilk hafta olmasına rağmen OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 HA % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarındaki TRAP yükselmesi daha az idi. Bu sonuç ise osteoklastik aktivitenin daha az olduğunu göstermektedir. İkinci hafta OP DEF grubuna göre tüm tedavi gruplarımızda anlamlı bir derecede düşüş mevcuttur. Yalnız OP DEF PLGA, OP DEF % 10 HA, OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında TRAP değerleri benzer olup diğer tedavi gruplarına göre yüksek olduğu görülmüştür.

4. haftada ise OP DEF grubuna göre OP DEF PLGA' dahil olmak üzere tüm tedavi gruplarımızda TRAP mRNA ekspresyon değerlerinde anlamlı bir düşüş gözlenirken ($p<0.001$), bu düşüş OP DEF % 2.5 BN % 10 HA, OP DEF % 5 HA % 10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarında anlamlı olarak daha belirgin şekilde olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). Ekspresyon miktarlarının yüksek olarak seyretmesi akla hala osteoklastik aktivitenin devam ettiğini ve komplet kemikleşmenin

bazı tedavi gruplarında oluşmadığını göstermektedir. Ayrıca TRAP mRNA ekspresyon seviyelerinin ikinci haftadan itibaren düşük seyri akla bor mineralinin anti-osteoporotik etkisi olabileceğini göstermektedir.

ALP, bir osteoblastik farklılaşma faktörüdür.³⁰² Aktif ALP pirofosfat ve inorganik fosfatın hidrolizi ile matriks proteinlerini minerilizasyona teşvik eder.³⁰³ ALP aktivitesinin artması özellikle osteogenezde osteopontin gibi osteojenik genlerin sentezini de arttırmaktadır. Yapılan hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda bu etki doğrulanmıştır.³⁰⁴

Xiaoning ve ark.³⁰⁵ yapmış oldukları karvaryl kemik defektinin hızlı iyileşme çalışmasında artmış olan ALP aktivitesinin, osteoblast hücre ve matriks minerilizasyonu üzerine etkileri olduğunu bildirmiş ve 1. 2. ve 3. hafta sonunda ALP seviyelerinin ve kalsiyum mineral seviyelerinin arttığını gözlemlemişlerdir.

ALP kemik mineralizasyonu için gerekli olan osteoblast tarafından salgılanan bir kollajen olmayan proteindir.³⁰⁶ Serumda ALP düzeyinin artması süratli bir kemik kaybı durumunu göstermektedir.³⁰⁷ Bu sonuçlara göre bizim osteoporoz zemininde yapmış olduğumuz çalışmamızda da ilk hafta sağlıklı gruba göre tüm gruplarda Alp mRNA ekspresyonlarının yüksek olduğunu ve literatür ile uyumlu olduğunu gördük.

2. hafta ise gruplarımıza baktığımızda OP DEF grubuna göre tüm tedavi gruplarında Alp mRNA ekspresyon miktarlarının ilk haftaya göre artmış olduğunu ve OP DEF grubu ile tüm tedavi gruplarımızı karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görmekteyiz ve özellikle OP DEF % 2.5 HA % 10 HA, OP DEF % 5 BN %10 HA, OP DEF % 2.5 BN ve OP DEF % 5 BN gruplarında da Alp seviyeleri benzer olarak daha fazla oranda düştüğü tesbit edilmiştir ($p<0.001$). Ayrıca OP DEF grubu ile karşılaştırdığımızda OP DEF PLGA, OP DEF % 10 HA, OP DEF % 10 BN % 10 HA ve OP DEF % 10 BN gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş

gerçekleşmiş olmasına rağmen bu azalma diğer tedavi gruplarına göre daha az miktarda oluşmuştur ($p<0.05$). İlk haftaya göre Alp mRNA ekspresyon miktarlarının artışının osteoporoza bağlı mineral kaybının devam ettiğinin ayrıca bir taraftan da minerilizasyon için osteoblastik aktivitenin hala devam ettiğini göstermekte olup yine literature uygun sonuçlar elde edilmiştir.

4. haftaya baktığımızda ise OP DEF grubuna göre OP DEF % 2.5 BN %10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA grubunda Alp mRNA ekspresyon seviyeleri diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde düşmüş olduğu ve diğer gruplarda ise düşüşün anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir ($p<0.01$). Bu veriler devam eden osteoporoz zemininde kemik mineral kayıplarının ilk haftaya göre azaldığını komplet kemik oluşumun sürdüğü söylenebilir. Yalnız OP DEF % 2.5 BN % 10 HA ve OP DEF % 5 BN % 10 HA gruplarında Alp miktarlarının azalmış olması ise kemik oluşumunun tamamlandığını göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Deneyssel olarak osteoporoz zemininde oluşturulan kemik defekti üzerine değişik oranlarda BN ve HA' in etkilerini incelediğimiz çalışmamızın sonuçları gerçekten umut vericidir.

Sonuç olarak bu çalışmada biyomalzeme materyali olarak hakkında fazla bilgi sahibi olmadığımız BN molekülünün in vivo olarak 4 haftalık kemik defekti üzerine olan etkileri farklı perspektiflerden incelenmeye çalışılmıştır. Çeşitli oranlarda PLGA taşıyıcısına emdirilmiş HA ve BN scaffold implantları in vivo olarak test edildiğinde; kemik iyileşmesine katkıda bulundukları ve biyouyumluluk özellikleri sayesinde kemik dokusu ile uyumlu oldukları için biyomalzeme olarak oldukça yüksek oranda gelecek vadetmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarını özetlersek;

1. BN özellikle % 2.5 oranında kullanıldığında HA ile kombine edilsin veya edilmesin kemik iyileşmesine önemli katkılarda bulunmaktadır. Aynı etki % 5 BN % 10 HA ve % 5 BN gruplarında da görünmekle beraber tüm verilerimizi incelediğimizde en iyi iyileşme % 2.5 BN gruplarında olduğu görülmektedir.
2. BN kemik iyileşmesi üzerine olan etkisi dışında aynı zamanda antiosteoporotik etki göstermiştir.
3. BN'nin % 10'luk oranda kullanılması bu etkiyi durdurmuş olup histopatolojik sonuçlarla beraber incelediğimizde yabancı cisim reaksiyonuna neden olmuştur.

Özellikle ülkemizin hammadde olarak büyük rezerve sahip olduğu, ancak sağlık alanında oldukça yeni ve gelecek vaat eden BN ile ilgili literatürde çok az ve kısıtlı bilgi olduğundan hakkında daha ileri araştırmalar yapılması kaçınılmaz olmakta ve de gerekmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilerin, ileri araştırmalarla desteklenmesi durumunda, osteoporozun neden olduğu kemik defektlerinin tedavisinde BN'ün kullanılabilecek potent bir ajan olabileceğini göstermesi bakımından umut verici olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. CAL. B. The Biochemistry and Physiology of Bone. İçinde: Bourne GH (editör). *Biophysical principles of affecting bone structures*, 2 Baskı. NewYork, Acad. Press Inc., 1971: 1-76.
2. Keen R. Osteoporosis: strategies for prevention and management. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 2007, 21: 109-122.
3. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 2000, 289: 1508-1514.
4. Nielsen FH. Update on human health effects of boron. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 2014, 28: 383-387.
5. Dogan A, Demirci S, Bayir Y, Halici Z, Karakus E, Aydin A, Cadirci E, Albayrak A, Demirci E, Karaman A, Ayan AK, Gundogdu C, Sahin F. Boron containing poly-(lactide-co-glycolide) (PLGA) scaffolds for bone tissue engineering. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 2014, 44: 246-253.
6. Xu P, Hu WB, Guo X, Zhang YG, Li YF, Yao JF, Cai QK. [Therapeutic effect of dietary boron supplement on retinoic acid-induced osteoporosis in rats]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*, 2006, 26: 1785-1788.
7. Endo Y, Iijima T, Yamakoshi Y, Fukasawa H, Miyaura C, Inada M, Kubo A, Itai A. Potent estrogen agonists based on carborane as a hydrophobic skeletal structure - A new medicinal application of boron clusters. *Chemistry and Biology*, 2001, 8: 341-355.

