

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

DOKTORA TEZİ

**D VİTAMİNİ İNKÜBASYONU YAPILAN FARKLI
PARTİKÜL BOYUTLARINDAKİ BİYOSERAMİK
GREFTLERİN İNSAN OSTEOLAST HÜCRE
KÜLTÜRLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ÇAĞRI AKÇAY

**DANIŞMAN
PROF. DR. BANU GÜRKAN KÖSEOĞLU**

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

İSTANBUL-2016

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Ağız Diş Çene Cerrahisi Programında Doktora öğrencisi Çağrı AKÇAY tarafından Prof.Dr.Banu Gürkan KÖSEOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan " D Vitamini İnkübasyonu Yapılan Farklı Partikül Boyutlarındaki Byoseramik Greftlerin İnsan Osteoblast Hücre Kültürlerine Etkisinin İncelenmesi " başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06/10/2016 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Danışman

Prof.Dr.Banu Gürkan KÖSEOĞLU
İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Hülya Koçak BERBEROLĞU
İ.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Jüri

Prof.Dr.Bahar GÜRSOY
M.Ü.Diş Hekimiği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Jüri

Doç.Dr.Sema Sırma EKMEKÇİ
Aziz SANCAR DETAE
Genetik Anibilim Dalı

Jüri

Doç.Dr.Ediz DENİZ
Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

BEYAN

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

ÇAĞRI AKÇAY

(İmza)

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bütün bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, bilimsel vizyonuyla ufkumu genişleten, akademiye olan merakımı arttıran, ahlaki ve etik değerleriyle bana yol gösteren, her konuda verdiği destekle doktora eğitimimin bugünlere gelmesini sağlayan çok sevgili ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Banu Gürkan Köseoğlu' na

Doktora eğitimimde ikinci danışman hocam olarak gördüğüm, bana her konuda destek olan, bilgisi ve becerisiyle eğitimime katkı sağlayan, sevgili ve saygıdeğer hocam Prof. Dr. Hülya Koçak Berberoğlu' na

Doktora eğitimim süresince bilgisini ve desteklerini esirgemeyen, eğitimimin klinik kısmında ise adaletli ve etik yönetsel anlayışıyla huzurlu ve mutlu bir doktora eğitimi geçirmemizi sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız saygıdeğer hocam Prof. Dr. Çetin Kasapoğlu' na

Tez çalışmamın esas kısmı olan deney aşamasında, hücre kültürü hakkındaki bütün deneyimsizliklerimi tolere ederek, bilgileriyle becerileriyle ve üstün tecrübeleriyle çalışmanın başarıya ulaşmasına en büyük katkıyı veren saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. Sema Sırma Ekmekci ve Doç. Dr. Neslihan Abacı başta olmak üzere, Dr. Aris Çakiris, Dr. Zeliha Emrence ve doktora öğrencisi Melda Sarıman' a

Doktora eğitimim boyunca klinik pratik ve teorik anlamda bildiğim ve yapabildiğim bir çok şeye katkısı olan, hakları ödenemez sayın Doç. Dr. Burak Çankaya ve sayın Doç. Dr. Mehmet Ali Erdem' e,

Benimle birlikte aynı yollardan geçen doktora hayatımı güzelleştiren bütün bölüm arkadaşlarıma,

Çalışmamın hazırlanma süresince bütün zorluklara göğüs germemi sağlayan, beni cesaretlendiren, tez yazım öncesi ve sırasında özgüvenimi sağlayan Dt. Hülya Çerçi' ye,

Dünyaya geldiğim günden beri sonsuz sevgileri, maddi manevi her türlü destekleriyle her anımda yanımda hissettiğim, bugünleri görmemi sağlayan annem Sevim Akçay, babam İsmail Akçay ve kardeşim Dr. Çağla Akçay' a,

Tez çalışmamda katkıda bulunan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı' na

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55890



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokunun Anatomisi	3
2.1.1. Kemik Matriksi	3
2.1.1.1. Organik Matriks	3
2.1.1.2. İnorganik Matriks.....	4
2.1.2. Makroskopik Olarak Kemik Tipleri.....	4
2.1.2.1. Kompakt Kemik	4
2.1.2.2. Spongiöz Kemik.....	5
2.1.3. Mikroskopik olarak Kemik Tipleri	6
2.1.3.1. Primer Kemik	7
2.1.3.2. Sekonder Kemik.....	7
2.1.3.3. Komposit(Bundle) Kemik	8
2.1.4. Kemik Dokunun Hücre Biyolojisi	8
2.1.4.1. Osteoblastlar.....	8
2.1.4.2. Osteoklastlar.....	10
2.1.4.3. Osteositler	11
2.1.4.4. Osteoprogenitör Hücreler.....	13
2.1.4.5. Kemikteki Diğer Hücre Tipleri	14
2.2. Kemik Zarları.....	14
2.2.1. Periosteum.....	14

2.2.2. Endosteum.....	15
2.3. Kemikleşmenin oluşumu ve gelişimi.....	16
2.3.1. İntramembranöz Kemikleşme.....	16
2.3.2. Endokondral Kemikleşme.....	19
2.3.3. Remodeling.....	20
2.4. Kemik Formasyon Göstergeleri.....	22
2.4.1. Alkalen Fosfataz (ALP).....	22
2.4.2. Osteokalsin.....	23
2.4.3. Tip I Prokollagen Karboksiterminal Propeptid (PCIP) ve Tip I Prokollajen Aminoterminal Propeptid (PNIP).....	23
2.4.4. Kemik Sialoproteini (Bone Sialoprotein-BS).....	23
2.4.5. Osteopontin.....	23
2.4.6. Core Binding Factor Alpha 1.....	24
2.5. Çenelerde Kemik Kaybını Etkileyen Faktörler.....	24
2.6. Diş Hekimliğinde Kullanılan Greftler.....	26
2.6.1. Greftlerin Tarihsel Gelişimi.....	27
2.6.2. Greftlerin İşlev Mekanizmaları.....	29
2.6.2.1. Osteogenezis.....	29
2.6.2.2. Osteoindüksiyon.....	30
2.6.2.3. Osteokondüksiyon.....	30
2.6.3. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması.....	31
2.6.3.1. Otojen Greftler.....	32
2.6.3.2. Allogreftler (Homojen Kemik Greftleri).....	34
2.6.3.3. Ksenogreftler.....	37
2.6.3.4. Alloplastlar.....	38
2.7. D Vitamini (1, 25 dihidroksivitamin- D3).....	41
2.7.1. D Vitamini Kaynakları.....	42
2.7.2. D Vitamini Metabolizması.....	42
2.7.3. D Vitamini Reseptörü.....	44
2.7.4. D Vitamininin Etki Mekanizması ve Fonksiyonları.....	46
2.7.4.1. D Vitamininin Kemik Metabolizması Üzerine Etkisi.....	47
2.7.4.2. D Vitamininin Kemik Harici Etkileri.....	49
2.7.5. D Vitamini Eksikliğinde Ortaya Çıkan Durumlar.....	53

2.7.6. D Vitamini Toksikasyonu	53
2.7.7. D Vitamini Katabolizması	54
2.8. Hücre Kültürü	54
2.8.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi.....	54
2.8.2. Hücre Kültür Tipleri.....	55
2.8.2.1. Primer Hücre Kültürleri	56
2.8.2.2. Devamlı Hücre Kültürleri	56
2.8.2.3. Diploid Hücre Kültürleri	57
2.8.3. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları	57
2.8.4. Hücre Kültürünün Avantaj ve Dezavantajları.....	58
2.8.5. Hücre Kültürü Aşamaları	59
2.8.5.1. Hücre Ekimi	59
2.8.5.2. Pasajlama.....	59
2.8.5.3. Hücrelerin Yaşam Fazları	60
2.8.6. Hücre Kültürü Laboratuvarı.....	61
2.8.6.1. Hücre Üretim Yüzeyleri	62
2.8.6.2. Hücre Kültürü Vasatları	62
2.8.6.3. Kontaminasyon	64
2.8.7. Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum (MTT) Test Yöntemi.....	64
2.8.8. Alkalen Fosfataz Testi	65
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	66
3.1. Deney Grupları.....	66
3.2. Hücre Kültür Besiyerinin Hazırlanması.....	68
3.3. Hücre Ekimi	69
3.4. Pasajlama	71
3.5. Deney Düzenineğinin Hazırlanması	74
3.6. MTT Test Kitinin Uygulanması.....	76
3.7. ALP (Alkalen Fosfataz) Test Kitinin Uygulanması.....	77
3.8. İstatiksel Değerlendirme	78
4. BULGULAR.....	79
4.1. ALP Bulguları.....	79
4.1.1. ALP 24. Saat Bulguları	81
4.1.2. ALP 48. Saat Bulguları	82

4.1.3. ALP 72. Saat Bulguları	84
4.2. MTT Bulguları	87
4.2.1. MTT 24. Saat Bulguları	89
4.2.2. MTT 48. Saat Bulguları	90
4.2.3. MTT 72. Saat Bulguları	92
5. TARTIŞMA	95
6. SONUÇLAR	109
KAYNAKLAR	111
HAM VERİLER	133
FORMLAR	134
ETİK KURUL KARARI	135
PATENT HAKKI İZİNİ	136
TELİF HAKKI İZİNİ	137
ÖZGEÇMİŞ	138

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının kullanım şekli.....	75
Tablo 2: Deney gruplarının düzenek içindeki yerleşimi.....	75
Tablo 3: MTT Assay Kit malzeme listesi ve saklama koşulları.....	77
Tablo 4: ALP Test Kiti malzeme listesi ve saklama koşulları.....	77
Tablo 5: Saat gruplarında ayrı ayrı gruplara göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi	79
Tablo 6: Grupların kendi içlerinde saat gruplarına göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi	80
Tablo 7: ALP 24. saat deney sonuçları	81
Tablo 8: ALP 24. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi	82
Tablo 9: ALP 48. saat deney sonuçları	82
Tablo 10: ALP 48. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi	83
Tablo 11: ALP 72. saat deney sonuçları	84
Tablo 12: ALP 72. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi	85
Tablo 13: Deney gruplarının saat dilimlerine göre ALP bulgularının grafiği	85
Tablo 14: Saat gruplarında ayrı ayrı gruplara göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi	87
Tablo 15: Grupların kendi içlerinde saat gruplarına göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi	88
Tablo 16: MTT 24. Saat deney sonuçları	89
Tablo 17 : MTT 24. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi	90
Tablo 18: MTT 48. Saat deney sonuçları	90
Tablo 19: MTT 48. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi	91
Tablo 20: MTT 72. Saat deney sonuçları	92
Tablo 21: MTT 72. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi	93
Tablo 22: Deney gruplarının saat dilimlerine göre MTT bulgularının grafiği	93

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kompakt kemiğin enine kesiti ve osteon yapısı	5
Şekil 2: Spongiöz kemiğin morfolojik yapısı:	6
Şekil 3: Kansellöz ve kortikal kemiğin kollajen yapıları.....	6
Şekil 4: Primer ve sekonder kemiğin histolojik görünümü:	8
Şekil 5: Osteoblastların mikroskopik görüntüsü.....	9
Şekil 6: Osteoklastların mikroskopik görünümü	10
Şekil 7: Osteoklast hücresi tarafından kemik dokunun yıkılması.....	11
Şekil 8: Osteositlerin mikroskopik görünümü	12
Şekil 9: Kemik hücrelerinin farklılaşma yollarının şematik olarak gösterimi:.....	13
Şekil 10: Periosteum ve endosteum	15
Şekil 11: Kemik zarlarının histolojik görünümü	16
Şekil 12: İntramembranöz kemikleşmenin başlangıç aşaması	17
Şekil 13: İntramembranöz kemikleşmenin şematik olarak gösterilmesi:	18
Şekil 14: Endokondral kemikleşmenin şematik olarak gösterilmesi:	20
Şekil 15: Ağız içi verici bölgeler	34
Şekil 16: D vitamininin metabolik aktivasyonu	43
Şekil 17: D vitamini metabolizması.....	44
Şekil 18: D vitamini reseptörünün yapısı	45
Şekil 19: D vitamininin hedef hücrede VDR aracılığıyla etkileri	45
Şekil 20: D vitamininin kalsiyum metabolizmasına olan etkisi	48
Şekil 21: D vitaminin etkileri.....	49
Şekil 22: Aktif D vitamininin endokrin, otokrin ve parakrin fonksiyonları	52
Şekil 23: 37° C su banyosu (Mettler GmbH + Co., Germany)	69
Şekil 24: % 5 CO ₂ ve %95 atmosferik hava içeren, 37°C buhara doymuş CO ₂ İnkübatörü (İnkübatör Therma Form Direct Heat, USA).....	70
Şekil 25: Hettich® ROTINA 38/38R santrifüj makinesi (Sigma- Aldrich)	70
Şekil 26: 1500 devirde 5 dk santrifüj sonrası birbirine yapışarak dibe çöken insan osteoblast hücreleri	71
Şekil 27: 25 cm ³ lük hücre flaskı	72
Şekil 28: Pasajlama işlemi sırasında tripsinle flask yüzeyinden ayrılmış insan osteoblast hücrelerine medyum eklenmesi	73

Şekil 29: Hücre sayımı ve hücre canlılığının ölçümü için kullanılan ViCell cihazı (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, USA).....	73
---	----



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALP:	Alkaleen fosfataz
ATCC:	American Type Culture Collection
BS:	Bone Sialoprotein
Ca:	Kalsiyum
Ca ₃ (PO ₄) ₂ :	Kalsiyum Fosfat
CBFA1:	Core Binding Transcription Factor
CJD:	Jacob-Creutzfeld Disease
DBP:	D vitamini bağlayan protein
DDH:	Deli dana hastalığı
DDKKA :	Deminerale edilmiş dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DKKA:	Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DKM :	Deminerale kemik matriksi
DM:	Diabetes Mellitus
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
HA:	Hidroksiapatit
HCO ₃ :	Bikarbonat
HIV:	Human Immundeficiency Virus
IGF:	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL:	İnterlökin
KMP:	Kemik morfojenik protein
LED:	Light Emitting Diode
Mg:	Magnezyum
MTT:	Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum
Na:	Sodyum
PCIP:	Prokollagen Karboksiterminal Propeptid
PGE:	Prostaglandin E
PNIP:	Prokollajen Aminoterminal Propeptid
PTH:	Parathormon
PO ₄ :	Fosfat

RNA:	Ribo Nükleik Asit
RXR:	Retinoik asit X reseptörü
SDH:	Süksinil Dehidrogenaz
TCP:	Tricalcium Phosphate
TH:	T Helper
TME:	Temporomandibuler Eklem
TZP:	Trombositten zengin plazma
VDR:	D vitamini reseptörü
VDREs:	D vitamini response elementleri
YKR:	Yönlendirilmiş kemik grefti
µl:	Mikrolitre
mg:	Miligram
ml:	Mililitre
cm ³ :	Santimetreküp
rpm:	Revelations per minute
mm:	Milimetre
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre

ÖZET

Akçay Ç. (2016). D Vitamini İnkübasyonu Yapılan Farklı Partikül Boyutlarındaki Biyoseramik Greftlerin İnsan Osteoblast Hücre Kültürlerine Etkisinin İncelenmesi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Çeşitli nedenlerle kaybedilen kemiğin yerine koyulması ve/veya kemik formasyonunun sağlanması için çeşitli greft materyalleri kullanılmaktadır. Otojen greftler, greft seçenekleri arasında altın standart kabul edilseler de dezavantajlarından dolayı ideal greft materyalini bulmak yolundaki çalışmalar devam etmektedir. Biyoseramikler; kolay elde edilebilmeleri, biyouyumluluklarının yüksek olması, enfeksiyon riski taşımamaları ve yeni kemik oluşumu için iskelet görevi görmeleri sebebiyle sıklıkla tercih edilen greft materyalleridir. Kemik greftlerine osteoblastik aktiviteyi arttırmak amacıyla büyüme faktörleri, mineraller, vitaminler gibi yapılar ile yapılan çalışmalar literatürde büyük yer kaplamaktadır.

Çalışmamızda, D vitamini ile inkübasyonu yapılan farklı partikül boyutlarındaki biyoseramik greftlerin insan osteoblast hücreleri üzerindeki etkisi 24. 48. ve 72. saatlerde araştırılmıştır. Araştırmamızda 6 ana grup ve 18 alt grup incelenmiştir. Gruplara MTT ve ALP testleri uygulanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, ikili değerlendirmelerin Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, D vitamininin osteoblastlar üzerinde farklılaşmayı ve osteoblastik aktiviteyi artırıcı etkisi olduğu gözlenmiştir. Bunun yanında D vitamininin osteoblast proliferasyonunu azaltıcı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde D vitamini ile inkübe edilen greftlerin, D vitamini inkübasyonu yapılmayan greftlere nazaran osteoblast farklılaşmasını arttırdığı, osteoblastik aktiviteyi stimüle ettiği gözlenmiştir. Farklılaşmada 72. saatte gözlenen azalmanın, D vitamininin hücre kültüründe aktivitesinin azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. D vitamini inkübasyonu yapılmayan greft materyallerinin, osteoblast hücrelerinde proliferasyonu istatistiksel olarak anlamlı fark olmasa da artırıcı etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Greft materyalinin farklı partikül boyutlarının osteoblastlar üzerindeki etkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da sayısal olarak büyük partikül boyutlu greftlerin osteoblast differansiyasyonunu artırırken, küçük partikül boyutlu greftlerin osteoblast proliferasyonuna daha çok katkı yaptığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : D vitamini, Osteoblast, Trikalsiyum Fosfat, Partikül Boyutu, Hücre kültürü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55890

ABSTRACT

Akçay, Ç. (2016). Effects of Bioceramic Grafts in Different Particle Sizes Incubated with Vitamin D on Human Osteoblast Cell Cultures. İstanbul University, Institute of Health Science, Anabilim Dalının İngilizce Adı. Doktora Tezi. İstanbul.

Various graft materials are used so as to replace the bone which is lost for various reasons and/or provide bone formation. Even if autogenous grafts are considered as a golden standard among graft options, studies are continuing so as to find the ideal graft material because of its disadvantages. Bio-ceramics are mostly preferred graft materials for the reason that they are obtained easily, they have high biocompatibility, they bear no infection risk and they act as a skeleton for new bone formation. For the purpose of increasing osteoblastic activity of bone grafts; the studies related to structures such as growth factors, minerals, vitamins take a significant place in literature.

In our study, effects of bio-ceramic grafts in different particle sizes incubated with vitamin D on human osteoblast cell cultures are researched in 24th, 48th and 72nd hours. In our study, 6 main groups and 18 sub-groups are examined. MTT and ALP tests are applied to the groups. When examining the study data, Kruskal Wallis test is used in intra-groups comparisons of parameters not having normal distribution, Mann Whitney U test is used in binary evaluations.

At the end of our study, it is observed that vitamin D has an effect on osteoblasts to differentiate and increase the osteoblastic activity. In addition, it is concluded that vitamin D has an effect to reduce proliferation. Likewise, it is observed that grafts incubated with vitamin D are increasing osteoblast differentiation in comparison to non-incubated grafts, and stimulating osteoblastic activity. It is considered that reduction observed in 72nd hour depends on that activity of vitamin D reduces on cell culture. It is concluded that graft materials have an effect to increase proliferation on osteoblast without being a bearer even if there is no meaningful difference statistically. When examining the effect of different particle sizes of graft material on osteoblasts, it is observed that grafts with smaller particle sizes have more contribution on proliferation while grafts with bigger particle sizes numerically are increasing the osteoblastic differentiation even if there is no meaningful difference statistically.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 55890

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Maksillofasiyal cerrahide; çenelerin konjenital veya sonradan kazanılmış malformasyonlarında, tümör cerrahisi sonrası defektlerin onarımında, travma veya enfeksiyon sonrasında oluşan kemik defektlerinde, atrofiye uğramış çene kemiklerinin augmentasyonunda kemik grefti denilen biyomateryaller kullanılmaktadır. (Hollinger ve ark., 1996).

Klinik kullanımda defekt çeşitlerine göre farklı greft materyalleri (otojen greft, allogreft, ksenogreft, alloplastlar) kullanılmaktadır. Kişinin kendi kemiğinden elde edilen otojen greftler osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle altın standart kabul edilseler de bu greftlerin verici alan morbiditesi yaratması, kısıtlı miktarda elde edilebilmeleri ve alıcı bölgede enfeksiyon riski gibi dezavantajları alternatif materyal arayışlarına neden olmuştur (Deok-Won L, 2010; Choi YY, 2010).

Biyoseramik kemik greftleri (Alloplastik kemik greftleri), tamamıyla sentetik olarak üretilen kemik rejenerasyon materyalleri olarak tanımlanmaktadır (Kökden 1999). Belli oranda osteokondüktif özelliğe sahip olan bu materyaller aynı zamanda biyoyumludur. Defekti tamamıyla dolduracak biçimde yönlendirilirler. Aynı zamanda yeni oluşan kemik için iskelet görevi de görmektedirler (Garg 2004).

Alloplastların avantajları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

- Elde edilmesinin kolay olması,
- Saklanabilmesi ve steril edilebilmesi,
- Biyolojik açıdan uyumlu olması,
- Enfeksiyon riski taşımamasıdır.

D vitamini dokuda üretilerek kan dolaşımına verilmesi, diğer dokular üzerinde etki göstermesi ve bu etkisinin “feedback” mekanizmalarla düzenlenmesi nedeniyle daha çok steroid yapıda bir hormon olarak kabul edilen, en önemli fonksiyonu Ca ve P minerallerinin plazmadaki normal düzeylerini sürdürmek olan yapıdır.

D vitamininin, kemik metabolizmasının yanı sıra immun sistem düzenleyicisi, kanser hücrelerinde antiproliferatif etki, insülin üretimi, insülin direncinde azalma sağlama, Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozus gibi otoimmun hastalıklarda koruyucu olma özelliği, konjestif kalp yetmezliğinde korumayı artırma gibi bir çok

etkisi bulunmaktadır. Ayrıca D vitamininin kemik hücreleri olan osteoblastlar ve osteoklastlar üzerine D vitamini reseptörü aracılığıyla direk etkileri de bulunmaktadır.

Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılması, sürekli üretim ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısılarında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik durumunu taklit eden besleyici ortamlarda beslenerek çoğaltılmaktadır (Doyle ve ark. 1993, Helfrich ve ark. 2003)

Hücre ya da doku kültürü çalışmaları son yıllarda uygulamada büyük bir gelişim göstererek diş hekimliği de dahil olmak üzere modern bilimin bir çok dalında kendine yer bulmuş, hayvan ve insan haklarına gösterilen saygının artmasına paralel olarak önemi de o derece artmıştır. (Doyle ve ark. 1993, Helfrich ve ark. 2003)

Çalışmamızın amacı, biyoseramik greftlerde taşıyıcı madde olarak kullanılan D vitamininin ve farklı partikül boyutlarındaki biyoseramiklerin insan osteoblast hücrelerine etkilerini in vitro olarak gözlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokunun Anatomisi

Kemik; yüksek seviyede damarlanma ve innervasyona sahip, mineralize bir bağ dokusudur (Fernández ve ark., 2006). Şekil ve rijidite sağlamak, organizmadaki diğer dokulara destek olmak, bu dokuları korumak ve hareket kabiliyeti sağlamak kemiğin temel fonksiyonlarıdır (Data ve ark., 2008). Ayrıca mineral metabolizmasına, Ca (kalsiyum) ve PO₄ (fosfat) minerali deposu gibi görev yaparak da önemli katkı sağlar (Hadjidakis ve Androulakis, 2006). Kemik dokusunu, kemik hücreleri ve kemik matriksi denilen hücrelerarası madde oluşturur. Kimyasal yapısında ise %71 oranında inorganik tuzlar [kalsiyumfosfat (Ca₃(PO₄)₂) ve kalsiyumhidroksiapatit], %18,5 kollajen, %0,25 mukopolisakkarid, %1,75 protein ve %8,5 de su bulunur (Akay, 2001).

2.1.1. Kemik Matriksi

Kemik matriksi; organik ve inorganik elemanlardan oluşan kemik hücreleri arasında kalan hücrelerarası maddedir. Kemik dokunun işlevini ve fonksiyonlarını yerine getirebilmesi, organik ve inorganik komponentlerin birbiri ile uyumlu olmasına bağlıdır. Toplam kemik doku ağırlığının yaklaşık %20' sini su oluştururken, hacim olarak büyük çoğunluğu ise kollajen oluşturur. Kuru kemik ağırlığının %60-70' ini inorganik Ca₃(PO₄)₂ tuzları oluştururken, %30-35' ini ise organik fibröz protein ve kollajen fibriller oluşturur (Junquera ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2002; Bancroft ve Stevens, 1996).

2.1.1.1. Organik Matriks

Kemik organik matriksi, %90' ı kollajen, geri kalan kısmı nonkollajenöz proteinler, peptitler, karbonhidratlar, lipitler içeren ve osteoid denilen osteoblast hücreleri tarafından salgılanan mineralize olmamış organik yapıdan oluşan kısımdır. Kemik organik matriksini oluşturmada görev alan nonkollajenöz proteinler genellikle osteonektin, osteopontin, osteokalsin ve osteoprotegerinlerdir. Bu proteinlerin görevleri tam olarak bilinmemekle birlikte, kemik mineralizasyonunda, büyüme faktörlerinin salınmasında, organik matriks kalsifikasyonunda ve kemik hücrelerinin organik matrikse tutunmasında fonksiyon gösterdikleri düşünülmektedir.

Kemik dokunun direncini ve sertliğini, inorganik madde ve organik maddenin uyumlu şekilde olması sağlar. Kemik dokudan organik matriks çıkarıldığında kemik

doku şeklini korumaya devam eder ancak kırılma direnci azalır, toz haline kolayca gelebilir (Janqueria ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2002; Bancroft ve Stevens, 1996).

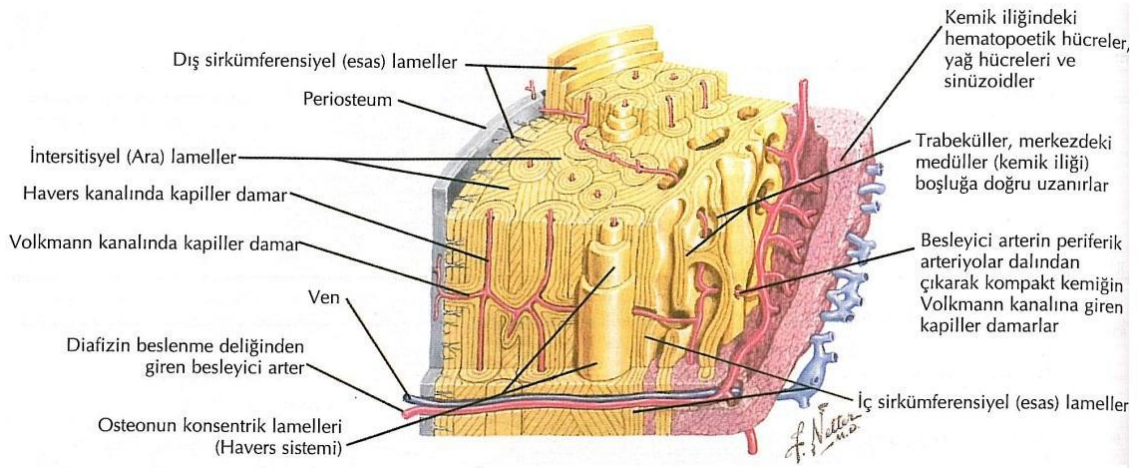
2.1.1.2. İnorganik Matriks

Kemik doku matriksinin kuru ağırlığının %50' sini inorganik maddeler oluşturur. Kemik inorganik elemanlarının başında Ca, PO₄, sitrat, bikarbonat (HCO₃), magnezyum(Mg) ve sodyum(Na) gibi mineral ve bileşikler gelir. Ayrıca organizmadaki toplam Ca miktarının %99' u, P miktarının %85' i, Mg ve Na miktarının %40-46' sı kemik doku-iskelet sistemindedir. Ca ve PO₄ mineralleri, kemik kollajen fibrillerinin yanında, amorf madde ile birlikte iç içe, organize hidroksiapatit kristalleri şeklinde kemikte bulunurlar. X ışınları kırınım yöntemi ile yapılan araştırmalarda; Ca ve P, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ kompozisyonunda bileşik oluşturarak hidroksiapatit kristallerini meydana getirdiği gözlenmiştir. (Janqueria ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2002; Bancroft ve Stevens, 1996). Hidroksiapatit kristallerinin en önemli fonksiyonu kollajen lifler ile özel dizilim oluşturarak, osteoid mineralizasyonu sayesinde kemik dokunun dayanıklılığını ve sertliğini sağlamaktadır. (Özyigit, 2007).

2.1.2. Makroskopik Olarak Kemik Tipleri

2.1.2.1. Kompakt Kemik

Kompakt kemik; solid, aralıkları olmayan ya da çok az boşluklu kemik dokudur. Kompakt kemiklerde bulunan lameller, Havers sistem lamelleri, interstisyel sistem lamelleri, iç ve dış sirkumferansiyel lameller olmak üzere üç şekilde dizilim gösterir. Havers sistem lamelleri, düzensiz silindirik şeklinde olup ortalarında Havers kanallarını bulundurlar. Bu lameller ile Havers kanalından oluşan bütün yapıya "osteon" adı verilir (Şekil 1). Kompakt kemiklerde, ilgili dokunun çoğunluğunu osteon bütünlükleri oluşturur. Osteonlar arasında kalan bölgelerde de değişik yönlerde izlenen ara lameller bulunur. Kompakt kemiklerin iç ve dış yüzleri ise, sirkumferansiyel lameller ile çevrelenmiştir. Dış sirkumferansiyel lameller, iç sirkumferansiyel lamellerden daha kalın yapılardır. (Bayar, 2004).

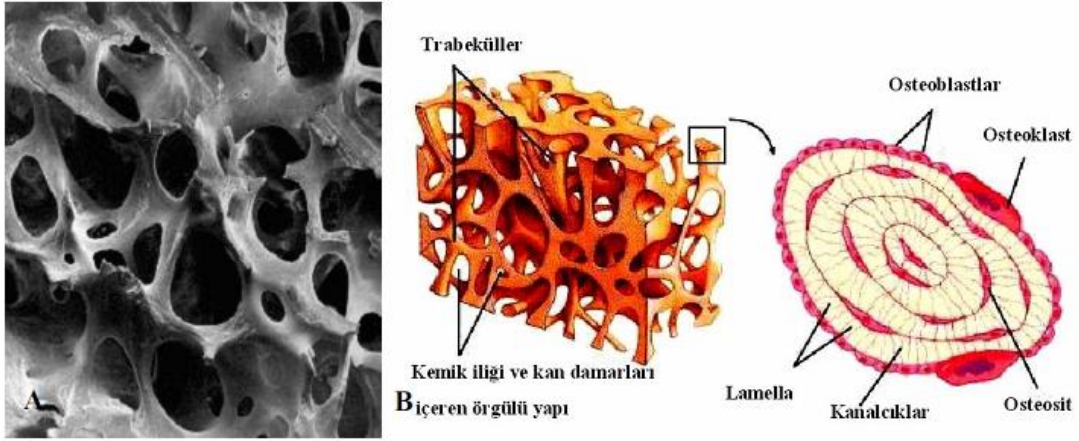


Şekil 1: Kompakt kemiğin enine kesiti ve osteon yapısı

Kompakt kemiğin, dış ve iç yüzeyleri zarlarla örtülüdür. Dış yüzeyde bulunan zara periosteum(periost), iç yüzeyde bulunana ise endosteum(endost) adı verilir. Periost, perikondrium gibi gelişmekte olan kemiklerde iki katlıdır. Bunun dış katı fibröz bağ dokusundan yapılmışken, iç katı daha çok hücrelidir. Endost, periosta kıyasla çok daha ince ve tamamen hücreli bir zarıdır. Periost damardan zengindir. Periosttaki damarlar, birbirlerine de bağlanan volkman kanalları ile Havers kanallarına ulaştığında, Havers kanallarını periosta bağlarlar. Damarların dağılımı sırasında, damarların çapı giderek küçüldüğünden, Havers kanalları içinde kapiller tipte kan damarı bulunur (Şimşek, 1998).

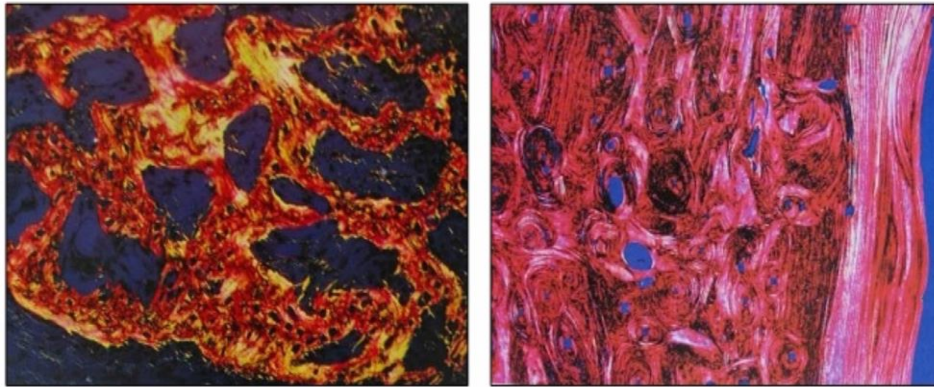
2.1.2.2. Spongiöz Kemik

Aralarında sement çizgileri olan bir çok lamelin biraraya gelmesiyle oluşan kemik trabeküllerinden meydana gelen kemik tipine spongiöz kemik denir. Bu kemik türünde küçük kalsifiye kıvrımda adacıkları da bulunabilir. Sadece büyük trabeküllerin içinde küçük Havers sistemleri görülür ancak ortalarında kan damarları bulunmamaktadır. Küçük ve ince trabeküllerde ise, mozaik gibi birleşmiş üçgen şekilli lameller bulunur. Trabeküller aralarında boşluklar bırakarak üç boyutlu kemik ağı oluştururlar (Şekil 2-A). Trabeküllerin araları endosteumla örtülüdür ve kavimleri kemik iliği ile doludur (Şekil 2-B) Kompakt kemiklerdeki düzenli kollajen lif diziliminin (Şekil 3-B) aksine spongiöz kemiklerde kollajen dizilimi gelişigüze'dir (Şekil 3-A) (Şimşek, 1998).



Şekil 2: Spongiöz kemiğin morfolojik yapısı: (A) Kansellöz kemiğin gevşek trabeküler yapısının görünümü. (B) Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının ve kemik iliği ile kan damarı içeren örgülü yapının şematik görünümü.

Dış taraftaki düzgün, dens bir kortikal (kompakt) kemik tabakası ile iç taraftaki spongiöz trabeküler (kansellöz) kemik kombinasyonu aşırı bir yük olmaksızın kemiğe yeterli direnci sağladığı gibi genişlemiş kemik yüzeyindeki hızlı formasyon ve rezorbsiyon da değişen metabolik ihtiyaçlara cevap verilebilmesini sağlar. İskelet dokusunda metabolik yanıtlar özellikle trabeküler kemik yüzeylerinde ve korteksin endosteal yüzeyinde ortaya çıkar. Buna rağmen, şiddetli hiperparatiroidizmde gelişen subperiosteal rezorbsiyonda olduğu gibi, korteksin periosteal yüzeyi de kalsiyum düzenleyici hormonlardan etkilenebilir (Alpar, 1980).



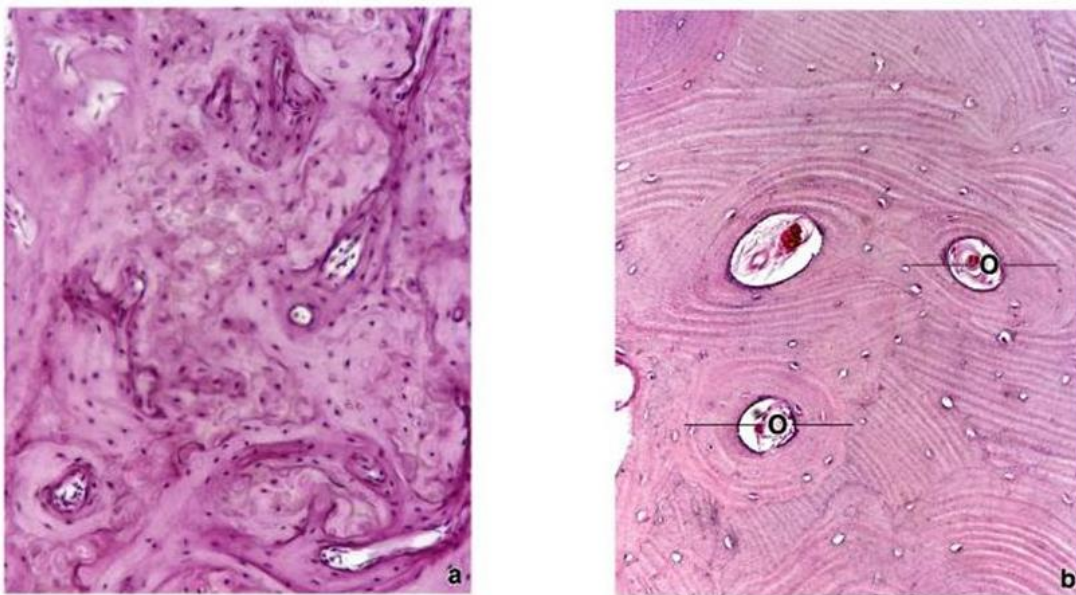
Şekil 3: Kansellöz ve kortikal kemiğin kollajen yapıları: Kansellöz ve kortikal kemiğin kollajen yapıları (A) Tipik, gelişigüzel kollajen lif dağılımı sergileyen kansellöz kemik kesiti. (B) Kortikal kemikte kollajen liflerinin düzenli paralel ve Havers sistemini oluşturan yapısını gösteren kemik kesiti (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw- Hill, New York, Chapter eight, page: 145-6, 2003).

2.1.3.1. Primer Kemik

İntrauterin hayatta embriyolojik gelişim sürecinde oluşan, ayrıca kırık veya diğer kemik onarımlarının başlangıç safhasında ortaya çıkan ilk kemik dokusuna primer kemik adı verilir. Primer kemikte bulunan kollajen iplikler, düzensiz kollajen demetler halinde olup dağınık seyrederek ağsı yapılar oluşturur. Bu kemik doku, osteoblast hücreleri ile döşeli düzensiz vasküler boşluklar ve kollajen fibrillerden meydana gelmektedir. Sekonder kemiğe göre, mineral yapıları daha azdır. Ayrıca lamel içermezler ve sekonder kemiğe nazaran daha fazla osteositleri vardır (Janqueria ve Carneiro, 2006; Martin ve Burr, 1989). Yeterince kalsifiye odaklar içermeyip, bol miktarda hücreden oluşmaktadır (Şekil 4-A). Temel maddesi yeterince kalsifiye olmamıştır. Doku hücrelerden oldukça zengindir. Primer kemik yetişkinde kafatasındaki yassı kemik eklemlerinde, diş alveol kemiklerinde ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgeler gibi birkaç bölge dışında, yerini 3-4 yaşından sonra lamellar kemiğe bırakır, yeniden yapılanma ile kortikal veya kansellöz kemiğe dönüşür (Janqueria ve Carneiro, 2006).

