

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DIŞ ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



**HEPARİN VERİLEN RATLARDA DARBELİ
ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ KEMİK
DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

OLGUN TOPAL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

ISPARTA-2016

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DIŞ ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

HEPARİN VERİLEN RATLARDA DARBELİ
ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ KEMİK
DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

OLGUN TOPAL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

Bu tez TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı
tarafından 114S071 Proje numarası ile desteklenmiştir

Tez. No: 152

ISPARTA-2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi **Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03.06.2016

- Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Timuçin BAYKUL
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Zuhale YETKİN AY
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Barış Çağrı DELİLBAŞI
Medipol Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
- Üye : Doç. Dr. Ahmet Hamdi ARSLAN
Yeditepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

BEYAN

“Heparin Verilen Ratlarda Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulamasının Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Olgun Topal

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, bilgi ve deneyimlerini aktarmaktan hiçbir zaman kaçınmayan, doktora tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve yol gösteren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY'a;

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum ve mesleki gelişimime büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Timuçin BAYKUL ve Doç. Dr. Gülperi KOÇER ve Yrd. Doç. Dr. Yavuz FINDIK'a;

Doktora tezimi destekleyen TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programına;

Tezimin deneysel kısmının gerçekleştirildiği SDÜ Deneysel Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı ve personeline;

Araştırmamın istatistiksel analizini yapan Yrd. Doç. Dr. Özgür KOŞKAN'a;

Tez izleme komitemde yer alarak tez çalışmalarımın takip ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Zuhal YETKİN AY'a;

Tez jürimde yer alarak beni onurlandıran Prof. Dr. Barış Çağrı DELİLBAŞI ve Doç. Dr. Ahmet Hamdi ARSLAN'na;

Bu zorlu süreçte desteklerini hep hissettiğim, zor anları kolaylaştıran, arkadaştan öte kardeş olarak gördüğüm ve birlikte çalışmaktan her zaman zevk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma;

SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı hemşire ve yardımcı personeline;

Eğitim sürecim boyunca ve hayatımın her aşamasında bana destek olan, beni cesaretlendirerek tüm sıkıntıların altından kalkmamı sağlayan, hayatlarını adayan annem Rahile TOPAL ve babam Ömer TOPAL ve kardeşim Onur TOPAL'a;

Doktora eğitimim süresince benden sevgisini, emeğini, fedakarlığını ve sabrını esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili biricik eşim Dt. Burcu GÜÇYETMEZ TOPAL'a çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kemik	3
2.1.1 Kemik Dokusunun Özellikleri	3
2.1.2 Kemik Dokunun Elemanları	3
2.1.2.1 Ekstrasellüler Matriks (Ara madde)	3
2.1.2.2 Lifler	3
2.1.2.3 Hücreler	4
2.1.2.3.1 Osteoprogenitör Hücreler	4
2.1.2.3.2 Osteoblastlar	4
2.1.2.3.3 Osteoklastlar	5
2.1.2.3.4 Osteositler	5
2.1.3 Kemik Zarları	5
2.1.4 Mikroskopik Yapısına Göre Kemik Doku Tipleri	6
2.1.4.1 Primer Kemik Dokusu	6
2.1.4.2 Sekonder Kemik Dokusu.....	6
2.1.4.2.1 Spongiyöz (Kansellöz) Kemik.....	6
2.1.4.2.2 Kortikal (Kompakt) Kemik.....	6
2.1.5 Kemik Oluşumu ve Büyümesi	6
2.1.5.1 İntramembranöz Kemikleşme	7
2.1.5.2 Endokondral Kemikleşme	7
2.1.6 Kemik İyileşmesi ve Evreleri.....	8
2.1.6.1 Enflamasyon Evresi (1-4 gün).....	8
2.1.6.2 Onarım Evresi (2-40 gün).....	8
2.1.6.3 Osteoid Doku Oluşumu Evresi (12-21 gün).....	9
2.1.6.4 Geçici Kallusun Kalsifikasyonu Evresi (21. günden sonrası).....	9

2.1.7	Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler	9
2.1.7.1	Hormonlar	9
2.1.7.2	Beslenme	11
2.1.7.3	Yandaş Hastalıklar	122
2.1.7.4	İlaçlar	12
2.1.7.5	Yaş	13
2.1.7.6	Alışkanlıklar	13
2.1.7.7	Kemoterapi Radyoterapi	13
2.1.8	Kemik Yapım-Yıkım Belirteçleri	13
2.2	Osteoporoz	15
2.2.1	Tanım	15
2.2.2	Sınıflama	16
2.2.2.1	Primer Osteoporoz	17
2.2.2.1.1	Postmenapozal (Tip 1)	17
2.2.2.1.2	Senil (Tip 2)	17
2.2.2.1.3	İdiyopatik (Juvenil, erişkin)	18
2.2.2.2	Sekonder Osteoporoz	18
2.2.2.3	Heparin İlişkili Osteoporoz	19
2.2.3	Epidemiyoloji	20
2.2.4	Patogenez	20
2.2.5	Görüntüleme Yöntemleri	22
2.2.6	Kan ve İdrar Biyokimya Testleri	23
2.2.7	Osteoporozun Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisi	24
2.3	Elektromanyetik Alan	25
2.3.1	Elektromanyetik Alan	26
2.3.2	Kemiğin Elektriksel Özellikleri	28
2.3.3	Elektromanyetik Alanların Kemik İyileşmesine Etkisi	29
3	GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1	Çalışma Planı	32
3.2	Deney Hayvanları	32
3.2.1	Gruplar	33
3.3	Cerrahi Uygulama	37
3.4	Postoperatif Bakım	40
3.5	Postoperatif Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulaması	40
3.6	Sakrifikasyon ve Kan Örneklerinin Eldesi	46

3.7	Kemik Örneklerin Hazırlanması.....	47
3.7.1	Fiksasyon ve Formalinden Arındırma İşlemi.....	47
3.7.2	Dekalsifikasyon İşlemi.....	48
3.7.3	Doku Takibi İşlemi	48
3.7.4	Bloklama İşlemi	49
3.7.5	Kesit Alma İşlemi	49
3.7.6	Hematoksilen-Eozin Boyama İşlemi	50
3.7.7	Kesitleri Kapama İşlemi.....	50
3.8	Histomorfometrik İnceleme.....	51
3.9	Biyokimyasal İnceleme	54
3.10	İstatistiksel Yöntem	54
4	BULGULAR.....	56
4.1	Deney Grupları	56
4.2	Canlı Ağırlık Bulguları ve İstatistiksel Değerlendirmeler.....	57
4.3	Histomorfometrik Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirmeler	58
4.4	Biyokimyasal Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirmeler.....	60
5	TARTIŞMA.....	68
6	SONUÇ ve ÖNERİLER	88
7	ÖZET	90
	ABSTRACT	91
8	KAYNAKLAR	92
	EKLER.....	112

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A/m	:	Amper/Metre
ASP	:	Aspirin
B	:	Manyetik Akı Yoğunluğu
BMP	:	Bone Morphogenetic Protein
Ca⁺⁺	:	Kalsiyum
Cl⁻	:	Klor
CTx	:	Tip 1 kollajen çapraz bağlı C- telopeptid
DEXA	:	Dual Enerji X-Ray Absorbsiyometre
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EKG	:	Elektrokardiyografi
EMG	:	Elektromiyografi
FDA	:	Food and Drug Administration
FGF	:	Fibroblast Growth Factor
FIX	:	Faktör 9
FVII	:	Faktör 7
FX	:	Faktör 10
FXII	:	Faktör 12
G	:	Gauss
GAG	:	Glikozaminoglikan
GER	:	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GHz	:	Gigahertz
gr	:	Gram
H	:	Manyetik Alan Gücü
Hz	:	Hertz
IL-11	:	İnterlökin-11

IL-6	:	İnterlökin-6
ILG 1	:	İnsulin Like Growth Factor 1 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
ILG 2	:	İnsulin Like Growth Factor 2 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2
ILGF	:	İnsulin Like Growth Factor (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)
IM	:	İntramuskuler
INT	:	Sağlam
IU	:	Ünite
J	:	Joule
K⁺	:	Potasyum
kg	:	Kilogram
KMY	:	Kemik Mineral Yoğunluğu
LLLT	:	Düşük Seviyeli Lazer Tedavisi
MHz	:	Megahertz
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
MRG	:	Magnetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	:	Mesajcı RNA
mT	:	Militesla
mV	:	Milivolt
Na⁺	:	Sodyum
NTx	:	Tip 1 kollajen çapraz bağlı N- telopeptid
Oe	:	Osert
OPG	:	Osteoprotegerin
OVX	:	Overektomi
P⁺⁺⁺	:	Fosfor
PDGF	:	Platelet Derived Growth Factor

PEMF:	Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulaması
PG :	Prostaglandin
PGE₂ :	Prostaglandin E ₂
PICP :	Karboksiterminal Prokollajen Propeptid
PINP :	Aminoterminal Prokollajen Propeptid
pm :	Pikometre
PTH :	Parathormon
RANK:	Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa B
RANK:	Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör Kappa B Ligand
SHBG:	Sex Hormone Binding Globulin
SL :	Sistemik Lupus Eritematozus
STAT-3:	Signal Transducer and Activator Of Transcription 3
T :	Tesla
TDK :	Türk Dil Kurumu
TGF- α:	Transforming Growth Factor Alfa
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TRAP :	Tartarata Dirençli Asit Fosfataz
Wb :	Weber
μs :	Mikrosaniye
μT :	Mikrotesla
Φ :	Manyetik Akı

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Kemik Yapım-Yıkımının Biyokimyasal Belirteçleri	14
Tablo 2.	DEXA İle Osteoporoz Tanımlaması	16
Tablo 3.	Farklı Açılardan Osteoporoz Sınıflaması	16
Tablo 4.	Tip I ve II Osteoporozun Karşılaştırması	17
Tablo 5.	Remodelingi Etkileyen Faktörler	21
Tablo 6.	Manyetik Alan İçin Kullanılan Birimler ve Dönüşümleri (106).....	27
Tablo 7.	Araştırma Grupları	36
Tablo 8.	Cihazın Teknik Özellikleri.....	42
Tablo 9.	Çalışma Dışı Bırakılan ve Çalışmaya Dahil Edilen Ratların Gruplara Göre Dağılımı.....	56
Tablo 10.	Zamana Göre Deney Hayvanlarının Ağırlık Bulguları (Ortalama ± Standart Hata).....	57
Tablo 11.	Yeni Kemik Oluşum Alanı İstatistik Değerleri.....	58
Tablo 12.	Yeni Kemik Yüzdesi İstatistik Değerleri	60
Tablo 13.	Serum Ca ⁺⁺ İstatistik Değerleri (Ortalama ± Standart Hata)	61
Tablo 14.	Serum CTx İstatistik Değerleri (Ortalama ± Standart Sapma)	62
Tablo 15.	Serum PTH İstatistik Değerleri (Ortalama ± Standart Hata)	64
Tablo 16.	Biyokimyasal Özellikler, Ağırlık ve Histomorfometrik Özelliklerin Korelasyonu.....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Gruplar.....	34
Şekil 2.	1a ve 1b Helmholtz Bobinlerinin Manyetik Dalgaları.....	44
Şekil 3.	Defekt Bölgesine Homojen Manyetik Akı Vektörünün Dik Gelmesi.....	45
Şekil 4.	Bobinlerin Uygulaması ve Cihazın Şeklinin Planlaması.....	46
Şekil 5.	Zamana Göre Deney Hayvanlarının Ağırlık Değişimleri.....	59
Şekil 6.	Grupların Ortalama Yeni Kemik Oluşum Alanları	60
Şekil 7.	Zamana Göre Ca ⁺⁺ Düzeylerinin Değişimi	63
Şekil 8.	Zamana Göre CTx Düzeylerinin Değişimi	64
Şekil 9.	Zamana Göre PTH Düzeylerinin Değişimi.....	66

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Heparin.....	34
Resim 2.	Subkutan Heparin Enjeksiyonu	34
Resim 3.	Anestezik İlaçlar	37
Resim 4.	Trepan Frez İle Kemik Kemik Defekti Açılması	37
Resim 5.	Monokortikal Kemik Defekti.....	38
Resim 6.	Kasın Dikilmesi	38
Resim 7.	Cildin Dikilmesi.....	39
Resim 8.	Kuyruktan Kan Alımı	39
Resim 9.	Rifen.....	40
Resim 10.	Restrainer	41
Resim 11.	Ratın Restrainere Yerleştirilmesi	41
Resim 12.	Darbeli Elektromanyetik Alan Cihazı	42
Resim 13.	Helmholtz Bobini	42
Resim 14.	Ratların Düzeneğe Yerleştirilmesi	45
Resim 15.	Darbeli Elektromanyetik Alan Cihazı, Bobinlerin Yerleştirildiği Düzenek ve Manyetik Alan Odası	46
Resim 16.	Rezeke Edilmiş Femur	47
Resim 17.	Kemiklerin Formalin Solüsyonunda Fikse Edilmesi	47
Resim 18.	Örneklerin Hazırlanması	48
Resim 19.	Örneklerin Kasetlenmesi.....	48
Resim 20.	Otomatik Doku Takip Cihazı	49
Resim 21.	Bloklama Cihazı.....	49
Resim 22.	Mikrotom cihazı	50
Resim 23.	Leica Auto Stainer XL Boyama Cihazı	50
Resim 24.	Leica CV5030 cihazı.....	51
Resim 25.	Osteoblast ve Osteoklast X 200	52
Resim 26.	Yeni Kemik X 200	52
Resim 27.	3 mm Kemik Defekt Alanı.....	53
Resim 28.	Imageji 1.46 Analysis Program ve Kemik Alanlarının Siyaha Boyanması.....	53

1. GİRİŞ

Antikoagülanlar; kanın pıhtılaşmasını azaltarak fibrin oluşumunu, trombüs gelişimi ve büyümesini önlerler. Heparinler, kliniklerde sık kullanılan parenteral antikoagülanlardandır. Venöz tromboembolinin tedavi ve profilaksisinde, atriyal fibrilasyona bağlı embolinin önlenmesinde, inme ve miyokard enfarktüsü tekrarının önlenmesinde ve kalp kapağı protezi olan hastalarda kullanılmaktadır (1). Gebelikte fetal komplikasyonları nedeniyle diğer antikoagülanların kullanımı sınırlanmakta; standart heparin ve düşük moleküler ağırlıklı heparin tercih edilmektedir. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda hemeodiyaliz sırasında pıhtılaşma faktörleri ve trombositlerin aktive olmasını önlemek amacıyla standart heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparinler kullanılmaktadır (2).

Pıhtı oluşum mekanizmasını engelleyerek terapötik yarar göstermesinin yanı sıra gastrointestinal kanama, yumuşak doku kanamaları ve hematüri heparin kullanımının yaygın komplikasyonlarından (3). Diğer sık görülen komplikasyon ise uzun dönem kullanıldığında kemik kaybı ve osteoporozu yol açarak kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etki göstermesidir. Antikoagülanlar içinde heparin kemik kaybı ve osteoporozu yol açtığı iyi bilinmektedir (4). Heparinin indüklediği osteoporozun multifaktöriyel olduğu, patogeneğinde kemik sentezinin azaldığı ve kemik rezorpsiyonunun arttığı belirtilse de bu sorunun hangi mekanizmalarla gerçekleştiği tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (5). Günde 15 000 IU'nin üzerinde ve 3 aydan fazla kullanımda kemik üzerinde olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır. Heparinin indüklediği osteoporozun gerçek insidansı bilinmemektedir. Ancak heparin tedavisi gören hastaların üçte birinde osteoporoz görüldüğü yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (6). Daha sonraları geliştirilen düşük molekül ağırlıklı heparinlerin kemik üzerinde olumsuz etkileri daha azdır. Literatürde, warfarin ve asetilsalisilik asitin kemik üzerine olumsuz etkileri ile ilgili çalışma bulunmamaktadır (7).

Osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığıdır. Osteoporozda düşük kemik kütlesi ile ilgili

histomorfolojik bulgular; incelmış korteks, kortikal kemikte trabekülasyon, trabeküler kemik kütlesinde azalma, trabeküler incelmeye, trabeküler bağlantılarda azalma ve mikro hasardır. Bu değişikliklerin sonucu kemiğin yoğunluk, sertlik ve gücü azalır. Cerrahi işlemlerde çene kemiğinin kantitesi veya yoğunluğu ve kemik kalitesi çok önemlidir. Osteoporoz varlığı cerrahi işlemlerde potansiyel risk teşkil edebilir. Çene cerrahları için osteoporoz süreci ile cerrahi sonuçlar arasındaki potansiyel etkileşimin farkında olmak önemlidir. Hastalara cerrahi tedavinin başarısında osteoporozun olası etkileri hakkında bilgi verilmelidir.

Hastaların cerrahi sonrası kemik iyileşmesinin hızlı ve kayıpsız şekilde tamamlanması amacıyla günümüzde kemik iyileşmesini hızlandırmak için birçok uygulama gerçekleştirilmektedir. Elektrik stimülasyonu, hiperbarik oksijen tedavisi, düşük yoğunluklu ultrason uygulaması, düşük enerjili lazer uygulaması, darbeli elektromanyetik alan uygulaması gibi fiziksel ajanlarla veya D vitamini, kalsiyum, büyüme faktörü gibi ilaç uygulamaları ile kemik iyileşme hızı arttırılmaya çalışılmaktadır (8). Kemik iyileşme sürecini hızlandırmaya ve komplikasyonları azaltmaya yönelik yaklaşımlardan birisi de darbeli elektromanyetik alan uygulamasıdır.

Birçok çalışmada darbeli elektromanyetik alanın kemik ve osteogenezis üzerinde olumlu etkileri olduğu (9-14) bildirilmesine rağmen hiçbir etkisi olmadığını (15) veya olumsuz etkisi olduğunu (16) gösteren çalışmalar da mevcuttur. Ancak darbeli elektromanyetik alanın bu etkiyi nasıl sağladığı, hücresel düzeyde hangi aktiviteleri arttırıp, hangilerini azalttığı tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Ayrıca literatürde bu konuda birçok çalışma yapılmasına rağmen, darbeli elektromanyetik alan uygulamasının kemik üzerinde olumlu etkilerinin hangi şiddet, frekans aralığında ve sürede sağlanabileceği hala kesin olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, ratlarda heparin ile sekonder osteoporoz oluşturularak, femurda açılan kritik boyutlu defektlerde, darbeli elektromanyetik alan uygulamasının iyileşme üzerine etkisinin histomorfometrik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik

2.1.1 Kemik Dokusunun Özellikleri

Kemik ekstrasellüler matriks, bu ekstrasellüler matriks içinde ayırt edilen lifler ve belli bir düzende yerleşmiş hücrelerden oluşan ileri düzeyde özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemik iskeletin en önemli yapı taşıdır. Yumuşak dokuları destekler. Çizgili kas kasılmalarının doğurduğu kuvvetleri arttırarak harekete dönüştürür. Kafatası, omurilik ve akciğer boşluğunda yer alan hayati organları korur. Kan hücrelerinin yapım yeri olan kemik iliğini barındırır. Vücudun kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların konsantrasyonunu dengede tutar. Dıştan gelen mekanik uyarılarla hacmini, şeklini, formunu yönlendirebilen ve kendini yenileyebilen bir dokudur (17).

2.1.2 Kemik Dokunun Elemanları

Kemik ekstrasellüler matriks (ara madde), fibriler elemanlar ve hücrelerden oluşmuştur.

2.1.2.1 Ekstrasellüler Matriks (Ara madde)

Ekstrasellüler matriksin organik içeriğinde; glikoproteinler (osteokalsin, osteopontin, osteonektin, silaloproteinler), fosfoproteinler, glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat), proteoglikanlar ve lipidler bulunur. Kemik kuru ağırlığının %35'ini oluşturan bu organik maddeler ile % 65'ini oluşturan inorganik bileşiklerle (kalsiyum, fosfat, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum) desteklenerek kemik dokunun ekstrasellüler matriksini oluştururlar. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlarlar. Kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır (18).

2.1.2.2 Lifler

Kollajen lifleri, özellikle tip 1 kollajen matrikse gömülüdür ve osteokollojen olarak adlandırılırlar (19).

2.1.2.3 Hücreler

Kemikte, osteoprogenitör hücre, osteoblast, osteosit ve osteoklast olarak adlandırılan 4 farklı hücre tipi bulunur.

2.1.2.3.1 Osteoprogenitör Hücreler

Kemiğin iç yüzeyini örten endosteum ile dış yüzeyinde yer alan periosteumda bulunurlar ve mezenkimden gelişen osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve osteoklastlar gibi kemik hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Pasif durumda morfolojik olarak görülmeleri zordur. Kemik yapımının aktif olduğu (kemik büyüme periyodu, kırık iyileşmesi vb.) zamanlarda, sayılarının artması ile fark edilirler (20, 21).

2.1.2.3.2 Osteoblastlar

Kemik ekstrasellüler matriksinin organik bileşenlerini (tip 1 kollajen, glikoproteinler, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar) sentezler. Kemik yüzeyinde yan yana dizilirler. Hücre çekirdeği kübikten silindiriğe yakın büyük, GER yapısı ve golgi bileşenleri iyi gelişmiştir (18). Kemik şekillenmesinde hücrede alkalen fosfataz aktivitesi artar ve sitoplazma bazofilik hale gelir. Osteoblastlar yeni sentez edilmiş matriks ile sarıldığında osteosit adını alırlar. Osteoblastlar ile önceden oluşmuş matriks arasında osteoid adı verilen ve henüz kalsifiye olmamış matriks bulunur. Kemik apozisyonu olarak adlandırılan bu durum zamanla kalsiyum çökmesi ile tamamlanır (17). Osteoklastların oluşumunda, osteoklastlarla beraber kemik rezorbsiyonunun düzenlenmesinde rol alır. PTH, prostaglandin, D vitamini metabolizması yan ürünleri gibi moleküllere özel reseptörler içerir (5). Kemik rezorbsiyonu sırasında osteoblastlar BMP, ILG₁ ve ILG₂ salgılar. Bu proteinler kök hücre havuzundan osteoblastların diferansiyasyonunu teşvik eder. Osteoblastlar kemik rezorbsiyonunu kontrol etmek ve yavaşlatmak için osteoklast fonksiyonu için direkt inhibitör protein (OPG) geliştirmiştir. OPG, osteoklast hücre membranı üzerindeki RANK reseptöre bağlanmak için RANKL olarak bilinen osteoklast stimüle edici protein kolektif grubu ile yarışan yalancı bir reseptördür. OPG, RANKL'ın osteoklast üzerindeki RANK hücre membranı reseptörüne bağlanmasını engelleyerek ve osteoklastların kemik rezorbsiyonunu uyararak osteoklastın diferansiyasyonunu ve fonksiyonunu geri dönüşümlü engeller. Osteoblastlar, osteoklastları hem kapatır

hem de açar çünkü osteoblastlar da osteoklastik kemik rezorbsiyonunu uyarmak için RANKL salgırlarlar (22).

2.1.2.3.3 Osteoklastlar

Osteoklastlar, monositlerin birleşmesiyle meydana gelen, kemik rezorpsiyonundan sorumlu mononükleer fagositik sisteme ait, en büyük çaplı, çok çekirdekli hücrelerdir (17). Kırmızı kemik iliğindeki köken hücreler osteoklastların salgıladığı bazı maddeler tarafından uyarılırlar. Uyarılan hücrelerden bir kısmı birleşerek osteoklastları meydana getirir. Kemik yapımında trabeküllerin yüzeyinde ve kompakt kısımların iç yüzeylerinde rezorbsiyon yaparlar. Kemik matriksinde asit kollojenaz, asit fosfataz vb. enzimler salgılayarak kemik rezorbsiyonuna sebep olurlar. Kemik yüzeyinde howship lakünası denen çukurcuklar oluştururlar (23). PTH bu hücrelerin aktivitelerinden sorumludur. PTH osteoblast hücre zarında bulunan reseptörlere bağladığında osteoblastlar osteoprotegerin ligantını salgırlar. Bu madde osteoklast diferansiyasyonunda etkili olarak rezorbsiyon yönünde bu hücreleri uyarır. PTH'nın salgılanmasının artması osteoklastların aktivitesini arttırarak osteoporoz denilen kemik hastalığına yol açar. Tiroidden salgılanan kalsitonin ise osteoklastların aktivitesini azaltır (18).

2.1.2.3.4 Osteositler

Kemiğin olgun hücreleri olan osteositler aktif olarak kemik matriksinin devamlılığını sağlarlar. Osteoblastların farklılaşması ile matrisin kalsifikasyonu arttıkça hücreler osteosite dönüşür. Metabolik aktivitesi azalmış osteoblastlardır (23). Osteoblastlardan farklı olarak alkale fosfataz sentezlemezler (17). Osteositik osteolizis adı verilen işlemle kalsiyum iyonları ve diğer minerallerin ekstrasellüler sıvıyla değış tokuşunda görevlidirler (24).

2.1.3 Kemik Zarları

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

2.1.4 Mikroskopik Yapısına Göre Kemik Doku Tipleri

2.1.4.1 Primer Kemik Dokusu

İlk oluşan kemik dokusudur. Fetal gelişim ve kemik onarımı sırasında şekillenir. Geçicidir, daha sonra sekonder kemik yapısına dönüşür. Hücreden yana zengindir ve kollajen fibriller gelişigüzel dağılmış ağlar oluşturur (23). Yetişkinlerde kafadaki yassı kemik eklemleri, dış alveolleri ve tendonların kemiğe tutunduğu yerler gibi birkaç yer dışında, yerini sekonder kemiğe bırakır (17).

2.1.4.2 Sekonder Kemik Dokusu

Yetişkinlerde bulunur. Kollajen iplikler birbirine paralel düzenlenmiş demetler, düzenli tabakalar halindedir. Hücreler daha az yer tutar. Spongiyoz (kansellöz) ve kortikal (kompakt) olmak üzere iki tiptir (23).

2.1.4.2.1 Spongiyoz (Kansellöz) Kemik

Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ve yassı kemiklerin iç yüzeylerinde bulunur. Geniş trabeküler aralıkları vardır ve daha yavaş bir yaşam döngüsüne sahiptir (23).

2.1.4.2.2 Kortikal (Kompakt) Kemik

Uzun kemiklerin diyafiz kısmı ve tüm kemiklerin dış yüzeylerini kaplar. İçerisinden kan damarları geçen havers ve volkmann kanalları vardır (23).

2.1.5 Kemik Oluşumu ve Büyümesi

Olgun kemik sadece mevcut yüzeylere yeni kemik materyalinden oluşan tabakaların depolanması ile büyüme gösterebilir. Ancak embriyoda kemik oluşumuna, puberteye kadar ki dönemde de kemik uzunluğunda artışa gereksinim vardır.

Kemik, farklılaşmamış mezenkimal dokularda iki yolla oluşur. Osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile gerçekleşen intramembranöz kemikleşme ya da daha önce varolan kıkırdak matriksinin üzerine kemik matriksinin çökmesi ile oluşan endokondral kemikleşme yoluyla oluşmaktadır (17).

Kemiğin boyuna büyümesi epifiz plağında gerçekleşen kıkırdağın interstisyel büyümesi ve alttan kemik dokunun endokondral yolla eklenmesi ile sağlanır. Kemiğin enine büyümesi ise periosteumdaki osteoblastik aktivite ve apozisyonel yolla yeni kemik eklenmesi ile sağlanır.

2.1.5.1 İntramembranöz Kemikleşme

Kafatasının yassı kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı bölümleri bu tür kemikleşmeyle meydana gelir. Damardan zengin mezenkimal doku içinde oluşur. Mezenkimal hücreler, osteoid sentezleyen osteoblastlara farklılaşır. Osteoid salgılanır, kalkerleşir ve osteoblastları sarar. Osteosit olarak farklılaşan hücreleri içeren ilk konsantrik lamel gelişir. Doğrudan mezenkimden kemik oluşumudur (18).

2.1.5.2 Endokondral Kemikleşme

Kısa ve uzun kemikler bu tür kemikleşmeyle meydana gelir. Hiyalin kıkırdaktan minyatür model oluşur, takiben kıkırdak dokunun yerini kemik doku alır.

Kemik oluşacak yerde hiyalin kıkırdak bir model oluşur. İçerisindeki kondrositler hipertrofiye uğrar. Sitoplazmalarında glikojen depolanır ve hipertrofi sonucu kalsifiye olurlar. Diyafiz kıkırdağında bulunan perikondrium damarlanır ve kıkırdaktaki hücreler osteoprogenitör hücrelere dönüşür. Perikondrium periosta dönüşür. Yeni osteoblastlar kemik matriksi salgılar. İntramembranöz kemikleşmeyle subperiosteal kemik manşet yapısı kıkırdak yüzeyinde oluşturulur. Kondrositlerin beslenmesi kemik manşetince engellenir. İskemi sonucu, kondrositler ölmeye başlar. Ortada birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur ve bunlar ilerideki kemik iliğini oluştururlar. Osteoklastlar periosteal delikler açarlar ve osteoprogenitör hücreler, hematopoetik hücreler ve kan damarları buraya gelerek besin ve oksijen taşırlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığı ile birleşerek kıkırdak matrikse çöker. Diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşarak kalsifiye kıkırdak / kalsifiye kemik kompleksi haline gelir. Kemik son şeklini alıncaya kadar bir taraftan yeni kemik yapılır, diğer taraftan da yapılan kemiğin bir bölümü yıkılır (19, 23).

2.1.6 Kemik İyileşmesi ve Evreleri

Kemikte meydana gelen herhangi bir hasar sonucunda, kemik iliği boşluğu, korteks, periosteum ve kemiği saran yumuşak dokularda farklı reaksiyonlar meydana gelir. Hasarın tipine, lokalizasyonuna ve tedavi metoduna bağlı olarak bu reaksiyonlar aynı anda veya ilerleyen dönemlerde gelişebilir (25). Kemik iyileşmesi; hematoma ve granülasyon dokusu oluşumuyla başlayıp, daha sonra iyileşme dokusunun yerini aldığı ve kemiğin yeniden şekillenmesiyle sona eren olaylar zinciridir. Evreler birbirinden mutlak sınırlarla ayrılmazlar, kendinden önceki veya sonraki evre ile iç içe bulunurlar (26).

Başarılı bir kemik iyileşmesi canlı periost varlığına, kırık uçların uygun biçimde karşı karşıya getirilmesine ve hareketsizleştirilmesine bağlıdır. Yeni kemik oluşumu embriyonik gelişim ve büyüme sırasında görülene benzer. Bu sebeple, kemik hasarlarına tedavi yaklaşımında embriyolojik iyileşme göz önünde bulundurulmalıdır. Embriyogenezdeki mekanizma, rejenerasyonda da görüldüğünden hasarlı kemikteki iyileşmede skar görülmez (24).

2.1.6.1 Enflamasyon Evresi (1-4 gün)

Kemikte de diğer dokularda olduğu gibi hasara ilk yanıt enflamasyon ve ödemdir. Kemik iliği boşluğu ve çevre dokulardaki yırtılan kan damarlarından kanama meydana gelir. Yırtılan damarlardan çıkan kan aralara dolarak pıhtılaşır veya hematoma meydana gelir. Pıhtı veya hematoma kemik iyileşmesinde büyük öneme sahip hücresel olayların başlamasını sağlayan sinyal veren moleküller içerir. Bölgedeki osteonların dolaşımı durur, kemik matriksin yıkımı ve hücre ölümü gerçekleşir. İlk görülen hücreler mezenkimal kök hücrelerdir. Bu hücreler farklılaşma yeteneğine sahip öncü hücrelerdir. Pıhtı önce akut enflamasyon hücreleri ile, sonra da kronik enfeksiyon hücreleri ve makrofajlar ile dolar. Pıhtı daha sonra fibrinden zengin organize bir yapıya dönüşür.

2.1.6.2 Onarım Evresi (2-40 gün)

Onarım evresinde hematoma organize olur. Mezenkimal öncü hücreler lokal uyaranlara cevap vererek farklılaşmaya başlar. Hematoma organize olmaya başlar. Mezenkimal öncü hücreler yeni damar oluşumu, fibroblast, hücreler arası materyaller, destek hücreleri ve diğer hücrelere farklılaşırlar.

Pıhtının etrafında ince bağ dokusuyla çevrelenmiş damarlar filizlenir. Damarlardan önce nötrofiller, peşinden de monositler açığa çıkar. Bu hücreler pıhtı ve yıkılan diğer dokuları fagosite etmeye başlar ve ölü kısımlar temizlenir. Diğer taraftan damarların etrafındaki bağ dokusunda fibroblastlar hızla bölünüp çoğalır ve temizlenen alanlara yayılırlar. Burada granülasyon dokusu oluştururlar. Bol kollajen içeren bu dokuya fibröz kallus adı verilir. Bu doku sonra yerini hiyalin kıkırdak dokusuna bırakır.

2.1.6.3 Osteoid Doku Oluşumu Evresi (12-21 gün)

Kıkırdak matriksi kireçlenir ve kemiklerin uçları oldukça sert olan kıkırdak doku ile bağlanır. Şekillenen bu dokuya geçici kallus ya da kıkırdak kallus denir. Kallus yüzeylerini kemik zarları örter. Zarda bulunan osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar kemik dokusu yapmaya başlarlar. Osteoblastlar arasında yarı katı bir madde olan osteoid dokusu oluşmaya başlar.

2.1.6.4 Geçici Kallusun Kalsifikasyonu Evresi (21. günden sonrası)

Kallusun içi ve dışında intramembranöz kemik meydana gelir ve kıkırdak hücreleri beslenemeyip bozulmaya başlar. Yerlerini endokondral kemikleşme ile şekillenen primer yapıdaki spongiyöz kemik dokusu alır. Bu dokuya kemik kallusu denir. Daha sonra kemik üzerine gelen kuvvetler kemik kallusunun yeniden şekillenmesinde görev alır. Kallusun yerleşimine göre spongiyöz (kansellöz) veya kortikal (kompakt) kemiğe dönüşür.

Kuvvetler kemik büyümesi sırasında gerçekleşen ve kemiğin yapısını etkileyen kuvvetlerle aynı ise kallusun primer kemik dokusu, sekonder yapıda olan kortikal kemik dokusuna dönüşür ve kemik yeniden şekillendirilerek ilk yapısına kavuşur. Bu şekilde oluşan kemik iyileşmesine sekonder kemik iyileşmesi denir. Eğer kemik uçları birbirine yaklaştırılarak fiske edilmişse kallus oluşmadan kemik iyileşmesi meydana gelir. Bu tür iyileşmeye de primer kemik iyileşmesi denir (23).

2.1.7 Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

2.1.7.1 Hormonlar

Parathormon (PTH); kalsiyum ve fosfor metabolizmasını düzenleyen, paratiroid bezlerden salgılanan, kemikten kalsiyum salınımını ve böbreklerden

kalsiyum reabsorpsiyonunu arttırmakla görevli 84 aminoasitten oluşan bir hormondur (27). Sadece osteoblastlar PTH reseptörlerine sahiptirler. Kemik yapım ve yıkımında iki yönlü etki gösterir. Osteoklastik etkiyi osteoblastların ürettiği RANK ligandını içeren yüzey sitokinleri aracılığı ile gerçekleştirmektedir. PTH, osteoklast formasyonuna neden olan sitokinleri aktive ederek osteoklastları uyarır ve indirekt rezorbsiyona yol açar. Osteoklastlar üzerinde PTH reseptörü bulunmadığı için direkt rezorbsiyon yapamaz. PTH anabolik etkisi ile kemik yapımını artırır ama mineralizasyonu arttırmaz. PTH'ın uyardığı osteoblastların yeni yapılan kemiği mineralize etmemesi ile osteoidde artış meydana gelir. Serum kalsiyum düzeyini devam ettirmek için kemik yıkıldığında iskelet matriksinin korunması açısından bu önemlidir (28). Serum PTH seviyesini ayarlayan en önemli faktör plazma iyonize Ca^{++} düzeyidir. Paratiroid bezinde kalsiyuma duyarlı reseptörler bulunur ve bu reseptörler sayesinde paratiroid bezi kandaki iyonize kalsiyum düzeyinde meydana gelen en ufak değişiklikleri hisseder. Serum Ca^{++} 'u 5.2 mg/dl olan fizyolojik değerin altına düştüğünde, homeostazı sağlamak için, PTH sentezi ve salgılanması artar. PTH sentezi düşük kalsiyum düzeyi ile uyarılır; yüksek kalsiyum düzeyi ile inhibe olur. PTH artışı veya dışarıdan yüksek miktarda PTH verilmesi ile kortikal kemikte rezorpsiyona yol açar. Düşük miktarda ve aralıklı verilen PTH ise preosteoblastın olgun osteoblasta dönüşümünü stimüle eder. Osteoblast yaşam süresini ve sayısını artırarak kemik üzerinde pozitif etki gösterir. PTH doz ile bağlantılı olarak kemik döngüsü üzerinde çift yönlü etki gösterir (29).

Tiroid hormonu olan kalsitonin doğrudan osteositler ve osteoklastlar üzerindeki reseptörlere etki eder. Osteositlere etkisi kemik deminerilizasyonunu inhibe etmesidir. Osteoklastlara etkisi ise rezorptif aktivitelerini inhibe etmektir. Plazmadaki kalsiyum ve fosfor düzeylerini düşürüp kemik yapımını artırır.

Östrojen kemik rezorpsiyonu ve yapımında önemlidir. Östrojen ve bir derecede testosteron osteoblastlara ve periferik monositlere etki ederek osteoklast farklılaşma faktörü olan IL-6 yapımını inhibe eder. Sonuçta östrojen varlığı kemik rezorpsiyonunun düşük olmasını sağlar. Eksikliğinde osteoklast yapımı ve aktivitesi artar ve kemik kütlelerinde azalmaya neden olur. Yaşlanma sırasında kemik yıkımın engeller.

Hipofiz ön lobundan salınan büyüme hormonu (somatotropin), epifiz diskindeki kıkırdak hücrelerinin büyümesini uyarır (30).

Glikokortikoidler matriks protein sentezini azaltarak kemik yapımını baskılar ve kemik kütlelerini azaltırlar. Osteoblastların PTH duyarlılığını arttırarak kemik rezorbsiyonunu uyarırlar (31).

2.1.7.2 Beslenme

Proteinler kollajen sentezinde gerekli aminoasitlerin sağlanmasında, kalsiyum ve fosfor matriks kalsifikasyonunda önemlidir. D vitamini bağırsaklardan kalsiyum ve fosforun absorpsiyonunu sağlar. D vitamini ya besinlerle alınır ya da ince bağırsaktaki hücreler tarafından üretilen ve kanla deriye taşındığında güneş ışığı etkisiyle D vitaminine dönüşen 7dehidrokolesterolden oluşturulur. Eksikliğinde kalsiyum alınımı azalır. C vitamini kollajen sentezinde etkili olup yetersizliği kollajen yapımını etkiler. A vitamini kemikte yapım ve yıkımı dengeler, osteoblast ile osteoklast dağılımı ve aktivitesini belirler (23).

Kalsiyum, kemik mineralizasyonu, kas ve sinirlerin fonksiyonunda, hücreler arası ve hücre içi sinyalizasyonda, hücre büyümesinde, kan pıhtılaşmasında, enzimatik olaylarda ve birçok vücut fonksiyonunda görevlidir. Kalsiyum vücuda sadece diyet yoluyla alınır. İnsan vücudunda 1-2 kg kadar kalsiyum bulunur ve % 99'u kemikte hidroksi apatit kristalleri şeklinde bulunur. Kalsiyum iskeletin mekanik gücünü sağladığı gibi, intrasellüler ve ekstrasellüler kalsiyum havuzlarının devamı için dinamik bir depo görevi görür. Kandan kemiğe ve kemikten kana günde 250-500 mg kalsiyum geçişleri görülür. Bu olay osteoblast ve osteoklast hücrelerinin birbirleriyle olan fizyolojik veya patolojik bağımlılığından etkilenir. Kalsiyum homeostazı; barsak, böbrek ve kemikteki kalsiyumun geçişini kontrol eden hormonal sistemle temin edilir. Kalsiyum düzenleyici sistem PTH, PTH reseptörü, $1,25(OH)_2D$ ve vitamin D reseptörü, iyonize Ca^{++} ve kalsiyum algılayıcı reseptörlerden oluşur. Kan iyonize Ca^{++} 'u direkt olarak PTH'yı; PTH, kalsiyum algılayıcı reseptörü aktive ederek baskılar. Serum Ca^{++} seviyesindeki azalma, paratiroid bezinde kalsiyum algılayıcı reseptörü inaktive eder ve PTH salgısı artar, böbrekteki PTH reseptörü aktive olur ve tubuler Ca^{++} absorpsiyonunu ve kemik resorpsiyonunu artırır. Artmış PTH, barsaktaki vitamin D reseptörünü aktive ederek, barsaktan Ca^{++}

absorpsiyonunu artırır, serum Ca^{++} u yükseldiğinde ise PTH salgısını azaltır ve kemik rezorpsiyonu inhibe olur. Serum Ca^{++} seviyesindeki azalma böbrekteki kalsiyum algılayıcı reseptörü inaktive ederek Ca^{++} reabsorpsiyonunu artırır ve PTH etkisini güçlendirir. Bu hormonal cevaplar serum Ca^{++} seviyesini düzeltir ve negatif geri bildirimini durdurur. Serum Ca^{++} seviyesinin yükselmesiyle bu olaylar tersine döner ve hormonal cevabı serum Ca^{++} 'u düşürür. Bütün bu mekanizmalar sağlıklı bireylerde total serum Ca^{++} seviyesini fizyolojik sınırlar içinde tutar (32).

Kemiğin gelişimi, büyümesi ve onarılması, beslenmeye, güneş ışığına, hormonlara ve fiziksel egzersizlere bağlıdır.

2.1.7.3 Yandaş Hastalıklar

Diabetes Mellitus'da kemik mineral yoğunluğunda, kemik mineral içeriği ve serum osteokalsin düzeyi ve biyomekanik gücünde azalma görülür (33).

Glukokortikoid hormon salgılanmasının artması kemik iyileşmesini olumsuz etkiler. Kortikosteroid ilaçların kullanılmasını gerektiren romatizmal eklem hastalıkları, otoimmün hastalıklar, Cushing Sendromu gibi durumlarda da kemik iyileşmesi olumsuz yönde etkilenir (34).

Paget, osteopetrosis, Rickets, osteomalasia, osteogenesis imperfekta, gibi kemik tutulumu yaratan genetik ve metabolik hastalıklar da kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkiler.

2.1.7.4 İlaçlar

Venöz tromboembolinin önlenmesi ve tedavisinde kullanılan heparin kemik yapımını azaltır ve kemik rezorpsiyonunu artırır. Günde 15 000 IU üzerinde ve 3 aydan fazla kullanımda kemik üzerinde olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı heparinin iskelet üzerine etkileri heparine benzer olmakla birlikte kemik kaybı daha az oranda görülmektedir. Warfarin'in kemik mineral yoğunluğunu azalttığına ve kırık oranını artırdığına dair çok kısıtlı veriler bulunmaktadır (32).

Non steroid antiinflamatuar ilaçlar kemik iyileşmesini yavaşlatır. Non steroid antiinflamatuar ilaçlar prostaglandinlerin osteoblastik aktiviteyi arttırıcı etkisini önleyerek kemik iyileşmesini geciktirirler (35).

Glukokortikoidler enflamatuar hastalıkların, otoimmün hastalıkların, neoplazilerin tedavisinde kullanılır. Osteoblastik diferansiyasyon ve fonksiyonu bozarak kemik yapımını azaltırlar (36).

Antiepileptik ilaçlar (fenitoin, fenobarbital, primidon, karbamazepin) kemik mineral yoğunluğunu azaltıcı ve kırık riskini artırıcı etkilerini D vitamini metabolizması üzerinden yapmaktadırlar (32).

Diürezi arttırmak amacıyla kullanılan furosemid grubu antihipertansif ilaçlar böbreğin Henle kulbunda bulunan Na-K-Cl kotransport sistemini inhibe eder ve üriner kalsiyum eksresyonunu arttırlar. Üriner kalsiyumdaki azalma kronik dönemde PTH ilişkili yolları tetikleyerek kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkiler.

Proton pompa inhibitörleri midede asit oluşumunun son basamağında yer alan hücrelerin yüzündeki adenozin trifosfatın fonksiyonunu geri dönüşsüz durdurur. Kalsiyum malabsorbsiyonunu tetikleyerek kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkiler (37).

2.1.7.5 Yaş

İlerleyen yaş ile beraber osteoblastların aktivitelerinde azalma meydana gelir. Menopoz sonrası östrojen salgılanmasının durması ile osteoporoz meydana gelir.

2.1.7.6 Alışkanlıklar

Sigara kemik iyileşmesini yavaşlatır, kemik mineral yoğunluğunu azaltır ve osteomyelit riskini artırır. Etken maddesi olan nikotin vücutta D vitamini depolanmasını ve osteoblast aktivitesini azaltır (38).

2.1.7.7 Kemoterapi Radyoterapi

Yüksek dozda radyasyon, kemikteki damarsal yapıyı bozarak kan akımı ve oksijen desteğini azaltmakta, hücresel yenilenme ve osteojenik kapasitenin azalmasına sebep olmakta ve kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir (39).

2.1.8 Kemik Yapım-Yıkım Belirteçleri

Kemik dokusu metabolik aktif ve dinamik bir doku olarak sürekli dönüşüm gösterir. Sağlıklı erişkinde osteoklastik ve osteoblastik aktivite birbirine sıkıca

bağlıdır. Kemik kaybı bu iki sürecin bozulması veya dengesiz hale gelmesi ile oluşur. Osteoblast ve osteoklastlar aracılığıyla ortama verilen yan ürünler kemik yapım yıkım belirteçleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Kemik yapım belirteçleri osteoblastların sentez etkinliğini veya prokollajen metabolizmasını değerlendirir. Yıkım belirteçleri ise osteoklast etkinliği ve/veya kollajen parçalanmasını yansıtır (Tablo 1) (40, 41).

Tablo 1. Kemik Yapım-Yıkımının Biyokimyasal Belirteçleri

Kemik yapımı biyokimyasal belirteçleri	Kemik özgü alkalin fosfataz Tip I kollajen C-terminal propeptid Tip I kollajen N-terminal propeptid Osteokalsin
Kemik yıkımı biyokimyasal belirteçleri	Tip I kollajen çapraz bağlı C- telopeptid (CTX) Tip I kollajen çapraz bağlı N- telopeptid (NTx) Pridinoline Deoksi pridinoline Serum tartrat dirençli asid fosfataz Hidroksiprolin

Organik kemik matriksinin % 90'dan fazlası tip I kollajenden oluşur. Kemik metabolizması sırasında, olgun tip I kollajen parçalanır ve küçük fragmanları seruma geçerek idrar ile atılır. Kemik rezorpsiyonunda tip I kollajen yüksek oranda parçalanır ve kanda kollajen fragmanları düzeyi yükselir.

CTX kemikte tip I kollajenin yıkımı için spesifiktir. Kemikteki tip I kollajenlerin sağlamlığını artırmak için çapraz bağlar mevcuttur. Kemik yıkımı sırasında çapraz bağlarla bağlı telopeptidler olarak bilinen terminal fragmanlar kanda ve idrarda saptanır. CTx kemikte bulunan ve osteoklastlar tarafından rezorbe edilen tip I kollajenin çapraz bağlantılar yapan peptididir. Kemik rezorpsiyonu sırasında açığa çıkan bu kısım, diğer dokularda bulunmadığından kemik dokuya özgüdür. CTX hem kemik rezorpsiyonunun tayininde hem de antirezorptif tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılan bir belirteçtir. Kemik rezorpsiyonunun değerlendirilmesinde en önde gelen serum belirleyicisi CTx'tir. Hem PTH hem de osteokalsin ile iyi bir korelasyon gösterir. Çapraz bağlı telopeptidlerin ölçümü böbrek fonksiyonlarından etkilenir. Ancak tip I kollajen çapraz bağlı C- telopeptid

(CTx) konsantrasyonunun kemik rezorpsiyonu ile korele olduğu gösterilmiştir (42). Marx bifosfonat tedavisi gören hastalarda cerrahi girişim öncesi risk belirleyicisi olarak serum CTx düzeyinin ölçülmesini önermiştir (43).

Kemik kayıp hızının belirlenmesinde, kalça kırık riskinin hesaplanmasında, hızlı kemik kaybedenlerin belirlenmesi ve tedavilerinin planlanmasında, hormon replasman tedavisi, bifosfanat tedavilerinin takibi ve etkinliğinin izlenmesinde, metabolik kemik hastalıklarında tedavi seçimi, takibi ve ilaç doz ayarlamasında CTx testi kullanılmaktadır. Kronik böbrek yetersizliği, hiperparatiroidizm, osteomalasi, romatoid artirit, multiple myeloma, karsinom kaynaklı kemik metastazlarında serum CTx düzeyi artar (44).

2.2 Osteoporoz

2.2.1 Tanım

Osteoporoz ilk kez JG Lobstein tarafından 1829'da "gözenekli kemik" anlamına gelen "porous bone" tanımı ile yapılmıştır (45). Otopsilerde kemikte yapılan gözlemlere dayanılarak türetilmiş bir kelimedir (46). Pommer 1885'te osteoporozu patolojik açıdan birim hacimdeki kemik kütlesinin azalması olarak tanımlamıştır (47). Osteoporoz radyolojinin ilerlemesi ile 1900'lü yıllarda netlik kazanmıştır (48). Albright tarafından 1948'de "kemik içinde çok az kemik" olarak tanımlanmıştır (49). 1970'lerde ise yaşlanma ile bereber oluşan bir kemik kaybından ziyade yaşlanmanın etyolojik faktör olduğu başka bir hastalık olarak tanımlanmıştır (50).

Dünya Sağlık Örgütü, 1990'da osteoporoz konferansında osteoporozu "düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro mimarisinin bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığı" şeklinde tanımlamıştır (46, 51, 52).

Osteoporoz kırık ya da vertebral deformite gelişene dek asemptomatiktir (53). Asemptomatik dönemde kemik mineral yoğunluğu ve içeriği azalmaktadır. Fizyolojik sınırların dışında, kırık olmaksızın kemik kütlesinin azalması osteopeni ve osteoporoz, kırık ile birlikte kemik kütlesi azalması ise yerleşmiş osteoporoz olarak

tanımlanır (54). Bu yüzden 1996'da Dünya Osteoporoz Kongresi'nde yapılan fikirbirliğinde osteoporoz, dual enerji x-ray absorbsiyometre (DEXA) ve kırık varlığına göre tanımlanmıştır (Tablo 2) (31).

Tablo 2. DEXA İle Osteoporoz Tanımlaması

Normal	Kemik mineral yoğunluğunun (KMY) genç erişkinlere göre 1 standart sapmanın altında olması
Osteopeni	Kemik mineral yoğunluğunun (KMY) genç erişkinlere göre -1 ile -2,5 standart sapmanın arasında olması
Osteoporoz	Kemik mineral yoğunluğunun (KMY) genç erişkinlere göre -2,5 standart sapmanın fazla düşük olması
Yerleşmiş Osteoporoz	Kemik mineral yoğunluğunun (KMY) genç erişkinlere göre -2,5 standart sapmadan fazla düşük olması ve ek olarak bir veya daha fazla kırık bulunması

2.2.2 Sınıflama

Osteoporoz yaş, lokalizasyon, kemik tutulumu, etyoloji ve histolojik görünümüne göre çok çeşitli sınıflandırılabilir (Tablo 3). En yaygın olan sınıflama etyoloji ve lokalizasyona göre sınıflamadır (45, 55-57).

Tablo 3. Farklı Açılardan Osteoporoz Sınıflaması (55)

Yaşa göre	Jüvenil	Adult	Senil
Lokalizasyona göre	Yaygın	Bölgesel	
Tutulan kemik dokuya göre	Trabeküler	Kortikal	
Etyolojiye göre	Primer	Sekonder	
Histolojik görünümüne göre	Hızlı döngülü	Yavaş döngülü	

Yaygın osteoporoz iskeletin tümünü etkilerken belli bir bölge etkilenecek bölgesel osteoporoz da görülebilir. Yaygın osteoporoz etyolojiye göre primer ve sekonder olarak ayrılmaktadır (Tablo 4) (55).

2.2.2.1 Primer Osteoporoz

Sebebi tam olarak bilinmemektedir. Kendi içinde klinik bulguların başlangıç yaşına göre sınıflandırılır.

2.2.2.1.1 Postmenapozal (Tip 1)

Menapoz sonrası 15-20 yıl içinde 65 yaşa kadar olan kadınlar etkilenmektedir. Östrojen eksikliği patogeneizde temel faktör olarak göze çarpmaktadır. Östrojen eksikliğinde kemik rezorpsiyonundaki sitokinlerin inhibe olmaması ve kemik formasyonundaki sitokinlerin de sentezinin uyarılmaması ile sürecin hızlandığı düşünülmektedir. Trabeküler kemik tutulumu belirgindir. Primer kırık lokalizasyonu vertebra ve el bileğinde olur (58, 59).

2.2.2.1.2 Senil (Tip 2)

70 yaş üstü kadın ve erkeklerin kemik hastalığını ifade eden klinik tablodur. Patogenezinde yaşlanma ile paratiroid fonksiyonun artması, D vitamini metabolizmasının bozulması, kalsiyum emiliminin ve kalsitonin salınımının azalması, mast hücrelerden osteoblastların fonksiyonlarının bozulması rol almaktadır. Trabeküler ve kortikal kemik aynı oranda tutulmuştur. Primer kırık lokalizasyonu kalça, humerus ve tibiada görülür (60).

Tablo 4. Tip I ve II Osteoporozun Karşılaştırması (55)

	Tip I osteoporoz	Tip II osteoporoz
Patogenez	Östrojen yetersizliği	Östrojen ve testosteron yetersizliği
PTH	Normal veya azalmış	Artmış
Ca kaybı	Artmış	Azalmış
Yaş	Postmenopoz + 10 Yıl	70-75 yaş üstü
Kemik kayıp hızı	hızlı ve orantısız	Yavaş
Tutulan kemik	Trabeküler > kortikal	Trabeküler ve kortikal
Kırık	Vertebra , el bileği	Kalça, vertebra, pelvis, tibia, humerus

2.2.2.1.2.3 İdiyopatik (Juvenil, erişkin)

Juvenil idiyopatik osteoporoz 8-14 yaş arası çocuklarda ortaya çıkan sebebi bilinmeyen osteoporozdur. Erişkin idiyopatik osteoporoz genç erkekler ve premenopozal kadınlarda sebebi bilinmeyen osteoporozdur (61).

2.2.2.2 Sekonder Osteoporoz

Osteoporozu neden olan etiyolojik faktör yoktur (62). Endokrin, romatizmal, hematolojik, gastrointestinal, onkolojik hastalıklar ve çeşitli ilaçların kullanımı gibi bilinen sebebe bağlı olarak gelişir. Pek çok faktörün etkili olması nedeniyle primer sekonder ayrımını yapmak güçleşir.

Premenopozal kadınlar ve genç erkeklerde genellikle sekonder osteoporoz görülür. Premenopozal kadınların % 50-90'ında (63), erkeklerinde % 50'sinde (64) görülmektedir.

Çeşitli ilaçlar kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkileyerek sekonder osteoporozu yol açmaktadır. Antikoagülanlar kemik kaybına ve osteoporozu neden olabilen ilaçlar arasındadır.

Heparin kemik yapımını azaltır ve kemik rezorpsiyonunu artırır. Düşük molekül ağırlıklı heparinin iskelet üzerine etkileri heparine benzer olmakla birlikte kemik kaybı daha az oranda görülmektedir (32). Warfarin, K vitamini analogudur. Warfarin direkt olarak osteoblastlar tarafından salgılanan vitamin K bağımlı nonkollajen bir protein olan osteokalsini inhibe ederek kansellöz kemik alanında ve kemik formasyon hızını azaltır. İndirekt olarak warfarin kullanan kişilerin K vitamininden zengin besinlerin alımını engellendiğinden hiperhomosisteinemiye yol açarak kemik kaybına yol açar. Asetilsalisilik asit de prostaglandin sentezini inhibe ederek osteoblast stimülasyonunu baskılar ve kemik iyileşmesini olumsuz etkiler (37).

2.2.2.3 Heparin İlişkili Osteoporoz

Heparin 1916'da Mc Lean tarafından tesadüfen öküz karaciğerinde, doğal negatif yüklü bir glikozaminoglikan olarak bulunmuştur. Howell pıhtılaşmayı engellediğini farketmiş ve karaciğerle ilişkilendirerek hepar olarak adlandırmıştır. Heparinin eldesi ise 1935-1937'de Best ve Jorpes tarafından gerçekleştirilmiştir. Crafoord tarafından 1937-1938 yıllarında ilk kez tedavide kullanılmıştır (65, 66).

Heparinin en önemli etkisi antikoagulan ve antitromboembolik özelliklere sahip olmasıdır. Kanda inaktif olarak bulunan antitrombin III proteinini aktive eder. Antitrombin III aktive olduğunda trombin, FVII, FIX, FX, FXII inhibe eder ve pıhtılaşmayı inhibe eder. Heparin venöz tromboz tedavisinde ve profilaksisinde, pulmoner embolizm, karasız angina, akut miyokard enfartüsü, koroner operasyonlar, damar içi yaygın pıhtılar, hemodiyalizde pıhtı oluşumunu önlemede kullanılmaktadır (65, 67).

Heparinin kemik kaybı ve osteoporozu yol açtığı bilinmektedir. Bunu farklı yollardan yaptığı öne sürülmektedir. Renal 1 α -hidroksilaz aktivitesi üzerine heparinin inhibitör etkisi mevcuttur. IL-11 aracılı STAT-3 aktivasyonu ile osteoklast aktivasyonu sağlar. Heparin sklerostin ile bağlanarak Wnt/ β catenin sinyalizasyon yolağını inhibe ederek osteoblast diferansiyasyonunun bozar. Direkt osteoblastlara bağlanıp, osteoklast aktivasyonuna neden olacak maddeleri salar. Doz ilişkili düzeyde alkalen fosfataz aktivitesini artırır. Kalsifikasyonda ve matriks tip II kollajen içeriğinde azalma yapar (37). Avioli heparin ilişkili osteoporozu; heparin kemik hücrelerine direkt osteoblastik aktiviteyi azaltarak ve osteoklastik aktiviteyi arttırarak; iyonize kalsiyumu azaltarak sekonder hiperparatiroid görülmesi ve kemik kaybı; kemikte heparin ilişkili artmış mast hücreleri; kemikteki normal mukopolisakkarit matriks kullanımının engellenmesi sonucu hatalı kemikleşme olması ile açıklamıştır (68). Aarskog kemik kaybını heparinin D vitamini metabolizmasına etkisi ile açıklamıştır (69).

2.2.3 Epidemiyoloji

İnsan yaşamının uzaması ve dünya nüfusunun giderek yaşlanması ile osteoporoz ve osteoporozla ilişkili komplikasyonlar ve yaşamı olumsuz etkilemesinden dolayı önemli bir sağlık problemidir (70). Osteoporoz epidemiyolojisi yaşanan dünyamızda giderek önem kazanmaktadır (71). Osteoporoz ile ilgili epidemiyolojik bilgiler hastalığın en önemli objektif bulgusu olan kırıklar üzerinde yoğunlaşmıştır. Osteoporoz ile ilgili epidemiyolojik bilgiler oldukça kısıtlıdır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre postmenopozal kadınların yaklaşık % 30 oranında görülmektedir (72). Osteoporoz, kadınların % 30-50'si, erkeklerin de % 15-30'unda görülmektedir (73). Osteoporoz sıklığı yaşla birlikte artmaktadır. Taşkale ve arkadaşları 45-54 yaş grubunda osteoporoz sıklığını % 7,2, 55-64 yaş grubunda % 39, 65-74 yaş grubunda % 48,1 ve 75 yaş üstünde ise bu oranı % 66,7 olarak bulmuşlardır (74). Başka bir çalışmada, postmenopozal kadınlarda osteoporoz sıklığı % 14,9; 54 yaş altı grupta % 11,4; 55 yaş üstü grupta ise % 21,5 olarak bulunmuştur (75). Türkiye Osteoporoz Derneği'nin verilerinde osteoporoz 50-64 yaş arasında %17,1 iken, 65 yaş üzerinde % 33,7 dir (76). Ülkemizde osteoporoz ve osteopeni oldukça yaygındır ve ilerleyen yıllarda nüfusla orantılı artacağı öngörülmektedir.

2.2.4 Patogenez

Osteoporoz patogenezinde doruk kemik kütlesi, kemik yapım-yıkım döngüsünün hızı, genetik, yaş, hormonlar, beslenme gibi birden fazla faktör rol oynamaktadır. Normal şartlarda kemik yapım ve yıkımı dengededir. Remodeling döngüsünde bozulma olduğunda, kemik kitlesi kaybı ve osteoporoz riski artmaktadır.

Doruk kemik kitlesi büyümenin sonunda kemik kaybından önceki en yüksek kemik kitlesidir. Otuzlu yaşların sonunda kemik kütlesinde azalma başlamaktadır. Yaşam boyu olan kemik kaybı erkeklerde % 20-30, kadınlarda ise % 45-50'dir. Kırık riskini önlemede en yüksek doruk kemik kütlesine ulaşmak önemlidir (77).

Kemiğin büyümesine ve iskelet gelişimine olanak sağlayan kemik dokunun değişimine kemiğin yapılanması (modeling) denir. Bu dönemdeki kemik dokusunda yapım, yıkımı geçer ve doruk kemik kütlesi oluşana kadar devam eder. Geç adölesan dönemde doruk kemik kitlesi kazanıldıktan sonra kemik dokusundaki değişiklikler

kemiğin yeniden yapılanması (remodeling) olarak tanımlanır. Yaşlanma ile yıkım hızı yapım hızını geçer. Normal şartlar altında her iki olay dengeli bir biçimde devam eder. Remodeling döngüsünde bozulma, kemik kitlesi kaybı ve kırıklara karşı hassasiyetle sonuçlanır (Tablo 5) (56).

Tablo 5. Remodelingi Etkileyen Faktörler

Hormonlar	PTH Kalsitonin İnsülin Büyüme hormonu Kortikosteroid Östrojen Testesteron
Lokal faktörler	ILGF TGF-B FGF IL-1 IL-6 TNF PG PDGF

Yaşlanma ile östrojen ve testosteron hormonlarının azalması, sekonder hiperparatiroidizm, osteoblast fonksiyon azalması, beslenme bozukluğu, hareketsizlik ve d vitamini sentezinin azalması sonucu osteoporoz görülebilir (78).

Östrojen eksikliğinde osteoblastlarda RANKL sentezi artar, osteoblast aktivitesini azaltan osteoprotegerin üretimi azalır ve osteoklast farklılaşması artar, osteoblastogenezis azalır. Osteoklast apoptozisi azalır. RANKL/osteoprotegerin oranı kemik rezorpsiyonu yönünde değişir. IL-1, IL-6, TNF- α , makrofaj koloni stimulatör faktör gibi sitokinlerin üretimi artar (79, 80). Tip I osteoporozda temel mekanizma östrojen yetmezliğine bağlı osteoklastik aktivitede artış; osteoblastların PTH'ye duyarlılığın artmasının yanı sıra apoptozisin azalması; IL-1, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin yükselmesi ile kemikte yıkım gerçekleşir. Testosteron osteoblastogenezini aktive eder ve osteoklastogenezini inhibe eder (81). PTH osteoklast farklılaşmasını uyularak kemik rezorpsiyonunu artırır (80). IGF-1 azalması ile kemik yapımının azalmasında ve trabeküler mikro yapı arasında sıkı bir ilişki vardır. IGF-1 bunu SHBG düzeyini etkileyerek yapmaktadır (82). Glikokortikoid osteoblastları etkileyerek kemik formasyonunu ve kollajen sentezini azaltır. Osteosit apoptozisini

uyarır. Osteoklast apoptozisini erteleyerek kemik rezorpsiyonunu arttırır. Barsaktan kalsiyum emilimini azaltıp, böbrekten kalsiyum atılımını arttırarak serum kalsiyum düzeyini azaltır. Sekonder hiperparatiroidiye sebep olur (80). 5 mg prednizolon 3 aydan fazla kullanıldığında kemik mineral yoğunluğunu azaltıp osteoporoz görülmesini arttırır (83).

Doruk kemik kütlesine ulaşmada en önemli faktör beslenmedir. Kalsiyum, fosfor, D, K, C vitaminlerinin yeterli alınması osteoporozun önlenmesinde önemlidir. Tip II osteoporozda temel mekanizma kemik yapım azlığı ve kalsiyum emiliminde yetersizlik sonucu sekonder hiperparatiroid oluşması ile kemik yıkımının artmasıdır. Yetersiz kalsiyum alımı ve D vitamini eksikliğine bağlı kalsiyum malabsorpsiyonunda sıkıntı söz konusudur.

Kemik turnover hızı arttığında, kemik yapım süresi kısılacağı için yıkım ön planda seyreder. Postmenopozal osteoporozun asıl sebebi östrojen yetersizliğidir. Kemik rezorpsiyonu sonucunda serum kalsiyum düzeyi artar. PTH salgılanmasının baskılanması ve böbrekten kalsitriol sentezinin azalması ile bağırsak kalsiyum absorpsiyonu azalır. Postmenopozal dönemde kemik turnoverında yıkım ön plandadır ve trabeküler kemikte daha fazla kayıp görülür. Yaşlılığa bağlı osteoporozda kemik kaybından çok kemik yapımı azalır ve kortikal kemikte kayıp daha belirgindir (84). Erişkin erkeklerde, yaş artışıyla birlikte kortikal kemik kütlesi doğrusal bir azalma göstermektedir. Seks hormonları erkekte kemik döngüsünün regülasyonunda önemli olsa da son çalışmalar testosterona göre östrojenin kemik mineral yoğunluğu ile daha güçlü ilişkili olduğu, kemik kaybının daha iyi bir belirleyicisi olduğunu göstermektedir (85).

2.2.5 Görüntüleme Yöntemleri

Konvansiyonel radyolojik yöntemler ile osteopeni ancak kemik kaybı %30'u aşınca görülebilir. Erken tanıda hassas değildir. Trabeküler kemikte yapım-yıkım aktivitesi yüksek olduğundan kemik kaybı ilk trabeküler kemikte bulgularını gösterir ve radyolusensi artışı gelişir.

Dansitometrik teknikler single foton absorpsiyometri, dual foton absorpsiyometri, single enerji X ray absorpsiyometri, dual enerji X ray absorpsiyometri, vertebral morfometri, kantitatif ultrasonografi, magnetik rezonans

görüntüleme, kantitatif bilgisayar tomografi, dijital X ışını radyogrametri, fotodansitometri, kemik sintigrafisi yöntemlerinden biri kullanılmaktadır. En sık dual enerji X ray absorpsiyometri (DEXA) kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü DEXA ile osteopeni ve osteoporoz teşhisi için tanımlamalar yapmıştır (86).

DEXA radyasyon kaynağı olarak çift enerjili X ışını kullanan kemik mineral yoğunluğu ölçüm yöntemidir. Tek düzlemlilik kemik mineral yoğunluğu ölçülür ve gr/cm^2 olarak ifade edilir. Kemik kırık riskinin tahmini, erken dönem kemikte meydana gelen değişimler, osteoporoz tespiti ve kemik yapım yıkım oranlarının belirlenmesinde kullanılır. Ham kemik mineral yoğunluğu yerine T ve Z skorları kullanılır. Z skor ölçüm bölgesinin kemik mineral yoğunluğu ile aynı yaş ve cinsiyetteki sağlıklı kontrollerin ortalama değerlerinin standart deviasyon cinsinden hesaplanan miktarı arasındaki farkı gösterir. 75 yaş ve üstü, premenopozal kadın, genç erkek ve çocuk hastalarda Z skoru kullanılır. T skoru hastanın kemik mineral yoğunluğu ile genç erişkin ırktaki sağlıklı popülasyonun ortalama kemik mineral yoğunluğu arasındaki farkı standart deviasyon cinsinden tanımlar ve pik kemik kütlesini gösterir. Postmenopozal ve 50 yaş üzeri erkeklerde T skoru kullanılır. Değerlerdeki azalış kemik kırılabilirliğinde artma, osteoporoz riski ve kemik yıkımı düşündürürken, artış ise kemik kırılabilirliğinde azalma ve kemik yapımı ve direncinde artış olarak analiz edilir (87).

2.2.6 Kan ve İdrar Biyokimya Testleri

Kan ve idrar analizi genel değerlendirmede kullanılır. Serum kalsiyum, fosfor, kreatinin, PTH ve D vitamini seviyeleri ile idrar kalsiyum ve fosfat atımı seviyeleri ayırıcı tanıda kullanılır. Kemik yapımında serumda kemik matriksinin proteini olan osteokalsin, kemik yapımının yan ürünlerinden olan aminoterminal prokollajen propeptid (PINP) ve karboksiterminal prokollajen propeptid (PICP) ve osteoblastın enzimi olan kemiğe spesifik alkalen fosfataz ölçülür. Kemik yıkımında hidroksiprolin, piridinolin ve deokspiridinolin kollajen yıkım ürünleri, karboksi ve aminoterminal telopeptidler (CTx, NTx) tip I kollajenin çapraz bağlı telopeptidleri ve osteoklast enzimi tartarata dirençli asid fosfataz belirteçleri kullanılabilir (56). Biyokimyasal belirteçler ile henüz osteoporoz tanısı koyulamaz iken, tedavi ve

kemik döngüsü takibi yapılabilmektedir. DEXA ise tanıda altın standart iken tedaviyi takipte hassas bir yöntem değildir (42).

2.2.7 Osteoporozun Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisi

Diş hekimliği cerrahi uygulamalarında çene kemiğinin kantitesi veya yoğunluğu ve kemik kalitesi önemlidir. Osteoporozda özgü düşük kemik kütlesi ve mikro yapıda bozulmalar hızlı kemik turnover sonucu oluşur (88). Osteoporozda düşük kemik kütlesi ile ilgili histomorfolojik bulgular incelenmiş korteks, kortikal kemikte trabekülasyon, trabeküler kemik kütlesinde azalma, trabeküler incelmeye, trabeküler bağlantılarda azalma, mikro hasardır (89). Sağlıklı kemikte oluşan hasarlar kemik rezorbsiyon ve formasyonundaki denge ile tamir edilir. Rezorbe olmuş kemiğin yerine yeni oluşan kemik geçer ve bu süre yaklaşık 3 ay sürer (88). Uzamış osteoblastik değişim süresi ve kemik rezorbsiyon hızının artması sonucu net kemik kaybı görülür (90).

Osteoporozdaki morfolojik değişiklikler hem kortikal hemde trabeküler kemikte görülür. Trabeküler kemiğin yüzey alanı büyük olduğu için ve turnover hızı yüksek olduğu için osteoporoz ilk önce trabeküler kemiğin fazla olduğu kemiklerde bulgu verir (91). Kortikal kalınlığın azalması stres kırıklarına yol açar ve trabeküler kemikte osteoklastik rezorbsiyon görülür (92). Bu değişikliklerin sonucu kemiğin yoğunluk, sertlik ve gücü azalır. Bu patolojik değişikliklerin artmış osteoklast yaşam süresi ve azalmış osteoblast yaşam süresinin yanı sıra kemik turnover hızında dramatik artış nedeniyle olduğu düşünülmektedir (93, 94). Maksiler anterior bölge trabeküler kemikten zengin olduğu için çenede osteoporozla ilişkin ilk bulgular bu bölgede gözlenmektedir (95).

Osteoporozla ilişkili alveolar kemikteki değişiklikler, kemik mineral içeriği ve kret haciminin azalması şeklinde olmaktadır. Hayvan çalışmalarında overektomiye takiben kemik mineral yoğunluğunda anlamlı azalma (96-98), trabeküler mikro yapıda değişiklikler (99-101), mandibular kortikal kalınlıkta azalma (102) ile ilgili bulgular mevcuttur.

Osteoporoz çene kemiğinin mineral içeriği ve yoğunluğunda azalmaya, trabeküler mikromimaride bozulmaya, osteoblastik aktivitede ve remodelasyon

hızında artışa, kalan kemik hacmi ve kortikal kemik kalınlığında azalmaya yol açması ile özetlenebilir.

2.3 Elektromanyetik Alan

2.3.1 Elektromanyetik Alan

Elektromanyetik alan tedavisi fiziksel tıp ve rehabilitasyonda incinme bölgesinin, ağrı kaynağının, enflamasyonun ve kırık iyileşmesinin tedavisinde invaziv olmayan, güvenli bir yöntem olarak kullanılmaktadır. MRG, EKG, EMG gibi manyetik alanlar inceleme alanında kullanılmaktadır.

Elektromanyetik alan tedavisi “hastalığın mıknatıslarla veya manyetizmayla tedavisi”dir. Bazı doğal taşların metalleri çektiğini antik çağlardan beri bilinmektedir. Efsanede ülkemizde Magnesia Köyü’de Yunan bir çoban sandaletlerini çeken taşlar bulmuş ve bazı rahatsızlıkların tedavisinde kullanmışlardır. M.Ö. 1100’lerde Çinli gemiciler pusulada mıknatıs kullanmışlardır. 1600’lü yıllarda William Gilbert’in “De Magnete” kitabında bilimsel verilere rastlanmıştır (103). 1778’de Franz Mesmer “evreni gözle görülmeyen manyetik bir sıvının kapladığını ve insan vücudunun bir mıknatısa benzer kutuplar içerdiğini” iddia etmiştir. Hatta daha da ileri giderek vücut kutupları dünyanın normal manyetik akışı ile aynı düzlemde olmazsa hastalıkla sonuçlanacağını iddia etmiştir. Hans Christian Oersted 1820’de pusula iğnesinin yakınındaki bir telden akım geçtiğinde pusula iğnesinin saptığını ve telin çevresinde manyetik alan oluştuğunu bulmuştur. Yine 1820’de Ampere elektromanyetik mıknatısı geliştirerek manyetik cismin içinde çok küçük elektrik akımları dolaştığını bulmuştur. Michael Faraday ve Joseph Henry iletken maddelerde değişen manyetik alanların oluşabileceğini göstermişlerdir. Eski çağlarda Çin, Japonya’da hekimler ve bilim adamları manyetik materyalleri hastalıkların tedavisinde kullanmışlardır. Elektromanyetik alan tedavisinin kullanımı Japonlar tarafından 2. Dünya Savaşı sonrası başlatılmıştır. Daha sonra hızlı bir şekilde Avrupa ve Rusya’ya yayılmıştır. ABD’de ilk elektromanyetik alan klinik uygulaması 1977 yılında Basset tarafından yapılmış ve PEMF uygulamasının kemik iyileşmesini güçlendirerek olumlu etkisi bildirilmiştir. Bu alanda ilk kitap Bulgar Todorov tarafından 1982’de kaleme alınmıştır. Manyetik alan uygulaması ile 2.700

hastada 33 farklı patoloji ile ilgili deneyimlerini anlatmıştır. Bassett, 1970'lerde gecikmiş kırıklarının tedavisinde bifazik düşük frekans sinyali kullanılarak çok özel bir yaklaşım tanıtmıştır. Gecikmiş kırık, ağrı azaltılması, multiple skleroz ve parkinson olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde statik ve zamanla değişen manyetik alanların kanıtlanmış yararları olduğu bildirilmiştir (103-105).

İçerisinden elektrik akımı geçen bir iletkenin etrafında manyetik alan meydana gelir. Düz bir iletkenden elektrik akımı geçtiğinde oluşan manyetik alan kuvvet çizgileri daireseldir. Başparmak akım yönünü gösterecek şekilde avuç içine alınırsa parmaklar manyetik alanın yönünü gösterir. Bobin halinde sarılmış bir iletkenin geçen elektrik akımının oluşturduğu manyetik alan kuvvet çizgileri ise bobinin iki tarafındaki son halkaların yüzeyine dikey yöndedir. Parmaklar akım yönünü gösterecek şekilde bobin avuç içine alınırsa, başparmak manyetik alanın yönünü gösterir.

Bir telden akımın akışına göre manyetik alan oluştuğuna göre tersinde de bir tel değişen bir manyetik alana maruz kalırsa veya sabit bir manyetik alan içerisinde hareket ettirilirse akım oluşur. Manyetik alan içerisindeki iletkenin geçen manyetik alan çizgilerinin kantitatif ölçüsüne “manyetik akı” denir. Manyetik cismin oluşturduğu kuvvet çizgilerinin sayısıdır. Φ ile sembolize edilir ve birimi Weber (Wb)'dir. Manyetik alan iletkenin iki ucu arasında 1 volt elektrik akımı oluşturduğunda iletkenin geçen manyetik akı saniyede 1 Weber'dir. Birim alan başına düşen manyetik akıya “manyetik akı yoğunluğu” denir. “B” ile sembolize edilir ve birimi Tesladır (T). “Manyetik alan gücü” oluşan manyetik alanın genliği metrede amper olarak ölçülebilir ve “H” ile sembolize edilir ve birimi A/m'dir (Tablo 6) (106).

Tablo 6. Manyetik Alan İçin Kullanılan Birimler ve Dönüşümleri (106)

Büyüklik	Birimi	Dönüşüm
Manyetik Akı	Weber (wb)	1 Wb = 1 volt-sn 1 Wb = 1T.1m ²
Manyetik Akı Yoğunluğu	Tesla (T)	1 T = 1 Wb/m ² 1 T = 10 ⁴ G
Manyetik Alan Gücü	Amper/metre (A/m)	1 A/m = 0.012566 Oe

Dünyanın manyetik alan şiddeti 0.025 – 0.065 mT, tanı amaçlı MRG görüntüleme sisteminin manyetik alan şiddeti 100 - 10000 mT, saç kurutma makinasını manyetik alan şiddeti 1 – 2.5 mT, floresan lambanın manyetik alan şiddeti 0.1 – 0.5 mT’ dir.

Elektromanyetik alan cihazı enerji girişi, enerji depolama yeri, açma kapama düğmesi, bobinlerden oluşur. Cihaz çalıştırıldığında elektrik akımı tel bobinden geçer, manyetik alan akımın akışı ile oluşur.

Elektromanyetik alanın günümüz tıbbında tedavi amaçlı kullanımı 40 yılı aşkın süredir devam etmektedir. Çok alçak frekanslı manyetik alanlar kırık iyileşmesinde, kemik oluşumunun uyarılmasında, kemik büyümesinin aktive edilmesinde, osteoklastik aktivitenin inhibe edilmesinde, yara iyileşmesinde granülasyon ve fibröz doku oluşumunu etkileyerek hızlandırmada, yumuşak doku romatizmal hastalıklarda kullanılmıştır (107, 108). Elektromanyetik alan tıbbi tedavi amaçlı kullanımı maliyetinin düşük olması, girişimsel olmaması, yan etki riskinin az olması nedeniyle öne çıkmaktadır. Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) kaynamamış kırıklarda, osteoporozun önlenmesi ve tedavisinde güvenli ve etkili bir yöntem olarak PEMF uygulamasını onaylamıştır. PEMF’in hangi sağlık sorunlarına klinik yararı olduğu da gösterilmiştir. Elektromanyetik alan tedavisinin bilinen bir yan etkisi yoktur. Gebeliğin ilk 3 ayında, kulak içi işitme cihazı, insülin pompası gibi

implante cihaz bulunanlar, kalp pili olanlarda sorun yaşanabileceği için tavsiye edilmemektedir (109-111). Vücuda implante edilmiş metallerin bulunmasının PEMF'in terapötik yeteneğini etkilemediği belirtilmiştir (107).

2.3.2 Kemiğin Elektriksel Özellikleri

Elektrik ve manyetik alan uygulaması kemik üzerine nasıl etki ettiğinin açıklanmasında Wolff kanunu, piezoelektrik etki ve akıntı potansiyellerinden yararlanır. Kemiğe mekanik güç uygulandığında kemikte elektrik akımı meydana gelir. Akım oluşması ve daha sonra kemikteki hücrelerin aktivasyonu ile kemikte yapım ve yıkım olayları meydana gelir. Kemik içerisinde sert mineral kristaller bulunmaktadır. Birçok kristal de piezoelektriktir ve mekanik stres uygulandığında elektrik akımı meydana getirir. Plazma membranı da piezoelektrik özelliktedir. Mekanik uyarım ile geçirgenliğinde değişim olur ve elektriksel iletkenlik gösterir. Mekanik yüklerden eksik kalan kemikte osteojenik aktivite azalır osteoporotik belirtiler artmaktadır ve mekanik yüklerle oluşan elektriksel uyarıların elektromanyetik alan uygulamaları ile taklit edilerek kemikteki aktivitelerin kontrol edilmesi araştırılmaktadır (112). Kemiğin elektromanyetik özellikleri bir kemiğin genetik modele göre gelişmesi veya kırılan kemiğin iyileşmesi ve yeniden şekillenmesi kemiği uzun eksenini etrafında etkileyen stres kuvvetlerinin yarattığı elektromanyetik alan sayesinde olması şeklinde özetlenen Wolff kanunu ile tanımlanmıştır. Fukuda ve Yasuda (1953), Bassett (1957) kemiğin piezoelektrik özelliğini göstermiş ve bunun kaynağının kollajen liflerin ve mukopolisakkaritlerin bükülmesi, kollajen hidroksiapatit ara yüzeyindeki stresler olduğunu belirtmişlerdir (113, 114). Kemiğin diğer elektriksel özelliği de deforme edilen kemiğin içindeki ekstrasellüler sıvının, sıkışma bölgesinden gerilme bölgesine akması olarak tabir edilen akıntı potansiyelleridir. Bu akım sırasında sıvı içindeki iyonik yüklerin transferiyle hafif şiddetli elektriksel akım oluşmaktadır. Kemik streslerle yüklendiğinde, yüzeysel yük dağılımı değişmekte ve osteoblastik kemik yapımı ve osteoklastik kemik yıkımı görülmektedir. Yük olmadığında ise kemikte atrofi görülür. Piezoelektrik ve akıntı potansiyelleri kemik iyileşme sürecini denetleyen mekanizmalar olarak kabul edilmektedir (113).

2.3.3 Elektromanyetik Alanların Kemik İyileşmesine Etkisi

Elektromanyetik alanın hedefi hücre membranıdır. PEMF uygulamasının hücre membranının geçirgenliğini ve iyon dengesini değiştirdiği, hücre membran reseptörleri üzerine etkileri olduğu, difüzyon ve aktif transportu etkilediği bilinmektedir. PTH'ya refrakter osteoklast cevabını ortadan kaldırdığını ve kalsiyum alımında hızlı bir artışa neden olduğunu bundan dolayı PTH aracılı kemik rezorpsiyonunu azalttığı, transmembran voltajında küçük bir değişiklik oluşturarak hücre membranında kalsiyum iyonunun enzime ve/veya reseptör bölgesine bağlanmasında etkili olduğu belirtilmiştir (115). Dokularda zaman değişkenli akım oluşumuna yol açıp ve osteogenezisi artırdığı bildirilmiştir (116). Osteoblastları stimüle ettiği, osteoblastlar üzerinden kemik oluşumunu artırdığı ve osteoblast hücrelerinde alkalen fosfotaz aktivitesini artırıp, hücre diferansiyasyonu stimüle ettiği bildirilmiştir (107, 117). Osteoblastlarda TGF- α ve IGF-2 gibi çok sayıda büyüme faktörlerinin salınımını uyardığı bildirilmiştir (110, 118). Osteoblastlarda bu uyarıyı iyon transport kanalları üzerinden ve membran protein değişikliklerini elektroforetik ve elektroosmotik etkileriyle yaptığı belirtilmiştir (119). Kapiller damar oluşumunu ve endotel hücre proliferasyonunu artırıp, IGF ve TGF- β salınımlarını uyarmaktadır (120). Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmaları değerlendirildiğinde osteojenik belirteç olan alkalen fosfatazın PEMF grubunda anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur (121). Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasına yardımcı olan BMP-2'nin etkisini arttırmaktadır (122). Mezenkimal kök hücrelerin osteoblast adiposit, kondroblast gibi hücrelere farklılaşmalarında artmış büyüme hızları tespit edilmiştir (123). Aslan derlemesinde bağ dokusunda ekstrasellüler matriks proteinlerini kodlayan gen ekspresyonunu düzenleyerek kıkırdak ve kemik doku oluşumunu ve osteoblastları uyardığı, kalsiyum kanalları, hücre içi iyonize kalsiyum değişiklikleri, reseptör davranışları ve genler üzerine etkisi olduğu, DNA sentezini, transkripsiyonu ve intersellüler kalsiyumu ve mRNA sentezini artırarak ekstrasellüler matriks yapımını uyardığını belirtmiştir (116). Darbeli elektromanyetik alan uygulamasının farklı bir dizi mekanizma aracılığıyla kemik iyileşmesi üzerinde etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. İlk mekanizma, PEMF'in kemik segmentleri arasındaki boşlukta fibröz kıkırdak kireçlenmesini uyarmasıdır. İkinci olarak, PEMF'in iyonik kalsiyum kanallarına etkisi nedeniyle ortaya çıkan artmış kan akımı

ile kemik iyileşmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Üçüncü olarak, PEMF'in yara iyileşmesinde rezorbsiyon fazını önleyici etkisiyle erken osteoid ve kallus oluşumuna yol açtığı öne sürülmüştür. Dördüncü mekanizma PEMF'in osteoblastlar aracılığıyla kemik formasyon oranının artırması ile kemik iyileşmesi üzerinde bir etkisi olduğu şeklinde tarif edilmektedir (107). Elektromanyetik alan uygulamalarında esas amaç doğal iyileşmeyi taklit etmektir. Çankaya ve ark. insanda birçok metabolik aktiviteyi kontrol altında tutan esas mekanizmanın elektriksel yükler ve bunların oluşturduğu düşük elektrik akımı olduğunu ve bu akımların hücreler arası iletişimi sağlayarak metabolizmanın düzenlenmesinde büyük rol oynadığını belirtmiştir. Kemik iyileşmesi sırasında hücrelerin çoğalmasının elektrik akımlarının uyarması ile başladığı, bu elektrik akımlarının kemik iyileşme bölgesinde en yüksek düzeydeyken 2-3 haftada yavaş yavaş azaldığı, elektromanyetik alan uygulaması ile elektriksel uyarımın artırılarak hücrelerin çoğalması ve olgunlaşmasının devam ettiği ve yeni kemik yapımının artmasının beklendiğini belirtmişlerdir (112).

PEMF'in olumlu etkilerinin en etkili düşük şiddet (< 50 mT) ve düşük frekans (< 100 Hz) parametrelerinde olduğu bilinmektedir. Hastalıkların tedavisinde PEMF'in muhtemel uyarıcı parametrelerinin bir biyolojik pencere aralığında olduğu bildirilmiştir. Biyolojik pencere şiddet, frekans, süre ve bunların kombinasyonları ile tespit edilebilir. Ancak, kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etki sağlayacak şiddet, frekans ve süre konusunda görüş birliğine varılamamıştır. Ancak terapötik etkili manyetik alanın düşük frekanslı ve darbeleri özellikli olması gerektiği belirlenmiştir.

Heparinin, osteoporoz ve kemik kaybına yol açtığı ve kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Literatürde heparinin neden olduğu osteoporozun ve kemik iyileşmesindeki olumsuz etkilerinin önlenmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Fiziksel bir ajan olan darbeleri elektromanyetik alan uygulaması da kemik yapımını arttırmakta ve yıkımını azaltmaktadır. Bu çalışmada osteoporoz ve darbeleri elektromanyetik alan uygulamasının kemik iyileşmesi üzerinde etkilerinden yola çıkarak; 33 gün boyunca 2 IU/g heparin enjeksiyonu ile sekonder osteoporoz oluşturulan ratlarda, otuzbeşinci günde, sağ femur kemiklerinde kritik boyutlu kemik defekti kemik defekti oluşturularak postoperatif 28 gün boyunca hergün 1 saat ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında darbeleri

elektromanyetik alan uygulamasının yeni kemik oluşumu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Çalışma Planı

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 114S071 proje numarasıyla desteklenmiştir (Ek 1). Araştırmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından hayvan etiği açısından uygun görülmüştür ve 09.01.2014 tarihinde 02 toplantı sayısı 03 karar sayısı ile kabul edilmiştir (Ek 2).

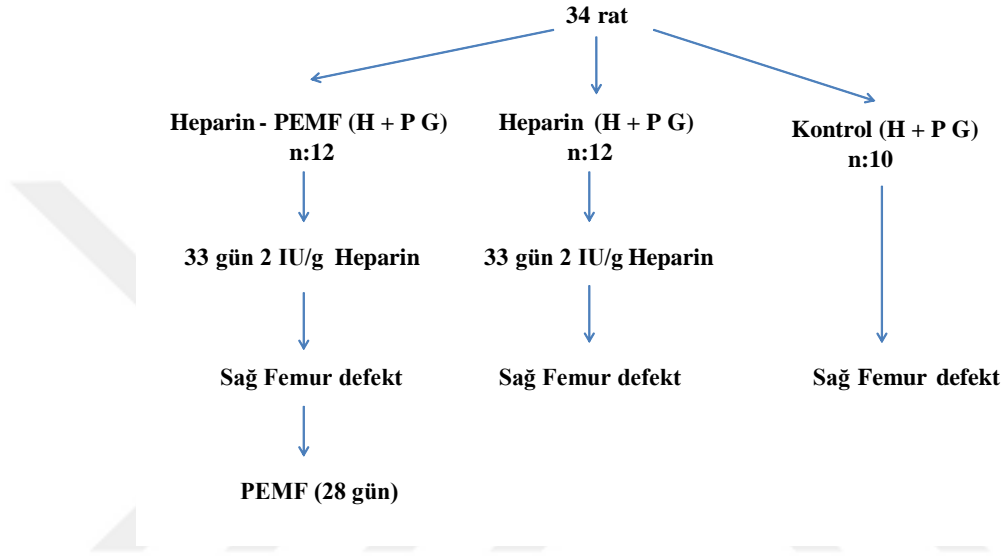
3.2 Deney Hayvanları

Çalışmanın başlangıcında çalışmanın güç değeri % 85 tutularak örneklem sayısı 34 olarak belirlendi. Böylece gereğinden fazla deney hayvanı itlafının önüne geçilerek etik açıdan oluşabilecek sakıncalar ortadan kaldırıldı. SDÜ Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında yetiştirilen, 34 adet erişkin ortalama ağırlıkları 300 - 400 gr ve ortalama 12 aylık iskeletsel gelişimini tamamlamış Sprague-Dawley erkek ratlar çalışmada kullanıldı.

Ratlar deney öncesi çalışmanın yapılacağı ortamda 3 gün tutularak alışmaları sağlanmıştır. Ratlar çalışma boyunca havalandırma delikleri bulunan, yem ve su gereksinimlerini rahatça giderebilecekleri talaş ile kaplı Eurotype 4 kafeslerde (Radon, Türkiye) 6'şarlı gruplar halinde tutuldu. Ratlar normal şehir suyu ve hazır özel pellet yem ile bazal miktarda (ad libitum) beslendi. Çalışmada etik kurallara uygun olarak deneye tabi tutulan her hayvan deney süresince ısı ve ışığı kontrol edilen ortamda 21-22 °C oda sıcaklığında, % 50 nem ayarlı odada tutuldu. Gün içerisinde yapılan kontrollerde ratların genel sağlık durumları, genel güçsüzlük, yem ve su alımında azalma, dispne, cilt-tüy değişikliği, kafes temizliği ve haftalık kontrollerde ağırlıkları takip edildi. Deney süresince çalışma grubundaki ratlara 1 saat boyunca darbeli elektromanyetik alan uygulaması süresince hareket kısıtlaması yapıldı.

3.2.1 Gruplar

Deney hayvanları heparin + PEMF grubu (H + P G) 12 rat, heparin grubu (H G) 12 rat ve Kontrol grubu (K G) 10 rat olacak şekilde rastgele üç ana gruba ayrıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Gruplar

Heparinin veriliş biçimi ve dozajı mevcut literatür bilgilerine ve hayvan çalışmalarındaki heparinin osteoporoz oluşturma dozuna uygun, 2 IU/g heparin subkutanöz yol olacak şekilde planlandı. İnsülin enjektörü ile aynı kişi tarafından 33 gün boyunca enjeksiyonlar yapıldı. Her 1 ml'lik heparin çözeltisi 5000 IU heparin sodyum içermekteydi. 0.08 ml heparin, 0.92 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak ve vücut ağırlıklarına göre dozlar toplamda 1 ml subkutan enjeksiyon olacak şekilde ayarlandı (Resim 1, 2).



Resim 1. Heparin



Resim 2. Subkutan Heparin Enjeksiyonu

Heparin + PEMF Grubu (H + P G): 12 rattan oluşan bu grupta, her hayvana 33 gün boyunca 2 IU/g heparin enjeksiyonu yapıldı. 33 gün tamamlandıktan sonra bir gün (34. gün) heparin enjeksiyonu yapılmadan ara verildi, operasyon günü (35. gün) her hayvanın sağ femur kemiğine 3 mm'lik defekt oluşturuldu. Postoperatif 4 hafta boyunca operasyon günü (35. gün) başlayarak ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında günde 1 saat boyunca darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapıldı ve bu gruptaki deney hayvanları postoperatif 4. hafta sonunda sakrifiye edildi (Tablo 7).

Heparin Grubu (H G): 12 rattan oluşan bu grupta, her hayvana 33 gün boyunca 2 IU/g heparin enjeksiyonu yapıldı. 33 gün tamamlandıktan sonra bir gün (34. gün) heparin enjeksiyonu yapılmadan ara verildi, operasyon günü (35. gün) her hayvanın sağ femur kemiğine 3 mm'lik defekt oluşturuldu. Postoperatif darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapılmadı. Yine bu gruptaki deney hayvanları postoperatif 4. hafta sonunda sakrifiye edildi (Tablo 7).

Kontrol Grubu (K G): 10 rattan oluşan bu grupta, hayvanlara heparin enjeksiyonu yapılmadı. 35. gün her hayvanın sağ femur kemiğinde 3 mm'lik defekt oluşturuldu. Postoperatif darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapılmadı ve bu gruptaki deney hayvanları da postoperatif 4. hafta sonunda sakrifiye edildi (Tablo 7).

Tablo 7. Araştırma Grupları

Grup	Heparin uygulama ve süresi (1.-33. gün)	Ara (34.gün)	Operasyon günü (35.gün)	PEMF uygulama ve süresi (35.-62.gün)	Sakrifikasyon günü (63.gün)
Heparin + PEMF grubu n=12	2 IU/g heparin	1 gün	Sağ femur 3 mm'lik defekt	0.8±0.2 mT	Sağ femur rezeksiyonu
Heparin grubu n=12				7.3 Hz	
Kontrol grubu n=10				PEMF uygulaması yapılmadı	
			Kuyruk veninden kan alındı		Vena cavadan kan alındı
			Biyokimya:		Biyokimya:
			CTx		CTx
			PTH		PTH
			Ca ⁺⁺		Ca ⁺⁺

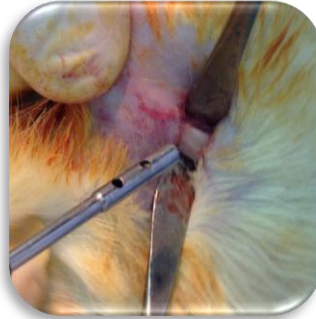
3.3 Cerrahi Uygulama

Ketamin hidrasyon (Ketamol®, Richter Pharma AG) 90 mg/kg ve Xlazine hidrasyon'un (Alfazine®, Alfasan, Hollanda) 10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyonları ile genel anestezi sağlandı (Resim 3).



Resim 3. Anestezik İlaçlar

Operasyon bölgesi povidon iyot ile dezenfekte edilip traşlandı. Femurun dış medial tarafında yaklaşık 1 cm uzunluğunda cilt insizyonu yapılarak künt diseksiyonla kaslar ve periost eleve edildikten sonra femur yüzeyine ulaşıldı. Sağ femur distal yüzeyine serum fizyolojik irrigasyonu altında, trefin frez yardımı ile, 3 mm çapında korteksten medullaya ulaşan monokortikal kemik defekti oluşturuldu (Resim 4, 5).



Resim 4. Trepan Frez İle Kemik Kemik Defekti Açılması



Resim 5. Monokortikal Kemik Defekti

Cerrahi alan serum fizyolojik ile yıkanarak artık dokular uzaklaştırıldı. Kemik yüzeyinden diseke edilen kaslar 3/0 vicril suture (Doğsan®, Trabzon, Türkiye), cilt ise 3/0 ipek suture kullanılarak (Doğsan®, Trabzon, Türkiye) primer olarak kapatıldı (Resim 6, 7).

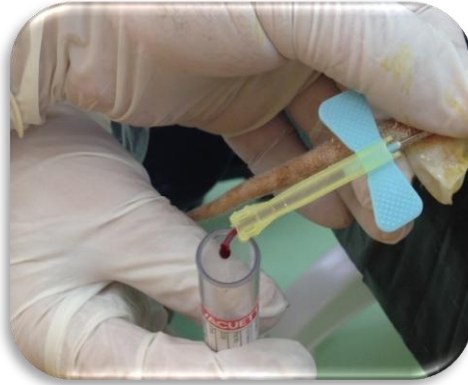


Resim 6. Kasın Dikilmesi



Resim 7. Cildin Dikilmesi

Kuyruk tıraşlandı ve antiseptiklerle temizlendi. Venlerin dilate olarak daha iyi görünmesi için hayvanın kuyruğunun 5-8 dakika 37 °C'lik suya daldırıldı. Rat kuyruk köküne turnike uygulandı. Kuyruğun vücuda yakın kısmından, kuyruk kökünden yaklaşık olarak 1/3 uzaklıktan kelebek seti iğnesi ile lateral vene girildi. Kan akışına izin verilmesi için turnike serbest bırakıldı. Kuyruk veninden yaklaşık 1 ml kan temin edildi. (Resim 8).



Resim 8. Kuyruktan Kan Alımı

Operasyon günü (35.gün) kuyruk veninden alınan 1 ml kanlar santrifüj edildikten sonra serumları ependorf tüplere ayrılarak -80°C donduruldu.

3.4 Postoperatif Bakım

3 gün intramuskuler 150 mg/kg/gün Amoksisilin (Tümamoks® 3,5 g flakon, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 3 mg/kg/gün Ketoprofen (Rifen® 50 mg ampul Richter Pharma AG) enjeksiyonu yapıldı (Resim 9). Povidon iyot ile operasyon bölgesi pansumanları yapıldı.



Resim 9. Rifen

3.5 Postoperatif Darbeli Elektromanyetik Alan Uygulaması

Postoperatif 4 hafta boyunca ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında, restrainerde hareket kısıtlaması olacak şekilde, her gün 10:00-11:00 saatleri arası 1 saat boyunca heparin + PEMF grubundaki ratlara darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapıldı (Resim 10, 11). Uygulama sırasında ratlar ve cihaz gözlenerek herhangi bir sorun yaşanması önleildi. Heparin grubu ve kontrol grubuna operasyonu takiben 4 hafta boyunca darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapılmadan gözleildi.



Resim 10. Restrainer



Resim 11. Ratın Restrainere Yerleştirilmesi

Darbeli elektromanyetik alan üretici olarak EMTS (BioMedsa SDÜ Teknokent, Isparta, Türkiye) cihazı kullanıldı (Resim 12). Cihazda manyetik alan oluşturmak için helmholtz bobin çiftleri kullanıldı (Resim 13). Cihazın teknik özellikleri (Tablo 8) de gösterilmiştir. Karşılıklı helmholtz bobinlerinden çıkan manyetik dalgalar şekilde gösterilmiştir (Şekil 2).



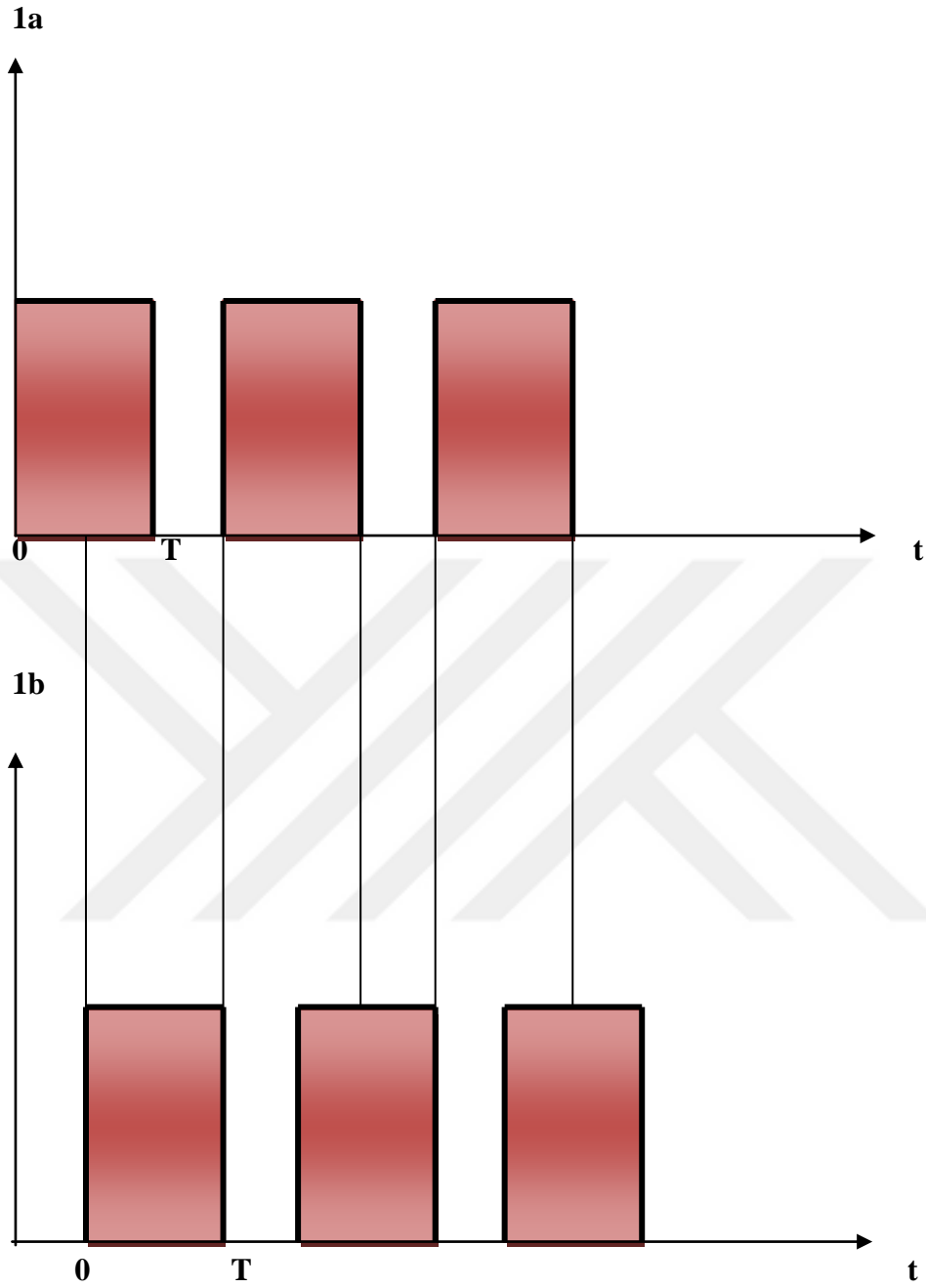
Resim 12. Darbeli Elektromanyetik Alan Cihazı



Resim 13. Helmholtz Bobini

Tablo 8. Cihazın Teknik Özellikleri

AC Besleme:	220 V- 50 Hz
DC Besleme:	+12 V
Güç Harcaması:	15W
Sigorta 1:	1A
Sigorta 2:	150 mA
Çıkış:	(0,2 V) – (+12 V) 1 mT
Çalışma Sıcaklığı:	-10°C,+40°C
Çalışma Süresi:	15 saat



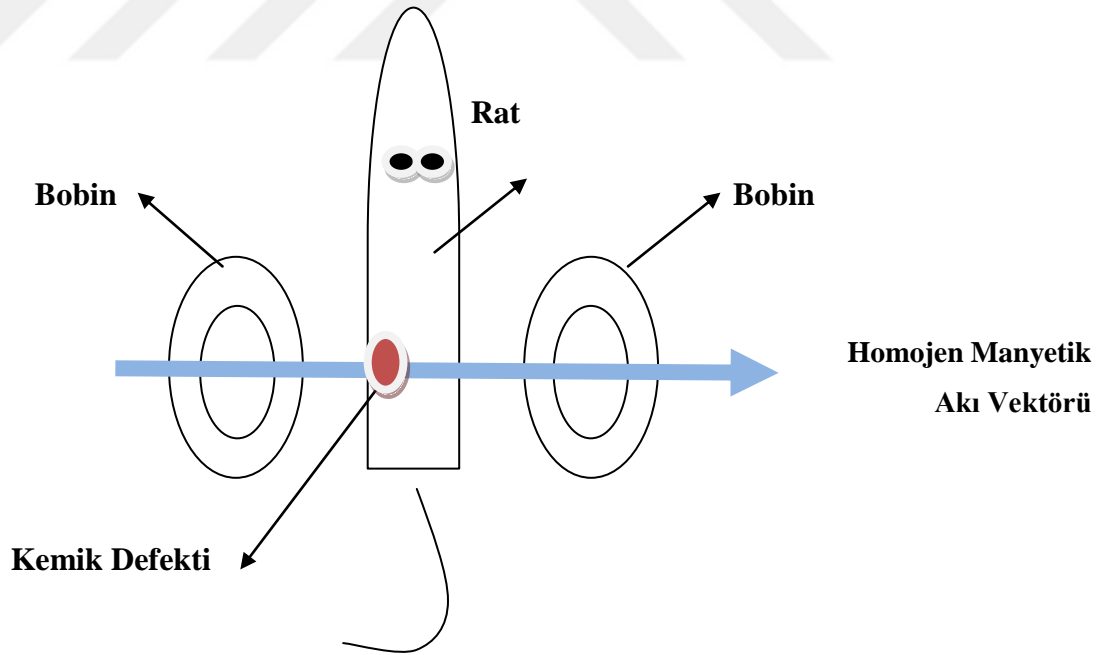
$$T = 0.133 \text{ sn}$$

$$f = 7.3 \text{ Hz}$$

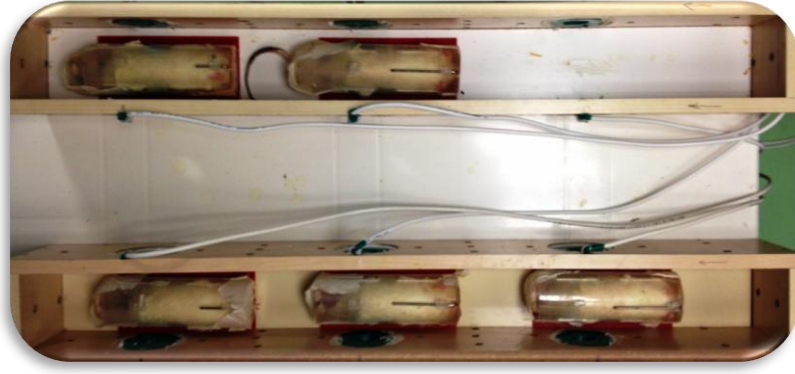
$$B = 0.8 \pm 0.2 \text{ mT}$$

Şekil 2. 1a ve 1b Helmholtz Bobinlerinin Manyetik Dalgaları

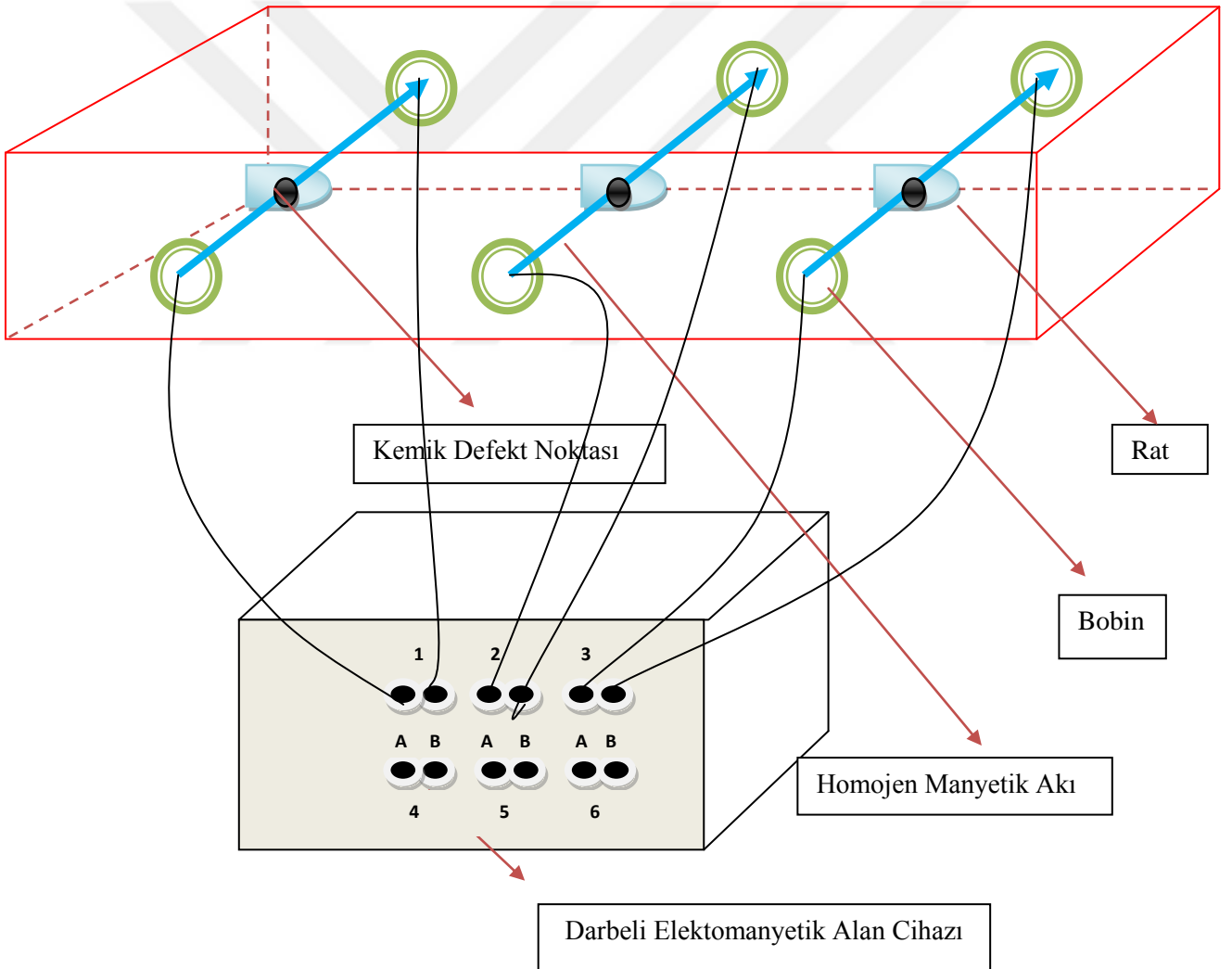
Dairesel sarmal bobinlerin her biri çapı 6 cm olacak şekilde, 1 mm çapında yalıtılmış bakır tellerden 200 sarım yapıldı. Cihazdan çıkan kutup başlarının geldiği bobinler dikdörtgen kutunun karşılıklı kenarlarına birbirine paralel ve düzlemleri arasındaki uzaklıkları 10 cm olacak şekilde yerleştirildi. Bobinlerden çıkan homojen manyetik akı vektörü ile ratlardaki defekt alanına dik birim vektörü paraleldir (Şekil 3). 100 x 10 x 15 cm boyutlarında tahta kutunun dış yüzeylerine bobinler yerleştirildi (Resim 14). Ratlar restrainerlara yerleştirilerek hareket kısıtlaması yapıldı ve bobinlerden çıkan homojen manyetik akı vektörünün defekt alanına dik gelmesi sağlandı (Resim 14) (Şekil 4). PEMF uygulanırken şiddeti etkileyebilecek çevresel faktörleri engellemek amacıyla SDÜ Deneysel Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Uygulama ve Araştırma Merkezinde dış ortamdan tamamen izole manyetik alan odasında deney düzeneği gerçekleştirildi (Resim 15). Frekans ve şiddet ölçümleri deney öncesinde ve sırasında ölçülerek cihazın güvenilirliği kontrol edildi.



Şekil 3. Defekt Bölgesine Homojen Manyetik Akı Vektörünün Dik Gelmesi



Resim 14. Ratların Düzeneğe Yerleştirilmesi



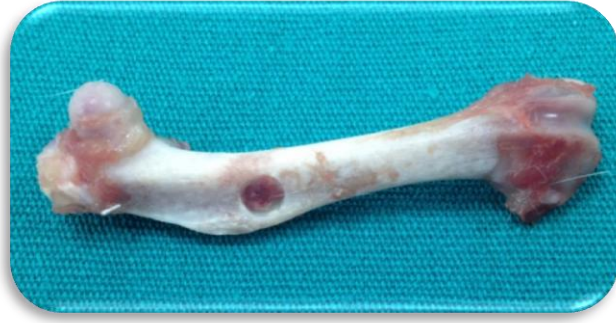
Şekil 4. Bobinlerin Uygulaması ve Cihazın Şeklinin Planlaması



Resim 15. Darbeli Elektromanyetik Alan Cihazı, Bobinlerin Yerleştirildiği Düzenek ve Manyetik Alan Odası

3.6 Sakrifikasyon ve Kan Örneklerinin Eldesi

Altmış üçüncü günde yüksek dozda anestezi madde verildikten sonra eksanguinasyon yöntemi ile ötanazi yapıldı. Yumuşak dokular diseke edilerek defektli femura ulaşıldı ve rezeke edildi (Resim 16). Vena cavadan alınan 8 ml kan santrifüj edildikten sonra serumları Eppendorf tüplere ayrılarak -20°C donduruldu. Değerlendirme yapılacağı zaman serumlar dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığında çözümleri sağlandı. Serum CTx, PTH ve Ca^{++} düzeyleri değerlendirildi.



Resim 16. Rezeke Edilmiş Femur

3.7 Kemik Örneklerin Hazırlanması

Elde edilen örnekler, kemik dokusunun histomorfometrik analizine izin verecek şekilde histolojik kesit hazırlama aşamalarından geçirildi. Bu aşamalar sırasıyla şöyledir.

Ratların femurlarındaki tüm yumuşak dokular temizlenerek tek tek histolojik kesitler alınmak üzere % 10'luk tamponlu nötral formol içerisinde 72 saat fikse edildi (Resim 17).



Resim 17. Kemiklerin Formalin Solüsyonunda Fikse Edilmesi

3.7.1 Fiksasyon ve Formalinden Arındırma İşlemi

%10'luk tamponlu nötral formalin içerisinde en az 72 saat fikse edilen dokuları formalinden arındırmak için örnekler önce akan çeşme suyunda, sonra tamponlu fosfat solüsyonunda (Merck, Darmstadt, Almanya), en son ise distile suda yıkandı. Bu işlemler sonunda dokular formalinden arındırılmış oldu.

3.7.2 Dekalsifikasyon İşlemi

%15'lik tamponlu formik asit solüsyonunda (Merck, Darmstadt, Almanya) 4 gün bekletilerek dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Tüm örnekler dekalsifiye olduktan sonra 3-4 saat akan suda yıkandı. Kemik örnekleri, üzerine örnek numaraları yazılan doku takip kasetleri ile kasetlenerek doku takibi işlemine geçildi (Resim 18, 19).



Resim 18. Örneklerin Hazırlanması

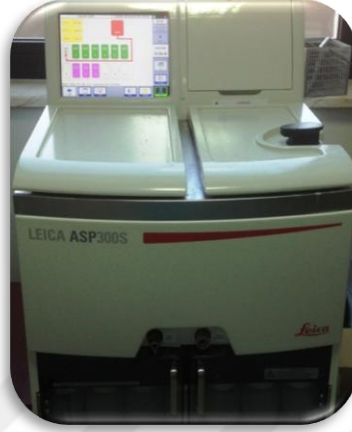


Resim 19. Örneklerin Kasetlenmesi

3.7.3 Doku Takibi İşlemi

Doku takip işlemi kapalı devre otomatik cihazda (Leica ASP 300S) gerçekleştirildi (Resim 20). Doku takibi için parafin tekniği kullanıldı. Bu takip cihazı ile doku takip kasetleri içerisindeki dokulara ısı, pres, vibrasyon ve titrasyon

uygulamaları otomatik olarak gerçekleştirildi. Daha sonra %10'luk tamponlu nötral formalin, alkol, ksilen ve parafin uygulamalarından geçirilerek doku takip işlemi sona erdirildi.



Resim 20. Otomatik Doku Takip Cihazı

3.7.4 Bloklama İşlemi

Takip işlemi tamamlanan dokular bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem doku takip kaseti içerisinde gerçekleştirildi (Resim 21).



Resim 21. Bloklama Cihazı

3.7.5 Kesit Alma İşlemi

Dondurularak kesit almaya hazır hale getirilen dokulardan tam motorize mikrotom cihazı (Leica RM 2155) yardımıyla defekte paralel olacak şekilde 4 seviyede kesitler elde edildi (Resim 22). En fazla kemikleşme alanı olan kesit

seçildi. Bu kesitler sıcak su banyosuna alınarak dokuların kırışıklığının açılması sağlandıktan sonra lam üzerine taşındı ve kurutuldu.



Resim 22. Mikrotom cihazı

3.7.6 Hematoksilen-Eozin Boyama İşlemi

Preperatlar kurutma fırınında bekletildikten sonra (Leica Auto Stainer XL) cihazı ile Hematoksilen-Eozin ile boyandı (Resim 23).



Resim 23. Leica Auto Stainer XL Boyama Cihazı

3.7.7 Kesitleri Kapama İşlemi

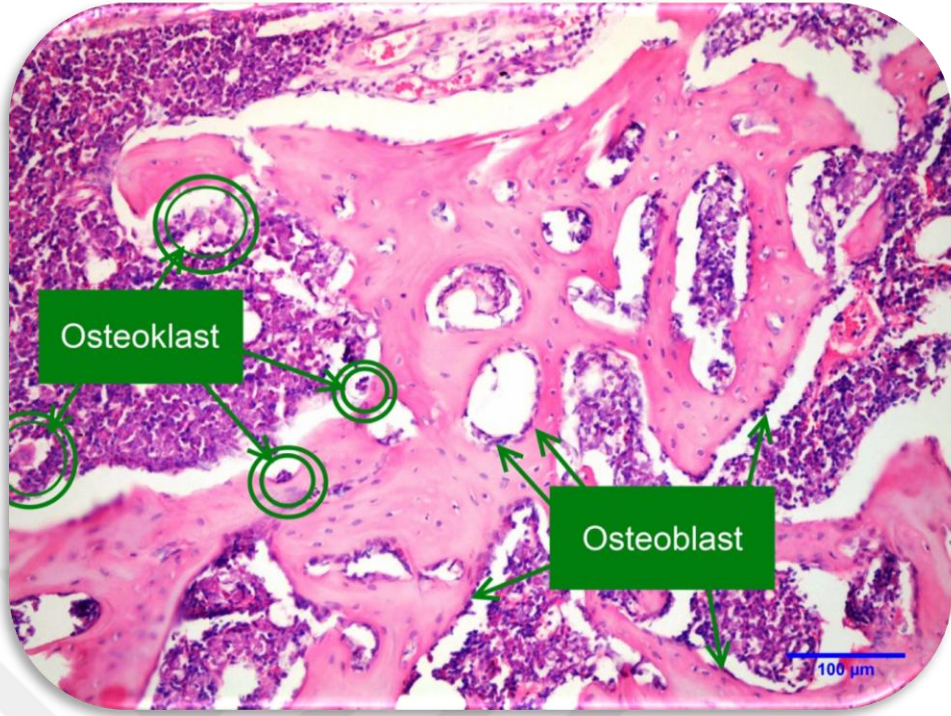
Kesitler çıkarıldıktan sonra Leica CV5030 cihazı ile kapatıldı (Resim 24).



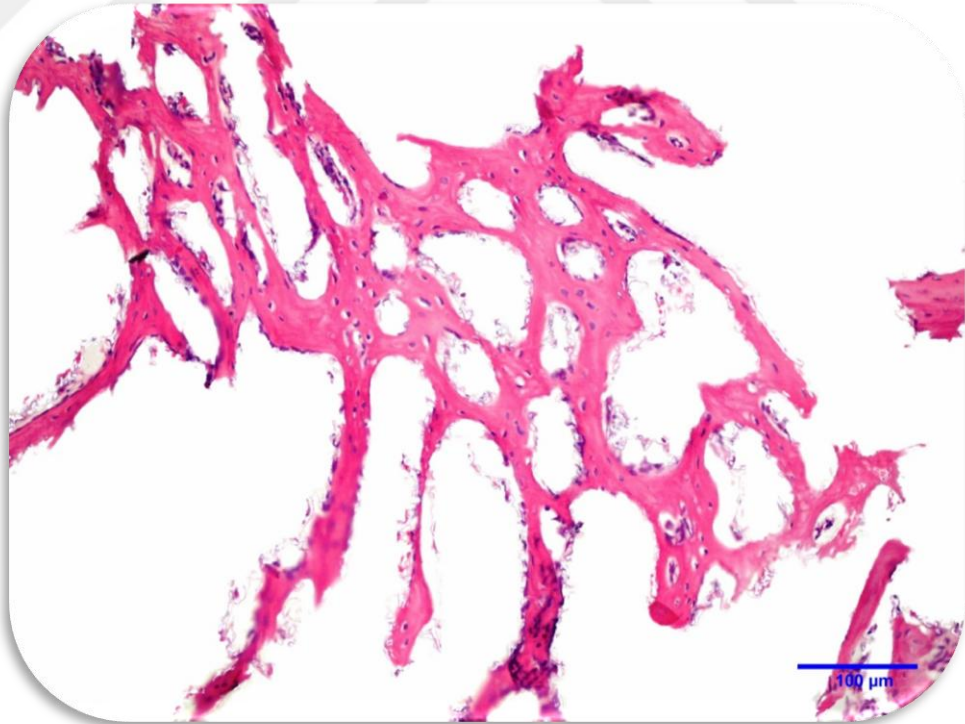
Resim 24. Leica CV5030 cihazı

3.8 Histomorfometrik İnceleme

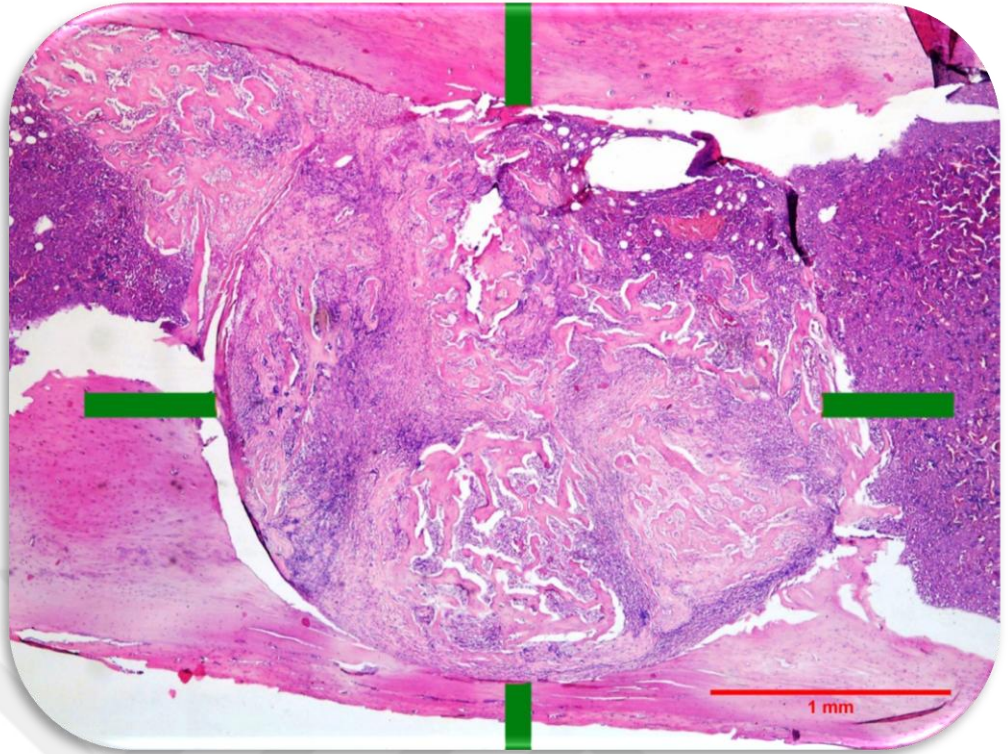
Hemotoksilen-Eozin ile hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Bu değerlendirme esnasında aynı zamanda ışık mikroskobuna bağlı bulunan dijital fotoğraf makinası ile de fotoğraflandırıldı (Resim 25). Tüm görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı ve ImageJ/Fiji 1.46 Analysis program ile değerlendirildi. İyileşme alanı 4 seviyedeki kesitlerde incelendi. En fazla kemikleşme alanı seçildi. ImageJ V1.9.b (<http://imagej.nih.gov/ij/>) programı ile kemik alanı ölçüldü. Bunun için iyileşme alanlarından 1 mm çapında alan seçildi. 200x büyütmede dijital fotoğrafı çekildi (Resim 26, 27). Recomposit pro v5.2 (<http://www.stepok.net/Recomposit.htm>) programı ile kemik dışı alanlar dijital olarak silindi. Kemik alanlar dijital olarak siyah renge boyandı (Resim 28). Imagej ile siyaha boyanmış kemik fotoğrafına toplam alan ve boyalı alanın ölçümü piksel olarak yapıldı. Boyalı alan ölçümü image-->adjust--> color threshold --> ile uygun renk ayarları yapılarak boyalı alan seçildi ve ölçümü yapıldı. Görüntü analizini yapan kişi, grupları ve olguları bilmeden değerlendirdi.



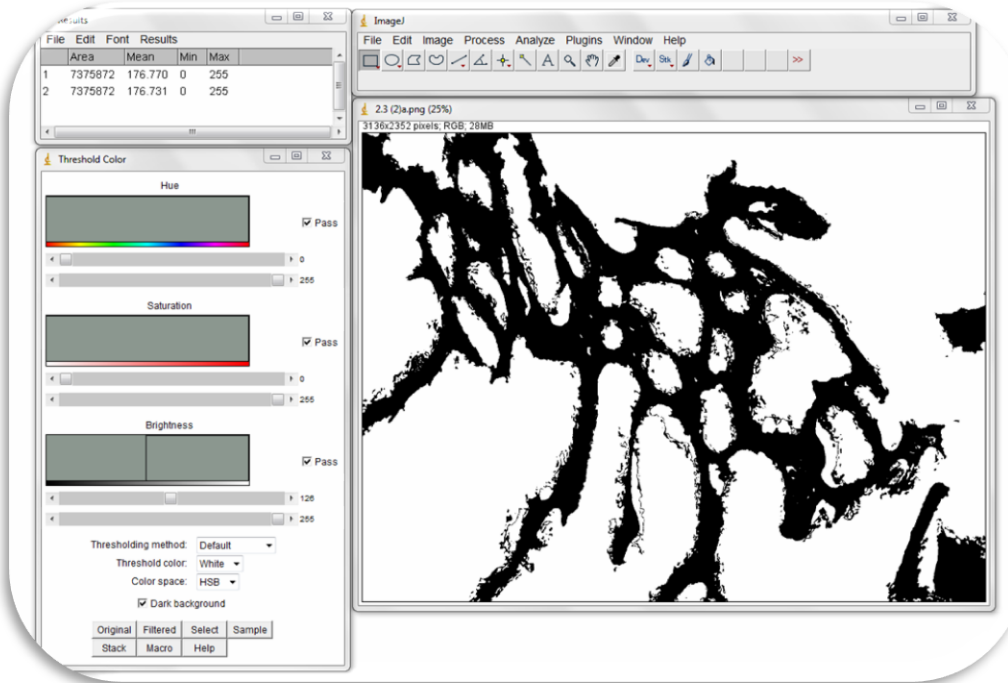
Resim 25. Osteoblast ve Osteoklast X 200



Resim 26. Yeni Kemik X 200



Resim 27. 3 mm Kemik Defekt Alanı



Resim 28. Imageji 1.46 Analysis Program ve Kemik Alanlarının Siyaha Boyanması

3.9 Biyokimyasal İnceleme

Otuzbeşinci ve 63. günlerde alınan kanlar Nüve NF1200R (Türkiye) markalı santrifüj cihazında 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar porsiyonlanarak çalışma zamanına kadar -80°C ve -20°C donduruldu. Çalışma zamanında serumlar oda ısısında bekletilerek çözdürüldü. Serum Ca⁺⁺ değerleri otoanalizörde (Beckman Coulter AU5800, USA) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Serum CTx düzeyleri rat spesifik CTX (Eastbiopharm, Hangzhou Eastbiopharm, Torrance, USA) kiti ile ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemiyle belirlendi. Serum PTH düzeyleri rat spesifik PTH (Eastbiopharm, Hangzhou Eastbiopharm, Torrance, USA) kiti ile ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemiyle belirlendi. Biyokimyasal analizi yapan kişi, grupları ve olguları bilmeden kör değerlendirdi.

3.10 İstatistiksel Yöntem

Araştırmada istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Science) 18.0 (Chicago, IL, 2010) yazılım paket programı kullanılarak yapıldı.

Yeni kemik alanı özelliği bakımından elde edilen veriler logaritmik transformasyona tabi tutulmasına rağmen parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadığı için non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ve grupların rank ortalaması arasındaki farklılıkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Bonferroni-Dunn testi uygulandı.

Yeni kemik yüzdesi özelliği bakımından elde edilen veriler açı transformasyonuna tabi tutulduklarında parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadığı için grupların rank ortalamaları arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar Bonferroni-Dunn testi ile analiz edildi.

Ca⁺⁺ ve PTH özellikleri bakımından elde edilen veriler parametrik testlerin ön şartlarını sağladıkları için faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümlü varyans analiz tekniği ile analiz edildi. Çalışmada grup faktörünün heparin + PEMF, heparin, kontrol olmak üzere üç seviyesi, zaman faktöründe 35. gün ve 63. gün olmak üzere

iki seviyesi mevcuttu. Tekrarlanan ölçümler zaman faktörünün seviyelerinde gerçekleştirildi.

CTx özelliği bakımından elde edilen veriler logaritmik transformasyona tabi tutulmasına rağmen parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadığı için non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi uygulanmış ve grupların rank ortalaması arasındaki farklılıkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Bonferroni-Dunn testi uygulandı. Her bir grupta zamanlar arası farkın incelenmesinde Wilcoxon İşaretli Sıralar testi uygulandı.

Hayvanların canlı ağırlıkları bakımından elde edilen veriler parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadığı için gruplar arasındaki farklılıklar her bir zamanda ayrı ayrı Kruskal-Wallis testi ile irdelendi. Zamanlar arasındaki farklılıklar her bir grupta ayrı ayrı olmak üzere Friedman testi ile irdelendi.

Son olarak tüm değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin varlığı ikişer ikişer Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak irdelendi.

4. BULGULAR

4.1 Deney Grupları

Araştırmada 34 adet deney hayvanı kullanıldı. Deney hayvanlarından 4 tanesinin anestezi sırasında, 2 tanesinin cerrahi işlem sonrası aşırı kilo kaybından, 1 tanesinin operasyon sahasında apse formasyonu sonucu ölmesi, histomorfometrik incelemede kesit alırken 1 femurun kırılması ve biyokimyasal incelemede 1 örnekten sonuç alınamaması sebebiyle çalışma dışı bırakıldı. Heparin + PEMF grubu sekiz (8), heparin grubu sekiz (8) ve kontrol grubu dokuz (9) olmak üzere toplamda yirmibeş (25) deney hayvanı çalışmaya dahil edildi. Operasyon sonrasında 3 deney hayvanında yara yüzeyindeki sütürlarda açılma görüldü. Hafif sedasyon altında tekrar suture edildi. Bu hayvanlar sakrifiye edilene kadar canlı kaldı (Tablo 9).

Tablo 9. Çalışma Dışı Bırakılan ve Çalışmaya Dahil Edilen Ratların Gruplara Göre Dağılımı

	Kontrol	Heparin	Heparin+PEMF	Toplam
Çalışmaya Dahil Edilmeyen	1	4	4	9
Anestezi	-	2	2	4
Kilo kaybı	-	1	1	2
Apse	-	1	-	1
Histomorfometrik İnceleme	-	-	1	1
Biyokimyasal İnceleme	1	-	-	1
Çalışmaya Dahil Edilen	9	8	8	25

4.2 Canlı Ağırlık Bulguları ve İstatistiksel Değerlendirmeler

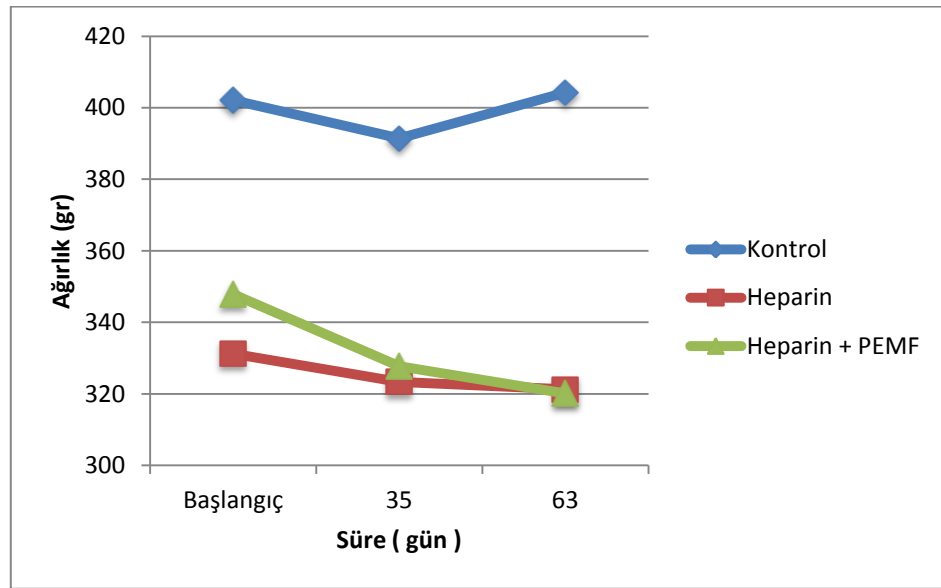
Gruplar arasındaki ağırlık özelliği Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($p < 0,05$) (Tablo 10) (Şekil 5). Zamanlar arasındaki ağırlık özelliği Friedman testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli değildir ($p > 0,05$).

Tüm zamanlarda kontrol grubunun ağırlık ortalaması, heparin + PEMF grubu ve heparin grubundan yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

Tablo 10. Zamana Göre Deney Hayvanlarının Ağırlık Bulguları (Ortalama \pm Standart Hata)

Grup	n	Süre (gün)		
		Başlangıç	35	63
Kontrol	9	402,111 \pm 10,317 ^A	391,444 \pm 10,258 ^A	404,222 \pm 9,886 ^A
Heparin	8	331,250 \pm 10,943 ^B	323,375 \pm 10,880 ^B	321,250 \pm 10,486 ^B
Heparin+PEMF	8	347,875 \pm 10,943 ^B	327,750 \pm 10,880 ^B	320,125 \pm 10,486 ^B

İstatistik farklar harflerle belirtilmiştir. Farklı harflerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Aynı harflerin olduğu gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).



Şekil 5. Zamana Göre Deney Hayvanlarının Ağırlık Değişimleri

4.3 Histomorfometrik Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Yeni kemik oluşum alanları 7875872 piksel birim alanda görüntü analizi programı ile hesaplandı. Bu hesaplama işlemi için yeni kemik alanları dijital mavi tonlamaya tabi tutuldu. Sonunda bu renkli alanlar μm^2 cinsinden hesaplandı. Alan hesaplamasındaki bu işlemlerin tümü ImageJ/Fiji 1.46 Analysis program ile gerçekleştirildi.

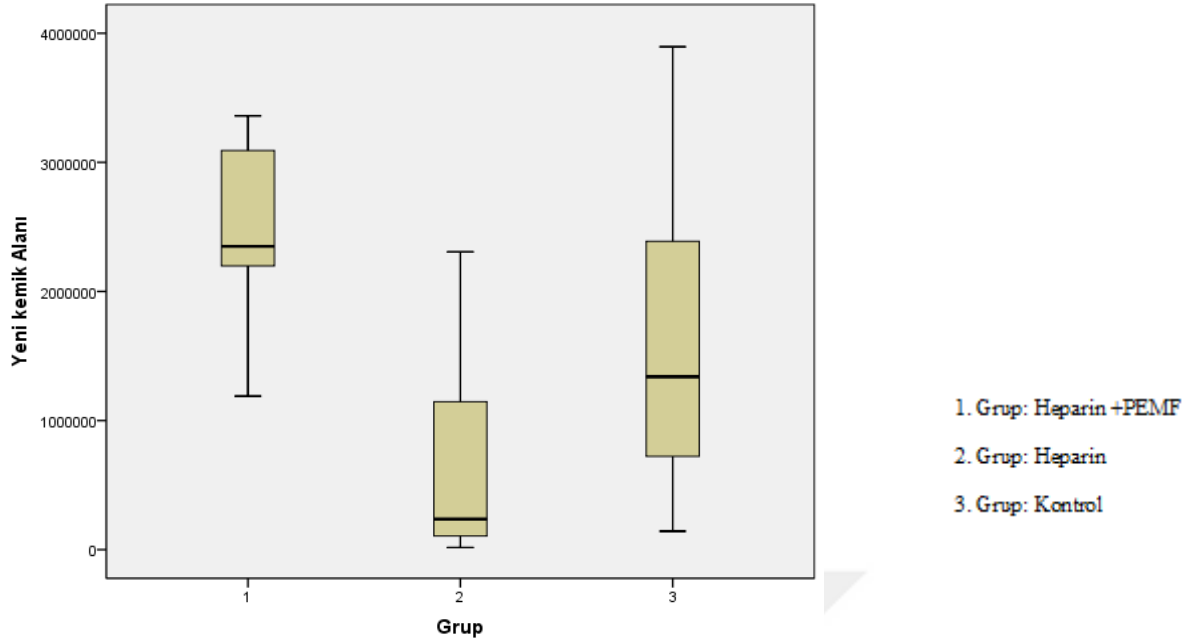
Yeni kemik oluşumu özelliği bakımından Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis testi sonuçları ortalamalar üzerinde gösterilmiştir (Tablo 11) (Şekil 6).

Histomorfometrik değerlendirmede en yüksek yeni kemik oluşum alanı heparin + PEMF grubunda görülmektedir. Heparin + PEMF grubunun yeni kemik oluşum alanı, heparin grubundan yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p = 0,002$). Heparin + PEMF grubunun yeni kemik oluşum alanı kontrol grubundan daha yüksektir fakat bu fark istatistik olarak anlamlı değildir ($p = 0,196$).

Tablo 11. Yeni Kemik Oluşum Alanı İstatistik Değerleri

Grup	n	Ortalama \pm Standart Hata	Rank Ort.	Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	9	1663171,22 \pm 393058,682 ^A	13,44	142120	3895210
Heparin	8	662668,88 \pm 291374,705 ^B	7,25	17401	2306580
Heparin+PEMF	8	2478232,25 \pm 247944,862 ^A	18,25	1189847	3360414

İstatistik farklar harflerle belirtilmiştir. Farklı harflerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p < 0,05$). Aynı harflerin olduğu gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,05$).



Şekil 6. Grupların Ortalama Yeni Kemik Oluşum Alanları

Yeni kemik yüzdesi bakımından elde edilen verilere yapılan varyans analizi sonucunda grupların ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($p < 0,05$). Tukey testi sonuçları ortalamalar üzerinde gösterilmiştir (Tablo 12).

Histomorfometrik değerlendirmede en yüksek yeni kemik alanı yüzdesi heparin + PEMF grubunda görülmektedir. Heparin + PEMF grubunun yeni kemik alanı yüzdesi, heparin grubundan yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,05$). Heparin + PEMF grubunun yeni kemik yüzdesi, kontrol grubundan daha yüksektir fakat bu fark istatistik olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$).

Tablo 12. Yeni Kemik Yüzdesi İstatistik Değerleri

Grup	n	Ortalama ± Standart Hata	Rank Ort.	Alt Sınır	Üst Sınır
Kontrol	9	0,225489 ± 0,0532882 ^A	13,44	0.0193	0,5281
Heparin	8	0,089850 ± 0,0395009 ^B	7,25	0.0024	0,3127
Heparin+PEMF	8	0,335988 ± 0,0336166 ^A	18,25	0.1613	0,4556

İstatistik farklar harflerle belirtilmiştir. Farklı harflerle belirtilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p<0,05$). Aynı harflerin olduğu gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

4.4 Biyokimyasal Bulgular ve İstatistiksel Değerlendirmeler

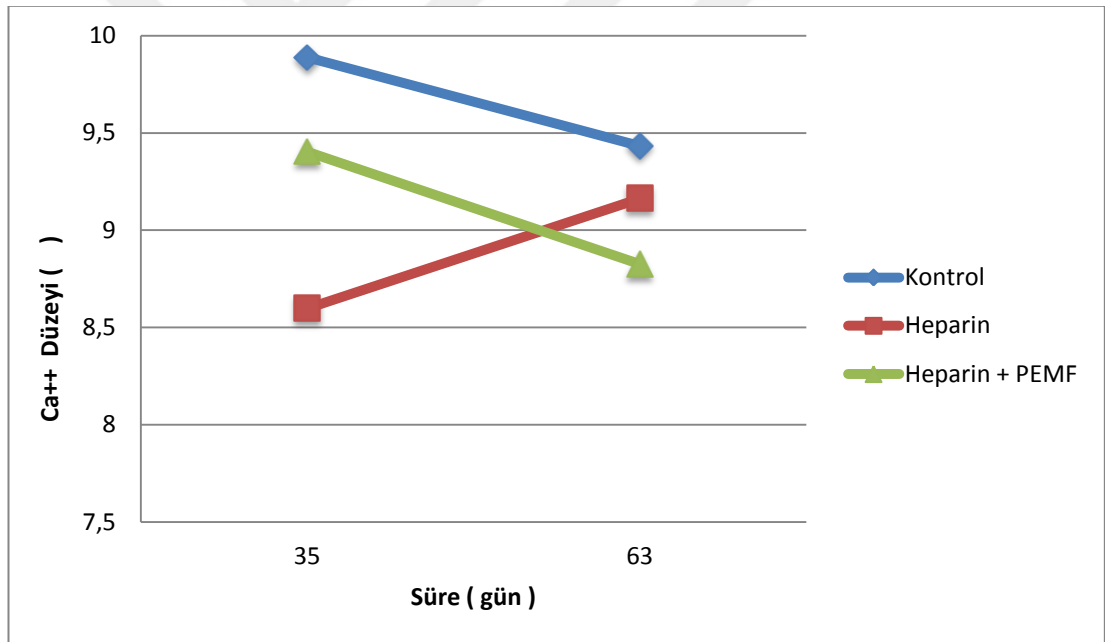
Serum Ca^{++} özelliği bakımından elde edilen verilere varyans analizi sonucunda zaman x grup intraksiyonu istatistik olarak önemlidir ($p<0,01$). Bunun anlamı grupların ortalamaları arasındaki farkların zamandan zamana sabit kalmayıp değiştiğidir. Bunun gereği olarak grupların ortalamaları arasındaki farklar belirlenirken her bir zamanda ayrı ayrı belirlenmeli, zamanların ortalamaları arasındaki farklar belirlenirken de her bir grupta ayrı ayrı belirlenmelidir. Nitekim Tukey testide bu esasa göre yapılarak farklılıklar Latin harfleri ile ortalamalar üzerinde gösterilmiştir (Tablo 13) (Şekil 7).

Biyokimyasal değerlendirmede serum Ca^{++} değerlerinin ortalaması heparin + PEMF grubunda ve kontrol grubunda 35. günde, 63. günden daha yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,01$). Heparin grubunda serum Ca^{++} değerlerinin ortalaması 35. günde, 63. günden daha düşüktür ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,01$). Gruplar arasında 35. günde serum Ca^{++} değerlerinin ortalaması heparin grubunda en düşüktür ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,01$). Gruplar arasında 63. günde serum Ca^{++} değerlerinin ortalaması arasında istatistik olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,01$).

Tablo 13. Serum Ca⁺⁺ İstatistik Değerleri (Ortalama ± Standart Hata)

Grup	n	Süre (gün)	
		35	63
Kontrol	9	9,888 ± 0,155 ^{Aa}	9,433 ± 0,247 ^{Ba}
Heparin	8	8,599 ± 0,165 ^{Bb}	9,163 ± 0,261 ^{Aa}
Heparin+PEMF	8	9,403 ± 0,165 ^{Aa}	8,825 ± 0,261 ^{Ba}

İstatistik farklar harflerle belirtilmiştir. Büyük harfler her bir grupta zamanlar arası farklılığı, küçük harfler ise her bir zamanda gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0,01).



Şekil 7. Zamana Göre Serum Ca⁺⁺ Düzeylerinin Değişimi

Serum CTx özelliği bakımından elde edilen veriler logaritmik transformasyona tabi tutulmasına rağmen parametrik testlerin ön şartlarını sağlamadığı için non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile irdelenmiştir. Grupların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir (p<0,05).

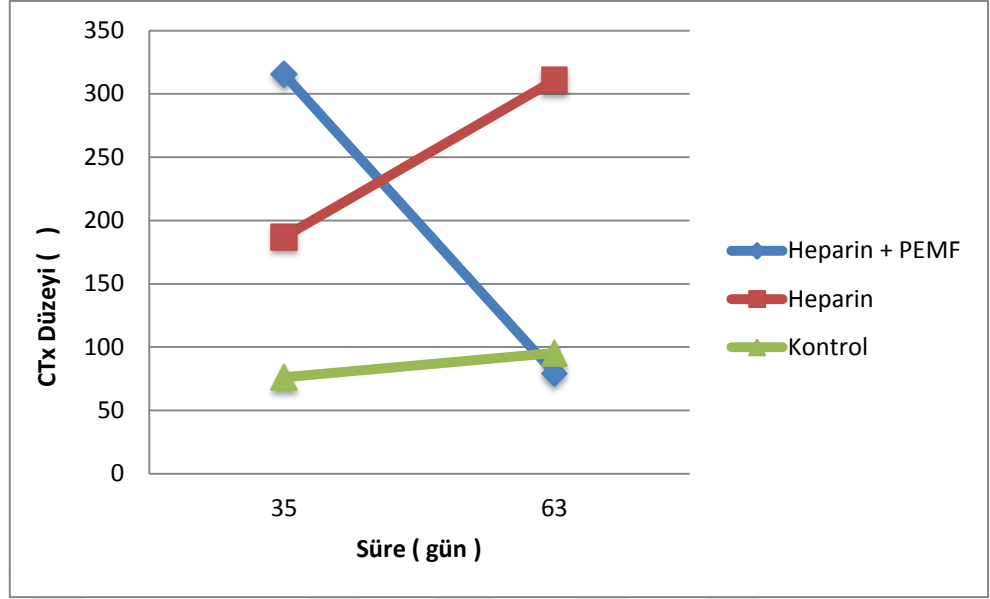
Bonferroni-Dunn testi sonuçları rank ortalamaları üzerinde gösterilmiştir (Tablo 14) (Şekil 8).

Biyokimyasal değerlendirmede serum CTx değerlerinin ortalaması heparin + PEMF grubunda 35. günde, 63. günden daha yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Heparin ve kontrol gruplarında serum CTx değerlerinin ortalaması 35. günde, 63. günden daha düşüktür ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Gruplar arasında 35. günde serum CTx değerlerinin ortalaması heparin + PEMF grubunda en yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Gruplar arasında 63. günde serum CTx değerlerinin ortalaması heparin + PEMF grubunda en düşüktür ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Tablo 14. Serum CTx İstatistik Değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma)

Grup	n	Süre (gün)	
		35	63
Kontrol	9	76,189 \pm 5,812 ^{Cb}	95,406 \pm 45,013 ^{Ba}
Heparin	8	187,144 \pm 58,62953 ^{Bb}	310,700 \pm 157,803 ^{Aa}
Heparin+PEMF	8	315,375 \pm 133,822 ^{Aa}	79,144 \pm 11,566 ^{Bb}

İstatistik farklar harflerle belirtilmiştir. Büyük harfler her bir grupta zamanlar arası farklılığı, küçük harfler ise her bir zamanda gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p<0,05$).



Şekil 8. Zamana Göre Serum CTx Düzeylerinin Değişimi

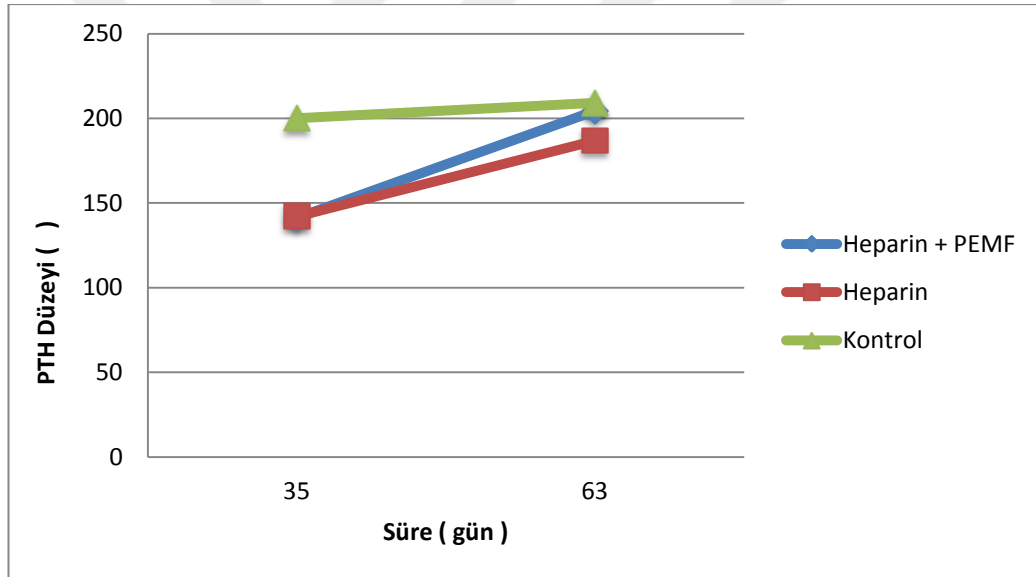
Serum PTH özelliği bakımından elde edilen verilere varyans analizi sonucunda zaman x grup intraksiyonu istatistik olarak önemlidir ($p < 0,01$). Bunun anlamı grupların ortalamaları arasındaki farkların zamandan zamana sabit kalmayıp değiştiğidir. Bunun gereği olarak grupların ortalamaları arasındaki farklar belirlenirken her bir zamanda ayrı ayrı belirlenmeli, zamanların ortalamaları arasındaki farklar belirlenirken de her bir grupta ayrı ayrı belirlenmelidir. Nitekim Tukey testinde bu esasa göre yapılarak farklılıklar Latin harfleri ile ortalamalar üzerinde gösterilmiştir (Tablo 15) (Şekil 9).

Biyokimyasal değerlendirmede serum PTH değerlerinin ortalaması heparin + PEMF grubunda ve heparin grubunda 35. günde, 63. günden daha düşüktür ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). Kontrol grubunda serum PTH değerlerinin ortalaması 35. ve 63. günler arasında istatistik olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,01$). Gruplar arasında 35. gün serum PTH değerlerinin ortalaması kontrol grubunda en yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p < 0,01$). Gruplar arasında 63. gün serum PTH değerlerinin ortalaması arasında istatistik olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,01$).

Tablo 15. Serum PTH İstatistik Değerleri (Ortalama ± Standart Hata)

Grup	n	Süre (gün)	
		35	63
Kontrol	9	200,006 ± 17,105 ^{Aa}	209,239 ± 11,143 ^{Aa}
Heparin	8	142,031 ± 18,142 ^{Bb}	186,931 ± 11,819 ^{Aa}
Heparin+PEMF	8	141,237 ± 18,142 ^{Bb}	204,450 ± 11,819 ^{Aa}

İstatistik farklar harflerle belirtilmiştir. Büyük harfler her bir grupta zamanlar arası farklılığı, küçük harfler ise her bir zamanda gruplar arası farklılığı göstermektedir (p<0,01).



Şekil 9. Zamana Göre Serum PTH Düzeylerinin Değişimi

Serum Ca⁺⁺, CTx, ve PTH özellikleri; 35. gün ağırlıkları ve 63. gün ağırlıkları ile histomorfometrik özellik arasında doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı korelasyon kat sayısı hesaplanarak irdelenmiştir (Tablo 16).

Yeni kemik alanı özelliği ile, serum CTx 65. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı -0,62 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir (p = 0,001). Yani iki

özelliik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri azalmakta ve bu azalışın derecesi % 62 dir.

35. gün ağırlık özelliği ile 63. gün ağırlık özelliği arasında korelasyon katsayısı 0,85 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir (p = 0,000). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri de artmakta ve bu artışın derecesi % 85 tir.

35. gün ağırlık özelliği ile serum Ca⁺⁺ 35. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı 0,57 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir (p = 0,003). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri de artmakta ve bu artışın derecesi % 57 dir.

Otuzbeşinci gün ağırlık özelliği ile serum CTx 35. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı -0,45 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir (p = 0,022). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri azalmakta azalışın derecesi % 45 tir

Serum Ca⁺⁺ 35. gün özelliği ile serum Ca⁺⁺ 63. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı 0,451 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir (p = 0,024). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri de artmakta ve bu artışın derecesi % 45 tir.

Serum Ca⁺⁺ 35. gün özelliği ile serum CTx 63. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı -0,52 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir (p = 0,008). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri azalmakta ve bu azalışın derecesi % 52 dir.

Serum Ca⁺⁺ 35. gün özelliği ile serum PTH 35. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı 0,47 olarak bulunmuş istatistik olarak önemlidir (p = 0,018). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri de artmakta ve bu artışın derecesi % 47 dir.

Serum PTH 35. gün özelliği ile serum PTH 63. gün özelliği arasında korelasyon katsayısı 0,60 olarak bulunmuş istatistik olarak önemlidir ($p = 0,001$). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilmektedir. Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğerisi de artmakta ve bu artışın derecesi % 60 tır.



Tablo 16. Biyokimyasal Özellikler, Ağırlık ve Histomorfometrik Özelliklerin Korelasyonu

	Yeni Kemik Alanı	35. gün ağırlık	63. gün ağırlık	Ca 35. gün	Ca 63. gün	CTx 35.gün	CTx 63.gün	PTH 35. gün
35. gün ağırlık	-0,165	0,431						
63. gün ağırlık	-0,158	0,847**						
	0,450	0,000						
Ca 35. gün	0,214	0,570**						
	0,304	0,003						
Ca 63. gün	-0,110	0,189	0,281	0,451*				
	0,601	0,364	0,174	0,024				
CTx 35.gün	0,105	-0,454*		-0,123	-0,186			
	0,617	0,022		0,557	0,374			
CTx 63.gün	-0,622**	-0,136	-0,192	-0,520**	-0,004	0,079		
	0,001	0,518	0,358	0,008	0,983	0,709		
PTH 35. gün	0,021	0,352		0,468*	0,389	-0,307	-0,154	
	0,919	0,085		0,018	0,055	0,135	0,462	
PTH 63. gün	0,063	-0,050	0,034	0,296	0,125	0,036	-0,157	0,579**
	0,7662	0,812	0,871	0,150	0,552	0,864	0,452	0,002

**Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır

* Korelasyon 0.05 düzeyinde anlamlıdır

5. TARTIŞMA

Araştırma, az bilineni ya da bilinmeyeniyi tam bilinen yapma çabasıdır. Sağlık çalışmalarında amaç; sağlıklı organizmayı ve hastalığı anlayabilmek, korumak veya tedavi için güvenli ve etkili yollar üretebilmektir (124). Osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro yapısının bozulduğu, çok sayıda erkek ve kadını etkileyen sistemik bir iskelet hastalığıdır. Artan hayat beklentisi ve dental implant kullanım popülaritesi sonucu çok sayıda osteoporozlu hastada diş çekimi, kemik augmentasyonu, implant yerleştirilmesi gibi klinik uygulamalar ile karşılaşmaktadır. Osteoporozlu hastalarda oral ve maksillofasiyal cerrahi işlemlerden sonra bozulmuş kemik iyileşmesinin arttırılması ve hızlandırılması ile ilgili arayışlar artmıştır. Elektrik stimülasyonu, hiperbarik oksijen tedavisi, düşük yoğunluklu ultrason uygulaması, düşük enerjili lazer uygulaması, darbeli elektromanyetik alan uygulaması gibi fiziksel ajanlarla veya D vitamini, kalsiyum, büyüme faktörü gibi ilaç uygulamaları ile kemik iyileşme hızı arttırılmaya çalışılmaktadır (8). Bu çalışmada kemik iyileşmesinde olumlu etkileri bilinen darbeli elektromanyetik alan uygulamasının, heparinin indüklediği sekonder osteoporoz oluşturulmuş ratlarda, kemikte defekt iyileşmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla heparin + PEMF grubu ratlara 33 gün 2 IU/g heparin enjeksiyonunu takiben femur kemiklerinde oluşturulan 3 mm çapında monokortikal defektlere 28 gün boyunca ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında günde 1 saat darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapılmıştır. Heparin grubu ratlara 33 gün 2 IU/g heparin enjeksiyonunu takiben femur kemiklerinde oluşturulan 3 mm çapında monokortikal defektlere darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapılmamıştır. Kontrol grubu ratlara heparin verilmemiş ve femur kemiklerinde oluşturulan 3 mm çapında monokortikal defektlere defektlere darbeli elektromanyetik alan uygulanmayarak darbeli elektromanyetik alan uygulamasının sekonder osteoporoz oluşturulmuş kemikte defekt iyileşmesi üzerindeki etkisi karşılaştırılarak incelenmiştir.

Sağlık alanındaki araştırmaların amacı yaşayan organizmaları ve hastalıklarda neyin yanlış gittiğini anlayabilmek ve bu hastalıklardan korunmak veya tedavi

edebilmek için güvenli ve etkili yollar üretebilmektir. İnsan üzerindeki çalışmalar sağlıklı ve hastalıklı vücut ile tedavisi hakkında çok faydalı bilgiler sağlar, ancak etik kısıtlamalar söz konusudur. Deney hayvanları canlıının vücudunda ne olduğunun ve tedavisinin test edilmesi gerektiğinde ve insanların bu araştırma için kullanılmasının etik olmadığı durumlarda kullanılır (125). Ratlar kemik iyileşmesi, osteoporoz ve kritik boyutlu kemik defekti çalışmalarında sık kullanılan deney hayvanlarıdır. Kolay temin edilmesi, hızlı büyümeleri, fiyatının ucuz olması, cerrahi operasyonun kolay yapılabilmesi, daha çok örnek alınabilmesi, doku, organ ve iskelet sistemleri hakkında yeterli bilgi sahibi olunması, bakım, barındırma ve beslenmesinin kolay olması deney hayvanı olarak rat kullanımını avantajlı kılmıştır (126, 127).

Önceki çalışmalarda daha çok dişi deney hayvanları kullanılırken; çalışmamızda heparinin indüklediği sekonder osteoporoz modeli oluşturmayı amaçladığımızdan menstruel siklüs ve östrojen hormonunun kemik iyileşmesi üzerine etkisini ekarte edebilmek için yetişkin erkek rat kullanılması tercih edilmiştir (128).

Rat kemik dokusu, insan kemik dokusuyla karşılaştırıldığında çok az varyasyona sahip bir deney hayvanıdır (129). Ratların fasiyal bölge ve femur kemikleri çalışmalarda kullanılmaktadır. Fasiyal bölge kemik defektlerinde çalışmanın çeşitli zorlukları bulunmaktadır. Ağız boşluğuna komşuluğu nedeniyle mandibula ve maksillada oluşturulan kemik defektlerinde operasyon sonrası dönemde herhangi bir nedenle ağız ortamı ile ilişkiye geçmesi halinde ağız florasındaki yüksek miktarda mikroorganizma ile enfekte olma riski mevcuttur. Deney hayvanlarının beslenmesi güçleşir ve diyetlerinde değişiklik zaruri hale gelir. Mandibular defektlerin oluşturulmasında da zorluklar mevcuttur. Bu konuda sadece mandibula ramusunda boydan boya defekt yapılabileceği çalışmalarda belirtilmiştir (130). Femur kemiği distraksiyon osteogenezi, implant yerleştirilmesi, osteotomi, kırık ve kritik boyutlu defekt çalışmalarında sık kullanılmaktadır. Kemik hacim ve yoğunluk ölçümü, mekanik test, radyolojik, histolojik ve histomorfometrik örnekler daha kolay hazırlanabilmektedir. Cerrahi girişim yapmak daha kolaydır. Deney hayvanları beslenme güçlüğü çekmez, diyetleri değişmez ve genel bir güçsüzlük görülmez. Dışarıdan cihaz uygulamaya izin verir. Granström ve Nilsson Sprague-

Dawley ratlarda mandibular fraktür oluşturdıkları çalışmalarında, 14-16 gün sonra yeni oluşan kemiğin hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşme gösterdiğini belirtmişlerdir (131). Sonuçta rat mandibulalarında kemik iyileşmesinde her iki kemikleşmenin de görüldüğü belirtilmiştir. Endokondral kemikleşme gösteren femur, intramembranöz kemikleşme gösteren fasiyal bölge kemiklerinden farklı olsa da vücudun herhangi bir bölgesindeki kemik iyileşmesinin diğer bölgelerdeki kemik iyileşmesi için de geçerli olduğu çalışmalarda belirtilmiştir (132). Çalışmamızda kemik modeli olarak fasiyal bölge kemiği yerine avantajları daha fazla olan femur kemiği tercih edilmiştir.

Çalışmada, tüm gruplara ait ratların her hafta vücut ağırlıkları, beslenmeleri, sağlık durumları kontrol edilmiştir. Tüm grupların ağırlık ortalamasının deney başlangıcından operasyon gününe doğru azaldığı tespit edilmiştir. Heparin + PEMF ve heparin gruplarının ağırlık ortalamasında operasyondan sonra da azalma eğilimi devam etmiştir. Fakat kontrol grubunun ağırlık ortalaması operasyondan sonra diğer gruplardan farklı olarak artış göstermiştir. Çalışmamızda darbeli elektromanyetik alan uygulamasından bağımsız olarak heparin ile sekonder osteoporoz oluşturulmasının vücut ağırlığını azalttığını; fakat darbeli elektromanyetik alan uygulamasının ratların vücut ağırlığını etkilemediği tespit edilmiştir. Shen ve Zhao osteoporoz oluşturulmuş ratlara 8 hafta boyunca günde 2 saat 0.8 mT şiddetinde ve 15 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uygulamasının kemik remodeling sürecini etkileyerek kemik kütle kaybına ve vücut ağırlığında değişime engel olduğu sonucuna varmışlardır (133). Erpek ve arkadaşları, ratlarda 8 hafta boyunca çok düşük frekanslı elektromanyetik alanın vücut ağırlıklarında azalma eğilimi yarattığı fakat anlamlı azalmanın olmadığını belirtmişlerdir (134). Gonzales ve arkadaşları 3 haftalık dişi ratlara 30 gün boyunca 24 saat 3 mT şiddetinde ve 100Hz frekansında elektromanyetik alan uygulamasının vücut ağırlığını etkilemediğini tesbit etmişlerdir (135). Çalışmamızın sonuçları farklı şiddet, frekans ve sürelerde darbeli elektromanyetik alan uygulamasının sağlıklı ve osteoporoz oluşturulmuş fare ve ratların vücut ağırlıklarının değişimi üzerine etkisi olmadığını belirten Shen ve Zhao, Gonzalez ve Erpek'in çalışmaları ile uyumludur (133-135).

Deneysel olarak hazırlanan kemik defektlerinin kritik boyutlarda (kendiliğinden iyileşmeme sınırı) oluşturulması önemlidir. Kritik boyutta defekt, yaşam boyu kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki defekt olarak tanımlanır (136-138). Her deney hayvanı için kritik kemik defekti boyutu değişir. Literatürde rat femurunda kendiliğinden iyileşemeyen kritik boyutta daire şekilli defektler 2 mm (139) ve 3 mm (140-142) boyutlarındadır. Ratların anatomik farklılıkları göz önüne alındığında bu beklenen bir durumdur (143). Tüm bu çalışmalar dikkate alınarak, çalışmamızda rat femurun diafiz bölgesi operasyon sahası olarak belirlenmiştir. Ortalama diafiz bölgesinin çapı 4.5 - 5 mm, tek bir korteksinin kalınlığı 1-2 mm olan femurların çapından küçük olacak şekilde çapı 3 mm olan trefan frez ile monokortikal kalınlıkta kritik boyutta kemik defekti oluşturulmuştur.

İnsanda kemik iyileşmesi 4-16 haftada gerçekleşir. Ratların kemik iyileşmesi de insanlarınkine benzemekle beraber metabolizmaları daha hızlı çalıştığı için kemik iyileşmesi daha kısa zamanda gerçekleşir (144). Kemik dokuda oluşan defektler, vücudun yara iyileşme kapasitesi (skar dokusu) ile sonlanmadan yeniden şekillenme ile onarılır. Kemik iyileşmesi pek çok düzenleyici ile hücrel yapıların etkileşimini içeren kompleks bir süreçtir. Süreçlerin düzenli bir şekilde birbirini izlemesiyle kemik devamlılığı sağlanmış olur (132). Ratlar üzerinde kırık ve defekt oluşturulan çalışmalarda iyileşme dört aşamada gerçekleşir. İlk aşama; enflamasyon fazıdır. Hasardan hemen sonra hematoma ile oluşması ve rezorbe olup fibröz granülasyon dokusunun yerleştiği 3 günlük bir periyoddur. İkinci aşama; kemik iyileşmesinin başlangıcıdır. Periosttan defekt alanına mezenkimal kök hücrelerin göç ettiği ve intramembranöz ve endokondral kemik yapımının görüldüğü 2-3 haftada sonlanan periyoddur. Üçüncü aşama; rezopsiyonun başladığı, kalsifiye kartilajın ortadan kalkarak yerini örgü kemiğe bıraktığı yaralanmadan sonraki 3-6 haftada sonuçlanan periyoddur. Dördüncü aşama; lameller kemiğin oluştuğu sekonder kemik remodelasyonunun olduğu ve kemiğin yaralanma öncesindeki durumuna döndüğü süreçtir. Kemik iyileşmesinin tüm basamakları; moleküler, hücrel ve biyomekanik olaylar ile düzenlenmektedir. Her kemik iyileşme safhası kendinden sonraki aşamayı uyarır (145).

Literatürde deney hayvanlarında kemik iyileşmesinin değerlendirildiği sürelerin çok değişik zaman dilimlerinde olduğu görülür. Kemik doku üzerine yapılan çalışmalarda kemik iyileşmesinin değerlendirme süreleri arasında görüş birliği yoktur. Operasyon sonrası 1. ile 8. haftalar arasında sakrifikasyon uygulanmış çalışmalar olduğu gibi, sakrifikasyon süresinin 12.-16. haftaya kadar uzadığı geç dönem çalışmalarda bulunmaktadır. Namkung Matthai ve arkadaşları, kırık oluşturduktan sonra 1., 2. ve 3. haftalarda sakrifiye edilen ratlarda ikinci haftada sert kallusun oluştuğunu üçüncü haftada remodellingin olduğunu bildirmişlerdir (146). Yapılan bir çalışmada 4 haftalık sürenin ratlarda yeni kemik oluşumunu değerlendirmek için uygun bir süre olduğu rapor edilmiştir (147). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda ratların femur kemiğindeki defektin iyileşmesini değerlendirmek için 4. hafta sonundaki iyileşmeler esas alınarak sakrifiye edilmiştir.

Kemik iyileşmesini değerlendirmek için histolojik ve histomorfometrik yöntemler kullanılmaktadır. Skorumla ile yapılan histolojik incelemelerin hata payı barındırması, sonuçların objektifliğini tartışılır hale getirmektedir. Kemik iyileşmesi araştırmalarında son zamanlarda objektif ve sayısal sonuçların elde edildiği, iyileşme aşamalarının doku ve hücre seviyesinde değerlendirildiği histomorfometrik inceleme tercih edilmektedir. Kemik yapım-yıkım ve yapısal parametrelerinin incelenmesinde histomorfometrik incelemenin altın standart olduğu bilinmektedir (148). Histomorfometrik analizdeki parametreler kemiğin yapısal özelliklerini ve yeniden şekillenme özelliklerini değerlendirmek üzere 2 gruba ayrılır. Remodelling özellikleri de statik ve dinamik olmak üzere 2 alt gruba ayrılır (149). Kemik dokusunun mineralizasyonu, kemik hücrelerinin aktiviteleri hakkında detaylı ve objektif bilgilerin elde edilmesi ve de elde edilen sayısal değerlerin özellikle yeni oluşan kemiğin değerlendirilmesinde kullanılmasından dolayı çalışmamızda bilgisayar destekli histomorfometrik inceleme tercih edilmiştir. Çalışmamızda yeni kemik yapımı hakkında sayısal değer elde edilmesi bakımından “yeni kemik oluşum alanı” histomorfometrik parametre olarak ele alınmıştır. Her kesit için defekt alanının aynı genişlikte olması histomorfometrik inceleme açısından sağlıklı bir fikir vermektedir.

Kemik yapım ve yıkımını değerlendirmede biyokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır. Biyokimyasal incelemede, radyolojik ve histolojik incelemelere göre kemik metabolizması hakkında daha erken bilgi sahibi olunur ancak her zaman kesin sonuç vermeyebilir. Sağlıklı erişkinde osteoklastik ve osteoblastik aktivite birbirine sıkıca bağlıdır. Ancak bu homeostazis osteoporoz tarafından bölünebilir ve kemik kaybı ile sonuçlanır. Osteoblast ve osteoklastlar aracılığıyla ortama verilen yan ürünler kemik yapım ve yıkım belirteçleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Kemik yapımı belirteçleri osteoblastların sentez etkinliğini veya prokollajen metabolizmasını değerlendirir. Yıkım belirteçleri ise osteoklast etkinliği ve/veya kollajen parçalanmasını yansıtır. Kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde; kemik yapımı için osteokalsin ve alkalen fosfataz, kemik yıkımı için ise NTx, CTx ve TRAP incelenir (40). Bunun yanında kemik metabolizmasında önemli rol oynayan Ca^{++} , PTH, kalsitriol değerleri de kemik yapım yıkımı ile yakından ilişkilidir (150). Bu nedenle çalışmamızda kemik yapım ve yıkımının biyokimyasal belirteci olan serum CTx ve PTH ölçümü için rat spesifik CTx ve PTH kiti kullanılmıştır, serum Ca^{++} düzeyi ise otoanalizörde spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Dünya Sağlık Örgütü osteoporozu, “düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığı” şeklinde tanımlamıştır (51). Osteoporoz gelişmiş ülkelerde çok sayıda erkek ve kadını etkileyen bir hastalıktır. Artan hayat beklentisi ve dental implant kullanım popülaritesi sonucu çok sayıda osteoporozlu hastada diş çekimi, kemik augmentasyonu, implant yerleştirilmesi uygulamaları ile karşılaşmaktadır. Cerrahi işlemin başarısı kemik metabolizması hastalıklarından etkilenir. Kemik kalitesinde, kortikal ve trabeküler kemik kalınlığı ve kemik mineral yoğunluğu önemlidir. Osteoporozun çene kemikleri üzerindeki etkileri kemik mineral içeriğinde ve yoğunluğunda azalma, trabeküler yapıda bozulma, azalmış osteoblastik aktivite ve remodelasyon hızı, rezidüel kemik hacminde ve kortikal kemik kalınlığında azalma şeklindedir. Osteoporoz varlığı cerrahi işlemlerde potansiyel risk teşkil edebilir ve kemik iyileşmesini olumsuz etkileyebilir. Osteoporoz; diş çekimi, kırık iyileşmesi, kemik augmentasyonu ve implant operasyonu başarısızlığında büyük bir risk

oluştursa da bu işlemler için bir kontrendikasyon teşkil etmemektedir. Çene cerrahları için osteoporoz süreci ile cerrahi sonuçlar arasındaki potansiyel etkileşimin farkında olmak önemlidir. Hastalara cerrahi tedavinin başarısında osteoporozun olası etkileri hakkında bilgi verilmelidir (151).

Osteoporozlu bireylerin çene kemikleri ince, belirsiz trabeküllü ve ince kortekslidir. Lamina dura incelmıştır. Osteoporozlu ve sağlıklı kadınların karşılaştırıldığı bir vaka kontrol çalışmasında mandibular kemik mineral içeriği osteoporozlu kadınlarda önemli derecede düşük olduğu rapor edilmiştir (152). Osteoporozda maksiller alveoler kemik kaybının da hızlandığı belirtilmiştir (153).

Cerrahi işlemlerde kemik augmentasyonun başarısının yaş ve osteoporoz gibi bazı sistemik hastalıklar ile belirgin bir şekilde azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (154-157). Hildebrand ve arkadaşları 17 osteoporoz hastasının maksilla ve mandibulasına augmentasyon uygulaması (onley, inley greft; serbest flep; vestibuloplasti) yaptıklarında şiddetli osteoporozu olan hastalarda anlamlı oranda komplikasyon görüldüğünü belirtmişlerdir. Preprotetik kemik grefti cerrahisinde düşük kemik mineral yoğunluğunun artmış komplikasyon oranı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (154). Kemik augmentasyonu sonrası iyileşme başarısı postmenopozal kadınlarda, düşük kemik yoğunluğuna ve alıcı alan mikro mimarisinde meydana gelen değişikliklere bağlı olabileceği belirtilmiştir (158).

Osteoporoz ile çene kırıkları arasında açık bir ilişki gösterilememiştir. Osteoporozun, iyileşme ve komplikasyon oranını etkileyen olası bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Werning ve arkadaşları yaptıkları retrospektif bir çalışmada osteoporoz derecesi ile birden çok maksillofasial yaralanma sayısı arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu osteoporozun maksillofasial yaralanmalarda bağımsız risk faktörü olabileceğini belirtmişlerdir (159).

Osteoporozun dental implant kaybında risk faktörü olduğu ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. Moy ve arkadaşları 1140 hastaya 4680 implant yaptıkları çalışmalarında, implant kayıplarının sistemik ve lokal faktörlerini araştırmışlar. Osteoporozlu hastalarda artan bir implant kayıp oranını bulmalarına rağmen osteoporozun implant için bir kontrendikasyon olmadığını belirtmişlerdir (160). Birçok yazar da osteoporozun implant kaybını arttıran bir faktör olmadığını ve

osteoporoz hastalarında dental implant yerleştirilmesi için kontrendikasyon bulunmadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte maksillada kansellöz kemiğin büyük yer kaplaması ve osteoporozda kansellöz kemiğin daha fazla etkilenmesinden dolayı şiddetli osteoporoz hastalarında maksillaya implant yerleştirilmesinde dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir (151).

Osteoporoz etyolojisine göre primer ve sekonder olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer osteoporozun sebebi tam olarak bilinmezken sekonder osteoporoz endokrin, romatizmal, hematolojik, gastrointestinal, onkolojik hastalıklar ve çeşitli ilaçların kullanımına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (62). Premenopozal kadınlar ile 50 yaştan genç erkeklerde görülen osteoporozda çoğunlukla sekonder nedenlerin söz konusu olduğu belirtilmiştir (161).

Antikoagülanlar tromboz ve embolinin önlenmesi ve tedavi edilmesinde olumlu etkilerinin yanı sıra kemik kaybı ve sekonder osteoporoz gibi olumsuz etkilerinin de olduğu bilinmektedir. Heparin; venöz tromboembolinin önlenmesi ve tedavisinde, atriyal fibrilasyona bağlı embolinin önlenmesinde, inme ve miyokard enfarktüsü tekrarının önlenmesinde, protez kalp kapağı bulunması durumunda, hamilelikte venöz tromboembolinin önlenmesi ve tedavisinde, kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda hemeodiyaliz sırasında kullanılan etkili bir paranteral antikoagülandır (4). Daha sonraları heparinin olası komplikasyonları üzerine geliştirilen düşük molekül ağırlıklı heparin kemik üzerinde daha az olumsuz etki göstermektedir. Warfarin ve asetilsalisilik asitin kemik üzerine olumsuz etki ettiği ile ilgili açık kanıtlar bulunmamaktadır (7).

Kısa süreli heparin kullanımı kanama riskine yol açarken uzun süreli heparin kullanımı ise kemiği etkileyerek sekonder osteoporoz gelişimine yol açmaktadır (162). Heparinin indüklediği osteoporoz 1964'te Griffith ve arkadaşlarının tanımlanması ile ortaya çıkmıştır (37). Heparinin indüklediği osteoporozun multifaktöriyel olduğu patogenezinde kemik sentezinin azaldığı ve kemik rezorbsiyonunun arttığı belirtilse de bu sorunun hangi mekanizmalarla gerçekleştiği tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (5). Günde 15 000 IU'nin üzerinde ve 3 aydan fazla kullanımda kemik üzerinde olumsuz etkileri ortaya çıkmaktadır. Heparinin indüklediği osteoporozun gerçek insidansı bilinmemektedir. Ancak

heparin tedavisi gören hastaların üçte birinde osteoporoz görüldüğü yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (6).

Kemik iyileşmesi; osteojenik hücrelerin osteoblastlara farklılaşması, proliferasyonu ve migrasyonuna bağlıdır (132). İn-vitro koşullarda heparinin osteoklast formasyonunu, sayısını ve aktivitesini arttırdığı osteoblastların farklılaşmasını ve fonksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (163-166). Ayrıca, heparinin BMP-2'nin osteojenik aktivitesini inhibe ettiği (167), düşük konsantrasyonlarda osteoklast formasyonunu arttırdığı (168), kemik mineral kütlelerini azalttığı (169, 170), trabeküler kemik kaybına yol açtığı (164, 171) ve hücre kültüründe osteoblast büyümesini inhibe ettiği (172) de rapor edilmiştir. Bununla birlikte, heparinin osteoblast büyümesini, diferansiyasyonunu ve mineralizasyonunu arttırdığı (173), BMP antagonistlerini inhibe ettiği, BMP-2 bozulmasını önleyerek BMP-2 nin biyolojik aktivitesini arttırdığı ve RANKL'a bağlanarak osteoklastogenezisi inhibe ettiği ile ilgili çalışmalar da mevcuttur (174). İn vitro çalışmalarda ve hayvan çalışmalarında heparinin etkisinde görülen farklılıklar; hayvan türü veya hücre kültürü, fraksiyon tipi, heparin konsantrasyonu ve uygulama süresi ile ilişkilendirilebilir (175).

Mätzsch ve arkadaşları günde 2 IU/g heparin verdikleri dişi ratların 33. ve 65. gündeki femur kemik mineral kütlelerini ölçtüklerinde, heparin verilen ratlarda kemik mineral kütlelerinin anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir. Bu etkinin 33. ve 65. günlerde aynı olduğunu ve 2 IU/g heparinin ratlarda 33 günlük süreçte osteoporoz görülmesine yol açtığı sonucuna varmışlardır. (170).

Monreal ve arkadaşları 33 gün boyunca 2 IU/g heparin ve 1 IU/g düşük molekül ağırlıklı heparin enjeksiyonu yaptıkları çalışma grupları ve salin enjekte ettikleri plasebo grubu ratların femur kemik mineral kütlelerini karşılaştırdıklarında, heparin grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmış kemik yoğunluğu tesbit ettiklerini belirtmişlerdir. Benzer şekilde, yandıktan sonra bıraktıkları kül miktarının da heparin grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğunu belirtmişlerdir (169).

Shaughnessy ve arkadaşları 4-5 aylık Sprague-Dawley ratlara 28 gün boyunca 0.5 IU/g ve 1 IU/g heparin ve salini subkutanöz enjekte ederek ve daha sonra 28 gün boyunca enjeksiyon yapmadan, sağ femur distal üçte birinde bulunan epifiziyal büyüme plağının proksimal bölgesinde histomorfometrik inceleme gerçekleştirmişler. İlk 28 günde 1 IU/g heparin verilen ratlarda % 30 kansellöz kemik kaybı, % 137 artmış osteoklast yüzeyi ve % 60 azalmış osteoblast ve osteoid yüzeyi tesbit ettiklerini belirtmişlerdir. Daha sonraki 28 günde de bu parametrelerin geri dönmediğini ve heparin enjeksiyonunun bittiği 28. gündeki azalmış serum alkalin fosfataz seviyesinin, 56. gün sonundaki seviye ile aynı düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Heparinin kemik üzerinde uzun süreli etkisini ¹²⁵I-işaretlenmiş heparin verdiklerinde kemikte biriktiğini ve heparin enjeksiyonu kesildikten sonrada kemikte tutulduğunu gözlemlemişler. Histomorfometrik ve biyokimyasal incelemeler sonucunda heparinin uzun bir süre kemik içinde biriktiği için meydana gelen osteoporozun hızlı şekilde geri dönüşü olmadığını rapor etmişlerdir (163).

Folwarczna ve arkadaşları 28 gün boyunca 1 ile 2 IU/g dozlarında heparin ve düşük molekül ağırlıklı heparin enjekte ettikleri dişi ratlarda kemik mineral içeriğinin sadece 2 IU/g heparin grubunda anlamlı oranda azaldığını ($p < 0.01$) belirtmişlerdir (176).

Yapılan çalışmalarda heparinin indüklediği sekonder osteoporozun hem süreye hem doza bağımlı olduğu, bununla birlikte dozun süreden daha etkili olduğu belirtilmiştir (5, 177). 28 ile 33 gün arasında günlük 0.5-2 IU/g dozları arasında heparin verilen deney hayvanlarında, heparinin sekonder osteoporozu yol açtığı ve kemikte beklenen en erken anlamlı değişim süresinin kemiğin anatomik ve histolojik yapısına bağlı olarak değişebileceği gösterilmiştir (5, 163-165, 169, 170, 176, 177). Çalışmamızda Mätzsch ve Monreal'in çalışmaları (169, 170) referans alınarak ratlara 33 gün boyunca 2 IU/g dozunda heparin verilmiştir. Heparin verilen tüm ratlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 35. günde serum Ca^{++} seviyesinin anlamlı oranda azalması ($p < 0,01$) ve serum Ctx seviyesinin de anlamlı oranda artması ($p < 0,05$), osteoporoz oluşturma hedefimizi doğrulamıştır. Ayrıca uzun dönem heparin kullanımının geri dönüşümlü osteoporozu yol açtığını bildiren çalışmalar olmasına rağmen, kemik kaybının kalıcı olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur.

Ratlarda yapılan bir çalışmada, ¹²⁵I-işaretlenmiş heparinin uzun süre boyunca kemikte biriktiği ve oluşan osteoporozun geri dönüşünün hızlı olmadığı belirtilmiştir, bu sonuçların da insanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olduğunu gözlemlediklerini rapor etmişlerdir (163). Heparin verilen ve darbeli elektromanyetik alan uygulanmayan grupta 63. gün serum CTx düzeyi, 35. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda artmıştır (p < 0,05). Elde ettiğimiz bu sonuç 33 gün heparin enjeksiyonunun kemik kaybı ve osteoporozu yol açtığı ve 63. güne kadar ilerleyerek devam ettiğini göstermekte ve literatürle uyumluluk sağlamaktadır. Çalışmamızın bu sonuçları, heparin verilen ratlarda serum Ca⁺⁺ düzeyinin azaldığını ve osteoporoz oluştuğunu bildiren ve osteoporoz oluşan ratlarda serum CTx düzeyinin yükseldiğini belirten Akkaş ve Jing'in çalışmalarıyla uyumludur (5, 178).

Darbeli elektromanyetik alanın tıbbi tedavi amaçlı kullanımını maliyetinin düşük olması, girişimsel olmaması, yan etki riskinin az olması ile öne çıkmaktadır (107, 108). Yapılan çalışmalarda darbeli elektromanyetik alan uygulaması ile ilgili hiçbir yan etkiye rastlanmamıştır (3.18). Darbeli elektromanyetik alan segmental kemik kayıplarında, enfekte nonunion, sinoviyal psödoartroz, fraktür sahasında zayıf stabilite görüldüğünde kullanılması kontrendikedir (1.43). Gebeliğin ilk 3 ayında, kulak içi işitme cihazı, insülin pompası gibi implante cihaz bulunanlar, kalp pili olanlarda sorun yaşanabileceği için tavsiye edilmemektedir (109-111). Huang ve arkadaşları darbeli elektromanyetik alan uygulamasının primer osteoporozda hızlı ve etkili şekilde ağrıyı azalttığını ancak kemik mineral yoğunluğu ve kemik rezorbsiyonuna etkisinin tartışmalı olduğunu bununla birlikte, sekonder osteoporozda kemik oluşumunu uyardığı ve kemik mineral yoğunluğunu arttırdığı sonucuna varmışlardır (111).

Birçok çalışmada darbeli elektromanyetik alanın kemik ve osteogenezis üzerinde olumlu etkileri olduğu (9-14) bildirilmesine rağmen hiçbir etkisi olmadığını (15) veya olumsuz etkisi (16) olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Ancak darbeli elektromanyetik alanın bu etkiyi nasıl sağladığı, hücresel düzeyde hangi aktiviteleri arttırıp, hangilerini azalttığı tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır. Yapılan çalışmalarda, darbeli elektromanyetik alanın osteojenik hücre proliferasyonunu, diferansiasyonunu ve mineralizasyonu arttırarak osteogenezisi

arttırdığı (9, 179-181), Wnt/LRP5/ β katenin sinyal yolunu aktive ederek osteoblastogenez ve osteoblast/osteosit aktivitesini arttırdığı (182, 183), ancak RANK/ RANKL sinyal yolu üzerinden arttırmadığı (184), PI3 kinaz/ mTOR sinyal yollarını aktive ederek büyüme faktörüne benzer etki sağlayarak, sitozolik Ca^{++} artışına yol açarak çeşitli hücre sinyal iletim yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (185, 186). Bir diğer görüş de PEMF'in büyüme faktörlerinin (BMP, TGF- β , IGF) sentezini uyararak kemik oluşumuna yol açan olaylar dizisini uyardığı (187-190) ve alkalen fosfataz aktivitesini arttırdığıdır (9-11, 188, 191). Extrasellüler matriks üretiminde arttırdığı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (186). Ayrıca, kemik oluşumu (HOXA10, Akt1), hücre iskelet bileşenleri (FN1, VCL), kollajenöz ve non-kollajenöz matriks bileşenleri (COL1A2, SRtRC) ile ilgili genlerin ekspresyonunu arttırıp, matriks yıkımı (MMP-11, DUSP4) ile ilgili genlerin ekspresyonunu azalttığı (192) ve DNA sentezini arttırdığı da (193) belirtilmiştir. Bununla birlikte darbeli elektromanyetik alanın osteogenezisi bu yollardan arttırmaktan ziyade damarlanma ve anjiogenezisi arttırarak kemik iyileşmesini arttırdığını belirten çalışmalar da mevcuttur (194).

Çeşitli hastalıkların tedavisinde darbeli elektromanyetik alan uygulamasının muhtemel uyarıcı parametrelerinin bir “biyolojik pencere” aralığında olduğu bildirilmiştir. “Biyolojik pencere” doku tipi, şiddet, frekans, uygulama süresi ve bunların kombinasyonları ile tespit edilebilir. Ancak, darbeli elektromanyetik alan uygulamasının biyolojik etkilerinin karmaşıklığı nedeniyle herhangi bir hastalık için kesin parametre penceresi hakkında şimdiye kadar fikir birliği oluşturulamamıştır. Birçok çalışmada organizmalar üzerine darbeli elektromanyetik alan uygulamasının en etkili pozitif biyolojik etkilerinin düşük şiddet (< 50 mT) ve düşük frekans (< 100 Hz) parametrelerinde olduğu kanıtlanmıştır (103, 195). Darbeli elektromanyetik alan uygulamasının osteogenezis üzerine etkilerini inceleyen araştırmalar etkin bir tedavi protokolü geliştirilmesi açısından önemlidir. Şiddet, frekans, süre ve uygulama yönü (vertikal veya horizontal) gibi birçok parametrenin farklı olması farklı sonuçları da beraberinde getirmiştir. Bu yüzden en uygun şiddet, frekans, süre ve uygulama yönünün bir araya gelerek meydana getirdiği olumlu sonuçlar, kullanılacak uygun parametrelerin ortaya çıkmasında yararlı olabilir.

Çok düşük frekanslı elektromanyetik alanlar 3 Hz-3 KHz frekans bandında bulunan dalga ve impulslardır. McLeod ve Rubin çalışmalarında kemik dokusunun çok düşük frekanslarda duyarlılık gösterdiğini belirtmişlerdir (196). Hayvan modellerinde ve klinik çalışmalarda çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların kırık iyileşmesini arttırdığı, kemiğin kaynaşması için gereken süreyi azalttığı gösterilmiştir (10). Otter ve arkadaşları kemik üzerinde olumlu etki sağlayan frekansın, kemikte fonksiyon sırasında oluşan frekans seviyesine (1-100 Hz) yakın olması gerektiğini bildirmişlerdir (197). Osteogenezisin uyarılması ve artırılmasında 7.5 - 75 Hz aralığındaki frekanslar kullanılmaktadır (198). Mekanik gerilimlere ve endojen akımlara neden olan yürüme aktivitesinin 10 Hz'den düşük frekanslarda olduğu bilinmektedir (199). 7.5 Hz frekansının osteoklastlarda apoptozis oranını arttırdığı (200), osteoblast proliferasyonunu arttırdığı (193) belirtilmiştir. Bununla birlikte bir çalışmada 7.5 Hz frekansının osteojenik diferansiasyonu inhibe ettiği öne sürülmüştür (201).

Uluslararası noniyonize radyasyondan koruma komisyonu 0.1 mT şiddetinin hiçbir biyolojik etkiye sahip olmadığını belirtmiştir (202). Çalışmalarda osteogenezisi stimüle eden darbeleri elektromanyetik alan şiddeti 0.1 - 3 mT aralığındadır (201). Matsunaga ve arkadaşları osteogenezis üzerine etkinin frekansın ziyade şiddete bağlı olduğunu bildirmişlerdir (11). Chang ve arkadaşları bilateral overektomili ratlarda 0.4 – 0.8 mT şiddetinde darbeleri elektromanyetik alan uygulandığında trabeküler kemikte kaybın baskılandığı ve yapısının restore edildiğini belirtmişlerdir (12). Fakat Matsumoto ve arkadaşları 0.2, 0.3 ve 0.8 mT şiddetinde darbeleri elektromanyetik alanın implant osteointegrasyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında kemik kontak oranı ve alanının 0.8 mT şiddetinde anlamlı oranda en düşük olduğunu belirtmişlerdir (203).

Uygulama süresi diğer önemli bir faktördür (204). İn-vitro çalışmalarda, in-vivo ve klinik çalışmalardan daha kısa süre darbeleri elektromanyetik alan uygulanması gerektiğini gösteren açık kanıtlar vardır (199). Frederics ve arkadaşları tavşan tibialarında osteotomi sonrası 28 gün boyunca günlük 30 ve 60 dk darbeleri elektromanyetik alan uygulamasının süre ile bağımlı şekilde kallus formasyonunu ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını belirtmişlerdir (14). Huang ve arkadaşları 30 gün

boyunca günlük 20, 40 ve 60 dk darbeleri elektromanyetik alan uyguladıkları overektomili ratlarda kemik mineral yoğunluğu karşılaştırıldığında uygulama süreleri arasında anlamlı fark olmadığını ve günlük 20-60 dk aralığının tedavi süresi açısından yeterli olduğunu belirtmişlerdir (13).

Darbeleri elektromanyetik alanın günün hangi saatinde uygulanma zamanında önemli olduğu belirtilmiştir. Jing ve arkadaşları overektomi yapılan ratlara gündüz (9:00-15:00) veya gece (00:00- 6:00) darbeleri elektromanyetik alan uyguladıklarında overektominin indüklediği kemik kaybı ve trabeküler kemik kalitesinin bozulmasının önlenmesinde gündüz uygulanmasının daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (205). Çalışmamızda darbeleri elektromanyetik alan uygulaması gündüz gerçekleştirilmiştir.

Darbeleri elektromanyetik alanın osteogenezisin hangi aşamasında uygulanması gerektiği hakkında hala fikir birliğine varılamamıştır. Inoue ve arkadaşları köpeklerin sol arka tibialarına osteotomi sonrası eksternal fiksator yerleştirdikten 4 hafta sonra başlayarak 8 hafta boyunca günde 1 saat 0.2 mT şiddetinde ve 15 Hz frekansında darbeleri elektromanyetik alan uygulamasını kemik iyileşmesinin başlangıç aşamalarının tamamlandığı 4. haftadan sonraki geç safhada kallus formasyonunu ve maturasyonunu artırıcı etkileri olduğunu belirtmişlerdir (206).

Erdem tez çalışmasında ratlarda günde 12 saat, 0.3 mT şiddetinde ve 100 Hz frekansında 15 gün darbeleri elektromanyetik alan uygulamanın kemik yapımında herhangi bir fark yaratmadığını, fakat 45 gün uygulamanın kemik yapımını arttırdığını belirterek darbeleri elektromanyetik alan uygulamasının kemik iyileşmesinin geç dönem differansiyasyon ve mineralizasyon evrelerinde etkili olduğunu belirtmiştir (207). Inoue ve ark. ve Erdem, çalışmalarında darbeleri elektromanyetik alan uygulamasının kemik iyileşmesinin geç döneminde uygulandığı zaman olumlu etkilerinin görüldüğünü belirtmişlerdir (206, 207).

Diniz ve arkadaşları osteoblastlara 7 mT şiddetinde ve 15 Hz frekansında darbeleri elektromanyetik alan uygulamasının kemik doku üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında darbeleri elektromanyetik alanın aktif proliferasyon aşamasında hücrel proliferasyonu hızlandırdığı, hücrel farklılaşmayı geliştirdiği ve kemik benzeri doku oluşumunu hızlandırdığını, diferansiyasyon aşamasında da hücrel farklılaşmayı geliştirdiği ve kemik benzeri doku oluşumunu hızlandırdığını, fakat mineralizasyon aşamasında ise kemik benzeri doku oluşumunu azalttığını

belirterek, darbeli elektromanyetik alanın erken dönemde osteoblastlar üzerinde uyarıcı bir etki ile kemik benzeri dokusu oluşumunu arttırdığını belirtmişlerdir (9).

Taylor ve arkadaşları tavşanlara distraksiyon osteogenezisinin konsolidasyon periyodunda 20 gün boyunca günde 1 saat, 0.2 mT şiddetinde 1.5 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uygulamasının yeni kemik alanı, kallus mineralizasyonu, yapısal sertlik ve maksimal tork parametrelerinde anlamlı fark yaratmadığını belirtmişlerdir. Distraksiyon sonrası oluşan yeni kemik alanında gruplar arasında anlamlı fark olmamasını darbeli elektromanyetik alan uygulamasının geç dönemde (konsolidasyon safhası) uygulanmasına bağlamışlardır (194).

Fredericks ve arkadaşları tavşanlara distraksiyon periyodunda günde 1 saat 1.5 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uygulamasının kallus oluşumunu artırdığı ve kırık iyileşmesinin olgunlaşmasını hızlandığı belirtmişlerdir. Distraksiyon periyodunda darbeli elektromanyetik alan uygulamasının yeni oluşan kemikte konsolidasyonu hızlandığını vurgulamışlardır (208).

Midura ve arkadaşları ratlara osteotomi sonrası 5 hafta boyunca her gün günde 3 saat 2 mT şiddetinde ve 15 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uyguladıklarında kemik defektinin daha fazla trabeküler kemikle dolduğunu ve kortikal kemiğin arttığını belirterek bunun kemik iyileşmesinin erken döneminde darbeli elektromanyetik alan uygulamasından kaynaklandığını belirtmişlerdir (209). Diniz, Taylor, Fredericks ve Midura darbeli elektromanyetik alan uygulamasının olumlu etkilerinin erken dönemde uygulandığı zaman görüldüğünü belirtmişlerdir.

Çalışmamızda darbeli elektromanyetik alanın osteogenezisin proliferasyon (0-5 gün), diferansiyasyon (10-15 gün) ve mineralizasyon (25-28 gün) evrelerini içeren süre boyunca uygulanmıştır. Çalışmamız osteogenezisin farklı evrelerindeki etkisine odaklanan önceki çalışmalar ile bu açıdan benzerlik göstermemektedir.

Literatürde darbeli elektromanyetik alanın kemik defektinde yeni kemik oluşumuna etkileriyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Çalışmamızda da osteoblastik aktiviteyi arttıran ve/veya osteoklastik aktiviteyi azaltan darbeli elektromanyetik alan 28 gün boyunca günde 1 saat, ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında uygulanmıştır. Heparinin ve darbeli elektromanyetik alanın yeni oluşan kemiğe etkilerini değerlendirmek için histomorfometrik olarak yeni

kemik alanı, biyokimyasal olarak serum Ca^{++} , CTx ve PTH parametreleri değerlendirilmiştir.

Literatürde heparinin ve darbeli elektromanyetik alanın her ikisinin birlikte değerlendirildiği kemik defektinde yeni kemik oluşumuna etkileriyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Literatürdeki çalışmalarda heparinin ve darbeli elektromanyetik alanın kemik üzerine etkileri birbirinden bağımsız olarak ayrı çalışmalarda değerlendirilmiştir. Cane ve arkadaşları atların metakarpal kemiklerinde defekt oluşturup 30 gün 2.8 mT şiddetinde ve 75 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uyguladıklarında, histomorfometrik incelemede yeni kemik oluşumunun anlamlı oranda arttığını bunun da osteoblastik aktivitenin artmasından dolayı kaynaklandığını bildirmişlerdir (210).

Hwang ve arkadaşları tavşanların maksiller sagittal sütür bölgesindeki kalvaryal kemik defektlerine günde 8 saat, 38 G şiddetinde, 100 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uyguladıklarında 4. ve 8. haftalarda yeni kemik oluşumunun arttığını bildirmişlerdir (211).

Erdem tez çalışmasında ratların tibia kemiğinde oluşturduğu defektlere 45 gün boyunca günde 12 saat, 0.3 mT şiddetinde ve 100 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uyguladığında iyileşme alanında damarlanmanın artması nedeniyle yeni kemik oluşumunun anlamlı oranda arttığını belirtmiştir (207).

Darendeliler ve arkadaşları domuzların mandibula gonial bölgelerine defekt oluşturup günde 8 saat 1.8mT şiddetinde ve 15Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uyguladıklarında 9. gün sonunda yeni kemik yapımının daha hızlı olduğunu ve bunun da darbeli elektromanyetik alan uygulaması ile Ca^{++} tutulumunun artmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir (212).

Takano ve arkadaşları ratların premaksillasında oluşturdukları defektlere 21 gün boyunca günde 12 saat, 1.5-1.8 Gauss şiddetinde ve 100 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uyguladıklarında defekt bölmesine demineralize kemik grefti yerleştirdiklerinde anlamlı oranda artmış yeni kemik oluşumu saptamışlar. Demineralize kemik greftinin osteoblastların diferansiasyonunu uyarıcı etkisini, darbeli elektromanyetik alan uygulamasını arttırdığını ancak tek başına darbeli

elektromanyetik alan uygulamasının yeni kemik oluşumunu anlamlı oranda arttırmadığını, ek bir yöntem olarak kullanıldığında fayda sağladığını bildirmişlerdir (213).

Çalışmamızda heparin verilen ve darbeli elektromanyetik alan uygulanan ratların ortalama yeni kemik oluşum alanı sadece heparin verilenlere göre neredeyse dört kat, kontrol grubu ratlardan da bir buçuk kat fazladır. Çalışmamızda darbeli elektromanyetik alan uygulamasının heparin verilen ratlarda yeni kemik oluşumunu arttırdığı görülmektedir. Çalışmamız sonuçları kemik defektlerinin iyileşmesinde darbeli elektromanyetik alan uygulamasının yeni kemik oluşumunu arttırdığını belirten Cane, Hwang ve Erdem ve Darendeliler'in çalışmaları ile uyumludur (207, 210-212).

Yeni kemik oluşumunu değerlendirdiğimiz çalışmamızda histomorfometrik yöntemin yanısıra biyokimyasal olarak, osteoklastik rezorpsiyonu gösteren serum CTx düzeyi de incelenmiştir. Swaminathan'ın yaptığı çalışmada serum CTx düzeyi ile kemik yıkımı arasında histomorfometrik analizde anlamlı ilişki olduğu rapor edilmiştir (214). Serum CTx düzeyinin artmasının kemik yıkımının hızlandığının göstergesi olduğu yine çalışmalarda belirtilmiştir (42). Çalışmamızın sonuçlarında darbeli elektromanyetik alan uygulaması ile serum CTx düzeyinin anlamlı oranda azaldığı bulunmuştur. Yeni kemik oluşumunun artmasında darbeli elektromanyetik alanın osteoklastik rezorpsiyonu azaltan etkisinin ön plana çıktığı düşünülebilir. Serum CTx düzeyi ile histomorfometrik parametre olan yeni kemik alanı arasında doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı Pearson korelasyon kat sayısı hesaplanarak irdelenmiştir. Yeni kemik alanı arttıkça serum CTx düzeyinin azaldığı görülmüştür. Darbeli elektromanyetik alan uygulanan ratlar diğerleri ile karşılaştırıldığında deney sonunda anlamlı oranda azalmış serum CTx düzeylerinin ortaya çıkması, bu grupta osteoklastik rezorpsiyonun azaldığını göstermektedir.

Literatürde kemik dokuda darbeli elektromanyetik alan uygulaması ile ilgili daha önce yapılan çalışmalarda serum Ca^{++} düzeyinin anlamlı oranda azaldığı, serum Ca^{++} düzeyindeki azalmanın iyileşme sahasında lokal Ca^{++} kullanımının artmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. (207, 215, 216). Çalışmamızın sonuçları darbeli elektromanyetik alan uygulaması sonucu serum Ca^{++} düzeyinin anlamlı oranda

azaldığını göstermiştir. Bu azalmanın sebebinin darbeleri elektromanyetik alanın intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunu arttırarak ya da PTH'ın kemik hücrelerinde cAMP aktivitesini arttırarak plazma Ca^{++} seviyesini yükseltmesi etkisini ortadan kaldırarak, serum Ca^{++} değerlerini azaltmış olabileceği düşünülebilir. Yine de bu sonuçlar, darbeleri elektromanyetik alan uygulamasının serum Ca^{++} düzeyi üzerine etkisi ile ilgili tam bir fikir veremeyebilir. Sonuçlarımız Eraslan, Erdem ve Schober'in darbeleri elektromanyetik alan uygulaması sonucu serum Ca^{++} düzeyinin azaldığını bildirdikleri çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir.

Bununla birlikte bazı çalışmalarda serum Ca^{++} düzeyinin darbeleri elektromanyetik alan uygulaması sonucu arttığı ya da değişmediği ifade edilmiştir ve serum Ca^{++} düzeyindeki artışın elektromanyetik alan uygulamasının kemikteki Ca^{++} serbest bırakarak seruma geçmesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (217, 218). Sert ve arkadaşları overektomi yapılmış dişi ratlara 6 hafta boyunca 1 mT şiddetinde 50 Hz frekansında darbeleri elektromanyetik alan uyguladıklarında serum Ca^{++} değerlerinde anlamlı değişiklik görülmediğini rapor etmişlerdir (219).

Çalışmamızda heparin verilen ve darbeleri elektromanyetik alan uygulanmayan grupta ameliyattan sonra serum Ca^{++} seviyesi beklenmeyen bir şekilde anlamlı oranda artmıştır. Çalışmamızdan çıkan bu sonucun, heparinin indüklediği sekonder osteoporozda yeni kemik yapımının azalmasından dolayı lokal Ca^{++} kullanımının da azalması ya da artan intestinal absorpsiyon sonucu serum Ca^{++} düzeyinin yükselmesine bağlı olduğu düşünülebilir.

Kemik iyileşmesi sırasında serum Ca^{++} düzeyinin azalması beklenen bir durumdur. Meller ve arkadaşları köpeklerde fraktür sonrası serum Ca^{++} düzeyinin azaldığını, kallus oluşumu sonrasında (20. gün) normal düzeye geri döndüğünü belirtmişlerdir (220). Yine Meller ve arkadaşları 13 genç hastanın fraktürden 6 hafta sonra serum Ca^{++} düzeyinin anlamlı oranda azaldığını belirtmişlerdir (221). Rao ve arkadaşları köpeklerin diafiziyal ulnalarına segmental defekt oluşturduktan 4 hafta sonra serum Ca^{++} düzeylerinin azaldığını belirtmişlerdir (222). Suryawanshi ve arkadaşları köpeklerde tibial fraktür oluşturduklarında serum Ca^{++} seviyelerinin postoperatif dönemde azaldığını bildirmişlerdir (223). Shakya ve arkadaşları radiuslarında 2 mm defekt oluşturdukları tavşanların 7. ve 15 günlerde serum Ca^{++}

seviyesinin azaldığını tesbit etmişlerdir (224). Çalışmamızda kontrol grubu ratlarda serum Ca^{++} değerleri ameliyattan sonra anlamlı oranda azalmıştır, bu bulgu yapılan çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir ve kemik defekti iyileşmesinde osteogenezin artması ile ya da ameliyat sonrası sekonder hipokalsemi görülebilmesi olarak düşünülebilir.

Erişilebilir kaynaklarda heparinin indüklediği osteoporozda serum PTH düzeyinin değişimi ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Mutoh ve arkadaşları 2 IU/g heparin verdikleri ratlarda serum PTH düzeyinin heparine başladıktan 1 hafta sonra anlamlı şekilde ($p < 0.001$) arttığını bunun da düşük 1-25 dihidroksikolekalsiferol seviyesi yüzünden olabileceğini belirtmişlerdir (177). Çalışmamızdan çıkan sonuçlarda ise heparin verilen tüm ratlarda ameliyat öncesi serum PTH değerleri anlamlı oranda azalmıştır. Serum PTH seviyesindeki azalmanın, çalışmamızda bakılmamış olan plazma iyonize kalsiyum seviyesinin artmış olabilmesinden ya da paratiroid bezinin aktivitesinin azalmasından ya da heparinin böbrek fonksiyonlarını etkileyerek 25 hidroksikolekalsiferolün hidroksilasyonunu artırarak 1-25 dihidroksikolekalsiferol yapımını artırması sonucu kaynaklanmış olabileceği düşünülebilir. Çalışmamızın sonuçları Mutoh ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumluluk göstermemektedir (177).

Heparin verilen tüm ratlarda darbeli elektromanyetik alan uygulamasından bağımsız olarak ameliyattan sonra serum PTH düzeyleri anlamlı oranda artmıştır. Bunun ameliyat sırasında lokal hemoraji görülmesi ve biyokimyasal değerlendirmeler için kan alınması sonucu oluşan sekonder hipokalsemiye cevaben serum PTH düzeyinin artmasından ya da vücuttaki diğer fizyolojik mekanizmaların devreye girmesi sonucu azalmış serum PTH'ın kompanse edilmesi olarak düşünülebilir. Çalışmamızda darbeli elektromanyetik alan uygulaması sonucu serum PTH düzeyinin değişmesine etki etmediği gösterilmiştir.

Çalışmanın prospektif olmasına rağmen birkaç kısıtlılığı vardır. Çalışmamızın bir kısıtlılığı sadece erkek ratlar kullanarak gerçekleştirmemizdir. Dişi ratlarda menstruel siklus ve östrojen hormonunun kemik iyileşmesi üzerine etkisi bulunmaktadır. Dişi ratları da kapsayan kontrollü ileri çalışmalar ile heparin ile indüklenmiş sekonder osteoporozlu dişi ve erkek ratlarda darbeli elektromanyetik

alanın kemik iyileşmesi üzerine etkileri karşılaştırılabilir. Çalışmamızın bir diğer kısıtlılığı da osteogenezisin ayrı evrelerinde darbeli elektromanyetik alan uygulanmamasıdır. Darbeli elektromanyetik alanın osteogenezisin farklı evrelerde uygulandığı ileri çalışmalar yapılabilir. Çalışmamızda ratlara 28 gün boyunca günde 1 saat ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uygulanmasının muhtemel osteoklastik aktiviteyi azaltma etkisi nedeni ile heparinin kemik iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerini azaltmıştır. Oral ve maksillofasiyal cerrahi işlemlerde kemik iyileşmesini arttırmak için darbeli elektromanyetik alanın kullanılması önerilebilir. Hem heparinin yarattığı kemikteki olumsuzluğun hem de darbeli elektromanyetik alanın kemik iyileşmesi üzerine etkisinin daha açık gösterilebilmesi için osteogenezin farklı evrelerinde darbeli elektromanyetik alan uygulaması ile osteoblast ve osteoklast sayılarının değerlendirildiği daha ayrıntılı histomorfometrik inceleme ve biyokimyasal tetkikler ile ileri çalışmalar yapılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. 33 gün, 2 IU/g heparinin subkutan enjeksiyonunun sekonder osteoporoz oluşturulmasında uygun süre ve doz olduğu sonucuna varılmıştır.

2. 12 aylık erişkin Sprague-Dawley ratlarda, femurda kritik boyutta kemik defekti oluşturulabilmesi için, 3 mm çapında trefin frezin kullanılması kemik dayanıklılığını azaltmamaktadır.

3. Darbeli elektromanyetik alan uyguladığımız düzenek, aynı anda 6 deney hayvanına hareket kısıtlaması yaparak homojen manyetik akı vektörünün defekt bölgesine dik gelmesi bakımından çalışma literatürdeki birçok çalışma ile metodoloji bakımından farklılık göstermektedir.

4. Kemik iyileşmesinin değerlendirilmesinde yeni kemik alanı oluşumunun histomorfometrik incelenmesi nedeniyle objektif bir değerlendirme yapılmasına imkan sunmuştur.

5. Histomorfometrik analizde 28 gün boyunca 7.3 Hz frekansında, ortalama 0.8 ± 0.2 mT şiddetinde, günde 1 saat darbeli elektromanyetik alan uygulanması yeni kemik oluşum alanını arttırdığı bulunmuştur.

6. Biyokimyasal analizde heparin verilen her iki grup ratlarda serum Ca^{++} düzeyi düşük bulunmuştur. Bu da 33 gün boyunca ratlara heparin enjeksiyonu yapılmasının kemik içerik ve yoğunluğunu azaltarak serum Ca^{++} düzeyini düşürdüğünü göstermektedir.

7. Biyokimyasal analizde heparin verilen ratlarda artmış CTx düzeyi tespit edilmesi, 33 gün boyunca heparin verilen ratlarda kemik içerik ve yoğunluğunun azaldığını göstermektedir. 63. günde CTx düzeyi heparin + PEMF uygulanan grupta azalmıştır. Bu da darbeli elektromanyetik alan uygulamasının, kemik yıkım belirteci olan CTx seviyesini azalttığını göstermektedir. Heparin verilen ratlarda CTx düzeyi artmıştır. Bu bulgu da 33 gün heparin enjeksiyonunun kemik içerik ve yoğunluğunu azalttığı ve 63. günde de ilerleyerek devam ettiğini göstermektedir.

8. Biyokimyasal analizde heparin verilen tüm ratlarda azalmış PTH düzeyi tespit edilmiştir. PTH düzeyinin azalmasının sebebinin iskeletten artmış kalsiyum mobilizasyonuna karşı verilen fizyolojik bir cevap olabileceği düşünülebilir.

9. Osteoporoz hastalarında çekim soketi iyileşmesi, kırık iyileşmesi, sinus yükseltme, kemik augmentasyonu, implant osteointegrasyonu vb. işlemlerde kemik iyileşmesini tetiklemek ve hızlandırmak komplikasyonları önlemek, normal hayata dönüş süresini kısaltmak ve başarı oranını artırmak için darbeli elektromanyetik alan uygulaması tavsiye edilebilir.

10. Hem heparin enjeksiyonu sonucu oluşan osteoporozun kemik üzerindeki olumsuz etkilerini, hem de darbeli elektromanyetik alan uygulamasının kemik üzerindeki olumlu etkilerinin hücresel düzeyde mekanizmalarını da içerecek şekilde daha ayrıntılı gösterilebilmesi için ileri histomorfometrik ve biyokimyasal incelemeler yapılabilir.

11. Darbeli elektromanyetik alan uygulamalarında birçok farklı şiddet, frekans ve süre gibi değişkenlerin olması standart tedavi uygulanmasını güçleştirmektedir.

12. Darbeli elektromanyetik alan uygulamasının, kemik defekti tamiri, alveoler kemik miktarının artırılması, distraksiyon osteogenezisi, ortognatik cerrahi kemik içi implant osteointegrasyonu, bifosfonatların indüklediği çene nekrozlarının tedavisi gibi oral ve maksillofasiyal cerrahi pratiğinde yapılan işlemlerdeki etkinliğini araştırmak için klinik çalışmalar önerilebilir.

7. ÖZET

HEPARİN VERİLEN RATLARDA DARBELİ ELEKTROMANYETİK ALAN UYGULAMASININ KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Osteoporoz, düşük kemik kütlesi ve kemik dokusunun mikro yapısının bozulması sonucu kemik kırılabilirliğinin ve kırık olasılığının artması ile karakterize sistemik bir iskelet hastalığıdır. Antikoagülan olarak kullanılan heparinin kemik kaybı ve osteoporozu yol açtığı bilinmektedir. Kemik iyileşmesinin hızlandırılması için literatürde pek çok farklı yöntem araştırılmaktadır. Girişimsel olmayan ve düşük komplikasyon oranına sahip bir tedavi şekli olan darbeli elektromanyetik alan uygulamasının kemik oluşumunu uyardığı bilinmektedir. Bu çalışmada, heparin ilişkili sekonder osteoporoz oluşturulmuş ratlarda, darbeli elektromanyetik alan uygulamasının kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine etkilerinin histomorfometrik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Prospektif, randomize, tek kör çalışmada 12 aylık Sprague-Dawley cinsi erkek ratlar; heparin + PEMF grubu, heparin grubu ve kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Heparin + PEMF grubu ve heparin grubu ratlara 33 gün boyunca 2 IU/g heparin verilerek osteoporoz oluşturuldu. 35. günde tüm ratların sağ femur kemiklerinde 3mm'lik defektler açıldı. Heparin + PEMF grubunda operasyonu takip eden 28 gün boyunca hergün 1 saat, ortalama 0.8 mT şiddetinde ve 7.3 Hz frekansında darbeli elektromanyetik alan uygulaması yapıldı. Kemik iyileşmesi 4. haftanın sonunda histomorfometrik ve biyokimyasal analizlerle değerlendirildi.

Histomorfometrik değerlendirmede en yüksek yeni kemik alanı heparin + PEMF grubunda tesbit edilmiştir. Heparin + PEMF grubunun yeni kemik oluşum alanı, heparin grubundan yüksektir ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p=0,002$). Biyokimyasal değerlendirmede gruplar arasında 63. günde CTx değerlerinin ortalaması heparin + PEMF grubunda en düşüktür ve bu fark istatistik olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Bu çalışmanın sonuçları, heparin verilmesinin kemik kaybı ve osteoporozu yol açtığını ve darbeli elektromanyetik alan uygulamasının bu olumsuz etkiyi azaltmada yardımcı olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, Heparin, Darbeli Elektromanyetik Alan, Defekt, Kemik İyileşmesi

ABSTRACT

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF PULSED
ELECTROMAGNETIC FIELD THERAPIES ON BONE DEFECT HEALING
IN HEPARINIZED RATS**

Osteoporosis is a systemic skeletal disorder and as a result of low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue, characterised by increased bone fragility and the likelihood of sustaining fractures. Heparin, which is used as an anticoagulant, is known to result in bone loss and osteoporosis. Many different methods have been discussed in the literature to accelerate bone recovery. As a non-interventional mode of therapy associated with low complication rates, pulsed electromagnetic field therapy is known to stimulate bone formation. The aim of the present study was to evaluate the histomorphometric and biochemical effects of pulsed electromagnetic field therapy on the healing of bone defects in rats with heparin-induced bone defects.

In this prospective, randomized, single-blind study, 12-month-old Sprague-Dawley male rats were divided into three groups as heparin + PEMF group, heparin group, and the control group. In order to produce osteoporosis, the rats in the heparin + PEMF and the heparin group received heparin 2 IU/G for 33 days. At day 35, a 3-mm defect was created in the right femur of the rats. The rats in heparin + PEMF group received pulsed electromagnetic field therapy at 0.8 mT and 7.3 Hz frequency 1 hour/day for the subsequent 28 days. At the end of the 4th week, bone healing was evaluated using histomorphometric and biochemical analyses.

Histomorphometric assessment revealed that the rats in heparin + PEMF group had the highest level of new bone. The level of new bone was higher in the heparin + PEMF group compared with the heparin group, and the difference was statistically significant ($p=0.002$). In biochemical assessment, average CTx values at day 63 were lower in the heparin + PEMF group, and the difference was statistically significant ($p<0.05$).

The results of this study, showed that; the administration of heparin has been lead to bone loss and osteoporosis and the pulsed electromagnetic field therapy has been usefull to reduce this negative effect

Key Words: Osteoporosis, Heparin, Pulsed electromagnetic field, Defect, Bone Healing

8. KAYNAKLAR

1. Avşar G, Kaşıkçı M. Subkütan heparin enjeksiyonlarında ekimoz, hematoma ve ağrıyı önlemek için nelere dikkat edilmeli. İstanbul Üniversitesi Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi 2012; 20(3): 239-246.
2. Yurdsever E, Kalkan İ, Tuna S, Coşkun M, Konuksal C, Keskin N. Hemodiyaliz hastalarında standart heparin yerine düşük molekül ağırlıklı heparin (deltaparin) kullanımının serum lipid profiline etkisi. İstanbul Tıp Dergisi 2000; 1: 13-17.
3. Şendir M. Antikoagülan tedavi uygulanan nöroşirurji hastalarında bakım. Florence Nightingale Hemşirelik Dergisi 2008; 16(62): 129-135.
4. Rajgopal R, Butcher M, Weitz JI, Shaughnessy SG. Heparin synergistically enhances interleukin-11 signaling through up-regulation of the MAPK pathway. Journal of Biological Chemistry 2006; 281(30): 20780-20787.
5. Akkaş N, Yeni Y, Turan B, Delibaşı E, Günel U. Effect of medication on biomechanical properties of rabbit bones: heparin induced osteoporosis. Clinical Rheumatology 1997; 16(6): 585-595.
6. Ariyoshi W, Takahashi T, Kanno T, Ichimiya H, Shinmyozu K, Takano H, Koseki T, Nishihara T. Heparin inhibits osteoclastic differentiation and function. Journal of Cellular Biochemistry 2008; 103(6): 1707-1717.
7. Feridun Ç, Kömürcü M. Ortopedide kırıkların tedavisinde bazı güncel sorunlar. Dirim 2005; 3(1): 89-94.
8. Leisner S, Shahar R, Aizenberg I, Lichovsky D, Levin-Harrus T. The effect of short-duration, high-intensity electromagnetic pulses on fresh ulnar fractures in rats. Journal of Veterinary Medicine Series A 2002; 49(1): 33-37.
9. Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. Bioelectromagnetics 2002; 23(5): 398-405.
10. Chang WH, Jimmy K, Sun J. Bone defect healing enhanced by pulsed electromagnetic fields stimulation: in vitro bone organ culture model. Journal of Medical and Biological Engineering 2005; 25: 27-32.
11. Matsunaga S, Sakou T, Ijiri K. Osteogenesis by pulsing electromagnetic fields (PEMFs): optimum stimulation setting. In Vivo 1996; 10(3): 351-356.

12. Chang K, Chang W. Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: A prostaglandin E2-associated process. *Bioelectromagnetics* 2003; 24(3): 189-198.
13. Huang L, Wang W, Xiao D, Yang L, Lei Z, He C. Effect of pulsed electromagnetic fields of different treatment time on bone mineral density of femur in ovariectomized rats. *Journal of Reparative and Reconstructive Surgery* 2008; 22(5): 548-550.
14. Fredericks DC, Nepola JV, Baker JT, Abbott J, Simon B. Effects of pulsed electromagnetic fields on bone healing in a rabbit tibial osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Trauma* 2000; 14(2): 93-100.
15. Van der Jagt OP, Van der Linden JC, Waarsing JH, Verhaar JA, Weinans H. Systemic treatment with pulsed electromagnetic fields do not affect bone microarchitecture in osteoporotic rats. *International Orthopaedics* 2012; 36(7): 1501-1506.
16. Jing D, Cai J, Wu Y, Shen G, Zhai M, Tong S, Xu Q, Xie K, Wu X, Tang C. Moderate intensity rotating magnetic fields do not affect bone quality and bone remodeling in hindlimb suspended rats. *PloS one* 2014; 9(7): 1-11.
17. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji* 8. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi, 1998, s. 132-151.
18. Öber A, İzzetoğlu GT. *Histoloji 1*. Baskı, Ankara: Nobel Basımevi, 2006, s.11-123
19. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Atlas and Text of Histology* 2 nd edn, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 1-250.
20. Soydan N. *Genel Histoloji*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi; 1985, s. 1-189.
21. Garant PR, Garant PR. *Oral cells and tissues* 1st edn. Kanada: Quintessence Publishing Company, 2003, p. 1-400.
22. Marx RE. *Oral and Intravenous Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws*. Illinois: Quintessence Publishing Company, 200, p. 1-169.
23. Özer A. *Temel Histoloji*. İstanbul: Nobel Yayınevi, 2011, s. 1-352
24. Ovalle WK, Netter FH, Chovan J, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. *Netter Temel Histoloji*. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009, s. 1-486
25. Zhang X, Naik A, Xie C, Reynolds D, Palmer J, Lin A, Awad H, Guldberg R, Schwarz E, Keefe, R. Periosteal stem cells are essential for bone revitalization

- and repair. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions* 2005; 5(4): 360-362.
26. Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 2002; 30(3): 445-452.
 27. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy* 2006; 86(1): 77-91.
 28. Blair H, Zaidi M, Schlesinger P. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochemical Journal* 2002; 364: 329-341.
 29. Mihai R, Farndon JR. Parathyroid disease and calcium metabolism. *British Journal of Anaesthesia* 2000; 85(1): 29-43.
 30. Ackermann U. *PDQ Physiology*. Londra: PMPH-USA, 2002, p. 1-208.
 31. Marcus R. The nature of osteoporosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996; 81(1): 1-5.
 32. Cantürk Z. İlaça Bağlı Osteoporoz. İçinde: *Metabolik Kemik Hastalıkları*. Sözen T. Ankara: Miki Matbaacılık, 2013, s. 99-108.
 33. Graves DT, Alblowi J, Paglia DN, O'Connor JP, Lin S. Impact of diabetes on fracture healing. *Journal of Experimental & Clinical Medicine* 2011; 3(1): 3-8.
 34. Luppen C, Blake C, Ammirati K, Stevens M, Seeherman H, Wozney J, Bouxsein ML. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid treated rabbits. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002; 17(2): 301-310.
 35. Harder AT, An YH. The mechanisms of the inhibitory effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on bone healing. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 43(8): 807-815.
 36. Pereira RMR, Carvalho JFd, Canalis E. Glucocorticoid induced osteoporosis in rheumatic diseases. *Clinics* 2010; 65(11): 1197-1205.
 37. Gökkaya N, Kutsal YG. İlaça bağlı osteoporoz. *Türk Osteoporoz Dergisi* 2011; 17(1): 30-36.
 38. Sloan A, Hussain I, Maqsood M, Eremin O, El-Sheemy M. The effects of smoking on fracture healing. *The Surgeon* 2010; 8(2): 111-116.
 39. Muhonen A, Muhonen J, Lindholm TC, Minn H, Klossner J, Kulmala J, Happonen, RP. Osteodistraction of a previously irradiated mandible with or

without adjunctive hyperbaric oxygenation: an experimental study in rabbits. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2002; 31(5): 519-524.

40. Gürer N, Başak R, Bahadır C, Koç H, Nur H, Polat Y. Kemik mineral yoğunluğu ile kemik döngüsünün biyokimyasal göstergelerinin ilişkisi. *Türk Fiz Tıp Rehabilitasyon Dergisi* 2005; 51(2): 54-57.
41. Christenson R. Biochemical markers of bone metabolism. *Clinical Biochemistry* 1999; 30(8): 573-593.
42. Demir H. Osteoporoz Tanı ve Tedavisinde Biyokimyasal Markerler. *Turkiye Klinikleri Journal of Physical Medicine Rehabilitation Special Topics*. 2012;5(3):29-33.
43. Marx RE, Cillo Jr JE, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum CTX testing, prevention, and treatment. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007; 65(12): 2397-2410.
44. Okabe R, Nakatsuka K, Inaba M, Miki T, Naka H, Masaki H, et al. Clinical evaluation of the elecsys β -crosslaps serum assay, a new assay for degradation products of type I collagen C-telopeptides. *Clinical chemistry* 2001; 47(8): 1410-1414.
45. Hahn BH. Osteopenic bone diseases. In: *Arthritis and Allied Conditions A Textbook of Rheumatology*. McCarty DJ, Koopman WJ, Eds. 12th Ed., London: Lea & Febiger, 1993: p. 1933-1995.
46. Akyol Y, Durmuş D. Osteoporozun epidemiyolojisi ve sınıflandırılması. İçinde: *Romatoloji*. Arasil T, Editör. 1. Baskı Ankara: Rotatıp Kitabevi, 2011 s. 1915-1923.
47. Gambert SR, Schultz BM, Hamdy RC. Osteoporosis. Clinical features, prevention, and treatment. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 1995; 24(2): 317-371.
48. Bijlsma AY, Meskers CGM, Westendorp RGJ, Maier AB. Chronology of age-related disease definitions: osteoporosis and sarcopenia. *Ageing Research Reviews* 2012; 11(2): 320-324.
49. Reifenstein Jr EC, Albright F. The metabolic effects of steroid hormones in osteoporosis. *Journal of Clinical Investigation* 1947; 26(1): 24-56.
50. Thorn GW, Adams RD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, 1977, p. 2005-2025.

51. Kanis JA, Glüer CC. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. *Osteoporosis International* 2000; 11(3): 192-202.
52. Bouillon R, Burckhardt P, Christiansen C, Fleisch HA, Fujita T, Gennari C. Consensus development conference: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *American Journal of Medicine* 1991; 90: 107-110.
53. Bozkuş H, Canbulat N, Güven Ş, Özer AF, Çetinsarıoğlu A. Osteoporotik omurgaya multidisipliner yaklaşım. *Türk Nöroşirurji Dergisi* 2000; 10: 32-40.
54. Arasıl T, Sindel D. Osteoporoz. İstanbul: Merck Sharp & Dohme, 2002, s. 1-60.
55. Melikoğlu MA. Osteoporoz tanımlama ve sınıflaması. *Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Özel Dergisi* 2012; 5(3): 1-5.
56. Eskiuyurt N, Akyüz G. Genel bir değerlendirme. İçinde: Osteoporoz. Karaaslan GA. Ankara: MD Yayıncılık, 2002: s.1-22.
57. Matkovic V, Colachis SC, Ilich JZ. Osteoporosis: Its prevention and treatment. In: *Physical Medicine and Rehabilitation*. Braddom R, Buschbacher RM, Dumitru D, Eds. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996: p.851-876.
58. Kassem M. Cellular and molecular effects of growth hormone and estrogen on human bone cells. *Apmis* 1997; 105(71): 7-30.
59. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11(8): 1043-1051.
60. Prince RL, Dick IM, Lemmon J, Randell D. The pathogenesis of age related osteoporotic fracture: effects of dietary calcium deprivation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; 82(1): 260-264.
61. Atik OŞ. Osteoporoz. Ankara: Meteksan, 1998, s. 1-50.
62. Leidig-Bruckner G, Raue F, Frank-Raue K. Secondary osteoporosis relevant clinical characteristics in diagnosis and therapy. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 2012; 137(7): 326-332.
63. Bhalla AK. Management of osteoporosis in a pre-menopausal woman. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 2010; 24(3): 313-327.
64. Kelepouris N, Harper KD, Gannon F, Kaplan FS, Haddad JG. Severe osteoporosis in men. *Annals of internal medicine* 1995; 123(6): 452-460.
65. Özkocaman V. Antikoagülan kullanım ilkeleri. *Türkiye Klinikleri Journal of Hematology Special Topics* 2011; 4(2): 100-105.

66. Owen CA. A History Of Blood Coagulation. Rochester, Minnesota: Mayo Foundation for Medical Education and Research, 2001, p.75-150.
67. Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. Chest Journal 2001; 119(1): 64-94.
68. Avioli LV. Heparin induced osteopenia: an appraisal. Advances in Experimental Medicine and Biology 1975; 52: 375-387.
69. Mazanec DJ, Grisanti JM. Drug induced osteoporosis. Cleveland Clinic Journal of Medicine 1989; 56(3): 297-303.
70. Kartal B, Başer M. Yaşam kalitesini etkileyen kadın sağlığı sorunları. Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics 2011; 21(3): 195-200.
71. Kocabaş H, Tuncer T. Osteoporoz epidemiyolojisi. Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Özel Dergisi 2009; 2(1): 1-8.
72. World Healthy Organization. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO study group. World Health Organ Tech Rep Ser 1994; 1994(843): p.1-129.
73. Tural Ş, Kara N, Alaylı G. Osteoporoz genetiği. Türk Osteoporoz Dergisi 2011; 17(3): 100-109.
74. Taşkale MG, Sermez Y. Osteoporosis and its relationship with various risk factors in postmenopausal women in Denizli province. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 2010; 30(6): 1958-1964.
75. Kutlu R, Çivi S, Pamuk G. Postmenopozal kadınlarda osteoporoz sıklığı ve fraxtm skalası kullanılarak 10 yıllık kırık riskinin hesaplanması. Türk Fiz Tıp Rehab Derg 2012; 58: 126-135.
76. Arasıl T. Osteoporoz epidemiyolojisi ve türkiye verileri. Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Özel Dergisi 2012; 5(3): 6-10.
77. Özkan B, Döneray H. Çocuklarda Osteoporoz. Güncel Pediatri 2006; 2: 1-7.
78. Clarke B, Khosla S. Physiology of bone loss. Radiologic Clinics of North America 2010; 48(3): 483-495.
79. Aubin J, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. Osteoporosis international 2000; 11(11): 905-913.

80. Nesrin Ş, Tuncer T. Osteoporoz patofizyolojisi. Türkiye Klinikleri Journal of Physical Medicine Rehabilitation Special Topics 2012; 5(3): 11-6.
81. Michael H, Härkönen PL, Väänänen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. Journal of Bone and Mineral Research 2005; 20(12): 2224-2232.
82. Khosla S, Melton III LJ, Achenbach SJ, Oberg AL, Riggs BL. Hormonal and biochemical determinants of trabecular microstructure at the ultradistal radius in women and men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2006; 91(3): 885-891.
83. Chitre M, Hayes W. 3 year results of a member and physician intervention to reduce risk associated with glucocorticoid induced osteoporosis in a health plan. Journal of Managed Care Pharmacy 2008; 14(3): 281-290.
84. Tanakol R. Fizyopatolojik etmenler. İçinde: Osteoporozda Kemik Kalitesi. Kutsal YG, Editör. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004: s. 3-70.
85. Akgün K. Erkek osteoporozu. Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Özel Dergisi 2012; 5(3): 66-72.
86. Adams JE. Dual energy X-ray absorptiometry. In: Osteoporosis and Bone Densitometry Measurements. Grampp S, Eds. New York: Springer, 2013: p. 101-122.
87. Erdem HR. Osteoporozda tanı yöntemleri. Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Özel Dergisi 2012; 5(3): 34-42.
88. Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. Medical and pediatric oncology 2003; 41(3): 182-185.
89. Recker RR. Bone remodelling findings in osteoporosis. In: Osteoporosis. Marcus R, Feldman D, Kelsey J, Eds. Orlando: Academic Press, 1996: p.703-713. .
90. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. The Journal of clinical investigation 2005; 115(12): 3318-325.
91. Lane JM. Osteoporosis: Medical prevention and treatment. Spine 1997; 22(24): 32-7.
92. Kostenuik PJ, Capparelli C, Morony S, Adamu S, Shimamoto G, Shen V, et al. OPG and PTH-(1-34) have additive effects on bone density and mechanical

- strength in osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology* 2001; 142(10): 4295-4304.
93. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine* 2000; 21(2): 115-137.
 94. Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD. Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1996; 11(3): 337-349.
 95. White SC, Rudolph DJ. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1999; 88(5): 628-635.
 96. Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi K. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clinical oral implants research* 2001; 12(6): 604-608.
 97. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *Journal of bone and mineral metabolism* 2003; 21(6): 388-395.
 98. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Diseases* 2003; 9(1): 24-28.
 99. Cao T, Shirota T, Ohno K, Michi KI. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. *Journal of Periodontal Research*. 2004; 39(1): 37-41.
 100. Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2003; 95(4): 495-502.
 101. Yang J, Pham SM, Crabbe DL. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofac Radiol* 2003; 32(4): 247-251.
 102. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *Journal of Dentistry* 2005; 33(2): 123-129.
 103. Markov MS. Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2007; 26(3): 257-274.

104. Andrew C, Bassett L, Pawluk RJ, Pilla AA. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science* 1974; 184(4136): 575-577.
105. Beyazova M, Gökçe Kutsal Y. *Fiziksel Tıp Ve Rehabilitasyon*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2011, s.1549-1576.
106. Bueche F, Wallach DL. *Technical Physics*, New York: Wiley, 1994, p. 15-60.
107. Shupak NM, Prato FS, Thomas AW. Therapeutic uses of pulsed magnetic field exposure. *Radio Science Bulletin* 2003; 307: 9-32.
108. Ciombor DM, Aaron RK. The role of electrical stimulation in bone repair. *Foot and Ankle Clinics* 2005; 10(4): 579-593.
109. Rubin CT, Mcleod KJ, Lanyon LE. Prevention of osteoporosis by pulsed electromagnetic fields. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 1989; 71(3): 411-417.
110. Bassett CA. Fundamental and practical aspects of therapeutic uses of pulsed electromagnetic fields. *Crit Rev Biomed Eng* 1989; 17(5): 451-529.
111. Huang LQ, He HC, He CQ, Chen J, Yang L. Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *Chinese Medical Journal* 2008; 121(20): 2095-2099.
112. Çankaya AB, Erdem MA, Okhan O, Yaltrık M, Kasapoğlu Ç, Oral CK. Elektromanyetik alanın kemik defektleri üzerine etkileri. *Journal of İstanbul University Faculty of Dentistry* 2007; 41(3): 17-23.
113. Eriksson C. Electrical properties of bone. *The Biochemistry and Physiology of Bone*. 2012; 4: 329-384.
114. Büyükönder H. Kemik ve elektrik. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 1985; 11(1): 83-95.
115. Spadaro JA, Bergstrom WH. In vivo and in vitro effects of a pulsed electromagnetic field on net calcium flux in rat calvarial bone. *Calcified tissue international* 2002; 70(6): 496-502.
116. Aslan A. Düşük ve yüksek frekans elektromanyetik alanların kırık iyileşmesine etkileri. *Kafkas J Med Sci* 2012; 2(2): 34-42.
117. Yıldız M, Çicek E, Çerci SS, Çerci C, Oral B, Koyu A. Influence of electromagnetic fields and protective effect of CAPE on bone mineral density in rats. *Archives of Medical Research* 2006; 37(7): 818-821.

118. Ryaby JT. Clinical effects of electromagnetic and electric fields on fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1998; 355: 205-215.
119. Akpolat V. Oldukça Düşük frekanslı manyetik alan ve mangan'ın kemik mineral içeriği ve yoğunluğu üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 2008; 35(4): 240-244.
120. Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, Jacobson BS. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 1988; 134(1): 37-46.
121. Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, Chang WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *Journal of Orthopaedic Research* 2009; 27(9): 1169-1174.
122. Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, Barabino G, Chaudhri R, Boyan BD. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research* 2008; 26(9): 1250-1255.
123. Sun LY, Hsieh DK, Yu TC, Chiu HT, Lu SF, Luo GH, et al. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* 2009; 30(4): 251-260.
124. Güneli E, Ateş M, Gümüştekin M. Deneysel hayvan araştırmalarının planlamasında dikkat edilecek hususlar. Ankara: Matris Tanıtım Baskı Hizmetleri; 2012, s. 1-138.
125. Dikensoy Ö. Neden deneysel araştırmalar. *Türk Toraks Derg* 2013; 14(2): 3-5.
126. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative medicine* 2008; 58(5): 424-430.
127. Turner AS. Animal models of osteoporosis necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001; 1: 66-81.
128. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, et al. Sex specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone* 2009; 45(6): 1065-1072.
129. Akpolat V, Çelik MS, Çelik Y, Akdeniz N, Özerdem MS. Treatment of osteoporosis by long term magnetic field with extremely low frequency in rats. *Gynecological Endocrinology* 2009; 25(8): 524-529.

130. Develiođlu H. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi 2003; 6(1): 60-63.
131. Granström G, Nilsson LP. Experimental mandibular fracture: studies on bone repair and remodellation. Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery 1987; 21(2): 159-165.
132. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. International Journal of Developmental Biology 1995; 39: 881-894.
133. Shen WW, Zhao JH. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. Bioelectromagnetics 2010; 31(2): 113-119.
134. Erpek S, Bilgin MD, Kacar F. Elektromanyetik alanın (50 Hz, 6 mT) sıçan karaciğer ve böbreğine etkileri. Adnan Menderes University Tıp Fak Derg 2007; 8: 5-11.
135. Gonzalez Riola J, Pamies JA, Hernandez ER, Revilla M, Seco C, Villa LF. Influence of electromagnetic fields on bone mass and growth in developing rats: a morphometric, densitometric, and histomorphometric study. Calcified Tissue International 1997; 60(6): 533-537.
136. Öztuna V. Ortopedi ve Travmatolojide kullanılan deneysel hayvan modelleri (temel ilkeler, etik unsurlar ve modeller). Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi. 2007; 6(1-2): 47-55.
137. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1986; 205: 299-308.
138. Mills LA, Simpson AH. In vivo models of bone repair. Journal of Bone & Joint Surgery 2012; 94(7): 865-874.
139. Komatsu DE, Brune KA, Liu H, Schmidt AL, Han B, Zeng QQ. Longitudinal in vivo analysis of the region specific efficacy of parathyroid hormone in a rat cortical defect model. Endocrinology 2009; 150(4): 1570-1579.
140. Fındık Y, Baykul T. Effects of low intensity pulsed ultrasound on autogenous bone graft healing. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology 2012; 117(3): 255-260.
141. şimşek HO, Tüzüm Mř, Baykul T, Gürer İE, Başsorgun Cİ. Experimental investigation of the effects of a blood stopper agent (ankaferd blood stopper) on bone surfaces. Turkish Journal of Hematology 2013; 30(2): 177-183.

142. Alaei F, Virk MS, Tang H, Sugiyama O, Adams DJ, Stolina M, et al. Evaluation of the effects of systemic treatment with a sclerostin neutralizing antibody on bone repair in a rat femoral defect model. *Journal of Orthopaedic Research* 2014; 32(2): 197-203.
143. An YH, Freidman RJ. *Animal Models In Orthopaedic Research*. Boca Raton: CRC Pres, 1999, p. 1-624.
144. Lieberman JR, Friedlaender GE. *Bone Regeneration And Repair*. Totowa: Humana Press Inc, 2005 p. 551-555.
145. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 2005; 20(10): 1715-1722.
146. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Lin JH, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 2001; 28(1): 80-86.
147. Ejiri S, Toyooka E, Tanaka M, Anwar RB, Kohno S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Archives of Oral Biology* 2006; 51(11): 941-950.
148. Libouban H, Moreau MF, Legrand E, Baslé MF, Audran M, Chappard D. Comparison insight dual X-ray absorptiometry (DXA), histomorphometry, ash weight, and morphometric indices for bone evaluation in an animal model (the orchidectomized rat) of male osteoporosis. *Calcified Tissue International* 2001; 68(1): 31-37.
149. Kulak CAM, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2010; 54(2): 87-98.
150. Kanat E, Çelen H, Yıldırım M, Dıraz N, Alp A, Yurtkuran M. Primer Osteoporoz hastalarında demografik veriler, biyokimyasal ölçümler, dxa değerleri ve kırık arasındaki ilişki. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2008; 34(1): 27-30.
151. Beikler T, Flemmig TF. Implants in the medically compromised patient. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2003; 14(4): 305-316.
152. Wowern Nv, Klausen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *Journal of Periodontology* 1994; 65(12): 1134-1138.

153. von Wowern N, Kollerup G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1992; 67(5): 656-660.
154. Hildebrand H, Ehrenfeld M, Schneider F, Goerlich R, Goerlich H, Spitz J, Wolf J, Delling G. Possibilities for preoperative determination of transplant quality using an osteoporosis index. *Fortschritte der Kiefer und Gesichtschirurgie*. 1994; 39: 34-39.
155. Schliephake H, Neukam FW, Wichmann M. Survival analysis of endosseous implants in bone grafts used for the treatment of severe alveolar ridge atrophy. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1997; 55(11): 1227-1233.
156. Blomqvist JE, Alberius P, Isaksson S, Linde A, Hansson BG. Factors in implant integration failure after bone grafting: an osteometric and endocrinologic matched analysis. *International journal of oral and maxillofacial surgery* 1996; 25(1): 63-68.
157. Toffler M. Osteotome mediated sinus floor elevation: a clinical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2003; 19(2): 266-273.
158. Erdoğan Ö, Shafer DM, Taxel P, Freilich MA. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007; 104(6): 738. e1-13.
159. Werning JW, Downey NM, Brinker RA, Khuder SA, Davis WJ, Rubin AM, et al. The impact of osteoporosis on patients with maxillofacial trauma. *Archives of Otolaryngology Head & Neck Surgery* 2004; 130(3): 353-356.
160. Moy PK, Medina D, Shetty V, Aghaloo TL. Dental implant failure rates and associated risk factors. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2004; 20(4): 569-577.
161. Öncel S. Sekonder osteoporoz. *Türkiye Klinikleri Journal of Physical Medicine Rehabilitation Special Topics* 2012; 5(3): 49-55.
162. Simon RR, Shaughnessy SG. Effects of anticoagulants on bone. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2004; 2(2): 151-158.
163. Shaughnessy SG, Hirsh J, Bhandari M, Muir JM, Young E, Weitz JI. A histomorphometric evaluation of heparin induced bone loss after discontinuation of heparin treatment in rats. *Blood* 1999; 93(4): 1231-1236.

164. Muir JM, Hirsh J, Weitz JI, Andrew M, Young E, Shaughnessy SG. A histomorphometric comparison of the effects of heparin and low molecular weight heparin on cancellous bone in rats. *Blood* 1997; 89(9): 3236-3242.
165. Muir JM, Andrew M, Hirsh J, Weitz J, Young E, Deschamps P, Shaughnessy SG. Histomorphometric analysis of the effects of standard heparin on trabecular bone in vivo. *Blood* 1996; 88(4): 1314-1320.
166. Mazziotti G, Canalis E, Giustina A. Drug induced osteoporosis: mechanisms and clinical implications. *The American Journal of Medicine* 2010; 123(10): 877-884.
167. Jiao X, Billings PC, O'Connell MP, Kaplan FS, Shore EM, Glaser DL. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) modulate BMP2 osteogenic bioactivity in C2C12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(2): 1080-1086.
168. Folwarczna J, Sliwinski L, Janiec W, Pikul M. Effects of standard heparin and low molecular weight heparins on the formation of murine osteoclasts in vitro. *Pharmacol Rep* 2005; 57(5): 635-645.
169. Monreal M, Vinas L, Monreal L, Lavin S, Lafoz E, Angles AM. Heparin related osteoporosis in rats. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 1990; 20(4): 204-207.
170. Mätzsch T, Bergqvist D, Hedner U, Nilsson B, Ostergaard P. Heparin induced osteoporosis in rats. *Thrombosis and haemostasis* 1986; 56(3): 293-294.
171. Murray W, Lindo V, Kakkar V, Melissari E. Long term administration of heparin and heparin fractions and osteoporosis in experimental animals. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 1995; 6(2): 113-118.
172. Kock H, Handschin A. Osteoblast growth inhibition by unfractionated heparin and by low molecular weight heparins: an in-vitro investigation. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 2002; 8(3): 251-255.
173. Miyazaki T, Miyauchi S, Tawada A, Anada T, Matsuzaka S, Suzuki O. Oversulfated chondroitin sulfate-E binds to BMP-4 and enhances osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 2008; 217(3): 769-777.
174. Kanzaki S, Ariyoshi W, Takahashi T, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Nakashima K, Tsujisawa T, Nishihara T. Dual effects of heparin on BMP-2 induced osteogenic activity in MC3T3-E1 cells. *Pharmacological Reports* 2011; 63(5): 1222-1230.

175. Simann M, Schneider V, Le Blanc S, Dotterweich J, Zehe V, Krug M, et al. Heparin affects human bone marrow stromal cell fate: Promoting osteogenic and reducing adipogenic differentiation and conversion. *Bone* 2015; 78: 102-113.
176. Folwarczna J, Janiec W, Sliwinski L. Effects of heparin and low-molecular-weight heparins on bone mechanical properties in rats. *Thrombosis And Haemostasis*. 2004; 92: 940-946.
177. Mutoh S, Takeshita N, Yoshino T, Yamaguchi I. Characterization of heparin induced osteopenia in rats. *Endocrinology* 1993; 133(6): 2743-2748.
178. Jing D, Cai J, Wu Y, Shen G, Li F, Xu Q, Xie K, Tang C, Liu J, Guo W, Wu X, Jiang M, Luo E. Pulsed electromagnetic fields partially preserve bone mass, microarchitecture, and strength by promoting bone formation in hindlimb suspended rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 2014; 29(10): 2250-2261.
179. Lim K, Hexiu J, Kim J, Seonwoo H, Cho WJ, Choung PH, Chung JH. Effects of electromagnetic fields on osteogenesis of human alveolar bone derived mesenchymal stem cells. *BioMed Research International* 2013; 1-14.
180. Petecchia L, Sbrana F, Utzeri R, Vercellino M, Usai C, Visai L, Vassalli M, Gavazzo P. Electro-magnetic field promotes osteogenic differentiation of BM-hMSCs through a selective action on Ca²⁺-related mechanisms. *Scientific reports* 2015; 5:13856: 1-13.
181. De Mattei M, Caruso A, Traina GC, Pezzetti F, Baroni T, Sollazzo V. Correlation between pulsed electromagnetic fields exposure time and cell proliferation increase in human osteosarcoma cell lines and human normal osteoblast cells in vitro. *Bioelectromagnetics* 1999; 20(3): 177-182.
182. Lin CC, Lin RW, Chang CW, Wang GJ, Lai KA. Single-pulsed electromagnetic field therapy increases osteogenic differentiation through Wnt signaling pathway and sclerostin downregulation. *Bioelectromagnetics*. 2015; 36(7): 494-505.
183. Jing D, Li F, Jiang M, Cai J, Wu Y, Xie K, Wu X, Tang C, Liu J, Guo W, Shen G, Luo E. Pulsed electromagnetic fields improve bone microstructure and strength in ovariectomized rats through a Wnt/Lrp5/ β -catenin signaling-associated mechanism. *PloS One* 2013; 8(11): 1-9.
184. Wang Y, Zhang W. The Effect of pulsed electromagnetic field on the bone volume of human being. *Procedia Technology* 2015; 20(2015): 66-71.

185. Patterson TE, Sakai Y, Grabiner MD, Ibiwoye M, Midura RJ, Zborowski M, Wolfman A. Exposure of murine cells to pulsed electromagnetic fields rapidly activates the mTOR signaling pathway. *Bioelectromagnetics* 2006; 27(7): 535-544.
186. Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov A, Jefcoat SC, Partridge NC. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. *Journal of Orthopaedic Research* 2007; 25(9): 1213-1220.
187. Chalidis B, Sachinis N, Assiotis A, Maccauro G, Graziani F. Stimulation of bone formation and fracture healing with pulsed electromagnetic fields: biologic responses and clinical implications. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2011; 24(1): 17-20.
188. Li JK-J, Lin JC-A, Liu HC, Chang WH-S. Cytokine release from osteoblasts in response to different intensities of pulsed electromagnetic field stimulation. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2007; 26(3): 153-165.
189. Aaron RK, Wang S, Ciombor DM. Upregulation of basal TGF β 1 levels by EMF coincident with chondrogenesis implications for skeletal repair and tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research* 2002; 20(2): 233-240.
190. Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2004; 419: 30-37.
191. Chang WHS, Chen LT, Sun JS, Lin FH. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics*. 2004; 25(6): 457-65.
192. Sollazzo V, Palmieri A, Pezzetti F, Massari L, Carinci F. Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblastlike cells (MG-63): a pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2010; 468(8): 2260-2277.
193. Tsai MT, Chang WHS, Chang K, Hou RJ, Wu TW. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. *Bioelectromagnetics* 2007; 28(7): 519-528.
194. Taylor KF, Inoue N, Rafiee B, Tis JE, McHale KA, Chao E. Effect of pulsed electromagnetic fields on maturation of regenerate bone in a rabbit limb lengthening model. *Journal of Orthopaedic Research* 2006; 24(1): 2-10.
195. Markov MS. Pulsed electromagnetic field therapy history, state of the art and future. *The Environmentalist* 2007; 27(4): 465-475.

196. McLeod KJ, Rubin CT. The effect of low-frequency electrical fields on osteogenesis. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 1992; 74(6): 920-929.
197. Otter MW, McLeod KJ, Rubin CT. Effects of electromagnetic fields in experimental fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1998; 355: 90-104.
198. Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, Harrison BS. The effect of low frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Research* 2015; 15(1): 96-108.
199. Li J, Chang WHS, Jan HW, Ruaan RC, Liu HC, Sun JS. Optimum parameters of specific 7.5 Hz single pulsed electromagnetic field stimulation on osteoblast growth. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2003; 22(2-3): 87-101.
200. Chang K, Chang WH-S, Tsai M-T, Shih C. Pulsed electromagnetic fields accelerate apoptotic rate in osteoclasts. *Connective Tissue Research* 2006; 47(4): 222-228.
201. Kang KS, Hong JM, Kang JA, Rhie J-W, Jeong YH, Cho D-W. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Experimental & Molecular Medicine* 2013; 45(1): 1-9.
202. Zhong C, Zhang X, Xu Z, He R. Effects of low intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells. *Physical Therapy*. 2012; 92(9): 1208-1219.
203. Matsumoto H, Ochi M, Abiko Y, Hirose Y, Kaku T, Sakaguchi K. Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. *Clinical Oral Implants Research* 2000; 11(4): 354-360.
204. Barak S, Neuman M, Iezzi G, Piattelli A, Perrotti V, Gabet Y. A new device for improving dental implants anchorage: a histological and micro computed tomography study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research* 2015; 0: 1-8.
205. Jing D, Shen G, Huang J, Xie K, Cai J, Xu Q, Wu X, Luo E. Circadian rhythm affects the preventive role of pulsed electromagnetic fields on ovariectomy induced osteoporosis in rats. *Bone* 2010; 46(2): 487-495.
206. Inoue N, Ohnishi I, Chen D, Deitz LW, Schwardt JD, Chao E. Effect of pulsed electromagnetic fields (PEMF) on late-phase osteotomy gap healing in a canine tibial model. *Journal of Orthopaedic Research* 2002; 20(5): 1106-1114.

207. Erdem MA. Kemik defektlerinde elektromanyetik alanın ıyileşme üzerine biyokimyasal ve histopatolojik etkilerinin deneysel olarak araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul,(Prof. Dr. Çetin Kasapoğlu), İstanbul, 2006, 1-119.
208. Fredericks DC, Piehl DJ, Baker JT, Abbott J, Nepola JV. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on distraction osteogenesis in the rabbit tibial leg lengthening model. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 2003; 23(4): 478-483.
209. Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, Sakai Y, Doehring T, Grabiner MD, Patterson TE, Zborowski M, Wolfman A. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *Journal of orthopaedic research* 2005; 23(5): 1035-1046.
210. Canè V, Botti P, Soana S. Pulsed magnetic fields improve osteoblast activity during the repair of an experimental osseous defect. *Journal of Orthopaedic Research*. 1993; 11(5): 664-670.
211. Hwang KG, Lee JH, Kim MJ, Shim KS, Kim JW. A study of effect of pulsed electromagnetic fields on osteogenesis in rabbit cranial bone defect. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2002; 28(4): 264-273.
212. Darendeliler MA, Darendeliler A, Sinclair PM. Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. *The International Journal of Adult Orthodontics and Orthognathic Surgery* 1997; 12(1): 43-53.
213. Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Sakuda M. Effect of a pulsing electromagnetic field on demineralized bone-matrix-induced bone formation in a bony defect in the premaxilla of rats. *Journal of Dental Research* 1992; 71(12): 1920-1925.
214. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta*. 2001; 313(1): 95-105.
215. Eraslan G, Bilgili A, Eşsiz D, Saltaş H. The effects of an electromagnetic field (90 hz and 5 mt) on some blood electrolyte levels in male mice. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2002; 26(6): 1233-1236.
216. Schober A, Yanik M, Fischer G. Electrolytic changes in the white mouse under the influence of weak magnetic fields. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg B* 1982; 176(4): 305-315.

217. Hanafy E, Elhafez S, Aly F, Elazhary M. Loss of bone calcium in exposure to 50 Hz magnetic fields. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2008; 27(4): 402-408.
218. Seyhan N, Canseven A. In vivo effects of ELF MFs on collagen synthesis, free radical processes, natural antioxidant system, respiratory burst system, immune system activities, and electrolytes in the skin, plasma, spleen, lung, kidney, and brain tissues. *Electromagnetic Biology and Medicine* 2006; 25(4): 291-305.
219. Sert C, Mustafa D, Düz MZ, Akşen F, Kaya A. The preventive effect on bone loss of 50-Hz, 1mT electromagnetic field in ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2002; 20(6): 345-349.
220. Meller Y, Kestenbaum R, Mozes M, Mozes G, Yagil R, Shany S. Mineral and endocrine metabolism during fracture healing in dogs. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1984; 187: 294-295.
221. Meller Y, Shainkin-Kestenbaum R, Shany S, Zuilli I, Yankowitz N, Giat J, Konforti A, Torok G. Parathyroid hormone, calcitonin, and vitamin d metabolites during normal fracture healing in humans. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1984; 183: 238-245.
222. Rao TM, Lakshmi pathi G, Sastry T, Ramakrishna O. Biochemical changes following ulnar segmental defect repair with fibrillar collagen-hydroxyapatite, and porous hydroxyapatite implants in canines. *Indian Journal of Animal Research* 2001; 35(2): 112-115.
223. Suryawanshi S, Maiti S, Singh G. A comparative study of two different fixation techniques in the management of tibial metaphyseal fracture in dogs. *Journal of Applied Animal Research* 2001; 20(1): 89-98.
224. Shakya G, Zama M, Aithal H, John R, Baghel M. Biochemical changes following electroacupuncture and static magnetic field therapy in rabbits for bone defect healing. *Veterinary World* 2014; 7(2): 83-6.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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 haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan

Olgun Topal

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

İmza

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad:	Olgun	Soyad:	Topal
Doğum Yeri:	Muğla	Doğum Tarihi:	27 Temmuz 1986
Uyruğu	27 Temmuz 1986	Tel:	05056535211
E-Posta Adresi	dtolguntopal@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2010
Lise	Muğla Anadolu Lisesi	2005
İlköğretim	Emirbeyazıt İlköğretim Okulu	2001

İş Deneyimi

	Kurum	Süre
Diş Hekimi	Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (Geçici Görevlendirme)	2012-2016

Yabancı Diller

	ÜDS
İngilizce	82,5 (2010)

Yayınlar

Uluslararası kongre, sempozyum, panel, kurs (workshop) gibi bilimsel toplantılarda sunularak programda yer alan özet metin olarak yayımlanan bildiriler

1. Müge Çına Aksoy, Olgun Topal, Hatice Varol Özkavak, Duygu Kumbul Doğuç, Azime Aslıhan İlhan, Selçuk Çömlekçi. Erkek Ratlarda Heparinin İndüklediği Osteoporozda Darbeli Elektromanyetik Alanın Kemik Mineral Yoğunluğu, Biyomekanik Özellikler ve RANK / RANKL / OPG Üzerine Etkileri. 2016 TAOMS Bodrum (Sözlü Bildiri)
2. Müge Çına Aksoy, Olgun Topal. Distraction Osteogenesis in Trauma Patient: A case report. 2016 AÇBİD Antalya
3. Yavuz Fındık, Timuçin Baykul, Mustafa Asım Aydın, Olgun Topal. Segmental Le Fort I Osteotomy For Closing Wide Alveolar Cleft. 2016 AÇBİD Antalya
4. Olgun Topal, Seden Sert Zayıf, İlter İlhan, Müge Çına Aksoy, Duygu Kumbul Doğuç. The Effect Of Pulsed Electromagnetic Field Application On Oxidative Stress İn Osteoporosis Model İnduced By Heparin. 6 th World Congress of Oxidative Stress, Calcium Signaling and TRP Channels. 24-27 May 2016 Isparta
5. Olgun Topal, Müge Çına Aksoy, İbrahim Metin Ciriş, Duygu Kumbul Doğuç, Selçuk Çömlekçi. Evaluation of The Effects of Pulsed Electromagnetic Field Therapies on Bone Defect Healing in Heparinized rats. 2015 AÇBİD Antalya
6. Yavuz Fındık, Olgun Topal. Maxillar Adenomatoid Odontogenic Tumor: A Case Report. 2015 AÇBİD Antalya
7. Yavuz Fındık, Timuçin Baykul, Olgun Topal. Use of Distraction Osteogenesis in Cleft Palate and Trauma Patients. 2015 AÇBİD Antalya
8. Yavuz Fındık, Timuçin Baykul, Olgun Topal, Esra Bolat. Use of Custom Made Mandibular Midline Distractor for Width Discrepancies of The Mandible. 2015 AÇBİD Antalya
9. Müge Çına Aksoy, Olgun Topal, Tayfun Yazıcı, Timuçin Baykul. An Unusual Fracture of the Mandibular Ramus. 2014 AÇBİD Antalya
10. Yavuz Fındık, Olgun Topal. Non Grafted Sinus Floor Elevation Using Platelet Rich Fibrin and Additional Space-Maintaining Management with Mini-Screws. 2014 AÇBİD Antalya.

11. Yavuz Fındık, Olgun Topal. Plasmacytoma of the Mandible: A rare case report. 2014 AÇBİD Antalya.
12. Yavuz Fındık, Olgun Topal. Management of A Huge Central Giant Cell Granuloma of Mandible: A case report: 2013 AÇBİD Antalya
13. Topal O, Komerik N, Esenlik E, Bolat E. Does the Number of Third Molars Depend on Jaw Geometry? 2013 AÇBİD Antalya
14. Timuçin Baykul, M. Asım Aydın, Elçin Esenlik, Yavuz Fındık, Olgun Topal. Correction of a Severe Class III Malocclusion with Orthognathic Surgery: A Case Report. International Craniofacial Anomalies Congress 2013. Isparta
15. Yavuz Fındık, Timuçin Baykul, Olgun Topal. Closure of the Alveolar Clefts with Mandibular Symphyseal Bone Grafts and with PRF Under Local Anesthesia: Three case reports. 2012 AÇBİD Antalya
16. Topal O, Komerik N, Esenlik E, Bolat E. Absence of Third Molars in Relation to Facial Morphology. 2012 AÇBİD Antalya

SCI, SSCI ve AHCI dışındaki indeks ve özetler tarafından taranan dergilerde yayımlanan teknik not, editöre mektup, tartışma, vaka takdimi ve özet türünden yayınlar dışındaki makale

1. Komerik N, Topal O, Esenlik E, Bolat E. Skeletal facial morphology and third molar agenesis. Journal of Research and Practice of Dentistry. Vol. 2014 (2014), Article ID 452422, 11

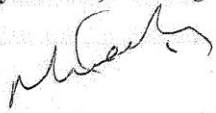
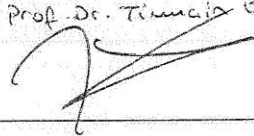

TÜBİTAK 3001 Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Protokolü

TÜBİTAK PROJE DESTEKLEME SÖZLEŞMESİ KABUL ve BEYAN TAAHHÜTNAMESİ

İşbu taahhütname 114S071 nolu Projeye ilişkin düzenlenen destekleme sözleşmesinin eki olup bahsi geçen sözleşmede ve aşağıda imzası bulunanlar;

- Sözleşmenin, 6098 sayılı Türk Borçlar Kanunu'nun 20 ila 25 inci maddeleri çerçevesinde genel işlem koşulları içerdiğini,
- Sözleşme ekindeki mevcut mevzuatın sözleşmenin ayrılmaz parçası olduğu, sözleşmenin uygulanmasının söz konusu mevzuat kapsamında gerçekleştirileceği ve bahsi geçen mevzuata "www.tubitak.gov.tr/mevzuat" web adresinden erişim sağlanabileceğini,
- Söz konusu sözleşmenin imzalanmasından önce, anlaşılmayan ve tereddüt duyulan sözleşme ve atıf yapılan mevzuat hükümlerinin içeriği hakkında, tarafımıza bildirilen irtibat noktası ile bağlantıya geçilerek bilgi edinilmesinin mümkün olduğunu,
- Bu şartlarda sözleşmenin uygun bulunmaması durumunda sözleşmenin imzalanmaması, imzalanmama halinde herhangi bir yükümlülüğün doğmayacağını ve herhangi bir yaptırımla karşılaşmayacağımızı,

ve sözleşme ile ekli mevzuatın içeriğini okuyarak anladığımızı, kabul ettiğimizi taahhüt ederiz.

Proje Yürütücüsünün Adı Soyadı: Doç.Dr.Müge Çına Aksoy İmza: 	Projenin Yürütüleceği Birim Yöneticisinin (*) Adı Soyadı: Prof. Dr. Tuncay Barıkcı İmza: 
Projenin Yürütüleceği Kurumun Üst Düzey Yöneticisinin (**) Adı Soyadı: İmza:	Prof. Dr. Mehmet Cengiz KAYACAN Rektör Yardımcısı 

(*) : Bölüm Başkanı, Anabilim Dalı Başkanı (Tıp Fakülteleri veya Sağlık Bilimleri için), Enstitüsü Müdürü vb.
(**) : Üniversite Rektörü/Rektör Yardımcısı, Genel Müdür vb.

SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı


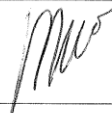




TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
09.01.2014	02	03

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 09 OCAK 2014 tarihinde Saat 14:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi A.D. Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY'un yürütücüsü olduğu Doç. Dr. İbrahim Metin ÇİRİŞ, Doç. Dr. Selçuk ÇÖMLEKÇİ, Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ, Dr. Seden SERT ZAYIF, Dt. Olgun TOPAL'ın yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Heparin Verilen Ratlarda Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Uygulamasının Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Sprague Dawley)	Erkek	34	6-8 aylık / 250-300gr

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından oy birliği ile UYGUN görülmüştür.

Doç. Dr. Efkan UZ BAŞKAN	Prof. Dr. Münire ÇAKIR BAŞKAN YARDIMCISI	Doç. Dr. İ. Metin ÇİRİŞ ÜYE
		KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Gülnur ÖZGÜNER ÜYE	Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY ÜYE
		KATILMADI
Öğr. Gör. İbrahim ONARAN ÜYE	Vet. Hekim İsmail UZ ÜYE	Ecz. Mustafa Serhan DERYAL ÜYE
		KATILMADI

SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı

S.D.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI		
TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO
06.11.2013	41	02

02- Enstitümüz Ağız Diş ve Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Olgun TOPAL'ın tez konusunun belirlenmesi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığının 30.10.2013 tarih ve 54814351/302.14/131 sayılı yazısı ve eklerinin görüşülmesi.

Enstitümüz Ağız Diş ve Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Olgun TOPAL'ın tez konusunun belirlenmesi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığının 30.10.2013 tarih ve 54814351/302.14/131 sayılı yazısı ve ekleri görüşüldü.

Enstitümüz Ağız Diş ve çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Olgun TOPAL danışmanı Yrd.Doç.Dr.Müge ÇINA AKSOY yönetiminde hazırlamış olduğu "Heparin Verilen Radlarda Darbeli Elektromanyetik Alan (PEMF) Uygulamasının Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez konusunun Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin 37. maddesi uyarınca kabulüne,

Oy birliği ile karar verildi.

(İMZA) (KATILMADI) (İMZA)
Doç.Dr.Nejdet ADANIR Doç. Dr.Efkan UZ Yrd.Doç.Dr. Feyza ÖZDEMİR KISACIK
Enstitü Müdür Enstitü Müdür Yardımcısı Enstitü Müdür Yardımcısı

(KATILMADI) (İMZA) (İMZA)
Prof.Dr.A.Nesimi KİŞİOĞLU Doç.Dr.Elçin ESENLİK Doç.Dr.Ferdi BAŞKURT
Üye Üye Üye

(İMZA)
Raportör
Ali Rıza YEŞİLİRMAK
Enstitü Sekreter V.


ASLININ AYNIYDIR
Ali Rıza YEŞİLİRMAK
Enstitü Sekreter V.
06.11.2013