8. Nielsen FH. Studies on the Relationship between Boron and Magnesium Which Possibly Affects the Formation and Maintenance of Bones. *Magnesium Trace Elem*, 1990, 9: 61-69.
9. Zofkova I, Nemcikova P, Matucha P. Trace elements and bone health. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 2013, 51: 1555-1561.
10. Hirata M, Inada M, Matsumoto C, Takita M, Ogawa T, Endo Y, Miyaura C. A novel carborane analog, BE360, with a carbon-containing polyhedral boron-cluster is a new selective estrogen receptor modulator for bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 380: 218-222.
11. RS T. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. İçinde: *Junqueira's Basic Histology*, 12th Baskı. 2010.
12. PAMUK G KR, ÇİVİ S,. Osteoporozu Olan ve Olmayan Postmenopozal Kadınlarda QUALEFFO-41 Ölçeği ile Yaşam Kalitesinin Değerlendirilmesi. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi*, 2014, 60: 39-46.
13. Nikel O, Laurencin D, McCallum SA, Gundberg CM, Vashishth D. NMR investigation of the role of osteocalcin and osteopontin at the organic-inorganic interface in bone. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 2013, 29: 13873-13882.
14. Nandeesh UKaBN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*, 2012, 17: 29-55.
15. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine*, 2007, 13: 791-801.
16. Kalbasi Anaraki P, Patecki M, Tkachuk S, Kiyan Y, Haller H, Dumler I. Urokinase Receptor Mediates Osteoclastogenesis via M-CSF Release From Osteoblasts and the c-Fms/PI3K/Akt/NF-kappaB Pathway in Osteoclasts. *Journal of bone and*

mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2015, 30: 379-388.

17. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 561: 3-12.
18. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and tissue research*, 2011, 343: 289-302.
19. Nakasaki M, Yoshioka K, Miyamoto Y, Sasaki T, Yoshikawa H, Itoh K. IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone*, 2008, 43: 869-879.
20. Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Experimental hematology*, 1999, 27: 1229-1241.
21. Baron R. 1993. İçinde:G.R. Mundy TJM (editör). *Handbook of Experimental Pharmacology: Physiology and Pharmacology of Bone*, Springer-Verlag, Biology of the osteoclast.
22. Bonewald LF. Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *Journal of bone and mineral metabolism*, 1999, 17: 61-65.
23. Plotkin LI, Manolagas SC, Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277: 8648-8657.
24. Plotkin LI, Aguirre JI, Kousteni S, Manolagas SC, Bellido T. Bisphosphonates and estrogens inhibit osteocyte apoptosis via distinct molecular mechanisms downstream of extracellular signal-regulated kinase activation. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280: 7317-7325.
25. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Communica and biophysical research communications*, 2005, 328: 709-720.

26. Aydin A, Halici Z, Akoz A, Karaman A, Ferah I, Bayir Y, Aksakal AM, Akpinar E, Selli J, Kovaci H. Treatment with alpha-lipoic acid enhances the bone healing after femoral fracture model of rats. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 2014, 387: 1025-1036.
27. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, 2005, 36 Suppl 3: S5-7.
28. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011, 42: 551-555.
29. Buckwalter JA ET, Marsh JL Fractures in adults. İçinde: Bucholz RW HJ (editör). *Bone and joint healing Lippincott*, Philadelphia, 2001: 245-271.
30. Giannoudis PV, Jones E, Einhorn TA. Fracture healing and bone repair. *Injury*, 2011, 42: 549-550.
31. Lau KH, Popa NL, Rundle CH. Microarray Analysis of Gene Expression Reveals that Cyclo-oxygenase-2 Gene Therapy Up-regulates Hematopoiesis and Down-regulates Inflammation During Endochondral Bone Fracture Healing. *Journal of bone metabolism*, 2014, 21: 169-188.
32. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature reviews. Rheumatology*, 2012, 8: 133-143.
33. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2010, 16: 427-434.
34. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 1978, 60-B: 150-162.

35. Wray JB. Acute Changes in Femoral Arterial Blood Flow after Closed Tibial Fracture in Dogs. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1964, 46: 1262-1268.
36. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schutze N, Jakob F, Schell H. Differential Regulation of Blood Vessel Formation between Standard and Delayed Bone Healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, 27: 1133-1140.
37. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003, 88: 873-884.
38. Xing Z, Lu C, Hu D, Yu YY, Wang X, Colnot C, Nakamura M, Wu Y, Miclau T, Marcucio RS. Multiple roles for CCR2 during fracture healing. *Disease models & mechanisms*, 2010, 3: 451-458.
39. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2001, 16: 1004-1014.
40. Kılıcoglu S. Mikroskobi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 2002, 55: 143-150.
41. Melnyk M, Henke T, Claes L, Augat P. Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2008, 128: 1159-1165.

42. Ratti C, Vulcano E, Canton G, Marano M, Murena L, Cherubino P. Factors affecting bone strength other than osteoporosis. *Aging clinical and experimental research*, 2013, 25 Suppl 1: S9-11.
43. Unnanuntana A, Rebolledo BJ, Khair MM, DiCarlo EF, Lane JM. Diseases affecting bone quality: beyond osteoporosis. *Clinical orthopaedics and related research*, 2011, 469: 2194-2206.
44. Bilezikian JP, Potts JT, Jr. Asymptomatic primary hyperparathyroidism: new issues and new questions--bridging the past with the future. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2002, 17 Suppl 2: N57-67.
45. Rebolledo BJ, Unnanuntana A, Lane JM. A comprehensive approach to fragility fractures. *Journal of orthopaedic trauma*, 2011, 25: 566-573.
46. Ebeling PR. Clinical practice. Osteoporosis in men. *The New England journal of medicine*, 2008, 358: 1474-1482.
47. Alman BA GM. Metabolic and endocrine abnormalities. İçinde: Lovell WW WR, Morrissy RT, Weinstein SL (editör). *Lovell and Winter's pediatric orthopaedics*, 6th Baskı. Philadelphia, 2006: 167-203.
48. Svedbom A, Hernlund E, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jonsson B, Kanis JA, IOF EURPo. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Archives of osteoporosis*, 2013, 8: 137.
49. Oral A, Kucukdeveci AA, Varela E, Ilieva EM, Valero R, Berteanu M, Christodoulou N. Osteoporosis. The role of physical and rehabilitation medicine physicians. The European perspective based on the best evidence. A paper by the

UEMS-PRM Section Professional Practice Committee. *European journal of physical and rehabilitation medicine*, 2013, 49: 565-577.

50. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Dawson A, De Laet C, Jonsson B. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2001, 12: 989-995.

51. Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, De Laet C, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, 3rd, Pols HA, Reeve J, Silman AJ, Tenenhouse A. A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. *Bone*, 2004, 35: 1029-1037.

52. Kanis JA, Johnell O, De Laet C, Johansson H, Oden A, Delmas P, Eisman J, Fujiwara S, Garnero P, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. A meta-analysis of previous fracture and subsequent fracture risk. *Bone*, 2004, 35: 375-382.

53. Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, de Laet C, Melton LJ, Tenenhouse A, Reeve J, Silman AJ, Pols HAP, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom D. A meta-analysis of prior corticosteroid use and fracture risk. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2004, 19: 893-899.

54. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, Pols H, Tenenhouse A. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporosis International*, 2005, 16: 737-742.

55. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, Fujiwara S, Kroger H, McCloskey EV, Mellstrom D, Melton LJ, Pols H, Reeve J, Silman A, Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporosis international :*

a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 2005, 16: 155-162.

