

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

**ALENDRONAT VE K1 VİTAMİNİNİN RAT FEMURAL  
KIRIK KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**DT. SERAP ŞİMŞEK**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR**

**2011-İSPARTA**

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

**ALENDRONAT VE K1 VİTAMİNİNİN RAT FEMURAL  
KIRIK KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**DT. SERAP ŞİMŞEK**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim  
Birimi tarafından 1771-D-09 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

**Tez. No: 57**

**2011- ISPARTA**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

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

Tez Savunma Tarihi: 29/04/2011

- Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR  
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi  
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı
- Üye : Prof. Dr. Üstün GÜLDAĞ  
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi  
Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı Başkanı
- Üye : Prof. Dr. Timuçin BAYKUL  
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi  
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı
- Üye : Doç. Dr. Mehtap MUĞLALI  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi  
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı
- Üye : Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY  
Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi  
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, doktora tezimin her aşamasında bilgisini ve emeğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇADIR'a;

Doktora tezimi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ) Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine;

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

Araştırma verilerimin histomorfometrik değerlendirmesini gerçekleştiren Prof. Dr. Elif İnanç GÜRER ve Dr. İbrahim BAŞSORGUN'a;

Araştırmamın istatistiksel değerlendirmesini yapan Uzm. Dr. Tufan NAYIR'a;

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarıma, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim dalı klinik ve ameliyathane personeline;

Doktora eğitimimin başlangıcından itibaren sağladığı yurt içi doktora burs imkanı için TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığına;

Eğitim sürecim boyunca ve hayatımın her aşamasında bana her bakımdan destek olan sevgili annem Meral DİNGEÇ ve babam Hasan DİNGEÇ'e;

Doktora eğitimim süresince benden sevgisini, emeğini ve özverisini esirgemeyen, desteği ile tüm sıkıntıların altından kalkmamı sağlayan sevgili eşim Atakan ŞİMŞEK'e teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
RESİMLER DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kemik Dokusunun Özellikleri .....	3
2.1.1. Kemik Hücreleri .....	3
2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler .....	4
2.1.1.2. Osteoblastlar .....	4
2.1.1.3. Osteositler .....	5
2.1.1.4. Osteoklastlar .....	5
2.1.2. Kemik Matriksi .....	6
2.1.3. Periosteum ve Endosteum .....	7
2.1.4. Kemik Dokusu Tipleri .....	7
2.1.4.1. Birincil (Örgü) Kemik Dokusu .....	7
2.1.4.2. İkincil (Lamelli) Kemik Dokusu .....	8
2.1.4.2.1. Trabeküler (Spongioz) Kemik Dokusu .....	8
2.1.4.2.2. Kortikal (Kompakt) Kemik Dokusu .....	9
2.1.5. Kemik Oluşumu .....	9
2.1.5.1. İntramembranöz Kemikleşme .....	10
2.1.5.2. Endokondral Kemikleşme .....	10
2.2. Kırık İyileşmesi .....	11
2.2.1. Enflamasyon Evresi .....	12
2.2.2. Tamir Evresi .....	13
2.2.3. Yeniden Şekillenme Evresi .....	13
2.3. Bifosfonatlar .....	14
2.3.1. Kimyasal Yapısı .....	15
2.3.2. Etki Mekanizması .....	17
2.3.3. Klinik Kullanım Alanları .....	19
2.3.4. Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri .....	21
2.3.5. Toksik ve Yan Etkileri .....	21
2.3.6. Bifosfonat Kullanımına Bağlı Osteonekroz .....	22
2.3.7. Bifosfonatların Kırık İyileşmesi Üzerindeki Etkileri .....	23
2.3.8. Alendronat Sodyum .....	24
2.4. K Vitamini .....	26
2.4.1. K Vitamini Gereksinimi .....	27
2.4.2. K Vitaminin Emilimi ve Dokulara Taşınması .....	28
2.4.3. K Vitamini Yıkımı ve Atılımı .....	29
2.4.4. K Vitaminine Bağlı Karboksilasyon Reaksiyonu .....	29
2.4.5. K Vitaminine Bağımlı Proteinler .....	30

2.4.5.1. Kemikte Bulunan K Vitaminine Bağımlı Proteinler.....	31
2.4.6. K1 Vitaminin Kemik Dokusu Üzerindeki Etkileri.....	32
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	34
3.1. Deney Hayvanları.....	34
3.2. Gruplar .....	34
3.3. Cerrahi Girişim.....	35
3.4. İlaçların Hazırlanması ve Deney Hayvanlarına Verilmesi.....	38
3.5. Postoperatif Takip .....	39
3.6. Deney Hayvanlarından Kemik Örneği Elde Edilmesi .....	40
3.7. Kesit Hazırlama Yöntemi.....	41
3.7.1. Fiksasyon ve Formalinden Arındırma İşlemi.....	41
3.7.2. Gümüş Boyama İşlemi .....	41
3.7.3. Dekalsifikasyon İşlemi.....	41
3.7.4. Doku Takibi İşlemi .....	42
3.7.5. Bloklama İşlemi .....	43
3.7.6. Kesit Alma İşlemi .....	44
3.7.7. Hematoksilen Eozin Boyama İşlemi.....	45
3.7.8. Kesitleri Kapama İşlemi.....	46
3.7.9. Histomorfometrik Analiz .....	47
3.8. İstatistik .....	48
<b>4. BULGULAR</b> .....	49
4.1. Deney Hayvanları.....	49
4.2. Deney Hayvanı Ağırlığı .....	50
4.3. Histomorfometri.....	53
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	58
5.1. Deney Hayvanları ve Ağırlık .....	58
5.2. Histomorfometri.....	60
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	88
<b>ÖZET</b> .....	90
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	94
<b>EKLER</b> .....	115
EK 1: SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı .....	115
EK 2: SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı .....	116
EK 3: SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü.....	117
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	118

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin Trifosfat
BAP	: Kemik Alkalen Fosfataz
BFR/BS	: Kemik Formasyon Oranı/Kemik Yüzeyi
$^{\circ}\text{C}$	: Derece Santigrad
$\text{cm}^3$	: Santimetre Küp
CTx	: Karboksi Terminal Telopektid
DPyr	: Deoksipiridinolin
EHDP	: Etan-1-Hidroksil, 1-Difosfonat
FPP	: Farnesil Difosfat
FDPyr/Cr	: Serbest Deoksipiridinolin/Kreatinin
g	: Gram
GI	: Gastrointestinal
GIS	: Gastrointestinal Sistem
GTP	: Geranil Trifosfat
GGPP	: Geranilgeranil Difosfat
HE	: Hematoksilen Eozin
IL-6	: İnterlökin- 6
IM	: İntramuskuler
IP	: İntraperitoneal
IV	: İntravenöz
kg	: Kilogram
KMD	: Kemik Mineral Densitesi
MAR	: Mineral Apozisyon Oranı
Md.Ar	: Mineralize Kemik Alanı
Me.Dm	: Meduller Çap
MK	: Menakinon
mm	: Milimetre
$\mu\text{m}^2$	: Mikrometre Kare
mg	: Miligram

MS/BS	: Mineralize Yüzey/Kemik Yüzeyi
NTx	: Amino Terminal Telopektid
O.Ar	: Osteoid Kemik Alanı
Ob.Ar	: Osteoblast Alanı
OC	: Osteokalsin
PICP	: Karboksi Terminal Propektid
P1NP	: AminoTerminal Propektid
PRGP	: Prolinden Zengin Gamma Karboksiglutamik Asit Protein
PTH-rP	: Paratiroid Hormon İlişkili Protein
Pyr	: Piridinolin
SDÜ	: Süleyman Demirel Üniversitesi
Tb.Ar	: Trabeküler Kemik Alanı
TMG	: Transmembran Gamma Karboksiglutamik Asit Protein
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
ucOC	: Karboksile Olmamış Osteokalsin
>	: Büyüktür
<	: Küçüktür



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 : Pirofosfat ve bifosfonatların kimyasal yapısı (Drake et al. 2008) .....	15
Şekil 2 : Mavelonat mekanizması (Morris and Einhorn 2005) .....	18
Şekil 3: Alendronatın kimyasal yapısı (Fleish 1998) .....	24
Şekil 4 : K vitamini türlerinin kimyasal yapısı (Shearer and Newman 2008) .....	27
Şekil 5 : Karboksilasyon döngüsü (Berkner and Runge 2004) .....	30

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Genel anestezi için kullanılan ilaçlar .....	35
Resim 2: Operasyon alanının traşlanarak tüylerden arındırılması .....	36
Resim 3: Cilt insizyonu .....	36
Resim 4: Osteotomi sonrası kırık parçaların miniplak ve mikrovida ile fikse edilişi	37
Resim 5: Operasyon alanının dikiş ile kapatılması .....	37
Resim 6: Gavaj uygulamasında kullanılan gavaj sondası .....	38
Resim 7: Gavaj yöntemi ile sıçanlara alendronat ve K1 vitamini verililişi.....	39
Resim 8: Fosamax® (Alendronat Sodyum) ve K1 Vitamini (filokinon).....	39
Resim 9: Postoperatif uygulanan amikasin sülfat ve tramadol hidroklorür .....	40
Resim 10: Otomatik kaset yazıcı cihaz .....	42
Resim 11: Otomatik doku takip cihazı .....	43
Resim 12: Bloklama cihazı ve kaset içerisinde bloklama .....	43
Resim 13: Kaset içerisinde bloklanmış ve dondurulmuş dokular .....	44
Resim 14: Tam motorize mikrotom cihazı .....	44
Resim 15: Kesitlerin kurutulması ve lam üzerine fikse edilmesinde kullanılan etüv	45
Resim 16: Otomatik boyama cihazı .....	46
Resim 17: Otomatik preperat kapama cihazı .....	46
Resim 18: Axiocam MRc kamera taşıyan Axioskop 2 plus ışık mikroskobu .....	47
Resim 19: Kontrol grubuna ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE).....	53
Resim 20: Alendronat grubuna ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE) .....	53
Resim 21: K1 vitamini grubuna ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE) .....	54
Resim 22: Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği gruba ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE) .....	54

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Nitrojen atomu taşımalarına bifosfonatların göre sınıflandırması.....	16
Tablo 2 : R2 zincir yapısındaki farklılığa göre bifosfonatların sınıflandırılması.....	16
Tablo 3: Yaşa göre günlük K vitamini ihtiyacı.....	28
Tablo 4: Araştırma gruplarını oluşturan Kontrol ve çalışma grupları.....	35
Tablo 5 : Çalışma dışı bırakılan sıçanlar ve femurların gruplara göre dağılımı (Deney hayvanı veya femur sayısı (n)).....	50
Tablo 6: Deney hayvanı ağırlık bulguları .....	52
Tablo 7: Histomorfometrik analiz bulguları .....	55
Tablo 8: Histomorfometrik parametreler arası korelasyon tablosu.....	56

## 1. GİRİŞ

Kemik dokusu, oral ve maksillofasiyal cerrahinin sıklıkla operasyon alanında yer alan, iyileşmesi ve rekonstrüksiyonu kritik öneme sahip olan bir dokudur. Çene kemiği kırıkları, ortognatik cerrahi, kemiği içine alan kistik ve tümoral lezyonlarda kemiğe yapılan müdahaleler sonrası kemiğin komplikasyonsuz ve kısa sürede iyileşmesi tedavinin başarısı ve hasta morbiditesinde oldukça önemlidir.

Kemik iyileşmesi, birbirine eşlik eden osteoblastik ve osteoklastik aktivite sonucu gerçekleşen, anabolik ve katabolik olayları içeren bir süreçtir. Kemik dokusunun tamir süreci ve iyileşen doku miktarı anabolik etkinin artışı veya katabolik etkinin azalışı ile ilişkilidir. Kemik kırığı iyileşmesi birbirini takip eden ve zaman zaman iç içe gelişen enflamasyon, tamir ve yeniden şekillenme evresi adı verilen üç ayrı evreden oluşur (Simmons 1985, Einhorn 1998). Kemik iyileşmesinin bu dönemlerinde kemik yapım ve yıkım mekanizmaları moleküler, hücresel ve dokusal düzeyde yüksek aktivite gösterir (McKibbin 1978, Simmons 1985, Kılıçoğlu 2002). Kemik iyileşme aşamalarının ortaya konan mekanizmasının açık bir şekilde anlaşılmasından bu yana, kırık iyileşmesinin pek çok faktörden etkilenebileceği araştırmalarla gösterilmiştir (Simmons 1985, Marsh and Li 1999). Bu çalışmalar içerisinde kırık iyileşmesi üzerindeki etkisi araştırılan çeşitli lokal ve sistemik uygulamalar yer almaktadır (Einhorn et al. 1988, Bourque et al. 1993, Li et al. 1999, Turk et al. 2004, Ozturk et al. 2006, Ghodadra and Singh 2008, Lysiak et al. 2008, Della Rocca 2009, Fu et al. 2009). Kemik morfogenetik proteinleri (Ghodadra and Singh 2008), kalsiyum fosfat (Ozturk et al. 2006), trombosit zengin plazma (Lysiak et al. 2008), büyüme faktörleri (Bourque et al. 1993), çeşitli vitaminler (Einhorn et al. 1988, Turk et al. 2004, Cao et al. 2007, Fu et al. 2009), ultrason (Della Rocca 2009) ve bifosfonat (Li et al. 1999) uygulamaları bunların başında gelmektedir.

Bifosfonatların osteoklastik aktiviteyi baskıladığı ve metabolik kemik hastalıklarının tedavisinde geniş kullanım alanı olduğu bilinmektedir (Russell 2006). Özellikle menapoz sonrası osteoporoz tedavisinde (Bone et al. 1997) sıklıkla kullanılan bifosfonatlar osteoporozdan başka, paget hastalığı (Preston et al. 1986,

Lyles et al. 2001), kemik tümörleri (Kreel et al. 1989, Khan and Partin 2003), malignite hiperkalsemisi (Percival et al. 1985, Penel et al. 2008) gibi hastalıklarda da yaygın kullanılmaktadır. Bifosfonatlar içerisinde bu amaçla en yaygın kullanılan alendronat, nitrojen içeren ikinci kuşak bifosfonattır. Diğer bifosfonatlar gibi kemik yapım ve yıkımının ve tek başına kemik yıkımının arttığı hastalıkların tedavisinde sıklıkla tercih edilen bir ilaçtır (Gallacher et al. 1992, Bone et al. 1997, Lyles 2001, Vachal et al. 2006). Alendronat son yıllarda ortopedi ve diş hekimliği alanında kemik dokusu üzerindeki etkisi araştırılan bir ilaçtır.

K vitamininin yaygın olarak bilinen koagülasyon mekanizması üzerindeki etkisinin yanısıra kemik metabolizması üzerinde de etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Bouchaert and Said 1960, Pettifor and Benson 1975, Einhorn et al. 1988, Petursson 1994, Cadir et al. 1998, Booth et al. 2000, Cadir et al. 2000). Bu konu üzerinde yapılan çalışmalar, K vitamininin deney hayvanlarında (Bouchaert and Said 1960, Pettifor and Benson 1975, Einhorn et al. 1988) ve insanda (Petursson 1994, Çadır et al. 1998, Booth et al. 2000, Cadir et al. 2000) kemik dokusu üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermiştir. K1 vitamini, K vitamininin yeşil lif içeren sebze ve soya fasulyesi gibi bitkilerin yağından elde edilen bir türevidir (Shearer 1995).

Yukarıdaki çalışmalara dayanarak, bu araştırmanın amacı kemik dokusu üzerinde olumlu etkisi olduğu bildirilen alendronat ve K1 vitamininin kırık kemik iyileşmesi üzerindeki ayrı ayrı ve ortak etkilerini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik Dokusunun Özellikleri

Kemik dokusu, yetişkin iskeletinin en önemli yapı taşıdır. Yumuşak dokulardan meydana gelmiş olan yapıları destekler. Diğer destek dokularda olduğu gibi hücreler, zemin maddesi ve fibrillerden oluşmasına karşın kemik dokusu, hücre dışı öğelerin mineralleşmesi ile iskelette destekleyici ve koruyucu bir işleve sahiptir. Kemiğe bu özelliği veren en önemli mineral hidroksiapatit kristalleri şeklinde bulunan kalsiyum fosfattır. Kas ve tendonların tutunma yerleri olan kemikler hareket etmeye yardımcı olur. Kendilerine uygulanan kuvveti emerek dağıtır. İç organların, kemik iliğindeki hematopoietik hücrelerin, baş ve göğüs bölgesindeki organların korunmasından sorumludur. Bu işlevlerinin yanı sıra organizmanın kalsiyum ve fosfor deposu olarak metabolizmada önemli rol oynar. Kemik dokusunun özellikleri ile ilgili olarak belirtilen tüm bilgiler Açıklan ve ark. (1995), Ross et al. (1995), Jungueria (1998), Cireli (1999), Akay (2006), Öber (2006), Ovalle and Nahirney (2008), Weinstein and Buckwalte (2009)'in kitaplarından elde edilmiştir.

#### 2.1.1. Kemik Hücreleri

Aktif olarak büyümekte olan kemiklerde dört çeşit kemik hücresi bulunmaktadır. Bunlar osteoprogenitor hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Osteoprogenitor hücreler, osteoblastlar ve osteositler kemiğin farklı evrelerinde, birbirlerine dönüşebilme özellikleri bakımından aynı hücre tipinin farklı işlevsel evreleri olarak tanımlanabilir. Osteoklastlar ise kemik iliğinden oluşan ve dolaşımda bulunan monositlerden köken alır. Bu nedenle köken ve işlevine bağlı olarak sahip olduğu yapıyla da osteoklastlar diğer üç hücre tipinden oldukça farklı bir özelliğe sahiptir.

### **2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler**

Periosteumun iç tabakası ile endosteumda yer alan embriyonik mezenşimden gelişen kaynak hücreleridir. İğ şeklindedir ve uzamış çekirdekleri vardır. Kemikte yaralanma, kırıkların iyileşme bölgelerinde ve kemiğin yeniden yapılanması sürecinde sayıları mitoz ile artan bu hücreler osteoblasta farklılaşırlar. Osteogenez durduğunda osteoblastlar da osteoprogenitör hücrelere dönüşebilir.

### **2.1.1.2. Osteoblastlar**

Osteoblastlar kemik oluşumundan sorumlu hücrelerdir. Kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde dizilmiş halde bulunurlar. Dış görünüşleri epitel hücrelerine benzer. 15-20 mikron büyüklüğündeki bu hücreler stoplazmik uzantıları ile birbirine bağlanmışlardır. Çekirdekleri büyük olup, 1-2 çekirdekçik içerirler. Stoplazmaları granüllü endoplazmik retikulum ve golgi komplekslerinden zengindir.

Bu hücreler kemik matriksinin organik kısmını yani kollojen fibrilleri, proteoglikanları, glikozaminoglikan ve glikoproteinleri salgılar. Henüz mineralize olmamış bu ara maddeye osteoid denir ve osteoblastlar salgıladıkları osteoid içinde gömülü kalır. Yeni kemik oluşumu durduğunda osteoblastların aktiviteleri önce yavaşlar sonra da durur.

Osteoblastların hücre zarında kemik alkale fosfataz (BAP) aktivitesi yüksek olup bu enzim aktif kemik şekillenmesinde önemlidir. Osteoblastların kemik alkale fosfataz salgılaması kanda bu enzimin yükselmesini sağlar, bu da kemik yapımı aktivitesi konusunda belirleyici olarak kullanılır.

### **2.1.1.3. Osteositler**

Kalsiyum tuzlarının birikmesiyle mineralize olmuş kemik matriksi içinde kalan osteoblastlar osteosit haline dönüşürler. Bu nedenle osteositler oluşumunu tamamlamış kemik dokusunun esas hücreleridir. Osteositin hücre gövdesi lakün adı verilen boşluklar içine yerleşmiştir. Yassı şekilde yapısı olan bu hücreler ince stoplazmik uzantılara sahiptir. Bu uzantıları sayesinde kemik matriksi içindeki diğer osteositlerle bağlantı kurar. Bu yapılanma şekli osteositlerin tüm mineralize matriks yüzeyine ulaşabilmelerini sağlar ve bu durum kemik sıvılarıyla kan arasındaki hücre kontrollü mineral alışverişine imkan verir. Böylece vücut mineral dengesi ve kemik sıvı kompozisyonunu dengede tutmaya yardımcı olur.

Bu hücrelerin endoplazmik retikulum ve golgi kompleksleri osteoblastlara göre oldukça küçülmüştür ve çekirdek kromatinleri daha yoğundur. Osteositlerin kemiğin diğer hücrelerine dönüşebilme özellikleri vardır. Kemik yıkımı sırasında içinde buldukları lakünlerden dışarı çıkarak dinlenme halindeki osteoprogenitor hücrelere, onlar da osteoblastlara dönüşürler.

### **2.1.1.4. Osteoklastlar**

Kemik dokusunun yeniden şekillenmesi sırasında kemiğin yıkılarak çevre dokularca emilmesinden sorumlu hücreler olan osteoklastlar, bir çok monositin birleşmesinden meydana gelir. Özellikle kemik yıkımının olduğu bölgelerde bulunan, 5-50 adet çekirdeği bulunan dev hücrelerdir. Osteoklastlar kemik yüzeyinde Howship lakünleri adı verilen yıkım alanları içinde bulunur.

Osteoklastlar kemik matriksini etkileyen asit, kollojenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgılar. Böylece kalsifiye olmuş temel yapı maddesini serbest hale getirir ve kemik yıkımı sırasında meydana gelen artıkların ortadan kaldırılmasını sağlar. Kalsiyumun kemikten kana salınmasında aktif rol oynayarak vücut sıvılarında kalsiyum derişiminin hemostatik olarak düzenlenmesinde rol oynar. Böylece



osteoklastlar hormonal ve hücresele mekanizmaların kontrolünde kemik yıkımını gerçekleştirir.

### **2.1.2. Kemik Matriksi**

Kemik matriksi iki esas ögeden oluşmuştur. Bunlardan biri organik diğeri de inorganik matrikstir. Kemiğin %67'sini inorganik bileşenler, %33'ünü ise organik bileşenler oluşturur. Organik matriks kemiğe şeklini verir ve gerilme gücünü sağlar. Mineral kısmı ise kemiğin sıkışma kuvvetine karşı dayanıklılığını sağlar.

Kemik matriksinin organik kısmını büyük oranda tip 1 kollajen oluşturur. Kalan kısmını ise glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asit), glikoproteinler (osteonektin, osteopontin, sialoprotein), kemiğe özgü K vitamini bağımlı proteinler (osteokalsin (OC), matriks Gla-protein, protein S) ve az miktarda tip 5 kollajen oluşturur.

Matriksin inorganik kısmını büyük oranda kalsiyum fosfat oluşturur. Diğere mineraller ise kalsiyum karbonat, kalsiyum florid, magnezyum florid, magnezyum hidroksit ve magnezyum sülfattır.

Osteoid genel adı verilen organik maddeler, inorganik bileşenlerle desteklenerek olgun kemik dokusunun matriksini oluşturur. Kalsiyum, hidroksiapatit kristallerini oluşturur ve bu da kollajen liflerce sıkıca sarılarak matriksin yapısını belirlemektedir. Matrikste bulunan glikoproteinlerden OC ve osteopontin de hidroksiapatitlere bağlanırlar ve osteoblast ve osteositlerin matriks ile ilişkisini sağlamaya yardımcı olurlar. Kemiğe sertliğini veren yapı hidroksiapatit kristalleri ile kollajenin oluşturduğu yapıdır ve birinin eksikliğinde kemik kolay kırılabilir hale gelir.

### **2.1.3. Periosteum ve Endosteum**

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri, kemiği oluşturan hücrelerden ve bağ dokudan oluşan tabakalarla örtülüdür. Dıştakin periosteum içtekin endosteum denir.

Periosteumun dış tabakası kollajen lifler ve fibroblastlardan oluşmuştur. Demetler halinde periosteal kollajen liflerden oluşan sharpey lifleri, matriks içine girerek periostu kemiğe bağlar. Hücreden daha zengin olan periosteumun iç tabakası bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahip olan osteoprogenitör hücreler bakımından zengindir.

Endosteum, kemiğin içindeki bütün boşlukları örten ve tek kat yassı osteoprogenitör hücreler ile çok az miktarda bağ dokusundan oluşur. Bu yüzden endosteum periosteumdan oldukça incedir.

Periosteum ve endosteumun temel işlevleri kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları aralıksız olarak sağlamaktır. Bu nedenle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilir.

### **2.1.4. Kemik Dokusu Tipleri**

Kemik dokusu birincil kemik dokusu ve ikincil kemik dokusu olarak iki ayrı başlık altında incelenmektedir.

#### **2.1.4.1. Birincil (Örgü) Kemik Dokusu**

Fötal gelişim ve kemik oluşumu sırasında ilk oluşan kemik dokusudur. Bu dokuda gelişmesi tamamlanmış olgun kemik dokusunda görülen doku organizasyonu yoktur. Hücre sayısı olgun kemik dokusundan daha fazladır, ancak hücreler rastgele dağılım gösterirler. Hücrelerin sentezlediği kollajen fibriller de her yöne dağılarak doku içinde ağ yapıları oluşturur.

Birincil kemik dokusu geçicidir ve yetişkinlerde kafadaki yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe tutunduğu yerler gibi birkaç yer dışında yerini ikincil kemiğe bırakır.

#### **2.1.4.2. İkincil (Lamelli) Kemik Dokusu**

Erişkinlerde bulunan kemik dokusudur. Bu dokuda kollajen liflerin düzenli dağılımına bağlı olarak gelişen kemik lamelleri, olgun kemiğin kendine özgü lameller sistemine sahip olmasına neden olur. Birincil kemik dokusuna göre daha az sayıda olan kemik hücreleri lameller üzerinde düzenli bir şekilde yer alır. Kalsiyum tuzları hidroksiapatit kristalleri şeklinde kollajen fibriller üzerinde birikmiş olup, mineralizasyon tamamlanmıştır.

İkincil kemik dokusu spongioz ve kortikal kemik olmak üzere iki tip kemikten oluşur.

##### **2.1.4.2.1. Trabeküler (Spongioz) Kemik Dokusu**

Kısa ve uzun kemiklerin epifiz ve metafizi ile yassı kemiklerin iç kısmında yer alan trabeküler kemik, bulunduğu yerlerde kortikal kemikten oluşan bir tabaka ile örtülüdür. Trabeküler kemik birbiriyle ağızlaşan kemik trabeküllerinden oluşur. Bu trabeküllerde bulunan kemik lamelleri birbirine paralel seyrederek. Trabeküllerin aralarında bulunan birbiriyle ilişkili meduller alan adı verilen boşlukların içerisinde kemik iliği bulunur. Kemik hücreleri, trabeküllerin yapısını oluşturan kemik lamelleri üzerinde bulunur ve besinlerini kemik iliğinden temin ederler. Trabeküler kemik dokusunda kan damarları ve havers kanalları bulunmaz.

#### **2.1.4.2.2. Kortikal (Kompakt) Kemik Dokusu**

Uzun kemiklerin gövde kısmı olan diafiz kortikal kemikten oluşur. Organizmada bulunan tüm kemiklerin dış yüzeyleri kortikal kemikle kaplıdır. Çıplak gözle homojen ve dolgun yapıda olduğu görülen kortikal kemiğin, mikroskopta incelendiğinde düzenli yerleşim gösteren lamel ve kanallar sistemleri içerdiği görülmektedir. Kemik hücreleri lameller üzerinde bulunur ve bu hücreler ince kanalcıklar aracılığıyla hem birbirleriyle hem de damar içeren kanallar ile bağlantı kurarlar.

Yalnızca kortikal kemik dokusunda bulunan ve içerisinden kan damarlarının geçtiği kanallara kemik kanalları denir. Havers ve volkmann kanalları olarak iki tiptir. Kortikal kemikte lameller havers sistemleri, dış dairesel lameller, iç dairesel lameller ve intertisyel lamellerden ibaret tipik bir düzenlenim gösterirler. Bu kanalın etrafını saran dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe havers sistemi yada osteon denir.

Volkman kanalları kemiğin enine yerleşim gösteren kanallarıdır ve kemiğin periosteumundan endosteumuna kadar uzanır. Havers kanalları ise kemiğin uzun eksenine paraleldir ve volkmann kanalları aracılığı ile kemik iliği boşluğu, periosteum ve birbirleri ile iletişim kurarlar. Volkman kanallarının etrafında havers kanallarında olduğu gibi dairesel lameller yoktur ve kanallar lamelleri delerek geçer.

#### **2.1.5. Kemik Oluşumu**

Kemik oluşumu iki yol ile olur. Birincisi osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile (intramembranöz kemikleşme) ya da daha önce var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile (endokondral kemikleşme) gerçekleşir.

Her iki yolla da ilk ortaya çıkan doku birincil kemik dokusudur ve bir süre sonra yerini ikincil kemik dokusuna bırakır. Kemiğin yapımı ve yeniden şekillenmesi

sadece büyüyen kemiklerde olmayıp, yetişkinlerde de hızını oldukça azaltarak hayat boyu devam eder.

#### **2.1.5.1. İntramembranöz Kemikleşme**

Frontal, parietal, oksipital, temporal kemikler ile maksilla ve mandibulanın bazı bölümleri intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. Bu tip kemiğin oluşacağı bölgelerde mezenşim hücreleri yoğunlaşıp birbirleriyle bağlantı kurarlar. Mezenşim yoğunlaşması içinde kemikleşmenin başladığı ilk noktaya birincil kemikleşme merkezi denir. Bir grup mezenşim hücresi osteoblasta dönüşür. Yeni kemik matriksinin oluşmasını kalsifikasyon takip eder. Bunun sonucunda osteoblastların etrafı sarılır ve daha sonra bu hücreler osteosit haline gelirler. Gelişmekte olan bu kemik adacıklarına spikül adı verilir. Spiküller, kapillerleri, kemik iliği hücrelerini ve farklılaşmamış hücreleri içeren boşluk ile birleşerek spongios kemik yapısını oluşturur.

İleride kortikal kemiğin oluşacağı bölgelerde kemik trabekülleri kan damarlarının etrafındaki bağ dokusunu daraltarak kalınlaşmasını sürdürür. Spongios kemiğin sürekli kalacağı bölgelerde ise trabeküler kalınlaşma devam etmez. Damarlı bağ dokusu da yavaş yavaş kan hücrelerini üretecek olan hematopoietik doku haline dönüşür. Bağ dokusunun kemikleşmeye katılmayan bölümlerini ise periosteum ve endosteumu oluşturur.

#### **2.1.5.2. Endokondral Kemikleşme**

Omurgada, pelviste, kol ve bacaklardaki kemikler endokondral kemikleşme ile oluşurlar. Bu kemikleşme modelinde hyalin kıkırdak sonradan kemik ile yer değiştirir.

Başlangıçta kıkırdağın tam ortasında bulunan kondrositlerin büyümesiyle görülen bir kemikleşme merkezi oluşur. Bu bölgeye birincil kemikleşme merkezi

denir. Bu bölgedeki hücreler hipertrofiye uğrar ve aralarında glikojen birikmeye başlar. Bu arada matriks ince delikli bölmelere ayrılır ve düzensiz şekilli iğnemi yapılar oluşur. Hipertrofik kırıkta hücrelerinin etrafındaki hyalin matriks mineralize olabilir özellik kazanır ve kalsiyum fosfat kristalleri depolanmaya başlar. Hipertrofik kırıkta hücreleri de zamanla özelliklerini kaybeder ve ölür.

Kırıkta modelinin içindeki bu değişikliklerle aynı zamanda perikondriumdaki hücrelerin osteojenik etkinlikleri harekete geçirilir. Böylece periosteum bandı denilen ince kemik tabakası kemiğin orta parçası etrafında birikir. Kan damarları da, daha sonra periosteumu oluşturacak bağ dokusu tabakasından kemiğin diafizine girerek matriksteki düzensiz boşluklara yerleşir. Kan damarlarının etrafında bulunan mezenşimal bağ dokusu sayesinde kırıkta iç kısımlarına kadar taşınan osteoprogenitor hücrelerin bir kısmı kemik iliği hücrelerine, bir kısmı osteoblastlara farklılaşır. Bu osteoblastlar mineralize kırıkta matriksine yerleşerek kemik matriksi üretmeye başlar. Oluşan kemik trabeküllerinin içinde bir kırıkta merkezi yer alırken, dış tarafta çeşitli kalınlıklarda bir kemik tabakası oluşur.

## **2.2. Kırık İyileşmesi**

Dıştan veya içten gelen zorlamalarla kemik bütünlüğünün bozulmasına kırık denir. Bozulan kemik bütünlüğünün tekrar sağlanmasına yönelik olarak bir takım fizyolojik süreçler gerçekleşir. Kırık iyileşmesi ile ilgili yer alan tüm bilgiler Peterson et al. 1998, Miloro et al. 2004, Ovalle and Nahirney 2008, Weinstein and Buckwalte 2009'in kitapları ve Kılıçoğlu 2002, Altunatmaz 2004, Schindeler et al. 2008'in yayınlarından elde edilmiştir. Kemik diğer dokular gibi skar dokusu oluşturmaz. Kemik iyileşmesi remodeling olarak adlandırılan kemiğin rejenerasyonu ile iyileşir. Bu süreç kırık olduğu andan itibaren başlar ve düzenli kemik doku ile kırık uçları tamamen bir araya gelinceye kadar devam eder. Kırık iyileşmesi birincil ve ikincil kırık iyileşmesi olarak iki türlü olabilir.

Birincil kemik iyileşmesi kırık yüzeyleri sıkı bir şekilde ve birbiriyle temas halinde tutulduğunda gerçekleşir. Bu iyileşmenin gerçekleşebilmesi için kırık uçları arasında herhangi bir doku kaybı veya mesafe olmamalıdır. Bu durumda kallus

dokusu oluşumu meydana gelmeden kortikal ve trabeküler kemik oluşumu izlenir. Bazı cerrahlar bu tip kırık iyileşmesinden doğrudan kemik iyileşmesi olarak bahsederler. Bu tip iyileşme kırık uçlarının birbirine temas ettiği aralıkta lameller osteonların uzaması ile doğrudan oluşabilir. Osteoklastlarla beraber osteoblastlar yeni kemik oluşumuna başlarlar. Osteositlere eklenen yeni kemik matriksi ve kan damarları havers sistemlerini oluşturur. Boşlukların kemik dokusu ile dolmasından sonra havers yeniden yapılanması başlar ve normal kortikal kemik yapısı tekrar kurulur.

İkincil kırık iyileşmesinde kemik fragmanları karşı karşıya gelememiştir ve periosteum ile yumuşak dokular arasında meydana gelen temas sonucu kallus oluşumu gözlenir. İkincil kırık iyileşmesi birbirini tamamlayan üç evreden oluşur. Bu evreler; enflamasyon evresi, tamir evresi ve yeniden şekillenme evresidir.

### **2.2.1. Enflamasyon Evresi**

Travmanın şiddetine bağlı olarak kırık uçları komşuluğundaki periost ve çevre yumuşak dokular yırtılarak damarlar zarar görür. Kanın pıhtılaşması ile kırık uçları arasında, periost altında ve periost yırtılmışsa bunun etrafında hematoma oluşur. Kırık hematomunun ikincil kırık iyileşmesinde önemli rolü vardır. Hematomun basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına yardım eder ve fibrinden bir yapı iskeleti oluşturur. Ayrıca kırık hematomunda bulunan trombosit ve diğer kan hücrelerinden, büyüme faktörü ile diğer proteinler salınır.

Kırık meydana geldikten sonra geçici bir arteriyel daralmayı, mast hücrelerinin histamin salgılamasına bağlı olarak arteriyel, kapiller ve venüllerin genişlemesi izler. Vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Polimorf çekirdekli lökositler, monosit ve lenfositleri içeren akut enflamasyon hücreleri, ödemli bölgeye doğru göç eder. Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Polimorf çekirdekli lökositler ve makrofajların kapillerlerin duvarlarından geçerek dışarı çıkması ile fibrin matriksi oluşur. Fibrin ağından kemik yapımı için hücre çoğalması başlar.

### 2.2.2. Tamir Evresi

Tamir evresi kırık iyileşmesinin en önemli basamağıdır. Tamir mekanizmasında rol oynayan hücreler mezenşimal kökenli çok yönlü gelişim potansiyeline sahip (pluripotent) hücrelerdir. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Fibroblastlar yalnızca kollajen, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan sentezlerler. Böylece kırıkta ve fibröz dokudan oluşan yumuşak kallus şekillenir. Aynı zamanda osteoblastlar kemik matriksi olan osteoidin yapımına başlar ve dış tarafta sert kallus oluşur. İç taraftaki yumuşak kallus bölgesinde de endokondral kemikleşme süreci ile kırıkta dokudan yavaş yavaş kemik doku oluşumu başlar, sert kallus büyür ve kırık parçaların stabilitesi artar. Bu dönemde kemik kallusu normal kemiğe göre daha zayıftır ve tam gücünü yeniden şekillenme evresinde kazanır.

### 2.2.3. Yeniden Şekillenme Evresi

Kemiğin şekillenmesi en uzun evre olup, aylar hatta yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşüm evresidir.

Yeniden şekillenme evresinde, kalsifiye kırıkta doku osteoid doku ile değişerek birincil kemik dokusunu oluşturur. İlerleyen zamanlarda ise bu dokunun yerini ikincil kemik dokusu alır. Kortikal kemik bölgesinde oluşan kırık kallusu, ikincil osteonlara değişir ve havers sistemi oluşur. Kemik iliği kanalı da yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus osteoklastlar tarafından yıkılarak boşluklar yeniden düzenlenir.

1892 yılında Wolff, kemiğin yeniden şekillenmesi ile stres kuvvetleri arasında bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Wolff kuralına göre mekanik olarak strese maruz kalan kemiğin dış bükey kısmında osteoklastik aktivitenin hakim olduğu kemik yıkımı; strese maruz kalmayan iç bükey kısmında ise osteoblastik aktivite ile yeni kemik yapımının gerçekleştiğini açıklamıştır.



### 2.3. Bifosfonatlar

Bifosfonatlar günümüzde osteoporoz (Gallacher et al. 1992, Bone et al. 1997), bazı malign tümörlerin osteolitik kemik metastazları (Kreel et al. 1989, Khan and Partin 2003), paget hastalığı (Preston et al. 1986, Lyles et al. 2001), malignite hiperkalsemisi (Percival et al. 1985, Penel et al. 2008) gibi bir çok kemik ve kalsiyum metabolizması hastalıklarında tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan, kemik yıkımının güçlü inhibitörleridir (Russell 2006).

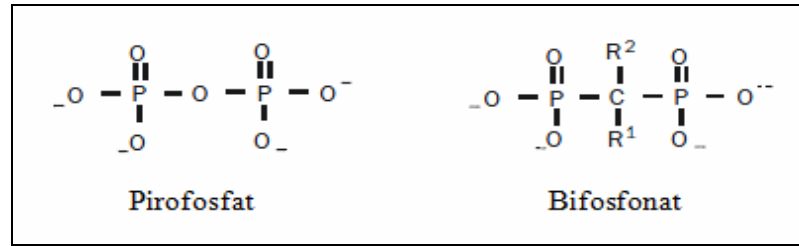
Bifosfonatlar doğal olarak bulunan inorganik pirofosfat bileşenlerinin stabil sentetik analoglarıdır. Kimyagerler tarafından 19. yüzyıldan bu yana bilinen bir bileşik olup günümüzde tekstil, yağ ve gübre endüstrisi gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır (Fleisch 1998). Kalsiyum karbonatın çökmesine engel olmak amacıyla antitartar diş macunlarının ve deterjanların içinde (Williams 2004) yer alan bifosfonatlar, tanı amaçlı olarak kemik taramalarında teknyum-99 gibi radyoizotoplarla beraber kullanılarak bu molekülün kemiğe taşınmasında da kullanılmaktadır (Fogelman et al. 1978, Tang and Chan 1982).

Endüstriyel alanda uzun yıllar kullanılan bifosfonatların biyolojik etkileri çok daha sonra keşfedilmiştir. Yaklaşık 100 yıl önce sentezlenmiş olan etidronat insanlarda tedavi amacı ile kullanılan ilk bifosfonattır ve ilk kez Paget hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Smith et al. 1971).

Günümüze kadar yüzlerce bifosfonat üretilmiş olup, bir düzineden fazlası insanlarda kullanılmıştır. Bifosfonatların potansiyel klinik önemi anlaşıldıkça, çalışmalar kemik yıkımını engelleme konusunda daha yüksek etki gösteren bileşiklerin gelişimi üzerine yoğunlaşmıştır (Ebetino et al. 1996). Bu bileşiklerin değişen yapısal özellikleri, farklı kimyasal, biyolojik ve klinik karakteri olan bifosfonatların üretilmesini sağlamıştır.

### 2.3.1. Kimyasal Yapısı

Bifosfonatlar, pirofosfatların sentetik analoglarıdır ve pirofosfatlara benzer bir kimyasal yapı gösterirler. Her iki bileşiğin de hidroksiapatit moleküllerine yüksek afiniteleri vardır ve bu nedenle kemik dokusuna kuvvetli şekilde bağlanırlar (Rodan and Fleisch 1996). Pirofosfatlar oksijen atomuna bağlanmış iki adet fosfat atomu (P-O-P) içerirken (Şekil 1), bifosfonatlarda ise fosfat grupları oksijen yerine karbon atomuna (P-C-P) bağlanmaktadır (Rodan and Reszka 2002). Pirofosfatların kimyasal yapısından dolayı kolayca metabolize olmasına karşın bifosfonatların kimyasal yapısı enzimatik hidrolize dayanıklıdır (Rodan and Fleisch 1996). Bu durum bifosfonatların vücutta neden metabolize olmadığını ve neden değişmeden atıldığını açıklamaktadır.



Şekil 1 : Pirofosfat ve bifosfonatların kimyasal yapısı (Drake et al. 2008)

Bifosfonatların yapısında bulunan karbon atomları üzerine R1 ve R2 yan zincirlerinin bağlanması veya fosfat gruplarının esterleşmesi çok sayıda farklı bifosfonat varyasyonu oluşmasını sağlar (Fleisch 1998). Bifosfonatların hidroksiapatit kristallerine bağlanma kabiliyeti ile kristal büyümesini ve çözünmesini engelleme özelliği büyük ölçüde R1 yan zincirinin yapısına bağlıdır. Kemiğe lokalize olduktan sonra ise, R2 yan zincirinin yapısı ve üç boyutlu şekli molekülün biyolojik aktivitesini belirler. Böylece ilaçların spesifik moleküler hedefi ile ilişki kurma yeteneği sağlanmış olur (Van Beek et al. 1996). İlk sentezlenen bifosfonatlardan etidronatın R1 yan zincirinde hidroksil grubunu taşıyor olması, hidroksil yerine halojen grubu taşıyan klodronata göre kalsiyuma ve diğer kemik minerallerine olan afinitesini artırmıştır (Van Beek et al. 1996). Bu nedenle daha sonraki kuşak bifosfonatların çoğunda R1 yan zincirinde hidroksil grubu bulunurken R2 yan

zincirlerinde farklı değişiklikler oluşturulmuştur. Bifosfonatların R2 yan zincirine bağlanmış olan nitrojen atomu varlığı kemik yıkımının inhibisyonu şartlarında belirgin bir klinik farklılığa neden olur. Alendronat, risedronat, ibandronat, pamidronat ve zoledronat gibi nitrojen içeren bifosfonatlar etidronat, klodronat ve tiludronat gibi nitrojen içermeyen bifosfonatlara (Tablo 1) göre çok daha güçlü etki gösterir (Ebetino et al. 1996).

Tablo 1: Nitrojen atomu taşımalarına bifosfonatların göre sınıflandırması

<b>Nitrojen İçeren Bifosfonatlar</b>	<b>Nitrojen İçermeyen Bifosfonatlar</b>
Alendronat	Etidronat
Risedronat	Klodronat
İbandronat	Tiludronat
Pamidronat	
Zoledronat	

Bifosfonatların R2 yan zincirindeki farklılığa bağlı olarak yapılan diğer bir sınıflandırmaya göre ise, yan zincirinde alkil grubu taşıyan etidronat, klodronat ve tiludronat gibi bifosfonatlar birinci kuşak; yan zincirinde bir terminal amino grubu taşıyan alendronat, pamidronat, ibandronat gibi bifosfonatlar ikinci kuşak; bir heterosiklik zincir taşıyan zoledronat ve risedronat ise üçüncü kuşak bifosfonatlar (Tablo 2) olarak adlandırılırlar (Russell 2007). Birinci kuşak bifosfonatlarla karşılaştırıldığında alendronat, pamidronat gibi ikinci kuşak bifosfonatlar 10-100 kat, zoledronat ve risedronat gibi üçüncü kuşak bifosfonatlar ise 10.000 kat daha etkilidir (Ebetino et al. 1996, Pazianas et al. 2009).

Tablo 2 : R2 zincir yapısındaki farklılığa göre bifosfonatların sınıflandırılması

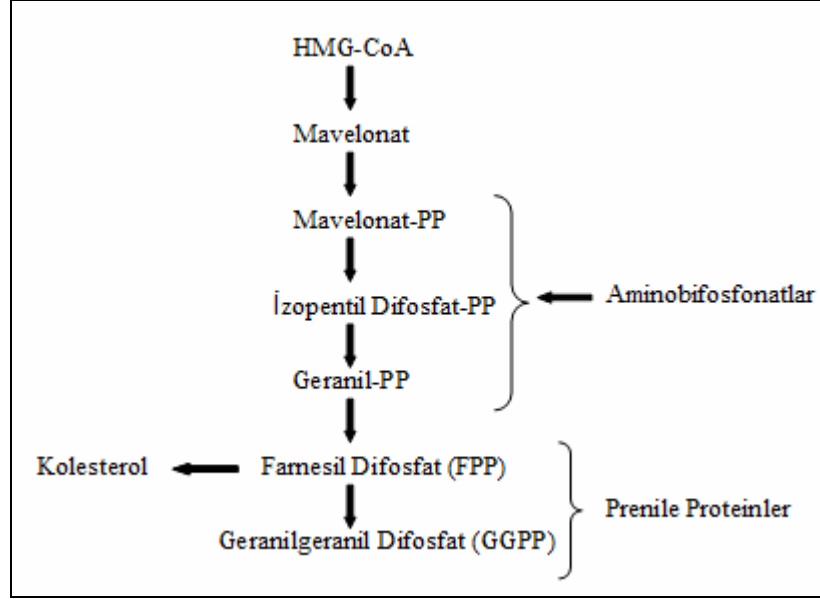
<b>1. Kuşak Bifosfonatlar</b>	<b>2. Kuşak Bifosfonatlar</b>	<b>3. Kuşak Bifosfonatlar</b>
Etidronat	Alendronat	Zoledronat
Klodronat	Pamidronat	Risedronat
Tiludronat	İbandronat	

### 2.3.2. Etki Mekanizması

Bifosfonatların etki mekanizması moleküler, hücrel ve dokusal olmak üzere üç farklı düzeyde açıklanabilir.

Moleküler düzeydeki etki mekanizması nitrojen içeren ve içermeyen bifosfonatlarda farklılık göstermektedir. Bifosfonatlar normal yada patolojik kemik yıkımı sırasında osteoklastlar tarafından açığa çıkarılan kemik mineral bileşenlerine bağlanırlar. Nitrojen içermeyen bifosfonatlar osteoklastlar tarafından adenosin trifosfatın (ATP) hidrolize edilemeyen analoglarına metabolize olurlar. Yüksek endositik aktiviteye sahip olan osteoklastlar, kemiğin yeniden şekillenmesinin ilerleyen safhalarında kemiği ve kemikte bulunan bifosfonatı veya ATP analogunu yıkarlar. Bu sitotoksik ATP analoglarının daha sonra hücre içine birikmesi sonucu osteoklastik fonksiyonu engellediği ve apoptozisi uyardığı ileri sürülmüştür (Van Beek et al. 1999).

Nitrojen içeren bifosfonatlar etkilerini hücre içi mavelonat mekanizması bileşenlerinin aktivitesini engellemek suretiyle gösterirler (Van Beek et al. 1999). Mavelonat mekanizması izopentenildifosfat, farnesildifosfat (FPP) ve geranilgeranildifosfat (GGPP) gibi izoprenoid lipidlerin ve kolesterolün üretiminden sorumludur (Şekil 2) ki hem FPP hem GGPP kendi lipid gruplarının bir protein sistein artıklarının üzerine transferinden sorumludur. Bu olay protein prenilasyonu olarak adlandırılır. Geranil trifosfataz (GTPaz), protein prenilasyonu tarafından oluşturulan önemli bir sinyal proteindir. Geranil trifosfataz prenilasyonunun olmaması, hücre morfolojisinin kontrol ve sinyal bozukluğu, değişmiş membran protein giriş çıkışı ve apoptozisin uyarılması gibi yollarla osteoklast regülasyonunun bozulmasına yol açar (Luckman et al. 1998). Bir çok çalışma bulgusu, nitrojen içeren bifosfonatların kemik yıkımını engellemede başlıca mekanizmanın protein prenilasyonunun engellenmesi olduğu hipotezini desteklemektedir (Zhang et al. 1995, Fisher et al. 1999).



Şekil 2 : Mavelonat mekanizması (Morris and Einhorn 2005)

Hücresel seviyede, bifosfonat etkisinin hedefinin osteoklastlar olduğu düşünülmektedir. Bifosfonatlar osteoklastik kemik yıkımını üç şekilde engeller. Bunlar:

- Kemik yüzeyine osteoklast toplanmasının engellenmesi,
- Kemik yüzeyindeki osteoklast aktivitesinin engellenmesi,
- Osteoklastların ömrünün kısaltılmasıdır (Rodan and Fleisch 1996).

Hücresel seviyede bifosfonatların osteoklastlar üzerindeki etkileri direkt veya indirekt yollarla olabilir. Osteoklast sayısında azalma, osteoklast öncüleri üzerinde gerçekleşen direkt bir etki ile yada indirekt olarak uyarılan osteoblastların osteoklast yapımını engellemesi ile meydana gelebilir. Osteoklast inaktivasyonu, bifosfonatların kemik yüzeyindeki yıkım alanlarında yüksek konsantrasyonda bulunmalarından dolayı osteoklastlar tarafından seçici olarak hücre içine alınmalarına ve bu hücrelerin fagositik özelliklerine bağlı olabilir. Osteoklastların ömrünün kısaltılması bifosfonatların osteoklastlar üzerinde yarattığı toksik etki ve apoptozise veya osteoklast morfolojisinde gerçekleşen değişikliklere bağlı olabilir (Sato et al. 1991). Günümüzde bifosfonatların osteoklastlar üzerindeki direkt ve indirekt etkilerinin hangi mekanizmalarla meydana geldiği bilinmemektedir. Ancak bilinen odur ki,

kemik yıkımındaki azalma, bifosfonat bileşiklerinin kemik yüzeyine emilmesine bağlı olarak mineral çözünmesindeki fizikokimyasal azalmaya bağlıdır (Rodan and Fleish 1996).

Doku seviyesinde, tüm aktif bifosfonatlar kemik yapım yıkım döngüsünün yavaşlamasına neden olur. Bu da kemik yapım yıkımının arttığı patolojik durumlarda kemik kaybında azalmaya yol açar (Rodan and Fleish 1996). Bifosfonatların doku seviyesindeki etkileri:

- a. Kemik yıkımının engellenmesi,
- b. Kemik yapım yıkım döngüsünün engellenmesi,
- c. Kemik dayanıklılığının artması ve buna bağlı kırıklarda azalma şeklinde belirtilebilir (Rodan and Reszka 2002).

### **2.3.3. Klinik Kullanım Alanları**

Bifosfonatların deneysel olarak kemik yıkımını engellediği gösterildikten sonra (Minaire et al. 1981), klinik rahatsızlıklarda kullanımına başlanılmıştır. Ancak etkinliğinin ispatlanması uzun yıllar almıştır. Bifosfonatların en etkileyici klinik kullanımları, daha önce etkili bir tedavisi olmayan bazı hastalıklarda olmuştur. Böylelikle bifosfonatlar yüksek osteoklastik aktivitenin önemli bir patolojik özellik olduğu paget hastalığı (Preston et al. 1986), metastatik ve osteolitik kemik hastalıkları (Kreel et al. 1989), malignansi hiperkalsemisi (Percival et al. 1985) ve osteoporoz (Gallacher et al. 1992) gibi çok çeşitli kemik hastalıkları için bir tedavi seçeneği olmuştur.

Paget hastalığı, insanlarda bifosfonatların doza bağlı olarak kemik yıkımını engellediği gösterilen ilk klinik bozukluktur (Smith et al. 1971). Paget hastalığında görülen kemik ağrısı, kırıklar, iskeletsel deformiteler gibi patolojik özellikler osteoklastların artan sayısının ve aktivitesinin bir sonucudur. Osteoklastları sayıları ve yaşam sürelerini azaltmak ve aktivitesini engellemek suretiyle etkileyen bifosfonatlar bu nedenle günümüzde paget hastalığında kullanılan en önemli ilaç grubudur (Lyles et al. 2001). Bifosfonatların insanlarda tedavi amaçlı kullanılmasından sonra kalsifikasyon inhibitörü olarak da kullanım alanı bulduğu

görülmüştür. İlk olarak etidronat, fibröz displazi (miyozitis ossifikans) hastalarında kalsifikasyonu önlemek amacıyla kullanılmıştır (Smith et al. 1976). Ayrıca bifosfonatlar total kalça eklemi protezi ve spinal kord yaralanmaları gibi vakalarda ektopik kalsifikasyonu önlemek amacıyla kullanılmaktadır (Sheppard et al. 1974). Bifosfonatların en geniş kullanım alanı dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen osteoporoz tedavisidir. Osteoporoz ileri yaşlarda kemik kırıkları için başlıca risk faktörüdür ve riski düşürmek için etkili bir tedaviye gereksinim duyulmaktadır (Morris and Einhorn 2005). 1990'lı yıllara kadar osteoporoz için kullanılan çok az sayıda tedavi yöntemi varken, son yıllarda osteoporozun önlenmesi ve tedavisinde farklı türde ilaçlar kullanılmaya başlanmıştır. Bifosfonatlar, kemik yıkımını önleyici ilaçlar arasında en önemli sınıf olup alendronat, risedronat, etidronat ve ibandronat osteoporoz tedavisinde sıklıkla kullanılan türleridir (Fleisch 2003). Bifosfonatlar aynı zamanda onkolojide de sıklıkla kullanılan ilaç grubudur. Kanser vakalarında bifosfonat tedavisinin yararlarını araştırmak üzere yapılan klinik çalışmalarda myeloma (Sirohi and Powles 2004), meme (Pavlakakis et al. 2005), prostat (Khan and Partin 2003) ve akciğer (Price 2004) kanserlerinin kemik metastazı vakalarında bifosfonatların patolojik kırıkları, spinal kord sıkışmalarını ve malign hiperkalsemiyi önlediği gösterilmiştir. İnsanlarda görülen pek çok kanser türünde hiperkalsemi ve kemik yıkımı söz konusudur. Bu durumun tümörlerden salınan paratiroid hormon ilişkili protein (PTH-rP) veya interlökin 6 (IL-6) gibi kemik yıkımına neden olan sitokinlerin kemik yıkımını artırmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (De la Mata et al. 1995). Yapılan çalışmalarda kemik tümörleri tedavisinde kullanılan çeşitli bifosfonatların, PTH-rP ve IL-6 sitokinlerinin salınımını ve bu sitokinlerin neden olduğu serum kalsiyum seviyesindeki artışı engellediği gösterilmiştir (Su et al. 1993, Derenne et al. 1999).

Son olarak osteogenesis imperfekta gibi osteolitik kemik hastalıklarında da bifosfonatların kullanıldığı bildirilmektedir (Uveges et al. 2009).

#### **2.3.4. Farmakodinamik ve Farmakokinetik Özellikleri**

Bifosfonatlar özelliklerine göre oral veya intravenöz (IV) yoldan kullanılabilen ilaçlardır. Genel olarak oldukça düşük biyoyararlanımı olan bifosfonatların barsaktan absorpsiyonlarının da oldukça zayıf olmasına bağlı olarak oral kullanımındaki biyoyararlanımını oldukça düşüktür (%0.6-1) (Mitchell et al. 2001). Bu durumun bifosfonatların düşük lipofilik özelliğe ve gastrointestinal bölge pH'sının lipofilik membranlardan hücrelerarası geçişini engellemesi ile açıklanmıştır (Kimmel 2007). Bifosfonatların kalsiyum ve demirle beraber alınması emiliminde azalmaya neden olduğu için yemekle ve süt ürünleri ile alınması tavsiye edilmemektedir (Cryer and Bauer 2002).

Absorbe edilen bifosfonatların plazmadaki ömürleri oldukça kısa olup, dozun %20-80'i kemik tarafından hızlıca alınır. Kalanı ise, vücutta herhangi bir değişikliğe uğramadan idrarla atılır (Kimmel 2007). Kemik dokusunda bifosfonatların biriktiği alanlar büyük ölçüde kemik yapımı ya da yıkımı lokalizasyonlarıdır. Kemikte depolanan ve kemiğin yeni oluşan tabakaları ile sınırlanan bifosfonatlar, yalnızca depolanmış oldukları kemik bölgesi yıkımı olursa salınım gösterirler (Cremers et al. 2005). Bu nedenle bifosfonatların iskeletsel yarılanma ömürleri oldukça uzun olup insanlarda on yıldan daha uzun olabilir (Fleisch 2003).

#### **2.3.5. Toksik ve Yan Etkileri**

Bifosfonatların kullanımları sonucu ortaya çıkan toksik etkiler bifosfonat türüne bağlı olarak değişiklik göstermekle beraber, oldukça nadir görülür. Bu durumun bifosfonatların kalsifiye dokular içine hızlı geçişleri ve dolaşımda kısa süre bulunmalarına bağlı olduğu düşünülmektedir (Kimmel 2007).

Akut toksisite genellikle hipokalsemi şeklinde görülür ki, bu durum bifosfonatların kalsiyum ile kümelenmesinin iyonize kalsiyumda azalmaya neden olmasına bağlıdır. Kronik toksisite diğer fosfat ve polifosfatlarda da görüldüğü gibi genellikle ilk olarak böbreklerde görülür (Alden et al. 1989, Diel et al. 2007). Bu etki



yüksek dozlar uygulandığında meydana gelir ve yüksek dozlar alınmaya devam edilirse diğer organlarda da hücresel değişiklikler görülmeye başlanır (Diel et al. 2007).

Bifosfonatların bildirilen yan etkileri genellikle gastrointestinal sistem (GİS) üzerinedir. Oral kullanılan bifosfonatlar mide bulantısı, kusma, dispepsi, gastrik ağrı, diyare, özofagal reflü ve bazen ülsera neden olabilir (De Groen et al. 1996, Cryer and Bauer 2002). Bu yan etkiler hastanın ilacı yeterli miktarda su ile alması ile azalırken ilacın alımından sonra özofagal reflüyü en aza indirmek amacıyla uzanmaması önerilir.

Bifosfonatların IV kullanılan türlerinin ise vücut sıcaklığında 1-3 °C artış ve beraberinde nezle benzeri yan etkilere neden olabildiği bildirilmiştir. Bu semptomlar 24-48 saat içinde en üst düzeye çıkar ve üç gün içerisinde kaybolur (Adami and Zamberlan 1996). Bu değişikliklerin mekanizmasının makrofajların uyarılması ile IL-6 ve tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) salınımı ve bunların plazmada artması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (Sauty et al. 1996, Dicuonzo et al. 2003).

Bunun yanısıra, bifosfonat kullanan bazı hastalarda oküler yapılarda enflamasyon, allerjik reaksiyon ve karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk gibi yan etkiler de bildirilmiş; ancak oldukça az görülen bu etkilerin ilacın bırakılması ile ortadan kalktığı belirtilmiştir (Lieberman 2006).

### **2.3.6. Bifosfonat Kullanımına Bağlı Osteonekroz**

Son yıllarda bifosfonatların kullanım alanı ve sıklığındaki artış ile birlikte maksilla ve mandibulada ağrılı kemik nekrozları görülmeye başlanmıştır. Marx (2003) ve Miglorati (2003) tarafından ilk kez rapor edilen osteonekrozlar başlangıçta ender görülen bir komplikasyon olarak değerlendirilse de, özellikle nitrojen içeren IV bifosfonatların kullanımı ile çene kemiklerinde benzer nekrozların görülmeye devam etmesi ile artış göstermiştir (Miglorati et al. 2006, Mariotti 2008, Manfredi et al. 2011). Marx et al. (2005) tarafından yapılan araştırmada hastaların %26'sının IV pamidronat, %40.3'ünün IV zoledronat, yalnızca %2.5'inin ise oral bifosfonatlardan

alendronat kullandığı kaydedilmiştir. Daha güncel bir çalışmada ise bifosfonat kullanımına bağlı osteonekrozun büyük ölçüde onkoloji hastalarında kullanılan yüksek etkili IV bifosfonatların kullanımı sonrası ortaya çıktığı bildirilmiştir (Bagan et al. 2009). Bu sonuçlara göre oral yoldan kullanılan bifosfonatların IV bifosfonatlara göre osteonekroz meydana gelme riskine karşı daha güvenli olduğu ileri sürülmektedir (Bagan et al. 2009).

### **2.3.7. Bifosfonatların Kırık İyileşmesi Üzerindeki Etkileri**

Osteoklastların kemiğin yeniden şekillenmesi için zorunlu olduğu, kemik büyümesi, gelişmesi ve tamiri ile ilişkili olduğunun anlaşılmasıyla bifosfonat kullanımının osteoklast aktivitesini engellemesi ve kemik yapım yıkım döngüsünü yavaşlatması önem kazanmıştır. Bifosfonatlar üzerinde yapılan deneysel ve klinik çalışmalar bifosfonatların kemik yapısı ve dayanıklılığı üzerinde olumlu etkiye bulunduğunu göstermesine rağmen (Azuma et al. 1998, Itoh et al. 2004, Diaz Curiel et al. 2008), uzun süre yüksek dozda kullanılan bifosfonatların kemik yapım yıkım mekanizması üzerindeki etkisi dolayısıyla kemik yapısını zayıflattığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Flora et al. 1981, Mashiba et al. 2000). En sık sorulan sorulardan biri bifosfonatların kırık iyileşmesini etkileyip etkilemediğidir. Flora et al. (1981) tarafından yapılan bir araştırma, yüksek doz ilk jenerasyon bifosfonatlardan etan-1-hidroksil-, 1-difosfonat (EHDP) verilen köpeklerde kemik mineralizasyonunun yavaşladığı ve kırık iyileşmesinin geri dönüşümü olmayacak şekilde engellendiği gözlenmiştir. Ancak sonraki yıllarda yüksek etkili ve az toksik bifosfonatların kullanımının kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilemediği bildirilmiştir (Nyman et al. 1993). Sıçanlarda klodronatın kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada klodronat kırık iyileşme bölgesinde yeni kemik yapımını etkilememiş, kırık meydana gelmesinden 2 ay sonra alınan örneklerde kallus bölgesinin kalsiyum içeriğinin klodronat verilmeyen gruba göre daha yüksek olduğu izlenmiştir (Nyman et al. 1993).

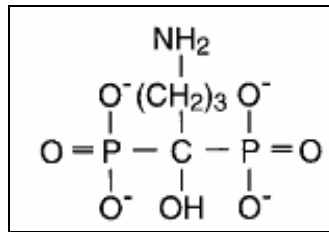
Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda bifosfonatların kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediği de gösterilmiştir. Little et al. (2001) tarafından tavşan

tibiasında distraksiyon osteogenezi modeli kullanarak yapılan araştırmada, tavşanlara tek doz IV pamidronat verilmiş, 42 gün sonra alınan örneklerde pamidronat alan grupta kemik mineral yoğunluğu, kemik mineral içeriği ve kemiğin mekanik özelliklerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir. Selvi (2008) tarafından yapılan araştırmada da, sıçan mandibulalarında kırık oluşturulmuş ve postoperatif birinci haftanın sonunda tek doz IV zoledronik asit uygulanmasını takiben 6. haftada elde edilen örneklerde zoledronik asitin kırık iyileşmesi üzerinde olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Bu sonuçlar zaman içerisinde geliştirilen bifosfonatların olumsuz etkilerinin azaldığını göstermekle beraber günümüzde bifosfonatların kırık iyileşmesi üzerindeki etkisinin hangi yönde olduğu tartışılan bir konudur.

### 2.3.8. Alendronat Sodyum

Alendronat nitrojen içeren ikinci jenerasyon bir bifosfonattır. Kimyasal olarak 4-amino-1-hidroksibtiliden-1,1-bifosfonat (şekil 3) olarak ifade edilen bileşik suda çözünen bir yapıya sahiptir (Fleish 1998).



şekil 3: Alendronatın kimyasal yapısı (Fleish 1998)

Alendronat, FDA tarafından onaylanan ve kemik yıkımının grldğu pek çok kemik hastalığının tedavisinde geniş kullanım alanı bulunan bir ilaçtır (Perez Lopez 2004). Piyasada bulunan Fosamax®, Bonemax®, Osteomax®, Andante® gibi ilaçların etken maddesi alendronat sodyumdur.

Alendronat oral yoldan kullanılan bir ilaçtır ve diğer bifosfonatlarda da olduğu gibi emilimi oldukça zayıftır (Gertz et al. 1995). Hastaların a olduğu sabah

saatlerinde herhangi bir yiyecek ve içecek almaması emilimi artırır. Buna rağmen GIS yan etkilerinin düşük görülme sıklığında olduğu bildirilmiştir (Cryer et al. 2005).

Alendronat, tıp ve diş hekimliğinde insan ve hayvan çalışmalarında sık kullanılan bir ilaçtır. Alendronatın osteoporoz hastalarında gösterilen klinik etkisi kemik mineral densitesini artırma ve buna bağlı olarak kemiklerde kırık meydana gelme riskini azaltma yönünde olmuştur (Lieberman et al. 1995). Ovaryumları çıkarılarak osteoporoz oluşturulan sıçanlarda alendronatın iskelet sisteminde osteoporoza bağlı kemik yıkımı ve kemik yüzeyi değişikliklerini önlediği gösterilmiştir (Pytlík et al. 2004).

Alendronat kullanımının kırık iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışma, kırık oluşumunun öncesinde ve sonrasında oral yoldan alendronat verilen köpeklerde kemik yapımının ve mineralizasyonunun engellemediğini, normal kemik iyileşmesinin gerçekleştiğini ve iyileşen kemik dokusunun mekanik özelliklerinin olumsuz yönde etkilenmediği bildirmiştir (Peter et al. 1996). Bu konuda yapılan çalışmaların bazılarında alendronat kullanımının kırık iyileşmesi üzerinde olumlu etkisinin olduğu rapor edilmiştir. Küçük'ün 2007 yılında yaptığı tez çalışmasında lokal ve sistemik alendronat kullanımının sıçan mandibuler distraksiyon osteogenezis modelinde kemik mineral yoğunluğunu artırdığı ayrıca yeni oluşan rejenere kemik miktarında ve osteoblast sayısında artışa yol açarken, osteoklast sayısında azalmaya neden olduğunu bildirilmiştir (Küçük 2007). Alendronatın kırık iyileşmesinde özellikle mineralizasyonu olumsuz etkilediğini ileri süren güncel bir araştırmada (Saito et al. 2010), sıçanlara verilen alendronatın kemik yapım mekanizmasını yavaşlatmasına bağlı olarak kemik mineralizasyonunda azalmaya ve örgü kemiğin lameller kemiğe dönüşümünü engelleyerek kallus dokusunun yeniden şekillenmesinde gecikmeye neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu çalışmada kırık alanında geniş kallus dokusu oluşumunun örgü kemiğin lamellar kemiğe dönüşümde meydana gelen gecikmeyi telafi etmek amacıyla meydana geldiği düşünülmüştür.

## 2.4. K Vitamini

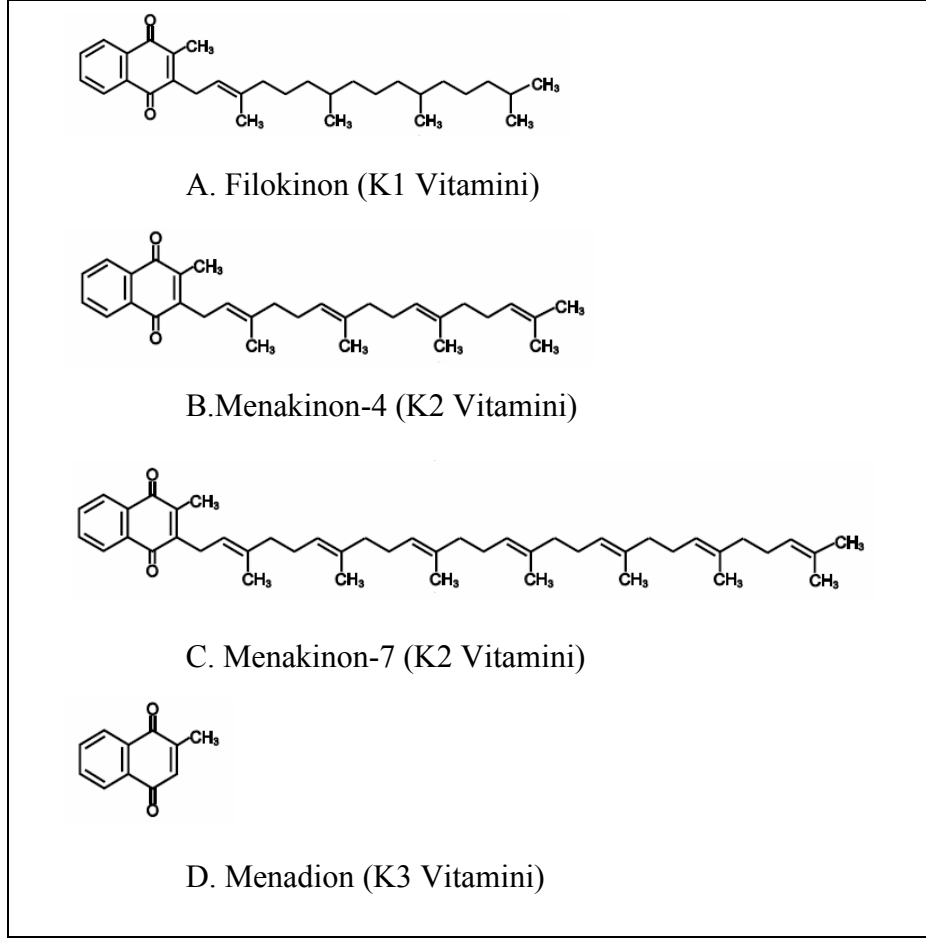
K vitamini, yağda çözünen bir vitamin olup naftokinonlar olarak adlandırılan bileşiklerin bir grubudur. K vitamini ilk kez Danimarkalı bilim adamı Henrik Dam tarafından 1935 yılında bulunmuştur (Dam 1935 a,b). Dam, yağsız diyetle beslenen tavukların deri altı ve kas içi kanamalar nedeniyle öldüğünü, yeşil yapraklı bitkiler verilen tavuklarda ise kanama olmadığını belirlemiştir. Böylece besinlerde kanamayı önleyen bir vitaminin olduğunu keşfetmiş ve bu vitamini koagülasyondan köken alan K vitamini ismini vermiştir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile K vitamininin farklı alt grupları (Şekil 4) izole edilmiştir (Almquist 1975).

K vitamininin üç alt grubu bilinmektedir:

K1 vitamini (Filokinon), 2-methyl-1,4-naftokinon çekirdeği ve bir lipofilik zincir içerir. Ağırlıklı olarak yeşil bitkilerde ve bitkisel yağlarda bulunur.

K2 vitamini (Menakinon), değişik uzunluklarda izoprenoid yan zinciri içeren bir çok bileşikten oluşan bir gruptur. Fermantasyon yapan mikroorganizmalar ve barsak bakterileri tarafından üretilir. Hayvansal kaynaklı yiyeceklerde ve peynir gibi fermente ürünlerde bulunur.

K3 vitamini (Menadion), sentetik bir bileşiktir. Kimyasal yapı olarak K2 vitamininin izoprenoid zinciri içermeyen türüdür.



Şekil 4 : K vitamini türlerinin kimyasal yapısı (Shearer and Newman 2008)

#### 2.4.1. K Vitamini Gereksinimi

K vitamininin günlük gereksinimi, Dünya Sağlık Örgütü ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004 ) tarafından Tablo 3’de belirtildiği şekilde rapor edilmiştir.

Tablo 3: Yaşa göre günlük K vitamini ihtiyacı

Yaş	Günlük Gereksinim ( $\mu\text{g/gün}$ )
0-6 ay	5
7-12 ay	10
1-3 yaş	15
4-6 yaş	20
7-9 yaş	25
10-18 yaş (Adolesan)	35-55
19-65 yaş (Kadın)	55
19-65 yaş (Erkek)	65
65+ yaş (Kadın)	55
65+ yaş (Erkek)	65

Günlük K vitamini ihtiyacı yeni doğanda nispeten fazlaca ( $1.5 \mu\text{g/kg}$ ) olup diğer yaş gruplarında yaklaşık  $1 \mu\text{g/kg}$ 'dır. Bu değer K vitamininin bir çok besinde bulunduğu ve bunun yanısıra barsak bakterileri tarafından da sentez edildiği göz önüne alınırsa oldukça düşük bir değerdir. Bu nedenle sağlıklı bireylerde K vitamini eksikliği sık rastlanan bir durum değildir. Ancak K vitamini antagonisti ilaçların uzun süre kullanımı, çölyak hastalığı, kolestatik hastalıklar, malabsorbsiyona neden olan hastalıklar gibi durumlar K vitamini eksikliğine neden olabilmektedir (Zempleni et al. 2007).

#### 2.4.2. K Vitaminin Emilimi ve Dokulara Taşınması

Diyetle alınan K vitamini, ince bağırsağın üst kısmından yağlarla birlikte emilerek herhangi bir değişikliğe uğramadan lenfatik dolaşıma dahil olur. Lenfatik sistemde safra ve pankreas sıvılarının bulunması emilimin en yüksek seviyede olmasını sağlar (Shearer et al. 1996). Yiyeceklerin içerisinde alınan K vitamini emiliminin daha az olduğu ileri süren çalışmalar olsa da (Garber et al. 1999), diyetteki yağların K vitamininin emilimini artırdığı belirtilmektedir (Booth and Suttie 1998).

Emilen K vitamini kısa süre içerisinde kana, oradan da hızlıca dokulara taşınır. Oral yoldan alınan K1 vitamininin alımından 30 dakika sonra plazmada tesbit

edildiği, 2-4 saat içerisinde en üst seviyeye ulaştığı, 24 saat içerisinde de en yüksek seviyenin %10-20'sine gerilediği gösterilmiştir (Shearer et al. 1970).

řilomikronlar ve dűřük densiteli lipoproteinler aracılıđı ile K vitamini karaciđer, dalak ve kemik iliđinde bulunan reseptör tařıyıcı hűcrelerin dolařımdaki lipoproteinele bađlanması ile bu dokulara tařınır (Kohlmeier et al. 1996). K vitamininin dokulara dađılım miktarı tam olarak bilinmemekle birlikte en çok karaciđerde depolanmaktadır. Kortikal kemiđin de önemli bir K vitamini deposu olduđu bilinmektedir (Kohlmeier et al. 1996, Shearer and Newman 2008). Karaciđerde depo edilen K vitamininin bűyűk bir kısmı K2 vitaminidir. Bu durumun karaciđerde depo edilen K1 vitamininin oldukça labil olmasına, 3 gűn içerisinde karaciđer konsantrasyonunun %25'ine kadar gerilemesine bađlı olduđu dűřűnűlmektedir (Usui et al. 1990). Kemik dokusunda ise, karaciđer dokusunun tersine ađırlıklı olarak bulunan vitamin K1 vitaminidir. Kemik dokudaki K vitamininin depo edilme sűresi tam olarak bilinmemektedir (World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004).

#### **2.4.3. K Vitamini Yıkımı ve Atılımı**

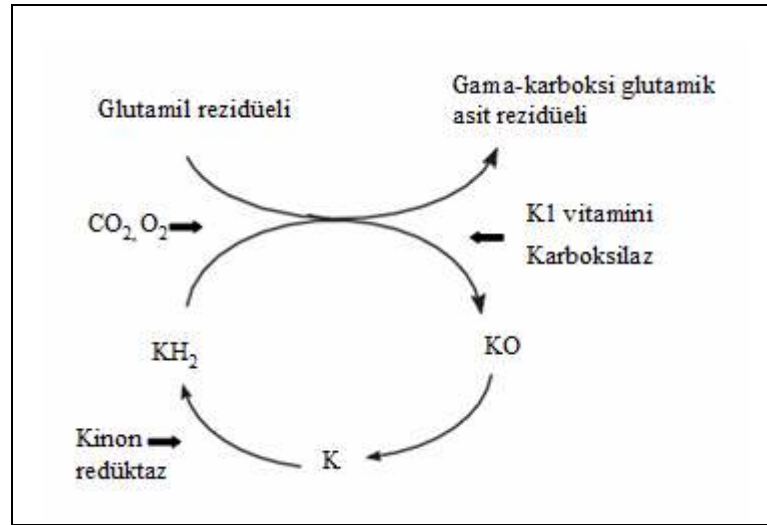
K vitamininin katabolik transformasyonundan karaciğer sorumludur. K1 vitamininin yıkılarak atılma sűresi K2 vitaminine göre kısadır. Alınan K1 vitamininin yaklaşık %20'si idrarla, %40-50'si safra aracılığılıyla feçes ile atılır (Shearer et al 1974). Bu sonuçlar, vűcuttaki K1 vitaminini depolarının sűrekli takviye edildiğini göstermektedir (World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations 2004).

#### **2.4.4. K Vitaminine Bağlı Karboksilasyon Reaksiyonu**

K vitamininin, izole edilmesinden sonra bazı koagűlasyon faktörlerinin biyolojik aktivitesi için gerekli bir vitamin olduđu kabul edilmiřtir. Ancak bu önemli



biyolojik etkinin mekanizması araştırılınca K vitamininin asıl önemi, vücuttaki bazı proteinlerde bulunan spesifik glutamil rezidüelinin gama karboksiglutamil rezidüeline dönüşümünden sorumlu, mikrozomal bir enzim olan karboksilaz enzimi için kofaktör rolünün tanımlanması ile ortaya çıkmıştır (Mack et al. 1976). Karboksilasyon reaksiyonu adı verilen bu dönüşüm reaksiyonu, protein moleküllerine kalsiyuma bağlanma özelliği kazandırır ki, bu da proteinlerin biyolojik aktivitesi için çok önemlidir (Mack et al. 1976, Berkner 2005). Karboksilasyon reaksiyonu hücrelerin endoplazmik retikulumunda meydana gelir. Dietle alınan K vitamini kinon formundadır ve dokuda indirgenerek hidrokinon formuna döndürülerek aktif hale gelir ( $KH_2$ ) ve karboksilaz için kofaktör görevi yapar. Hidrokinon okside olarak karboksilasyon için gerekli enerjiyi sağlar ve reaksiyon sonunda K vitamininin epoksit formu ortaya çıkar (KO). Epoksit formu daha sonra epoksit redüktaz tarafından tekrar kinon formuna indirgenir (Şekil 5) (Berkner and Runge 2004, Stafford 2005).



Şekil 5 : Karboksilasyon döngüsü (Berkner and Runge 2004)

#### 2.4.5. K Vitaminine Bağımlı Proteinler

Uzun yıllar K vitamininin tek fonksiyonunun koagülasyon faktörleri üzerindeki etkisi ile sınırlı olduğu düşünülmüş ancak daha sonra kemik, kan, kıkırdak, dentin,

sement, akciğer, böbrek, nöral dokular gibi vücudun çeşitli dokularında da K vitamini bağımlı proteinler olduğu tesbit edilmiştir (Price et al. 1981). Günümüzde en az 14 farklı K vitaminine bağımlı protein olduğu bilinmektedir. Bu proteinlerin içerisinde primer sentez yeri karaciğer olan 4 prokoagülan (faktör VII, IX, X ve protrombin) ve 3 antikoagülan protein (protein C, protein S ve protein Z) bulunmaktadır. İlave olarak, kemik ve ekstraselüler matriksin 2 proteini (osteokalsin (OC) ve matriks Gla proteini), büyüme önleyici spesifik protein 6 (Gas6) gibi çok sayıda farklı döngüde görev alan proteinler (Berkner and Runge 2004), fonksiyonları henüz tam olarak tanımlanamamış olan transmembran Gla ailesinden 4 membran proteini (PRGP1, PRGP2, TMG3, TMG4) (Kulman et al. 2001) bulunmaktadır.

#### **2.4.5.1. Kemikte Bulunan K Vitaminine Bağımlı Proteinler**

Kemikte şu ana kadar tanımlanmış K vitaminine bağımlı üç protein bulunmaktadır. Bunlar OC, matriks Gla proteini ve protein S'tir (Hauschka et al. 1989). Bu proteinlerin rolleri tam olarak anlaşılmasa da içerdikleri ve proteinlerin biyolojik aktiviteleri için esansiyel olan Gla rezidüellerinin kalsiyum iyonlarına yüksek afinite gösterdikleri belirlenmiştir. Karboksile olmayan proteinler kalsiyuma düşük bağlanma özelliği gösterirler ve bu nedenle düşük biyolojik aktiviteleri söz konusudur (Stanley et al. 1999).

OC, kemikte en çok bulunan ve kemik matriks formasyonu sırasında osteoblastlar tarafından üretilen bir proteindir. Bu protein, üç adet Gla rezidüelini içeren küçük bir proteindir ve kemiğin organik matriksi, dentin ve diğer mineralize dokularda bulunur (Hauschka et al. 1989, Weber 2001). OC'nin osteoblast regülasyonu ve hidroksiapatit kristallerinin büyümesinde görev aldığı düşünülmektedir (Galli and Caniggia 1984). Yapılan çalışmalar vücuda K vitamini alınımındaki farklılığın OC'nin karboksilasyon seviyesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Sokoll and Sadowski 1996). Bu nedenle karboksile olmamış OC, K vitamini seviyesinin duyarlı bir belirteci olarak kabul edilmektedir.

Matriks Gla proteini, kemik ve kıkırdak ile ilişkili bir proteindir ve beş Gla rezidüeli içerir (Price and Williamson 1985). Matriks Gla proteininin kemik yapımı

ve mineralizasyonunda rolü olduğu ve arter kalsifikasyonunu engellediği düşünülmektedir (Proudfoot and Shanahan 2006).

Protein S ise esas olarak koagülasyonda rol alan bir proteindir; ancak daha sonra protein S'nin insan kemik matriksinde de bulunduğu ve osteoblast benzeri hücrelerden salgılandığı gösterilmiştir (Maillard et al. 1992). Kongenital protein S defekti bulunan hastalarda osteopeninin görülmesi, kemik yapım yıkım döngüsünde bu proteinin rolü olduğu iddialarını güçlendirmekle birlikte kemikteki rolü halen tam olarak bilinmemektedir (Maillard et al. 1992, Proudfoot and Shanahan 2006).

#### **2.4.6. K1 Vitamini Kemik Dokusu Üzerindeki Etkileri**

Literatürde K vitamini ile kemik dokusu arasındaki ilişkiye dair bildirilen ilk rapor Bouchaert and Said (1960)'in K vitamininin tavşanlarda kırık iyileşmesini hızlandırdığını bildiren çalışmasıyla ortaya konmuştur. İlerleyen yıllarda yapılan bir başka çalışmada hamileliğin ilk üç ayında K vitamini antagonisti ilaç kullanan annelerin doğan çocuklarında ciddi kemik malformasyonları bulunduğu bildirilmiştir (Pettifor and Benson 1975). Daha sonra Hart et al. (1985) osteoporoz hastası olan bireylerde serum K1 vitamini seviyesinin osteoporoz hastası olmayan kişilere göre daha düşük olduğunu tesbit etmiştir. Kırık meydana gelmesini takiben serum K1 vitamini seviyesi ölçümü yapılan çalışmalar, kırık ve K1 vitamini arasında da bir ilişki olduğunu ileri sürmüştür. Bitensky et al. (1988) el bilek kemik kırığı sonrası ölçülen K1 vitamini seviyesinin düşük olduğunu, pelvis, femur gibi nispeten daha büyük kemik kırıklarında K vitamini seviyesi düşüşünün nispeten daha uzun süre devam ettiğini göstermiştir. Hodges et al. (1993), kalça kırığı meydana gelen hastalarda serum K1 ve K2 (menakinon-7 ve menakinon-8) vitamini düzeyinin kırık meydana gelmemiş kişilere göre düşük olduğunu rapor etmiştir. Cham et al. (1999) tarafından yapılan diğer bir çalışmada travmatik kalça kırığı olan hastaların kırık meydana gelmesinden itibaren 10 gün içerisinde serum K1 vitamini konsantrasyonunda anlamlı azalma olduğu bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar, K1 vitamininin kemik dokusundaki K vitaminine bağımlı proteinlerin karboksilasyonunda gerekli olduğu ve bu nedenle kırık bölgesinde iyileşme devam

ettiği sürece kullanılmak üzere serumdan alındığı şeklinde yorumlanmıştır (Bitensky et al. 1988, Hodges et al. 1993, Cham et al. 1999).

Bu çalışmalar dietle K vitamini alımının kemik üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik yeni çalışmalara temel teşkil etmiştir. Yaşları 38 ile 63 arasında değişen 72,327 kadın üzerinde yapılan bir araştırmada günlük yaşamlarında 109 µg'dan az K1 vitamini aldığı tesbit edilen bireylerdeki kalça kırığı riskinin, günlük yaşamlarında 109 µg'dan daha fazla K1 vitamini alımı olan bireylere göre %30 daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Feskanich et al. 1999). Booth et al. (2000) tarafından ileri yaşlardaki 888 kadın ve erkek üzerinde yapılan çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiş, K1 vitamininden düşük dietle beslenen kişilerde kalça kırığı görülme sıklığında artış olduğu rapor edilmiştir. Booth et al. (2003) tarafından yapılan bir başka araştırmada ise düşük K1 vitamini içeriği olan diyet ile beslenen bireylerdeki femur boynu kemik mineral densitesi (KMD) ölçümü sonuçlarının K1 vitamininden zengin diyetle beslenen kişilere göre nispeten az olduğu bildirilmiştir.

K1 vitamini ile kemik arasındaki bu etkileşimin açıklığa kavuşması için yapılan çalışmaların bir kısmında da kemik yapım ve yıkım parametreleri kullanılmıştır. Martini et al. (2006) serum kemik yıkım parametrelerinin K1 vitamininden düşük diyetle beslenen kişilerde, normal K1 vitamini diyetiyle beslenenlere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Serum kemik yapım parametrelerinde ise herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Kalkwarf et al. (2004) yaşları 3 ile 16 arasında değişen kız çocuklarında serum K1 vitamini seviyesi yükseldikçe, kemik yıkım parametresinde düşüş olduğunu bildirmiştir. Ancak kemik yapım parametresi ile serum K1 vitamini seviyesi arasında bir ilişki tesbit edilmemiştir. Braam et al. (2003) ise diyetle K1 vitamini verilen kişilerde serum karboksile olmamış OC seviyesinde düşüş gözlerken, kemik yapım ve yıkım parametrelerinde anlamlı bir değişiklik olmadığını rapor etmiştir. Bu K vitamininin kemik sağlığını korumada önemli olduğunu ortaya koymaktadır ve K1 vitamininin kemik dokusu üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar güncelliğini korumaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Deney Hayvanları

Sunulan araştırma prospektif, rastgele ve tek kör olarak planlandı. Araştırmada kullanılan 60 adet Wistar albino, 12 aylık yetişkin erkek sıçan SDÜ Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Sıçanlar, her bir kafeste beş adet olmak üzere tabanı talaş ile kaplı Eurotype 4 polikarbon kafeslere (Radon®, Ankara, Türkiye) yerleştirildi. Araştırma, 21±1 °C sıcaklıkta; %55 bağıl nem oranı; 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık periyodu standardını sağlayacak ortamda gerçekleştirildi. Araştırma süresince deney hayvanlarının standart pelet formundaki sıçan yemi (Poyraz Zirve® S-2, Kütahya, Türkiye) ve musluk suyuna ad libitum olarak ulaşmasına izin verildi.

#### 3.2. Gruplar

Deney hayvanları her grupta 15 sıçan olacak şekilde rastgele dört (4) gruba dağıtılarak kontrol ve çalışma grupları oluşturuldu (Tablo 4). Kontrol grubunu oluşturan birinci grupta yer alan deney hayvanlarına alendronat sodyum (Fosamax®, Merck Sharp & Dohme, İtalya) içermeyen su (Erikli®, Bursa, Türkiye) ve K1 vitamini (Sigma®, Almanya) içermeyen trigliserid yağ (Komili® Zeytinyağı, Balıkesir, Türkiye) verildi. Alendronat grubunu oluşturan ikinci grupta yer alan deney hayvanlarına 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün alendronat sodyum içeren su ve K1 vitamini içermeyen trigliserid yağ, K1 vitamini grubunu oluşturan üçüncü grupta bulunan hayvanlara alendronat içermeyen su ve 12 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda K1 vitamini içeren trigliserid yağ ve son olarak Alendronat ile K1 vitaminin birlikte verildiği dördüncü grubu oluşturan hayvanlara ise, hem 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün alendronat içeren su hem de 12 mg/kg vücut ağırlığı/gün K1 vitamini içeren

trigliserid yağ gavaj yöntemiyle verildi (Resim 6 ve 7). Çalışma süresince hayvanlara fiziksel olarak herhangi bir kısıtlama getirilmedi.

Tablo 4 : Araştırma gruplarını oluşturan Kontrol ve çalışma grupları

Gruplar	n	Alendronat 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün	K1 Vitamini 12 mg/kg vücut ağırlığı/gün	Su ve Yem (ad libitum)
Kontrol	15	-	-	+
Alendronat	15	+	-	+
K1 Vitamin	15	-	+	+
Alendronat ve K1 Vitamini	15	+	+	+

### 3.3. Cerrahi Girişim

Ameliyat öncesi sıçanlar tartılarak kiloları kaydedildi ve genel anestezi için kullanılması gereken ilaç miktarları hesaplandı (ketamin hidroklorür ve ksilazin hidroklorür). Verilen anestetik maddelerden ketamin hidroklorür (Ketasol®, Richterpharma, Avusturya) 90 mg/kg, ksilazin hidroklorür (Alfazyne®, Alfasan, Hollanda) 10 mg/kg olarak intraperitoneal (IP) olarak enjekte edilerek genel anestezi sağlandı (Resim 1).



Resim 1: Genel anestezi için kullanılan ilaçlar

Sıçanların sağ ve sol üst bacak üst yüzeyleri traşlandıktan sonra %10'luk povidon iyot solüsyonu (Poviodeks®, Kimpa, Türkiye) ile silinip dezenfeksiyonu sağlanarak cerrahi girişime hazır hale getirildi (Resim 2).



Resim 2: Operasyon alanının traşlanarak tüylerden arındırılması

Cilt insizyonu yapıldıktan sonra (Resim 3) künt disseksiyonla cilt ve cilt altı yumuşak dokular (fasiya, kas) ve periost geçilerek femura ulaşıldı. Femuru çevreleyen kas ve periost tamamen diseke edildikten sonra osteotomi alanını bu dokulardan izole hale getirmek için araya alüminyum folyo yerleştirildi. Femurda ince fissür frez kullanılarak yapılan osteotomi ile oluşturulan kırık parçalar 1 adet 4 delikli mini plak (Primed®, Ankara, Türkiye) ve 4 adet (7 ve 5 mm uzunluğunda, 1.5 mm çapında) mikro vida (Primed®, Ankara, Türkiye) yardımıyla rigid olarak fikse edildi (Resim 4).



Resim 3: Cilt insizyonu



Resim 4: Osteotomi sonrası kırık parçaların miniplak ve mikrovida ile fikse edilişi

Fiksasyon sonrası cerrahi alan serum fizyolojik ile irrigate edilerek atık dokular uzaklaştırıldı. Kemik yüzeyinden disseke edilen kaslar 3/0 katgüt sutur (Doğsan®, Trabzon, Türkiye), cilt ise 3/0 ipek sutur kullanılarak (Doğsan®, Trabzon, Türkiye) primer dikiş ile suture edildi (Resim 5).



Resim 5: Operasyon alanının dikiş ile kapatılması

Deney hayvanları cerrahi girişimi takip eden 9. haftada sakrifiye edildi.

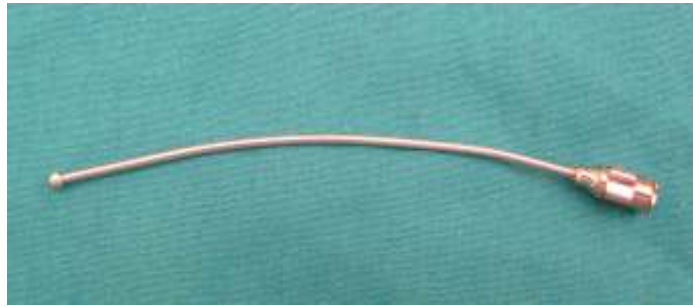


### 3.4. İlaçların Hazırlanması ve Denev Hayvanlarına Verilmesi

Sıçanlara ait oldukları grubun protokolüne göre alendronat sodyum ve/veya K1 vitamini ameliyattan bir gün önce başlanarak 2 hafta süreyle verildi. Böylece ameliyat sırasında alendronat ve K1 vitamininin dolaşımında hazır bulunması sağlandı.

Alendronat solüsyonu, 70 mg alendronat sodyum içeren (Fosamax® (Merck Sharp&Dohme, İtalya) tabletlerden 2 adedi (140 mg), (Resim 8) 70 ml su (Erikli®, Bursa, Türkiye) içerisinde çözündürülerek hazırlandı (2 mg alendronat sodyum/1 ml su). Sıçanların ağırlıklarına göre 2 mg/1ml/kg vücut ağırlığı/gün dozunda oral yoldan gavaj yöntemiyle (Resim 6 ve 7) günde bir defa verildi.

K1 vitamini (filokinon) solüsyonu, 1 g K1 vitamini (Sigma®, Almanya) (Resim 8) yağın özkütlesinin 0.9 g/cm<sup>3</sup> olduğu göz önünde bulundurularak 1.1 ml hacminde olduğu hesaplandı ve 82.2 ml trigliserit yağ içerisinde çözündürülerek 1 ml'de 12 mg K1 vitamini olacak şekilde hazırlandı. K1 vitamini ısı ve ışığa duyarlı olduğu için 2-8 °C'lik muhafaza edilme sınırları içerisinde olan +4 °C'lik buzdolabında ve alüminyum folyo ile kaplı şişede muhafaza edildi. İlaç sıçanlara verilmeden 30 dakika önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve sıçanların ağırlıklarına göre 12 mg/1ml/kg vücut ağırlığı/gün dozunda oral yoldan gavaj yöntemiyle (Resim 6 ve 7) günde bir defa verildi.



Resim 6: Gavaj uygulamasında kullanılan gavaj sondası



Resim 7: Gavaj yöntemi ile sıçanlara alendronat ve K1 vitamini verilışı



Resim 8: Fosamax® (Alendronat Sodyum) ve K1 Vitamini (filokinon)

### 3.5. Postoperatif Takip

Ameliyat sonrası üç (3) gün süreyle tüm sıçanlara enfeksiyon kontrolü için intramuskuler (IM) 5 mg/kg amikasin sülfat/gün (Amikozit® 500 mg flakon, Eczacıbaşı, Türkiye) antibiyotik ve ağrı kontrolü için de IP 1 mg/kg/gün tramadol hidroklorür (Contramal® 100mg ampul, Abdiibrahim, Türkiye) analjezik verildi (Resim 9).



Resim 9: Postoperatif uygulanan amikasin sülfat ve tramadol hidroklorür

İlki ameliyat öncesi olmak üzere, postoperatif dönemde ilaç verilisinin sonlandırıldığı 2. hafta ve sıçanların sakrifiye edildiği 9. haftada deney hayvanlarının ağırlıkları kaydedildi. Kayıt döneminde hiçbir sıçanda çalışma dışı bırakılma kriteri olan ağırlığın %20'sinden fazla kilo kaybı izlemedi. Gün içerisinde yapılan kontrollerde sıçanların genel sağlık durumları (genel güçsüzlük, yem ve su alımında azalma, dispne, cilt ve tüy değişikliği vs.) takip edildi.

### 3.6. Deney Hayvanlarından Kemik Örneği Elde Edilmesi

Postoperatif 9. haftanın sonunda yüksek doz anestezi verilerek sakrifiye edilen deney hayvanlarından femuru çevreleyen yumuşak dokular diseke edilerek femura ulaşıldı. Kırık hattını içine alan femural kemik örneği mikroplak ve mikrovidalar çıkarılarak %10'luk formalin (Merck®, Darmstadt, Almanya) içerisinde histomorfometrik analiz uygulanmak üzere muhafaza edildi.

### **3.7. Kesit Hazırlama Yöntemi**

Elde edilen kemik örnekler, kemik dokusunun histomorfometrik analizine müsaade edecek şekilde histolojik kesit hazırlama aşamalarından geçirilerek hazırlandı. Bu aşamalar sırasıyla:

#### **3.7.1. Fiksasyon ve Formalinden Arındırma**

%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. Gümüş Boyama**

Kemik dokusunda mineralize dokuyu ayırt etmeye yarayan gümüş boyama işlemi için dokular %10'luk gümüş nitrat (Merck®, Darmstadt, Almanya) solüsyonu içerisinde 24 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda doku içerisine alınan gümüş nitratin doku içerisinde tesbitini sağlamak için önce %10'luk formalin daha sonra da sodyum tiyosülfat (Merck®, Darmstadt, Almanya) solüsyonu içerisinde bekletildi. Örnekler akan suda 2 saat yıkanarak dekalsifikasyon işlemine hazır hale getirildi.

#### **3.7.3. Dekalsifikasyon**

Dekalsifikasyon işlemi için boyaya ve kemik dokuya zarar vermeden dekalsifiye etme yeteneği yüksek olan TBD-2 (Merck®, Darmstadt, Almanya) dekalsifiyer solüsyonu kullanıldı. 24 saat bu solüsyon içerisinde bekletilen kemik

örneklerinin kesilebilecek kadar dekalsifiye olanları solüsyon içerisinden alınırken, yeterince dekalsifiye olmayanları bir süre daha bekletildi. Tüm örnekler dekalsifiye olduktan sonra 3-4 saat akan suda yıkandı. Kemik örnekleri otomatik kaset yazıcı cihaz (Thermo Shandon® Microwritten, Pensilvanya, ABD) (Resim 10) yardımıyla üzerlerine örnek numaraları yazılan doku takip kasetleri ile kasetlenerek doku takibi işlemine geçildi.



Resim 10: Otomatik kaset yazıcı cihaz

#### 3.7.4. Doku Takibi

Doku takip işlemi kapalı devre otomatik ototeknikon cihazında (Thermo Shandon® Pathcenter, Pensilvanya, ABD) (Resim 11) gerçekleştirildi ve 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 sırasıyla;

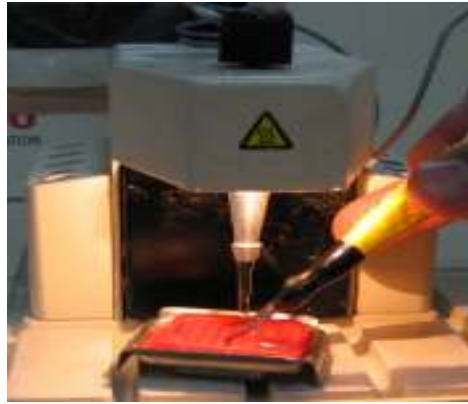
1. %10'luk tamponlu nötral formalin (Merck®, Darmstadt, Almanya) uygulama,
2. Alkol (Fluka®, Buchs, İsviçre) uygulama,
3. Ksilen (Merck®, Darmstadt, Almanya) uygulama ve
4. Parafin (İsolab®, Wertheim, Almanya) uygulamalarından geçirilerek doku takip işlemi sona erdirildi.



Resim 11: Otomatik doku takip cihazı

### 3.7.5. Bloklama

Takip işlemi tamamlanan dokular otomatik bloklama cihazında (Thermo Shandon® Histocenter 3, Pensilvanya, ABD) bloklama işlemine tabi tutuldu (Resim 12). Bu işlem doku takip kaseti (Thermo Shandon®, Pensilvanya, ABD) içerisinde gerçekleştirildi (Resim 12 ve 13). Bloklama sonrası dokular dondurucuda  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu.



Resim 12: Bloklama cihazı ve kaset içerisinde bloklama yöntemi



Resim 13: Kaset içerisinde bloklanmış ve dondurulmuş dokular

### 3.7.6. Kesit Alma

Dondurularak kesit almaya hazır hale getirilen dokulardan tam motorize mikrotom cihazı (Thermo Shandon® Rotary, Pensilvanya, ABD) (Resim 14) yardımıyla osteotomi hattına dik olacak şekilde aksiyel olarak ikiye ayrılan femurun (toplam 2 adet) her bir parçasının kesi yüzeyinden 4 µm kalınlığındaki ilk kesitler elde edildi. Bu kesitler sıcak su banyosuna alınarak dokuların kırışıklığının açılması sağlandıktan sonra lam (İsolab®, Wertheim, Almanya) üzerine taşındı. Lamın üzerine taşınan kesitler etüve (Thermo Shandon® Heraeus Oven, Pensilvanya, ABD) (Resim 15) konularak kurutuldu. Etüv sıcaklığı parafinin erime derecesinden 10 °C daha yüksek ayarlanarak parafinin erimesi ve dokunun lam üzerine fikse olması sağlandı.



Resim 14: Tam motorize mikrotom cihazı



Resim 15: Kesitlerin kurutulması ve lam üzerine fikse edilmesinde kullanılan etüv

### 3.7.7. Hematoksilen Eozin Boyama

Otomatik boyama cihazında (Thermo Shandon® Varistain XY, Pensilvanya, ABD) (Resim 16) gerçekleştirilen boyama işleminde sırasıyla şu işlemler uygulandı:

1. Ksilende bekletme
2. Alkolde bekletme
3. Hematoksilen boyası (Merck®, Darmstadt, Almanya) içinde bekletme
4. Suda yıkama
5. Asit alkol (Fluka®, Buchs, İsviçre) içinde bekletme
6. Suda yıkama
7. Amonyaklı suda bekletme
8. Suda yıkama
9. Eozin boyası (Merck®, Darmstadt, Almanya) içinde bekletme
10. Alkolde bekletme ve
11. Ksilende bekletme





Resim 16: Otomatik boyama cihazı

### 3.7.8. Kesitleri Kapama

Kesitler ksilenden çıkarıldıktan sonra otomatik cihazda (Thermo Shandon® Consul, Pensilvanya, ABD) (Resim 17) üzerine 1 damla entellan (Merck®, Darmstadt, Almanya) damlatılarak lamelle (İsolab®, Wertheim, Almanya) kapatıldı.



Resim 17: Otomatik preperat kapama cihazı

### 3.7.9. Histomorfometrik Analiz

Üzerinde Axiocam MRc (Zeiss®, Jena, Almanya) kamera taşıyan Axioskop 2 plus (Zeiss®, Jena, Almanya) ışık mikroskobu (Resim 18) yardımıyla elde edilen görüntüler bilgisayara aktarıldı ve Axiovision Release 4.7.2 software (Zeiss®, Jena, Almanya) yazılım programı ile histomorfometrik değerlendirilmeye tabi tutuldu.



Resim 18: Axiocam MRc kamera taşıyan Axioskop 2 plus ışık mikroskobu

Her bir kemik örneğinin kırık hattını içine alan ve bu hatta dik olarak oluşturulan kesi yüzeylerinden alınan örneklerden hazırlanan kesitlerde Parfitt et al. (1987) tarafından kullanılan histomorfometrik analiz parametreleri değerlendirildi. Kesitlerden elde edilen ve bilgisayara aktarılan görüntülerde yeni oluşan kemik dokusunda trabeküler kemik alanı (Tb.Ar) ve meduller kemik çapı (Me.Dm) bilgisayar programı yardımıyla seçilerek trabeküler kemik alanı/meduller kemik çapı oranı (Tb.Ar/Me.Dm) hesaplandı. Trabeküler kemik dokusu içerisinde osteoblast alanı (Ob.Ar) mikrometrekare ( $\mu\text{m}^2$ ) cinsinden tesbit edildi. Son olarak trabeküler kemik dokusunda mineralize kemik alanı (Md.Ar) ve osteoid kemik alanı (O.Ar) seçilerek mineralize kemik alanı/osteoid kemik alanı oranı (Md.Ar/O.Ar) hesaplandı.

### 3.8. İstatistik

Araştırmada istatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Science) 15.0 (Chicago, IL, 2006) yazılım paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde her bir gruptaki örnek sayısı 30'dan az olduğu ve varyanslar farklı olduğu için nonparametrik istatistik yöntemi tercih edildi. Gruplar arası histomorfometrik parametrelerin karşılaştırılmasında MannWhitney *U* test, grup içi kilo ölçümlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi uygulandı. Ayrıca grup içi histomorfometrik parametrelerin kendi aralarındaki korelasyon değerlendirilmesinde Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Analiz sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deney Hayvanları

Araştırmaya dahil edilen 60 adet sıçanın 14 adedi genel anestezi komplikasyonu, postoperatif enfeksiyon ve dikişlerini kopararak operasyon sahasını açması (Kontrol grubu= dört (4), Alendronat grubu= üç (3), K1 vitamin grubu= üç (3), Alendronat ile K1 vitaminin birlikte verildiği grup= dört (4)) nedeni ile çalışma dışı bırakıldı. Bunların yanısıra bazı femurlarda fiksasyon problemine bağlı olarak malunion meydana geldiği (Kontrol grubu= 10, Alendronat grubu= 11, K1 vitamin grubu= 11, Alendronat ile K1 vitaminin birlikte verildiği grup= 10), bazılarında da osteomyelit ve femur çevresi dokularında lokal apse formasyonu olduğu görüldü (Kontrol grubu= üç (3), Alendronat grubu= bir (1), K1 vitamini grubu= iki (2) ve Alendronat ile K vitamininin birlikte verildiği grup= bir (1))(Tablo 5). İyileşmeyen femurların tamamında ameliyat sırasında 5 mm'lik kısa vidaların kullanılmış olduğu, normal iyileşme gösteren femurlarda 7 mm'lik uzun vidaların kullanılmış olduğu tesbit edildi. İyileşmeyen femurlar çalışma dışı bırakılırken aynı sıçanın normal iyileşme gösteren diğer femuru çalışmaya dahil edildi. Sonuç olarak kontrol grubunda dokuz (9), alendronat grubunda 12, K1 vitamini grubunda 11 ve alendronat ve K1 vitamininin beraber kullanıldığı grupta 11 olmak üzere 43 femur çalışmaya dahil edildi. Makroskopik olarak kontrol grubunda bir (1), alendronat grubunda üç (3), K1 vitamini grubunda iki (2) ve alendronat ile K1 vitamininin beraber kullanıldığı grupta iki (2) örnekte kırık iyileşmesinin geniş kallus dokusu oluşumu ile gerçekleştiği görüldü. Diğer kemik örneklerinde geniş kallus dokusunun meydana gelmediği görüldü.

Tablo 5: Çalışma dışı bırakılan sıçanlar ve femurların gruplara göre dağılımı (Deney hayvanı veya femur sayısı (n))

	Ölen Deney Hayvanları	Femur			Toplam
		İyileşmeyen			
		Malunion	Osteomyelit	Apse	
<b>Kontrol</b>	4	10	2	1	21
<b>Alendronat</b>	3	11	1	-	18
<b>K1 Vitamini</b>	3	11	2	-	19
<b>Alendronat ve K1 Vitamini</b>	4	10	-	1	19
<b>Deney Hayvanı</b>	14	-	-	-	-
<b>Femur</b>	28	42	5	2	67

#### 4.2. Deney Hayvanı Ağırlığı

Gruplar içerisinde preoperatif 1. günde, postoperatif 2. hafta ve postoperatif 9. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlıkları ve istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 6’da verildi. Elde edilen sonuçlara göre tüm gruplarda postoperatif 2. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlığında preoperatif 1. günde ölçülen deney hayvanı ağırlığına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma tesbit edildi. Postoperatif 9. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlığı postoperatif 2. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlığına göre Kontrol grubu, Alendronat grubu ve Alendronat ile K1 vitaminin birlikte verildiği grupta istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken, K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmedi. Postoperatif 9. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlığı preoperatif 1. günde ölçülen deney hayvanı ağırlığına göre Kontrol ve K1 vitamini grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalma

gösterirken, Alendronat grubu ve Alendronat ile K1 vitaminin birlikte verildiği grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

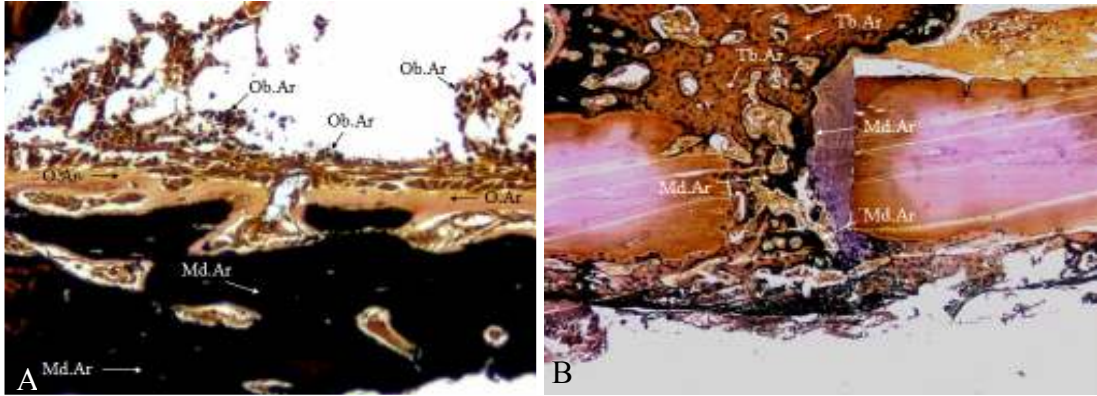
Tablo 6 : Deney hayvanı ağırlık bulguları

Gruplar	Deney Hayvanı Ağırlığı (g)								
	Preoperatif 1. Gün			Postoperatif 2. Hafta			Postoperatif 9. Hafta		
<b>Kontrol</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	
	394,333	37,792	361,222	32,019	<b>0.008*</b>	377,778	34,913	<b>0.024†</b>	
<b>Alendronat</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	
	354,667	39,739	330,417	31,440	<b>0.003*</b>	356,667	37,071	0,666* <b>0.002†</b>	
<b>K1 vitamini</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	
	405,273	47,699	376,455	28,832	<b>0.021*</b>	385,727	34,849	<b>0,023*</b> 0.131†	
<b>Alendronat ve K1 vitamini</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	
	382,364	33,404	347,455	29,480	<b>0.003*</b>	362,091	37,721	0,056* <b>0,008†</b>	

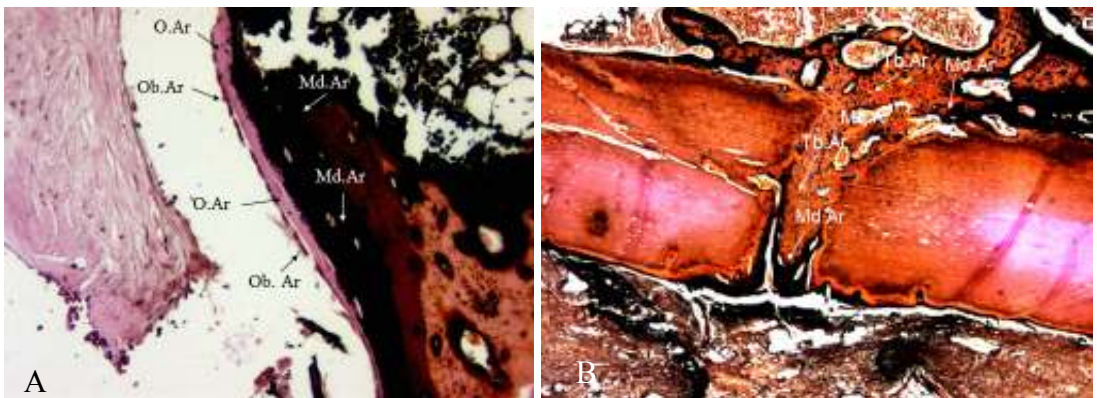
\* Aynı grup içinde preoperatif 1. gün deney hayvanı ağırlığı ile karşılaştırma sonucu istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi, † Aynı grup içinde postoperatif 2. hafta vücut ağırlığı ile karşılaştırma sonucu istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

### 4.3. Histomorfometri

Gruplardan alınan histolojik kesitlere ait resimlerde (Resim 19,20,21,22) trabeküler kemik alanı (Tb.Ar), osteoblast alanı (Ob.Ar), mineralize kemik alanı (Md.Ar) ve osteoid kemik alanı (O.Ar) işaretlenerek gösterilmiştir. Resimlerde meduller boşluklar içeren bölge Tb.Ar, koyu renkli çekirdek içeren oval şekilli hücrelerin bulunduğu bölge Ob.Ar, siyah renkle boyanmış bölge Md.Ar, mineralize kemik alanı ile osteoblast alanı arasında kalan açık renkli bölge ise O.Ar olarak temsil edilmektedir.

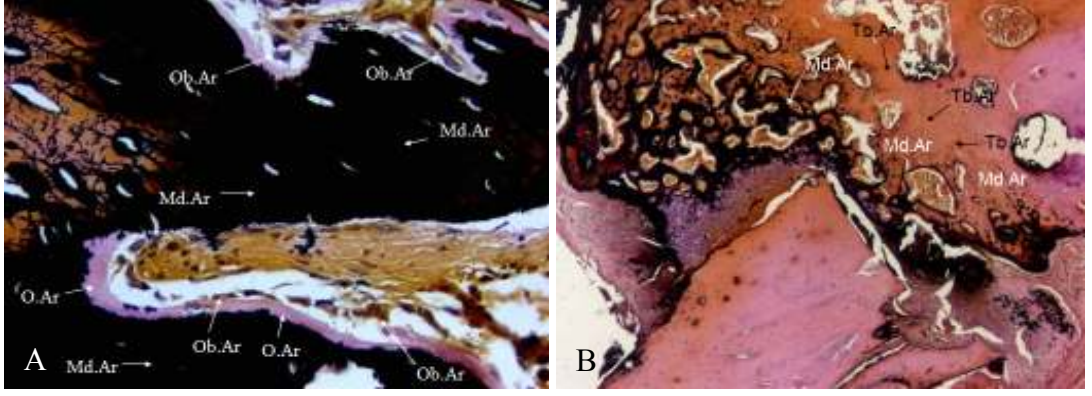


Resim 12: Kontrol grubuna ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE)

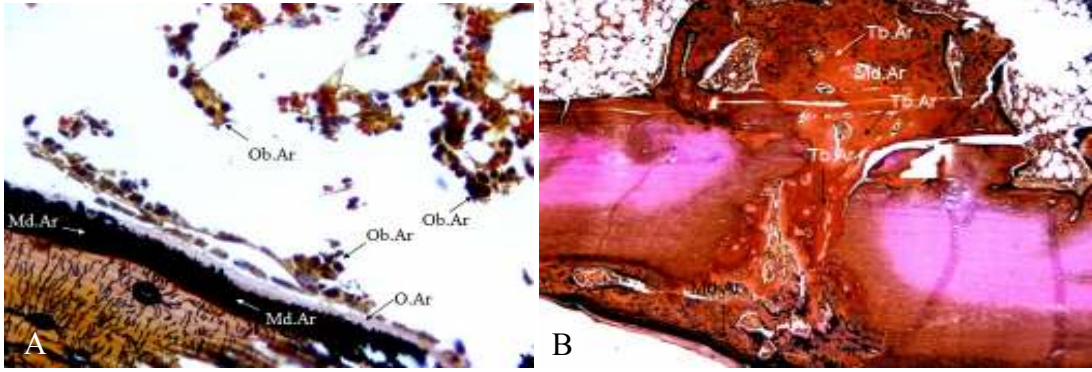


Resim 34: Alendronat grubuna ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE)





Resim 56: K1 vitamini grubuna ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE)



Resim 78: Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği gruba ait histolojik kesit; Tb.Ar (B), Ob.Ar (A), Md.Ar (A,B) ve O.Ar (A) (A: x40, B: x5, gümüş nitrat ve HE)

Araştırmada elde edilen histomorfometrik bulgular ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 7'de verildi. K1 vitamini grubu ve Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği grupta ölçülen Tb.Ar/Me.Dm parametresinde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artış tesbit edildi. Ayrıca Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği grupta ölçülen Md.Ar/O.Ar parametresinde Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Gruplar arasında karşılaştırılan diğer histomorfometrik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilmedi.

Tablo 7: Histomorfometrik analiz bulguları

Gruplar	Histomorfometrik Parametreler								
	Tb.Ar/Me.Dm			Ob.Ar ( $\mu\text{m}^2$ )			Md.Ar/O.Ar		
<b>Kontrol</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>		<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>		<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	
	344,059	274,968		2431,687	2112,490		21,820	23,473	
<b>Alendronat</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>
	469,113	236,186	0,201*	1732,657	1097,537	0,477 *	14,819	12,469	0,227*
<b>K1 vitamini</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>
	636,018	300,828	0,044* 0,110†	1846,644	889,601	0,732* 0,498†	11,786	2,952	0,102* 0,580†
<b>Alendronat ve K1 vitamini</b>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>	<i>P Değeri</i>
	895,071	853,904	0,044* 0,325† 0,622‡	2454,359	1417,696	0,518* 0,097† 0,341‡	10,291	2,106	0,044* 0,902† 0,158‡

\* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi, † Alendronat grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi, ‡ K1 vitamini grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi

Tablo 8 : Histomorfometrik parametreler arası korelasyon tablosu

	Kontrol		Alendronat		K1 vitamini		Alendronat ve K1 Vitamini	
	Tb.Ar/ Me.Dm	Md.Ar/ O.Ar	Tb.Ar/ Me.Dm	Md.Ar/ O.Ar	Tb.Ar/ Me.Dm	Md.Ar/ O.Ar	Tb.Ar/ Me.Dm	Md.Ar/ O.Ar
Kontrol	Tb.Ar/ Me.Dm	r= 0,633 p= 0,067						
	Ob.Ar	r= 0,250 p= 0,516	r= -0,067 p= 0,865					
Alendronat	Tb.Ar/ Me.Dm			r= 0,126 p= 0,697				
	Ob.Ar		r= -0,133 p= 0,681	r= 0,070 p= 0,829				
K1 Vitamini	Tb.Ar/ Me.Dm					r= 0,173 p= 0,612		
	Ob.Ar				r= 0,227 p= 0,502	r= -0,109 p= 0,750		
Alendronat ve K1 Vitamini	Tb.Ar/ Me.Dm							r= 0,236 p= 0,484
	Ob.Ar						r= -0,355 p= 0,285	r= -0,473 p= 0,142

Her bir grupta ölçülen histomorfometrik parametrelerin korelasyonu değerlendirildiğinde hiçbir grupta parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyona rastlanmadı (Tablo 8).

## 5. TARTIŞMA

Alendronat ve K1 vitamininin ayrı ayrı ve birlikte kullanımının sıçanlarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmada kullanılan dozlarda alendronatın kırık iyileşmesi üzerinde etkisi olmadığı, K1 vitaminin trabeküler kemik oluşumunu artırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilediği, Alendronat ve K1 vitamininin birlikte kullanımının ise trabeküler kemik artışına karşılık mineralizasyonda defekte neden olarak kırık iyileşmesini olumsuz etkilediği görüldü.

### 5.1. Deney Hayvanları ve Ağırlık

Sunulan araştırmada kemik örneklerini toplama aşamasında bazı femurlarda malunion, osteomyelit ve apse formasyonu meydana geldiği görüldü (Tablo 5). Femurda meydana gelen bu patolojik bulguların ortaya çıkış nedeni incelendiğinde malunion, osteomyelit ve apse gelişen femurların tamamının fiksasyonunda Wistar türü sıçanların femur çaplarıyla ortalama olarak uyum gösteren (Çadır 2002) 5 mm uzunluğunda vidaların kullanıldığı tespit edildi. Herhangi bir patoloji oluşmaksızın iyileşme gösteren femurların fiksasyonunda ise, Wistar türü sıçanların femur çaplarından daha fazla olan 7 mm uzunluğundaki vidaların kullanılmış olduğu görüldü. Cadir et al. (2008) tarafından 7 mm uzunluğundaki vidalar daha önce kullanılmış ve kırık kemik parçalarının fiksasyonunda başarılı sonuçlar elde edildiği ve çok düşük oranda benzer komplikasyon oluşumu rapor edilmiştir. Araştırmamızda 7 mm uzunluğundaki vidaların yanı sıra, Wistar türü sıçan femur kemiği çapına uygunluğu ve bikortikal uygulanabilme avantajı sağlayabileceği düşüncesiyle, ihtiyaç duyulan bir kısım vida 5 mm uzunluğundaki vidalardan seçildi. Ancak elde edilen bulgular, 5 mm uzunluğunda vidaların sıçanların arka bacaklarına binen kuvvet karşısında kırık parçalarının hareketsizliğini sağlamada yetersiz olduğuna, 7 mm uzunluğundaki vidaların ise daha hareketsiz kırık sabitlemesi ve dolayısıyla daha sağlıklı kırık iyileşme ortamı sağladığına işaret etmektedir.

Preoperatif 1. gün, postoperatif 2. ve 9. haftalarda ağırlığı ölçülen deney hayvanlarının postoperatif 2. haftada ölçülen ağırlıklarının tüm gruplarda preoperatif 1. gün ağırlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı kaydedildi (Tablo 6). Araştırmada yer alan tüm gruplarda görülen bu azalma yapılan cerrahi işlemin girişimsel (invaziv) oluşu nedeniyle sıçanların genel vücut direncinin zayıflamasına bağlı kilo kaybı şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen bulgular Lucke et al.'in 2005 yılında yaptığı araştırma bulguları ile uyumludur. Bu araştırmada sıçan tibiasına intrameduller kirschner teli uygulamasını takiben ameliyat sonrası ilk haftada tüm gruplarda ölçülen deney hayvanı ağırlığında azalma kaydedilmiş, benzer sonuçlar Stuermer et al. (2010)'in sıçan tibialarında bilateral osteotomi gerçekleştirilmesi sonrası tüm gruplarda deney hayvanı ağırlığında azalma olduğunu bildiren çalışmasında da izlenmiştir. Araştırmacılar (Lucke et al. 2005, Stuermer et al. 2010) deney hayvanı ağırlığındaki azalmanın cerrahi girişim ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Postoperatif 9. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlığı postoperatif 2. haftada ölçülen vücut ağırlığına göre Kontrol, Alendronat ve Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken K1 vitamini grubunda görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Tablo 6). Sonuç olarak postoperatif 9. haftada ölçülen deney hayvanı ağırlığı preoperatif 1. gün ölçümleriyle karşılaştırıldığında, Alendronat ve Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülerek bu gruplardaki deney hayvanı ağırlıklarının tekrar ameliyat öncesi değerlere ulaşabildiğini göstermiştir. Bununla birlikte Kontrol ve K1 vitamini gruplarında ise göreceli bir artış söz konusu olmakla birlikte preoperatif 1. gün ölçümlerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma şeklinde ortaya çıkan bir tablo söz konusu olmuştur. Preoperatif 1. gün ölçümlerine göre bu iki grupta tespit edilen azalma, araştırma sürecinde her iki grupta tespit edilen osteomyelit ve apse formasyonu sıklığının diğer gruplara oranla fazla olması sonucu (Kontrol grubu: üç (3), Alendronat grubu: bir (1), K1 vitamini grubu: iki (2), Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği grup: bir (1)) deney hayvanlarındaki sistemik enfeksiyonun yan etkisine bağlanmıştır. Her ne kadar osteomyelit ve apse formasyonu tespit edilen femur kemikleri çalışma dışı bırakılmışsa da herhangi bir patoloji tespit edilmeyen aynı deney hayvanına ait diğer femur çalışma dışı

bırakılmamış ve dolayısıyla ilgili deney hayvanı ağırlığı da istatistiksel değerlendirmeye dahil edilmiştir. Rissing et al. (1985) tarafından yapılan ve sıçan tibialarına stafilokokus aureus implante edilerek deneysel osteomyelit oluşumu sağlanan bir araştırmada, 5 haftalık çalışma süresi sonunda bakteri implante edilmeyen kontrol grubunda deney hayvanı ağırlığı artışı izlenirken bakteri implante edilen gruplarda elde edilen deney hayvanı ağırlığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldüğü bildirilmiştir. Steawart et al (2010) sıçan femurlarında oluşturulan kırık alanına bakteri implante ederek osteomyelit meydana gelmesini sağladığı deney hayvanlarının ağırlıklarında preoperatif olarak ölçülen deney hayvanı ağırlığına göre azalma olduğunu rapor etmiştir. Rissing et al. (1985) ve Steawart et al (2010)'e ait bu bulgular, araştırmamızda elde edilen bulgularla uyumlu olup lokal osteomyelit ve apse formasyonunun sistemik enfeksiyon boyutuna taşınarak deney hayvanı ağırlığında azalma şeklinde ortaya çıktığı sonucuna ulaşılmıştır.

## **5.2. Histomorfometri**

Araştırmamızda incelenen histomorfometrik parametrelerden biri olan Tb.Ar/Me.Dm meduller kemik bölgesinde oluşan mineralize olan ve mineralize olamayan dokuları içeren trabeküler kemik dokusunun oranını göstermektedir. Bu doku kırık sonrası yeni oluşan rejeneratif dokudur. Kırık sonrası görülen iyileşme döneminde kırık alanında kemik dokusu dışında kıkırdak ve fibröz yapıyı da içeren endokondral kemik iyileşmesi uzun kemiklerin iyileşmesinde ağırlıklı olarak görülen kemikleşme tipidir. Çene kemiklerinin oluşumu ve kırık sonrası iyileşmeleri ise genel olarak intramembranöz kemikleşme yoluyla gerçekleşmektedir. Kemikleşme tipleri birbirinden farklı olsa da yapılan araştırma sonucu vücudun herhangi bir bölgesindeki kemik dokusunun iyileşmesi ile ilgili elde edilen bulguların başka bir bölgede meydana gelen kırık iyileşmesi için de geçerli olabileceği düşünülmektedir. Ancak araştırmamızda kırık modeli olarak mandibula yerine femuru tercih etmemizin ana nedeni sıçan mandibulasının açık kırık modeli uygulamak ve mikropalak ile tesbit etmek için oldukça küçük bir kemik olması ve maniplasyon

güçlüğünün önemli bir dezavantaj oluşudur. Bunun yanısıra mandibulaya uygulanacak cerrahi işlem, ciddi bir beslenme zorluğuna yol açarak hayvanlarda genel güçsüzlüğe neden olabilmektedir (Erdoğan 2007). Ayrıca postoperatif dönemde kırık bölgesinin periodontal nedenlerle ağız ortamı ile ilişkili hale geçmesi durumunda bölgede enfeksiyon gelişme riski ortaya çıkmaktadır (Selvi 2008). Uzun kemiklerin maniplasyonlarının kolay olması ve postoperatif dönemde iyileşmenin daha az riskli olması (Özan 2006) gibi avantajlarından dolayı araştırmamızda deneysel kırık modeli sıçan femurlarında gerçekleştirilmiştir.

Medullar alanda oluşan trabeküler kemik miktarı kırık iyileşmesinin sağlıklı süreç gösterip göstermediğinin belirteçidir. Ancak oluşan dokunun miktarı kadar niteliği de önemlidir. Kemik dokusunun histomorfometrik analizinde trabeküler kemik dokusu yalnızca ilgili doku miktarını değil, içerdiği hücreler, mineralize olmuş ve olmamış kemik dokusu gibi bir çok belirtecin de ölçülebilmesine izin vermesi nedeniyle sıklıkla tercih edilir. Sunulan çalışmamızda kullanılan diğer iki parametre olan Ob.Ar ve Md.Ar/O.Ar bahsedilen trabeküler kemik dokuda analizi yapılan parametrelerdir. Ob.Ar kırık bölgesinde proliferen olan ve halen aktif olarak bulunan osteoblast miktarının histomorfometrik olarak ölçülen bir belirteçidir. Trabeküler kemik miktarı kırık iyileşme alanında rejeneratif dokuya özgü ve iyileşme süresince görülen osteoblastların sayısı ve aktivitesi ile ilişkilidir. Dolayısıyla kırık iyileşmesinin büyük ölçüde tamamlandığı 9. haftada trabeküler alanda ölçülebilen osteoblast alanının fazla olması bölgede aktif kemik yapımı sonucu osteoid kemik dokusu üretiminin devam ettiğini göstermektedir. Kemik iyileşme alanına özgü olan bu osteoblastlar kemik iyileşmesi devam ettiği sürece görülür ve iyileşme tamamlandıkça kemik dokusu içerisinde osteositlere dönüşerek yer alır. Kemik yapımı devam ettikçe osteoblastlarca üretilen bu osteoid doku mineralize kemik dokusuna dönüşür. Son olarak bakılan Md.Ar/O.Ar histomorfometrik parametresi trabeküler iyileşme alanındaki mineralize dokunun mineralize olmayan dokuya oranını göstermektedir. Dolayısıyla bu değerin yüksek olması kırık iyileşme modelinde kemik dokusunun hangi oranda mineralize kemik dokusu içerdiğini gösteren histomorfometrik bir parametredir. Kontrol grubunda bu üç parametrenin değeri Tb.Ar/Me.Dm= 344,059±274,968, Ob.Ar= 2431,687±2112,490, Md.Ar/O.Ar= 21,812±23,473 olarak ölçülmüş (Tablo 4.3)



ayrıca makroskopik olarak dokuz femurdan bir femurda geniş kallus dokusu izlenirken, sekiz femurda geniş kallus dokusunun ortadan kalkarak normal kemik formuna dönüştüğü görülmüştür. Kontrol grubunda elde edilen bulgular çalışma gruplarının karşılaştırılacağı referans değerler olarak tesbit edilmiştir. Kontrol grubunda tesbit edilen bu üç parametre arasında hiçbir korelasyon görülmemesi (Tablo 8) genel anlamda bu üç parametrenin birbirlerini doğrudan etkilemediği göstermektedir ki Ob.Ar dışındaki iki parametrenin oransal olarak ölçülmüş olması bunun nedeni olabilir.

Araştırmamızda kırık iyileşmesini değerlendirmek amacıyla kullandığımız histomorfometrik analiz; doku kesitlerinde kemiğin yapım, yıkım ve yapısal parametrelerinin ölçülerek kantitatif değerler elde edilmesini sağlayan, altın standart sayılan en geçerli yöntemdir (Rewell 1983, Parfitt 1988). Elde edilen kantitatif değerlerden hareketle kemik dokusunun ve özellikle yeni oluşan kemiğin kalitesinin değerlendirilmesinde ideal bir yöntem olarak bildirilmiş (Ott 2008) ve kemik gelişimi, kemik yapım yıkım döngüsü ile kemiğin mikromimari yapısının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmıştır (Cao et al. 2000, Pytlik et al. 2004, Carbonare et al 2005, Ogawa et al. 2005, Cao et al. 2007, Saito et al. 2010). Bu yöntem metabolik kemik hastalıklarının teşhisleri ve tedavilerinin etkinliğinin değerlendirilmesinde de oldukça güvenilir bir yöntem olarak bildirilmiştir (Dalle Carbonare and Giannini 2004). Histomorfometrik analiz invaziv bir değerlendirme yöntemi olmakla birlikte kırık iyileşmesinin çeşitli aşamaları ile iyileşme sürecinin doku ve hücre seviyesindeki değişikliklerini değerlendirebilmesi bakımından (Gerstenfeld et al. 2005) günümüzde deney hayvanı çalışmalarında tercih edilen bir yöntemdir.

Araştırmamızda ikinci grubu temsil eden Alendronat grubunda analizi yapılan üç histomorfometrik parametrenin Kontrol grubu ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermediği tesbit edildi (Tablo 7). Bu anlamda deney hayvanlarına 14 gün süreyle oral 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün alendronat verilen bu grupta kırık alanındaki iyileşmenin Kontrol grubundan farklılık göstermediği ve alendronatın sıçanların femur kemiğinde osteotomi yöntemiyle oluşturulan kırık iyileşmesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görülmektedir. Ayrıca Alendronat grubunda 12 femurdan üçünde geniş kırık kallusu görülürken, dokuz

femurda normal kemik formunun oluşarak geniş kallus dokusunun ortadan kalkmış olduğu ve Kontrol grubuna göre farklı bir bulgu ortaya koymadığı dikkat çekmiştir. Bu sonuçlar, alendronatın histomorfometrik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya koymaması ve kallus genişliğinde artışa neden olmaması bakımından Peter et al. (1996) tarafından yapılan bir başka araştırma bulguları ile uyumlu görülmektedir. Köpeklerde radius kemiğinde oluşturulan kırık modelinde postoperatif 16 hafta süreyle oral 2 mg/kg/gün alendronat verilen grupta kontrol grubuna göre histomorfometrik parametrelerden mineral apozisyon oranında (MAR) ve osteoid yüzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasının yanısıra bu grupta kallus genişliğinde de kontrol grubuna göre artış olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada preoperatif 9 haftalık dönemden başlayarak toplamda 25 hafta alendronat verilen grupta kontrol grubuna göre kırık alanındaki kallusun 2-3 kat daha geniş olduğu izlenmiştir. Bu durumun, alendronatın farmakolojik etkisine bağlı olarak kemiğin yeniden şekillenmesinde yavaşlama ile uyumlu olduğu düşünülmüştür. Elde edilen bu sonuç bizim çalışmamızla ilişkili olmayıp alendronatın preoperatif dönemde verilmeye başlanarak kırık meydana geldiği sırada kanda bulunmasının ve/veya uzun süreli kullanımının bu tarz bir etkiye neden olabileceğini akla getirmektedir. Her ne kadar klinik olarak meydana gelen kırık vakalarının önceden tahmin edilmesi ve kırık meydana gelmeden önce ilaç verilmesi mümkün olmasa da kırık görülme sıklığının fazla olduğu osteoporoz hastalarının alendronat kullandığı sırada gelişen kırıklarda alendronatın kırık iyileşmesini olumsuz etkileyebileceğini göstermesi anlamında önemlidir. Bu etkiyi gösterme konusunda alendronatın preoperatif uygulanmasının mı yoksa uzun süre verilmesinin mi daha önemli olduğu literatürde preoperatif alendronat uygulamasının kırık iyileşmesi üzerinde etkisinin araştırıldığı başka bir çalışma bulunmaması nedeniyle yorumlanamamaktadır. Kallus alanı ve trabeküler densiteyi değerlendiren bir başka deneysel kırık çalışmasında (Kolios et al. 2010), 0.17 mg/gün oral alendronat verilen sıçanların tibialarında osteotomi yöntemiyle oluşturulan kırık 5 hafta süreyle titanyum plakla fikse edilmiştir. Kırık alanında ölçülen total kallus alanı ile kallus ve trabekül densitesinde alendronat verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmamıştır. Bu çalışma alendronatın uygulama yolu, oluşturulan kırık modelinin fiksasyon yöntemi ve çalışma sonucunda

kallus genişliğinde artış olmaması bakımından bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Alendronatın yukarıda bahsedilen ve kırık iyileşmesi üzerinde olumlu yada olumsuz herhangi bir etki göstermediğine dair çalışmaların yanısıra olumsuz etkilerinin rapor edildiği çalışmalar da mevcuttur. Cao et al. (2002) tarafından SC 0.01 mg/kg/gün alendronatın ovaryumları çıkarılan sıçan femurunda osteotomi yöntemiyle oluşturulan ve intrameduller kirshner teli yardımıyla fikse edilen kırık modelinde 6. ve 16. haftalarda kırık iyileşmesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Alendronat kullanan grupta 6. (Kontrol= 9.2±0.9, Alendronat= 16.7±2.0,  $p < 0.05$ ) ve 16. haftada (Kontrol= 8.2±1.0, Alendronat= 12.7±2.6,  $p < 0.05$ ) kırık bölgesindeki kallus alanında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Histomorfometrik analiz sonucuna göre alendronat verilen grupta 6. ve 16. haftada lamellar kemik alanının kallus alanına oranı (6. haftada Kontrol= 44.2±6.1, Alendronat= 12.3±1.2,  $p < 0.05$ , 16. haftada Kontrol= 100.0±0.0, Alendronat= 87.0±3.8,  $p < 0.05$ ), kemik yapım parametrelerinden MAR (6. haftada Kontrol= 2.96±0.21, Alendronat= 1.61±0.07,  $p < 0.05$ , 16. haftada Kontrol= 2.21±0.14, Alendronat= 1.35±0.09,  $p < 0.05$ ) ve kemik formasyon oranında (6. haftada Kontrol= 809±138, Alendronat= 295±21,  $p < 0.05$ , 16. haftada Kontrol= 528±68, Alendronat= 180±22,  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana geldiği bildirilmiştir. Alendronat verilen grupta 6. haftada mineralize yüzeyin toplam kemik yüzeyine oranı (MS/BS) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiş (Kontrol= 0.252±0.029, Alendronat= 0.160±0.019,  $p < 0.05$ ), 16. haftada ise anlamlı bir fark görülmemiştir. Araştırma sonucuna göre alendronat örgü kemiğin lamellar kemiğe dönüşümünü dolayısıyla da kallus dokusunun yeniden şekillenmesini yavaşlatmıştır. Buna bağlı olarak kırık iyileşmesi daha geniş kırık kallusunun oluşumu ile sonuçlanmıştır. Cao et al. (2007) tarafından yapılan benzer bir başka çalışmada sıçanlara SC 10 µg/kg/gün alendronat uygulamasının femurda osteotomiyle oluşturulan ve intrameduller kirshner teli ile fikse edilen kırık modelinde 6. ve 16. haftada gösterdiği etki araştırılmıştır. Alendronat verilen grupta 6. (Kontrol= 8.0±0.6, Alendronat= 14.6±1.1,  $p < 0.05$ ) ve 16. (Kontrol= 2.1±0.4, Alendronat= 10.0±1.2,  $p < 0.05$ ) haftada kallus alanının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu görülürken histomorfometrik

inceleme sonuçlarına göre 6. ve 16. haftada alendronat grubunda osteoid yüzeyi (6. hafta Kontrol= 54.3±2.7, Alendronat= 12.1±2.2,  $p < 0.05$ ; 16. hafta Kontrol=35.0±3.6, Alendronat= 7.4±0.9,  $p < 0.05$ ), MS/BS (6. hafta Kontrol= 31.0±1.6, Alendronat= 11.5±1.4,  $p < 0.05$ ; 16. hafta Kontrol= 34.6±2.8, Alendronat= 6.5±0.6,  $p < 0.05$ ) ve lamellar kemik yüzeyi (6. haftada Kontrol= 56.6±1.3, Alendronat= 11.2±1.2,  $p < 0.05$ , 16. haftada Kontrol= 99.2±0.3, Alendronat= 58.4±3.4,  $p < 0.05$ ) parametrelerinin yanısıra kemik yapım parametresi olan kemik formasyon oranında (6. hafta Kontrol= 0.272±0.040, Alendronat= 0.036±0.012,  $p < 0.05$ ; 16. hafta Kontrol=0.256±0.026, Alendronat= 0.040±0.004,  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. Alendronat grubunda ölçülen diğer kemik yapım parametresi MAR'da 6. haftada (Kontrol=2.08±0.05, Alendronat= 1.00±0.31,  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu, ancak 16. haftada istatistiksel olarak anlamlı bir fark meydana gelmediği bildirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre alendronat grubunda kemik yapım yıkım mekanizmasında tesbit edilen yavaşlama mineralize kemik alanında azalmaya neden olmuş bunun yanısıra kallus dokusunun yeniden şekillenmesinin tamamlanamamasına bağlı olarak geniş kallus dokusu izlenmesine yol açmıştır. Saito et al. (2010) SC 0.01 mg/kg/gün alendronatın ovaryumları çıkarılan sıçanların femurlarında oluşturulan ve intrameduller kishner teli yardımıyla fikse edilen kırık modelinde 12. haftada yapılan histomorfometrik analiz sonuçlarına göre alendronat verilen grupta kontrol grubuna göre lamellar kemik oluşumunun daha az ( $p < 0.05$ ) örgü kemik oluşumunun ( $p < 0.05$ ) ise daha fazla olduğunu rapor etmiştir. Alendronat verilen grupta, MS/BS kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterirken ( $p < 0.001$ ), kırık alanında yeni oluşan ve düşük düzeyde mineralize olan kemik dokusunda istatistiksel olarak anlamlı artış tesbit edildiği bildirilmiştir ( $p < 0.05$ ). Ayrıca alendronat verilen grupta kontrol grubuna göre geniş kallus dokusu oluşumu izlendiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada alendronatın kemik yapım mekanizmasını yavaşlatmasına bağlı olarak kemik mineralizasyonunda azalmaya ve örgü kemiğin lamellar kemiğe dönüşümünü engelleyerek kallus dokusunun yeniden şekillenmesinde gecikmeye neden olduğu ileri sürülmüştür. Kırık alanında oluşan geniş kallus formasyonunun örgü kemiğin lamellar kemiğe

dönüşümde meydana gelen gecikmeyi telafi etmek amacıyla meydana geldiği düşünülmüştür.

Manabe et al. (2009) maymun femurunda osteotomi ile oluşturulan ve plak yöntemiyle fikse edilen kırık modelinde SC 100 µg/kg alendronat verilen grupta ölçülen kallus genişliğinde (Kontrol= 1030.8±230.5, Alendronat= 2034.9±503.5,  $p < 0.05$ ) ve kallus alanındaki toplam kemik alanında (Kontrol= 99.5±12.7, Alendronat= 139.8±19.3  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış meydana gelirken, kemik yapım parametreleri olan MAR (Kontrol= 1.4±0.3, Alendronat= 0.1±0.1,  $p < 0.001$ ) ve kemik formasyon oranında (Kontrol= 0.074±0.009, Alendronat= 0.001±0.0004,  $p < 0.0001$ ) ayrıca MS/BS (Kontrol= 0.236±0.041, Alendronat= 0.010±0.004,  $p < 0.001$ ) ile osteoklast sayısında (Kontrol= 1.5±0.2, Alendronat= 0.2±0.04,  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu rapor etmiştir. Kemik dokusunun yeniden şekillenmesinde alendronatın etkisiyle meydana gelen yavaşlama kırık kallusundaki kemik alanının artmasını sağlamış ancak oluşan mineralize kemik dokusu yüzeyini azaltmıştır. Elde edilen sonuçlar alendronatın osteoklastlar üzerinden gösterdiği kemik yıkımını engelleyici etkinin indirekt olarak kemik yapımını da baskıladığını bu nedenle nicelik bakımından artış gösteren kemik dokusunun nitelik bakımından zayıfladığını öne sürmektedir. Alendronatın kemik yapım yıkım mekanizması üzerindeki etkisini araştıran bir başka çalışmada (Sloan et al. 2010) sıçanlarda kırık oluşturulmasını takiben herhangi bir fiksasyon uygulanmamış, 4. haftada SC 2 µg/kg/gün alendronat verilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında histomorfometrik kemik yapım parametreleri olan MAR (Kontrol= 1.90±0.10, Alendronat= 1.30±0.15,  $p < 0.05$ ) ve kemik formasyon oranında (Kontrol= 269.43±25.26, Alendronat= 151.83±35.73,  $p < 0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldüğü kaydedilmiştir. Kortikal kemik alanı, örgü kemik alanı ve MS/BS'de alendronat grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Alendronatın bu çalışmada gösterilen kemik yapımı üzerindeki olumsuz etkisinin azalan osteoklastik aktivitenin kemik yıkımını baskılaması ve buna bağlı indirekt olarak kemik yapımının baskılanması ile olabileceği gibi, direkt olarak osteoblastik aktiviteyle ilişkili olarak da gerçekleşmiş olabileceği ileri sürülmüştür. Bazı araştırmacılar ise bifosfonatların kemiğin yeniden şekillenmesini osteosit apoptozisini engellemek yoluyla baskıladığını ileri

sürmektedir (Follet et al 2007, Cardoso et al. 2009). Cardoso et al. (2009) apoptozis inhibitörü yoluyla osteosit apoptozisi bloke edildiğinde osteoklastik yıkım aktivasyonu da ortadan kalktığını bildirmiştir. Ancak alendronatın kemik iyileşmesi üzerindeki etkisinin osteosit apoptozisi yoluyla meydana gelebileceğini söylemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Alendronatın kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalarda (Cao et al. 2002, 2007, Manabe et al. 2009, Saito et al. 2010, Sloan et al. 2010) ölçülen histomorfometrik parametrelerde görülen farklı sonuçlara karşılık, çalışmalardan elde edilen sonuçların ortak yönü kemik yapım yıkım parametrelerinde görülen azalmadır. Bu durum rapor edilen çalışmalarda alendronatın kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkilediğini göstermekle birlikte; kırık iyileşme süresi, kullanılan deney hayvanı türü, ilacın uygulama yolu ve dozu, kırığın fiks edilip edilmemesi veya uygulanan fiksasyon metodu gibi çeşitli faktörlerin alendronatın kırık alanında histomorfometrik olarak ölçülen trabeküler kemik alanı ve mineralizasyonu gibi parametrelerde etki göstermemesine neden olabildiğine işaret etmektedir. Bu nedenle araştırmamızda Alendronat grubunda ölçülen medüller bölgedeki trabeküler kemik alanı (Tb.Ar/Me.Dm), osteoblast alanı (Ob.Ar) ve mineralize alanın osteoid alana oranının (Md.Ar/O.Ar) Kontrol grubuna göre farklılık göstermemesi pek çok faktöre bağlı olabilir.

Bu faktörlerden birinin kırık iyileşmesi için uygun görülen süre olabileceği düşünülmektedir. Literatüre bakıldığında kırık iyileşme süreleri ile ilgili farklı uygulamalar görülmektedir. Utvag and Reikeras (1998) sıçan femurlarında oluşturulan kırık sonrası 6. ve 12. haftalarda kırık iyileşmesini biyomekanik ve densitometrik olarak değerlendirmiş, 12. haftada ölçülen proksimal diafizyal alan ( $p < 0.01$ ), maksimum eğilme kuvveti ( $p < 0.001$ ), total femur kemik mineral densitesi (KMD) ( $p < 0.001$ ) ve kemik mineral içeriği ( $p < 0.001$ ) değerlerinde 6. haftada ölçülen değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğunu bildirmiştir. Kratzel et al. (2008) sıçan tibialarında kırık oluşturulmasını takiben 4, 6 ve 12. haftalarda kırık iyileşmesini biyomekanik olarak değerlendirmiş, tork yükleme kuvveti ve kemik sertliği parametrelerinde 6. haftada 4. haftaya göre, 12. haftada da 6. haftaya göre istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiğini göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Ekeland et al. (1982) tarafından sıçanlarda yapılan araştırmada femurda kapalı kırık

oluşturulmasını takiben 3, 6, 9, 12 ve 22. haftalarda yapılan biyomekanik testlerde kemik dayanıklılığının, kırık oluşturulmamış grubun kemik dayanıklılığına benzer değerlere 9. haftadan itibaren ulaştığı bildirilmiştir. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda 9 haftalık sürenin sıçanlarda kırık iyileşmesini değerlendirmek için uygun bir süre olduğu düşünülerek, araştırmamızda kırık oluşturulmasını takiben 9. haftada sıçanlar kurban edildi. Cao et al. (2002) tarafından yapılan çalışmada alendronat grubunda kontrol grubuna göre 6. haftada MS/BS'de görülen istatistiksel olarak anlamlı azalma, 16. haftada ortadan kalkmıştır. Bu sonuç normal kırık iyileşme döngüsü içerisinde mineralizasyonun devam ettiği erken dönemde mineralize kemik miktarının daha az, ilerleyen haftalarda ise iyileşmenin tamamlanması ile mineralize kemiğin daha fazla miktarda meydana gelmiş olması ile ortaya çıkmış olabileceği gibi, alendronat verilmesi ile mineralizasyonda görülen azalmanın 16 haftalık sürenin sonunda iyileşmenin alendronatın mineralizasyondaki yavaşlatıcı etkisine rağmen tamamlanmış olması ile de ilişkili olabilir. Yaptığımız araştırmada Alendronat grubunda mineralize kemik alanının osteoid kemik alanına oranında (Md.Ar/O.Ar) Kontrol grubuna göre fark bulunmaması, kırık sonrası yeni oluşan dokuda iyileşmenin erken tamamlanması ile daha erken dönemde görülebilecek olan mineralize kemik alanındaki azalmanın nispeten uzun bir takip süresi olan 9. haftada tesbit edilememiş olma ihtimalini akla getirmektedir.

Sunulan araştırmada Alendronat grubunda histomorfometrik parametrelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edilememesine neden olan faktörlerden ikincisi kullanılan alendronatın uygulama yolu ve dozu olabilir. Araştırmamızda uygulanan alendronatın terapötik amaçlı olarak insanlarda yalnızca oral yoldan kullanılması nedeniyle piyasada IV ve SC formları bulunmamakta yalnızca tablet formları temin edilebilmektedir. Ancak alendronat (Gertz et al. 1995) ve diğer tüm oral bifosfonatların (Mitchell et al. 2001, Cryer and Bauer 2002) biyoyararlanımının düşük olduğu bilinmektedir. IV uygulanan ve biyoyararlanımı daha yüksek olan bifosfonatların ise oral kullanılan bifosfonatlara göre klinik kullanımının yan etkisi olarak sıkça rapor edilen çene kemiği nekrozlarının meydana gelmesi açısından daha riskli olduğu bildirilmektedir. Marx et al. (2005) çene kemiklerinde osteonekroz meydana geldiği görülen hastaların %26'sının IV

pamidronat, %40.3'ünün IV zoledronat, yalnızca %2.5'inin oral alendronat kullandığını bildirmiştir. Daha güncel bir çalışmada da bifosfonat kullanımına bağlı osteonekrozun büyük ölçüde onkoloji hastalarında uygulanan yüksek etkili IV bifosfonatların kullanımı sonrası ortaya çıktığı bildirilmiştir (Bagan et al. 2009). IV bifosfonatların bildirilen bu yan etkisi nedeniyle çalışmamızda oral yoldan uygulanan alendronat tercih edilmiştir. Literatürde oral yoldan çeşitli dozlarda uygulanan alendronatın sıçanlarda yapılan çalışmalarda 6 µg/kg'dan (Giavaresi et al. 2001) 5 mg/kg'a (Azuma et al. 1998) kadar değişen dozlarda kullanıldığı görülmektedir. Mosekilde et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada oral alendronatın 0.2, 1, 2 mg/kg dozlarının arka bacakları immobilize edilen sıçanlarda femurun mekanik özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmış, sadece 2 mg/kg alendronat uygulanan grupta distal femur metafizinde kemik dayanıklılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu kaydedilmiştir ( $p < 0.005$ ). Azuma et al. (1998)'in ovaryumları çıkarılmış sıçanlarda 0.04, 0.2, 1 ve 5 mg/kg oral alendronatın kemik dokusu üzerindeki etkilerini histomorfometrik olarak değerlendirdiği çalışmasında yalnızca 1 ( $p < 0.01$ ) ve 5 mg/kg ( $p < 0.001$ ) alendronat verilen gruplarda trabeküler kemik hacminde herhangi bir ilaç verilmeyen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldüğü bildirilmiştir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında alendronatın kemik dokusundaki etkisinin doz artışı ile pozitif korelasyon gösterdiği izlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda 2 mg/deney hayvanı ağırlığı kg/gün dozunda kullanılan alendronatın, daha yüksek dozlarda verilmesinin histomorfometrik parametreler üzerinde daha yüksek etki göstermede bir faktör olabileceği izlenimi oluşmuştur.

Literatürde uzun kemiklerde oluşturulan kırık modellerinin cerrahi olarak fiksasyonunda çeşitli metodlar uygulanmakla beraber en sık intrameduller kirshner telleri (Cao et al. 2002, 2007 ve Saito et al. 2010) ve plak osteosentezi yöntemlerinin (Wingerter et al. 2007) kullanıldığı bildirilmiştir. Intrameduller kirschner telleri rigid fiksasyon sağlayamamakla birlikte ortopedide sıklıkla tercih edilmektedir (Molster and Gjerdet 1984, Foster et al. 1985). Meydana gelen mikro hareketlilik nedeniyle bu yöntem kırık iyileşmesinde geniş eksternal kallus oluşumuna neden olmakta (Taljanovic et al. 2003, Wingerter et al. 2007) ayrıca intrameduller olarak yerleştirilmesi nedeniyle meydana gelen dolaşım bozukluğuna



bağlı enfeksiyon gelişme riskini arttırmaktadır. Plak osteosentezi metodu ise, daha rigid bir fiksasyon sağladığı için kırık iyileşmesi alanında fibröz dokunun ve geniş eksternal kallus dokusunun oluşumunu sınırlar (Rodriguez-Merchan 2004, Foster et al. 1985). Sıçanların femurunda oluşturulan kırık modelinde intramedullar kirshner teli ve plak uygulamasını karşılaştıran Wingerter et al. (2007) kirshner teli uygulanan deney hayvanlarında kırık alanında fibröz dokunun artarken, yeni kemik yapımının azaldığını, plak uygulanan grupta ise kırık bölgesinde fibröz doku azalırken yeni oluşan kemik miktarında artış olduğunu bildirmiştir. Literatüre bakıldığında genel olarak araştırmacılar plak osteosentezi metodunun kırık iyileşmesi bakımından daha avantajlı olduğunu savunurken, bazı araştırmacılar kırık yüzeyine plak uygulaması sırasında periostun zarar görmesinin kırık iyileşmesini olumsuz etkileyeceği yönünde görüş bildirmektedir (Rodriguez-Merchan and Gomez-Castresana 2004, Stiffler 2004, Ozkaya et al. 2009). Ozkaya et al. (2009) intrameduller kirshner teli uyguladıkları önkol kırığı olan hastalarındaki iyileşme süresinin plak uygulanan gruptaki hastalara göre kısa olduğunu ortaya koymuşlardır ( $p < 0.05$ ). Araştırmamızda ise sıçan femurlarında kırık tesbiti amacıyla uygulama zorluğunun bir dezavantaj olmasına rağmen, literatürde pek çok bakımdan daha avantajlı olduğu bildirilen plak yöntemi uygulanmıştır. Bununla birlikte plak yönteminin olumsuz etkisinin bilimsel anlamda kabul görebilmesi için daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır.

Iwata et al. (2006) SC 10 µg/kg alendronat verilen sıçanlarda femur periosteal yüzeyinde histomorfometrik olarak ölçülen kemik yapım parametresi olan MAR'da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu ( $p < 0.01$ ) buna karşılık MS/BS'de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığını bildirmiştir. Alendronatın kemik yapımını yavaşlatması ancak mineralize kemik yüzeyini etkilememiş olması alendronatın osteoblast proliferasyon ve differansiasyonunda baskılayıcı etki göstermeyip, yalnızca osteoblast aktivitesini baskıladığı şeklinde yorumlanmıştır. Ancak osteoblast aktivitesinin alendronatın direkt osteoblastlar üzerinde mi etkili olduğunu yoksa indirekt olarak osteoklast regulasyonun osteoblast aktivitesi üzerindeki etkisi ile mi olduğu bilinmemektedir. Bazı araştırmacılar bifosfonatların osteoklastları, osteoblast kökenli hücrelerin osteoklast inhibitörlerinin salgılanmasını uyarması yoluyla da engelliyor olabileceğini ileri sürmektedir (Boivin

and Meunier 2002a). Alendronatın kemik yapımını hangi mekanizma ile baskıladığı bilinmemekle birlikte günümüzde hala geçerli olan düşünce bifosfonatların kemik yapım yıkım döngüsü üzerindeki etkisini osteoklastlar yoluyla gerçekleştirdiğidir (Boivin and Meunier 2002a). Yaptığımız araştırmada Alendronat grubunda Kontrol grubuna göre osteoblast alanında (Ob.Ar) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış olması alendronatın kırık sonrası 9. haftada ölçülen osteoblast sayısını etkilememiş olduğunu göstermektedir. Alendronat grubunda Tb.Ar/Me.Dm, Ob.Ar ve Md.Ar/O.Ar parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tesbit edilmemiş olması (Tablo 8) alendronatın bu parametreleri etkilememiş olmasına bağlı olabileceği gibi bu parametrelerin birbirleriyle istatistiksel olarak anlamlı bir etkileşiminin olmadığını da düşündürebilir. Kontrol grubunda da belirtildiği gibi parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmaması parametrelerin ikisinin oran şeklinde hesaplanmış olmasına bağlı olabileceği ihtimalini güçlendirmektedir.

Literatürde kırık iyileşmesi üzerindeki etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunan alendronatın osteoporoz üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yapılmış çok sayıda farklı çalışma mevcuttur. Pytlik et al. (2004) tarafından yapılan araştırmada ovaryumları çıkarılarak osteoporoz oluşumu meydana gelen sıçanlardan oral 3 mg/kg/gün alendronat verilen grupta ovaryumları çıkarılan kontrol grubuna göre densitometrik olarak tibia, femur ve vertebrada kemik mineral içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiği (Tibia Kontrol=216.00±3.28, Alendronat= 231.91±2.35,  $p < 0.01$ , femur Kontrol= 295.77±5.22, Alendronat= 313.05±2.56,  $p < 0.05$ ; vertebra Kontrol= 81.61±2.55, Alendronat= 92.26±2.07,  $p < 0.01$ ) gösterilmiştir. Yapılan histomorfometrik değerlendirme sonucunda alendronat verilen grupta kontrol grubuna göre femurda ölçülen trabeküler kemik alanında istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiği (Kontrol= 35.16±1.4, Alendronat= 47.68±1.22,  $p < 0.001$ ), tibiada ölçülen osteoid kemik alanında (Kontrol= 20.76±0.25, Alendronat= 15.02±0.48,  $p < 0.01$ ) ise istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldüğü bildirilmiştir. Alendronatın tibianın osteoid genişliğinde azalmaya neden olması, femurun trabekül alanında artış sağlaması ve tibia, femur ve vertebrada kemik mineral içeriğinde artışa neden olması kemik yapım yıkım döngüsünün baskılanmasıyla tabeküler kemik dokusu artışını ve kemik mineralizasyon derecesini

desteklediği yönünde yorumlanmıştır. Bu sonuçlar alendronatın literatürde bildirilen ovaryumların çıkarılması sonrası ortaya çıkan kemik dokusu değişiklikleri üzerindeki koruyucu ve kemik yıkımını engelleyici etkisini (Seedor et al. 1991, Paz et al. 2001, Ogawa et al. 2005) destekler niteliktedir.

Ogawa et al. (2005) ovaryumları çıkarılarak osteoporoz oluşumu meydana gelen sıçanlardan SC 2 µg/kg/gün alendronat verilen grupta üç boyutlu görüntü analiz programı yardımıyla ölçülen trabeküler kemik hacminde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış meydana geldiğini (Kontrol= 3.9 ± 2.3, Alendronat= 10.8 ± 3.4  $p < 0.01$ ), ayrıca serum kemik yapım parametresi OC (Kontrol= 32.6 ± 5.2, Alendronat= 23.7 ± 3.7  $p < 0.01$ ) ve kemik yıkım parametresi C terminal telopeptidde (CTX) (Kontrol=25.9 ± 9.2, Alendronat= 27.3 ± 13.1,  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu rapor etmiştir. Elde edilen sonuçlara göre alendronat kemik yapım ve yıkım döngüsünü yavaşlatmış ancak bu durum trabeküler kemik hacminin artmasını sağlayarak üç boyutlu yapısının korunmasını sağlamıştır. Iwamoto et al. (2006) tarafından yapılan çalışmada ovaryumları çıkarılan sıçanların proksimal tibial metafizlerinde ovaryumları çıkarılmayan gruba göre trabeküler kemik hacminin tüm kemik dokusu hacmine oranında istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken ( $p < 0.05$ ), osteoklast sayısı, osteoklast yüzeyi, osteoblast yüzeyi ve kemik yapım ve yıkım parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış meydana gelmiştir ( $p < 0.05$ ). Oral 2.5 mg/kg/gün alendronat verilen grupta ise ovaryumları çıkarılan ve hiçbir ilaç kullanmayan kontrol grubuna göre, trabeküler kemik miktarında istatistiksel olarak anlamlı artış meydana gelmiş ( $p < 0.05$ ), osteoklast (Kontrol= 14.1±3.0, Alendronat= 5.3±1.0  $p < 0.05$ ) ve osteoblast (Kontrol= 17.7±3.7, Alendronat= 14.1±2.1  $p < 0.05$ ) yüzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür. Alendronat verilen grupta MS/BS'de (Kontrol= 29.5±4.0, Alendronat= 8.3±2.3,  $p < 0.05$ ), kemik yapım parametresi olan MAR (Kontrol= 0.75±0.14, Alendronat= 0.44±0.1  $p < 0.05$ ) ve kemik formasyon oranı (Kontrol= 22.3±6.3, Alendronat= 3.7±1.4  $p < 0.05$ ) ile kemik yıkım parametresi olan aşınmış yüzeyde (Kontrol= 11.5±2.8, Alendronat= 5.8±1.6,  $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre anlamlı azalma tesbit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar osteoporoz oluşumu meydana gelen kemikte alendronatın kemik yapım yıkım döngüsünü baskılayarak

trabeküler kemik dokusunda artış sağladığını ancak mineralize kemik dokusunda azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

Osteoporoz araştırmalarında sıklıkla kullanılan alendronatın kemik dokusu üzerindeki klinik etkileri de büyük önem taşımaktadır. Black et al. (1996) tarafından yapılan çalışmada alendronat kullanan osteoporoz hastalarında üç yılın sonunda femur boynunda, kalçada (trokanter) ve vertebrada ölçülen kemik mineral densitesi başlangıç değerlerine göre anlamlı artış gösterirken ( $p<0.001$ ), plasebo grubunda başlangıç değerlerine göre anlamlı değişiklik olmamıştır. Alendronat grubunda plasebo grubuna göre klinik olarak görülen vertebra ( $p= 0.001$ ), kalça ( $p=0.47$ ) ve el bilek kırığı ( $p=0.013$ ) sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma meydana gelmiş, ayrıca alendronat grubunda bulunan hastalarda meydana gelen vertebral kırık sayısının plasebo grubunda bulunan kadınlarda meydana gelen vertebral kırık sayısına göre %47 daha düşük olduğu bildirilmiştir ( $p< 0.001$ ). Bu çalışma alendronatın osteoporoz hastalarında kemik yapısını koruyarak kırık meydana gelme riskini düşürdüğü bildirilmektedir ayrıca dikkat çeken diğer bir nokta alendronat verilen hastalarda yüksek oranda trabeküler kemik içeren vertebrada görülen kırık sayısının azaltılması üzerinde diğer kemiklere göre yüksek etki göstermiş olmasıdır. Bu sonuç alendronatın kortikal kemikten çok trabeküler kemik dokusunu etkilediği şeklinde yorumlanabilir.

Yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlara göre alendronat kullanımı kırık iyileşmesinin tersine deneysel olarak osteoporoz gelişiminin sağlandığı araştırmalar yada klinik olarak menapoz sonrası dönemde osteoporoz hastaları üzerinde yapılan araştırmalarda kemik dokusu üzerinde olumlu etki göstermektedir. Osteoporoz çalışmalarında elde edilen sonuçların kırık iyileşmesi çalışmalarına ne derece ışık tuttuğu bilinmemekle birlikte kemik yapım yıkım hızının osteoporotik kemiklere benzer şekilde kırık sonrası iyileşme dönemlerindeki kemiklerde de hızlandığı bilinmektedir. Ancak osteoporozda bu etki patolojik bir duruma bağlı olarak, kırık iyileşmesinde ise fizyolojik olarak meydana gelmektedir. Yüksek oranda trabeküler kemik yıkımının olduğu osteoporoz tedavisinde verilen alendronatın patolojik olarak artan kemik yapım yıkım hızını baskılayarak ortaya çıkan kemik dokusu kayıplarını engelleyerek kemik yapısının korunmasını sağlamaktadır. Trabeküler kemik kaybının engellenmesi veya yavaşlatılması kemik dokunun mineralizasyon

derecesinin yüksek olmasını buna bağılı olarak kırık meydana gelme sıklığında azalma olmasını sağlamaktadır. Ancak yeni kemik yapımının olduğu kırık iyileşmesi durumunda alendronat kemik yapım yıkım döngüsünü baskılayarak trabeküler kemiğin ve mineralize kemik miktarının oluşumunu yavaşlatmaktadır. Araştırmamızda kırık iyileşme süresinin uzun tutulmasının alendronatın trabeküler kemik alanında ve mineralize olmuş kemiğin osteoid kemiğe oranında erken dönemde tesbit edilmesi muhtemel olan olumsuz etkisini kamufle etmiş olabileceği düşünülmektedir. Ancak alendronatın normal yapım yıkım hızı olan kemik dokusunda kırık iyileşmesi üzerindeki etkisinin ortaya konulabilmesi için daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sunulan araştırmada K1 vitamini grubunda histomorfometrik analiz yöntemi ile meduller alanda ölçülen trabeküler kemik alanında (Tb.Ar/Me.Dm) Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 7). Ancak osteoblast alanı (Ob.Ar) ile mineralize kemik alanının osteoid kemik alanına oranında (Md.Ar/O.Ar) Kontrol grubu ve diğere gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir (Tablo 7). Ayrıca üç histomorfometrik parametre arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Kontrol ve Alendronat gruplarında da görülen histomorfometrik parametreler arasında korelasyon bulunmaması sonucunun, parametrelerden Ob.Ar hariç diğere ikisinin (Tb.Ar/Me.Dm, Md.Ar/O.Ar) oran olarak ölçülmüş olmasına bağılı olduğu düşünülmektedir.

Araştırmamızda K1 vitamini verilmesi sonucu kırık iyileşme bölgesinde trabeküler kemik alanı artışıyla elde edilen olumlu sonuç, Bouchaert and Said (1960)'in araştırmasında ilk kez bildirilen, tavşanlarda K1 vitamini verilmesinin kırık iyileşmesini olumlu etkilediğini gösteren sonuçlar ve Cadır et al. (2008)'in çalışmasında rapor ettiğı K1 vitamininin osteotomi sonrası kırık iyileşmesini hızlandırabileceğine dair bulguları ile desteklenmektedir. Cadır et al. (2008) sıçan femur kemiğinde osteotomi yöntemiyle oluşturulan ve mini plak vida ile yöntemiyle fikse edilen kırık modelinde kemik yapımının biyokimyasal belirteci olan BAP düzeyinin kontrol grubunda 2. ve 9. haftalarda preoperatif seviyesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını ( $p < 0.05$ ), 12 mg/kg/gün oral K1 vitamini verilen grupta 2. haftada kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

artış gösterdiğini ( $p < 0.05$ ), 9. haftada ise preoperatif seviyeye ulaştığını rapor etmiştir. Bu sonuç osteotomi sonrası 2. hafta gibi kısa bir sürede bile K1 vitamininin kemik yapımını artırarak kırık iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceğine işaret etmektedir. Çalışmadan elde edilen diğer bir bulgu da sıçanlarda kırık sonrası kemik yapımının dolayısıyla da kırık iyileşmesinin 9. haftada tamamlanmış olabileceğidir. Araştırmamızda da K1 vitamini grubunda trabeküler kemik dokusunda meydana gelen mineralize kemik alanında (Md.Ar/O.Ar) Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark olmayışı, Kontrol ve K1 vitamini grubunda mineralizasyonun tamamlandığı anlamına gelebilmektedir. Bununla birlikte K1 vitamini grubunda trabeküler alanın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiş olması ise K1 vitamini grubunda mineralizasyonun Kontrol grubuna göre nispeten daha erken dönemde gerçekleşmiş olmakla birlikte örneklerin deney hayvanlarından 9. haftada toplanması nedeniyle Kontrol grubunun K1 vitamini grubunu 9. haftada yakalamış olabileceği ihtimalini taşımaktadır.

Cadır et al. (1997, 2000) bimaxiller ortognatik cerrahi geçiren ve oral K1 vitamini verilen hastalardan ameliyattan bir gün öncesinden başlamak üzere farklı günlerde alınan örneklerde ameliyat sonrası 1. günde BAP ve piridinolin (Pyr) düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını ancak 7, 40, 90 ve 180. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediğini kaydetmiştir. Bununla birlikte diğer kemik yıkım parametresi deoksipiridinolin (Dpyr) postoperatif 1. ( $p = 0.001$ ), 7. ( $p = 0.03$ ), ve 40. günde ( $p = 0.001$ ) ölçülen düzeyi preoperatif düzeye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular araştırmacılar tarafından kemik biyokimyasal yapım yıkım belirteçlerinin bireyler arası farklılıklardan etkilenebilmesine ve her bir biyokimyasal belirtecin kemik metabolizmasının farklı bir sürecini yansıtmaları bakımından doğru belirteçlerin seçilmesinin önemli olduğuna dikkat çekmiştir. Cadır et al. (2008) Wistar türü sıçanlarda osteotomi yöntemiyle oluşturulan kırık iyileşmesi modelinde ölçülen serum BAP seviyesinde K1 vitamini verilen grupta kontrol grubuna göre 2. haftada istatistiksel olarak anlamlı artış olmasına karşılık N-telopeptid (NTx) seviyesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığını bildirmiştir. Buna göre sıçanlarda K1 vitamini verilmesiyle serum BAP seviyesinde kırık iyileşmesi sırasında görülen artışın insanlarda tesbit edilememesinin, kemik

biyokimyasal belirteçlerinin insanlarda bireyler arası farklılıklardan etkilenmesi ile ilişkili olabileceği bu nedenle de bu belirteçlerin kemik dokusu değişikliklerini yansıtması açısından güvenilir olmayabileceği düşünülmektedir. Sıçanlarda ise çalışma şartlarının daha standardize olması güvenilir sonuçlar alınmasında etken görülmektedir.

Tasatargil et al.'in 2007 yılında yaptığı çalışmada sıçanlara oral 25 mg/kg/gün K1 vitamini verilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, femurda gerçekleştirilen osteotomi sonrası ortaya çıkan oksidatif stresin azaldığı ve bunun yanısıra kırık iyileşme alanında vasküler reaktivitenin arttığı tesbit edilmiş bu sonuçlara göre K1 vitamininin kırık iyileşmesinde olumlu etkisinin olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışma, sıçan femurlarında deneysel osteotomi yöntemi uygulaması sonrası oral K1 vitamininin kırık iyileşmesi üzerinde olumlu etkisi olabileceğini göstermiş olması bakımından araştırmamızı desteklemektedir. İnsanlarda osteotomi sonrası kırık iyileşmesini inceleyen bir çalışma oral K1 vitamini verilen bimaxiller ortognatik cerrahi hastalarında ameliyat sonrası postoperatif 90. günde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ağrı analog skalası yardımıyla ölçülen kallus hassasiyetinde klinik olarak tesbit edilecek şekilde azalma olduğunu bildirmiştir (Kontrol= 0.2, K1 vitamini= 0,  $p= 0.065$ ) (Cadır et al. 1998). Elde edilen sonuçlara dayanarak K1 vitamini uygulamasının kırık iyileşmesini hızlandırarak osteotomi alanında oluşan kallus dokusunun hassasiyetinde azalma sağlamış olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmadaki ağrı skorunda dikkati çeken azalma Tasatargil (2007)'in çalışmasında bildirilen kırık iyileşmesi alanında K1 vitamininin oksidatif stresi azaltarak vasküler reaktiviteyi artırmış olması ile açıklanabilir.

Yukarıda bildirilen çalışmalarda sıçanlarda farklı oral dozlarının uygulandığı görülen (Tasatargil et al. 2007, Cadır et al. 2008) K1 vitamininin literatürde oral olarak 10  $\mu\text{mol/kg}$ 'dan (Sakamoto et al. 1996) 90 mg/kg'a kadar değişen (Zhao et al. 1999) farklı dozları yer almaktadır. K vitamini dozunun bu kadar geniş aralıkta uygulanma nedenlerinden biri K1 vitaminin oral yolla alınımı sonucu şu ana kadar herhangi bir toksik etkiye rastlanmamış olmasına bağlı olabilir. (Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition et al. 1995, Weber 2001). Laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılan sıçanların (Sprague Dawley, Wistar Albino) günlük K1 vitamini

ihtiyaçları 1mg/kg yem olarak bildirilmiştir (Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition et al. 1995). Ronden et al. (1998) sıçanlarda oral K1 vitamininin yalnızca 600 µg/g yem/gün ve 3000 µg/g yem/gün dozlarının kemik dokusuna ulaşarak dokuda toplandığını diğer düşük dozların ise kemik dokuda tesbit edilemediğini bildirmiştir. Bu çalışmada sıçanların günlük ortalama 20 g yem yedikleri belirtilmiş, buna göre kemik dokuya ulaştığı bildirilen K1 vitamini dozu 12 mg/gün ve 60 mg/gün olarak hesaplanarak bu dozların benzer etki göstermesi nedeniyle 12 mg/gün olan düşük dozu çalışmamızda tercih edilmiştir. Ancak ilaç uygulamalarının vücut ağırlığına göre uygulanmasının daha doğru olacağı düşünülerek, Cadir et al. (2008)'in 12 mg/kg/gün dozunda K1 vitamini verilen sıçanlarda kırık iyileşmesinin hızlandığına dair bulguları da göz önüne alınarak araştırmamızda K1 vitamini 12 mg/kg dozunda kullanılmıştır. Oral yoldan K1 vitamininin tablet şeklindeki ticari preperatı kullanıldığında, gereken etken madde dozuna ulaşılabilmesi için yüksek miktarlarda verilmesi gerektiğinden ve intravenöz uygulamanın her gün uygulandığında kollapsa neden olabileceği düşünüldüğünden araştırmamızda sıçanlara hiçbir ilave madde içermeyen K1 vitamini preperatı ile hazırlanan solüsyon oral olarak verilmiştir. Araştırmamızda K1 vitamini uygulanan grupta Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meduller alanda ölçülen trabeküler kemik alanında (Tb.Ar/Me.Dm) görülen artış, uygulanan dozun ve ilacın veriliş yolunun K1 vitamininin kemikte yeterli miktara ulaşarak kemik yapımına yetecek seviyeye ulaştığını göstermektedir.

Araştırmamızda K1 vitamininin trabeküler kemik alanını artırmak yoluyla kırık iyileşmesini hızlandırdığına dair bulguları destekleyen çalışmalara (Cadir 1998, 2008, Tasatargil et al. 2007) karşılık Einhorn et al. (1988) sıçan femurunda oluşturulan kırık modelinde K1 vitamininden düşük diyet ile beslenen grupta 2. ve 8. haftalarda biyomekanik olarak ölçülen kemik sertliği ile tork kuvvetine dayanıklılık parametreleri ile femur uzunluğu ve kallus genişliğinde normal K1 vitamini diyetiyle beslenen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediğini, 8. haftada serum karboksile OC yüzdesinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu bildirmiştir (Kontrol= 88.3±6.5, K1 vitamini= 15.5±1.7,  $p < 0.001$ ). Bu bulgular K1 vitamini eksikliğinin iyileşme sürecinde kemiğin büyümesi, geometrik yapısı ve yapısal özellikleri üzerinde etki göstermemiş olmasına bağlı olabileceği gibi, K vitamini eksikliğinde az miktarda



karboksile olan OC'nin yeni oluşan kallusa bağlanarak normal kırık iyileşmesinin ve mekanik yapının sağlanmasında yeterli olabileceği yönünde yorumlanmıştır.

Deney hayvanlarında oluşturulan kırık modelinde K1 vitamini etkisinin araştırıldığı çalışmalar sınırlı olduğundan, insanlarda kırık sonrası alınan serum örneklerinde ölçülen K1 vitamini seviyesinin kırık iyileşmesi ile olan ilişkisini araştıran çalışmalar bu anlamda oldukça önemlidir. Bitensky et al. (1988), vücudun çeşitli bölgelerinde kırık meydana gelmiş 16 hastadan alınan serum örneklerinde K1 vitamini seviyesinde kırık meydana gelmesini takiben benzer yaş grubunda kırık oluşumu olmayan bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğunu rapor etmiştir ( $p < 0.01$ ). Ayrıca bilek ve humerus kırığı gibi nispeten küçük kırıklarda serum K1 vitamini seviyesi kısa sürede normale dönerken, femur ve vertebra kırığı gibi büyük kırıklarda serum K1 vitamini seviyesinin 300 gün sonra bile normal seviyeye ulaşamadığı bildirilmiştir. Yapılan bu araştırma sonuçları, bazı özel kemik peptitlerinin Gla transformasyonunda görevli olan K1 vitamininin serumdan kırık bölgesinde kullanılmak üzere iyileşme devam ettiği sürece alındığı fikrini öne sürmelerine neden olmuştur. Bunun yanısıra meydana gelen kırığın ciddiyeti, kallusun genişliği ve yeni oluşan kemik miktarının serumdan alınan K1 vitamininin miktarını belirleyebileceği ileri sürülmüştür. Hodges et al. (1993) femur boynu ve vertebra kırığı olan osteoporoz hastalarından kırık meydana gelişini takip eden 10. günde serumda tesbit edilen K1 ve K2 vitamini seviyelerinin femur boynu ve vertebra kırığı meydana gelen hastalarda kontrol grubuna göre sadece serum K1 vitamini seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını göstermiştir ( $p < 0.001$ ). Elde edilen bu sonuçlar kırık meydana gelmesi ile serumda azalma tesbit edilen K1 vitamini düzeyinin kemik iyileşmesi ile yakından ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir. Cham et al.'in (1999) yaptığı benzer bir araştırmada, travmatik pelvis kırığı meydana gelen hastalardan kırığı takip eden 10. günde ölçülen serum K1 vitamini seviyesinde sağlıklı gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalma ( $p < 0.001$ ) izlendiği bildirilmiştir. Petursson et al. (2004) ortognatik cerrahi öncesi kan dolaşımındaki K1 vitamini düzeyinin ameliyat sonrası yaklaşık olarak %3-25 oranında azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte K1 vitamini 3-4 hafta içinde operasyon öncesi değerler ulaşmıştır. Araştırmacılar azalan K1 vitamini düzeyinin nedenini kemik bütünlüğü için gereken kemik matriks yapılarını üretmek için

iyileşen kemiğin K vitaminine ihtiyacı şeklinde yorumlamıştır. Bu nedenle iyileşme süreci tamamlana kadar iyileşen kemiğin dolaşımdaki K1 vitaminini aldığını kabul etmiştir. Bu sonuçlar kan dolaşımındaki K1 vitamini düzeyinin kemik iyileşmesinin potansiyel göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

K1 vitamininin serum seviyesinin kırık meydana gelmesiyle azaldığını bildiren çalışmalar, K1 vitaminin kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini K vitaminine bağımlı kemik proteinlerinin karboksilasyonunu artırma yoluyla gerçekleştirdiğini ileri sürmektedir (Bitensky et al. 1988, Hodges et al. 1993, Cham et al. 1999, Petursson et al. 2004). Bu kemik proteinlerinin başında gelen OC, osteoblastik aktivitenin belirteci olarak kabul edilmekte aynı zamanda bu proteinin osteoblast aktivasyonunun regülasyonunda görev yaptığı düşünülmektedir (Galli and Caniggia 1984). K vitaminin başta OC olmak üzere kemikte bulunan K vitamini bağımlı proteinlerin karboksilasyonunda görevli olması nedeniyle serumda ölçülen karboksile olmamış OC seviyesi (ucOC) kemik dokuda bulunan K vitamini seviyesinin hassas bir belirteci (Skoll et al. 1996, Skoll et al. 1997) ve kırık gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir (Sugiyama et al. 2001, Aonuma et al. 2009). Szulc et al. (1993) menapoz sonrası dönemdeki kadın hastalarda serum karboksile olmamış OC seviyesi ile kalça kırığı meydana gelme riski arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif bir ilişki olduğunu bildirmiştir ( $p < 0.001$ ). Yapılan çalışmalarda serumda ölçülen OC seviyesi aynı zamanda kemik yapımı belirteci olarak kabul edilmektedir (Garnero and Delmas 1997). Hermann et al. (2002) travmatik femur kırığı olan hastalardan normal iyileşme gösteren bireylerde klinik ve radyografik olarak kırık iyileşmesinde gecikme görülenlere göre serum OC seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunduğunu bildirmiştir ( $p < 0.05$ ). Buna göre OC kırık iyileşmesi sırasında görülen kemik yapımının belirteci olarak kabul edilebilir. Kemik kalitesi ile OC arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla yapılan bir başka çalışmada, prepubertal dönemdeki bireylerde serum karboksile OC'nin karboksile olmamış intakt OC'ye oranı ile kemik kütlelerinin ve kalitesinin belirteci olarak kabul edilen ultrason hızı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunduğu ( $p = 0.016$ ), ancak ultrason hızı ile kemik yapım yıkım parametreleri olan serum BAP kemik alkalen fosfataz ve tip I kollajen C terminal propeptid (PICP) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmadığı

bildirilmiştir (Sugiyama and Kawai 2001). Bu sonuç karboksile olmuş OC'nin kemik kalitesi ile doğrudan ilişkili olup kemik yapım yıkım mekanizmasını etkilemediğini göstermektedir. Ancak kemik kalitesini hangi mekanizma yoluyla etkilediği bilinmemekle birlikte OC'nin osteoblast aktivasyonunun regulasyonuna ilave olarak kemik mineralizasyonu sırasında dokuda hidroksiapatit kristallerine bağlanarak kemik mineral olgunlaşmasını stimule ettiğini ileri sürülmektedir (Boskey et al. 1998). Araştırmamızda K1 vitamini grubunda trabeküler kemik alanında meydana gelen artışın K1 vitamininin kırık alanında karboksile olmuş OC düzeyini artırması yoluyla gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde K1 vitamininin serum kemik yapım ve yıkım mekanizması üzerindeki etkisini ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalardan birinde Booth et al. (2001) K1 vitamininden düşük diyetle beslenen daha sonra da yüksek miktarda K1 vitamini verilen kişilerde serumda ölçülen kemik yapım (OC, BAP) ve yıkım parametrelerinde (NTx, Dpyr) önce artış sonra da kontrol seviyesine gerileme gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). K1 vitamininin düşük miktarda alınması kemik yapım yıkım döngüsünü hızlandırmış, yüksek miktarlarda alınması ise kemik yapım yıkım döngüsünü normal düzeye kadar indirmiştir. Oral 0.2 mg/g/gün verilen K1 vitamininin sodyum florür (NaF) uygulaması ile iskeletsel florozis gelişimi sağlanan sıçanlarda femurda ölçülen kemik dokusu değişikliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, yalnızca NaF verilen grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösteren milimetre cinsinden ölçülen toplam kortikal kemik kalınlığının (Kontrol=  $2.88 \pm 0.66$ , NaF=  $3.55 \pm 0.85$ ,  $p = 0.04$ ), NaF'a ilaveten K1 vitamini verilen grupta NaF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı fakat kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı kaydedilmiştir (K1 vitamini=  $2.94 \text{mm} \pm 0.34$ ,  $p = 0.03$ ). Antero-posterior femur dış çapında da NaF grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış (Kontrol=  $2.94 \pm 0.1$ , NaF=  $3.15 \pm 0.15$   $p = 0.0001$ ) meydana gelirken, K1 vitamini grubunda NaF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma (K1 vitamini=  $2.82 \pm 0.19$ ,  $p = 0.0001$ ) olduğu bildirilmiştir. Ayrıca NaF grubunda histolojik olarak trabeküler kemikte mineralizasyon bozukluğunu simgeleyen düzensiz osteoid kemik dokusunun yerini K1 vitamini grubunda bol kollajen içeren dekalsifiye kemik matriksinin aldığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak K1 vitamininin, NaF'ın neden olduğu morfolojik

ve histolojik değişiklikleri önleyerek kemik dokusunun yapısal özelliklerini regule ettiği ileri sürülmüştür (Cadır et al. 2003). Cadır et al. (2008) 12mg/kg/gün dozunda K1 vitamini verilen sıçanlarda ölçülen kemik yapım parametresi olan BAP seviyesinin kırık iyileşmesi sırasında preoperatif dönemde ölçülen seviyeye göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiğini ( $p < 0.05$ ), kırık iyileşmesi tamamlandığında ise kırık meydana gelmeden önceki normal seviyeye gerilediğini göstermiştir. K1 vitamininin çeşitli çalışmalarda rapor edilen ve bizim araştırmamızda da gözlenen kırık iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisinin (Cadır et al. 1998, Tasatargil et al. 2007, Cadır et al. 2008) yanısıra bildirilen mevcut kemik dokusunun korunması ve geliştirilmesi yönünde gösterdiği etkinin (Booth et al. 2001, Cadır et al. 2003) K1 vitaminin OC üzerinden gösterdiği etki ile meydana gelebileceği gibi, kemik yapım yıkım mekanizmalarını etkilemesi yoluyla da ortaya çıkabileceği hatta bu iki mekanizmanın kemik dokusu üzerinde birlikte etki gösterebileceği düşünülmektedir. K1 vitamininin tam olarak hangi mekanizma ile kemik dokusunda olumlu etki gösterdiğinin açıklığa kavuşabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Cadır et al. (2009) oral yüksek doz florid ve K1 vitaminin sıçanlarda kemik dokusu üzerindeki etkilerini histomorfometrik olarak değerlendirmiş, florid ve K1 vitaminin birlikte verildiği grupta vertebral trabeküler kemik alanında kontrol grubuna ve yalnızca florid verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldüğünü bildirmiştir (Kontrol=  $28.40 \pm 2.28$ , Florid=  $35.13 \pm 2.65$ , Florid+K1 vitamini=  $37.75 \pm 3.59$ ,  $p < 0.05$ ). Tibiada kortikal kemiğin toplam alanında (Kontrol=  $3.83 \pm 0.31$ , Florid=  $5.21 \pm 0.76$ , Florid+K1 vitamini=  $4.23 \pm 0.37$ ,  $p < 0.05$ ) ve kemik iliği kavitesi alanında (Kontrol=  $0.91 \pm 0.07$ , Florid=  $1.86 \pm 0.24$ , Florid+K1 vitamini=  $0.79 \pm 0.30$ ,  $p < 0.05$ ) florid grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülürken, floride ilaveten K1 vitamini verilen grupta ölçülen kortikal kemik alanının kontrol grubuna benzer değerlere gerilediği bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre K1 vitamini trabeküler kemik dokusunda kemik yapımını artırmıştır. Kemik iliği kavitesinde meydana gelen daralma da endokortikal kemik yıkımının azalarak kemik yapımının arttığına işaret etmektedir. Kortikal kemik dokusunda ise K1 vitamini florid ile meydana gelen kemik dokusu değişikliklerini normal seviyeye ulaştırmıştır. Ayrıca K1 vitamininin yüksek oranda trabeküler kemik içeren

vertebrada hem florid hem de kontrol grubuna göre trabeküler kemik yapımında artış sağlaması K1 vitamininin bizim araştırmamızda elde edilen trabeküler alanda kemik oluşumunu artırdığını gösteren bulgular ile uyumlu olması bakımından önemlidir.

Araştırmamızda Alendronat ve K1 vitamininin birlikte kullanıldığı grupta ölçülen medullar kemik alanında oluşan trabeküler kemik alanının (Tb.Ar/Me.Dm) Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışına karşılık mineralize kemik dokusunun osteoid kemik dokusuna oranında (Md.Ar/O.Ar) istatistiksel olarak anlamlı azalma tesbit edilmiştir (Tablo 7). Bu grupta kırık alanında trabeküler kemik yapımında artış meydana gelmesine rağmen mineralize alandaki azalma, aktif kemik yapımı ile kırık iyileşmesinin devam ettiğinin ve kırık alanında osteoblastlar tarafından aktif olarak üretilen osteoid kemik dokusunda mineralizasyon defekti meydana geldiğinin bir göstergesidir. Bu grupta da diğer gruplarda olduğu gibi histomorfometrik parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon görülmemiştir (Tablo 8). Daha önce de değinildiği üzere parametrelerden ikisinin oran (Tb.Ar/Me.Dm, Md.Ar/O.Ar) olarak sunulması, sadece birinin yapısal bir özelliğe ait olması (Ob.Ar) bu korelasyonun belirlenmesini engelleyici bir faktör olabilir.

Araştırmamızın literatürde alendronat ve K1 vitamininin kemik dokusundaki etkilerini değerlendiren ilk çalışma olması nedeniyle bulgularımızı tartışmak amacıyla alendronat ile K vitamininin diğer bir alt grubu olan K2 vitamininin kemik dokusundaki etkilerini inceleyen araştırmalara yer verilmiştir. K vitamini alt gruplarının karboksilasyon döngüsü üzerinde bilinen rolleri ortak olsa da, kemik doku ve kanda bulunma ve depolanma oranlarında farklılıklar olması kemik dokudaki etkilerinin de birbirinden farklı düzeylerde olacağını düşündürmektedir. Kohlmeier et al. (1996), insanlarda K vitamininin dolaşımında büyük oranda bulunan bölümünün K1 vitamini olduğunu, K2 vitamininin ise oldukça düşük konsantrasyonda olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Sakamoto et al. (1996) oral K1 ve K2 vitamini verilen sıçanlarda K1 vitamininin K2 vitaminine (MK-4) göre serumda daha uzun süre kaldığı rapor edilmiştir. Will and Suttie (1992) ise, düşük K vitamini diyetiyle beslenen sıçanlarda oral verilen K1 vitamininin serum ve karaciğer K vitamini seviyesinin yükselmesinde K2 vitaminine göre daha etkili olduğunu ileri

sürmüştür. K vitamini türevlerinin kemik dokusundaki konsantrasyonlarını ölçen araştırmacılardan Hodges et al. (1993) K1 vitamini ve K2 vitamininin MK-6, MK-7, MK-8 olmak üzere üç çeşidini karşılaştırmıştır. Araştırma bulguları K vitamini türevlerinin kemik dokusunda yüksek oranda bulunduğunu ancak K1 vitamininin trabeküler ve kortikal kemikte K2 vitaminine göre daha yüksek konsantrasyonda bulunduğunu bildirilmiştir. Thijssen and Driitj-Reijnders (1994) 9 gün süreyle K vitamininden fakir diyetle beslenen sıçanlara oral ve IV K1 vitamini vererek karaciğer, kalp, kemik ve kıkırdak dokusunda yüksek miktarda K1 vitamini bulunduğunu tesbit etmiş, K2 vitamininin ise ağırlıklı olarak beyin, pankreas ve salgı bezlerinde bulunduğunu bildirmiştir. Bu bulgulara dayanarak, K1 ve K2 vitaminlerinin dokularda selektif dağılım gösterdiği ve vücuda alınan K1 vitamininin vücutta K2 vitaminine dönüştürüldüğü ileri sürülmüştür. Bu nedenle araştırmamızda kemik dokuda K2 vitaminine göre daha yüksek oranda bulunduğu bildirilen K1 vitamini tercih edilmiştir.

Kobayashi et al. (2004) tarafından yapılan çalışmada düşük magnezyum diyeti ile beslenen sıçanlara oral 60mg/100g diet/gün K2 vitamin ve SC haftada iki kez 2, 20 ve 200 µg/kg alendronat verilmiştir. Bu dozlardan sadece 200 µg/kg alendronat verilmesi durumunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında femoral diafizde kemik mineral içeriği (Kontrol= 7.69±0.22, Alendronat= 9.30±0.19,  $p < 0.01$ ), KMD (Kontrol= 1321±15, Alendronat= 1232±10,  $p < 0.01$ ), toplam kemik alanı (Kontrol= 5.84±0.22, Alendronat= 7.56±0.20,  $p < 0.01$ ) ve kortikal kemik kalınlığında (Kontrol= 0.628±0.024, Alendronat= 0.808±0.019,  $p < 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilmiştir. Biyomekanik test bulguları ise aynı grupta yine kontrol grubuna göre maksimum yükleme kuvvetinde istatistiksel olarak anlamlı artış ( $p < 0.01$ ) olduğunu göstermiş, ancak elastik katsayı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. K2 vitamini verilen grupta ise, kemik mineral içeriği KMD, kortikal kemik alanı ve kortikal kemik kalınlığında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmezken, biyomekanik olarak maksimum yükleme kuvveti ( $p < 0.01$ ) ve elastik katsayıda ( $p < 0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı artış bildirilmiştir. Alendronat doza bağlı olarak kemik dokuda yıkımı engelleyerek mineral yapı bakımından daha zengin kemik dokusu oluşumunu sağlarken, K2 vitamini kemik mineral yapısını değiştirmeden kollajen yapıdaki kemik matriks

proteini yapımını artırmak suretiyle elastik katsayıyı olumlu yönde etkilemiştir. Bu verilere dayanarak alendronat ve K2 vitaminin farklı mekanizmalarla kemik dokusu üzerinde olumlu etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır.

Kemiğin yeniden şekillenmesi sürecinde kemik yapımı yeni kemik matriksinin oluşumu ve mineralizasyonu ile başlar. Bu dönem primer mineralizasyon dönemidir. Kemik yapımını artıran K1 vitamini gibi ajanlar, bu dönemde kemik matriksi yapımını artırır (Otomo et al. 2004, Petursson et al. 2004). Kemiğin temel yapısal birimlerinin yani trabeküler kemik ve kortikal kemik osteonlarının tamamının primer mineralizasyonunun tamamlanmasıyla sekonder mineralizasyon başlar. Sekonder mineralizasyon döneminde primer evrede depolanmış mineral içerik olgunlaşarak hidroksiapatit kristallerinin sayısı ve büyüklüğünde artışı sağlar (Boivin and Meunier 2002b). K1 vitamininin bu dönemde de etkisinin OC'nin hidroksiapatit kristallerine bağlanarak kemik mineral olgunlaşmasını artırdığı yönünde olduğunu düşünülmektedir (Boskey et al. 1998). Olgun kemik dokusunda kemik mineralizasyon derecesi kemik yapım yıkım oranı ile ilişkilidir. Alendronat gibi kemik yıkımını önleyici ajanlar ise, trabeküler ve kortikal kemik doku osteonlarının oluşumunu ve yıkımını geciktirerek sekonder mineralizasyon süresini uzatmak yoluyla kemik mineralizasyon derecesini artırmakla birlikte mineralize kemik miktarında artış sağlamamaktadır (Boivin and Meunier 2002b). Bu bilgi alendronatın osteoporoz çalışmalarında mineralize kemik yüzeyinde etki göstermemesini (Iwamoto et al.2006) hatta azalmasını (Bone et al. 1997) açıklar niteliktedir. Kemiğin yeniden şekillenmesinde meydana gelen yavaşlamanın kemik mineralizasyon derecesindeki artışı direkt olarak etkilediği hipotezi alendronatın kemik matriks hacminin artmasına gerek kalmadan kırık meydana gelme sıklığını, kemik mineral densitesini ve kemik dayanıklılığını nasıl arttırdığını da açıklamaktadır (Boivin and Meunier 2002b). Osteoporotik kemikte bu şekilde mevcut kemik dokusunun korunmasını sağlayan K1 vitamini ve alendronat, kırık iyileşmesi gibi yeni kemik dokusunun meydana gelmesi sırasında daha farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. K1 vitamini kırık iyileşme döneminin başında kemik yapımını hızlandırarak kırık alanında meydana gelen kemik matriksinin artmasını sağlamaktadır. Bu bilgi bizim araştırmamızda K1 vitamini uygulamasıyla tesbit edilen trabeküler kemik alanındaki artış ile uyumludur. Alendronat ise, kemik

yıkımını buna bağılı indirekt olarak kemik yapımını baskılamak suretiyle yeni oluşan kemik matriksinin ve dolayısıyla kemik dokusunun daha düşük miktarda oluşmasına neden olur. Yani osteoporotik kemik dokusunda kemik yapım yıkımının baskılanması olumlu etki gösterirken, kırık iyileşmesi sırasında olumsuz etkiye neden olmaktadır. Sonraki aşamada görülen primer ve sekonder mineralizasyon dönemlerinde K1 vitamini, OC yoluyla mineralizasyonun daha erken tamamlanmasını sağlarken, alendronat az miktarda oluşan kemik dokusuna bağılı olarak mineralize kemik dokusunun az miktarda oluşmasına neden olma potansiyeli taşımaktadır. Alendronatın kemik yapım yıkım döngüsünü baskılaması bu aşamada kemiğin yeniden şekillenmesi ve mineralizasyonunun yavaşlamasına neden olarak kırık dokusunun mineralizasyonunda olumsuz etki gösterdiğini akla getirmektedir.

Sunulan araştırmada K1 vitamini grubunda kırık alanında trabeküler kemik oluşumu artarken, Alendronat grubunda trabeküler kemik oluşumunda herhangi bir değışiklik görülmemiştir. Son grupta Alendronat ile birlikte kullanıldığında K1 vitamininin trabeküler kemik oluşumu üzerindeki bu olumlu etkisininin devam etmiş olduğu izlenimi edinilmiştir. Yani bu grupta K1 vitamini kırık alanında kemik yapımı üzerindeki olumlu etkisini alendronatın kemik yapım yıkımını baskılayıcı etkisine rağmen sürdürebilmektedir. Bu bulgu K1 vitamininin kemik yapımı üzerindeki etkisinin alendronatın kemik yapım yıkım mekanizması üzerindeki etkisinden daha güçlü olduğunu düşündürmektedir. İleri sürdüğümüz bu düşünce Alendronat ile K2 vitaminin birlikte ve ayrı ayrı etkilerini araştırmak amacıyla yakın dönemde yapılan bir başka çalışma bulguları ile de desteklenmektedir. Sasaki et al. (2010) tarafından ovaryumları çıkarılarak osteoporoz oluşumu sağlanan farelerde SC 56 µg/kg/hafta alendronat verilen grup (Kontrol= 1.33±0.03, Alendronat= 1.57±0.04,  $p < 0.05$ ) ile alendronata ilave olarak oral 30 mg/kg/gün K2 vitamini verilen bir diğere grupta (Alendronat+K2 vitamini= 1.49±0.03,  $p < 0.05$ ) femur metafizinde ölçülen kortikal kemik alanında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görülürken, trabeküler kemik alanında alendronat grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma kaydedilmiştir (Kontrol= 2.04±0.04, Alendronat= 1.78±0.04,  $p < 0.05$ ). K2 vitamininin tek veya ve alendronat ile birlikte verildiği grupta trabeküler alanda kontrol grubuna göre anlamlı bir değışiklik olmamıştır. Araştırmada K2 vitamininin, trabeküler alan miktarında etki göstermemesi daha önce



bahsedilen, çeşitli yollardan vücuda alınan K2 vitamininin kemik dokuya düşük miktarda dağılımı sonucunda kemikteki etkisinin düşük olabileceği (Thijssen and Drittij-Reijnders 1994) hipoteziyle uyumluluk göstermektedir. Araştırmada alendronat tek başına trabeküler alanda azalmaya neden olurken, K2 vitamini ile birlikte verildiği grupta trabeküler alanda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmemiştir. Bu durum, bizim araştırmamızdaki alendronatın K1 vitamini ile birlikte verildiği grupta görülen trabeküler alandaki artışa karşılık, tek başına alendronat verilen grupta trabeküler alanda anlamlı bir değişikliğin olmadığı bulgusu ile benzerlik taşımaktadır. Dolayısıyla alendronat tek başına trabeküler kemik alanında olumsuz etki göstermiş olsa da K vitamininin trabeküler alan üzerinde sağladığı olumlu etki alendronatın neden olduğu olumsuz etkiyi önüyor görünmektedir.

Literatürde, alendronatın mineralize kemik miktarı üzerinde olumsuz etki gösterdiği çeşitli araştırmalar mevcuttur (Bone et al. 1997, Cao et al. 2002, 2007). Bone et al. (1997) tarafından menapoz sonrası dönemdeki osteoporoz hastaları üzerinde yapılan araştırmada histomorfometrik olarak ölçülen mineralize kemik yüzeyinde 1 mg/gün alendronat kullanan grupta plasebo grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmezken, 2,5 mg/gün ( $p<0.01$ ) ve 5 mg/gün ( $p<0.001$ ) alendronat kullanan gruplarda plasebo grubuna göre anlamlı azalma görülmüştür. Alendronat kullanımının histomorfometrik değerlendirme sonucunda doza bağlı olarak trabeküler kemikte ölçülen mineralize kemik alanını azalttığı kaydedilmiş, meydana gelen bu durumun alendronatın kemik yapım yıkım döngüsünü baskılamak yoluyla yeni oluşan trabeküler kemik dokusunda osteoid dokunun mineralize dokuya dönüşümünü yavaşlatması ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Ancak araştırmamızda alendronat tek başına mineralizasyonu etkilememiştir. Elde edilen bu sonuç alendronatın yeni oluşan mineralize kemik alanı üzerindeki olumsuz etkisinin K1 vitamini ile birlikte kullanıldığında ortaya çıktığını göstermektedir. Alendronat ile K1 vitamini birlikte verildiğinde mineralizasyon defektine neden olarak kırık iyileşmesini engellediği ileri sürülebilir. Alendronat ile K1 vitamini arasında henüz bilinmeyen bir etkileşim neticesinde bu durumun ortaya çıkmış olabileceği akla gelmektedir. Ancak hangi mekanizmayla ortaya çıkmış olursa olsun K1 vitamininden zengin dietle beslenen toplumlarda yada ülkelerde yaşayan veya

kanama problemine karşı dışarıdan K1 vitamini takviyesi alan bireylerde aynı zamanda alendronat kullanımının kırık iyileşmesini olumsuz etkileyebileceği ihtimali yüksektir. Bu anlamda alendronat ve K1 vitamininin birlikte kullanımının kemik dokusu üzerindeki etkisini açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sıçan femurlarının kırık tesbitinde 5 mm'lik kısa vidalar kullanıldığında arka ayaklara binen kuvvetin kırık alanında harekete yol açarak maluniona neden olabileceği, 7 mm uzunluğundaki vidaların femur çapından nispeten uzun olmasına rağmen rigid fiksasyon için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.
2. Femur kırık iyileşme alanında meydana gelen osteomyelit ve apse formasyonunun sistemik enfeksiyona dönüşerek deney hayvanı ağırlığını olumsuz etkileyebileceği tespit edilmiştir.
3. Araştırmamızda kırık iyileşmesinin değerlendirilmesi anlamında histomorfometrik analiz, invaziv bir yöntem olmakla birlikte objektif verilere ulaşarak güvenilir sonuçlar sunmaktadır.
4. Kullanılan dozlarda, Alendronatın kırık iyileşmesi üzerinde etki göstermediği, K1 vitamininin kırık iyileşmesini olumlu etkilediği, Alendronat ve K1 vitamininin birlikte verilmesinin ise kırık iyileşmesini olumsuz etkilediği görülmüştür.
5. Alendronatın çalışmamızda kullanılan dozu kırık iyileşmesini etkilemediğinden, farklı uygulama yolu ve dozunu kullanan diğer araştırmalar, ne tür bir farklı sonuca ulaşılabilceği konusunda aydınlatıcı olabilir.
6. Sıçanlarda kırık iyileşmesi çalışmalarının 9 haftadan daha kısa sürede yapılmasının, iyileşme dokusundaki değişiklikleri zamanında kaydetmek açısından daha uygun olacağı sonucuna ulaşılmıştır.
7. Araştırmamızda K1 vitamini grubunda trabeküler kemik oluşumundaki artış kırık iyileşmesi üzerinde olumlu etkiye işaret ederken; mineralize kemik miktarında kontrol grubuna benzer sonuç elde edilmesi olumsuz bir bulgu değil, takip süresinin daha kısa süre tutulmasının önemine işaret eden bir bulgudur.
8. Alendronatın K1 Vitamini ile birlikte verildiği son gruptaki bulgu, K1 vitamininden zengin diyetle beslenen Japonya gibi ülkelerde veya kanama problemi nedeniyle K1 vitamini kullanan ve alendronat kullanımını gerektiren

patolojik durumu olan bireylerde kemik iyileşmesinin olumsuz etkilenebileceğine işaret etmektedir.

## ÖZET

### **Alendronat ve K1 Vitamininin Rat Femural Kırık Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkisi**

Kemik iyileşmesi osteoblastik ve osteoklastik bağlantının kemik yapımını artırmasıyla meydana gelen kemik dokusunun rejenerasyon sürecidir. Alendronat kemik yapım yıkım döngüsünün hızlandığı kemik hastalıklarında kullanılmaktadır. K1 vitamini ise koagülasyon mekanizması üzerinde bilinen etkisinin yanısıra kemik mineralizasyonu üzerinde etkili olduğu bilinen bir vitamindir.

Bu araştırmanın amacı her iki ajanın kırık kemik iyileşmesi üzerindeki tek tek ve birlikte kullanıldığında gösterdiği etkiyi araştırmaktır.

Sunulan prospektif, randomize ve tek kör çalışmada, 12 aylık Wistar albino sıçanlar (n=60) Kontrol (n=15), Alendronat (n=15), K1 vitamini (n=15) ve Alendronat ile K1 vitamininin birlikte verildiği (n=15) gruplar olmak üzere dört gruba dağıtıldı. Femur kemiğinde osteotomi yöntemiyle oluşturulan kırık parçalar mini plak ve mikro vidalarla rigid fiksasyon uygulanarak sabitlendi. Sıçanlara 2 mg/kg vücut ağırlığı/gün alendronat ve 12 mg/kg vücut ağırlığı/gün K1 vitamini 2 hafta süreyle ait olduğu grubun protokolüne uygun olmak üzere gavaj yöntemiyle verildi. Ameliyatı takip eden 9. haftada çıkarılan femur kemiklerinde histomorfometrik olarak trabeküler alan/meduller çap (Tb.Ar/Me.Dm), osteoblast alanı (Ob.Ar) ve mineralize alan/osteoid alanı (Md.Ar/O.Ar) analiz edildi.

K1 vitamini grubu ve Alendronat ile K1 vitamininin birlikte kullanıldığı gruplarda Tb.Ar/Me.Dm'de (Kontrol grubu= 344,059±274,968; K1 vitamini grubu= 636,018±300,828,  $p=0,044$ ; Alendronat ve K1 vitamininin birlikte kullanıldığı grup= 895,071±853,904,  $p=0,044$ ), Alendronat ve K1 vitamininin birlikte verildiği grupta ise Md.Ar/O.Ar'de (Kontrol grubu= 21,812±23,473, Alendronat ve K1 vitamininin birlikte verildiği grup= 10,291±2,106,  $p=0,044$ ) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark tesbit edildi.

K1 vitamini kırık iyileşmesini trabeküler kemik alanını artırarak olumlu yönde etkilerken, alendronat ve K1 vitamininin birlikte verilmesinin kemik

mineralizasyonunu engelleyerek kırık iyileşmesini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Alendronat, K1 vitamini, Kemik, Kırık İyileşmesi, Histomorfometri.

## ABSTRACT

### **The Effect of Alendronate and/or Vitamin K1 on Fractured Rat Femoral Bone Healing**

Bone healing is a bone regenerative process characterized with osteoblastic and osteoclastic coupling in the advantage of bone formation. Alendronate is typically used for bone diseases in which increased bone turnover. Vitamin K1 has also reported as a micronutrient regulates bone mineralization as well as its' well known role on coagulation pathway.

The aim of this study was to investigate the effect of alendronate and/or vitamin K1 on bone fracture healing.

This prospective, randomized and single blind study, 12-months-old Wistar albino rats (n=60) were divided into four-groups as Control (n=15), Alendronate (n=15), Vitamin K1 (n=15) and Alendronate&Vitamin K1 (n=15) groups. Bone fracture model was created with femoral osteotomy and fragments were fixed rigidly with mini-plate and micro-screws. The rats recieved alendronate 2 mg/kg body weight/per day and the vitamin K1 12mg/kg body weight/per day via gavaj for 2-weeks according to their group protocol. In the femurs which were removed at 9-weeks after operation, trabecular area/medullar diameter (Tb.Ar/Me.Dm), osteoblast area (Ob.Ar) and mineralized area/osteoid area (Md.Ar/O.Ar) were investigated histomorphometrically.

The statistically significant differences were observed in Tb.Ar/Me.Dm in Vitamin K1 and Alendronate&Vitamin K1 groups (Control group= 344,059±274,968; Vitamin K1 group= 636,018±300,828,  $p=0,044$ ; Alendronate&Vitamin K1 group= 895,071±853,904,  $p=0,044$ ); and in Md.Ar/O.Ar in Alendronate&Vitamin K1 group (Control group= 21,812±23,473; Alendronate&Vitamin K1 group= 10,291±2,106,  $p=0,044$ ) when compared to Controls.

In conclusion, while individual administration of vitamin K1 seems to affect fracture healing in a favorable manner by increasing trabecular bone area; combined

administration of the alendronate and vitamin K1 appeared to affect fracture healing negatively by inhibition of bone mineralization.

**Key Words:** Alendronate, Vitamin K1, Bone, Fracture Healing, Histomorphometry.



## KAYNAKLAR

Açıklım E, Bayçu C, Gürer F, Aral E. *Histoloji*. 2. Baskı, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Yayınları, 1995.

Adami S, Zamberlan N. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf* 1996; 14(3): 158-170.

Akay, M.T. *Genel Histoloji*. 6. Baskı, Ankara: Palme yayıncılık, 2006.

Alden CL, Parker RD, Eastman DF. Development of an acute model for the study of chloromethanediphosphonate nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 1989; 17: 27-32.

Alicıkaya C. Kemik defektlerinde ABM/P-15 ile lokal alendronatın kombine kullanımının histopatolojik olarak incelenmesi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji AD, Doktora Tezi, Ankara, (Doç. Dr. Şule Bulut), 2006.

Almquist H.J. The early history of vitamin K. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1975; 28: 656-659.

Altunatmaz K. Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2004; 30(1): 141-147.

Anbinder AL, Prado FA, Prado MA, Balducci I, Rocha RF. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res* 2007; 21(3): 247-252.

Aonuma H, Miyakoshi N, Hongo M, Kasukawa Y, Shimada Y. Low serum levels of undercarboxylated osteocalcin in postmenopausal osteoporotic women receiving an inhibitor of bone resorption. *Tohoku J Exp Med* 2009; 218(3): 201-205.

Azuma Y, Oue Y, Kanatani H, Ohta T, Kiyoki M, Komoriya K. Effects of continuous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats: comparison with pamidronate and etidronate in growing rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 286(1): 128-135.

Azuma Y, Sato H, Oue Y, Okabe K, Ohta T, Tsuchimoto M, et al. Alendronate distributed on bone surfaces inhibits osteoclastic bone resorption in vitro and in experimental hypercalcemia models. *Bone* 1995;16(2): 235-45.

Bagan JV, Jiménez Y, Hernández S, Murillo J, Díaz JM, Poveda R et al. Osteonecrosis of the jaws by intravenous bisphosphonates and osteoradionecrosis: a comparative study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2009; 14(12): 616-619.

Balena R, Toolan BC, Shea M, Markatos A, Myers ER, Lee SC, et al. The effects of 2-year treatment with the aminobisphosphonate alendronate on bone metabolism, bone histomorphometry, and bone strength in ovariectomized nonhuman primates. *J Clin Invest* 1993; 92(6): 2577-2586.

Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 2118-2132.

Berkner KL. The vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 127-149.

Bilezikian J P. Osteonecrosis of the Jaw. Do Bisphosphonates Pose a Risk? *N Eng J Med* 2006; 355: 2278-2281.

Bitensky L, Hart JP, Catterall A, Hodges SJ, Pilkington MJ, Chayen J. Circulating vitamin K levels in patients with fractures. *J Bone Joint Surg Br* 1988; 70(4): 663-664.

Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC, et al. Randomised trial of effect of alendronate on risk of fracture in women with existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Lancet* 1996; 348(9041): 1535-1541.

Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, et al. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(11): 4118-4124.

Boivin G, Meunier PJ. Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002a; 2(6): 538-543.

Boivin G, Meunier PJ. Changes in bone remodeling rate influence the degree of mineralization of bone. *Connect Tissue Res*. 2002b; 43(2-3): 535-537.

Bone HG, Downs RW Jr, Tucci JR, Harris ST, Weinstein RS, Licata AA, McClung MR, Kimmel DB, Gertz BJ, Hale E, Polvino WJ. Dose-response relationships for alendronate treatment in osteoporotic elderly women. Alendronate Elderly Osteoporosis Study Centers. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(1): 265-274.

Booth SL, Broe KE, Gagnon DR, Tucker KL, Hannan MT, McLean RR et al. Vitamin K intake and bone mineral density in women and men. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 512-516.

Booth SL, Broe KE, Peterson JW, Cheng DM, Dawson-Hughes B, Gundberg CM, et al. Associations between vitamin K biochemical measures and bone mineral density in men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(10): 4904-4909.

Booth SL, Dallal G, Shea MK, Gundberg C, Peterson JW, Dawson-Hughes B. Effect of vitamin K supplementation on bone loss in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 1217-1223.

Booth SL, Lichtenstein AH, O'Brien-Morse M, McKeown NM, Wood RJ, Saltzman E, et al. Effects of a hydrogenated form of vitamin K on bone formation and resorption. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(6): 783-790.

Booth SL, Suttie JW. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr* 1998; 128: 785-788.

Booth SL, Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Gagnon DR, Cupples LA et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1201-1208.

Boskey AL, Gadaleta S, Gundberg C, Doty SB, Ducy P, Karsenty G. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone* 1998; 23: 187-196

Bouchaert JH, Said AH. Fracture healing by vitamin K. *Nature* 1960; 185: 849-857.

Braam LA, Knapen MH, Geusens P, Brouns F, Hamulyák K, Gerichhausen MJ, Vermeer C. Vitamin K1 supplementation retards bone loss in postmenopausal women between 50 and 60 years of age. *Calcif Tissue Int.* 2003; 73(1): 21-26.

Bügel S, Sorensen AD, Hels O, Kristensen M, Vermeer C, Jakobsen J et al. Effect of phyloquinone supplementation on biochemical markers of vitamin K status and bone turnover in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition* 2007; 97(2): 373-380.

Bügel S. Vitamin K and bone health in adult humans. *Vitamins and Hormones* 2008; 78: 393-416.

Cadir B, Heys TD, Hodges S, Harris M, Meghji S. The effect of vitamin K1 and aprotinin on bone healing. *J Dent Res* 2000; 79:624 (abs).

Cadir B, Kurkcu M, Oz IA, Benlidayı ME. Effects of vitamin K1 on fluoride-induced bone changes in growing rats: A histomorphometric and radiodensitometric study. *Archives of oral biology* 2009; 54: 512-517.

Cadir B, Kurkcu M, Uysal H, Kircelli C, Solmaz S. Vitamin-K1 (Phylloquinone) prevents sodium fluoride (NaF)-induced skeletal fluorosis. *Journal of Dental Research* 2003; 82(Special Issue):B-24.

Cadir B, Meghji S, Hodges S, Harris M. Aprotinin (Trasylol) and vitamin K1 (Phylloquinone) reduce tenderness in healing bone. *J Dent Res* 1998; 77: 775 (abs).

Cadir B, Nair S, Meghji S, Hodges S, Harris M. Changes in bone alkaline phosphatase and pyridinoline crosslinks after orthognathic surgery. *The British Society for Dental Research* 1997, 76(5):1075 (abs).

Cadir B, Onaran I, Nayir T, Mermi B, Delibaş N. Low-dose Sodium-Fluoride may have an Antioxidant Effect: a Preliminary Report. 2. Ağız Çene-Yüz Cerrahisi Birliği Derneği Uluslararası Kongresi Poster Sunumu, 16-20 Mayıs 2008, Antalya, Türkiye.

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2002; 17(12): 2237-2246.

Cao Y, Mori S, Mashiba T, Kaji Y, Manabe T, Iwata K, et al. 1Alpha,25-dihydroxy-2beta(3-hydroxypropoxy)vitamin D3 (ED-71) suppressed callus remodeling but did not interfere with fracture healing in rat femora. *Bone* 2007; 40(1): 132-139.

Cardoso L, Herman BC, Verborgt O, Laudier D, Majeska RJ, Schaffler MB. Osteocyte apoptosis controls activation of intracortical resorption in response to bone fatigue. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 597-605.

Cham BE, Smith JL, Colquhoun DM. What happens to vitamin K(1) in serum after bone fracture? *Clin Chem* 1999; 45(12): 2261-2263.

Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1475-1480.

Cireli, E. *Genel Histoloji Hücre ve Dokular*. 6. Baskı, İzmir: Ege Üniversitesi Yayınları, 1999.

Cremers SC, Pillai G, Papapoulos SE. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of bisphosphonates: use for optimisation of intermittent therapy for osteoporosis. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44(6): 551-570.

Cryer B, Bauer DC. Oral bisphosphonates and upper gastrointestinal tract problems: What is the evidence? *Mayo Clin Proc* 2002; 77: 1031-1043.

Cryer B, Miller P, Petruschke RA, Chen E, Geba GP, Papp AE. Upper gastrointestinal tolerability of once weekly alendronate 70 mg with concomitant non-steroidal anti-inflammatory drug use. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21(5): 599-607.

Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Connor E, Musliner TA, et al. Effect of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: results from the Fracture Intervention Trial. *JAMA* 1998; 280(24): 2077-2082.

Çadır B. K1 vitamini ve iskeletsel florozis. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, (Yrd. Doç. Dr. Mehmet KÜRKÇÜ), 2002.

Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron* 2005; 36: 609-616.

Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochem J* 1935b; 29: 1273-1280.

Dam H. The antihemorrhagic vitamin of the chick: Occurrence and chemical nature. *Nature* 1935a; 135: 652-659.

Dannemann C, Gratz KW, Zwahlen R. Clinical experiences with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaws. *Swiss Med Wkly* 2006; 36: 504-509.

Davidson RT, Foley AL, Engelke JA, Suttie JW. Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *J Nutr* 1998; 128(2): 220-223.

De Groen PC, Lubbe DF, Hirsch LJ, Daifotis A, Stephenson W, Freedholm D et al. Esophagitis associated with the use of alendronate. *N Engl J Med* 1996; 355: 1016-1021.

De la Mata J, Uy HL, Guise TA, Story B, Boyce BF, Mundy GR et al. Interleukin-6 enhances hypercalcemia and bone resorption mediated by parathyroid hormone-related protein in vivo. *J Clin Invest* 1995; 95(6): 2846-2852.

Derenne S, Amiot M, Barille S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res* 1999; 14(12): 2048-2056.

Diaz Curiel M, Piedra C, Romero FI, Montero M, Gomez S, Lefort M et al. Effect of risedronate on bone mass, remodelling and biomechanical strength in orchidectomized rats. *Horm Res* 2008; 70: 93-99.

Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc* 2008; 83(9): 1032-1045.

Ebetino FH, Bayless AV, Amburgey J, Ibbotson KJ, Dansereau S, Ebrahimpour A. Elucidation of a Pharmacophore for the Bisphosphonate Mechanism of Bone Antiresorptive Activity. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 1996; 109 (4) : 217-220.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;(355): 7-21.

Einhorn TA, Gundberg CM, Devlin VJ, Warman J. Fracture healing and osteocalcin metabolism in vitamin K deficiency. *Clin Orthop Relat Res* 1988; 237: 219-225.

Ekeland A, Engesoeter LB, Langeland N. Influence of age on mechanical properties of healing fractures and intact bones in rats. *Acta Orthop Scand* 1982; 53(4): 527-534.

Erdoğan Ö. Düşük Yoğunlukta Kesikli Ultrason Uygulamasının Mandibuler Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, (Prof. Dr. Emin ESEN), 2007.

Feskanich D, Weber P, Willett WC, Rockett H, Booth SL, Colditz GA. Vitamin K intake and hip fractures in women: A prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 74-79.

Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ et al. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 133-138.

Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J* 2003; 12(2): 142-146.

Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanism of action. *Endocr Rev* 1998; 19(1): 80-100.

Flora L, Hassing GS, Cloyd GG, Bevan JA, Parfitt AM, Villanueva AR. The long-term skeletal effects of EHDP in dogs. *Metab Bone Dis Relat Res* 1981; 3: 289-300.

Fogelman I, Bessent RG, Turner JG, Citrin DL, Boyle T, Greig WR. The use of whole body retention of Tc-99m diphosphonate in the diagnosis of metabolic bone disease. *J Nucl Med* 1978; 19: 270-275.

Follet H, Li J, Phipps RJ, Hui S, Condon K, Burr DB. Risedronate and alendronate suppress osteocyte apoptosis following cyclic fatigue loading. *Bone* 2007;40: 1172-1177.

Foster RJ, Dixon GL, Bach W, Appleyard RW, Green TM. Internal fixation of fractures and non-unions of the humeral shaft. Indications and results in a multi-center study. *J Bone Joint Surg Am* 1985; 67(6): 857-864.

Fu L, Tang T, Miao Y, Hao Y, Dai K. Effect of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on fracture healing and bone remodeling in ovariectomized rat femora. *Bone* 2009; 44(5): 893-898.

Gallacher SJ, Fenner JA, Anderson K, Bryden FM, Banham SW, Logue FC. Intravenous pamidronate in the treatment of osteoporosis associated with corticosteroid dependent lung disease: an open pilot study. *Thorax* 1992; 47(11): 932-936.

Galli M, Caniggia M. Osteocalcin. *Minerva Med* 1984; 75(42): 2489-2501.

Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *N Engl J Med*. 1980; 302(26):1460-6.

Garber AK, Binkley NC, Krueger DC, Suttie JW. Comparison of phylloquinone bioavailability from food sources or a supplement in human subjects. *J Nutr* 1999; 129: 1201-1203.

García-Moreno C, Serrano S, Nacher M, Farré M, Díez A, Mariñoso ML, et al. Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone* 1998; 22(3): 233-239.

Garnero P, Delmas PD. Bone markers. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1997; 11(3): 517-537.

Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of Histomorphometric Methods to the Study of Bone Repair. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1715-1722.

Gertz BJ, Holland SD, Kline WF, Matuszewski BK, Freeman A, Quan H, et al. Studies of the oral bioavailability of alendronate. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58(3): 288-298.

Ghodadra N, Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures. *Biologics*. 2008; 2(3): 345-354

Giavaresi G, Fini M, Gnudi S, Aldini NN, Rocca M, Carpi A, Giardino R. Comparison of calcitonin, alendronate and fluorophosphate effects on ovariectomized rat bone. *Biomed Pharmacother*. 2001; 55(7):397-403.

Groenen-van Dooren MM, Rondén JE, Soute BA, Vermeer C. Bioavailability of phylloquinone and menaquinones after oral and colorectal administration in vitamin K-deficient rats. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(6): 797-801.

Hart JP, Shearer MJ, Klenerman L, Catterall A, Reeve J, Sambrook PN et al. Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K1 in osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60(6): 1268-1269.



Herrmann M, Klitscher D, Georg T, Frank J, Marzi I, Herrmann W. Different kinetics of bone markers in normal and delayed fracture healing of long bones. *Clin Chem*. 2002; 48(12): 2263-2266.

Hirao M, Hashimoto J, Ando W, Ono T, Yoshikawa H. Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to alendronate monotherapy and combined therapy with vitamin K2 in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 2008; 26(3): 260-264.

Hodges SJ, Akesson K, Vergnaud P, Obrant K, Delmas PD. Circulating levels of vitamins K1 and K2 decreased in elderly women with hip fracture. *J Bone Miner Res* 1993; 8: 1241-1245.

Hodges SJ, Bejui J, Leclercq M, Delmas PD. Detection and measurement of vitamins K1 and K2 in human cortical and trabecular bone. *J Bone Miner Res* 1993; 8(8): 1005-1008.

Hodges SJ, Pilkington MJ, Stamp TC, Catterall A, Shearer MJ, Bitensky L et al. Depressed levels of circulating menaquinones in patients with osteoporotic fractures of the spine and femoral neck. *Bone* 1991; 12: 387-389.

Hofstaetter JG, Wang J, Hofstaetter SG, Glimcher MJ. The effects of high-dose, long-term alendronate treatment on microarchitecture and bone mineral density of compact and trabecular bone in the proximal femur of adult male rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 2010; 130(7): 937-944.

Ito M, Azuma Y, Takagi H, Komoriya K, Ohta T, Kawaguchi H. Curative Effect of Combined Treatment With Alendronate and 1 -Hydroxyvitamin D3 on Bone Loss by Ovariectomy in Aged Rats. *Jpn J Pharmacol* 2002; 89: 255-266.

Itoh F, Aoyagi S, Kusama H, Kojima M, Kogo H. Effects of clodronate and alendronate on local and systemic changes in bone metabolism in rats with adjuvant arthritis. *Inflammation* 2004; 28: 15-21.

Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Yeh JK. Comparative effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and bone mechanical properties in ovariectomized rats. *Exp Anim* 2006a; 55(4): 357-367.

Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S, Sato Y, Yeh JK. Differential effect of vitamin K and vitamin D supplementation on bone mass in young rats fed normal or low calcium diet. *Yonsei Med J* 2004; 45: 314-324.

Iwamoto J, Takeda T, Sato Y, Shen CL, Yeh JK. Beneficial effect of pretreatment and treatment continuation with risedronate and vitamin K2 on cancellous bone loss after ovariectomy in rats: a bone histomorphometry study. *J Nutr Sci Vitaminol* 2006b; 52(5): 307-315.

Iwamoto J, Takeda T, Sato Y, Yeh JK. Additive effect of vitamin K2 and risedronate on long bone mass in hypophysectomized young rats. *Exp Anim* 2007; 56(2): 103-110.

Iwata K, Li J, Follet H, Phipps RJ, Burr DB. Bisphosphonates suppress periosteal osteoblast activity independently of resorption in rat femur and tibia. *Bone* 2006; 39: 1053–1058.

Jungueira LC. Temel Histoloji. 1. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi, 1998.

Karamustafa F, Çelebi N. Bisphosphonates and Alendronate. *J Pharm Sci* 2006; 31: 31-42.

Kılıçoğlu S.S. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002; 55(2): 143-150.

Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res* 2007; 86(11): 1022-1033.

Khan MA, Partin AW. Bisphosphonates in metastatic prostate cancer. *Rev Urol.* 2003; 5(3): 204-206.

Knapen MHJ, Hamulyak K, Vermeer C. The effect of vitamin K supplementation on circulating osteocalcin (bone GLA protein) and urinary calcium excretion. *Ann Intern Med* 1989; 111: 1001-1005.

Knoch F, Jaquier C, Kowalsky M, Schaeren S, Alabre C, Martin I, et al. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2005; 26(34): 6941-6949.

Kobayashi M, Hara K, Akiyama Y. Effects of vitamin K2 (menatetrenone) and alendronate on bone mineral density and bone strength in rats fed a low-magnesium diet. *Bone* 2004; 35: 1136-1143.

Kohlmeier M, Salomon A, Saupe J, Shearer MJ. Transport of vitamin K to bone in humans. *J Nutr.* 1996; 126: 1192-1196.

Koivukangas A, Tuukkanen J, Kippo K, Jämsä T, Hannuniemi R, Pasanen I, et al. Long-term administration of clodronate does not prevent fracture healing in rats. *Clin Orthop Relat Res* 2003; 408: 268-278.

Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, et al. Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? *Calcif Tissue Int* 2010; 86(1): 23-32.

Koshihara Y, Hoshi K, Okawara R, Ishibashi H, Yamamoto S. Vitamin K stimulates osteoblastogenesis and inhibits osteoclastogenesis in human bone marrow cell culture. *J Endocrinol* 2003; 176(3): 339-348.

Kratzel C, Bergmann C, Duda G, Greiner S, Schmidmaier G, Wildemann B. Characterization of a rat osteotomy model with impaired healing. *BMC Musculoskelet Disord* 2008; 9: 135.

Kreel L, Thornton A, Stewart I. Renal metastases shown by <sup>99m</sup>Tc-methylene diphosphonate scintigram which failed to detect vertebral metastases. *Postgrad Med J* 1989; 65(759): 22-26.

Kulman JD, Harris JE, Xie L, Davie EW. Identification of two novel transmembrane gamma carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(4): 1370-1375.

Lafage MH, Balena R, Battle MA, Shea M, Seedor JG, Klein H, et al. Comparison of alendronate and sodium fluoride effects on cancellous and cortical bone in minipigs. A one-year study. *J Clin Invest* 1995; 95(5): 2127-2133.

Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. *J Bone Miner Res* 1999; 14(6): 969-979.

Lieberman UA, Weiss SR, Broell J, Minne HW, Quan H, Bell NH et al. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1437-1443.

Lieberman UA. Long-term safety of bisphosphonate therapy for osteoporosis: a review of the evidence. *Drugs Aging* 2006; 23(2): 89-98.

Little DG, Cornell MS, Hile MS, Briody J, Cowell CT, Bilston L. Effect of pamidronate on distraction osteogenesis and fixator-related osteoporosis. *Injury* 2001; 32(4): 14-20.

Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G. Systemic versus local application of gentamicin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone*. 2005;36(5):770-778.

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russell RGG, Rogers MJ. Nitrogen containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent posttranslational prenylation of GTP binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 581-589.

Lyles KW, Siris ES, Singer FR, Meunier PJ. A clinical approach to diagnosis and management of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1379-1387.

Macdonald HM, McGuigan FE, Lanham-New SA, Fraser WD, Ralston SH, Reid DM. Vitamin K1 intake is associated with higher bone mineral density and reduced bone resorption in early postmenopausal Scottish women: no evidence of gene nutrient interaction with apolipoprotein E polymorphisms. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1513-1520.

Mack DO, Suen ET, Girardot JM, Miller JA, Delaney R, Johnson BC. Soluble enzyme system for vitamin K-dependent carboxylation. *J Biol Chem* 1976; 251(11): 3269-3276.

Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Dechavanne M, Delmas PD. Protein S, a vitamin K-dependent, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology* 1992; 130: 1599-1604.

Manabe T, Mori S, Mashiba T, Cao Y, Kaji Y, Iwata K et al. Eel calcitonin (elcatonin) suppressed callus remodeling but did not interfere with fracture healing in the femoral fracture model of cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Metab* 2009; 27(3): 295-302.

Manfredi M, Merigo E, Guidotti R, Meleti M, Vescovi P. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case series of 25 patients affected by osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011; 40(3): 277-284.

Mariotti A. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *J Dent Educ*. 2008; 72(8): 919-929

Marsh DR, Li G. The biology of fracture healing: optimising outcome. *British Medical Bulletin* 1999; 55(4): 856-869.

Martini LA, Booth SL, Saltzman E, do Rosario Dias de Oliveira Latorre M, Wood RJ. Dietary phyloquinone depletion and repletion in postmenopausal women: effects on bone and mineral metabolism. *Osteoporos Int* 2006; 17: 929-935.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the jaws: Risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1567-1575.

Marx RE. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61(9): 1115-1117.

Mashiba T, Hirano T, Turner CH, Forwood MR, Johnston CC, Burr DB. Suppressed bone turnover by bisphosphonates increases microdamage accumulation and reduces some biomechanical properties in dog rib. *Journal of Bone and Mineral Research* 2000; 15: 613-620.

McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978 ; 60-B(2):150-162.

Migliorati CA, Siegel MA, Elting LS. Bisphosphonate-associated osteonecrosis: a long-term complication of bisphosphonate treatment. *Lancet Oncol* 2006; 7(6): 508-514.

Migliorati CA. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4253-4254.

Miloro M, Ghali GE., Larsen PE, Waite PD. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2nd Edition, London: BC Decker Inc, 2004.

Minaire P, Berard E, Meunier PJ, Edouard C, Goedert G, Pilonchery G. Effects of disodium dichloromethylene diphosphonate on bone loss in paraplegic patients. *J Clin Invest* 1981; 68(4): 1086-1092.

Mitchell DY, Barr WH, Eusebio RA, Pallone-Stevens KA, Duke FP, Russell DA, et al. Risedronate pharmacokinetics and intra and inter-subject variability upon single-dose intravenous and oral administration. *Pharm Res* 2001; 18:166-170.

Molster A, Gjerdet NR. Effects of instability on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 1984; 55: 342-346.

Morris CD, Einhorn TA. Bisphosphonates in orthopaedic surgery *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87: 1609-1618.

Mosekilde L, Thomsen JS, Mackey MS, Phipps RJ. Treatment With Risedronate or Alendronate Prevents Hind-Limb Immobilization-induced Loss of Bone Density and Strength in Adult Female Rats. *Bone* 2000; 27: 639-645.

Notoya K, Yoshida K, Shirakawa Y, Taketomi S, Tsuda M. Similarities and differences between the effects of ipriflavone and vitamin K on bone resorption and formation in vitro. *Bone* 1995; 16(4 Suppl): 349-353.

Nyman MT, Paavolainen P, Lindholm TS. Clodronate increases the calcium content in fracture callus. An experimental study in rats. *Arch Orthop Trauma Surg* 1993; 112(5): 228-231.

Ogawa K, Hori M, Takao R, Sakurada T. Effects of combined elcatonin and alendronate treatment on the architecture and strength of bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2005; 23(5): 351-358.

Otomo H, Sakai A, Ikeda S, Tanaka S, Ito M, Phipps RJ, Nakamura T. Regulation of mineral-to-matrix ratio of lumbar trabecular bone in ovariectomized rats treated with risedronate in combination with or without vitamin K2. *J Bone Miner Metab*. 2004; 22(5): 404-414.

Ott SM. Histomorphometric Measurements of Bone Turnover, Mineralization, and Volume. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3: 151-156.

Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter's Essential Histology*. 1st Ed., Philadelphia, Saunders/Elsevier, 2008.

Ozkaya U, Kiliç A, Ozdoğan U, Beng K, Kabukçuoğlu Y. Comparison between locked intramedullary nailing and plate osteosynthesis in the management of adult forearm fractures. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2009; 43(1): 14-20.

Öber, A. *Histoloji*. 2. Baskı, Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 2006.

Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system). *Bone* 1988; 9(1): 67-69.

Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M. Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 3: 34-47.

Paz LH, Falco V, Teng NC, Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V. Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34(8): 1015-1022.

Pazianas M, Epstein S, Zaidi M. Evaluating the antifracture efficacy of bisphosphonates. *Rev Recent Clin Trials* 2009; 4(2): 122-130.

Penel N, Dewas S, Doutrelant P, Clisant S, Yazdanpanah Y, Adenis A. Cancer-associated hypercalcemia treated with intravenous diphosphonates: a survival and prognostic factor analysis. *Support Care Cancer*. 2008; 16(4): 387-392.

Percival RC, Paterson AD, Yates AJ, Beard DJ, Douglas DL, Neal FE et al. Treatment of malignant hypercalcaemia with clodronate. *Br J Cancer* 1985; 51(5): 665-669.

Perez Lopez FR. Postmenopausal osteoporosis and alendronate. *Maturitas* 2004; 48: 179-192.

Peter CP, Cook WO, Nunamaker DM, Provost MT, Seedor JG, Rodan GA. Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs. *Journal of Orthopaedic Research* 1996; 14(1): 74-79.

Peterson LJ., Ellis E., Hupp JR., Tucker MR. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. 3rd. Edition, USA: Mosby-Year Book, 1998.

Petursson S, Harrington D, Shearer M, Hopper C, Hodges SJ. Circulating levels of phylloquinone (vitamin K1) in patients following orthognathic surgery. *Journal of Dental Research*. 1994; 72(4): 689.

Pettifor J, Benson R. Congenital malformations associated with the administration of oral anticoagulants during pregnancy. *J Pediatr* 1975; 86: 459-462.

Preston CJ, Yates AJ, Beneton MN, Russell RG, Gray RE, Smith R et al. Effective short term treatment of Paget's disease with oral etidronate. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 292: 79-80.

Price PA, Lothringer JW, Baukol SA, Reddi AH. Developmental appearance of the vitamin K-dependent protein of bone during calcification. Analysis of mineralizing tissues in human, calf, and rat. *J Biol Chem* 1981; 256(8): 3781-3784.

Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K dependent bone protein. *The Journal of Biological Chemistry* 1985; 260(28): 14971-14975.

Proudfoot D, Shanahan CM.. Molecular mechanisms mediating vascular calcification: Role of matrix Gla protein. *Nephrology* 2006; 11: 455-461.

Pytlik M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Sliwiński L, Janiec W, Rymkiewicz I. Effect of concurrent administration of alendronate sodium and retinol on development of changes in histomorphometric parameters of bones induced by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol* 2004; 56(5): 571-579.

Rasubala L, Yoshikawaa H, Islama AAS, Nagatab K, Iijima T, Ohishia M. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004; 42: 315-322.

Revell PA. Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol* 1983; 36(12): 1323-1331.

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys* 1998; 20(2): 92-102.

Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK. Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun* 1985; 47(3): 581-586.

Rodan GA, Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *J Clin Invest* 1996; 97(12): 2692-2696.

Rodan GA, Rezska AA. Bisphosphonate mechanisms of action. *Curr Mol Med* 2002; 2(6): 571-577.

Rodriguez-Merchan E C, Gomez-Castresana F. Internal Fixation of Nonunions. *Clin Orthop* 2004; 419: 13-20.

Ronden JE, Thijssen HH, Vermeer C. Tissue distribution of K-vitamins under different nutritional regimens in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1379(1): 16-22.

Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histology A Text and Atlas*. 3rd Ed., Maryland, USA; 1995.

Russell RGG, Rogers MJ. Bisphosphonates: From the laboratory to the clinic and back again. *Bone* 1999; 25(1): 97-106.

Russell RGG. Bisphosphonates from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 367-401.

Russell RGG. Bisphosphonates: Mode of action and pharmacology. *Pediatrics* 2007; 119: 150-162.



Saito M, Shiraishi A, Ito M, Sakai S, Hayakawa N, Mihara M, et al. Comparison of effects of alfacalcidol and alendronate on mechanical properties and bone collagen cross-links of callus in the fracture repair rat model. *Bone* 2010; 46(4): 1170-1179.

Sakamoto N, Kimura M, Hiraike H, Itokawa Y. Changes of phylloquinone and menaquinone-4 concentrations in rat liver after oral, intravenous and intraperitoneal administration. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66(4): 322-328.

Sama AA, Khan SN, Myers ER, Huang RC, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, et al. High-dose alendronate uncouples osteoclast and osteoblast function: a study in a rat spine pseudarthrosis model. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 425: 135-142.

Sasaki H, Miyakoshi N, Kasukawa Y, Maekawa S, Noguchi H, Kamo K, et al. Effects of combination treatment with alendronate and vitamin K(2) on bone mineral density and strength in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab* 2010; 28(4): 403-409.

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991; 88(6): 2095-2105.

Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Fioroni P, Juillerat L, Markert M et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* 1996; 18(2): 133-139.

Schindeler A, McDonald MM., Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2008; 19: 459-466.

Schmidt A, Rutledge SJ, Endo N, Opas EE, Tanaka H, Wesolowski G, et al. Protein-tyrosine phosphatase activity regulates osteoclast formation and function: inhibition by alendronate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(7): 3068-3073.

Seedor JG, Quartuccio HA, Thompson DD. The bisphosphonate alendronate (MK-217) inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *J Bone Miner Res* 1991; 6(4):339-346.

Selvi F. Deneysel olarak oluşturulan kırıklara bifosfonat ilaç kullanımının etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Prof.Dr.Ayfer Kaynar), 2008.

- Shearer MJ, McBurney A, Barkhan P. Studies on the absorption and metabolism of phylloquinone (vitamin K1) in man. *Vitam Horm* 1974; 32: 513-542.
- Shearer MJ. Vitamin K. *Lancet* 1995; 345(8944): 229-234.
- Simmons DJ. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res.* 1985; 200:100-113.
- Sirohi B, Powles R. Multiple myeloma. *Lancet* 2004; 363: 875-887.
- Sloan AV, Martin JR, Li S, Li J. Parathyroid hormone and bisphosphonate have opposite effects on stress fracture repair. *Bone.* 2010; 47(2): 235-240.
- Smith R, Russell RGG, Bishop M. Diphosphonates and Paget's disease of bone, *The Lancet* 1971; 297 (7706): 945-947.
- Sokoll LJ, Booth SL, O'Brien ME, Davidson KW, Tsaion KI, Sadowski JA. Changes in serum osteocalcin, plasma phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(3): 779-784.
- Sokoll LJ, Sadowski JA. Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(4): 566-573.
- SPSS Inc. SPSS for Windows. Version 15.0, Chicago, IL, 2006.
- Stanley TB, Jin DY, Lin PJ, Stafford DW. The propeptides of the vitamin K-dependent proteins possess different affinities for the vitamin K-dependent carboxylase. *J Biol Chem* 1999; 274(24): 16940-16944.
- Stiffler KS. Internal fracture fixation. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2004; 19(3):105-113.
- Stuermer EK, Komrakova M, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S et al. Musculoskeletal response to whole-body vibration during fracture healing in intact and ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87(2): 168-180.
- Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council. *Nutrient Requirements of Laboratory Animals.* 4th Ed., Washington D.C: National Academy Press, 1995.

Su RJ, Chang CC, Tsai KS. Plasma PTH and PTH-rP levels and clodronate therapy in cancer patients with hypercalcemia. *J Formos Med Assoc* 1993; 92(11): 977-982.

Sugiyama T, Kawai S. Carboxylation of osteocalcin may be related to bone quality: a possible mechanism of bone fracture prevention by vitamin K. *J Bone Miner Metab* 2001; 19(3): 146-149.

Szulc P, Chapuy MC, Meunier PJ, Delmas PD. Serum undercarboxylated osteocalcin is a marker of the risk of hip fracture in elderly women. *J Clin Invest* 1993; 91(4): 1769-1774.

Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Hiroe Aoshima, Tsuyoshi Ohishi, Tetsuo Inoue. Acute Effects of Fracture on Bone Markers and Vitamin K. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 1583-1584.

Taljanovic MS, Jones MD, Ruth JT, Benjamin JB, Sheppard JE, Hunter TB. Fracture fixation. *Radiographics* 2003; 23(6): 1569-1590.

Tang KF, Chan CH. Technetium-99m methylene diphosphonate bone scan: Mechanisms and clinical applications. *Singapore medical Journal* 1982; 24(2): 61-72.

Tanvetyanon T, Stiff PJ. Management of the adverse effects associated with intravenous bisphosphonates. *Ann Oncol* 2006; 17(6): 897-907.

Tasatargil A, Cadir B, Dalaklioglu S, Yurdakonar E, Caglar S, Turkay C. Effects of vitamin K1 supplementation on vascular responsiveness and oxidative stress in a rat femoral osteotomy model. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25(5): 485-490.

Thijssen HH, Drittij-Reijnders MJ. Vitamin K distribution in rat tissues: dietary phylloquinone is a source of tissue menaquinone-4. *Br J Nutr* 1994; 72(3): 415-425.

Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, et al. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab* 2008; 26(1): 79-85.

Turk C, Halici M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S. Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J Int Med Res* 2004; 32(5): 507-512.

Usui Y, Tanimura H, Nishimura N, Kobayashi N, Okanoue T, Ozawa K. Vitamin K concentrations in the plasma and liver of surgical patients. *American Journal of Clinical Nutrition* 1990; 51: 846-852.

Utvag SE, Reikeras O. Effects of nail rigidity on fracture healing. Strength and mineralisation in rat femoral bone. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 118 : 7-13.

Uveges TE, Kozloff KM, Ty JM, Ledgard F, Raggio CL, Gronowicz G et al. Alendronate treatment of the osteogenesis imperfecta mouse improves femoral geometry and load response before fracture but decreases predicted material properties and has detrimental effects on osteoblasts and bone formation. *J Bone Miner Res* 2009; 24(5): 849-859.

Vachal P, Hale JJ, Lu Z, Streckfuss EC, Mills SG, MacCoss M et al. Synthesis and study of alendronate derivatives as potential prodrugs of alendronate sodium for the treatment of low bone density and osteoporosis. *J Med Chem* 2006; 49 (11): 3060-3063.

Van Beek E, Löwik C, Que I, Papapoulos S. Dissociation of binding and antiresorptive properties of hydroxybisphosphonates by substitution of the hydroxyl with an amino group. *J Bone Miner Res* 1996; 11(10):1492-1497.

Van Beek E, Löwik C, Van Der Pluijm G, Papapoulos S. The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: A clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Bone Miner Res* 1999; 14(5): 722-729.

Vermeer C, Knapen MHJ, Schurgers LJ. Vitamin K and metabolic bone disease. *Clin Pathol* 1998; 51: 424-426.

Weinstein SL, Buckwalter JA. Çeviri A.Mümtaz Alpaslan. *Turek Ortopedi İlkeler ve Uygulamalar*. 6.baskı, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi, 2009.

Will BH, Suttie JW. Comparative Metabolism of Phylloquinone and Menaquinone-9 in Rat Liver. *J. Nutr* 1992; 122: 953-958.

Williams KR. The Bisphosphonate story: From detergents to bone disease. *Journal of Chemical Education* 2004; 81(10) : 1406-1407.

Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Tsao A, Russell G, Benghuzzi H. Comparison of two different fixation techniques for a segmental defect in a rat femur model. *Journal of Investigative Surgery* 2007; 20: 149-155.

Wolff J. (1892) *The Law of Bone Remodeling* (Das Gesetz der Transformation der Knochen). In Rubin C, Judex S, Hadjiargyrou M. Skeletal adaptation to mechanical stimuli in the absence of formation or resorption of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2002; 2: 264-267.

World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. 2nd Ed., Bangkok, Thailand: World Health Organization Publications 2004.

Yoshiaki A, Oue Y, Kanatani H, Ohta T, Kiyoki M, Komoriya K. Effects of continuous alendronate treatment on bone mass and mechanical properties in ovariectomized rats comparison with pamidronate and etidronate in growing rats *J Pet* 1998; 286: 128-135.

Zempleni J, Rucker RB, McCormick DB, Suttie JW. *Handbook of vitamins*. 4th Ed., USA: Taylor and Francis Group 2007.

Zhang D, Udagawa N, Nakamura I, Murakami H, Saito S, Yamasaki K et al. The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J Cell Sci* 1995; 108: 2285-2292.

Zhang L, Hu H, Tian F, Song H, Zhang Y. Enhancement of subchondral bone quality by alendronate administration for the reduction of cartilage degeneration in the early phase of experimental osteoarthritis. *Clin Exp Med* 2011; 9: 29-38.

Zhao X, Zhao X, Cui W, Ren D. Preventive effect of vitamin K1 and calcium on osteoporosis in ovariectomized rat (Abstract). *Wei Sheng Yan Jiu* 1999; 28(6): 367-369.

Zittermann A. Effects of vitamin K on calcium and bone metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4: 483-487.

## EKLER

### EK 1: SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Kararı

#### S.D.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO
18.03.2009	10	08

08- Enstitümüz Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi (0640308001) Serap ŞİMŞEK'in Araştırma Projesi Teklifi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 03.03.2009 tarih ve B.30.2.SDU.0.21.14.00/301.02/131 sayılı yazısı ve eklerinin görüşülmesi.

Enstitümüz Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora öğrencisi (0640308001) Serap ŞİMŞEK'in Araştırma Projesi Teklifi ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 03.03.2009 tarih ve B.30.2.SDU.0.21.14.00/301.02/131 sayılı yazısı ve ekleri görüşüldü.

Adı geçen öğrencinin tez konusu ile aynı olan "Alendronat ve K1 vitamini'nin rat femoral kırık kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi" başlıklı proje uygun görülmüş olup, Araştırma Projeleri Yönetim Birimine teklifine,

Oy birliği ile karar verildi.

(İMZA) Doç. Dr. F. Nilgün KAPUCUOĞLU Enstitü Müdürü (İMZA) Yrd. Doç. Dr. Duygu K. DOĞUÇ Enstitü Müdür Yardımcısı (İMZA) Yrd. Doç. Dr. Zuhal YETKİN AY Enstitü Müdür Yardımcısı

(İMZA) Doç. Dr. Hasan Hüseyin YILMAZ Üye (İMZA) Doç. Dr. Ahmet KOYU Üye (İMZA) Doç. Dr. Osman SULAK Üye

(İMZA)  
Raporör  
Erol KAYA  
Enstitü Sekreteri



## EK 2: SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı

### SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİV. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARLARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
30.10.2008	08	02

SDÜ. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 30 Ekim 2008 tarihinde Saat 13:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.,

02- SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Hastalıkları A.D. Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Bilge ÇADIR'ın "Alendronat ve K1 Vitamininin Rat Femural Kırık Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkisi." konulu çalışma;

Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul tarafından uygun görülmüştür.

(KATILMADI) (KATILMADI) (KATILMADI)  
Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR Prof. Dr. Ahmet Rifat ÖRMECİ Prof.Dr.Mahmut BÜLBÜL  
BAŞKAN ÜYE ÜYE


(KATILMADI) (İMZA) (İMZA)  
Prof. Dr.Mehmet İŞLER Prof. Dr. Abdullah DİLER Doç.Dr.Pınar YÜKSEL BAŞAK  
ÜYE ÜYE ÜYE

Doç. Dr. Nilgün KAPUCUOĞLU Doç.Dr.Çağrı SAVAŞ Yrd.Doç.Dr.Esin KULAÇ  
(ÜYE) (ÜYE) (ÜYE)  
(İMZA) (İMZA) (KATILMADI)

Yrd.Doç.Dr.Duygu KUMBUL DOĞUŞ Yrd. Doç. Dr.Ekrem ÇİÇEK Yrd.Doç.Dr.Zuhal YETKİNAY  
ÜYE ÜYE ÜYE  
(İMZA) (KATILMADI) (İMZA)

Yrd.Doç.Dr.Kenan ÇINAR Yrd.Doç.Dr.Vahdettin AYDIN Öğr.Gör.İbrahim ONARAN  
ÜYE ÜYE ÜYE  
(İMZA) (İMZA) (İMZA)

Dr.Metin AYDIN Vet.Hek.Hamdi BALCI  
ÜYE ÜYE  
(İMZA) (İMZA)

  
Prof. Dr. Yıldırım SONGÜR  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı  
ASLI GİRİŞİ  
0212.2008

## EK 3: SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ  
DESTEKLEME PROTOKOLÜ

Proje No : 1771-D-09  
Proje Yöneticisi : Yrd.Doç.Dr. Bilge ÇADIR  
Yöneticinin Adresi : Diş Hekimliği Fakültesi , Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi  
Proje Başlığı : Alendronat ve K1 Vitaminin Rat Femoral Kırık Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkisi  
Proje Bütçesi (TL) : 9.987,00  
Proje süresi : Başlangıç Tarihi : 14.04.2009 Bitiş Tarihi: 14.07.2010 - 15 ay

İMZA  
Prof.Dr.Mehmet Ali KOYUNCU  
B.A.P. Komisyon Bşk.

İMZA  
Prof.Dr.Fatma Yeşim KIBZIOĞLU  
Üye

İMZA  
Prof.Dr. Mustafa KUŞÇU  
Üye

İMZA  
Doç.Dr. Nebi BİLİR  
Üye

İMZA  
Prof.Dr. Nevin ÖZGÜR  
Üye

İMZA  
Doç.Dr. Fatma Nilgün KAPUCUOĞLU  
Üye

İMZA  
Doç.Dr. Ali Mahmmet BAYRAKTAROĞLU  
Üye

İMZA  
Prof.Dr. Yıldırım SONGÜR  
Üye


İMZA  
Doç.Dr. İlker Huseyin ÇARIKÇI  
Üye

PROJE YÖNETİCİSİNE TEBLİGAT  
Sayın: Yrd.Doç.Dr. Bilge ÇADIR  
Süleyman Demirel Üniversitesi  
Diş Hekimliği Fakültesi

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunuz yakındaki karar uyarınca sunduğumuz projenin belirtilen şartlarda desteklenmesine karar verilmiştir.

Proje protokolünü imzalamak üzere aşağıda belirtilen tarih ve saatte Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nde hazır buluşmanızı rica eder, başarılarınızın devamını dilerim.

Tarih ve Saat :

  
Prof.Dr. Mehmet Ali KOYUNCU  
Bilimsel Araştırma Projeleri  
Komisyon Başkanı



## ÖZGEÇMİŞ

Isparta'da 17.08.1983 tarihinde doğdum. İstanbul Tuzla İlkokulu'ndan 1994 yılında mezun oldum. İstanbul Kartal Köy Hizmetleri Anadolu Lisesi'nde bir yıl hazırlık sınıfını okuduktan sonra ortaokula Malatya Anadolu Lisesi'nde devam ederek 1998 yılında mezun oldum. Liseyi Malatya Fen Lisesi'nde 2001 yılında bitirerek aynı yıl Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'ni kazandım. Lisans ve yüksek lisans eğitimimi 2006 yılında tamamlayarak aynı yıl Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım.