

T. C.  
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ORTOPEDİ ve TRAVMATOLOJİ  
BİLİM DALI

T. C.  
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

FLOR'UN DENEYSEL KIRIK İYİLEŞMESİNDE  
KOLLAJEN SENTEZİNE ETKİSİ  
(Otoradyografik-Morfolojik-Kimyasal-Dansitometrik .  
Değerlendirme)

DOÇENTLİK TEZİ

Dr. BURHAN USLU

MART, 1981

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ ve AMAÇ -----	1
GENEL BİLGİLER -----	3
- Flor ve Flor Metabolizması -----	3
- Kemik Hücreleri -----	14
- Kırık İyileşmesi -----	15
- Kollajen -----	18
- Kollajen Sentezi -----	19
- Otoradyografi -----	22
GEREÇ ve YÖNTEM -----	24
BULGULAR -----	33
TARTIŞMA -----	67
SONUÇ -----	78
ÖZET -----	80
KAYNAKLAR -----	81

## G İ R İ Ő v e A M A Ç

Flor, birleşik halinde ya da tek başına iyon halinde iken insan vücudu için gerekli olan elementlerden biridir. Doğada bitkilerde, suda, atmosferde ve toprakta bulunur. İçme sularından uzun süre alınan florun, vücut üzerinde kronik toksik etkisi vardır. Florozis, fazla miktarda flor alınımı sonucu oluşan kronik bir zehirlenmedir<sup>8,11,15,31,32,36,89,94,109</sup>. Bu zehirlenme, kemiklerde osteoskleroz, ligaman, interosseos membranlarda ve tendinöz yapışma yerlerinde kalsifikasyon ve dişlerde lekelenme ile belirgindir. Daha fazla miktarlarda ve uzun süre flor alınımında, kifoz, omurgada sertlik, göğüs kafesinde hareket azalması ve ekzostoz gibi belirgin deformiteler oluşabilir<sup>7,36,62,86,87,89,94,109</sup>.

Türkiye'de çeşitli yörelerde florozis saptanmış ve bu zehirlenmenin önemli bir sağlık sorunu olduğu gösterilmiştir<sup>44,93,97,100</sup>. Eskişehir'e bağlı Kızılcaören köyünde 1977-1978 yıllarında tarafımızdan yapılan çalışmada, endemik florozis tesbit edilmiştir. Bu ön çalışmaya dayanarak, florozis konusunda deneysel bir araştırma yapılması planlanmıştır.

Son 30 yılda flor zehirlenmesi konusunda, klinik ve deneysel birçok çalışma yapılmıştır. Bu zehirlenmenin iskelet dokularına olan etkisi bilinmekle birlikte birkaç önemli temel ilke dışında, pek çok yönü halâ tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Yapılan çalışmalarda florun iskelet sisteminde, özellikle kemiğin organik kısmına olan etkileri yönünden yeterli sayıda değerlendirmeye rastlanılamamıştır.

Kırık iyileşmesi, çeşitli faktörlerden etkilenen bir olaydır ve günümüzde birçok yönleri halâ aydınlatılamamıştır. Kırık iyileşmesinde florun etkisi, özellikle organik matriks yönünden incelenmediğinden araştırılmaya değer görülmüştür.

Kırık iyileşmesinde kollajenin hücrelerden nasıl salgılandığı, salgılanan kollajen ile kırık iyileşmesi arasındaki ilişki ve florun bu olaylara etkisinin saptanması bu çalışmanın esas amacını oluşturmaktadır.

Konuyu aydınlatmak amacı ile aşağıdaki sorular yanıtlanmaya çalışılacaktır :

1. Kollajenin kırık iyileşmesinde hangi hücreler tarafından sentez edilip, salgılandığı
2. Florun, bu hücreler ve kollajen sentez ve salgılanmasına etkisi
3. Kırık iyileşmesinde florun önemi.

Kollajende bulunan başlıca aminoasitler; glisin, prolin, hidroksi-prolin ve glutamik asittir. Bunların arasında kollajene özgü olan prolin kullanılarak bu çalışma yapıldı. Deneysel olarak flor zehirlenmesi oluşturulmuş ve normal hayvanlarda, kırık bölgesinde kollajen sentezinde rol oynayan hücreler trityumlu prolin ile işaretlendi. Çalışmamızda, kırık iyileşmesi otoradyografik, histolojik, radyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilerek sonuca varıldı.

Araştırmamızın metninde geçen yabancı sözcüklerin Türkçe karşılığı kullanılmış, dilimizde karşılığı olmayanlar ise okundukları şekilde yazılmıştır.

## G E N E L B İ L G İ L E R

### 1. FLOR ve FLOR METABOLİZMASI

Flor, atom ağırlığı 19, atom numarası 9, moleküler ağırlığı 38 ve valans değeri 1 olan bir elementtir. Yer kabuğunda % 0.027 oranında bulunur<sup>26</sup>.

Flor; su, yiyecekler (Tablo I), belirli ilaçlar, bazı bölgelerdeki tozlar ve endüstriyel işlemler sonucu oluşan gazlar ile insan organizmasına alınır<sup>31,36,81,94,109</sup>.

Flor, içilen suda NaF, CaF<sub>2</sub> ve MgF<sub>2</sub> gibi kimyasal birleşikler halinde erimiş olarak bulunur. İçme suyundaki 4 ppm<sup>x</sup> den yüksek flor, iskelet florozisine sebep olur. Eriyebilir inorganik flor birleşiklerindeki flor iyonları, hızlı bir şekilde emilirler. Flor, sindirim sistemi mukozasından basit diffüzyon şeklinde % 80 oranında emilir. CaF<sub>2</sub>, kriyolit ve kaya fosfatları gibi daha az çözülebilir flor birleşikleri ise % 60 oranında emilir. Endüstri bölgelerinde, atmosferde bulunan tozlardan ve gazlardan flor solunum yoluyla alınarak hızla ve tümüyle organizmaya girer<sup>35,62,84,86,94,109</sup>.

Flor atılımı idrar, ter, feçes ile olur. Süt, tükürük, saç ve gözyaşında eser olarak bulunur. Solunum yolu ile atılmaz. En fazla idrar yolu ile atılır. İdrar ile atılımı, günlük alınan miktara bağlıdır<sup>3,83,109</sup>.

---

<sup>x</sup> ppm : Milyonda kısım olarak

Florun özellikle kemikler, böbrekler, dişler ve tiroide olmak üzere birçok biyolojik etkileri saptanmıştır<sup>84,87,109</sup>.

Flor, kemiklerde tutulmaya aşırı eğilimi olan bir elementtir. Vücutta bulunan florun % 96 sı kemikte depolanır<sup>83,84,87,109</sup>. Flor, kemiğin fiziksel ve kimyasal yapısına olduğu kadar, morfolojik ve fizyolojik yapısına da etkilidir.

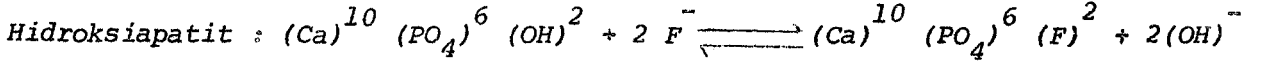
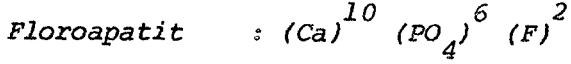
TABLO I : Çeşitli Yiyeceklerdeki Flor Miktarı<sup>109</sup>.

Cinsi	Flor miktarı (ppm)	Cinsi	Flor miktarı (ppm)
. İnek Karaciğeri	5.20 - 5.80	. Mısır	0.58
. Piliç	1.40	. Un	0.27 - 1.32
. Biftek	2.00	. Soya Fasulyesi	4.00
. Yumurta	0.6 - 1.5	. Havuç	0.4 - 6.92
. Sardunya (Taze)	26.89	. Lahana	9.34
(Kurutulmuş)	84.47	. Soğan (yeşil)	10.11
. Uskumru	16.1	. Maya	220
. Çay	38 - 178.8	. Şarap	0.07 - 0.24

Kalsiyuma aşırı eğilimi olup, biriktiği tüm dokularda kalsifikasyon görülür. Kemikte, kalsiyum florür ve magnezyumflorür şeklinde çöker. Bu arada kemikte karbonat, sitrat miktarlarında azalmaya, magnezyum miktarında ise artmaya neden olur<sup>16,84,103,110</sup>.

Florun kemikte depolanması, kristal yüzeyinde hidroksil iyonu ile değişim göstermesi ve kristal yapısına girmesi ile olur. Bu birleşme mineral depolanması sırasında heteroionik değişim ile olur. Floroapatit ve

hidroksiapatit karışık kristalleri oluşur. Floroapatit, kristal boyutunda artmaya ve çözünürlüğünde azalmaya neden olur<sup>16, 83, 88, 103, 109</sup>. Floroapatit ve hidroksiapatit kristallerinin formülleri aşağıda gösterilmiştir :



Florun heteroionik değişim ile kristal yüzde yerleşimi, anatomik yapılara ve kalsifiye dokuların fizyolojik durumuna bağlıdır. Kalsifiye dokuların yapım-yıkım oranı, büyüme oranı, kemiğin çeşitli kısımlarının damarlanma derecesi ile ilgilidir. Böylece aynı kemikte, çeşitli kısımlarda değişik flor oranı gözlenir. Örneğin; epifizeal bölgede, diafizeal bölgeye kıyasla daha fazla flor tutulur<sup>7, 62, 84, 104, 114</sup>.

İskelette flor depolanması kalıcı değildir. Yüksek florlu bölgelerden, düşük florlu bölgelere gidenlerde, plasmadaki flor miktarı azalınca, kristal yüzdeki flor hidroksil iyonu ile yer değiştirip, serbest dolaşıma geçer ve idrar yolu ile atılır<sup>109</sup>.

Flor kemik için gerçekten temel bir element midir? Bu soruya tam açıklayıcı bir cevap getirilememiştir. Bununla birlikte, eser miktarda florun normal mineralizasyon için gerekli olduğuna inanan araştırmacılar da vardır<sup>109</sup>.

Flor, kemikte doymuş faza ulaştıktan sonra da kalsifiye dokulara birikimi devam eden tek elementtir. Ana elementler, kalsiyum, fosfor, magnezyum, karbonat ve sitrat, yaşamın erken dönemlerinde en üst düzeye ulaşıp değişmeden kalırlar. Buna karşın, florun içilen sudaki oranı arttıkça, kemikteki oranı da buna bağlı olarak artma gösterir.

Flor ile kalsiyum arasında karşılıklı bir etkileşim olduğu gösterilmiştir. Florun vücutta dağılımı belirli oranda kalsiyuma uyar. Kalsiyum, florun plasma proteinleri ile birleşmesinde ortam oluşturur. Diyet kalsiyumu florun emilimini azaltıp, zehirlenmeden korur.

Yakın zamanda osteoporoz, paget ve raşitizm gibi hastalıklarda florun tedavi edici değeri olduğu konusunda yayınlar vardır<sup>7,31,37,47</sup>. Bu etki, florun kısmen pozitif kemik dengesi yaratmasından kaynaklanır.

Florozis, aşırı flor alınımı sonucu dişlerde beneklenme, iskelet sisteminde osteoskleroz, kas yapışma yerlerinde, ligamanlarda ve interosseos membranlarda kalsifikasyon ile belirlenen bir kronik zehirlenmedir. Flor zehirlenmesi, ilk kez 1937 yılında Hindistan'ın Madras eyaletinde Shortt tarafından endemik florozis adıyla tanımlanmış ve daha sonra çeşitli ülkelerde aynı tipte flor zehirlenmesi tarif edilmiştir<sup>78,94,102</sup>.