56. Jaglal SB, Hawker G, Cameron C, Canavan J, Beaton D, Bogoch E, Jain R, Papaioannou A, Osteoporosis Research M, Evaluation Working G. The Ontario Osteoporosis Strategy: implementation of a population-based osteoporosis action plan in Canada. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2010, 21: 903-908.

57. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 2005, 34: 1015-1030, xi.

58. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, Lindsay R. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2014, 25: 2359-2381.

59. Dempster DW, Shane E, Horbert W, Lindsay R. A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies: qualitative observations in normal and osteoporotic subjects. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1986, 1: 15-21.

60. Nih Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention D, Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *Jama*, 2001, 285: 785-795.

61. Assessment of fracture risk and its implication to screening for postmenopausal osteoporosis, Baskı, 1994.

62. Richmond B. DXA scanning to diagnose osteoporosis: do you know what the results mean? *Cleveland Clinic journal of medicine*, 2003, 70: 353-360.
63. Kanis JA, Melton LJ, 3rd, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1994, 9: 1137-1141.
64. Nanes MS, Kallen CB. Osteoporosis. *Seminars in nuclear medicine*, 2014, 44: 439-450.
65. Romagnoli C, D'Asta F, Brandi ML. Drug delivery using composite scaffolds in the context of bone tissue engineering. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 2013, 10: 155-161.
66. Panday K, Gona A, Humphrey MB. Medication-induced osteoporosis: screening and treatment strategies. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2014, 6: 185-202.
67. Bolland MJ, Avenell A, Baron JA, Grey A, MacLennan GS, Gamble GD, Reid IR. Effect of calcium supplements on risk of myocardial infarction and cardiovascular events: meta-analysis. *Bmj*, 2010, 341: c3691.
68. Brown JP, Morin S, Leslie W, Papaioannou A, Cheung AM, Davison KS, Goltzman D, Hanley DA, Hodsman A, Josse R, Jovaisas A, Juby A, Kaiser S, Karaplis A, Kendler D, Khan A, Ngui D, Olszynski W, Ste-Marie LG, Adachi J. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms, and drug holidays. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 2014, 60: 324-333.
69. Mendoza N, Sanchez-Borrego R, Villero J, Baro F, Calaf J, Cancelo MJ, Coronado P, Estevez A, Fernandez-Moya JM, Gonzalez S, Llana P, Neyro JL, del

Pino J, Rodriguez E, Ruiz E, Cano A, Spanish Menopause S. 2013 Up-date of the consensus statement of the Spanish Menopause Society on postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*, 2013, 76: 99-107.

70. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, Scientific Advisory Board of the European Society for C, Economic Aspects of O, Osteoarthritis, the Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis F. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2013, 24: 23-57.

71. Meeta, Harinarayan CV, Marwah R, Sahay R, Kalra S, Babhulkar S. Clinical practice guidelines on postmenopausal osteoporosis: An executive summary and recommendations. *Journal of mid-life health*, 2013, 4: 107-126.

72. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women - Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2002, 288: 321-333.

73. Mok CC, Ying KY, To CH, Ho LY, Yu KL, Lee HK, Ma KM. Raloxifene for prevention of glucocorticoid-induced bone loss: a 12-month randomised double-blinded placebo-controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases*, 2011, 70: 778-784.

74. Vogel VG, Costantino JP, Wickerham DL, Cronin WM, Cecchini RS, Atkins JN, Bevers TB, Fehrenbacher L, Pajon ER, Jr., Wade JL, 3rd, Robidoux A, Margolese RG, James J, Lippman SM, Runowicz CD, Ganz PA, Reis SE, McCaskill-Stevens W, Ford LG, Jordan VC, Wolmark N, National Surgical Adjuvant B, Bowel P. Effects of

tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama*, 2006, 295: 2727-2741.

75. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK, Raloxifene Use for The Heart Trial I. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *The New England journal of medicine*, 2006, 355: 125-137.

76. Mosca L, Grady D, Barrett-Connor E, Collins P, Wenger N, Abramson BL, Paganini-Hill A, Geiger MJ, Dowsett SA, Amewou-Atisso M, Kornitzer M. Effect of raloxifene on stroke and venous thromboembolism according to subgroups in postmenopausal women at increased risk of coronary heart disease. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2009, 40: 147-155.

77. Chesnut CH, 3rd, Silverman S, Andriano K, Genant H, Gimona A, Harris S, Kiel D, LeBoff M, Maricic M, Miller P, Moniz C, Peacock M, Richardson P, Watts N, Baylink D. A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *The American journal of medicine*, 2000, 109: 267-276.

78. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2004, 19: 1059-1066.

79. Brown JP, Reid IR, Wagman RB, Kendler D, Miller PD, Jensen JE, Bolognese MA, Daizadeh N, Valter I, Zerbin CA, Dempster DW. Effects of up to 5 years of denosumab treatment on bone histology and histomorphometry: the FREEDOM study

extension. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2014, 29: 2051-2056.

80. Black DM, Bilezikian JP, Ensrud KE, Greenspan SL, Palermo L, Hue T, Lang TF, McGowan JA, Rosen CJ, Pa THSI. One year of alendronate after one year of parathyroid hormone (1-84) for osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 2005, 353: 555-565.

81. Middleton ET, Steel SA, Doherty SM. The effect of prior bisphosphonate exposure on the treatment response to teriparatide in clinical practice. *Calcified Tissue International*, 2007, 81: 335-340.

82. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN, American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological I. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 2001, 83-A Suppl 2 Pt 2: 98-103.

83. Simsek A CG, Erdal C,. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Dernegi Dergisi*, 2004, 3: 70-84.

84. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery*, 2001, 71: 354-361.

85. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*, 1996, 35: 413-417.

86. Fleming JE, Jr., Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *The Orthopedic clinics of North America*, 2000, 31: 357-374.

87. Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials*, 2010, 3: 3867-3910.
88. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity (Reprinted from J Bone Joint Surg, vol 45B, pg 386-401, 1963). *Clinical orthopaedics and related research*, 1999: S5-S11.
89. Muramatsu K, Hashimoto T, Tominaga Y, Taguchi T. Vascularized bone graft for oncological reconstruction of the extremities: review of the biological advantages. *Anticancer research*, 2014, 34: 2701-2707.
90. Dym H, Huang D, Stern A. Alveolar bone grafting and reconstruction procedures prior to implant placement. *Dental clinics of North America*, 2012, 56: 209-218, x.
91. Chappard D, Guillaume B, Mallet R, Pascaretti-Grizon F, Basle MF, Libouban H. Sinus lift augmentation and beta-TCP: a microCT and histologic analysis on human bone biopsies. *Micron*, 2010, 41: 321-326.
92. Santos EA B-PV. Materiais cerâmicos. İçinde: Cultural SPV (Çeviri editörü). Granjeiro JM SG (editör). *Biomateriais Em Odontologia*, 2011: 57-68.
93. D'Lima J P, Paul J, Palathingal P, Varma B, Bhat M, Mohanty M. Histological and Histometrical Evaluation of two Synthetic Hydroxyapatite Based Biomaterials in the Experimental Periodontal Defects in Dogs. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 2014, 8: ZC52-55.
94. EVIS Z. Çeşitli İyonlar Eklenmiş Nano-Hidroksiapatitler: Üretim Yöntemleri, İç Yapı, Mekanik ve Biyouyumluluk Özellikleri Yönlerinden İncelenmesi,. *International Journal of Research and Development*, 2011, 3: 55-61.