2.1.3.2. Sekonder Kemik

Postuterin (yetişkin) dönemde gözlenen yoğun lameller kemik dokusuna sekonder kemik denilmektedir. Bu lamellere, kemik lameli adı verilmektedir. Her lamel içinde bulunan kollajen fibriller birbirine paralel seyrederken, diğer lamellerdeki kollajen fibrillere çapraz ve spiraller yaparak komşuluk eder. Kollajen fibrillerin bu özel seyirleri sekonder kemiğe dayanıklılık kazandırır. İç içe geçmiş bu lameller, kemiğin uzun eksenine paralel olarak dizilen Haversian kanallarının etrafında bulunurlar. İçerisinde damar sinir paketi bulunan bu kanallar ve onları çevreleyen lamellere “Havers Sistemi” veya “Osteon” adı verilir. Kemik yüzeyine dik olarak konumlanan ve kemiğin iç ve dış yüzeylerinin birbiriyle iletişimini sağlayan diğer kanal sistemine “Volkman Kanalları” adı verilir (Şekil 4-B) (Duthie ve ark., 1989; Soydan, 1985; Hollinshead, 1985;). Erişkinlerde bulunan kemik dokusu genellikle sekonder kemik dokusudur. (Müftüoğlu, 1993)



Şekil 4: Primer ve sekonder kemiğin histolojik görünümü: A) primer kemik B) sekunder kemik

2.1.3.3. Kompozit(Bundle) Kemik

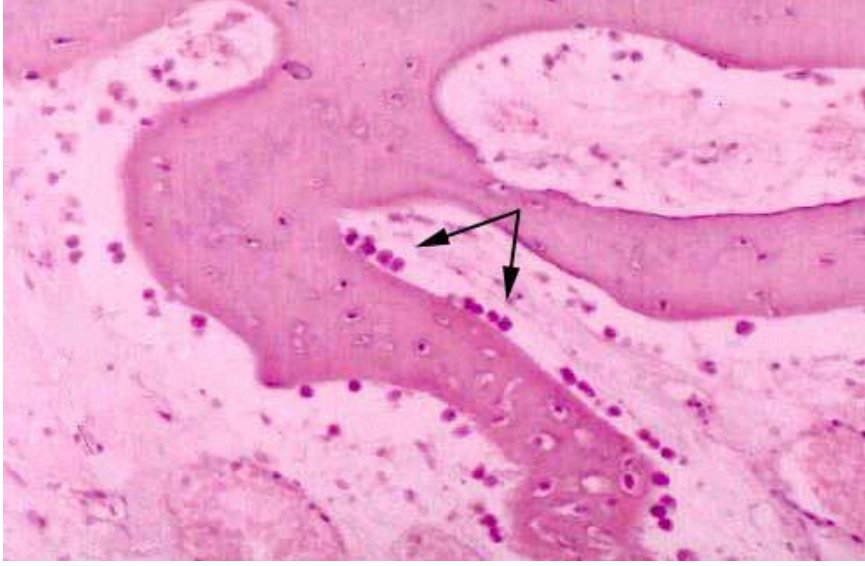
Primer kemikten, sekonder kemiğe gelişim sırasında lameller kemiğin woven kemikle birlikte görüldüğü kemik yapıya kompozit(bundle) kemik adı verilir. Çizgisel iç bağlantılara sahip olan bu kemik, özellikle eklemlerin ve eklem ligamanlarının etrafında bulunmaktadır. (Garg AK, 2004).

2.1.4. Kemik Dokunun Hücre Biyolojisi

2.1.4.1. Osteoblastlar

Kemik yapımından sorumlu hücrelere osteoblast adı verilmektedir. Kemik yapımı sırasında bolca gözlenen bu hücreler, şekillenmekte olan kemik trabeküllerinde ya da lamel yüzeylerinde tek sıra halinde dizilmiş olarak bulunurlar. Yoğun olarak buldukları bir başka yer ise periosttur.

Mikroskopik olarak ilk bakışta tek katlı epitel hücrelerine benzetilirler ancak aktivasyonlarına göre kübik, prizmatik veya basık şekilli olabilirler. Çekirdekleri ökromatik olan bu hücrelerin sitoplazmaları granüllü retikulumdan ve golgi cisiminden zengindir (Şekil 5). Bu özellikleri osteoblastların yüksek metabolik aktiviteye sahip olduklarını gösterir.



Şekil 5: Osteoblastların mikroskopik görüntüsü

Osteoblastlar kemik matriksinin kollajen fibriller, proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler gibi organik kısmını salgılamakla görevlidir. Henüz kireçlenmemiş haldeki bu temel maddeye osteoid adı verilir ve osteoblastlar kendi salgıladıkları bu osteoid doku içinde gömülü kalırlar. Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerden farklılaşır. Metabolik olarak aktif salgı hücreleridir. Osteoblastların sitoplazmalarında bulunan bol miktardaki alkalin fosfataz(ALP) enzimi, hücrenin temel madde içerisinde $Ca_3(PO_4)_2$ halinde Ca depolanmasını ayarladığını gösterir (Jungueira ve ark., 1998; Sağlam, 1987; Soydan, 1993; Thibodeu ve Patton, 2002).

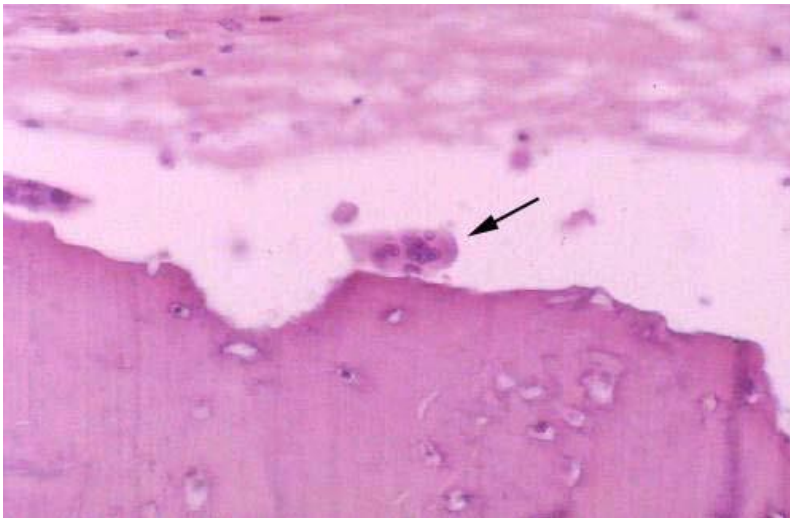
Osteoblastlar, matriks komponentlerinin düzenlenmesi ve aktif matriks depozisyonu görevleri sırasında iki ayrı hücreye farklılaşabilirler. Bu hücreler *osteositler* ve *kemiği sınırlandıran hücreler* olarak isimlendirilir. Kemiği sınırlandıran hücreler, kemik dokusu yüzeyini saran ancak hücreler sentezleme aktivitesi göstermeyen hücrelerdir. Osteositler ise ince sellüler yapıyla diğer kemik hücrelerine bağlanan ve mineralize kemik matriksi içinde yıldız şeklinde bulunan hücrelerdir. Osteositler, hücreler ve kemik dokunun hücreler olmayan bölümüyle geniş temas alanı oluşturacak şekilde organize olur. Bu organizasyon sayesinde kan Ca homeostazının düzenlenmesi (Branemark ve ark., 1969); mekanik yükün algılanması (Branemark ve

ark., 1977) ve bu bilginin kemik içindeki diğer hücrelere iletilmesi gibi işlevleri yerine getirir.

Osteoblastlar hücre yüzeylerinde ve sitoplazmalarında paratiroid hormon, 1,25-dihidroksivitamin D ve sistemik gelişim düzenleyiciler için özel reseptörlere sahiptir. Prostaglandinler ve kemik dönüştüren gelişim faktörleri gibi düzenleyicilerin lokal kemik oluşumunun düzenlenmesinde otokrin faktörler içinde en önemli kaynak oldukları açıktır. Osteoblastlar kemik yapımının yanı sıra remodeling sürecinde kemik rezorpsiyonunu tetikleyebilir. Bu aktivasyon basamağı şekil değişimlerini veya plazminojen aktivatörü gibi proteolitik enzimlerin sekresyonunu içerebilir. Bu değişiklikler mineralize kemik yüzeyine osteoklastların girişini arttırabilir. Osteoblastlar ayrıca osteoklastları aktive eden faktörleri de salabilir (Becker, 1990; Rose ve Oreffo, 2002).

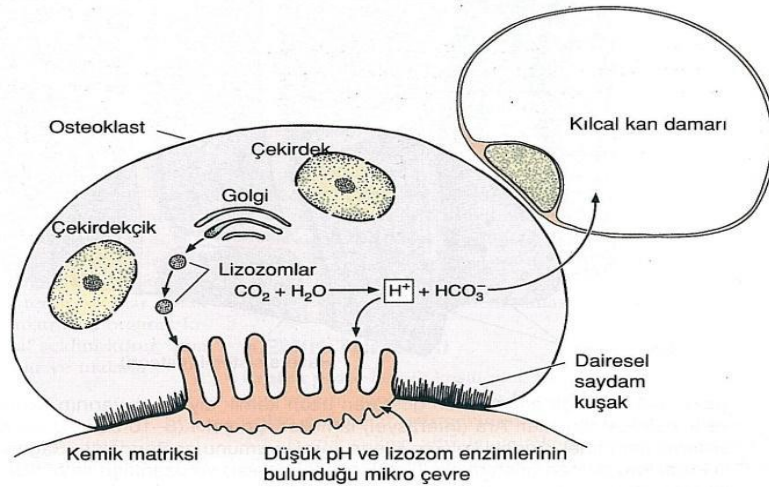
2.1.4.2. Osteoklastlar

Kemiği ve kalsifiye kartilajı rezorbe eden, kemik doku yıkımından sorumlu hücrelere osteoklast adı verilir. Tek çekirdekli öncü hücrelerin füzyonu ile şekillenen bu hücreler, geniş ve çok çekirdeklidir (Şekil 6). Osteoklastların öncü mezenkimal hücrelerden çok hematopoetik kök hücrelerden türediği tahmin edilmektedir. Osteoklastların hücre şekli, monosit-makrofaj serisinden kaynak olsa da makrofajlarda bulunan yüzey belirteçleri osteoklast yüzeylerinde bulunmaz. Osteoklast ve monosit öncü hücrelerinin şekilleri differansiyasyonun erken dönemlerinde birbirinden farklılaşır. (Rose ve Oreffo, 2002).



Şekil 6: Osteoklastların mikroskopik görünümü

Osteoklast hücrelerinin sitoplazmaları bol miktarda mitokondri, pek çok lizozom ve osteoblastlara nazaran daha az pürüzlü endoplazmik retikulum içerir. Osteoklastı diğer hürelere ayıran en önemli özelliklerden biri aktif rezorpsiyon alanına komşu buruşuk, yüzeysel kabarıklık bir sınırının bulunmasıdır. Bu sınırın etrafında temiz bir bölge vardır. Bu bölgenin işlevi osteoklastın kemiğe tutunması ve lizozomal enzimler aracılığıyla hidrojen iyonlarının yüksek konsantrasyonda korunabilmesi için buruşuk hücre sınırının hücre dışı sıvıdan izole olmasını sağlamaktır. Hücre, dışa dönmüş dev bir fagolizozom görünümünü taklit eder (Şekil 7). Osteoklast hücreleri, asit fosfataz enziminin zengin olmasının yanı sıra, bolca lizozomal enzim ve hidrojen (H) iyon sekresyonuna yardımcı olan karbonik anhidraz içermektedir. H iyonları, mineral mobilizasyonunun yanı sıra kemik matriks komponentlerini (düşük bir pH da kollajeni de içerir) azaltabilen lizozomal enzimlerin aktivasyonunda da önemlidir. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu hyaluronik asit sentezindeki bir artışla da birleşir (Becker, 1990; Rothman ve Simeone, 1975).



Şekil 7: Osteoklast hücresi tarafından kemik dokunun yıkılması

2.1.4.3. Osteositler

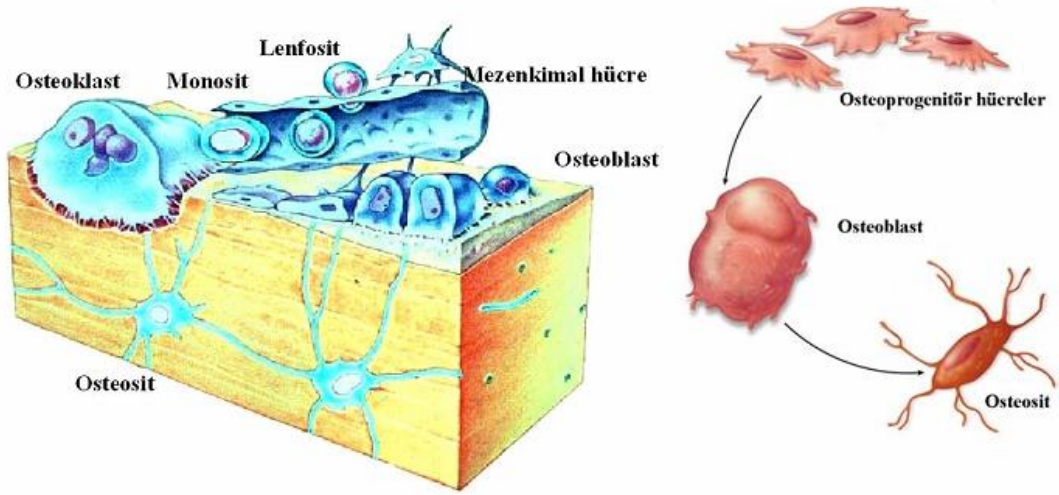
Osteoblastların fonksiyonlarının ve morfolojik özelliklerinin değişmesiyle meydana gelen kemiğin esas hücrelerine osteosit adı verilir. Osteoblastların, osteositlere dönüşüm sürecinde hücrede çok sayıda protoplazmik uzantı meydana gelir, ayrıca hücrenin protein sentezleme kapasitesi belirgin oranda düşer. Hücrede meydana gelen

protoplazmik uzantılar sayesinde, hücreler kemik dokuda osteonlardaki diğer osteositlerin uzantıları ve yüzey osteoblastlarının uzantıları ile bağlantı oluşturur (Şekil 8). (Alpar, 1980).



Şekil 8: Osteositlerin mikroskopik görünümü

Osteositlerin protein sentezleme kapasitelerinin olmamasının yanı sıra bu hücreler Ca metabolizmasının düzenlenmesinde osteoblastlar kadar anlamlı bir rol oynamamaktadır. Osteonal remodeling için en önemli uyaran kemikte meydana gelen harabiyettir. Bu tip bir harabiyet genellikle fiziki strese maruz kalan kemik dokusunda ortaya çıkar. Meydana gelen harabiyetin tamiri için osteoklastların ilgili bölgeye göç etmesi ve aktif bir rezorbsiyon sahası oluşturmaları gerekmektedir. Osteoklastlar, osteositler tarafından aktive edilmektedir. Osteosit hücreleri osteoklastlarla sürekli temas halinde bulunurlar ve harabiyette ilk etkilenen hücreler oldukları için osteoklastları uyararak rezorbsiyonu tetikleyen hücre görevini üstlenirler. (Bayar, 2004).



Şekil 9: Kemik hücrelerinin farklılaşma yollarının şematik olarak gösterimi: Osteoklastlar, kemik iliğinde yer alan makrofaj öncülerinden köken alan monositlerin füzyonuyla oluşur. Osteoprogenitör hücreler ise kemikteki aktiviteye göre osteoblastlara, osteoblastlar da osteositlere farklılaşabilir (Kierszenbaum A.L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 127, 2002).

Kemik doku üzerine gelen fiziki stresten ve travmadan en çok etkilenen hücreler osteositler ve yüzeyde yerleşmiş osteositlerle ilişkide bulunan osteoblast hücreleridir. Hayvan çalışmalarında osteositlerin bu uyarılara en erken cevap verdiği gözlenmiş, hücrelerde glikoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivitesinin ve RNA (Ribo Nükleik Asit) miktarının arttığı belirlenmiştir. Travma ve fiziki stresle ortamda artan PGE (Prostaglandin E) ve PGE-2' nin bu olayların mediatörü olabileceği düşünülmüştür. PGE' nin yüzey osteoblastları tarafından salınırken, PGE-2' nin hem yüzey osteoblastları hem de osteositler tarafından meydana getirildiği immüno-kimyasal çalışmalarla doğrulanmıştır. (Alpar, 1980)

2.1.4.4. Osteoprogenitör Hücreler

Kemik dokunun esas hücreleri olup mezanşimden kaynak alan hücrelere osteoprogenitör hücre adı verilir. Genel olarak bu hücreler asidofilik sitoplazmalıdır. Periosteumun iç katmanında, Havers kanallarında ve endosteumda yer almaktadırlar. Bu hücreler mitoz bölünmeyle olgun kemik hücrelerinde farklılaşma göstermektedirler (Şekil 9). Kemiklerin büyümesinde, herhangi bir kırık ya da zedelenme durumlarında aktif duruma gelirler ve bölünerek osteoblast hücrelerine dönüşürler.

2.1.4.5. Kemikteki Diğer Hücre Tipleri

Kemik doku içerisinde ana hücreler olan osteoblast, osteoklast, osteosit ve osteoprogenitör hücreler dışında başka hücreler de bulunabilmektedir. Örneğin kemiğin osteoklastlar tarafından rezorbe edilmesinden sonra rezorbsiyon alanında makrofajlar gözlemlenebilir. Makrofajların fonksiyonu belirsizdir, ancak tam olarak sindirilememiş rezidüel matriksi kaldırabilirler. Bu yüzden lizozomal enzimler yanında kollajenaz da salgırlar. Makrofajlar aynı zamanda kemik rezorbsiyonu için güçlü bir stimülatör olmalarının yanında osteoblast öncü hücrelerinin kopyalanmasını stimüle eden ve remodeling döngüsünde formasyon fazını başlatabilen IL-1 (İnterlökin-1) ve PGE-2'nin de kaynağıdır. Lenfositler de kemik rezorbsiyonuna yol açan faktörlerin salgılanmasında rol oynayabilir.

Fibroblastik hücreler lokal düzenleyicilerin salgılanmasında rol oynayabilir. Somatomedin veya insülin benzeri gelişim faktörü (IGF-1) fibroblastlar tarafından üretilebilir ve kemik gelişimi üzerinde güçlü bir stimülasyon etkisi vardır.

Mast hücreleri rezorbe kemiğe komşu bulunabilir ve bazı kültür sistemlerinde gösterildiği gibi kemik rezorbsiyonunu arttıran heparin üretebilirler.

Son olarak, endotelial hücreler de kemik metabolizmasında rol oynayabilir. Bu hücreler gelişim faktörü üretir ve kemik rezorbsiyonunu stimüle eden ve kemik kan akımını da etkileyebilen prostasiklinin en önemli kaynağıdır (Becker, 1990).

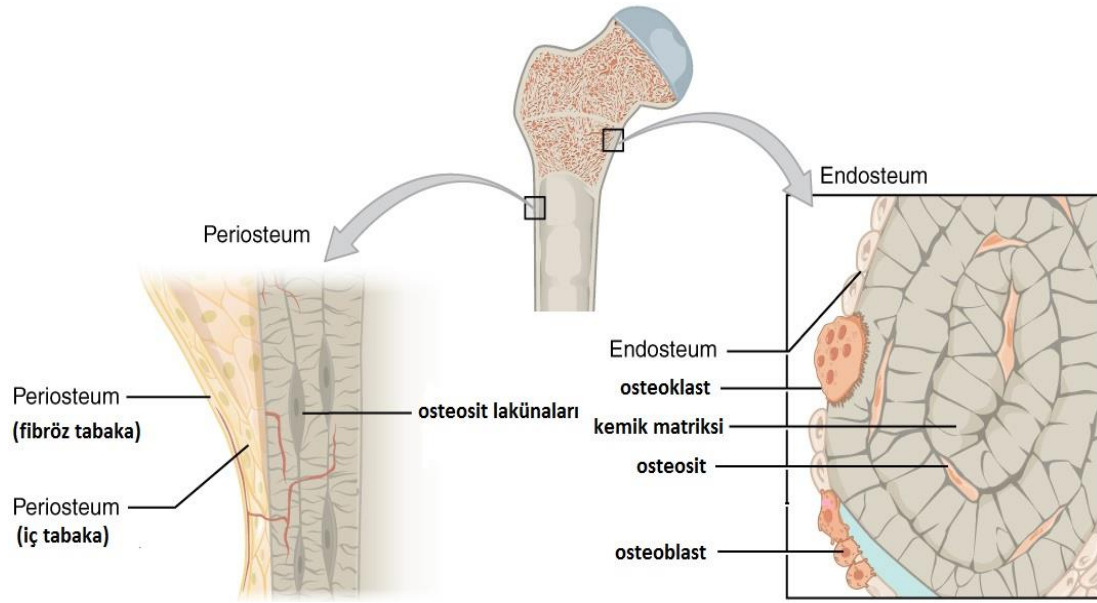
2.2. Kemik Zarları

Bütün kemikler iç yüzeylerde endosteum ve dış yüzeylerde de periosteum adı verilen osteojenik hücrelere sahip zarlar ile örtülüdür.

2.2.1. Periosteum

Periosteum, kemikleri saran (eklem kıkırdağı ile örtülü yüzeyde, tendon ve kasların yapışma yerlerinde bulunmaz) kaba, vasküler ve sıkı bir bağ doku tabakasıdır. Dış tabaka fibröz bağ dokusu görünümündedir ve sıkı bir damar ağı içerir, hücreden zengindir. İç tabakanın lifleri periostal lamellere giren demetler oluşturur (Sharpey lifleri). Periosteum kemiğin beslenmesinde, gelişmesinde, tamirinde ve kemik dokuya destek sağlanmasında önemli rol oynar. Periosteumun tabakalarından olan dış tabakası fibröz tabaka olarak isimlendirilir (Şekil 10). Bu tabaka kollajen lifler yardımıyla fibroblast denilen organizmalardan oluşmaktadır.

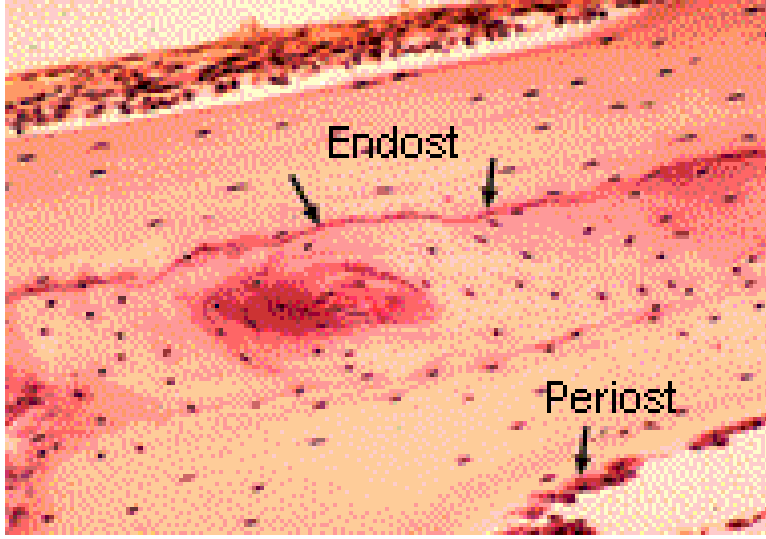
Sharpey lifleri matriks içine girer ve periostun kemiğe bağlanmasını sağlar. Periosteum hücreden daha zengin bir yapıya sahiptir (Şekil 11). Bu nedenle osteojenik tabaka olarak isimlendirilir. Bu hücreler kemiğin büyümesi ve onarımında başlıca rolü oynamaktadır. Sharpey liflerinin çevresindeki matriks kalsifiye olmamıştır ya da az kalsifiyedir. Bu liflerin sayısı buldukları anatomik bölgeye göre farklılık göstermektedir. Kafatası kemiklerinde, tendon ve kasların yapışma yerlerinde fazladır (Soydan, 1985; Janqueria ve Carneiro, 2006).



Şekil 10: Periosteum ve endosteum

2.2.2. Endosteum

Endosteum, kemik içinde bulunan boşlukların örtülmesini sağlayan tabakadır (Şekil 10). Yassı osteoprogenitör hücrelerle az miktarda bağ dokudan oluşan bir yapıya sahiptir. Periosteum ile karşılaştırılırsa çok ince bir yapısı vardır. İnce retiküler bağ dokusundan oluşmuştur (Şekil 11) ve hem osteojenik, hem hematopoetik özellik göstermektedir. Gelişim sona erdikten sonra da osteojenik etkinliğini sürdürmektedir (Soydan, 1985; Janqueria ve Carneiro, 2006).



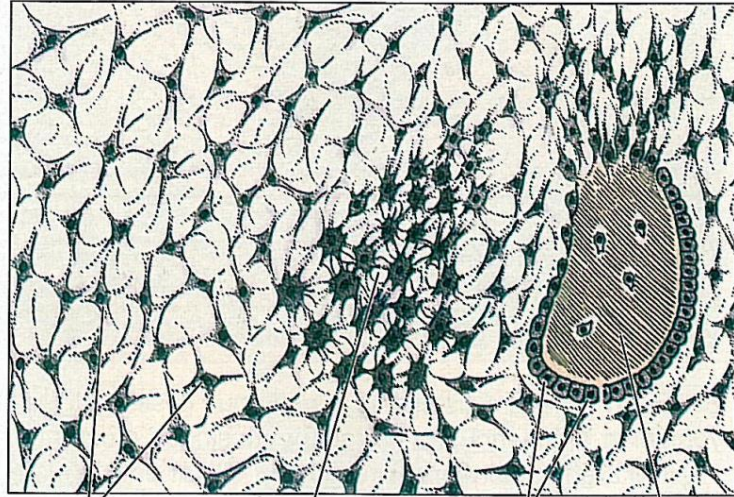
Şekil 11: Kemik zarlarının histolojik görünümü

2.3. Kemikleşmenin oluşumu ve gelişimi

Kemik oluşumu iki şekilde meydana gelmektedir. Bunlar intramembranöz ve endokondral kemikleşmedir. İntramembranöz kemikleşme mezenşimal bağ dokusunun, endokondral kemikleşme ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Yassı kemiklerin çoğunda intramembranöz kemikleşme, uzun ve kısa kemiklerde ise genellikle endokondral kemikleşme görülür. Her iki kemikleşme çeşidinde de ortaya çıkan ilk kemik primer kemiktir ve daha sonra yerini sekonder kemiğe bırakır. Kemik büyümesi esnasında primer kemik alanları, rezorbsiyon alanları ve sekonder kemik alanları yan yana görülürler bu sayede kemik yapımı ve yeniden şekillenme meydana gelir. Yeniden şekillenme ve kemik yapımı büyüyen kemiklerde daha hızlı, yetişkinlerde daha yavaş olarak hayat boyu devam eder (Junquera ve Carneiro, 2006; Müftüoğlu, 1993).

2.3.1. İntramembranöz Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme, mezenşimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir. Frontal ve pariyetal kemiklerin tamamı ile oksipital ve temporal kemikler, mandibula ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. (Janquera ve Carneiro, 2006).

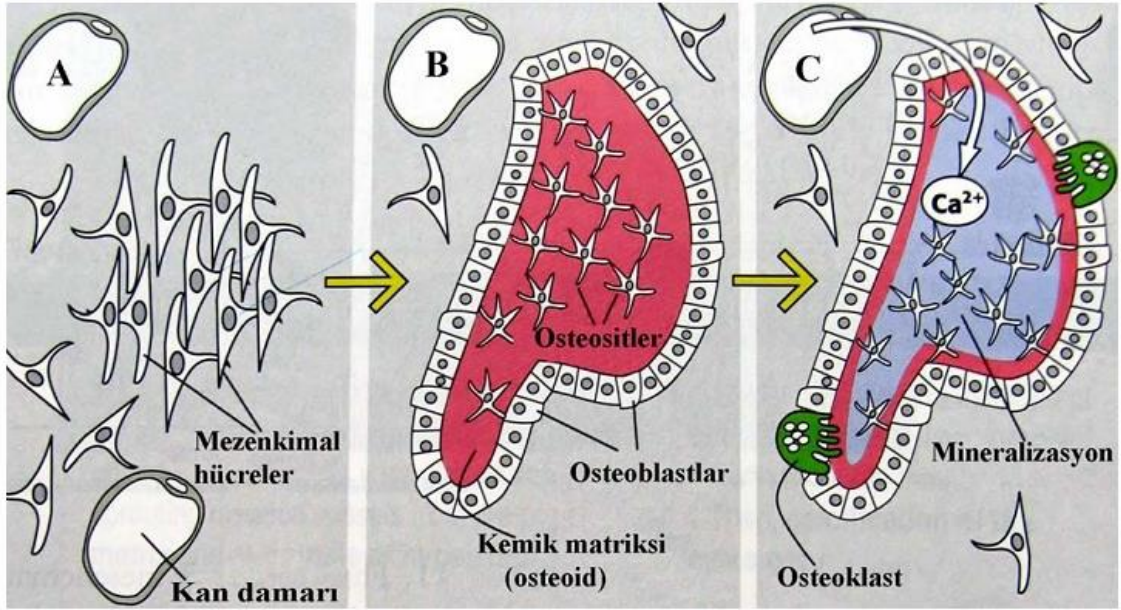


Mezenkim Kemik blasteması Osteoblast Birincil kemik dokusu

Şekil 12: İnamembranöz kemikleşmenin başlangıç aşaması (Blastema: büyüme ve rejenerasyon yeteneği olan hücre topluluğu)

Mezenşim hücreleri önce hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklılaşırlar, daha sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler (Şekil 12, Şekil 13-A, Şekil 13-B). Bu dokuda bol kılcıl damar gözlenir. Bu damarlar osteoid dokuya Ca ve P iyonlarını taşır. İyonlar, osteoblastların salgıladığı ALP aracılığıyla $Ca_3(PO_4)_2$ moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlar (Şekil 13-C). Oluşan dokuya kemik trabekülleri denir. Trabeküller içinde kalan osteoblastlar aktivitesi azalmış osteositlere dönüşür. Şekillenen trabeküllerin yüzeyine osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar tek sıra halinde dizilirler ve kemik lamelleri yaparlar. Bu olayın art arda tekrarlanması sonucu birincil kemik trabeküllerinin yüzeyinde ve kenarında lamelli ikincil kemik yapısında katmanlar meydana gelir ve trabeküller kalınlaşıp uzar. Bu sırada osteoklastlar lamelleri iç yüzlerinden rezorbe ederken, osteoblastlar da bir taraftan yeni kemik lamelleri ekler. Bu sayede trabekül denilen birincil kemik dokusu içeren yapılar ortadan kalkar. Yalnızca ikincil kemik dokuda yer alan trabeküller kalır. Spongiöz kemiği bu komşu trabeküllerin kaynaşması sonucu şekillenir. Spongiöz kemiklerin yüzeylerine intramembranöz yolu ile kompakt kemik eklenerek kemikleşme süreci tamamlanır. Trabeküllerin aralarında kalan mezenşim dokusundan da kemik iliği şekillenir (Bancroft

ve Stevens, 1996; Cotran, Kumar ve Robbins, 1999; Gartner ve James, 2000; Janqueria ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2002).



Şekil 13: İntramembranöz kemikleşmenin şematik olarak gösterilmesi: (A) Mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir. (B) Mezenşim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklılaşıp, sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. (C) Kılcal damarlardan osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonları taşınıp, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. (Kierszenbaum A.L. Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131, 2002).

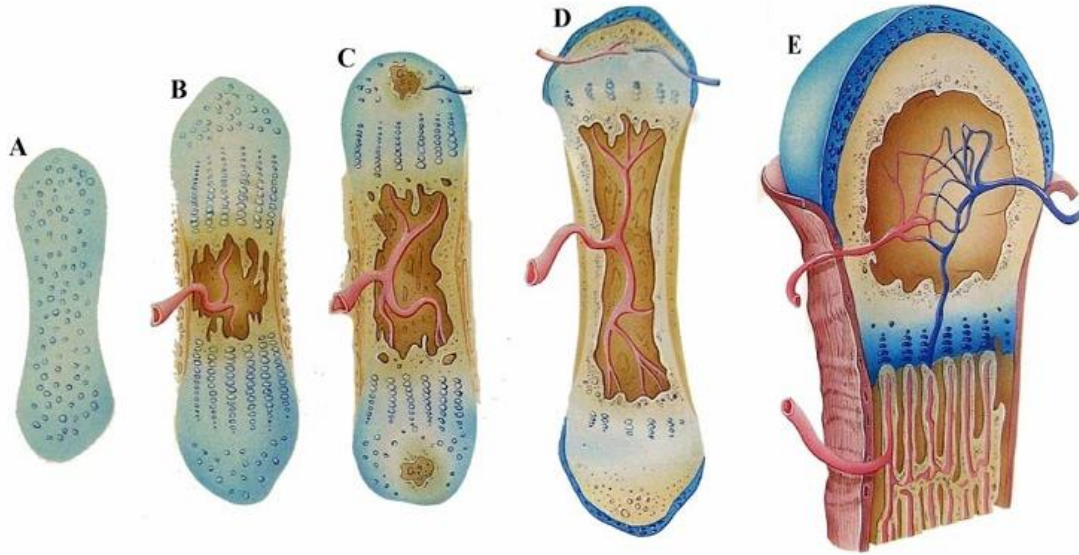
Doğumdan sonra kafatasının yassı kemiklerinin gerek iç gerekse dış yüzeylerindeki intramembranöz kemik yapımının kemik yıkımına nazaran belirgin bir üstünlüğü vardır. Kafatası gelişmelere paralel olarak genişlemek zorundadır. Bu nedenle kafatası kemikleri devamlı olarak iç yüzeylerinde osteoklastlar tarafından yıkılırken aynı anda dış yüzeylerine osteoblastlar tarafından yeni kemik lamelleri eklenmekte ve böylece gelişme sona erdiğinde kompakt kemik şekillenmektedir. Böylece iki tabaka kompakt kemik (iç ve dış tabakalar) ortaya çıkar ama merkezi kısım süngerimsi yapısını korur (Oktay, 1992; Ballı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.3.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme iki aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşama kondrositlerin hipertrofisi ve harabiyetidir. İkinci aşama ise, farklılaşmamış mezenkim hücrelerinin kıkırdağı rezorbe etmeleri ve osteoblastların oluşmasıdır (Paker 1994).

Endokondral kemikleşme uzun ve kısa kemiklerde görülür ancak bu tür kemikleşme karakteristik olarak en belirgin uzun kemiklerde dir. Kemikleşme hiyalin kıkırdaktan ufak bir modelle başlayıp (Şekil 14-A), kemik dokusu oluşumuyla sonlanır. Modelin kıkırdağında bulunan mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler de osteoblastlara differansiye olurlar (Şekil 14-B). Bu sayede yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında silindirik biçimde bir kemik manşet ortaya çıkar. Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerin önce hipertrofisine, ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip edip, ölmelerine neden olur (Şekil 14-C). Kıkırdak modelin ortasında birbiri ile devamlı yapıda boş kaviteler oluşur (kemik iliği kavitesi). Periosteumdaki osteoklastlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları açarlar. Periosteumdaki kan damarları bu deliklerden girerek, osteoprogenitör ve hematopoetik hücreleri taşırlar. Damarlarla gelen Ca ve P iyonları, ALP aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Diyafizde şekillenen boşluklara, kan damarları ile gelen mezenşim hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar, kalsifiye kıkırdak matriksi üzerine tek sıra halinde dizilerek kemik dokusu yapmaya başlarlar. Böylece ortaları kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan meydana gelen kemik trabekülleri ortaya çıkar. Kemik trabekülleri ile kan damarlarının aralarında kalan boşluklarda kemik iliği şekillenir. Bu arada kıkırdak modelin epifiz ve diyafizi arasında kondrositler mitoz ile çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar (Şekil 14-D). Böylece modelin boyu da devamlı olarak uzar. Kemik manşet de kalınlaşıp, epifizlere doğru uzanır ve kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dıştan sarar. Kemikleşme merkezinde olduğu gibi önce kıkırdak matriks, ardından da ilk şekillenenlerin devamı halinde kemik trabekülleri oluşur. Endokondral kemikleşme epifizlere yaklaşıncaya, epifizlerin içinde ikincil kemikleşme merkezleri belirir. Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece kıkırdak bir disk kalır ki buna epifiz plağı denir (Şekil 14-E). Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plaklarındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönüne doğru bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusu yapar, bu kıkırdak da devamlı olarak yerini kemik

dokusuna bırakır. Böylelikle kemikler belli bir yaşa kadar uzamaya devam eder. En sonunda epifiz plakları da kemikleşir ve kemik büyümesi sonlanır (Bancroft ve Stevens, 1996; Cotran, Kumar ve Robbins, 1999; Gartner ve James, 2000; Janqueria ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2002).



Şekil 14: Endokondral kemikleşmenin şematik olarak gösterilmesi: (A) Hyalin kıkırdak modeli (B) Diyafiz kıkırdağını örten perikondriumun iç katındaki mezenkimal hücrelerin osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşmaları. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar. (C) Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesini bozarak, kondrositlerde hipertrofiye, ardından ölümlerine neden olur. (D) Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. (E) Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece epifiz plağı kalır (Gartner L.P., James L.H. Color Atlas of Histology, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, page 73, 2000).

2.3.3. Remodeling

Kemik doku sabit bir destek dokusu olmayıp sürekli olarak yıkım ve ardından yeni kemik oluşumu şeklinde yeni yapılanma gösterir. Canlı olan kemik dokuları, mekanik zorlama çizgileri boyunca mineral ve matriks depolarını sürekli olarak yenileyerek adapte olur. Oluşan bu olaylar normal şartlarda dengeli bir biçimde süregelir ve ortaya çıkan kemik doku, rezorbe olanla eşit özellikler gösterir. Osteoklastlar kemiklerin mineral ve protein matrikslerini rezorbe ederek kemikte bir boşluk meydana getirirler. Akabinde ortaya çıkan bu boşluk, osteoblastlar yardımıyla doldurulur. Eski kemiğin rezorbe olmaması durumunda yeni kemik oluşmamaktadır (Alpar, 1980a). Kemiğin yapılanması, yeniden yapılanmasından farklı olan bir olaydır.

Kemiğin yeniden yapılanması yaşanan kemiğin yeni olan kemikle yer değiştirmesini sağlayan ve yaşam boyu devam eden hücresel değişimlerin sirkülasyonu olarak değerlendirilmelidir. Kemiğin yapılanması ise çocuklukta ve adolesan devrede kemiklerin büyümesi ile seyreden bir durumdur. Yetişkinde de kemik metabolizması devamlı olarak aktiftir. Kemik yaşlanması ile ortaya çıkan mikrofraktürleri tamir için veya değişen mekanik strese bağlı olarak kemik gücünü artırmak için kemiğin yeniden yapılanması zorunludur. Kemiğin yeniden yapılanma yerleri: periosteal kılıf, Haversian kılıf ve endosteal kılıftır. Fizyolojik gereksinimlere göre bu üç kılıfta değişik cevaplar ortaya çıkabilir. Bu olay çeşitli hücrelerin differansiye olarak rezorbsiyonu yapan osteoklast şekline dönüşmeleri ile başlar. Daha sonra bu osteoklastlar aktive olarak rezorbsiyonu başlatırlar. Rezorbsiyonun tamamlanmasından sonra ise bu alan osteoblastlar tarafından işgal edilerek yeni kemik yapımı mümkün olur. Kemik rezorbsiyonu ve formasyonu her zaman bir eşleşme şeklinde birbirini takip ederler. Hiçbir zaman sadece formasyon ya da sadece rezorbsiyon söz konusu olamaz. Osteoklastik kemik rezorbsiyonu daha kısa sürede tamamlanırken, formasyon için harcanan zaman daha uzun olup üç aydan daha fazladır (Alpar, 1980a). Kompakt kemikte yeniden yapılanma, yaşlı kemiğe doğru daha progresif ilerleyip korteks boyunca bir kanal açan osteoklastlar tarafından başlatılır. Bu alana “cutting cone” (kesik koni) denir. Bu açılan alanın hemen gerisinden başlayarak vasküler stroma ve az differansiye hücreler kaviteye doğru ilerler. Ortama eklenen aktif osteoblastlar ise bu bölgede yeni bir Haversian sistemin oluşmasını sağlarlar (Alpar, 1980a). Trabeküler kemikte ise osteoklastik aktivasyon Hawship lakuna denilen kemik iliği duvar yüzeyindeki boşluklarda oluşur. Buraları daha sonra aktif osteoblastlar tarafından doldurulur (Alpar, 1980a). Kemiğin yeniden yapılanmasında tetik veya osteoklastları aktive ederek rezorbsiyonu başlatan mekanizma iyi bilinmemekle birlikte osteoklastların aktive olması için ortamda aktif osteoblast varlığı gereklidir. Rezorbsiyonu başlatan uyarıcının osteoblast kökenli bir ürün olduğu düşünülmektedir (Goldstein ve Bonadio, 1998). Osteoklastlar, kemik yüzeyi boyunca hareket edebilen ve kemik yüzeye yapışma yeteneği olan hücrelerdir. Osteoklast aktivasyonundan hemen sonra osteoklastın bu yapışma yüzeyi tırtıklı bir görünüm alır ve bu yüzden osteoklastlardan proteolitik enzimler salgır. Osteoklastlar ortamın pH'ını devamlı H salgılayarak asidik yaparlar. Kemiğin rezorbsiyon ortamındaki proteolitik enzimler ve düşük pH, kemiğin organik kısmının ve mineral sindirimi için gereklidir. Rezorbsiyon

aktivitesi belli bir derinliğe ulaştıktan sonra osteoklastlar buradan ayrılır ve başka bir rezorbsiyon kavitesi yapmadan önce kemik boyunca yer değiştirirler. Osteoklastların matriks sindirimi için sentezlediği enzimler fosfatazlar, sülfotazlar, beta-glukuronidaz ve metalloproteinazlardır (Einhorn, 1995). Kemik yeniden yapılanmasına katılan hücrelerin tamamı “Basic Multicellular Unit (Temel Hücresel Birim)” veya “Bone Remodeling Unit (Kemik Yeniden Yapılanma Birimi)” adını alır. Bu birimin lokal olarak devamlılığı kemik kitlesinin korunmasında son derece önemlidir. Kemik yeniden yapılanması yeni bir kemik birimi olan “Bone Structural Unit (Kemik Yapısal Birimi)” olarak adlandırılır (Goldstein ve Bonadio, 1998). Birim zamanda bir birim kemik hacimindeki rezorbe olan ve daha sonra yapılan kemik miktarı, kemik dönüşüm hızı olarak adlandırılır. Kemik dönüşüm hızı trabeküler kemikte kompakt kemikten çok daha hızlıdır (Alpar, 1980a, 1980b)

2.4. Kemik Formasyon Göstergeleri

2.4.1. Alkalin Fosfat (ALP)

ALP osteoblast membranında yer almaktadır. Bu madde kemik oluşumu sırasında kana salınır, kemik yapımının ölçütüdür. ALP hücre membranlarının ekstrasellüler yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına sıkıca bağlanan bir glukoproteindir. Enzim membrana bağlı iken bir tetramerdir, ancak dolaşıma katıldığında diamerdir. İskeletin ALP' si osteoblastların membranında yerleşmiştir ve henüz anlaşılamayan bir mekanizma ile dolaşıma salgılanır. Serum total ALP' si sıklıkla kullanılan kemik yapımı göstergesidir. Paget hastalığı, raşitizm, osteomalasi ve renal osteodistrofi gibi kemik metabolizması ile ilgili bozukluklarda, enzim aktivitesi değişiklikleri tedavi gidişatını yansıtır ve yeni kırıkların iyileşmesinin izlenmesi açısından yararlı bir göstergedir (Odendaal 2006).

Kemik ALP' sinin kesin fonksiyonu bilinmemesine rağmen, hipofosfataz defektlerinden anlaşıldığına göre enzim, mineralizasyonda çok önemli rol oynar. ALP, mineralleşme başlangıcının odağı olduğuna inanılan membrandaki matriks keseciklerinde bol miktarda bulunur. Kıkırdakta kalsiyumpirofosfatdihidrat kristallerinin çözülüşünde de rolü olduğu düşünülmektedir.

Osteoblastlar aktif olarak kemik matriksini depolamaları sırasında, çok miktarda ALP salgırlar. Bu fosfatazın inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırdığı ya da

kollajen liflerini, Ca tuzlarının depolanmasını sağlayacak şekilde aktive ettiği sanılmaktadır. ALP düzeyi, genellikle kemik yapım hızının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. ALP enziminin temel rolü kemik yapımının başlatılmasını sağlamaktır (Delmas 2000).

2.4.2. Osteokalsin

Osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteindir. Kemikte en çok bulunan glutamik asitten zengin 49 aminoasitli nonkollojenik matriks proteini olup kemiğe oldukça spesifiktir. Osteokalsin Ca iyonunu kemik matriksine bağlayan bir proteindir. Osteokalsin gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur (Kayaalp 1998)

2.4.3. Tip I Prokollagen Karboksiterminal Propeptid (PCIP) ve Tip I Prokollajen Aminoterminal Propeptid (PNIP)

Kollajenler kemiklerin majör formlarıdır. Organik matriks yapısının % 90' ından fazlasını kapsamaktadırlar. Bir konnektif doku proteindir. Kollajen sentez ve yıkımı (kollajen turnover) gelişim esnasında belirgindir. Mineralize kemikte kollajen olarak tip I kollajen bulunur. Tip I kollajen, prokollajen I adı verilen öncü molekül olarak osteoblastlarca sentez olurlar. Prokollajen 1, kollajen üretimini ve büyümeyi gösteren biyokimyasal bir belirteçtir (Delmas 2000, Haspolat 2002)

2.4.4. Kemik Sialoproteini (Bone Sialoprotein-BS)

Osteoblastlar ve osteoklastlar tarafından sentezlenir. Kemiğin nonkollajenöz organik matriksinin önemli kısmını oluşturur. Tam spesifik sayılmasa da kemik turnoverinin hassas bir markerı olan BS, preosteoblastlar için mitojeniktir ve osteoblastlara differansiye olmalarını sağlar. BS, diferansiyasyonun geç safhalarında eksprese olan kemik matriksinin osteoblast kaynaklı komponentidir (Haspolat 2002, Seibel ve ark. 1996).

2.4.5. Osteopontin

İlk defa 1979 yılında extrasellüler bir matriks proteini olarak tanımlanmıştır. Osteopontin ekspresyonu, kemik ve epitel yüzeylerde yapısalıdır. Osteopontin kemikte ve hasarlanmış veya inflame olmuş dokulardaki kalsifikasyonda (distrofik kalsifikasyon) Ca depozisyonunu düzenler, osteoporoz, ateroskleroz patogenezi, tümör

büyümesi gibi bir çok olayda da görev alabileceği de öne sürülmüştür (Yoon ve ark. 1987).

2.4.6. Core Binding Factor Alpha 1

Kemik oluşumunda olmazsa olmaz transkripsiyon (DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)'nin RNA'ya kopyalanma işlemi, DNA'dan mRNA sentezlenmesi) faktörlerinin başında gelir. Kemik oluşturma gibi bir faaliyet içinde olan her hücrede mutlaka vardır. Osteoblast gelişim mekanizmaları tam anlaşılammış olmakla birlikte, Cbfa1'in (core binding transcription factor = osteoblast stimüle edici faktör 2 = Osf2), osteoblast farklılaşmasındaki temel faktör olduğu bilinmektedir (Cui ve ark. 2003).

2.5. Çenelerde Kemik Kaybını Etkileyen Faktörler

Çene kemiklerinde kayıplar genel veya lokal nedenlerle olabilmektedir. Lokal nedenlerle oluşan kemik kayıpları temel olarak periodontal hastalıklar ya da diş çekimi nedeniyle oluşan diş kayıplarına bağlıdır. Periodontal hastalıkta kemik yıkımı esas olarak lokal faktörler ile ilişkilidir. Bu lokal faktörler ya diş eti enflamasyonuna yol açarak ya da oklüzal travmaya neden olarak kemiği yıkıma uğrattır (Zarb ve ark., 2002).

Oklüzal travma, fizyolojik limitleri aşan kuvvetlerin periodonsiyumda oluşturduğu değişikliklerdir. Basınç altında periodontal ligament lifleri, damarlar ve sinirler sıkışmakta, alveol kemiği üzerinde rezorbsiyon bulguları başlamaktadır. Gerilim altında ise periodontal aralık genişlemekte kollajen lifler gerilerek yırtılmaktadır (Caranza ve Newman, 1996).

Diş çekimlerine bağlı rezorbsiyon ise, o bölgenin fonksiyondan çıkması ile birlikte başlar. Dişlerin kaybından sonra çenelerde kemik değişiklikleri erken dönemde izlenir. Dişler ve periodontal lifler tarafından bu bölgeye herhangi bir basınç iletilmediği için kemik rezorbsiyonu başlar. Çekimi takiben socketin altındaki kemik formasyonu ve kret tepesindeki kemik rezorbsiyonu ikinci haftada bile izlenebilir ve bu devam eden bir süreçtir. Değişiklikler kemiğin vertikal boyutunda olduğu kadar transversal boyutlarında da oluşmaktadır (Zarb ve ark., 2002).

Rezorbsiyon bütün hayat boyunca aynı oranda olmamaktadır. Maksimum rezorbsiyon diş çekiminden sonraki ilk bir yıl içerisinde oluşmaktadır. Daha sonra rezorbsiyon miktarı azalmakta fakat açıklanamaz bir şekilde sürmektedir. Mandibulanın anterior rezidüel kretinin vertikal boyutundaki azalma maksillanın anterior kretindeki

azalmadan dört kat fazla olmaktadır. Genelde mandibulanın posterior bölgesinde anteriora göre daha belirgin miktarda kemik kaybı oluşmaktadır. Alveoler kemik kaybı miktarı kişiden kişiye farklılıklar göstermektedir. Diş kayıplarından sonra oluşan alveoler kemik kayıpları kret şekillerinde değişik formlar oluşmasına neden olmaktadır (Güven ve Keskin, 1996).

Genel faktörler ise:

1- Sistemik kemik hastalıkları:

a) Osteoporoz:

- Senil osteoporoz,
- Menopoz sonrası görülen osteoporoz,
- Sekonder osteoporoz (Cushing sendromu).

b) Osteomalazi:

- D vitamini yetmezliği,
- Renal osteodistrofi,
- Sekonder hiperparatiroidizm.

c) Kötü beslenme veya beslenme yetersizliği.

2- Endokrin hastalıklar:

a) Diabetes mellitus,

b) Primer ve sekonder hiperparatiroidizm,

c) Alkolizm,

d) Diyaliz gerektiren renal bozukluklar.

3- İlaç tedavileri:

a) Kronik kortikosteroid tedavisi,

b) Kronik heparin tedavisi,

c) Antikonvülsifler,

d) İmmünosupresanlar olarak sayılabilmektedir (Güven ve Keskin, 1996).

2.6. Diş Hekimliğinde Kullanılan Greftler

Greft bir dokunun cerrahi yöntemlerle herhangi başka bir bölgeye taşınmasıdır. Kemik greftleri; kaybedilen kemiğin yerine koyulması ve/veya kemik formasyonunun sağlanması için kullanılan materyallerdir. Maksillofasial cerrahide; çenelerin konjenital veya sonradan kazanılmış malformasyonlarında, tümör cerrahisi sonrası defektlerin onarımında, travma veya enfeksiyon sonrasında oluşan kemik defektlerinde, atrofiye uğramış çene kemiklerinin yükseltilmesinde kullanılan biyomateryallerdir (Hollinger ve ark., 1996).

İdeal kemik greft materyalinin özellikleri şunlardır:

- Antijenik özellik taşımamalı.
- Karsinojenik ve toksik olmamalı.
- Yapısal olarak güçlü ve dayanıklı olmalı, yeterli destek ve stabiliteyi sağlayabilmeli.
- Enfeksiyona dayanıklı olmalı.
- Kök rezorpsiyonu ya da ankiloza neden olmamalı.
- Kolay uygulanabilmeli ve istenilen forma kolayca getirilebilmeli.
- Hızlı ve yeterli miktarda elde edilebilmeli.
- Minimal cerrahi işlemle kullanılabilmesi.
- Maliyeti ucuz olmalı.
- Osteoindüktif ve kondüktif özellikleri olmalı.
- Yeni ataşmanı tetiklemelidir (Rosenberg ve Rose, 1998).

Oral ve maksillofasiyal cerrahide en sık rastlanan greft uygulama endikasyonları şu şekilde sıralanabilir (Fonseca 1991, Peterson 1992);

- Kist çıkarılması, tümör rezeksiyonu sonrası, gömük diş çekimi gibi oral operasyon sonucu ortaya çıkan defektler,
- Estetik amacıyla gerçekleştirilen operasyonlar,
- Travmatik diş çekimi, çenenin kırılması, sinüslerin açılması gibi travmatik defektler,
- Cerrahi işlemler arasında yer alan ortognatik operasyonlar sırasında ortaya çıkan defektler,
- Trafik kazası gibi aşırı doku kayıplarının ortaya çıkardığı komplikasyonlar,
- Preprotetik operasyonlar, kret ogmentasyonu ve sinus tabanı yükseltilmesi operasyonu planlananlar,
- Endosseöz implantların etrafında meydana gelen defektler,
- Neoplazmlar,
- Enfeksiyonel osteomyelit olguları,
- Dudak damak yarıkları defektleri,
- Periodontal defektler,
- Lokal skatrisler,
- TME (Temporomandibular eklem) artroplastisi.

2.6.1. Greftlerin Tarihsel Gelişimi

Cerrahi operasyonlarda, uzun yıllar boyunca bir çok araştırmacı bir çok türde greft materyalleri uygulamaları gerçekleştirmiştir. Bu durum tarihsel olarak Eski Mısır dönemine kadar dayanmaktadır.

- Van Meerken 1668 yıllarında, bir insanın kafatasında bir dokunun yerine köpektan aldığı dokuyu transplante ettiğini ifade etmiştir (Kruger 1984).
- Başarılı olarak bilinen ilk uygulama, Merrem tarafında 1809 yılında gerçekleştirilmiştir (Kruger 1984).

- Ollier ise 1867 yılında, periost içeren canlı kemiğin greft uygulamasının gerçekleştirilmesi için kullanılması gereken en uygun kemik olduğunu ifade etmiştir (Archer 1975).
- Macewen ise 1878 yılında, klinik hastalarında başarılı allojenik kemik transplantasyonunu gerçekleştirmiştir (Kruger 1984).
- Dressman 1892 tarihinde, alçının greft olarak kullanımından söz etmiştir (Kruger 1984).
- Zoltan Hegedüs ise 1923 yılında, otojen ve allojen greftlerini kemik kayıplarını tedavi etmek için kullanmıştır (Polater 1994).
- Orell 1938 yılında, greft materyalini, araştırması için kullandığı bir sığır kemiğinden ortaya çıkarmıştır (Kruger 1984).
- Bu tarihi takip eden 1942 yılında Inçlan adında bir araştırmacı, modern kemik bankasını geliştirmiş, ilk defa kryobiyolojik yöntemleri kullanmıştır (Kruger 1984).
- Bir diğer araştırmacı olan Wilkstrom ise 1950 yılında, mandibulada yer alan büyük bir radiküler kisti çıkarmak için bir operasyon yapmıştır. Kisti çıkardıktan sonra yerine otojen kemik grefti yerleştirmiş ve 5 aylık süre zarfında tam iyileşme gözlemlemiştir (Weiland 1984).
- Martin, Lindsay ve Gren ise 1966 yılında, travmatik bir kist tedavi ettikleri esnada “firedried kemik grefti” kullanmışlardır. Operasyon sonucu 6 aylık gözlem sürecinde iyileşmenin tam olduğunu ifade etmişlerdir (Lindsay ve ark. 1966).
- 1972 yılında ise bilim dünyası için bir ilki White adında bir araştırmacı gerçekleştirmiştir. White denizde yaşayan omurgasız canlıların iskelet yapılarının, metakrilat, kalay, titanyum oksit, krom kobalt, molibden ve alüminyum oksit ile replike edilmesi sonucu, yapay poröz bir protetik materyalin elde edilebileceği öne sürmüştür. (Polater 1994).
- Kruger ise 1974 yılında, kemik greftlerinin homojen olarak hazırlanabilmesi için en uygun yöntemin kryobiyolojik yöntem olduğunu ifade etmiştir (Kruger 1984).

- Carraro ve ark., 1976 yılında, iki duvarlı defeklerde, tek duvarlılara oranla daha fazla yeni kemik oluşumu olduğunu tespit etmişlerdir (Polater 1994).
- Tadjoedin ve ark., 2002 yılında yaptıkları araştırmada bioaktif cam parçacıklarının otojen kemik ile kombine edilebileceğini, bu parçaların otojen kemik için kabul edilmesi muhtemel bir alternatif oluşturduğunu ifade etmişlerdir (Tadjoedin ve ark. 2002).
- Serino ve ark., ise 2003 yılında yaptıkları araştırmada, diş çekimi sonrası oluşan alveoler kemik rezorbsiyonunun, poliaktid-poliglikolikasit içeren sentetik süngerin dış yüzeyine monte edilmesi ile engellenebileceğini ya da asgari miktara indigenebileceğini ifade etmişlerdir (Serino ve ark. 2003).
- Guarrieri ve ark., 2004 yılında, kalsiyum sülfat hemihidrat maddesinin, çekim soketindeki kemiğin rejenerasyonu için ideal bir greft materyali olduğunu öne sürmüşlerdir (Guarrieri ve ark. 2004).

2.6.2. Greftlerin İşlev Mekanizmaları

Kemik greftlerinin işlev mekanizmaları 3 yolla gerçekleşir. Bunlar osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyondur.

2.6.2.1. Osteogenezis

Osteogenezis, bir greft materyalinin doğrudan osteoblastlar ile yeni kemik oluşturabilmesi durumudur. Osteogenezisde greft materyalinin içinde yeni kemik oluşturma yeteneğine sahip olan öncül hücreler (osteoprogenitör hücreleri) mevcuttur. Canlı kansellöz kemik, kemik iliği ve otojen greftler içerdikleri hücreler ile nakledildikleri yerde doğrudan yeni kemik oluşumunu başlatırlar. Osteojenik etki gösterebilen tek greft materyali otojen kemiktir ve bu otojen kemiğin greft materyalleri içerisinde “altın standart” olarak kabul edilmesini sağlar. (Bowers ve ark. 1989, Efeoglu 2002, Glowacki ve ark. 1981, Junquera ve ark. 1998). Greft, yeni kemik kaynağı gibi kendi başına osteoblastların canlılığını sağlayabildiği zaman osteogenezis meydana gelir. Kemik greftlerinin osteogenezisi artırması iki yolla gerçekleşebilir (Alfaro 2006, Ezirganlı ve ark. 2013, Kökden 1999).

- Osteoblastlara dönüşmesi mümkün olan canlı hücreleri koruması yoluyla,
- Alıcı dokuda osteoblastların sayısının artmasını sağlaması yoluyla.

2.6.2.2. Osteoindüksiyon

Osteogenezis mekanizmasını uyarma işlemidir. Bazı greft maddelerinin içindeki büyüme faktörlerinin ve diğer sinyal proteinlerinin, alıcı dokudaki mezenkimal kök hücrelerinin osteogenez yönünde farklılaşmalarına neden olmasıdır. Örneğin, demineralize kemik ve demineralize dentin greftlerinin osteoindüktif özellikleri gösterilmiştir. Osteoindüktif greftler yeni kemik oluşumunu hızlandırmak için kullanılabilirler ve kemiğin normalde bulunmadığı alanlara doğru büyümesini sağlayabilirler (Efeoğlu 2002, Ezirganlı ve ark. 2013, Finkemeier 2012, Glowacki ve ark. 1981).

2.6.2.3. Osteokondüksiyon

Osteokondüksiyon ise, yeni kemiğin oluşabilmesi için fiziksel bir matriks veya iskeletsel bir çatı oluşturulmasıdır. Greft materyalleri, defektin kenarlarından oluşacak yeni kemik dokusu için bir yapı iskeleti görevi görürler. Bu tür greft maddelerinin bazıları yeni kemik oluşumuyla rezorbe olarak tümüyle ortamdaki uzaklaşırken, bazıları ise rezorbe olmazlar ve yeni oluşan kemik greft parçacıkları arasındaki boşlukları doldurarak defektin iyileşmesini sağlarlar. Osteokondüksiyon sürecinde, greft maddesi kemik oluşumunu aktive etmez (Bowers ve ark. 1989, Efeoglu 2002, Ezirganlı ve ark. 2013, Glowacki ve ark. 1981, Güven 1996).

Osteokondüktif greftler yumuşak dokuların içerisine yerleştirildiklerinde kemik oluşturamazlar. Osteokondüktif greft yüzeyinde kemik oluşmasını sağlamak için var olan kemik dokusuna veya farklılaşmamış mezenkimal hücrelere ihtiyaç duymaktadır. Kadavralardan elde edilen, kortikal veya trabeküler olabilen allogreftler, osteokondüktif ve büyük olasılıkla osteoindüktif özelliklere sahiptir fakat kemik oluşturucu özelliğe sahip değildirler. Alloplastlar ise sentetik materyallerden oluştuğu için sadece osteokondüktif özellik gösterirler (Ezirganlı ve ark. 2013, Garg 2004).

Bir greft maddesinin hangi tür bir etkiyle iyileşmeye katkıda bulunduğu, kemik dışı bir doku içine yerleştirilerek anlaşılabilir. Eğer deri altına yerleştirilen bir greft maddesi osteoindüktif karakterde ise, bulunduğu bölgede ektopik kemik dokusu oluşumunu başlatır. Eğer osteokondüktif karakterde ise, bölgede değişime uğramadan kalabilir ve hafif düzeyde bir enflamasyona neden olabilir ya da rezorbe olarak ortamdaki uzaklaşır (Efeoglu 2002, Glowacki ve ark. 1981).

Greftin başarısı bir çok faktöre bağlıdır. Bunlardan ilki, greftin mevcut olan biyolojik aktivitesidir. Canlı hücrelerin sayısı ve onların hücresel ürünleri, protein içerikleri matris içinde saklanmıştır. İkinci faktör, alıcı alandaki dokuda greftin kemik oluşturma kapasitesidir. Üçüncü faktör ise, greftin uygulanan bölgede, dokuların çevresinden yeni kemik oluşumunu desteklemedeki kapasitesidir. Vaskülarize olmayan bir greftin revaskülarizasyonu tamamen alıcı alanı çevreleyen dokuya bağlıdır. Greftin başarısındaki diğer önemli bir faktör ise, alıcı alandaki mekanik özelliklerdir. Alıcı alan ile greft arasındaki reaksiyon sonradan greftin revaskülarizasyonunu tehlikeye atabilir. Greftlemenin başarısı, hücresel ve biyomekanik olayların hepsine birden bağlıdır. Bu olayların herhangi birinde bir problem varsa veya meydana gelirse, greftleme başarılı olmaz (Ezirganlı ve ark. 2013, Kahnberg 2005).

2.6.3. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması

Kemik greftleri, “İnsan Kaynaklı Kemik Greftleri” ve “İnsan Kaynaklı Olmayan Kemik Greftleri” şeklinde iki ana başlık altında aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir. (Nasr ve ark., 1999)

1- İnsan kaynaklı kemik greftleri

a) Otojen greftler (Otogreftler)

b) Allojenik greftler (Allogreftler)

i. Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (DKKA)

ii. Demineralize edilmiş dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (DDKKA)

iii. Demineralize kemik matrisi (DKM)

2- İnsan kaynaklı olmayan kemik greftleri

a) Ksenojenik greftler (Ksenogreftler)

i. Sığır kaynaklı hidroksiapatit

ii. Mercan kalsiyum karbonat

b) Alloplastik greftler (Alloplastlar)

i. Polimerler

ii. Bioseramikler

[1] Trikalsiyum fosfat (TCP)

[2] Hidroksiapatit (HA)

iii. Bioaktif camlar

2.6.3.1. Otojen Greftler

Otojen greft, greftin aynı bireyden alınıp yine aynı bireyde kullanılması durumudur. Diğer bir deyişle hem alıcının hem de donörün aynı kişi olmasıdır (Bloomquist 1992). Osteojenik etkili tek greft materyalidir. Otojen kemik greftleri uzun zamandır greft materyallerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir ve günümüzde klinik pratikte kullanılmaya uygun tek osteojenik greft materyalidir. Greft materyali olarak otojen kemik kullanıldığında kemik iyileşmesi osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon yoluyla olur.

Diğer yandan bazı önemli dezavantajları vardır: (Kneser ve ark., 2006; Lynch ve ark, 1999; Yoshikawa ve ark., 1998; Oshikawa ve ark., 1996).

- Greftin elde edilmesi hastanın postoperatif dönemdeki rahatsızlığını arttıran ikinci bir cerrahi işlem gerektirir.
- Donör alanda, enfeksiyon veya morbidite riskini arttıran başka bir osseöz defekt oluşur.
- Özellikle iliak greftler ağız içi sahaya taşındığında, aşırı greft rezorbsiyonu gözlenebilir. Mandibular greftlerde, alıcı yatak ile aynı embriyonik orjinden olduğundan daha az rezorbsiyon gözlenir.
- İntraoral donör alanlardan sadece kısıtlı miktarda greft materyali elde edilebilir.
- Çene ucu greftlerinde, apikal kök yaralanması ve duyusal sinir yaralanması riski vardır.

Otojen kemik greftleri yapısal olarak 3 şekilde olabilir:

Kansellöz Greftler:

İçerisinde medullar kemik ve kemik iliği ihtiva eden greftlerdir. Kansellöz kemik greftlerinin en önemli avantajı; osteojeniteyi indüklenme kapasiteleri kadar içerisinde bulunan kemik iliğinde osteoblastlara differansiye olabilecek canlı hücrelere sahip olmalarıdır. Bu yüzden, osteojeniteyi belirgin olarak artırma kapasiteleri vardır.

Bu greftlerin bir tek dezavantajı vardır. Bu dezavantaj; mekanik sağlamlığının yetersiz olmasıdır.(Laurencin, 2004).

Kortikal Greftler:

Kortikal greftler lameller kemiklerin parçalarıdır. Kortikal greftlerin transfer edildiği temel hücre tipleri osteositlerdir. Kranium, kaburga, iliak kemiğin anterior bölgesinden elde edilirler. Bu greftler, sert ve dayanıklı yapı oluşturur. Form sağlar. Ancak osteogenezi artırma yeteneği çok kısıtlıdır. Kemiğin tamamen tamir edilmesini sağlayamazlar, canlı ve nekroze kemiğin bir karışımı olarak kalırlar (Laurencin,2004).

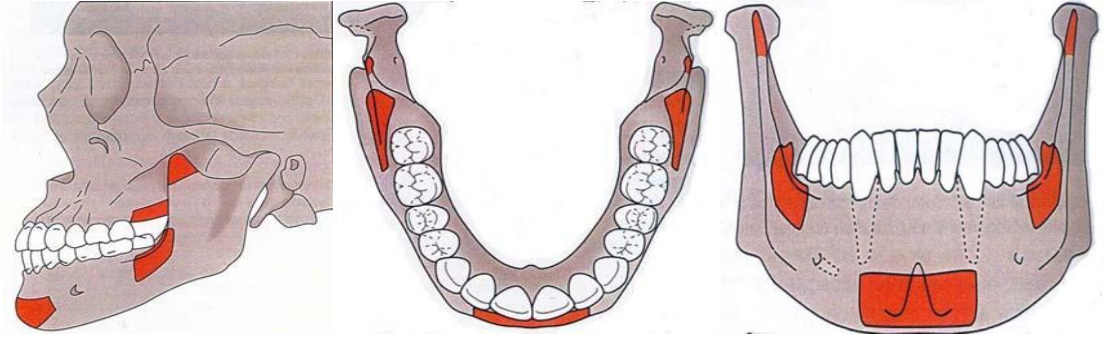
Kortiko-Kansellöz Greftler:

Bu tür greftler kortikal kemik ile altında bulunan kansellöz kısmı içerir. Son zamanlarda bu tip greftler sıkça kullanılmaktadır. Fakat bu tip greftler hem kansellöz kemiklerin hem de kortikal greftlerin önemli özelliklerini aynı seviyede kombine edemezler.

Bu greftlerin avantajları, kortikal greftlerde olduğu gibi form ve mekanik sağlamlık kazandırılır. Bunun yanından kortikal greftlerden ayrılmasının en önemli özelliği ise, bir miktar da osteogeneziste artış elde edilebilmesidir (Kruger, 1974).

Otojen kemik grefti uygulamalarında farklı ekstraoral ve intraoral otojen greft sahaları mevcuttur. Kemik greftinin alınacağı yerin (bölgenin) seçiminde; alıcı bölgenin lokalizasyonu, ihtiyaç olunan kemiğin kalite-kantititesi ve oluşabilecek cerrahi komplikasyonlar değerlendirilmesi gereken faktörlerdir (Bernstein ve ark., 2006).

Ağız içi verici bölgeler: Alt çene ucu bölgesi, alt çene ramus bölgesi, üst çene tüber bölgesidir. Bunun yanında kemik çıkıntılar ve egzostoslar da greft için kemik kaynağıdır (Şekil 15). Yoğun olan bu kemik kaynakları ufalanarak ve parçalanarak partikül grefte dönüştürülmektedir. Toplama cihazlarından elde edilen kemiklerde otojen kemik olarak kullanılabilir (Ersu, 2007). Ağız içi bölgelerden alınan greftler hacimsel olarak yetersiz kalabilmektedir.



Şekil 15: Ağız içi verici bölgeler

Ağız dışı verici bölgeler arasında ise iliak kret, tibia, kaburga sayılabilir. Otojen greftlerin ekstraoral bölgelerden alınması ise genel anestezi ihtiyacı, ikinci bir cerrahi girişim gerektirmesi, donör alan morbiditesi, fonksiyon kaybı, iyileşme periodunun uzaması ve tedavi maliyetinin artması gibi bir çok dezavantaja sahiptir (Younger ve Chapman, 1989).

Otojen greft çoğunlukla tercih edilen grefttir. Fakat, rezorbsiyon süresinin kontrol edilememesi, uygun bölgenin her zaman bulunamaması bu greftleri tek başına kullanma konusunda sınırlayıcı yapmaktadır (Aaboe ve ark., 1995; Haas ve ark.,1998).

2.6.3.2. Allogreftler (Homojen Kemik Greftleri)

Genetik açıdan alıcıya benzemeyen ancak aynı türden olan canlılardan alınan dokulara allogreft denilmektedir. Kemik allogreftleri, farklı kadavralardan çıkarılan, genotipleri değişik kemiklerden elde edilir. Bir takım işlemler yapıldıktan sonra kemik bankalarında muhafaza edilir (Grageda 2004).

Bu greftler immünolojik potansiyele sahip oldukları için ikinci dünya savaşına kadar çok kullanılmamıştır. Ancak savaş sırasında ihtiyacın artması nedeniyle kemik bankalarında muhafaza edilebilmesi için yeni teknikler geliştirmek için çalışmalar yapılmıştır (Tuskan 2002). Bu greftlerin hastalık potansiyellerini ve immünolojik komplikasyonlarını yok etmek amacıyla oluşturulan son teknikler dondurma, dondurup kurutma gibi metodlar ya da radyasyondur. Kemik kaynaklı biyomateryallerin vericiden alıcıya geçebilecek HIV (Human Immunodeficiency Virus), Jakob-Creutzfeldt hastalığı (CJD) ve hepatit gibi önemli virütik hastalıklar vardır (Kübler ve ark. 1993, Tuskan 2002).

Taze Dondurulmuş Kemik Allogreftleri

Taze dondurulmuş kemiğin çene yüz bölgesindeki faydaları sınırlıdır. Bu greftler genellikle ortopedik onarım için kullanılan osteokondral allogreftler için kullanılır. Verici öldükten 12 saat içerisinde steril ortamda allogreftler alınır. Alınan allogreft bir takım bakteriyolojik çalışmalar yapılarak kemik iliği kültürüne tabi tutulur ve genellikle onarıma katılmaktadır. Preparasyon işlemi, yumuşak dokunun kaldırılıp yapışık dokunun ayrılması işlemlerini kapsar. Yapışık olan kapsüller kesilerek ayrılır. Bu işlem intrakapsüler yolun donmasını sağlar. Biyolojik olarak gerçekleşen kanamalar donma esnasında dokuların hasar görmesine ve hücrelerin ölmesine neden olur. Dokunun donma oranının kontrolü ve soğutma ajanlarına maruz bırakılması kontrollü gerçekleştirilir (Tuskan 2002).

Donmuş-Kurutulmuş Kemik Allogreftleri

Maksillofasiyal iskeletin onarımı için 1950'lerden beri kullanılan allogreftlerdir. Bu greftlerin antijenitesi ayarlanabilmektedir. -76°C 'de kemik dondurulur. Donma işleminden sonra kurutma işlemleri yapılarak ısının artması sağlanır. Bu işlemin amacı yakalanan su moleküllerini ortamdan uzaklaştırmaktır. Ortamdaki su uzaklaştırıldıktan sonra iki hafta dehidrasyon işlemi için beklenir. Alınan mikrobiyolojik örnekler, iki aşamada toplanır. Dondurma işleminden önce ve dondurma işleminden sonra alınan örnekler, steril ortamda depolanarak saklanır. Uygulanacak olan kemik revaskülarizasyon açısından yavaştır ve otojen greftlere göre rezorbe olma ihtimali daha yüksektir. Revaskülarizasyon mekanizması akut inflamasyon yanıtı ile başlar ve uzun sürer, sonra kronik inflamasyon gözlenir. Bu inflamasyon predominant durumda birkaç ay kalır. Bu sırada fibröz doku besiyeri gelişim gösterebilir ve grefti kapsül ile çevreleyebilir. Çok değişken yapıya sahiptir. Aylarca devam edebildiği gibi erkenden de engellenebilir. Revaskülarizasyonun 8 ayda tamamlanmadığı ve revaskülarize olmayan kemik cepleriyle karşılaştığı gözlenir. Osteodepozisyon tarafından periferde meydana gelen mineralizasyon, kortikal kemik otojen greftlerindeki gibidir, fakat daha yavaş ve daha az olarak görülür. Dondurulmuş kemik uygulamalarında hücrel immunolojik yanıtla karşılaşır (Kübler ve ark. 1993, Tuskan 2002). Donmuş durumda homojen kuru kemik osteokondüktif materyaller olarak ifade edilebilir (Caranza 2002). Yalnızca oluşan alveol defektleri ve kronik fistüllerin tedavisinde başarılı olarak kullanılır ve hastalık nakil riski enderdir (Tuskan 2002, Caranza 2002).

Demineralize Dondurulmuş-Kurutulmuş Kemik Allogreftleri (DDKKA)

Hidroklorik asit ile demineralizasyon işlemi inorganik kemik matriksi içindeki kemik oluşumunu uyarıcı proteinlerin açığa çıkmasını sağlar. Kemik oluşumunu uyarıcı bu proteinlerin tümü birden “kemik morfogenetik protein” (KMP) olarak adlandırılabilir (Caranza 2002, Fonseca 2000). DDKKA’ ların iyileşmesi konusunda tartışmalar vardır. Bazı yazarlar bu tür greftlerin osteoindüksiyon ile iyileştiklerini ileri sürerler. Bu süreç greftin yerleştirildiği alıcı doğal kemikten kaynaklanan çok potansiyelli hücreleri kapsar. Bölgeyi dolduran bu hücreler farklılaşarak osteoblastlara dönüşürler. Zamanla allogreft alıcı kemik tarafından rezorbe edilir, ve bu rejeneratif sürecin KMP ve muhtemelen allogreft içindeki diğer büyüme faktörleri tarafından indüklendiği düşünülmektedir. Greft materyalinin dondurulması veya dondurularak kurutulmuş olmasının greftin hücrel aktivitesini bozmadığı gösterilmiş olmasına rağmen, bazı yazarlar osteoindüksiyonun gerçekten meydana geldiğine inanmamaktadırlar. DDKKA elde edilme kolaylığı, güvenilirliği ve ileri sürülen osteoindüktif özellikleri nedeniyle en çok kullanılan allogreftlerdir. Kortikal kemik allogreftlerinin antijenik özellikleri kansellöz kemik allogreftlerine oranla çok daha azdır. Aynı zamanda kansellöz kemikten daha yüksek konsantrasyonda KMP içerir. Bu nedenle DDKKA’lerinden kortikal kemikten elde edilenleri tercih edilmelidir. Allogreft uygulamalarında hastalık transferi riski önemli bir konudur. Doku bankaları kullanacakları kadavralarda HIV antikor ve antijeni aramakta ve lenf bezi biyopsileri yapmaktadırlar. Ayrıca, yalnızca dondurma işlemi uygulanmış olan allogreftlerde HIV bulunma olasılığı 8 milyonda 1 dir. HCl ile demineralizasyon HIV’i inaktive etmektedir.

Allogreft hazırlanmasındaki standart işlemler kabaca şöyle sıralanabilir:

- Kemik doku, ölümün ardından 12 saat içerisinde alınır.
- Önce kemik 0,5 ile 5 mm aralığında parçalanır ve saf etanolde bir saat bekletilir. Kortikal kemiğe etanol tamamen penetre olduktan sonra saf etanol içerisinde 1 dakika bekletilerek viral enfeksiyon önlenir.
- Hastalık transferi riskini azaltmak için kemik doldurulur.
- Periodontal defektler için kortikal kemil uygun büyüklükte partiküllere ayrılır.
- Yeniden saf etanole bırakılır.

- Son olarak dondurularak kurutma işlemi yapılır.

Bu işlemin yapılması greftin uzun süre saklanabilmesini sağlar. Bunun yanında antijenik özelliğini minimize eder.

DDKKA' lar ile elde edilen sonuçlar farklılıklar göstermektedir. Bunun en önemli nedenlerinden biri üretilen DDKKA' ların birbirlerinden farklı özelliklerde olmasındandır.

Ticari kemik bankaları ürettikleri her bir greftteki KMP miktarını veya greftin osteoindüktif kapasite düzeyini belirlememektedir. Greftin elde edildiği kadavranın yaşı, cinsiyeti, geçirmiş olduğu hastalıklar, kullanmış olduğu ilaçlar, genetik özellikleri, ölümünden sonra geçen süre ve saklanma koşulları ve doku bankasının greft üretim protokolü gibi bir çok faktör greftin kalitesini etkilemektedir. Greftlerdeki KMP miktarı da önemlidir. Vericideki KMP miktarı minimal 2µg/40mg yaş ağırlık, optimal 10µ olmalıdır (Efeoğlu 2002, Kübler ve ark. 1993).

Farklı oral cerrahi uygulamaları için hazırlanmış allojenik kemikler değişik anatomik şekillerde kullanıma sunulur. Kansellöz iliak kemik, kemik içi defektlerde kullanılmak üzere yaklaşık 2–10 mm çapta parçacıklara ayrılır. Küçük kansellöz parçacıklar periapikal alanlarda küretaj sonrasında, sınırlı alveoler kenar düzeltmelerinde kullanılır (Grageda 2004).

2.6.3.3. Ksenogreftler

Ksenogreftler farklı tür canlılardan alınan greftlerdir. Memeli hayvanların kemiklerinden veya mercan kabuklarından elde edilirler. At, domuz ve sığaçığillere ait kemiklerin de uygun olmasına karşın, sığır kemikleri daha çok tercih edilmektedir (Revell 1986).

Ksenogreftler genelde sığır kemiklerinin tam olarak deproteinize edilmesi ile elde edilirler. Doğal sığır kemiğinin organik bileşenleri tümüyle elimine edilir. Geri kalan inorganik bölüm, poröz hidroksiapatit partikülleridir ve yapısal olarak insan kansellöz kemiğine benzer. Alıcı doku tarafından iyi tolere edilirler. İyileşmeye osteokondüktif katkı gösterirler (Adem 2007).

Sığır kaynaklı kemik grefti uygulamaları, son yıllarda sağlık konusunda önemli bir yer tutan, prionlarla bulaşan Deli Dana Hastalığını (DDH) (bovine spongiform encephalopathy) ve bunun insanlardaki varyasyonu olan Creutzfeldt-Jakop hastalığını

gündeme getirmektedir. Bazı yazarlar, heterogreft uygulamalarında bu riski sıfıra indirmek veya mümkün olan en azda tutmak için DDH' nin bulunmadığı ülkelerdeki (örn: ABD) firmalar tarafından üretilen heterogreftlerin kullanılmasını önerirler. Ancak prionların kemik dokusunun tümüyle deproteinize ediliyor olması nedeniyle böyle bir risk söz konusu değildir. Aynı zamanda, Dünya Sağlık Örgütü de kemik dokusunu prion hastalıkları için güvenilir ilan etmiştir (Develioğlu 2003, Mutaz ve ark. 2003, Rekow 2003).

Ksenogreftlerin ve allogreftlerin önemli avantajlarından biri, otojen kemik ile birlikte kemik greft genişleticileri olarak kullanılabilirler, böylece otojen kemik greftine olan ihtiyacı azaltmış olurlar (Revell 1986).

Yapılan araştırmalar, ksenogreftlerin sentetik hidroksiapatitlerden daha kompleks bir yapıya sahip olmalarına rağmen, alloplastlara göre daha biyouyumlu bir materyal olduklarını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda porozite ve yüzey özellikleri alloplastlardan daha iyi olduğundan osteointegrasyon başarısı alloplastlara oranla daha yüksektir. Kortikal ve kansellöz kemiğe benzer mekanik özellikler gösterirler ve sentetik hidroksiapatitlere göre daha iyi rezorbe olma özelliğine sahiptirler (Baver ve ark. 2000, Nasr ve ark. 1999, Okumuş ve ark. 2005, Schidmaier ve ark. 2009).

2.6.3.4. Alloplastlar

Alloplastik kemik greftleri, tamamıyla sentetik olarak üretilen kemik rejenerasyon materyalleri olarak tanımlanmaktadır (Kökden 1999). Belli oranda osteokondüktif özelliğe sahip olan bu materyaller aynı zamanda biyouyumludur. Defekti tamamıyla dolduracak biçimde yönlendirilirler. Aynı zamanda yeni oluşan kemik için iskelet görevi de görmektedirler (Garg 2004).

Allogreftlerin oluşturacağı yan etkileri azaltmak amacıyla geçtiğimiz 20 yıl içerisinde alloplastlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Rezorbe olan ya da olmayan, mikropöröz (350 µm'den küçük), makropöröz (350 µm'den büyük) veya pöröz olmayan yapıda olabilirler. Alloplastların avantajları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır:

- Elde edilmesinin kolay olması,
- Saklanabilmesi ve steril edilebilmesi,
- Biyolojik açıdan uyumlu olması,

- Enfeksiyon riski taşımamasıdır.

Dört çeşit alloplast mevcuttur. Bunlar (Garg 2004):

- Kompozit polimerler (rezorbe olan ve olmayan),
- Biyoseramikler (sentetik HA, trikalsiyum fosfat (TCP), biyoaktif cam),
- Kalsiyum sülfat
- Kalsiyum karbonat.

Kompozit Polimerler

Rezorbe Olanlar: Polilaktik veya poliglikolik asitten oluşan ürünler sütür materyali, fiksasyon vidaları, kemik vidaları olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu materyaller yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve 3 yıla varan yıkılma süreleri vardır. Polimerlerin biyolojik degradasyonunda hastanın yaşı, immün sistemin durumu, dokunun toleransı, defektin lokalizasyonu ve ekspoz olan yüzeyin konfigürasyonu gibi bir çok faktör rol oynar (Kökden 1999).

Son yıllarda polilaktik asit ve poliglikolik asitin düşük dansiteli kopolimerleri üretilmiştir. Bu kopolimerler minimum 3-4 ay, maksimum 6-8 aylık degradasyon zamanına sahiptir. Toz formu üç duvarlı osseöz defektler için endikedir, sünger formu iki veya üç duvarlı defektler için endikedir. Jel formu, şırınga ile enjekte edilerek derin defektler için kullanılır (Garg 2004, Kökden 1999).

Rezorbe Olmayanlar: Polihidroksietil metakrilat ile polimetil metakrilat moleküllerinin karıştırılması sonucu oluşan polimerlerdir. Yapısına baryum sülfat eklenerek radyoopasite sağlanır. Uygulandıktan sonra sonuçların pozitif olması için YKR (yönlendirilmiş kemik rejenrasyonu) membranları kullanılır. Bu materyal membran görevi gördüğü için, membran kullanımı elimine edilebilir (Kökden 1999).

Biyoseramikler

Sentetik Hidroksiapatit: Hidroksiapatit (HA) $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, kemiklerin inorganik doğal komponentleri olarak ifade edilir. Mine'nin %98' ini, kalsifiye iskeletin ise % 70' e yakını hidroksiapatitten oluşur. Biyolojik olarak uyumlu bir maddedir. Yumuşak ve sert dokulara kolaylıkla yapışabilir. Greftin kimyasal ve fiziksel özellikleri bu materyalin klinik kullanımını belirler. Partiküllerinden geniş olanlarının rezorbe süresi uzun olduğu için rezorbe olmayanlar arasında sınıflandırılır. Amorf HA

ve kristal HA'ların küçük boyutluların yıkımı çok hızlı olur. Bu yüzden materyalin kristalizasyonu, rezorbe olma derecesini ortaya koyar.

Öte yandan pörözite, grefte olan kan geçişini ve vasküler infiltrasyonu belirler. 250-350 μm 'lik delikler (pore) kemik büyümesi için ideal olarak kabul edilir. Ancak pörözite artışı ile dayanıklılık azalır ve bu durum önemli bir dezavantajdır. Solid, dens, blok greftler yüksek sıkışma dayanıklılığına sahiptirler; öte yandan kırılma yapıya sahiptirler ve iyileşme esnasında stres altında yer değiştirirler (Tofe 1991).

Trikalsiyum Fosfat (TCP): Trikalsiyum fosfat, kimyasal olarak HA'e benzer, fakat doğal kemiğe benzer kimyasal kompozisyona sahip değildir. Ca/P oranı 3:2'dir. Rezorbsiyon hızı materyalin kimyasal yapısına bağlıdır (Horch 2006). TCP' nin α ve β fazları mevcuttur. Sinterizasyon sıcaklığındaki varyasyonlar, farklı kristal fazların oluşmasına neden olur. 900°C' lik sıcaklıkta β -TCP oluşur. Sıcaklıktaki artış (1180°C'den fazla) α -TCP'nin oluşmasına neden olur. α veya β terimleri, TCP kristallerinin partikül oryantasyonunu ifade eder. α -TCP çok yavaş rezorbe olur ve yıllar sonra dahi kemikte saptanabilir. Diğer yandan β -TCP tamamen rezorbe olur ve 8-12 ay sonra tamamen doğal kemikle yer değiştirir. Bu sebeple α -TCP'nin klinik kullanımı önerilmemektedir.

TCP, yeni kemik oluşumu için fiziksel bir matriks oluşturur ve β -TCP'nin rezorbsiyon hızı kemik remodelasyon hızıyla eş zamanlı olduğu için defekt alanında tam kemik rejenerasyonu oluşması beklenebilir. Manipülasyon kolaylığı sağlaması ve osteoindüktif özellik sağlaması için TCP'nin tercihen otojen kemik greftleri veya allogreftler ile kombine kullanılması önerilmektedir (Horch 2006, Swart 1979).

Bioaktif Cam: Bioaktif cam greftler; Ca tuzu, Na tuzu ve silikon karışımıdır. Granüllerin ortalama boyutu 300-355 μm 'dir. Cam yüzeyinde hidroksikarbonat apatit tabakası oluşur ve materyal kemiğe bağlanır. Yapılan bir çalışmada Schepers ve ark., bioaktif camların manipülasyonunun HA granüllerinden daha kolay olduğunu ve cam granüllerinin komşu dokulara yayılma eğiliminde olmadığını rapor etmiştir. Cam granülleri birbirine bağlı bir kitle oluşturur ve kan ile temas ettiğinde dağılmaz. (Schepers ve ark. 1993, Tadjoedin 2002)

Kalsiyum Sülfat

Greft materyali olarak kullanılabilen bir diğer alloplast türü olan kalsiyum sülfat “*paris alçısı*” olarak da bilinmektedir. Sıvı ile karıştırılan kalsiyum sülfat tuzu, alçı formuna ulaşarak uygulanması kolaylaşmaktadır. 30 gün içerisinde rezorbe olmaktadır. Defekt bölgede matriks görevini üstlenir ve osteokondüktif etkiye sahiptir (Garg 2004, Şimşek 2004.)

Kalsiyum Karbonat

Yavaş rezorbe olan alloplastik greft materyalidir. Kemik formasyonunun hızlı olmasını sağlar. Yüksek hemostatik özellik gösterirler. Ancak uygulandığı alandan uzaklaştırılması kolay değildir. Hassas bir yapıya sahip olan bu materyal, iyileşme sürecinde stres altında migrasyon gerçekleştirebilmektedir (Şimşek 2004).

2.7. D Vitamini (1, 25 dihidroksivitamin- D3)

Vitaminler, besinler ile veya ek olarak dışardan alınması zorunlu olan besin öğeleri olarak tanımlanmasına rağmen; D vitamini dokuda üretilerek kan dolaşımına verilmesi, diğer dokular üzerinde etki göstermesi ve bu etkisinin “feedback” mekanizmalarla düzenlenmesi nedeniyle vitaminden çok steroid yapılı bir hormon olarak değerlendirilir. (Holick 1994)

D vitaminin (1,25 dihidroksivitamin-D3, Vitamin D3, kalsitriol, 1- 25 dihidroksi D3) fotosentezinin dünya üzerinde 750 milyon yıldan fazla süredir meydana geldiği kanıtlanmıştır. D vitamininin biyolojik fonksiyonu ilkel canlılarda iyi bilinmemekle birlikte omurgalılarda D vitamininin Ca metabolizmasının düzenlenmesi ve kalsifiye olmuş bir iskelet oluşturmak üzere geliştiği tahmin edilmektedir (Holick 1995).

D vitamininin en önemli fonksiyonu Ca ve P’ nin plazmadaki normal düzeylerini sürdürmektir. Bu nedenle, epifizleri henüz kapanmamış çocuklardaki raşitizm ile yetişkinlerdeki osteomalazi gibi kemik hastalıklarının ve hipokalsemik tetaninin önlenmesi için gereklidir. D vitamini, nöron uyarılması ve kas gevşemesi için gerekli olan Ca iyonlarının hücre dışı sıvılardaki konsantrasyonunu ayarlar. Hücre dışı sahalarda Ca’ nın yetersiz olması sürekli kas uyarılmasına neden olur. Ayrıca lenfosit ve makrofaj gibi hücrelerde bulunarak bağışıklığı düzenleyici bir faktör olarak da iş görür (Holick 1995, Kumar ve ark 2000, Kato ve ark. 1998).

2.7.1. D Vitamini Kaynakları

Güneş ışınları: Güneş ışınları insan metabolizması için en önemli D vitamin kaynağıdır. Ultraviöle ışınlarına maruz kalan yüz ve kol bölgesine ait deride 20 dakikada günlük 200 IU D vitamini sentezlenebilmektedir.

Normal koşullar altında insan vücudundaki D vitamininin %90-95'i güneş ışınlarının etkisiyle sentezlenir. Özellikle besinlere katılmadıkça diyetle alınan D vitamininin büyük bir önemi yoktur. Bu sebeple güneş ışığı temel kaynaktır ve güneş ışığından yeterince faydalanılırsa ilave D vitamini almaya gerek yoktur (Atas A., 2008; Özkan B., 2007)

Besinsel kaynaklar: Hayvansal kaynaklı besinlerden; balık yağı, tereyağı, yumurta sarısı, süt, sebzelerden; koyu yapraklı yeşil sebzeler ve mantar D vitamini yönünden zengindir. İnsan sütü de 25 hidroksikolekalsiferol içermektedir. Bu durum yeni doğanlarda karaciğerin kolekalsiferolün ilk hidroksilasyonunu yapabilecek kadar gelişmemiş olmasından ileri gelir. (Rucker 2001)

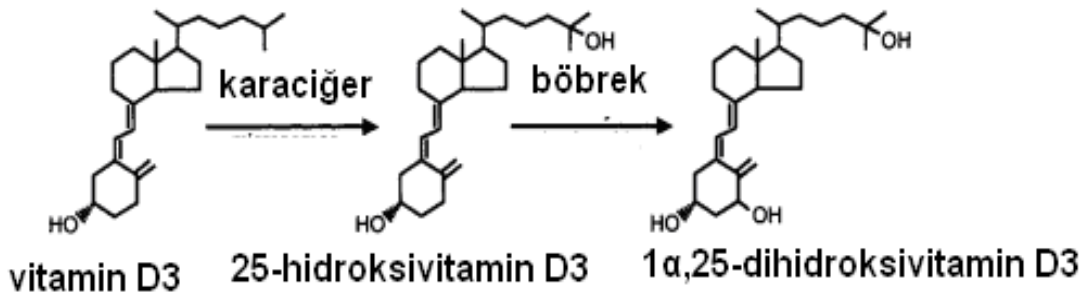
2.7.2. D Vitamini Metabolizması

Bir ön hormon olan D vitamininin kolekalsiferol (D3 vitamini) ve ergokalsiferol (D2 vitamini) olmak üzere iki kaynağı vardır. Kolekalsiferol 290-310 nm dalga boyundaki ultraviöle ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7-dehidrokolesterolden yapılır. Bu endojen üretim D vitamininin temel kaynağıdır (Koo ve ark. 2005). Bu dönüşüm deri pigmentasyonu arttıkça azalırken, ultraviöle ışınına maruz kalma miktarı ile doğru orantılı olarak artar (Koo ve ark. 2005). Ergokalsiferol ise bitkisel sterol olan ergosterolün irradiasyonu ile oluşur ve daha çok süt ürünlerinin güçlendirilmesi amacıyla kullanılır. D3 ve D2 vitamini benzer yolla metabolize olduklarından ortak bir isimle, D vitamini olarak isimlendirilebilir (Koo ve ark. 2005). Deride 7-dehidrokolesterolün ışınlanmasından oluşan kolekalsiferol deride depolanabilir. Ancak büyük kısmı D vitamini bağlayan protein (DBP) yardımı ile karaciğere gider (Granner 1996). DBP bütün D vitamini şekillerini bağlar, serbest D vitamini konsantrasyonu DBP'ye bağlı vitamin konsantrasyonundan daha düşüktür. D3 vitamini esas olarak yağ dokusu, kas dokusu ve karaciğerde depolanırken bağırsaklarda, kemiklerde ve böbreklerde de depolanabilir (Koo ve ark. 2005).

Diyetle bitkisel besinlerden alınan D2 vitamini ve hayvansal besinlerden alınan (karaciğer, yağ ve etlerle) D3 vitamini safra tuzlarının etkisiyle diğer yağda eriyen vitaminlerle birlikte duodenum ve jejunumdan emilir. Emildikten sonra, şilomikronlarla duktus torasikustan genel kan dolaşımına katılarak karaciğere gelir. Orada deriden gelen kolekalsiferol ile birlikte 25-hidroksilaz enzimi tarafından hidroksilasyona uğrayarak 25(OH)D3' e dönüşür (Koo ve ark. 2005).

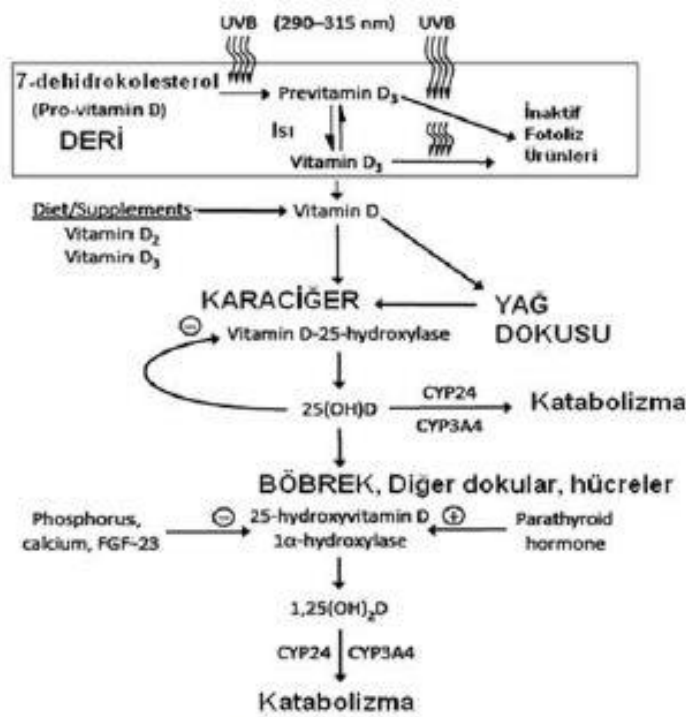
25(OH)D3 kalsidiol olarak da bilinir. D vitamininin 25. karbon atomunu hidroksilleyen 25-Hidroksilaz enzimi; oksijen, NADPH ve Mg gerektiren hepatik mikrozomal bir enzimdir. 25(OH)D3 insanda dolaşımda bulunan başlıca D vitamini metabolitidir ve yarı ömrü yaklaşık 20 gündür (Rucker ve ark. 2005). Bu yüzden 25(OH)D3 organizmadaki D vitamini durumunu yani sentez, alım, harcama gibi durumları en iyi yansıtan parametre olarak kabul edilmektedir (Vieth 1999). Sentezi feedback mekanizmasıyla zayıfça regüle edildiğinden plazma seviyesi yazın artar, kışın azalır (Granner 1996, 173). Farklı laboratuvarlarda 25(OH)D3 normal düzeyleri 20-200 nmol/L (8-80 ng/mL) arasında değişmektedir (Rucker ve ark. 2005).

Yüksek dozda D vitamini alımı, 25(OH)D3' nin plazma düzeyini yükselterek normalin çok üzerine çıkarır ancak alınan D vitaminin hepsi 25(OH)D3' e çevrilmez, adipoz doku tarafından absorbe edilir. Yine 25(OH)D3 DBP' ye bağlanarak böbreğe gider. Böbrek kortikal hücrelerinde 25(OH)D3 serum Ca, P ve parathormon (PTH) konsantrasyonlarına bağımlı olarak daha ileri hidroksilasyona uğrar. Ca gerektiren bir reaksiyon sonucu moleküler oksijen ve redükte primidin nükleotidlerinin yardımıyla 1-hidroksilaz enzimi 1, 25(OH)2D3' yi sentezler (Şekil 16, Şekil 17) (Zitterman 2009).



Şekil 16: D vitamininin metabolik aktivasyonu

D vitamininin en aktif şekli olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, sirkülasyonda $25(\text{OH})\text{D}_3$ ' ün %0.1' inden yüksek değildir. Bu hormon hücre büyümesi ve farklı hücre tiplerinin differansiyasyonunu sağlar. İnce bağırsaktan Ca aktif transportunu (muhtemelen Ca transport eden proteinin aktivasyonunu indükleyerek) artırır. İnce bağırsak ve böbrekten fosfat reabsorbsiyonunu da stimüle eder (Popovtzer 2005). Bu hormon kemikteki mineral metabolizmasını (depolanma, rezorbsiyon) direkt olarak etkiler (osteoblast ve osteoklast prekürsör gen ekspresyonunu stümüle eder). Parathormon ve kalsitoninle birlikte vücut sıvı ve dokularında Ca ve P homeostazında major rol oynar. Bu hormonun reseptörleri, 30'dan fazla hedef dokuda transkripsiyon ve nongenomik yolların regülasyonunu sağlar (Nemere ve ark. 1998).

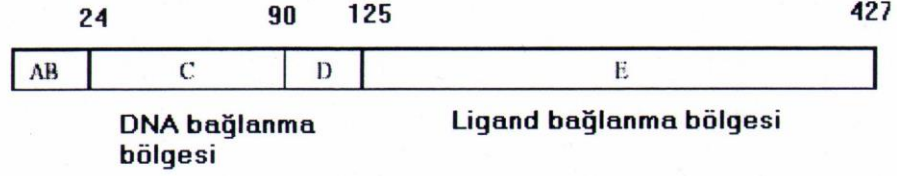


Şekil 17: D vitamini metabolizması

2.7.3. D Vitamini Reseptörü

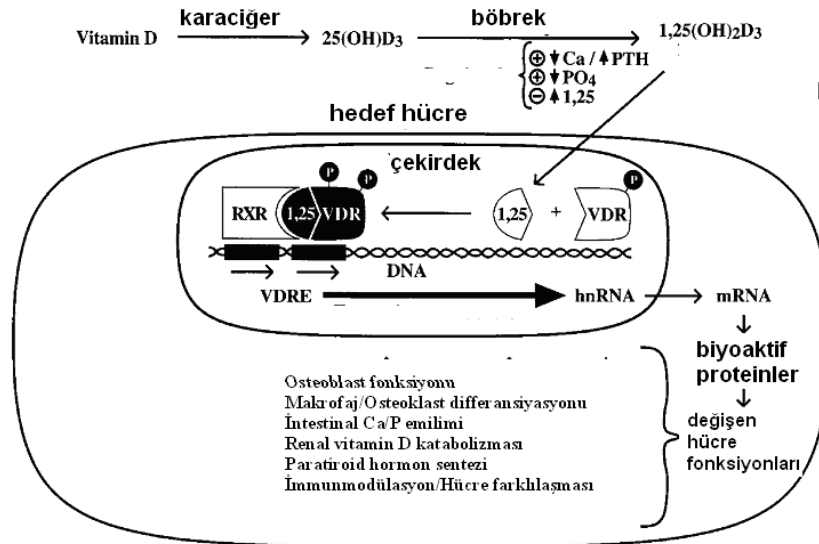
D vitamininin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, fonksiyonunu D vitamin reseptörü (VDR) aracılığıyla yapar. VDR, tiroid hormon reseptörü, retinoik asit reseptörü ve peroksizom proliferatör aktivatör reseptörünü de içeren nükleer reseptör süper ailesine mensuptur. İnsanlarda VDR' yi kodlayan gen 12cen-q12 üzerindedir ve çeşitli polimorfizmler içerir.

1,25(OH)₂D₃' ün VDR' ye bağlanması D vitamini tarafından regüle edilen genlerin transkripsiyonunu sağlar (Mathieu ve ark. 2005).



Şekil 18: D vitamini reseptörünün yapısı

Aktif D vitamini VDR' nin ligand bağlayıcı bölgesine (Şekil 18) bağlanır, bunun sonucunda VDR hiperfosforile olur. Daha sonra, VDR DNA bağlayıcı bölgesi (Şekil 18) ile hedef gende bulunan D vitamin response elementlerine (VDREs) bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Bu bağlanmanın gerçekleşebilmesi için, VDR proteininin öncelikle transkripsiyon başlangıç faktörlerinin bir araya toplanmasını sağlayan retinoik asit X reseptörü (RXR) ile kompleks oluşturması gereklidir. VDR proteininin paratiroid hücrelerde, pankreas adacık hücrelerinde, hemopoetik hücrelerde, keratonositlerde, üreme organları ve immun sistem dâhil vücutta bir çok dokuda etkileri olduğu bilinmektedir (Şekil 19) (Hausler ve ark. 1997).



Şekil 19: D vitamininin hedef hücrede VDR aracılığıyla etkileri

2.7.4. D Vitamininin Etki Mekanizması ve Fonksiyonları

D vitamininin aktif Ca transportu üzerindeki klasik etkisi bağırsak hücrelerinde gerçekleşir. Membran proteinleri yardımıyla hücreye Ca girer. Bağırsak hücresinde D vitamini, VDR' ye bağlanmakta ve Ca bağlayıcı protein sentezlenmektedir. Bu durum hücrede aktif transportu düzenler. Ca, ATP-bağımlı bir mekanizma ile ekstraselüler sıvıya geçer. D vitamini kemik, bağırsak, böbrek gibi hedef organlar üzerindeki etkisini göstermekte ve bu organlardan kana Ca geçmesine yardımcı olmaktadır.

D vitamininin üretimi paratiroid hormonu (PTH) tarafından uyarılmaktadır. PTH seviyesinin düşmesine neden olan negatif geri bildirim mekanizması Ca, 25 Hidroksilaz (Mitokondrial CYP27A1)(Mikrozomal CYP2R1) sayesinde olmaktadır. Diğer bir deyişle D vitamini, plazma membran reseptörleri ve MAP kinaz ya da siklik AMP gibi ikincil mesajcılar aracılığı ile de işlevini yerine getirmektedir (Armas ve ark. 2004).

D vitamini kanda insülin seviyesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar, şeker metabolizmasını destekler. Güçlü antiproliferatif, prodiferansiyatif, ve immunomodülatör etki göstermektedir (van Etten ve ark. 2005).

1,25(OH)₂ dihidroksikolekalsiferol Ca bağlayıcı proteinin sentezini uyararak Ca bağırsak hücrelerince emilimini artırır. Serum Ca seviyesini artırır, böylece Ca kemiklerde depo edilir. Kemik rezorbsiyonuna neden oluyormuş gibi görünse de sonuçta kemiklerde Ca depolanmasını arttırmaktadır.

Östrojen hormonu D vitamini üzerinde etkilidir. 1 α , 25(OH)₂ östrojen salınımı ile artar, buna bağlı olarak Ca absorpsiyonu da indirekt olarak artar. Dolayısıyla östrojen hormonu D vitamini reseptör fonksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır denilebilir (Karadavut ve ark. 2002).

Yapılan çeşitli araştırmalar, D vitamini metabolitlerinin makrofaj hücrelerinin antijen sunma kapasitelerini arttırdığını göstermektedir. Dolayısıyla, diabetes mellitus(DM) Tip 1'e karşı koruyucu özellik göstermektedir. Literatürde yapılan araştırmaların sonuçlarına göre DM tip 1 ve 2'ye yakalanma riski D vitamini seviyesinin yüksek olmasıyla azalmaktadır (Mathieu ve ark. 2005). Ayrıca obez olmayan diyabetik farelerde D vitamini ve analoglarının kullanımı başlangıç fazında görülen insülitis (pankreas beta hücrelerinde çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan

otoimmün ve inflamatuvar hasar) tablosunun klinik diyabete ilerlemesini engellediğini belirten çalışmalar vardır. (van Etten ve ark. 2005).

Yaşamın erken dönemlerinde D vitamini eksikliği ve raşitizm gelişen çocuklarda, daha ileri dönemde DM gelişme riski 3 kat artmıştır (Hypponen ve ark. 2001). Buna karşılık yaşamın erken döneminde D vitamini alımı ile Tip 1 diyabet gelişme riski arasında da ters ilişki gösterilmiştir (Harris 2002).

D vitamini non-genomik etkisini osteoblast ve osteoklast hücrelerinde Ca^{2+} kanallarının açılmasını sağlayarak, karaciğerde lipid metabolizmasına etki ederek, kaslarda ise pek çok yoldan göstermektedir. D vitamini eksikliğinde kaslarda zayıflık veya miyopati gözlenmektedir. Myoblast ve iskelet kası hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar D3 formunun Ca taşınmasına direkt olarak etkili olduğunu göstermiştir. D3 formunun kalp kası fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için önem taşıdığı bilinmektedir (Rucker 2001).

Bir çok gen fonksiyonu D vitamini tarafından düzenlenmektedir. Bu genlere örnek olarak osteokalsin, osteopontin, kalbindin, 24-hidroksilaz, karbonik anhidraz verilebilir (Rucker 2001, Nagpal ve ark. 2005). Öteki taraftan, D vitamini IL-2 ve IL-12 gibi inflamatuvar markerları azaltmakta ve antiproliferatif etki göstermektedir. Sitokinlerin etkisi ile ekstrarenal hücreler ve dokularda 25(OH)D formu hidroksillenerek 1, 25(OH)2D formuna dönüşmektedir. Bu ekstrarenal D vitamini formu hücrelerel farklılaşma sırasında parakrin regülasyon için önemlidir. D vitamini etkisi ile gen ürünlerinin azalmasına örnek olarak T lenfositlerdeki γ -interferon ile böbrek ve bağırsak hücrelerindeki sitokrom B verilebilir (Rucker 2001).

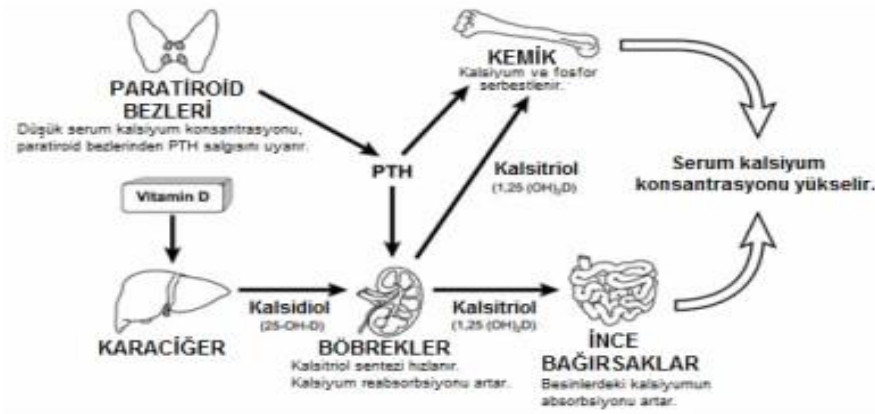
Pankreasta insülin sekresyonunun normal bir şekilde yapılabilmesi için D3 formunun gerekli olduğu ratlarda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Vitamin D3 formu pankreas β hücreleri fonksiyonunu direkt olarak etkilemektedir (Rucker 2001).

Bir çok onkogen ürününü içeren elliden fazla proteinin vitamin D3 tarafından düzenlendiği bilinmektedir (Rucker 2001).

2.7.4.1. D Vitamininin Kemik Metabolizması Üzerine Etkisi

1,25(OH)2D3, kemik ve Ca metabolizması üzerine en etkili olan hormonlardan biridir. Bu hormon, ince bağırsakta bulunan bir Ca bağlayıcı protein olan ve Ca'nın enterositlerden aktif transportunda önemli bir rol oynadığına inanılan calbindin 9K'nin

majör indükleyicisidir. Bağırsak epitelinde bulunan iki major Ca taşıyıcısı, TRPV5 ve TRPV6 (transient receptor potential vanilloid), de D vitaminine duyarlıdır. Aktif D vitamini, ince bağırsaktaki bu ve diğer genlerin ekspresyonunu arttırarak intestinal Ca emiliminin etkinliğini arttırır (Şekil 20) (Fauci 2008).



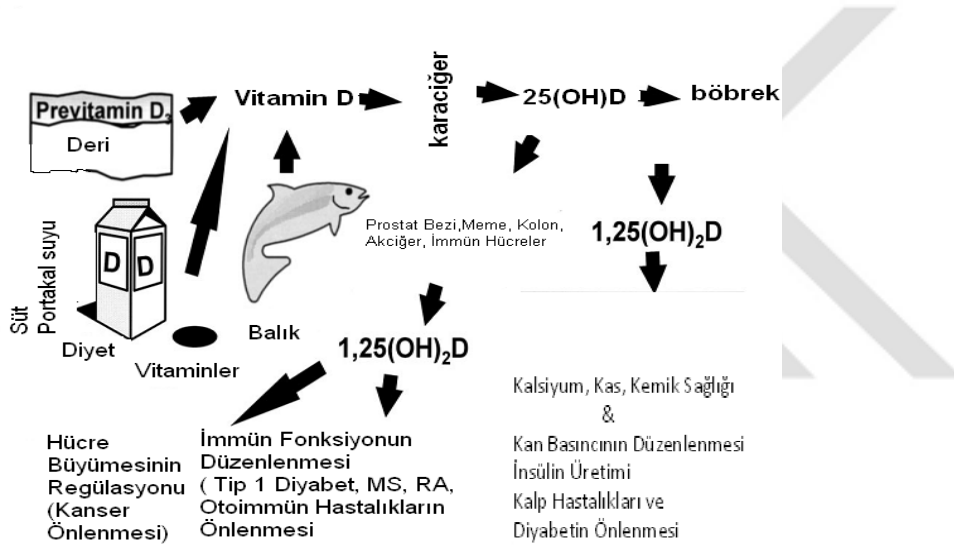
Şekil 20: D vitamininin Ca metabolizmasına olan etkisi

VDR, osteoblastlardaki bazı genlerin ekspresyonunu düzenler. Bu sayede aktif D vitamininin Tip I Kollajen sentezinin baskılanması ve osteokalsin, osteopontin ve kemik matriks proteinleri sentezinin arttırılması gibi etkileri ortaya çıkar (Fauci 2008, Harrison 1989). VDR, sadece osteoblastlar üzerinde bulunur. PTH ile birlikte 1,25(OH)2D3, osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini arttıran RANK Ligandının ekspresyonunu arttırır. Bu mekanizma ile aktif D vitamini kemik rezorpsiyonunu düzenler (Fauci 2008). Yapılan çalışmalar D vitamininin esas etkisinin Ca ve P emilimini uyararak kemik mineralizasyonunun uygun koşullarda devam etmesini sağlamak olduğunu göstermiştir.

VDR ayrıca paratiroid bezi üzerinde de bulunur. Paratiroid bezinden salgılanan hormon olan parathormon, böbrek ve kemik hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak kan Ca arttırır, böbrekte 1,25(OH)2D3 sentezini arttırarak Ca' nın bağırsaktan emilimini arttırır, kemik rezorpsiyonu ve döngüsünü arttırır (Fauci 2008). Aktif D vitamininin ise paratiroid hücreler üzerinde anti-proliferatif etkilerinin bulunduğu ve iyonize Ca' nın kan ve hücre dışı sıvılardaki düzeyini hassas şekilde kontrol eden PTH' nın gen transkripsiyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Fauci 2008, Li ve ark. 1998)

2.7.4.2. D Vitamininin Kemik Harici Etkileri

VDR' nin ilk saptandığı dönemlerde D vitamininin sadece Ca ve kemik metabolizması üzerine etkili olduğu düşünülmekteydi. Bu sebeple, D vitamini yetmezliği olan fareler üzerinde yapılan bir çalışmada işaretlenmiş 1,25 (OH)₂D₃ hayvanlara verilmiş ve işaretli D vitamininin hemen tüm çekirdekli hücrelerde biriktiği saptanmış (Stumpf ve ark. 1979). Bunu takiben yapılan çalışmalarda VDR' nin cilt, kolon, beyin, pankreas, meme, aktive olmuş T ve B lenfositler, monositler ve makrofajların da içinde olduğu bir çok doku ve organda bulunduğu tespit edilmiş (Holick 2010).



Şekil 21: D vitaminin etkileri

D Vitamini ve Kanser İlişkisi

Yapılan çalışmalarda yüksek enlemlerli coğrafik bölgelerde yaşayan insanlarda kolorektal, prostat, over, meme, akciğer ve özofagus kanserlerinin daha sık görüldüğü ve ölüme sebep olduğu saptanmıştır (Garland ve ark. 2001, Grant 2006). D vitamini düzeyi ve kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi daha net olarak belirlemek için bazı çalışmalarda kanserli olmayan kişilere D vitamini ve Ca takviyesi verilmiş ve takip eden dönemlerde takviye alanlarda plasebo grubuna göre kanser gelişiminde belirgin düşme saptanmıştır (Holick 2010, Lappe ve ark. 2007).

Aktif D vitamininin transkripsiyonel aktivitesi sayesinde direk veya indirek yolla yaklaşık 200 geni düzenlemekte olduğu görülmüştür. Bu genler arasında çoğalmayı, differansiyasyonu, apoptosisi ve anjiyogenezi düzenleyen genler de bulunmaktadır. 1,25(OH)2D3, hücre döngüsü inhibitörlerini uyarır (Şekil 21) ve siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksleri aktivatörlerini baskılar. Bununla birlikte, hücreyi G1/S fazında tutup DNA sentezini ve hücre büyümesini engelleyen siklin-bağımlı kinaz inhibitörlerinin düzeyini de artırır (Holick 2010).

Bir çok kanser hücresinde VDR bulunduğu saptandığında araştırmacılar, aktif D vitamininin kanser tedavisinde yer alıp alamayacağını anlamak için çalışmalara başlamışlardır. Ancak yapılan çalışmalarda genellikle aktif D vitamini tedavisinin yan etkileri, özellikle hiperkalsemi yapıcı etkisi, ortaya çıkmış ve çalışmaları kısıtlamıştır. Bu sebeple en az hiperkalsemik etki yaratacak D vitamini analoglarına yönelinmiştir.

Yapılan çalışmalarda umut verici bazı sonuçlar elde edilse de kanser hücrelerinin 1,25(OH)2D3' ün etkilerine karşı stratejiler geliştirdiği gözlenmiştir. Bunlar arasında kanser hücresi 24-hidroksilaz aktivitesinin artırılması veya bir VDR inhibitörü olan Snail faktörünün ekspresyonunun artırılması sayılabilir (Holick 2010).

Sonuç olarak, D vitamini ve kanser ilişkisini araştıran bir çok çalışma mevcut olmakla birlikte D vitamini ile kanser önlenmesi veya tedavisi açısından kesin bir ilişkiyi göstermek henüz mümkün olmamıştır.

D Vitamininin Pankreas Üzerindeki Etkisi

Pankreas β hücreleri VDR içerir ve 1,25(OH)2D3' ün insülin yapımını uyardığı bilinmektedir (Şekil 21). Etki mekanizması olarak aktif D vitamininin pankreas adacık hücrelerinde sitozolik Ca düzeyini belirgin şekilde artırarak insülin salınımını uyardığı ve D vitamini bağımlı Ca bağlayıcı protein olan "Calbindin" sentezi artışı sonucu sitokinlerle uyarılan β hücre hasarını önlediği düşünülmektedir (Tanaka ve ark. 1986, Hahn ve ark. 1997).

Bununla beraber yapılan çalışmalarda Tip II diyabetik hastalarda D vitamini seviyesinin düzelmesi ile insülin rezistansında iyileşme görülmüştür (Mohr ve ark. 2008, Chiu ve ark. 2004).

D Vitamini ve İmmunite İlişkisi

Aktif T ve B lenfositleri üzerinde VDR bulunur ve 1,25(OH)2D3 hem T hem de B lenfositleri için güçlü bir düzenleyicidir. T ve B lenfositleri uyarılınca ilk aktive olan genlerden biri VDR genidir. Aktif D vitamini;

- İmmunglobulin sentezini baskılar (Bikle 2009, Cantorna ve ark. 2004),
- T hücre proliferasyonunu, özellikle interferon-gamma ve interlökin-2 (IL-2) üretiminden sorumlu olan T helper1 (Th1) hücrelerini, inhibe eder.

Bu şekilde T hücrelerinin antijen sunumuna devam etmesini kısıtlar.

Ayrıca aktif D vitamini, IL-4, IL-5 ve IL-10'un yapımını arttırarak dengeyi T Helper (Th) 1' den Th 2 hücrelerine kaydırır (Bikle 2009, Adorini ve ark. 2004).

1,25(OH)2D3, sadece T hücreler üzerinde değil, ayrıca antijen sunumunda anahtar role sahip olan dendritik hücreler üzerinde de etkilidir. Dendritik hücreler üzerinde de VDR bulunur ve bu hücreler de aktif D vitamininin anti-proliferatif ve immunmodulatuvar etkilerine yanıt verirler (Holick 2010).

1,25(OH)2D3'ün immün sistemdeki diğer bir etkisi de otoimmün hastalıklarda önemli bir rolü olduğu düşünülen Th 17' yi baskılamaktır (Bikle 2009). Bu sayede D vitamininin romatoid artrit, Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozus, multipl sklerozis, Hashimoto tiroidi gibi bazı otoimmün hastalıklara karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir (Holick 2010).

Aktif D vitamininin kazanılmış immün sistem üzerinde tüm bu etkileri bulunmaktadır, ancak 1,25(OH)2D3, bir çok dokuda sentezlenebilmekteyken lenfositler 1 α -hidroksilaz enzimleri bulunmadığı için kendileri aktif D vitamini sentezleyemezler. Aktif D vitamini, aktif T ve B lenfositler üzerine etkisini, makrofajlarda sentezlenen 1,25(OH)2D3'in parakrin etki ile aktif lenfositler üzerindeki VDR' yi uyarmasıyla gösterirler (Holick 2007).

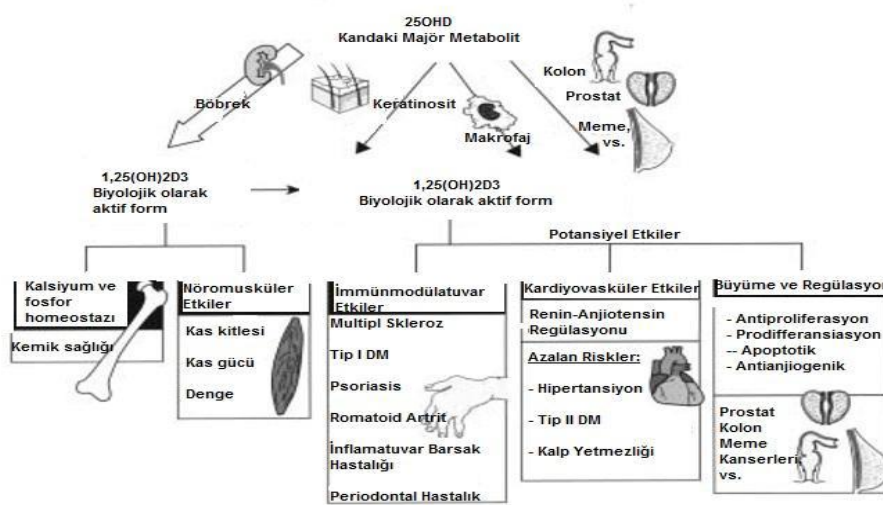
Aktif D vitamini kazanılmış immün sistem üzerine olduğu kadar doğal bağışıklık üzerine de etkilidir. Bu etkisi monosit ve makrofajlar yardımıyla oluşur. Bakteriyel ajanlarla monosit/makrofajların karşılaşması, VDR ve 1 α -hidroksilaz gen ekspresyonlarını arttırır. 48 saat içinde bazı doğal koruyucuların yapımı artar ve özellikle mikobakterilerin hücre içi yaşamı kısıtlanır (Liu ve ark. 2004).

D Vitamini ve Kronik Hastalıklar

D vitamininin bir çok kronik hastalıkta koruyucu etkisi bilinmektedir. 1,25(OH)2D3' ün eksikliğinin kemik mineral dansitesinde azalma ve bu nedenle kırık riskinde artmaya neden olduğu gösterilmiştir (Outila ve ark. 2001). Bununla birlikte D vitamini eksikliğinde kas hücrelerinde intrasellüler Ca metabolizmasının bozulduğu ve kas güçsüzlüğü olduğu belirtilerek konjestif kalp yetmezliği patogenezine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (Şekil 22) (Zittermann ve ark. 2003).

Konjestif kalp yetmezliğinin şiddetinde önemli bir indikatör olan atrial natriüretik peptidin dolaşımdaki seviyesi ile 25(OH)D3 seviyesi arasında ters korelasyon tespit edilmiştir (Zittermann ve ark. 2003).