#### Flor ve Kalsiyum :

Florun vücutta dağılımı, belirli oranlarda kalsiyuma uyar. Flor depolanması ile metastatik kalsifikasyon arasında pozitif ilişki gösterilmiştir<sup>109</sup>. Kalsiyum florun plasma proteinleri ile birleşmesi için ortam hazırlar. Diyet kalsiyumu, flor emilimini azaltarak organizmayı flor zehirlenmesinden korur<sup>62,77,78,86</sup>. Yüksek doz flor, osteoporozlu hastalarda pozitif kalsiyum dengesi sağlamak ve iyi bir klinik netice elde etmek için kullanılır<sup>7,37,62,65</sup>.

#### Flor ve Magnezyum :

Diyet magnezyumundaki eksiklik, flor zehirlenmesinin şiddetini artırır. Flor birleşiklerin arasında en toksik olanı magnezyum florürlür<sup>77,87</sup>. Flor ve magnezyum, civcivlerde florun tek başına yaptığı büyüme geriliğinden daha fazlasına neden olur. Köpeklerde, florozis sonucu oluşabilen aortik



lezyonlar ve yumuşak doku kalsifikasyonu, düşük magnezyumlu diyet ile önle-  
nebilir<sup>109</sup>. Bunun nedeni açıklığa kavuşturulamamıştır.

*Flor ve Fosfatlar :*

Fosfatlar, florun barsaktan emilimini hızlandırır. Yavru köpeklerde  
uzun süre flor alınımının, serum organik fosfatında artışa ve inorganik  
fosfatında azalışa neden olduğu bildirilmiştir<sup>109</sup>.

*Flor ve Demir :*

Farelerde nazogastrik tüp ile demir verildiğinde, flor emilimi ar-  
tar. Flor ile demir, barsakta karşılıklı etkileşim ile birbirlerinin emili-  
mini engellerler<sup>109</sup>.

*Flor ve Protein Metabolizması :*

Florozisli maymunların idrarlarının koyu olduğu saptanmış ve bu he-  
mogensitik asit fazlalığına bağlanmıştır. Bu florun, fenilalanin ve tiro-  
zin metabolizması ile karşılıklı etkileşimi sonucudur<sup>109</sup>. Florun diyet pro-  
teinleri ile sindirim sisteminde plasma proteinleri ile tendon ve hücre içi  
proteinlerle bağlanması tartışmalıdır. Düşük proteinli diyet alanlarda, flo-  
rozisin şiddetli olarak görüldüğü saptanmıştır<sup>62,78</sup>.

*Flor ve Lipid Metabolizması :*

Yağlı ve florlu diyet ile beslenen fare ve civcivlerde, büyümenin  
geciktiği, bütün vücutta fazla flor birikimi olduğu gözlenmiştir<sup>7,87</sup>. Flo-  
run serum kollesterol seviyesine etkisi olmadığı gözlenmiştir. Bazı araş-  
tırmacılar, florun arterioskleroz görülme oranında rol oynadığını iddia et-  
mişlerdir<sup>97,109</sup>.

*Flor ve Karbonhidrat Metabolizması :*

*Flor, mikroorganizmalardaki mayalanmayı uyarır. Bu polisakkarit sentezinin baskılanması ile birlikte olur<sup>109</sup>. Yüksek seviyelerde, karbondioksit yapımını inhibe eder ve enolaz sisteminde blok yapar<sup>7,87,109</sup>. Farelerde akut flor zehirlenmesinde, glikojen karaciğerde ve iskelet kasında azalır. Kronik flor zehirlenmesinde ise fosforilaz kaybı ve karaciğerde nekrotik odaklar oluşur. Suttie ve Phillips<sup>109</sup> farelerde yaptıkları deneysel çalışmalarda, florozisde yağlı asit katabolizmasının azaldığını, glikojen yapım-yıkım oranının baskılandığını tesbit etmişlerdir.*

*Flor ve Parathormon :*

*Her iki böbreği çıkartılmış farelerde, flor ile peritoneal yıkama yapıldığında kemiklerde trabeküler zonlarda osteoklastların proliferasyonuna ve bu hücrelerin aktivitesinin artmasına neden olur. Plasma iyonik kalsiyumu kontrol grubuna göre düşüktür. Flor almayan paratiroidi sağlam farelerde, osteoklast aktivitesi artar, paratiroidleri çıkarılmış olanlarda ise artmaz. Flor muhtemelen düşük plasma iyonik kalsiyumu ile dolaylı olarak paratiroid bezlerini uyarmaktadır<sup>16,39</sup>. Bazı araştırmacılar, florun kemik mineral çözünürlüğünü artırdığını ve serum kalsiyum seviyesinin azalıp, paratiroid bezlerin uyarıldığını ileri sürmüşlerdir<sup>8,16</sup>. Böylece paratiroid hormon salınımı artıp, serum kalsiyum seviyesinin normale döndüğünü belirtmişlerdir. Sidhu ve arkadaşları<sup>85</sup>, endemik florozisli iki olgunun otopsisinde paratiroid hiperplazisi saptamışlardır.*

*Flor ve Vitamin Metabolizması :*

*Tüm vitaminler içinde askorbik asit, flor metabolizmasında en fazla dikkati çeker. Pandit ve Narayana<sup>109</sup>, vitamin C eksikliğinin flor zehirlenmesini artırdığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, vitamin C den zengin*

yiyeceklerle beslenen maymunlarda, flor zehirlenmesinin daha az olduğunu gözlemişlerdir.

Florozis oluşturulmuş farelere, normal ve skorbutik diyet verildiğinde skorbutik diyet alan farelerde, eklemlerde hareket kısıtlanması ve sertlik olduğu ve ölüm oranının arttığı görülmüştür. Vitamin C tedavisinden sonra, ani ve gözle görülür bir iyileşme saptanmıştır<sup>109</sup>. Florozisde organizmada askorbik asit ihtiyacının arttığına, vitamin C nin fazla atıldığına veya fazla kullanıldığına ait bir bulguya rastlanılmamıştır.

Bazı araştırmacılar, diyet ile alınan vitamin D fazlalığının, flor zehirlenmesini azalttığını iddia etmişlerdir<sup>77,78,89</sup>. Yapılan çalışmalarda, vitamin D ve florun aynı etkiye sahip oldukları, fakat vitamin D nin florozisde tedavi edici etkisi olmadığı saptanmıştır<sup>90</sup>.

#### Flor ve Enzimler :

Florun, enzimler ve genel metabolizma üzerindeki etkileri konusu tam açıklığa kavuşturulamamıştır. Çeşitli bitkilerde flor, az dozlarda büyümeye ve çiçek açmaya etkilidir. Belkide bitkilerdeki bu büyüme, az miktarda flor ile olan fotosentez uyarımına bağlı olabilir. Flor, çeşitli enzimler ve metabolik olaylar üzerine baskılayıcı veya uyaran olarak tesir eder. Eser halinde flor, invitro civciv kalb ve böbrek doku kültüründe büyümeyi uyarır. Flor ile beslenen sıçanlarda glikoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi azalmış olarak tesbit edilmiştir<sup>109</sup>. Florun, enzimler üzerine olan etkileri Tablo 2 de gösterilmiştir.

#### Florun Kemik Üzerine Etkileri :

Florun insan fizyolojisi ve patolojisi üzerine etkisi bugün çok sayıda deneysel hayvan çalışmaları ile araştırılmakta ve elde edilen veriler insana uygulanmaya çalışılmaktadır. Kısaca bu çalışmalardan bir kısmını gözden geçirirsek ;

TABLO 2 : Az veya Orta Derecede Flor Konsantrasyonundan Etkilenen Enzimler ve Fizyolojik Olaylar ( $10^{-4}$  M/lt veya daha aşağısı)<sup>109</sup>.

Etkilenen Fizyolojik Olaylar ya da Enzimler	Kaynak ya da Gereç	Flor Konsantrasyonu (M/lt)
<b>AKTİVASYON</b>		
. Glikoz Fermentasyonu	E. Koli	$10^{-5}$
. Fermentasyon	Maya	$3 \times 10^{-5}$
. Solunum	Kanser Dokusu	$10^{-4}$
. Lipaz	Karaciğer	$5 \times 10^{-8}$
<b>İNHİBİSYON</b>		
. Kalsifikasyon	Sıçan Hipertrofik Kıkırdağı	$10^{-5}$
. Sitrik Asit Yapımı	Aspergillus Niger	$5 \times 10^{-5}$
. Esteraz	Domuz Karaciğeri	$5 \times 10^{-7}$
. ATP	Kalb Kası	$10^{-5}$
. Fosfataz	Hindistan Cevizi Çekirdeği	$10^{-4}$
. Pirofosfataz	Maya	$10^{-4}$
. Asit Fosfataz	İnsan Tükürük Bezi Prostat	$10^{-4}$
. İzositrik Dehidrogenaz	Sıçan Karaciğeri	$10^{-4}$

Briggs ve arkadaşları<sup>15</sup> tavşanlarda florun büyüme geriliğine, kilo kaybına, eklemde sertliğe, dişlerde değişikliğe neden olduğunu bildirdiler. Singh ve arkadaşları<sup>86</sup>, florozisli bir olgunun otopsisinde, kemikleri ağır, düzensiz, mat renkli bulmuşlardır. Kas ve tendon giriş yerlerinde aşırı periosteal reaksiyon, birçok ekzostoz, eklem kapsülü ve interosseos membranlarda değişiklik tesbit etmişlerdir. Nichol ve Flanagan<sup>65</sup>, insanda rezorbtif

kemik hastalıklarında eğer flor bir sene süre ile günde 15-30 miligram verilirse, kollajen sentezinde belirgin bir azalma olacağını bildirdiler. Evans<sup>32</sup>, florotik kemiğin normale oranla daha yüksek basınç kuvvetlerine karşı koyabildiğini, ancak gerilme kuvvetlerine karşı daha düşük bir direnç gösterdiğini belirtti. Steider ve arkadaşları<sup>90</sup>, sıçanlarda flor ve vitamin D nin kırık iyileşmesinde mineralizasyona etkisini incelemişler, florun tek başına mineralizasyona etkili olmadığını, vitamin D ile verildiğinde mineralizasyonun hızlandığını belirtmişlerdir.

Srikantia ve Siddiqui<sup>89</sup>, insanda iskelet florozisinde, idrarda aminoasit ve kalsiyum atılımının azaldığını, serum kalsiyum ve fosfor seviyesinin normal sınırlarda olduğunu ve alkalin fosfataz seviyesinin arttığını belirtmişlerdir. Wolff ve Kerr<sup>110</sup>, inceledikleri iskelet florozisli bir olguda serum kalsiyum ve fosforunun normal sınırlarda olduğunu bulmuşlardır. Weidmann ve Weatherell<sup>104</sup>, deney hayvanları üzerinde yaptıkları çalışmalarda, flor alınımının kemiğin damarlanmasına, büyümesine, hayvanın genç olup olmadığına bağlı olduğunu söylemişlerdir. Flor, genç kemiklerde epifizeal ve kansellöz bölgelerde daha fazla tutulur demişlerdir.

Reddy ve Srikantia<sup>78</sup>, maymunlarda düşük kalsiyum ve düşük vitamin C li diyetin florozisi alevlendirdiğini bildirmişlerdir. Düşük proteinli diyetle beslenen hayvanlarda, osteoporozun geliştiğini ve florun raşitometik bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Lindeman<sup>61</sup>, deney hayvanlarında rickets ve deneysel florozis biribirine benzediğini, flor ve vitamin D nin aynı etkiyi gösterdiklerini bildirdi. Shupe<sup>84</sup>, florotik hayvanlarda anormal osteoblastik aktivite, mineralizasyonun düzensiz ve yetersiz biçimde olduğunu belirtti

Golub ve arkadaşları<sup>39</sup>, kemik doku kültüründe H<sup>3</sup>-Prolin ile yaptıkları çalışmalarda, kültür ortamında bulunan hidroksiprolinin muhtemel

kaynakları ve florun etkisi konusu üzerinde durmuşlar, florun muhtemelen hücre dışı ortamda kollajen yapımına etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir (Şekil 1).

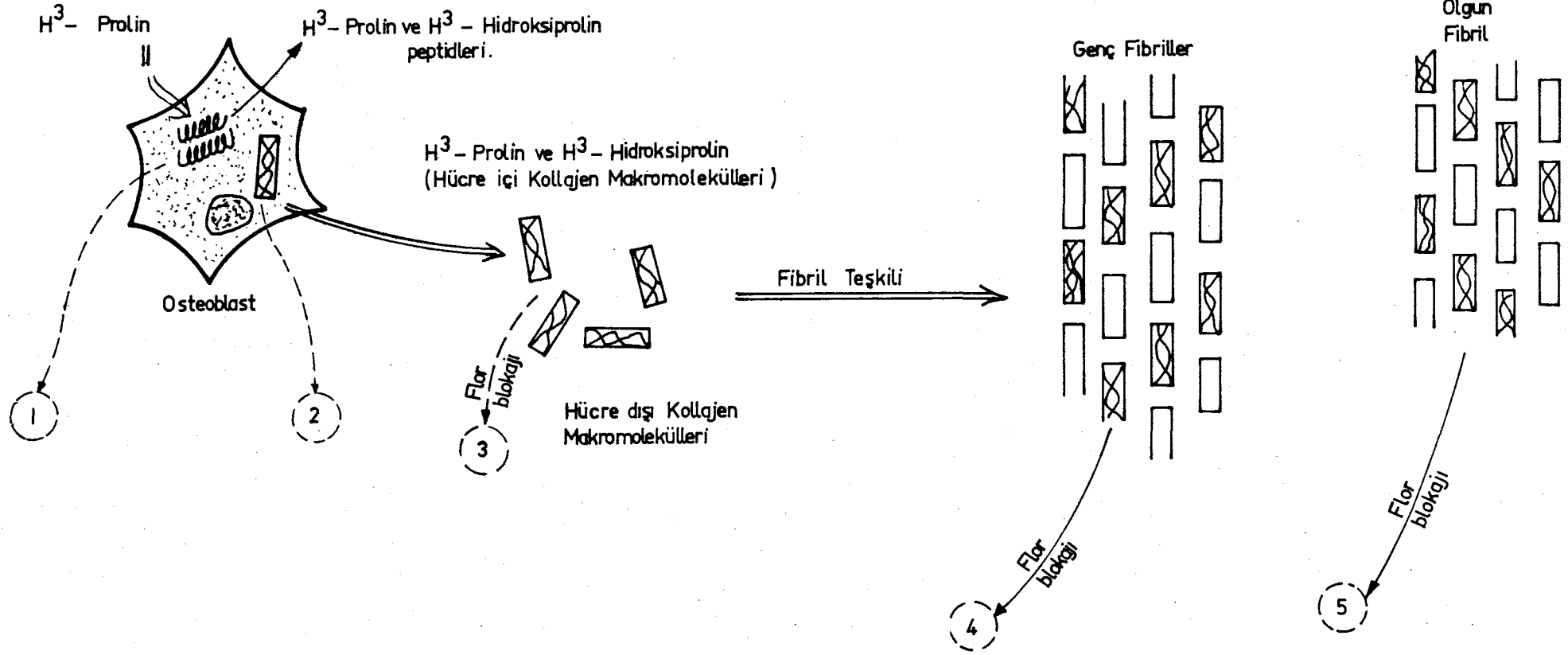
*Florozisde Radyolojik Bulgular :*

İnsanlarda oluşan ve deneysel olarak hayvanlarda oluşturulan floroziste, osteoskleroz ve osteoporoz radyolojik olarak saptanmıştır<sup>29,36,83,86,87,94</sup>. Osteosklerozun görülme olasılığı, osteoporozdan daha fazladır. Osteoporoz genellikle başlangıç bulgusu olarak görülebilir<sup>29,36</sup>. Roholm, floroziste radyolojik bulguları üç döneme ayırarak incelemiştir<sup>29,87</sup> :

1. Dönem : Trabeküllerde kabalaşma, omurga ve pelviste silik bir görünüm mevcuttur.
2. Dönem : Kemik sınırlarında düzensizlik, medüller boşlukta endosteal-kortikal kalınlaşma, ligaman ve interosseos membranlarda kalsifikasyon gözlenir. Appendeküler iskelet sisteminin hastalığa yakalanma olasılığı azdır.
3. Dönem : Aksiyal kemikler normal yapılarını kaybedip, beyaz bir tebeşir görünümünü alırlar. Kortikal ve trabeküler ayırım kaybolmuştur. Uzun kemiklerin korteksleri kalınlaşmış ve yoğunlukları artmıştır. Medüller boşluk daralmıştır. Eklem çevresi ligamanlar, tendonlar ve kasların yapışma yerlerinde kalsifikasyon olur. Omurgada osteofit oluşumu sıktır. Kaburgalar ve bunların arasındaki kaslarda kalsifikasyon oluşur. Topuk dikenini oluşumu ve kortikal kalınlaşma görülür.

*İskelet Florozisinde Histolojik Bulgular :*

Çeşitli araştırmacılar<sup>7,35,36,87,94</sup>, yaptıkları iliak kemik biyopsilerinde düzensiz lameller dizilim, geniş haversien sistem, spongiöz kemikte kabalaşma, düzensiz matriks yapımı, osteositik boşluklarda genişleme gözlediler. Saptanan diğer bulgular, bazı osteoid doku birikimlerinin kaslara kadar uzanması, subperiosteal fibroz kemik oluşumu ve bunun lameller kemiğe dönüşümü idi.



ŞEKİL 1. Kollajen sentezi sırasında florun muhtemel etki yerleri (Golub ve ark. dan)

Florozisde, metaplastik kemik oluşumu konusunda tam bir fikir birliği yoktur. Bazı yazarlar bu olayda nörovasküler anomali ve hücre zedelenmesini sorumlu tutarlar<sup>7,104</sup>. Florotik kemikte mekanik fonksiyonda bozulma, mikrokırıkların görülme oranında artışa ve sonuçta tendonda kemikleşme oluşmasına sebep olur. Yeni oluşan metaplastik kemik dokusunun, şekli ve dağılımı belirgin bir düzen göstermez. Çoğunlukla ekzostozlar, kas ve tendon yapışma yerlerinden başlarlar<sup>7,86,87,102</sup>.

Çeşitli hayvan deneylerinde, tibia-fibular interosseos membranda ve medüller boşluklarda ekzostoza rastlanmıştır<sup>7,87,89,102</sup>. Ekzostoz, kortikal kemikten daha az kalsifiyedir fazla ve differansiye osteoblast, osteoklast ve örgü kemik kapsar. Kortikal kemikten daha az kalsifiye olması, örgü kemiğin kalsifikasyon derecesi ile ilgili değil, gecikmiş kalsifikasyon sonucudur ve anormal kalsifiye matriks görülür.

## II. KEMİK HÜCRELERİ

Osteoblast : Ossifikasyon olan her yerde görülen, küboid şekilde, geniş eksentrik çekirdekli, sitoplazmaları bazofilik hücrelerdir. Endoplazmik retikulumdan çok zengin olup, mitokondrileri çok belirgindir. Çekirdeğin hemen yanında, jukstanuklear vakuol adı verilen bir oluşum bulunur, bunun bariz belirli negatif golgi görüntüsü vardır<sup>2,18,30,73</sup>. Osteoblastların ana görevi, kemik matriksini salgılamaktır<sup>4,13,24,30,105,107</sup>.

Osteosit : Osteoblastlar kemiğin organik, hücreler arası maddesini sentez edip salgırlar. Bu madde ile kendi çevrelerini sararlar. Hücreler arası madde içindeki lakunalarda osteoblastlar yerleşir ve osteosit olarak farklılaşırlar. Osteositler, ovoid görünümündedirler. Osteositin bazofilik sitoplazması, büyük kromatin granüllü geniş oval çekirdeği ve bir ya da birkaç çekirdeği vardır<sup>30,33</sup>. Elektron mikroskopik çalışmalarda, osteosit-



lerin iyi gelişmiş endoplazmik retikuluma çok sayıda mitokondriye, golgi aygıtına ve vezikülüne sahip oldukları görülür. Osteositlerin, kan ile kemik matriksi arasında mineral ve organik madde alışverişini ayarladığı düşünülmektedir. Metabolik aktivitesi azdır<sup>30,45,113</sup>.

**Osteoklast** : Osteoklastlar, çeşitli büyüklük ve sayıda çekirdekleri olan dev hücrelerdir. Kemikte rezorpsiyonu sağlarlar ve kökenleri kesin olarak bilinmemektedir. Bazı yazarlara göre, osteoblastlardan<sup>30</sup> veya retikülo-endotelial sistemin makrofaj ve histiositlerinden ile monositlerden geliştiği bildirilmiştir<sup>30</sup>.

Osteoklastların görevi, hem kemiğin minerallerini hem de hücreler arası maddeyi rezorbe etmektir. Bu görevi nasıl yaptıkları kesin olarak bilinmemektedir. Osteoklastlar, daima mineralize doku ile birlikte bulunurlar ve en önemli enzimleri beta-glukoronidazdır<sup>30</sup>.

### III. KIRIK İYİLEŞMESİ

Kırık iyileşmesinin histolojik yapısı ve hücre kaynağı konusunda yeterli bilgi edinmek için, deney hayvanları üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. İnsanda kırık iyileşmesinin izlenmesi, klinik ve radyolojik yöntemlerle yapılır. İnsanlarda hergün biyopsi alma olanağı bulunmadığından, deney hayvanları kullanılır. Bunun için en ideal hayvan kemiricilerdir<sup>46</sup>.

Ham ve Harris<sup>46</sup>, tavşan kaburgasında yaptıkları deneysel çalışmaların ışığı altında, kırık iyileşmesini değerlendirmişler, kemiğin kırılır kırılmaz iyileşmeye başladığını görmüşlerdir. Şartlar uygun olursa iyileşmenin bazı devrelerden geçip konsolidasyona uğradığını saptamışlardır. Bu gözlemler, hayvan deneylerine dayanmakla birlikte, insanda da aynı şekilde seyrettiği düşünülmektedir.

Araştırmacılar kırık iyileşmesinin dönemlerini çeşitli şekillerde sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada kırık iyileşmesi üç devrede incelenmiştir :

A. İltihabi Dönem :

Kırık oluştuğunda, periost, kas ve kemik damarları yırtılarak kanama oluşur. Kanama sonucu ortaya çıkan kan, zamanla pıhtılaşır. Kırık bölgesindeki kapillerlerin parçalanması ile, kırık uçlarındaki kemikte, birkaç milimetrelilik nekroz oluşur. Çok fazla nekrotik materyel bulunması, akut iltihabi yanıtı neden olur. Aşırı vazodilatasyon ve plazma eksüdasyonu görülür. Kırık bölgesinde ödem gelişir ve iltihabi hücreler, makrofajlar ve polimorf çekirdekli lökositlerde bölgeye gelirler.

Akut iltihabi yanıt yavaş yavaş gerileyince ikinci dönem başlar.

B. Tamir Dönemi :

Kırık oluştuktan en geç kırksekiz saat sonra tamir başlar. Hematom organize olur. Kırık çevresinin pH'ı asidiktir. Bu durum, iyileşmede erken devrelerde hücreler için ek bir uyarandır. Tamir olayı ilerledikçe pH yavaş yavaş nötrale gelir ve daha sonra hafif bazik olur.

Kırık iyileşmesinden sorumlu olan hücreler, mitotik bölünme sonucu sağlanırlar. Bu hücreler, periostun derin tabaka hücreleri ile endosteum ve kemik iliği hücreleridir. Kırık oluştuğunda, yukarıda belirtilen bu tabakalarda hücre proliferasyonu başlar. Bu tabakalarda bulunan hücreler, mezenşimal kökenli olan ve daha sonra osteoblasta dönüşecek osteoprogenitör hücrelerdir. Bu hücreler iki uçtan ilerleyip zamanla birleşirler. Bu hücrelerin bazıları kırıkta hücrelerine farklılaştığından, kallus içinde kırıkta hücrelerine de bol miktarda rastlanır<sup>1,2,50,99</sup>. Kırık bölgesinde osteoprogenitör hücreler osteoblasta dönüşükten sonra, osteoblastlar kemiğin hücreler

arası matriksini salgırlarlar. Bu matriks kollajen ve polisakkaritlerden oluşur. Tamir olayının bu döneminde, hücrelerin davranışlarını etkileyen mekanizma, muhtemelen kırığın çevresi ile ilgilidir. Basınç ya da gerginliğin bulaşmayışı, fibroz doku oluşmasını güçleştirir. Oksijen basıncındaki değişiklikler ise, kemik ya da kırık yönde gelişmeye neden olur<sup>21,45,58,70</sup>. Tamir olayına kırık bölgesinde canlı kalmış osteositler katılmazlar ve rezorbsiyon sırasında yavaş yavaş harap olurlar.

Kırık kemiğin kan dolanımı kırıktan sonra artmaya başlar, fakat kırık bölgesinde osteojenik yanıt sınırlıdır. Kırığın erken devrelerinde perios-teal damarların önemi daha fazladır, ileri devrelerde ise besleyici medüller arterler önem kazanır<sup>57,58</sup>.

Kırık iyileşmesinin erken döneminde, kırık oluşumu önde gelir ve mukopolisakkaritler yüksek seviyelere erişir. Sonra kemik yapımı daha belirginleşir. Hidroksiapatit kristallerinin birikimi ile birlikte kollajen seviyesinde yavaş yavaş artma olur. Kollajen seviyesi, mineralizasyon hadisesinden sonra normal düzeye düşer<sup>70,99</sup>. Kırık uçları çevresinde iç şeklinde yeni sert bir dokunun oluştuğu gözlenir. Buna kallus denir. İç ve dış kallus, kırık uçlarının sıkıca tesbitini sağlar ve klinik olarak kaynama gelişir.

#### C. Yeniden Şekillenme Dönemi :

Yeniden şekillenme dönemi, kallusun istenmeyen kısımlarının rezorbsiyonu ile başlar. 1892 de Wolff tarafından ileri sürülen bir sav'a göre, kemiğin lamelleri ağırlık doğrultusunda şekillenir. Bu dönemde kemiğin dış yüzeyindeki ve medüller kanalı tıkayan yeni kemik, etkilendiği kuvvetler altında rezorbe olmaya başlar ve daha sonraları kemik normal şeklini alır<sup>2,17,46</sup>. Kemikte yeniden şekillenme olayı, bölgedeki oksijen seviyesine ve iyonize plazma kalsiyum düzeyine bağlıdır.

Kırığın yeniden şekillenmesi uzun sürede olur. Radyoaktif çalışmalar bunun daha önce düşünülenden daha uzun devam ettiğini göstermiştir<sup>80</sup>. İnsanda tibia kırığında yeniden şekillenme, 6-9 yıl devam etmektedir.

#### IV. KOLLAJEN :

Bağ dokusunda ençok bulunan protein kollajendir. Kemiğin organik matriksinin % 90 ını fibroz kollajen teşkil eder. İnsan vücudundaki proteinlerin 1/3 ünü kollajen oluşturur<sup>43,49,64,66,107</sup>. Kollajen kemik, kırıkta, tendon, ligaman ve derinin ana fibroz elemanıdır. Bu kollajenin ana aminoasitlerini glisin, prolin ve hidroksoprolin oluşturur. Bu aminoasitlerin kollajendeki oranı glisin'in % 33, prolin ve hidroksoprolin'in ise % 20 dir. X-ışını difraksiyon, kimyasal analiz ve elektron mikroskopik çalışmalar sonucu kollajen liflerinin uzun zincirli moleküllerden oluştuğu anlaşılmıştır. Önemli bir buluşta, ince kollajen liflerinin moleküllerine parçalanarak, organizma dışında orijinal şekline dönüştürülmesidir<sup>21,43</sup>.

Kollajen, dokudan dokuya çapı değişen lif demetlerinden oluşur. Kemikte kollajen lifler, bir köprünün birbirine geçen parçaları gibi organize olurlar. Mineralizasyon, liflerin ince yapılarını takip eder. Kırıkta, eklem yüzünü oluşturur, elastik ve düz olması gerektiğinden lifler genellikle çok incedir<sup>30</sup>. Kollajen özellikle osteoblast, fibroblast ve kondroblastlar tarafından salgılanır<sup>20,43,60,101,106</sup>.

Kollajen molekülü üç polipeptid zincirinden oluşur ki, bunların her biri birbirine bitişik 1000 aminoasitten oluşur. Üç zincirden biri, diğerinin çevresinde sola dönen pervane gibidir. Üç temel molekül bir araya gelip, sağa dönen pervane gibi dizilirler. Her zincirin molekül ağırlığı 100.000 daltondur<sup>43,64,66</sup>. Kollajende iki tip zincir vardır. Bunlar alfa zinciridir. Biri alfa<sub>1</sub>, diğeri alfa<sub>2</sub> dir. Alfa<sub>1</sub> ve alfa<sub>2</sub> zincirlerinin aminoasit kompo-

zasyonları birbirinden farklıdır. Monomer kollajen molekülünde, iki alfa<sub>1</sub> ve bir alfa<sub>2</sub> zinciri vardır. Bunların birbirleriyle bağlanarak oluşturduğu yapıya, tropokollajen denir.

Hidroksiprolin ve hidroksilizin, moleküler zincir oluştuktan sonra zincirdeki prolin ve lizin ünitelerine hidroksil grubunun katılması ile oluşur. Prolin ve hidroksiprolin, buldukları bölgenin dönmesine mani olurlar, yani stabiliteyi sağlarlar. Prolin ve hidroksiprolin miktarı arttıkça, molekülün sıcağa ve kimyasal parçalanmaya direnci artar.

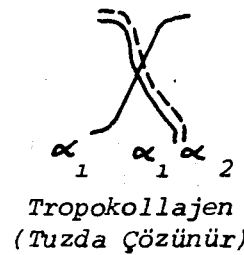
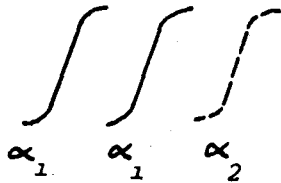
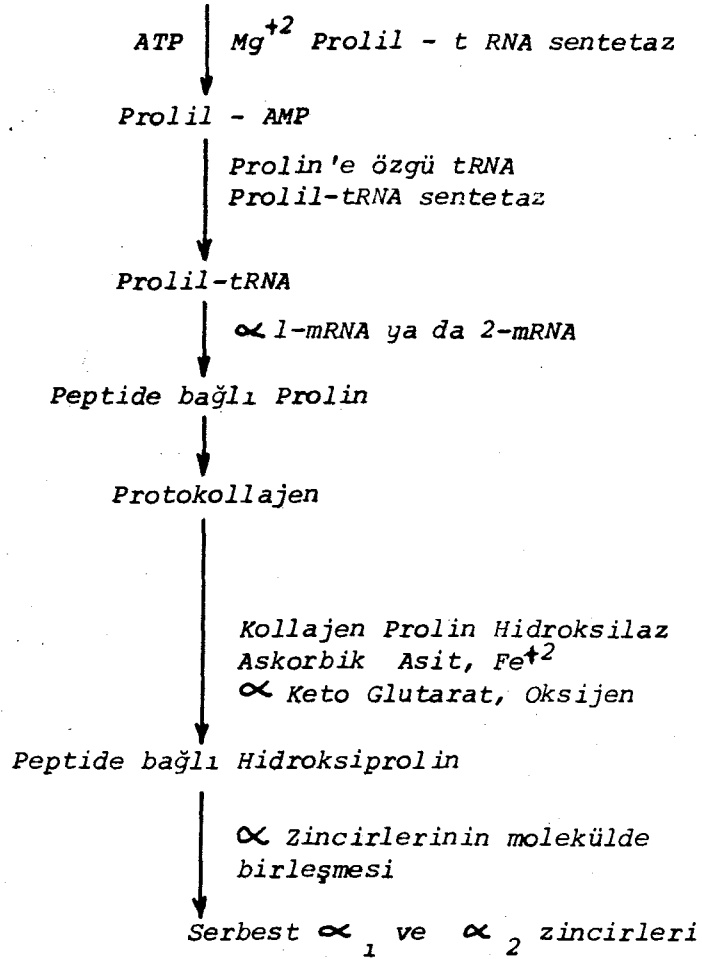
#### V. KOLLAJEN SENTEZİ (Şekil 2) :

Osteoblast, fibroblast ve kondroblastlar üçlü tropokollajen sentezi yapıp, hücre dışı ortama çıkararak liflerin polimerize olmasını sağlarlar. Kollajen sentezi hücre içinde olur. Hücre içinde sentez ribozomlarda başlar<sup>64,66,82,107</sup>. Serbest aminoasitler, aminoasite özgül enzimlerle aktif forma (aminoasit adenilat) dönüşürler. Sonra aminoasit, bir transfer RNA ya geçer bu aminoasite özgüdür. Bu basamaktan sonra, messenger RNA tarafından düzenlenen peptid bağları düzenine girer. Kollajenin polipeptid zincirleri için messenger RNA ya eklenen ribozom kümeleri, kollajen sentezleyen dokular içinde bulunur.

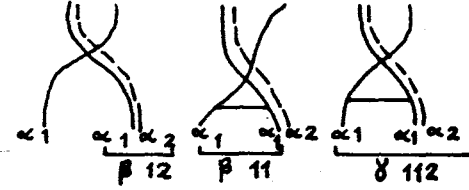
Kollajen içinde bulunan lizin ve prolin artıklarının sadece bir kısmı hidroksillenir. Prolin - t RNA, hidroksile olup, hidroksiprolin - t RNA ya dönüşür ve bu hidroksiprolin kollajenin büyüyen zincirleri içinde yer alır. Bu hidroksilasyon stabilizasyonu sağlar ve proteinin ısıya dayanıklılığını artırır. Hidroksilasyon, prolin hidroksilaz enzimi vasıtası ile olur<sup>60,98</sup>. Bu hidroksilasyon için çeşitli ko-faktörlere ihtiyaç vardır. Bunlar, askorbik asit, Fe<sup>-2</sup> iyonu, oksijen ve alfa-keto glutarat'tır<sup>43,64,82</sup>.

SİTOPLAZMİK OLAYLAR

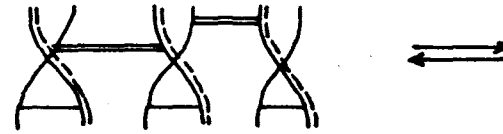
Ribozomlarda .. Prolin



HÜCRE DIŞI OLAYLAR



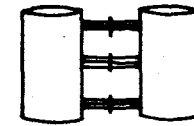
Molekül içi çapraz zincirleme  
(Tuzda Çözünebilir)



Molekül arası çaprazlaşmış zincirler  
(Asidde erir)



Eski polimerize olmuş  
Kollajen fibrilleri  
(Asitte çözünebilir)



Çözünmez Fibriller

ŞEKİL II : KOLLAJEN BİYOSENTEZİ (Ege'den)

Bir sonraki aşamada, moleküle özel transferaz enzimi aracılığı ile karbonhidrat üniteleri, yine özel bir enzim aracılığı ile de UDP-Galaktoz ve UDP-Glikoz üniteleri hidrosilazine takılır<sup>75</sup>. Artık molekül bir gli-koproteindir. Yapı tropokollajen haline gelmeden, küçük bir peptid kısmı ay-rılır ve çaprazlaşmaya hazır hale gelir. Bu peptidler, heliks yapısını alıp aralarındaki disülfid köprüleri ile tek bir fibril haline gelirler ve hücre dışına atılıp kollajen liflerini oluştururlar (Şekil 2)<sup>41,52</sup>.

#### VI. KIRIK İYİLEŞMESİNDE KOLLAJEN SENTEZİ

Kırık iyileşmesinde kollajenin önemi çeşitli çalışmalarla araştırıl-mıştır. Yapılan çalışmalar gözden geçirildiğinde, otoradyografik ve elektron mikroskobik bulgularla, periosteal ve endosteal hücrelerin bu iyileşme olayında önemleri saptanmıştır<sup>60,96,105,108,112</sup>.

1940 yılına kadar, baş dokusu hücrelerinin kollajen oluşumundaki rol-leri tam olarak saptanamamıştır. Eastoe<sup>28</sup>, organik matriksin % 90 ını kol-lajenin oluşturduğunu belirtmiştir. Gross, kollajende ana aminoasitlerin glisin, prolin ve hidrosiprolin olduğunu bildirmiştir. Jackson<sup>54</sup>, kollajen salgılanmasında endoplazmik retikülüm ve golgi aygıtının sorumlu olduğunu iddia etmiştir. Owen<sup>67</sup> trityumlu timidin ile yaptığı çalışmalarda, os-teoblastların kırık iyileşmesindeki rolünün zemin maddesi salgılaması oldu-ğunu iddia etmiştir. Carnerio, Leblond<sup>19</sup>, kemik ve dentin matriksde kolla-jen sentezini Trityumlu glisin ile incelemişler ve kollajenin osteoblast, odontoblastlar tarafından salgılandığını saptamışlardır.

Jackson<sup>54</sup>, fibroblastların, Hay ve Reel<sup>4</sup> de, kırık hücrelerinin kollajen sentezindeki rollerini incelemişlerdir. Weinstock ve Leblond<sup>105</sup>, sıçanlarda osteoblastların kollajen salgılanmasındaki rollerini H<sup>3</sup>-Prolin ile incelemişler ve sentezin ribozomlarda başladığını saptamışlar, endoplazmik

retikülüm ve golgi aygıtının sentez ve salgılamadaki önemini vurgulamışlardır. Udupa ve Prasadoc<sup>99</sup>, deneysel kırık oluşturulan sıçanlarda, ilk haftada mukopolisakkarit seviyesinde, ikinci haftada kollajen seviyesinde bir artış saptamışlar, kollajen seviyesinde üç ve dördüncü haftalarda azalma, beş ve altıncı haftalarda normal düzeye erişme olduğunu bildirmişlerdir. Pentinen<sup>70</sup>, sıçanlarda tibia kırıklarında, iyileşme sürecinde ilk üç hafta içinde kollajen sentezinin arttığını saptamıştır.

#### VII. OTORADYOGRAFİ

Otoradyografi, doku veya organlara verilen radyoaktif maddenin, histolojik doku kesitleri üzerine uygulanan film veya emülsiyonda radyoaktif yıkılma sırasında dışarı çıkan iyonize ışınların dağılımının gösterilmesi tekniğine denir<sup>25,56,69</sup>. Radyoaktif madde ihtiva eden doku kesitleri üzerine sıkıca sarılan film, karanlık odada ışık olmayan özel kutularına yerleştirilerek saklanır. Sonra bu filmler banyo edilerek otoradyograflar elde edilir.

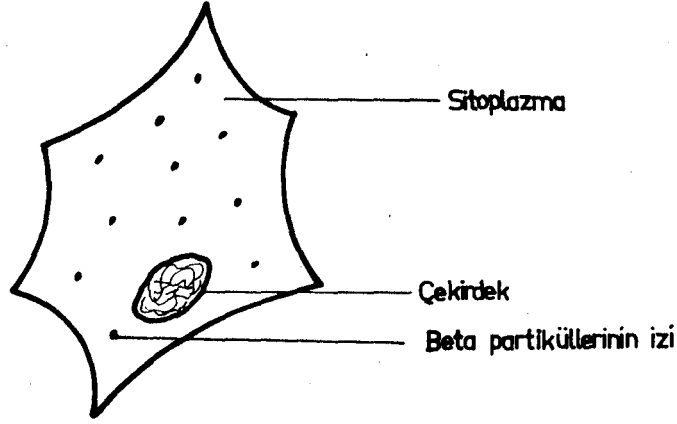
Otoradyografik emülsiyon ve film içinde, gümüş bromür kristalleri vardır. Radyoaktif maddeden yayılan alfa ve beta partikülleri, gümüş bromür kristallerini aktive eder ve metalik gümüş haline çevirir. Işınlanamayan kısımlar ise kristal durumlarını korumaya devam ederler.

Metalik gümüş, özel film developmanları ile ortaya çıkarılır ve bu şekilde radyoaktif gerecin kaynağı, gümüş tanelerinin dağılımı sayesinde takip edilir. Gümüş tanelerinin görülebilmesi için optimum ısı ve ışınlama süresi uygulanmalıdır. Eğer uzun süre ışınlamaya bırakılırsa, emülsiyondaki bütün gümüş bromür kristalleri, metalik gümüşe dönüşür.

Banyo edilen doku boyanıp, ışık mikroskopunda incelenir. Dokuda radyoaktif lamın üzerine sarılı olan ve developmana tabi tutulan film veya



emülsiyonda tanecikler halinde görülür. Işık mikroskopunda gümüş taneleri, siyah noktalar halinde görülür. Bunlara otoradyografik tanecik adı verilir (Şekil 3).



ŞEKİL - 3. İşaretli hücrede beta partiküllerinin izinin şematik resmi

Dokulardan ışınlanan beta partikülleri 0.8-1.0 mikron yol alırlar. Otoradyografiden iyi bir netice elde etmek isteniyorsa film histolojik kesitlerin üzerine sıkı bir şekilde sarılmalıdır

Beta ışınları salan trityum ile işaretli prolinin otoradyografide kullanılması, protein sentezini incelemek yönünden çeşitli imkanlar sağlamıştır. Prolin bir aminoasittir ve glisin ile kollajenin yapısına girer. Kollajen sentezinde prolin önce endoplazmik retikulumda, sonra golgi aygıtında tesbit edilir ve kollajenin yapısı içinde hücre dışına atılır.

## G E R E Ç v e Y Ö N T E M

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi, Patoloji Bilim Dalı, Beytepe Kampusu Karınlık Odası ve Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bilim Dalında yapıldı.

Deneylerde, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Laboratuvarında üretilen % 90 oranında homojen, Swiss Albino türü 108 adet sıçan kullanıldı. Bu 108 hayvan, 20 günlükken deney gruplarına alındı. Sıçanların hepsi erkek ve ağırlıkları 40-60 gr arasında idi. Deney grubumuzu oluşturan 108 sıçan basit tesadüfi örnekleme yöntemi ile<sup>92</sup> üç ana gruba ayrılarak, tüm örnekler özel olarak hazırlanan protokol kağıtlarına kaydedildi.

**GRUP I (Kontrol Grubu) :** Çift distile su ve palet yem ile beslendi. Hayvanlar 55 günlükken sağ arka bacak tibia ve fibulaları, parmakla zorlama yöntemiyle kırıldı. Kırıktan sonra ilk 14 gün her gün, sonra 3, 4, 5, ve 6 cı haftalarda ikişer hayvan olmak üzere toplam 36 hayvan öldürüldü.

**GRUP II :** Bu gruptaki deney hayvanlarına 40 günlükten itibaren 30 ppm sodyum florürlü distile su ve palet yem verildi. Hayvanlar 55 günlük olunca sağ arka bacak tibia ve fibulaları, parmakla zorlama yöntemi ile kırıldı. Kırıktan sonra ilk 14 gün her gün, 3, 4, 5 ve 6 cı haftalarda ikişer hayvan olmak üzere toplam 36 hayvan öldürüldü.

**GRUP III :** Bu gruptaki deney hayvanlarına 35 gün süre ile 100 ppm

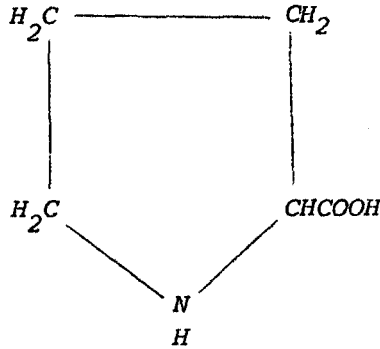
sodyumflorürlü distile su verildi. Sonra bütün hayvanların sağ arka bacak tibia ve fibulaları parmak ile zorlama yöntemiyle kırıldı. İlk 14 gün her gün ve 3, 4, 5 ve 6 cı haftalarda ikişer hayvan olmak üzere, toplam 36 hayvan öldürüldü.

Tablo 3 : Tüm Gruplardaki Deneş Hayvanlarının Yaş, Cins, Aldıkları NaF ve H<sup>3</sup>-Prolin Miktarını Gösteren Tablo.

GRUP	Deneş Başlangıcında Hayvanın Yaşı	Kırık Oluşturuldu-ğunda Hayvanın Yaşı	Distile Suda NaF Miktarı	I.P. H <sup>3</sup> -Prolin
I	20 gün	55 gün Erkek	-	0.5 µCi/gr
II	20 "	55 " "	30 ppm	"
III	20 "	55 " "	100 ppm	"

- Kullanılan Radyoaktif Madde :

Otoradyografi çalışmalarımızda, Radiochemical Centre-Amersham, İngiltere'den getirdiğimiz L (3,4(n)-H<sup>3</sup>) Prolin kullanıldı<sup>76</sup> (Şekil 4). Spesifik aktivitesi 565 Ci/mmol (565 mCi/mg), molekül ağırlığı 115, ince tabaka kromatografi ile saflığı % 95 idi. L (3,4(n)-H<sup>3</sup>) Prolin'in fiziksel yarılanma ömrü ise 1200 yıldı.



ŞEKİL 4 : L - [ 3.4 (n) - <sup>3</sup>H ] Prolin<sup>76</sup>

Radyoaktif madde, deney hayvanlarına uygulanmadan önce 1.0 Ci/ml si, 4 ml steril serum fizyolojik ile seyreltildi. Sıçanlara, ağırlıklarının her gramı için 0.5 mikrocuri radyoaktif madde periton içine steril şartlarda zerk edildi.

- Kırık Oluşturma ve Biyopsi Alma Tekniği :

Deney hayvanları, içinde pamuğa emdirilmiş eter bulunan cam fanus içine konulup, eter inhalasyonu yolu ile anestezi verildi. Anestezi altındaki sıçanların, sağ arka bacaklarının tibia ve fibulası parmak ile zorlama yöntemiyle kırıldı. Kırık oluşturulduktan sonra, alçı ile tesbit yapıp, hayvanlar kafeslerinde deney sonuna kadar bekletildi.

Deney hayvanları öldürülmeden önce, kırık uçlarının durumu klinik muayene ile tesbit edildi. Bunu takiben deney hayvanları, periton içine nembutal zerk edilip öldürüldü. 14 gün süre ile her gün ikişer hayvan, 3, 4, 5 ve 6 cı haftalarda da ikişer hayvan olmak üzere, her deney grubunda toplam 36'şar hayvan öldürüldü.

Kırığın oluşturulduğu sağ arka bacak ön yüzünden uzunlamasına bir girişim ile deri açılıp, kaslar sıyrıldı. Bacak diz ekleminden dezartiküle edildi. Çıkartılan tibialardan bir tanesi otoradyografik ve histopatolojik tetkik için, diğeri ise protein, hidroksprolin ve flor tayini için kullanıldı.

Otoradyografik histolojik ve histopatolojik kesitlerin hazırlanması için alınan doku örnekleri, nötral tamponlu formalin solüsyonunda (Formül I) 24 saat tesbit edildi.

Formalin % 40	100 cc
Distile Su	900 cc
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	4.2 gr
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6.5 gr

Formül I : Nötral Tamponlu Formalin.

Bu sürenin sonunda, doku örneği 24 saat akan musluk suyu ile yıkandı ve % 5 lik formik asit içine konup, 7 gün dekalsifikasyon için bekletildi. Sonra dehidrate edilip, parafin bloklarına gömüldü. Bloklar mikrotom ile 5 mikron kalınlığında kesilerek, histopatolojik yöntem için normal lamlara, otoradyografik yöntem için de, daha önce eter-alkol karışımında temizlenip jelatinli krom solüsyonuna batırılmış lamlara yerleştirildi (Formül-2).