95. Friedmann A, Dard M, Kleber BM, Bernimoulin JP, Bosshardt DD. Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations. *Clinical oral implants research*, 2009, 20: 708-714.
96. Hoffmann W, Bormann T, Rossi A, Muller B, Schumacher R, Martin I, de Wild M, Wendt D. Rapid prototyped porous nickel-titanium scaffolds as bone substitutes. *Journal of tissue engineering*, 2014, 5: 2041731414540674.
97. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 2002, 84-A: 454-464.
98. Janicki P, Schmidmaier G. What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 2011, 42: S77-S81.
99. Mourino V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 2010, 7: 209-227.
100. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology*, 2012, 30: 546-554.
101. Kim SS, Sun Park M, Jeon O, Yong Choi C, Kim BS. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27: 1399-1409.
102. Lao L, Wang Y, Zhu Y, Zhang Y, Gao C. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite nanofibrous scaffolds fabricated by electrospinning for bone tissue engineering. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 2011, 22: 1873-1884.

103. Ngiam M, Liao S, Patil AJ, Cheng Z, Chan CK, Ramakrishna S. The fabrication of nano-hydroxyapatite on PLGA and PLGA/collagen nanofibrous composite scaffolds and their effects in osteoblastic behavior for bone tissue engineering. *Bone*, 2009, 45: 4-16.
104. Penk A, Forster Y, Scheidt HA, Nimptsch A, Hacker MC, Schulz-Siegmund M, Ahnert P, Schiller J, Rammelt S, Huster D. The pore size of PLGA bone implants determines the de novo formation of bone tissue in tibial head defects in rats. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 2013, 70: 925-935.
105. Nielsen FHM, SL. Growing Evidence for Human Health Benefits of Boron. *Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 2011, 16: 169-180.
106. Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological trace element research*, 1998, 66: 299-317.
107. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anatomical record*, 2008, 291: 441-447.
108. Nielsen FH, Penland JG. Boron supplementation of peri-menopausal women affects boron metabolism and indices associated with macromineral metabolism, hormonal status and immune function. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 1999, 12: 251-261.
109. Goncu Y. Hekzagonal Bor Nitrur Urun Ozelliklerine Ogutmenin Etkisi. Fen Bilimleir Enstitüsü. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, 2012.
110. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science*, 2002, 295: 1014-1017.

111. Neumann DRP, Thaler C, Hitzl W, Huber M, Hofstadter T, Dorn U. Long-Term Results of a Contemporary Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty A 10-Year Follow-Up Study. *J Arthroplasty*, 2010, 25: 700-708.
112. Milosev I, Trebse R, Kovac S, Cor A, Pisot V. Survivorship and retrieval analysis of Sikomet metal-on-metal total hip replacements at a mean of seven years. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 2006, 88: 1173-1182.
113. Chang JD, Lee SS, Hur M, Seo EM, Chung YK, Lee CJ. Revision total hip arthroplasty in hip joints with metallosis: a single-center experience with 31 cases. *The Journal of arthroplasty*, 2005, 20: 568-573.
114. Su EP, Callander PW, Salvati EA. The bubble sign: a new radiographic sign in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 2003, 18: 110-112.
115. Wagner M, Wagner H. Medium-term results of a modern metal-on-metal system in total hip replacement. *Clinical orthopaedics and related research*, 2000: 123-133.
116. Neumann DR, Thaler C, Hitzl W, Huber M, Hofstadter T, Dorn U. Long-term results of a contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty: a 10-year follow-up study. *J Arthroplasty*, 2010, 25: 700-708.
117. Khan WS, Agarwal M, Malik AA, Cox AG, Denton J, Holt EM. Chromium, cobalt and titanium metallosis involving a Nottingham shoulder replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 2008, 90: 502-505.
118. Sayed-Noor AS, Sjoden GO. Severe metallosis after total elbow arthroplasty-a case report. *Hand*, 2010, 5: 86-89.
119. Park YS, Moon YW, Lim SJ, Yang JM, Ahn G, Choi YL. Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 2005, 87: 1515-1521.

120. Heffernan EJ, Alkubaidan FO, Nielsen TO, Munk PL. The imaging appearances of metallosis. *Skeletal radiology*, 2008, 37: 59-62.
121. I.A. K. Plazma Püskürtme Yöntemiyle Üretilen Hidroksiapatit-Cam Kompozit Kaplamaların Karakterizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul: Marmara Üniversitesi, 2011.
122. Lahiri D, Singh V, Benaduce AP, Seal S, Kos L, Agarwal A. Boron nitride nanotube reinforced hydroxyapatite composite: mechanical and tribological performance and in-vitro biocompatibility to osteoblasts. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 2011, 4: 44-56.
123. Lee S, Aronoff S. Boron in plants: a biochemical role. *Science*, 1967, 158: 798-799.
124. Sheng MH, Taper LJ, Veit H, Qian H, Ritchey SJ, Lau KH. Dietary boron supplementation enhanced the action of estrogen, but not that of parathyroid hormone, to improve trabecular bone quality in ovariectomized rats. *Biological trace element research*, 2001, 82: 109-123.
125. Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1987, 1: 394-397.
126. Nielsen FH. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 2000, 16: 512-514.
127. Sowers MR, Zheng H, McConnell D, Nan B, Harlow SD, Randolph JF. Estradiol rates of change in relation to the final menstrual period in a population-based cohort of women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, 93: 3847-3852.

128. Burger HG, Dudley EC, Hopper JL, Groome N, Guthrie JR, Green A, Dennerstein L. Prospectively measured levels of serum follicle-stimulating hormone, estradiol, and the dimeric inhibins during the menopausal transition in a population-based cohort of women. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 1999, 84: 4025-4030.
129. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical chemistry*, 1999, 45: 1353-1358.
130. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 2000, 21: 115-137.
131. Bajoria R, Sooranna SR, Chatterjee R. Leptin and bone turnover in monochorionic twins complicated by twin-twin transfusion syndrome. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2007, 18: 193-200.
132. Li X, Shi J, Dong X, Zhang L, Zeng H. A mesoporous bioactive glass/polycaprolactone composite scaffold and its bioactivity behavior. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2008, 84: 84-91.
133. Mondrinos MJ, Dembzyński R, Lu L, Byrapogu VK, Wootton DM, Lelkes PI, Zhou J. Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27: 4399-4408.
134. Wu C, Miron R, Sculean A, Kaskel S, Doert T, Schulze R, Zhang Y. Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds. *Biomaterials*, 2011, 32: 7068-7078.

135. Zhang Y, Cheng N, Miron R, Shi B, Cheng X. Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects. *Biomaterials*, 2012, 33: 6698-6708.
136. Gorustovich AA, Lopez JM, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biological performance of boron-modified bioactive glass particles implanted in rat tibia bone marrow. *Biomedical materials*, 2006, 1: 100-105.
137. Miron RJ, Zhang YF. Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. *Journal of dental research*, 2012, 91: 736-744.
138. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau T, 3rd, Marcucio RS. Action of IL-1beta during fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 2010, 28: 778-784.
139. Brincat SD, Borg M, Camilleri G, Calleja-Agius J. The role of cytokines in postmenopausal osteoporosis. *Minerva ginecologica*, 2014, 66: 391-407.
140. Kvist TM, Schwarz P, Jorgensen NR. The P2X7 receptor: a key player in immune-mediated bone loss? *TheScientificWorldJournal*, 2014, 2014: 954530.
141. Suzuki Y. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology*, 1999, 201: 255-271.
142. Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Galli CL, Marinovich M. Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicology letters*, 2004, 149: 85-89.
143. Yilmaz O, Taskiran D, Aydar S. Cytotoxicity in cytokine stimulated astrocyte cultures: Role of IL-6 and nitric oxide. *Neuroscience Research Communications*, 2004, 34: 82-91.
144. Sheng Z, Xu K, Ou Y, Dai R, Luo X, Liu S, Su X, Wu X, Xie H, Yuan L, Liao E. Relationship of body composition with prevalence of osteoporosis in central south Chinese postmenopausal women. *Clinical endocrinology*, 2011, 74: 319-324.

145. Zhang J, Fu Q, Ren Z, Wang Y, Wang C, Shen T, Wang G, Wu L. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 2014; 1-8.
146. Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet*, 2002, 359: 2018-2026.
147. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *Journal of Clinical Investigation*, 2000, 106: 749-752.
148. Li Q. Transforming growth factor beta signaling in uterine development and function. *Journal of animal science and biotechnology*, 2014, 5: 52.
149. Karsdal MA, Hjorth P, Henriksen K, Kirkegaard T, Nielsen KL, Lou H, Delaisse JM, Foged NT. Transforming growth factor-beta controls human osteoclastogenesis through the p38 MAPK and regulation of RANK expression. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278: 44975-44987.
150. Dallas SL, Rosser JL, Mundy GR, Bonewald LF. Proteolysis of latent transforming growth factor-beta (TGF-beta)-binding protein-1 by osteoclasts. A cellular mechanism for release of TGF-beta from bone matrix. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277: 21352-21360.
151. Edwards CJ, Williams E. The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2010, 21: 1287-1293.
152. Kwan Tat S, Padrines M, Theoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews*, 2004, 15: 49-60.

153. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 1996, 87: 2095-2147.
154. Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P. Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine and cytokine research*, 1991, 10: 15-21.
155. Manolagas SC, Jilka RL. Mechanisms of Disease - Bone-Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling - Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 1995, 332: 305-311.
156. Ralston SH. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1994, 9: 883-890.
157. Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98: 2443-2448.
158. Kamel Mohamed SG, Sugiyama E, Shinoda K, Hounoki H, Taki H, Maruyama M, Miyahara T, Kobayashi M. Interleukin-4 inhibits RANKL-induced expression of NFATc1 and c-Fos: a possible mechanism for downregulation of osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 329: 839-845.
159. Miossec P, Chomarat P, Dechanet J, Moreau JF, Roux JP, Delmas P, Banchereau J. Interleukin-4 Inhibits Bone-Resorption through an Effect on Osteoclasts and Proinflammatory Cytokines in an Ex-Vivo Model of Bone-Resorption in Rheumatoid-Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 1994, 37: 1715-1722.

160. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *The Journal of endocrinology*, 2012, 214: 241-255.
161. Sprini D RGB, Stefano L. D, Cianferotti L. Napoli N Correlation between osteoporosis and cardiovascular disease. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 2014, 11: 117-119.
162. Osako MK, Nakagami H, Koibuchi N, Shimizu H, Nakagami F, Koriyama H, Shimamura M, Miyake T, Rakugi H, Morishita R. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system: common mechanism of osteoporosis and vascular calcification. *Circulation research*, 2010, 107: 466-475.
163. Chmielnicka M, Wozniacka A, Torzecka JD. The influence of corticosteroid treatment on the OPG/RANK/RANKL pathway and osteocalcin in patients with pemphigus. *Postepy dermatologii i alergologii*, 2014, 31: 281-288.
164. Kuwabara A, Tanaka K, Tsugawa N, Nakase H, Tsuji H, Shide K, Kamao M, Chiba T, Inagaki N, Okano T, Kido S. High prevalence of vitamin K and D deficiency and decreased BMD in inflammatory bowel disease. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2009, 20: 935-942.
165. Al-Daghri NM, Yakout S, Al-Shehri E, Al-Fawaz HA, Aljohani N, Al-Saleh Y. Inflammatory and bone turnover markers in relation to PTH and vitamin D status among saudi postmenopausal women with and without osteoporosis. *International journal of clinical and experimental medicine*, 2014, 7: 3528-3535.
166. Lorenzo J. Interactions between immune and bone cells: new insights with many remaining questions. *J Clin Invest*, 2000, 106: 749-752.

167. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF-alpha on Bone Homeostasis. *Frontiers in immunology*, 2014, 5: 48.
168. Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. *Cytokine*, 2003, 22: 33-41.
169. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/PeBP2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*, 2002, 277: 2695-2701.
170. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *Journal of molecular medicine*, 2001, 79: 243-253.
171. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine & growth factor reviews*, 2001, 12: 9-18.
172. Frost A, Jonsson KB, Nilsson O, Ljunggren O. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta orthopaedica Scandinavica*, 1997, 68: 91-96.
173. Weitzmann MN, Pacifici R. The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunological reviews*, 2005, 208: 154-168.
174. Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The Journal of clinical investigation*, 2006, 116: 1186-1194.
175. Huan JL, Xing L, Qin XJ, Gao ZG, Pan XF, Zhao ZD. Expression and clinical significance of osteopontin in calcified breast tissue. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 2012, 13: 5219-5223.

176. Franzen A, Heinegard D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *The Biochemical journal*, 1985, 232: 715-724.
177. Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *The Biochemical journal*, 1996, 317 (Pt 1): 59-64.
178. Chatakun P, Nunez-Toldra R, Lopez EJD, Gil-Recio C, Martinez-Sarra E, Hernandez-Alfaro F, Ferres-Padro E, Giner-Tarrida L, Atari M. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2014, 71: 113-142.
179. Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *Journal of bone and mineral research* 2010, 25: 695-705.
180. Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CAG, Sodek J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 1486-1497.
181. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107: 1055-1061.
182. Khan SA, Lopez-Chua CA, Zhang J, Fisher LW, Sorensen ES, Denhardt DT. Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors. *Journal of cellular biochemistry*, 2002, 85: 728-736.
183. Zofkova I. Bone tissue as a systemic endocrine regulator. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2014.

184. Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 2000, 142: 9-21.
185. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, Konishi Y, Kusumoto K, Ogawa Y, Iizuka T. Osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 at intramuscular, intermuscular, subcutaneous and intrafatty sites. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2000, 29: 62-66.
186. Rahman CV, Ben-David D, Dhillon A, Kuhn G, Gould TW, Muller R, Rose FR, Shakesheff KM, Livne E. Controlled release of BMP-2 from a sintered polymer scaffold enhances bone repair in a mouse calvarial defect model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2014, 8: 59-66.
187. Lee JW, Kang KS, Lee SH, Kim JY, Lee BK, Cho DW. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly(propylene fumarate)/diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres. *Biomaterials*, 2011, 32: 744-752.
188. Lochmann A, Nitzsche H, von Einem S, Schwarz E, Mader K. The influence of covalently linked and free polyethylene glycol on the structural and release properties of rhBMP-2 loaded microspheres. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2010, 147: 92-100.
189. Liu TM, Lee EH. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2013, 19: 254-263.
190. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 1997, 89: 747-754.
191. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM, Tjia JS, Pierce WA, Wozney JM, Li XJ. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture

healing in a goat tibial fracture model. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1998, 13: 1483-1490.

192. Phimpilai M, Zhao ZR, Boules H, Roca H, Franceschi RT. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, 21: 637-646.

193. Grskovic I, Kutsch A, Frie C, Groma G, Stermann J, Schlotzer-Schrehardt U, Niehoff A, Moss SE, Rosenbaum S, Poschl E, Chmielewski M, Rappl G, Abken H, Bateman JF, Cheah KS, Paulsson M, Brachvogel B. Depletion of annexin A5, annexin A6, and collagen X causes no gross changes in matrix vesicle-mediated mineralization, but lack of collagen X affects hematopoiesis and the Th1/Th2 response. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2012, 27: 2399-2412.

194. von der Mark K, Frischholz S, Aigner T, Beier F, Belke J, Erdmann S, Burkhardt H. Upregulation of type X collagen expression in osteoarthritic cartilage. *Acta orthopaedica Scandinavica. Supplementum*, 1995, 266: 125-129.

195. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb Journal*, 2004, 18: 816-827.

196. Loeys BL, Mortier G, Dietz HC. Bone lessons from Marfan syndrome and related disorders: fibrillin, TGF-B and BMP at the balance of too long and too short. *Pediatric endocrinology reviews : PER*, 2013, 10 Suppl 2: 417-423.

197. Wallace JM, Orr BG, Marini JC, Holl MMB. Nanoscale morphology of Type I collagen is altered in the Brtl mouse model of Osteogenesis Imperfecta. *Journal of Structural Biology*, 2011, 173: 146-152.

198. Ek-Rylander B, Barkhem T, Ljusberg J, Ohman L, Andersson KK, Andersson G. Comparative studies of rat recombinant purple acid phosphatase and bone tartrate-resistant acid phosphatase. *The Biochemical journal*, 1997, 321 (Pt 2): 305-311.
199. Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgard M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Rylander B, Andersson G. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280: 28370-28381.
200. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clinical chemistry*, 2001, 47: 74-80.
201. Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegard D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 1994, 269: 14853-14856.
202. Ek-Rylander B, Andersson G. Osteoclast migration on phosphorylated osteopontin is regulated by endogenous tartrate-resistant acid phosphatase. *Experimental cell research*, 2010, 316: 443-451.
203. Sheu TJ, Schwarz EM, Martinez DA, O'Keefe RJ, Rosier RN, Zuscik MJ, Puzas JE. A phage display technique identifies a novel regulator of cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278: 438-443.
204. Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, Janckila AJ, Heikkinen JE, Suominen H, Cheng S, Vaananen HK. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcified tissue international*, 2002, 71: 20-25.

205. Suter A, Everts V, Boyde A, Jones SJ, Lullmann-Rauch R, Hartmann D, Hayman AR, Cox TM, Evans MJ, Meister T, von Figura K, Saftig P. Overlapping functions of lysosomal acid phosphatase (LAP) and tartrate-resistant acid phosphatase (Acp5) revealed by doubly deficient mice. *Development*, 2001, 128: 4899-4910.
206. Yamamoto T, Nagai H. Ultrastructural localization of tartrate-resistant acid phosphatase activity in rat osteoblasts. *Journal of electron microscopy*, 1998, 47: 659-663.
207. Melhus G, Solberg LB, Dimmen S, Madsen JE, Nordsletten L, Reinholt FP. Experimental osteoporosis induced by ovariectomy and vitamin D deficiency does not markedly affect fracture healing in rats. *Acta orthopaedica*, 2007, 78: 393-403.
208. Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Lee SH, Fisher DE, Kook H, Kim KK, Choi Y, Kim N. Nuclear factor of activated T cells c1 induces osteoclast-associated receptor gene expression during tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine-mediated osteoclastogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280: 35209-35216.
209. Janckila AJ, Lin HF, Wu YY, Ku CH, Yang SP, Lin WS, Lee SH, Yam LT, Chao TY. Serum tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a (TRACP5a) as a potential risk marker in cardiovascular disease. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 2011, 412: 963-969.
210. Boufker HI, Lagneaux L, Najjar M, Piccart M, Ghanem G, Body JJ, Journe F. The Src inhibitor dasatinib accelerates the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells into osteoblasts. *Bmc Cancer*, 2010, 10.
211. Postiglione L, Domenico GD, Montagnani S, Spigna GD, Salzano S, Castaldo C, Ramaglia L, Sbordone L, Rossi G. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

(GM-CSF) induces the osteoblastic differentiation of the human osteosarcoma cell line SaOS-2. *Calcified tissue international*, 2003, 72: 85-97.

212. Ross PD, Kress BC, Parson RE, Wasnich RD, Armour KA, Mizrahi IA. Serum bone alkaline phosphatase and calcaneus bone density predict fractures: a prospective study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 2000, 11: 76-82.

213. Li D, Ye C, Zhu Y, Qi YY, Gou ZR, Gao CY. Fabrication of poly(lactide-co-glycolide) scaffold embedded spatially with hydroxyapatite particles on pore walls for bone tissue engineering. *Polymers for Advanced Technologies*, 2012, 23: 1446-1453.

214. Koumoulidis GC, Katsoulidis AP, Ladavos AK, Pomonis PJ, Trapalis CC, Sdoukos AT, Vaimakis TC. Preparation of hydroxyapatite via microemulsion route. *Journal of colloid and interface science*, 2003, 259: 254-260.

215. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.

216. Suchanek WL, Shuk P, Byrappa K, Riman RE, TenHuisen KS, Janas VF. Mechanochemical-hydrothermal synthesis of carbonated apatite powders at room temperature. *Biomaterials*, 2002, 23: 699-710.

217. Fathi MH, Hanifi A, Mortazavi V. Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *J Mater Process Tech*, 2008, 202: 536-542.

218. Kuriakose TA, Kalkura SN, Palanichamy M, Arivuoli D, Dierks K, Bocelli G, Betzel C. Synthesis of stoichiometric nano crystalline hydroxyapatite by ethanol-based sol-gel technique at low temperature. *Journal of Crystal Growth*, 2004, 263: 517-523.

219. Fathi MH, Hanifi A, Mortazavi V. Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of Materials Processing Technology*, 2008, 202: 536-542.
220. O'Shea DC, Bartlett ML, Young RA. Compositional analysis of apatites with laser-Raman spectroscopy:(oh,f,cl)apatites. *Archives of oral biology*, 1974, 19: 995-906.
221. Griffith WP. Raman Studies on Rock-Forming Minerals .2. Minerals Containing Mo₃, Mo₄, and Mo₆ Groups. *J Chem Soc A*, 1970: 286-&.
222. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials*, 1997, 18: 1037-1041.
223. Tsuda H, Arends J. Raman spectra of human dental calculus. *Journal of dental research*, 1993, 72: 1609-1613.
224. Sauer GR, Zunic WB, Durig JR, Wuthier RE. Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. *Calcified tissue international*, 1994, 54: 414-420.
225. Vey E, Rodger C, Booth J, Claybourn M, Miller AF, Saiani A. Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies. *Polymer Degradation and Stability*, 2011, 96: 1882-1889.
226. Sanna V, Roggio AM, Pala N, Marceddu S, Lubinu G, Mariani A, Sechi M. Effect of chitosan concentration on PLGA microcapsules for controlled release and stability of resveratrol. *International journal of biological macromolecules*, 2015, 72: 531-536.
227. Shin YC, Yang WJ, Lee JH, Oh JW, Kim TW, Park JC, Hyon SH, Han DW. PLGA nanofiber membranes loaded with epigallocatechin-3-O-gallate are beneficial to

prevention of postsurgical adhesions. *International journal of nanomedicine*, 2014, 9: 4067-4078.

228. van Apeldoorn AA, van Manen HJ, Bezemer JM, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Otto C. Raman imaging of PLGA microsphere degradation inside macrophages. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126: 13226-13227.

229. Griffith WP. Raman Studies on Rock-Forming Minerals .2. Minerals Containing Mo₃, Mo₄, and Mo₆ Groups. *Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical*, 1970: 286-&.

230. deAza PN, Guitian F, Santos C, deAza S, Cusco R, Artus L. Vibrational properties of calcium phosphate compounds .2. Comparison between hydroxyapatite beta-tricalcium phosphate. *Chemistry of Materials*, 1997, 9: 916-922.

231. Ugarov MV, Ageev VP, Konov VI. Chemical-Vapor-Deposition of Boron-Nitride Films Stimulated by Ultraviolet-Radiation Pulses from a Krf Excimer-Laser. *Kvantovaya Elektronika*, 1995, 22: 706-710.

232. Ugarov MV, Ageev VP, Karabutov AV, Loubnin EN, Pimenov SM, Konov VI, Bensaoula A. UV laser induced interfacial synthesis of CN-BCN layers on diamond films in borazine and ammonia. *Applied Surface Science*, 1999, 138: 359-363.

233. Lian G, Zhang X, Zhu LL, Tan M, Cui DL, Wang QL. A facile solid state reaction route towards nearly monodisperse hexagonal boron nitride nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry*, 2010, 20: 3736-3742.

234. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1986, 68: 1017-1035.

235. Kaveh MH, Golij M, Nazari M, Mazloom Z, Rezaeian Zadeh A. Effects of an osteoporosis prevention training program on physical activity-related stages of change and self-efficacy among university students, Shiraz, Iran: a Randomized Clinical Trial. *Journal of advances in medical education & professionalism*, 2014, 2: 158-164.
236. Park C, Ha YC, Jang S, Jang S, Yoon HK, Lee YK. The incidence and residual lifetime risk of osteoporosis-related fractures in Korea. *Journal of bone and mineral metabolism*, 2011, 29: 744-751.
237. Palacios S, Agodoa I, Bonnick S, Van den Bergh JP, Ferreira I, Ho PR, Brown JP. Treatment satisfaction in postmenopausal women suboptimally adherent to bisphosphonates who transitioned to denosumab compared with risedronate or ibandronate. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 2015, 100: E487-492.
238. Vestergaard P. New strategies for osteoporosis patients previously managed with strontium ranelate. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2014, 6: 217-225.
239. Capone A, Orgiano F, Pianu F, Planta M. Orthopaedic surgeons' strategies in pharmacological treatment of fragility fractures. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 2014, 11: 105-109.
240. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clinical orthopaedics and related research*, 2000: 10-27.
241. Jing X, Ling Z, Zhenhu An Z, Guoqiang C, Yandao G, Nanming Z, Xiufang Z. Preparation and evaluation of porous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hydroxyapatite composite scaffolds. *Journal of biomaterials applications*, 2008, 22: 293-307.

242. Hou T, Li Q, Luo F, Xu J, Xie Z, Wu X, Zhu C. Controlled dynamization to enhance reconstruction capacity of tissue-engineered bone in healing critically sized bone defects: an in vivo study in goats. *Tissue engineering. Part A*, 2010, 16: 201-212.
243. Chang Z, Hou T, Wu X, Luo F, Xing J, Li Z, Chen Q, Yu B, Xu J, Xie Z. An anti-infection tissue-engineered construct delivering vancomycin: its evaluation in a goat model of femur defect. *International journal of medical sciences*, 2013, 10: 1761-1770.
244. Debnath T, Chakraborty A, Pal TK. A clinical study on the efficacy of hydroxyapatite - Bioactive glass composite granules in the management of periodontal bony defects. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2014, 18: 593-600.
245. Zhang X, Awad HA, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Schwarz EM. A perspective: engineering periosteum for structural bone graft healing. *Clinical orthopaedics and related research*, 2008, 466: 1777-1787.
246. Orsal E, Halici Z, Bayir Y, Cadirci E, Bilen H, Ferah I, Aydin A, Ozkanlar S, Ayan AK, Seven B, Ozaltin S. The role of carnitine on ovariectomy and inflammation-induced osteoporosis in rats. *Experimental biology and medicine*, 2013, 238: 1406-1412.
247. Polat B, Halici Z, Cadirci E, Albayrak A, Karakus E, Bayir Y, Bilen H, Sahin A, Yuksel TN. The effect of alpha-lipoic acid in ovariectomy and inflammation-mediated osteoporosis on the skeletal status of rat bone. *European journal of pharmacology*, 2013, 718: 469-474.
248. Kim JS, Lee SW, Kim SK, Na SW, Kim YO. Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes japonica* in ovariectomized rats. *Journal of exercise rehabilitation*, 2014, 10: 372-377.

249. Saravani M, Kazemi Mehrjerdi H, Mirshahi A, Afkhami Goli A. Protective effects of pomegranate seed oil on ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoporosis: A multi-detector computed tomography evaluation. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 2014, 5: 263-267.
250. Aydin A, Halici Z, Akpınar E, Aksakal AM, Saritemur M, Yayla M, Kunak CS, Cadirci E, Atmaca HT, Karcioğlu SS. What is the role of bosentan in healing of femur fractures in a rat model? *Journal of bone and mineral metabolism*, 2014.
251. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 2008, 14: 179-186.
252. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in cell & developmental biology*, 2008, 19: 459-466.
253. Li Q, Reed DA, Min L, Gopinathan G, Li S, Dangaria SJ, Li L, Geng Y, Galang MT, Gajendrareddy P, Zhou Y, Luan X, Diekwisch TG. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *International journal of molecular sciences*, 2014, 15: 8509-8525.
254. Suliman S, Xing Z, Wu X, Xue Y, Pedersen TO, Sun Y, Doskeland AP, Nickel J, Waag T, Lygre H, Finne-Wistrand A, Steinmüller-Nethl D, Krueger A, Mustafa K. Release and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 are affected by scaffold binding techniques in vitro and in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2015, 197: 148-157.
255. Wang X, Li Y, Han R, He C, Wang G, Wang J, Zheng J, Pei M, Wei L. Demineralized bone matrix combined bone marrow mesenchymal stem cells, bone

morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta3 gene promoted pig cartilage defect repair. *PloS one*, 2014, 9: e116061.

256. Zhang D, Huang D, Huang Y, Liu Y, Lin B, Yu C, Mou Y, Wu W, Zhang H, Lin H. Efficacy of combined therapy of periosteum and bone allograft in a critical-sized defect model in New Zealand white rabbits. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 2014, 20: 2394-2403.

257. Aydin A, Halici Z, Albayrak A, Polat B, Karakus E, Yildirim OS, Bayir Y, Cadirci E, Ayan AK, Aksakal AM. Treatment with Carnitine Enhances Bone Fracture Healing under Osteoporotic and/or Inflammatory Conditions. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2015.

258. Huang RL, Yuan Y, Tu J, Zou GM, Li Q. Opposing TNF-alpha/IL-1beta- and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Cell death & disease*, 2014, 5: e1187.

259. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiological reviews*, 2012, 92: 689-737.

260. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 2011, 75: 50-83.

261. Schett G. Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *European journal of clinical investigation*, 2011, 41: 1361-1366.

262. Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, Cai Y, Cheng S, Wang X, Liu Y, Tang L, Ding Y, Jin Y. Tumor necrosis factor alpha suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Journal*

of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2013, 28: 559-573.

263. Zhao B, Grimes SN, Li S, Hu X, Ivashkiv LB. TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *The Journal of experimental medicine*, 2012, 209: 319-334.

264. Wahl EC, Aronson J, Liu L, Skinner RA, Miller MJ, Cockrell GE, Fowlkes JL, Thrailkill KM, Bunn RC, Ronis MJ, Lumpkin CK, Jr. Direct bone formation during distraction osteogenesis does not require TNFalpha receptors and elevated serum TNFalpha fails to inhibit bone formation in TNFR1 deficient mice. *Bone*, 2010, 46: 410-417.

265. Nanes MS. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*, 2003, 321: 1-15.

266. Cardemil C, Elgali I, Xia W, Emanuelsson L, Norlindh B, Omar O, Thomsen P. Strontium-doped calcium phosphate and hydroxyapatite granules promote different inflammatory and bone remodelling responses in normal and ovariectomised rats. *PloS one*, 2013, 8: e84932.

267. Zhang Y, Wu C, Luo T, Li S, Cheng X, Miron RJ. Synthesis and inflammatory response of a novel silk fibroin scaffold containing BMP7 adenovirus for bone regeneration. *Bone*, 2012, 51: 704-713.

268. Zohar R, Lee W, Arora P, Cheifetz S, McCulloch C, Sodek J. Single cell analysis of intracellular osteopontin in osteogenic cultures of fetal rat calvarial cells. *Journal of cellular physiology*, 1997, 170: 88-100.

269. Jahnen-Dechent W, Schafer C, Ketteler M, McKee MD. Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *Journal of molecular medicine*, 2008, 86: 379-389.

270. Xing Z, Pedersen TO, Wu X, Xue Y, Sun Y, Finne-Wistrand A, Kloss FR, Waag T, Krueger A, Steinmuller-Nethl D, Mustafa K. Biological effects of functionalizing copolymer scaffolds with nanodiamond particles. *Tissue engineering. Part A*, 2013, 19: 1783-1791.
271. Casarin RC, Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ghiraldini B, Duarte PM, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2014, 43: 900-906.
272. Cho EH, Cho KH, Lee HA, Kim SW. High serum osteopontin levels are associated with low bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of Korean medical science*, 2013, 28: 1496-1499.
273. Fodor D, Bondor C, Albu A, Simon SP, Craciun A, Muntean L. The value of osteopontin in the assessment of bone mineral density status in postmenopausal women. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, 2013, 61: 15-21.
274. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 8156-8160.
275. Lau E, Al-Dujaili S, Guenther A, Liu D, Wang L, You L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts. *Bone*, 2010, 46: 1508-1515.
276. Wu SH, Zhong ZM, Chen JT. Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *International journal of medical sciences*, 2012, 9: 801-807.

277. Ishii T, Ohshima S, Ishida T, Mima T, Tabunoki Y, Kobayashi H, Maeda M, Uede T, Liaw L, Kinoshita N, Kawase I, Saeki Y. Osteopontin as a positive regulator in the osteoclastogenesis of arthritis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 316: 809-815.
278. Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 8156-8160.
279. Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *The Journal of experimental medicine*, 2001, 193: 399-404.
280. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Noda M. Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2002, 17: 661-667.
281. Chabas D. [Osteopontin, a multi-faceted molecule]. *Medecine sciences : M/S*, 2005, 21: 832-838.
282. Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. Osteopontin Promotes Vascular Cell-Adhesion and Spreading and Is Chemotactic for Smooth-Muscle Cells in-Vitro. *Circulation research*, 1994, 74: 214-224.
283. Reddi AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. *Clinical orthopaedics and related research*, 1998: S66-72.
284. Rosen V. BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine & growth factor reviews*, 2009, 20: 475-480.

285. Ducy P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2000, 219: 461-471.
286. Kempen DH, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, Dhert WJ, Yaszemski MJ. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2008, 29: 3245-3252.
287. Kim TH, Yun YP, Park YE, Lee SH, Yong W, Kundu J, Jung JW, Shim JH, Cho DW, Kim SE, Song HR. In vitro and in vivo evaluation of bone formation using solid freeform fabrication-based bone morphogenetic protein-2 releasing PCL/PLGA scaffolds. *Biomedical materials*, 2014, 9: 025008.
288. Asamura S, Mochizuki Y, Yamamoto M, Tabata Y, Isogai N. Bone regeneration using a bone morphogenetic protein-2 saturated slow-release gelatin hydrogel sheet: evaluation in a canine orbital floor fracture model. *Annals of plastic surgery*, 2010, 64: 496-502.
289. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*, 2003, 32: 136-141.
290. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 1997, 89: 755-764.
291. Ziros PG, Georgakopoulos T, Habeos I, Basdra EK, Papavassiliou AG. Growth hormone attenuates the transcriptional activity of Runx2 by facilitating its physical association with Stat3beta. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2004, 19: 1892-1904.

292. Kimura A, Inose H, Yano F, Fujita K, Ikeda T, Sato S, Iwasaki M, Jinno T, Ae K, Fukumoto S, Takeuchi Y, Itoh H, Imamura T, Kawaguchi H, Chung UI, Martin JF, Iseki S, Shinomiya K, Takeda S. Runx1 and Runx2 cooperate during sternal morphogenesis. *Development*, 2010, 137: 1159-1167.
293. Wang Y, Belflower RM, Dong YF, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Drissi H. Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 2005, 20: 1624-1636.
294. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 1997, 89: 765-771.
295. Byers BA, Guldberg RE, Hutmacher DW, Garcia AJ. Effects of Runx2 genetic engineering and in vitro maturation of tissue-engineered constructs on the repair of critical size bone defects. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2006, 76: 646-655.
296. Zheng H, Guo Z, Ma Q, Jia H, Dang G. Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo. *Calcified tissue international*, 2004, 74: 194-203.
297. Zhao Z, Wang Z, Ge C, Krebsbach P, Franceschi RT. Healing cranial defects with AdRunx2-transduced marrow stromal cells. *Journal of dental research*, 2007, 86: 1207-1211.
298. Wojtowicz AM, Templeman KL, Hutmacher DW, Guldberg RE, Garcia AJ. Runx2 overexpression in bone marrow stromal cells accelerates bone formation in critical-sized femoral defects. *Tissue engineering. Part A*, 2010, 16: 2795-2808.

299. Chuang LS, Ito K, Ito Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 2013, 132: 1260-1271.
300. Zhang DW, Wang ZL, Qi W, Zhao GY. The effects of Cordyceps sinensis phytoestrogen on estrogen deficiency-induced osteoporosis in ovariectomized rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 2014, 14: 484.
301. Xu XC, Chen H, Zhang X, Zhai ZJ, Liu XQ, Qin A, Lu EY. Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. *Journal of translational medicine*, 2014, 12: 284.
302. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *European journal of pharmacology*, 2011, 662: 78-84.
303. Wang W, Olson D, Liang G, Franceschi RT, Li C, Wang B, Wang SS, Yang S. Collagen XXIV (Col24alpha1) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF-beta/Smads signaling pathway. *International journal of biological sciences*, 2012, 8: 1310-1322.
304. Singh RK, Patel KD, Lee JH, Lee EJ, Kim JH, Kim TH, Kim HW. Potential of magnetic nanofiber scaffolds with mechanical and biological properties applicable for bone regeneration. *PloS one*, 2014, 9: e91584.
305. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PloS one*, 2014, 9: e104061.
306. Havill LM, Hale LG, Newman DE, Witte SM, Mahaney MC. Bone ALP and OC reference standards in adult baboons (*Papio hamadryas*) by sex and age. *Journal of medical primatology*, 2006, 35: 97-105.

307. Ross PD, Knowlton W. Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1998, 13: 297-302.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Atilla TOPÇU Doğum tarihi: 10.01.1983 Doğum yeri: Üsküdar Medeni hali: Evli, 1 çocuk Uyruğu: T.C. Adres: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM Tel: 0442 344 8738 Faks: 0442 236 1301 E-mail: atopcu53@gmail.com
Eğitim
Lise: Hacı Sabancı Lisesi (2000) Lisans: Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Yüksek lisans: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2007-2011) Doktora: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı (2011-2015)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derecede (ÜDS 57, 2008) Almanca:-..... Rusça:-.....
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
.....-.....-.....
İlgi Alanları ve Hobiler
.....-.....-.....

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 36643897-127

Konu : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı.

31.07.2014
ERZURUM

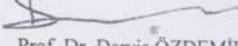
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

25240 – Kampus / ERZURUM

İlgi : 24.06.2014 tarih ve 42190979-01-02/2902 sayılı yazınız.

İlgide kayıtlı yazıda belirtildiği üzere, Fakülteniz Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Zekai HALICI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Moleküler Farmakoloji Laboratuvarında yürütülecek olan "**Kemik Defekti Oluşturulmuş Osteoporotik Ratlarda Bor Nitrür ve/veya Hidroksiapatit Bileşiklerinin Etkisinin Araştırılması**" başlıklı araştırma çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.07.2014 tarih ve 5 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 103 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna mevcut oy birliğiyle karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.


Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR
Başkan

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ DEKANLIĞI
25240
07.08.2014

Toplantı Tarihi : 25.07.2014

Toplantı Sayısı : 5

KARAR NO : 103- Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Zekai HALICI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığının Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Moleküler Farmakoloji Laboratuvarında yürütülecek olan "**Kemik Defekti Oluşturulmuş Osteoporotik Ratlarda Bor Nitrür ve/veya Hidroksiapatit Bileşiklerinin Etkisinin Araştırılması**" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 24.06.2014 tarih ve 42190979-01-02/2902 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

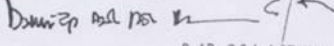
Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğunun, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Adres : Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı. 25240 – Yakutiye / ERZURUM

Telefon : 0-442-231 47 30

Fax : 0-442-231 55 63

e-mail: hadyek@atauni.edu.tr


Prof. Dr. S. Selçuk ATAMANALP
Dekan
08.08.2014