



**RATLARDA OLUŞTURULAN FEMUR KIRIĞI
MODELİNDE BİR KALSİYUM KANAL BLOKERİ
OLAN AZELNİDİPİN'İN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Hilal KAYA

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK

Doktora Tezi-2023

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

**RATLARDA OLUŞTURULAN FEMUR KIRIĞI
MODELİNDE BİR KALSİYUM KANAL BLOKERİ OLAN
AZELNİDİPİN'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hilal KAYA

**Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK**

**ERZURUM
2023**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Dokusu ve Histolojisi.....	4
2.2. Kemiğin Hücresel Bileşenleri	5
2.2.1.Osteoprogenitör Hücre.....	5
2.2.2. Osteoblastlar	5
2.2.3. Osteositler	7
2.2.4. Osteoklastlar	8
2.3. Kemik Matriksi	9
2.4. Periosteum ve Endosteum.....	11
2.5. Kemik Dokunun Beslenmesi	12
2.5.1. Besleyici Arter Sistemi	12
2.5.2. Metafizo-epifiziel sistem	13
2.5.3. Periosteal sistem	13
2.6. Kemik Oluşum Tipleri	14
2.6.1. Enkondral Kemikleşme.....	14
2.6.2. İntramembranöz kemikleşme.....	15

2.7. Kırık İyileşmesi.....	16
2.7.1. Yangı (İnflamasyon) Evresi.....	19
2.7.2. Onarım (Reperasyon) Evresi	21
2.7.3. Yeniden Şekillenme (Remodelling) Evresi	22
2.8. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	23
2.8.1. Lokal Faktörler	25
2.8.2. Sistemik Faktörler.....	28
2.9. Kırık İyileşmesinin Düzenlenmesi.....	32
2.10. Ca Kanal Blokerleri	34
2.10.1. Ca kanal Blokerlerinin Sınıflandırılması	36
2.11. Azelnidipin.....	38
2.11.1. Azelnidipin'in Farmakokinetiği.....	38
2.11.2. Azelnidipin'in Endikasyonları ve Yan Etkileri	39
2.12. Osteopontin (OPN)	40
2.13. Osteokalsin (OCN)	43
2.14. Sitokinler.....	44
2.14.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)	46
2.14.2. İnterlökin 1 (IL-1).....	49
2.14.3. İnterlökin- 17	50
2.15. Serbest Radikaller	53
2.15.1. Serbest Radikallerin Oluşum Kaynakları	55
2.15.2. Serbest Radikallerin Etkileri	55
2.16. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	57
2.16.1. Eksojen Antioksidanlar.....	58
2.16.2. Endojen Antioksidanlar	58

2.17. Total Antioksidan Kapasite (TAS), Total Oksidan Kapasite (TOS) Ve Oksidatif Stres İndeksi (Osi)	61
2.17.1 Total Oksidan Kapasite.....	63
2.17.2. Total Antioksidan Kapasite	64
3. MATERYAL VE METOT.....	66
3.1. Materyal.....	66
3.1.1. Deney Hayvanları	66
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	66
3.2. Metot.....	67
3.2.1. Deney Planı.....	67
3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar	69
3.2.2.1. Serumda Yapılan Analizler.....	69
3.2.3. Radyolojik Çalışmalar	75
3.2.4. İstatistiksel Analiz.....	76
4. BULGULAR.....	77
5. TARTIŞMA.....	88
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
KAYNAKLAR	109
EKLER	150
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	150
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	151
EK-3. ETİK KURULU ONAY BELGESİ.....	152

TEŞEKKÜR

Doktora süresince ve tez çalışmamda, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, fikirleriyle her zaman yol gösteren, çalışmalarımda katkı ve desteklerini esirgemeyen, mesleğimin inceliklerini öğrenmemde emeği geçen, tez danışmanım Prof. Dr. Abdulmecit ALBAYRAK’a, doktora süresince, bilgi ve deneyimlerinden istifade ettiğim çok değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Elif ÇADIRCI hocama, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı’ndaki çalışmalarımda yol gösterici olan Prof. Dr. Zekai HALICI, Prof. Dr. Yasin BAYIR hocalarıma, bölüm personeliyle birlikte, sevgili asistan arkadaşlarıma; birlikte paylaştığımız sıcak çalışma ortamı ve dostlukları için de teşekkür ederken, sabırları ve fedakârlıkları için şükranlarımı iletirim.

Tez çalışmama olan katkılarından dolayı Prof. Dr. Ali AYDIN hocama emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Yapmış olduğumuz bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2021-9366 numaralı proje ile desteklenmiş olup çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu zorlu süreçte hep yanımda olup desteklerini hiç esirgemeyen kıymetli eşim Abdullah Şahin Kaya ‘ya, kızlarım Nil Ada, Ela Asya ve Gökçe Naz’a sabırları ve fedakarlıkları için çok teşekkür ederim.

ÖZET

Ratlarda Oluşturulan Femur Kırığı Modelinde Bir Kalsiyum Kanal Blokeri Olan Azelnidipin'in Etkilerinin Araştırılması

Amaç. Ağrı indüklemesi, komplikasyonları gibi hayat kalitesini düşürmesinden dolayı kırıklar çok önemli bir sağlık problemidir. L-tipi kalsiyum kanalı yoluyla sinyal osteoblast fonksiyonları için önemlidir. Azelnidipine, Dihidropiridin (DHP) türevi L ve T tipi kalsiyum kanal blokeridir. Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden türetilir, kemik oluşumunda önemli bir rol oynar ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları içerir. L-tipi kalsiyum kanalı yoluyla sinyal osteoblast fonksiyonları için önemlidir. Bununla birlikte, dihidropiridin bileşiklerinin kemik metabolizması üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Tüm bu bilgilere dayanarak, çalışmamızın amacı, azelnidipin'in (bir L ve N tipi kalsiyum kanal bloker) kemik kırığı patofizyolojisi üzerindeki etkilerini radyolojik ve biokimyasal yöntemlerle incelemektir.

Materyal ve Metot. Çalışmamızda 5 gruptan oluşan 40 adet dişi rat kullanıldı. Sıçanlar beş gruba ayrıldı (n=8): Sağlıklı grup, femoral kırık kontrol grubu, femoral kırık + 4 mg / kg grubunda azelnidipin, 8 mg / kg grupta femoral kırık + azelnidipin ve 16 mg /kg femoral kırık + azelnidipin. Cerrahi prosedür öncesi tüm sıçanlara intraperitoneal (İ.P.) ketamin/xylasin (50 mg/kg, 5 mg/kg) ve idame olarak sevofluran uygulama suretiyle anestezi uygulandı.

Bulgular. Yapılan ölçümlerde serum Tümör Nekrozis Faktör- α (TNF- α) , interlökin 1 Beta (IL-1 β) , interlökin 17 (IL-17) , osteocalcin (OC) , OPN (OP), total oksidan kapasite(TOS) seviyeleri kırık grubunda artarken, azelnidipin verilen gruplarda bu parametreler düzelme eğilimine girdi. Kırık grubunda, serumda ölçülen total antioksidan kapasite (TAS) miktarı azalma gösterirken, azelnidipin bu parametreleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düzeltti. Serum kalsiyum(Ca), fosfor(P) düzeylerinde anlamlı bir farklılık meydana gelmemiştir. Kemige spesifik alkalen fosfataz (BSALP)anlamlı farklılık meydana gelmemiştir. Radyolojik bulgularda azelnidipin kırık iyileşmesine olumlu katkıda bulunmuştur.

Sonuç. Tüm bu sonuçlar Ca kanal blokeri olan azelnidipin'in femur kırık modelinde iyileştirici etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Azelnidipin, femur, kırık, rat

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Azelnidipine, a Calcium Channel Blocker, in a Femur Fracture Model in Rats

Aim: Fractures are a very important health problem because they reduce the quality of life such as pain induction and complications. Signaling through the L-type calcium channel is important for osteoblast functions. Azelnidipine is a Dihydropyridine (DHP) derivative L and T type calcium channel blocker. Osteoblasts are derived from mesenchymal stem cells, play an important role in bone formation and contain voltage-gated calcium channels. Signaling through the L-type calcium channel is important for osteoblast functions. However, little is known about the effects of dihydropyridine compounds on bone metabolism. Based on all this information, the aim of our study is to examine the effects of azelnidipine (an L and N type calcium channel blocker) on the pathophysiology of bone fracture by radiological and biochemical methods.

Material and Method: In our study, 40 female rats consisting of 5 groups were used. Rats were divided into five groups (n=8): Healthy group, femoral fracture control group, femoral fracture + azelnidipine in the 4 mg/kg group, femoral fracture + azelnidipine in the 8 mg/kg group, and 16 mg/kg femoral fracture + azelnidipine. Before the surgical procedure, all rats were anesthetized by intraperitoneal (I.P.) administration of ketamine/xylasin (50 mg/kg, 5 mg/kg) and maintenance sevoflurane.

Results: Serum Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), interleukin 1 Beta (IL-1 β), interleukin 17 (IL-17), osteocalcin (OC), OPN (OP), total oxidant capacity (TOS) levels in the fracture group were measured. These parameters tended to improve in the groups given azelnidipine. In the fracture group, while the amount of total antioxidant capacity (TAS) measured in serum decreased, azelnidipine statistically improved these parameters. There was no significant difference in serum calcium(Ca), phosphorus(P) levels. Bone-specific alkaline phosphatase (BSALP) did not differ significantly. In radiological findings, azelnidipine contributed positively to fracture healing.

Conclusion: All these results showed that azelnidipine, a Ca channel blocker, has a healing effect in the femoral fracture model.

Key Words: Azelnidipin, femur, fracture, rat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	:	Alkalen Fosfotaz
ATADEM	:	Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Uygulama Merkezi
BMP	:	Kemik Morfogenetik Proteini
BSALP	:	Kemik Spesifik Alkalen Fosfataz
CMC	:	Karboksi Metil Selüloz
CSF	:	Koloni Uyarıcı Faktör
CYP	:	Sitokrom P450 enzim ailesi
DHP	:	Dihidropiridin
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
EDRF	:	Epidermal büyüme faktör reseptör
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	:	Extracellular Signal-Regulated Kinaz
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
IGF	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	:	İnterlökin
LDL	:	Low Density Lipoprotein(Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
LPS	:	Lipopolisakkarit
MDA	:	Malonildialdehid
NAC	:	N-asetilsistein
NADPH	:	İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz
NAPQI	:	N-asetil-p-benzokinonimin
NO	:	Nitrik oksit

NSAİİ	:	Non steroidal antienflamtuvar ilaçlar
OCN	:	Osteokalsin
ODF	:	Osteoklast Farklılaşma Faktörü
OPN	:	Osteopontin
PBS	:	Phosphate buffer saline
PDGF	:	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PG	:	Prostaglandin
PT	:	Protrombin zamanı
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TAS	:	Total Antioksidan Kapasite
TBA	:	Tiyobarbitürik asit
TGF	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TNF	:	Tümör nekrotizan faktör
TOS	:	Total Oksidan Kapasite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kemiğin Beslenmesi.....	13
Şekil 2.2. Uzun kemiklerin endokral kemikleşme ile oluşum basamakları.....	15
Şekil 2.3. Kırık bölgesindeki “Cutting Cone” uzantıları	18
Şekil 2.4. Antioksidan Sistemler	58
Şekil 2.5. Süperoksit radikalının SOD tarafından dismutasyonu.	60
Şekil 2.6. Total Antioksidan Kapasitesinin Patofizyolojisi.....	63
Şekil 4.1. Rat Serumunda Ölçülen TNF- α Miktarları	77
Şekil 4.2. Rat Serumunda Ölçülen IL-1 β Miktarları	78
Şekil 4.3. Rat Serumunda Ölçülen IL-17 Miktarları	79
Şekil 4.4. Rat Serumunda Ölçülen OPN Miktarları	80
Şekil 4.5. Rat Serumunda Ölçülen OCN Miktarları	81
Şekil 4.6. Rat Serumunda Ölçülen TOS miktarları	82
Şekil 4.7. Rat Serumunda Ölçülen TAS miktarları	83
Şekil 4.8. Rat Serumunda Ölçülen Kemiğe Spesifik ALP Miktarları	84
Şekil 4.9. Rat Serumunda Ölçülen P miktarları	85
Şekil 4.10. Rat Serumunda Ölçülen Ca miktarı	86
Şekil 4.11. Radyolojik görüntüler.....	87

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Kemik Matriksi Bileşenleri.....	10
Tablo 2.2. Kemik İyileşmesine Etki Eden Ana Büyüme Faktörleri	23
Tablo 2.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler	24
Tablo 2.4. Kırıkların İyileşmesini Etkileyen İlaçlar.....	30
Tablo 2.5. Reaktif Oksijen Ürünleri.....	54
Tablo 2.6. Reaktif Nitrojen Ürünleri.....	54
Tablo 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	67
Tablo 3.2. Deney Grupları	68
Tablo 3.3. Radyolojik Değerlendirme İçin Lane- Sandhu Skorlama Sistemi.....	76
Tablo 4.1. Rat Serumunda Ölçülen TNF- α Miktarları.....	77
Tablo 4.2. Rat Serumunda Ölçülen IL-1 β Miktarları.....	78
Tablo 4.3. Rat Serumunda Ölçülen IL-17 Miktarları.....	79
Tablo 4.4. Rat Serumunda Ölçülen OPN Miktarları.....	80
Tablo 4.5. Rat Serumunda Ölçülen OCN Miktarları	81
Tablo 4.6. Rat Serumunda Ölçülen TOS Miktarları	82
Tablo 4.7. Rat Serumunda Ölçülen TAS Miktarları	83
Tablo 4.8. Rat Serumunda Ölçülen Kemiğe spesifik ALP Miktarları	84
Tablo 4.9. Rat Serumunda Ölçülen P Miktarları.....	85
Tablo 4.10. Rat Serumunda Ölçülen Ca Miktarları	86
Tablo 4.11. 21. Günde Kırık İyileşmesinin Radyolojik Skorlaması.....	87

1. GİRİŞ

Kemik dokusu, insan vücudundaki sistemlerin düzgün çalışabilmesi için gerekli çatının temel unsurudur.¹

Kırık, kemik yapısının anatomik bütünlüğünün kısmi olarak veya tamamen bozulması ve bunun yanısıra kırık çevresindeki yumuşak dokuların da etkilenmesi durumudur.² Ağrı indüklemesi, komplikasyonları gibi hayat kalitesini düşürmesinden dolayı kırıklar çok önemli bir sağlık problemidir.³ Tarih boyunca kavgalar, savaşlar ve kazalar varolmuştur ve devamda etmektedir. Günümüzde teknolojinin gelişmesi, yaşam süresinin uzaması gibi faktörlerle de kırık insidansı artmıştır. Bu faktörler göz önünde bulundurulunca hayatımız boyunca kırık riski ile karşı karşıya kalmaktayız. Bu nedenle kırık tedavisi daha hızlı ve daha etkili olmalıdır. Kırığın iyileşmesi için geçen süre ne kadar kısa olur ve kırık ne kadar etkin iyileşirse, maliyetler düşer, hastanede yatış süresi azalır, yaşam kalitesi artar. Kullanılan pahalı implantlara gerek kalmayacağı gibi işe dönüş çabuk olacağı için de toplam iş gücü kaybı azalır. Bu gibi nedenlerden dolayı kırık, ortopedik cerrahinin en fazla uğraşılan konularından biri olmuştur.²

Kırık meydana geldikten sonra çeşitli fizyolojik olaylar ile kemik bütünlüğü yeniden sağlanmaya çalışılır. Kemik dokusu, diğer dokulardan farklı olarak skar bırakmadan aslına en yakın şekilde iyileşir.⁴⁻⁶ Kırık iyileşmesi kırığın meydana geldiği andan itibaren başlar ve kemik tekrar eski haline gelinceye kadar devam eder.¹ Birçok aşamadan oluşan bu süreçte bu aşamaları etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Kişinin genel durumu, hastalıklar, kullanılan ilaçlar, yaş, travmanın karakteri ve şiddeti gibi çeşitli etkenlerin, kırık iyileşmesine olumlu ya da olumsuz etkileri olabilir. Kırık iyileşmesi, inflamasyon, onarım (reperasyon) ve yeniden yapılanma (remodeling) evreleri ile tanımlanmış üç aşamalı bir süreçtir.⁷ Bu evrelerden herhangi birinde aksaklık olması durumunda kırık iyileşmesinin bu durumdan etkilenmesi kaçınılmazdır.

Kemik dokusu kendini onarma yeteneğine sahiptir ve bunu yaparken de osteoblastlar ve osteoklastlar gibi birçok hücre ve hücre dışı matrisin belirli lokal faktörleri aracılığıyla kırık kemik segmentinin restorasyonunda birlikte hareket ederler. Kemik iyileşmesinde dönüştürücü büyüme faktörü beta, lokal kemik mediatörleri ve anjiyojenik moleküller iyi tanımlanmıştır. Birçok büyüme faktörünün, özellikle insülin benzeri büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve fibroblast büyüme faktörünün rolleri de son zamanlarda gösterilmiştir.^{8,9}

Moleküler ve hücrel olarak, kırık iyileşmesi yavaş yavaş aydınlatıldığından, kırık iyileşmesi için yeni tedavi mekanizmaları ve ilişkili yeni tedavi stratejileri deneysel ve klinik olarak incelenmektedir. Kemik iyileşmesine ilişkin tüm hücrel ve fizyolojik mekanizmaların uygun aktivitesi için, o bölgedeki kan damarlarının ve kemik hücrelerinin iletişimi düzgün bir şekilde olmalıdır.¹⁰⁻¹² Kemik oluşumu, yeniden modellenmesi ve onarımında en önemli etmen, kırık bölgesi beslenmesinin ve oksijen iletiminin vasküler yapılarla sağlanmasıdır.¹³ Yapılan çalışmalar sonucunda, kemik dokusunun embriyolojik gelişiminde ve kemik kırığı iyileşmesinde rol oynayan osteojenik öncüllerin, kan damarları yoluyla o bölgeye ulaştığı gösterilmiştir.¹⁴⁻¹⁶ Bu nedenle, anjiyogenez ve o bölgeye kan temini kırık iyileşmesi açısından oldukça önemlidir. Travma sonucu ortaya çıkabilecek kırıklardaki kas hasarı kaslardaki vasküler yatlara zarar verir.^{17, 18} Deneysel kırık kemik iyileştirme çalışmalarında, kırığa bağlı vasküler iskemi ve kırık çevresindeki hasarın iyileşmede gecikmeye neden olduğu tespit edilmiştir.¹⁹ Başka bir çalışmada da yaşlı farelerdeki vasküler yetmezliğin kemik iyileşmesini azalttığı gösterilmiştir.²⁰

Azelnidipine Dihidropiridin (DHP) türevi L ve T tipi kalsiyum kanal blokeridir.²¹ Japonya’da hipertansiyonlu hastaların tedavisi için onaylanmıştır. Azelnidipinin vasküler yeniden şekillenmede önemli bir ajan olduğu bilinmektedir.

Ayrıca, oksidatif stresin azelnidipin aracılı inhibisyonu, vasküler yeniden şekillenmeyi teşvik etmesi nedeniyle yaralı arterdeki extracellular signal-regulated kinaz (ERK) ve bir sinyal çevirici ve transkripsiyonun (STAT) aktivasyonu ile olumlu katkıda bulunabilir.²² Azelnidipin, antioksidan reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltarak antifibrotik etki gösterir.²³ Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden türetilir, kemik oluşumunda önemli bir rol oynar ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları içerir. Dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerleri, L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı yoluyla kalsiyum akışını engellerler. Sonuç olarak kalsiyumun kardiyovasküler sisteme ve düz kas hücrelerine girişini yavaşlatırlar.²⁴ En azından bir kısmı dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerleri tarafından azaltılan hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun, D3 vitamini^{25, 26} paratroid hormon^{25, 27} ve prostaglandin E2^{25, 28} gibi çeşitli kemik düzenleyici faktörlerle arttığı gösterilmiştir. Bu faktörler osteoblast farklılaşmasını da değiştirir.^{29, 30} Bu nedenle, L-tipi kalsiyum kanalı yoluyla sinyalin osteoblast fonksiyonları için önemli olabileceği görülmektedir. Kırık iyileşmesinde Azelnidipin'in etkisinin araştırılması önem arz etmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu ve Histolojisi

Kemik dokusu vücuttaki en sert dokulardan biridir. Mineralize bir bağ dokusu olan kemik dokusu, yapım ve yıkımın eş zamanlı seyrettiği bir dokudur. Kasların bağlantı noktası olması nedeniyle denge ve hareketin meydana gelmesinde rolü büyüktür. Ayrıca organların korunmasını sağlamak gibi önemli bir rolü de mevcuttur. Kemik dokusu, kemik iliği sayesinde kan hücrelerinin yapımında etkin bir rol oynadığı gibi, metabolik olarak da vücudun ihtiyacı olan fosfat (PO₄) ve kalsiyum (Ca) gibi minerallerin depolanıp, gerektiğinde salınmasını sağlar.^{31, 32} Kemik dokuda bulunan ana biyolojik hücreler; osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar, osteoprogenitör hücreler ve kemik etrafında ‘‘Lining Cell’’ olarak adlandırılan çevreleyici dinlenen osteoblastlardır. Özelleşmiş bir bağ doku olan kemik doku, temelde ‘Osteosit’, ‘Osteoblast’ ve ‘Osteoklast’ olarak adlandırılan 3 temel hücre ve hücre dışı matriksinden oluşmaktadır. Bütün kemikler, iç kısmına ‘Endosteum’, dış kısmına ise ‘Periosteum’ adı verilen ve içerisinde osteojenik hücreler içeren, bir bağ doku tabakası ile çevrilidirler.³³ Osteoblastlar, pluripotent mezenkimal hücreler tarafından sentezlenirler ve aktif durumda kemik matriksinin üretiminden sorumludurlar. Aktif osteoblastların yaklaşık üçte biri mineralize matriks içinde osteositleri meydana getirirler. Osteositler, kalsiyum ve fosfor dengesinin sağlanmasında görev alırlar. Osteoklastlar, monosit öncülerinin birleşmesiyle oluşan çok çekirdekli dev hücreler olup mineralize kemik matriksinin rezorpsiyonundan sorumludurlar. Osteoprogenitör hücreler, aktive olmayı bekleyen osteoblastların mezenkimal öncüleridir.³⁴⁻³⁶ Hüresel olmayan matriks ise organik ve inorganik olmak üzere iki kısımdan oluşur. Organik kısım kolajen lifleri, glikoproteinler, proteoglikanlar, fosfoproteinler ve fosfolipidlerden oluşurken, inorganik kısmı kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfat oluşturmaktadır.^{34, 36}

Yetişkin insan iskelet sisteminde sesamoid kemikler dışında 213 adet kemik bulunur. Tübüler olan uzun ve kısa kemiklerde hyalin kıkırdaktan kemik oluşumuna endokondral kemikleşme denir. Yassı kemiklerde mezenkimal dokunun yoğunlaşarak direk kemik oluşturmaya ise intramembranöz kemikleşme denir.³⁷

Kemik yapısında kemik iliği, endosteum, periosteum, kan damarları, kıkırdak ve sinir dokular bulunmaktadır. Kemik, vücuda yapısal destek veren, temel olarak vücudun farklı bölgelerinin bağımsız hareketlerini sağlayan, iç organları dış kuvvetlerden koruyan bir dokudur. Bunun yanında kan üretimi, hormonal düzenleme, asit baz dengesinin sağlanması, IGF (insülin like growth faktör), BMP (Bone Morfojenik Protein), TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) gibi büyüme hormonlarının depolanması, yağ depolanması, vücutta mineral düzeylerinin ayarlanması, toksik maddelerin kandan uzaklaştırılması (ağır metal birikimi) gibi çeşitli görevleri vardır.³⁸

2.2. Kemik Hücresel Bileşenleri

Kemik yaklaşık olarak %2'sini oluşturur.

2.2.1. Osteoprogenitör Hücre

Embriyogenik mezenkimal hücrelerden oluşan, kök hücre özelliğinde olup kırık iyileşmesi ve kemik büyümesi gibi durumlarda osteoblastlara farklılaşabilen, kemik matriksi salgılayabilen, iğsi görümlü soluk boyanan, oval çekirdekli hücrelerdir.³² Periosteumun iç tabakasında ve havers kanallarını çevreleyen endosteumda bulunurlar.³²

2.2.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden köken alan, tek çekirdekli hücreler olup, kemik hücrelerinin %4-6'sını oluştururlar. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması için 'Runx2' gen ekspresyonu gerekmektedir. Osteoblastlara farklılaşmada Fibroblast Büyüme Faktörü'nün de önemli rol oynadığı

bildirilmiştir.³⁹ İnaktif osteoblastlar, periosteal ve endosteal kemik yüzeyinde yer alırlar.⁴⁰ Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, yan yana, tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar.⁴¹ Aktif olarak sentez yapan osteoblastlar, çeşitli şekillerde olup bazofilik sitoplazmaları vardır. Kemik matriksinin organik bileşenlerini (Glikoproteinler, Proteoglikanlar, Tip 1 Kolajen) üretirler. Osteoblastlar, fibroblast ve kondroblastlar gibi çok yönlü salgı yapan hücreler olup, bölünme yeteneklerini de korumuşlardır.⁴² Kemikteki inorganik bileşenlerin depolanmasında da osteoblastik aktivite rol oynamaktadır.⁴² Kemik matriksinin dış yüzeyinde bulunan aktif osteoblastlar, özelleşmiş hücreler arası bağlantılar ile bağlıdırlar.⁴¹ Kemik yüzeyindeki osteoblastlar, diğer bölgelerde bulunan osteoblastlarla kıyaslandığında metabolik olarak daha aktiftirler.⁴³ Görevlerini tamamlayan bazı osteoblastlar, osteositlere farklılaşarak matriks-bağlı lakünelarda tuzaklanırlar ve matriks yüzeyini sararak ‘Kemiği Kaplayan Hücreler’e dönüşürler. Büyük miktarı ise apoptoza uğrayarak ömürlerini tamamlar.^{39, 41} Osteoblastlar tarafından sentezlenen kemik matriks proteinlerinden bazıları ‘Kemik Siyaloproteinleri I ve II’, ‘Trombospondin’ , ‘Osteonektin’ gibi proteinler, ‘OPN’, ‘OCN’ ve çeşitli proteoglikanlardır.⁴² Matriks bileşenleri, hücre yüzeyinde mevcut kemik matriksi ile etkileşerek salgılanır. Sonuç olarak, osteoblast katmanı ve mevcut kemik yüzeyi arasında ‘Osteoid’ adı verilen, özgün, kolajenden zengin bir tabaka meydana gelir. Meydana gelen matriks içerisine kalsiyum tuzlarının birikimi sonucunda, kemiğin bu mevcut kemik üzerine depolanarak büyümesi tamamlanır.⁴¹ Matriks mineralizasyonu tam olarak aydınlatılamamış olsa da, OCN ve diğer glikoproteinlerin kalsiyum iyonunu bağladığı bilinmektedir. Osteoblastlar, özellikle Alkalen Fosfataz’dan ve diğer enzimlerden zengin olan ‘Membran-Bağlı Matriks Vezikülleri’ salgılayarak lokal fosfor iyon konsantrasyonunu da yükseltirler. Kalsiyum ve fosfor iyonlarının birleşmesi ile ‘Hidroksiapatit Kristalleri’ $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$

oluşur. Kalsifikasyonun ilk gözle görünür aşaması olarak bu molekül kabul edilmektedir. Bu kristaller, mineral birikimi sonucu hızlıca büyür ve kolajen lif ve proteoglikan içeren kalsifiye bir kitleye dönüşürler.⁴¹ Osteoblast aktivitesi, çeşitli hormonlar ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Osteoblastların hücre zarlarında Troid Hormonu, Paratiroid Hormonu, İnsülin, Büyüme Hormonu, Prolaktin ve Progesteron reseptörleri yer almaktadır. Osteoblast aktivitesi ve fizyolojik homeostaz mekanizmaları bu hormonlar aracılığı ile endokrin olarak düzenlenmektedir.⁴⁴ Osteoblastlarda, Platelet Kökenli Büyüme Faktörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü, Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta gibi büyüme faktörlerinin reseptörleri de mevcuttur. Aktiviteleri bu faktörler aracılığı ile otokrin ve parakrin olarak düzenlenmektedir.⁴⁵ Son çalışmalarda, epidermal growth faktör (EGF)'ün, osteoblast çoğalmasını uyardığı fakat farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir.⁴⁶ Osteoblast aktivitesi, osteoklastlar tarafından salgılanan 'Klastokin' ile inhibe edilmektedir.⁴¹

2.2.3. Osteositler

Osteoblastların kemik matriksi ile tamamen çevrili halidir.⁴² Kemik hücrelerinin yaklaşık olarak %90-95'ini meydana getirirler ve 25 yıla kadar canlı kalabilmektedirler.³⁹ Kemik matriksinin devamlılığından sorumludurlar. Görevlerinden biri de mekanotransdüksiyondur. Kemiğe uygulanan mekanik güçlere bu süreçle yanıt verirler.⁴² Hücre dışı kalsiyum ve fosfat konsantrasyonunun kontrolünde de önemli görevleri vardır.³² Osteoblastlardan oluşan osteositler, matriksin arasında 'Laküna' adı verilen boşluklarda yer alırlar.⁴² Her lakunada yalnızca bir osteosit vardır. Osteositlerin sitoplazmik uzantıları ince silindirik kanalcıklarla sarılmıştır.⁴⁷ Osteositler, özelleşmiş hücreler arası bağlantıları sayesinde birbirleriyle molekül transferini sağlarlar. Azalmış perinükleer sitoplazmalarından dolayı öncüllerinden daha küçüktürler. Mikroskopik incelenmelerde, hücrelerin, kemiğin kesit öncesi matriks dekalsifikasyonundan dolayı

büzüşme ve diğer defektler nedeniyle önemli derecede biçim bozukluğu meydana geldiği görülmüştür. Bu durumda nükleus tek belirgin özelliktir.³¹ Osteositler, yassı, badem şekillidirler. Işık mikroskopisinde, epeyce azalmış Granüllü Endoplazma Retikulum, Golgi Organı ve daha koyulaşmış Kromatin gözükmemektedir. Kemik matriksinin bakımından bu hücreler sorumludurlar.³¹ Osteositlerin travma veya apoptoz ile ölmeleri, osteoklast aktivitesiyle kemik matriksinin rezorbsiyonuna neden olur. Bu süreci, kemik dokusunun osteoblast aktivitesi ile onarımı veya yeniden şekillenmesi takip eder.⁴²

2.2.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar, hareket kabiliyeti olan ve diğer kemik hücrelerinden daha büyük hücrelerdir. Kemik rezorbsiyonu sonrası enzimlerin lizisi ile oluşmuşlardır. Howship Lakünası adı verilen çukurlarda yer alırlar.³¹ Osteoklastlar, kan kaynaklı monositlerin birleşmesi ile oluşan, mononükleer fagositer sistemde yer alan hücrelerdir. Sitoplazmaları asidofiliktir. Hücre gövdelerinde değişik büyüklük ve çok sayıda çekirdekleri vardır. Bir hücrede çok sayıda nükleus, mitokondri, lizozom, iyi gelişmiş golgi aygıtı ve granüllü endoplazmik retikulum vardır.^{32, 48, 49} Osteoklast oluşumu, kemik iliğindeki stromal hücrelerin rol oynadığı bir süreçle başlamaktadır. Stromal hücreler tarafından, makrofajlar ve osteoklastların farklılaşması için gerekli olan sitokinler salgılanmaktadır.⁴² Aktif osteoklastların kemik matriksine bakan yüzeyinde, fırçası kenar yapısı bulunmaktadır. Aktin filamanlarından zengin, hücre organelleri bulunmayan sitoplazma kuşağı, fırçası kenarı çevreler. Osteoklastlar, bu kuşak sayesinde kemik matriksine tutunmaktadır. Osteoklast aktivitesini, fırçası kenar aktivitesi sağlamaktadır.³³ Osteoklastlar, Katepsin K gibi lizozomal enzimleri salgırlar ve bu enzimler fırçası kenar aracılığı ile kemik matriksine iletilir. Hidroksiapatit kristallerinin kolajen bağları bu enzimler ile koparılır.⁴⁵ Osteoklastlarda, kalsiyum metabolizmasında önemli rolü olan Kalsitonin reseptörleri bulunmaktadır.

Osteoklastlar üzerinde İnsülin, Tiroid Hormonu, Androjen, PTH, PDGF, IGF-1, CSF-1 ve IL-1 reseptörleri de mevcuttur.⁴⁵ Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) de osteoklast öncülü olan hücrelerin çoğalmasını uyarır.⁴⁶ Osteoklastların çalışması da diğer hücrelerdeki gibi hormonlar ve sitokinler tarafından kontrol edilmektedir. Osteoklast rezorpsiyon aktivasyonunu, osteoblastlar, lenfositler ve makrofajlar uyarırlar. Ancak intersellüler kalsiyumun yükselmesi osteoklast rezorpsiyon aktivasyonunu olumsuz yönde etkiler. Osteoklast aktivasyonunda D vitamini, kalsitonin ve bazı düzenleyici moleküller rol alırlar.^{5, 32, 49}

2.3. Kemik Matriksi

Kemik dokusu, temelde hücre-dışı kemik matriksinden oluşan bir doku olup diğer dokulardan daha az hücreli olan bir yapıya sahiptir. Kemik matriksi; protein, lipidler, glikoproteinler, proteoglikanlar, mineral, tuz ve sudan oluşan bir dokudur. Çoğunlukla osteoblastlardan oluşmuştur. Organik Matriks, kemik dokusunun %30'unu meydana getirir ve aynı zamanda kemiğin esneklik özelliğini de vermektedir. %70'ini ise İnorganik Matriks ve diğer hücreler oluşturmaktadır.⁵⁰ (Tablo 2.1.)

Kemik Matriksinin organik kısmını, asıl olarak tip I kolajen, az miktarda tip V kolajen, glikoproteinler ve proteoglikanlar oluşturmaktadır. Kolajen moleküllerinin toplamı, matriks proteinleri'nin toplam ağırlığının %90'ını meydana getirmektedir.⁵⁰ Kemik matriksinde, kemik dokusunun ara maddesinde bulunan matriks proteinleri de yer almaktadır. Matriks proteinlerinin toplam ağırlığının yalnızca %10'unu meydana getirir de kemiğin gelişimi, yeniden şekillenmesi ve kırık iyileşmesi için bu proteinlere ihtiyaç vardır. Osteopontin, osteokalsin, osteonektin, fibronektin, büyüme faktörleri ve kemik sialoprotein I- II kolajenöz olmayan proteinlerine örnek olarak gösterilebilir. Proteoglikanlar Hiyalüronik Asit, Keratan Sülfat ve Kondroitin Sülfat'tan oluşur. Esas

kemik dokusu, kolajen içerik ve ara maddenin kalsifiye olması neticesinde meydana gelir.³⁹

Kemik matriksinin %50'sini inorganik maddeler oluşturmaktadır. Kalsiyum ve fosfor yoğun olarak bulunmakla birlikte, potasyum, sodyum, bikarbonat, magnezyum ve sitrat da bulunur. Elektron mikroskobunda, kemiğin hidroksiapatit kristalleri, kolajen lifçiklerin yanına yatmış tabakalar halinde etrafları ara madde ile sarılı halde gözlenmektedir.⁴¹

Matriks kalsifikasyonunun başlatılmasında, kemik glikoproteinlerinin etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Kemik dokusunun sertliği ve direncini, minerallerin kolajen liflerle ilişkisi oluşturur. Kemikte kalsiyum olmadığında, şekli korunur, fakat tendon kadar esnek bir hal alır. Çok miktarda kolajenden meydana gelen matriksin organik kısmı çıkarıldığında kemiğin orijinal şekli korunur, fakat daha kırılgan bir hal alır.⁵⁰

Tablo 2.1. Kemik Matriksi Bileşenleri

Bileşen	Fonksiyon	Tipler	Özellikler
Organik Matriks			
Kolajen	Gerilim gücü sağlama	Primer olarak Tip 1 Daha az miktarda Tip 5, Tip 3, 11, 13 Kolajen	Organik Matriks' in %90'ını oluşturur.
Proteoglikanlar	Basınç kuvvetlerine karşı direnç	Hyalüronik Asit	Kayganlaştırıcı ve su emici
		Kondroitin Sülfat	Şok emici özellik
		Keratan Sülfat	Protein ligandlarının hücrel tanınması
Kolajen Olmayan Proteinler	Mineralizasyon ve kemik oluşumunu artırmak	OCN	Osteoklastlar üzerine etkili, Kemik yoğunluğu regülasyonu, En çok bulunan KOMP (% 10-20)
		Osteonektin	Kalsiyum regülasyonu
		OPN	Hücrebağlayıcı Protein

Tablo 2.1. (Devamı)

Bileşen	Fonksiyon	Tipler	Özellikler
Organik Matriks			
Büyüme Faktörü ve Sitokinler	Kemik hücresi farklılaşması, Aktivasyonu, Büyümesi ve Kemik Döngüsü'nde görevli	TGF-Beta, IGF, IL-1JL-6 BMP	
İNORGANİK MATRİKS			
Kalsiyum Hidroksiapatit	Kompresif Güç		İnorganik matriksin büyük kısmını oluşturur. Primer Mineralizasyon
Osteokalsiyum Fosfat			Geriye kalan inorganik matriksi oluşturur.

2.4. Periosteum ve Endosteum

Bağ dokusu, bütün dokularda olduğu gibi kemik dokuyu da örtmektedir. Kemik dokunun iç yüzeyini örten bağ doku tabakasına 'Endosteum', dış yüzeyini örten bağ doku tabakasına ise 'Periosteum' adı verilir.⁴¹

Periosteum, fibro-vasküler zar yapısında özelleşmiş bir fibröz dokudur. Damarlanması muhteşem olan bu fibröz kılıf, kemiğin tüm dış yüzeyini sarmaktadır.⁵¹ Periosteumun, 'Sharpey Lifleri' adı verilen kısmı kolajen lif demetlerinden meydana gelmektedir ve matriks içine girerek periosteumu kemiğe bağlamaktadır.⁴¹ Periosteum, kemiğin diyafiz kısmında kalın bir yapı sergilerken, metafiz ve epifiz bölümlerinde çok daha incedir.⁵¹ Periosteum mikroskobik olarak incelendiğinde, dış kısım fibröz, iç kısım ise hücreli yapı olarak gözlenmektedir. Fibröz dış kısmı, temel olarak kolajen, fibroblast ve elastin oluşturmaktadır. Bu içerik periosteuma esneklik özelliğini kazandırmaktadır. Dış kısmında yer alan damar ve sinir ağı ile periosteumun beslenmesi ve innervasyonu sağlanmaktadır.⁵² Periosteumun hücreli olan iç kısmına 'Kambiyum' adı verilir. Kambiyum kısmı temel olarak 3 ayrı tabakadan oluşmaktadır. Kemiğe en

yakın olan tabakada osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar yer almaktadır. Ara tabakada, kapiller damarlar ve hücre dışı matriks yer almaktadır. En dış tabakada ise fibroblastlar ve bunların salgıladığı kolajen lifler yer almaktadır. Kambiyum, kortikal kemiğin üzerine ikincil kemik üretimini sağlayarak kemiğin enine büyümesini sağlar. Ayrıca kırık oluşumu sonrası birincil kemiğin meydana gelmesini sağlayarak kırık iyileşmesinde de görev alır.⁵¹ Periosteum, kemik yüzeyi sararak kırık iyileşmesine önemli katkıda bulunur. Çocukluk çağında kemiğin beslenmesi de önem arz etmektedir.^{31, 32} Endosteum, tek tabaka halinde olup osteoprogenitör hücreler ile az miktarda bağ dokusundan oluşur ve kemik içindeki tüm boşlukları kaplar. Endosteum, periosteumdan çok daha ince bir yapıdadır.⁴¹ Periosteum ve endosteum, kemik dokusunun beslenebilmesi, onarımı ve büyüyebilmesi için gerekli olan osteoblastları sağlarlar. Periosteum ve endosteumun korunması, kırık iyileşmesi açısından önemlidir.^{31, 32}

2.5. Kemik Dokunun Beslenmesi

Kemik kan akımı, hormonal, metabolik ve otonom sistemler tarafından kontrol edilmektedir.⁴³ Uzun kemiklerin beslenmesi 3 kaynaktan olup, bunlar Besleyici Arter Sistemi, Metafizyel-Epifizyal Sistem ve Periosteal Sistem'dir.⁵³

2.5.1. Besleyici Arter Sistemi

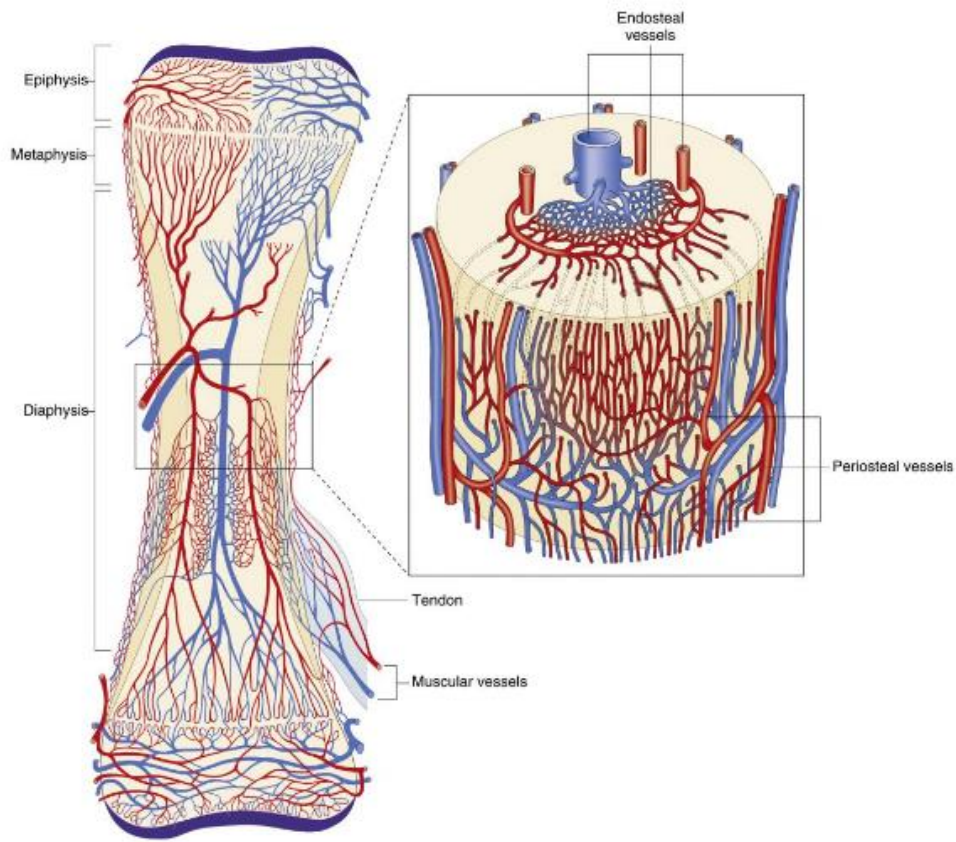
Sistemik arterlerden kaynak alırlar. Kortikal kemik beslenmesinin %60'ından sorumludur. Kemiğin diyafizyal kortekslerinde bulunan nutrisyonel foramenden girerler. Medüller kanala geçtikten sonra inen ve çıkan arterler olarak ayrılırlar. Ayrıca, endosteal kortekste arteriyol dallarına ayrılırlar ve haversian sistemi yolu ile olgun diyafizyal korteksin yaklaşık üçte ikilik kısmını beslerler. Bu sistemdeki kan basıncı yüksektir.⁵³

2.5.2. Metafizo-epifiziel sistem

Periartiküler vasküler pleksustan köken alır.⁵³

2.5.3. Periosteal sistem

Periosteal sistemde kan basıncı düşük olup, yüksek oranda kapiller damarlardan meydana gelmektedir. Korteksin maksimum üçte birlik dış kısmını besler.⁵³ Yüksek basınçlı besleyici arter sistemi ile düşük basınçlı periosteal sistem arasındaki basınç farkından dolayı olgun kemiklerde kan akımı merkezden perifer doğru ilerler (santrifüjel). Olgun bir kemikte venöz akım ise periferden merkeze doğrudur.⁴⁴ Kırık durumunda, besleyici arter sistemi zarar göreceğinden periosteal sistem baskın hale gelir ve kan akımı dışarıdan içeriye (sentripedal) doğru olur. Olgunlaşmamış kemikte de periosteal sistem baskın olduğundan kan akımı sentripedaldır. Venöz akış da olgun kemiklerde olduğu gibi sentripedaldır (Şekil 2.1).⁵⁴



Şekil 2.1. Kemiğin Beslenmesi.

2.6. Kemik Oluşum Tipleri

Kemiğin ilk oluşumu 2 farklı mekanizma ile meydana gelmektedir. Osteoblastlar tarafından salgılanan matrikse doğrudan minerallerin çökmesi ile ‘İntramembranöz Kemikleşme’ veya kıkırdak matriks üzerine kemik dokusunun oluşması ile ‘Enkondral Kemikleşme’ dir.⁴¹ İlk oluşturulan kemik dokusunun yerine oluşan kemik, ilk oluşum mekanizmasından sonra yeniden şekillenme ile önceden var olan kemiğin üzerine apozisyonel büyüme ile oluşturulur.⁴²

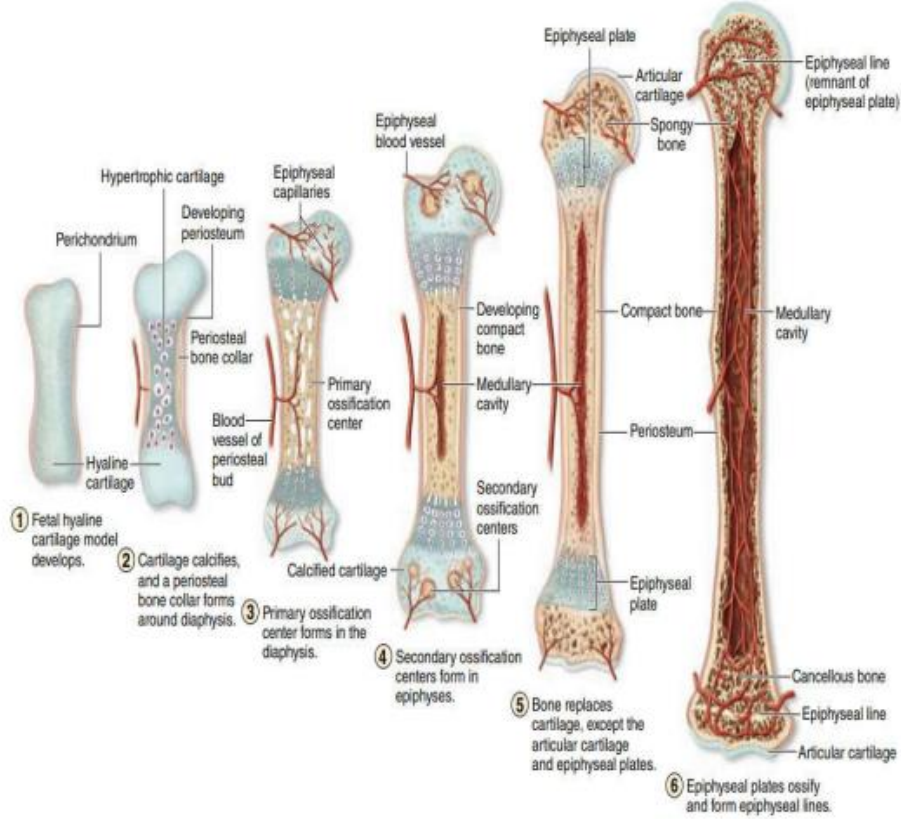
2.6.1. Enkondral Kemikleşme

Küçük bir hyalin kıkırdak yapının kemikleşmesi sonucu meydana gelen kemikleşme sürecidir. Çoğunlukla uzun ve kısa kemiklerin oluşumu bu süreçle olmaktadır. Mezenkimal hücrelerin, proliferasyon ve kümelenmeleriyle başlamaktadır. Farklı BMP ve FGF’nin etkisiyle, mezenkimal hücreler önce Tip II Kolajen salgılar ve kondroblastlara farklılaşarak kıkırdak matriksi meydana getirirler.⁴²

İlk oluşan kemik dokuya ‘Kemik Halkası’ adı verilir ve bu doku kıkırdak modelin orta kısmını saran içi boş kemik silindiri şeklindedir. Kemik halkası, perikondriumun içinde zar içi kemikleşme sonucu oluşur. Sonuç olarak kıkırdak hipertrofisi ve matriks kalsifikasyonu ile kalsifiye olmuş kıkırdak matriksten oluşan 3 boyutlu yapı oluşur.⁴² Oluşan kıkırdak modelde, osteoklastlar tarafından kemik halkasına açılan deliklerden osteoprogenitör hücreler taşınır. Osteoblastlar, kalsifiye kemik matriksine yapışırlar ve birincil kemik katmanlarını meydana getirerek kıkırdağımsı kalsifiye matriksi çevrelerler. Bu süreç sonucunda oluşan birincil kemik, bazofilik görünen kalsifiye kıkırdaktan farklı olarak eozinofilik görünmektedir.⁴¹

Primer kemikleşme, diyafiz bölgesindeki kemikleşmeye denir. Diyafizer bölgenin tamamen kemikleşmesi bitinceye kadar devam eder. Primer kemikleşmeden sonra sekonder kemikleşme başlar. Kıkırdak modelinin uçlarındaki epifiz bölgesindeki

sekonder kemikleşme merkezinden kaynaklanan kemik oluşumu meydana gelir. Epifizdeki eklem kıkırdığı kemikleşmeye katılmaz.⁵⁵ Primer ve sekonder kemikleşme merkezlerinde kalsifiye olmuş kıkırdak dokular arasındaki genişlemiş alanlara lakuna denir. Sekonder kemikleşmede, eklem yerlerinde ve kemiğin uzamasının gerçekleştiği epifiz bölgelerindeki kıkırdak doku varlığını sürdürmektedir. Eklem bölgelerindeki kıkırdak yapılar, yaşam boyu varlıklarını sürdürür ancak yetişkin döneme gelindiğinde epifiz hatları tamamen kemikleşir. Her kemiğe uygun bir kronolojik sıra ile ve hemen hemen 20'li yaşlarda epifizlerin kapanışları tamamlanır (Şekil 2.2).⁴¹



Şekil 2.2. Uzun kemiklerin endokondral kemikleşme ile oluşum basamakları

2.6.2. İntramembranöz kemikleşme

Çoğunlukla yassı kemik oluşumunda gözlenen kemikleşme şeklidir. Kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında da rol oynar. Mezenkimal hücrelerin yoğunlaşması ile oluşmaktadır.⁴¹ Mezenkimal hücrelerin yoğunlaşmaya

başladığı noktaya ‘Birincil Kemik Merkezi’ adı verilir. Mezankimal hücrelerin osteoblasta farklılaşması, oluşan osteoblastlar tarafından kemik matriksi komponentlerinin üretililmesi ve takiben kalsifikasyon süreci başlar.⁴² Son aşamada periosteum oluşur. Kemik oluşumunun devamı, kemiğin her iki yanından başlayarak periosteum katmanlarıyla olur.⁵⁶ Bazı osteoblastların etrafları sarılarak osteosit haline gelir. Oluşan bu kemik adacıklarına spikül denilir. Spiküller; kapiller, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreler bulundurlar. Spiküller apozisyonel şekilde büyüyerek, gelişmekte olan kemiğin şekline göre trabekül ağı halinde birleşirler. Mitotik aktivite sayesinde osteoprogenitör hücrelerin sayıları korunur. Osteoblastlar kemik matriksi üreterek süngerimsi kemik yapısını meydana getirirler. Kemik iliği, farklılaşmamış mezankimal hücreler ile kan damarlarının spiküller arası bağ dokuya gelmesiyle oluşur.⁵⁵ Meydana gelen kemik dokunun birbiri ile birleşerek bağ dokunun yerini almasıyla süreç sonlanır. Endosteum ve periosteum bağ dokusunun kemikleşmeyen kısımlarından oluşur. Öncelikle birincil kemik oluşmakta olup, süreç içerisinde ikincil kemiğe dönüşmektedir.⁴¹

2.7. Kırık İyileşmesi

Dışarıdan veya içeriden etki eden kuvvetlerce kemiğin anatomik yapısının bozulmasına kırık denilir. Kırık sonrası kemik bütünlüğün yeniden oluşması için fizyolojik reaksiyon zinciri başlar.⁵ Kırık iyileşmesinin diğer doku iyileşmelerinden farklı olarak skar dokusu olmadan gerçekleşir. Kemik doku dışındaki diğer dokularda iyileşmede fibröz skar dokusu oluşur. Oluşan fibröz skar dokusunun işlevi yetersiz olabileceği gibi işlevsiz de olabilir. Fibröz skar ile iyileşmiş bir kırık biyomekanik açıdan yetersizdir. Psödoartroz olarak adlandırılan, klinik olarak patolojik hareket ve ağrı durumu oluşabilir.

Kırık iyileşmesi karmaşık bir süreç olup ve şu evrelerden oluşmaktadır ⁵⁷:

1. Periosteal ve endosteal kallus oluşumu ve fragmanlar arası fibrokartilaj dönüşümü,
2. İntramembranöz ve enkondral kemikleşmeyle kemik devamlılığının sağlanması,
3. Nekrotik ve avasküler sahalarda yeni havers kanalları oluşumu,
4. Remodelling,
5. Fonksiyonel adaptasyon.

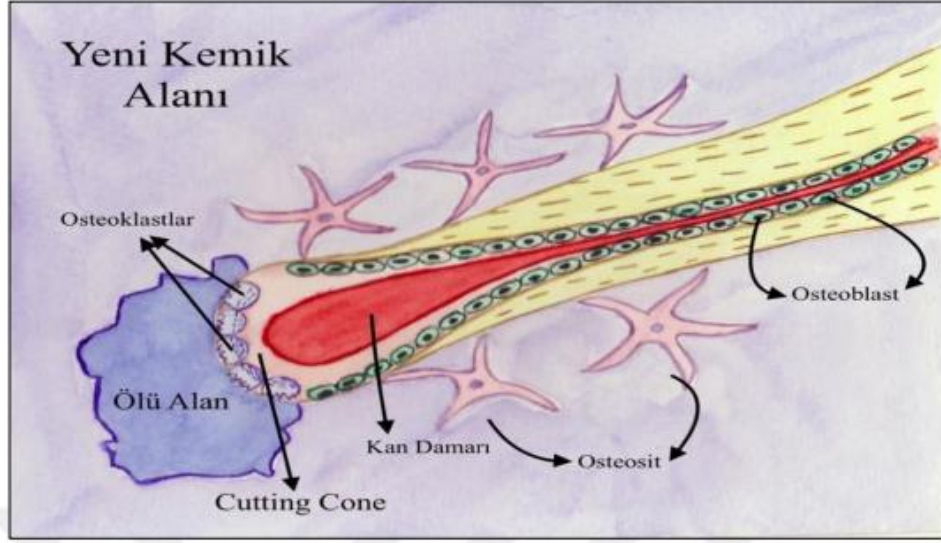
Kırık iyileşmesi, kırık meydana gelen kemiğe ve uygulanan tedavi şekline göre primer (direkt) ve sekonder (indirekt) iyileşme olarak sınıflandırılır.

Primer kırık iyileşmesi; genelde dış kallus dokusu olmadan iç kallus oluşumuyla devam eden temas (kontakt) iyileşmedir. Kemik uçlarının aralık olmadan anatomik olarak redükte edilmesi ve sağlam tespiti sonrasında oluşur. Kemik zamanla lamellar kemiğe dönüşür. Haversian kanalları ile yeni kandamarları oluştuğunda iyileşmeden bahsedilebilir. Bu süreç birkaç ay olabileceği gibi birkaç yıla kadar da sürebilmektedir.⁵⁵

Temas(kontakt) iyileşmesi ve aralık(Gap) iyileşmesi olarak ikiye ayrılır. Her iki iyileşmede de anatomik ve biyomekanik olarak sağlam lameller kemik iyileşmeyi vardır. Primer kırık iyileşmesi, periostal kallus oluşmadan meydana gelen iyileşmedir.

Temas (Kontakt) İyileşmesi: Bu iyileşmenin oluşabilmesi için kırık uçları arasındaki mesafenin 0.01 mm den az, kırık uçları arasındaki gerilimin % 2'den az olması gereklidir. Kırık bölgesinde osteonların uçlarında osteoklast kümelerinden "Cutting Cone" oluşur. Kırık uçlarındaki ölü alana doğru ilerler ve osteoklastik aktiviteyle birlikte, ölü dokularda fagositoz meydana gelir. "Cutting Cone" yapısının arka kısmında yer alan osteoblastlar, ölü dokulardan kalan boşlukları doldururarak kemik matriksi ve haversiyen sistemi içeren osteoid dokuyu oluşturur (Şekil 2.3).

Havers kanalları ile osteoprogenitör hücreler göç eder ve osteon köprüleşmesi ile lameller kemik ve ardından matür kemik oluşumu gözlenir.^{58, 59}



Şekil 2.3. Kırık bölgesindeki “Cutting Cone” uzantıları

Aralık (Gap) iyileşmesi: Anatomik redüksiyon ve mutlak tespit ile birlikte kırık uçlarının birbirine olan uzaklığı 0,01 -1 milimetre arasında ise minimal boşluklu kaynama görülür.⁶⁰ Bu boşluklar kemiğin kendi aksında iyileşmesini engellediği için, aksa dik olarak lameller kemik oluşumu gözlenir. Boşluk örgülü kemik ile dolduktan sonra oluşan haversiyen sistem, osteoprogenitör hücreleri taşır. Damarlanma ile kan akışı sağlanır ve sonrasında osteonlarla yer değişikliği başlar. Oluşan lameller kemik, aksa dik olduğu ve örgülü kemik ile doldurulduğu için biyomekanik olarak zayıftır.⁶¹

Sekonder kırık iyileşmesi; İntramembranöz ve endokondral iyileşme ile gerçekleşen, en sık meydana gelen iyileşme türüdür. Sekonder iyileşme, alçı, atel, breys gibi konservatif tedavilerde, intramedüller çivilemede veya parçalı kırıkların minimal girişimsel internal (perkütan osteosentez) tespiti gibi cerrahi tedavilerde görülür.⁵⁵

Kemiğin histolojik olarak iyileşme süreci ise üç aşamada oluşur:

1. Yangı (inflamasyon)
2. Onarım (reperasyon)

3. Yeniden şekillenme (remodelling)

2.7.1. Yangı (İnflamasyon) Evresi

Kemik kırılması ile mekanik olarak başlayan süreç, çeşitli faktörlerin salınması ile sistematik olarak birçok biyolojik mekanizmayı tetikler. Kemik yaralanması ile yumuşak dokular, periost, kemik matriksi, kemik iliği ve kan damarları hasar görür. Lokal oksijenizasyonu sağlanamayan hücreler, kendisine en yakın kollateral beslenmesi olan bölgeye kadar nekroze olur. Bu nekroz sonucunda ölü hücrelerden kalan artıklar, periost ve kemik iliğinde bulunan hücrelerin eklenmesi ve medüler kanaldan kaynaklanan kanama ile kırık hematomunun ana yapısını oluşturur. Hematomda bulunan ve hematoma sınırlandırmakta görevli olan koagülatör hücrelerle koagülasyon sonucunda oluşan fibrin onarıcı hücreler için çatı görevi görerek bu hücreleri kırık bölgesine göç etmesi için uyarır.⁶² Ölü veya hasarlanmış hücrelerden salınan inflamatuvar mediyatörler (IL-1 β , IL-6, IL-17F, IL-18, IL-23, TNF- α , TGF- β) vazodilatasyon oluşturur ve sonrasında plazma sıvısı bu alanda ödem meydana getirir. Trombositlerden salınan PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü) sayesinde plazma içerisinde PMNL (polimorfonükleer lökositler), lenfositler ve makrofajlar bu alana göç ederler. İnflamatuvar hücreler ile angiogenesis oluşturan sitokinlerin salınımı başlar.^{63, 64} Akut inflamatuvar yanıt, TNF- α ile birlikte 24. saatte tepe noktasına ulaşır ve bir hafta boyunca devam eder. IL-6 artışı ile hücresel kallus, angienez osteoblast ve osteoklast rejenerasyonu başlar.⁶⁵ Makrofajlar tarafından nekrotik yapıları fagosite edilerek sinyal molekülleri olan BMP-2, BMP-7, PDGF, FGF, TGF-Beta ve IGF gibi büyüme faktörleriyle rejenerasyon başlar. Mezenkimal kök hücrelerin göçü, toplanması ve çoğalmasın büyüme faktörleri sayesinde olur. Aynı zamanda kök hücrelerden kondroblast, fibroblast, angioblast ve osteoblastların meydana gelmesinde de rol oynarlar.⁶² Kırık uçları arasındaki boşluk endotelial hücreler, osteoblastlar ve

fibroblastların granülasyon dokusu oluşturmasıyla doldurulur. İnflamasyon evresinde, ilkel bir kallus oluşumuyla kırık uçları arasındaki kontrolsüz hareket bir miktar da olsa sınırlandırılır.⁶⁶

TNFR-1 ve TNFR-2 reseptörleri, osteoblast ve osteoklastlarda bulunurlar. Mezenkimal ve inflamatuvar hücreler, farklılaşmayı uyarıcı etkilerini bu reseptörler aracılığı ile gösterirler. Kırık iyileşmesinde sadece TNFR-2 reseptörü gözlenir. Kırık iyileşmesinde, IL-1 ve IL-6'nın etkileri diğer inflamatuvar mediatörlerden fazladır. Makrofajlar tarafından salınan IL-1, osteoblastlardan IL-6 salınımını artırır. Kırıkta kallus oluşumu IL-6 etkisiyle uyarılır ve ILR-1 ve ILR-2 reseptörleri aracılığıyla da anjiyogeneze uyarılır. IL-6 yalnızca akut fazda salgılanır. Anjiyogenezi uyarmasının yanısıra VEGF salınımını artırıcı ve osteoblast-osteoklast farklılaşmasını uyarıcı etkiye de sahiptir.⁶² Kırık iyileşmesinde, kambium tabakasında yer alan mezenkimal kök hücrelerin de etkisi büyüktür. BMP-2 ve BMP-7 mezenkimal kök hücrelerin artışından sorumludur.⁶⁶ Lenfositler kırık iyileşmesinin başlangıç evresinde etkin rol oynamamalarına rağmen, iyileşmenin normal seyrinde ilerlemesi için gereklidirler. Doku hasarı oluşumu ile lenfositler immün sistem aktive olur ve immünsupresyon durumu oluşur. Nitrik Oksit, stres hormonları ve PgE2 gibi inflamatuvar sitokinler T-Lenfosit sayısını azaltır ve aktivitesini düşürür. T-Lenfositlerin fonksiyonlarının azalması B-Lenfositler'inde olumsuz olarak etkilenmesine neden olmaktadır.⁶²

Nötrofillerin kırık bölgesine göçü IL-1 ve TNF- α aracılığı ile olmaktadır.⁶⁶ İnflamatuvar cevabın hemen sonrasında, fibröz kallus dokusunda ve yeni oluşan kemik dokuda makrofajlar tespit edilmiştir. Makrofajlar, kırık iyileşmesinin erken döneminde, hem kondrosit farklılaşmasını uyarırlar hemde vaskülarizasyonu düzenlenir.

Makrofajların, öncül hücrelerin farklılaşmasında da rol oynadığı düşünülmektedir.⁶⁷ Başlangıç evresinde IL-1, IL-6, IL-11, IL-18 ve TNF- α düzeyinde

artış görülür. İlk 24 saatte en yüksek düzeye ulaşan TNF- α ve 72. saatte tekrar normal seviyesine döner ve kemotaktik etkisiyle ikincil inflamatuvar etki oluşturur.⁶⁸

Özetle, inflamatuvar dönemde nekrotik dokular imha edilir. İnflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler anjiogenezi uyarır. Mezenkimal hücreler, osteoblastlar ve fibroblastların kırık hattına göç ederek çoğalmasıyla granülasyon dokusu meydana gelir.⁶⁶

2.7.2. Onarım (Reperasyon) Evresi

Akut inflamasyonu sonrası büyüme faktörleri, kemik matriks proteinleri ve kemotaktik faktörler aracılığıyla onarım evresi başlar.⁶³ Enerji metabolizması bu evrede maksimum seviyededir.⁶⁹

Kırık hematomunun fibrinize olması ile granülasyon dokusu meydana gelir. Periost üzerinde BMP-2, TNF- β 2 ve TNF- β 3 enkondral kemikleşme için kondrositlere dönüşümü başlatır.⁶⁵ Granülasyon dokusu ve kırıkta yapı ile beraber yumuşak kallus süreci başlar. Meydana gelen yumuşak kallus, mineralizasyon, kondrositlerin apoptozu, anjiyogenez, osteoblastların çoğalması ve enkondral kemikleşme ile sert kallusa dönüşür.⁶⁶ Yumuşak kallusun sert kallusa dönüşümünde RANKL, M-CSF, Osteoprotegerin ve TNF- α görev alır.⁶⁸ Kondrositler, Tip-10 kolajen ve intramembranöz kemik oluşumunda gerekli olan OCN ve OPN üretiminden sorumlu Runx2 transkripsiyon faktörünü salgırlar. Runx2 ile aktive olan osteoklastlar meydana gelen sert kallusun ikinci kez çözünmesine aracılık ederler. Sert kallus, rezorbsiyon sürecinde lameller kemiğe dönüşerek remodelizasyon evresine geçer.^{70, 71} Eş zamanlı olarak subperiosteal alanda intramembranöz kemikleşme görülür. BMP-5 ve BMP-6 intramembranöz kemikleşme için osteoblastik aktiviteyi uyarır.⁶⁵ Onarım evresinde VEGF (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü), FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), Anjiopietin 1 ve 2 ile nekroze alanda yeniden anjiogenezisi başlatır.⁷² İlk aşamada anjiopietin 1 ve 2 düzeyi yükselir.⁷³ Daha sonra VEGF bu görevi devralır ve baskın

hale geçer. Anjiogeneziste BMP ve aksiyel mekanik yüklenme, VEGF ile sinerjik etki oluşturur.⁷⁴

2.7.3. Yeniden Şekillenme (Remodelling) Evresi

Meydana gelen sert kallus dokusu, biyomekanik olarak yeterli olmayan ancak daha katı bir yapıdır. Bu nedenle sert kallusun lamellar kemiğe dönüşmesini gerektiren bir süreç ihtiyacı vardır. Bu yapı yeniden şekillenme döneminde meydana gelmektedir.⁶⁶ Yeniden şekillenme evresinde, osteoklastların sayesinde sert kallusun rezorpsiyonu gerçekleşirken, osteoblastların etkisi ile yeni lamellar kemik oluşumu gerçekleşmektedir. Bu süreç kırık iyileşmesinin 3. ve 4. haftalarda başlayıp yıllarca sürebilmektedir.⁶⁶ Osteoklastların mineralize yüzeylere yapışması ile howship lakünaları oluşur. Bu bölgelere yerleşen osteoblastlar sayesinde yeni kemik oluşumu meydana gelir.⁷⁵ Proinflamatuvar sitokinlerden IL-1, IL-6, IL-11 ile artmış TNF- α , IL-12 ve Interferon-Gama bu süreçte görev alan temel sitokinlerdir. Ayrıca Büyüme Hormonu ve PTH ‘ında bu evrede önemli görevleri vardır.⁷⁶ Sonuç olarak, kemik maruz kaldığı travmalar sonrası kendini yenileme özelliğine sahiptir. Aksiyel yüklenme ile kristalize dokuda oluşan elektriksel polariteye bağlı olarak, elektropozitif konveks yüzeyde osteoklast; elektronegatif konkav yüzeyde osteoblast aktivitesini uyarır. Dış kallus dokusu lamellar kemiğe, iç kallus Medüller Kaviteye dönüşür. Onarım fazında oluşan örgü kemiğin, lamellar kemikle yer değiştirmesiyle iyileşme süreci sonlanır.⁶⁶ Rejenerasyon evresi bittiğinde iyileşmiş alandaki matür kemik dokusu ile normal doku birbirinden ayırt edilemez hale gelir. Büyüme faktörlerinin etki mekanizması öğrenildikçe; rekombinant teknolojilerle üretilen preparatlar üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır (Tablo 2.2).⁷⁷

Tablo 2.2. Kemik İyileşmesine Etki Eden Ana Büyüme Faktörleri

Büyüme Faktörleri	Hücre Kaynağı	Evre*	Etki
PDGF	• Trombosit	i	• Nötrofil ve Makrofaj ların Kırık Hematomuna Göçü
	• Osteoblast	O	• VEGF vc IL-6 Arttırarak Anjiogenezis
	• Endotel		• Osteoblastlar Üzerinde Mitojenik ve
	• Monosit		Kemotaktik
	• Makrofaj		• Kırık İyileşmesi Alanında Ümit Verici
TGF- p	• Trombosit	i	• Fibroblast ve Makrofaj İçin Kemotaktik
	• Osteoblast	o	• Matriks Oluşumu
	• Kondrosit	R	• Angiogenoz
	• Endotel		• Kalsifikasyon
	• Fibroblast		• MKH Tip 2 Kollajcn + Proteoglikan
	• Makrofaj		• Kallus Kıkırdak + Kemik
FGF	• Makrofaj	i	• Anjiogenezis
	• Monosit	O	• Fibroblast. Kondrosit ve Osteoblast Üzerinde
	• Kondrosit		Mitotik Etki (FGF-2)
	• Osteoblast		
	• Endotel		
VEGF	• Osteoblast	o	• Angiogenezis
	• Trombosit		• RANKL vc BMP ile Kombine Kırık İyileşmesini Olumlu Etkilemiştir
IGF-2	• Osteoblast	o	• Tip 1 Kollajcn Üretimi
	• Kondrosit	R	• Anjiogenezis
	• Endotel		• Osteoprogenitör Hücre Çoğalması
BMP	• Osteoprogenitör	i	• MKH —♦ Osteoblast
	• Osteoblast	O	• Matriks Sentezi
	• Kondrosit	R	• Hücre Migrasyonu
	• Endotel		• Kemik Oluşumunun Aktivasyonu

(*İ: İnflamasyon. O: Onarım. R: Remodeling)

2.8. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kırık iyileşmesini etkileyen birçok faktör vardır.⁷⁸ Yapılan çalışmalarla kırık iyileşmesini etkilediği kanıtlanan faktörler Tablo 2.3’de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

1. Sistemik Faktörler	2. Yaralanmaya Bağlı Lokal Faktörler
• Yaş • Aktivite Seviyesi • Beslenme Durumu • Hormonal Faktörler 1. Büyüme Hormonu 2. Kortikosteroidler 3. Diğer: • Paratiroid Hormon • Kalsitonin • Tiroid • Östrojen • Androjen • Hastalıklar - o Osteoporoz - o Diyabet - o Anemi - o Nöropatiler • Vitamin Eksikliği; - o A, C, D, K • İlaçlar: - o Nonsteroid • Antienflamatuvar İlaçlar (NSAİİ) - o Antikoagülanlar - o Kalsiyum Kanal Blokörleri • Diğer Maddeler (Nikotin, Alkol) - o Sistemik Büyüme Faktörleri - o Çevresel Isı - o Radyasyon - o MSS Travması	• Lokal Hasarın Derecesi - o Açık Kırıklar - o Parçalı Kırıklar - o Yaralanma Hızı • Vasküler Desteğin Kemik Parçalarına veya Yumuşak Dokulara Kadar Kaybolması • Kırık Tipi ve Lokalizasyonu • Kemik Kaybı • Araya Yumuşak Doku Girmesi • Lokal Büyüme Faktörleri
	3. Tedaviye Bağlı Lokal Faktörler • Cerrahi Travma • İmplanta Bağlı Değişen Kan Akımı • Tespitin Rijiditesi, Derecesi ve Zamanlamaya Etkisi • Mekanik Yüklerin Derece, Süre ve Yönleri • Parçalar Arası Temas Oranı • Posttravmatik Osteogenezi Uyarıcı Faktörler (Kemik Greftleri, BMP, Elektriksel Uyarım)
	4. Komplikasyonlarla Birlikte Olan Lokal Faktörler: • Enfeksiyon • Venöz Staz • Metal Allergisi
	5. Diğer Faktörler • Kemik Tipi • Anormal Kemik • Denervasyon

2.8.1. Lokal Faktörler

Yaralanma, tedavi ve komplikasyondan bağımsız faktörler

1. Kemik tipi

Karşılıklı gelmiş süngerimsi kemikler, süngerimsi kemiğin birim hacmine oranla yüksek yüzey alanının olması, hücre ve kemik açısından fazlaca temas noktası oluşturması ve osteoblastların mevcut trabeküllerin doğrudan üzerinde yeni kemik oluşturması nedeniyle hızlıca kaynarlar.⁶³

Anormal kemik

Radyasyon nekrozu: Yüksek dozda radyasyon, haversiyan sistemde kalıcı hasarlar oluşturacağından hücreliliği azalır.⁷⁹

Enfeksiyon: Vücutta herhangi bir enfeksiyon varsa çok sayıda hücrenin enfeksiyonu yok etmeye çalışmasından dolayı enerji tüketimi fazla olur. Ayrıca, enfeksiyon sağlıklı doku nekrozuna ve kan damarlarının trombozuna sebep olarak iyileşmeyi yavaşlatır veya engeller.⁶³

Tümör ve diğer patolojik durumlar: Osteoporoz, osteomalazi, paget hastalığı, osteogenezis imperfekta, metastatik tümörler, kötü huylu kemik tümörleri, iyi huylu kemik tümörleri, kemik kistleri, hiperparatiroidizm, fibröz displazi ve enfeksiyonlar patolojik kırıkların sebepleri arasında gösterilebilir.⁶³

Denervasyon

İmmünohistokimyasal çalışmalarda, kırık kallusunda yedinci günde sinir dokusu elemanlarının gözlendiği ve 14-21 günler arasında da periostta sinir liflerinin varlığı bildirilmiştir. Kırık bölgesindeki ilişkili sinir dokusunun hasarlı olması kırık iyileşmesini olumsuz etkileyebilmektedir.⁸⁰

Yaralanmaya bağlı faktörler

1-Lokal hasarın derecesi

Açık kırıklar: Yumuşak dokunun hasar görmesiyle kırık kan pıhtı oluşumu engellenip veya azalacağından onarım dokusunun meydana gelmesi gecikir ve kırık bölgesine kan desteği engellenir.⁶³

Parçalı kırıklar: Parçalı kırık durumunda yaygın yumuşak doku hasarında meydana gelir. Osteopenik hastalarda küçük travmalarla ortaya çıkan parçalı kırıklar istisnadır. Kırık parçalarının birbirinden uzaklaşması ile nekroze alan artar ve kırık bölgesindeki kan akımı engellenerek iyileşmesi gecikir.⁶³

2-Vasküler desteğin kaybolması

Kırık bölgesine gerekli kan akımının olmaması iyileşmeyi geciktirebilir veya engelleyebilir.⁶³

3-Kırık tipi ve lokalizasyonu

Eklem dışı metafiz kırıkları, diafiz kırıklarından daha çabuk iyileşirken humerus, tibia, talus ve skafoid kırıkları diğer kemiklere göre daha zor iyileşir.

4-Kemik kaybı

İyileşmeyi olumsuz etkiler.

5-Araya yumuşak doku girmesi

Kırık parçaların arasına kas, tendon, damarlar ve sinirleri içeren yumuşak dokunun girmesi, iyileşmeyi olumsuz etkilemektedir.⁶³

6-Lokal büyüme faktörleri

TGF, FGF, PDGF gibi büyüme faktörleri anjiyogenezi ve mitogenezi başlatarak hücrelerin göçünü, farklılaşmasını ve çoğalmasını tetikler.

Tedaviye bağı faktörler

1. Cerrahi travmanın derecesi

İşlem esnasında yapılan geniş diseksiyonlar, hematom oluşmasına sebep olur ve dolaşımı bozulduğundan iyileşme olumsuz etkilenir.

2. İmplanta bağlı değişen kan akımı

Oymalı çiviler endosteal kan akımını, plaklar ise periosteal kan akımını olumsuz etkiler.

3. İnternal veya eksternal tespitin rijiditesi

Eksternal tespit veya metal implantlarla yapılan iç sabitleme, kırığın sıkı tespitini sağlayıp birincil kemik onarımına yardımcı olur ancak iyileşmeyi hızlandırmaz.⁶³

4. Kemik ve yumuşak dokulara etki eden yüklerin derece, süre ve yönleri

Kırık alanına yapılan yüklenme kemik oluşumunu harekete geçirir, yüklemenin azalması ise iyileşmeyi yavaşlatır.⁶³

5. Parçalar arası temasın derecesi

Temas alanı arttıkça kaynama oranı yükselir.

6. Posttravmatik osteogenezi uyaran faktörler

PRP, BMP, WNT aktivatörü uygulaması (mesela lityum), kemik greftleri, kemik iliği uygulaması ve kırık uçlarına elektriksel uyarım osteogenezi uyaran maddelere örnek verilebilir.³²

Komplikasyonlarla Birlikte Olan Faktörler

1. Enfeksiyon

2. Venöz staz (durgunluk)

3. Metal alerjisi

2.8.2. Sistemik Faktörler

Yaş

Mezankimal hücre farklılaşması, kırığın yeniden şekillenmesi ve yeni kemik dokusu oluşumu ileri yaşla birlikte yavaşlamaktadır.⁸¹

Genel Durum

Hastanın genel durumu, beslenme durumu ve aktivite seviyesi kırık iyileşmesini etkiler. Genel durum bozukluğu, sitokin düzensizliğine sebep olarak kırık iyileşmesini geciktirir. Kırıkta ve kemik üretimi için sürekli olarak protein, karbonhidrat ve kolajene gereksinim vardır. Ayrıca osteoporoz, diyabet, hipervitaminöz D, raşitizm, anemi ve nöropatiler kırık iyileşmesini geciktirmektedir. Osteoporoz kemik kütle kaybına neden olduğu için kırık durumlarında önem arz etmektedir.⁶³ Tip 1 osteoporoz trabeküler kemik kaybı oluştururken, Tip 2 osteoporoz kortikal kemik kaybı oluşturur. Aynı zamanda kemik kırılabilirliği sebebiyle kırık tespiti zor olduğundan sonrasında redüksiyon kaybı gözlemlenebilir.⁸²

Hormonlar

Parathormon (PTH)

Parathormon, kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Kemik mineral yoğunluğunu ve kırık iyileşmesini artırır, kırık riskini azaltır.⁸³ Kırık hematoma oluştuğunda trombositlerden salınan Paratiroid büyüme faktörleri (PGGA), TGF ile birlikte kırık onarımının başlamasında önemli rol oynarlar.⁶³ Pulsatif salınımı osteoblastik aktiviteyi artırarak kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir.⁸⁴ Bunun yanı sıra vücut minerallerinin önemli bir düzenleyicisidir.

Büyüme Hormonu ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF-1)

Kalsiyum tutulumu, büyüme faktörlerinin aktivasyonu ve anabolik etkisi ile kırık iyileşmesini arttıracak düşünülmektedir.⁶³ Klinikte cücelik tedavisinde kullanımı olmasına rağmen, kırık iyileşmesi için kullanımı netlik kazanmamıştır.⁸⁵

Kortikosteroidler

Mezenşimal Kök Hücre (MKH)'lerin osteoblastlara farklılaşmasını engellediği düşünülmektedir. Organik matriks ve kolajen üretimini baskılayarak kırık iyileşmesini geciktirir.⁸⁶ Kortizon iyileşmeyi yavaşlatır ve kallus oluşumunu azaltır. PDGF, EGF ve FGF üzerine antagonist etkisi nedeniyle iyileşmeyi olumsuz yönde etkiler.³¹

Kalsitonin

PTH'nun antagonisti olup hertürlü kemik yapımını arttırır.

İnsülin de kırık iyileşmesini hızlandırır. Anabolizan hormonlar kırık iyileşmesine olumlu katkıda bulunurlar.

Tiroid hormonu Kemiğin yeniden şekillenmesinde rol oynar.⁸¹

Vitaminler

A vitamini

Kırık iyileşmesine mezankimal hücre farklılaşmasını uyararak katkıda bulunur. Vücutta az bulunması durumunda osteoblast ve osteoklast aktivitesi azalır ve kemik oluşumu yavaşlar.⁸⁷ A vitamini fazlalığında hücre çoğalması olumsuz etkilediğinden kırıkta aşınma oluşur. Osteoklast dönüşümü fazlaca uyarılacağından iyileşme olumsuz etkilenir.

C vitamini

Mezenkimal hücre farklılaşmasını uyararak dolaylı olarak kırık iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunur.⁸⁷ Kolajen sentezini uyararak dolaylı yoldan kırık iyileşmesini olumlu yönde etkiler.⁸⁸ C vitamininin fazla alımı kırıkta dejenerasyonuna sebep olur.⁸⁷

D vitamini

Normal dozlarda kırık iyileşmesini hızlandırır. Kemiğin yeniden şekillenme evresinde rol oynar. Vücutta D vitamininin az olması durumunda Ca düzeyi azalır ve kemik kalsifikasyonu olumsuz etkilenir. Toksik dozda ise kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler.⁸⁸ D vitamini eksikliği sekonder hiperparatiroidizme sebep olacağından

kemik yıkımını arttırır. D vitamini eksikliği ve fazlalığı kırık iyileşmesini geciktirir. Bu nedenle normal değerlerde tutulması gereklidir.⁵⁴ K vitamini antagonistleri (warfarin) ve B6 vitamini eksikliği kırık iyileşmesine olumsuz yönde etki ederler.⁸⁸

İlaçlar

Hareket problemleri olan kırık hastalarında tedavi çoklu ilaç kullanımına neden olur. Kırık iyileşmesini birçok ilaç farklı yönlerde etkilemektedir (Tablo 2.4).⁸⁹

Tablo 2.4. Kırıkların İyileşmesini Etkileyen İlaçlar

İlaç	Olumlu	Olumsuz	Etkisiz
Prostaglandin NSAİİ	• PGE-2		• Piroksikam
		• Aspirin • Diklofenak • Ketorolak • İbuprofen • Naproksen • İndometazin • Cox-2 İnhibitörleri • Tenoksikam • Fenilbutazon	
Opioidler	• Opioid peptidler		• Tramadol
Antibiyotikler		• Siprofloksasin • Levofloksasin • Trovafloksasin	• Gentamisin • Vankomisin • Sefazolin
Antikoagulanlar		• K vit antagonistleri	• Düşük molekül ağırlıklı heparin • Rivaroksaban
Vitaminler	• Vitamin C • Vitamin E • Vitamin D		
Hormonlar	• PTH • GH • İnsülin • FGF-2	• Kortikosteroidler • Alendronat • Östrojen • Raloksifen • 17-Beta- Östradiol	• Metil- prednizolon
Nikotin		• Nikotin	
Alkol		• Etanol	
Diğerleri	• Simvastatin • Fenitoin • Kalsiyofiks	• Doksorubisin	

İnflamatuar evrede siklooksijenaz yolağını etkileyen ilaçlar kırık iyileşmesine etki ederler. Nonsteroid anti-inflamatuar (NSAİ) ilaçlar bu yolağı inaktive ederken, PGE-2 agonistleri bu yolağı aktive ederler. PGE-2 agonistleri mezenşimal kök hücre dönüşümünü hızlandırır, kallus oluşumu ve mineralizasyonunu artırır. Ancak PGE-2 agonistlerinin yan etkileri (ateş, bulantı, bitkinlik vb...) sebebiyle kullanımı sınırlıdır.⁹⁰

Kırık hastalarında en fazla kullanılan ilaçlar ağrı kesicilerdir. Kırık iyileşmesine olan olumsuz etkileri nedeniyle NSAİ ilaçların kullanımına dikkat etmek gerekir. Parasetamol grubu ağrı kesici ilaçlar NSAİ ilaçlara alternatif olabilir.

Postoperatif kırık hastalarında antibiyotik seçiminde dikkat edilmelidir. Özellikle kinolon grubu antibiyotikler kırıkdağlar için toksiktir ve kırık iyileşmesini geciktirir.⁵⁴

Uzun süre immobilizasyona sebep olan kırıklarda derin ven trombozu profilaksisi önerilmektedir. Heparin ve K vitamini antagonistleri kallus yapısındaki hücrelere sitotoksik etki gösterirken, düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) kırık iyileşmesine herhangi bir etkisinin olmadığı kanıtlanmıştır.⁹¹

Yaşlı hasta grubundaki kırıkların nedeni önemli ölçüde osteoporozdur. Osteoporoz tedavisinde kullanılan bifosfanatların kırık kallusunu arttırmasına rağmen kaynamayı geciktirdiğı yönünde çalışmalar mevcuttur. Bunun nedeni remodelling evresinde ihtiyaç olan osteoklastik aktiviteyi baskılamasıdır. Ancak halen kırık hastalarında kullanımı tartışmalıdır.^{92, 93}

Dikumarol, hiyalüronidaz ve kondroitin sülfat kırık iyileşmesini olumlu yönde etkiler. Klonidin ve L-Dopa büyüme hormonu salınımını arttırarak iyileşmeyi olumlu yönde etkiler. Yapılan çalışmalarda, yüksek doz İndometazin'in iyileşmeyi durdurduğu tespit edilmiştir.⁸⁸

Hiperbarik Oksijen

Günde iki saat kadar 2-3 atmosfer basıncında oksijen uygulamasının kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilerken, günde 6 saat uygulamanın iyileşmeyi geciktirdiği gözlenmiştir.⁸⁸

Kırık Bölgesi Ekgersiz ve Stresleri

Redüksiyon işleminden sonra sıkı bir tespit yapılan kırıklarda, kırık bölgesi egzersizi ve kontrollü yük verildiği takdirde kemik gelişimi uyarılmaktadır.³¹

Merkezi Sinir Sistemi Travması

Uzun kemik ve eklemlerde merkezi sinir sistemi uyarıları ile osteogenesis artar.

2.9. Kırık İyileşmesinin Düzenlenmesi

Kırık oluşumu sonrasında, başta osteoblastlar ve osteoklastlar olmak üzere, kırık bölgesinde hücrelerin toplanması ve bir düzen içerisinde görevlerini yapabilmesi için birtakım düzenleyicilere ihtiyaç vardır. Kırık alanında bölgesel olarak üretilen veya kan dolaşımıyla gelen, prostoglandinler ve kemik uyarıcı faktörler gibi kemik dengesini koruyabilen faktörler de gereklidir.⁹⁴ İyileşmenin erken döneminde, ilgili gen ekspresyonunda da artışlar meydana gelmiştir.⁹⁵

I. Prostaglandinler:

Araşidonik Asit'ten Siklooksijenaz enzimi aracılığıyla üretilirler. Prostaglandinler hücre duvarının hasar görmesi durumunda sentezlenir. Akut inflamasyon evresinde rol alırlar ve kemotaktik etkilidirler. Güçlü vazodilatatör etki gösterirler. Hücre çoğalmasını hızlandırırlar ve antikor yapımının düzenlenmesinde görev alırlar.⁹⁶ PgI-2, PgE-1 ve PgE-2 yeni kemik yapımını artırır. TGF-Alfa, EGF, PDGF, Trombin ve Bradikinin, PgE2 aracılığı ile etkilerini gösterir. PgF-2 kondrogenezde görevlidir.⁸⁸

II. Dönüştürücü Büyüme Faktörü – Beta:

Doku rejenerasyonu ve inflamasyonda rol oynar. Vücutta bulunan tüm hücrelerden salgılanabilir ve bütün hücrelerde reseptörleri bulunur. Travma sonrası oluşan trombositlerden ve kemik matriksinden çokça salgılandığı tespit edilmiştir.⁹⁷ Makrofajlardan da salınarak kemotaksisi artırır. Enkondral kemikleşmede ve kırıkta hücre çoğalmasında kemik matriksinde birikir.⁹⁵ Proteolitik enzimleri baskılayarak granülasyon dokusunun oluşumunda rol oynar. Reseptörleri uyararak fibronektin, kolajen ve proteoglikanların oluşumunu artırır.⁶⁶

III. Kemik Morfogenetik Proteini:

Morfogenetik bir protein olup hasarlı kemik dokusundan kaynak alır. BMP'lerin, osteogenez ve kondrogenez ile sonuçlanan oluşum kaskadını indüklediği tespit edilmiştir.⁹⁵ Osteoprogenitör, mezenkimal ve anjiogenik hücrelerin kemotaksisi, proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlayarak indüksiyon işlemini sağlamaktadır. Kemik matriks üretiminde de rol almaktadır. 10 alt türü olduğu bildirilmiştir.⁶⁶

IV. Fibroblast Büyüme Faktörü:

Kırıkta oluşumu sürecinde kallusu genişleterek vaskülarizasyonunu sağlar. Osteoblastlar ve fibroblastlar için mitojeniktir.⁹⁷

V. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü:

İnflamasyon esnasında trombositlerden salgılanır. Osteoblast ve fibroblastlar başta olmak üzere diğer kemik hücreleri için de mitojeniktir.⁹⁷ Makrofajların kemotaksisinde de etkin rol oynar. Kırık bölgesindeki hematoma ve kan dolaşımında vardır. Bağ dokusunda kolajen sentezinin artmasını sağlar. Mezenşimal kök hücre ve fibroblast mitozunu artırır.⁶⁶

VI. İnterlökınler:

Makrofajlardan salgılanan lokal faktörler olup fibroblast proliferasyonunda rol oynarlar. IL-1 ve IL-6 kırık oluşumunun erken döneminde ortaya çıkmakta olup, kırık oluşumundan bir gün sonra en yüksek düzeyde bulunduğu gösterilmiştir.⁶⁶

VII. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü:

Hipertrofik kondrositler tarafından kırık kallusunda salgılanır. Osteoblast proliferasyonu ve farklılaşmasını uyarırlar. Kıkırdak dokuda vasküler kemik dokusunun oluşturulmasını sağlar.⁹⁸

VIII. Epidermal Büyüme Faktörü:

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) reseptörleri, osteoblastlar ve osteoklastlarda yer almaktadır.⁹⁹ EGF'nin kemik doku üzerine etkileri aydınlatılmış olup, kırık iyileşmesi olan etkisi hakkında bilgi bulunmamaktadır.

2.10.Ca Kanal Blokerleri

Esansiyel bir iyon olan kalsiyum, Sir Humphrey Davy tarafından 1808 yılında bulunmuştur.¹⁰⁰ Kalsiyumun, canlı organizmada önemli derecede yapısal ve fizyolojik görevleri vardır. Birçok hücre fonksiyonunun sürdürülebilmesi için gerekli bir iyondur.^{101, 102} Bu iyonun plazmadaki konsantrasyonu oldukça sabit olup 8.5-10.4 mg/dl arasındadır. Plazmada üç fraksiyon şeklinde bulunur.^{102, 103} Kalsiyumun yaklaşık % 41' i plazma proteinleriyle birleşmiş olarak, % 50' si iyonize durumda, % 9 kadarı da iyonize olmayan bir durumda bağlanmış şekilde bulunur. Hücre dışı kalsiyum miktarı hücre içi kalsiyum miktarının 10000 kat fazlasıdır. Hücre içi konsantrasyonu çok düşük olan kalsiyum, hücre içi organellerde bağlanmış bir şekilde veya sitoplazmada serbest halde bulunmaktadır.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Kalsiyum kanal blokörleri, voltaja bağımlı kalsiyum kanal proteini veya oligomerik kompleksi üzerinde bulunan kendilerine özgü reseptörlere yüksek afiniteli bir şekilde bağlanarak kalsiyum kanalları açık hale geldiğinde, yüklü

kalsiyum iyonlarının ie akışını engellerler.¹⁰² Böylece damar düz kası ve miyokard hücrelerine Ca^{+2} girişini azaltır. Sitosolik Ca^{+2} düzeyini düşürerek eksitasyon kontraksiyon ikili ilişkisini bozarlar. Sonuç olarak vasodilatasyon ve negatif inotropik etki oluşur.¹⁰⁵ Kalsiyum kanal blokörlerinin antihipertansif etki mekanizması, oluşan arteriyel dilatasyon sonucu periferik direncin azalması şeklinde olmaktadır.¹⁰⁶

Kalsiyum kanal blokeri olan azelnipin antienflamatuar ve antioksidan etkili olduğundan kalsiyum iyonunun inflamasyondaki rolünden bahsetmek gerekir. Kalsiyum iyonu, inflamasyona neden olan kimyasal mediatörlerinin sentez ve salınımında da rol alır.¹⁰⁷ Deneysel çalışmalar ile ağrı ve inflamasyonun, kalsiyum iyonunun dokularda azaltılması ile azaldığı, dokularda artırılması ile arttığı gösterilmiştir.^{108, 109} Kalsiyum iyonunun inflamasyondaki rolünü gösteren bir başka kanıt ise PNL (polimorf nüveli lökosit)'lerin aktif hale gelmesiyle artan hücre içi kalsiyumun hücre içi kontraktıl elamanlarını aktif hale getirerek PNL'lerin hareketlilik kazanmasını sağlaması ve PNL'ler içinde bulunan süperoksit anyonu lizozomal enzim ve PAF (Trombosit aktive eden faktör)sekresyonunu artırmasıdır.^{104, 110} İnflamasyonun en önemli mediatörleri araşidonik asit metabolitleridir. Fosfolipaz A2 enzimi membran fosfolipitlerinden araşidonik asit sentezlenmesini gerçekleştirir. Bu enzimin aktivasyonu için de kalsiyum iyonları olmalıdır.^{108, 111} Önemli inflamasyon mediatörlerinden olan nitrik oksidin sentezlenmesini sağlayan NOS (nitrik oksit sentaz) enziminin aktivasyonu da intraselüler kalsiyum iyonunun artmasına bağlıdır.^{111, 112}

Dihidropiridin kalsiyum kanal blokerlerinin bir başka etkisi, kalsiyumun L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı yoluyla kalsiyum akışını engelleyerek kalsiyumun kalp sistemine ve düz kas hücreleri seviyesinde girişini yavaşlatmaktır. Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden türetilir, kemik oluşumunda önemli bir rol oynar ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları içerir.²⁴ En azından bir kısmı dihidropiridin türevi kalsiyum

kanal blokerleri tarafından azaltılan hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun, D3 vitamini^{25, 26} paratroid hormon^{25, 27} ve prostaglandin E2^{25, 28} gibi çeşitli kemik düzenleyici faktörlerle arttığı gösterilmiştir Bu faktörler osteoblast farklılaşmasını da değiştirir.^{29, 30}

2.10.1. Ca kanal Blokerlerinin Sınıflandırılması

Kalsiyum kanal blokerlerinin başlıca etkisi, uyarılabilir membranlarda kalsiyum kanalları aracılığıyla kalsiyumun hücre içine akışının bloke edilmesidir.¹¹³ Kalsiyum kanal blokerlerinin hormon ve nörotransmitterlerin salınması, trombosit fonksiyonu, kas kasılmaları gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde de etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Antihipertansif etkilerini, arteriyollerdeki damar tonüsü ve periferik damar rezistansını azaltıp vazodilatasyon yaparak oluştururlar.¹¹⁴ Kalsiyum kanal blokerlerinin venler üzerinde etkileri olmamasına rağmen, koroner, pulmoner ve periferik arterlerde vazodilatasyon oluştururlar.¹¹⁵ Bazı supraventriküler ve ventriküler taşikardik aritmi tedavilerinde kullanılırlar.¹¹⁶ Konjenital kalp hastalığı, pulmoner hipertansiyon, hipoksinin neden olduğu pulmoner vazokonstriksiyon, pulmoner fibrozis gibi hastalıklarda kalsiyum kanal blokerleri ile tedavi edilebilir.¹¹⁷

Kalsiyum kanal blokerleri aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır;

A-Selektif olanlar

1. Dihidropiridinler (nifedipin, nikardipin, nitrendipin, amlodipin, nizoldipin, isradipin, lasidipin, felodipin, nimodipin)
2. Fenilalkilaminler (verapamil, gallopamil)
3. Benzotiazepin (diltiazem)

B- Non - selektif olanlar

1. Flunarizin
2. Sinarizin

3. Prenilamin

4. Perheksilin

Bu gruplar dünya sağlık örgütü tarafından da kabul edilmiş bir sınıflandırmadır.^{118, 119}

Dihidropiridin Türevi Kalsiyum Kanal Blokerleri (DHP):

Antihipertansif bir ilaç grubu olan 1,4-dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerleri, vasküler sistemde düz kas gevşemesine neden olarak, periferik direncin düşmesini sağlarlar. L-tipi kalsiyum kanallarına bağlanarak hücre içi kalsiyum girişini inhibe ederler.¹²⁰

Antihipertansif etkilerini iki yol üzerinden oluşturmaktadırlar.¹²¹

1. Düz kaslarda bulunan L-tipi kalsiyum kanallarına etki ederek hücre içine Ca iyonlarının girişini inhibe ederek direkt gevşetici etki,
2. Vasküler endotelden NO salınımı aracılığı ile sağladığı indirekt gevşetici etkidir.

Vazoselektif olduklarından dolayı, damarları gevşeten doz ve konsantrasyonlarda kalp kası ve diğer kalp hücreleri üzerinde çoğunlukla belirgin bir depresan etki meydana getirmezler.¹²²⁻¹²⁶ Tokolitik olarak, obstetrik ve jinekoloji alanında da kullanılmaktadır.¹²⁷ Dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerlerinin protipi nifedipin'dir. Birbirleri içerisindeki en önemli ayırıcı faktör etki süresi ve vasküler selektifite dereceleridir.¹⁰⁶ Nifedipin, amlodipin, nikardipin ve diltiazem gibi dihidropiridinler, afferent arterioller üzerindeki baskın etkileri sebebiyle glomerüler hipertansiyonu artırırken; nilvadipin, manidipin, efonidipin ve benzindamin gibi dihidropiridinler hem afferent hem de efferent arterioller üzerindeki gevşetici etkileri sebebiyle glomerüler hipertansiyonu iyileştirir ve böbrek üzerinde koruyucu etki

sağlarlar.^{124, 128} Böbrek üzerindeki koruyucu etkilerini, böbrek tübüllerine etki ederek sodyum reabsorbsiyonunu azaltıp renal kan akımını artırarak oluşturmaktadırlar.^{122, 123}

2.11. Azelnidipin

2.11.1. Azelnidipin'in Farmakokinetiği

Azelnidipin çoğunlukla bağırsak duvarlarında CYP3A4 izoenzimleri tarafından metabolize edilir ve aktif metaboliti yoktur.¹²⁹ CYP3A4 enziminin substratı olan diğer ilaçlar veya bileşiklerle etkileşim potansiyeline sahiptir. Güçlü bir CYP3A4 inhibitör aktivitesine sahip bir ilaç olan intrakonazol (50mg) ile uygulanan azelnidipin (8mg) hakkında bir çalışma yapılmıştır. İntrakonazol ile uygulanan azelnidipinin Cmax değeri, tek başına azelnidipin uygulananlara göre 1,6 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.¹³⁰ Böbrek fonksiyon bozukluğu olan antihipertansif hastalarda, azelnidipinin kararlı durum plazma konsantrasyonları, sağlıklı gönüllülerinkinden yaklaşık 2 kat daha yüksek olarak tespit edilmiştir.¹³⁰ Yeni bir kalsiyum antagonisti olan azelnidipin, farmakokinetik olarak da amlodipinden farklıdır. Azelnidipin yüksek oranda lipofilik olmasından dolayı vasküler duvarda tutulur.²¹ Bir klinik öncesi çalışmada azelnidipinin yıkama ile bile kan damarlarından çıkarılamadığını gösterilmiştir. Sonuç olarak, azelnidipin muhtemelen vasküler duvarda tutulduğu ve kandan kaybolduktan sonra bile hipotansif bir aktivite gösterdiği için kalıcı bir etki ortaya çıkarır. Diğer dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerlerinden farklı olarak, azelnidipin muhtemelen kan basıncında kademeli bir düşüşe neden olduğu için refleks taşikardiye neden olmaz. Klinik çalışmalar azelnidipinin sempatik sinir aktivitesini baskılayarak hipertansif hastalarda kalp hızını ve proteinüriyi önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. Hipertansiyonlu hastalarda önerilen doz günde bir kez ağızdan 8-16 mg'dır.¹³⁰ Hipertansiyonu olan hastalarda azelnidipinin farmakokinetiği sağlıklı gönüllülerinkine benzer görülmektedir. Japon sağlıklı gönüllüler üzerinde yiyeceklerin azelnidipin

üzerindeki etkisi çalışılmıştır. Yemekten sonra tek bir oral doz (10mg) azelnidipin uygulandığında ortalama C_{max}, aç karnına elde edilen değerlere kıyasla 2.6 kat daha yüksektir. Sonuç olarak yemeklerden sonra azelnidipin uygulaması önerilmektedir.¹³⁰

2.11.2. Azelnidipin'in Endikasyonları ve Yan Etkileri

Azelnidipine Dihidropiridin (DHP) türevi L ve T tipi kalsiyum kanal blokeridir.²¹ Japonya'da hipertansiyonlu hastaların tedavisi için onaylanmıştır. Klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, hafif-orta derecede hipertansiyonlu olan 95 hastada azelnidipin uzun süreli tedavinin kan basıncını (BP) etkili bir şekilde kontrol ettiği gösterilmiştir. 1 yıllık tedaviden sonra sistolik/diastolik kan basıncında başlangıça göre ortalama azalma 27.8/16.6 mm Hg olarak tespit edilmiştir. Kalsiyum kanal blokeri olmayan antihipertansif ajanları alan 172 hasta arasında, azelnidipin tedavisinin eklenmesi 1 yıllık çalışmada ortalama kan basıncını önemli derecede düşürmüştür. (başlangıçta 165.7/95.4 mm Hg'den 138.2/79.9 mm Hg'ye azalma) Hafif- orta derecede hipertansiyonu olan hastalarda azelnidipinin antihipertansif etkinliğinin, randomize çift kör çalışmalarda amlodipin veya nitrendipininkine benzer gösterilmiştir. Azelnidipin ve amlodipin 24 saatlik kan basıncını benzer şekilde kontrol etmiştir. Azelnidipin genellikle iyi tolere edilir. Baş ağrısı ve yüz kızarması gibi advers olaylardan vazodilatör etkisi sorumludur. Myokard enfarktüsü sonrası iskemik kalp hastalığı ve kardiyak yeniden şekillenme tedavisinde kullanılır. Hipertansiyonlu hastalarda kalp hızını arttırmadan kan basıncının düşürülmesine yardımcı olduğu bildirilmiştir. Azelnidipin büyük ölçüde insan plazma proteinlerine (%90-91) bağlanır. Çoğu kalsiyum kanal blokeri gibi ilk geçiş eliminasyonuna maruz kalır.¹³⁰ Literatür, Azelnidipin'in çeşitli hayvan hipertansiyon modellerinde güçlü ve sürekli bir kan basıncını düşürücü etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca renoprotektif etkilerin yanı sıra kardiyoprotektif, serebroprotektif, anti-aterosklerotik ve insülin direncini

iyileştiren etkilere sahip olduğu doğrulanmıştır. Azelnidipin, Amlodipin'den 17 kat daha yüksek lipofilikliğe sahiptir.¹²⁹ Azelnidipinin vasküler yeniden şekillenmede önemli bir ajan olduğu bilinmektedir. Ayrıca, oksidatif stresin azelnidipin aracılı inhibisyonu, vasküler düz kas hücresinin (VSMC) çoğalmasını azaltması ve vasküler yeniden şekillenmeyi teşvik etmesi nedeniyle yaralı arterdeki extracellular signal-regulated kinaz (ERK) ve bir sinyal çevirici ve transkripsiyonun aktivasyonu ile olumlu katkıda bulunabilir.²² Azelnidipin, antioksidan reaktif oksijen türleri (ROS) azaltarak antifibrotik etki gösterir.²³ Azelnidipin antihipertansif etkili bir ilaç olup kalp hasarını önler. Antioksidan ve antienflamatuvar etkisi amlodipin'den daha fazladır.¹³¹ Karaciğerde TGF- β 1'i inhibe ederek antifibrotik etki gösterir.²³ Hipertansiyon tedavisinde, amlodipin, lasidipin ve nikardipin gibi dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik çalışmalar, kan basıncını düşürerek ve in-vitro damarlar üzerinde antioksidan etkiye sahip olarak kardiyovasküler olayları önlemede yararlı olduklarını göstermiştir.¹³² İlgili mekanizmalar karmaşıktır ve nitrik oksit üretiminde bir artış meydana gelir¹³³ ve oksidatif stres azalır.¹³⁴

2.12. Osteopontin (OPN)

Osteopontin (OPN), ilk olarak 1979'da Senger tarafından bildirilen ve 1985'te Franzen tarafından isimlendirilen dönüşümle ilişkili bir fosfoproteindir. OPN küçük integrin bağlayıcı, ligand N-bağlantılı glikoprotein (SIBLING) ailesine aittir.¹³⁵ Kromozomun uzun kodu ile eşlenen SPP1 geni tarafından kodlanmıştır.¹³⁶

OPN, kemik iliğinde kolajen olmayan kemiğin yaklaşık % 2'sini oluşturur ve esas olarak osteoblastlar tarafından salgılanır.^{137, 138} Kemik iliğindeki osteogenez progenitör hücreleri, kemik hücreleri ve diğer hematopoietik hücreler tarafından da sentezlenebilir¹³⁹ ve belirli bir arginin-glisin-aspartat (RGD) dizisine sahiptir. Bu nedenle, hücre yüzeyindeki ilgili integrin tarafından tanınabilir, bağlanabilir ve eksprese

edilebilir, bu da hücre yapışması ve göçü için önemli hale gelir. Biyomineralizasyon, hücre aracılı bağışıklık, iltihaplanma, fibroz, hücre hayatta kalması, tümörjenez ve metastaz gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçle oldukça ilişkilidir.¹⁴⁰ Son çalışmalar, OPN'nin nöron aracılı ve endokrin regüle kemik kütlesinde bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca OPN'nin osteoporoz, romatoid artrit ve osteosarkom gibi kemikle ilgili birçok hastalığın ortaya çıkması ve gelişmesi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Romatoid artrit, eklemlerde geri dönüşü olmayan hasara neden olan kemikle ilişkili bir otoimmün hastalıktır. Osteosarkom, kemik dokusunda meydana gelen, sıklıkla akciğer metastazına neden olan ve kötü prognoza sahip yaygın bir kötü huylu tümördür. Kemik homeostazının sürdürülmesi sadece sinyal iletimini değil, aynı zamanda normal kalsiyum ve fosfor regülasyonunun sürdürülmesini de gerektirir. Bu karmaşık süreç, PTH, Klotho geni^{141, 142} ve aktif D vitamini tarafından düzenlenir. Çalışmalar, PTH'nin OPN ekspresyonunu düzenleyerek Klotho - / - farelerinde mineralizasyon bozukluklarını ve iskelet deformitelerini doğrudan etkilediğini göstermektedir.¹⁴³ OPN'nin tam ekspresyonu, PTH anabolizması için gereklidir; OPN'nin yok edilmesi, PTH ile uyarılan alkalın fosfataz (ALP) aktivitesini ve OCN (OCN) ekspresyonunu ve ayrıca mineralizasyon indüksiyonunu bloke edebilir. Doğrulanmış bir şekilde, PTH ile indüklenen hücre içi sinyalleşme, reseptörü olan PTH / PTH ile ilişkili protein (PTHrP) reseptörüne (PPR) dayanmaktadır.¹⁴⁴ Hücre dışı matriks proteini olan OPN, kemik oluşumunda PPR sinyalleşmesinin negatif bir düzenleyicisidir.¹⁴⁵ Tüm bu sonuçlar, OPN'nin PTH regülasyonunda önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

Kemik homeostazını sürdürmek için mezenkimal kök hücrelerin kemik yüzeyinde toplanması gerekir. Mezenkimal kök hücreler, osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonu sırasında kemik rezorpsiyon yüzeylerinden salınan hücre dışı Ca^{2+}

sayesinde mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu ve göçünü artıran OPN ekspresyonunu ve salgılanmasını indükler.¹⁴⁶

Kemik metabolizması bozukluklarının neden olduğu osteoporoz, insanlarda en sık görülen kemik hastalığıdır. Bir dizi çalışma, bu iskelet hastalıklarının gelişiminde OPN'nin anormal ekspresyonunun rol oynadığını göstermiştir. OCN, OPN ve diğerleri gibi kolajen olmayan proteinler, kemik matrisi hacminin veya ağırlığının nispeten küçük bir yüzdesini oluşturur, ancak bunlar, çeşitli yollarla kemik matrisi kalitesine katkıda bulunurlar. Kolajen olmayan proteinler, hidroksiapatit kristal çekirdeklenmesini, büyümesini, şeklini ve boyutunu kontrol etmenin yanı sıra ana organik (kolajen) ve inorganik (hidroksiapatit) fazlar arasındaki bağlanmayı kolaylaştırır.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ OPN eksikliğinin daha önce tüm kemiklerin makro-mekanik özelliklerini bozduğu gösterilmiş olmasına rağmen, bu bozukluğun mekanizması belirsizliğini korumaktadır. OPN, osteoklast bağlanmasını kolaylaştırır ve kristal şeklini ve boyutunu etkileyerek mineral birikmesini yönlendirir.¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Diğer kolajenöz olmayan proteinlerin yanı sıra OPN, çimento hatları, lamellar arayüzler ve mineralize kolajen fibrillerin interibriler boşlukları bakımından zenginleştirilmiştir.¹⁵²

Farklı kemik hiyerarşisi düzeylerinde malzeme özelliklerini ve bileşimi değerlendiren yaklaşımları birleştirerek, mevcut sonuçlar OPN'nin kemik matriksi malzeme özelliklerinin oluşturulmasına katıldığını ortaya koymaktadır. En önemlisi, OPN eksikliği, çatlak yayılmasını engellemede OPN'nin önemli bir rol oynadığını düşündüren, kırılma tokluğunun % 30 oranında azalmasına neden olur. Kırılma dayanıklılığındaki bu belirgin düşüş, tüm kemik kütlesi, yapısı veya matriks gözenekliliğindeki değişikliklerden bağımsızdır. Kırılma tokluğunun kaybindan potansiyel olarak sorumlu olan mekanizmaların araştırılması, OPN'den yoksun kortikal kemiğin önemli ölçüde azaltılmış indentasyon modülüne sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Modüldeki azalma, mineral konsantrasyonundaki yerel değişikliklere karşılık gelmese de, OPN eksikliği olan kemik matriksinin mineralizasyonu daha heterojendir. Bu özelliklerden bazıları, aynı zamanda önemli bir tokluk kaybı sergileyen osteoporotik kemik matrisinin bileşimsel ve mekanik özelliklerine benzer.¹⁵³ Mineralize dokudan üretililen çok işlevli bir glukoprotein olan OPN¹⁵⁴ osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve osteoblastik kemik oluşumunu azaltır.¹⁵⁵ Önceki çalışmalarda OPN'nin bifazik etkisi tartışılmış olup ve kemik oluşumu sırasında osteoblastik hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir.^{156, 157}

2.13. Osteokalsin (OCN)

Osteokalsin (OCN) (kemik γ karboksiglutamik asit –Gla protein veya BGP) Ca bağlayan bir protein olup, kemik, dentin ve diğer mineralize dokuda yüksek oranda bulunmasına rağmen diğer dokularda bulunmamaktadır. 46-50 aminoasitten oluşan bu proteinin molekül ağırlığı 5210-5889 arasında değişiklik gösterebilmektedir.¹⁵⁸

Kemik Gla proteini olarak da adlandırılan OCN osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. OCN, K vitaminine bağımlıdır. Kalsiyum metabolizması ve kemik mineralizasyonu düzenleyen hormonlardan (paratiroid hormon, kalsitonin, D vitamini) doğrudan etkilenir.¹⁵⁹ Hormonal durumdaki değişiklikler dolaşımdaki OCN düzeyini etkiler. OCN gen transkripsiyonları ve mRNA düzeyleri tiroid hormonu, paratroid hormonu, östrojen, sıklık adenizin monofosfat (cAMP) ve 1,25-dihidroksikolekalsiferol tarafından kontrol edilir. 1,25-dihidroksikolekalsiferol verilmesi ile OCN seviyeleri hızla artırır. D vitamininin eksik olması durumunda düşük veya normal OCN seviyeleri ölçülmüştür.^{160, 161} OCN ile ilgili çalışmalarda, spesifik bir osteoblastik bir belirteç olduğu ve kemik formasyonu esnasında meydana geldiği gösterilmiştir. OCN, kemik patolojilerinde teşhis parametresi olarak kullanılmaktadır. Kemik hastalığı dışındaki diğer hastalıklarda serum osteokalsin düzeyi normaldir. Biyosentezi üç vitamin ile ilgili

olup, K vitamini Gla formasyonunu, C vitamini hidroksiprolin oluşumunu, D vitamini OCN yapımının uyarılmasını sağlar.¹⁶² OCN mineral depolanmasını ve kemiğin yeniden şekillenmesini sağlar. Kalsiyum iyonunun kemik matrisine bağlanmasını sağlayarak yeni kemik oluşumuna yardımcı olur. Hidroksiapatit kristallerine yüksek ilgisi nedeniyle, kalsiyum iyonlarının özgül Gla bağlarına bağlanmasını ve bunların üzerine hidroksiapatit kristallerinin çökmesini sağlar. Kemotaktik etkisini yalnızca osteoklast öncü hücrelerine değil aynı zamanda periferik kan monositleri için de gösterir.¹⁶³

2.14. Sitokinler

Sitokinler, protein veya glikoprotein yapısında olan hücreler arası bilgi ve sinyal iletimi yapan moleküllerdir. Molekül ağırlıkları 6000-60000 dalton arasındadır. İmmün yanıt oluşumunda ve inflamasyonda önemli görevleri vardır.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶

Başlangıçta, sitokinlerin yalnızca lenfositlerden sentezlendiği düşünüldüğünden lenfokin olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda monositler tarafından da sentezlendiği ortaya konulmuş olup monokin olarakta isimlendirilmiştir. Makrofajlar tarafından üretilen sitokinlere monokinler, aktive olmuş T lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerden üretilen sitokinlere lenfokinler, lökositlere etki eden monokin ve lenfokinlere de interleukin (IL) adı verilmiştir.¹⁶⁷ Hücre yüzeyinde bulunan spesifik reseptörler aracılığıyla etkilerini gösterirler.¹⁶⁸ Sitokinlerin sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Sitokinleri kodlayan mRNA'lar stabil değildir. Sitokin salınımı kısa süreli olup kendini sınırlayan bir olaydır. Depolanamadıkları için ihtiyaç halinde yeni bir gen transkripsiyonu ile yeniden sentez ve salınımları gerçekleşir. Birbirlerinin sentez ve/veya salınımına etki ederek serum düzeylerini değiştirebilirler.¹⁶⁹ Hedef hücredeki spesifik membran reseptörlerine bağlanarak çok küçük konsantrasyonlarda bile etkilerini gösterebilirler.¹⁷⁰ Çok yüksek biyolojik aktiviteleri

sayesinde, spesifik reseptörü bulunan hücrelerde 10^{-10} - 10^{-15} mol/L konsantrasyonda bile uyarı oluşturabilirler.¹⁷¹ Farklı hücreler tarafından sentezlenip, salınan sitokinlerin aynı hücre üzerinde oluşturduğu etkiye pleiotropizm denilmektedir.¹⁷¹ Sitokinler etkilerini, otokrin (sentezlenen hücrelerin kendi salgısı ile etkilenmesi), parakrin (sentezlenen hücrenin yanındaki hücrelerin etkilenmesi), justakrin (bitişik hücreye etki) ve endokrin (uzakta bulunan hedef hücre üzerinde oluşturduğu etki) şeklinde gösterebilirler. IL-1 gibi hem parakrin hem de otokrin etki eden sitokinler de mevcuttur.¹⁷² İnflamasyon ve immün yanıtın oluşması ve düzenlenmesi, hematopoez, embriyogenez, organ gelişimleri, nöroendokrinolojik ve nöroimmünolojik aşamalarda da önemli rol oynamaktadır. Hücre yaşamı, farklılaşması, göçü ve ölümü olaylarında da rol alırlar.¹⁷³

Sitokinlerin Sınıflandırılması

Temel etkilerine göre sitokinler¹⁷⁴

1. Doğal immüniteye aracılık eden sitokinler:¹⁷⁴

- Tip I interferonlar (IFN)
- Tümör nekrotizan faktör (TNF)
- İnterlökin-1 (IL-1)
- İnterlökin-6 (IL-6)
- Kemokinler

2. Lenfosit aktivasyonu, büyüme, diferansiasyon regülatörleri olarak T lenfositlerinin özel antijenleri tanımalarına yanıtı temin eden sitokinler:¹⁷⁴

- İnterlökin-2 (IL-2) (T-hücresi büyüme faktörü)
- İnterlökin-4 (IL-4) (IgE sentez regülatörü)
- Transforming büyüme faktörü- β (TGF- β)

3. Bağışıklık aracılığıyla enflamasyonu düzenleyen sitokinler: ¹⁷⁴

Bu grup sitokinler antijenle uyarılmış CD4 + ve CD8 + T lenfositler tarafından uyarılırlar ve enflamatuvar lökositleri aktive ederler. Bu hücrelerin T hücresi regülasyonuna girmesini sağlarlar.

- İnterferon γ (IFN- γ) (Mononükleer fagositlerin birincil aktivatörü)
- Lenfotoksin (LT) (Nötrofil aktivatörü)
- İnterlökin 10 (IL-10) (Mononükleer fagositlerin negatif regülatörü)
- İnterlökin-5 (IL-5) (Eosinofil aktivatörü)
- İnterlökin-12 (IL-12) (Naturel Killer (NK) ve T hücre stimülatörü)

4. İmmatür lökosit büyüme ve farklılaşmasına aracılık eden mediatörler:¹⁷⁴

- C-kit-ligand · İnterlökin-3 (Koloni stimüle eden faktör)
- Granulosit-makrofaj koloni stimulatör faktör (GM-CSF)
- Monosit-makrofaj koloni uyaran faktör (M-CSF)
- Granulosit koloni stimülatör faktör (G-CSF)
- İnterlökin-7 (IL-7)
- İnterlökin-9 (IL-9)
- İnterlökin-11 (IL-11)

2.14.1. Tümör Nekrozis Faktör (TNF)

Kaşektin olarak bilinen TNF- α , infeksiyon ajanlarına karşı meydana gelen akut inflamatuvar yanıtın temel mediatörüdür. Proinflamatuvar bir sitokin olup, aktive olmuş monositler ve makrofajlar tarafından salgılanır.¹⁷⁵ TNF, gram negatif bakterilerin aktif bir hücre duvarı maddesi olan lipopolisakkarid (LPS) uyarımı ile salgılanır. Tümör dokusunu nekroze edebilme özelliğinden dolayı böyle adlandırılmıştır.¹⁷⁶ TNF- α ile tümör hücrelerinin etkisiz hale gelmesi, hayvan vücudunda makrofaj ve sitotoksik T hücrelerin tümöridal aktivitelerinin çoğunda etkili olmasıyla olmaktadır. Ancak TNF- α 'ya duyarlı olmayan tümörler için etkili değildir. TNF- α tümör dokularının

damarlanmasını zarar vererek tümör nekrozu oluşturur.¹⁷⁷ Yüksek dozda LPS verilmesi, B hücrelerini poliklonal olarak aktive eder, intravasküler koagülasyona ve şoka sebep olur. TNF- α , antijen ile uyarılmış T hücreleri, doğal katil (NK) hücreler, nötrofiller, aktive mast hücreleri ve LPS ile aktive olmuş mononükleer fagositlerde dahil olmak üzere inflamatuvar yanıtta görev alan çeşitli hücreler tarafından salgılanmaktadır.¹⁷⁶ İnsan TNF'si, nonglikolize bir transmembran protein olup, molekül ağırlığı 17 kDa'dır. İki çeşit TNF vardır. Genellikle aktif makrofajlardan salınan TNF- α (orijinal olarak kaşektin de denir) ve aktif T hücrelerinden salınan TNF- β (Lenfotoksin)'dir.^{178, 179} TNF süper ailesi TNF- α , TNF- β , Fas ligand, CD40 ligand ve diğer bazı proteinleri içerir. TNF- α monomerik tip 2 transmembran prekürsör protein (tmTNF) olarak 26 kDa moleküler ağırlıkta bir protein olarak üretilir. Daha sonra TNF- α dönüştürücü enzim tarafından (TACE) parçalanır ve 17 kDa moleküler ağırlığında çözünebilen bir sitokine (sTNF) dönüşür. TNF- α , 55 kDa TNF reseptör 1 (TNFR1) ve 75 kDa TNF reseptör 2 (TNFR2) olmak üzere 2 farklı reseptörün hücre yüzeyine bağlanarak etki gösterir.¹⁸⁰ İnflamatuvar yanıtın çoğunun TNFR1 aracılığıyla oluştuğu düşünülmektedir. İn vivo çalışmalarla TNFR2'nin sinyallerinin, TNF tarafından oluşturulan inflamatuvar yanıtı azalttığı gösterilmiştir.^{181, 182} TNF'nin mikrobiyal patojenlere karşı dirençteki önemli rolü yapılan deneysel çalışmalar ile gösterilmiştir.¹⁸³ Deneysel çalışmalarla TNFR1 ve/veya TNFR2 reseptörlerinin çıkarıldığı farelerde bu reseptörlerin görevleri daha iyi tanımlanmıştır.^{182, 184} TNFR reseptörleri çıkarılan farelerde enfeksiyon ajanlarına karşı aşırı hassasiyet meydana gelmektedir.¹⁸⁵ TNF- α salınımı, akut travmaya bağlı olarak hızlı ve kısa süreli olarak meydana gelir. Deneysel çalışmalarda, akut inflamasyonda TNF'nin monofazik bir eğri çizdiği, 90 dakikada pik yapıp 4 saat içinde ölçülemeyecek düzeye indiği gösterilmiştir. Yarı ömrü 15–18 dakikadır. TNF- α 'nın ortamda kısa süreli bulunmasıyla bile önemli hemodinamik ve metabolik değişiklikler meydana gelir ve

diğer sitokinlerin aktive olmasını sağlar. Reseptörlerinin çok çeşitli yerlerde bulunmasına bağlı olarak, multipl sinyal üretim mekanizmalarını aktive etmesi ve çok sayıda genin ekspresyon, indüklemeye veya baskılama özelliğinden dolayı son derecede pleiotropik bir sitokindir.

TNF- α 'nın biyolojik yanıtı konsantrasyonuna bağlı olup, düşük konsantrasyonda lokal etki meydana getirir. TNF'nin düşük konsantrasyonda biyolojik etkileri şöyledir:

1. Damar endotelinde bulunan adhezyon moleküllerinin çıkmasına neden olarak, nötrofil ve mononükleer lökositlerin endotele yapışmasını sağlar. Sonuçta inflamatuvar reaksiyona neden olan hücrelerin infeksiyon alanına göçü sağlanır.
2. Mononükleer fagositler, eozinofil ve nötrofillerin mikroorganizmaları öldürmeleri için aktive eder.
3. İnflamatuvar yanıtta rol alan hücrelerde TNF- α , IL-1, IL-6 ve kemokin gibi sitokinlerin sentez ve salınımını uyarır.

4. TNF sitokin salgılatma özelliğiyle T ve B hücre aktivasyonunu da etkiler.¹⁷³

TNF'nin yüksek konsantrasyonda biyolojik etkileri şöyledir:

1. Endojen pirojen olarak davranıp hipotalamusu uyarır ve IL-1 sayesinde ateş yükselmesine sebep olur. Hipotalamusun sitokinle uyarılması sonucu prostaglandin E2 sentezlenmesi nedeniyle ateş yükselmesi meydana gelir.
2. IL-1, IL-6 ve TNF salgılanmasını artırır.
3. Hepatositleri etkileyerek IL-1'inde etkisiyle bazı serum proteinlerinin sentezini artırır. Bunun yanı sıra IL-1 ve IL-6'nında ortak etkileriyle inflamasyon durumlarında akut faz proteinlerinin sentezlenmesini de sağlamaktadır.

4. Damar endotelinde prokoagulan ve antikoagulan aktivitesindeki dengeyi bozarak koagülasyon sisteminde aksaklıklara neden olur.
5. Kemik iliği üzerine baskı yapar, kronik durumda immün yetmezlik ve lenfopeni oluşur.
6. Hayvan deneylerinde uzun süre TNF verilmesi durumunda, kas ve yağ hücrelerinin kaybolduğu, kaşeksi meydana geldiği tespit edilmiştir. Kaşeksi oluşumunda IL-1’inde etkisi vardır. Gram negatif bakterilerin neden olduğu sepsislerde, yüksek konsatrasyonda TNF meydana gelir. Hayvan deneylerinde yüksek doz TNF verilmesi durumunda, dolaşım kollapsı ve intravasküler koagülasyon nedeni ile ölüm olur. Endotoksik veya septik şoktan ölümün önlenmesi için nötralizan antikor uygulaması gereklidir.
7. Ağır metabolik bozukluklar oluşabilir. TNF α ’nın birçok fizyolojik etkisi IFN- γ tarafından artırılır. Bu etki; TNF- α reseptör sayısının IFN- γ ile uyarılarak artırılması ile sağlanabilir.¹⁸⁶⁻¹⁸⁸

2.14.2. İnterlökin 1 (IL-1)

IL-1, inflamasyon dönemi boyunca meydana gelen genleri direkt olarak düzenleyen ve biyolojik aktiviteleri çok geniş olan proinflamatuvar bir sitokindir.¹⁸⁹ Mononükleer fagosit hücreler tarafından T hücresinin antijenik uyarımı esnasında salgılanır. Polipeptit yapısındadır. T hücresi yardımcı uyarıcı olarak ta işlevi vardır. IL-1, antijen tarafından aktive edilmiş T hücresi tarafından, endotel ve epitel hücrelerinden ve bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) uyarımları ile de salgılanmaktadır.¹⁷⁶ IL-1 ailesi agonist etkili olan, IL-1 α ve IL-1 β ile bunların reseptörlerine bağlanan IL-1 reseptör antagonisti (IL-1ra) olmak üzere 3 forma sahiptir. IL-1 α ve IL-1 β genel olarak benzer etkiler gösterirler. Hedef hücrelerin yüzeyinde IL-1 reseptör-1 (IL-1R1) ve IL-1 reseptör-2 (IL-1R2) olmak üzere her iki IL-1 reseptörü de mevcuttur.¹⁹⁰ IL-1R1

tarafından, IL-1'in yanıtlarının çoğunun düzenlendiği, IL-1R2'nin ise genel olarak tuzak reseptör işlevi gördüğü düşünülmektedir.¹⁹¹ Ancak hücresel aktivitenin düzenlenmesinde de etkili olduğuyla ilgili çalışmalar mevcuttur.¹⁹² IL-1 α ve IL-1 β ligandlarının veya IL-1R1'in farelerde yapılan çalışmalarda deneysel olarak baskılanmasıyla ortaya çıkan IL-1 aktivite eksikliğinin, inflamatuvar cevabın azalmasına ve bazı enfeksiyonlara yatkınlığa neden olduğu kanıtlanmıştır.¹⁹³ Deneysel çalışmalarda IL-1R1'in çıkarıldığı farelerin (IL-1R1-/-) gelişimleri normal olduğu, kilo veya büyüklük anomalilerinin olmadığı ve eksojen antijenlere karşı antikor geliştirmeye devam ettikleri gözlemlenmiştir. Ancak enfeksiyon ve yaralanmalara karşı oluşan yanıtta akut faz proteinlerinin azaldığı ve buna bağlı olarak azalmış hipersensitivite yanıtı tespit edilmiştir.¹⁹⁴ IL-1 doğumsal kalp yetmezliği, astım, septik şok ve erken doğumunda aralarında bulunduğu çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol almaktadır.¹⁹⁵ ¹⁹⁶ IL-1 kolajenaz, fibroblast çoğalması ve PGE-2 üretiminde rol almaktadır. Osteoklastlara olan etkisiyle kemik geri emiliminde de rol oynar.⁹⁴ Kırık iyileşme sürecinde çeşitli interlökinler görev almasına rağmen, IL1 ve IL-6'nın önemleri büyüktür. IL-1 konsatrasyonunun yükselmesi, osteoblastlar tarafından salınan IL-6 miktarını artırır. ILR-1 ve ILR-2'ye etki ederek damarlanmayı uyarır ve kırıkta kallus gelişimini sağlar.⁶² Kırık bölgesinde yoğunlaşan IL-1 ve TNF- α sayesinde, nötrofillerin kırık alanına göç etmesi sağlanır. Diğer hücrelerin kırık bölgesine göçünü nötrofil göçü olumsuz yönde etkilemez.⁶⁶

2.14.3. İnterlökin- 17

Memelilerde, interlökin-17 sitokin ailesi IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ve IL17F olmak üzere altı üyeden oluşmaktadır. İnsan IL-17A (diğer ismi IL-17) sitokini, moleküler ağırlığı 15 kilodalton (kDa) olan 155 aminoasitten oluşan bir protein olup, 30-35 kDa ağırlığında disülfide bağlı bir glikoprotein olarak salgılanır.¹⁹⁷ IL-17A

ve IL-17F üretimi, esas olarak T helper 17 (Th17), CD4+ T, CD8+ T, $\gamma\delta$ T hücreleri tarafından sağlanmaktadır. Doğal bağışıklık sistemi üyeleri olan nötrofil, doğal öldürücü hücreler, monosit ve lenfoid doku indükleyici benzeri hücrelerin de hızla IL-17A ve IL-17F üretebildiği gösterilmiştir. Meme kanseri metastazında, mantar enfeksiyonları, astım gibi çeşitli hastalıklarda, makrofajlar ve nötrofil gibi diğer immün sistem hücrelerinden de IL-17 salgılandığı bildirilmiştir.^{198, 199} Romatoid artrit ve psöriaziste de mast hücrelerinden IL-17 sentezlendiği kanıtlanmıştır.^{200, 201} IL-17A'ya yapısal olarak benzerlik gösteren beş ek sitokin tanımlanmıştır. IL-17 ailesinin bu beş üyesi IL-17A ile %16-50 oranında aminoasit özdeşliği gösterir. IL-17A ve IL-17F, %50 ile en yüksek homoloji derecesini göstermektedir. IL-17E ise IL-17A'ya %16 ile en az benzerlik gösteren aile üyesidir. Aminoasit benzerliği C-terminali ve beş sistein kalıntısında daha yüksektir. Bu sistein kalıntılarından dördü, TGF β , sinir büyüme faktörü, kemik yapısal proteini (BMPs) süper ailelerindeki sistein kalıntıları ile benzerlik göstermektedir.²⁰²

İnterlökin 17 reseptör (IL-17R) ailesi, IL-17RA, IL17-RB, IL17-RC, IL17-RD ve IL17-RE reseptörlerinden oluşur. IL-17A ve IL-17F, IL17-RA ve IL17-RC reseptörlerine bağlanır. Bu reseptörlerin IL-17A ve IL-17F'ye farklı afiniteleri vardır. IL-17RA ve IL- 25 17RC'nin doku dağılımı da farklıdır. Sitokinlerin bazı fonksiyonel ayrışmalarına bu farklılıklar sebep olur.²⁰³

IL-17RA başlıca hematopoetik hücrelerde bulunurken; endotel hücreleri, osteoblastalar, dentritik hücreler, fibroblastlar, lenfositler, makrofajlar, keratinositler, gingival epitel hücrelerinde de bulunmaktadır.²⁰⁴

IL-17RC öncelikle IL-17'nin öncelikle etkisini gösterdiği mezenkimal, epitel ve endotel hücreleri gibi hematopoetik kökenli olmayan hücrelerde bulunur.^{205, 206} Makrofajlar hem IL-17RA hem de IL-17RC'yi taşıyan bir istisna olarak görülmektedir.

IL-17B ve IL-17C fonksiyonları henüz tam olarak tanımlanamamasına rağmen dokulara geniş oranda ekspresse olur. IL-17B, IL-1 β ve TNF- α 'nın salınımını uyarır. IL-17C, dendritik hücreler ve makrofajlar tarafından salgılanır. IL-17C enfeksiyonlara karşı vücudun savunmasında görev alır.²⁰⁵

IL-17D (IL-22 olarak da bilinir) IL-17B'ye en fazla homoloji derecesi göstermektedir. İskelet kaslarında, kalp, akciğer, pankreas, beyin ve adipoz dokuda yüksek oranda üretilmektedir. IL-17D, IL-6 ve IL-8 salgılanmasını stimüle ederek hemotopoezi baskılar.²⁰⁷

IL-25 olarak da bilinen IL-17E'nin ana kaynağı Th2 hücreler olmasına rağmen, IgE çapraz bağlanması sonucu aktive mast hücrelerinden, epitelyal hücrelerden, atopik kişilerde bazofil ve eozinofillerden de sentezlenebilmektedir. IL-17 ailesinin diğer üyelerinden farklı olarak IgE ve IgG1'in ve antienflamatuar sitokinler olan IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi Th2 tip sitokinlerin salınımını artırır.²⁰⁸

Bir yönüyle alerjik hastalıklara karşı antienflamatuar fonksiyonlar gösterse de, diğer yönüyle deri hastalıklarında proenflamatuar özellikleri bulunmaktadır. Bu fark IL-17E'nin dokuya özgü etkilerinden kaynaklanmaktadır.²⁰⁹

IL-17A ve IL-17F'nin bağırsaklar, oral kavite, akciğer gibi mukozal bölgelerdeki konak savunmasında önemli rolleri vardır. Mukozalarda, IL-17 üreten hücreler daha fazla olduğu gibi, Th17 hücreler de üzerlerinde kendilerini mukozal alanlara yönlendirecek reseptörler taşırlar. IL-17A ve IL-17F'nin fazla üretimi, abartılı bir inflamasyon yanıtına ve doku zedelenmesine sebep olabilmektedir.²¹⁰ Pulmoner, kardiyak ve karaciğer fibrozisinde IL-17 sinyalizasyonu rol almaktadır.^{211, 212} Osteoklastların olgunlaşmasını ve kemik rezorbsiyonunu indükleyen osteoklast farklılaşma faktörünü (ODF) uyarabilir.²¹³ Matriks metalloproteinazları (MMP-1, MMP-3, MMP-9 ve MMP-13), IL-17'ye cevap olarak salınırlar ve matriks yıkımına

sebeap olarak kemik rezorbsiyonu oluşumunda rol oynarlar. IL-17, osteoblastlardan RANKL salımını arttırarak osteoprotegerin salımını azaltır. RANK osteoklast progenitör hücre yüzeylerinde yer alır ve RANKL'a bağlanarak aktif hale gelir. Bu durum osteoklastların meydana gelmesi ve kemik rezorbsiyonu için şarttır.²¹⁴ Yani IL-17 osteoklastogenez ve kemik yıkımı üzerindeki indirekt olarak etki etmektedir. Ayrıca TNF- α ve IL-1 β gibi osteoklastik sitokinlerin aktivitesini arttırıp kemik yıkımında rol oynar.²¹⁵

2.15. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, molekül ağırlığı düşük, kararsız, kısa ömürlü ve çok etkin moleküllerdir. Moleküllerin dış yörüngesinde biri diğerine zıt yönde dönen elektron çiftleri mevcuttur. Oldukça reaktif olup, elektronlarını eşleştirmek için başka moleküller ile reaksiyona girme eğilimindedirler.²¹⁶ Aerobik hücre metabolizma ürünü olarak devamlı üretilirler ve antioksidan savunma sistemi sayesinde dengede tutulurlar. Oksidan ve antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulmasına oksidatif stres denilmektedir. Serbest radikallerin ömürleri çok kısadır. Serbest radikaller protein, lipid ve nükleik asit gibi moleküller ile etkileşerek, hücrelerin yapısı ve fonksiyonlarında hayati değişikliklere sebep olmaktadır. Antioksidan kapasitenin sürekli yenilenmesi, homeostazisin sürdürülebilmesi için gereklidir.^{216, 217} En önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijenin redüklenmesi ile hidrojen peroksit, hidroksil radikali, süperoksit anyonu ve singlet oksijen gibi serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır.²¹⁸ Serbest oksijen radikallerinin oluşumunda, öncelikle moleküler oksijene tek elektron transferi ile süper oksit ($O_2 \cdot^-$) radikali oluşur. Süperoksit radikali, tek başına fazla zararlı değildir. Süperoksit iki elektron transferiyle daha zararlı olan hidrojen peroksit (H_2O_2)

meydana gelir. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen ürünleri Tablo 2.5’de gösterilmektedir.²¹⁹

Tablo 2.5. Reaktif Oksijen Ürünleri

Reaktif Oksijen Ürünleri			
Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	O ₂ ⁻	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Hidroksil	OH	Singlet oksijen	*O ₂
Peroksil	ROO-	Ozon	O ₃
Alkoksil	RO-	Lipid hidroperoksit	LOOH
Hidroperoksil	HO ₂ -	Hipokloröz asit	HOCl
Lipidalkoksil	LO-	Organik peroksit	ROOH
Ariloksil	ArO [•]	Hipobromöz asit	HOBr

Endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bilinen nitrik oksit (NO⁻), reaktif nitrojen türleri arasında en önemlisidir. Hücre sinyal iletiminde görev alır. Ortalama ömrü 20-30 saniyedir.²¹⁹

Reaktif nitrojen ürünleri Tablo 2.6’de gösterilmektedir.

Tablo 2.6. Reaktif Nitrojen Ürünleri

Reaktif Nitrojen Ürünleri	
Radikaleler	
Nitrik oksit	NO
Nitrojen dioksit	NO ₂ ⁻
Radikal Olmayanlar	
Nitrous asit	HNO ₂
Peroksinitrit	ONOO
Peroksinitrous asit	ONOOH
Dinitrojen trioksit	N ₂ O ₃
Dinitrojen tetraoksit	N ₂ O ₄
Nitroksil anyon	NO ⁻
Azot oksit	N ₂ O
Nitrosil katyon	NO ⁺
Nitronyum (nitril) iyonu	NO ₂ ⁺
Nitril klorür	NO ₂ Cl
Alkil peroksinitritler	ROONO

Peroksinitrit, nitrik oksit ile süperoksitin katıldığı reaksiyon ile meydana gelmektedir.²²⁰ Fizyolojik pH’da, süperoksit ve nitrik oksitten çok daha güçlü, son derece reaktif bir oksidandır. Yarı ömrü 10-20 saniyedir.²²¹ Endotel ve epitel hücre

hasarına, eritrositlerin parçalanmasına ve trombositlerde fonksiyon bozukluğuna sebep olmaktadır. Aterosklerotik plak oluşumu, DNA hasarı ve vasküler doku hasarına sebep olur.^{217, 222, 223}

2.15.1. Serbest Radikallerin Oluşum Kaynakları

Endojen Kaynaklar

Organizmada birçok fizyolojik olaylar neticesinde serbest radikaller oluşmaktadır. Serbest radikallerin meydana gelmesinde mitokondriyal elektron taşıma zinciri çok önemlidir. Serbest radikallerin oluşmasını sağlayan endojen kaynakların en önemlileri, endoplazmik retikulum ve nükleusun iç membranlarında sitokromların oksidasyonu, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla ATP (adenozin trifosfat)'nin oluşumu ve endojen bileşiklerin hidroksilasyonudur.²²⁴

Eksojen Kaynaklar

Eksojen kaynaklar, dışarıdan aldığımız veya maruz kaldığımız kaynaklardır. Kirli hava, sigara, stres, alkol, ilaçlar, güneş ışınları, petrol ürünleri, pestisitler eksojen kaynaklara örnek olarak verilebilir.²²⁵

2.15.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, canlı organizmada bulunan lipidler, emzimler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi organizma için önemli tüm molekülleri etkilerler. Süperoksit ve hidroksil radikali mitokodri, sitoplazma, endoplazmik retikulum membranlarında ve nükleusta lipid peroksidasyonuna neden olur. Bunun sonucunda membran permeabilitesi artar.²²⁶ Serbest radikallerin proteinlerde oluşturduğu hasar aminoasit yapılarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren aminoasitlerin (histidin, tirozin, triptofan, metiyonin, sistein, fenilalanin) serbest radikallerle etkileşimi sonucu kimyasal değişiklikler oluşmaktadır. Serbest radikallerle reaksiyon sonucunda albümin ve immünoglobülin G gibi bazı proteinlerin yapıları tamamen hasar görüp artık işlevsiz

hale gelirler. Serbest radikaller protein yapısında olan enzimlerde zarar vermektedir.²²⁷ Serbest radikaller, karbonhidratların oksidayonuna sebep olarak yaşlanma, inflamatuvar eklem hastalıkları ve kanser gibi çeşitli hastalıkların meydana gelmesinden de sorumludur. Hücre bileşenlerine serbest radikallerinin tüm bu etkileri neticesinde hücre hasarı oluşur. Hücre hasarının en önemli nedeni reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikallerin hücrede artmasıdır. Serbest radikaller üç ana hücresel bileşene saldırarak zarar verirler.²²⁸

1. Lipitler üzerine etkileri:

Serbest radikallerle en kolay reaksiyona giren biyomoleküllerdir. Serbest radikaller hücre membranlarında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağlarını kolayca etkileyerek peroksidasyon ürünleri meydana getirirler. Lipid peroksidasyonu lipoproteinler, diğer lipid içeren yapılar ve hücre mebranının oksidatif hasarının iyi bilinen bir örneğidir. Hücre membranı ve diğer bölgelerdeki kolesterol, doymamış fosfolipidler ve glikolipidler serbest radikallerin hedefidir.²²⁹ Meydana gelen oksidatif hasar ile hücre membranının permeabilitesini bozular, hızlı bir şekilde hücre ve doku hasarları meydana gelir. Lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılması ile birçoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler meydana gelir. Oluşan bileşikler metabolize edilemezse, hasar bu bileşikler tarafından hücrenin diğer bölümlerine de yayılır. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) oluşur. İdrarda ve kanda gözlenir.²³⁰ Lipid peroksidasyonu, doku hasarının iyi bir göstergesidir. İn vivo lipid peroksit seviyesi, biyolojik materyalde MDA seviyesinin tespiti ile mümkündür. Tiyobarbitürik asit testi ile MDA miktarının ile ölçümü yapılmaktadır.²³¹

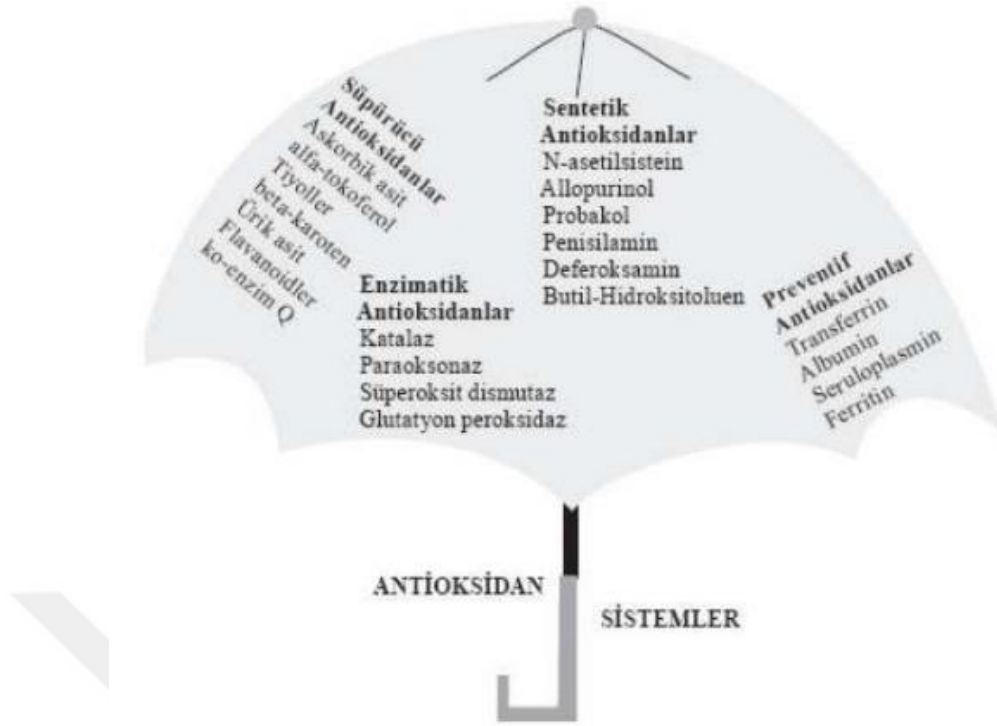
2. Proteinler üzerine etkileri:

Serbest radikallerden yağ asitleri kadar kolay etkilenmezler. Kükürt ve doymamış bağ içeren histidin, sitein, triptofan, metiyonin, fenilalanin gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha çok etkilenirler. Proteinler ve serbest radikallerin etkileşimi sonucunda, proteinlerin tersiyer yapıları hasar gördüğünden normal işlevlerini sürdüremezler.²²⁸

3. DNA üzerine etkileri: Yalnızca kopyalanarak meydana gelen bir molekül olmasından dolayı, DNA 'da meydana gelen herhangi bir hasar mutasyonlara ve genetik bozukluklara neden olmaktadır. DNA hasarı, reaktif oksijen türleri ile indüklenen hücresel değişikliklerin en ciddisidir denilebilir. İyonize edici radyasyon ile meydana gelen serbest radikallerin DNA'yı etkilemesi sonucu hücrede mutasyon ve sonuç olarak hücre ölümü olur.²²⁸ Normal metabolizma tarafından ya da ekzojen kaynaklarla oluşan serbest radikaller oksidatif DNA hasarına yol açarak mutageneze, karsinogeneze ve yaşlanmaya neden olurlar.²³²

2.16. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, organizmada bulunan lipid, karbonhidrat, protein ve DNA gibi maddelerin oksidasyonlarını engelleyen veya okside olmalarını geciktiren maddelerdir. Endojen kaynaklı antioksidanlar veya ekzojen kaynaklı antioksidanlar mevcuttur.²³³ Antioksidanlar etkilerini, radikal oluşumunu engileyerek, oluşan radikali tutarak, oluşmuş hasarı onararak veya hasara uğramış hücreyi yenileyerek gösterebilirler (Şekil 2.4).²³⁴



Şekil 2.4. Antioksidan Sistemler

2.16.1. Eksojen Antioksidanlar

İlaçlar, vitaminler ve gıda antioksidanları olarak ayırabiliriz. Vitamin antioksidanlara örnek olarak askorbik asit (vitamin C) , β -karoten, Vitamin E (α -tokoferol) ve folik asit (folat) gösterilebilir. Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz (NADPH) inhibitörleri, rekombinant süperoksit dismutaz, ksantin oksidaz inhibitörleri, demir redoks döngüsü inhibitörleri, demir şelatörleri, nötrofil adezyon inhibitörleri, sitokinler (TNF ve IL-1) ve barbitüratlar ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlara örnek olarak gösterilebilirler.

2.16.2. Endojen Antioksidanlar

Enzim olan endojen antioksidanlar: 1) Süperoksit dismutaz (SOD) 2) Glutasyon S-Transferazlar (GST) 3) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) 4) Katalaz (CAT) 5) Hidroperoksidaz 6) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi

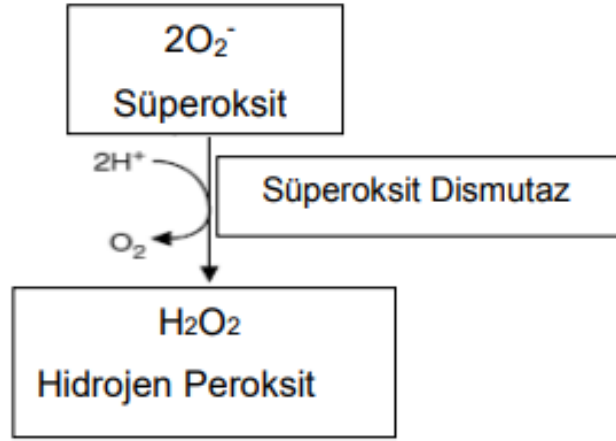
Enzim olmayan endojen antioksidanlar: 1) Hemoglobin 2) Ferritin 3) Albumin 4) Glutasyon 5) Sistein 6) Seruloplazmin 7) Bilirubin 8) Miyogloblin 9) Transferritin 10) Metiyonin 11) Ürat 12) Laktoferrin 13) Melatonin

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Scavenging(Temizleme) Etkisi: Antioksidan enzimler tarafından oluşturulan bu etki ile oksidanlar daha zayıf bir moleküle çevirirler.
2. Quencher(Baskılama) Etkisi: Antioksidan vitaminler ve flavonoidler tarafından oluşturulan bu etkide oksidanlara bir hidrojen aktarılarak etkisiz hale getirilir.
3. Onarma Etkisi(Repair Etki): Oksidatif hasara uğramış DNA molekülünün enzimler tarafından tamir edilmesi örnek olarak verilebilir.²³⁵
4. Zincir Koparma Etkisi: Hemoglobin, E vitamini ve seruloplazmin tarafından oksidan molekülleri bağlayarak fonksiyonlarının engellenmesi şeklinde meydana gelir.²³⁶

Süperoksit Dismutaz(SOD)

Süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metalloenzimdir. (Şekil 2.5.) SOD ve GPx enzimleri, serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı oluşturulmuş önemli bir savunma mekanizmasıdır.²³⁷ SOD organizmada mitokondri, sitozol ve ekstraselüler matrikste bulunur. Bilinen tek substratı süperoksit radikalıdır.²³⁸



Şekil 2.5. Süperoksit radikalının SOD tarafından dismutasyonu.

Katalaz (CAT)

Hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüştürüldüğü reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Hücre içerisinde peroksisomlarda bulunur. SOD'a benzer şekilde etki gösterir.²³⁹

Glutatyon Peroksidaz(Gpx)

Redükte glutatyonu(GSH) yükseltir. Aynı zamanda H₂O₂'i de suya çevirir. GPx iyi bilinen doğal bir antioksidandır. Eritrositlerde bulunan en kuvvetli antioksidan olup, hemoglobini ve membran lipidlerini oksidatif strese karşı korur. GPx enziminin integral parçası selenyum olduğundan, selenyum eksikliğinde GPx yetersizliği oluşabilir. GPx aktivitesi için GSH gereklidir.²⁴⁰

Glutatyon Redüktaz(GR)

Yükseltgenmiş(okside) glutatyonu indirgenmiş hale çevirir.²⁴¹

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Askorbik Asit

C vitamini birçok enzimin kofaktörü olarak görev yapar. Suda çözünen ve biyolojik sıvılarda en çok bulunan antioksidandır. C vitamini, serbest radikal toplayıcısı ve indirgeyici ajandır.²³⁹

β -Karoten(Vitamin-A Ön Maddesi)

A vitamini prekürsörü olup antioksidan özelliği de vardır. Lipit peroksidasyonunu önler. Radikal toplayıcı olarak etki edebildiği gibi zincir kıran antioksidan olarak peroksit radikallerin meydana gelmesini engeller.²⁴²

Vitamin-E(α -Tokoferol)

Yağda çözünen bir antioksidan olup, zincir-kırıcı etkisiyle membran lipitlerindeki yağ asitlerini serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerinden korur.²⁴³

Transferin ve Laktoferrin

Demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarını ve lipid peroksidasyonunu, demiri bağlama yeteneğiyle yavaşlatır veya durdurur.²⁴³

Seruloplazmin

Bakır içeren ve taşıyan akut faz proteinidir. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu engeller. Süperoksit radikali ile de reaksiyona da girer.²³⁹

Albumin

Etkisini kuvvetli şekilde bakırı ve daha zayıf olarak da demiri bağlayarak gösterir.²⁴³

Ürik Asit

Etkisini kuvvetli şekilde demir ve bakırı bağlayarak gösterir. Serbest radikalleri temizler ve lipid peroksidasyonunu engeler.²⁴³

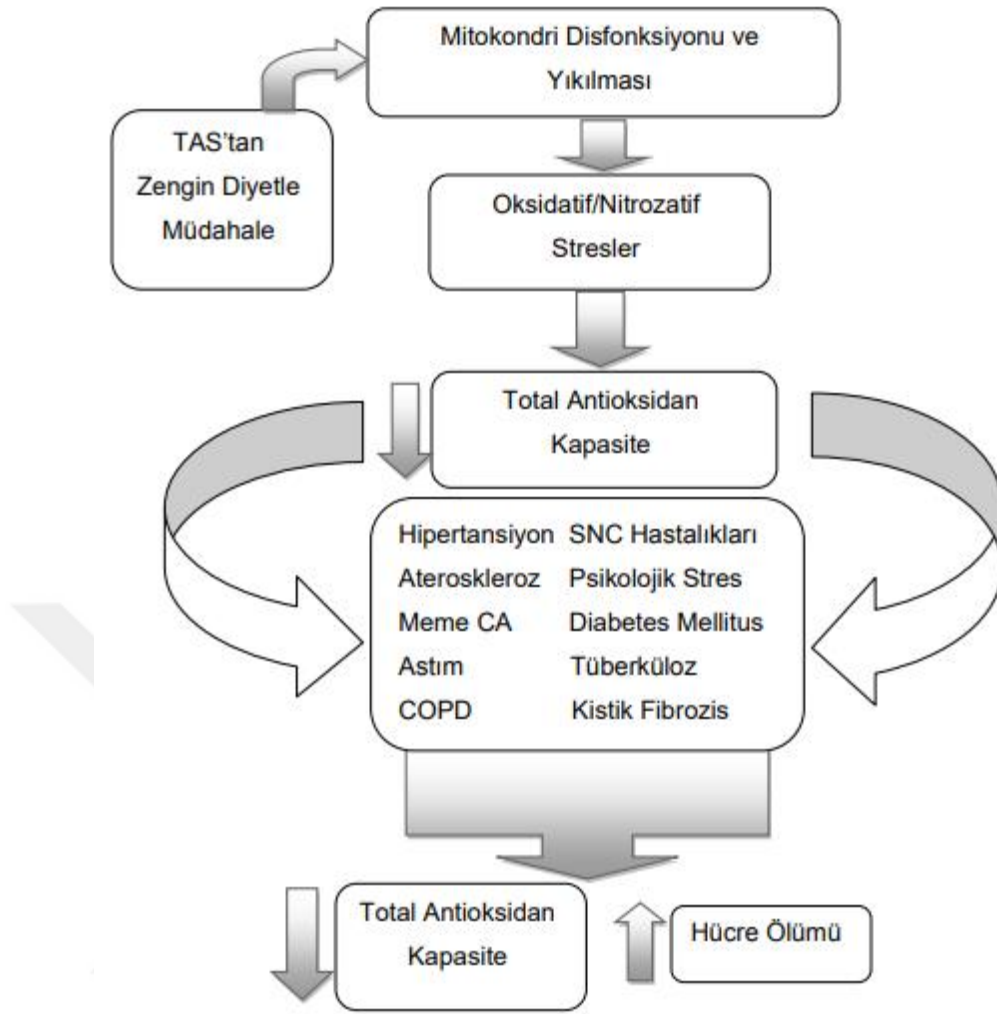
Bilirubin

Yağ asitlerini peroksidasyona karşı korur.²⁴³

2.17. Total Antioksidan Kapasite (TAS), Total Oksidan Kapasite (TOS) Ve Oksidatif Stres İndeksi (Osi)

Sağlıklı bir organizmada normal fizyolojik şartlarda, endojen veya eksojen sebeplerle oluşmuş serbest radikaller ve oluşan oksidatif strese karşı organizmayı

koruyan gelişmiş bir antioksidan savunma sistemi mevcuttur. Kan dolaşım sistemi, antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirdiğinden, vücudun oluşan oksidan durumlara karşı cevabında çok önemlidir. Total oksidan kapasite çoğunlukla endojen olarak vücutta oluşan serbest oksijen moleküllerinin yan ürünlerinden meydana gelmektedir. Canlı organizmada hayatın normal akışında veya patolojik olarak serbest radikaller meydana gelir. Oluşan bu zararlı ürünler sentez edildikleri yerde etkisiz hale getirilmezlerse zararlı etkileri ortaya çıkar. Total antioksidan kapasiteye en fazla katkısı plazmada bulunan antioksidan molekülleri sağlamaktadır. Plazmada seruloplazmin, bilirubin, ürik asit, transferrin, E vitamini, C vitamini gibi antioksidanlar mevcuttur. Plazmada bulunan antioksidanlar sürekli etkileşim halindedirler ve genel olarak ta sinerjistik etki göstermektedirler. Glutasyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesine neden olması bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Organizmada bir antioksidan düzeyindeki azalma diğer antioksidanların artışları ile dengelenebilmektedir. Oksidatif stres ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmek amacıyla oksidan ve antioksidan moleküllerini tek tek ölçmek yerine total olarak ölçümünü sağlayan yöntemler kullanılmaktadır.^{244, 245} TOS miktarının, TAS miktarına oranlanmasıyla oksidatif stres indeksi(OSİ) hesaplanır. Oksidatif stres indeksi oksidan antioksidan dengesinin yönünü gösterir. Total antioksidan kapasitenin patofizyolojisi²⁴⁶ Şekil 2.6'da gösterilmiştir.



Şekil 2.6. Total Antioksidan Kapasitesinin Patofizyolojisi.

2.17.1 Total Oksidan Kapasite

Organizma, normal fizyolojik koşullarda endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir.²⁴⁴ Normal metabolik olaylar sırasında sürekli olarak serbest radikaller meydana gelmektedir. Serbest radikaller, mitokondriyal solunum zincirinde, karaciğer karışık fonksiyonlu oksidaz ve ksantin-ksantin oksidaz aktivitesi aracılığıyla, atmosferdeki kirlenmeler, geçiş metallerinin katalizlediği reaksiyonlar, ilaç ve ksenobiyotik metabolizmasındaki reaksiyonlar gibi çeşitli nedenlerle meydana gelirler. Ayrıca ateş, enfeksiyon, açlık, laktasyon ve egzersiz vb.

durumlarda lipidlerin kimyasal mobilizasyonu ile radikal aktivitelerinde artış meydana gelir ve doku hasarı oluşur. Serbest oksijen radikalleri, proteinlerde glikasyona, enzimlerde inaktivasyona neden olmaktadır.²⁴⁷

2.17.2. Total Antioksidan Kapasite

Antioksidanlar, hem organizmada tarafından oluşturulan zararlı bileşenlerin, hem de hava kirliliği, sigara, alkol, radyasyon gibi vücudumuzu dışarıdan etkileyen maddelerin zararlı etkilerini engellerler. Antioksidanlar, serbest radikallerin sentez ve salınımlarına engel olarak oksidatif reaksiyonları yavaşlatarak veya durdurarak etki ederler. Serbest radikallerin sebep olduğu parkinson hastalığı, demans, mongolizm, nörodejenerasyon, anemi, artrit, iskemi-reperfüzyon hasarı, yaşlanma, enflamasyon gibi çeşitli hastalıkların oluşmasını engellemede önemli rol oynarlar. A, C ve E vitaminleri, flavonoidler, alfa- lipoik asit ve karotenoidler önemli eksojen antioksidanlara örnek olarak gösterilebilir.²⁴⁷ Total antioksidan kapasiteye en büyük katkıyı plazmadaki antioksidan moleküller sağlamaktadır. Plazmada bilirubin, serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin, ürik asit, C vitamini, E vitamini gibi proteinlerin yanısıra serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır. Serumda ölçülen TAS miktarını yüksek oranda tiyol grubu bileşikler, bilirubin, C vitamini ve ürik asit oluşturmaktadır. İnsan plazmasında ölçülen total antioksidan kapasitenin yaklaşık %85'inden fazlası askorbik asit, ürik asit ve albüminden oluşmaktadır. Bunun sebebi, kanda bulunan bilirubin, alfa tokoferol, flavonoidler, glutatyon ve beta karoten gibi antioksidan sistem bileşenlerine göre askorbik asit, ürik asit ve albumin düzeylerinin fazla olmasıdır. Fakat yenidoğanlarda, TAS'ın en önemli komponentlerini ürik asit ve bilirubin oluşturmaktadır. Özellikle yenidoğanda E ve C vitaminleri, sülfidril grupları ve bilirubin gibi bağ kıran antioksidanlar total antioksidan kapasite için oldukça önemlidirler.²⁴⁸ Total antioksidan kapasiteye en fazla katkıyı plazmada bulunan

antioksidan molekülleri sağlamaktadır. Plazmada seruloplazmin, bilirubin, ürik asit, transferrin, E vitamini, C vitamini gibi antioksidanlar mevcuttur. Plazmada bulunan antioksidanlar sürekli etkileşim halindedirler ve genel olarak sinerjist etki göstermektedirler. Glutasyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesine neden olması bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Organizmada bir antioksidan düzeyindeki azalma diğer antioksidanların artışları ile dengelenebilmektedir.²⁴⁴ Patojenik durumlar sırasında meydana gelen oksidatif hasarın derecesi sadece serbest radikal üretimiyle değil antioksidan savunma kapasitesiyle de bağlantılıdır. TAS ve TOS düzeylerinin birlikte ölçülmesi ve Oksidatif Stres indeksinin hesaplanması oksidatif denge durumunun anlaşılması açısından önemlidir.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Yapmış olduğumuz çalışmamızda kullanılan 40 adet 200-250 gr ağırlığındaki Albino Wistar cinsi erkek sıçan Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi (ATADEM)'den temin edildi. Deneysel çalışma süresince, sıçanlar yeteri kadar yem ile beslendi. Hayvanlar deneysel çalışma öncesinde laboratuvarında oda sıcaklığında (22 C⁰) barındırıldı ve beslendi. Deneysel araştırmamızın bütün evrelerinin Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.02.2020 tarih ve 26 numaralı kararı ile etik kurallara uygun olduğu onaylanmıştır (Ek-3).

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Parasetamol: (Parasetamol, Doğa İlaç Hammadde Ltd. şirketi, İstanbul) Cerrahi işlem uygulanan hayvanların içme sularına katıldı.

Azelnidipin: (Marka: ACROS) Çalışmada, azelnidipin 4,8 ve 16 mg/kg dozlarında %0,5 karboksimetilselülozda çözülmesi sağlanarak, gavaj ile oral yoldan verildi.

Ksilazin (Xylasinbio, İntermed eczadeposu Ltd.Şti., Ankara) ve Ketamin (Ketalar 50mg/ml flakon): Çalışmada intraperitoneal (i.p.) olarak anestezi için ketamin/ksilazin (50 mg/kg, 5 mg/kg) dozunda verildi.

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

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

Sefazolin Sodyum: (İESPOR 1 g IM Flakon) İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. İstanbul, Türkiye: Operasyon günde 2 kez 40 mg/kg dozunda intramüsküler olarak verildi.

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

Tablo 3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Modeli ve Firması
Eliza Okuyucu	Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA
Mikroplate Yıkayıcı	Stat Fax 2600 Microplate Washer, USA
Santrifüj (Soğutmalı)	Hettich Zentrifugen 320R, Germany
Manyetik Karıştırıcı	Wisd WiseStir MSH-20A, Germany
Doku Homojenizatörü	Tissue Lyser II Qiagen, Germany
Hassas Terazî	Shimadzu ATX224, USA
Etüv	Memmert WNB 7-45, Germany
Karıştırıcı	IKA- MS 3 basic, USA
Buzdolabı (-86 °C)	Nuaire NU-9483E, USA
Derin Dondurucu	Vestel BZP-XL3402W, Türkiye
Otomatik Multikanal Pipet	Eppendorf Research Pro (20-300µ)
Pipet Seti	Eppendorf Research Plus

3.2. Metot

3.2.1. Deney Planı

40 adet erkek albino Wistar cinsi sıçanın temini Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'nden sağlandı. Sıçanlar 200-250 gr ağırlığında ve deneyden önce normal sıcaklık koşulları (22° C) ve kontrollü ışık koşulları altında (14 saat / 10 saat aydınlık-karanlık döngüsü) klimalı bir odada talaş yatağı üzerinde standart plastik kafeslere yerleştirilerek standart sıçan yemi ve musluk

suyu ile ad libitum beslendi. 1 haftalık adaptasyonu takiben rastgele dağıtılarak deney grupları oluşturuldu.

Çalışmada, her grupta 8 hayvan olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Toplamda 40 hayvan kullanıldı.

Hayvanlar aşağıdaki şekilde gruplandırıldı:

Grup I: Sağlıklı grup

Grup II: Femoral Kırık Kontrol Grubu'na % 0,5'lik CMC çözeltisi gavaj aracılığıyla oral olarak verildi.

Grup III: 4 mg/kg dozunda (% 0,5'lik CMC çözeltisiyle) hazırlanan Azelnidipin çözeltisi, gavaj aracılığıyla oral olarak verildi.

Grup IV: 8 mg/kg dozunda (% 0,5'lik CMC çözeltisiyle) hazırlanan Azelnidipin çözeltisi gavaj aracılığıyla oral olarak verildi.

Grup V: 16 mg/kg dozunda (% 0,5'lik CMC çözeltisiyle) hazırlanan Azelnidipin çözeltisi gavaj aracılığıyla oral olarak verildi.

Tablo 3.2. Deney Grupları

Deney ve kontrol grupları	Grup başına hayvan adedi	Tekrar Sayısı	Kullanılan toplam Hayvan sayısı/grup
Sağlıklı grup	8	1	8
Femural Kırık Kontrol Grubu	8	1	8
Femur Kırık+ 4mg/kg Azelnidipin	8	1	8
Femur Kırık+ 8mg/kg Azelnidipin	8	1	8
Femur Kırık+ 16 mg/kg Azelnidipin	8	1	8

Cerrahi prosedür öncesi tüm sıçanlara intraperitoneal (İ.P.) ketamin/xylasin (50 mg/kg, 5 mg/kg) ve idame olarak sevofluran uygulama suretiyle anestezi uygulandı. Ameliyat sonrası ağrıyı önlemek için İ.P. metamizol sodyum enjeksiyonu (150 mg / kg) uygulandı.

Sağ arka ekstremitte traş edilerek, 2 cm'lik lateral parapatellar insizyon yapılarak patella sağ arka ekstremitenin distal femoral kondilini ortaya çıkarmak için lateral olarak yer değiştirildi. Femur kırığı modeli, femurun orta kısmında çapraz kesilerek oluşturuldu. Manuel indirgeme işleminden sonra, kırık femur intramedüller Kirschner telleri ile sabitlendi. Yaralar 4-0 Vicryl suturelerle kapatıldı. Ameliyattan sonra sıçanların serbestçe içmelerine ve yemelerine izin verildi. Üç farklı dozda azelnidipin uygulandı. Sıçanlara post-operatif 1. günden başlayarak 21 gün boyunca günde bir kez 4mg, 8mg ve 16 mg / kg azelnidipin (gavaj yoluyla) verildi. Çalışmaya başladıktan 21. gün sonunda, deneklere intraperitoneal (i.p.) olarak yüksek doz (50 mg/kg) tiyopental sodyum verilip ötanazi yapıldıktan sonra, femurlar çıkarılıp Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Radyoloji A.D. bünyesinde radyolojik inceleme yapıldı. Çıkarılan femurların radyolojik görüntüleri Anteroposterior tek planda Mamografi cihazı (General Electric®, SENOGRAPHIE DMR) kullanılarak alındı. Biokimyasal olarak ELİSA kitiyle serum osteokalsin, osteopontin, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite ve sitokin düzeylerine (TNF- α , İnterlökin 1-Beta, İnterlökin-17) bakıldı. Atatürk Üniveriste Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında serum fosfor, kalsiyum ve kemiğe spesifik alkalen fosfataz değerlerine bakıldı.

Çalışmanın yapılması için 28.02.2020 tarih ve 75296309-050.01.04-E.2000067729 sayılı HADYEK Kararı ile etik kurul onayı ekte sunulmuştur.

3.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar

3.2.2.1. Serumda Yapılan Analizler

Osteokalsin, Osteopontin, total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite, TNF- α , İnterlökin 1-Beta, İnterlökin-17 miktarlarının tespiti için kullanılacak serumun temin edilmesi:

Ötenazi yapılan sıçanlardan elde edilen kanlar EDTA'lı biyokimya tüpüne konularak 4000 rpm de 10 dk +4 °C 'de santifüj edildi. -80 °C'de analiz yapılınca kadar saklandı. Bütün örneklerde Osteokalsin, Osteopontin, Total antioksidan kapasite, Total oksidan kapasite, TNF- α , İnterlökin 1-Beta, İnterlökin-17 seviyeleri yüksek hassasiyetteki ELISA kitiyle (USCN life science-E90207Ra, E91214Ra (China) ölçüldü.

Osteokalsin Miktarının Tespiti

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Stop Solution Streptavidin-HRP, Wash Buffer Concentrate (25*), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Biotinylated Rat BGP Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 μ l eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40 μ l örnek örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 μ l anti – BGP antibody örnek kuyucuklarına eklendi.
4. 50 μ l streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 μ l substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.
8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 μ l Stop Solutin eklendi. Sonuç olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm'de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.

Osteopontin Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Stop Solution Streptavidin-HRP, Wash Buffer Concentrate (25*), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Biotinylated Rat OPN Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40 µl örnek örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 µl anti – OPN antibody örnek kuyucuklarına eklendi.
4. 50 µl streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 µl substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.
8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 µl Stop Solutin konuldu. Sonuç olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm’de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.

TNF- α Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Stop Solution Streptavidin-HRP, Wash Buffer Concentrate (25*), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Biotinylated Rat TNF- α Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40 µl örnek, örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 µl anti-TNF- α antibody örnek kuyucuklarına eklendi.
4. 50 µl streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 µl substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.
8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 µl Stop Solutin konuldu. Sonuç olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm'de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.

İnterlökin 1- β Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Stop Solution Streptavidin-HRP, Wash Buffer Concentrate (25*), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Biotinylated Rat IL-1 β Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40 µl örnek örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 µl anti –IL-1 β antibody örnek kuyucuklarına eklendi.

4. 50 µl streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 µl substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.
8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 µl Stop Solutin konuldu. Sonuç olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm’de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.

İnterlökin 17 Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Streptavidin-HRP, Stop Solution, Substrate Solution A, Substrate Solution B, Wash Buffer Concentrate (25*), Biotinylated Rat IL-17 Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40 µl örnek örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 µl anti –IL-17 antibody örnek kuyucuklarına eklendi.
4. 50 µl streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 µl substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.

8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 µl Stop Solutin konuldu. Sonuç olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm’de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.

Total Oksidan Kapasite Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Stop Solution Streptavidin-HRP, Wash Buffer Concentrate (25*), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Biotinylated Rat TOS Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40µl örnek örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 µl anti –TOS antibody örnek kuyucuklarına eklendi.
4. 50 µl streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 µl substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.
8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 µl Stop Solutin konuldu. Son olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm’de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.

Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

Kullanılan reaktifler: Standart Solution, Standart Dilüent, Stop Solution Streptavidin-HRP, Wash Buffer Concentrate (25*), Substrate Solution A, Substrate Solution B, Biotinylated Rat TAS Antibody

Deneyin yapılışı:

1. Standart kuyularına hazırlanan standartlardan 50 µl eklendi. (Standart kuyucuklarına antibody eklenmeyecek)
2. 40 µl örnek örnek kuyucuklarına eklendi.
3. 10 µl anti –TAS antibody örnek kuyucuklarına eklendi.
4. 50 µl streptavidin- HRP örnek ve standart kuyucuklarına eklendi.(kör kuyucuğu hariç)
5. Karıştırma işlemi yapıldıktan sonra üzeri kapatılarak 60 dk 37 °C derecede inkubasyona bırakıldı.
6. İnkubasyondan sonra solüsyonlar wash buffer ile 5 defa yıkandı.
7. Yıkama işleminden sonra tüm kuyulara 50 µl substrate solution A ve sonra substrate solution B konuldu. Üzeri kapatılarak 10 dk süreyle 37 °C de karanlıkta inkube edildi.
8. İnkubasyondan sonra her kuyuya 50 µl Stop Solutin konuldu. Sonuç olarak kuyucuklarda sarı renk oluşmaya başladı.
9. 450 nm’de ölçüm alınarak standart ve numunelerin miktarları hesaplandı.
10. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında Serum kalsiyum, fosfor, Alkalen fosfataz ve kemiğe spesifik alkalen fosfataz ölçümleri yapılmıştır.

3.2.3.Radyolojik Çalışmalar

Denekler sakrifiye edilip, femurlar çıkarıldıktan sonra Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Radyoloji A.D. bünyesinde radyolojik inceleme yapıldı.

Çıkarılan femurların radyolojik görüntüleri Anteroposterior tek planda Mamografi cihazı (General Electric®, SENOGRAPHIE DMR) kullanılarak alındı.

Radyografiler, 1987 yılında Lane ve Sandhu tarafından tanımlanan skorlama sistemi kullanılarak²⁴⁹ değerlendirildi. (Tablo 3.3)

Tablo 3.3. Radyolojik Değerlendirme İçin Lane- Sandhu Skorlama Sistemi

Skor	Radyolojik Bulgular
0	Kallus dokusu yok, kırık hattı açık
1	% 25 kallus dokusu, kırık hattı açık
2	% 50 kallus dokusu, kırık hattı bulanık
3	% 75 kallus dokusu, kırık hattı zorlukla görülebilmekte
4	% 100 kallus dokusu, kırık hattı görülmemekte

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama(ort)±standart sapma(ss) olarak verildi ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testinde post-hoc testlerinden “Duncan” tekniği kullanılarak belirlendi.

4. BULGULAR

TNF- α Analizleri

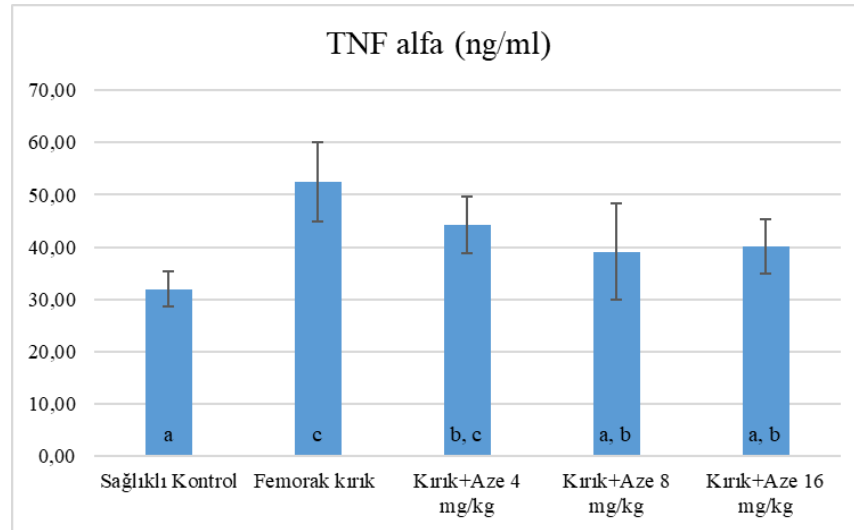
Tablo 4.1’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki TNF- α miktarları sırası ile; 31.98 ng/ml, 52.42 ng/ml, 44.29 ng/ml, 39.13 ng/ml, 40.10 ng/ml olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda TNF- α miktarı önemli miktarda artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşüş meydana gelmiştir. (Şekil 4.1)

Tablo 4.1. Rat Serumunda Ölçülen TNF- α Miktarları.

	TNF- α (ng/ml)
Sağlıklı Kontrol	31.98 $\pm$ 3.34 a
Femorak kırık	52.42 $\pm$ 7.60 c
Kırık+Aze 4 mg/kg	44.29 $\pm$ 5.46 b,c
Kırık+Aze 8 mg/kg	39.13 $\pm$ 9.17 a,b
Kırık+Aze 16 mg/kg	40.10 $\pm$ 5.18 a,b

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p > 0,05$)).



Şekil 4.1. Rat Serumunda Ölçülen TNF- α Miktarları

Interlökin-1 β Analizleri

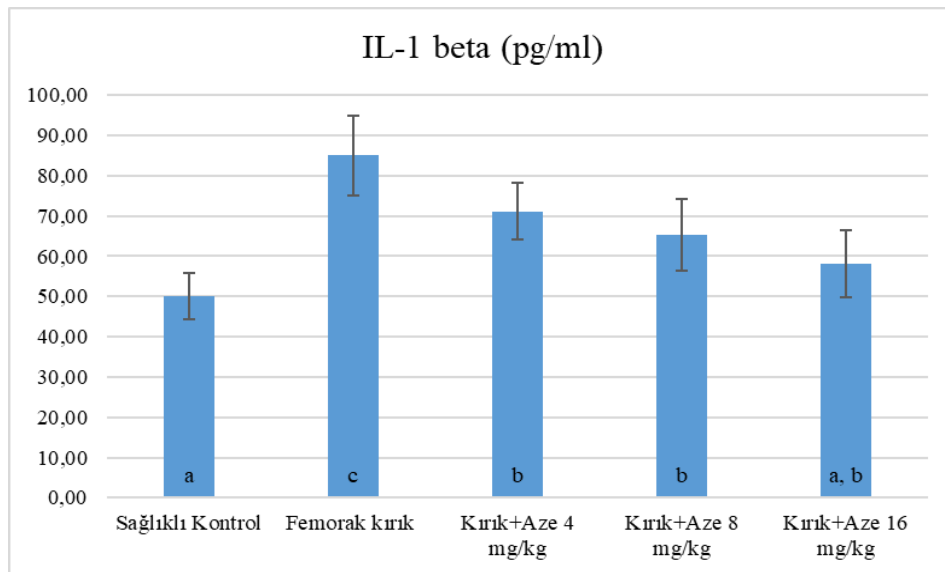
Tablo 4.2’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki IL-1 β miktarları sırası ile; 50.03 pg/ml, 84,98 pg/ml, 71.17 pg/ml, 65.43 pg/ml, 58.19 pg/ml olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda IL-1 β miktarı önemli miktarda artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki IL-1 β miktarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. (Şekil 4.2)

Tablo 4.2. Rat Serumunda Ölçülen IL-1 β Miktarları

	IL-1 beta (pg/ml)			
Sağlıklı Kontrol	50.03	±	5.75	a
Femorak kırık	84.98	±	9.84	c
Kırık+Aze 4 mg/kg	71.17	±	7.15	b
Kırık+Aze 8 mg/kg	65.43	±	8.91	b
Kırık+Aze 16 mg/kg	58.19	±	8.35	a,b

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p > 0,05$)).



Şekil 4.2. Rat Serumunda Ölçülen IL-1 β Miktarları

İnterlökin- 17 Analizleri

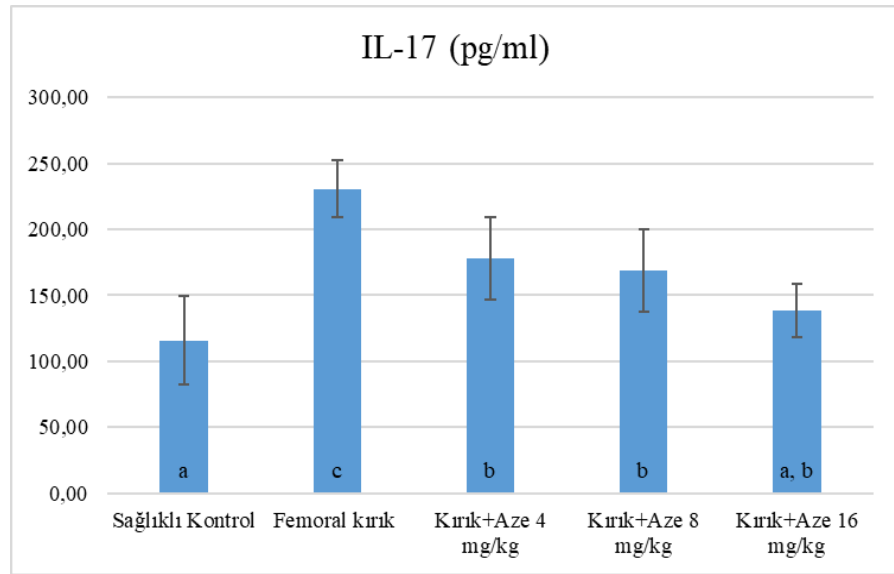
Tablo 4.3’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki IL-17 miktarları sırası ile; 115.76 pg/ml, 230.63 pg/ml, 178.15 pg/ml, 168.75 pg/ml, 138.45 pg/ml olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda IL- 17 miktarı önemli miktarda artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki İnterlökin- 17 miktarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. (Şekil 4.3)

Tablo 4.3. Rat Serumunda Ölçülen IL-17 Miktarları

IL-17 (pg/ml)				
Sağlıklı Kontrol	115.76	± 33,61	a	
Femoral kırık	230,63	± 21,62	c	
Kırık+Aze 4 mg/kg	178,15	± 31,13	b	
Kırık+Aze 8 mg/kg	168,75	± 31,52	b	
Kırık+Aze 16 mg/kg	138,45	± 20,45	a,b	

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p<0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p>0,05$)).



Şekil 4.3. Rat Serumunda Ölçülen IL-17 Miktarları

Osteopontin Analizi

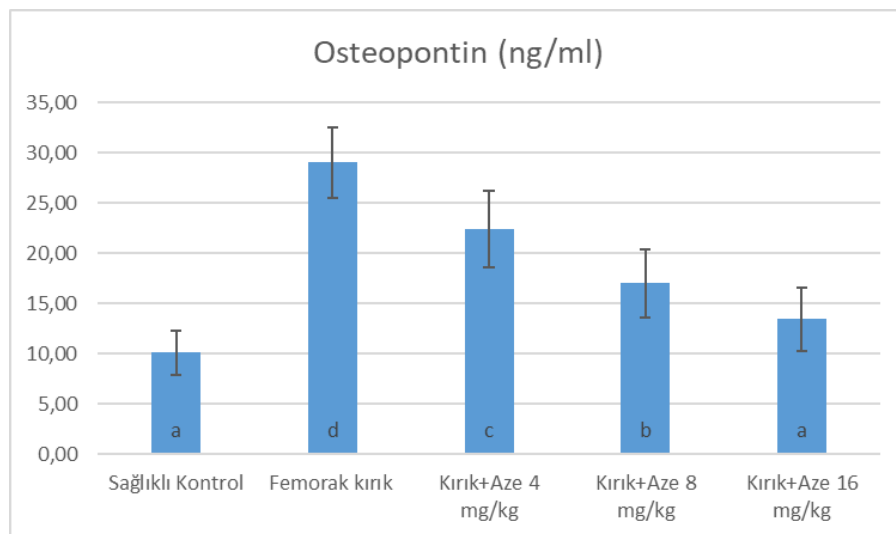
Tablo 4.4’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki OPN miktarları sırası ile; 10,08 ng/ml, 29,04 ng/ml, 22,39 ng/ml, 16,99 ng/ml, 13,43 ng/ml olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda OPN miktarı önemli miktarda artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki OPN miktarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. (Şekil 4.4).

Tablo 4.4. Rat Serumunda Ölçülen OPN Miktarları

OPN (ng/ml)		
Sağlıklı Kontrol	10.08 ± 2.25	a
Femorak kırık	29.04 ± 3.54	d
Kırık+Aze 4 mg/kg	22.39 ± 3.84	c
Kırık+Aze 8 mg/kg	16.99 ± 3.39	b
Kırık+Aze 16 mg/kg	13.43 ± 3.13	a

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p<0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p>0,05$)).



Şekil 4.4. Rat Serumunda Ölçülen OPN Miktarları

Osteokalsin Analizleri

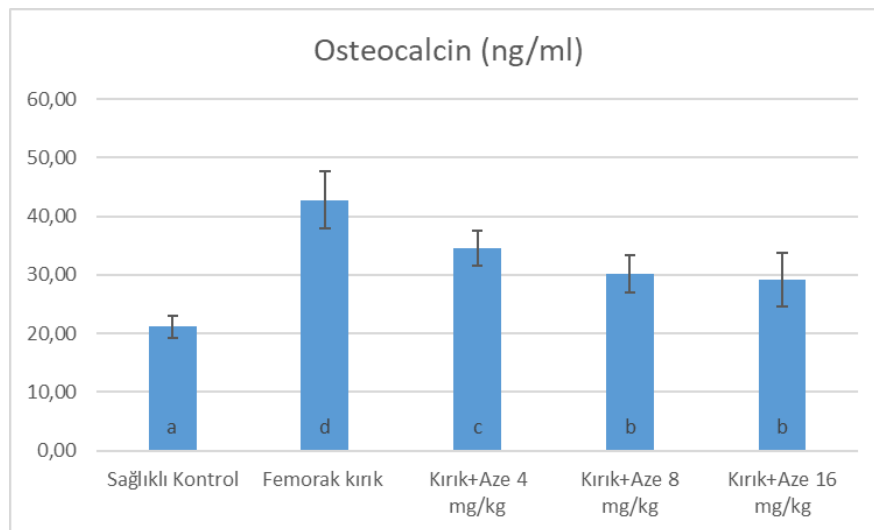
Tablo 4.5’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki Osteocalcin miktarları sırası ile; 21.15 ng/ml, 42.78 ng/ml, 34.64 ng/ml, 30.13 ng/ml, 29.14 ng/ml olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda OCN miktarı önemli miktarda artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki OCN miktarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. (Şekil 4.5)

Tablo 4.5. Rat Serumunda Ölçülen OCN Miktarları

Osteocalcin (ng/ml)			
Sağlıklı Kontrol	21.15	± 1.92	a
Femorak kırık	42.78	± 4.89	d
Kırık+Aze 4 mg/kg	34.64	± 2.99	c
Kırık+Aze 8 mg/kg	30.13	± 3.17	b
Kırık+Aze 16 mg/kg	29.14	± 4.53	b

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p<0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p>0,05$)).



Şekil 4.5. Rat Serumunda Ölçülen OCN Miktarları

Total Oksidan Kapasite (TOS) Analizleri

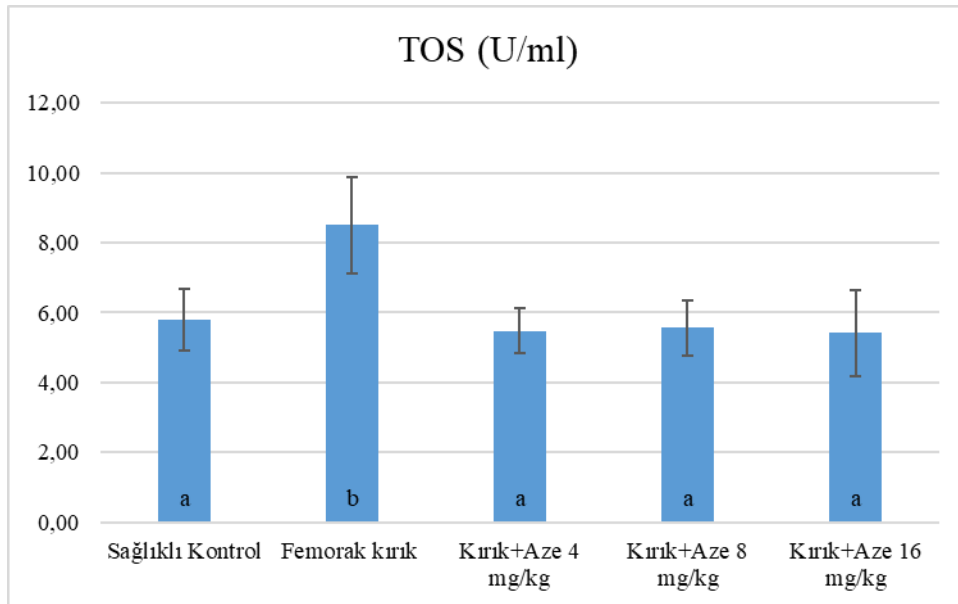
Tablo 4.6’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki TOS miktarları sırası ile; 5.79 U/L, 8.50 U/L, 5.48 U/L, 5.56 U/L, 5.41 U/L olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda TOS miktarı artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki TOS miktarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş olmuştur. (Şekil 4.6)

Tablo 4.6. Rat Serumunda Ölçülen TOS Miktarları

TOS (U/ml)		
Sağlıklı Kontrol	5.79 ± 0.88	a
Femorak kırık	8.50 ± 1.38	b
Kırık+Aze 4 mg/kg	5.48 ± 0.66	a
Kırık+Aze 8 mg/kg	5.56 ± 0.79	a
Kırık+Aze 16 mg/kg	5.41 ± 1.24	a

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p<0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p>0,05$)).



Şekil 4.6. Rat Serumunda Ölçülen TOS Miktarları

Total Antioksidan Kapasite (TAS) Analizleri

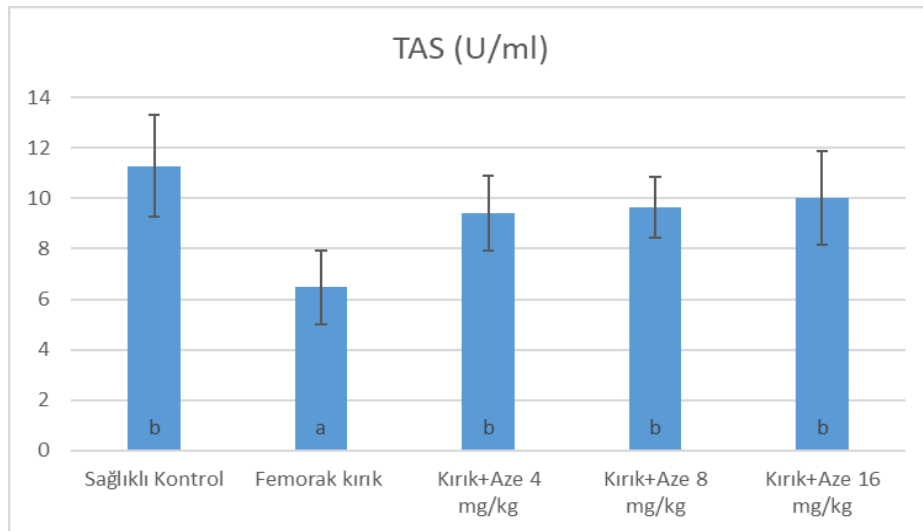
Tablo 4.7’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki Total Antioksidan Kapasite miktarları sırası ile; 11.29 U/L, 6.47 U/L, 9.41 U/L, 9.65 U/L, 10.01 U/L olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda TAS miktarında düşüş meydana gelirken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki TAS miktarında istatistiksel olarak anlamlı miktarda artış olmuştur. (Şekil 4.7)

Tablo 4.7. Rat Serumunda Ölçülen TAS Miktarları

TAS (U/ml)			
Sağlıklı Kontrol	11.29 ± 2.01	b	
Femorak kırık	6.47 ± 1.46	a	
Kırık+Aze 4 mg/kg	9.41 ± 1.48	b	
Kırık+Aze 8 mg/kg	9.65 ± 1.22	b	
Kırık+Aze 16 mg/kg	10.01 ± 1.85	b	

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p > 0,05$)).



Şekil 4.7. Rat Serumunda Ölçülen TAS Miktarları

Kemiğe spesifik ALP Analizleri

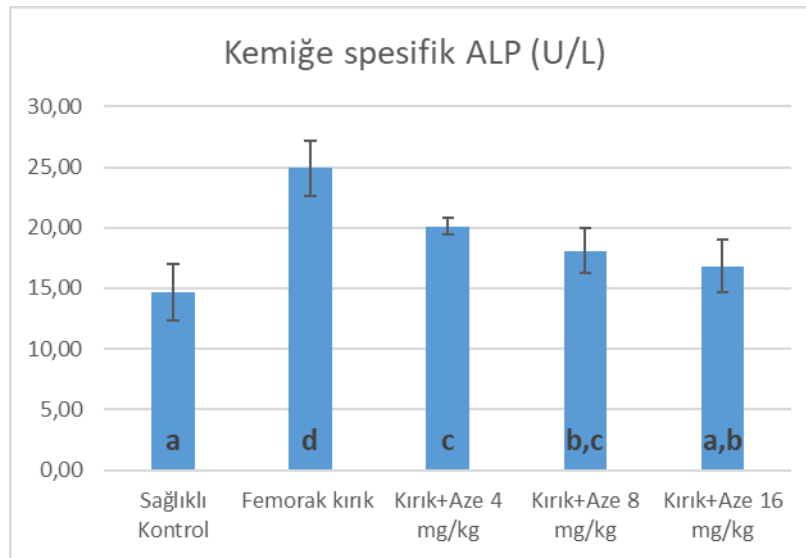
Tablo 4.8’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki Kemiğe Spesifik ALP miktarları sırası ile; 14.68 U/L, 24.90 U/L, 20.12 U/L, 18.10 U/L, 16.83 U/L olarak ölçüldü.

Femoral kırık kontrol grubunda Kemiğe Spesifik ALP miktarı önemli miktarda artarken, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki Kemiğe Spesifik ALP miktarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır. (Şekil 4.8)

Tablo 4.8. Rat Serumunda Ölçülen Kemiğe Spesifik ALP Miktarları

Kemiğe Spesifik ALP (U/ml)			
Sağlıklı Kontrol	14.68 ± 2.32	a	
Femorak kırık	24.90 ± 2.28	d	
Kırık+Aze 4 mg/kg	20.12 ± 0.65	c	
Kırık+Aze 8 mg/kg	18.10 ± 1.88	b,c	
Kırık+Aze 16 mg/kg	16.83 ± 2.19	a,b	

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p<0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p>0,05$)).



Şekil 4.8. Rat Serumunda Ölçülen Kemiğe Spesifik ALP Miktarları

Fosfor(P) Analizleri

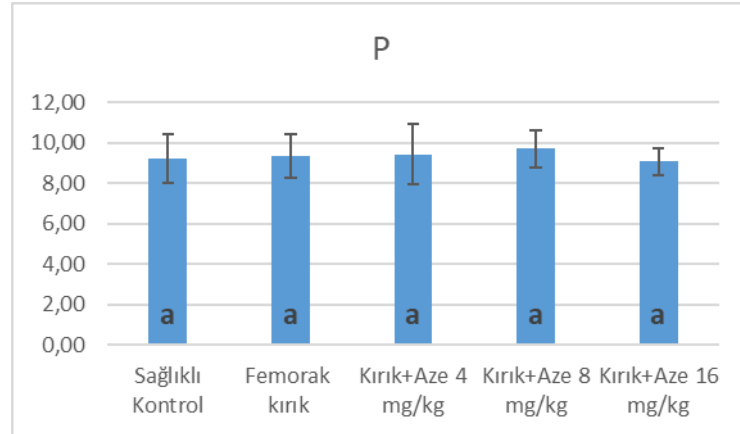
Tablo 4.9’de görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki P miktarları sırası ile; 9.21mg/dl, 9.34 mg/dl, 9.44 mg/dl, 9.70mg/dl, 9.07mg/dl olarak ölçüldü.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. (Şekil 4.9)

Tablo 4.9. Rat Serumunda Ölçülen P Miktarları

P (mg/dl)			
Sağlıklı Kontrol	9.21 ± 1.21	a	
Femorak kırık	9.34 ± 1.08	a	
Kırık+Aze 4 mg/kg	9.44 ± 1.49	a	
Kırık+Aze 8 mg/kg	9.70 ± 0.92	a	
Kırık+Aze 16 mg/kg	9.07 ± 0.66	a	

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p > 0,05$)).



Şekil 4.9. Rat Serumunda Ölçülen P Miktarları

Kalsiyum Analizleri

Tablo 4.10’da görüldüğü gibi Sağlıklı, Femoral Kırık Kontrol Grubu, Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki Ca

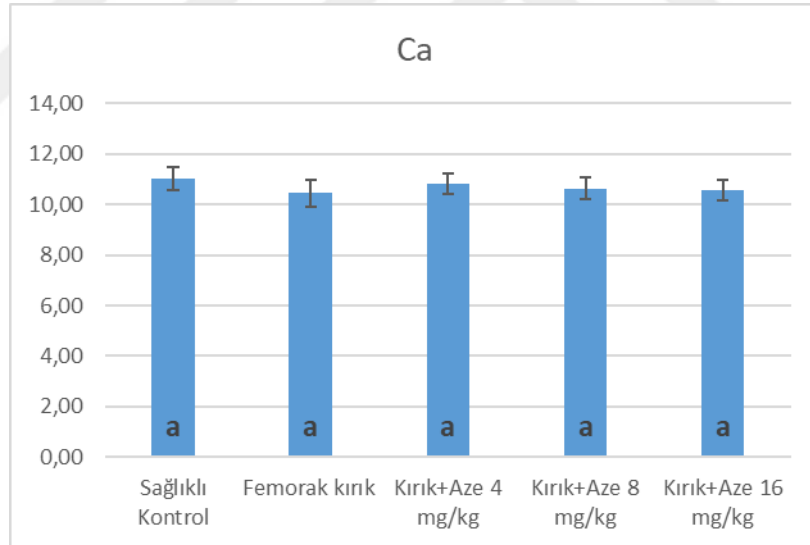
miktarları sırası ile; 11.03mg/dl, 10.44mg/dl, 10.82 mg/dl, 10.64mg/dl, 10.55mg/dl olarak ölçüldü.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. (Şekil 4.10)

Tablo 4.10. Rat Serumunda Ölçülen Ca Miktarları

Ca (mg/dl)		
Sağlıklı Kontrol	11.03 ± 0,46	a
Femorak kırık	10.44 ± 0.55	a
Kırık+Aze 4 mg/kg	10.82 ± 0.42	a
Kırık+Aze 8 mg/kg	10.64 ± 0.42	a
Kırık+Aze 16 mg/kg	10.55 ± 0.41	a

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p<0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p>0,05$)).



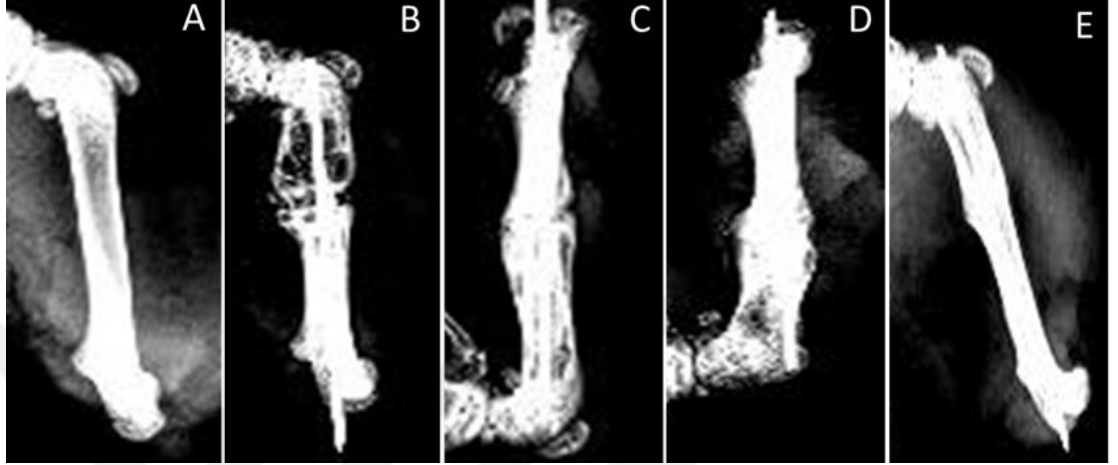
Şekil 4.10. Rat Serumunda Ölçülen Ca Miktarları

Radyolojik Bulgular

Çalışmadaki tüm deneklerin röntgen görüntüleri Lane-Sandhu skorumasına göre puanlandı.²⁵⁰

Çalışmamızda bulunan sağlıklı kontrol, femur kırık, femur kırık + Azelnidipin 4mg/kg, femur kırık+ Azelnidipin 8mg/kg ve femur kırık +azelnidipin 16mg/kg

gruplarındaki ratlara, postoperatif 21. Günde deneklere intraperitoneal (i.p.) olarak 50 mg/kg dozunda tiyopental sodyum verilip ötanazi yapıldıktan sonra femurlar çıkarıldı. Çıkarılan femurlar mamografi kasetine yerleştirildi ve anteroposterior tek planda grafileri alındı (Şekil 4.11)



Şekil 4.11. Radyolojik görüntüler (A: Sağlıklı Kontrol, B: Femoral kırık, C: Kırık+Aze 4 mg/kg, D: Kırık+Aze 8 mg/kg, E: Kırık+Aze 16 mg/kg)

Tablo 4.11. 21. Günde Kırık İyileşmesinin Radyolojik Skorlaması

Gruplar	Skor	İstatistik
Sağlıklı Kontrol	4.00 ± 0.00	d
Femoral kırık	1.13 ± 0.38	a
Kırık+Aze 4 mg/kg	2.25 ± 0.46	b
Kırık+Aze 8 mg/kg	3.00 ± 0.53	c
Kırık+Aze 16 mg/kg	3.25 ± 0.46	c

(Aze: Azelnidipin Sonuçlar ortalama değer ± SD olarak ifade edilmiştir. One-Way ANOVA Duncan testine göre farklı harf ve harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$); aynı harf ve harfler ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığını gösterir ($p > 0,05$)).

Lane-Sandhu skorumaya sistemine göre değerlendirme yapıldığında çalışmamızda bulunan femur kırık+ Azelnidipin 8mg/kg ve femur kırık +azelnidipin 16mg/kg gruplarındaki ratlardaki iyileşmenin femur kırık + Azelnidipin 4mg/kg grubundaki ratlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Ayrıntıları tam olarak aydınlatılamamış olan kırık iyileşmesinde tedavi sürecinin hızlandırılması açısından, mekanizmanın tam olarak aydınlatılması önemlidir. Bu sebeple iyileşme sürecine katkı sağlayabilecek çeşitli moleküller üzerine yapılan çalışmada artmıştır. Kırık iyileşmesindeki biyolojik süreci hızlandırmak amacıyla güncel literatür bilgilerinden faydalanılarak, Azelnidipin'in potent ajan olarak kullanılabilirliğini araştıran deneysel çalışmamız gerçekleştirilmiştir.

Mineralize bir bağ dokusu olan kemik dokusu kanlanma özelliği iyi olan, canlı, yapım ve yıkımın birbirine paralel seyrettiği, vücudun en sert dokularından birisidir. Kaslarla olan bağlantıları sayesinde, denge ve hareketin oluşturulması bunun yanı sıra hayati organların korunması gibi önemli görevleri vardır. Kemik doku içerisinde yer alan kemik iliğinde kan hücrelerinin yapımı gerçekleşmektedir. Ayrıca metabolik olarak da kalsiyum (Ca) ve fosfat (PO₄) gibi minerallerin depolanarak gerekli durumlarda salınmasında önemli bir rol oynar.^{31, 32}

Dışarıdan veya içeriden etki eden kuvvetlerce kemiğin anatomik yapısının bozulmasına kırık denilir. Kırık sonrası kemik bütünlüğün sağlanması için karmaşık ve dinamik bir süreçle bir dizi fizyolojik reaksiyonlar başlar.⁵ Kemik dışındaki dokularda iyileşme fibröz skar dokusuyla olmasına rağmen kemik dokusu skar doku oluşturmadan iyileşir. Oluşan skar dokusu ya işlevizdir veya işlevi yetersizdir. Fibröz skar doku oluşturarak iyileşen kırık, biyomekanik yetersiz olup klinik olarak ta hareket kısıtlılığı ve ağrı oluşabilir. Bu duruma psödoartroz denilmektedir. Avrupa Birliği'ne üye ülkeler arasında yapılan araştırmayla kırık tedavileri için gerekli mali yükün otuz yedi milyar euro olduğu tespit edilmiş olup 2025 yılına kadar bu tutarın % 25 kadar daha artacağı öngörülmektedir. Bu nedenle kırıkların tedavisi ve/veya önlenmesi amacıyla sağlık politikalarının düzenlenmesi ve kırık tedavisinde kullanılacak ajanların araştırılması

önemlidir.²⁵¹ Kırık oluşumu sonrasında iyileşmenin olabilmesi için, prostoglandinler ve kemik uyarıcı faktörler gibi kırık alanında bölgesel olarak üretilen veya kan dolaşımı ile kırık alanına gelen mediatörler, kırık iyileşme sürecinde önemli rolleri olan başta osteoblastlar, osteoklastlar ve diğer hücrelerin toplanabilmesi ve görevlerini sorunsuz yerine getirebilmeleri için gereklidirler.⁹⁴ Hücre döngüsü ve hücre-hücre etkileşimini sağlayan genlerin ekspresyonu erken dönem kırık iyileşmesinde artmaktadır.⁹⁵ Kırık iyileşmesi; kırıkta kallus oluşumu, kalsifikasyon, kemiğin yeniden şekillenmesi ve hematoma oluşması gibi birçok farklı süreçler ile seyreder ve bu süreçleri etkileyen çeşitli faktörler vardır.²⁵² Kemik defekti yaparken, teknik işlem nedeniyle özellikle hasar gören damar duvarından kanama meydana gelir ve hematoma oluşur. Süreç içerisinde oluşan hematomun yerini kırık bölgesine göç eden inflamatuvar hücreler ve fibröz doku alır.⁶⁰ Bu olaya fibrozis denilir ve meydana gelen doku granülasyon dokusudur. Olaya fibroblastik proliferasyon, kapiller damar angiogenezi ve yine inflamatuvar mononükleer hücre infiltrasyonu eşlik eder. Kırık iyileşmesinin en önemli basamağı olup kaybolan doku açığını kapatılır ve kemikleşme süreci başlar.

Literatürde farklı materyel ve yöntemlerin kırık iyileşmesine olan etkilerini araştırmak için sıçan, fare, tavşan, köpek, koyun ve domuz gibi hayvanlar kullanılmıştır. Bu hayvanlar içinde kırık modeli için kullanılabilecek en küçük hayvan sıçandır.²⁵³ Sıçanların enfeksiyona karşı dirençlerinin yüksek olması, şartlara hızlı uyum sağlayabilmeleri, üretimlerinin kolay ve ekonomik olması nedeniyle tercih edilen bir deney hayvanıdır. Sıçan femur kemiği insan morfolojisine benzerdir. Yürüyüş süresince yük döngüsünün benzerdir ve etrafındaki yumuşak dokusu desteği sayesinde dış etkenlerden korunur. Bu nedenlerden dolayı sıçan femur kemiği kırık modeli uygulaması için en uygun kemiklerden birisidir.²⁵⁴ 200-250 gr ağırlığında Albino Wistar cinsi erkek sıçanları deneyimizde kullandık.

Kemik kırığının tedavisi için etkileri araştırılan ajanların denendiği çalışmalarda, oluşturulan kırık modeli de önemlidir. Açık osteotomi şeklinde kırık, kapalı basit kırık, segmental kırık modelleri gibi çeşitli kırık modelleri kullanılabilir. Literatürdeki çoğu araştırmada kapalı kırık modeli tercih edilmesi rağmen, geç kaynamaya neden olması ve kaynamamaya yatkınlık gibi nedenlerle açık osteotomi, daha başarılı bulunmuştur.^{255, 256} Kırığın iyileşme sürecinde yaralanmaya ve tedaviye bağlı faktörler etkili olmaktadır. Deney hayvanlarında cerrahi teknikte açık veya kapalı kırık modeli tercih edilebilir. Açık cerrahi kırık modeli, cerrahi tedavi ve implant uygulama araştırmalarına imkân vermesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir.²⁵⁴ Kapalı kemik kırığı modeli, ilk kez 1970 yılında ratlarda pnömatik presle Jackson ve ark.²⁵⁷ tarafından oluşturulmuştur. Bonnarens ve ark.²⁵⁷ 1984 yılında ratlarda, dizden retrograd intramedüller pin uyguladıktan sonra giyotin ile kırık oluşturarak yeni bir model tanımlamışlardır. Ancak bu modelde kırık hattı standart olmadığından dolayı kallus dokusunun standardize edilememiştir. Ayrıca doku enfeksiyonu ve ölüm gibi komplikasyonlarda sıkça ortaya çıkmıştır.^{258, 259} Neagu ve ark.²⁵⁹ ile Claes ve ark.²⁶⁰ tarafından uygulanan açık femoral osteotomi modelinde, standardize bir kırık hattı elde edilmiş olup, doku enfeksiyonu ve ölüm gibi komplikasyonlar görülmemiştir.^{260, 261} Femur diafizer kırıklarda altın standart tedavi intramedüller çivilemedir.²⁶² Yapılan deney hayvanı araştırmalarında oluşturulan kırığın tespiti için intramedüller Krishner teli, plak-vida ve eksternal fiksator gibi çeşitli tespit yöntemleri tercih edilmiştir. Çalışmamızda 1,2 mm çapında Krishner teli ile intramedüller fiksasyon uygulandı. Deneyde kullanılan sıçanlar benzer boyutlarda ve aynı aileden geldiği için tüm femurlarda intramedüller dolgunluk sağlanarak optimum fiksasyon sağladık.

Kırık iyileşmesini etkileyen önemli faktörlerden birisi de oluşan enfeksiyon ve tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Klinik ortopedi ve travmatoloji ile ilgili girişimlerde

cerrahi profilakside Sefazolin Sodyum önerilmektedir.^{263, 264} Açık kırık modelinde kemik doku açığa çıkartıldığı için enfeksiyon riski yüksektir. Çalışmamızda postoperatif dönemde profilaktik olarak, klinik kullanımı yaygın olan ve kırık kaynaması üzerine etkisi olmayan sefazolin sodyum kullandık.⁸⁹ Kemik kırığı olgularında, kırığa ve cerrahi operasyon bölgesine bağlı olarak ağrı meydana gelmektedir. Bu nedenle kemik kırığı vakalarında ağrı kesiciler sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanılacak ağrı kesicilerin dikkatli seçilmesi çok önemlidir. İnflamatuvar süreci baskılayan özellikle NSAİ grubu ağrı kesicilerin kırık iyileşmesi geciktirdiği yapılan klinik ve prelinik çalışmalarda ispatlanmıştır.²⁶⁵ Parasetamol ve Tramadol grubu ağrı kesicilerin kırık iyileşmesini üzerine etkisi yoktur.⁸⁹

Yaptığımız deneysel çalışmada bir kalsiyum kanal blokeri olan azelnipin'in antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri göz önünde bulundurup kırık iyileşmesindeki rolünü inceleyeceğimiz için inflamasyon süresince kalsiyum iyonunun fonksiyonundan bahsetmek gerekir. Kalsiyum iyonu, inflamasyon oluşumuna neden olan biyolojik moleküllerin sentez ve salınımında önemli rol oynamaktadır.¹⁰⁷ İnflamasyon oluşumunda sitokinler, serbest oksijen radikalleri, nitrik oksit, histamin, serotonin, bradikinin, PG'ler, lizozomal enzimler ve lipooksijenaz ürünleri gibi inflamasyon mediyatörlerinin görevleri hakkında bilgiler mevcuttur.²⁶⁶ Mast hücrelerinde intraselüler kalsiyum iyon miktarının yükselmesi, mast hücrelerini aktive ederek histamin salgılanmasına sebep olur.²⁶⁷ Dihidropiridin kalsiyum kanal blokerlerinin bir başka etkisi, kalsiyumun L-tipi voltaj kapılı kalsiyum kanalı yoluyla kalsiyum akışını engelleyerek kalsiyumun kalp sistemine ve düz kas hücreleri seviyesinde girişini yavaşlatmaktır. Osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden türetilir, kemik oluşumunda önemli bir rol oynar ve voltaj kapılı kalsiyum kanalları içerir.²⁴ Osteoblastlar L tipi kalsiyum kanalları içerdiğinden ve Azelnidipin L tipi kalsiyum

kanal blokeri olduğundan kemik oluşumu ve iyileşmesinde önemli görevi olan osteoblast farklılaşmasında ve etkinliğinde önemli rolü vardır. En azından bir kısmı dihidropiridin türevi kalsiyum kanal blokerleri tarafından azaltılan hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun, D3 vitamini^{25, 26}, paratroid hormon^{25, 27} ve prostaglandin E₂²⁵ gibi çeşitli kemik düzenleyici faktörlerle arttığı gösterilmiştir. Bu faktörler osteoblast farklılaşmasını da değiştirir.^{29, 30}

TNF- α en sık kullanılan inflamatuvar belirteçlerden birisidir ve inflamasyonda çok önemli bir faktördür. İlk önce fagositik hücre ailesinin bir ürünü olarak üretilir ve birçok bilinen ve bilinmeyen hücre tipinin çoğalması, inhibisyonu, farklılaşması ve aktivasyonundan sorumludur.²⁶⁸ Ayrıca kemik iliği stromal hücreleri ve osteoblastlar tarafından sentezlendiği gösterilmiştir. Hashimoto ve ark.²⁶⁹ tarafından, TNF- α 'nın in vitro çoklu osteoblast fonksiyonlarını inhibe etme ve in vivo olarak kırık onarımını teşvik etme kabiliyetini rapor edilmiştir. Kemik oluşumu süreci sırasında, TNF sinyalinin yokluğu kemik oluşumunu önleyebilir. TNF- α doza duyarlı bir şekilde hareket edebilir. TNF- α 'nın düşük dozları osteoblast çoğalmasını olumlu etkilerken yüksek dozları in vivo ve in vitro olarak kemik oluşumunu engelleyebilir.^{270, 271} TNF- α kemik metabolizmasını olumsuz etkileyen sitokinler içinde en önemlilerinden biridir. Ankilozan spondilit ve artritlerin patolojik süreçleride de etkin rol oynamaktadır.²⁷² Kemik hasarlarında TNF- α düzeylerinin aşırı derecede artması neticesinde osteoblastogenezde göreceli bir bozulma oluşmaktadır.^{267, 273} TNF- α , hücre içi sinyal yollarında BMP-2 gibi MAPK situmülasyonuna neden olarak enflamasyona yol açmaktadır.^{274, 275} BMP-2'nin kemik gelişimini olumlu yönde etkilemesine rağmen, TNF- α osteoklastogenezi uyarır ve osteoblastik farklılaşmayı engelleyerek kemik mineral yoğunluğunun azalmasına neden olmaktadır.^{276, 277} Kemik hasarının iyileşmesindeki inflamatuvar fazda, öncü sentezlenen sitokinler arasında yer alan TNF- α

kemik rezorpsiyonunu uyarır.²⁷⁸ İn vitro kemik çalışmalarıyla, TNF- α 'nın osteoblastların farklılaşmasını engellediği gösterilmiştir. TNF- α insülin benzeri büyüme faktörleri-1 gibi faktörleri inhibibe ederek, osteoblast farklılaşmasını engeller.²⁷⁹ İn vivo ve in vitro araştırmalarda TNF düzeyinin yükselmesiyle, kemik oluşumunu ve onarımının engellendiği, osteoblast fonksiyonları ve osteoblastogenezisin olumsuz yönde etkilendiği gösterilmiştir.^{268, 280} Normal düzeylerde TNF- α sentezinin ise kemik oluşumu için gerekli olduğu gösterilmiştir.²⁷⁸ Long H. ve ark.²⁸¹ tarafından TNF- α serum düzeylerinin malignite, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalık, kronik inflamatuvar hastalık ve kemik kırığı gibi hastalıklarda arttığı gösterilmiştir. Aydın A. ve ark.²⁷³ yapmış oldukları çalışmayla kontrol gruplarında kırık indüksiyonundan 30 gün sonra TNF- α seviyesinin yüksek düzeyde olduğunu göstermişlerdir. Hui Z. ve ark. tarafından yapılan çalışmanın bulguları, travmatik femur boynu kırığı olan hastaların çalışma grubundaki serum TNF- α düzeylerinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığını göstermiştir.²⁸² Ko ve ark.²⁸³ tarafından bu bulguları destekleyen daha önce yayınlanmış benzer bir çalışma yapılmıştır. Son zamanlarda, Lim ve ark.²⁸⁶ tarafından TNF- α diyabetli hastalarda kırık iyileşmesinde anjiyogenezi desteklediğini gösterilmiştir.^{284, 285} Alblowi ve ark TNF- α , nükleer faktör kappa- β ligand (RANKL) yolunun reseptör aktivatörü aracılığıyla FOXO1 genini aktive ederek kemik rezorpsiyonunu uyardığını göstererek, TNF- α kırıklarda önemli bir rol oynadığını ve kırıklı hastalarda potansiyel bir prognostik gösterge olabileceğini göstermiştir.²⁸⁵

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda TNF- α seviyelerinin arttığı tespit edilmişken, uygulanan ilaç tedavilerine göre TNF- α seviyeleri kırık iyileşme durumuna göre azalmıştır.

Bizim çalışmamızda da deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda TNF- α seviyelerinde anlamlı bir artış olmuştur. Azelnidipin 4 g/kg, Azelnidipin 8 mg/kg,

Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı miktarda düşüş meydana gelmiştir

IL-1, monositler, endotel hücreleri ve fibroblastlar tarafından, esas olarak IL-1 α ve IL-1 β formunda, enfeksiyon veya yaralanmayı takiben salgılanan inflamatuvar bir sitokindir. Lange ve ark.²⁸⁶ tarafından daha önce yayınlanan bir çalışma, kırıklı hastaların serumunda serum IL-1 β düzeylerinin anlamlı olarak arttığını göstermiştir ve bu da mevcut çalışmanın bulgularıyla tutarlıdır.²⁸⁶ Bu bulgular, nöroendokrin ve metabolik değişiklikler de dahil olmak üzere kırığı takip eden ve TNF- α ve IL-1 β serum düzeylerinin artmasına neden olan bir dizi patolojik değişikliklerle açıklanabilir.²⁸⁷ IL-17, T hücresine bağlı inflamatuvar yanıtların erken bir destekleyicisi olarak, pro-inflamatuvar sitokinleri, IL-1 β ve TNF- α teşvik ederek inflamasyonu şiddetlendirir.²⁸⁸ Hui Z. ve ark.²⁸² tarafından yapılan çalışmada postoperatif IL-1 β , IL-17, TNF- α düzeyleri ile Harris Kalça Skoru (HHS), arasındaki ilişkiler analiz edilmiş ve travmatik femur boynu kırığı olan hastalarda serum IL-1 β , IL-17 ve TNF- α düzeylerindeki artışla birlikte, kalça protezi ameliyatı olan hastalarda HHS'nin giderek azaldığı ve bu durumun postoperatif sonuçla bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Ameliyat öncesi ve sonrası IL-1 β , IL-17 ve TNF- α serum düzeylerinin saptanması, bu göstergelerin ameliyat sonrası anlamlı olarak azaldığını göstermiştir.²⁸² IL-1 β enflamasyon evresinde öncü sitokinlerden olup, immün cevabın başlaması, düzenlenmesi ve sürdürülmesinde çok önemlidir.²⁸⁹ Primer mediyatörlerin indüksiyonu sekonder mediatörlerin salınımını stümüle eder. Örneğin İnterlökin-1 (IL-1) primer mediatör olup, prostoglandinlerin veya kemokinlerin üretimine sebep olan sekonder mediatör siklooksijenazın salınımını uyarır. Sonuç olarak osteoklastik kemik rezorbsiyonu ve bağ dokusunun hasar görmesine sebep olan enzimlerin salınımıyla iki yoldan birlikte inflamatuvar cevap oluşmaktadır.²⁹⁰ Farelerde IL-1 α ve IL-1 β ligandlarının veya IL-1R1'in deneysel olarak baskılanmasıyla, IL-1'in

görevleri hakkında çok şey öğrenilmiştir. Araştırmaların birçoğunda farelerdeki IL-1 fonksiyon eksikliğinin inflamatuvar cevabın azalmasına ve bazı enfeksiyonlara karşı daha fazla yatkınlığın oluşmasına sebep olduğu kanıtlanmıştır.²⁹¹ IL-6, travmadan hemen sonra IL-1 ve TNF- α 'nın indüklemesi sonucu salınmaktadır. İyileşme sürecinin başlangıç aşamasında IL-1, IL-6, IL-11, IL-18 ve TNF- α seviyelerinde artış meydana gelir. Kırık iyileşmesinde birçok interlökin etkili olmakla birlikte, IL1 ve IL-6'nın etkisinin daha önemli olduğu ispat edilmiştir. Makrofajlarla IL-1 seviyesinin yükselmesi, osteoblastlardan IL-6 salınımını uyarır. Ayrıca kırıkta kallus gelişimini, ILR-1 (interlökin reseptör 1) ve ILR-2 (interlökin reseptör 2)'ye etki ederek te damarlanmayı indükler.²⁹² Proinflamatuvar sitokin TNF- α ve IL-1 β seviyelerinin tedavi sonrası düştüğünü ve mononükleer hücrelerde Nrf-2 fosforilasyonu ile birlikte CK-2 ekspresyonunu artırdığını bildirmiştir.²⁹³

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda IL-1 β seviyelerinin arttığı tespit edilirken, uygulanan ilaç tedavilerine göre IL-1 β seviyeleri kırık iyileşme durumuna göre azalmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarında da deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda IL-1 β seviyelerinde anlamlı bir artış olmuştur.

Kırık+Azelnidipin 4 mg/kg, 8mg/kg ve 16mg/kg grubunda IL-1 β düzeyinde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Azelnidipin artan dozlarda uygulamasının kırık olgusunda artan IL-1 β miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü kırık iyileşmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

IL-17, Aksiyal spondiloartropati patogenezinde rol oynamanın yanı sıra, osteoporoz oluşumunda da rol oynar. N-kaderini artırarak ve Wnt sinyalini inhibe ederek kemik kaybını uyarır. Sonuç olarak osteoblast aktivasyonunu inhibe eder.²⁹⁴ Tyagi ve ark'nın²⁹⁵ yaptıkları çalışmada ooferektomi fare osteopeni modelinde, Anti-

IL17 antikorunun, osteoklast fonksiyonunu baskılayarak ve osteoblast farklılaşmasını teşvik ederek kemik kaybına karşı koruduğunu tespit etmişlerdir. Bu osteoprotektif etkiler, RANKL veya TNF inhibitörleri ile osteoklast aktivasyonunu bloke ederek görülen etkilerden üstündür. Molnar ve ark.²⁹⁶ IL-17A düzeyleri yüksek postmenapozal kadınların daha düşük lomber omurga KMY'sine ve daha yüksek sRANKL'a sahip olduğunu saptamıştır. Azizieh ve ark.²⁹⁷ normal KMY'ye sahip kadınlara kıyasla, düşük KMY'li kadınların TNFa gibi sitokinlerle birlikte daha yüksek IL-17 seviyeleri olduğunu bildirmiştir. Birçok çalışmada Ankilozan Spondilit etyopatogenezinde IL-6, IL-8, IL-17 ve IL-23 gibi sitokinlerin rolleri gösterilmiştir.^{298, 299} Wang ve ark.³⁰⁰ yaptığı bir çalışmada BASDAI>4 olan Ankilozan Spondilit hastalarında serumda IL-17 ve IL-23 seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Bir başka çalışmada da Ankilozan Spondilit hastaları ile sağlıklı gönüllüler karşılaştırılmış olup ve serum IL-17 ile IL-23 seviyeleri Ankilozan Spondilit hastalarında daha yüksek bulunmuştur.²⁹⁸ Kemik homeostazi, osteoblastlar tarafından kemik oluşumunun koordinasyonu ve osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonu ile karmaşık bir şekilde korunur. Kotake ve ark.²¹³ tarafından, IL-17'nin kemiğin yeniden şekillenmesi sürecindeki rolü, ilk olarak romatoid artrit hastalarının sinoviyal sıvılarında bol miktarda bulunan osteoblasta bağımlı bir şekilde osteoklastogenezi uyaran IL-17'yi gösteren çalışmayla gösterilmiştir.²¹³ Takip eden çok sayıda çalışma, IL-17'nin hem in vitro hem de in vivo pro-osteoklastojenik rolünü doğrulamıştır. IL-17, fetal fare uzun kemiklerinde TNF- α ile kombinasyon halinde kemik rezorpsiyonunu uyarır.³⁰¹ Sato ve ark.³⁰² tarafından yapılan çalışmayla, IL-17'nin doğrudan osteoklast öncüleri üzerinde çalışıp çalışmadığı veya stromal hücreler aracılığıyla dolaylı olarak osteoklast farklılaşmasını etkileyip etkilemediği, Th17 hücrelerinin osteoklastogenez üzerindeki rolü ortaya konulmuştur.³⁰² Araştırmacılar, T hücrelerinin artritlik kemik yıkımındaki rolünü incelemek amacıyla,

IL-17'nin, sadece makrofaj içeren bir kültürün farklılaşması üzerinde hiçbir etkisi olmamakla birlikte, fare osteoklastları ve kemik iliği makrofajlarından (osteoklast prekürsörü) oluşan bir ortak kültürde osteoklastogenezi uyardığını göstermişlerdir. Bu durum IL-17'nin osteoblastlar gibi osteoklast destekleyen hücrelerde RANKL'nin (osteoklast farklılaşma faktörü) ekspresyonunu indüklediğini düşündürmektedir. Yine de, IL-17'nin osteoklast öncüleri üzerindeki doğrudan etkisi hala tartışmalıdır. IL-17, osteoblastların yokluğunda insan monositlerinden osteoklast farklılaşmasını indüklemiştir.³⁰³ Buna karşılık, Kitami ve ark.³⁰⁴ IL-17'nin RAW264 hücrelerinden osteoklast farklılaşmasını inhibe ettiğini bildirdi.³⁰⁴ Son zamanlarda, IL-17'nin, bir anti-osteoklastogenezi sitokini olan GM-CSF'nin salınmasını indükleyerek fare osteoblast-kemik iliği hücre ko-kültüründe osteoklastogenezi engellediği bildirilmiştir.³⁰⁵ IL-17'nin osteoklastogenezi üzerindeki kesin rolünün hala tam olarak ortaya çıkarılması gerekse de, IL-17'nin osteoklast farklılaşması üzerindeki etkisinin osteoklast öncülerinin kaynağı gibi birçok faktörden büyük ölçüde etkilenmesi muhtemeldir. IL-17'nin osteoblast farklılaşması ve kemik oluşumundaki rolü hakkında çok az şey bilinmektedir. Huang ve ark.³⁰⁶ IL-17'nin hem insan hem de fare kemik iliği stromal hücrelerinden koloni oluşturan birim fibroblast (CFU-f) oluşumunu uyardığını bildirerek, IL-17'nin mezenkimal kök hücreler için bir büyüme faktörü olduğunu öne sürmüşlerdir.³⁰⁶ IL-17'nin adipogenezi inhibe ettiği geniş çapta kabul görmüştür.³⁰⁷ Hui Z. ve ark.²⁸² tarafından yapılan çalışmanın bulgularında, kontrol grubundaki serum IL-17 düzeyleri çalışma grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiş olup kırıklı hastalarda potansiyel prognostik rolü desteklemiştir.²⁸² Daha önce yayınlanmış bir çalışma, IL-17'nin osteogenezi hücre immün yanıtlarda önemli bir aracı rolü olduğunu göstermiştir³⁰⁸ ve in vitro bir çalışma, IL-17'nin osteoblast olgunlaşmasını uyardığını göstermiştir.³⁰⁹

Bütün bu çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda IL-17 miktarlarının arttığı tespit edilirken, uygulanan ilaç tedavilerine göre IL-17 miktarları kırık iyileşme durumuna göre azalmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarında da deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda IL-17 seviyelerinde anlamlı bir artış olmuştur.

Kırık+Azelnidipin 4 mg/kg, 8mg/kg ve 16mg/kg grubunda IL-1B düzeyinde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Azelnidipin artan dozlarda uygulamasının kırık olgusunda artan IL-17 miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü kırık iyileşmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

OPN, kemikte bulunan kalsiyum bağlayıcı ekstraselüler matriks proteindir. OPN iltihaplanma, bağışıklık, anjiyogenez, yara onarımı, metastaz, göç ve osteoklastik kemik yeniden şekillenmesi gibi farklı görevlerde rol oynar. OPN mineralizasyon ve yeniden yapılanmanın kontrolünde önemli bir rol oynadığı kemikten üretilir. OPN mineral oluşumunu ve kemik büyümesini inhibe eder.³¹⁰⁻³¹² OPN eksikliği olan farelerde, artan mineral içeriği ve kristalliliği olduğunu göstermişlerdir. OPN aynı zamanda osteoklast aktivitesini düzenleyen CD44 reseptörlerine de bağlanır.³¹³⁻³¹⁵ Aydın A. Ve ark.³¹⁶ sıçanlarda yaptığı femur kırık modelinde OPN düzeylerinin sadece kırık grubunda daha yüksek olduğunu, OPN düzeylerinin α -LA uygulanan kırık gruplarında doza bağlı olarak düştüğünü, bu nedenle α -LA uygulamasının kemik iyileşmesini hızlandırdığı ve kırık dokuların iyileşmesini desteklediğini düşündüklerini bildirmişlerdir. Xing ve ark.³¹⁷ araştırmalarında, OPN mitarlarının hücre dışı matriks olgunlaşmasında arttığı tespit edilmiş olup yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarımızı desteklemektedir. Casarin ve ark.³¹⁸ tarafından yapılan başka bir araştırmada, OPN gen seviyelerinin sıçanlarda

oluşturulan deneysel kemik defekti iyileşmesinde arttığı ve kemik hasarının tamir edilmesine yardım ettiği tesbit edilmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda OPN miktarlarının arttığı tespit edilirken, uygulanan ilaç miktarlarına göre OPN düzeyleri kırık iyileşme durumuna göre azalmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarında da deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda OPN seviyelerinde anlamlı bir artış olmuştur.

Kırık+Azelnidipin 4 mg/kg, 8mg/kg ve 16mg/kg grubunda OPN düzeyinde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Azelnidipin artan dozlarda uygulamasının kırık olgusunda artan OPN miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü kırık iyileşmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

OCN sadece osteoblastlarda ve megakaryositlerde sentezlenir.³¹⁹ OCN rezorpsiyon sırasında kemikten salınmadığında OCN'nin serum seviyesi osteoblastların sentetik aktivitesini yansıtır.³²⁰ Kemik histomorfometri ölçümlerinde, serum OCN seviyeleri ile kemik oluşum hızları arasında yakın bir ilişki bulunmuştur.³²¹ OCN'nin serum konsantrasyonları ile diğer kemik oluşumu belirteçlerinininkiler arasında da bir korelasyon vardır.³²² Aydın A. ve ark.²⁷³ sıçanlarda yaptığı femur kırık modelinde OCN seviyelerinin OPN seviyeleri ile korele olduğunu bulduklarını belirtmişlerdir. α -LA uygulanan sıçanlarda serumunda ölçülen OCN ve OPN seviyelerinin azaldığı ve bu durumun kemik iyileşmesinin hızlanmasına neden olduğu tespit edilmiştir.²⁷³

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda OCN miktarlarının artmış olduğu tespit edilirken, uygulanan ilaç tedavilerine göre OCN miktarları kırık iyileşme durumuna göre azalmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçların da deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda OCN miktarlarında anlamlı bir artış olmuştur.

Kırık+Azelnidipin 4 mg/kg, 8mg/kg ve 16mg/kg grubunda OCN düzeyinde anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. Azelnidipin artan dozlarda uygulamasının kırık olgusunda artan OCN miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü kırık iyileşmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu sonuçlar, azelnidipin'in serum OPN ve OCN seviyelerini etkileyerek kemiğin yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğunu göstermektedir. Birlikte ele alındığında, azelnidipin'nin çeşitli etkileri (serum sitokini, OPN, OCN seviyeleri), bunun altta yatan karmaşık bir biyoloji yoluyla kemiğin yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğunu düşündürür.

Osteoporoz, KMY'de bir azalma ve kemiğin mikro-mimarisinde bozulma sonucunda kırılmaya yatkınlık ve kemik kırılabilirliğinde artış ile karakterize bir hastalıktır.³²³ Osteoporoz ve osteopeni oluşumu için, artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan kapasite gibi çeşitli risk faktörlerinin olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir.³²⁴ Oksidatif stres ile kemik yoğunluğu kaybı arasında bir ilişki olduğunu öne süren bazı kanıtlar vardır.³²⁵ Sies H. Ve ark.³²⁶ tarafından yapılan çalışmayla menopozda östrojen yoksunluğunun oksidatif stresi ve kemik yoğunluğu kaybını arttırdığı gösterilmiştir.³²⁶ Çelikel. ve ark.³²⁷ tarafından postmenopozal kemik yoğunluğu üzerine oksidatif stres ve antioksidan kapasitenin etkisinin araştırıldığı çalışmalarında serum TOS düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında osteopeni ve osteoporoz gruplarında artış gösterdiğini ancak bunun önemli bir fark olmadığını, gruplar arasında serum TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığını bildirmişlerdir.³²⁷ Genel olarak osteoblastlar ve osteoklastlar, sistemik hormonlar, kalsitonin, östrojen, sitokinler ve paratiroid hormonu (PTH), 25-hidroksivitamin D ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi diğer yerel faktörler tarafından kontrol edilir. Serbest radikallerin osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonunda yer aldığı daha önce

gösterilmiştir. Osteoklastlar, monosit makrofajlar tarafından³²⁸ üretilir ve ailesindeki hücreler, bağ dokusu bozulmasının yanı sıra çoklu hücrel etkilerle bağlantılı olan serbest radikaller meydana getirir.³²⁹ Oksijen kaynaklı serbest radikallerin oluşumunun, PTH, TNF- α ve IL-1 β tarafından uyarılan osteoklastik kemik rezorpsiyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. TNF- α 'nın, nükleer faktör B ligandı (NF-KB), osteoprotegerin (OPG) ve NF KB'nin uyarıcı reseptör aktivatörü dahil dolaylı veya doğrudan mekanizmalar yoluyla osteoklast oluşumunu modüle ettiği gösterilmiştir.^{330, 331} Yükselmiş plazma TNF alfa seviyeleri postmenopozal kadınlarda görülen indüklenmiş oksidatif stres ile ilişkilidir.³³² İndüklenmiş oksidatif stres, artmış kemik rezorpsiyonu ile sonuçlanır.³³³ Lee ve ark.³³⁴ ROS'un osteoklast farklılaşması için bir hücre içi sinyal aracısı olarak hareket ettiğini bildirmiştir. Kim ve ark.³³⁵ yakın zamanda ROS'un osteoklast farklılaşmasında önemli bir rol oynayabileceğini ve antioksidan alfa-lipoik asidin kemik eroziv hastalıkları için terapötik bir potansiyele sahip olduğunu bildirmiştir. Dreher ve ark.³³⁶ eksik veya azalmış GPx ekspresyonunun, bozulmuş osteoblast fonksiyonuna ve osteoporoz gibi ardışık kemik hastalıklarının gelişmesine yol açabileceğini iddia etmiştir. Antioksidan enzimler, kemik rezorpsiyonu için antioksidan savunma mekanizmasının belirteçleri olarak kabul edilmektedir.³²⁸ Altındağ ve ark çalışmalarında, osteoporozu olan hastalarda sağlıklı kontrollere göre daha düşük toplam antioksidan durum (TAS), daha yüksek toplam oksidatif durum (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonuçları ile artmış osteoklastik aktivite ve azalmış osteoblastik aktivitenin postmenopozal osteoporozda oksidan ve antioksidan durumu arasındaki dengesizlikle ilişkili olabileceğini gösterilmiştir.³³⁷ Hatipoğlu ve ark.³³⁸ yaptıkları hayvan çalışmalarında deneysel periodontitiste alıç (*Crataeus orientalis* M Bieber.) ekstraktının serum oksidatif durumu ve alveolar kemik kaybı üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda

tedavi ettikleri grupta artmış TAS ve azalmış TOS ve OSI seviyeleri tespit ettikleri için alıcın antioksidan etkisi nedeniyle alveoler kemik kaybını azaltabileceğini bildirmişlerdir.³³⁸

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda TAS miktarlarının azalmış olduğu tespit edilirken, uygulanan ilaç tedavilerine göre TAS smiktarları kırık iyileşme durumuna göre artmıştır. Bunun yanısıra TOS seviyeleri anlamlı olarak artarken uygulanan ilaç tedavilerine göre TOS miktarları kırık iyileşme durumuna göre azalmıştır.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarımızda da deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda TAS seviyelerinde anlamlı bir düşüş olurken TOS seviyeleri artmıştır.

Kırık+Azelnidipin 4 mg/kg, 8mg/kg ve 16mg/kg grubunda TAS düzeyinde anlamlı bir artış, TOS düzeylerinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Azelnidipin artan dozlarda uygulamasının kırık olgusunda azalan TAS miktarını anlamlı derecede artırdığını, TOS miktarını ise azaltarak kırık iyileşmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu durumun Azelnidipin'in antioksidan etkisiyle açıklayabiliriz.

Osteoblastik farklılaşma faktörü olan ALP ³³⁹, aktif haldeyken inorganik fosfat ve pirofosfatın hidrolizi ile matriks proteinlerini minerilazisyon için uyarır.³⁴⁰ İn vivo ve İn vitro çalışmalarla, ALP'deki aktivite artışının özellikle osteogenesiste OPN gibi ajanların ve osteojenik genlerin sentezini de artırdığı gösterilmiştir.³⁴¹ Xiaoning ve ark.³⁴² tarafından yapılan, karvaryl kemik defektinin iyileşmesinin araştırıldığı çalışmada artmış ALP aktivitesinin, osteoblast hücre ve matriks minerilazisyonunda etkisi olduğunu bildirilmiştir. 1. 2. ve 3. hafta sonunda ALP miktarlarının ve kalsiyum miktarlarının arttığını tespit etmişlerdir. ALP, osteoblastlar tarafından salgılanan ve kemik mineralizasyonunda önemli rolü olan kolajen olmayan proteindir.³⁴³ Kemik kaybı durumunda serumda ALP seviyesi artar.³⁴⁴ ALP'nin plazma konsantrasyonu,

kemik oluşumunun bir biyokimyasal göstergesidir; ancak ALP birkaç dokudan elde edilebilir.³⁴⁵⁻³⁴⁷ Kallustaki kırıkta hücreleri tarafından salgılanabilen kemiğe özgü ALP (BSALP), serum ALP'den daha doğru bir osteoblastik aktivite indeksidir. Xufeng ve ark.³⁴⁷ yapmış oldukları çalışmada kırık sonrası 1. ve 3. haftalarda, deney grubu kallusundaki ALP düzeyinin kontrol grubundan önemli ölçüde yüksek olduğunu tespit etmiş, bununla birlikte, BSAP'ın bu aynı etkisini hayvan kırık modelinin yerel kallusunda da göstermişlerdir. Bu çalışmada kırık sonrası 8. haftada kontrol ve deney grupları arasında ALP düzeyinde anlamlı bir fark olmamasına rağmen, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deney grubunda sayısal olarak daha yüksek bir ALP düzeyi gözlenmiştir. Kırık iyileşmesi, ALP'nin salgılanarak kemiğin yeniden şekillenmesine yol açtığı kademeli ve sıralı bir süreçtir.³⁴⁷ Sağlıklı deneklerde BSALP, dolaşımdaki toplam alkalın fosfatazın yaklaşık %50'sini oluşturur. BSALP, hem kemik oluşumunu hem de kemik yıkımını alkalın fosfatazdan daha duyarlı bir şekilde yansıtır.³⁴⁸ Serum BSALP, kemik oluşumunun dinamik parametreleri ile dikkate değer bir korelasyon gösterir.³⁴⁹ Çetin G. Ve ark multipl miyelomlu yüz on üç hastada yaptıkları çalışmada çeşitli tedavi rejimleri uygulanan hastalardaki tedavinin üçüncü ve altıncı ayında serum BSALP düzeylerini ölçerek karşılaştırmış olup, bortezomib ve tedavi dışı gruplardaki tedavi öncesi seviyelerden anlamlı derecede yüksekken, diğer gruplarında anlamlı bir fark gözlemlenmemişlerdir.³⁴⁸ Herrmann ve ark.³⁵⁰ yapmış oldukları çalışmada, 1 femur ve 13 tibia kırığı dışında herhangi bir hastalığı olmayan 14 adet hastadan aldıkları kan örneklerinden ALP miktarlarına bakmışlardır. Kırık durumunda ALP düzeylerinin belirgin olarak arttığı, iyileşmeye bağlı olarak zamanla azaldığı tespit edilmiştir. Gecikmiş kaynama grubunda, başlangıç ALP miktarları yüksek tespit edilmiş olup ve araştırma süresince de artışın devam ettiği saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada, kırık sonrası ilk iki ayda ALP'nin ardışık ölçülmesinden, gecikmiş kaynama durumunun

göstergesi olarak yararlanılabileceği düşünülmüştür.³⁵⁰ Muljačić ve ark. tarafından yapılan araştırmada, 8 femur kırığı ve 33 tibia kırığı olan ve cerrahi işlem uygulanan 41 hastada erken posttravmatik dönemde serum kemik-spesifik ALP seviyelerinin kırık iyileşme hızının tespitinde kullanılıp kullanılamayacağını incelemişlerdir. Bu çalışmada postoperatif 7. 14. ve 21. günlerde alınan kan örneklerinde ALP ve kemiğe spesifik ALP seviyeleri ölçülmüş ve aynı zamanda kırık kaynaması da değerlendirilmiştir. Femur ve tibia gruplarında 21. gündeki BSALP seviyelerinin diğer günlerdeki ölçümlere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her iki grupta da serum ALP miktarları ile BALP miktarlarının birbiriyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde serum ALP ve BSALP gibi biyokimyasal parametrelerin sonuçları değerlendirilerek kırık iyileşmesi hakkında yorumlar yapılabileceği sonucuna varılmıştır.³⁵¹ Kanwar ve ark.³⁵² yapmış oldukları çalışmada, uzun kemik kırıkları olan 50 hastada cerrahi işlem sonrası alınan kandan serum ALP değerleri postoperatif 2, 3 ve 6. hafta ve 3 ve 6. aylarda ölçülmüştür. ALP seviyelerinin 6. haftada maksimum düzeye ulaştığı, kaynama sonrası normale dönüş varken gecikmiş kaynama grubunda normale dönmesinin 6 aya kadar uzadığı tespit edilmiştir. Yapılan bu araştırmada serum ALP seviyelerinin kırık iyileşmesi sürecine iyi bir katkısı olduğu tespit edilmesine rağmen, diğer bazı araştırmalarda ALP'ın kemik oluşumunda daha spesifik belirteç olduğu bildirilmiştir.³⁵² Özmeriç A. ve ark.³⁵³ yapmış oldukları sıçanlarda oluşturulan deneysel kemik kırığı modelinde Kübik Bor Nitrür ile Kaplanmış İntramedüller İmplantların etkisini araştırdıkları çalışmada BN kaplama gruplarında daha yüksek alkalik fosfataz seviyeleri tespit etmiş ve bunun BN'ye bağlı olarak hızlandırılmış yeni kemik oluşumunun sonucu olabileceğini bildirmişlerdir.³⁵³

Bizim çalışmamızda femoral kırık kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre Kemiğe Spesifik ALP miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana

gelirken, Azelnidipin 4 mg/kg, Azelnidipin 8 mg/kg, Azelnidipin 16mg/kg deney gruplarındaki Kemiğe Spesifik ALP miktarında anlamlı şekilde azalmıştır. Azelnidipin artan dozlarda uygulamasının kırık olgusunda artan Kemiğe Spesifik ALP miktarını anlamlı derecede düşürdüğünü kırık iyileşmesinde etkin rol oynadığı düşünülmektedir.

Kommenou ve ark.³⁵⁴ alkalın fosfatazın lokal, inorganik fosfor konsantrasyonunu arttırdığına inanıldığını belirtmişlerdir. Hücre dışı fosfor konsantrasyonundaki artışlar, kalsiyum tuzları birikmesine neden olur. Bu birikintiler hidroksiapatit kristal oluşumuna dönüşür ve sonuç olarak hücre dışı kalsiyum konsantrasyonları düşer. Kırık oluşumuna bağlı akut reaksiyonlar serum alkalin fosfataz aktivitesinde artışa, hipokalsemiye ve hiperfosfatemiyeye neden olur. Özmeriç A. ark.³⁵³ yapmış oldukları sıçanlarda oluşturulan deneysel kemik kırığı modelinde Kübik Bor Nitrür ile Kaplanmış İntramedüller İmplantların etkisini araştırdıkları çalışmada biyokimyasal test sonuçlarında BN kaplama grubuna kıyasla kontrol grubunda daha yüksek serum kalsiyum seviyeleri ve daha düşük kan fosfor seviyelerinin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Kommenou ve ark.³⁵⁵ araştırmalarında, köpekte uzun kemik diafizer kapalı kırık işleminden 10. gün, 20. gün ve 30. gün sonra kan numuneleri alınarak serum P, Ca+2 ve ALP düzeyleri ölçülmüş olup, serum ALP seviyesinin 10. günde maksimum seviyede olduğu ilerleyen dönemlerde normal seviyelere geldiği tespit edilmiştir. Tüm gruplarda serum Ca+2 ve P miktarlarının ALP miktarları ile ters orantılı olduğu tespit edilmiştir. Nilsson ve ark. yapmış oldukları çalışmada,⁶³ femur boyun kırığı olan ve cerrahi işlem uygulanan hastalarda serum ALP, P ve Ca+2 değerlerini postoperatif 1, 2, 4 ve 8. hafta alınan kan örnekleri ile karşılaştırmışlardır. Serum ALP seviyelerinin 1.haftada en yüksek düzeye çıkıp 8. haftada normal seviyelere indiği, P seviyelerinin yavaş yavaş artarak 2. ve 3. haftalarda en yüksek düzeye çıkıp 8. haftada normal seviyelere indiği ve Ca+2

seviyelerinin ise ilk bir ay düşük seyredip, ilerleyen günlerde normal seviyelerine döndüğü tespit edilmiştir.³⁵⁶

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda deneysel kırık modeli oluşturulan gruplarda P miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamıştır.

Yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarımızda P ve Ca düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

Birlikte ele alındığında, azelnidipin'nin çeşitli etkileri (serum sitokini, OPN, OCN seviyeleri vs), bunun altta yatan karmaşık bir biyoloji yoluyla kemiğin yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğunu düşündürür.

Kırık iyileşmesi; kırıkta kallus oluşumu, kalsifikasyon, kemiğin yeniden şekillenmesi ve hematoma oluşması gibi birçok farklı süreçler ile seyreder ve bu süreçleri etkileyen çeşitli faktörler vardır.²⁵²

Kemik defekti yaparken, teknik işlem nedeniyle özellikle hasar gören damar duvarından kanama meydana gelir ve hematoma oluşur. Süreç içerisinde oluşan hematomun yerini kırık bölgesine göç eden inflamatuvar hücreler ve fibröz doku alır.⁶⁰ Bu olaya fibrozis denilir ve meydana gelen doku granülasyon dokusudur. Olaya fibroblastik proliferasyon, kapiller damar angiogenezi ve yine inflamatuvar mononükleer hücre infiltrasyonu eşlik eder. Kırık iyileşmesinin en önemli basamağı olup kaybolan doku açığını kapatılır ve kemikleşme süreci başlar. Kırık tanısı ve takibi için altın standart, muayene ve radyolojik incelemedir. Hayvan deneylerinde, sıçan mobilizasyonu ile muayene bulguları değerlendirilebilir ancak objektif değerlendirme için radyolojik inceleme önemlidir. Radyolojik inceleme ile klinik yansımalar hakkında bilgi sahibi oluruz. Radyolojik değerlendirmede literatürde direk grafi, bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmıştır. Biz çalışmamızda mamografi ile görüntülemeyi kullandık. Direk grafilerin değerlendirilmesinde farklı skorlama

sistemleri bulunmaktadır.^{357, 358} 2014 yılında Tulyapruek ve ark.³⁵⁸ küçük hayvan deneylerinde radyolojik kırık iyileşme skorlarını doğrulamak ve birbirleri ile kıyaslamak için bir çalışma yapmıştır. Lane-Sandhu kırık sınıflama sisteminin kemik iyileşmesi değerlendirmesinin ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğuna dair sonuçlar bildirmiştir.³⁵⁸

Çalışmamızda radyolojik incelemede Azelnidipin ve kontrol gruplarına mamografi görüntülemesi sonucunda Lane-Sandhu Kırık İyileşmesi Skorlama Sistemine göre skorlama yaptık. Çalışmamızda bulunan femur kırık+ Azelnidipin 8mg/kg ve femur kırık +azelnidipin 16mg/kg gruplarındaki ratlardaki iyileşmenin femur kırık + Azelnidipin 4mg/kg grubundaki ratlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Kallus dokusunu, psödoartrozu, kaynamayı ve kaynamamayı bize gözle görülür bir şekilde göstermesi, diğer bulgularda oluşabilecek şüpheyi ortadan kaldırmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar bulunması, diğer sonuçlarla örtüştüğü için çalışmamızın gücünü arttırmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

“Ratlarda Oluşturulan Femur Kırığı Modelinde Bir Kalsiyum Kanal Blokeri Olan Azelnidipin’in Etkilerinin Araştırılması” adı altında yapılan araştırmamızın sonuçları umut vericidir. Deneysel araştırmalarımız neticesinde;

Serum sitokin düzeylerine (TNF- α , IL-1ve IL-17) üzerine etkileri olumlu yöndedir.

Kırık iyileşmesinde önemli parametreler olan serum OPN ve OCN seviyeleri azelnidipin grubunda düzelme göstermiştir.

Antioksidan sistem (TOS ve TAS) üzerine Azelnidipin’in etkileri ise olumlu yöndedir.

Serum BSALP seviyeleri üzerine Azelnidipin’in etkileri olumlu yönde olup, P ve Ca seviyeleri üzerine Azelnidipin’in etkisiyle anlamlı değişiklikler meydana gelmemiştir.

Radyolojik incelemeler sonucunda da Azelnidipin’in kırık iyileştirmesinde etkili olduğu gözlenmektedir.

Tespit edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; Ca kanal blokeri olan Azelnidipin’in kemik kırığı tedavisinde önemli bir rol üstlenebileceği gösterilmiştir. Azelnidipin’in kemik kırığının iyileşmesinde olumlu etkileri tespit edildiği gerek biyokimyasal gerekse radyolojik olarak görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Brand RA, Lehmann TR. Low-back impairment rating practices of orthopaedic surgeons. Spine (Phila Pa 1976), 1983, 8: 75-78.
2. Ege R. Travmatoloji kırıklar eklem yaralanmaları, 4. Baskı, Kadioğlu Matbaası Ankara, 1989: 2462-2506.
3. MacKenzie EJ, Bosse MJ, Pollak AN, Webb LX, Swiontkowski MF, Kellam JF, Smith DG, Sanders RW, Jones AL, Starr AJ, McAndrew MP, Patterson BM, Burgess AR, Castillo RC. Long-term persistence of disability following severe lower-limb trauma. Results of a seven-year follow-up. J Bone Joint Surg Am, 2005, 87: 1801-1809.
4. Alturfan A, Akalın Y. Ortopedik travmatoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, 2002: 10-14.
5. Kılıçoğlu Ss. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2002, 55.
6. Rowe NL. Maxillofacial injuries--current trends and techniques. Injury, 1985, 16: 513-525.
7. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury, 2005, 36: 1392-1404.
8. Stauffer BL, Hoetzer GL, Smith DT, DeSouza CA. Plasma C-reactive protein is not elevated in physically active postmenopausal women taking hormone replacement therapy. J Appl Physiol (1985), 2004, 96: 143-148.
9. Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in patients with type II diabetes mellitus. Circulation, 2002, 106: 1783-1787.

10. Trueta J, Buhr AJ. The Vascular Contribution to Osteogenesis. V. The Vasculature Supplying the Epiphysial Cartilage in Rachitic Rats. *J Bone Joint Surg Br*, 1963, 45: 572-581.
11. Trueta J, Little K. The vascular contribution to osteogenesis. II. Studies with the electron microscope. *J Bone Joint Surg Br*, 1960, 42-B: 367-376.
12. Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1575-1582.
13. Clarkin CE, Gerstenfeld LC. VEGF and bone cell signalling: an essential vessel for communication? *Cell Biochem Funct*, 2013, 31: 1-11.
14. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell*, 2010, 19: 329-344.
15. Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*, 2007, 38 Suppl 1: S11-25.
16. Rath B, Nam J, Knobloch TJ, Lannutti JJ, Agarwal S. Compressive forces induce osteogenic gene expression in calvarial osteoblasts. *J Biomech*, 2008, 41: 1095-1103.
17. Dickson KF, Katzman S, Paiement G. The importance of the blood supply in the healing of tibial fractures. *Contemp Orthop*, 1995, 30: 489-493.
18. Park S, Han SH, Lee TJ. Algorithm for recipient vessel selection in free tissue transfer to the lower extremity. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 103: 1937-1948.
19. Lu C, Miclau T, Hu D, Marcucio RS. Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res*, 2007, 25: 51-61.

20. Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS. Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res*, 2008, 26: 1384-1389.
21. Oizumi K, Nishino H, Koike H, Sada T, Miyamoto M, Kimura T. Antihypertensive effects of CS-905, a novel dihydropyridine Ca^{++} channel blocker. *Jpn J Pharmacol*, 1989, 51: 57-64.
22. Jinno T, Iwai M, Li Z, Li JM, Liu HW, Cui TX, Rakugi H, Ogihara T, Horiuchi M. Calcium channel blocker azelnidipine enhances vascular protective effects of AT1 receptor blocker olmesartan. *Hypertension*, 2004, 43: 263-269.
23. Ohyama T, Sato K, Kishimoto K, Yamazaki Y, Horiguchi N, Ichikawa T, Kakizaki S, Takagi H, Izumi T, Mori M. Azelnidipine is a calcium blocker that attenuates liver fibrosis and may increase antioxidant defence. *Br J Pharmacol*, 2012, 165: 1173-1187.
24. Duncan RL, Akanbi KA, Farach-Carson MC. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin Nephrol*, 1998, 18: 178-190.
25. Lieberherr M. Effects of vitamin D3 metabolites on cytosolic free calcium in confluent mouse osteoblasts. *J Biol Chem*, 1987, 262: 13168-13173.
26. Caffrey JM, Farach-Carson MC. Vitamin D3 metabolites modulate dihydropyridine-sensitive calcium currents in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem*, 1989, 264: 20265-20274.
27. Bidwell JP, Carter WB, Fryer MJ, Heath H, 3rd. Parathyroid hormone (PTH)-induced intracellular Ca^{2+} signalling in naive and PTH-desensitized osteoblast-like cells (ROS 17/2.8): pharmacological characterization and evidence for synchronous oscillation of intracellular Ca^{2+} . *Endocrinology*, 1991, 129: 2993-3000.

28. Moreau R, Hurst AM, Lapointe JY, Lajeunesse D. Activation of maxi-K channels by parathyroid hormone and prostaglandin E2 in human osteoblast bone cells. *J Membr Biol*, 1996, 150: 175-184.
29. Kurihara N, Ishizuka S, Kiyoki M, Haketa Y, Ikeda K, Kumegawa M. Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Endocrinology*, 1986, 118: 940-947.
30. Nakatani Y, Tsunoi M, Haketa Y, Kurihara N, Fujita K, Kumegawa M. Effects of parathyroid hormone on cAMP production and alkaline phosphatase activity in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123: 894-898.
31. Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. Bone, basic histology. 1995.
32. Sezgin A. Sıçan femur kırık modelinde traneksamik asit kullanımının kırık iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi: Deneysel çalışma.
33. L Mescher A. Junqueira's basic histology. 2016.
34. Webb J, Tricker J. A review of fracture healing. *Current Orthopaedics*, 2000, 6: 457-463.
35. Rey C, Kim HM, Gerstenfeld L, Glimcher MJ. Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium-phosphate crystals formed during the calcification of the organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 1577-1588.
36. Weinstein S, Buckwalter J. Musculoskeletal tissues and the musculoskeletal system. *İçinde: Turek's Orthopedics*, Lippincott, Philadelphia, 1994: 42-67.
37. Kalenderer O, Turgut A. Totek Ortopedi ve Travmatoloji Temel Bilimler ve Araştırma Kitabı 2 Baskı. Ankara, Totek, 2016.

38. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 2007, 130: 456-469.
39. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 421746.
40. de Boer HH, Van der Merwe AE. Diagnostic dry bone histology in human paleopathology. *Clin Anat*, 2016, 29: 831-843.
41. Mescher AL, Neff AW, King MW. Inflammation and immunity in organ regeneration. *Dev Comp Immunol*, 2017, 66: 98-110.
42. Baykal B. Histoloji konu anlatımı ve atlas. Palme Yayıncılık, Ankara, 2014, 676.
43. Tanrıku S, Gönen E. Kırık iyileşmesi. *TOTBİD Dergisi*, 2017, 16: 455-475.
44. Hall J. Guyton ve Hall tıbbi fizyoloji (13. Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2016.
45. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1092: 385-396.
46. Xian CJ. Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. *Endocr Rev*, 2007, 28: 284-296.
47. Küçükalp A. İmmünnutrisyonun (Glutamin-Alanin) kırık iyileşmesi üzerine Etkisi. Bursa Uludag University (Turkey), 2012.
48. Aydın Ş. Yüksek doz atorvastatinin kırık iyileşmesi üzerine etkisinin radyolojik, histopatolojik ve biyomekanik yönden araştırılması (Ratlarda deneysel çalışma).
49. Junqueira LC, Long J. Basic Histology 5th Edition. Baskı. Lange Medical Publications 1986., 1998.

50. Alparslan B. TOTEK Ortopedi ve Travmatoloji Temel Bilimler ve Araştırma Kitabı. 2 Baskı. Ankara, Totek, 2016.
51. Augustin G, Antabak A, Davila S. The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology. *Injury*, 2007, 38: 1115-1130.
52. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res*, 2014, 93: 109-116.
53. Miller M, Thompson S. ur. Miller's review of orthopaedics. 7. izd. 2016.
54. Miller MD, Thompson SR. Miller's Review of Orthopaedics E-Book. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2019.
55. Aydın B. Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. TC Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 1.
56. İnsal B, Pişkin İ. Kemik Dokusunun Fizyolojisi. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 2017, 28: 28-32.
57. Browner BD. What's new in orthopaedic surgery. *J Am Coll Surg*, 1997, 184: 169-176.
58. Niedzwiedzki T, Filipowska J. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *J Mol Endocrinol*, 2015, 55: R23-36.
59. Leiggener CS, Curtis R, Pfluger D, Rahn BA. Effect of perforations in burr hole covers on cranial bone regeneration in rabbits. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61: 131-137.
60. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011, 42: 551-555.

61. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop Relat Res, 1998; S7-21.
62. Einhorn TA, Buckwalter JA, O'Keefe RJ. Orthopaedic basic science: foundations of clinical practice. Baskı. Amer Academy of Orthopaedic, 2007.
63. Buckwalter JA, Einhorn TA, Marsh J, Gulotta L, Ranawat A, Lane J. Bone and joint healing. Rockwood and Green's Fractures in Adults. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins, 2001: 245-271.
64. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. Journal of Bone and Mineral Research, 2001, 16: 1004-1014.
65. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. J Bone Miner Res, 2002, 17: 513-520.
66. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. Biomedical and environmental sciences, 2015, 28: 57-71.
67. Cho-Chung YS. Autoantibody biomarkers in the detection of cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2006, 1762: 587-591.
68. 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. J Cell Biochem, 2003, 88: 873-884.
69. Leung KS, Sher AH, Lam TS, Leung PC. Energy metabolism in fracture healing. Measurement of adenosine triphosphate in callus to monitor progress. J Bone Joint Surg Br, 1989, 71: 657-660.

70. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 1992, 13: 81-88.
71. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*, 1996, 19: 1S-12S.
72. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*, 2011, 42: 551-555.
73. Lehmann W, Edgar CM, Wang K, Cho TJ, Barnes GL, Kakar S, Graves DT, Rueger JM, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing. *Bone*, 2005, 36: 300-310.
74. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*, 2008, 15: 100-114.
75. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol*, 2008, 19: 459-466.
76. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 2008, 14: 179-186.
77. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*, 2008, 92: 161-168.
78. Buckwalter JA, Grodzinsky AJ. Loading of healing bone, fibrous tissue, and muscle: implications for orthopaedic practice. *J Am Acad Orthop Surg*, 1999, 7: 291-299.
79. Miller MD, Thompson SR, Hart J. Review of orthopaedics e-book. Baski. Elsevier Health Sciences, 2012.
80. Li J, Ahmad T, Spetea M, Ahmed M, Kreicbergs A. Bone reinnervation after fracture: a study in the rat. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1505-1510.

81. Miller M. Miller'in Ortopedi Kitabı (Çev. Yetkin H ve Yazıcı M) Akademi Doktorlar Yayınevi. 2006.
82. Mauck KF, Clarke BL. Diagnosis, screening, prevention, and treatment of osteoporosis. Mayo Clin Proc, 2006, 81: 662-672.
83. Wood G. General principles of fracture treatment. Campbell's operative orthopaedics, 2003, 3: 3053-3054.
84. Peichl P, Holzer LA, Maier R, Holzer G. Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93: 1583-1587.
85. Raschke M, Rasmussen MH, Govender S, Segal D, Suntum M, Christiansen JS. Effects of growth hormone in patients with tibial fracture: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Eur J Endocrinol, 2007, 156: 341-351.
86. Cruess RL, Sakai T. Effect of cortisone upon synthesis rates of some components of rat bone matrix. Clin Orthop Relat Res, 1972, 86: 253-259.
87. Evarts CM. Surgery of the musculoskeletal system. Baskı. Churchill Livingstone, 1990.
88. Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. Orthop Clin North Am, 2000, 31: 375-388.
89. Hamdan TA, Hussein RA, Jawad AM. Drugs And Fracture Healing: A Review Of Literature. Basrah Journal of Surgery, 2005, 11.
90. Dekel S, Lenthall G, Francis M. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. J Bone Joint Surg Br, 1981, 63: 185-189.

91. Street JT, McGrath M, O'Regan K, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. Thromboprophylaxis using a low molecular weight heparin delays fracture repair. Clin Orthop Relat Res, 2000: 278-289.
92. Li J, Mori S, Kaji Y, Mashiba T, Kawanishi J, Norimatsu H. Effect of bisphosphonate (incadronate) on fracture healing of long bones in rats. J Bone Miner Res, 1999, 14: 969-979.
93. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Endocr Rev, 1998, 19: 80-100.
94. Rw B, Heckman J. Court-Brown CM. Rockwood & Green's fractures in adults, volume I (30); 117-1159. 2006.
95. Luginbuehl V, Meinel L, Merkle HP, Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 2004, 58: 197-208.
96. Kayaalp O. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Baskı. Ankara, Pelikan Yayınları, 2019.
97. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84: 1032-1044.
98. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. Injury, 2008, 39 Suppl 2: S45-57.
99. Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J. Angiogenic factors in bone local environment. Cytokine Growth Factor Rev, 2013, 24: 297-310.

100. Rasmussen H. The calcium messenger system (2). N Engl J Med, 1986, 314: 1164-1170.
101. Spedding M, Paoletti R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. Pharmacol Rev, 1992, 44: 363-376.
102. Halici Z. Amlodipin, lasidipin ve nikardipinin intakt ve adrenaletomili sıçanlarda karrageninle oluşturulan inflamasyona etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005, Erzurum.
103. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. Baskı. Saunders Philadelphia, 1986.
104. Godfraind T, Miller R, Wibo M. Calcium antagonism and calcium entry blockade. Pharmacol Rev, 1986, 38: 321-416.
105. Remme WJ, Krauss XH, van Hoogenhuyze DC, Kruyssen DA. Hemodynamic tolerability and anti-ischemic efficacy of high dose intravenous diltiazem in patients with normal versus impaired ventricular function. J Am Coll Cardiol, 1993, 21: 709-720.
106. Kushiro T, Watanabe N, Takahashi A, Koike M, Saito F, Otsuka Y, Kanmatsuse K. Different effects of L-type and L+N-type calcium channel blockers on hamster cheek pouch venules. J Cardiovasc Pharmacol, 2004, 44: 672-675.
107. Abdollahi M, Nikfar S, Abdoli N. Potentiation by nitric oxide synthase inhibitor and calcium channel blocker of aspartame-induced antinociception in the mouse formalin test. Fundam Clin Pharmacol, 2001, 15: 117-123.
108. Carnevale KA, Cathcart MK. Calcium-independent phospholipase A(2) is required for human monocyte chemotaxis to monocyte chemoattractant protein 1. J Immunol, 2001, 167: 3414-3421.

109. Schmidt WK, Way EL. Hyperalgesic effects of divalent cations and antinociceptive effects of a calcium chelator in naive and morphine-dependent mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 1980, 212: 22-27.
110. Feng YH, Hart G. Suppression of oxidant production by diltiazem, nifedipine and verapamil in human neutrophils. *Clin Sci (Lond)*, 1996, 91: 459-466.
111. Laroux FS, Pavlick KP, Hines IN, Kawachi S, Harada H, Bharwani S, Hoffman JM, Grisham MB. Role of nitric oxide in inflammation. *Acta Physiol Scand*, 2001, 173: 113-118.
112. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol*, 1993, 54: 171-178.
113. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 1993, 361: 315-325.
114. Messerli FH. Introduction: antihypertensive therapy: past, present, and future. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1994, 8 Suppl 1: 7-9.
115. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. The pharmacological basis of therapeutics. Goodman, Gilmans, editors, 2006, 11.
116. Köse İ. Kemik defektlerinin iyileşmesinde sentetik kemik greftleri ile kalsiyum kanal blokerleri ve β -2 reseptör antagonistlerinin etkilerinin deneysel olarak incelenmesi.
117. Krebs R. Calcium antagonists: New vistas in theoretical basis and clinical use. *Calcium antagonists and cardiovascular disease*, 1984: 347-357.
118. Vanhoutte PM. The expert committee of the World Health Organization on classification of calcium antagonists: the viewpoint of the rapporteur. *Am J Cardiol*, 1987, 59: 3A-8A.

119. Fleckenstein A, Van Breemen C, Gross R, Hoffmeister F. Cardiovascular effects of dihydropyridine-type calcium antagonists and agonists. Baskı. Springer Science & Business Media, 2013.
120. Korstanje C. Barnidipine, a long-acting slow onset calcium antagonist. Int J Clin Pract Suppl, 2000: 2-5.
121. Dhein S, Salameh A, Berkels R, Klaus W. Dual mode of action of dihydropyridine calcium antagonists: a role for nitric oxide. Drugs, 1999, 58: 397-404.
122. Farmakoloji KST. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. 2000.
123. Epstein BJ, Vogel K, Palmer BF. Dihydropyridine calcium channel antagonists in the management of hypertension. Drugs, 2007, 67: 1309-1327.
124. Grossman E, Messerli FH. Calcium antagonists. Prog Cardiovasc Dis, 2004, 47: 34-57.
125. Israili ZH. The use of calcium antagonists in the therapy of hypertension in the elderly. Am J Ther, 2003, 10: 383-395.
126. Hernandez RH, Armas-Hernandez MJ, Velasco M, Israili ZH, Armas-Padilla MC. Calcium antagonists and atherosclerosis protection in hypertension. Am J Ther, 2003, 10: 409-414.
127. Economy KE, Abuhamad AZ. Calcium channel blockers as tocolytics. Semin Perinatol, 2001, 25: 264-271.
128. Richard S. Vascular effects of calcium channel antagonists: new evidence. Drugs, 2005, 65 Suppl 2: 1-10.
129. Kain V, Kumar S, Puranik AS, Sitasawad SL. Azelnidipine protects myocardium in hyperglycemia-induced cardiac damage. Cardiovasc Diabetol, 2010, 9: 82.

130. Wellington K, Scott LJ. Azelnidipine. *Drugs*, 2003, 63: 2613-2621; discussion 2623-2614.
131. Komoda H, Inoue T, Node K. Anti-inflammatory properties of azelnidipine, a dihydropyridine-based calcium channel blocker. *Clin Exp Hypertens*, 2010, 32: 121-128.
132. Civantos B, Aleixandre A. Blood pressure and alpha-vascular reactivity in hypertensive rats treated with amlodipine and dietary Ca. *Eur J Pharmacol*, 2004, 489: 101-110.
133. Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation*, 1998, 97: 576-580.
134. Mason RP, Walter MF, Trumbore MW, Olmstead EG, Jr., Mason PE. Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31: 275-281.
135. Chen Q, Shou P, Zhang L, Xu C, Zheng C, Han Y, Li W, Huang Y, Zhang X, Shao C, Roberts AI, Rabson AB, Ren G, Zhang Y, Wang Y, Denhardt DT, Shi Y. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2014, 32: 327-337.
136. Kothari AN, Arffa ML, Chang V, Blackwell RH, Syn WK, Zhang J, Mi Z, Kuo PC. Osteopontin-A Master Regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Clin Med*, 2016, 5.
137. Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, 41: 723-749.
138. Mckee MD, Nanci A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connective tissue research*, 1996, 35: 197-205.

139. Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch J-V. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone γ -carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation*, 1988, 37: 123-136.
140. Farrokhi V, Chabot JR, Neubert H, Yang Z. Assessing the Feasibility of Neutralizing Osteopontin with Various Therapeutic Antibody Modalities. *Sci Rep*, 2018, 8: 7781.
141. Komaba H, Kaludjerovic J, Hu DZ, Nagano K, Amano K, Ide N, Sato T, Densmore MJ, Hanai JJ, Olauson H, Bellido T, Larsson TE, Baron R, Lanske B. Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. *Kidney Int*, 2017, 92: 599-611.
142. Li SA, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. *Cell Struct Funct*, 2004, 29: 91-99.
143. Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, Hruska KA, Higashio K, Enomoto S, Nifuji A, Rittling SR, Noda M. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem*, 2001, 276: 13065-13071.
144. Morishita M, Ono N, Miyai K, Nakagawa T, Hanyu R, Nagao M, Kamolratanakul P, Notomi T, Rittling SR, Denhardt DT, Kronenberg HM, Ezura Y, Hayata T, Nakamoto T, Noda M. Osteopontin deficiency enhances parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor (PPR) signaling-induced alteration in tooth formation and odontoblastic morphology. *Tissue Cell*, 2011, 43: 196-200.
145. Bouleftour W, Bouet G, Granito RN, Thomas M, Linossier MT, Vanden-Bossche A, Aubin JE, Lafage-Proust MH, Vico L, Malaval L. Blocking the expression of

- both bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN) impairs the anabolic action of PTH in mouse calvaria bone. *J Cell Physiol*, 2015, 230: 568-577.
146. Lee MN, Hwang HS, Oh SH, Roshanzadeh A, Kim JW, Song JH, Kim ES, Koh JT. Elevated extracellular calcium ions promote proliferation and migration of mesenchymal stem cells via increasing osteopontin expression. *Exp Mol Med*, 2018, 50: 1-16.
 147. Chen Y, Bal BS, Gorski JP. Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem*, 1992, 267: 24871-24878.
 148. Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90: 8562-8565.
 149. Hunter GK, Hauschka PV, Poole RA, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*, 1996, 317: 59-64.
 150. Qiu S, Wierzbicki A, Orme C, Cody A, Hoyer J, Nancollas G, Zepeda S, De Yoreo J. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization by osteopontin and citrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, 101: 1811-1815.
 151. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biology*, 2000, 19: 615-622.
 152. McKee M, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microscopy research and technique*, 1996, 33: 141-164.

153. Busse B, Hahn M, Soltau M, Zustin J, Puschel K, Duda GN, Amling M. Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. *Bone*, 2009, 45: 1034-1043.
154. McKEE MD, Nanci A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 760: 177-189.
155. Ishijima M, Rittling SR, Yamashita T, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Enhancement of osteoclastic bone resorption and suppression of osteoblastic bone formation in response to reduced mechanical stress do not occur in the absence of osteopontin. *J Exp Med*, 2001, 193: 399-404.
156. Aubin JE, Liu F, Malaval L, Gupta AK. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 1995, 17: 77S-83S.
157. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 1993, 14: 424-442.
158. Poser CM. [Physical trauma and psychological stress in multiple sclerosis (author's transl)]. *Rev Neurol (Paris)*, 1980, 136: 807-814.
159. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev*, 1989, 69: 990-1047.
160. Cole DE, Gundberg CM. Changes in serum osteocalcin associated with parathyroid hormone infusion in X-linked hypophosphatemic rickets. *Clin Chim Acta*, 1985, 151: 1-7.
161. Kruse K, Kracht U. Evaluation of serum osteocalcin as an index of altered bone metabolism. *Eur J Pediatr*, 1986, 145: 27-33.

162. Glowacki J, Lian JB. Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differ*, 1987, 21: 247-254.
163. Hauschka PV, Wians FH, Jr. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *Anat Rec*, 1989, 224: 180-188.
164. Suzuki Y. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology*, 1999, 201: 255-271.
165. Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Galli CL, Marinovich M. Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicol Lett*, 2004, 149: 85-89.
166. Yilmaz O, Taskiran D, Aydar S. Cytotoxicity in cytokine stimulated astrocyte cultures: role of IL- 6 and nitric oxide. *Neuroscience Research Communications*, 2004, 34: 82-91.
167. Cruse JM, Lewis RE. Cytokines and Chemokines. In: Norwitz BE (ed). *Atlas of Immunology*. Baskı. New York, CRC Press, 2010.
168. Kılıçturgay K. Sitokinler. *İmmünoloji*, 2003, 10: 113-145.
169. Saçu D. Deneysel olarak fibrosarkoma oluşturulan ratların serumlarında interlökin-6 ve tümör nekrosis faktör alfa düzeylerinin belirlenmesi. *Adnan Menderes Üniversitesi*, 2008.
170. van der Zee AG, de Cuyper EM, Limburg PC, de Bruijn HW, Hollema H, Bijzet J, Krans M, de Vries EG. Higher levels of interleukin-6 in cystic fluids from patients with malignant versus benign ovarian tumors correlate with decreased hemoglobin levels and increased platelet counts. *Cancer*, 1995, 75: 1004-1009.
171. JS AALAP. *Cellular and Molecular Immunology*. Pennsylvania: WB Saunders Company, 2000.
172. Akan E. *Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji*. Güney Matbaası, Adana, 1992.

173. Ferah I. İnfliksimabın parasetamolle indüklenen akut karaciğer toksisitesi üzerine etkilerinin araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012, Erzurum.
174. Guner I, Ozmen D, Bayındır OS. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences. 1997.
175. Morse HN. Ueber eine neue Darstellungsmethode der Acetylamidophenole. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, 1878, 11: 232-233.
176. Gülmezoğlu E. İmmünoloji. Baskı. Ankara, Taş, 1994.
177. Schwartz S. Liver. Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC, editors. Principles of Surgery. International Edition: McGraw-Hill Book Company, 1999: 1403-1405.
178. Noronha IL, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. Nephrol Dial Transplant, 1995, 10: 775-786.
179. Jaattela M. Biologic activities and mechanisms of action of tumor necrosis factor- α /cachectin. Laboratory investigation, 1991, 64: 724-742.
180. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. Nature, 1997, 385: 729-733.
181. Amar S, Van Dyke TE, Eugster HP, Schultze N, Koebel P, Bluethmann H. Tumor necrosis factor (TNF)-induced cutaneous necrosis is mediated by TNF receptor 1. J Inflamm, 1995, 47: 180-189.
182. Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice

- reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol*, 1998, 160: 943-952.
183. Ferrante A, Martin AJ, Bates EJ, Goh DH, Harvey DP, Parsons D, Rathjen DA, Russ G, Dayer JM. Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor- α -activated neutrophils. The role of serum opsonins, integrin receptors, respiratory burst, and degranulation. *J Immunol*, 1993, 151: 4821-4828.
184. Matsumoto M, Mariathasan S, Nahm MH, Baranyay F, Peschon JJ, Chaplin DD. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science*, 1996, 271: 1289-1291.
185. Pruitt JH, Copeland EM, 3rd, Moldawer LL. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock. *Shock*, 1995, 3: 235-251.
186. Noronha I, Niemir Z, Stein H, Waldherr R. Cytokines and growth factors in renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1995, 10: 775-786.
187. Farrar MA, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 1993, 11: 571-611.
188. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10: 411-452.
189. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 2003, 74: 391-401.
190. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. 1996.
191. Colotta F, Sironi M, Borrè A, Pollicino T, Bernasconi S, Boraschi D, Mantovani A. Type II interleukin-1 receptor is not expressed in cultured endothelial cells and is not involved in endothelial cell activation. 1993.

192. Chou HH, Takashiba S, Maeda H, Naruishi K, Nishimura F, Arai H, Lu H, Murayama Y. Induction of intracellular interleukin-1 beta signals via type II interleukin-1 receptor in human gingival fibroblasts. *J Dent Res*, 2000, 79: 1683-1688.
193. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, Bartfai T, Solorzano C, Moldawer LL, Chizzonite R, McIntyre KW. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol*, 1997, 159: 2452-2461.
194. Graves DT, Chen C-P, Douville C, Jiang Y. Interleukin-1 receptor signaling rather than that of tumor necrosis factor is critical in protecting the host from the severe consequences of a polymicrobe anaerobic infection. *Infect Immun*, 2000, 68: 4746-4751.
195. Okada S, Inoue H, Yamauchi K, Iijima H, Ohkawara Y, Takishima T, Shirato K. Potential role of interleukin-1 in allergen-induced late asthmatic reactions in guinea pigs: suppressive effect of interleukin-1 receptor antagonist on late asthmatic reaction. *J Allergy Clin Immunol*, 1995, 95: 1236-1245.
196. Dudley DJ. Pre-term labor: an intra-uterine inflammatory response syndrome? *Journal of reproductive immunology*, 1997, 36: 93-109.
197. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau A-M, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 1995, 3: 811-821.
198. Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, Weiden J, Vrijland K, Hau CS, Verstegen NJM, Ciampricotti M, Hawinkels L, Jonkers J, de Visser KE. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*, 2015, 522: 345-348.

199. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng ZH. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol*, 2008, 181: 6117-6124.
200. Lin AM, Rubin CJ, Khandpur R, Wang JY, Riblett M, Yalavarthi S, Villanueva EC, Shah P, Kaplan MJ, Bruce AT. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 490-500.
201. Hueber AJ, Asquith DL, Miller AM, Reilly J, Kerr S, Leipe J, Melendez AJ, McInnes IB. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol*, 2010, 184: 3336-3340.
202. Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, 2011, 34: 149-162.
203. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*, 2009, 9: 556-567.
204. Toy D, Kugler D, Wolfson M, Bos TV, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 36-39.
205. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki H. Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity*, 2009, 30: 108-119.
206. Kuestner RE, Taft DW, Haran A, Brandt CS, Brender T, Lum K, Harder B, Okada S, Ostrander CD, Kreindler JL. Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F. *The Journal of Immunology*, 2007, 179: 5462-5473.

207. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *J Immunol*, 2002, 169: 642-646.
208. Fort MM, Cheung J, Yen D, Li J, Zurawski SM, Lo S, Menon S, Clifford T, Hunte B, Lesley R, Muchamuel T, Hurst SD, Zurawski G, Leach MW, Gorman DM, Rennick DM. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 2001, 15: 985-995.
209. Xu M, Dong C. IL-25 in allergic inflammation. *Immunol Rev*, 2017, 278: 185-191.
210. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin- 17 and its target genes: mechanisms of interleukin- 17 function in disease. *Immunology*, 2010, 129: 311-321.
211. Gasse P, Riteau N, Vacher R, Michel M-L, Fautrel A, Di Padova F, Fick L, Charron S, Lagente V, Eberl G. IL-1 and IL-23 mediate early IL-17A production in pulmonary inflammation leading to late fibrosis. *PLoS One*, 2011, 6: e23185.
212. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q, Han X, Peng Y, Chen X, Shen L. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 2011, 166: 281-290.
213. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, 1999, 103: 1345-1352.
214. Özçaka Ö, Nalbantsoy A, Buduneli N. Interleukin- 17 and interleukin- 18 levels in saliva and plasma of patients with chronic periodontitis. *Journal of periodontal research*, 2011, 46: 592-598.

215. Danks L, Takayanagi H. Immunology and bone. *The Journal of Biochemistry*, 2013, 154: 29-39.
216. Bekerecioğlu M, Uğraş S, Dilek O, Tercan M, Özyazgan İ. Serbest radikaller. *Sendrom*, 1998, 10: 85-94.
217. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *The american journal of surgery*, 1991, 161: 488-503.
218. Akkus I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1-151. Mimoza Basım Yayın ve Dağıtım AS Konya, 1995.
219. Taysi S, Tascan AS, Ugur MG, Demir M. Radicals, oxidative/nitrosative stress and preeclampsia. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2019, 19: 178-193.
220. Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free radical research communications*, 1993, 18: 195-199.
221. Denicola A, Souza JM, Radi R. Diffusion of peroxynitrite across erythrocyte membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95: 3566-3571.
222. Denicola A, Rubbo H, Rodríguez D, Radi R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, 304: 279-286.
223. Mondoro TH, Shafer BC, Vostal JG. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22: 1055-1063.
224. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Baskı. Oxford university press, USA, 2015.

225. Gumustekin K, Taysi S, Alp HH, Aktas O, Oztasan N, Akcay F, Suleyman H, Akar S, Dane S, Gul M. Vitamin E and Hippophea rhamnoides L. extract reduce nicotine- induced oxidative stress in rat heart. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 2010, 28: 329-333.
226. Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Grijalba MT, Meinicke AR, Castilho RF. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience reports*, 1997, 17: 43-52.
227. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 797-821.
228. Sarma AD, Mallick AR, Ghosh A. Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2010, 1: 185-192.
229. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of lipid research*, 1998, 39: 1529-1542.
230. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 1993, 57: 715S-725S.
231. Vahip S. Bipolar depresyon. *Klinik Psikiyatri*, 2004, 1: 41-44.
232. Totter JR. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980, 77: 1763-1767.
233. Iqbal M, Cawthon D, Beers K, Wideman Jr R, Bottje W. Antioxidant enzyme activities and mitochondrial fatty acids in pulmonary hypertension syndrome (PHS) in broilers. *Poultry Science*, 2002, 81: 252-260.

234. Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. *J Clin Exp Invest*, 2015, 6: 331-336.
235. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCORD JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*, 1987, 107: 526-545.
236. Çavdar C, Sıfıl A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 1997, 6.
237. Bayraktar M, Kılıç S, Özdemir İ, Aydemir S, Ulu R. The investigation of serum malondialdehyde levels and erythrocyte antioxidant enzymes in hypertension patients. *J Healt Sci*, 2005, 14: 76-81.
238. Lieberman M, Marks AD. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Baskı. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.
239. Ürküp R. Çevresel sigara dumanı maruziyetinin çocuklarda oksidatif stres durumuna ve apoptozis belirteci olan kaspaz 3 ve kaspaz 7 aktivitesine etkisi. 2017.
240. Memisoğulları R, Taysı S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 2003, 21: 291-296.
241. Köksal C, Konukoğlu D, Ercan M, Arslan C, Kazımoğlu K, Bozkurt K. Periferik arter hastalarında lipid peroksidasyonu ve antioksidan kapasite. *Türk Gogus Kalp Dama*, 1999, 7: 244-246.
242. Guidetti, Sforzini, Bersani, Corsini, Grossi, Zolezzi, Fasano, Pironi. Vitamin A and vitamin E isoforms stability and peroxidation potential of all-in-one admixtures for parenteral nutrition. *International Journal for vitamin and nutrition research*, 2008, 78: 156-166.

243. Yazicioğlu Ç. Fetal hidrosefali ve nöral tüp defekti olan gebelerde total oksidan seviye-total antioksidan kapasite-oksidatif stres indeksinin değerlendirilmesi. 2008.
244. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 2005, 38: 1103-1111.
245. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 2004, 37: 112-119.
246. Kusano C, Ferrari B. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and molecular biology*, 2008, 7: 1-15.
247. Yilmaz N, Aydin O, Yegin A, Tiltak A, Eren E. Increased levels of total oxidant status and decreased activity of arylesterase in migraineurs. *Clinical biochemistry*, 2011, 44: 832-837.
248. Yilmaz N, Erel Ö, Hazer M, Bagci C, Namiduru E, Giil E. Biochemical assessments of retinol, α -tocopherol, pyridoxal-5-phosphate oxidative stress index and total antioxidant status in adolescent professional basketball players and sedentary controls. *International journal of adolescent medicine and health*, 2007, 19: 177-186.
249. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthopedic Clinics of North America*, 1987, 18: 213-225.
250. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*, 1987, 18: 213-225.
251. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA. Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Archives of osteoporosis*, 2013, 8: 1-218.

252. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 2008, 14: 179-186.
253. Nunamaker D. Experimental models of fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007), 1998, 355: S56-S65.
254. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): Implant evolution and surgical technique on a rat's femur/Der kritische Knochendefekt am Kleintier zur Untersuchung der Knochenheilung (II): Implantatentwicklung und Operationstechnik am Rattenfemur. 2005.
255. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br*, 2006, 88: 701-705.
256. Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, Little DG, Cool SM. The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res*, 2006, 24: 636-644.
257. Jackson RW, Reed CA, Israel JA, Abou-Keer FK, Garside H. Production of a standard experimental fracture. *Can J Surg*, 1970, 13: 415-420.
258. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*, 1984, 2: 97-101.
259. Handool KO, Ibrahim SM, Kaka U, Omar MA, Abu J, Yusoff MSM, Yusof LM. Optimization of a closed rat tibial fracture model. *J Exp Orthop*, 2018, 5: 13.
260. Neagu TP, Tiglis M, Popp CG, Jecan CR. Histological assessment of fracture healing after reduction of the rat femur using two different osteosynthesis methods. *Rom J Morphol Embryol*, 2016, 57: 1051-1056.

261. Claes L, Blakytyn R, Göckelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009, 27: 22-27.
262. Marti RK, Kloen P, PhD M. Concepts and cases in nonunion treatment. Baski. Thieme New York, 2011.
263. Schmidmaier G, Wildemann B, Ostapowicz D, Kandziora F, Stange R, Haas NP, Raschke M. Long-term effects of local growth factor (IGF-I and TGF- β 1) treatment on fracture healing: A safety study for using growth factors. *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22: 514-519.
264. Bratzler DW, Dellinger EP, Olsen KM, Perl TM, Auwaerter PG, Bolon MK, Fish DN, Napolitano LM, Sawyer RG, Slain D. Clinical practice guidelines for antimicrobial prophylaxis in surgery. *Surg Infect (Larchmt)*, 2013, 14: 73-156.
265. Dimar JR, Ante WA, Zhang YP, Glassman SD. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on posterior spinal fusions in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1996, 21: 1870-1876.
266. Takeuchi A, Kobayashi K, Yukiya Y, Chihara T, Matsuta K, Hashimoto A. Role of protease--protease-inhibitor complexes in inflammation. *International journal of tissue reactions*, 1984, 6: 1-8.
267. Chand N, Pillar J, Diamantis W, Sofia RD. In vitro inhibition of allergic histamine release by calcium antagonists. *Eur J Pharmacol*, 1985, 107: 353-358.
268. Nanes MS. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*, 2003, 321: 1-15.
269. Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Iida M. [Study of cytokine production in inflamed human gingival tissues in periodontitis. Interleukin-1 (IL-1

- alpha, beta) and tumor necrosis factor (TNF alpha)]. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1989, 31: 843-848.
270. Frost RA, Lang CH, Gelato MC. Transient exposure of human myoblasts to tumor necrosis factor-alpha inhibits serum and insulin-like growth factor-I stimulated protein synthesis. *Endocrinology*, 1997, 138: 4153-4159.
 271. Kon T, Cho TJ, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 1004-1014.
 272. Huang RL, Yuan Y, Tu J, Zou GM, Li Q. Opposing TNF-alpha/IL-1beta- and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1187.
 273. Aydin A, Halici Z, Albayrak A, Polat B, Karakus E, Yildirim OS, Bayir Y, Cadirci E, Ayan AK, Aksakal AM. Treatment with Carnitine Enhances Bone Fracture Healing under Osteoporotic and/or Inflammatory Conditions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 117: 173-179.
 274. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*, 2012, 92: 689-737.
 275. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews*, 2011, 75: 50-83.
 276. Yang N, Wang G, Hu C, Shi Y, Liao L, Shi S, Cai Y, Cheng S, Wang X, Liu Y. Tumor necrosis factor α suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis

- promoter miR- 21 in estrogen deficiency–induced osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2013, 28: 559-573.
277. Zhao B, Grimes SN, Li S, Hu X, Ivashkiv LB. TNF-induced osteoclastogenesis and inflammatory bone resorption are inhibited by transcription factor RBP-J. *Journal of Experimental Medicine*, 2012, 209: 319-334.
 278. Wahl EC, Aronson J, Liu L, Skinner RA, Miller MJ, Cockrell GE, Fowlkes JL, Thrailkill KM, Bunn RC, Ronis MJ. Direct bone formation during distraction osteogenesis does not require TNF α receptors and elevated serum TNF α fails to inhibit bone formation in TNFR1 deficient mice. *Bone*, 2010, 46: 410-417.
 279. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, Van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Nanes MS. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 α A) is inhibited by tumor necrosis factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 2695-2701.
 280. Frost A, Jonsson KB, Nilsson O, Ljunggren Ö. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand*, 1997, 68: 91-96.
 281. Long H, Xia Y, Liu D, Zheng T, Qiu F. Clinical value of TNF- α in serum of patients with colorectal cancer. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2017: 1319-1321.
 282. Zhang H, Tai H, Ma Y, Li Y, Dang Z, Wang J, Zhao L. Postoperative serum levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-17 (IL-17), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in patients following hip replacement surgery for traumatic fractured femoral neck: a retrospective study. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2019, 25: 6120.

283. Ko FC, Rubenstein WJ, Lee EJ, Siu AL, Sean Morrison R. TNF-alpha and sTNF-RII Are Associated with Pain Following Hip Fracture Surgery in Older Adults. *Pain Med*, 2018, 19: 169-177.
284. Lim JC, Ko KI, Mattos M, Fang M, Zhang C, Feinberg D, Sindi H, Li S, Alblowi J, Kayal RA. TNF α contributes to diabetes impaired angiogenesis in fracture healing. *Bone*, 2017, 99: 26-38.
285. Alblowi J, Kayal RA, Siqueira M, McKenzie E, Krothapalli N, McLean J, Conn J, Nikolajczyk B, Einhorn TA, Gerstenfeld L, Graves DT. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. *Am J Pathol*, 2009, 175: 1574-1585.
286. Lange J, Sapozhnikova A, Lu C, Hu D, Li X, Miclau III T, Marcucio RS. Action of IL- 1 β during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010, 28: 778-784.
287. Amanvermez R, Gunay M, Piskin A, Keles G, Tomak L. TNF- α , IL-1 β , and oxidative stress during fracture healing with or without ankaferd. *Bratislavske Lekarske Listy*, 2013, 114: 621-624.
288. De Simone V, Franze E, Ronchetti G, Colantoni A, Fantini M, Di Fusco D, Sica G, Sileri P, MacDonald T, Pallone F. Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 2015, 34: 3493-3503.
289. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppl D. Interleukin- 1 alpha, interleukin- 8 and interferon- alpha levels in gingival crevicular fluid. *Journal of periodontal research*, 1996, 31: 489-495.
290. Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin- 1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 2003, 74: 391-401.

291. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, Bartfai T, Solorzano C, Moldawer LL, Chizzonite R. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *The Journal of Immunology*, 1997, 159: 2452-2461.
292. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg*, 1996, 224: 647.
293. Delgado-Roche L, Riera-Romo M, Mesta F, Hernandez-Matos Y, Barrios JM, Martinez-Sanchez G, Al-Dalaien SM. Medical ozone promotes Nrf2 phosphorylation reducing oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in multiple sclerosis patients. *Eur J Pharmacol*, 2017, 811: 148-154.
294. Mansoori MN, Shukla P, Singh D. Combination of PTH (1-34) with anti-IL17 prevents bone loss by inhibiting IL-17/N-cadherin mediated disruption of PTHR1/LRP-6 interaction. *Bone*, 2017, 105: 226-236.
295. Tyagi AM, Mansoori MN, Srivastava K, Khan MP, Kureel J, Dixit M, Shukla P, Trivedi R, Chattopadhyay N, Singh D. Enhanced immunoprotective effects by anti- IL- 17 antibody translates to improved skeletal parameters under estrogen deficiency compared with anti- RANKL and anti- TNF- α antibodies. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2014, 29: 1981-1992.
296. Molnar I, Bohaty I, Somogyine-Vari E. IL-17A-mediated sRANK ligand elevation involved in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporosis International*, 2014, 25: 783-786.
297. Azizieh F, Raghupathy R, Shehab D, Al-Jarallah K, Gupta R. Cytokine profiles in osteoporosis suggest a proresorptive bias. *Menopause*, 2017, 24: 1057-1064.
298. Chen W-S, Chang Y-S, Lin K-C, Lai C-C, Wang S-H, Hsiao K-H, Lee H-T, Chen M-H, Tsai C-Y, Chou C-T. Association of serum interleukin-17 and interleukin-

- 23 levels with disease activity in Chinese patients with ankylosing spondylitis. Journal of the Chinese Medical Association, 2012, 75: 303-308.
299. Sağ Ö. Associations between polymorphisms of IL-17F and IL-17A genes with disease activity and clinical outcome of Ankylosing Spondylitis. Acta Reumatol Port, 2016, 41.
 300. Wang X, Lin Z, Wei Q, Jiang Y, Gu J. Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. Rheumatology international, 2009, 29: 1343-1347.
 301. Van Bezooijen RL, Farih- Sips HC, Papapoulos SE, Löwik CW. Interleukin- 17: a new bone acting cytokine in vitro. Journal of Bone and Mineral Research, 1999, 14: 1513-1521.
 302. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. J Exp Med, 2006, 203: 2673-2682.
 303. Yago T, Nanke Y, Ichikawa N, Kobashigawa T, Mogi M, Kamatani N, Kotake S. IL- 17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti- TNF- α antibody: A novel mechanism of osteoclastogenesis by IL- 17. J Cell Biochem, 2009, 108: 947-955.
 304. Kitami S, Tanaka H, Kawato T, Tanabe N, Katono-Tani T, Zhang F, Suzuki N, Yonehara Y, Maeno M. IL-17A suppresses the expression of bone resorption-related proteinases and osteoclast differentiation via IL-17RA or IL-17RC receptors in RAW264. 7 cells. Biochimie, 2010, 92: 398-404.
 305. Balani D, Aeberli D, Hofstetter W, Seitz M. Interleukin- 17A stimulates granulocyte–macrophage colony- stimulating factor release by murine osteoblasts

- in the presence of 1, 25- dihydroxyvitamin D3 and inhibits murine osteoclast development in vitro. *Arthritis & rheumatism*, 2013, 65: 436-446.
306. Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2006, 24: 1512-1518.
 307. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2010, 21: 449-453.
 308. Abusrer S. The role of interleukin-17 and RANKL in the regulation of bone destruction in arthritis. Newcastle University, 2004.
 309. Wang Y, Kim J, Chan A, Whyne C, Nam D. A two phase regulation of bone regeneration: IL-17F mediates osteoblastogenesis via C/EBP- β in vitro. *Bone*, 2018, 116: 47-57.
 310. Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. *Bone Miner*, 1993, 22: 147-159.
 311. Boskey AL, Spevak L, Paschalis E, Doty SB, McKee MD. Osteopontin deficiency increases mineral content and mineral crystallinity in mouse bone. *Calcif Tissue Int*, 2002, 71: 145-154.
 312. Hunter GK, Grohe B, Jeffrey S, O'Young J, Sorensen ES, Goldberg HA. Role of phosphate groups in inhibition of calcium oxalate crystal growth by osteopontin. *Cells Tissues Organs*, 2009, 189: 44-50.
 313. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 1101-1111.

314. Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int*, 2003, 72: 197-205.
315. Suzuki K, Zhu B, Rittling SR, Denhardt DT, Goldberg HA, McCulloch CA, Sodek J. Colocalization of intracellular osteopontin with CD44 is associated with migration, cell fusion, and resorption in osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 2002, 17: 1486-1497.
316. Aydin A, Halici Z, Albayrak A, Polat B, Karakus E, Yildirim OS, Bayir Y, Cadirci E, Ayan AK, Aksakal AM. Treatment with carnitine enhances bone fracture healing under osteoporotic and/or inflammatory conditions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 117: 173-179.
317. Xing Z, Pedersen TO, Wu X, Xue Y, Sun Y, Finne-Wistrand A, Kloss FR, Waag T, Krueger A, Steinmüller-Nethl D. Biological effects of functionalizing copolymer scaffolds with nanodiamond particles. *Tissue engineering part A*, 2013, 19: 1783-1791.
318. Casarin R, Casati M, Pimentel S, Cirano F, Algayer M, Pires P, Ghiraldini B, Duarte P, Ribeiro F. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 2014, 43: 900-906.
319. Thiede MA, Smock SL, Petersen DN, Grasser WA, Thompson DD, Nishimoto SK. Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megakaryocytes and peripheral blood platelets. *Endocrinology*, 1994, 135: 929-937.
320. Price PA. Vitamin K-dependent formation of bone Gla protein (osteocalcin) and its function. *Vitam Horm*, 1985, 42: 65-108.

321. Ebeling PR, Butler PC, Eastell R, Rizza RA, Riggs BL. The nocturnal increase in growth hormone is not the cause of the nocturnal increase in serum osteocalcin. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991, 73: 368-372.
322. Joffe P, Heaf JG, Hyldstrup L. Osteocalcin: a non-invasive index of metabolic bone disease in patients treated by CAPD. *Kidney Int*, 1994, 46: 838-846.
323. Huang Q-Y, Kung AWC. Genetics of osteoporosis. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2006, 88: 295-306.
324. Yamada Y, Ando F, Niino N, Miki T, Shimokata H. Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *J Hum Genet*, 2003, 48: 469-475.
325. Gokulakrishnan K, Deepa R, Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Mohan V. Association of leukocyte count with varying degrees of glucose intolerance in Asian Indians: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-26). *Metabolic syndrome and related disorders*, 2009, 7: 205-210.
326. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 1993, 215: 213-219.
327. Özgan Çelikel Ö, Yildirim F, Yildirim Z, Ayhan S, Sepici Dinçel A. The Effect of Oxidative Stress and Antioxidant Capacity on Postmenopausal Bone Mineral Densitometry. *Gazi Medical Journal*, 2022, 33.
328. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo R, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, 1990, 85: 632-639.
329. Brown JP, Josse RG, Scientific Advisory Council of the Osteoporosis Society of C. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *CMAJ*, 2002, 167: S1-34.

330. Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*, 2003, 111: 1221-1230.
331. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 1996, 11: 1043-1051.
332. Vural P, Akgül C, Canbaz M. Effects of menopause and tibolone on antioxidants in postmenopausal women. *Ann Clin Biochem*, 2005, 42: 220-223.
333. Isomura H, Fujie K, Shibata K, Inoue N, Iizuka T, Takebe G, Takahashi K, Nishihira J, Izumi H, Sakamoto W. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology*, 2004, 197: 92-99.
334. Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong D-w, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*, 2005, 106: 852-859.
335. Kim HJ, Chang E-J, Kim H-M, Lee SB, Kim H-D, Kim GS, Kim H-H. Antioxidant α -lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- κ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and tumor necrosis factor- α . *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40: 1483-1493.
336. Varenna M, Binelli L, Zucchi F, Rossi V, Sinigaglia L. Prevalence of osteoporosis and fractures in a migrant population from southern to northern Italy: a cross-sectional, comparative study. *Osteoporosis International*, 2003, 14: 734-740.
337. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatology international*, 2008, 28: 317-321.

338. Hatipoğlu M, Sağlam M, Köseoğlu S, Köksal E, Keleş A, Esen HH. The effectiveness of *Crataegus orientalis* M Bieber.(Hawthorn) extract administration in preventing alveolar bone loss in rats with experimental periodontitis. PLoS One, 2015, 10: e0128134.
339. Hagiwara K, Goto T, Araki M, Miyazaki H, Hagiwara H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. Eur J Pharmacol, 2011, 662: 78-84.
340. Wang W, Olson D, Liang G, Franceschi RT, Li C, Wang B, Wang SS, Yang S. Collagen XXIV (Col24 α 1) promotes osteoblastic differentiation and mineralization through TGF- β /Smads signaling pathway. International journal of biological sciences, 2012, 8: 1310.
341. Singh RK, Patel KD, Lee JH, Lee E-J, Kim J-H, Kim T-H, Kim H-W. Potential of magnetic nanofiber scaffolds with mechanical and biological properties applicable for bone regeneration. PLoS One, 2014, 9: e91584.
342. He X, Liu Y, Yuan X, Lu L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. PLoS One, 2014, 9: e104061.
343. Havill LM, Hale L, Newman D, Witte S, Mahaney M. Bone ALP and OC reference standards in adult baboons (*Papio hamadryas*) by sex and age. Journal of medical primatology, 2006, 35: 97-105.
344. Ross PD, Knowlton W. Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. Journal of Bone and Mineral Research, 1998, 13: 297-302.
345. Oni OO, Stafford H, Gregg P. An experimental study of the patterns of periosteal and endosteal damage in tibial shaft fractures using a rabbit trauma model. J Orthop Trauma, 1989, 3: 142-147.

346. Moss DW. Diagnostic aspects of alkaline phosphatase and its isoenzymes. *Clinical biochemistry*, 1987, 20: 225-230.
347. Wang J, Wang L, Yang H, You Y, Xu H, Gong L, Yin X, Wang W, Gao S, Cheng L. *BMC Complementary Altern. Med*, 2017, 17: 1186.
348. Çetin G, Eşkazan AE, Ar MC, Aydın ŞÖ, Ferhanoğlu B, Soysal T, Başlar Z, Aydın Y. Bone-specific alkaline phosphatase levels among patients with multiple myeloma receiving various therapy options. *Turkish Journal of Hematology*, 2014, 31: 374.
349. Abildgaard N, Glerup H, Rungby J, Bendix- Hansen K, Kassem M, Brixen K, Heickendorff L, Nielsen J, Eriksen E. Biochemical markers of bone metabolism reflect osteoclastic and osteoblastic activity in multiple myeloma. *European journal of haematology*, 2000, 64: 121-129.
350. Herrmann M, Klitscher D, Georg T, Frank J, Marzi I, Herrmann W. Different kinetics of bone markers in normal and delayed fracture healing of long bones. *Clin Chem*, 2002, 48: 2263-2266.
351. Muljačić A, Poljak-Guberina R, Živković O, Bilić V, Guberina M. Course and rate of post-fracture bone healing in correlation with bone-specific alkaline phosphatase and bone callus formation. *Collegium antropologicum*, 2013, 37: 1275-1283.
352. Kanwar G, Yadav M, Kumar S, Kirad S, Jain N. Serum alkaline phosphatase a prospective biomarker for assessment of progress of fracture healing. *Intern J Resea Appli Natu Soci*, 2014, 3: 15-20.
353. Ozmeric A, Tanoglu O, Ocak M, Celik HH, Firat A, Kaymaz FF, Koca G, Senes M, Alemdaroglu KB, Iltar S, Hacaloglu T, Kaftanoglu B. Intramedullary implants

- coated with cubic boron nitride enhance bone fracture healing in a rat model. *J Trace Elem Med Biol*, 2020, 62: 126599.
354. Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou ZS, Constantinidis TC, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Vet Clin Pathol*, 2005, 34: 35-38.
355. Komnenou A, Karayannopoulou M, Polizopoulou Z, Constantinidis T, Dessiris A. Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of long bone fractures in dogs. *Veterinary Clinical Pathology*, 2005, 34: 35-38.
356. Nilsson BE, Westlin NE. The plasma concentration of alkaline phosphatase, phosphorus and calcium following femoral neck fracture. *Acta Orthop Scand*, 1972, 43: 504-510.
357. Tawonsawatruk T, Hamilton DF, Simpson AHR. Validation of the use of radiographic fracture- healing scores in a small animal model. *Journal of Orthopaedic Research*, 2014, 32: 1117-1119.
358. Zhao L, Zhao J, Yu J-J, Zhang C. Irregular bone defect repair using tissue-engineered periosteum in a rabbit model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2020, 17: 717-727.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı:
Doğum tarihi:
Doğum Yeri:
Medeni Hali:
Uyruğu:
Adres:
Tel:
Faks:
E-mail:
Eğitim
Lise:
Lisans:
Yüksek lisans:
Doktora:
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce:
Almanca: -
Rusça: -
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı	Hilal Kaya	
Öğrencinin Numarası		
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Farmakoloji	
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 6	% 15
II. Genel Bilgiler	% 28	% 35
III. Materyal ve Metod	% 29	% 35
IV. Bulgular	% 10	% 15
V. Tartışma	% 2	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i>		
Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı	

EK-3. ETİK KURULU ONAY BELGESİ



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : 75296309-050.01.04-E.2000067729
Konu : HADYЕК Kararı.

28.02.2020

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 24.02.2020 tarihli ve 42190979-000-E.2000058640 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 27.02.2020 tarih ve 1 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 26 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYЕК Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

TOPLANTI TARİHİ : 27.02.2020

TOPLANTI SAYISI : 1

KARAR N0 26: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Abdulmecit ALBAYRAK'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Ratlarda Oluşturulan Femur Kırığı Modelinde Bir Kalsiyum Kanal Blokeri Olan Azelnidipin'in Etkilerinin Araştırılması”** isimli araştırma çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 24.02.2020 tarihli ve 42190979-000-E.2000058640 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

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

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