Histopatolojik inceleme için alınan kesitler hematoksilin-eosin, Van Gieson ve Alcian Blue ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Toz Jelatin	2.5 gr
Distile Su	500 ml
Chrome Allum	0.25 gr

Formül 2. Subbing Solüsyonu.

Jelatinli krom solüsyonuna batırılmış lam üzerine alınan kesitler deparafinize edildi.

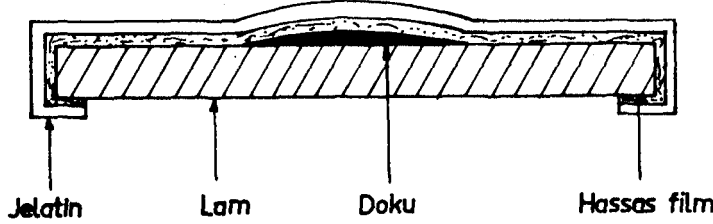
- Soyma Film Otoradyografilerinin Hazırlanması :

Soyma film otoradyografileri, Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampusu Karanlık Odasında tarafımızdan hazırlandı. Deneylelerimizde, British Kodak firmasınınca hazırlanan A.R. 10 soyma film plakları kullanıldı. Bu tür otoradyografi filmleri, cam plak üzerine monte edilmiş emülsiyon ve jelatinden ibarettir. Film, jilet ile istenilen parçaya ayrılır ve cam plak üzerinden soyulup, lama monte edilir.

Otoradyografik filmlerin sarılması sırasında, kullanılacak distile suyun CO<sub>2</sub> ihtiva etmemesi gerekir. Eğer suda CO<sub>2</sub> olursa, otoradyografik tanecek görülmez. Bunun için daha önceden, üzerinde Soda-Lime bulunan şişelerde saklanmış distile su kullanıldı.

Cam plak üzerinden kesilip soyulan filmler, ters yüz edilip distile

su içine konuldu. Emülsiyon alt yüzde, jelatinli tabaka ise üstte olacak şekilde 3 dakika kadar filmlerin şişmesi beklendi. Subbing solüsyonlu lam üzerinde bulunan kesitlere, bu filmler sarıldı. Bu arada doku ile filmin çok sıkı temas etmesine ve filmde kırışıklık olmamasına dikkat edildi (Şekil 5).



ŞEKİL 5 : Otoradyografi filmine sarılı dokunun enine kesiti. (Otoradyografik tanecikler hassas film üzerinde oluşur. Doku ile tanecikler arasında bir seviye farkı vardır. Tanecikleri görmek için mikroskop netleştirilince, alttaki dokunun netliği kaybolur).

Preparatlar kurutulup, özel otoradyografi film kutuları içine yerleştirilerek, 35 gün süre ile buzdolabında 4°C ta ışınlanmaya bırakıldı.

#### - Otoradyografi Filmlerinin Banyosu :

35 gün süre ışınlanmaya bırakılan otoradyografi filmleri karanlık odada kırmızı ışık altında kutularından çıkarılıp, banyoları yapıldı. Developer olarak Kodak D-19 yüksek kontrast negatif banyo, tesbit banyosu olarak da Kodak Metafix Tozu kullanıldı. Banyo işlemi sırasında kullanılan kimyasal maddelerin ve distile suyun sıcaklığının 20°C olmasına dikkat edildi.

Otoradyografi filmleri, D-19 developer'ında 5 dakika süre ile tutuldu, 15-30 saniye süre ile distile su ile yıkanıp, tesbit edici banyoda 3 dakika tutuldu. Daha sonra ışık açıldı ve preparatlar yarım saat akan musluk suyu ile yıkanıp kurutuldu.

- Otoradyografi Filmlerinin Boyanması :

Preparatların boyanması sırasında otoradyografik taneciklerin mikroskopta görülebilmesi için, Ehrlich'in Hematoksilen solüsyonu distile su ile 1/1 oranında seyreltildi. Boyama işlemi 18°C ta ve aşağıda gösterildiği gibi tarafımızdan yapıldı.

- |   |           |
|---|-----------|
| - Preparatlar distile suya kondu                                      | 5 dk.     |
| - Hematoksilen solüsyonu ile boyandı                                  | 25 dk.    |
| - % 0.2 Hidroklirik asit ile renk açıldı                              | 1 dk.     |
| - Musluk suyu ile mavi renk elde edilinceye kadar preparatlar yıkandı | 30-40 dk. |
| - Eosin ile boyandı   | 1 dk.     |
| - Eosini, belirginlemek için distile suya kondu                       | 5 dk.     |
| - Preparatlar kurutuldu.  |           |

Preparatın alt tarafına uzanan soyma filmler, jilet ile temizlendi ve ışık mikroskopi ile tarafımızdan incelendi.

- Protein Tayini :

-20°C ta donmuş olarak saklanan doku örnekleri, hassas terazide tartılıp, havanda ezildi. 5 mM Tris HCl, pH 7.8 tamponu içinde 10 dakika homojenize edildi. Bu homojenat 4°C ta, dakikada 40.000 devirli santrifüjde 10 dakika santrifüje edilip, tüpün üstünde kalan homojen kısım protein seviyesinin saptanması için kullanıldı.

Protein seviyesinin saptanmasında, Biuret yöntemi kullanıldı<sup>95</sup>.

Doku homojenatınının 0.1 ml si, 8 ml biuret reaktifi ve 2 ml serum fizyolojik ile karıştırıldı. Oluşan mavi renk, 550 milimikronda spektrofotometrede okundu. Standart protein olarak, sığır serum albumininin 2.5, 5, 7.5 mg lık çözeltileri kullanıldı. Kemik protein seviyeleri, bu standartlara göre hesaplandı (Tablo 4).

- Hidroksiprolin Tayini :

Deney grubumuzu oluşturan 3 grubun her birinden, 18 er sıçanın tibiasından birer adet olmak üzere, toplam 54 sıçandan kırık bölgesinden doku örnekleri alındı. Bu örnekler  $-20^{\circ}\text{C}$  ta saklandı. Sonra, tek tek hassas terazide tartılıp, havanda ezildi. 100 mgr yaş doku ağırlığı başına, 2 ml 6 N HCl konularak dokular 10 dakika homojenize edildi. Bu homojenatlar özel protein hidroliz tüplerine konulup,  $100^{\circ}\text{C}$  ta, 8 saat hidrolize edildi. Hidroliz olan asit örnekleri, vakum altında tam kuruyuncaya kadar, uçurma işlemine tabi tutuldu. Bu örnekler, 1 ml distile suda çözülüp, hidroksiprolin seviyeleri Bergman'ın modifiye Stegman yöntemi<sup>12</sup> ile saptandı.

Bu yöntem, Kloramin-T ile oksitlenen örneklerin, p-dimetil amino benzaldehit (Erllich) ile renklendirilmesi esasına dayanır. Oluşan renk 540 nm de, Coleman Junior spektrofotometresinde okundu. Her grup deney 4 ve 8 mikrogram hidroksiprolin standart ile beraber çalışıldı. Alınan sonuçlar, yaş doku ağırlığı başına bulunan proteinin, mikrogram değerine düşen hidroksiprolinin mikrogram değeri şeklinde ifade edildi (Tablo 4).

- Kemikte Flor Tayini :

Flor tayinleri Maden Tetkik ve Arama Enstitüsü'nde yapıldı.

Kırık oluşturulan tibialardan, her gruptan 5 er adet tesadüfi örnekleme yöntemi ile alınıp, duyarlı terazide tartıldı, sonra  $150^{\circ}\text{C}$  ta, 24 saat otoklavda kurutuldu. Kurutulan bu kemikler, eter-alkol karışımına konulup, yağları çıkartıldı. ve  $600-700^{\circ}\text{C}$  da fırında yakılıp kül haline getirildi. Küller, duyarlı terazide tartılıp, ağırlıkları kaydedildi. Bu küller daha sonra Willard-Winter distilasyon cihazına konulup, 150 ml distile elde edildi.

Distilasyon kabı az miktarda su kapsar. Küller 10-20 ml tercihan



buzlu perklorik ya da sülfürik asit içine konur. Toplayıcı 1 ml, 1 N alkali ihtiva eder. Buna 1 damla fenolfitalein ilave edilmelidir. Distilasyon kabı 135-145°C ta tutulur ve 50 dakikada 150 ml distile toplanmalıdır. Toplayıcı alkali tutmak için, ilave desinormal NaOH solüsyonu gerekebilir. Son 5 dakikada toplayıcı alçaltılıp, kondansörün içi son birkaç damla distile ile temizlenir.

Elde edilen bu distileden flor iyonu tayini, Salt-Asit Thorim titrasyon metodu<sup>51</sup> ile yapıldı.

- Mikrodansitometrik Tayin :

Mikrodansitometrik tayinler Step-Wedge tekniği ile yapıldı<sup>63,111</sup>.

Her grupta 6 hafta boyunca deney hayvanları öldürülüp, tibiaları çıkartıldıktan sonra, bunların diş filmleri ile radyografik takibi yapıldı.

Radyograflar, Hacettepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Radyoloji Bölümünde bulunan Siemens-Heliodont rontgen cihazı ile 50 Kvp ve 10 mA, 0.45 sn ayarlanarak çekildi.

Radyografların alınmasında dansiteye tesir edebilecek etmenlerin belirli seviyede tutulması gerekiyordu. Bu etmenler şunlardır :

- Radyografların alınmasında paralel teknik yönteminin tatbiki,
- Kilovaltaj ve miliamperin değişmemesi,
- Işınlama süresinin aynı olması,
- Işın kaynağı-film, Kemik-Film Uzaklığının eşit tutulması,
- Aynı tür film kullanılması,
- Bütün filmlerin aynı şartlarda, aynı anda banyo edilmesi.

Işın kaynağı-film, mesafesinin sabit tutulması için 40 cm uzunluğunda pleksiglastan imal edilen silindir tüp, rontgen cihazının koni başına geçirilip, radyograflar bu şekilde alındı.

Bütün radyograflarda, Agfa Gevart firmasının ürettiği, hızlı periapikal, yüksek dansiteli film kullanıldı.

Filmlerin dansitesine etki edebilecek koşulların bir düzeye getirilmesine rağmen, her film çekilişinde silindir tüpün tam ayarlanamaması ve voltajdaki değişiklikler gibi nedenlerle dansite değişiklikleri olabilir. Yapılan çalışmalarda, 7 mm kalınlıkta aliminyum plakanın dansitesinin, kemik dokusunun dansitesine eşit olduğu saptanmıştır<sup>71,72,111</sup>. Biz de çalışmamızda hata oranını minime indirebilmek için, en kalın basamağı 7 mm olan ve merdiven basamağı şeklinde sıralanan aliminyum plaka (Step-Wedge) kullandık. Film çekilirken bu aliminyum basamak dokunun yanına kondu. Alınan radyograflar dansitometrik analize tabi tutuldu ve aynı bölümdeki dansite farkları tesbit edilmeye çalışıldı.

Bu radyografların dansitesi, Atom Araştırma Enstitüsü, Ankara Nükleer Araştırma Merkezinde bulunan ve Macbeth firmasınca imal edilen TD-102 model dansitometre cihazı ile saptandı. Bu cihaz maddelerin ışık yoğunluğu ve renklerini ölçecek duyarlıkta olup ışınlanan filmlerin değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Dansite değerleri 0-4 birimli ölçek ile değerlendirilmektedir. Bu işlem yapılırken, cihazın kendi kontrol filmleri ile karşılaştırma yapılarak, en duyarlı okuma sağlandı. Okuma sırasında, serideki her filmin daima aynı bölgesi okunmaya çalışıldı. Kırık bölgesinde, kemiğin 2 mm proksimali okundu.

Amaç bölümünde belirtildiği gibi, florozisin insan sağlığı üzerindeki etkilerini göstermek için, daha önce tesbit ettiğimiz Endemik florozisli yöreden alınan bir olgu incelendi. Bu olgunun radyolojik ve iliak kemik biyopsisindeki histopatolojik değişiklikler, konunun önemini vurgulaması nedeni ile araştırılmaya çalışıldı.

## B U L G U L A R

Gerecimizi oluşturan deney hayvanlarındaki bulguların değerlendirilmesine geçmeden önce, konunun önemini vurgulamak için endemik florozisli yöreden seçilen bir olgunun, radyolojik ve histopatolojik verileri aşağıda sunulmuştur.

Bu olgunun yapılan radyolojik incelenmesinde, pelvis ve vertebralarda yaygın skleroz, tipik beyaz tebeşir manzarası mevcuttu. Sakro-Pubik ligaman, obturator membran, sağ radio-ulnar ve her iki tibia-fibular interosseos membranlarda kalsifikasyon saptandı (Resim 1).



RESİM 1 : Endemik florozisli bir olgunun pelvis, vertebra (a), önkol (b) ve bacak (c) grafisindeki patolojiler gözlenmekte.

*İliak kemik biyopsisinde, kemik lamellerin düzensiz dizilim gösterdikleri, haversien sistemde genişleme, boş haversien kanallarının mevcudiyeti, osteositik boşluklarda yer yer genişleme, osteositlerde piknoz ve lakunalarda genişleme gözlemlendi (Resim 2,3).*



*RESİM 2 : Aynı olgunun iliak kemik biyopsisinde, osteositlerin nukleuslarında piknoz ve lakunalarda genişleme görülmekte. (H.E., x 420).*



*RESİM 3 : Aynı olgunun kemik biyopsisinde düzensiz kemik lamellerinin oluşturduğu kaba trabeküller, boş haversien kanallar görülmekte. (H.E., x 75).*

Endemik florozisli yöreden seçilen bu olgunun radyolojik ve histopatolojik incelemesinden sonra, çalışmamızda gereci oluşturan deney hayvanlarındaki bulgular çeşitli yöntemlerle değerlendirildi. Otoradyografik ve histopatolojik incelemelerde, tüm gruplarda aynı bulguları kapsayan günler birlikte değerlendirildi.

OTORADYOGRAFİK BULGULAR :

I. GRUP : Florsuz çift distile su içen deney hayvanları bu grubu oluşturmaktadır.

Kırık oluşturulduktan 24 saat sonra, kırık bölgesinde periostun fibroz ve kambiyum tabakasında az miktarda hücre proliferasyonu, bu hücrelerin sitoplazma ve çevre matrikslerinde kollajen sentezini gösteren tek tük işaretli prolin tesbit edildi. Periostun kambiyum tabakasında, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlar saptandı.

Kortekste yer yer otoradyografik tanecik, yüzeyel osteositlerde göze çarpıyordu.

Kırık fragmanları arasındaki hematomda otoradyografik tanecikler tesbit edildi.

Endosteumda, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlar da, kollajen salgılandığını gösteren az miktarda otoradyografik tanecik gözlemlendi.

Kemiğin iliğindeki hücrelerin çevrelerinde prolin ile işaretli aşırı kollajen yapımı dikkati çekti.

2. günde, periost proliferasyonunun ilerlediği, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastların sitoplazma ve çevrelerinde işaretli prolin içerdikleri saptandı. Kollajen yapımı ilk güne göre artmıştı.

Endosteum ve kemik iliğinde, kollajen salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler tesbit edildi.

Kırık uçları arasındaki hematonda, otoradyografik tanecik sayısı artmıştı.

3 ve 4. günlerde, çevre yumuşak dokuda iltihabi hücrelerde ve genç bağ dokusu hücrelerinde kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler, hücrelerin sitoplazma ve çevre matrikslerinde gözlemlendi.

Kambiyum tabakasında, osteoprogenitor hücrelerin bir kısmının oval yapı aldıkları, osteoblastlar ve bunların sitoplazma ve çevrelerinde kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler saptandı.

Kortekste yüzeyel kısımlarda, tek tük otoradyografik tanecik tesbit edildi.

Endosteumda, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastik aktivite artmıştı. Hücrelerin sitoplazma ve çevresinde bol miktarda otoradyografik tanecik gözlemlendi. Bu hücrelerin salgılama faaliyeti, medüller boşluğa doğru idi (Resim 4).

Kemik iliğinin hücreden zengin olduğu ve bu hücrelerin etrafında bol miktarda otoradyografik tanecik mevcudiyeti gözlemlendi.

5. ve 6. günde, kırık uçları ve çevresinde genç kemik dokusu, muntazam osteoblastik hücre dizisinin oluşturduğu örgü kemik, kemik dokusu ile devam eden kırık dokusu ve kollajen liflerin varlığı saptandı.

Endosteumda, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlar, bunların çevrelerinde kollajen salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler gözlemlendi.

7 ve 8. günlerde, çevre yumuşak dokuda kollajen yapımı tesbit edildi.



Resim 4 : Kontrol grubunda 4. günde endosteumda ve kemik iliğinde, osteoblast ve osteoprogenitor hücrelerde kollajen sentezini gösteren otoradyografik tanecikler. (H.E., x 420).

Periostun dış tabakasında, fibroblastik ve kondroblastik aktivite, bunların etrafında kollajen liflerin varlığı dikkati çekiyordu.

Kambiyum tabakasında, kemik yapının teşkil ettiği, örgü kemik teşkili, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlar saptandı. Örgü kemikte ve osteoblastlar çevresinde 6. güne oranla artmış otoradyografik tanecik gözlemlendi.

Korteksde, yüzeyel osteositler çevresinde hala tek tük otoradyografik tanecik varlığına rastlandı.

Endosteumda, endosteal ossifikasyonun başladığı, örgü kemik teşkili, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlar gözlemlendi. Kollajen sentezinin daha fazla olduğunu gösteren, bol miktarda otoradyografik tanecik tesbit edilen diğer bir bulgu idi.

Kemik iliğinde kollajen sentezi aşırı bir şekilde devam ediyordu.

9 ve 10. günlerde, periosteumda fibroblast ve kondroblastlarda belirli sahalarda, yer yer yoğun kollajen sentez ve salgılanması gözlemlendi. Kambiyum tabakasında osteoblastların lakuna oluşturmaya başladığı, sitoplazmalarında ve lakuna etrafında bol kollajen sentez ve salgılanmasını belirleyen otoradyografik taneciklerin varlığı saptandı.

Korteksde belirli sahalarda tek tük otoradyografik tanecik izleniyordu.

Endosteumda kollajen sentez ve salgılanmasının bol bir şekilde devam ettiği, örgü kemikte, yoğun bir şekilde otoradyografik tanecik varlığı gözlenen diğer bir bulgu idi.

11. ve 12. günlerde, çevre yumuşak dokuda hala otoradyografik taneciklere rastlanıyordu.

Periostun dış tabakasında, fibroblastik ve kondroblastik aktivite bunların sitoplazma ve çevrelerinde yoğun otoradyografik tanecik saptandı.

Kambiyum tabakasında kemik dokusu teşkili, kırık uçları ve kemik doku sınırında, fibroblastik elemanlarda demet şeklinde kollajen teşkili gözlemlendi. Osteoprogenitor hücre varlığı, osteoblastların lakuna teşkili ve bu hücrelerin kollajen sentez ve salgılama fonksiyonlarına devam ettikleri saptanan diğer bir bulgu idi. Kollajen yapımı dokuz ve onuncu güne nazaran bariz bir artış gösteriyordu.

Endosteumda kemik dokusu teşkili, örgü kemik ve yoğun kollajen yapımı tesbit edildi.

Kırık uçları arasındaki kırık uç dokuda da kollajen salınımını gösteren yoğun otoradyografik tanecik saptandı.

13 ve 14. günlerde, periostun fibroz tabakasında, fibroblast ve



kondroblastların sitoplazma ve çevrelerinde, örgü kemikte kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren yoğun otoradyografik tanecik varlığı gözlemlendi.

Kambiyum tabakasında, kemik dokusu teşkilinin ilerlediği, yoğun kollajen salınımı saptandı (Resim 5).



RESİM 5 : Periostun kambiyum tabakasında osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlarda kollajen sentezini gösteren demet şeklinde otoradyografik tanecikler. (H.E., x 420).

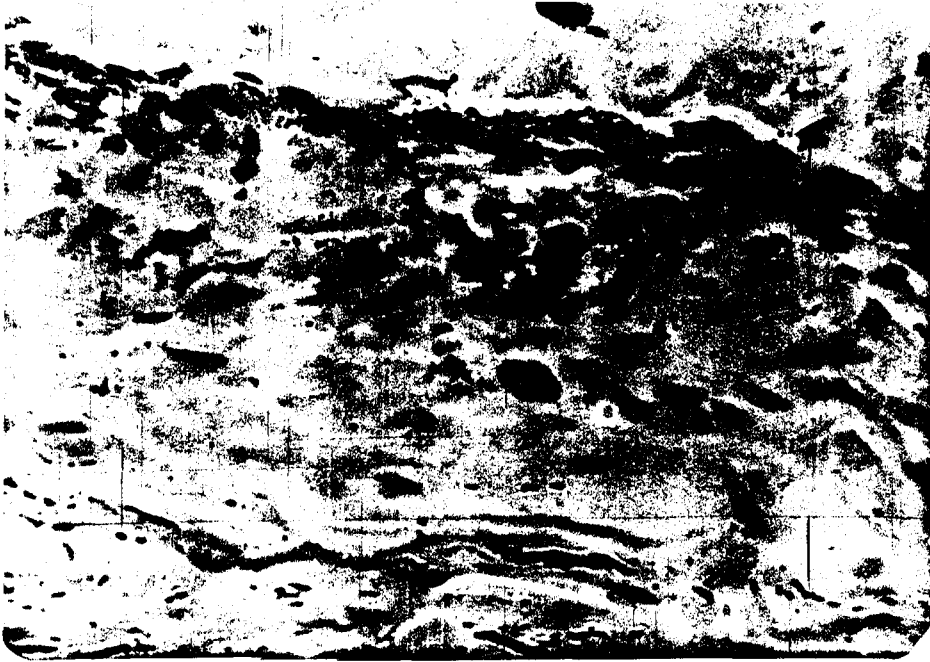
Endosteumda örgü kemikte, bol otoradyografik tanecik tesbit edildi.

Kırık uçları arasındaki kırık dokuda, otoradyografik tanecik sayısı azalmıştı.

Bu günde kemik dokuda tesbit edilen otoradyografik tanecik sayısı 11 ve 12. günlere oranla daha fazla idi.

3. Hafta : Periostun dış tabakasında fibroblastik aktivasyon hala devam ediyordu. Örgü kemik ve çevresinde yoğun kollajen sentez ve salgılanması gözlemlendi. Osteoblastlardaki aktivasyon, yeni oluşan kemikte demetler halinde bol kollajen sentezini gösteren otoradyografik taneciklerle saptandı. Fibroblastlar ve osteoblastlar etrafında, demet şeklinde kollajen oluşumu tesbit edildi (Resim 6). Korteksde hala tek tük otoradyografik tanecik göze çarpıyordu.

Endosteumda, örgü kemikte kompakt kemiğe geçiş, kollajen sentezinde ve kıkırdak doku oranında azalma mevcuttu.



RESİM 6 : Periostta osteoprogenitor hücreler ve fibroblastlarda kollajen sentezini gösteren otoradyografik tanecikler. (H.E., x 420).

4. Hafta : Periostun dış tabakasında fibroblastik aktivite ve kollajen sentezi az da olsa gözleniyordu.

Trabeküler ve kompakt kemik oluşumu, arada lameller kemik adaları ve kollajen sentezini gösteren otoradyografik tanecikler saptandı. Kollajen

oluşumu, 3. haftaya oranla azalmıştı. Kırık bölgesinde az miktarda kırık doku varlığı saptandı.

Endosteal bölgede, lameller kemikte bol otoradyografik tanecik gözlenen diğer bir bulgu idi. Kompakt kemikte otoradyografik tanecik sayısı azalmıştı.

5. Hafta : Medüller kanal rekanalize olmuştu. Kompakt kemik oluşumu fazlalaşmıştı. Tek tük kırık doku adalarının varlığı gözlendi. Trabeküller incelmeye başlamıştı. Kollajen sentezi bütün bölgelerde çok azdı.

6. Hafta : Periosteal çok az osteoblastik aktivite vardı. Kompakt kemiğin oluşumu tamamlanmıştı. Bu dönemde periost ve endosteumda kollajen sentezini gösteren tek tük otoradyografik tanecik saptandı.

II. GRUP : Bu grubu, 30 ppm sodyum florürlü distile su içen deney hayvanları oluşturuyordu.

Kırık oluşturulduktan sonra 24 ve 48 saatteki gözlenen otoradyografik bulgular kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu.

3 ve 4. günde, periostun dış tabakasında fibroblastlar, kondroblastlar ve bunların sitoplazmalarında ve çevresinde yer yer yoğun olarak kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler gözlendi.

Kambiyum tabakasında, osteoprogenitor hücreler ve osteoblastlarda kollajen sentez ve salgılama fonksiyonu saptandı.

Kontrol grubundan farklı olarak periostta kondroblastik aktivitenin fazlalığı, osteoblastik aktivitenin azlığı göze çarpıyordu : Diğer bulgular kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu.

5. ve 6. günlerde, fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin kontrol grubuna oranla fazlalığı dikkati çekiyordu.

7 ve 8. günlerde, periostun dış tabakasında fibroblastik ve kondroblastik aktivite fazlalığı, bunların içinde ve etraf ara maddede kontrol grubuna oranla yoğun olan ve kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler saptandı.

Kambiyum, korteks ve endosteum bölgelerindeki bulgular, kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu.

Kollajen sentez ve salgılanması 5 ve 6. günlere oranla fazla, fakat kontrol grubuna göre ise daha azdı.

9 ve 10. günlerde, periostun dış tabakasında fibroblastik ve kondroblastik aktivitede kontrol grubuna oranla artış, osteoplastik aktivitede ise azalma gözlemlendi. Kırık uçları arasındaki kırık dokuda, kontrole oranla daha fazla idi.

11 ve 12. günlerde : Kollajen sentezi, kontrol grubuna göre az, 9 ve 10. günlere oranla artmıştı. Kollajen sentezi, kemik dokuda az idi. Fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin yoğunluğu ve kollajen sentezi otoradyografik taneciklerin fazla olması ile saptandı.

13 ve 14. günlerde, kollajen sentezini gösteren otoradyografik taneciklerin, örgü kemikte kontrole oranla daha az olduğu buna karşın fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin belirgin olarak fazlalığı dikkati çekiyordu (Resim 7). Periost ve kırık uçları arasındaki kırık dokuda, kırık dokuda hücreleri sitoplazmalarında ve çevre ara dokuda bol otoradyografik tanecik tesbit edildi.



RESİM 7 : Geniş kıkırdak dokusu ve çevresindeki fibroblastlardan yoğun kollajen sentezini gösteren otoradyografik tanecikler. (H.E., x 420).

3. hafta, kemik dokusunda kollajen sentezinin kontrole oranla az olduğu dikkati çekiyordu. Geniş kıkırdak doku adalarının varlığı ve buradaki hücrelerde yoğun bir şekilde kollajen sentezi ve salgılanması saptandı. Kollajen yapımı kemik dokuda, kontrole oranla azalmış, 2. haftaya oranla ise artmıştı.

4. hafta, Kollajen sentezini gösteren otoradyografik taneciklerin, kemik dokusunda kontrole oranla daha az olduğu saptandı. Fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin ise daha fazla olduğu gözlenen diğer bir bulgu idi. Kollajen sentezi 3. haftaya oranla azalmıştı.

5. ve 6. haftalarda fibroblastik aktivitenin varlığı belirli alanlarda göze çarpıyordu. Kontrol grubuna oranla geniş kıkırdak sahaları ve bunlarda az da olsa kollajen salgılanmasını gösteren, otoradyografik tanecikler tesbit edildi.

III. GRUP : Bu grubu 100 ppm sodyum florürlü distile su içen deney hayvanları oluşturuyordu.

1 ve 2. günlerde kontrol grubundan farklı olarak, fibroblastik aktivitenin fazlalığı saptandı.

3 ve 4. günlerde, periostun dış tabakasında, fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin fazlalığı, bu hücrelerde kollajen sentezini ve salgılanmasını gösteren otoradyografik tanecikler gözlemlendi.

Kambiyum tabakasında, osteoprogenitor hücrelerde ve osteoblastlarda kollajen sentez ve salgılanması kontrole oranla azdı.

Kortekste, tek tük otoradyografik tanecik saptandı.

Endosteumda ve kemik iliğinde tesbit edilen bulgular II. Grup ile benzerlik gösteriyordu.

5 ve 6. günlerde, periostun dış tabakasında fibroblastik ve kondroblastik aktivite fazlalığı, bu hücrelerde yoğun kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren, bol otoradyografik tanecikler saptandı.

Kambiyum tabakasında ve örgü kemikte, kontrol ve II. Gruba oranla kollajen sentez ve salgılanmasının düşük düzeyde olduğu gözlemlendi.

Kırık uçları arasındaki kırık dokusu, kontrol ve II. Gruba oranla daha genişti ve kollajen salgılanmasını gösteren yoğun otoradyografik tanecik kapsıyordu.

7 ve 8. günlerde, fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin fazlalığı ve kollajen sentezi daha belirgin olarak gözleniyordu.

Örgü kemikte, osteoprogenitor hücrelerde ve osteoblastlarda otoradyografik tanecikler daha az sayıda idi.

*Kemik iliği normosellüler ve kontrol grubuna oranla daha az otoradyografik tanecik kapsıyordu.*

*9. ve 10. günlerde, çevre yumuşak dokuda, bol otoradyografik tanecik gözlemlendi. Periostun fibroz tabakasında fibroblast ve kondroblastların sitoplazmalarında ve çevre ara maddede yoğun otoradyografik tanecik saptandı.*

*Lameller kemik oluşumu, osteoklastik ve osteoblastik aktivite gözlenen diğer bulgulardı. Kemik dokusunda kollajen sentezi, diğer gruplara göre az, 7. ve 8. günlere oranla artmış olarak tesbit edildi.*

*11 ve 12. günlerde saptanan bulgular 10. gün ile benzerlik gösteriyordu.*

*13 ve 14. günlerde, çevre yumuşak dokuda, otoradyografik tanecik vardı.*

*Periostun dış tabakasında fibroblast ve kondroblastlar içinde ve çevre ara dokuda, diğer gruplara oranla daha bol otoradyografik tanecik saptandı.*

*Örgü kemik, kompaktlaşmaya başlamıştı. Otoradyografik tanecikler kemik dokuda kontrole oranla azdı. Yer yer osteoklastik aktivite gözleniyordu.*

*Kırık uçları arasındaki kırık dokusu, geniş bir alanı kapsamakta idi ve kollajen sentezini gösteren demet halinde, yoğun otoradyografik tanecik tesbit edildi (Resim 8).*

*3. Hafta : Periostta fibroblastlar ve kondroblastlar içinde ve çevresinde kollajen sentez ve salgılanmasını gösteren bol otoradyografik tanecik saptandı. Lameller kemik oluşumu ve trabeküler yapı gözlenen diğer bir bulgu idi. Kemik yapıda kollajen yapımı kontrole oranla azdı, fakat ikinci haftaya oranla artmıştı.*



RESİM 8 : Kırık uçları arasındaki kırık dokusunda kollajen sentezini gösteren demet şeklinde sıralanmış otoradyografik tanecikler. (H.E., x 420).

Kırık uçları arasındaki kırık dokuda bol miktarda demetler halinde otoradyografik tanecikler gözlemlendi. Örgü kemik devamlılığı ve kollajen sentez ve salgılanması gözlenen diğer bir bulgu idi (Resim 9).



RESİM 9 : Yüksek flor grubunda, üçüncü haftada genç kemik dokusu etrafında osteoblastik hücre dizilimi ve kollajen sentezini gösteren otoradyografik tanecikler. (H.E., x 420).



4. hafta : Kemik ve kırık dokusunda, otoradyografik taneciklerin üçüncü haftaya oranla daha az olduğu saptandı. Kırık dokunun ve bu dokuda kollajen sentezinin kontrole oranla belirgin fazlalığı dikkati çekti.

Osteoklastik aktivitenin fazlalığı saptanan diğer bir önemli bulgu idi.

5. ve 6. haftalarda, periostta osteoblastik aktivitenin az da olsa varlığı, osteoklastik aktivite, kırık doku ve kollajen sentezini gösteren tek tük otoradyografik tanecikler saptandı.

Bu grup ile kontrol grubu arasındaki önemli farklılıklar ise, kırık dokunun fazlalığı ve bu dokudaki kollajen sentezindeki fazlalık idi.

#### HİSTOPATOLOJİK BULGULAR :

I. GRUP : Bu grubu florsuz distile su ile beslenen deney hayvanları oluşturmaktadır.

Kırık oluşturulduktan yirmidört saat sonra, kırık bölgesinde hematoma, fibrin ve çevre dokuda iltihabi hücreler gözlemlendi. Kırık uçları arasında bol miktarda fibrin, eritrosit ve polimorfların hakim olduğu iltihabi hücreler saptandı. Çevre dokuda mono ve polimorfonükleer hücre hakimiyeti vardı. Periostta, kırık alanında çok az kollajen demetleri mevcuttu.

2. günde, çevre yumuşak dokuda granülasyon dokusu saptandı. Periosteal hücre proliferasyonu, osteoprogenitor hücreler ve çok az kollajen demetleri gözlemlendi.

3. ve 4. günlerde, periosteal reaksiyonun belirgin hale geldiği, en dışta genç bağ dokusu elemanları fibroblastlar, miksoid hücreler, bol miktarda yeni kapiller damarların varlığı saptandı. Bunu izleyen tabakada,

fibroblastların oluşturduğu demet şeklinde doku bandı, osteoprogenitor hücreler, osteoblastlar ve genç kemik dokusu varlığı gözlemlendi (Resim 10). Bu hücrelerin çevrelerinde kollajen lifleri saptandı.



RESİM 10 : Periostta fibroblastik ve osteoblastik aktivite, osteoprogenitor hücreler ve kollajen demetleri görülmekte. (H.E., x 200).

Endosteal bölgede, örgü kemiğin oluşmaya başladığı ve kollajen demetleri gözlemlendi. Kemik iliği hücreden zengin olarak tesbit edildi.

5 ve 6. günlerde, çevre kas dokusunda ödem ve dağınık mono ve polimorfonükleer iltihabi hücre infiltrasyonu gözlemlendi. Periostun fibroz tabakasında, fibroblastik hücre proliferasyonu, osteoblastların düzensiz gelişigüzel dizilimi, kemik doku yanında kıkırdak dokusu ve kollajen lifleri saptandı.

Endosteal lameller kemik yapımı, osteoblastik aktivite varlığı ve kollajen lifleri gözlenen bir diğer bulgu idi.

Kemik iliği hücreden zengin idi.

7 ve 8. günlerde, çevre kas dokusunda iltihabi hücre infiltrasyonu, genç bağ dokusu, kollajen demetleri gözlemlendi. Periostun dış tabakasında fibroblastik proliferasyon, kollajen teşkili, kas tabakası içine doğru gelişen kırık dokusu ve kemik doku birbirleriyle devam ediyorlardı. Bunların etrafında kollajen varlığı gözlemlendi.

Medüller boşluk kapanmıştı.

Endosteumda yerel osteoplastik aktivite, örgü kemik oluşumu saptandı. