

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
KEMİK DEFEKTLERİNDE İYİLEŞME ÜZERİNE
OBEZİTE VE LEPTİNİN ETKİSİ**

Dt. Berkay AŞKIN

**Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU**

**ERZURUM
2019**

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

İLGİLİ TEZ KONUSU

RATLARDA DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN KEMİK DEFİKTLERİNDE
İYİLEŞME ÜZERİNE OBEZİTE VE LEPTİNİN ETKİSİ

Dt. Berkay AŞKIN

Tez Savunma Tarihi : 23.05.2019

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ümit ERTAŞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ümit YOLCU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Adnan KILINÇ

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Nesrin SARUHAN

ONAY

Bu Çalışma Yukarıdaki jüri tarafından **Uzmanlık Tezi** Olarak Kabul Edilmiştir.



Prof. Dr. Abdulvahit ERDEM
Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi
ERZURUM-2019

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik.....	3
2.1.1. Kemik Doku Tipleri.....	4
2.1.1.1. Dokunun Yapısına Göre	4
2.1.1.2. Matriksin Düzenlenmesine Göre	4
2.1.1.3. Maturasyon Derecesine Göre.....	5
2.1.1.4. Gelişimsel Kökene Göre	5
2.1.2. Kemiğin Moleküler Yapısı	6
2.1.3. Kemik Matriksi	6
2.1.4. Kemik Hücreleri	7
2.1.4.1. Osteoblast Hücreleri	7
2.1.4.2. Sınır Hücreleri (Lining Hücreleri)	8
2.1.4.3. Osteosit	8
2.1.4.4. Osteoklast.....	9
2.1.5. Kemik Homeostazını Düzenleyen Lokal ve Sistemik Faktörler	10
2.1.6. Kemik Remodelling Süreci.....	11
2.1.7. Kırık İyileşmesi.....	12

2.2. Obezite	14
2.2.1. Obezitenin Tanımı	14
2.2.2. Obezitenin Sınıflandırılması ve Ölçüm Yöntemleri	15
2.2.3. Obezitenin Patolojisi ve Etiyolojisi	16
2.2.4. Obezite İle İlişkili Komorbiditeler.....	18
2.2.5. Deneysel Olarak Oluşturulan Obezite Modelleri.....	18
2.2.5.1. Monogenik Mutasyonlar	18
2.2.5.2. Diyete Bağlı Obezite.....	19
2.2.5.2.1. Yüksek Yağlı Diyet	19
2.2.5.2.2. Kafeterya Diyetiyle İndüklenmiş Obezite	20
2.2.5.2.3. Doğum Sonrası Küçük Kafeslerde Yetiştirme ve Aşırı Beslenmeye Bağlı Obezite	20
2.2.5.2.4. Annenin Aşırı Beslenmesi ve Yüksek Yağlı Diyetlere Maruziyeti.....	20
2.2.5.3. Cerrahi ve Kimyasal Obezite Modelleri	21
2.2.5.3.1. Ventromedial Hipotalamusun Lezyonu	21
2.2.5.3.2. Hipotalamik Paraventriküler Nükleusun Lezyonu (PVN Lezyon).....	21
2.2.5.3.3. Arkuat Nükleusun Lezyonu (ARC Lezyonu)	21
2.2.5.3.4. Ovariectomi	22
2.2.5.3.5. Kahverengi Adipoz Doku (KAD) Ablasyonu	22
2.3. Leptin	23
2.3.1. Leptin Geni	24
2.3.2. Leptinin Etki Mekanizması.....	24
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	25
3.2. Obezite Gruplarının Oluşturulması.....	26

3.3. Cerrahi Yöntem.....	29
3.4. Leptinin Hazırlanması.....	35
3.5. Ratların Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması	36
3.6. Histolojik İnceleme.....	38
3.6.1. Doku Takip Aşaması	38
3.7. İstatiksel Analiz	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. Klinik Bulgular	42
4.2. Histolojik Bulgular	44
5. TARTIŞMA.....	53
6. SONUÇLAR.....	67
KAYNAKLAR	68
EKLER	96
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	96
EK-2. ETİK KURUL ONAYI.....	97

TEŞEKKÜR

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi uzmanlık eğitimimde, bütün akademik faaliyetlerimde ve tezimin hazırlanmasında değerli bilgilerini, tecrübelerini, zamanını ve desteğini benden esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasını titizlikle yöneten saygıdeğer danışman hocam **Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU**'na, eğitimim boyunca her türlü desteği esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, **Sayın Prof. Dr. Ümit ERTAŞ**'a, **Sayın Prof. Dr. Ertunç DAYI**'ya ve **Sayın Doç. Dr. Adnan KILINÇ**'a, **Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ertan YALÇIN**'a, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.D.'da birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma, tez çalışmamın histolojik incelenmesinde ve istatistik olarak değerlendirilmesinde her türlü desteği sağlayan **Sayın Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA**'ya, hayatımın her döneminde varlığını hissettiren ve yol gösteren sevgili **aileme**, yaşadığım her sıkıntıda bana destek olan, hayatımı anlamlı bir hale getiren sevgili eşim **Dt. Merve Özer AŞKIN**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dt. Berkay AŞKIN

ÖZET

Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde İyileşme Üzerine Obezite ve Leptinin Etkisi

Amaç: Deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın amacı, leptinin ve obezitenin kemik iyileşmesi üzerine etkilerini, rat kalvaryalarında oluşturulan kritik kemik defekti modeli ile değerlendirmektir.

Materyal ve Metod: Çalışmamızda 3 ve 12 haftalık olmak üzere Sprague Dawley cinsi 40 adet erkek rat kullanıldı. 3 haftalık ratlar, obez diyet uygulama (ODU), obez diyet kontrol (ODK) ve 12 haftalık ratlar normal diyet uygulama (NDU), normal diyet kontrol (NDK) olarak 2 eşit gruba rastgele ayrıldı. 8 hafta boyunca yüksek yağlı diyet (YYD) uygulanarak obezite gruplarının beden kitle indekslerinde (BKİ) artış sağlandı. Cerrahi işlem esnasında deneklere %2'lik Ksilazin (10 mg/kg) (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve %10'luk Ketamin HCl (50 mg/kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, ABD) anestezisi uygulandı ve kalvarya üzerinde 5 mm'lik defektler oluşturuldu. Dört gün boyunca kontrol gruplarına 0.5 ml serum fizyolojik, uygulama gruplarına ise 60 µg/kg leptin intraperitoneal olarak verildi. Ameliyattan sonra, kemik oluşumunu 14 gün beklendi ve histolojik değerlendirmeyi yapmak için ratlar %100 CO₂ ile sakrifiye edildi.

Bulgular: Yeni kemik oluşum yüzeylerinde osteoblast ve osteoklast aktivitesi incelendi. Osteoblast aktivitesinin en az NDK ve ODK gruplarında olduğu görülürken, NDU grubunda artmaya başladığı, ODU grubunda ise en üst düzeyde olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Osteoklast aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0.05$). Fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumunun en az NDK ve ODK gruplarında olduğu görülürken, NDU grubunda artmaya başladığı, ODU grubunda ise en ileri düzeyde olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Sonuç: Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre leptin uygulamasının erken dönem kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkisi olduğu ancak obezitenin tek başına kemik iyileşmesini etkilemediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kemik iyileşmesi, leptin, obezite

ABSTRACT

The Effect of Obesity and Leptin on Healing of the Experimental Bone Defects in Rats

Aim: The aim of this experimental study was to evaluate the effects of leptin and obesity on bone healing with critical bone defect model in rat calvaria.

Materials and Methods: In our study, 40 Sprague Dawley male rats, 3 and 12 weeks old were used. 3 weeks old rats were randomly divided into 2 equal groups within themselves as obese diet application (ODU), obese diet control (ODK) and 12 weeks old rats were divided into 2 equal groups as normal diet application (NDU), normal diet control (NDK). The body mass indexes of obesity groups were increased by applying high-fat diet for 8 weeks. During the surgical procedure, subjects were anesthetized with 2% Xylazine (10 mg / kg) (Xylazinbio, Bioveta, Czech Republic) and 10% Ketamine HCl (50 mg / kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, USA) and defects were created 5 mm on calvaria. For 4 days, 0.5 ml saline were administered intraperitoneally to the control groups and 60 µg / kg leptin were administered intraperitoneally to the application groups. After the surgery, we waited the bone formation for 14 days and the rats were sacrificed with 100% CO₂ in order to perform histological evaluation.

Results: Osteoblast and osteoclast activity were investigated on new bone formation surfaces. Osteoblast activity was found to be the least in the NDK and ODK groups, however, it was observed that it started to increase in the NDU group and the highest in the ODU group ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference in terms of osteoclast activity ($p > 0.05$). Fibrous tissue thickness and new vessel formation were found to be the least in the NDK and ODK groups, however, it was determined that the NDU group started to increase and that it was the most advanced level in the ODU group ($p < 0.05$).

Conclusion: According to the results of our study, leptin administration had a positive effect on bone healing at early stage, but only obesity did not affect bone healing.

Keywords: Bone healing, leptin, obesity,

KISALTMALAR DİZİNİ

ARC	Arkuat nükleus
Ark.	Arkadaşları
BDNF	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BKİ	Beden kitle indeksi
BOS	Beyin omuriliği sıvısı
CART	Kokain ve amfetamin regulated transcript
CCK	Kolesistokinin
db	Diyabetik gen
DKK-1	Dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü 1
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü 1
IL	İnterlökin
KAD	Kahverengi adipoz doku
KMY	Kemik mineral yoğunluğu
KMP	Kemik morfogenetik proteinler
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MMP-9	Matriks metalloproteinaz 9
ND	Normal diyet
NDK	Normal diyet kontrol
NDU	Normal diyet uygulama
NO	Nitrik oksit
ob	Obez gen
OD	Obezite diyeti
ODK	Obez diyet kontrol

ODU	Obez diyet uygulama
OLETF	Otsuka Long Evans Tokushima Yağlı
OPG	Osteoprotegerin
Ovx	Overektomi
PGE2	Prostaglandin E2
PGI2	Prostasiklin
POMC	Pro-Opiomelanokortin
PTH	Paratiroid hormon
PTHrP	PTH ile ilişkili protein
PVN	Paraventriküler nükleus
RANKL	Nükleer faktör kappa beta ligandı
TNF-a	Tümör nekroz faktör alfa
TSH	Tiroid stimulan hormon
TRAP	Tartarat dirençli asit fosfataz
UCP-1	Enerjiyi ısı olarak dağıtan protein 1
V-ATPase	Vakuolar tip H ⁺ ATPase
WHO	Dünya Sağlığı Örgütü
WYR	Wistar yağlı ratı
YYD	Yüksek yağlı diyet
ZYR	Zucker Yağlı Rat

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Çalışmamızda kullandığımız pelet D12492 rodent diyet yemi	27
Şekil 3.2. Ratlarda kilo alımını ve yağ birikimini indüklemek için YYD'e ad libitum (serbest) erişim sağlanması	28
Şekil 3.3. Cerrahi işlem öncesi hazırlık safhası.....	30
Şekil 3.4. İntraperitoneal anestezi uygulamasının gerçekleştirilmesi	31
Şekil 3.5. 20 mm longitudinal bir cilt insizyonunun gerçekleştirilmesi.....	32
Şekil 3.6. Orta hatta deri insizyonunu takiben frontoparietal bölgenin ekartasyonu	32
Şekil 3.7. Kalvaryal defektlerin oluşturulmasında kullanılan trephan frezler	33
Şekil 3.8. Defektlerin oluşturulması esnasında kullanılan tur motoru	33
Şekil 3.9. Bregma noktası referans alınarak parietal kemiklerde trephan frez yardımıyla 5 mm çapında kavite oluşturulması.....	34
Şekil 3.10. Periost sutureasyonu.....	34
Şekil 3.11. Cilt sutureasyonu.....	34
Şekil 3.12. Deneklerin özel kafesler içerisinde % 100 CO ₂ ile sakrifiye edilmesi.....	35
Şekil 3.13. Çalışmamızda kullandığımız Rat Leptin Recombinant proteini	36
Şekil 3.14. Steril fosfat tampon hazırlanması esnasında kullanılan tabletler	36
Şekil 3.15. Sakrifiye edilen deneklerin parietal kemikleri defekt bölgesini de içine alacak şekilde çıkarılması ve histopatolojik inceleme için %10'luk formalin içine konulması.	37
Şekil 4.1. NDK ve NDU gruplarının haftalık ortalama kilo değişimi (gram cinsi)	42
Şekil 4.2. NDK ve NDU gruplarının haftalık ortalama BKİ değişimi (kg/m ²).....	42
Şekil 4.3. ODK ve ODU gruplarının haftalık ortalama kilo değişimi (gram cinsi)	43
Şekil 4.4. ODK ve ODU gruplarının haftalık ortalama BKİ değişimi (kg/m ²).....	43

Şekil 4.5. NDK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin).....	48
Şekil 4.6. ODK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin).....	49
Şekil 4.7. NDU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu orta üstü düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin).....	49
Şekil 4.8. ODU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu ileri düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin).....	50
Şekil 4.9. NDK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson Trichrome)	50
Şekil 4.10. ODK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson trichrome)	51
Şekil 4.11. NDU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu orta düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson trichrome)	51
Şekil 4.12. ODU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu ileri düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson trichrome)	52

TABLULAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Beden kitle indeksine göre obezitenin sınıflaması	15
Tablo 2.2. Obezite Etyolojisi	17
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan standart pelet yemin kalori içeriği ve enerji yoğunluğu	27
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan YYD'in kalori içeriği ve enerji yoğunluğu.....	28
Tablo 3.3. Parafin takip protokolü	38
Tablo 3.4. Hemotoksilen eozin boyama protokolü	39
Tablo 3.5. Masson trichrome boyama protokolü	40
Tablo 4.1. Gruplarda histolojik inceleme sonucu ortaya çıkan osteoblast ve osteoklast aktiviteleri	45
Tablo 4.2. Gruplar arası osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	46
Tablo 4.3. Gruplarda histolojik inceleme sonucu görülen fibröz doku kalınlıkları ve yeni damar oluşumları.....	46
Tablo 4.4. Gruplar arasında fibröz doku kalınlıkları ve yeni damar oluşumlarının istatistiksel olarak incelenmesi	48

1. GİRİŞ

Maksillofasiyal cerrahi alanı kapsamında kraniyofasiyal kırıklar ve kemik defektleri yaygın görülen sağlık sorunlarını teşkil ederek günümüzde önemli sağlık harcamalarına yol açarlar. Oluşan kemik defektlerinde başarılı bir şekilde kemik rejenerasyonunun gerçekleşebilmesi için, kemik defektlerinin oluşmasını takip eden osteogenez ve vaskülarizasyon süreçlerinin doğru bir şekilde gerçekleşmesi gerekir. Ayrıca kemiğin yeniden şekillenme sürecinde yaş, daha önce geçirilen hastalıklar, sigara kullanımı, farmakolojik ajanlar, diyabet ve diyet gibi çeşitli lokal ve sistemik faktörler etkilidir^{1,2}.

Doku kayıplarının giderilmesinde temel yaklaşım öncelikle kaybedilen dokunun vücudun kendi onarım mekanizmaları ile onarılmasının sağlanmasıdır. Tedavide ilk seçenek vücudun doku onarım ve yenilenme mekanizmalarının iyileştirilmesi olmalıdır. Kemik doku kayıplarındaki defektin onarılmasında da aynı temel prensipler geçerlidir. Kaybedilen kemik doku miktarının büyüklüğü, yeri, çevre dokuların ve bireyin sistemik durumuna göre kemik greftleri, kemik flepleri, biyolojik veya sentetik materyaller kullanılabilir. Kullanılan her yöntemin kendine ait avantajları ve dezavantajları bulunmakla beraber kemik kayıplarının giderilmesine yönelik yapılan cerrahi uygulamalarda en sık karşılaşılan sorunlar genellikle kullanılan materyalin rezorpsiyonu, enfeksiyon, doku reaksiyonları ve donör sahada oluşabilecek morbidetelerdir. Sistemik rahatsızlıkların varlığında bu komplikasyonlar durumu daha da şiddetlendirebilmektedir^{1,2}.

Obezite; hipertansiyon, dislipidemi, tip 2 diyabet, koroner kalp hastalığı ve bazı kanserlerin oluşumu gibi birçok kronik hastalığa yol açabilen önemli bir sağlık sorunudur³. Adiposit ve osteoblast hücreleri ortak bir pluripotent mezenşimal hücreden türemektedir ve obeziteye sahip kişilerde kök hücre farklılaşmasının adiposit hücre

artışı yönünde etki gösterip osteoblastik aktivitenin azalmasına yol açabildiği bildirilmiştir⁴. Günümüzde hızla artan bu sağlık probleminin kemik dokuda gerçekleştirilen işlemler üzerine olumsuz etkileri hala tartışmalı olmakla beraber yeni yapılan çalışmalarda kemik kırıklarının iyileşme periyodunda obezitenin kemik mineral dansitesi üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı görülmüştür⁵.

Leptin, başlıca beyaz yağ dokusu tarafından salgılanan, obez (Ob) geni tarafından kodlanan, peptid yapılı bir hormondur. Özellikle enerji tüketimini ve yiyecek alımını düzenlemesiyle tanınmaktadır⁶. Bu etkilerinin yanında, erişkin osteoblast ve kondrositlerinde leptin reseptörleri gösterilerek; leptinin, kemik büyümesi ve gelişmesinde uyarıcı bir rolü olduğu bildirilmiştir⁷. Ayrıca leptin, kemik oluşumu üzerine etkisini sadece sistemik bir hormon olarak değil, endokondral kemikleşmede anjiogenezi düzenleyerek lokal bir faktör olarak da gösterir⁸. Kemik oluşumunda bu denli etkili olan leptinin bu noktadan yola çıkarak büyük kemik defektlerinde de etkili olabileceği düşünülebilir.

Bu deneysel çalışmada, sistemik olarak uygulanan leptinin hem osteoblastlar hem de anjiogenez üzerine olan etkileriyle obezitenin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin histolojik olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla rat kalvaryalarında oluşturulan 5 mm çapındaki kritik kalvaryaya defektinde 14 günlük iyileşme periyodu sonunda oluşan kemik yüzeyleri incelenerek aradaki farklılıklar ortaya konmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

Kemik, mineralize bir doku olup insan yaşamı boyunca modelling ve remodelling olarak bilinen iki temel süreçle değişen, esnek ve canlı bir dokudur⁹. Kemik dokusunun vücutta; vücuda mekanik olarak destek sağlama, önemli hayati organları koruma, kalsiyum ve fosfat homeostazını koruma olmak üzere üç ana işlevi vardır⁹.

Kemik dokusunda bulunan hücreler; osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve sınır hücreleri (lining hücreleri) olmak üzere toplamda dört çeşittir^{10, 11}. Kemik dokusu, osteoklastlar tarafından gerçekleştirilen kemik rezorpsiyonu ve osteoblastlar tarafından gerçekleştirilen kemik oluşumu gibi birbirini takip eden uyumlu süreçlerle sürekli olarak yeniden şekillendirilir. Osteosit hücreleri ise kemik yeniden şekillenirken mekano sensör görevi görür ve bu işlemin yönetilmesinde önemli bir rol oynar¹²⁻¹⁵. Sınır hücrelerinin işlevi tam olarak belli olmamakla beraber kemik rezorpsiyonu ile kemik oluşumu arasındaki bağlantıda önemli bir rol oynadığı görülmektedir¹⁶. Ayrıca kandaki kalsiyum oranı düştüğünde, kana acil olarak kemikten kalsiyum salınımı yapılmasında görev alırlar. Kemiğin remodellingini tetikleyebilecek hormonları ve faktörleri tanıyan reseptörleri vardır¹⁷.

Kemiğin yeniden şekillenmesi esnasında, eski kemiğin yeni kemik ile değişim süreci üç aşamadan oluşan bir döngü şeklinde gerçekleşir ve oldukça karmaşık bir süreçtir: **1)** osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunun başlatılması, **2)** resorpsiyon sürecinden yeni kemik oluşumuna geçiş, **3)** osteoblastlar tarafından kemik oluşumu^{18, 19}. Bu süreç, temel çok hücreli birim olarak adlandırılan geçici anatomik yapıyı oluşturan osteoklastların, osteoblastların, osteositlerin ve sınır hücrelerinin koordineli bir şekilde etkileşimleriyle gerçekleşir^{20, 21}. Kemik oluşumu ve rezorpsiyon arasında denge

gereklidir ve bu denge hormonlar, sitokinler, kemokinler ve biyomekanik stimülasyon dahil olmak üzere çeşitli lokal ve sistemik faktörler ile sağlanır²²⁻²⁴.

2.1.1. Kemik Doku Tipleri

Kemik dokusu; yapısına, matriksin düzenlenmesine, maturasyon ve gelişimsel kökene dayanarak çeşitli yollarla sınıflandırılabilir.

2.1.1.1. Dokunun Yapısına Göre

Kompakt kemik (yoğun kemik, kortikal kemik): Kompakt kemik; fildişi renginde, boşluksuz yoğun yapıda bir dokudur. Birçok kemiğin dış yüzeyinde bulunan kabuğudur ve merkezde bulunan trabeküler kemiği çevreler. Kompakt kemik Havers sistemlerinden oluşur. Havers kanalları bir tür tünelle çevrili merkezi bir vasküler kanaldan oluşur ve içerisinde kılcal damarlar, arterioller, venüller, sinirler ve lenfatikleri içerebilir²⁵.

Süngerimsi kemik (trabeküler kemik): Çok sayıda boşluk içerdiği ve yapısı sünger şeklinde kavitelerden oluştuğu için süngerimsi kemik olarak adlandırılmıştır. Medüller boşluğun içinde yer alır ve stres çizgileri boyunca uzanan kemik trabekülleriyle bağlantılıdır. Kompakt kemiğin aksine, trabeküllerin incelmesi nedeniyle süngerimsi kemikte osteonlar genellikle yoktur. Süngerimsi kemik aynı zamanda yeniden şekillenme için çok daha geniş yüzey alanı içermesi nedeniyle kompakt kemikten metabolik olarak daha fazla aktiftir²⁵.

2.1.1.2. Matriksin Düzenlenmesine Göre

Lamellar kemik (sekonder kemik dokusu): Lameller kemik, lamel içinde düzenlenmiş kollajen liflere sahip olgun kemiktir. Lamellerin birbirine paralel olarak düzenlendiği süngerimsi kemiğin aksine kompakt kemikte lameller, Havers kanalı olarak adlandırılan bir vasküler kanal etrafında eş merkezli olarak düzenlenir²⁵.

Örgülü kemik (birincil kemik dokusu): Örgülü kemik, kollajen liflerinin düzensiz rastgele dizildiği ve lamellar kemikten daha az miktarda mineral madde ve daha yüksek oranda osteosit içeriğine sahip, olgunlaşmamış kemiktir. Örgülü kemik geçicidir ve sonunda lameller kemiğe dönüştürülür. Bu tip kemikler, erişkinlerde kafatasının düz kemiklerinin suturaları etrafında ve diş soketleri gibi vücudun birkaç yerinde görülürken, vücudun başka bölgelerinde görüldüğünde patolojik bir doku olarak değerlendirilir²⁵.

2.1.1.3. Maturasyon Derecesine Göre

Olgunlaşmamış kemik (primer kemik dokusu): Olgunlaşmamış kemik örgülü kemiktir²⁵.

Olgun kemik (sekonder kemik dokusu): Olgun kemik karakteristik olarak lamellar kemiktir. Yetişkinlerde hemen hemen tüm kemikler lamellar kemiklerdir²⁵.

2.1.1.4. Gelişimsel Kökene Göre

İntramembranöz kemik (mezenkimal kemik): İntramembranöz kemikleşme esnasında mezenkimal hücre yoğunlaşması gözlenir ve mezenkimal hücreler doğrudan osteoblastlara farklılaşırlar. İntramembranöz kemikleşme yassı kemiklerde gözlenmekte olup frontal, parietal, oksipital, temporal, mandibula ve maksilla gibi bazı kraniofasial kemiklerde ve klavikuların lateral kısımlarında görülür. Bu hücreler kemik dokusunu oluşturacak organik matriksi sentezlerler. Bu doku oldukça vasküler bir yapıya sahiptir. Vaskülarite sayesinde osteoid dokusuna kalsiyum ve fosfor iyonları taşınır. Osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla iyonların kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşmesiyle kalsifikasyon sağlanır²⁵.

İntrakartilajinöz kemik (kıkırdak kemiği, endokondral kemik): Endokondral kemikleşme esnasında mezenkimal hücreler doğrudan kemik ve kemik iliği ile yer değiştirecek olan kıkırdak modelinin sentezi için yoğunlaşır ve kondroblastlara

farklılaşırlar²⁵. Endokondral kemikleşme süreci uzun kemikler, kafatasının bazal kısmı, vertebra, kaburga ve klavikuların medial kısmında gerçekleşir. Görülen iki tip kemikleşme paterni arasındaki en önemli fark endokondral kemikleşme sırasında kıkırdak bir şablonun varlığıdır²⁵.

2.1.2. Kemiğin Moleküler Yapısı

Kemik dokusu hücre dışı bir ağ veya matriks tarafından çevrelenmiş seyrek hücrelerden oluşur. Kemik matriksi, sert ve esnek bir protein ve mineral karışımıdır. Bir tür kemik hücresi olan osteoblastlar, proteinleri matrikse salgırlar ve bu durum gerilme mukavemetini sağlar. Kemik matriksinin ana proteini, kuru kemik ağırlığının neredeyse üçte birini oluşturan kollajendir. Kemiğin ağırlığının geri kalanının çoğunu matriks mineralleri oluşturur. Bunlar başlıca kalsiyum, fosfat ve kalsiyum karbonattır. Protein ağına gömülü mineraller sertlik ve basınç dayanımı sağlamaktadır. Kemik hücreleri canlı kalır ve vücuttaki diğer hücreler gibi, kanla beslenmelidir. Besinlerin dağılımı ve kemik içerisindeki atıkların uzaklaştırılması için kan damarlarının geçebileceği genişlikteki sert, kompakt yüzeyler "kanallar" tarafından delinir. Bu kanal sistemi kemik yüzeyinin içerisine girdiğinde kan damarlarının kemik boyunca hücrelere ulaşmasına izin verir. Kemik hücreleri kalsifiye matriksin halkaları içinde gömülüdür ve hepsi içi boş bir kanalı çevreler. Osteon denilen bu yapı birimleri, kompakt kemikte paralel olarak ilerler, ancak süngerimsi kemikte daha gevşek ve daha az sıralı bir ağ oluştururlar²⁵.

2.1.3. Kemik Matriksi

Kemik, inorganik tuzlar ve organik matriks ile meydana gelir²⁶. Organik matriks, kollajen proteinler (% 90), ağırlıklı olarak tip I kollajen ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, fibronektin ve kemik sialoprotein II, kemik morfogenetik proteinler(KMP) ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere kollajen olmayan proteinler içerir²⁷. Ayrıca

ekstrasellüler matriks içerisinde dekorin, biglikan, lumikan, osteoaderin ve serik proteinleri içeren küçük lösinden zengin proteoglikanlar da vardır²⁸. İnorganik kemik malzemesi ağırlıklı olarak fosfat ve kalsiyum iyonlarından oluşur. Bununla birlikte, önemli miktarlarda bikarbonat, sodyum, potasyum, sitrat, magnezyum, karbonat, flor, çinko, baryum ve stronsiyum da mevcuttur^{10, 11}. Kalsiyum ve fosfat iyonları, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ kimyasal formülü ile temsil edilen hidroksiapatit kristallerini oluşturur. Kollajen ile birlikte, kollajen olmayan matriks proteinleri, hidroksiapatit birikimi için bir iskele oluşturur ve bu tür bir ilişki, kemik dokusunun tipik sertliği ve direncinden sorumludur²⁹. Kemik matriksi, mekanik destek sağlayan ve kemik homeostazında önemli rol oynayan karmaşık ve organize bir iskelet oluşturur³⁰.

2.1.4. Kemik Hücreleri

2.1.4.1. Osteoblast Hücreleri

Osteoblastlar, kemik hücrelerinin toplamda % 4-6'sını oluşturan, kemik yüzeyi boyunca yer alan ve kemik oluşumunda önemli görevi olduğu bilinen küboidal hücrelerdir²⁷. Bu hücreler, bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum içerir ve belirgin sayıda golgi cisimciğinin yanı sıra çeşitli salgı vezikülleri içeren protein sentezleyen hücrelerin morfolojik özelliklerini gösterir^{27, 31}.

Osteoblastlar, normal mineralize kemik oluşum sürecinde kalsifiye hale gelen organik kemik matriksinin ana bölümünü üretir ve salgılar. Ayrıca osteoblastlar osteokalsin, sialoprotein ve osteopontin, proteoglikanlar, belirli hormon reseptörleri, sitokinler, büyüme faktörleri, kemik matriks proteinleri dahil olmak üzere kemik oluşumu ile ilişkili birçok molekülü sentezleyebilmektedir³². Osteoblastlardan sentezlenen İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1), kemik dokusunda bulunan bir kemokin olup osteoblastların kemik dokuyu oluşturmaları sırasında önemli bir rol oynamaktadır³³.

Osteoblast gelişiminin dört olgunlaşma aşaması vardır; preosteoblast, osteoblast, osteosit ve sınır hücresi. Preosteoblast, osteoblastların öncüsü olarak kabul edilir³⁴.

2.1.4.2. Sınır Hücreleri (Lining Hücreleri)

Sınır hücreleri, kemik rezorpsiyonu ve kemik oluşumunun meydana gelmediği kemik yüzeylerini örten sessiz düz şekilli osteoblastlardır. Bu hücreler ince ve düz nükleer bir profil sergiler; sitoplazması kemik yüzeyi boyunca uzanır ve granüllü endoplazmik retikulum, golgi cisimciği gibi birkaç sitoplazmik organel gösterir³⁵.

Sınır hücreleri osteositlere uzanan sitoplazmik çıkıntılar gösterir^{35, 36}. Sınır hücrelerinin salgı aktivitesi kemiğin fizyolojik durumuna bağlıdır. Bu hücreler kendi salgı aktivitelerini yeniden oluşturabilir, boyutlarını arttırabilir ve kübik bir görünüm benimseyebilir¹⁷. Sınır hücrelerinin işlevleri tam olarak anlaşılammıştır, ancak bu hücreler, kemikte rezorpsiyonun meydana gelmemesi gerektiğinde osteoklastlar ile kemik matriksi arasındaki direkt etkileşimi önler ve osteoklast farklılaşmasına neden olur²¹.

2.1.4.3. Osteosit

Toplam kemik hücrelerinin % 90-95'ini oluşturan osteositler³⁷, 25 yıla varan yaşam ömrüne sahip en bol ve uzun ömürlü hücrelerdir³⁸. Kemik oluşumu ve kemik rezorpsiyonu sırasında kendi fonksiyonları ile tanımlanan osteoblastlar ve osteoklastlardan farklı olarak, osteositler morfolojileri ve konumları ile tanımlanmıştır. Osteositler mineralize kemik matriksi ile çevrili lakuna içinde yer alırlar ve burada dendritik morfoloji gösterirler^{37, 39, 40}. Osteositler, mezenşimal hücrelerinden kaynaklı osteoblastların farklılaşmasıyla oluşur. Bu süreçte dört tanınabilir evre belirtilmiştir; osteoid-osteosit, preosteosit, genç osteosit ve olgun osteosit³⁸. Bu kemik oluşum döngüsünün sonunda, osteoblastların bir alt popülasyonu olan osteositler kemik matriksine dahil edilirler. Granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği gibi

organellerin sayısı azalır ve protein sentezi ve sekresyonunda bir azalmaya karşılık gelen nükleustan sitoplazmaya geçiş oranı artar. Osteoblast / osteosit geçişi sırasında, osteositler kemik matriksine yerleştirilmeden önce sitoplazmik süreç ortaya çıkmaya başlar²⁷. Osteosit hücre gövdesi lakuna içinde yer alırken, sitoplazmik süreçler kanalcık denilen lakuna boşluğundan çıkan küçük tünellerden geçerek osteosit lakuno-kanalikül sistemini oluşturur⁴¹. Osteosit lakuno kanalikül sistemi, vasküler yolla oksijen ve besinleri osteositlere ulaştırır³⁹. Hücre-hücre iletişimi, osteositler ve kanallar arasında akan interstisyel sıvıyla da sağlanır⁴². Laküno-kanaliküler sistem ve osteositlerin birbirine bağlandığı ağ sistemi ile birlikte mekanik basınçları ve yükleri tespit etme kapasitesine sahip olması ve böylece kemiğin günlük mekanik kuvvetlere adaptasyonuna yardımcı olmaları nedeniyle mekanosensörler olarak işlev görür³⁷. Osteositler, osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin düzenlenmesi ve kemiğin yeniden şekillenmesinde orkestra şefi gibi davranırlar^{39, 43}. Osteosit apoptozu osteoklastik kemik rezorpsiyonuna kemotaktik sinyal olarak kabul edilmiştir⁴⁴⁻⁴⁷.

2.1.4.4. Osteoklast

Osteoklastlar, Howship'in lakuna veya rezorpsiyon çukurları olarak adlandırılan kemik yüzeylerinde bulunan büyük, çok çekirdekli hücrelerdir²⁵. Osteoklastlar, çeşitli faktörlerin etkisi altında hematopoetik kök hücrelerin mononükleer hücrelerinden köken alıp terminal olarak farklılaşmış hücrelerdir. Bu faktörler arasında osteoprogenitor mezenkimal hücreler ve osteoblastlar⁴⁸ tarafından salgılanan makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF); osteoblastlar, osteositler ve stromal hücreler tarafından salgılanan RANK ligandı yer almaktadır²⁴.

Osteoklastların fonksiyonları kemik liflerinin ve mineralize dokunun yıkımı ve rezorpsiyonunu içerir. Osteoklastlar bir monosit kök hücre soyundan türetildiği için, dolaşımdaki makrofajlara benzer fagositoz yeteneklerine sahiptir. Osteoklastlar

olgunlaşır ve başka kemik yüzeylerine göç eder. İlgili bölgeye ulaştıklarında tartarat dirençli asit fosfataz gibi aktif enzimler mineral substratına karşı salgılanır²⁵.

Ruffled sınırın korunması (osteoklast plazmalarının parmaksı uzantıları) osteoklast aktivitesi için önemlidir. Bu yapı, lizozomal ve endozomal bileşenlerin yoğun trafiğine bağlı olarak oluşmaktadır. Ruffled sınırdaki lakuna rezorpsiyonunun asitlenmesini ve dolayısıyla hidroksiapatit kristallerinin çözünmesini mümkün kılan bir vakuolar tip H⁺ ATPaz (V-ATPase) bulunmaktadır^{24, 49, 50}. Bu bölgede tartarat-dirençli asit fosfataz (TRAP), katepsin K ve matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) gibi protonlar ve enzimler, kemiğin çözündüğü Howship lakunasına nakledilir⁵⁰⁻⁵⁴. Bu çözünme ürünleri daha sonra ruffled sınır boyunca endositozlanır ve plazma membranındaki fonksiyonel salgı alanına nakledilir^{14, 55}.

2.1.5. Kemik Homeostazını Düzenleyen Lokal ve Sistemik Faktörler

Kemik remodeling süreci osteoblastların, osteositlerin, osteoklastların ve sınır hücrelerinin birbiriyle uyumlu hareket etmesiyle elde edilen oldukça karmaşık bir döngüdür⁵⁷. Bu hücrelerin oluşumu, proliferasyonu, farklılaşması ve aktivitesi lokal ve sistemik faktörlerle kontrol edilir^{21, 22}. Lokal faktörler, kemik rezorpsiyonu sırasında açığa çıkan kemik matriksi faktörlerinin yanı sıra kemik hücreleri tarafından üretilen büyüme faktörleri, sitokinler ve prostaglandinler gibi otokrin ve parakrin moleküllerdir^{57, 58}. Kemik homeostazının korunmasında önemli olan sistemik faktörler arasında paratiroid hormon (PTH), kalsitonin, 1,25-dihidroksivitamin D3 (kalsitriol), glukokortikoidler, androjenler ve östrojenler bulunur⁵⁹⁻⁶³. PTH'ye benzer şekilde, PTH reseptörüne de bağlanan PTH ile ilişkili proteinin (PTHrP) de kemiğin yeniden şekillenmesini etkilediği bildirilmiştir⁶⁰.

Östrojen kemik dokusu homeostazı için önemli rol oynar. Menopozda östrojen seviyesindeki azalma, kemik kaybının ve osteoporozun ana nedenidir⁵⁹. Östrojenin

kemik dokusu üzerinde etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte birçok çalışma, östrojenin, osteoblast ve osteosit apoptozu inhibe ederek⁶⁴⁻⁶⁶ ve aşırı kemik emilimini önleyerek kemik homeostazını koruduğunu göstermiştir. Östrojen osteoklast oluşumunu ve aktivitesini baskıladığı gibi osteoklast apoptozu indükler^{54, 59, 67, 68}.

2.1.6. Kemik Remodelling Süreci

Kemik remodelling süreci, yeniden şekillendirilmesi gereken kemik boşlukları içerisinde gerçekleşir. Bu boşluklarda, temel çok hücreli birimler olarak adlandırılan geçici anatomik yapıların oluşumu vardır. Bu yapılar; osteoklast, kan damarları ve osteoblastları içerir^{19, 69}. Kemik yeniden şekillendirme kompartmanını oluşturan hücrelerin (muhtemelen sınır hücreleri), temel çok hücreli birimlerin üzerini bir hücre örtüsü ile kaplandığı öne sürülmüştür²⁰. Kemik yeniden şekillendirme kompartmanının kemik yüzeyi üzerindeki sınır hücrelerine bağlı olduğu görülmekte olup kemik matriksinin içerisine yerleştirilmiş osteositler ile iletişim halindedir^{20, 21}.

Kemik remodelling döngüsü, osteoklastlar tarafından oluşturulan kemik rezorpsiyonu ile başlayan bir başlangıç fazıyla başlar, bunu osteoblastlar tarafından bir kemik oluşumu aşaması izler ve bu iki faz arasında bir geçiş fazı vardır. Döngü osteositlerin ve sınır hücrelerinin koordineli eylemleriyle tamamlanır^{70, 71}.

Kemik formasyonu ve kemik rezorpsiyonu kemik yüzeyinde rastlantısal olarak meydana gelmez, eski kemiğin yeni kemikle yer değiştirdiği turnover mekanizmasının bir parçası olarak koordine edilirler. Normal yetişkin iskeletinde, kemik oluşumu, çoğunlukla, kemik erimesinin gerçekleştiği yerlerde meydana gelir. Yeniden modelleme alanındaki hücresel aktivitenin bu temel prensibi Aktivasyon-Resorpsiyon oluşum dizisidir⁷¹.

Osteoklastlar ve osteoblastların yanı sıra, kemik remodeling döngüsü sırasında osteositlerin kilit rol oynadığı gösterilmiştir¹⁵. Osteositler, kemik remodelling sürecinde orkestra şefleri gibi hareket ederler, osteoblast ve osteoklast aktivitelerini etkileyen faktörler oluştururlar³⁷. Mekanik etkiler osteositi uyarırken, prostaglandin E2 (PGE2), prostasiklin (PGI2) ve nitrik oksit (NO)⁷²⁻⁷⁵ gibi kemik üzerinde anabolik etki yapan faktörler üretilir. Ayrıca mekanik etkinin azalması anabolik faktörleri azaltır ve osteosit aktivitesini inhibe eden sklerostin, Dickkopf WNT sinyal yolu inhibitörü 1 (DKK-1)'i⁷⁶⁻⁷⁹ ve lokal osteoklastogenezi uyaran spesifik faktörleri üretmek için osteositleri uyarır⁸⁰.

2.1.7. Kırık İyileşmesi

Kırık iyileşmesi üç aşamada gerçekleşmektedir⁸¹;

1-İnflamatuar Süreç

2-Onarım Süreci

3-Remodelling Süreci

İnflamatuar süreçte; öncelikle kanama ve pıhtı oluşumu gözlenir. Çoğunlukla periosteal ve endosteal damarlardan olmak üzere kırık uçlarından kanama meydana gelir. Kırık uçları arasında bir pıhtı oluşur⁸². Pıhtı oluşumunu takiben inflammatuar hücreler (makrofajlar, monositler, lenfositler ve polimorfonükleer hücreler) ve fibroblastlar prostaglandinler aracılığıyla çevre dokulardan kemiğe infiltre olmaktadır⁸¹. Meydana gelen şişlik ile periosteumda gevşeme meydana gelir. Kırık bölgede kanlanmanın bozulması, oksijenlenmenin azalmasına ve osteositlerin canlılığını kaybetmesine yol açarak nekroz gelişmesine neden olur⁸². İnflamatuar hücre göçü sonucunda granülasyon dokusu oluşmakta ve çevre dokulardan vasküler doku büyümesi olmaktadır. Bunun sonucunda da kırık bölgesine mezenkimal hücrelerin göçü görülmektedir. Bu dönemde başlıca besin ve oksijen kaynağı, hasar sonucu açığa çıkan kansellöz kemik ve kas yüzeylerinden olmaktadır⁸². Granülasyon dokusu 3-4 gün

boyunca organize olmaya devam eder ve osteoblastlar da bu doku içerisinde üretilmektedir. Eş zamanlı olarak, lokal olarak salınan faktörler de revaskülarize alanı anjiyogenez için uyarır⁸².

Onarım süreci geçici kallus oluşumu ile başlar. Organize pıhtı, kollajen üreten fibroblastları, kondroblastları ve osteoblastları matriksin alt yüzeyinde bulundurur. Oluşan doku ilk başta kırık ve fibrokartilaj adı verilen bağ dokusunun bir karışımıdır. Bu doku 2-6 hafta boyunca kendi içerisinde organize olmaya devam ederek kemiğe dönüşür ve oluşan dokuya kallus ismi verilir. Kırık boyunca iyileşme kırık uçlarında başlar. Subperiosteumdan başlayarak kırık uçlarında ossifikasyon görülür. Başlangıçta nispeten olgunlaşmamış ve daha az kararlı örgü kemik üretilir. 6-12 hafta süresince geçici kallus boyunca bulunan kırık boşluklarında köprüye benzer ossifikasyon alanları oluşur. Aynı zamanda yapısal olarak daha sağlam lamellar kemik şeklinde matürasyon görülür ve kırık hattı birleştirilir⁸².

Kemik remodelling süreci; sert kallusun yeni kortikal veya trabeküler kemiğin yer değiştirdiği bir süreç ile karakterizedir. Yeni kemik sekresyonu yapan osteoblastlar ile kemik yüzeyinin rezorpsiyonunu sağlayan osteoklastlar bu evrede önemli bir rol oynar. Osteoklastlar özellikle matriksin demineralize edilmesi ve kollajen gibi organik bileşenlerin indirgenmesi için asit ve proteinazları rezorpsiyon alanına pompalamaktadır. Osteoblastlar, osteoklast davranışını etkileyen, kemik oluşum ve rezorpsiyon koordinasyonundan sorumlu sitokinleri salgılar⁸³⁻⁸⁵.

İyileşen kırık bölgesi çevresine uygulanan kuvvetlerde ilk iki yıla kadar uyum süreci devam etmektedir. Farklı kemiklerde remodelling süreci de farklı olmaktadır ve çocuklar yetişkinlere göre özellikle de yaşlılara kıyasla belirgin bir şekilde remodelling kabiliyetine sahiptir⁸².

2.2. Obezite

2.2.1. Obezitenin Tanımı

Obezite, kalori alımı ve harcanması arasındaki farkla ortaya çıkan, vücutta harcanan enerjiden daha çok besin alındığında görülen ve vücutta aşırı yağ birikimi ile gelişen çok yönlü bir hastalıktır. Obezitenin oluşumunda; genetik, nörolojik, endokrin, sosyoekonomik, psikolojik faktörler ile birlikte fiziksel aktivite azlığı ve cinsiyet de etkili olmaktadır⁸⁶. Obezite, başta kardiovasküler ve endokrin sistem olmak üzere vücudun tüm organ ve sistemlerini etkileyerek çeşitli bozukluklara ve hatta ölümlere yol açabilen önemli bir sağlık problemidir⁸⁷.

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre dünya çapında obezite 1975'ten beri neredeyse üç katına çıkmıştır. 2016 yılında 18 yaş ve üstü 1.9 milyardan fazla yetişkin aşırı kilolu olup 650 milyondan fazlası da obezdi. 2016 yılında 5 yaşın altındaki 41 milyon çocuk aşırı kilolu veya obezdi. 2016 yılında 5-19 yaş arasındaki 340 milyondan fazla çocuk ve ergen fazla kilolu veya obezdi. Obezitenin bu denli yaygın bir hastalık oluşu ve birçok morbiteyle ilişkili olması üzerinde dikkat edilmesi gereken bir durum olarak karşımıza çıkmasına neden olur.

Obezite tanısında kullanılan birçok yöntem olmasına rağmen, günümüzde tanıda en çok kullanılan yöntemler beden kitle indeksi (BKİ) ve bel çevresi ölçümüdür. BKİ kilogram olarak vücut ağırlığının metrekare olarak boya bölünmesi ile hesaplanır. WHO, yetişkinlerde BKİ için sağlıklı aralığın 18.5-24.9 arasında olduğunu belirtmektedir. Aşırı kilolular için vücut kitle indeksi olarak 25-29.9 aralığı tanımlanır ve 30 veya daha yüksek vücut kitle indeksi için ise obezite tanımlaması yapılır. WHO'ya göre obezite sınıflaması Tablo 2.1'de gösterilmiştir⁸⁷.

$$\text{Beden Kitle İndeksi} = \text{Vücut ağırlığı (kg)} / \text{Boy (m}^2\text{)}$$

Yetişkinlerde BKİ aralıkları, kişilerin yaşlarına bakılmaksızın erkekler ve kadınlar için aynıdır. Klinik ve araştırma amaçlı obezite üç kategoriye ayrılır: sınıf I (30-34.9), sınıf II (35–39.9) ve sınıf III (> 40)⁸⁸. Aşırı obezitenin artmasıyla araştırmacılar ve klinisyenler, sınıf III'ü süper obezite (BMI 50-59) ve süper-süper obezite (BKİ> 60) olmak üzere ikiye ayırdılar⁸⁹.

Tablo 2.1. Beden kitle indeksine göre obezitenin sınıflaması⁸⁷

SINIFLANDIRMA	BKİ(kg/m ²)
Zayıf	<18.5
Normal kilolu	18.5-24.9
Fazla kilolu	25-29.9
Obezite	<30
Obezite (sınıf 1)	30-34.9
Obezite (sınıf 2)	35-39.9
Morbid (aşırı) Obezite (sınıf 3)	>40

2.2.2. Obezitenin Sınıflandırılması ve Ölçüm Yöntemleri

Obez bireyler sadece aşırı yağ kütlesi bakımından değil, aynı zamanda farklı vücut bölgelerindeki bölgesel yağ dağılımı bakımından da farklıdır. Yağın vücudun etrafında periferik olarak tahsis edildiği, android-elma tip obezite (erkeklerde) ve jinoid-armut tip obezitede (kadınlarda) yağ dağılımı arasında ayırım yapmak önemlidir⁹⁰.

Jinoid Tip Obezite: Gluteal ve femur üzerinde yağ toplanması jinoid tip, kadın tipi, periferik tip, armut tipi veya femoral obezite olarak tanımlanmaktadır. Bu obezite tipi yağ hücre sayısındaki artış ile gelişen obezite modelidir. Hiperplastik obezite tipi olarak bilinir⁹¹.

Android Tip Obezite: Her iki cinstede de karın bölgesinde yağ toplanması; android tip, erkek tipi, santral, abdominal, elma tipi veya visseral obezite olarak tanımlanmaktadır. Android obezitede ise yağ hücreleri büyümüştür. Yani hipertrofik bir obezite tipidir⁹².

Obezite Ölçüm Yöntemleri

Antropometrik Ölçümler⁹²

1. Vücut Kitle İndeksi
2. Vücut Yağ Oranı
3. Bel-Kalça Oranı
4. Deri Kalınlıkları Ölçümü

Laboratuvar Yöntemleri İle Yapılan Ölçümler⁹²

1. İzotop ve kimyasal dilüsyon yöntemi (vücut suyu, vücut potasyumu)
2. Vücut yoğunluğu ve hacmi (su altı ölçümü, pletismografik yöntem)
3. İletkenlik (total vücut elektriksel geçirgenlik, biyoelektrik impedans analizi)
4. Görüntüleme yöntemleri (ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans, dual enerji x ışını absorpsiyometresi)

2.2.3. Obezitenin Patolojisi ve Etiyolojisi

Obezitenin etiyojisi multifaktöriyeldir. Genetik, hormonal ve çevresel faktörleri içeren karmaşık bir etkileşim sonucu ortaya çıkar⁹³. Vücut ağırlığı, hem çevresel hem de merkezi faktörleri içeren çok yönlü bir sistem tarafından düzenlenir. Obezitenin sekonder patolojik nedenleri diğer tedaviler başlamadan önce endokrinolog tarafından dışlanması gereken ilaçlar ve nöroendokrin hastalıkları (hipotalamik, hipofiz, tiroid ve adrenal) içerir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Obezite Etiyolojisi⁸⁹

-
- Çevresel sebepler
 - Diyet faktörleri
 - Fiziksel aktivite eksikliği
 - Yaşam tarzı faktörleri
 - Nöroendokrin obezite
 - Hipotalamik obezite
 - Travma
 - Tümörler
 - İnflamasyon
 - Cerrahi
 - Artan intrakraniyal basınç
 - Cushing sendromu
 - Hipotiroidi
 - Polikistik Over Sendromu
 - Büyüme hormonu eksikliği
 - Hipogonadizm
 - İnsülinoma ve hiperinsülinemi
 - Psödohipoparatiroidizm
 - İlaçlar
 - Antipsikotikler
 - Antidepresanlar
 - Antikonvülsanlar
 - Steroidler
 - Adrenerjik antagonistler
 - Serotonin antagonistleri
 - Oral hipoglisemik ajanlar
 - Genetik ve konjenital bozukluklar
 - Prader-Willi sendromu
 - Bardet-Biedl sendromu
 - Leptin eksikliği
 - Albright kalıtsal distrofisi
 - Alstrom-Hallgren sendromu
 - Cohen sendromu
 - Carpenter sendromu
 - Beckwith-Wiedemann sendromu
 - Psödohipoparatiroidizm tipi 1a
 - Hamilelik ve menopoz
 - Yeme bozuklukları ve psikolojik nedenler
 - Bulimia nevroza
 - Stres
 - Anormal yeme alışkanlıkları
 - Depresyon, güven eksikliği ve benlik saygısı
 - Sosyal faktörler
-

2.2.4. Obezite İle İlişkili Komorbiditeler

Obezite ile ilişkili kronik komorbiditeler, fiziksel veya psikolojik semptomlar ve fonksiyonel sınırlamalar ile ilişkilidir, bu da yaşam kalitesi üzerinde önemli negatif etkiye ve mortaliteye sahip olabilir. Obezite ile ilişkili en çok bilinen hastalıklar insülin direnci, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıktır ve riskleri BKİ ile orantılıdır. Aşırı kilolu ve obezite ile ilişkili diğer tanınmış komplikasyonlar arasında obstrüktif uyku apnesi, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, osteoartrit, polikistik over sendromu ve mortalite artışı sayılabilir⁹⁴.

2.2.5. Deneysel Olarak Oluşturulan Obezite Modelleri

Obezite insidansı dünya çapında sürekli artış eğiliminde olup obeziteyle ilişkili birçok ciddi sağlık problemine yol açmaktadır⁹⁴. Bu durum insandakine benzer obezite ve komorbiditelerinin özelliklerini paylaşan hayvan modellerinin deneysel olarak benzerinin oluşturulup yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır⁹⁵⁻⁹⁸.

RAT OBEZİTE MODELLERİ

2.2.5.1. Monogenik Mutasyonlar

Leptin Reseptör Eksikliği Olan Ratlar: Zucker Yağlı Rat (ZYR) ve Koletsky Rat

1961'de L.M. Zucker ve T.F. Zucker obezite araştırmasında yeni fikirlere yön veren kromozom 5 üzerinde bulunan, yağ üzerine etkili (fa) gende otozomal resesif mutasyonunu bildirmişlerdir⁹⁹. Daha sonra fa geni leptin reseptör geni olarak gösterilmiştir¹⁰⁰.

Lep^{db}/ Lep^{db} faresine benzer şekilde oluşturulan leptin dirençli obezite rat modeli leptin reseptöründe mutasyonlar vardır. Obez Zucker (fa / fa veya yağlı rat) ve Koletsky rat, leptin reseptörünün hücre dışı alanının mutasyona uğramış formlarını taşır. Bu

modeller hiperfaji ve enerji tüketiminin azalmasına benzer bir fenotip geliştirerek morbid obeziteye yol açarlar^{95, 96}.

Wistar Yağlı Rat (WYR)

1981'de Ikeda ve ark. başka bir obezite rat modeli olan Wistar yağlı ratı (WYR) bildirmiştir¹⁰¹. WYR, fa geninin ZYR'den zayıf glukoz toleransı sergileyen Wistar Kyoto ratlarına aktarılmasıyla türetilmiştir¹⁰¹. Zucker (fa / fa) ratına benzer şekilde, WYR, insülin direnci, hiperinsülinemi ve hiperlipidemi gibi obezite ve komorbiditeler geliştirir. İnsülin direnci, beyinde ve çevresel organlarda (karaciğer) azalan insülin bağlanması ile ilişkilidir⁹⁷.

Otsuka Long Evans Tokushima Yağlı (OLETF) Ratı

Otsuka Long Evans Tokushima Yağlı (OLETF) ratları hafif bir obezite modelidir¹⁰²⁻¹⁰⁴. OLETF ratlarında doğumdan birkaç hafta sonra hiperfaji başlar ve artan vücut ağırlığı sonunda obezite meydana gelmektedir⁹⁸. OLETF ratları, obezite ve diyabet araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır^{102, 105}.

2.2.5.2. Diyete Bağlı Obezite

2.2.5.2.1. Yüksek Yağlı Diyet

Leptin eksikliği olmayan model olarak obezite araştırmasında sıklıkla yüksek yağlı bir diyet (YYD) kullanılmaktadır. Yağ açısından zengin olan diyetler, sadece insanlarda obeziteyi teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda hayvanları da obez yapar¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Rodent ¹⁰⁹⁻¹¹² diyetindeki yağ seviyesi ile vücut ağırlığı veya yağ kazancı arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. YYD tüketen ratlar, minimum miktarda yağ içeren diyet tüketenlere oranla daha hızlı kilo alırlar. 1949'da farelerin, ilk kez, yarı sıvı, lezzetlendirilebilen bir diyet ile ad libitum (serbest) olarak beslenmesiyle obezite indüklendi¹¹³. Daha sonra 1953 yılında, Fenton & Dowling, obeziteyi indüklemek için süttten kesilmiş farelerde toplam enerjinin % 50'sinde yağ içeren YYD'ler kullandılar ve

elde ettikleri sonucu besinsel obezite olarak adlandırdılar¹¹⁴, ancak model daha sonra obezite diyeti olarak yeniden adlandırıldı¹¹⁵.

2.2.5.2.2. Kafeterya Diyetiyle İndüklenmiş Obezite

Farelere, insandakine benzer batı diyetini (kafeterya diyeti) taklit eden lezzetli bir diyet uygulandığında obez olurlar¹¹⁶⁻¹¹⁸. Kafeterya diyetine bağlı obezite, esas olarak artan yağ tüketiminin kısmen harcandığı hiperfajiden ve kahverengi yağın sempatik aktivasyonu nedeniyle diyetle indüklenen termogenezden kaynaklanmaktadır. Kafeterya diyetlerinde obezite oluşumu, artan yeme sıklığının yanı sıra ortalama yemek büyüklüğündeki artışa da bağlıdır¹¹⁷.

2.2.5.2.3. Doğum Sonrası Küçük Kafeslerde Yetiştirme ve Aşırı Beslenmeye Bağlı Obezite

Kafes boyutunun manipülasyonu ile farelerde ve ratlarda doğum sonrası aşırı beslenme, obezite modeli olarak kullanılmıştır ayrıca küçük kafes boyutunun büyük kafes boyutuna oranla obezitenin gelişmesinde daha etkin olduğu görülmüştür¹¹⁹⁻¹²¹. Erken aşırı beslenilmeye başlanması, önemli ölçüde daha yüksek vücut ağırlığına sahip yetişkin hayvanlara yol açar ve bu durum artmış adipozite, erken leptin direnci, hiperinsülinemi ve glukoz intoleransı ile ilişkilidir. Sütten kesildikten sonra YYD uygulandığında yavrudaki etki güçlendirilebilir. Anneden bağımsız olarak rat yavrularının aşırı beslenmesi, erişkinlik döneminde obez olma eğiliminin artmasına da yol açmaktadır¹²².

2.2.5.2.4. Annenin Aşırı Beslenmesi ve Yüksek Yağlı Diyetlere Maruziyeti

İntrauterin ve perinatal çevre, enerji dengesinin yaşam boyu kontrolünde önemli bir rol oynar. Hamilelik esnasında uygulanan diyetle enerji alımının ve tüketiminin kontrolünün çocukların ileriki dönem metabolizmasını etkileyebileceği bilinmektedir. Hamile ratları beslemek için uygulanan YYD bir diyetin yavrular üzerinde belirgin bir

etkisi bulunmaktadır¹²²⁻¹²⁶. Diyetle indüklenen obezitedeki anne ratların yavruları diğer hayvanların yavrularından daha ağır ve daha obezdir. Benzer şekilde, insanlarda annelerin YYD ile beslenmesi yavruların yetişkin yaşamında belirgin bir şekilde artan obezite riskine yol açar¹²²⁻¹²⁶.

2.2.5.3. Cerrahi ve Kimyasal Obezite Modelleri

2.2.5.3.1. Ventromedial Hipotalamusun Lezyonu

Kemirgenlerde indüklenen obezite modellerinden biri olan mediobazal hipotalamusun ventromedial / arkuat bölgesinin cerrahi lezyonları; hiperfajiye, vücut ağırlığında artışa ve adipoziteye neden olur. Ventromedial hipotalamusun lezyonuyla indüklenmiş obezitenin ortaya çıkma nedenleri hala belirsizken, sempatik ve parasempatik sinir sistemlerindeki bir değişiklik sendroma katkıda bulunur. Bu değişiklikler azalmış aktivite ve enerji harcamaları ile ilişkilidir. Hiperfaji muhtemelen POMC nöronlarının ve hipotalamik arkuat çekirdekte beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) üreten nöronların tahrip edilmesinden kaynaklanmaktadır¹²⁷⁻¹²⁹.

2.2.5.3.2. Hipotalamik Paraventriküler Nükleusun Lezyonu (PVN Lezyon)

Ventromedial hipotalamusun lezyonlarına benzer şekilde, hipotalamik paraventriküler nükleusun lezyonları da obeziteye neden olur. Obezite esas olarak artan yeme isteğinden kaynaklanır. PVN lezyonlu ratlarda obezite sonunda insülin direnci ve hiperinsülinemi meydana gelir^{96, 130, 131}.

2.2.5.3.3. Arkuat Nükleusun Lezyonu (ARC Lezyonu)

ARC lezyonunun anatomik şekli ve yeri nedeniyle seçici bir cerrahi lezyonunun yapılması zordur. Şimdiye kadar yapılan çoğu lezyon, ventromedial alan dahil olmak üzere tüm mediobasal hipotalamusu kapsamıştır. Alternatif olarak, ilk 10 postnatal gün içinde neonatal ratlara tekrarlanan monosodyum glutamat kullanımı, PVN'ye yansıyan ARC nöronlarının nispeten seçici yıkımına yol açmıştır. Monosodyum glutamat

lezyonlu ratlar hiperfajiktir ve daha sonra insülin direnci ve hiperinsülinemi ile obezite geliştirir¹³². ARC nöronları, aynı zamanda, altın tiyoglukozun lokal olarak uygulanmasıyla da yok edilebilir ve bu da benzer bir obezite fenotipine neden olur¹³³⁻¹³⁵.

2.2.5.3.4. Ovariektomi

Kadınlarda gonadektomi, yemek yemedeki artışla birlikte vücut ağırlığında artışa neden olur. Dişi ratlarda ve farelerde ovariektomi (OVX), menopozda ortaya çıkan artmış kadın obezitesinin bir modeli olarak kullanılmıştır. Östradiol eksikliğinden ötürü, OVX ratları ve fareleri, östrusta yemekte döngüsel düşüş sergilemezler. Bu siklik etki, OVX hayvanlarında östradiol replasmanı ile restore edilebilir. OVX ratlarında, diyetin diğer günlerinde, östradiol eksikliğine bağlı olarak bir tonik disinhibisyona işaret eden yemek yeme ihtiyacında artış görülür. OVX sonrası yeme artışının altında yatan mekanizmalar net değildir; döngüsel etki muhtemelen kolesistokinin (CCK), Glukagon Benzeri Peptid-1 (GLP-1), glukagon gibi yeme ihtiyacının denetleyicileri üzerindeki östradiol etkisinden kaynaklanır¹³⁶⁻¹³⁹.

2.2.5.3.5. Kahverengi Adipoz Doku (KAD) Ablasyonu

Kahverengi adipoz doku (KAD), enerji tüketiminin kontrolünde önemli bir rol oynar. KAD, enerjiyi ısı olarak dağıtan protein 1'i (UCP-1) ifade eder. KAD ablasyonu olan transgenik fareler, belirgin bir şekilde obezdir ve enerji tüketiminde azalmaya sahiptir^{140, 141}. Bu farelerde KAD'ın ablasyonu, UCP-1 eksprese eden hücrelerde difteri toksini A'nın eksprese edilmesiyle sağlanmakta ve bu da KAD'ın yaklaşık % 70'inin ablasyonuna yol açmaktadır. Obez fenotip, YYD ile beslenen farelerde geliştirilmiştir¹⁴⁰.

2.3. Leptin

Leptin, 167 amino asit içeren protein yapısında bir hormondur, molekül ağırlığı 16 kDa'dur. Yapısı IL-6 ve IL-11 ile benzerlik gösterir. Biyolojik aktiviteden N-terminal bölgesi sorumludur¹⁴². Leptin, ob geni tarafından kodlanır. Ob geni, farelerde 6 no'lu kromozomda, insanlarda 7. kromozomun uzun kolundadır¹⁴³. Leptin, başlıca adipositlerde sentezlenirken, plasentada ve midenin epitelyum hücrelerinde, iskelet kası, hipofiz ve meme bezinde de sentezlendiği bilinmektedir.

Leptin sekresyonunu; adipoz dokudan, aşırı yeme, obezite, insülin, glukokortikoidler, akut enfeksiyon ve proinflamatuvar sitokinler (TNF- α , IL-1); iskelet kasından, glukoz, glukozamin, lipidler; plasentada, insülin, glukokortikoidler, hipoksi; midede beslenme ve kolesistokinin artırır. Açlık, soğuk, β -adrenerjik agonist, testosteron ise adipoz dokudan leptin sekresyonunu azaltır¹⁴⁴.

Leptinin atılımı başlıca böbrekler yoluyla olur¹⁴⁵. Leptin kanda serbest ve proteine bağlı olarak iki formda bulunmaktadır. Serbest form, leptinin aktivitesinden sorumludur. Yapılan tıbbi çalışmalarda, obez insanlarda leptinin büyük oranda serbest şekilde bulunduğu ve serbest leptin seviyelerinde artış olduğu görülmüştür. Bu durum, obezite oluşumunda asıl sorunun "leptin eksikliği değil, leptin direncidir" hipotezini destekleyen kanıtlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır¹⁴⁶. Fizyolojik şartlarda adipositlerde eksprese edilen leptin miktarı, hücrelerin yağ içeriği ile korelasyon gösterir¹⁴⁷. Leptin salınımı sirkadiyen ritim gösterir ve çeşitli faktörlerle düzenlenir¹⁴⁸.

Leptin direncinde, obez bireylerin çoğunda görülen bu durum leptinin etkisiyle gelişmektedir. Leptin rezistansı; i) Leptinin kan beyin bariyerinden geçişinin bozulması ve ii) Leptin reseptörlerinin bozulması olarak sınıflandırılabilir. 16 kDA molekül ağırlığında olan leptinin kan beyin bariyerini geçmesi kolay değildir. Uzun süre açlıktan

sonra ortaya çıkan triaçilgliseroller, leptinin kan beyin bariyerinden geçişini inhibe ederler¹⁴⁹.

2.3.1. Leptin Geni

Leptin geni ilk defa 1994 tarihinde farelerde bulunmuştur¹⁵⁰. Leptin gen mutasyonu ilk defa Pakistan asıllı bir ailede 8 yaşında bir kız ve 2 yaşında bir erkek kuzende saptanmıştır. Bu hastalarda obezite 3-4 aylıkken başlamış olup şiddetli hiperfaji gelişimi görülmüştür. Söz konusu hastaların serum leptin seviyelerinde sıfıra yakın değerler saptanmıştır. Açlık kan şekerlerinin normal ancak insülin düzeyleri ve TSH düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür¹⁵¹.

2.3.2. Leptinin Etki Mekanizması

Leptin, metabolik etkilerini, santral sinir sistemi ve periferik dokularda bulunan kendine özgü reseptörleri sayesinde gerçekleştirir¹⁵².

Leptin kemik kitlesini hipotalamus üzerinden farklı iki mekanizma ile kontrol eder. Birinci olarak, hipotalamusun gold-thioglucose duyarlı nöronlarındaki reseptörlerine bağlanarak sempatik sistemi aktive eder. Bu da osteoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol eder. Böylelikle kemik oluşumu artar^{153, 154}. Leptin, osteoblastların sempatik stimülasyonu ile osteoblastlardaki nükeer faktör kapa beta ligandı (RANKL) ekspresyonunu artırır, sonuçta kemik rezorpsiyonu da artmış olur¹⁵⁵. İkinci olarak; leptin, arkuat nükleus nöronlarındaki pro opiomelanokortin (POMC) üzerindeki reseptörlerine bağlanarak hipotalamik CART (Cocaine and Amfetamin Regulated Transcript) ekspresyonunu artırır ve bilinmeyen bir mekanizma ile RANKL ekspresyonunu azaltarak kemik rezorpsiyonunu inhibe eder¹⁵³.

Hipotalamus üzerinde gerçekleşen bu iki etki mekanizmasına ek olarak leptin, direkt osteoblastlar üzerindeki reseptörlerine bağlanır, böylece osteoblastların büyümesini ve kemik mineralizasyonunu da artırır¹⁵⁶.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından, çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup 30/03/2018-4 tarih ve sayılı oturumunda, 62 no'lu karar ile tez projesi olarak onaylanmıştır ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğünün TDH-2018-6724 proje numarası ile desteklenerek gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarımız Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde yapılmıştır.

Çalışmamızda denek olarak, Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edilen Sprague Dawley ırkı 40 adet erkek rat kullanıldı. Denekler 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık siklusu uygulanarak ortam sıcaklığı 24-26°C olacak şekilde paslanmaz tel kapakları olan plastik kafesler içerisinde, üzeri hava alabilecek şekilde tutuldu. Çalışma süresince kafesler 3 günde bir düzenli olarak temizlendi.

3.1. Deneysel Gruplarının Oluşturulması

Denekler yaş ve ağırlık olarak sınıflandırılarak, obez diyet grubu (OD) ve normal diyet (ND) grubu olmak üzere 2 ayrı gruba ayrıldı. Üç haftalık 40-60 gr. ağırlığına sahip toplamda 20 adet sprague dawley cinsi rat OD grubuna dahil edildi. ND grubuna ise 12 haftalık 250-300 gr ağırlığına sahip 20 adet Sprague Dawley cinsi rat dahil edildi.

Deneklerin çalışmaya dahil edilme yaşlarının farklı olmasının nedeni; OD grubundaki ratların 8 haftalık YYD diyet ile beslenerek deneye başlanıldığında 12 haftalık yaştaki deneklerle yaşça aynı olmasını sağlamaktır. Bunu gerçekleştirmekteki amacımız deneklerin deney başlangıçlarındaki yaşlarının aynı olmasını sağlayarak çalışmamızı standart hale getirmektir ve OD gruptaki deneklerin ND grubundaki deneklere oranla kilo artışlarındaki farkın belirlenebilmesiydi.

Seçilen obezite ve normal gruplardaki toplam 40 denek ortama uyum sağlaması amacıyla 1 hafta boyunca standart pelet yem ve su ile ad libitum (serbest) beslendi. Bir haftanın sonunda ise denekler rastgele her grupta 10 adet rat olacak şekilde kendi aralarında uygulama ve kontrol olmak üzere 2 gruba ayrıldı.

Uygulama grupları olarak obez diyet uygulama (ODU) ve normal diyet uygulama (NDU) grupları oluşturuldu. Kontrol grupları olarak da obez diyet kontrol (ODK) ve normal diyet kontrol (NDK) grupları oluşturuldu. Normal diyet gruplarına % 8 yağ içeriğine sahip pelet yem uygulaması gerçekleştirildi (Tablo 3.1). Obezite gruplarının oluşturulması için 8 hafta boyunca YYD (D12492, research diets, New Brunswick, NJ USA) uygulaması yapıldı (Şekil 3.1). Pelet yem şeklinde hazırlanmış olan rodent diyet yemi % 35 oranında yağ içermektedir. Yüksek yağlı rodent diyet yemi, toplam kalorisinin % 60'ını yağ içeriğinden sağlamaktadır (Tablo 3.2). Çalışma süresince haftalık olarak hayvanların ağırlıkları ve yedikleri yem hassas tartıda ölçülerek kayıt altına alınmıştır.

Deneklerin gruplara göre dağılımı: ($N_{\text{toplam}}=40$)

1. Normal Diyet Kontrol (NDK) grubu (n=10)
2. Obez Diyet Kontrol (ODK) grubu (n=10)
3. Normal Diyet Uygulama (NDU) grubu (n=10)
4. Obez Diyet Uygulama (ODU) grubu (n=10)

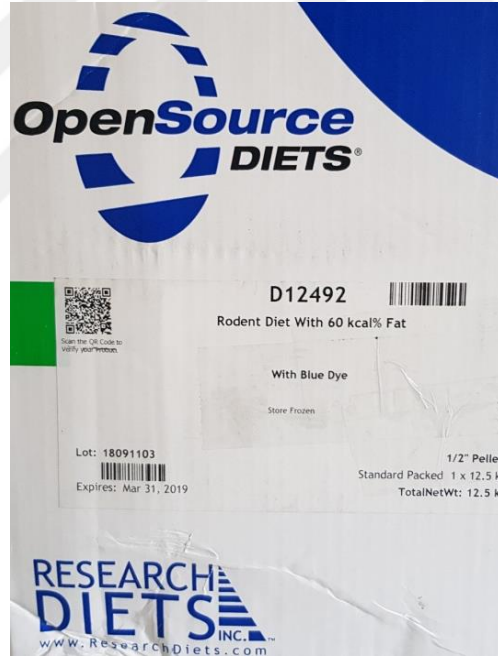
3.2. Obezite Gruplarının Oluşturulması

3 haftalık 40-60 gr. ağırlığına sahip toplamda 20 adet rat obezite grubuna dahil edildi. Denekler ortama uyum sağlaması amacıyla 1 hafta boyunca standart pelet yem ve su ile ad libitum (serbest) beslendi. Bir haftanın sonunda ise denekler rastgele her grupta 10 rat olacak şekilde kendi aralarında da uygulama ve kontrol olmak üzere 2 gruba ayrıldı. İkinci haftadan itibaren ratlarda kilo alımını ve yağ birikimini indüklemek

için 8 hafta boyunca YYD'e ad libitum (serbest) erişim izni verildi (Şekil 3.2). Ratların vücut, ağırlıkları ve boyları haftada bir kez olmak üzere takip edilerek kaydedildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan standart pelet yemin kalori içeriği ve enerji yoğunluğu

Protein;	% 26
Yağ;	% 8
Karbonhidrat;	% 66
Enerji yoğunluğu;	3.77 kcal / g



Şekil 3.1. Çalışmamızda kullandığımız pelet D12492 rodent diyet yemi



Şekil 3.2. Ratlarda kilo alımını ve yağ birikimini indüklemek için YYD'e ad libitum (serbest) erişim sağlanması

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan YYD'in kalori içeriği ve enerji yoğunluğu

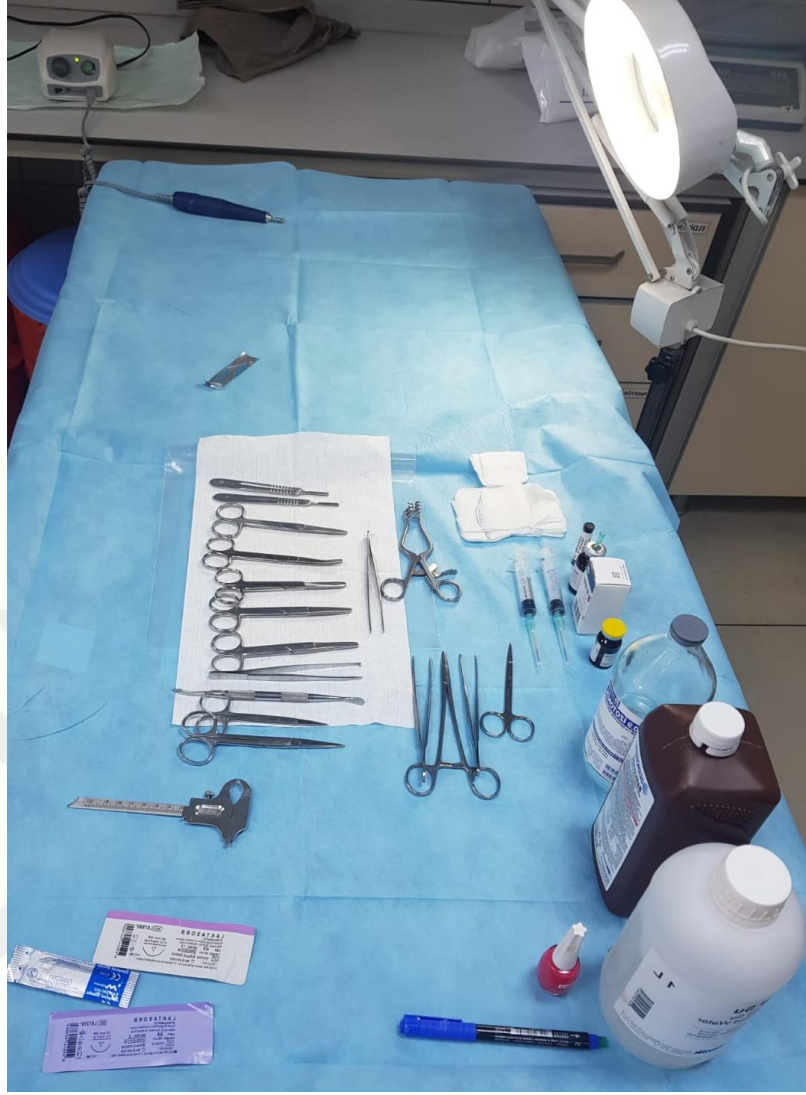
Protein;	% 20
Yağ;	% 60
Karbonhidrat;	% 20
Enerji yoğunluğu;	5.21 kcal / g

Toplam 9 hafta boyunca süren bu takip sonucunda her iki gruptaki deneklerin BKİ hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi. Boyun hesaplanması Fisler ve ark.¹⁵⁷ bildirdiği üzere; burun ucundan kuyruk başlangıcına olan mesafenin ölçümü ile yapıldı. Deneklerin ağırlıkları haftalık olarak hassas tartılarda ölçüldü. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri BKİ formülü kullanılarak hesaplandı ve BKİ sonuçları 5 kg/m²'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi.

3.3. Cerrahi Yöntem

Cerrahi işlemler öncesi, sterilizasyona dikkat edilerek kullanılacak olan cerrahi malzemeler prosedürlerin gerçekleştirileceği masaya özenle yerleştirildi (Şekil 3.3).

Deney hayvanlarına % 2'lik Ksilazin (10 mg/kg) (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) ve % 10'luk Ketamin HCl (50 mg/kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, ABD) anestezisi intraperitoneal olarak verildi (Şekil 3.4). Anestezi derinliği, göz kapağı refleksinin kaybolması ve enjeksiyon yapılmayan taraftaki ayağın çimdiklenmesiyle oluşan tepkiye göre değerlendirildi. Ayağında tepki görülen deneklerde anestezinin derinleşmesi için beklenerek tekrar test yapıldı. Tepki vermeye devam eden hayvanlara ek anestezi verildi.



Şekil 3.3. Cerrahi işlem öncesi hazırlık safhası



Şekil 3.4. İntraperitoneal anestezi uygulamasının gerçekleştirilmesi

Ratlarda kafa derisi enseden alına kadar tıraş edildi. Cerrahi işlem uygulanacak alanın antisepsi işlemi % 10'luk povidon iyot solüsyonu (Dermosept®, Baticinol, ALG İlaç Sanayi, Türkiye) ile gerçekleştirildi.

Orta hatta 20 no'lu bisturi yardımıyla 20 mm longitudinal bir cilt insizyonu yapıldı ve periost elevatörü ile periost kaldırıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. 20 mm longitüdüinal bir cilt insizyonunun gerçekleştirilmesi

Periostun kaldırılmasını takiben ekartör yardımı ile frontoparietal bölge işlem için ulaşılabilir hale getirilerek oluşturulacak kemik defektinin yeri belirlendi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Orta hatta deri insizyonunu takiben frontoparietal bölgenin ekartasyonu

Deneklerde kritik kalvaryal defekti oluşturabilmek için 5 mm. iç çapa sahip trephan frezler kullanıldı (Şekil 3.7).



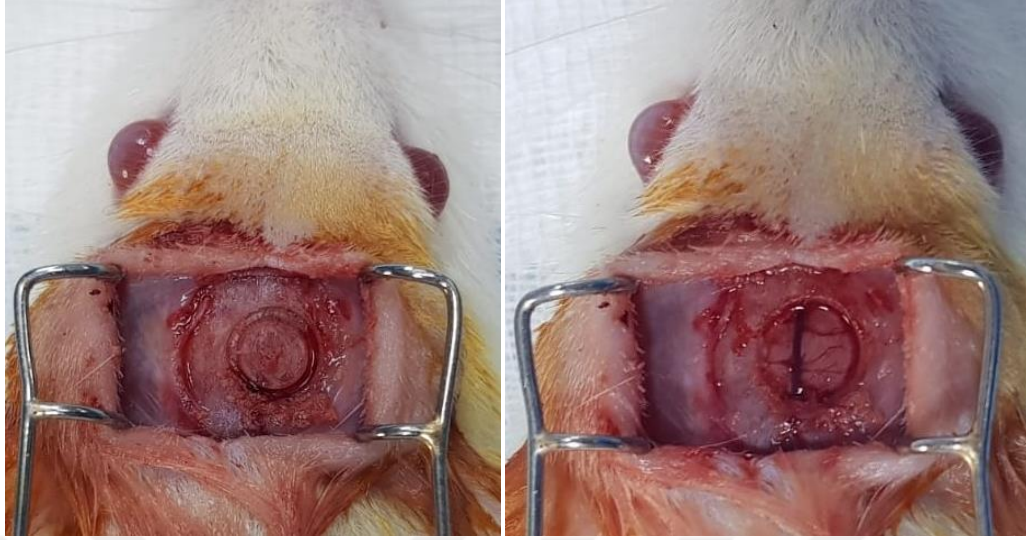
Şekil 3.7. Kalvaryal defektlerin oluşturulmasında kullanılan trephan frezler

Defektler, irrigasyon uygulaması altında tur motoru kullanılarak oluşturuldu (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Defektlerin oluşturulması esnasında kullanılan tur motoru

Deneklerde kaviterler, bregma noktası referans alınarak parietal kemiklerde oluşturuldu (Şekil 3.9). Soğutma ve açığa çıkan kemik dokularını uzaklaştırmak amacıyla steril sodyum klorürle irrigasyon yapıldı. Kavite açılırken dura materin zarar görmemesine dikkat edildi.



Şekil 3.9. Bregma noktası referans alınarak parietal kemiklerde trephan frez yardımıyla 5 mm çapında kavitelerin oluşturulması

4/0 Vicryl ile periost; 3/0 Vicryl ile de cilt insizyonu suture edildi (Şekil 3.10 ve 3.11). Uygulama grubundaki deneklere 4 gün boyunca 60 µg/kg/gün (Leptin, rat recombinant, Biovision, ABD) leptin intraperitoneal olarak uygulandı (Şekil 3.13). Aynı şekilde kontrol grubundaki deneklere 4 gün boyunca 0.5 ml steril serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı.



Şekil 3.10. Periost sutureasyonu



Şekil 3.11. Cilt sutureasyonu

Cerrahi işlemi takiben denekler 14. günün sonunda özel kafesler içerisinde % 100 CO₂ ile sakrifiye edildi (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Deneklerin özel kafesler içerisinde % 100 CO₂ ile sakrifiye edilmesi

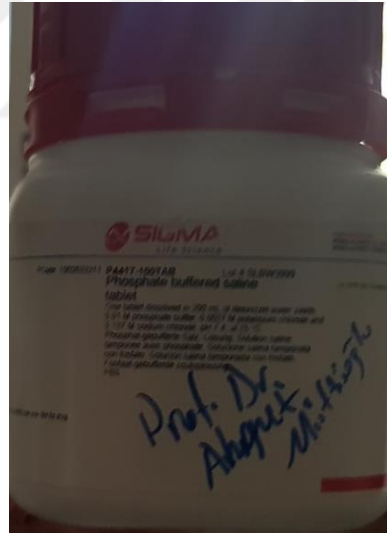
3.4. Leptinin Hazırlanması

-20 °C de korunan liyofilize steril toz haldeki (soğuk zinciri korunarak) 1 mg leptin (Leptin, rat recombinant, Biovision, ABD) başına 1 ml steril distile su olacak şekilde sulandırılma işlemi gerçekleştirildi. Sulandırılma işlemi takiben steril 50 ml fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffered saline tablet, Sigma-Aldrich, ABD) içinde seyreltilti. İlgili ürünün kullanım talimatlarında belirtildiği üzere 1 hafta boyunca +4°C' de saklanarak uygulamalar gerçekleştirildi.



Şekil 3.13. Çalışmamızda kullandığımız Rat Leptin Recombinant proteini

Steril fosfat tampon hazırlanması: Atatürk Üniversitesi Farmakoloji A.D. laboratuvarında üretici firmanın (Phosphate buffered saline tablet, Sigma-Aldrich, ABD) belirttiği üzere bir tabletin dördte biri kullanılarak steril distile su ile 50 ml fosfat tampon çözeltisi hazırlandı (Şekil 3.14). Hazırlanan fosfat tampon çözeltisi daha sonra +4°C’de saklandı.



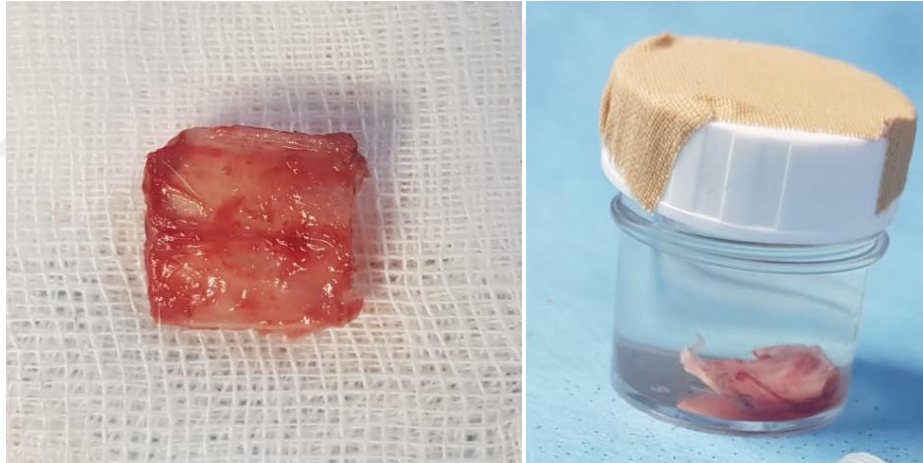
Şekil 3.14. Steril fosfat tampon hazırlanması esnasında kullanılan tabletler

3.5. Ratların Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması

Denekler kontrol edilip yara bakımı yapıldıktan sonra kafeslere yerleştirildi. Postoperatif dönemde deney hayvanlarına analjezik olarak Marcaine % 0.5 enjeksiyon solüsyonu (AstraZeneca, Türkiye) yara yerine topikal olarak uygulandı ve antibakteriyel olarak Genta 160 mg 1 ampül (İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi, Türkiye) 3-6 mg/kg

tek doz olarak intramusküler yöntemle uygulandı. OD grupları YYD ile beslenmeye devam ederken, ND grupları standart pelet yem ile beslendi. Deneklerin suya erişiminde kısıtlamaya gidilmedi. Kontrol gruplarına, cerrahi uygulanan günden başlamak üzere 4 gün boyunca her gün aynı saatte (18:00), günde bir kez intraperitoneal olarak 0.5 ml serum fizyolojik uygulandı. Uygulama gruplarına, cerrahi uygulanan günden başlamak üzere 4 gün boyunca her gün aynı saatte (18:00), günde bir kez intraperitoneal olarak 60 µg/kg leptin uygulaması yapıldı.

Defekt oluşumunu takiben 2. haftanın sonunda özel ötenazi kafesi içerisinde denekler % 100 CO₂ uygulaması ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen deneklerin parietal kemikleri defekt bölgesini de içine alacak şekilde çıkarıldı ve histopatolojik inceleme için % 10'luk formalin içerisinde konuldu (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Sakrifiye edilen deneklerin parietal kemikleri defekt bölgesini de içine alacak şekilde çıkarılması ve histopatolojik inceleme için %10'luk formalin içine konulması.

3.6. Histolojik İnceleme

3.6.1. Doku Takip Aşaması

Tablo 3.3. Parafin takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
TESPİT	%10 formalin	1 hafta
DEKALSİFİKASYON	HCl solüsyonu (Sigma Aldirich)	3 gün
DEHİDRATASYON	%50 alkol	½ saat
%60 alkol		½ saat
%70 alkol		½ saat
%80 alkol		½ saat
%95 alkol		1 saat
%95 alkol		1 saat
ŞEFFAFLAŞTIRMA	Alkol: ksilen	½ saat
Ksilen		1 saat
Ksilen		1 saat
İNFİLTRASYON	Ksilen-parafin	½ saat
Parafin		1 saat
Parafin		1 saat
GÖMME Parafin		

Tablo 3.4. Hemotoksilen eozin boyama protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
DEPARAFİNİZASYON	60 °C ETÜV	1 gece
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN	5 dakika
	KSİLEN	5 dakika
	KSİLEN	5 dakika
REHİDRATASYON	% 100 ALKOL	5 dakika
	%96 ALKOL	5 dakika
	% 80 ALKOL	5 dakika
	% 70 ALKOL	5 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	10 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1 saniye
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
BOYAMA	EOZİN	2 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
	% 80 ALKOL	1 saniye
	%96 ALKOL	1 saniye
	% 96 ALKOL	1 saniye
	KSİLEN	1 saat
KAPAMA	ENTELLAN	

Tablo 3.5. Masson trichrome boyama protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
DEPARAFİNİZASYON	60 °C ETÜV	1 gece
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN	1 saat
	KSİLEN	30 dakika
	KSİLEN	30 dakika
REHİDRATASYON	% 100 ALKOL	5 dakika
	%96 ALKOL	5 dakika
	%80 ALKOL	5 dakika
	%70 ALKOL	5 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	20 dakika
YIKAMA	AKARSU	1 dakika
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
BOYAMA	PONCEAU ASİT FUKSİN	5 dakika
YIKAMA	AKARSU	5 dakika
	ASİT-SU	
	METİLEN MAVİSİ	1 dakika
	% 80 ALKOL	1 saniye
	%96 ALKOL	1 saniye
	% 96 ALKOL	1 saniye
	KSİLEN	1 saat
KAPAMA	ENTELLAN	

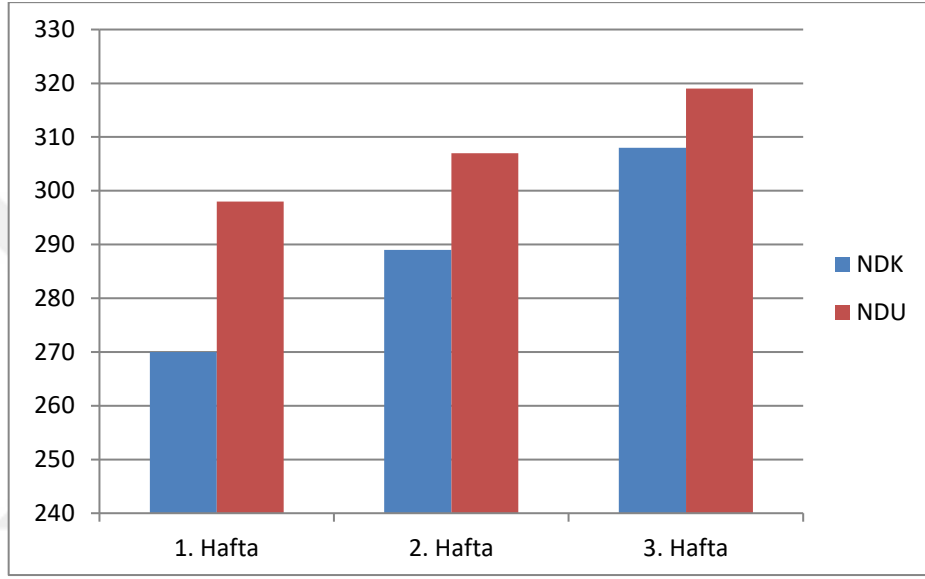
3.7. İstatiksel Analiz

Verilerin ön analizde normal dağılıma uygun olup olmadıkları Kolmogorov Smirnov testi ve grafiksel olarak değerlendirildi. Normal dağılım gösteren verilerde gruplar arası farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) analiz edildi. Farklılığı oluşturan gruplar DUNCAN çoklu karşılaştırma testi ile belirlendi. Normal dağılım göstermeyen verilerde gruplar arası farklılıklar Kruskal-Wallis testi ile; farklılığı oluşturan gruplar Mann-Whitney U testi ile belirlenmiştir (p <0.05). Verilerin analizinde IBM SPSS Statistics 20 yazılım programı (Armonk, NY: IBM Corp.) kullanılmıştır.

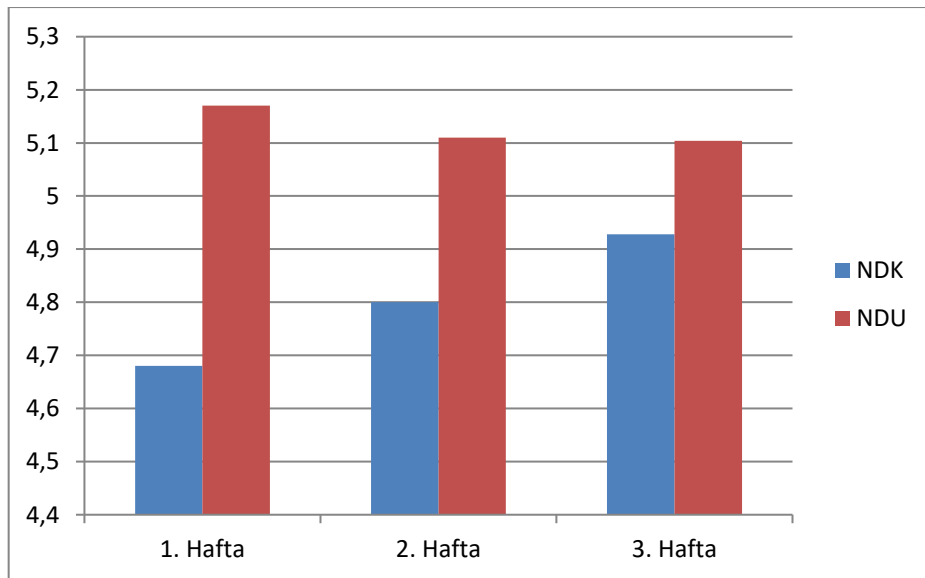
4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

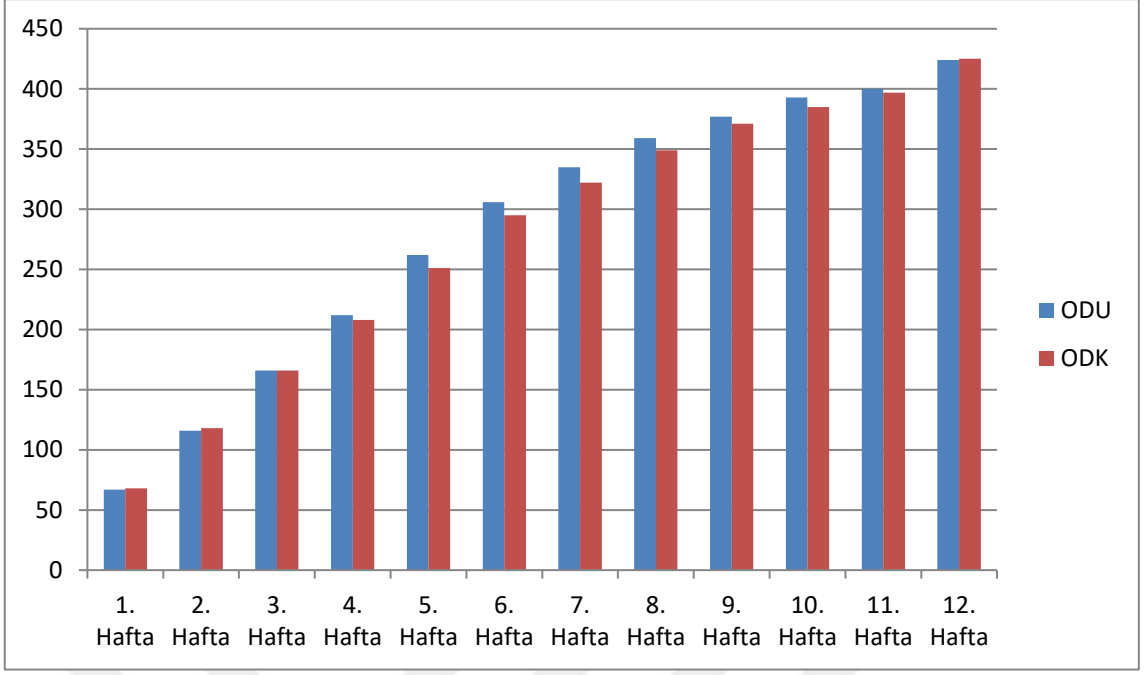
OD ve ND uygulanan kontrol gruplarında düzenli olarak BKİ ve kilo artışı gözlenmiştir. OD ve ND ile beslenen uygulama gruplarında ise leptin verilmesini takiben kontrol gruplarıyla kıyaslandığında BKİ ve kilo artışının daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1-4).



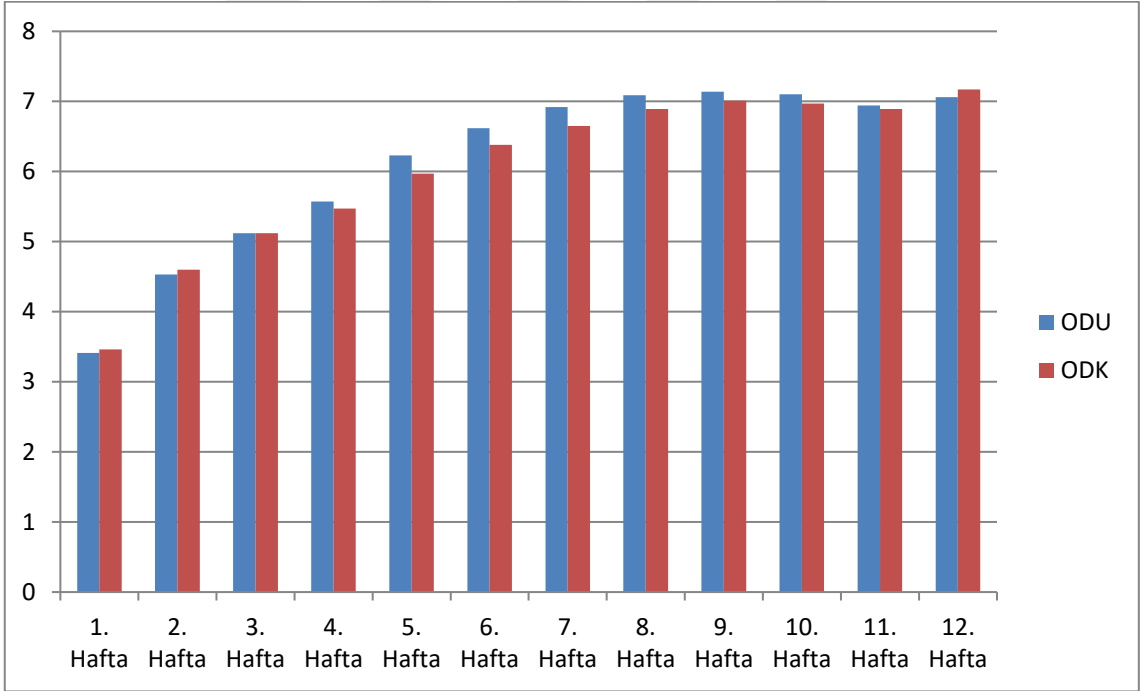
Şekil 4.1. NDK ve NDU gruplarının haftalık ortalama kilo değişimi (gram cinsi)



Şekil 4.2. NDK ve NDU gruplarının haftalık ortalama BKİ değişimi (kg/m²)



Şekil 4.3. ODK ve ODU gruplarının haftalık ortalama kilo değişimi (gram cinsi)



Şekil 4.4. ODK ve ODU gruplarının haftalık ortalama BKİ değişimi (kg/m²)

4.2. Histolojik Bulgular

Osteoblast ve osteoklast aktivitesinin belirlenmesi her deneğin; mikroskop (Olympus BX51 Fluorescence Microscope, Japan) x40'luk büyütme altında rastgele seçilen üç alanındaki oluşumlar incelenerek gerçekleştirilmiştir. Belirlediğimiz skorlama yöntemini Friedman ve ark.'nın¹⁵⁸ yaptığı skorlamaya benzer olarak gerçekleştirdik. Friedman ve ark.¹⁵⁸ skorlama yaparken oluşan kemik yüzelerini; yok (-), zayıf (+), orta (++) , ileri düzey (+++) kemikleşme olarak sınıflandırmıştır. Biz de Friedman ve ark. benzer şekilde örneklerin incelenmesi sonucu ortaya çıkan osteoblast aktivitesinin sayısal değerlendirmesini şu şekilde gerçekleştirdik: yok (-), 1-5(+), 6-10(++), 11 > (+++). Osteoklast aktivitesinin sayısal değerlendirmesi ise şu şekildedir: yok (-), 1-2(+), 3-4(++), 5 > (+++).

Ortaya çıkan sonuçlara göre gruplar arasında osteoblast aktivitesinin en az NDK ve ODK gruplarında olduğu görülürken, NDU grubunda artmaya başladığı, ODU grubunda ise en üst düzeyde olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.1) (Şekil 4.5-8).

Elde edilen bulgulara göre gruplar arasında osteoblast, fibröz doku kalınlığı, yeni damar oluşumu yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilirken ($p<0.05$), osteoklast aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Tablo 4.1. Gruplarda histolojik inceleme sonucu ortaya çıkan osteoblast ve osteoklast aktiviteleri

	Osteoblast	Osteoklast
NDK 1	++	-
NDK 2	-	+
NDK 3	+	+
NDK 4	+	+
NDK 5	+	++
NDK 6	-	+
NDK 7	+	+
NDK 8	+	+
NDK 9	+	+
NDK 10	+	+
ODK 1	++	+
ODK 2	+	++
ODK 3	+	+
ODK 4	+	-
ODK 5	+	+
ODK 6	+	+
ODK 7	+	++
ODK 8	+	-
ODK 9	-	+
ODK 10	+	-
NDU 1	+	+
NDU 2	++	+
NDU 3	++	+
NDU 4	++	+
NDU 5	+	+
NDU 6	+	+
NDU 7	++	++
NDU 8	++	+
NDU 9	++	+
NDU 10	++	+
ODU 1	+++	+
ODU 2	+++	+
ODU 3	+++	+
ODU 4	++	+
ODU 5	++	+
ODU 6	+++	-
ODU 7	+++	+
ODU 8	+++	+
ODU 9	++	+
ODU 10	++	+

Mikroskop (Olympus BX51 Fluorescence Microscope, Japan) altında x40'luk büyütme sonucunda rastgele seçilen üç alandaki osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin belirlenmesi esnasında değerlendirme: osteoblast aktivitesi; yok (-), 1-5(+), 6-10(++), 11 > (+++) ve osteoklast aktivitesi; yok (-), 1-2(+), 3-4(++), 5 > (+++)

Elde edilen bulgulara göre gruplar arasında osteoblast aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edilirken ($p < 0.05$), osteoklast aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Gruplar arası osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	Osteoblast	Osteoklast
NDK	1.00±0.14 ^a	1.00±0.14 ^a
ODK	1.00±0.14 ^a	0.90±0.23 ^a
NDU	1.70±0.15 ^b	1.10±0.10 ^a
ODU	2.60±0.16 ^c	0.90±0.10 ^a

Aynı sütundaki farklı harfler (^{a,b,c}) gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

Fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumunun belirlenmesi esnasında; her örneğin mikroskop (Olympus BX51 Fluorescence Microscope, Japan) x40'luk büyütme altında rastgele seçilen üç alanındaki oluşumlar incelenmiştir. Örneklerin incelenmesi sonucu ortaya çıkan yeni damar oluşumlarının sayısal değerlendirmesi şu şekildedir; yok (-), 1-3(+), 4-7(++), 7 > (+++). Fibröz doku kalınlığı ise μm cinsinden ölçüldü. Her denek için 3 farklı bölgenin fibröz doku kalınlığının ölçümü gerçekleştirilerek ortalaması hesaplandı. Fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumunun en az NDK ve ODK gruplarında olduğu görülürken, NDU grubunda artmaya başladığı, ODU grubunda ise en ileri düzeyde olduğu belirlendi (Tablo 4.3) (Şekil 4.9-12).

Tablo 4.3. Gruplarda histolojik inceleme sonucu görülen fibröz doku kalınlıkları ve yeni damar oluşumları

	Fibröz doku kalınlığı(μm)	Yeni damar oluşumu
NDK 1	94	+
NDK 2	88	+
NDK 3	116	+
NDK 4	78	+
NDK 5	93	+

NDK 6	102	++
NDK 7	96	+
NDK 8	109	+
NDK 9	84	-
NDK 10	107	+
ODK 1	91	+
ODK 2	118	+
ODK 3	89	+
ODK 4	98	-
ODK 5	73	+
ODK 6	121	+
ODK 7	96	+
ODK 8	86	+
ODK 9	92	+
ODK 10	105	+
NDU 1	152	++
NDU 2	123	++
NDU 3	134	+
NDU 4	116	++
NDU 5	145	+
NDU 6	133	++
NDU 7	98	+
NDU 8	129	++
NDU 9	131	++
NDU 10	142	++
ODU 1	149	+++
ODU 2	151	++
ODU 3	147	+++
ODU 4	139	++
ODU 5	166	+++
ODU 6	182	+++
ODU 7	163	+++
ODU 8	137	++
ODU 9	144	+++
ODU 10	153	+++

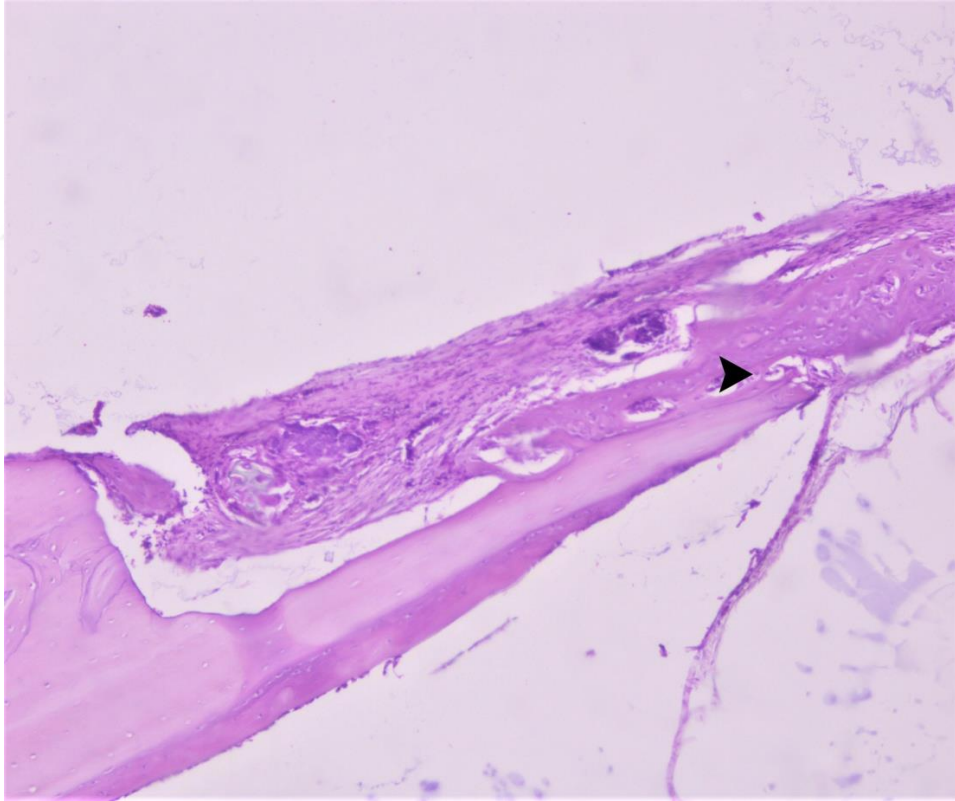
Mikroskop (Olympus BX51 Fluorescence Microscope, Japan) altında x40'luk büyütme sonucunda rastgele seçilen üç alandaki yeni damar oluşumunun belirlenmesi esnasında değerlendirme şeklimiz; yeni damar oluşumu; yok (-), 1-3(+), 4-7(++), 7 > (+++)

Fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit edildi ($p < 0.05$) (Tablo 4.4).

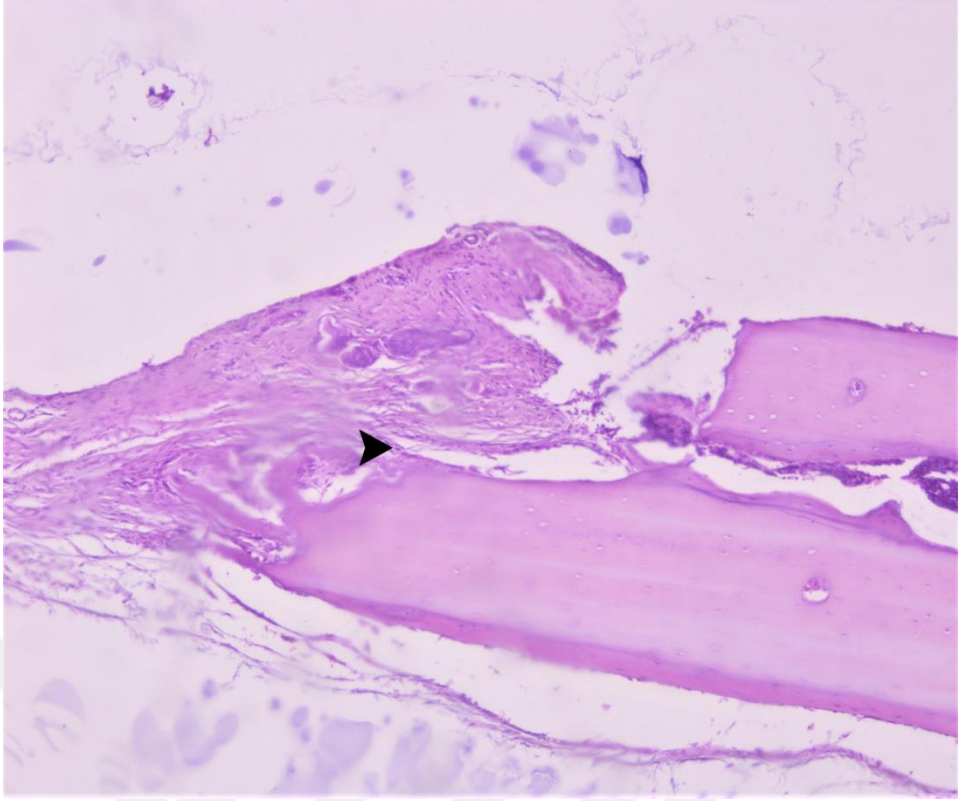
Tablo 4.4. Gruplar arasında fibröz doku kalınlıkları ve yeni damar oluşumlarının istatistiksel olarak incelenmesi

	Fibröz doku kalınlığı (μm)	Yeni damar oluşumu
NDK grubu	96.70 ± 3.75^a	1.00 ± 0.14^a
ODK grubu	96.90 ± 4.60^a	0.90 ± 0.10^a
NDU grubu	130.30 ± 4.88^b	1.70 ± 0.15^b
ODU grubu	153.10 ± 4.35^c	2.70 ± 0.15^c

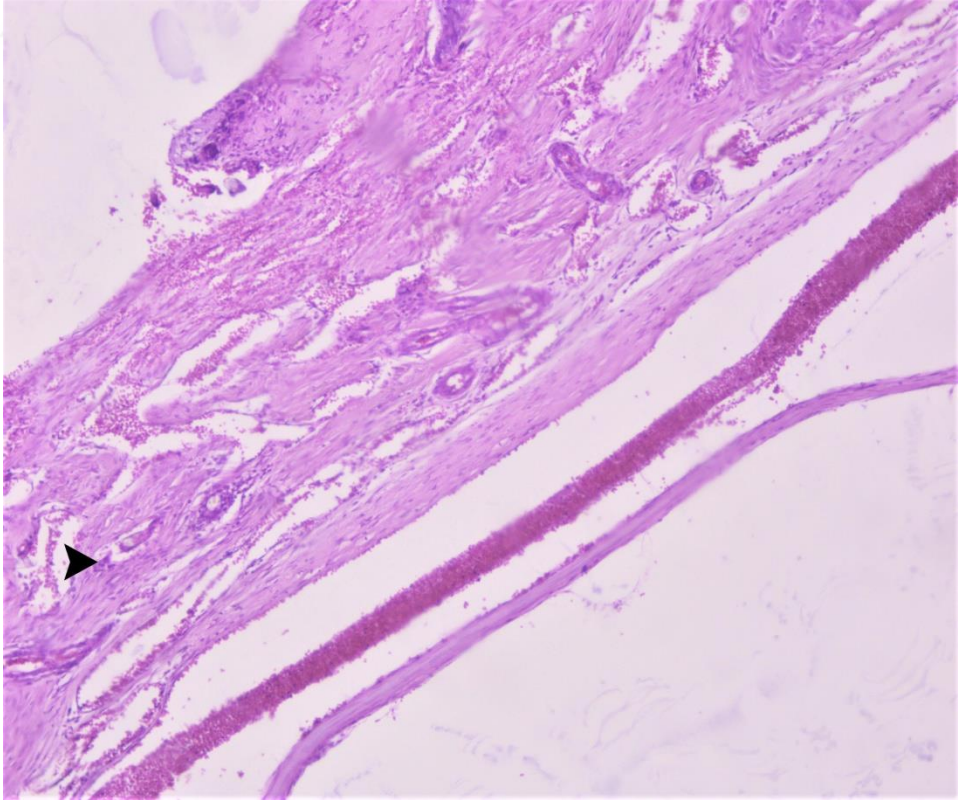
Aynı sütundaki farklı harfler (a,b,c) gruplar arası farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).



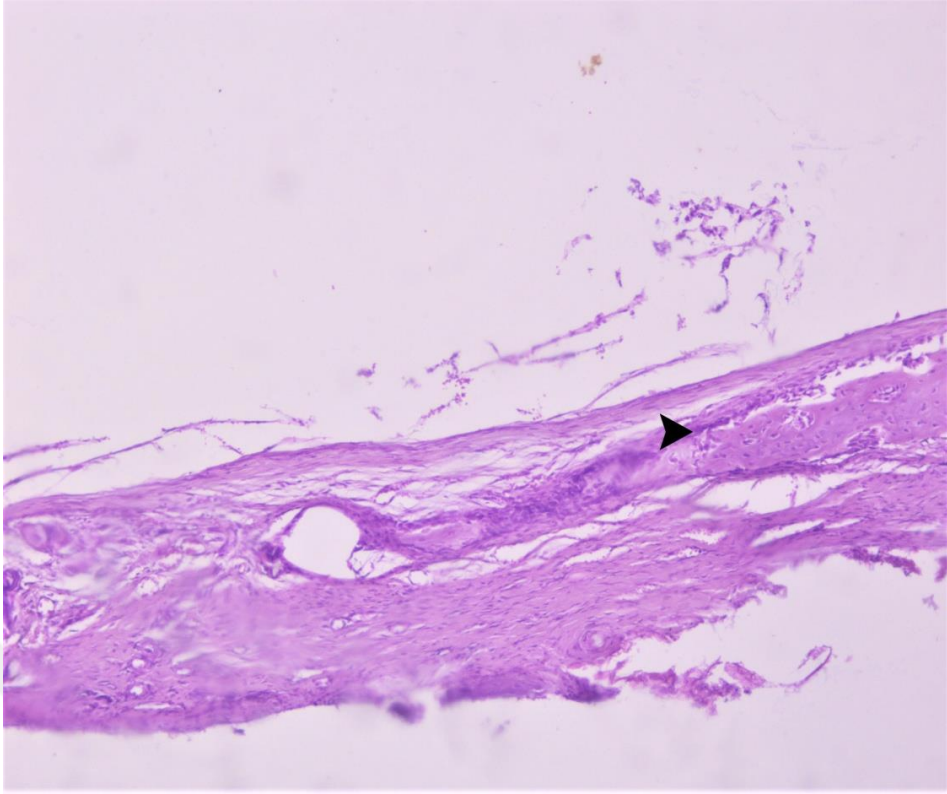
Şekil 4.5. NDK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin)



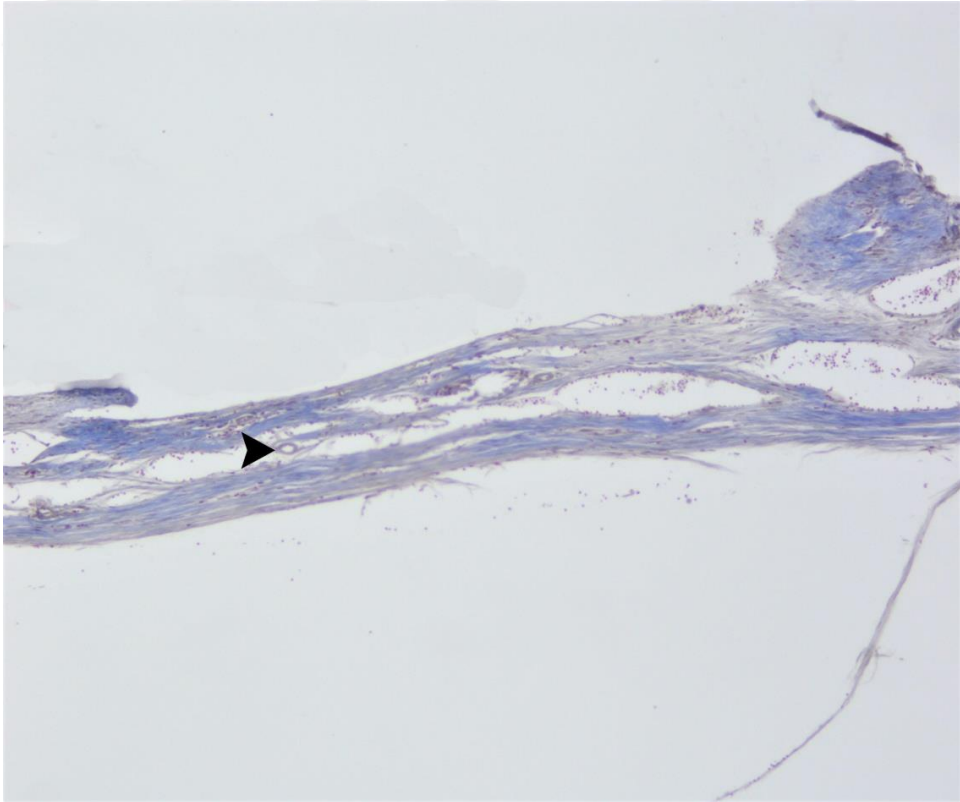
Şekil 4.6. ODK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin)



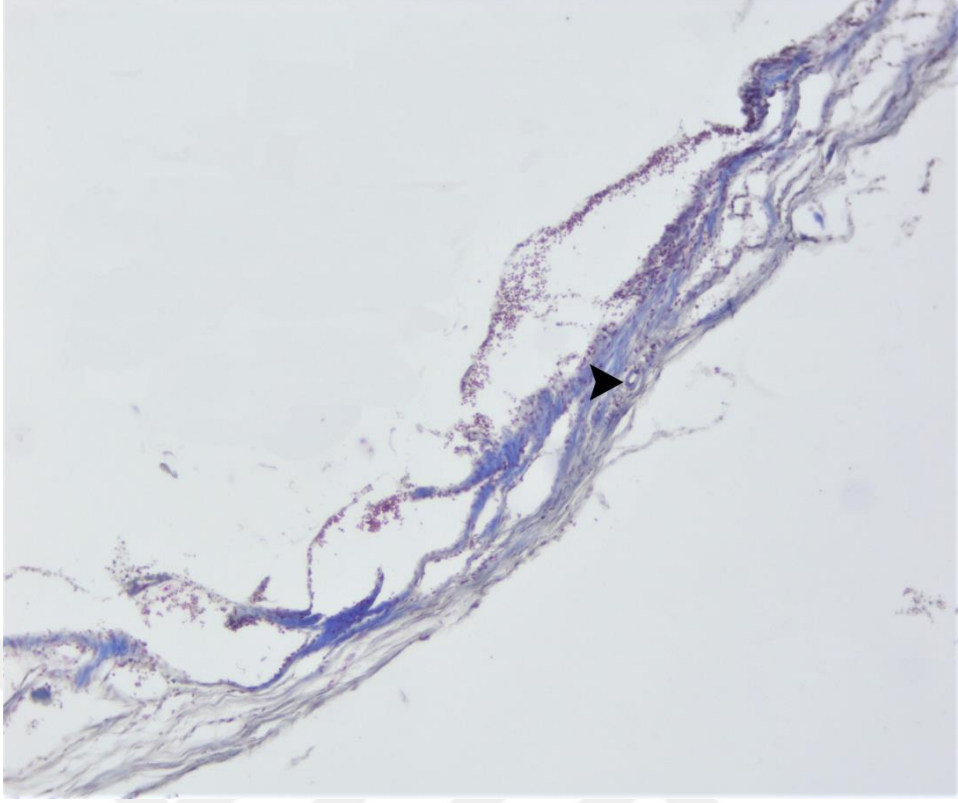
Şekil 4.7. NDU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu orta üstü düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin)



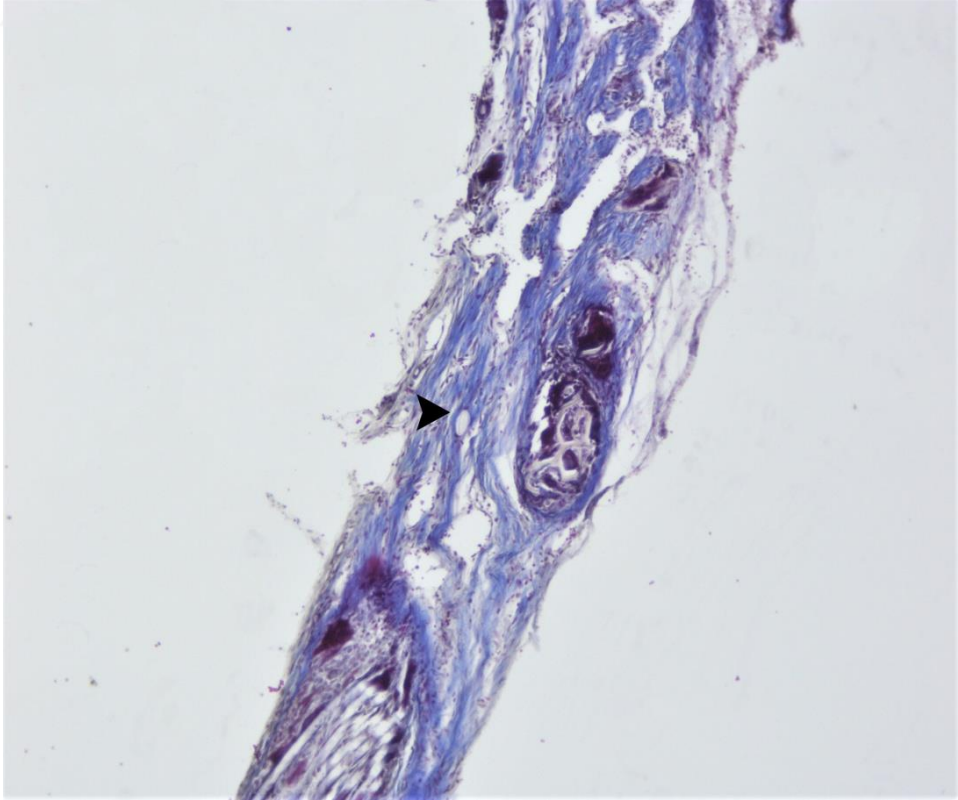
Şekil 4.8. ODU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu ileri düzeyde osteoblast aktivitesi (ok). x10 (Hemotoksilen Eozin)



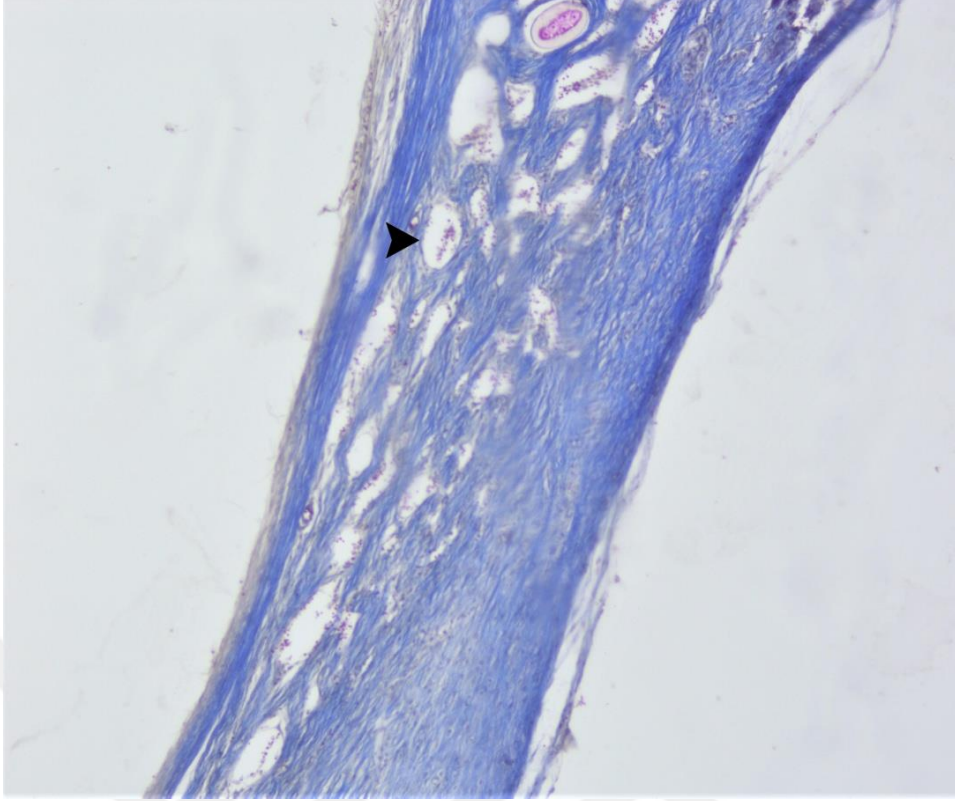
Şekil 4.9. NDK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson Trichrome)



Şekil 4.10. ODK grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu hafif düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson trichrome)



Şekil 4.11. NDU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu orta düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson trichrome)



Şekil 4.12. ODU grubu. Gruplar arasında değerlendirme sonucu ileri düzeyde fibröz doku kalınlığı ve yeni damar oluşumu (ok). x10 (Masson trichrome)

5. TARTIŞMA

Kemik dokusu, vücuttaki diğer dokulardan farklı olarak benzersiz bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Sağlıklı bir kemikte rezorbsiyon ve rejenerasyon dengededir. Kemik kırıklarında ve osteotomi cerrahisi sonrasında bütünlüğü bozulan kemik, kendini remodele edip tamir edebilmektedir⁸³. Kemik defektleri, konjenital ve travma nedeniyle olmakla birlikte tümör eksizyonu ve dejeneratif hastalıklar sonrası da oluşabilmektedir¹⁵⁹. Tüm bu nedenlere bağlı olarak meydana gelmiş kemik defektlerinde daha iyi şekilde ve kısa sürede gerçekleşebilecek bir kemik iyileşmesi istenmektedir. Bu nedenle kemik iyileşmesini olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilecek faktörlerin araştırılması çalışılmaya değer bir konudur. Biz de çalışmamızda, deneysel olarak oluşturduğumuz kemik defektlerinde, kemik iyileşmesi üzerine etkileri yönüyle leptin ve obeziteyi değerlendirmeyi amaçladık.

Literatürde kemik defektlerindeki iyileşmeyi değerlendirmek amacıyla farklı defekt modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır^{160, 161}. Bu çalışmalarda defekt modelinin olduğu kadar, tercih edilen deney hayvanının ve defekt boyutunun önemi büyüktür.

Histing ve ark.¹⁶² deney hayvanlarından rat ve farelerin, haversian kanal sistemine sahip olmamaları sonucu kemik defekt modeli olarak eksik sayılmalarına rağmen, boyutsal olarak küçük ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle avantajlı laboratuvar hayvanları olduklarını belirtmişlerdir. Aynı zamanda oda sıcaklığı, nem, yem standardizasyonunun sağlanabilmesi yönüyle de laboratuvar hayvanlarının kullanımları çalışmalarda kolaylık sağlamaktadır.

Femur kemik defekt modeli, deneysel çalışmalarda sık kullanılan bir modeldir. Osteoindüktif veya osteokondüktif materyallerin ya da farklı maddelerin salınımları

perfüzyon tekniklerinin denenmesi planlandığında kullanımı uygun uzun kemik modelidir^{163, 164}.

Radiusta oluşturulan kemik defekt alanına istenilen osteojenik ajanın yerleştirilmesi mümkündür¹⁶⁰. Distraksiyon ya da mekanik/fonksiyonel testlerin uygulanabilmesi bu modelin avantajları arasındadır. Esther ve ark.¹⁶⁰ belirttiği üzere, bu kemik defekti modelinin, anatomik nedenlerle ratlarda pek kullanışlı olmamasından kaynaklı deneysel çalışmalardaki uygulama sıklığı az olmuştur.

Zigoma kemik defekti modeli çok sık kullanılan bir model olmamakla birlikte; fasiyal bölge defektlerinin incelendiği çalışmalarda alternatif bir modeldir¹⁶¹.

Kalvaryal defektler, literatürde ilk kez 1889'da köpek kafatası üzerinde demineralize sığır kemik matriksi araştırılırken kullanılmıştır. Kalvaryal kemik defekti modeli, fasiyal bölge kemikleriyle embriyolojik açıdan benzeştiği için oldukça kullanışlıdır. Bu modeldeki kemik iyileşmesi intramembranöz olarak gerçekleşmektedir¹⁶⁵.

Çalışmamızda, kritik boyuttaki kemik defektini ratların kalvaryal kemiklerinde oluşturduk. Kalvaryal kemiğin embriyolojik açıdan intramembranöz gelişime sahip olması bizim bu modeli tercih etmemizde önemli bir rol oynadı.

Anatomik olarak kalvaryal kemiğin iç kısmında periost yerine dura mater olması nedeniyle kemiğin iyileşmesi vücudun diğer bölgelerindeki kemiklerden farklılık göstermektedir. Kalvaryal defektlerde dura materin zarar görmesi iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyebilmektedir¹⁶⁶. Cutting ve ark.¹⁶⁷ kalvarianın kanlanması, orta meningeal arter ve onun dalları tarafından sağlandığını belirtmişlerdir. Bu yüzden yeni kemiğin yapımı sadece defekt kenarlarından değil aynı zamanda dura materden de köken aldığı sonucuna varılabilir. Bu nedenle çalışmada oluşturduğumuz defektlerin hazırlanmasında dura materin zarar görmemesine olabildiğince özen gösterildi.

Schmitz ve Hollinger 1986'da deney hayvanının ömrü boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek boyutta en küçük kemik içi defektini 'kritik boyutta defekt' olarak tanımlamışlardır¹⁶⁸. Bu boyuttaki defekt kendi haline bırakıldığında kemik yerine fibröz bağ doku ile iyileşmektedir.

Ratların kalvarya kemiğinde oluşturulan kritik kemik defekt boyutu literatürde farklılıklar göstermekte, bu konuda standardize edilmiş bir ölçüm bulunmamaktadır. Kritik kemik defekt boyutu, canlının biyolojik durumuna veya yapılan cerrahiye bağlı olarak değişmektedir¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Yapılan çalışmalarda ratlardaki kritik kemik defekti boyutu 4 ile 8 mm'lik çaplar arasında değişmektedir^{168, 172-174}.

Vajgel ve ark.¹⁷⁵ yapmış oldukları sistematik bir derlemede 61 çalışmayı analiz etmişlerdir. Çalışmalarda en yaygın kullanılan çapların sırasıyla; 22 çalışmayla 5 mm ve 21 çalışmayla 8 mm olduğunu belirtmişlerdir.

Cacciafesta ve ark.¹⁷⁶ yetişkin ratlarda 5 mm'lik bir kemik defektinin kendiliğinden iyileşmediğini gözlemlemişlerdir.

Akita ve ark.¹⁷² ratların kalvaryalarında 4 mm'lik kemik defektlerinde, Nagata ve ark.¹⁷⁷ 5 mm'lik kemik defektlerinde, Pryor ve ark.¹⁷³ 6 mm'lik bilateral kemik defektlerinde iyileşmeyi değerlendirmişlerdir.

Defekt boyutuyla ilgili olarak ortak bir görüş olmadığından, literatür çalışmalarının ortalama olarak 5 mm'lik defektleri değerlendirdiğini göz önünde bulundurarak, çalışmamızda 5 mm'lik kritik kemik defektlerindeki iyileşme değerlendirilmiştir.

Vücut yağ kitlesi ve kemik metabolizması arasındaki ilişkilerin açıklanması için yapılan çalışmalar gittikçe artarak devam etmekte ve literatürdeki yerini almaktadır. Özellikle son zamanlarda bu konuda yapılan çalışmalarda bir adipokin olan leptin popülerlik kazanmıştır ancak bu ilişkideki pek çok nokta halen aydınlatılamamıştır.

Leptinin, kemik ve yağ dokusu arasında önemli bir fonksiyonel bağlantı sağladığı bilinmektedir¹⁷⁸.

Leptin üzerine yapılan çalışmalarda uygulama doz aralığı 0,1 µg/kg/gün^{179, 180} ile 0,1 mg/kg/gün¹⁸⁰ arasında değişebilmektedir. Doz aralığının belirlenmesi esnasında leptinin uygulama şekli de uygulama dozunun belirlenmesinde önemli bir faktördür. Daha önceki çalışmalarda intraperitoneal¹⁸¹, topikal olarak lokal uygulamalar¹⁸² ve osmotik pompa implantasyonu¹⁷⁹ olmak üzere çeşitli uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

Fayez ve ark.¹⁸¹ Sprauge Dawley cinsi ratlarda intraperitoneal 60 µg/kg/gün leptin uygulaması gerçekleştirerek melatonin ve leptinin sperm üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir.

Belirgin bir etki sağlamak amacıyla çalışmamızda leptin için uygun dozun intraperitoneal 60 µg/kg/gün olarak uygulanmasına karar verilmiştir. Belirlediğimiz bu doz ve uygulama şekli aynı zamanda insanda kullanılan leptin preparatı olan Metreleptinin kullanım talimatlarındaki subkutanöz enjeksiyon dozuna benzer bir dozdur.

Çalışmamızda kritik kemik defektlerinin oluşturulmasını takiben uygulama gruplarına 4 gün leptin enjeksiyonu yapılmış ve cerrahi işlemden 14 gün sonra kemik iyileşmesi değerlendirilmek üzere denekler kurban edilmiştir.

Kemik iyileşmesinin 14 günlük bir süre sonunda değerlendirilmesine literatür taraması ışığında karar verilmiştir. Kemik oluşumunun genellikle 1. haftanın sonunda başlayıp 6. haftaya kadar devam ettiği bilinmektedir. Kalfas⁸¹ tarafından kemik iyileşmesinin en kritik döneminin ilk 1-2 hafta olduğu, bu süre zarfında kemiğin iyileşme potansiyelinin çeşitli biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik mekanizmalardan etkilenebileceği belirtilmiştir. Literatürde bu anlamda çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Rat kalvaryalarında kemik iyileşmesini değerlendirmek üzere; Akita ve ark.¹⁷² tarafından yapılan çalışmada 2, 4 ve 8 hafta, Nagata ve ark.¹⁷⁷ tarafından yapılan çalışmada 4 hafta, Pryor ve ark.¹⁷³ tarafından yapılan çalışmada 4 ve 8 hafta, Bateman ve ark.¹⁸³ tarafından yapılan çalışmada ise 2-4 hafta sonunda ratlar sakrifiye edilerek gerekli incelemeler yapılmıştır.

Biz de çalışmamızda, kemiğin en kritik iyileşme dönemi olan ilk 14 gün sonunda, defekt bölgelerinden kesitler aldık.

Uygulama gruplarına 4 gün leptin verilmesi sırasında, aynı şekilde kontrol gruplarına da serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Kontrol gruplarına serum fizyolojik vermemizdeki amaç, diğer gruplara leptin uygulaması sırasında elimizle tutulmaları ve enjeksiyon ile oluşabilecek stresi kontrol grubunda da oluşturmaktır. Böylelikle çalışma gruplarında stres kaynaklı hormonal değişiklikler sonucu; kilo kaybı, kemik metabolizması gibi çeşitli faktörlerin meydana getirebileceği farklılıkları ortadan kaldırarak bu anlamda gruplar arası standardizasyonu sağlamış olduk.

Yapılan bir çalışmada, normal kilolu yetişkin erkek Sprague Dawley ratlarında 4 günlük sistemik olarak uygulanan leptin, inguinal yağ hücrelerinin sayısında bir azalmaya neden olmuştur¹⁸⁴. Beş gün boyunca uygulanan leptin enjeksiyonları, genç 3 aylık erkek Sprague-Dawley ratlarındaki yağ hücresi sayısını azaltmış, ancak olgun 8 aylık hayvanlarda yağ hücrelerinin sayısında değişiklik görülemediği¹⁸⁵.

Çalışmamızda leptin intraperitoneal enjeksiyon sürelerini belirlerken literatürle uyumlu olarak 4 günlük süreyi uygun gördük. Belirlediğimiz bu süre aynı zamanda kemik iyileşme sürecinde pre-osteoblastik hücre göçünün en aktif olduğu süreçtir.^{82, 186}.

Leptin uygulama gruplarımızda elde ettiğimiz bulgularda; osteoblastik aktivitenin daha fazla olduğu görülmüş olup, istatistiksel olarak değerlendirme

yapıldığında da sonuçların anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ayrıca bu durum fibröz doku kalınlığında da paralellik göstermiştir.

Diyet obezitesine katkıda bulunan faktörlerin kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri günümüzde hala net bir şekilde ortaya konamamıştır. Yaptığımız bu çalışmada YYD ile obezite gerçekleştirilen ratlarda bu durumun kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini değerlendirmeyi hedefledik.

Diyet yağlarının; kalsiyum atılımı, kemiğin mekanik özellikleri, mineral içeriği ve osteoblast oluşumu ile ilgili olarak kemik kalitesini olumsuz etkilediğini bildiren çalışmalar mevcuttur^{187, 188}.

Feng ve ark.¹⁸⁹ 2018 yılında yapmış oldukları çalışmada X-ışını, Hemotoksilen eozin ve Alcian mavisi boyama analizlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak obez farelerde kemik iyileşmesinin, normal farelerin oluşturduğu kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında, daha gecikmiş olduğu tespit etmişlerdir.

Yapılan bazı çalışmalar, hiperlipideminin çenede kemik mineral yoğunluğu ile ters orantılı olduğunu göstermiştir¹⁹⁰⁻¹⁹³. Ayrıca, bu ilişkide kemik ve yağ arasındaki homeostatik feed back mekanizması önemli rol oynamaktadır.

Cao ve ark.⁴, obezite patolojisinde leptin serum düzeyinin çok yükseldiğini ve bu durumun inflamasyonu arttırdığını belirtmişlerdir. Kemik iliğindeki adipoz doku hacminin artışı nedeniyle kemik iliğinde azalmış osteoblastogenezisin görüldüğü ve bunun sonucunda da kemik oluşumunda azalmanın ortaya çıktığı yapılan bu çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada YYD ile beslenmenin, obezitenin ortaya çıkmasına neden olduğunu ve obezitenin bağırsaklarda kalsiyum emilimini azalttığını ifade etmişlerdir. Ca^{++} emilimindeki azalmaya bağlı olarak yeni kemik oluşumunda da azalma gözlemlendiğini ortaya koymuşlardır.

Çalışmamızın sonucunda obezitenin tek başına kemik iyileşmesi üzerine etkisi olmadığını, NDK ve ODK gruplarındaki fibröz doku kalınlıklarındaki benzerlikle açıklayabiliriz. Fibröz doku kalınlıkları incelendiğinde NDK ve ODK grupları arasında istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Bizim bulgularımıza paralel olarak son yıllarda obezitenin kemik iyileşmesi üzerine etkisi yönüyle yapılan çalışmalardan bazıları şu şekildedir; Histing ve ark.¹⁹⁴ 2016 yılında yaptıkları çalışmada obezitenin farelerde femur kırıklarının iyileşmesine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Radyolojik, biyomekanik ve histolojik analizler sonucu ND ve OD gruplarında deneysel olarak oluşturulan femur kırıklarında, 2 ve 4 haftalık iyileşme periyotlarındaki kallus oluşumunda önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

Yamanaka ve ark.⁵ 2017 yılında yetişkin ratlarda YYD'in kemik iyileşmesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, tibia üzerinde 1mm derinliğinde defekt oluşturmuşlardır. Cerrahi işlemi takiben 2 hafta sonra ratlara ötenazi uygulayarak, defekt oluşturulan tibialardaki KMY'na bakmışlardır. ND ve YYD uygulanan gruplarda histolojik olarak iyileşmenin benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

Diyet obezitesini incelemek için ratlar ve fareler, insanlara gösterdiği benzerlikler nedeniyle uygun modeller olarak kabul edilirler. Ratlarda obezite oluşturulurken çeşitli modeller kullanılabilir. Obezite modeli oluşturulmasında; monogenik mutasyonlardan, diyete bağlı obeziteden, cerrahi ve kimyasal olarak oluşturulan modellerden yararlanılabilir^{95, 96, 101, 102, 105, 117-118, 122, 127-131}.

ZYR, WYR ve OLETF obezite modellerinin mutasyon aracılığı ile oluşturulması ve bu sürecin hayli zor olması nedeniyle çalışmamızda bu modeller tercih edilmemiştir.

Yapılan diğer obezite çalışmalarında, yüksek karbonhidrat-düşük yağlı diyetlerin^{110, 195-201} veya yüksek yağlı-düşük karbonhidratlı diyetlerin^{202, 203}

kullanıldığına sıklıkla rastlanmaktadır. Ratların diyetine^{110, 195-201} belirli bir oranda yağ ekleyerek ya da yağ ve şeker açısından zengin süpermarket gıdaları (kafeterya diyeti) kullanılarak oluşturulabilmektedir. Yüksek karbonhidrat-düşük yağlı diyetlerin kullanımı, obeziteyi indükleyen yüksek yağlı-düşük karbonhidratlı diyetler kadar etkili bulunmamıştır^{110, 197, 204}. YYD'te ise toplam alınan enerjinin % 30-78'i arasında YYD'ler kullanılır¹⁰⁷. Genel olarak, yağ açısından toplam enerjinin % 30'undan fazlasını içeren diyetler, obezitenin gelişmesine yol açar. YYD ile indüklenerek yapılan hayvan modeli çalışmaları; insülin rezistansı, dislipidemi ve obezite oluşturmak için kullanılan en etkili yöntem olarak görülmüştür^{202, 203}.

Bizim çalışmamızda obezite oluşturmak için kullandığımız model, YYD modelidir. Obezitenin oluşumunun sağlanması için yapılan çalışmalarla benzer olarak çalışmamızda kullandığımız diyet modelimizin yağ içeriğinin toplamı, diyetteki toplam besin içeriğinin %35'ini kapsamaktadır.

İnsanlarda olduğu gibi hayvan modellerinde de obezite oluşumu Lee obezite indeksi ve vücut yağ içeriğinin artmasına dayanan kriterler²⁰⁵ ile değerlendirilebilir. Çoğu çalışmada obezite derecesi; yüksek yağlı veya enerji açısından yoğun diyetle beslenen deney grubunun vücut ağırlığı (veya yağı), az yağlı diyetlerle veya normal kalorili diyetlerle beslenen normal kilo alımı gösteren kontrol hayvanları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir^{106, 110, 197, 198, 206, 207}.

Araştırmacılar yaşça aynı olan ratların obezitesini vücut ağırlığındaki artışa göre derecelendirirken, obez ratların vücut ağırlığının normal ratlara göre % 10-25 lik artışını orta derecede obezite^{197, 198}, % 40'dan daha yüksek orandaki artışı ise ağır obezite olarak nitelendirmişlerdir²⁰⁸. Ayrıca çift enerjili X-ışını absorpsiyometrisi vücut kompozisyonunu değerlendirmek için ratlarda da kullanıldığı belirtilmiştir^{110, 208}.

Yaptığımız çalışmada obez gruptaki deneklerin BKİ hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi. BKİ hesaplanması esnasında boyun belirlenmesi Fisler ve ark.¹⁵⁷ belirttiği üzere; burun ucundan kuyruk başlangıcı arası mesafe ölçülerek gerçekleştirildi. Ratların ağırlıkları her hafta hassas tartılarda ölçülerek tek tek not edildi. Hesaplanan sonuçlara göre BKİ 5 kg/m²'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi²⁰⁹. Ortalama BKİ hesaplandığında, obezite gruplarının BKİ 6,7 kg/m² olarak bulundu. Ayrıca bu değerlendirmelere ek olarak aynı yaşta bulunan ND ratlarının ağırlıklarıyla, OD gruptaki ratların ağırlıkları karşılaştırıldı. Ağırlıklarında ortalama %35 artış tespit edilerek orta derece obezite gelişimi sağlandığı tespit edildi.

Hayvanların cinsiyetinin, YYD'te yağ dokusunun hücrel tepkisini de etkileyebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Mayes ve ark.²¹⁰ 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada kadınlarda yağ depolarındaki östrojen ve progesteron reseptörlerinin daha yüksek konsantrasyonlarının varlığı nedeniyle daha fazla deri altı yağ bulunurken, erkeklerde iç organlarda yüksek konsantrasyonlarda androjen reseptörlerine bağlı bu bölgelerde daha fazla yağ bulunduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda dişi hayvan modelleri, insanlarda obeziteye karşı duyarlılığı taklit eden yüksek yağlı beslenmeye daha iyi yanıt vermektedir^{199, 211, 212}. Ancak Varma ve ark.²¹³ tarafından yapılan bir çalışmada erkek fareler ve ratlar diyet obezitesini incelemek için daha uygun bir model olarak gösterilmektedir. Bu durum dişi hayvanların her 4-6 günde bir tekrarlanan ve bu dönemlerde hayvanın besin alımını etkileyebilen östrus siklusu nedeniyledir.

Obezite oluşturabilmek amacıyla Varma ve ark.'ın²¹³ bildirdiği gibi çalışmamızda uygun model olarak erkek ratlar kullandık. Bu modeli seçmemizin amacı çalışmamızda obezite gelişiminde ve oluşturulan defektlerde kemik iyileşmesinin östrojen,

progesteronun ve 4-6 günde bir tekrarlanan östrus siklusunun çalışmanın sonuçlarını etkilemesinin önüne geçilmesidir.

YYD modellerinin obezite oluşturulmasında uygulama süresi, hayvan modeli seçimi ve çalışmaya başlangıç yaşları üzerine literatürde değişkenlik gösteren bilgiler mevcuttur.

Literatürde Takeuchi ve ark.²¹⁴ yaptıkları çalışmada 4 haftalık ratları, Yaqoob ve ark.¹⁹⁸ 3 haftalık ratları, Okuno ve ark.²¹⁵ 4 haftalık ratları, Briaud ve ark.²¹⁶ 6 haftalık ratları kullanarak obezite gelişimini sağlamaya çalışmışlardır. Çalışmalarda kullanılan diyet içeriği de değişkenlik göstermiş olup; kullanılan yağ içerikleri % 20^{199, 214} ila % 58²¹⁶ arasında değişmektedir. Diyet içeriğine bağlı olarak da obezitenin gelişimi için YYD uygulama süresi 7²¹⁷ ila 12^{215, 216} hafta süresi genel olarak yeterli görülmüştür.

Çalışmamız, 3 haftalık Sprauge Dawley cinsi ratlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. YYD'e 8 haftalık ad libitum (serbest) erişim sağlanarak obezite oluşumu sağlanmıştır. Ratların normal yeme ve çevreye alışabilmesi için ilk hafta standart pelet yem ile beslenmesi uygun görülmüştür. Diyetimiz oran olarak % 35'i yağ içeriğine sahip olup bu oranın obezite gelişimini indüklemek için yeterli olduğu literatürle desteklenmiştir.

Deneysel olarak yapılan çalışmalarda histolojik değerlendirme, in vivo olarak kemik remodelinginin sayısal değerlendirmesinde oldukça sık kullanılan güvenilir bir yöntemdir. Günümüzde de sık olarak kullanılan bu yöntem 2019 yılında; Mena ve ark.²¹⁷ tarafından periapikal cerrahi için kullanılan farklı lokal hemostatik ajanların değerlendirmesinde, Cynthia ve ark.²¹⁸ tarafından rat mandibulalarında kritik boyutta kortikal kemik defektinde kemik rejenerasyonunun değerlendirilmesinde, Karayürek ve ark.²¹⁹ trombosit zengin fibrinlerin farklı kemik greft malzemeleri ile birleştirilerek

kemik iyileşmesi üzerine etkileri histolojik olarak değerlendirip sayısal olarak verilendirmişlerdir.

Çalışmamızda, elde edilen histolojik kesitlerin incelenmesi sonucu fibröz doku kalınlığı, osteoblast, ve yeni damar sayısının en az NDK ve ODK gruplarında olduğu görülürken, NDU grubunda artmaya başladığı, ODU grubunda ise en ileri düzeyde olduğu belirlendi ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Gruplar arasında osteoklast aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Literatürde kırık iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda leptinin iyileşme üzerine olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir. Wang ve ark.²²⁰ yaptıkları bir çalışmada leptinin ratlarda femur kırığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir ve çalışmanın sonucunda ekzojen olarak leptin verilen (0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ve 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) gruplarda daha iyi kırık iyileşmesi gözlendiğini belirtmişlerdir. Liu ve ark.²²¹ yaptıkları çalışmada rat femur kırıklarında intraperitoneal olarak uygulanan leptinin (5 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{gün}$) ratlarda 4 hafta sonunda kırık iyileşmesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Iwaniec ve ark.²²² yaptığı çalışmada, leptinin in vitro koşullarda rat kemik iliği kültürlerinde mineralize kemik artışını sağladığını bildirmiştir. Yapılan bu çalışmalarda elde edilen olumlu sonuçlardan yola çıkarak kemik defektlerinde leptinin kemik iyileşmesini hızlandırabileceği düşünülmüştür ve nitekim leptin uygulama gruplarımızda fibröz doku kalınlıklarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu artış istatistiksel olarak da anlamlı görülmüştür ($p<0.05$).

Elefteriou ve ark.²²³, leptinin antiosteojenik ve anoreksijenik dozlarını değerlendirdiği bir çalışmada, her iki etkiyi meydana getirecek dozun benzer olduğu sonucuna varmış, uygulanan bu dozun leptinin in vivo kemik oluşumunun güçlü bir şekilde inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Bu sonuca göre savunulan, leptinin kemik kitlesini

azaltabilecek etki göstermesi durumunu, çalışmadaki leptin dozunun, anoreksijenik etki oluşturacak seviyede olması ve bu seviyedeki bir dozun antiosteojenik etki oluşturması ile açıklayabilmekteyiz.

Leptinin osteoblastik aktivite üzerine etkilerinin değerlendirildiği literatürdeki çalışmalarda; leptinin kemik iliği stromal hücrelerinden adipogenezise farklılaşmayı inhibe ederken, osteoblastlara farklılaşmayı stimule ettiği belirtilmiştir. Fötal farelerde yapılan çalışmalarda leptin uygulamasının kondrosit ve osteoblast farklılaşmasını ve çoğalmasını etkileyerek iskelet gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir^{224, 225}.

Reseland ve ark.¹⁵⁶, leptinin osteoblast farklılaşmasını stimule ederek osteoblast üzerindeki reseptörlerine direkt olarak bağlanmayı arttırdığını ve leptinin ayrıca osteoblast büyümesi ve kemik mineralizasyonu yolu ile intramembranöz ossifikasyon üzerine de olumlu etki edebildiğini bildirmişlerdir.

Özellikle intramembranöz ossifikasyonun başlatılmasında osteoblastların rolü dikkate alınacak olursa, leptinin bu farklılaşmayı arttırarak dolaylı yoldan intramembranöz ossifikasyon üzerine de olumlu etkisinin olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda histolojik kesitlerin incelenmesi sonucu leptin uygulamasının osteoblast aktivitesi üzerine olumlu etkisi olduğu görülmüştür. Kontrol gruplarıyla kıyaslandığında uygulama gruplarında osteoblast sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p < 0.05$).

Leptinin kemik iyileşmesini dolaylı olarak etkileyebilecek bir diğer faktörün ise anjiogenezis olduğu bilinmektedir ve leptinin anjiogenezis üzerine etkili olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır^{8, 182, 226, 227}.

Anjiogenez, yeni kan damarlarının oluşumudur ve oksijen hemostazı, besinlerin sağlanması, artık ürünlerin atılması, hücre ve biyolojik mediatörleri sağlamak için kırık

iyileşmesinde teşvik edilir. Bunun ötesinde anjiogenezis intramembranöz kemik oluşumunda ve endokondral ossifikasyonda önemli rol oynar^{228, 229}. Leptinin angiogeneze etkileri, yeni bir konu olmakla beraber, Liapakis ve ark.²²⁶ yaptıkları çalışmada ratlarda yanık dokusunda eksojen leptin uygulamasının erken doku angiogenezi arttırdığını bulmuşlardır. Tadokoro ark.¹⁸² yaptıkları çalışmada topikal olarak verilen leptinin, yaralanan alan etrafındaki anjiogenezini artırarak ciltte yara iyileşmesini desteklediğini tespit etmiştir.

Benzer şekilde Kume ve ark.'da⁸ yaptıkları çalışma sonucunda leptinin endokondral ossifikasyondaki angiogenezin düzenlenmesinde rolü olduğunu vurgulamışlardır. Bouloumie ve ark.'da²²⁷ yaptıkları çalışma sonucunda leptinin angiogenezin güçlü bir modülatörü olduğunu vurgulamışlardır. Yine başka çalışmalarda leptinin; endotelyal hücre göçünü ve aktivasyonunu in vitro, angiogenezisi de in vivo olarak etkilediği gösterilmiştir^{226, 227}. Sonuç olarak leptin angiogenezde önemli bir rol oynar²³⁰. Angiogenez üzerine bu olumlu etkilerinden yola çıkarak benzer şekilde kırık iyileşmesinde de angiogenezi arttırarak oldukça önemli bir role sahip olacağı ortaya çıkar.

Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak, elde ettiğimiz bulgulara göre leptin uygulamasının yeni oluşan damar sayısında istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirdiği gözlenmiştir ($p < 0.05$). Bu durumun, aynı zamanda uygulama gruplarındaki kemik iyileşmesinin daha iyi bir şekilde gerçekleşmesinde rol oynadığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, hem NDU hem de ODU gruplarda leptin uygulamasının erken dönemde fibröz doku kalınlığını arttırdığı ve en belirgin artışın ise ODU grubunda olduğu histolojik olarak görülmüştür ($p < 0.05$). Obezitede plazma leptin seviyelerinin normal diyet uygulanan ratlara oranla daha fazla olması beklenen bir durumdur. Yağ kütlesinin fazlalılığı ile artmış leptin düzeyleri arasında pozitif korelasyonun

saptanması, obezitenin “leptin direnci” ile oluştuğunu düşündürmektedir. Obezlerde leptinin beyin dokusuna taşınma kapasitesi ve BOS/plazma leptin oranının sağlıklı bireylere göre düşük olduğu saptanmıştır. Leptin direncinde bu mekanizmanın sorumlu olduğu düşünülmektedir. Serum leptin düzeyinin 2.5-3 ng/ml ve üstündeki değerlerinin, eşik değerin üzerinde olduğu ve leptin direncinin gelişmesine yol açtığı belirtilmektedir²³¹. Yolcu²³² yaptığı çalışmada odontojenik enfeksiyonlu bireylerde serum leptin düzeylerinin anlamlı bir şekilde azaldığını ayrıca çalışmaya katılan hastaların BKİ hesaplandığında ise grupların genel olarak normal değerlerde olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada odontojenik enfeksiyonu bulunmayan kişilerde ise serum leptin düzeyinin daha yüksek olduğu ve BKİ’lerinin ise normal sınırlarda olduğu bildirilmiştir. Bu durum serum leptin değerlerini değerlendirirken mevcut sistemik rahatsızlıkların ve enfeksiyonların da göz ardı edilmemesi gerekliliğini de ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, ODU gruplarımızda kemik iyileşmesinin daha ileri düzeyde olması, bize leptinin eksojen olarak uygulanmasını takiben feed-back mekanizmalarının yeniden düzenlenmesi ve leptin reseptör duyarlılığının artması nedeniyle olabileceğini düşündürdü.

6. SONUÇLAR

Kemik iyileşmesi üzerine intraperitoneal olarak uygulanan leptinin ve obezitenin etkilerini araştırmak için yaptığımız deneysel çalışmamızın sonucunda;

1. Leptin uygulamasının erken dönem kemik iyileşmesi üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir.
2. Obezitenin kemik iyileşmesini tek başına etkilemediği ancak obez gruplara leptin uygulamasını takiben iyileşmenin ileri düzeyde gerçekleştiği görülmüştür. Leptin uygulamasını takiben iyileşmenin ileri düzeyde olması; feed back mekanizmasının yeniden düzenlenmesi ve leptin reseptör duyarlılığının artması sonucunda olabileğini bize düşündürmüştür.
3. Erken dönem kemik iyileşmesinde leptinin olumlu sonuçlarının görülmesi geç dönem kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.
4. Daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için leptinin farklı dozlarda ve daha fazla sayıda denekle çalışılması gerekmektedir. Bu ve benzeri çalışmalar, leptinin birçok sisteme olan faydalı etkileri yanı sıra kemik iyileşmesini artırdığını gösteren etkisinin daha çok araştırılması ve bu konuda daha ileri deneysel çalışmalar yapılması için önemli bir basamak olmuştur.

KAYNAKLAR

1. Diniz SF, Amorim FPLGd, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm G, Silva TAd. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2008, 41:373-379.
2. Ogasawara A, Nakajima A, Nakajima F, Goto K-i, Yamazaki M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*, 2008, 43:832-839.
3. Yamasaki M, Hasegawa S, Imai M, Takahashi N, Fukui T. High-fat diet-induced obesity stimulates ketone body utilization in osteoclasts of the mouse bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473:654-661.
4. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 2011, 6:30.
5. Yamanaka JS, Yanagihara GR, Carlos BL, Ramos J, Brancalion BB, Macedo AP, Issa JPM, Shimano AC. A high-fat diet can affect bone healing in growing rats. *Journal of bone and mineral metabolism*, 2018, 36:255-263.
6. Donald V, Donald V, Voet Judith G, Pratt Charlotte W. *Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular Level*. 2nd ed. John Wiley and Sons Inc, USA, 2006:782-783.
7. Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regulatory peptides*, 2000, 92:73-78.
8. Kume K, Satomura K, Nishisho S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S, Nagayama M. Potential role of leptin in endochondral ossification. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2002, 50:159-169.

9. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015, 2015:1-17.
10. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional course lectures*, 1996, 45:371.
11. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Physical therapy*, 2006, 86:77-91.
12. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2008, 3:131-139.
13. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental*, 2009, 25:629-648.
14. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *The American Journal of Pathology*, 2007, 170:427-435.
15. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2011, 26:229-238.
16. Everts V, Delaisse J, Korper W, Jansen D, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2002, 17:77-90.
17. Donahue HJ, McLeod K, Rubin C, Andersen J, Grine E, Hertzberg E, Brink P. Cell-to-cell communication in osteoblastic networks: Cell line-dependent hormonal regulation of gap junction function. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1995, 10:881-889.

18. Sims NA, Gooi JH In *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*, Seminars In Cell & Developmental Biology, 2008; 444-451.
19. Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 473:201-209.
20. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, 16:1575-1582.
21. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE, Dagnaes-Hansen F, Plesner TL, Hauge EM, Plesner T, Delaisse J-M. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *The American Journal of Pathology*, 2009, 174:239-247.
22. LV Avioli and SM Krane. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. 3rd ed., California, Academic Press, 1997;2-16
23. Phan T, Xu J, Zheng M. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and Histopathology*, 2004, 19:1325-1344.
24. Crockett J, Mellis D, Scott D, Helfrich M. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis International*, 2011, 22:1-20.
25. Premkumar S. *Textbook of craniofacial growth*. 1st ed., New Delhi, JP Medical Ltd, 2011:1-24.

26. Boskey A, Spevak L, Paschalis E, Doty S, McKee M. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcified Tissue International*, 2002, 71:145-154.
27. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 561:3-12.
28. Christoffersen J, Landis W. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *The Anatomical Record*, 1991, 230:435-450.
29. Datta H, Ng W, Walker J, Tuck S, Varanasi S. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 2008, 61:577-587.
30. Green J, Schotland S, Stauber DJ, Kleeman CR, Clemens TL. Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 1995, 268:1090-1103.
31. Marks Jr SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy*, 1988, 183:1-44.
32. Wennberg C, Hessle L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, Millán JL. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000, 15: 1879-1888.
33. Nakasaki M, Yoshioka K, Miyamoto Y, Sasaki T, Yoshikawa H, Itoh K. IGF-I secreted by osteoblasts acts as a potent chemotactic factor for osteoblasts. *Bone*, 2008, 43:869-879.

34. Aubin JE, Turksen K, Heersche JN. Osteoblastic cell lineage. *Cellular and molecular biology of bone*, 1st ed., California, Academic Press, 1993:1-45.
35. Miller SC, Bowman B, Jee W. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microscopy*, 1989, 3: 953-960.
36. Aarden EM, Nijweide PJ, Burger EH. Function of osteocytes in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1994, 55:287-299.
37. Rochefort G, Pallu S, Benhamou C-L. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporosis International*, 2010, 21:1457-1469.
38. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 2006, 235:176-190.
39. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocrine Reviews*, 2013, 34:658-690.
40. Palumbo C, Palazzini S, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte differentiation in the tibia of newborn rabbit: an ultrastructural study of the formation of cytoplasmic processes. *Cells Tissues Organs*, 1990, 137:350-358.
41. Mosley JR. Osteoporosis and bone functional adaptation: mechanobiological regulation of bone architecture in growing and adult bone, a review. *Journal of Rehabilitation Research and Development*, 2000, 37:189.
42. Mullender M, Van Der Meer D, Huiskes R, Lips C. Osteocyte density changes in aging and osteoporosis. *Bone*, 1996, 18(2):109-113.
43. Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1116:281-290.
44. Noble B, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone*, 1997, 20:273-282.

45. Aguirre JI, Plotkin LI, Stewart SA, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2006, 21:605-615.
46. Plotkin LI. Apoptotic osteocytes and the control of targeted bone resorption. *Current Osteoporosis Reports*, 2014, 12:121-126.
47. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcified Tissue International*, 2014, 94:25-34.
48. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1999, 79:83-94.
49. Kornak U, Kasper D, Bösl MR, Kaiser E, Schweizer M, Schulz A, Friedrich W, Delling G, Jentsch TJ. Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, 2001, 104:205-215.
50. Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter ClC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature*, 2008, 453: 788.
51. Mulari M, Vääräniemi J, Väänänen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microscopy Research and Technique*, 2003, 61:496-503.
52. Yamaza T, Goto T, Kamiya T, Kobayashi Y, Sakai H, Tanaka T. Study of immunoelectron microscopic localization of cathepsin K in osteoclasts and other bone cells in the mouse femur. *Bone*, 1998, 23:499-509.
53. Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgard M, Dodds R, Hultenby K, Ek-Rylander B, Andersson G. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant

- acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(31):28370-28381.
54. Faloni APdS, Sasso-Cerri E, Rocha FRG, Katchburian E, Cerri PS. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *Journal of Anatomy*, 2012, 220:77-85.
 55. Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009, 41:446-450.
 56. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review Biomedecial Engineering*, 2006, 8:455-498.
 57. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 2000, 21:115-137.
 58. Negishi-Koga T, Takayanagi H. Bone cell communication factors and Semaphorins. *BoneKey Reports*, 2012, 1:183.
 59. Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2012, 23:576-581.
 60. Calvi L, Sims N, Hunzelman J, Knight M, Giovannetti A, Saxton J, Kronenberg H, Baron R, Schipani E. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone–related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *The Journal of Clinical Investigation*, 2001, 107:277-286.
 61. Miao D, Scutt A. Recruitment, augmentation and apoptosis of rat osteoclasts in 1, 25-(OH) 2 D 3 response to short-term treatment with 1, 25-dihydroxyvitamin D 3 in vivo. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 2002, 3:16.

62. Zaidi M, Inzerillo A, Moonga B, Bevis P, Huang C-H. Forty years of calcitonin—where are we now? A tribute to the work of Iain Macintyre, FRS. *Bone*, 2002, 30:655-663.
63. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocrine Reviews*, 2004, 25:389-425.
64. Tomkinson A, Reeve J, Shaw R, Noble B. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1997, 82:3128-3135.
65. Kousteni S, Chen J-R, Bellido T, Han L, Ali AA, O'Brien CA, Plotkin L, Fu Q, Mancino A, Wen Y. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science*, 2002, 298:843-846.
66. Emerton K, Hu B, Woo A, Sinofsky A, Hernandez C, Majeska R, Jepsen K, Schaffler M. Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice. *Bone*, 2010, 46:577-583.
67. Faloni A, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *Journal of Periodontal Research*, 2007, 42:193-201.
68. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nature Medicine*, 1996, 2:1132-1136.
69. Eleftheriou F. Regulation of bone remodeling by the central and peripheral nervous system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 473:231-236.
70. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, Bonewald LF, Kodama T, Wutz A, Wagner EF. Evidence for osteocyte regulation

- of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature Medicine*, 2011, 17:1231-1234.
71. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature Medicine*, 2011, 17:1235-1241.
72. Kleinnulend J, Semeins C, Ajubi N, Nijweide P, Burger E. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts-correlation with prostaglandin upregulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1995, 217:640-648.
73. Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E, Jiang JX. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16:3100-3106.
74. Genetos DC, Kephart CJ, Zhang Y, Yellowley CE, Donahue HJ. Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 212:207-214.
75. Lu XL, Huo B, Park M, Guo XE. Calcium response in osteocytic networks under steady and oscillatory fluid flow. *Bone*, 2012, 51:466-473.
76. Robling AG, Bellido T, Turner C. Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2006, 6:354.
77. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283:5866-5875.

78. Gaudio A, Pennisi P, Bratengeier C, Torrisi V, Lindner B, Mangiafico RA, Pulvirenti I, Hawa G, Tringali G, Fiore CE. Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95:2248-2253.
79. Moriishi T, Fukuyama R, Ito M, Miyazaki T, Maeno T, Kawai Y, Komori H, Komori T. Osteocyte network; a negative regulatory system for bone mass augmented by the induction of Rankl in osteoblasts and Sost in osteocytes at unloading. *PLoS One*, 2012, 7:40143.
80. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone*, 2008, 42:606-615.
81. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurgical Focus*, 2001, 10:1-4.
82. David Wray DS, David Lee and AJ Clark. *Textbook of General and Oral Surgery*. 1st ed., China, Churchill Livingstone, 2003: 62-63.
83. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, 355:7-S21.
84. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003, 88:873-884.
85. Le A, Miclau T, Hu D, Helms J. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *Journal of Orthopaedic Research*, 2001, 19:78-84.
86. Guyton AC, Hall J. E. . *Tibbi Fizyoloji*. 11. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2007:850.

87. Organization WH. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation presented at the World Health Organization, June 3–5, 1997, Geneva, Switzerland.
88. James WPT, Jackson-Leach R, Mhurchu CN, Kalamara E, Shayeghi M, Rigby NJ, Nishida C, Rodgers A. Overweight and obesity (high body mass index). *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors, Genova, WHO, 2004:Chapter 8*
89. Pozza C, Isidori AM. What's Behind the Obesity Epidemic. *Imaging in Bariatric Surgery*, SpringerLink, 2018:1-8.
90. De Lorenzo A, Soldati L, Sarlo F, Calvani M, Di Lorenzo N, Di Renzo L. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22:681.
91. Kopelman PG. 4 Hormones and obesity. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1994, 8:549-575.
92. Van der Kooy K, Seidell JC. Techniques for the measurement of visceral fat: a practical guide. *International Journal of Obesity*, 1993, 17:187-187.
93. Kaila B, Raman M. Obesity: a review of pathogenesis and management strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 22:61-68.
94. Hübscher SG. Role of liver biopsy in the assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2004, 16:1107-1115.
95. Bray GA. *The Zucker-fatty rat: a review*, Federation Proceedings, 1977;148-153.

96. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiological Reviews*, 1979, 59:719-809.
97. Figlewicz D, Ikeda H, Hunt T, Stein L, Dorsa D, Woods S, Porte Jr D. Brain insulin binding is decreased in Wistar Kyoto rats carrying the 'fa' gene. *Peptides*, 1986, 7:61-65.
98. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Natori T. OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1994, 24:317-320.
99. Zucker LM, Zucker TF. Fatty, a new mutation in the rat. *Journal of Heredity*, 1961, 52:275-278.
100. Ogawa Y, Masuzaki H, Isse N, Okazaki T, Mori K, Shigemoto M, Satoh N, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y. Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96:1647-1652.
101. Ikeda H, Shino A, Matsuo T, Iwatsuka H, Suzuoki Z. A new genetically obese-hyperglycemic rat (Wistar fatty). *Diabetes*, 1981, 30:1045-1050.
102. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M, Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications: Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 1992, 41:1422-1428.
103. Moran TH, Bi S. Hyperphagia and obesity in OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2006, 361:1211-1218.
104. Moran TH. Unraveling the obesity of OLETF rats. *Physiology & Behavior*, 2008, 94:71-78.

105. Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, Moran TH. A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 281:254-260.
106. Rothwell NJ, Stock MJ. The development of obesity in animals: the role of dietary factors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1984, 13:437-449.
107. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 2007, 15:798-808.
108. Warwick ZS, Schiffman SS. Role of dietary fat in calorie intake and weight gain. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1992, 16:585-596.
109. Boozer CN, Schoenbach G, Atkinson RL. Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 1995, 268:546-550.
110. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, Van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity Research*, 2002, 10:956-963.
111. Bourgeois F, Alexiu A, Lemonnier D. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *British Journal of Nutrition*, 1983, 49:17-26.
112. Takahashi M, Ikemoto S, Ezaki O. Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1999, 45:583-593.
113. Ingle DJ. A simple means of producing obesity in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1949, 72:604-605.

114. Fenton PF, Dowling MT. Studies on Obesity: I. Nutritional Obesity in Mice: Three Figures. *The Journal of Nutrition*, 1953, 49:319-331.
115. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology & Behavior*, 1976, 17:461-471.
116. Rothwell N, Stock M. Combined effects of cafeteria and tube-feeding on energy balance in the rat. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 1979, 38:5.
117. Rogers PJ, Blundell JE. Meal patterns and food selection during the development of obesity in rats fed a cafeteria diet. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1984, 8: 441-453.
118. Pérez C, Fanizza L, Sclafani A. Flavor preferences conditioned by intragastric nutrient infusions in rats fed chow or a cafeteria diet. *Appetite*, 1999, 32:155-170.
119. Faust IM, Johnson PR, Hirsch J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in the rat. *The Journal of Nutrition*, 1980, 110:2027-2034.
120. Schmidt I, Fritz A, Schölch C, Schneider D, Simon E, Plagemann A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *International Journal of Obesity*, 2001, 25:1168.
121. Morris MJ, Velkoska E, Cole TJ. Central and peripheral contributions to obesity-associated hypertension: impact of early overnourishment. *Experimental Physiology*, 2005, 90:697-702.
122. West DB, Diaz J, Woods SC. Infant gastrostomy and chronic formula infusion as a technique to overfeed and accelerate weight gain of neonatal rats. *The Journal of Nutrition*, 1982, 112:1339-1343.

123. Levin BE, Govek E. Gestational obesity accentuates obesity in obesity-prone progeny. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1998, 275:1374-1379.
124. Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*, 2009,58:1116-1125.
125. Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, Smith MS, Coleman K, Grove KL. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. *Journal of Neuroscience*, 2010, 30:3826-3830.
126. Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology*, 2011, 93:1-8.
127. Penicaud L, Larue-Achagiotis C, Le Magnen J. Endocrine basis for weight gain after fasting or VMH lesion in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 1983, 245:246-252.
128. King BM. Ventromedial hypothalamic obesity: a reexamination of the irritative hypothesis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 1991, 15:341-347.
129. King BM. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiology & Behavior*, 2006, 87:221-244.
130. Sims JS, Lorden JF. Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behavioural Brain Research*, 1986, 22:265-281.

131. Tokunaga K, Matsuzawa Y, Fujioka S, Kobatake T, Keno Y, Odaka H, Matsuo T, Tarui S. PVN-lesioned obese rats maintain ambulatory activity and its circadian rhythm. *Brain Research Bulletin*, 1991, 26:393-396.
132. Nemeroff CB, Lipton MA, Kizer JS. Models of neuroendocrine regulation: use of monosodium glutamate as an investigational tool. *Developmental neuroscience*, 1978, 1:102-109.
133. Bergen HT, Mizuno TM, Taylor J, Mobbs CV. Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. *Endocrinology*, 1998, 139:4483-4488.
134. Young JK. Hypothalamic lesions increase neuronal immunoreactivity for neuropeptide Y. *Brain Research Bulletin*, 1992, 29:375-380.
135. Young JK, McKenzie JC, Brady LS, Herkenham M. Hypothalamic lesions increase levels of neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus of mice. *Neuroscience Letters*, 1994, 165:13-17.
136. Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, 2002, 42:461-471.
137. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2006, 361:1251-1263.
138. Asarian L, Geary N. Estradiol enhances cholecystokinin-dependent lipid-induced satiation and activates estrogen receptor- α -expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. *Endocrinology*, 2007, 148:5656-5666.

139. Thammacharoen S, Lutz TA, Geary N, Asarian L. Hindbrain administration of estradiol inhibits feeding and activates estrogen receptor- α -expressing cells in the nucleus tractus solitarius of ovariectomized rats. *Endocrinology*, 2007, 149:1609-1617.
140. Hamann A, Flier JS, Lowell BB. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology*, 1996, 137:21-29.
141. Klaus S, Münzberg H, Trüloff C, Heldmaier G. Physiology of transgenic mice with brown fat ablation: obesity is due to lowered body temperature. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1998, 274:287-293.
142. Imagawa K, Numata Y, Katsuura G, Sakaguchi I, Morita A, Kikuoka S, Matumoto Y, Tsuji T, Tamaki M, Sasakura K. Structure-function studies of human leptin. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273:35245-35249.
143. Gong D-W, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271:3971-3974.
144. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annual Review of Physiology*, 2000, 62:413-437.
145. Jensen MD, Møller N, Sreekumaran Nair K, Eisenberg P, Landt M, Klein S. Regional leptin kinetics in humans—. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999, 69:18-21.
146. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel hormon: leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004, 30:113-118.
147. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 1998, 395:763.

148. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Annals of Internal Medicine*, 1999, 130:671-680.
149. Oswal A, Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity*, 2010, 18:221-229.
150. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 1994, 372:425.
151. Özata M. İnsan Obezitesinin Genetiği ve Türk Obezlerde Saptanılan Genetik Defektler. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2003, 7:5-11.
152. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutrition Reviews*, 2002, 60: 1-14.
153. Lieben L, Callewaert F, Bouillon R. Bone and metabolism: a complex crosstalk. *Hormone Research in Paediatrics*, 2009, 71: 134-138.
154. Fu L, Patel MS, Bradley A, Wagner EF, Karsenty G. The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell*, 2005, 122:803-815.
155. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 2002, 111:305-317.
156. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner , Gordeladze JO, Drevon CA. Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2001, 16:1426-1433.
157. Fislser JS, Warden CH, Pace MJ, Lusk AJ. BSB: a new mouse model of multigenic obesity. *Obesity research*, 1993, 1:271-280.

158. An YH, Freidman RJ. *Animal models in orthopaedic research*. 1st ed., London, CRC press, 1998:92.
159. Geiger M, Li R, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, 55:1613-1629.
160. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2008, 85:206-217.
161. Kim MG, Shin DM, Lee SW. The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2010, 63:459-466.
162. Histing T, Garcia P, Holstein J, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke M, Wehner T, Bindl R. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, 2011, 49:591-599.
163. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified β -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials*, 2005, 26:5600-5608.
164. Hutchens SA, Campion C, Assad M, Chagnon M, Hing KA. Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2016, 27:20.
165. Develioglu H, Saraydin SU, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental Materials Journal*, 2009, 28:396-400.

166. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2010, 125:1685.
167. Cutting C, McCarthy J, Berenstein A. Blood supply of the upper craniofacial skeleton: the search for composite calvarial bone flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 1984, 74:603-610.
168. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1986:299-308.
169. Donos N, Graziani F, Mardas N, Kostopoulos L. The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical-size calvarial defects. *Clinical Oral Implants Research*, 2011, 22:1346-1353.
170. Kruse A, Jung R, Nicholls F, Zwahlen R, Hämmerle C, Weber F. Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material. *Clinical Oral Implants Research*, 2011, 22:506-511.
171. Özeç İ, Kılıç E, Gümüş C, Göze F. Lokal olarak üç farklı dozda simvastatin uygulamasının kemik defekti iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2007, 10:82-86.
172. Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound repair and regeneration*, 2004, 12: 252-259.

173. Pryor ME, Susin C, Wikesjö UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *Journal of Clinical Periodontology*, 2006, 33:455-460.
174. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Engineering*, 2007, 13:619-627.
175. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clinical Oral Implants Research*, 2014, 25:879-893.
176. Cacciafesta V, Dalstra M, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *The European Journal of Orthodontics*, 2001, 23:733-740.
177. Nagata MJ, Messoria M, Pola N, Campos N, Vieira R, Esper LA, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A. Influence of the ratio of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: A histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010, 28:468-473.
178. U.J. Moore. Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 5th. ed., UK, Blackwell Science, 2001:170-195.
179. Philbrick KA, Wong CP, Branscum AJ, Turner RT, Iwaniec UT. Leptin stimulates bone formation in ob/ob mice at doses having minimal impact on energy metabolism. *Journal of Endocrinology*, 2017: JOE-16-0484.

180. Dinçer S, Gülen Ş. Wound tissue malondialdehyde and glutathione levels in leptin treated healthy and diabetic rats. *Erciyes Medical Journal*, 2010, 32:161-166.
181. Almabhouh FA, Osman K, Ibrahim SF, Gupalo S, Gnanou J, Ibrahim E, Singh HJ. Melatonin ameliorates the adverse effects of leptin on sperm. *Asian Journal of Andrology*, 2017, 19:647.
182. Tadokoro S, Ide S, Tokuyama R, Umeki H, Tatehara S, Kataoka S, Satomura K. Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS One*, 2015, 10:121242.
183. Bateman J, Safadi F, Susin C, Wikesjö U. Exploratory study on the effect of osteoactivin on bone formation in the rat critical-size calvarial defect model. *Journal of Periodontal Research*, 2012, 47:243-247.
184. Gullicksen P, Hausman D, Dean R, Hartzell D, Baile C. Adipose tissue cellularity and apoptosis after intracerebroventricular injections of leptin and 21 days of recovery in rats. *International Journal of Obesity*, 2003, 27:302.
185. Qian H, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA. Increased leptin resistance as rats grow to maturity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1998, 219:160-165.
186. Calciolari E, Mardas N, Dereka X, Anagnostopoulos A, Tsangaris G, Donos N. Protein expression during early stages of bone regeneration under hydrophobic and hydrophilic titanium domes. A pilot study. *Journal of Periodontal Research*, 2018, 53:174-187.
187. Woo D, Lee B, Lim D, Kim H. Relationship between nutrition factors and osteopenia: Effects of experimental diets on immature bone quality. *Journal of Biomechanics*, 2009, 42:1102-1107.

188. Corwin R. Effects of dietary fats on bone health in advanced age. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 2003, 68:379-386.
189. Gao F, Lv T-R, Zhou J-C, Qin X-D. Effects of obesity on the healing of bone fracture in mice. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 2018, 13:145.
190. Makovey J, Chen JS, Hayward C, Williams FM, Sambrook PN. Association between serum cholesterol and bone mineral density. *Bone*, 2009, 44:208-213.
191. Kim K-C, Shin D-H, Lee S-Y, Im J-A, Lee D-C. Relation between obesity and bone mineral density and vertebral fractures in Korean postmenopausal women. *Yonsei Medical Journal*, 2010, 51:857-863.
192. Kim Y-H, Nam G-E, Cho K-H, Choi YS, Kim S-M, Han B-D, Do Han K, Lee K-S, Park C-H, Kim D-H. Low bone mineral density is associated with dyslipidemia in South Korean men: the 2008–2010 Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *Endocrine Journal*, 2013, 60:1179-1189.
193. Jeong T-D, Lee W, Choi S-E, Kim JS, Kim H-K, Bae SJ, Chun S, Min W-K. Relationship between serum total cholesterol level and serum biochemical bone turnover markers in healthy pre-and postmenopausal women. *BioMed Research International*, 2014, 2014:1-7.
194. Histing T, Andonyan A, Klein M, Scheuer C, Stenger D, Holstein J, Veith N, Pohlemann T, Menger M. Obesity does not affect the healing of femur fractures in mice. *Injury*, 2016, 47:1435-1444.
195. Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats–. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 71:438-442.
196. Chang S, Graham B, Yakubu F, Lin D, Peters J, Hill J. Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats. *American Journal of*

- Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 1990, 259:1103-1110.
197. Harrold JA, Williams G, Widdowson PS. Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Journal of Neurochemistry*, 2000, 74:1224-1228.
198. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133:1081-1087.
199. Yaqoob P, Sherrington EJ, Jeffery NM, Sanderson P, Harvey DJ, Newsholme EA, Calder PC. Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1995, 27:297-310.
200. Sclafani A, Gorman AN. Effects of age, sex, and prior body weight on the development of dietary obesity in adult rats. *Physiology & Behavior*, 1977, 18:1021-1026.
201. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2002, 283:941-948.
202. Silva APS, Guimarães DE, Mizurini DM, Maia IC, Ortiz-Costa S, Sardinha FL, do Carmo MGT. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids*, 2006, 41:535-541.
203. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*, 2010, 23:270-299.

204. Ellis J, Lake A, Hoover-Plow J. Monounsaturated canola oil reduces fat deposition in growing female rats fed a high or low fat diet. *Nutrition Research*, 2002, 22:609-621.
205. Ichihara S, Yamada Y. Genetic factors for human obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65:1086-1098.
206. Schemmel R, Mickelsen O, Tolgay Z. Dietary obesity in rats: influence of diet, weight, age, and sex on body composition. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1969, 216:373-379.
207. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2002, 282:46-54.
208. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA. Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2004, 190:858-865.
209. Altunkaynak Z. Effects of high fat diet induced obesity on female rat livers (a histochemical study). *European Journal General Practise*, 2005, 2(3):100-109.
210. Mayes J, Watson G. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews*, 2004, 5:197-216.
211. Wade GN. Obesity without overeating in golden hamsters. *Physiology & Behavior*, 1982, 29:701-707.
212. Rodríguez AM, Quevedo-Coli S, Roca P, Palou A. Sex-dependent dietary obesity, induction of UCPs, and leptin expression in rat adipose tissues. *Obesity Research*, 2001, 9:579-588.

213. Varma M, Chai J-K, Meguid MM, Laviano A, Gleason JR, Yang Z-J, Blaha V. Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. *Physiology & Behavior*, 1999, 68:99-107.
214. Takeuchi H, Matsuo T, Tokuyama K, Shimomura Y, Suzuki M. Diet-induced thermogenesis is lower in rats fed a lard diet than in those fed a high oleic acid safflower oil diet, a safflower oil diet or a linseed oil diet. *The Journal of Nutrition*, 1995, 125:920-925.
215. Okuno M, Kajiwara K, Imai S, Kobayashi T, Honma N, Maki T, Suruga K, Goda T, Takase S, Muto Y. Perilla oil prevents the excessive growth of visceral adipose tissue in rats by down-regulating adipocyte differentiation. *The Journal of Nutrition*, 1997, 127:1752-1757.
216. Briaud I, Kelpe CL, Johnson LM, Tran POT, Poitout V. Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats. *Diabetes*, 2002, 51:662-668.
217. Mena-Álvarez J, Quispe-López N, Zubizarreta-Macho Á, Rico-Romano C, Rodero-Villanueva R, Fernández-Aceñero MJ. Histological analysis of different local haemostatic agents used for periapical surgery: An experimental study with Sprague-Dawley rats. *Australian Endodontic Journal*, 2019:1-8.
218. Trejo-Iriarte CG, Serrano-Bello J, Gutiérrez-Escalona R, Mercado-Marques C, García-Honduvilla N, Buján-Varela J, Medina LA. Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis. *Archives of Oral Biology*, 2019, 101:165-171.
219. Karayürek F, Kadiroğlu ET, Nergis Y, Akçay NC, Tunik S, Kanay BE, Uysal E. Combining Platelet Rich Fibrin With Different Bone Graft Materials: An Experimental Study On The Histopathological And Immunohistochemical

- Aspects Of Bone Healing. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2019, 47(5):815-825.
220. Wang L, Sun S, Yang L, Lu C, Cao X. Effects of leptin on femoral fracture in rats. *Journal of Biomedical Research*, 2018, 32: 130.
221. Liu P, Cai M. Leptin influences healing in the sprague dawley rat fracture model. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2017, 23:258.
222. Iwaniec U, Shearon C, Heaney R, Cullen D, Yee J. Leptin increases number of mineralized bone nodules in vitro. *Journal Bone Mineral Research*, 1998, 13:2-12.
223. Elefteriou F, Takeda S, Ebihara K, Magre J, Patano N, Kim CA, Ogawa Y, Liu X, Ware S, Craig W. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101:3258-3263.
224. Bertoni L, Ferretti M, Cavani F, Zavatti M, Resca E, Benelli A, Palumbo C. Leptin increases growth of primary ossification centers in fetal mice. *Journal of Anatomy*, 2009, 215:577-583.
225. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, 1999, 140:1630-1638.
226. Liapakis I, Anagnostoulis S, Karayiannakis A, Korkolis D, Lambropoulou M, Matarasso A, Simopoulos C. Burn wound angiogenesis is increased by exogenously administered recombinant leptin in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2008, 23:118-124.
227. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circulation Research*, 1998, 83:1059-1066.

228. Lienau J, Schmidt-Bleek K, Peters A, Haschke F, Duda GN, Perka C, Bail HJ, Schütze N, Jakob F, Schell H. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, 27:1133-1140.
229. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1998, 355:82-89.
230. Huang L, Cai L. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Research*, 2000, 10:81.
231. Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang P-L, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *The Lancet*, 1996, 348:159-161.
232. Yolcu Ü. Odontojenik enfeksiyonlu hastalarda periferik kan lenfosit fenotipleri ve leptin seviyelerinin analizi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. Doktora tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Berkay AŞKIN Doğum Tarihi: 13/08/1987 Doğum Yeri: Merkez/Çanakkale Medeni Hali: Evli Uyruğu: T.C. Adres: Tel: Faks: E-mail: dt_berkayas@hotmail.com
Eğitim
Lise: Çanakkale Milli Piyango Anadolu Lisesi (2001-2005) Lisans: Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2005-2012) Uzmanlık Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi AD (2015-2019)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: (orta)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAYI



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

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800107242

02.04.2018

Konu : HADYEK Kararı.

DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 19.03.2018 tarihli ve 25330273-929-E.1800092050 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 30.03.2018 tarih ve 4 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 62 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ : 30.03.2018

TOPLANTI SAYISI : 4

KARAR NO 62: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı, Klinik Diş Hekimliği Bölümü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU'unun yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde İyileşme Üzerine Obezite ve Leptinin Etkisi" isimli araştırma çalışması ile ilgili Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığının 19.03.2018 tarih ve 25330273-929-E.1800092050 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağı: <http://www.atauni.edu.tr/birim-veteriner-fakultesi>

İlgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vorfak@atauni.edu.tr

Kep Adresi: atasni@b01.kep.tr