Enfeksiyon hastalıkları ile D vitamini arasındaki ilişkiyi gösteren veriler yetersizdir (Muhe ve ark. 1997). Ancak D vitamini eksikliği ve artmış enfeksiyon riski birlikteliğini gösteren bir çok epidemiyolojik çalışma mevcuttur (Muhe ve ark. 1997, 186). Muhe ve ark. , Etiyopyalı 500 riketsli çocukta yaptıkları çalışmada pnömoni riskinin sağlıklı çocuklara göre 13 kez arttığını tespit etmişlerdir. Bundan başka Rehman ve ark. , sık solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuklarda haftalık 150 µg D vitamini ve günlük 650 mg Ca tedavisini 6 hafta uygulamışlardır. Bu çocukların sonraki 6 ay boyunca enfeksiyon geçirmediklerini bildirmişlerdir. Bu bulgulara dayanarak subklinik D vitamini eksikliğinin enfeksiyon riskini arttırdığını bildirmişlerdir.



Şekil 22: Aktif D vitamininin endokrin, otokrin ve parakrin fonksiyonları

2.7.5. D Vitamini Eksikliğinde Ortaya Çıkan Durumlar

D vitamini yeterliliği, Ca ve PTH arasındaki hassas denge nedeniyle PTH yükselmesine sebep olmayacak 25-OH D vitamin düzeyi saptanarak değerlendirilmektedir. Erişkinlerde yapılan çalışmalarda 25-OH D vitamin seviyesi 15 ng/ml dan az olduğunda PTH seviyesinin arttığı gözlenmiştir, bu nedenle 15 ng/ml değeri 'eşik değer' olarak kabul görmektedir. 25-OH D vitamini düzeyi 11 ng/dl'nin altına düştüğünde 1,25 (OH)₂ D vitamini düzeyi artmakta ve bu artışın etkisiyle kemiklerden Ca mobilizasyonu sağlanarak kompanzasyon sağlanmakta, ancak serum Ca düzeyi normale dönerken kemik mineralizasyonu bozulmaktadır (Hatun S. ve ark. 2003). 25-OH D vitamini eksikliği çocuklarda raşitizm, yetişkinde osteomalaziye yol açan kemik demineralizasyonuna sebep olur. Dünya da 1 milyar kişide D vitamini eksikliği ya da yetersizliği olduğu düşünülmektedir (Malabanan ve ark. 1998, McKenna 1992).

Organizmadaki D vitamininin büyük bir kısmı güneş ışığı tarafından fotolizle oluştuğundan kuzey bölgelerinde yaşayanlar, koyu tenli kişiler, geleneksel kapalı giyinen toplumlar, kapalı alanlarda bulunanlarda D vitamini eksikliği daha sık görülür. Ayrıca 70 yaş üstü erişkinler, D vitamini metabolizmasını etkileyen ilaç kullananlar ve obezlerde risk daha fazladır. Obezlerde D vitamini adipoz dokuda depolanmakta ve bu nedenle sistemik olarak kullanılmamaktadır (McKenna 1992).

2.7.6. D Vitamini Toksikasyonu

25-OH D vitamini düzeyi 150 ng/ml'nin üstünde olduğunda D vitamini intoksikasyonu görülmektedir. Fakat bu durum çok nadir olarak gözlenir. D vitamini infantlarda günde 40.000 IU 1-4 ay, erişkinlerde ise günde 100.000 IU birkaç ay kullanılırsa intoksikasyon görülebilmektedir (Burtis CA. ve ark. 2005). Bu hastalarda intoksikasyona bağlı olarak iştahsızlık, kusma, baş ağrısı, aritmi, hipertansiyon, poliüri, hiperkalsemi, hiperfosfatemi, hiperkalsiüri, damar kalsifikasyonu, nefrokalsinoz ve böbrek yetmezliği gelişebilmektedir (Burtis Ca. ve ark. 2005).

2.7.7. D Vitamini Katabolizması

24-hidroksilasyon yolu ile D vitamini böbrek ve karaciğerde katabolize olmaktadır. 24,25 – dihidroksivitamin D oldukça polar bir madde olduğundan böbrekten hızlı bir şekilde atılır. 1,25 – dihidroksivitamin D ise kalsitriol aside dönüştürülerek safra ile vücuttan dışarı atılmaktadır (Atas ve ark. 2008)

2.8. Hücre Kültürü

Hücre kültürleri, canlı dokuların vücut dışında yaşatılması, sürekli üretim ve gelişimini ifade etmektedir. Canlı yapılardan elde edilen dokular, vücut ısılarında kültüre edilmekte ve vücudun özgün fizyolojik durumunu taklit eden besleyici sıvılarda beslenerek çoğaltılmaktadır (Doyle ve ark. 1993, Helfrich ve ark. 2003)

Hücre kültürlerinin elde edilmesinde temel şart, steril ortamların korunmasıdır. Vücut dışında izole edilmiş hücre ya da organlar, enfeksiyonlara karşı koyabilecek kapasitede olmadıklarından, hücre kültürü çalışmalarında, özel ekipman ve malzemenin deneyimli personelce kullanımının yanı sıra kontaminasyondan kaçınmak için sterilizasyona azami dikkat gösterilmelidir. (Doyle ve ark. 1993, Helfrich ve ark. 2003)

Hücre ya da doku kültürü çalışmaları son yıllarda uygulamada büyük bir gelişim göstererek diş hekimliği de dahil olmak üzere modern bilimin bir çok dalında kendine yer bulmuş, hayvan ve insan haklarına gösterilen saygının artmasına paralel olarak önemi de o derece artmıştır. (Doyle ve ark. 1993, Helfrich ve ark. 2003)

2.8.1. Hücre Kültürünün Tarihçesi

Hücre kültürünün tarihi 1800'lü yıllarda başlar. İlk olarak 1866 yılında in vitro doku kültüründe kan hücrelerinin 35 gün canlılığı sağlanmıştır. İlk eksplantasyon uygulaması, Wilhelm Roux tarafından 1885 yılında ılık tuz içerisinde tavuk embriyosunun medüller tabakasını elde etmek için hazırlanan deney olarak kabul edilmektedir. Hemen hemen aynı yıllarda, kurbağalarda yapılan deneylerde kemik iliği fragmanlarının implantasyonu Arnold tarafından başarıyla tamamlanmıştır.(Freshney 1994, Mutlu 2003).

Bu iki deney kendi dönemlerine göre oldukça ileri iki çalışma olmasına rağmen, kesip çıkartılmış hayvan dokularının uygun koşullarda yaşatılabileceği gerçeği; 1898 yılında Ljungren' in in vitro şartlarda insan derisinin asidik sıvıda yaşayabileceğini ispatlamasına kadar geçerlilik kazanamamıştır (Freshney 1994, Mutlu 2003).

Jolly, 1903 yılında hücrelerin bölünmesi ve yaşamı ile alakalı ilk detaylı gözlemleri yapmıştır. Semenderden asılı damlalar şeklinde bir ay boyunca lökosit elde etmiştir. Bu çalışma 3 yıl sonra 1906' da Ewing ve Beebe tarafından takip edilmiş ve doku kültürü kavramına ilk gerçek teşebbüsü oluşturmuştur. Bu tür çalışmalar günümüzde halen kullanılmakta olan 30-40 yıllık tekniklerin temelini oluşturmaktadır (Davis 1994).

Doku, organ ve temel hücre kültürleriyle ilgili mühim gelişmeler 1910-1914 yılları arasında gerçekleşmiştir. 1914 yılına kadar aseptik çalışmalar devam ettirilmiş ve bu tarihte ilk yapay doku kültürü meydana getirilmiştir (Freshney 1994, Mutlu 2003).

1920' li yıllarda da hücre üretme vasatları üzerinde yoğunlaşmıştır. Fisher, analitik yöntemlerle hücre kültür vasatlarını hazırlamıştır (Freshney 1994, Mutlu 2003).

İlk sürekli hücre kültürü ise 1952 yılında insanın serviks karsinomasından elde edilmiştir (Freshney 1994, Mutlu 2003).

1955-1960 yılları arasında Eagle bugün kullandığımız anlamda temel hücre kültürü vasatlarını hazırlamıştır ki bu hücre kültürü çalışmalarında önemli adımlardan birisi daha olmuştur (Freshney 1994, Mutlu 2003).

1960 tarihinde monoklonal antikor üretimi hücre füzyonu yöntemi ile ve ilk defa 1961 yılında Barskib ve ark. in vitro şartlarda somatik hücre hibridleri elde etmişlerdir (Freshney 1994, Mutlu 2003).

1979 yılında Green ve ark. epidermal hücre kültürleri hazırlamışlardır, 1980' li yıllarda endotelial hücrelerden kapiller damarların oluşturulmasına ve 1989 yılında hücre kültürü teknolojisi, homograft yapımı ve rekonstrüktif cerrahide kullanılmaya başlanmıştır.. 1992' de Rosenfield ve Morgan ile ark. genetik olarak modifiye hücreleri hastalıkların tedavisinde kullanmaya başlamışlardır ki bu hücre kültürü teknolojisinin kullanıldığı en önemli uygulamalardan biri olmuştur (Freshney 1994, Mutlu 2003).

2.8.2. Hücre Kültür Tipleri

Farklı dokulardan üretimi sağlanan hücre kültürleri primer hücre kültürleri, devamlı hücre kültürleri ve diploid hücre kültürleri olmak üzere üç grupta toplanmaktadır.

2.8.2.1. Primer Hücre Kültürleri

Köken aldığı dokudan ilk defa ayrıştırılmış ve kültür şartlarına ilk defa konulmuş hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denilmektedir. Bu hücreler köken aldıkları dokudan yeni ayrıldıkları için dokunun fizyolojik durumunu tamamiyle yansıtır. Bu hücrelerin fenotipleri ve genotipleri köken alınan esas doku hücreleriyle bire bir aynıdır. Bu hücre kültür tipinde, hücreler pasajlandıktan sonra ikinci pasaj için başka bir kültür ortamına alınmaktadır. Bu aktarım sonucu oluşan kültüre subkültür denilmektedir. Her dokunun özelliklerine göre değişmekle birlikte sınırlı sayıda subkültür işlemi yapılabilir. Subkültür yapılan hücreler orijinal dokuyla aynı özelliklere sahip hücre hatları oluşturmaktadır. Ancak deneysel ortamda sınırlı sayıda üretilebilmesi bu hücre hatlarının dezavantajlarından biridir. (Hanks ve ark. 1996, Davis Jm. 1996, Spier ve ark. 1985)

Primer hücre kültürleri, üretim aşamalarının zor olmasına, hassas hücreler olmalarına, çalışma esnasında ortaya çıkabilecek sorunlara ve kontrollerinin son derece güç olmasına rağmen orijinal fizyolojik durumu ifade etmeleri nedeniyle değer kazanmışlardır. (Browne 1988, Mjör ve ark. 1983)

2.8.2.2. Devamlı Hücre Kültürleri

Subkültürleri sonsuz olarak yapılabilen ve karyotipleri alındıkları dokulardan farklı olarak geliştirilmiş kültürlerdir.

Hücre kültürlerinden herhangi birinin devamlı hücre kültürü olarak kabul edilebilmesi için minimum 70 defa subkültürünün gerçekleştirilmesi gerekir. Fazla sayıda subkültür gerçekleştirildiği için hücreler transformasyona uğramaktadırlar. Fizyolojik özellikler transformasyonlar sebebiyle korunamaz (Davis Jm. 1996).

Bu kültürler, standart kültürlere örnek teşkil eden embriyonik ya da kanserli dokulardan kodlanır ve kullanıma sunulur (Spier ve ark. 1985).

Primer hücre kültürleri, devamlı hücre kültürlerine göre sitotoksosite değerlendirmelerinde daha etkilidir ancak primer hücre kültürlerinin genetik ve metabolik stabilite problemlerinden dolayı test sonuçlarının standardizasyonunun daha iyi yapılabilmesi sebebiyle devamlı hücre kültürleri tercih edilmektedir (Schmalz 1994, Feigal ve ark. 1985).

2.8.2.3. Diploid Hücre Kültürleri

Sürekli olarak subkültüre edilmiş primer kültürlere diploid hücre kültürleri denilmektedir. Bu hücreler kaynak aldıkları dokunun özelliklerinin ancak % 85 kadarını koruyabilmektedir. Bunun sonucunda bu kültür tipinde bazı hücrelerde esas hücrelerdeki kromozom tiplerinin yokluğu saptanabilmektedir. (Spier ve ark. 1985)

2.8.3. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Hücre kültürleri günümüzde bir çok alanda kullanılmaktadır. En yaygın kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır;

- Enzim sentezi,
- İnsekt aşı sentezi,
- İnterferon sentezi,
- İnsülin üretimi,
- Büyüme hormonları üretimi,
- Viral aşı üretme ve teşhis amaçlı.

Hücre kültürleri bir çok yeni kullanım alanına da sahiptir. Bu alanlar aşağıda sıralanmıştır;

- Tümörlere engel teşkil eden aşı üretimi,
- Canlı olan hücrelerin greft amacıyla kullanımı,
- Kanser tedavisi için kemik iliklerinin kullanımı,
- Hücrelerin organizma dışında modifikasyonu için kullanımı,
- Kompleks yapıya sahip üç boyutlu dokularda kullanımı,
- Yapay deri üretimi,
- Yapay kıkırdak üretimi,
- Karaciğerin yapay olarak üretimi,
- Pankreasın yapay olarak üretimi,
- Parkinson hastalığını tedavi etmek amaçlı beyin hücrelerinin kullanımı,

- Eritrositlerin organizma dışında transfüzyon amacıyla kullanılması
- Parkinson hastalığının tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
- Somatik gen tedavisi (Poot ve ark. 1992, Mutlu 2003)

2.8.4. Hücre Kültürünün Avantaj ve Dezavantajları

Hücre kültürlerinin bir çok avantajı olduğu gibi bir takım dezavantajları da vardır. Aşağıda hücre kültürlerinin avantajları ve dezavantajları maddeler halinde sıralanmıştır.

Hücre kültür yönteminin avantajları;

- Hücre kültürü ortamında, fizikokimyasal çevre koşullarının kontrolü daha iyi yapılabilmektedir. Canlı ortamlarda çevre şartlarının standardizasyonunun sağlanması çok daha zordur.
- Kullanılan örneğin homojenlik durumu kontrol edilebilmektedir. Doku hücreleri yapıları itibarıyla genellikle heterojen yapıya sahiptir. Fakat birkaç pasaj sonrasında hücrelerin kültürlenmesi sonucunda homojen yapı gösterebilmektedirler. Homojen hücreler, elde edilen ürünün homojenlik durumu için önemli bir ölçüttür.
- Ekonomik açıdan hücre kültürleri avantajlıdır. Canlı hücrelerle yapılan çalışmalarda verilen maddenin %10'undan cevap alınırken, hücre kültürlerinde %90 oranında cevap alınmaktadır.
- Hücre kültürleri ile elde edilen ürünler endüstride kullanım alanı bulabilmektedir. Günümüzde teknolojik gelişmeler ile geliştirilen teknikler sayesinde bu durum oldukça kolay hale gelmiştir.

Hücre kültür yönteminin dezavantajları;

- Primer kültür ile çalışıldığında, takip eden pasajlar sonucunda hücreler farklılaşarak bir miktar hücre yok olmaktadır. Bu durum zamana bağlı kültürdeki kararsızlık olarak açıklanır.
- Hücre kültürleri oluşturulurken hijyenik koşullar oldukça önemli olduğundan, kültürlerin elde edildiği koşulların olumsuz olması tekrar hücre kayıplarına neden olabilmektedir.

- Hücre kültürü oluşturulurken tecrübe çok önemli bir konudur. İn vitro koşullarda çalışmak uzmanlık gerektiren bir durumdur.
- İn vitro koşullarda hücre kültürleri oluşturmak oldukça ekonomik olmasına rağmen, hücre üretmede kullanılan malzemeler oldukça pahalıdır. Bu duruma rağmen ürünün saf olarak elde edilmesi bir avantaj olarak gösterilebilir. Son zamanlarda teknolojik gelişmeler hücre kültürlerinin oluşumunda kullanılan malzemelerin ekonomik olarak uygun koşullara indirilmesini sağlamaktadır (Freshney 1994, Davis Jm. 1994).

2.8.5. Hücre Kültürü Aşamaları

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücreler kültür süresince hücre ekimi (inokülasyon), pasajlama ve kültür fazları gibi birtakım aşamalardan geçer.

2.8.5.1. Hücre Ekimi

Değişik kaynaklardan izole edilen örneğin diş pulpası için enfekte olmayan bir diştten alınan pulpa dokusu, periodontal ligament kültürü için aynı şekilde enfekte olmayan sağlıklı bir çekilmiş diştten (ortodontik ya da yirmi yaş dişi çekimi) alınan periodontal doku, ya da fare calvariasından alınan kemik parçalarından elde edilen ya da bir kültür bankasından alınan hücreler için kültür, hücrelerin steril bir besiyerinde ekim işlemi ile başlatılır. Optimum bir büyüme oranı elde etmek için hücre tipine bağlı olarak ortalama ml' de 10^4 - 10^5 hücre ekimi yapılmalıdır. Bu yoğunlukta hücre ekim işlemi, yaklaşık 3-4 gün içerisinde kültür kabında ml' de 10^6 hücre oluşmasını sağlamaktadır. Ankraj bağımlı hücreler (örn: osteoblast hücreleri) ekim işlemini takip eden 3- 4 saat içerisinde büyüme yüzeyine yapışmaktadır. Bu yapışma periyodu hücrelerin kendi karakteristik şekillerine göre yassılaştmasını, yayılmasını içermektedir. Ankraj bağımlı hücrelerde büyüme periyodu, beslenme yetersizliği, besiyerinde toksik metabolitlerin birikimi ve büyüme yüzeyinin yetersizliği gibi faktörlerle durmaktadır. Bu nedenle ekim işlemini takip eden 2-3 gün içerisinde besiyerinin kısmen ya da tamamen yenilenmesi gerekmektedir (Doyle 1998. Topal 2004).

2.8.5.2. Pasajlama

Hücreler buldukları kabı tamamen doldurduğunda ve büyüyüp çoğalması durduğunda, yapıştıkları yerden ayrılarak başka yerlere aktarılabilen ve böylelikle yeni kültürler oluşturulabilmektedir. Mevcut hücre sayısını arttırmak ve aynı tür

hücreleri karakterize etmek için yapılan bu işlem pasajlama olarak adlandırılır ve kültür devamlılığını sağlamak amacıyla yapılmaktadır. İlk pasajdan sonra devam eden kültürler cell line olarak tanımlanır. İki alt kültürden sonra sekonder kültürler, bundan sonra da tersiyer kültürler ve diğerleri elde edilir. Her alt kültür elde edilmesi sırasında da pasajlama yapılır. Meydana getirilen yeni kültürde hücrelerin yaşamasının sağlanabilmesi için maksimum yoğunlukta hücre ekimi yapılması gerekmektedir. Gingival fibroblast ve osteoblast hücreleri gibi ankraj bağımlı hücreler için en çok pasajlama sayısı 40 olarak bildirilmektedir. Pasajlama işlemi için ilk önce hücrelerin üzerindeki vasat dökülür ve serumun etkisini ortadan kaldırmak için hücreler az miktarda serumun yüzeye doldurulup boşaltılması suretiyle yıkanılır. Ardından hücrelerin üzerine çok az miktarda tripsin konularak yüzeyden kalkmaları için etüve kaldırılırlar. Tripsinin etkisi ile hücreler yüzeyden kalktıktan sonra, ortama bir miktar serum ya da serumlu vasat ilave edilerek tripsinin etkisi durdurulur, hücreler santrifüj ile yıkanarak tripsin uzaklaştırılır. Ardından hücreler, vasat ile süspanse edilip yeni bir kültür kabında inkübasyona kaldırılırlar (Öztürk SS, 2006).

2.8.5.3. Hücrelerin Yaşam Fazları

Pasajlanıp ekimi yapılan hücreler kültürde yaşamları boyunca bir kaç fazdan geçerler. Bunlardan ilki olan **başlangıç fazı (lag phase)**, hücre yoğunluğunda artış olmayan en erken safhadır. Bu faz hücre büyümesi meydana gelmeden önce kritik bir konsantrasyona ulaşması gereken büyüme faktörlerinin hücresel sentezi ile ilgilidir. Şayet ekimi yapılan hücrelerin canlılığı düşük düzeyde ise başlangıç fazının süresi uzamaktadır. Bu durum genellikle pasajlama işleminin geciktirilmesi nedeniyle olmaktadır. Hücre canlılığının yüksek seviyede olduğu durumlarda ise bu safha gözlenmeyebilir. Transformasyon geçirmiş hücreler, büyüme faktörü gereksiniminin düşük olması nedeniyle, çok düşük konsantrasyonlarda ekim yapılsa bile, sıklıkla başlangıç fazı göstermezler. Başlangıç fazını takip eden **büyüme fazında (growth phase)** hücreler hücre siklusuna girerler. Bu fazdan sonraki **istasyon fazında (stationary phase)** artık hücre konsantrasyonunda bir değişiklik olmamaktadır. İstasyon fazı genellikle besiyerindeki besinlerin azalmasını, metabolik artık ürünlerin besiyerinde birikerek büyümeyi inhibe etmesini ve hücrelerin büyüme yüzeyini tamamen kapladığını ifade etmektedir. Bu fazda hücre ölüm oranı, büyüme oranına eşittir. Bu fazda büyüme olmasa bile hücreler metabolik olarak aktif olabilirler. Son faz olan

azalma fazı (decline phase) ise hücre ölümünün bir sonucu olarak meydana gelmektedir. Bu faz hücre canlılığının en düşük düzeyde olduğu kültür fazıdır. Ölçülen canlı hücre konsantrasyonu, hücreler lizise uğradıkça ve hücre içi metabolitleri besiyeri solusyonuna salındıkça azalmaktadır. Kültürde hücre ölümünün apoptoz ve nekroz olmak üzere iki olası mekanizması vardır. Apoptoz, *invivo* ya da *invitro* olarak normal fizyolojik şartlar altında meydana gelen hücrenin bir kendini öldürme mekanizmasıdır. Bu süreçte görülen bir anormallik tümörögenез ile ilişkilendirilmektedir. Hücre ölümünün alternatif mekanizması olan nekroz ise, hücrelerin ani ve şiddetli bir stresle karşı karşıya kalması durumunda normal olarak meydana gelen pasif bir süreçtir. Bu süreç hücrelerin şişmesine ve sonuç olarak hücrelerin parçalanmasına neden olan plazma membran bütünlüğünün bozulması ile karakterizedir (Doyle 1998, Öztürk SS. 2006).

2.8.6. Hücre Kültürü Laboratuvarı

Hücre kültürü laboratuvarları, diğer araştırma laboratuvarlarına benzemelerinin yanında bu laboratuvarları diğerlerinden ayıran en önemli özellik, aseptik koşulların çok iyi sağlanması zorunluluğudur. Hücre kültürü işlemlerinde, hayvansal hücreler ile bakteri ve mantarların meydana getirdiği kontaminasyonlar risk oluşturmaktadır. Bu nedenle, kullanılan malzemelerden, çalışılan odaya kadar temizlik ve sterilizasyon çok önem taşımaktadır.

Hücre kültürü laboratuvarlarının en önemli elemanlarından olan “**Laminar Flow Kabinleri**” içindeki hava akımı ve taşıdıkları hepa filtreler sayesinde kabin içinde steril bir ortam sağlar.

Bir hücre kültürü laboratuvarında bulunması gereken cihazlar şunlardır(Harrison 1997 , Scott 1999):

- Laminar Flow Kabin,
- CO₂ İnkübatör,
- Sterilizatörler,
- Buzdolabı (+4°C),
- Derin Dondurucu (-20°C, -80° C),
- Mikroskoplar,

- Yıkama Düzeneği,
- Masa Santrifüjü,
- Sıvı Azot Tankı,
- pH Metre
- Hücre Sayaçları.

2.8.6.1. Hücre Üretme Yüzeyleri

Hayvan hücrelerinin üretilmesinde kullanılan yüzeyler genel olarak cam veya tek kullanımlık plastik malzemeden yapılmıştır. Cam, kolay temizlenebilir olması, maliyetinin ucuz olması, büyümeyi destekleyici, ekstra maddelere gerek duyulmaması ve sterilizasyonunun kolay olması nedeniyle tercih edilen bir malzemedir. Tek kullanımlık plastikler ise optik özellikleri ve düzgün yüzeylere sahip oluşları nedeniyle tercih edilebilirler. Bu malzemeler değişik şekillerde modifiye edilerek de kullanılabilirler. Pahalı olmalarına rağmen, günümüzde en çok bu materyaller kullanılmaktadır. Hücre üretme yüzeyleri, özellikle yüzeye bağımlı olarak üreyen hücreler için önemlidir. Çünkü, bu hücrelerin kültür ortamında canlılıklarını sürdürüp üreyebilmeleri, ancak bir yüzeye tutunmaları ile mümkün olmaktadır (Freshney 1994, Scott 1999).

Hücre üretme yüzeyleri için sıklıkla kullanılan malzemeler aşağıdaki gibidir (Freshney 1994, Scott 1999);

- Polistiren (PS),
- Polivinil Klorür (PVC),
- Polikarbonat (PC),
- Politetrafloroetilen (PTFE).

2.8.6.2. Hücre Kültürü Vasatları

Hücre üremesi için uygun ortamın oluşturulmasında hücre kültürü vasatlarından yararlanır. Toz halinde olup kullanıcı tarafından hazırlanabildiği gibi, sıvı olarak da satılırlar. Hazır sıvı olanlar daha güvenilir olması nedeniyle tercih edilirler. Toz

vasatlar, sterilizasyonları yapılmış ve içinde gerekli bütün bileşenleri içerecek şekilde satılır. Bunlar gerekli miktarlarda su ile çözülürler. Serum, antibiyotik ve sodyum bikarbonat ve gerekiyorsa glutamin ilavesi yapılır. Hazırlanan vasatların sterilizasyonu, otoklav veya filtrasyon ile yapılır. Otoklav her vasat için geçerli değildir. Filtrasyon, daha sıklıkla ve güvenle kullanılan bir yöntemdir.

Filtrasyonda iki tip filtre kullanılır:

- Asbest filtreler,
- Membran filtreler.

Hücre üretme vasatlarının fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir:

- pH ve ozmolarite gibi fizikokimyasal şartların devamlılığını sağlamak,
- Hücre ve hücre ürünlerinin sentezi için gerekli besinleri sağlamak,
- Hücrelerin yapısal ve metabolik aktivitelerini yerine getirmeleri için gerekli maddeleri oluşturmak (Harrison 1997).

Vasatların bileşiminde(Wise 2002):

- Dengelenmiş Tuz Çözeltileri,
- Enerji Kaynakları,
- Aminoasitler,
- Vitaminler
- Gazlar,
- Eser Elementler,
- Organik Tampon Çözeltileri,
- Antibiyotikler,
- Su,
- Serum,
- Nükleik Asit Sentezini Tesvik Edici Maddeler bulunmaktadır.

Vasatlarda, serumun total hacime oranı %10 olarak ayarlanır. Antibiyotikler bakteri üremesini önlemek için ortama ilave edilirler. Kültür yapılan hücreler, özel kaplarda 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 hava içeren ortamda inkübe edilirler. Vasatların içindeki maddelerin özelliklerinin iyi bilinmesi, toksik olmamaları, suda eriyebilmeleri ve stabil olmaları gerekmektedir (Freshney 1994, Wise 2002).

2.8.6.3. Kontaminasyon

Kontaminasyon, kültür vasatı, hava, cam malzeme ya da hücrenin kendisinden kaynaklanabilir. Bakteri, mantar, miyoplazma veya viral kaynaklı olabilir. Çalışan kişi önemli bir risk faktörüdür. Giyim şekli ve steril çalışma koşullarına uyulması gerekmektedir. Kontaminasyonun nedenleri arasında, çalışılan odanın işlem esnasında kapısının açılması, çalışan kişinin arkasından geçilmesi veya duvara monte edilmiş klimalardan kaynaklanan ani hava akımları sayılabilir. Bu nedenle, hücreler ile çalışılan ortamın, laboratuvar girişinden uzakta bulunması gerekmektedir (Harrison 1997).

2.8.7. Metil Tiazoldifenil Tetrazolyum (MTT) Test Yöntemi

MTT testi, sitotoksitenin değerlendirilmesi, hücre canlılığının tespiti ve yaşayan hücrelerdeki proliferasyonun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biridir (Vellonen ve ark. 2004).

Mosmann tarafından tanımlanan bu test; sarı renkte, suda çözünebilir tetrazolium tuzlarının [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] metabolizmaları aktif olan canlı hücreler tarafından alınması ve mitokondrial bir enzim olan “succinate dehidrogenase” tarafından parçalanarak mor suda çözülmeyen tetrazolium formazan (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan) yan ürünü salınması esasına dayanır. (Van de Loosdrecht AA ve ark. 1991, Wilson JK ve ark. 1990, Uo M ve ark. 2003, Scott ve ark. 1999, Wise C. 2002)

Formazan bileşiğinin oluşumu yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülür ve yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir (Tsuchiya ve ark. 1994, Cimpan ve ark. 2000)

Suda çözülmeyen formazan kristalleri DMSO veya başka bir organik çözücü (isopropanol) içinde çözünebilir ve çözünen materyallerin optik yoğunlukları (absorbans) spektrofotometre (570-690 nm) yardımı ile ölçülür. Elde edilen değer,

hücre hattında metabolizmaları aktif olan hücre sayısı ile doğru orantılıdır(Holst Hansen C 1998).

Materyallerin toksik etkileri sonucunda, çoğunlukla hücrelerin metabolizmaları etkilenmektedir. Özellikle hücrelerdeki mitokondrileri etkileyen bazı kimyasal maddeler MTT testi ile değerlendirilmektedir. Hücre kültürlerinde metabolik olarak aktif hücrelerin sayısıyla bağlantılı olarak boyanın konsantrasyonu ve emilim değerleri değişmektedir. MTT yöntemi, fazla sayıdaki hücre kültürlerinde canlı hücre oranının belirlenmesinde hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntemdir. MTT değerlendirmeleri, büyüme döngüsünün herhangi bir aşamasındaki canlı hücre yoğunluğu hakkında fikir vermektedir (Schmalz 1994).

MTT testinde oluşan formazan kristallerinin yoğunluğu hücre hatlarına ve kültürün yaşına göre değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle her hücre hattı için optimize edilmelidir. Ayrıca test, pH ve besiyeri glikoz değişimlerine hassas olduğundan titiz çalışılması gerekmektedir.

2.8.8. Alkalen Fosfataz Testi

Kemik yapımı ve remodellingi sırasında, Ca tuzlarının kemik dokuda bulunan osteoblastların hazırladığı gözeneklerin arasında bulunan osteoid yapının içerisine çökmesi sonucu kemik dokunun organik maddesi sertleşir. Bu durum kemiğin mekanik zorlanmalara karşı direncini artırır. Organik matriksin ara maddesine Ca tuzlarının çökmeden önce osteoblastlar kendi sitoplazmalarında alkalen fosfataz enzimi sentezler ve sitoplazmalarının dışına gönderir. Dolayısıyla ortamda bulunan alkalen fosfataz enzim miktarı kemik mineralizasyon miktarını gösteren belirteçlerden biridir(Fedde KN, 1992).

Alkalen fosfataz enziminin kemik oluşumu esnasında ortaya çıkması oldukça önemlidir. Bunun nedeni bu aşamada etkin rol oynuyor olmalarıdır. Sadece Ca tuzlarını organik matriks içerisine yerleştirme görevini yapmazlar, aynı zamanda kollajen fibrillerin oluşmasında aracı görev görürler (Millet, 1994; Skojdt, 1992). ALP enziminin bütün aktivitesi, osteoblastların aktif olarak fonksiyon gösterdiğinin bir delili olarak gösterilir (Fedde, 1992).

ALP enzimi aynı zamanda, içerisinde kemik doku oluşumu gözlenen tümörlerde osteoblastik aktivite için bir işaretleyici olarak kullanılır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş Çene Cerrahisi Ana Bilim Dalı ile İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Bölümü' nün ortak çalışması ile gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, farklı partikül boyutlarındaki biyoseramik greft materyallerinin, D vitamini ile inkübasyonu sonrası, in vitro ortamda sürekli osteoblast hücre kültürlerinde osteoblast proliferasyonunda ve apoptozisinde oluşturdukları değişikliklerin erken dönemde incelenmesi planlanmıştır.

Çalışmamızda biyoseramik greft materyali olarak CompactBone S (Germany) kullanılmıştır. Bu greftin farklı partikül boyutları olan CompactBone S (Germany)(0,5 - 1,0 mm) (1,0 cc) ve CompactBone S (Germany)(0,8 -1,5mm) (2,0 cc) greft materyalleri deneye dahil edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan D vitamini, “1alpha, 25(OH)₂ D₃ (1,25 D₃)>%99 HPLC” özelliğinde olup “Sigma-Aldrich” firmasından temin edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan insan kaynaklı sürekli osteoblast hücre kültürleri American Type Culture Collection (ATCC), (Rockville, MD, USA) (hFOB 1.19) firmasından temin edilmiştir.

3.1. Deney Grupları

Bu çalışma, 6 ana grup ve 24. saat, 48. saat ve 72. saatlik in vitro incelemelerine göre düzenlenmiş 18 alt grup içermektedir.

1. Grup (kontrol grubu)

Kontrol grubunu oluşturmak için osteoblast hücre kültürüne, D vitamini veya biyoseramik greft materyali (Compact Bone S) eklenmedi.

a) D vitamini veya biyoseramik greft materyali (Compact Bone S) eklenmemiş osteoblast hücre kültürü 24. saatte incelendi.

b) D vitamini veya biyoseramik greft materyali (Compact Bone S) eklenmemiş osteoblast hücre kültürü 48. saatte incelendi.

c) D vitamini veya biyoseramik greft materyali (Compact Bone S) eklenmemiş osteoblast hücre kültürü 72. saatte incelendi.

2. Grup (D vitamini grubu)

Osteoblast hücre kültürlerine yalnızca D vitamini eklendi.

- a) D vitamini eklenen osteoblast hücre kültürleri 24. saatte incelendi.
- b) D vitamini eklenen osteoblast hücre kültürleri 48. saatte incelendi.
- c) D vitamini eklenen osteoblast hücre kültürleri 72. saatte incelendi.

3. Grup (D vitamini inkübasyonu yapılmamış küçük partikül boyutlu biyoseramik CompactBone S (Germany)(0,5 -1,0 mm) (1,0 cc) grubu)

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, D vitamini inkübasyonu yapılmamış 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) yerleştirildi.

- a) 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 24. saatte incelendi.
- b) 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 48. saatte incelendi.
- c) 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 72. saatte incelendi.

4. Grup (D vitamini inkübasyonu yapılmamış büyük partikül boyutlu biyoseramik CompactBone S (Germany)(0,8 -1,5 mm) (2,0 cc) grubu)

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, D vitamini inkübasyonu yapılmamış 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) yerleştirildi.

- a) 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 24. saatte incelendi.
- b) 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 48. saatte incelendi.
- c) 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 72. saatte incelendi.

5. Grup (D vitamini inkübasyonu yapılmış büyük partikül boyutlu biyoseramik CompactBone S (Germany)(0,8 -1,5 mm) (2,0 cc) grubu)

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, D vitamini inkübasyonu yapılmış 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) yerleştirildi.

a) D vitamini inkübasyonu yapılan 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 24. saatte incelendi.

b) D vitamini inkübasyonu yapılan 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 48. saatte incelendi.

c) D vitamini inkübasyonu yapılan 0.8-1.5 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 72. saatte incelendi.

6. Grup (D vitamini inkübasyonu yapılmış küçük partikül boyutlu biyoseramik CompactBone S (Germany)(0,5 -1,0 mm) (1,0 cc) grubu)

Bu grupta osteoblast hücre kültürüne, D vitamini inkübasyonu yapılmış 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) yerleştirildi.

a) D vitamini inkübasyonu yapılan 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 24. saatte incelendi.

b) D vitamini inkübasyonu yapılan 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 48. saatte incelendi.

c) D vitamini inkübasyonu yapılan 0.5-1 mm partikül boyutlu biyoseramik greft (CompactBone S) eklenen osteoblast hücre kültürü 72. saatte incelendi.

3.2. Hücre Kültür Besiyerinin Hazırlanması

American Type Culture Collection (ATCC), (Rockville, MD, USA) firmasından temin edilen insan osteoblast hücrelerinin kültüre edilebilmesi için gerekli kültür vasatı bileşimleri firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Bu önerilere göre, F12 Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wisent Bioproducts), (Quebec, Canada)' dan 500 ml alındı. 50 ml Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific), (Ebsdorfergrund ,Germany), 5 ml fenol kırmızısı içermeyen L-Glutamine (Sigma-Aldrich) (St.Louis, MO, USA) ve 3 ml G418 Sulfate Solution (Wisent Bioproducts),

(Quebec, Canada), 500 ml' lik , F12 Medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wisent Bioproducts), (Quebec, Canada) üzerine eklendi.

Oluşan hücre kültür vasatı, steril filtrasyon sistemi kullanılarak filtre edildi ve hücre pasajlarında kullanılmak üzere daha küçük kaplara bölünerek, +4°C sıcaklığındaki soğutucu içerisinde hazır halde bekletildi.

3.3. Hücre Ekimi

2 ml' lik tüpler içinde sıvı azot tankında saklanan insan osteoblast hücreleri, çıkartıldıktan sonra hücrelerin çözünmesi için +37°C sıvı banyosunda (Şekil 23) 2 dakika boyunca tutuldu. Bakteri ve mantar kontaminasyonunun engellenmesi için 2 ml' lik tüplerin kapaklarının banyo dışında tutulmasına özen gösterildi.



Şekil 23: 37° C su banyosu (Mettler GmbH + Co., Germany)

2 ml' lik tüp içindeki hücre solüsyonundan 1 ml alınarak, 9 ml hücre kültür medyumu üzerine eklendi. Oluşturulan yeni karışım, 1500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra, santrifüj tüpünün dibine çöken insan osteoblast hücrelerinin üzerindeki medyum atılarak yeni medium eklendi ve 25 cm³' lük hücre flaskına ekildi. Oluşturulan 25 cm³ ' lük hücre flaskı, % 5 CO₂ ve %95 atmosferik hava içeren, 37°C buhara doymuş CO₂ İnkübatörüne (İnkübatör Therma Form Direct Heat, USA) (Şekil 24) kondu.



Şekil 24: % 5 CO₂ ve %95 atmosferik hava içeren, 37°C buhara doymuş CO₂ İnkübatörü (İnkübatör Thermo Forma Direct Heat, USA)



Şekil 25: Hettich® ROTINA 38/38R santrifüj makinesi (Sigma-Aldrich)



Şekil 26: 1500 devirde 5 dk santrifüj sonrası birbirine yapışarak dibe çöken insan osteoblast hücreleri

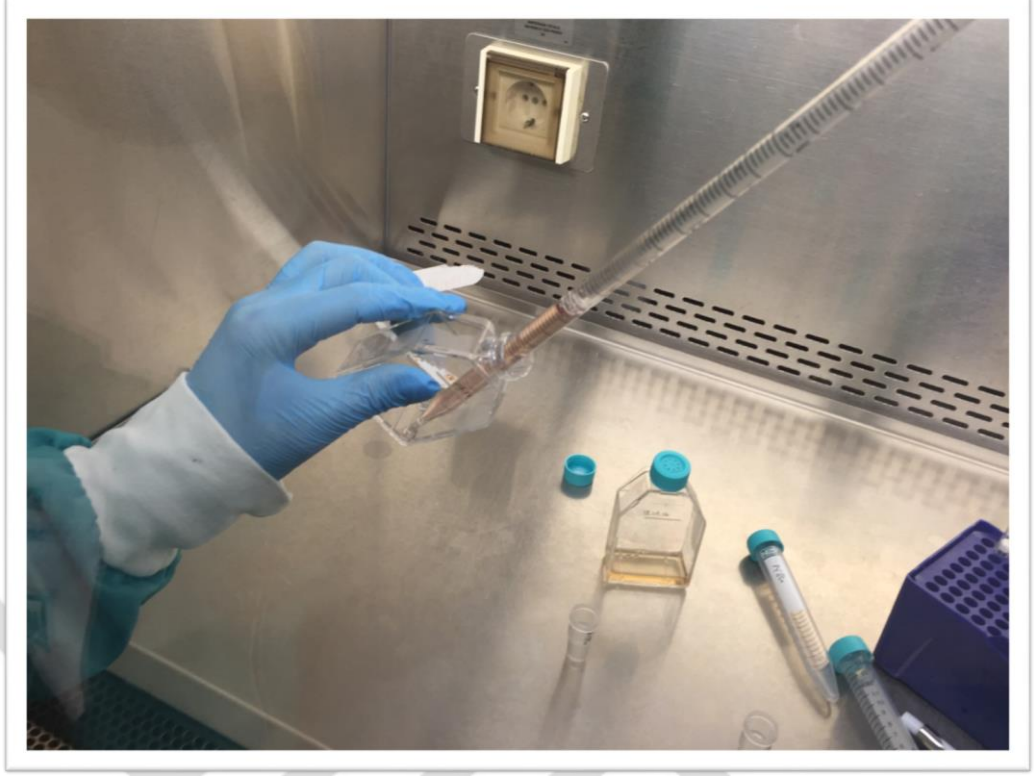
3.4. Pasajlama

Ekimi yapılan kültür flaskları inkübatörden çıkarılıp hücreler mikroskop altında mantar ve bakteri kontaminasyonuna karşı incelendi. Ayrıca bu incelemede hücrelerin flask yüzeyine yapışıp yapışmadığına ve yoğunluklarına bakıldı.



Şekil 27: 75 cm³' lük hücre flasks

İnkübatörden çıkarılan 25 cm³' lük hücre flasksındaki medyum atıldı. Pipet yardımıyla uzaklaştırılmayan medyumun atılması için flask yüzeyi 5 ml PBS(Wisent Bioproducts), (Quebec, Canada) ile yıkandı. Daha sonra 5 ml' lik PBS döküldü ve flask yüzeyine yapışan insan osteoblast hücrelerinin, yüzer hale geçmesi için 25 cm³' lük flaska 1,5 ml Trypsin-EDTA (%0,05 Trypsin, PBS ile çözülmüş EDTA, Biochrom KG, Seromed, Berlin, Trypsin-EDTA Solution) eklenip inkübatörde 5 dakika hücrelerin çözünmesi beklendi. Bu süre sonunda bir pipet yardımıyla flasks iyice yıkayıp hücre içeren bu çözelti mikroskop altında tüm hücrelerin yüzer hale geçtiğini görmek için incelendi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı görüldükten sonra, hücre ve 1,5 ml Trypsin-EDTA (%0,05 Trypsin, PBS ile çözülmüş EDTA, Biochrom KG, Seromed, Berlin, Trypsin-EDTA Solution) çözelti 20 ml medyumla beraber 50 ml'lik bir falkona konuldu. Bu falkon 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip hücrelerin çökmesi sağlandıktan (Şekil 25, Şekil 26) sonra üstteki sıvı uzaklaştırıldı ve 75 cm³' lük flaskslara alındı. (Şekil 27, Şekil 28). Santrifüjle birbirine yapışarak çöken hücrelerin üzerine 10 ml'lik konsantrasyonu sağlayacak şekilde medyum eklendi. Bu çözültiden 1 ml alınarak ViCell cihazında hücre sayımı (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, USA) (Şekil 29) yapıldı. Sayımdan sonra hücreler uygun miktarlara bölünerek 75' cm³' lük flaskslara konulup, iki hafta süreyle aynı prosedürlerle, deney için gerekli hücre sayısına ulaşıncaya dek, pasajlanmaya devam edildi.



Şekil 28: Pasajlama işlemi sırasında tripsinle flask yüzeyinden ayrılmış insan osteoblast hücrelerine medyum eklenmesi



Şekil 29: Hücre sayımı ve hücre canlılığının ölçümü için kullanılan ViCell cihazı (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, USA)

3.5. Deney Düzenine Hazırlanması

İki haftalık pasajlama süresinin sonunda deney için yeterli sayıya ulaşan insan osteoblast hücreleri ile deney düzenine hazırlanmasına başlandı. Deney düzeni için 96 kuyucuklu hücre kültür kapları kullanıldı (Tablo 1).

Yeterli sayıda pasajlama yapıldıktan sonra hücre sayımı ve hücre canlılığı için (Vi-Cell XR, Beckman Coulter, USA) cihazı kullanıldı. Hücre sayımı sonucunda toplam osteoblast hücre sayısı 20 ml solüsyonda $15,6 \times 10^6$ olarak bulundu. 1ml'de $0,78 \times 10^6$ hücre olan süspansiyonu 100 μ l'de 5×10^4 olacak şekilde sulandırıldı. Deneyde total hacim 200 μ l olacak şekilde her kuyucuk için 5×10^4 hücre kullanıldı. Kuyucukların ilk sırası kontrol grubu için, ikinci sırası ise sadece D vitamini grubu için ayrıldı. Kontrol grubuna total hacmi 200 μ l olacak şekilde sadece medyum ve hücre konuldu. D vitamini grubuna ise, 5 nM konsantrasyona sahip D vitamini, besin maddesi ve hücre eklendi. Sadece küçük partiküllü greft ve insan osteoblast hücresi içeren kuyucuk sırasına 200 μ l hücre solüsyonu eklenirken, elektronik hassas tartıyla ölçülmüş 3 mg greft hücrelerin üstüne koyuldu. Aynı prosedür sadece büyük partiküllü greft ve insan osteoblast hücresi içeren kuyucuk sırası için de uygulandı. D vitamini, greft ve insan osteoblast hücresi içeren kuyucuk sıralarına ise sırasıyla 200 μ l hücre solüsyonu, 3'er mg greft ve 5 nM D vitamini eklendi. Her deneme kendi grubu içerisinde 5 tekrarlı olarak yapıldı (Tablo 2).

96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına grupların yerleşimi aşağıdaki tablodaki gibi planlandı;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tablo 1: 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının kullanım şekli

A1-A5: KONTROL
B1-B5: D VİTAMİNİ
C1-C5: KÜÇÜK PARTİKÜL GREFT
D1-D5: BÜYÜK PARTİKÜL GREFT
E1-E5: BÜYÜK PARTİKÜL GREFT + D VİTAMİNİ
F1-F5: KÜÇÜK PARTİKÜL GREFT + D VİTAMİNİ

Tablo 2: Deney gruplarının düzenek içindeki yerleşimi

Deneyde kullanılacak olan greftler, greftli deney gruplarında her kuyucuğa 3 mg greft materyali gelecek şekilde hesaplandı. Hesaplama elektronik hassas tartı vasıtasıyla yapıldı. 100 µl medyumla beraber eppendorflara alınan greftler CO₂ inkübatöründe 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra greft koyulması gereken deney

grubundaki kuyucuklara, steril cerrahi küret yardımıyla 3 mg büyük veya küçük partikül boyutlu greft materyali eklendi.

Çalışma için gerekli olan D vitamini miktarı Woeckel ve ark.nın 2010 yılında D vitaminin osteoblastlar üzerine yaptığı etkinin araştırıldığı hücre kültürü çalışması baz alınarak hesaplandı (Woeckel ve ark. 2010). Buna göre D vitamini olması gereken her kuyucuğa 5 nM D vitamini koyuldu.

3.6. MTT Test Kitinin Uygulanması

Öncelikle “Hücre Bazlı Assay Buffer Tablet” 100 ml distile su içerisinde çözülerek “Assay Buffer” adı verilen çözelti şeklinde kullanıma hazırlandı. Toz halindeki “MTT Reagent” hazırlanan Assay Buffer çözeltisinde 25 mg/5 ml olacak şekilde karıştırıldı (Tablo 3). Yeni oluşan sarı renkli çözelti 24, 48 ve 72. Saatlerde kullanılmak üzere ufak şişelere bölündü.

24, 48 ve 72 saat inkübe edilen deney düzenekleri belirlenen saatler aşılmadan inkübatörden çıkarıldı. Her kuyucuktan 100 µl besin maddesi mini pipetler kullanılarak atıldı.

Hücre içeren her bir kuyucuğa daha önce hazırlanmış olan sarı renkli MTT Reagent solüsyonundan tekrarlayan pipetaj işlemiyle 10’ar µL eklendi. Hücre kabı orbital karıştırıcıda 1 dk kadar yavaşça karıştırıldı. Daha sonra hücre kabı firma önerisi dahilinde yaklaşık 4 saat CO₂ inkübatöründe (İnkübatör Therma Form Direct Heat, USA) bırakıldı. Bu sırada 1 şişe “Crystal Dissolving SDS” ve 1 şişe “Crystal Dissolving (hidroklorid)” birbirlerine içinde çözülerek “Crystal Dissolving” solüsyonu hazırlandı. 24., 48. ve 72. saatlerin her biri için ayrı “Crystal Dissolving” solüsyonları hazırlandı.

4 saatlik bekleme süresinden sonra inkübatörden çıkarılan hücre kabında her kuyucuğa taze olarak hazırlanmış “Crystal Dissolving” solüsyonundan 100 µL eklendi. “Crystal Dissolving” solüsyonu eklenmiş hücre kapları tekrar CO₂ inkübatörüne (İnkübatör Therma Form Direct Heat, USA) konuldu ve 18 saat beklendi. 18 saat sonunda çıkarılan hücre kapları 570 nm ELISA (ELX800 Universal Microplate Reader, BIOTEK Instruments, USA) mikropate okuyucuda ölçüldü.

Ürün	Adet	Saklama Koşulu
MTT Reagent (toz)	1 şişe/25 mg	4° C
Hücre Bazlı Assay Buffer Tablet	1 tablet	Oda Sıcaklığı
Crystal Dissolving SDS	5 şişe/1 g	Oda Sıcaklığı
Crystal Dissolving (hidroklorid)	5 şişe/10 ml	Oda Sıcaklığı

Tablo 3: MTT Assay Kit malzeme listesi ve saklama koşulları

3.7. ALP (Alkale Fosfataz) Test Kitinin Uygulanması

24, 48 ve 72 saat inkübe edilen deney düzenekleri belirlenen saatler aşılmadan inkübatörden çıkarıldı.

Ürün	Miktar	Saklama Koşulu
Alp Assay Buffer	100 ml	-20° C
pNPP	10 tablet	4° C
Alp Enzimi	1 şişe	4° C
Stop Solüsyonu	10 ml	-20° C

Tablo 4: ALP Kiti malzeme listesi ve saklama koşulları

ALP test kiti için firma önerisiyle 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında çalışmaya dahil olan her bir kuyucuğa $1 \cdot 10^5$ hücre koyuldu. Hücreler soğuk PBS (Wisent Bioproducts), (Quebec, Canada) ile yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL “ALP Assay Buffer” eklendi (Tablo 4). Çalışmaya dahil olan 30 kuyucuktan her biri ayrı ayrı 0,2 ml’ lik eppendorflara alındı ve 4° C soğuk santrifüjde maksimum hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant sıvı atıldı. Yeni bir 96 kuyucuklu hücre kabı açıldı ve her bir hücre örneği kuyucuğuna total hacim 80 µL olacak şekilde “ALP Assay Buffer” eklendi. Hücre örneği içeren her kuyucuğa, 2 pNPP tablet ve 5.4 ml “ALP Assay Buffer” karışımı olan ve önceden hazırlanan 5 mM’ lik

pNPP solüsyonundan 50 µL eklendi (Tablo 4). Daha sonra hücreler, 25° C’ de 60 dakika boyunca ışıktan uzak bir alanda inkübe edildi. İnkübasyon işlemi tamamlandığında, her bir kuyucuğa 20 µL “stop solüsyonu” eklendi. Elde nazikçe karıştırılan 96 kuyucuklu hücre kabındaki örnekler 405 nm dalga boyunda ELISA(ELX800 Universal Microplate Reader, BIOTEK Instruments, USA) mikroplate okuyucuda ölçüldü.

3.8. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, ikili değerlendirmelerin Mann Whitney U testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. ALP Bulguları

Saat	Grup	ALP
		Ort±SS (medyan)
24 saat	Kontrol	3,29±0,32 (3,2)
	D vitamini	4,94±0,68 (4,7)
	Küçük partiküllü greft	3,68±0,65 (4)
	Büyük partiküllü greft	4,62±0,54 (4,6)
	Büyük partiküllü greft+D vitamini	2,8±1,02 (2,7)
	Küçük partiküllü greft+ D vitamini	2,73±0,24 (2,9)
	p	0,001*
48 saat	Kontrol	3,86±0,4 (3,9)
	D vitamini	6,08±0,84 (5,8)
	Küçük partiküllü greft	1,92±0,61 (2)
	Büyük partiküllü greft	1,83±0,53 (1,7)
	Büyük partiküllü greft+D vitamini	4,78±1,55 (4,5)
	Küçük partiküllü greft+ D vitamini	3,76±1,24 (3,6)
	p	0,001*
72 saat	Kontrol	3,91±0,32 (4)
	D vitamini	6,53±0,88 (6,3)
	Küçük partiküllü greft	1,99±0,38 (1,8)
	Büyük partiküllü greft	2,22±0,79 (2,2)
	Büyük partiküllü greft+D vitamini	3,62±1,08 (3,1)
	Küçük partiküllü greft+ D vitamini	3,01±0,64 (2,6)
	p	0,001*

Tablo 5: Saat gruplarında ayrı ayrı gruplara göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi

Grup	Saat	ALP
		Ort±SS (medyan)
Kontrol	24 saat	3,29±0,32 (3,2)
	48 saat	3,86±0,4 (3,9)
	72 saat	3,91±0,32 (4)
	p	0,067
D vitamini	24 saat	4,94±0,68 (4,7)
	48 saat	6,08±0,84 (5,8)
	72 saat	6,53±0,88 (6,3)
	p	0,049*
Küçük partiküllü greft	24 saat	3,68±0,65 (4)
	48 saat	1,92±0,61 (2)
	72 saat	1,99±0,38 (1,8)
	p	0,009*
Büyük partiküllü greft	24 saat	4,62±0,54 (4,6)
	48 saat	1,83±0,53 (1,7)
	72 saat	2,22±0,79 (2,2)
	p	0,009*
Büyük partiküllü greft + D vit	24 saat	2,8±1,02 (2,7)
	48 saat	4,78±1,55 (4,5)
	72 saat	3,62±1,08 (3,1)
	p	0,105
Küçük partiküllü greft + D vit	24 saat	2,73±0,24 (2,9)
	48 saat	3,76±1,24 (3,6)
	72 saat	3,01±0,64 (2,6)
	p	0,356

Tablo 6: Grupların kendi içlerinde saat gruplarına göre ALP parametrelerinin değerlendirilmesi

4.1.1. ALP 24. Saat Bulguları

	1	2	3	4	5
Kontrol	3,660726	3,6019	3,0262666	3,160708	2,974427
D Vitamini	4,650956	4,582327	4,47448	6,1211596	4,86665
Küçük partiküllü greft	4,033288	4,19996	3,101883	2,856776	4,19996
Büyük partiküllü greft	5,405885	4,190156	4,807825	4641152	4,033288
Büyük partiküllü greft + D vit	4,47448	2,13126	1,866545	2,79795	2,729321
Küçük partiküllü greft + D vit	2,415584	2,876385	2,925406	2,533235	2,905797

Tablo 7: ALP 24. saat deney sonuçları

Gruplar arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.001; p<0.05**).

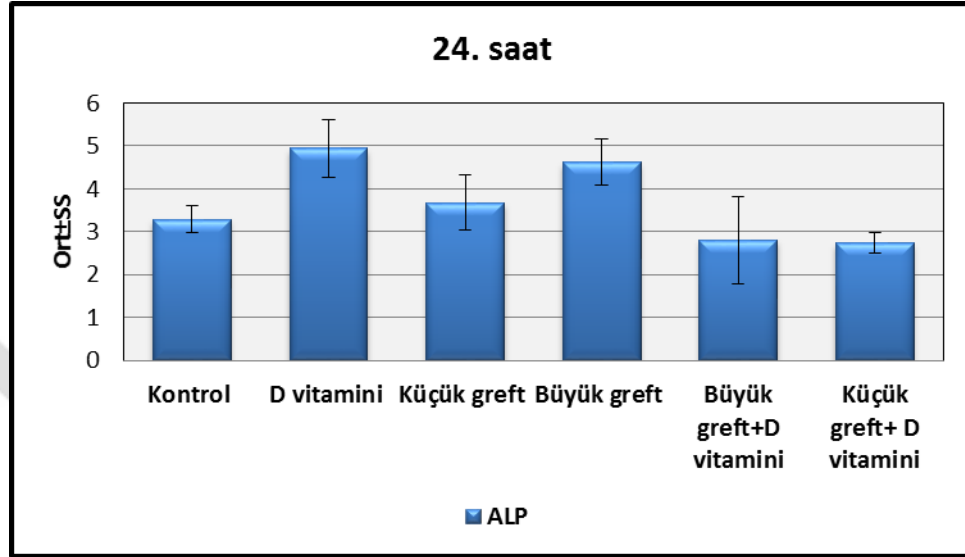
Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; D vitamini grubunun ALP düzeyleri, kontrol (p:0.001), küçük partiküllü greft (p:0.009), büyük partiküllü greft+D vitamini (p:0.012) ve küçük partiküllü greft+ D vitamini (p:0.009) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Büyük partiküllü greft grubunun ALP düzeyleri, kontrol (p:0.009), büyük partiküllü greft+D vitamini (p:0.028) ve küçük partiküllü greft+D vitamini (p:0.009) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Küçük partiküllü greft grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft+D vitamini grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p:0.047; p<0.05**).

Kontrol grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft+D vitamini grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.009$; $p<0.05$).

Diğer gruplar arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8)



Tablo 8: ALP 24. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi

4.1.2. ALP 48. Saat Bulguları

	1	2	3	4	5
Kontrol	4,400213	3,928338	3,737038	3,303424	3,915585
D Vitamini	5,892356	5,573522	5,548015	7,550292	5,828589
Küçük partiküllü greft	1,977074	2,729523	1,377666	1,262886	2,257648
Büyük partiküllü greft	2,308662	1,058832	1,683747	2,359675	1,722007
Büyük partiküllü greft + D vit	6,657557	5,892356	4,502239	2,691262	4,132392
Küçük partiküllü greft + D vit	5,165414	3,558491	2,576482	4,910347	2,576482

Tablo 9: ALP 48. saat deney sonuçları

Gruplar arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.001; p<0.05**).

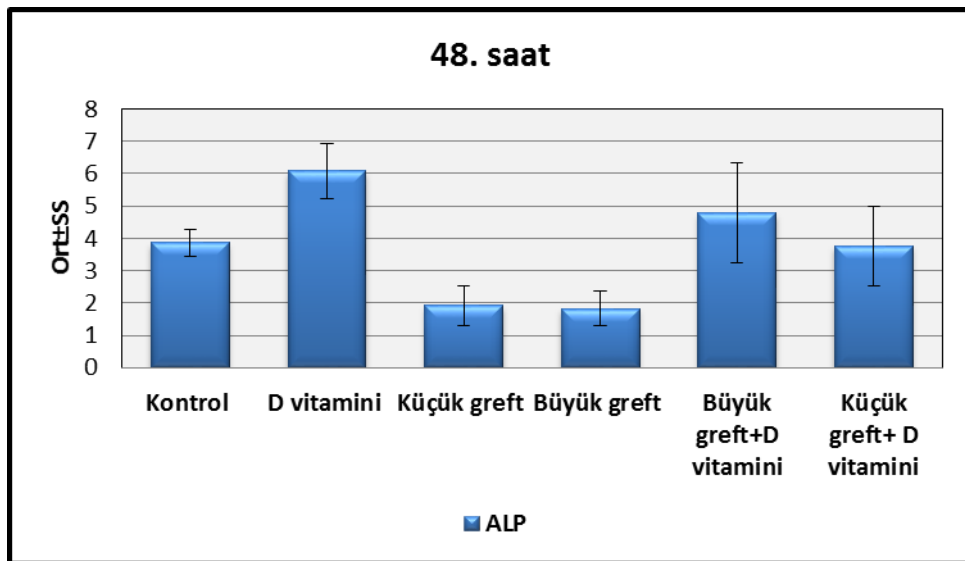
Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; D vitamini grubunun ALP düzeyleri, kontrol, küçük partiküllü greft, büyük partiküllü greft ve küçük partiküllü greft+ D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**).

Büyük partiküllü greft+D vitamini grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft (p:0.016) ve büyük partiküllü greft (p:0.009) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Kontrol grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft ve büyük partiküllü greft gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**).

Küçük partiküllü greft+D vitamini grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft (p:0.028) ve büyük partiküllü greft (p:0.009) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Diğer gruplar arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 9, Tablo 10).



Tablo 10: ALP 48. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi

4.1.3. ALP 72. Saat Bulguları

	1	2	3	4	5
Kontrol	3,957448	3,583967	3,5978	4,095774	4,330929
D Vitamini	6,281329	5,451372	6,07384	7,277278	7,581596
Küçük partiküllü greft	1,785726	2,422027	2,366696	1,564404	1,799559
Büyük partiküllü greft	1,301584	-	1,882554	2,588018	3,113658
Büyük partiküllü greft + D vit	5,396041	2,671014	3,141323	3,846787	3,044495
Küçük partiküllü greft + D vit	2,560353	2,601851	2,49119	3,708461	3,708461

Tablo 11: ALP 72. saat deney sonuçları

Gruplar arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.001; p<0.05**).

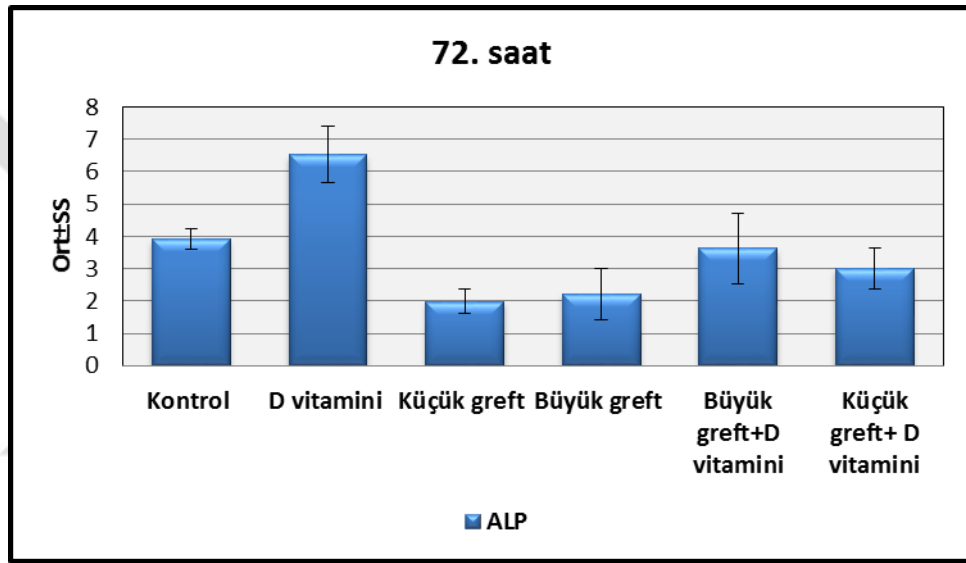
Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; D vitamini grubunun ALP düzeyleri, kontrol (p:0.009), küçük partiküllü greft (p:0.009), büyük partiküllü greft (p:0.014), büyük partiküllü greft+D vitamini (p:0.009) ve küçük partiküllü greft+ D vitamini (p:0.009) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Kontrol grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft (p:0.009) ve büyük partiküllü greft (p:0.014) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

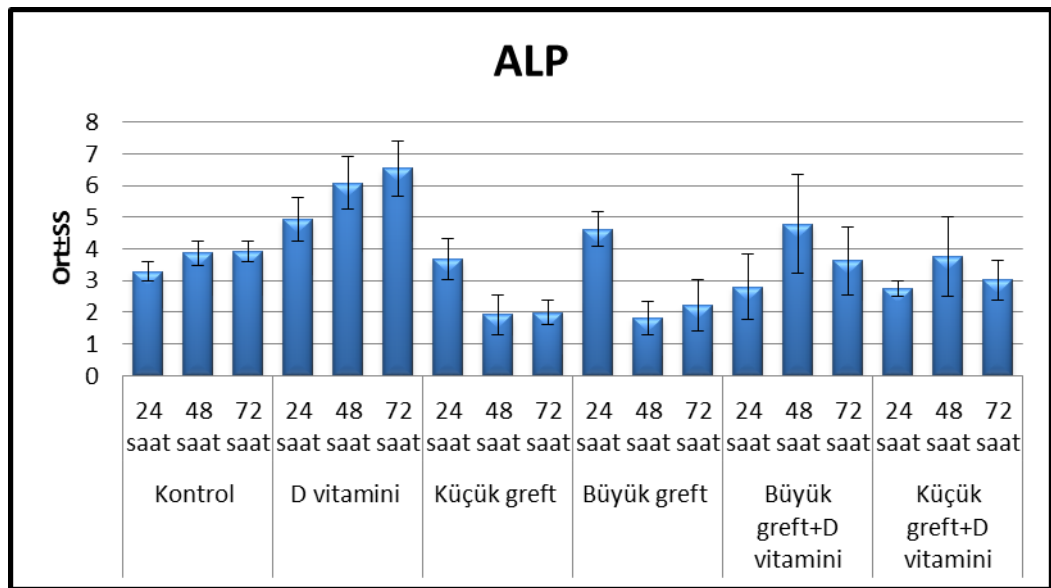
Büyük partiküllü greft+D vitamini grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft (p:0.009) ve büyük partiküllü greft (p:0.048) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Küçük partiküllü greft+D vitamini grubunun ALP düzeyleri, küçük partiküllü greft grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p:0.009**; **p<0.05**).

Diğer gruplar arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 11, Tablo 12).



Tablo 12: ALP 72. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi



Tablo 13: Deney gruplarının saat dilimlerine göre ALP bulgularının grafiği

Kontrol grubunun saat grupları arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

D vitamini grubunun saat grupları arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**$p:0.049$; $p<0.05$**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24. saatteki ALP düzeyleri, 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**$p:0.028$; $p<0.05$**). Diğer saatlerdeki ALP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Küçük partiküllü greft grubunun, saat grupları arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**$p:0.009$; $p<0.05$**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24. saatteki ALP düzeyleri, 48. saat ve 72. saatlerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**$p:0.009$; $p<0.05$**). 48. saat ve 72. saatler arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Büyük partiküllü greft grubunun, saat grupları arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**$p:0.009$; $p<0.05$**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24 saatteki ALP düzeyleri, 48. saat (**$p:0.009$**) ve 72. saatlerden (**$p:0.014$**) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**$p<0.05$**). 48. saat ve 72. saat ALP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Büyük partiküllü greft+ D vitamini grubunun, saat grupları arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Küçük partiküllü greft+ D vitamini grubunun, saat grupları arasında ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 13).

4.2. MTT Bulguları

Saat	Grup	MTT
		Ort±SS (medyan)
24 saat	Kontrol	1,35±0,16 (1,3)
	D vitamini	1,11±0,05 (1,1)
	Küçük partiküllü greft	1,13±0,08 (1,1)
	Büyük partiküllü greft	1,11±0,09 (1,1)
	Büyük partiküllü greft+D vitamini	1,01±0,06 (1)
	Küçük partiküllü greft+ D vitamini	1,08±0,06 (1,1)
	p	0,008*
48 saat	Kontrol	1,85±0,09 (1,9)
	D vitamini	1,2±0,06 (1,2)
	Küçük partiküllü greft	1,76±0,2 (1,7)
	Büyük partiküllü greft	1,83±0,11 (1,8)
	Büyük partiküllü greft+D vitamini	0,97±0,05 (1)
	Küçük partiküllü greft+ D vitamini	1,11±0,21 (1)
	p	0,001*
72 saat	Kontrol	1,9±0,11 (1,9)
	D vitamini	1,62±0,13 (1,6)
	Küçük partiküllü greft	2,04±0,2 (2)
	Büyük partiküllü greft	1,93±0,08 (1,9)
	Büyük partiküllü greft+D vitamini	0,97±0,24 (1)
	Küçük partiküllü greft+ D vitamini	1,21±0,15 (1,3)
	p	0,001*

Tablo 14: Saat gruplarında ayrı ayrı gruplara göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi

Grup	Saat	MTT
		Ort±SS (medyan)
Kontrol	24 saat	1,35±0,16 (1,3)
	48 saat	1,85±0,09 (1,9)
	72 saat	1,9±0,11 (1,9)
	p	0,009*
D vitamini	24 saat	1,11±0,05 (1,1)
	48 saat	1,2±0,06 (1,2)
	72 saat	1,62±0,13 (1,6)
	p	0,003*
Küçük partiküllü greft	24 saat	1,13±0,08 (1,1)
	48 saat	1,76±0,2 (1,7)
	72 saat	2,04±0,2 (2)
	p	0,004*
Büyük partiküllü greft	24 saat	1,11±0,09 (1,1)
	48 saat	1,83±0,11 (1,8)
	72 saat	1,93±0,08 (1,9)
	p	0,004*
Büyük partiküllü greft+D vitamini	24 saat	1,01±0,06 (1)
	48 saat	0,97±0,05 (1)
	72 saat	0,97±0,24 (1)
	p	0,655
Küçük partiküllü greft+D vitamini	24 saat	1,08±0,06 (1,1)
	48 saat	1,11±0,21 (1)
	72 saat	1,21±0,15 (1,3)
	p	0,326

Tablo 15: Grupların kendi içlerinde saat gruplarına göre MTT parametrelerinin değerlendirilmesi

4.2.1. MTT 24. Saat Bulguları

	1	2	3	4	5
Kontrol	1,327	1,556	1,171	1,223	1,449
D Vitamini	1,164	1,086	1,085	1,16	1,056
Küçük partiküllü greft	1,225	1,062	1,044	1,198	1,131
Büyük partiküllü greft	1,185	0,986	1,202	1,077	1,117
Büyük partiküllü greft + D vit	1,077	0,997	1,016	0,911	1,032
Küçük partiküllü greft + D vit	1,084	1,014	1,068	1,047	1,18

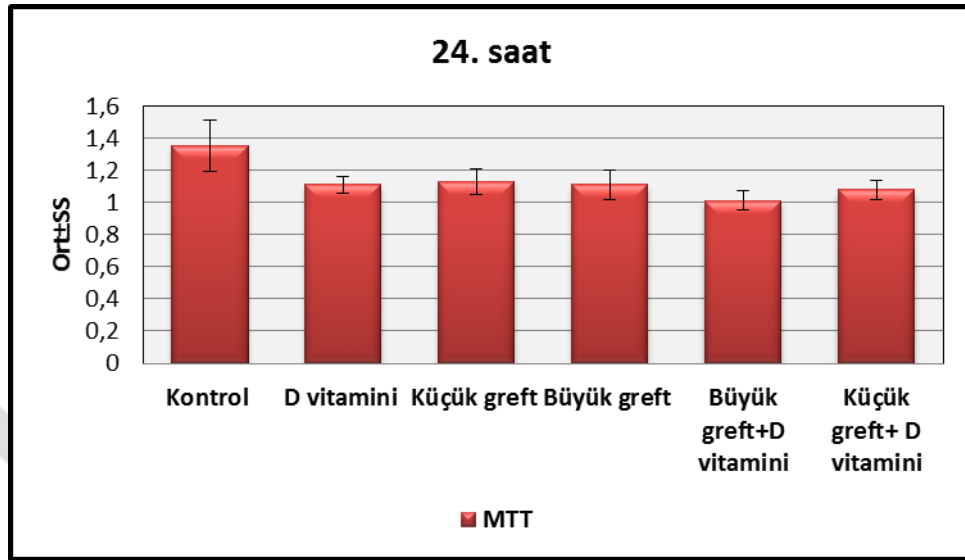
Tablo 16: MTT 24. Saat deney sonuçları

Gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.008; p<0.05**).

Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Kontrol grubunun MTT düzeyleri, D vitamini (p:0.001), küçük partiküllü greft (p:0.047), büyük partiküllü greft (p:0.028), büyük partiküllü greft+D vitamini (p:0.009) ve küçük partiküllü greft+D vitamini (p:0.016) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

Büyük partiküllü greft + D vitamini grubunun MTT düzeyleri, D vitamini (p:0.016) ve küçük partiküllü greft (p:0.028) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**p<0.05**).

Diğer gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16, Tablo 17).



Tablo 17 : MTT 24. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi

4.2.2. MTT 48. Saat Bulguları

	1	2	3	4	5
Kontrol	1,747	1,853	1,968	1,905	1,795
D Vitamini	1,26	1,19	1,206	1,229	1,109
Küçük partiküllü greft	1,67	1,65	1,603	2,107	1,783
Büyük partiküllü greft	1,752	1,75	1,817	1,82	2,016
Büyük partiküllü greft + D vit	0,932	0,911	1,012	1,005	0,999
Küçük partiküllü greft + D vit	1,012	1,426	0,992	0,903	1,192

Tablo 18: MTT 48. Saat deney sonuçları

Gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.001$; $p<0.05$).

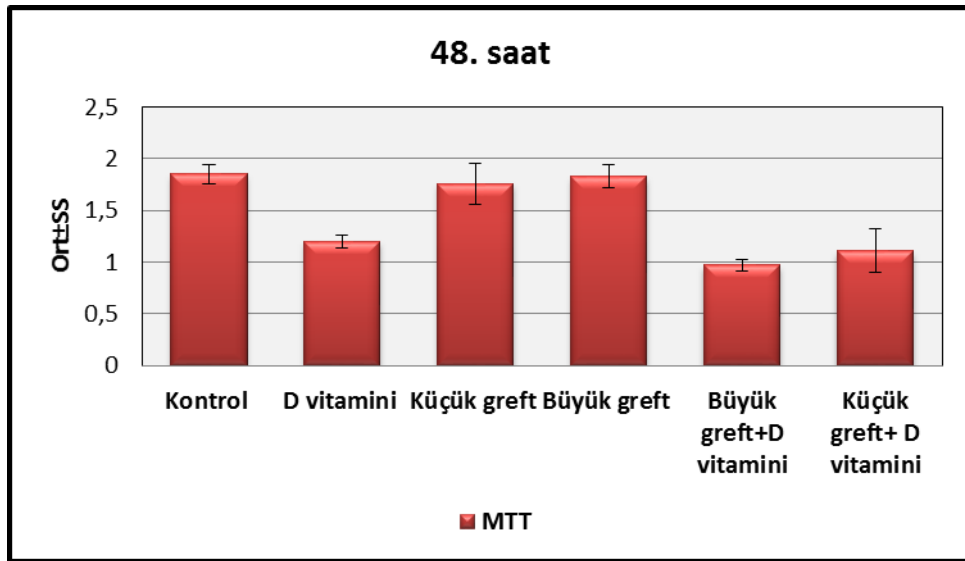
Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Kontrol grubunun MTT düzeyleri, D vitamini, büyük partiküllü greft + D vitamini ve küçük partiküllü greft + D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.009$; $p<0.05$).

Büyük partiküllü greft grubunun MTT düzeyleri, D vitamini, büyük partiküllü greft + D vitamini ve küçük partiküllü greft + D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.009$; $p<0.05$).

Küçük partiküllü greft grubunun MTT düzeyleri, D vitamini, büyük partiküllü greft+D vitamini ve küçük partiküllü greft + D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.009$; $p<0.05$).

D vitamini grubunun MTT düzeyleri, büyük partiküllü greft + D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.009$; $p<0.05$).

Diğer gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 18, Tablo 19).



Tablo 19: MTT 48. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi

4.2.3. MTT 72. Saat Bulguları

	1	2	3	4	5
Kontrol	1,783	1,823	1,967	1,88	2,047
D Vitamini	1,644	1,785	1,699	1,515	1,464
Küçük partiküllü greft	1,918	1,973	1,972	1,947	2,392
Büyük partiküllü greft	1,905	1,909	1,911	1,869	2,078
Büyük partiküllü greft + D vit	1,259	1,132	0,726	1,034	0,718
Küçük partiküllü greft + D vit	1,265	1,406	1,035	1,27	1,075

Tablo 20: MTT 72. Saat deney sonuçları

Gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.001; p<0.05**).

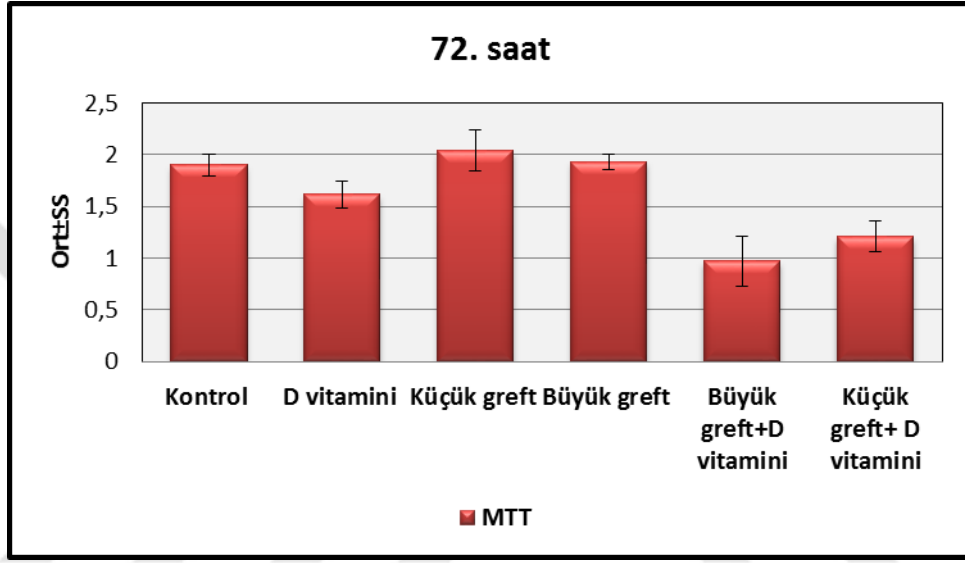
Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Küçük partiküllü greft grubundaki MTT düzeyleri, D vitamini, büyük partiküllü greft+D vitamini ve küçük partiküllü greft+D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**).

Büyük partiküllü greft grubundaki MTT düzeyleri, D vitamini, büyük partiküllü greft+D vitamini ve küçük partiküllü greft+D vitamini gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**).

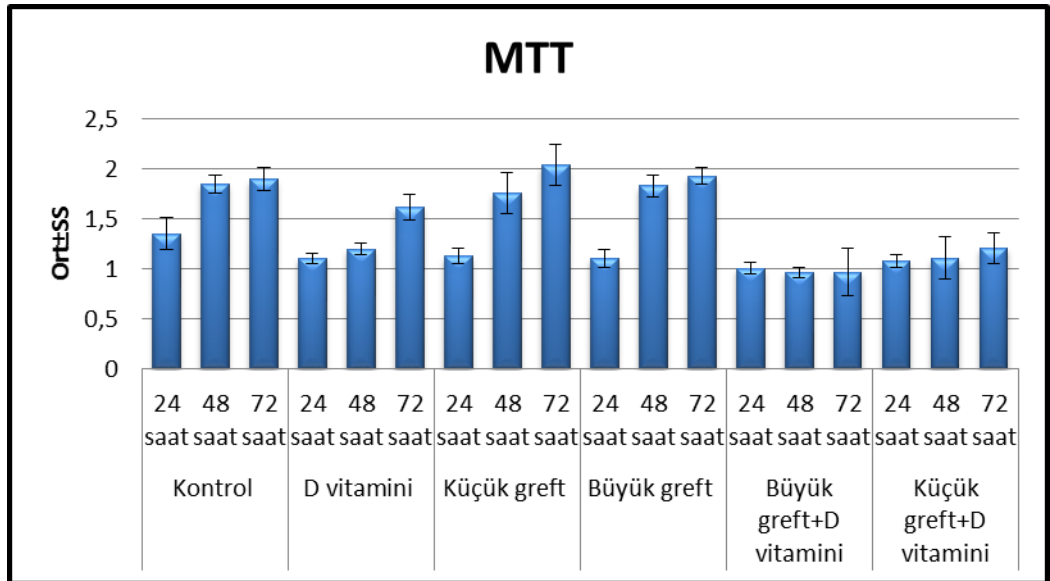
Kontrol grubundaki MTT düzeyleri, D vitamini (p:0.016), büyük partiküllü greft+D vitamini (p:0.009) ve küçük partiküllü greft+D vitamini (p:0.009) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (**p<0.05**).

D vitamini grubundaki MTT düzeyleri, büyük partiküllü greft + D vitamini ($p:0.009$) ve küçük partiküllü greft + D vitamini ($p:0.009$) gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Diğer gruplar arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 20, Tablo 21).



Tablo 21: MTT 72. Saat Bulgularının grafiksel gösterimi



Tablo 22: Deney gruplarının saat dilimlerine göre MTT bulgularının grafiği

Kontrol grubunun saat grupları arasında, MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.009; p<0.05**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24. saatteki MTT düzeyleri, 48. saat ve 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**). 48. saat ve 72. saatteki MTT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

D vitamini grubunun saat grupları arasında, MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.003; p<0.05**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24. saatteki MTT düzeyleri, 48. saat ($p:0.028$) ve 72. saatlerdeki ($p:0.009$) MTT düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**p<0.05**). 48. saat MTT düzeyleri, 72. saatten istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**).

Küçük partiküllü greft grubunun saat grupları arasında; MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.004; p<0.05**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24. saatteki MTT düzeyleri, 48. saat ve 72. saatlerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**). 48. saat ve 72. saatler arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Büyük partiküllü greft grubunun saat grupları arasında; MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (**p:0.004; p<0.05**). Anlamlılığın tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 24. saatteki MTT düzeyleri, 48. saat ve 72. saatlerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (**p:0.009; p<0.05**). 48. saat ve 72. saatler arasında MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Büyük partiküllü greft + D vitamini grubunun saat grupları arasında; ALP ve MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Küçük partiküllü greft + D vitamini grubunun saat grupları arasında; ALP ve MTT düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 22).

5. TARTIŞMA

Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi pratiğinde kullanıma sunulan materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin yanı sıra, biyolojik testlerle de standardize edilmiş olması, birbirleriyle kullanımının uyum göstermesi gerekmektedir.

Diş hekimliğinde kullanılan materyallerin dokular üzerinde yarattığı toksik etkilerinin değerlendirilmesinde in vitro ve in vivo koşullarda yürütülen yöntemler kullanılmaktadır (Kleinsasser ve ark. 2004, Schuster ve ark. 2001, Goldberg 2008). Hayvan deneylerinin pahalı ve zaman alıcı olması, hayvanların beslenme ve bakımıyla ilgili sorunlarla karşılaşılabilmesi, hayvan deneylerinden alınan sonuçların hücre kültür sonuçlarına göre güvenilirliğinin tartışılır olması bilimsel araştırmalarda hayvan deneklerin kullanımını sınırlandırmaktadır. (Smith ve ark. 1988, Rollin 2006)

Günümüzde in vitro hücre kültürü çalışmaları, hayvan deneylerinden önce yapılması gerekli çalışmalar olarak görülmektedir. Bununla birlikte in vitro hücre kültürü çalışmaları, bir çok alanda hayvan deneylerinin yerini almakta ve birçok hayvan çalışmasını gereksiz kılmaktadır. Örneğin yalnızca İngiltere'de bir yıl içinde 2.570.000 hayvan çeşitli deneylerde kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletlerinde ise bir yılda deney amacıyla kullanılan hayvanların sayısı 18-22 milyon arasında değişmiş olmakla beraber, bu rakama 50.000 kedi, 61.000 maymun, 180.000 köpek ve 554.000 tavşan da dahildir. Hayvan hakları savunucuları, hayvan deneylerinin birçoğunun gereksiz yapıldığı yönündeki düşüncelerini, bu deneylerden çıkan sonuçların güvenilemeyecek kadar değişken olmasına ya da hayvanların acı çektirilerek öldürülmelerine değmeyecek kadar önemsiz oldukları savlarına dayandırmaktadırlar. Hücre kültürü çalışmalarının faydası burada ortaya çıkmaktadır. Direkt hayvan deneyi yapmak yerine, günümüzde büyük gelişmeler göstermekte olan moleküler biyolojik tekniklerle yapılmış hücre kültürü çalışmalarından elde edilen bulgulara göre gerekli olduğu durumlarda hayvan deneyi yapılmasıyla hem çok sayıda hayvanın öldürülmesi engellenmiş olmakta hem de standart bir deney ortamının sağlanıp yalnızca denenen maddeye veya yönteme hücrenin verdiği cevabın ölçülebilmesi avantajını sağlamaktadır. (Tomas ve ark. 1997, Akbaba 2000)

İn vitro koşullarda yürütülen test yöntemleri, materyallerin temel biyolojik fonksiyonlar üzerine etkilerinin ve bunlara karşı oluşan hücresel yanıtların

belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. *In vitro* çalışmalar; kontrol edilebilen koşullarda yürütülen ve hüresel toksisitenin mekanizmasını açıklayan, uygulanması kolay araştırmalardır (Hanks 1996).

Hücre kültürü çalışmaları ve test yöntemleri; araştırma koşullarının standart hale getirilebilmesi, insan faktöründen minimum düzeyde etkilenmeleri, çalışma materyallerinin birbiriyle olan ilişkilerini parametrik olarak değerlendirebilmesi ve deneylerin kolayca tekrar edilebilmeleri sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. (Browne 1988, Nahid 2003, Schmalz 1994, Schmalz 1997)

Bu nedenlerin tümü göz önüne alınarak çalışmamızda, D vitamini ve farklı partikül boyutlarındaki greft materyallerinin insan osteoblast hücreleri üzerindeki etkisinin *in vitro* olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir.

Sitotoksosite testlerinde, hücre ölümü en önemli değerlendirme kriterlerinden biridir. Literatürde, sitotoksitenin, süksinil dehidrogenaz (SDH) isimli mitokondriyal enzimin aktivitesinin MTT testi kullanılarak ölçülmesiyle değerlendirildiği çeşitli çalışmalar mevcuttur (Schmalz ve ark. 2002, Vajrabhaya ve ark. 2003, Ergün ve ark. 2007, Schweikl 1996).

Schweikl ve Schmalz, kimyasal olarak farklı yapıda olan diş hekimliği materyalleri üzerinde MTT, nötral kırmızı ve kolorimetrik hücre çoğalmasını ölçen test yöntemlerinin hassasiyetini inceledikleri çalışmalarında; MTT testinin sitotoksosite çalışmalarında kullanılacak güvenilir, etkili ve ekonomik bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (Schweikl 1996).

Bean ve ark., aynı anda çok sayıda örneğin test edilebilmesine olanak sağlayan MTT test yönteminin hücre içi biyokimyasal değişiklikleri göstermesi ve tekrarlanabilir sonuçlara ulaşılabilmesi nedeniyle tercih edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (Bean 1995).

Tolosa ve ark., MTT test yönteminin dünya çapında tanınmış, özellikleri iyi betimlenmiş, kolay kullanılabilir ve ulaşılabilir bir test yöntemi olduğunu bildirmişlerdir (Tolosa ve ark. 2015).

Wataha ve ark., diş hekimliğinde kullanılan alaşımların toksik etkilerini farklı sitotoksosite test yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. Sonuçta, MTT yönteminde kullanılan boyanın, hücre içerisinde kısa sürede metabolize edilebilmesi; verilerin Elisa

okuyucusunda ya da spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi nedeniyle tekrarlanabilir olması; farklı zamanlarda yapılan araştırmalara ait sonuçların karşılaştırılabilmesi gibi nedenlerden dolayı; bu yöntemin diğer sitotoksisite testlerine oranla daha avantajlı olduğunu ifade etmişlerdir (Wataha ve ark. 1992).

Araştırmamızda, enzimatik test yöntemlerinden biri olan MTT testi, sitotoksisite testleri içerisinde tekrarlanabilirliği, uygulama kolaylığı, hızlı sonuç elde edilmesi, materyallerin çok düşük düzeydeki toksisitelerinin bile değerlendirilmesine imkan vermesi gibi avantajları nedeniyle tercih edilmiştir (Nalcaci ve ark. 2004, Thumwanit 1999)

Osteoblast hücrelerinin differansiyasyonlarının gösterilmesinde en sık kullanılan belirteçlerden biri , ALP aktivitesidir. İskelet ALP osteoblast membranında bulunur ve kemik oluşumu esnasında kana salınır, kemik yapımının ölçütüdür. ALP hücre membranlarının ekstrasellüler yüzeyindeki glukozil-fosfatidilinozitol kalıntılarına sıkıca bağlanan bir glukoproteindir. Genellikle, matriksi mineralize olmayan fibroblast gibi hücrelere göre, osteoblastlar yüksek ALP seviyeleri gösterirler. Osteoblastlar için ALP rölatif olarak erken bir diferansiyasyon belirteçidir (Haspolat 2002, Arısu 2004).

İskelet ALP direkt olarak osteoblast diferansiyasyonu ve kemik metabolizması ile bağlantılıdır. ALP bütün dünyada kabul görmüş bir matriks enzimidir ve başlamış osteogenezin analizi için sıklıkla kullanılmaktadır. Osteoblast diferansiyasyonu ve osteojenik özelliğin belirlenmesinde en sık kullanılan parametredir (Cooper ve ark. 2001, Ohbayashi ve ark. 1999).

Albergaria ve ark., osteoblastlar üzerinde LED (Light Emitting Diode) etkisini araştırdıkları çalışmalarında hücre canlılığını ve proliferasyonunu ölçmek için MTT test yöntemini kullanırken, hücrelerin aktifliklerini ölçmek için ALP test yöntemini kullanmışlardır. (Albergaria ve ark. 2014)

Arısu tarafından Nd: YAG lazerlerin farklı frekans ve güçlerde uygulanmasının insan osteoblast hücreleri üzerine olan etkilerinin incelendiği tez çalışmasında hücresel artış ve canlılık MTT testi ile, hücresel aktivite ise ALP ve osteokalsin testleri ile değerlendirilmiştir (Arısu 2004)

Schumacher ve ark., “baghdadite” adlı materyalin osteoblastlara olan etkilerini inceledikleri çalışmada hücre differansiyasyon miktarını ölçebilmek için ALP enzim miktarının ölçümünden faydalanmışlardır (Schumacher ve ark. 2015) .

Subramani ve ark., karbon nanotüp kaplı implant yüzeylerine osteoblastların verdiği tepkiyi inceledikleri in vitro çalışmalarında osteoblast proliferasyonunu ölçmek için MTT, differansiyasyonu ölçmek için ise ALP test yöntemini kullandıklarını bildirmişlerdir. Çalışma sonuçlarında, MWCNT-COOH kaplı yüzeylerin osteoblast hücrelerinde MTT ve ALP değerlerini yükselterek hem proliferasyonu hem farklılaşmayı arttırdığını göstermişlerdir (Subramani ve ark. 2016).

Tong ve ark., TGF- β 1 inkübasyonu yaptıkları ipek fibroin kitosan membranların osteoblast hücrelerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada TGF- β 1 içeren membranın kontrol grubuna göre ALP miktarını daha çok arttırdığını gözlemişlerdir. Osteoblast farklılaşmasını gözlemek için ALP test kitinden faydalanmışlardır. (Tong ve ark. 2016)

Bahsedilen ve benzeri tüm çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da, güvenilirliği kanıtlanmış, erken differansiyasyonun belirteci olarak hücrelerin salgıladığı ALP enziminden faydalanan ALP test yöntemi kullanılmıştır.

İn vitro sitotoksitesite testleri tasarlanırken, testlerin materyalin klinik kullanımını, direk ve indirek temas yollarını taklit etmesi hedeflenir. Direk hücre materyal teması test örneklerinin hücrelerin üzerine yerleştirilmesi ile sağlanır (Xu P. ve ark. 2010, Abdullah D. ve ark. 2002, Monteiro GQ. ve ark. 2010) İn vitro olarak indirek temasın sağlanması ise agar overlay, milipor filtre veya dentin bariyer gibi sert ara bir katmanın hücreler ve materyal arasına yerleştirilmesi ile gerçekleşir (Wennberg A. ve ark. 1979, Terhune WF. ve ark. 1983, Ulker HE. 2009)

Saw ve ark., kompozit materyallerin sitotoksitesitesini L- 929 hücre dizisinde, üç farklı temas yöntemi ile incelemişlerdir. MTT testi sonuçlarına göre direk temas yönteminin indirek temas yöntemine göre daha hassas olduğunu göstermişlerdir (Saw TY. ve ark. 2005).

Tang ve ark., altı çeşit metakrilat polimerinin sitotoksitesitesini, insan oral fibroblast kültüründe, farklı hücre-materyal temas yöntemleri ile incelemişlerdir. İndirek yöntemdeki bariyerin varlığının, hücre canlılığını etkilediğini, rezin

toksitesinde bilinmeyen faktörlerin ortaya çıkmasına neden olduğunu açıklamışlardır. Sitotoksitenin belirlenmesinde direk yöntemin kullanımını önermişlerdir (Tang AT. ve ark. . 1999)

Shaini ve ark. da yaptıkları çalışmada kültüre edilmiş hücrelerin materyal ile direkt temasının in vivo koşulları daha iyi yansıtması sebebiyle daha avantajlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Shaini FJ, 2000).

Çalışmamızda deney modellerinin hedef hücrelerle biyouyumluluğunu değerlendirmek amacıyla in vivo koşulları daha iyi yansıtması sebebiyle direkt temas yöntemi tercih edilmiştir.

Çalışmamızda orijinal hücelere benzer metabolik potansiyele sahip olma, hızlı üreyebilme, genetik farklılık içermeme gibi avantajları nedeniyle insan kaynaklı hFOB 1.19 osteoblast hücre serisi (ATCC, American Type Culture Collection , Rockville, MD, USA- hFOB 1.19) kullanılmıştır.

Sautier ve ark., osteoblast hücrelerinin hem düz hem de pürüzlü yüzeylere bağlanabildiğini bildirmişlerdir. (Sautier JM, 1990) Çalışmamızda insan kaynaklı osteoblast hücreleri hem çalışma yüzeyine hem de deney materyallerine başarılı şekilde bağlanmıştır.

Ca, P ve kemik doku metabolizmasının en önemli fizyolojik düzenleyicilerinden olan D vitamini, serum Ca düzeyinin düzenlenmesinde parathormon ile sinerjik etki göstermekte ve kemik mineralizasyonuna katkıda bulunmaktadır (Onat T. ve ark. 2002).

D vitamininin vücuttaki etkisi temel olarak kemik, bağırsak ve böbrekte görülür. 1,25(OH)₂D₃ kemik dokusunda, kemik mineralizasyonunun oluşması ve devamlılığı için gereken serum Ca ve P düzeylerini düzenlemektedir (Burtis CA ve ark. 2005). Kemik mineralizasyonu ile ilgili fonksiyonlarını ince barsaklardan Ca emilimini arttırarak, böbrekten Ca kaybını azaltarak, gerek duyulduğunda kemik rezorpsiyonunu uyararak sağlar (Onat T. ve ark. 2002, Champe PC. 1997, DeLuca H.F. ve ark. 2007). D vitamini yokluğunda Ca emilimi %10-15 dolayındayken, D vitamini etkisiyle bu oran %30-80'e çıkar (Hatun S. ve ark. 2003).

D vitamininin hem osteoklast hem de osteoblastik hücrelerin farklılaşmasında rolü olduğu bilinmektedir (Hatun S. ve ark. 2003). D vitamininin osteoblastları uyarıcı etkisi vardır. Ayrıca IL-6 sekresyonunu baskılayarak osteoklast aktivitesini yavaşlatır

(Kokino S. ve ark. 2004). Kan Ca düzeyi yükselip, 1,25(OH)2D3 sentezi azaldığında 24,25(OH)2D3 artar ve bu da kemikte hidroksiapatit kristallerinin çökmesini yani kalsifikasyonu sağlayarak plazma Ca homeostazında ve kalsifikasyonun oluşmasında rol oynar (Özsoylu S. 1990).

Woeckel ve ark., D vitamininin osteoblast hücre kültürlerinde mineralizasyonu ve farklılaşmayı arttırdığını göstermişlerdir (Woeckel VJ. ve ark. 2010).

Van der Meijden ve ark., D vitaminin öncül formu ve esas formunu insan osteoblast hücresi üzerinde in vitro olarak çalışmışlar ve sonuç olarak iki D vitamini formunun da insan osteoblast hücrelerinde proliferasyonu azaltırken, farklılaşmayı arttırdığını bildirmişlerdir (Van der Meijden ve ark. 2014).

Manolagas ve ark., D vitamininin osteoblast hücrelerinde ALP aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir (Manolagas SC. ve ark. 1981).

Van Driel ve ark., insan osteoblast hücreleri üzerinde in vitro olarak yaptıkları çalışmada D vitamininin osteoblastlarda ALP düzeylerini arttırarak mineralizasyonu stimüle ettiğini bildirmişlerdir (Van Driel M. ve ark. 2006).

Van den Bemd ve ark., insan osteoblast benzeri MG63 hücreleri üzerinde D vitamini analoglarının etkilerini inceledikleri çalışmalarında, D vitamininin osteoblast benzeri hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Bunun yanında osteoblastların osteopontin aktivitesini inceleyerek D vitamininin osteoblast benzeri hücrelerde farklılaşmayı arttırdığını göstermişlerdir (Van Den Bemd GJ. ve ark. 1995)

Beresford ve ark., kültüre insan osteoblast hücrelerinde D vitamininin ALP, tip 1 kollajen ve hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada, D vitamininin osteoblast hücrelerinde ALP aktivitesini ve tip 1 kollajen üretimini arttırdığını, proliferasyonu ise inhibe ettiğini göstermişlerdir (Beresford JN. ve ark. 1986.)

Matsumoto ve ark., osteoblast benzeri MC3T3-E1 hücrelerinde yaptıkları çalışmada D vitaminin hücrelerdeki ALP düzeylerini stimüle ettiğini ve bunun sonucu olarak mineralizasyonu arttırdığını bildirmişlerdir (Matsumoto T. ve ark. 1991).

Khanna Jain ve ark., insan dental pulpa hücreleri ve insan dental folikül hücrelerinde yaptıkları in vitro çalışma sonucunda D vitaminin bu hücrelerin osteojenik

kapasitelerini arttırdığını ancak hücre sayısı üzerinde olumsuz etki yaptığını bildirmişlerdir. (Khanna Jain R. ve ark. 2010)

Yang ve ark., MLO-A5 olgun osteoblast hücre hatlarında endojenöz ve eksojenöz D vitamininin etkilerini inceledikleri çalışmada, iki D vitamini grubu arasında anlamlı farklılık olmamasına rağmen kontrol grubuna göre osteoblast hücrelerinde proliferasyonda azalma, differansiyasyon ve mineralizasyonda artış gözlemlendiğini bildirmişlerdir (Yang D. ve ark. 2016).

Yang ve ark., MLO-A5 üzerinde yaptıkları bir başka çalışmada D vitamini ile birlikte Ca' nın osteoblast hücreleri üzerine etkilerini incelemişler ve D vitamininin Ca ile birlikte daha fazla olmakla birlikte, mineralizasyonu arttırdığını bildirmişlerdir. Buna bağlı olarak D vitamininin tek başınayken antiproliferatif etkisi mevcutken, Ca ile birlikte verildiğinde bu etkisinin bir nebze de olsa kompanse olduğu gözlemlenmiştir (Yang D. ve ark. 2015).

Jorgensen ve ark., 21-27 yaş arası gönüllü deneklerin kemik iliklerinden izole ettikleri osteoblastlar üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada; deksametazon, BMP-2 ve D vitamininin etkilerini ayrı ayrı ve kombine uygulayarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda insan osteoblast hücrelerindeki ALP aktivitelerinin, D vitamini eklenmiş bütün gruplarda anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur (Jorgensen NR. ve ark. 2004).

Atkins ve ark., insan femur kemiğinin boyun bölgesindeki trabeküler bölümden izole ettikleri osteoblastlar üzerinde yaptıkları çalışmada hem aktif hem inaktif D vitamini formlarını hücre kültürü üzerinde denemişlerdir. Çalışmalarının sonuçlarına göre iki D vitamini metaboliti de hücrelerin osteojenik kapasitelerini ALP aktivitesini artırarak genişletmiştir. Bunun yanında araştırmacılar yine her iki metabolitin de insan osteoblast hücreleri üzerinde antiproliferatif etkileri olduğunu göstermişlerdir (Atkins GJ. ve ark. 2007).

Bizim çalışmamızda da tüm bu literatürlere paralel olarak, D vitamini eklenmiş osteoblast hücreleri MTT testinde 24. 48. ve 72. saatlerin her birinde kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düşük değer göstermişlerdir. Bu sonuç D vitamininin osteoblast proliferasyonunu azalttığını göstermektedir. ALP test sonuçlarında ise D vitamini grubu istatistiksel olarak anlamlı şekilde diğer gruplardan her üç saat grubunda

da yüksek bulunmuştur ki bu sonuç da bize D vitamininin osteoblastlar üzerinde alkalin fosfataz aktivitesini arttırdığı dolayısıyla farklılaşmayı ve mineralizasyonu arttırdığını göstermektedir. D vitamini eklenmiş osteoblast grubunun deney sonuçları literatür ile paralellik göstermektedir.

Kemik defektlerinin tamirinde biyoyumlu ve hızlı revaskülerize olmalarından dolayı otojen kemik greftlerinin kullanılması altın standart olmakla birlikte, otojen greftin elde edilmesindeki zorluk, ikinci bir cerrahi operasyon alanına ihtiyaç duyulması, istenilen miktarda greftin her zaman temin edilememesi, operasyon sonrası morbidite, ağrı gibi komplikasyonlar bu greftin kullanımını kısıtlamaktadır. Bundan dolayı diğer greft türlerinin kullanımı ve kombine tedavilerle etkinliklerinin artırılması gündeme gelmektedir (Banwart 1995, Ezirganlı ve ark. 2013, Göğüş ve ark. 2001, Heary ve ark. 2002, Younger 1989).

Otojen greftlerde miktar yönünden her zaman sınırlanma mevcuttur. Otojen greftlerde alınan bölgelerde % 8–25 arasında değişen oranda enfeksiyon, ağrı, kanama ve sinir zedelenmesi gibi komplikasyonlar rapor edilmiştir (Gazdag ve ark. 1995, Khan 2000). ABD’ de yılda ortalama 500 bin otojen greft alınmakta ve diğer ülkelerde de bunun iki katı kadar operasyon yapılmaktadır. Maliyet faktörü sebebiyle otojen grefte alternatif olan kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da araştırmacıları ve medikal firmalarını ideal greft üretimine yöneltmiştir. Bu durumda otojen greftlere alternatif olarak heterogreftler ve allogreftler geliştirilmiştir (Khan 2000).

Kaya ve ark., ksenogreftler ile alloplastik sentetik greftlerin osteogenezis üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, greft uygulanan kemik kavitesindeki osteogenezisin kontrol grubundaki osteogenezise kıyasla daha başarılı olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanında aynı çalışma alloplastik sentetik greft materyallerinin, ksenogreftlere göre biyolojik uyumlarının daha iyi olduğu göstermiş, alloplastların maksillofasial cerrahi alanında daha sık kullanımları açısından çalışmaların devam etmesi gerektiğini vurgulamışlardır. (Kaya ve ark. 1999)

Otojen greftlerin ardından gelebilecek ideal greft materyaline ulaşma çabaları, sentetik greft materyalleri grubu içinde yer alan hidroksiapatit ve β -trikalsiyum fosfat üzerinde çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Bu iki materyalin her biri tek başına

greft materyali olarak kullanılmasına karşın, çalışmamızda ikisinin karışımı yani β -trikalsiyum fosfat/hidroksiapatit materyali kullanılmıştır (CompactBone S, Dentegris, (Germany)). Karışımın % 40' ını oluşturan β -trikalsiyum fosfat 1920' li yıllardan beri kemik grefti olarak kullanılmaktadır (Moore ve ark. 2001). β -TCP' in porlu yapısı kemiğin trabeküler yapısını taklit eder tarzda olup, porlar birbiriyle bağlantılıdır. Porların arası yeni kemik gelişimini stimüle edecek boyutta olup, bu porların büyüklüğü 1-1000 μ m arasında değişmektedir. Çalışmamızda kullandığımız β -TCP porları 200-800 μ m arasındadır. Bu por büyüklüğü optimal sellüler penetrasyonu ve vaskülarizasyonu desteklerken, implantın kemiğe entegrasyonunu güçlendirmektedir (Erbe 2000).

Bu doğrultuda Gazdag ve ark., seramik yapı içindeki porların, osteokondüksiyon için optimum 200-1000 μ m büyüklüğünde olması gerektiğini rapor etmişlerdir (Gazdag 1995). β -TCP defekte yerleştirme sırasında istenildiği gibi manüple edilebilir. Bu tür manüplasyonlar porların yapısında bir değişikliğe yol açmamaktadır. Tüm seramik greftlerde olduğu gibi β -TCP' ında osteoindüktif özelliği yoktur. β -TCP, basınç kuvvetine spongioz kemiğe göre daha dayanıklı iken, gerilme kuvvetine karşı verdiği cevap ise spongioz kemik ile yaklaşık olarak aynıdır

Çalışmamızda kullanılan materyalin % 60' ını oluşturan HA ise $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ formülasyonunda olup, 1970' li yıllardan beri oral ve maksillofasiyal cerrahide greft materyali olarak kullanılmıştır. HA sistemik toksisiteye neden olmayıp, aynı zamanda allerjik ve karsinojenik değildir. Kırılgan yapısı nedeniyle günümüzde daha çok aktif kuvvet gelmeyen defekt bölgelerinde tercih edilmektedir. Mükemmel derecedeki biyouyumluluğu ile dikkat çeken HA, defekt içinde kemiğe adapte edilerek yerleştirildiği zaman arada fibrotik doku oluşmaksızın yeni gelişen kemik yapısı içinde kalır (Pecora ve ark. 1998, Najjar ve ark. 1991).

Cameron ve ark., köpek femurlarında oluşturdukları 8 mm' lik defektlere trikalsiyum fosfat (TCP) uygulandıktan sonra kemik oluşumunun 3-6 hafta arasında başladığını, TCP' nin doku uyumlu bir biyomateryal olması sebebiyle bu materyale karşı iltihapsal cevabın oluşmadığını rapor etmişlerdir (Cameron HU, 1977).

Biyoseramik ve kalsiyum fosfat kaynaklı materyallerin önemli avantajlarından biri [(hidroksiapatit, mercan (coral) hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat)] kemik tamirinde büyüme faktörleri ile kombine kullanılabilmeleri ve biyouyumlu olmalarıdır (Lieberman JR, 2002).

İçten, 6 köpek çenesinde TCP' nin, yeni kemik oluşumu hızına etkisini deneysel ve histopatolojik olarak incelemiştir. Çalışma sonucunda TCP' nin doku ile uyumluluğu tam bulunmuş; yabancı cisim reaksiyonu ya da inflamatuvar reaksiyona rastlanmamıştır (İçten O, 1987).

Karaca, kemik iyileşme hızını değerlendirmek amacıyla kobaylarda yaptığı çalışmada TCP kullanmış; bu materyalin doku ile çok uyumlu olduğunu, iltihabi ya da yabancı cisim reaksiyonuna sebep olmadığını belirtmiştir (Karaca İR, 1990).

Yazawa ve ark., tavşanlarda yaptıkları araştırmada TCP kullanmışlar ve bu maddenin yabancı cisim reaksiyonu göstermediğini ifade etmişlerdir (Yazawa M, 2004).

Suba ve ark., köpekler üzerinde yapmış oldukları çalışmada β -TCP ve TZP(trombositten zengin plazma)'yi kullanmış ve TCP' nin doku ile tam uyumlu olduğunu rapor etmişlerdir (Suba Z, 2004).

Kovács ve ark., köpek mandibulaları üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada β -TCP ve TZP kullanmışlardır. 6. ve 12. hafta sonunda yaptıkları incelemeler sonucunda materyallerin dokular tarafından iyi tolere edildiklerini ve toksik reaksiyon oluşturmadıklarını ifade etmişlerdir (Kovacs K, 2005).

Wiltfang ve ark., araştırmalarında 39 hastaya β -TCP ve TZP ile uygulanan sinüs lift operasyonu sonrası 6. ayda yapılan biyopsiler neticesinde partiküller çevresinde yabancı cisim reaksiyonu izlenmediğini belirtmişlerdir (Wiltfang J, 2003).

Velich ve ark., β -TCP ve TZP' yi sinüs lift operasyonlarında kullanmışlar, sonuçta yabancı cisim reaksiyonu ve inflamatuvar olaylara rastlamamışlardır (Velich N, 2004).

Tüm bu literatürler eşliğinde çalışmamızda farklı partikül boyutları kullanılmak üzere biyoyumluluğu kanıtlanmış sentetik biyoseramik greft materyali olan β -trikalsiyum fosfat/hidroksiapatit grefti (CompactBoneS, Dentegris, (Germany)) kullanılmıştır.

Gregorie ve ark., yüzey özelliklerinin hücrelerin proliferasyonuna büyük bir etkisi olmadığını fakat greft materyallerinin topografisinin osteoblast hücrelerinin şekil ve oryantasyonunu belirlediğini rapor etmişlerdir (Gregorie M, 1990).

Uchida ve ark. greft materyallerinin porozitesinin ve gren büyüklüklerinin osteoblast hücrelerinin proliferasyonunda etkili olduğunu belirtmişlerdir (Uchida A, 1987). Bizim çalışmamızda da büyük partiküllü greft materyali ile temas eden osteoblast hücrelerin ALP oranlarının küçük partiküllü greftlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmasa da sayısal değer olarak daha yüksek bulunmuştur. ALP oranlarının daha yüksek olması dolayısıyla büyük partiküllü greft materyallerinin, küçük partiküllü greftlere göre osteoblast hücrelerin farklılaşmalarına daha çok katkıda bulunduğunu göstermiştir. Büyük partiküllü greftlerin, yüzey alanlarının daha büyük olmasının, osteoblast farklılaşması için elverişli ortam yaratmalarının bu sonucu ortaya çıkardığını düşünmekteyiz.

Pioletti ve ark., kalsiyum fosfat greft materyallerinden 100 μ ' dan küçük partiküle sahip olanların osteoblast proliferasyonunu ve ALP aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra küçük partiküllerin osteoblastların canlılığını da olumsuz etkilediklerini belirtmişlerdir (Pioletti DP, 2000). Çalışmamızda ise bu bulgudan farklı olarak istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasına rağmen, MTT testi göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede küçük partiküllü greftle temas eden osteoblast hücrelerinin , büyük partiküllü greftle temas eden osteoblast hücrelerine göre canlılığının ve sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. Büyük partiküllü greftlerin daha fazla fosfat iyonu salması ve fosfat iyonunun hücre proliferasyonunu azaltması nedeniyle bu sonucun ortaya çıktığını düşünmekteyiz. Alkalen fosfataz aktivitesi sonucu ise literatürle (Pioletti DP, 2000) aynı yönde olup büyük partiküllü greftle temas eden osteoblast hücrelerinde alkalen fosfataz aktivitesi ve dolayısıyla osteoblastların farklılaşmaları ile osteojenik kapasiteleri daha fazladır.

Jin Woo Nam ve ark., tavşan kraniyumunda demineralize dentin matriks greftinin farklı partikül boyutlarındaki formlarında kemik iyileşmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Histomorfometrik ölçümler sonucu küçük partikül boyutlu greftlerin kemik iyileşmesi yönündeki etkilerinin daha üstün olduğunu göstermişlerdir. (Jin Wo Nam ve ark. 2016).

Melloning ve ark., farklı partikül boyutlarındaki dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftlerinin kemik gelişimi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında küçük partikül boyutlarındaki allogreftlerin kemik rejenerasyonunda daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Melloning JT. 1984)

Bizim çalışmamızda ise 72. saat sonunda küçük partiküllü greft materyallerinin ALP düzeyleri sayısal olarak daha düşük bulunmuştur. MTT testi ise küçük partiküllü greftle inkübe edilmiş hücrelerin sayısal olarak büyük partiküllü greftle inkübe edilmiş hücrelerden daha fazla proliferasyon göstermektedir. Literatürle, çalışmamız arasındaki bu farklılıklar farklı türden greft materyallerinin kullanımına bağlanmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, ilk 24 saatte küçük partiküllü ve büyük partiküllü greft materyallerinin ALP düzeyleri artış gösterirken daha sonraki 48. ve 72. saatlerde ALP düzeyleri kontrol grubundan daha düşük olarak bulunmuştur. Bunun sebebinin, erken dönemde ilk 24 saat içinde greft - hücre etkileşimi az iken, ilerleyen saatlerde hücre-greft etkileşiminin artması olarak düşünmekteyiz. Aynı şekilde hücre-greft etkileşiminin ilk 24 saatte etkisiz olmasından dolayı, ilk 24 saat MTT sonuçları kontrol grubuna göre düşüken ilerleyen saatlerde hücre-greft etkileşimi arttıkça , sayısal olarak MTT değerlerinin kontrol grubuna göre yükseldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre küçük veya büyük partiküllü greft materyalleri tek başlarına osteoblastlar ile muamele edildiğinde hücre proliferasyonunu artırırken, hücrelerin osteojenik kapasitelerini azaltmaktadırlar.

Literatürde farklı partikül boyutlarında biyoseramik greftlerin ve hatta başka tür greftlerin, osteoblastlar ve kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini inceleyen çalışma sayısının çok az olmasından dolayı sonuçlar halen tartışmalıdır. Bu konu daha ileri in vitro, hayvan deneyleri ve in vivo çalışmalarla mutlaka desteklenmelidir.

D vitamininin çalışmalarla kanıtlanmış ve aynı bölüm içinde daha önce bahsettiğimiz üzere, osteoblastlar üzerindeki farklılaşmayı artırıcı, osteojenik özellikleri yükseltici ve mineralizasyona katkı yapıcı etkilerinden dolayı bu çalışma için greft materyallerine taşıyıcı olarak kullanılması fikrini doğurmuştur.

Hsi-Hong ve ark., köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada mandibulada 4 mm çapında ve 6 mm uzunluğunda defektler açmışlardır. Deney hayvanlarını iki gruba ayıran araştırmacılar, ilk grubun defektlerine yalnızca alloplast greft ile ogmentasyon yaparken, diğer gruba D vitamini ile inkübe edilmiş alloplast greft ogmentasyonu uygulanmıştır. Lokal olarak uygulanan D vitamininin kavitede kemik rejenerasyon miktarı sadece alloplast greft bulunan defekte göre artmış olarak bildirilmiştir (Hsi-Hong ve ark 2015).

Gogolewski ve ark., koyunlar üzerinde yaptıkları araştırmalarında bikortikal iliak kemik defektlerinde poliüretan kemik materyallerinin etkisini incelemişlerdir. Araştırmada bir grup defekte poliüretan kemik greftiyle beraber lokal D vitamini uygulaması yapılmıştır. Araştırmacılar alışma sonucunda boş bırakılan kontrol grubu defektinde kemik iyileşmesi gözükmezken, en iyi kemik iyileşmesinin Ca ve D vitamini eklenmiş greftli kaviterlerde olduğunu bildirmişlerdir (Gogolewski ve ark. 2006).

Kawakami, deneysel olarak diş hareketi oluşturulan ratlarda, diş çevresine lokal olarak uyguladığı D vitamini sonucunda, D vitamini uygulanmayan gruba göre diş hareketinden sonra diş çevresindeki kemik oluşumunun daha hızlı ve daha fazla olduğunu bildirmiştir (Kawakami M. 2004).

Liu ve ark., ratlarda açtıkları mandibular defektlerde D vitamininin kemik yapımındaki lokal etkisini araştırmayı hedeflemişlerdir. Bunun için dört gruba ayırdıkları defektlerden ilkini boş bırakmışlar, ikincisine yalnızca kollajen membran koymuşlar, üçüncüsüne polidopamin kaplı kollajen membran koymuşlar ve sonuncusuna D vitamini inkübe edilmiş polidopamin kaplı kollajen membran koymuşlardır. Çalışmanın sonucunda D vitamini inkübe edilen membranın diğer gruplardan önce, yaklaşık 2 hafta içinde rezorbe olarak yerini yeni kemiğe ve kemik iliğine bıraktığı gözlenmiştir (Liu ve ark. 2015).

Bizim alışmamızda da D vitamini inkübe edilmiş greft gruplarının, D vitamini inkübasyonu yapılmamış olan greft gruplarına göre 48 ve 72. saatlerde ALP düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur. ALP değerlerindeki bu artış biyoseramik greftlerin D vitamini ile birlikte kullanıldıklarında, yalnız greft kullanımına göre osteoblast farklılaşmasını arttırdığını, osteojenik kapasiteyi yükselttiğini göstermektedir. Sonuç olarak literatürlere paralel şekilde osteoblastlar üzerinde, greft materyalleri D vitamini inkübasyonu altındayken daha etkili olmuşlardır. D vitamininin osteoblastlar üzerindeki differansiyasyonu ve osteojenik kapasiteyi arttırma etkisinin bu sonucu ortaya çıkardığını düşünmekteyiz. 48. saatten 72. saate geçerken ALP düzeylerinde bir miktar düşüş olduğu saptanmıştır. ALP düzeyindeki bu düşmenin sebebi olarak D vitamininin hücreler tarafından kullanılmasına bağlı olarak, 72. saate doğru kültür ortamında miktarının azalmasından kaynaklanmış olabileceği düşünölmüştür.

D vitamini inkübasyonu altında bulunan greft gruplarından büyük partiküllü ve küçük partiküllü greft gruplarını karşılaştıracak olursak, büyük partiküllü greftlerin D vitamini inkübasyonu altındayken de sayısal olarak daha yüksek ALP sonuçları verdiği gözlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmasa da büyük partiküllü greftlerin küçük partiküllü greftlere göre osteojenik kapasiteyi daha da arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Bunun sebebi olarak büyük partiküllü greftlerin büyük yüzey alanlarının farklılaşmaya olumlu etkisinin ve D vitamininin osteojenik kapasiteyi artırma etkisinin bileşkesi olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde D vitamininin greft için taşıyıcı olarak kullanılması konusunda yeterli in vitro ve in vivo çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın sonuçları D vitamininin taşıyıcı olarak kullanılmasının, kemik rejenerasyonunu arttırdığı yönündedir. Literatürde bildirilen D vitamininin osteoblastlar üzerindeki pozitif etkisi ve çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlar bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılmasının klinik uygulamalara daha fazla katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

1) D vitamini grubunun, 24. 48. ve 72. saat ALP değerleri, diğer grupların ALP değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Buna göre D vitamini, osteoblast hücrelerinin differansiyasyon yeteneklerini ve osteojenik kapasitelerini arttırmaktadır.

2) D vitamini grubunun, 72. saatteki ALP değerleri 24. saatteki ALP değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu sonuca göre zaman geçtikçe D vitamininin osteoblast hücreleri üzerindeki differansiyasyon yeteneklerini ve osteojenik kapasitelerini geliştirme etkisi artmaktadır.

3) D vitamini grubunun, 48. ve 72. saatteki MTT değerleri kontrol, büyük partiküllü greft, küçük partiküllü greft gruplarının 48. ve 72. saatteki MTT değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Bu sonuca göre D vitamini osteoblast proliferasyonu üzerine olumsuz etki yapmaktadır.

4) Küçük partiküllü ve büyük partiküllü greft grubunun, 24. saatteki ALP değerleri kontrol grubundan yüksek iken, 48. ve 72. saatteki ALP değerleri kontrol grubundan daha düşüktür. Bunun sebebinin, erken dönemde greft-hücre etkileşimi azken 24. saatten sonra bu etkileşimin artması ve biyoseramik greftin ortama saldığı fosfat iyonlarının hücrelerin differansiyasyon yeteneklerini azaltmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

5) Küçük partiküllü greft grubunun 72. saat MTT değerleri, büyük partiküllü greft grubunun 72. saat MTT değerinden istatistiksel olarak olmasa da sayısal olarak daha büyük bulunmuştur. Buna göre küçük partiküllü greftler, osteoblast proliferasyonunu büyük partiküllü greftlere oranla arttırmaktadır. Büyük partikül boyutlu greftlerin daha fazla fosfat iyonu salması ve fosfat iyonunun hücre proliferasyonunu azaltması nedeniyle bu sonucun ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

6) Büyük partiküllü greft grubunun 72. saat ALP değerleri, küçük partiküllü greft grubunun 72. saat ALP değerinden istatistiksel olarak olmasa da sayısal olarak daha büyük bulunmuştur. Buna göre büyük partiküllü greftler, osteoblast hücrelerinin differansiyasyon yeteneklerini ve osteojenik kapasitelerini arttırmaktadır. Büyük

partiküllü greftlerin yüzey alanlarının daha büyük olmasının osteoblast farklılaşması için elverişli ortam sağlaması nedeniyle bu sonucun ortaya çıktığını düşünmekteyiz.

7) D vitamini ile inkübe edilmiş greft gruplarının, 48. ve 72. saat ALP değerleri, yalnızca greft uygulanmış gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Buna göre D vitamini inkübe edilmiş greft materyalleri, greftlerin tek başlarına uygulanmasına nazaran osteoblast farklılaşmasını arttırmaktadır. D vitaminin osteoblastlar üzerindeki differansiyasyonu ve osteojenik kapasiteyi artırma etkisinin bu sonucu ortaya çıkardığını düşünmekteyiz.

8) D vitamini ile inkübe edilmiş greft gruplarının, ALP değerleri 72. saatte 48. saate göre bir miktar azalma göstermektedir. Bunun sebebi olarak, osteoblast hücrelerinin D vitamini kullanımına bağlı olarak 72. saate doğru D vitamininin ortamdaki uzaklaşması olduğunu düşünmekteyiz.

9) D vitamini ile inkübe edilmiş greft gruplarının, 48. ve 72. saat MTT değerlerinin, yalnızca greft uygulanmış gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Buna göre D vitamini inkübe edilmiş greft materyalleri, greftlerin tek başlarına uygulanmasına nazaran osteoblast proliferasyonunu azaltmaktadır. D vitaminin osteoblastlar üzerindeki proliferasyonu azaltma etkisinin bu sonucu ortaya çıkardığını düşünmekteyiz.

10) D vitamini inkübe edilmiş greft gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda, D vitamini inkübe edilmiş büyük partiküllü greft gruplarının, D vitamini inkübe edilmiş küçük partiküllü greft gruplarına göre ALP değerlerinin 24., 48. ve 72. saatte daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna göre D vitamini inkübasyonu altındayken, büyük partiküllü greftler küçük partiküllü greftlere oranla hücre differansiyasyonunu ve osteojenik kapasiteyi daha fazla arttırmaktadır. Bunun nedeninin büyük partiküllü greftlerin yüzey alanlarının daha geniş olması ile birlikte D vitamininin osteojenik kapasiteyi arttırmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. (1995) Healing of experimentally created defects: A review. *British J MaxilloFac Surg.*;33:312-318.

Abdullah D, Ford TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. (2002) An evaluation of accelerated portland cement as a restorative material. *Biomaterials*; 23(19): 4001-10.

Ackermann KL. (1999) *The Sinus Bone Graft*, Jensen OT, Chicago, Quintessence Publishing.1-45

Adem, A. (2007). Yağlı kalsiyum hidroksit süspansiyonun ve ksenogreft + trombosit zengin plazma (TZP) karışımının deneysel olarak kemik defektlerinde uygulanmasının kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak histolojik değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, 109s.

Adorini, L., Giarratana, N., ve Penna, G. (2004) Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol.* 16(2): p. 127-134.

Akay, T. (2001). Genel histoloji. Palme yayıncılık. Ankara. 126-49.

Akbaba, G., Sunay, Ç. (2000)Hayvan Deneylei Yararsız ve Acımasız Çalışmalar mı, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? *Bilim ve Teknik*.

Alfaro, F.H. (2006). *Bone Grafting in Oral Implantology Techniques and Clinical Applications*, Quintessence Publishing Co. Inc., London, 9–15p.

Alpar, K. (1980). *Ortopedi İlkeleri ve Uygulamaları*. Yargıçoğlu Matbaası, Ankara

Alpar, K. (1980a). *Ortopedi İlkeleri ve Uygulamaları: Kemiğın Fiziyojisi ve Mineralizasyonu*. Yargıçoğlu Matbaası, Ankara, 100-53.

Alpar, K. (1980b). *Ortopedi İlkeleri ve Uygulamaları: Kemiğın Histolojisi ve Histopatolojisi*, Yargıçoğlu Matbaası, Ankara, 33-61

Archer WH. (1975) *Homogeneous (allogenic) Implants*. *Oral and Maxillofacial Surgery*. 5th edn. Philadelphia: WB Saunders Co. 11: 1512-1518

Arısu, D.H. (2004) Nd YAG lazerlerin Farklı Frekans ve Güçlerde Uygulanmasının İnsan Osteoblast Hücreleri Üzerindeki Etkisinin İncelenmesi. Dış Hastalıklar ve Tedavisi Programı Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bil.Enstitüsü, Ankara

Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. (2004) Vitamin D2 is much less effective than Vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab*; 89: 5387–5391.

Atas A., Çakmak A., Soran M. (2008) D Vitamin Metabolizması ve Rikets Hastalığı. *Bakırköy Tıp Dergisi*. 4: 1–7

Ballı, B. (2004). Kemik dokusu, iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler, Bitirme Tezi, İstanbul Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi, İstanbul, 70s

Bancroft JD, Stevens A. (1996): *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4. Edition Churchill Livingstone, New York, Chapter 15; p.309-339.

Banwart, J.C., Asher, M.A. and Hassanein, R.S. (1995). Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: A statistical evaluation, *Spine*. 20, 1055–1060.

Baver, T.W., Muschler, G.F. (2000). Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*, Feb; 371, 10-27.

Bean TA, Zhuang WC, Tong PY, Eick JD (1995) Chappelow CC, Yourtee DM. Comparison of tetrazolium colorimetric and 51cr release assays for cytotoxicity determination of dental biomaterials. *Dent Mater* 11(5): 327-331.

Becker, K. L. (1990). *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. J.B. Lippincott Co, Philadelphia

Beresford JN, Gallagher JA, Russell RG (1986) 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and human bone-derived cells in vitro: effects on alkaline phosphatase, type I collagen and proliferation. *Endocrinology* 119: 1776–1785.

Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang HL. (2006) Vertical bone augmentation: Where are we? *Implant Dent*. Sep; 15(3):219-28

Bikle, D. (2009) Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 94(1): p. 26-34.

Bloomquist DS, Turvey TA (1992) Modern Practice in Orthogantic and Reconstructive Surgery, Saunders, Volume 2, 831-851.

Bouillon R, Carmeliet G, Daci E, Segaert S, Verstuyf A (1998) Vitamin D metabolism and action. *Osteoporos int*; 8: 13-19.

Bouillon R, Moody T, Sporn M, Barrett JC, Norman AW. (2005) NIH deltanoids meeting on vitamin D and cancer conclusion and strategic options. *J Steriod Biochem Mol Biol* 97: 3-5.

Bowers, G.M., Chadroff, B., Carnevale, R., Mellonig, J., Corio, R., Emerson, J., Stevens, M. and Romberg, E. (1989). Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in humans. Part III, *J Periodontol*, 60, 683–693.

Branemark PI. (1983) Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent*. 50(3):399-410

Branemark, P-I., Breine, U., Adell, R., Hansson, B.O., Lindström, J., Olsson, A. (1969). Intraosseous anchorage of dental prostheses. 1. Experimental studies. *Scand Journal Plast Reconstr Surg*, 3(2), 81-100.

Branemark, P-I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindström, J., Hallen, O., Ömann, A. (1977). Osseo-integrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand Journal Plast Reconstr Surg*, (suppl 16)

Browne RM. (1988) The In Vitro Assessment of the Cytotoxicity of Dental Materials--Does It Have a Role? *Int Endod J* 21: 50-58.

Burtis C.A., Ashwood E.R. (2005) *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler*. Aslan D. 5. Baskı. Ankara. Palme Yayıncılık..

Cameron HU, Macnap I, Pilliar RM. (1977) Evaluation of a biodegradable ceramic. *J Biomed Mater Res* 11: 179-186.

Cantorna, M. T., Zhu, Y., Froicu, M., ve Wittke, A. (2004) Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D₃, and the immune system. *Am J Clin Nutr*, 80(6 Suppl): p. 1717S-1720S.

Cantorna, MT. (2000) Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *PSEBM*; 223: 230-233.

Caranza, F. A., Newman, M. G. (1996). *Clinical Periodontology*. 8. Baskı, W.B. Saunders Company, USA.

Champe P.C., Harvey R.A. (1997) *Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden Biyokimya*. Toklugil A., Dirican M., Ulukaya E. 2.Baskı.İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi..

Chiu, K. C., Chu, A., Go, V. L., ve Saad, M. F. (2004) Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 79(5): p. 820- 825.

Cimpan MR, Matre R, Cressey LI, Tysnes B, Lie SA, Gjertsen BT ve ark. (2000). The effect of heat- and auto-polymerized denture base polymers on clonogenicity, apoptosis, and necrosis in fibroblasts: denture base polymers induce apoptosis and necrosis. *Acta Odontol Scand* 58(5): 217-28.

Cooper, L.F., Haris, C.T., Bruder, S.P., Kowalski, R., Kadiyala, S. (2001) Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis, *J Dent Res*. 80,1,314-20.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. (1999): *Robbin's pathologic basis of disease*. 6. Edition WB Saunders Co, London

Cui, B.C., Cooper, L.F., Yang, X., Karsenty, G., Aukhil, I. (2003) Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ. *Molecular and Cellular Biology*., 23,3, 1004–1013

D. Yang (2015) 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 and extracellular calcium promote mineral deposition via NPP1 activity in a mature osteoblast cell line MLO-A5/*Molecular and Cellular Endocrinology* 412 140–147

D. Yang (2016), Comparison of the biological effects of exogenous and endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the mature osteoblast cell line MLO-A5, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*.

Data, HK., Walker, JA., Tuck, SP. and Varanasi, SS. (2008). The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*;61:577-587

Davis JM (1994) *Basic Cell Culture* Oxford Uni. Press

Delmas, P.D., Eastel, R., Garnero, M.J. (2000) The use of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporosis International*.,11-18.

DeLuca H.F., Plum L.A., Clagett-Dame M. (2007) Selective Analogs of $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ for the Study of Specific Functions of Vitamin D. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 103: 263–268

Develioğlu, H. (2003). Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Fak Derg.*, 6(1), 60-63.

Doyle, A., Griffiths, J.B. (1998) *Cell and tissue culture laboratory procedures in biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd., England.

Duthie RB, Kyle J, Karey LC. (1989) *Scientific Foundations of Surgery*. 4. ed. Heinemann Medikal Books, Londra, p.150-156

Efeoglu, A. (2002). Periodontal tedavide kemik greftleri. *Akademik Dental Dishekimligi Dergisi*, 4(1), 1-13.

Einhorn, T. (1995). *Current Concepts Review: Enhancement of Fracture Healing*. *J Bone Joint Surg Am.*; 77:940-56.

Erbe EM. (2000) Attributes of vitoss synthetic cancellous bone void filler, an ultraporous beta-tricalcium phosphate saccfold (abstract) Presented at: Int Workshop on Bone Substitutes; October 8-10.

Ergün G, Eğilmez F, Uçtasli MB, Yılmaz S. (2007) Effect of light curing type on cytotoxicity of dentine-bonding agents. *Int Endod J*. 40 (3): 216-23.

Ersu B. (2007) İmplant Diş Hekimliğinde kullanılan ağız içi otojen kemik greftleri. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi Cilt: 10 Sayı: 2*

Ezirganlı, Ş., Polat, S., Barış, E., Tatar, İ., Çelik, H.H. (2013). Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation, *Clin Oral İmplants Res*, 24(3), 312-319.

Fauci, Anthony S., (2008) *Harrison's principles of internal medicine / editors, Anthony S. Fauci ... [et al.]*. 17th ed., New York: McGraw-Hill Medical. v. <1-2 >.

Fedde KN. (1992) Human osteosarcoma cells spontaneously release matrix-vesicle-like structures with the capacity to mineralize. *Bone and Mineral* 17(2):145-51.

Feigal RJ, Yeşilsoy C, Messer HH, Nelson J. (1985) Differential Sensitivity of Normal Human Pulp and Transformed Mouse Fibroblasts to Cytotoxic Challenge. *Arch Oral Biol*; 30: 609–613.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I., Alobera Gracia, MA., Canto-Pingarrón, M. and Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*;11:47- 51.

Ferrari S, Bonjour JP, Rizzoli R. (1998) The vitamin D3 receptor gene and calcium metabolism. *Trends Endocrinol Metab*; 9/7: 259-263

Finkemeier, C.G. (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes, *J. Bone Joint Surg Am*, 84, 454–464.

Fonseca R.J, Walker RV. (1991) *Oral and Maxillofacial Trauma*. W B Saunders Company. Vol II : p183

Franz-Odendaal, T.A., Hall B.K., Witten P.E. (2006) How Osteoblasts Become Osteocytes. *Dev. Dyn.*, 235,1, 176-190.

Freshney R.I. (1994) *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. Third Edition. 486 Seiten, Wiley-Liss, a John Wiley and Sons, Inc., Publication. New York, Chichester, Brisbane, Toronto.

G.J. Atkins. (2007) Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: Evidence for autocrine and paracrine activities of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 / *Bone* 40 1517–1528

Garg, K.A. (2004). Bone biology, harvesting, grafting for dental implants: rationale and clinical applications, Quintessence Publishing Co. Ltd., Chicago, 21–33

Garland, C. F., Garland, F. C., ve Gorham, E. D. (1991) Can colon cancer incidence and death rates be reduced with calcium and vitamin D? *Am J Clin Nutr*, 54(1 Suppl): p. 193S-201S.

Gartner LP, James LH. (2000): *Color Atlas of Histology*, 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, Chapter 4, p. 73.

Gazdag, A.R., Lane, J.M., Glaser, D. and Forster, R.A. (1995). Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications, *J Am Acad Orthop Surg*, 3, 1–8.

Gerstner, R. (1971). Tissue cultures of pulpal elements. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, 32: 473-486

Glowacki, J., Altobelli, D., Mulliken, J.B. (1981). Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects, *Calcif Tissue Int*, 33, 71.

Gogolewski S, Gorna K, Turner AS. (2006) Regeneration of bicortical defects in the iliac crest of estrogen-deficient sheep, using new biodegradable polyurethane bone graft substitutes. *J Biomed Mater Res A*. 77: 802–10.

Goldberg M. (2008) In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: a review. *Clin Oral Investig*. 12(1): 1-8.

Goldstein, SA. ve Bonadio, J. (1998). Potential role of direct gene transfer in the Enhancement of fracture healing. *Clin Orthop.*; 154-62

Göğüş, A., Şener, N., Akman, Ş. ve Bilgiç, B. (2001). Kemik defektlerinin iyileştirilmesinde kalsiyum sülfat ve kalsiyum hidroksiapatitin karşılaştırılması, *Hacettepe Ortopedi Derg*, 11, 49–54.

Grageda E. (2004) Platelet-Rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol, *Implant Dentistry* 13 (4):301–308

Granner DK. (1996) Hormones that regulate calcium metabolism. RK Murray, DK Granner, PA Mayes, VW Rodwel Harper's *Biochemistry*. 20th ed., London: Appleton-Lange 539-546.

Grant, W. B. (2006) Lower vitamin-D production from solar ultraviolet-B irradiance may explain some differences in cancer survival rates. *J Natl Med Assoc*. 98(3): p. 357-364.

Guarrieri R, Pecora G, Fini M, Adlini NN, Giardino R, Orsini G. (2004) Medical grade Calcium Sulfate Hemihydrate in healing of human extraction sockets. Clinical and Histological observations at 3 months. *J Clin Periodontol* 75:902-908.

Güven, O., Keskin, A. (1996). *Çağdaş Preprotetik Cerrahi*. Irmak Matbaacılık, Ankara

Haas R. Donath K, Fodinger M, Watzek G. (1998) Bovine hydroxyapatite for maxillary sinus grafting: comparative histomorphometric findings in sheep. *Clinical Oral Implants Research*. 9:107–116.

Hadjidakis, DJ. ve Androulakis, II. (2006). Bone Remodeling. *Ann NY Acad Sci*; 1092:385–96.

Hahn, H. J., Kuttler, B., Mathieu, C., ve Bouillon, R. (1997) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 reduces MHC antigen expression on pancreatic beta-cells in vitro. *Transplant Proc.* 29(4): p. 2156-2157.

Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. (1996) In Vitro Models of Biocompatibility: A Review. *Dent Mater* 12: 186-193.

Harris S. (2002) Can vitamin D supplementation in infancy prevent type 1 diabetes? *Nutr Rev* 60: 118-21.

Harrison MA, Rae IF. (1997) *General techniques of cell culture.* Cambridge: Cambridge University Press

Harrison, J. R., Petersen, D. N., Lichtler, A. C., Mador, A. T., Rowe, D. W., ve Kream, B. E. (1989) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits transcription of type I collagen genes in the rat osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. *Endocrinology.* 125(1): p. 327-333.

Haspolat, K., Söker, M. (2002) Kemiğe Ait Biyokimyasal değerler ve onkoloji. *Dicle Tıp Dergisi.*, Diyarbakır

Hatun S., Bereket A., Çalıkoğlu A.H. (2003) Günümüzde D Vitamini Yetersizliği ve Nütrisyonel Rikets. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* 46: 224–241

Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Whitfield GK. (1997) The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *Endocrinol.* 154 Suppl:57-73.

Heary, R.F., Schlenk, R.P., Sacchieri, T.A., Barone, D. and Brotea, C. (2002). Persistent Iliac Crest Donor Site Pain: Independent Outcome Assessment, *Neurosurgery.* 50, 510–516.

Helfrich, M.H., Ralston, S.H. (2003) *Bone research protocols,* Humana Press Inc., Totowa.

Hobo S, Ichida E, Garcia LT (1990) *Osseointegration and occlusal rehabilitation.* Quintessence Publ. Co. Ltd. Tokyo

Holick MF. (1994) McCollum Award Lecture 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr*; 60: 619-630.

Holick MF. (1995) Noncalcemic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D and clinical applications. *Bone*; 17(2): 107-111.

Holick, M. F. (2010) Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 39(2): p. 381-400.

Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. (1996) Role of bone substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 324:55-65.

Hollinshead HW, Rosse C. (1985) *Textbook of Anatomy*. 4th ed. Harper and Row Publishing Philadelphia, p.24-30.

Holst-Hansen C, Brünner N. (1998) MTT- Cell Proliferation Assay, In *Cell Biology*. 2nd Ed. New York: Academic Press.

Hongrui Liu. (2015) Local administration of calcitriol positively influences bone remodeling and maturation during restoration of mandibular bone defects in rats. *Materials Science and Engineering C* 49 14–24

Horch, H.H., Sader, R., Pautke, C., Neff, A., Deppe, H., Kolk, A. (2006). Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35(8), 708-713.

Hsiang-Hsi Hong, Tzung-Hai Yen , Adrienne Hong , Ting-An Chou (2015) Association of vitamin D3 with alveolar bone regeneration in dogs. *J. Cell. Mol. Med*. Vol 19, No 6, pp. 1208-1217

Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. (2001) Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 358: 1500-1503.

Issa LL, Leong GM, Eisman JA. (1997) Molecular mechanism of vitamin D receptor action. *Inflamm res* 47:451-475.

İçten, O. (1987) Trikalسيومfosfatın Yeni Kemik Yapımına Etkisinin Deneysel İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara.

J.D. Silva Albergaria, B. Machado Bertassoli, C.M. Queiroz-Junior, E. Cristina Jorge, G.A. Borges Silva, K.L. Melo Maltos ve ark. (2014) Effects of LED in osteoblast cell culture as an indicator of its usefulness in periodontal disease management, *Microscopy: advances in scientific research and education*, 291-298.

Jørgensen, R., Henriksen, Z., Sørensen, O.H., Civitelli, R. (2004). Dexamethasone, BMP-2, and 1, 25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids* 69, 219–226.

Junguera LC, Carneiro J, Kelly RO. (1998): *Temel Histoloji* 8. Baskı İstanbul: Barış Kitapevi Ltd. Şti: p.132-151.

Junquera LC, Carneiro J. (2003): *Basic Histology*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, p.144-146

Kahnberg, K.E. (2005) *Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants*, Blackwell Munksgaard, Blackwell Publishing, Sweden, 2-11.

Karaca, İ.R. (1990) *Trikalsiyumfosfat, Hidroksilapatit ve Pyrostun Yeni Kemik Yapımına Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi*, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara.

Karadavut Kİ, Başaran A, Çakçı A. (2002) Osteoporoz tedavisinde vitamin D'nin yeri. *TJ Geriatrics* 5: 115-122.

Karen van der Meijden, Paul Lips, Marjolein van Driel, Annemieke C. Heijboer, Engelbert A. J. M. Schulten ve ark. (2014) Primary Human Osteoblasts in Response to 25-Hydroxyvitamin D3, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and 24R,25-Dihydroxyvitamin D3. *PLOS ONE*. Volume 9. Issue 10. 1-11.

Kato S, Sekine K, Matsumoto T, Yoshizawa T. (1998) Molecular genetics of vitamin D receptor acting in bone. *J Bone Miner Metab* 16: 65-71

Kawakami M, Takano-Yamamoto T. (2004) Local injection of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 enhanced bone formation for tooth stabilization after experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Metab*. 22: 541–6.

Kaya B., Ünlü G. (1999) Kistektomi ve apikal rezeksiyon operasyonlarındaki kemik defektlerinde sentetik alloplastlar ile ksenojenik greftlerin uygulanması Dicle Tıp Dergisi. 26 (4):103-116.

Kayaalp, O. (1998) Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt- 2, 1026-1057, Feryal Matbaacılık San. Tic. Ltd., Ankara

Khan, S.N., Tomin, E., Lane, J.M. (2000) Clinical applications of bone graft substitutes, Orthop Clin North Am, 31, 389–398.

Khanna-Jain R , Vuorinen A , Sándor GK , Suuronen R , Miettinen S (2010) Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. J Steroid Biochem Mol Biol 122:133–141

Kierszenbaum AL. (2002): Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 1st ed. Mosby Inc., St.Louis, Chapter 5, p.131

Kleinsasser NH, Wallner BC, Harreus UA, Kleinjung T, Folwaczny M, Hickel R ve ark. (2004) Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. J Dent 32(3): 229-34.

Kneser, U., Schaefer, D. J., Polykandriotis, E., Horch, R. E. (2006). Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon' s point of view. Journal Cell Mol. Med, 10(1), 7-19.

Kokino S., Pekindil Y., Hakgüder A. (2004) Postmenopozal Kadınlarda Kemik Mineral Yoğunluğu ile D Vitamini ve Diğer Laboratuar Değerlerin Karşılaştırılması. Osteoporoz Dünyasından. 10 (2): 70–73.

Koo WWK, Tsang RC. (2005) Calcium and Magnesium Homeostasis. MacDonald MH, Seshia MMK, Mullet MD. Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn, 6th edition. Philadelphia: Lippincott W&W 847-875.

Kökden, A. ve Türker, M. (1999). Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller, Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Fak Derg, 2, 134–140.

Kruger G. (1984) Textbook of Oral surgery. 6nd edn. St. Louis: The CV Mosby Co.

Kruger GO. (1974) Text book of oral surgery. 1st ed., Saint Louis; The C.V. Mosby Company. 265-278.

Kumar V, Cotran RS (2000) Robbins SL. Temel Patoloji (Basic Pathology çev.). 6. baskı, Nobel-İstanbul 248-252.

Kübler N, Reuther J, Kirchner T, Priessnitz B, Sebald W. (1993) Osteoinductive, morphologic, and Biomechanical Properties of Autolyzed, Antigen-Extacted, Allogenic Human Bone. *J Oral Maxillofac Surg.* 51: 1346-1357

Lappe, J. M., Travers-Gustafson, D., Davies, K. M., Recker, R. R., ve Heaney, R. P. (2007) Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 85(6): p. 1586-1591.

Laurencin CT. (2004) <http://www.emedicine.com/orthoped/topic611.htm>.

Li, Y. C., Amling M., Pirro, A. E., Priemel, M., Meuse, J., Baron, R., ve ark. (1998) Normalization of mineral ion homeostasis by dietary means prevents hyperparathyroidism, rickets, and osteomalacia, but not alopecia in vitamin D receptor-ablated mice. *Endocrinology*, 139(10): p. 4391-4396.

Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. (2002) The Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *J Bone Joint Surg Am*, 84 (6): 1032 -1044.

Lindsay JS, Martin WR, Gren HG. (1966) Traumatic bone cyst treated with homogeneous bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.* 21: 536-542.

Liu, P. T., Stenger, S., Li, H., Wenzel, L., Tan, B. H., Krutzik, S. R., ve Modlin, R. L. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 311(5768): p. 1770-1773.

Lynch, S.E., Genco, R.J., Marx, R.E. (1999). Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: *Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Ed: Carol Stream, Quintessence Publishing Co, Illinois: 71-83.

M. van Driel, M. Koedam, C.J. Buurman, M. Roelse, F. Weyts, H. Chiba ve ark. (2006) Evidence That Both 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and 24-Hydroxylated D₃ Enhance Human Osteoblast Differentiation and Mineralization. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:922–935.

Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. (1998) Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 351: 805-6.

Manolagas SC, Burton DW, Deftos LJ. (1981) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates the alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells. *J Biol Chem* 256: 7115-7117.

Martin RB, Burr DB. (1989): Mechanical adaptation, in structure, Function and Adaption of compact bone. Raven Press, New York, chaps 2, 4, 7 and 8.

Mathieu C, Gysemans C, Giuliatti A, Bouillon R. (2005) Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. Jul; 48(7):1247-57.

Matsumoto T, Igarashi C, Takeuchi Y, Harada S, Kikuchi T, Yamato H, ve ark. (1991) Stimulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of in vitro mineralization induced by osteoblast-like MC3T3-E1 cells *Bone* 12: 27-32.

May E, Asadullah K, Zügel U. (2004) Immunoregulation through 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and its analogs. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 3: 377-393.

McKenna MJ. (1992) Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med* 93: 69-77.

Melloning JT, Levey R (1984) The effect of different sizes of freeze dried bone allograft on bone growth. *J Dent Res* 63:222

Millet PJ. (1994) Investigation into the activity os osteoblast in vitro and in vivo. Dissertation. University of Cambridge.

Mjör IA, Hensten-Pettersen A. (1983) The Biological Compatibility of Alternative Alloys. *Int Dent J* 33: 35–40.

Mohr, S. B., Garland, C. F., Gorham, E. D., Garland, F. C. (2008) The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide. *Diabetologia*. 51(8): p. 1391-1398.

Monteiro GQ, Souza FB, Pedrosa RF, Sales GC, Castro CM, Fraga SN ve ark. (2010) In vitro biological response to a self-adhesive resin cement under different curing strategies. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 92(2):317-21.

Moore WR, Grave SE, Bain GI. (2001) Synthetic bone graft substitutes. Australian and New Zealand Journal of Surgery; 71:354-61.

Muhe L, Lulseged S, Mason KE, Simoes EAF. (1997) Case-control study of the role of nutritional rickets in the risk of developing pneumonia in Ethiopian children. Lancet 349: 1801–1804.

Mutaz, B., Habal, A., Hari, R. (2003). Bone grafts and bone substitutes 2809- 5

Mutlu İ. (2003) Hücre Kültürü ve Diş Hekimliğindeki Uygulamaları Gata

Müftüoğlu S. (1993): Kemik nasıl oluşur. Bilim ve Teknik Dergisi, Vol. 26(313): p.907.

Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. (2005) Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. Endoc Rev 26: 662-687.

Nahid M, Bottenberg P. (2003) Importance of Cell Cultures in Biocompatible Dental Materials Research. Rev Belge Med Dent 58: 189–196.

Najjar AT, Lerdrit W, Parsons JR. (1991) Enhanced osseointegration of hydroxylapatite implant material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol.71:9-15.

Nalcaci A, Oztan MD, Yilmaz S. (2004) Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. Int Endod J 37(2): 151-6.

Nasr, H.F, Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A. (1999). Bone and bone substitutes. Periodontology 2000, 19(1), 74-86.

Nemere I, Carson F. (1998) Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. Biochem Biophys Res Com 248: 442-449.

Ohbayashi, E., Matsushima, K., Hosoya, S., Y., Yamazaki, M. (1999) Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. J. Endod. 25, 1, 30-33,.

Oktay, Z. (1992). Çocuklarda kemik dokusunun yapılmasını, korunmasını ve mineralleşmesini negatif yönde etkileyen hastalıklar, Uludağ Üniversitesi, Bursa

Okumuş, Z., Yıldırım, Ö.S. (2005).The Cuttlefish Backbone: A new bone xenograft material, Turk J Vet Anim Sci 29, 1177-1184.

Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. (2002) İnsan Biyokimyası. Ankara. Palme Yayıncılık.

Oshikawa, T., Ohgushi, H., Akahane, M., Tamai, S. (1996). Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *Journal Biomed. Mater. Research*, 32, 481-492.

Outila TA, Karkkainen MUM, Lamberg-Allardt CJE. (2001) Vitamin D status affects serum parathyroid hormone concentrations during winter in female adolescents: associations with forearm bone mineral density. *Am J Clin Nutr* 74: 206–210.

Özkan B. (2007) Rikets. *Güncel Pediatri*. 5 (1): 34–41

Özsoylu S. (1990) D vitamini Metabolizması. *Katkı Pediatri Dergisi*. Rikets. 11 (4): 359– 366

Öztürk, S.S. (2006) *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell- Based Therapies*, CRC press, Boca Raton.

Özyiğit HA. (2007): Deneysel olarak oluşturulan defektlerde titanyum partikülleri ve değişik greft materyallerinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, p.89.

Paker M, Özmen E, Taşdemir Ö, Şahin D. (1994): Factors Related to Long-term Traumatic Stress Responses in Survivors of Torture in Turkey. *JAMA*.272(5): p.357-363

Pecora GE, De Leonardis D, Della Rocca C, Cornelini R, Cortesini C. (1998) Short term healing following the use of calcium sulfate as a grafting material for sinus augmentation: A clinical report. *Int J Oral and Maxillofac Imp*. 13:866-73

Peterson LJ, İndresano AT, Marciani RD, Rose SM (1992) *Principles of Oral and Maxillofacial Surgery* . J.B.Lippincott Company. Vol II

Pioletti DP, Takei H, Lin T, Van Landuyt P, Ma QJ, Kwon SY, Sung KL. (2000) The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials*. 21(11): 1103-1114.

Polater Kesikbaş H. İki Farklı Alloplastik Greft Materyalinin Periodontal Kemik İçindeki Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. İ. Ü. Diş Hekimliği Fakültesi. 3-22.

Poot A, Beugeling T, Dekker A, Spijkers J, Van Mourik JA, Feijen J. ve ark. (1992) Dependence of Endothelial Cell Growth on Substrate-Bound Fibronectin. *Clin Mater* 11: 151–155.

Popovtzer M. (2005) Kalsiyum, fosfor, d vitamini ve paratiroid hormon aktivitesi bozuklukları. Schrier RW, Böbrek ve elektrolit hastalıkları (6. Baskı), Ankara: Güneş Kitabevi, 225-231. 94

Rehman PKM. (1994) Sub-clinical rickets and recurrent infection. *J Trop Ped* 40: 58.

Rekow, D. (2003). Informatics challenges in tissue engineering and biomaterials. *Adv Dent Res*, 17, 49- 54.

Revell, P.A. (1986). *Pathology of Bone*. Great Britain: Springer - Verlag. Berlin Heidelberg, 1-30, 203-231.

Rollin BE. (2006) The regulation of animal research and the emergence of animal ethics: a conceptual history. *Theor Med Bioeth* 27(4): 285-

Rose, F. R., Oreffo, R. (2002). Bone tissue engineering: Hope vs Hype. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 1-7.

Rosenberg, E., Rose, LF. (1998). Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dental Clinics of North America*, 42, 467-490.

Rothman, R.H., Simeone, F.A. (1975). *The Spine*. 2. baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia

Rucker D, Allan JA, Fick GH, Hanley DA. (2002) Vitamin D insufficiency in a population of healthy western Canadians. *CMAJ* 166: 1517-1524.

Rucker RB. (2001) *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker, Inc 3: 616

Sağlam, M. (1987). *Genel Histoloji*. 3. Baskı, Emel Matbaacılık Sanayi, Ankara

Sautier JM, Nefussi JR, Boulekbache H, Forest N. (1990) In vitro bone formation on coral granules. *In Vitro Cell Dev Biol*; 26(11): 1079-1085.

Gregoire M, Orly I, Menanteau J. (1990) The influence of calcium phosphate biomaterials on human bone cell activities: An in vitro approach. *J Biomed Mater Res.* 24(2): 165-77.

Saw TY, Cao T, Yap AU, Lee Ng MM. (2005) Tooth slice organ culture and established cell line culture models for cytotoxicity assessment of dental materials. *Toxicol In Vitro* 19(1): 145-54.

Schepers, E.J.G., Ducheyne, P., Barbier, L., Schepers, S. (1993). Bioactive glass particles of narrow size range: A new material for the repair of bone defects, *Implant Dent*, 2, 151-156.

Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. (2002) Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod* (3); 28: 188-192.

Schmalz G. (1997) Concepts in Biocompatibility Testing of Dental Restorative Materials. *Clin Oral Investig* 1: 154-162.

Schmalz G. (1994) Use of Cell Cultures for Toxicity Testing of Dental Materials Advantages and Limitations. *J Dent* 22 Suppl 2: S 6-11.

Schmidmaier, G., Capanna, R., Wildemann, B., Beque, T., Lowenberg, D. (2009). Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defect: what are the options?, *Int J Care Injured*, 40, 39-43.

Schumacher TC, Aminian A, Volkmann E, Lührs H, Zimnik D, Pede D ve ark. (2015) Synthesis and mechanical evaluation of Sr-doped calcium-zirconium-silicate (baghdadite) and its impact on osteoblast cell proliferation and ALP activity. *Biomed Mater Oct* 20; 10(5):055013.

Schuster U, Schmalz G, Thonemann B, Mendel N, Metzl C. (2001) Cytotoxicity testing with three-dimensional cultures of transfected pulp-derived cells. *J Endod* 27 (4): 259-65.

Schweikl H, Schmalz G. (1996) Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci* 104(3): 292-9.

Scott MF, Bentley CM, Marshall CT. (1999) Setting up a new cell culture laboratory, In *Animal cell biotechnology*. Indianapolis: Humana Press.

Seibel, M.J., Woitge, H.V. (1996) Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J. Clin. Endocrinol Metab.*,81,9, 3289-3294.

Serino G, Biancu S, Iezzi G, Piatelli A. (2003) Ridge preservation following tooth extraction using a polyactide and polyglycolide humans. *Clin Oral Implants Res* 14(5): 651-658

Sertgöz A. (2005) Osseointegrasyon-I. *Implantr* 2:40-45.

Shaini FJ, Shelton RM, Marquis PM, Shortall AC. (2000) In vitro evaluation of the effect of freshly mixed amalgam and gallium- based alloy on the viability of primary periosteal and osteoblast cell cultures. *Biomaterials*. 21(2): 113-119.

Shuang Tong, Lei Xue, Da-Peng Xu, Zi-Mei Liu, Yang Du, Xu-Kai Wang (2016) In vitro culture of hFOB1.19 osteoblast cells on TGF- β 1-SF-CS three-dimensional scaffolds *Mol Med Rep*. 13(1): 181–187.

Skojdt M, Russell G. (1992) Bone cell biology and the regulation of bone turnover. Gowen M, *Cytokines and Bone Metabolism*. Florida: CRC Pres, 1- 70.

Smith SJ, Evans RM, Sullivan-Fowler M, Hendee WR. (1988) Use of animals in biomedical research. Historical role of the American Medical Association and the American physician. *Arch Intern Med* 148(8): 1849-53.

Soydan, N. (1993). *Diş Hekimleri için Gelişim ve Büyüme*. Doyuran Matbaası, İstanbul

Spier RE, Griffiths JB. (1985) *Animal Cell Biotechnology*. Volume 1: Cell Biology Experimental Aspects. Academic Pres Inc., London.

Stumpf, W. E., Sar, M., Reid, F. A., Tanaka, Y., DeLuca, H. F. (1979) Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary, and parathyroid. *Science*. 206(4423): p. 1188-1190.

Subramani K, Pandravadana SN, Puleo DA, Hartsfield JK Jr, Huja SS. (2016) In vitro evaluation of osteoblast responses to carbon nanotube-coated titanium surfaces. *Prog Orthod*. Dec; 17(1):23.

Swart JGN, Redjo BV, De Groot K. (1979) Porous calcium phosphates as alveolar bone implant. *J Dent Res* 263-264.

Şimşek A (2004) “Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Materyaller” TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi, 4.

Tadjoedin ES, DeLonge GL, Lyaruu DM, Kuiper L, Burger EH. (2002) High concentrations of bioactive glass material (Biogran®) vs. Autogenous bone for sinus floor elevation. *Clin Oral Implants Res* 13: 428-436.7

Tanaka, Y., Seino, Y., Ishida, M., Yamaoka, K., Satomura, K., Yabuuchi, H. ve ark. (1986) Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on insulin secretion: direct or mediated? *Endocrinology*. 118(5): p. 1971-1976.

Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. (1999) Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 45(3): 214-22.

Terhune WF, Sydiskis RJ, Davidson WM. (1983) In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding materials. *Am J Orthod* 83(6): 501-6.

Thibodeu, A.G., Patton, K.T. (2002). *Anatomy&Physiology*. 5. Baskı, Mosby, St Louis

Thumwanit V, Kedjarune U. (1999) Cytotoxicity of polymerized commercial cyanoacrylate adhesive on cultured human oral fibroblasts. *Aust Dent J* 44(4): 248-52.

Tofe AJ, Watson BA, Bowermann MA. (1991) Solution and cell mediated resorption of grafting. *J Oral Implantol* 17: 345.

Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. (2015) General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. *Methods Mol Biol*. 1250:333-48

Tomas, H., Carvalho, G.S., Fernandes, M.H., Freire, A.P., Abrantes, L.M. (1997) The use of rat, rabbit or human bone marrow derived cells for cytocompatibility evaluation of metallic elements. *J. of Materials science, Materials in Medicine*. 233-238.

Topal, Ş.R. (2004) Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar, Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul.

Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, Takagi N. (1994) Leaching and cytotoxicity of formaldehyde and methyl methacrylate from acrylic resin denture base materials. *J Prosthet Dent* 71(6): 618-62.

Tuskan C, Yalçın M. (2002) Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan biyomateryaller, İstanbul, İstanbul Üniv. Yayınları, 1-60

Uchida A, Nade S, McCartney E, Ching W. (1987) Growth of bone marrow cells on porous ceramics in vitro. *J Biomed Mater Res.* 21(1): 1-10.

Ulker HE, Sengun A. (2009) Cytotoxicity Evaluation of Self Adhesive Composite Resin Cements by Dentin Barrier Test on 3D Pulp Cells. *Eur J Dent* 3(2):120-6.

Uo M, Sjögren G, Sundh A, Watari F, Bergman M, Lerner U. (2003) Cytotoxicity and bonding property of dental ceramics. *Dent Mater* 19(6): 487-92

Vajrabhaya LO, Padasuk A, Harnirattisai C. (2003) Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 28(4):440-4.

Van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. (1991) Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified calorimetric MTT assay. A methodological study. *J Immunol Methods* 141(1): 15-22.

Van Den Bemd GJ, Pols HA, Birkenhager JC, Kleinekoort WM, Van Leeuwen JP. (1995) Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃- analogs on osteoblast- like cells and on in vitro bone resorption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 337-346.

Van Etten E, Mathieu C. (2005) Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97: 93-101.

Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A. (2004) Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *Eur J Pharm Sci* 23(2): 181- 8.

Vieth R. (1999) Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations and safety. *Am J Clin Nutr* 69: 842-856.

Wataha JC, Craig RG, Hanks CT. (1992) Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity. *Dent Mater* 8(1): 65-70.

Weiland AJ, Philips TW, Randolph MA. (1984) Bone grafts: A radiologic histologic allograft and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 379-386.

Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A (1979) Method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *J Biomed Mater Res* 13(1): 109-20.

Wilson JK, Sargent JM, Elgie AW, Hill JG, Taylor CG. (1990) A feasibility study of the MTT assay for chemosensitivity testing in ovarian malignancy. *Br J Cancer* 62(2): 189-94.

Wise C. (2002) *Epithelial Cell Culture Protocols in Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press

WoECKEL VJ, ALVES RD, SWAGEMAKERS SM, EIJKEN M, CHIBA H, VAN DER EERDEN BC (2010) 1 α ,25-(OH) $_2$ D $_3$ acts in the early phase of osteoblast differentiation to enhance mineralization via accelerated production of mature matrix vesicles. *J Cell Physiol* 225: 593-600

Xu P, Liang J, Dong G, Zheng L, Ye L. (2010) Cytotoxicity of RealSeal on human osteoblast-like MG63 cells. *J Endod* 36(1): 40-4.

Yazawa, M., Ogata, H., Kimura, A., Nakajima, T., Mori, T., Watanabe, N. (2004) Basic Studies On the Bone Formation Ability by Platelet Rich Plasma in Rabbits, *J. Craniofac. Surg.*, 15(3), 439-446.

Yoon, K., Buenaga, R., Rodan, G.A. (1987) Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. *Biochem.Bio phys.Res.Commun.*,148, 1129-1136.

Yoshikawa, T., Ohgushi, H., Akahane, M., Tamai, S., Ichijima, K. (1998). Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites: A comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. *Journal Biomedical Material Research*, 41(4), 568-573.

Younger EM, Chapman MW. (1989) Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 3:192-195.

Zarb, G., Lekholm, U., Albrektsson, T., Tenenbaum, H. (2002). *Aging Osteoporosis and Dental Implants*, Quintessence Publishing Co, Inc., Illinois.

Zittermann A, Schulze Schleithoff S, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P. (2003) Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure. *J Am Col Cardio* 43: 105–112.

Zittermann A. (2003) Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *British J Nutr* 89: 552–572.



HAM VERİLER

FORMLAR



ETİK KURUL KARARI



PATENT HAKKI İZİNİ



TELİF HAKKI İZİNİ

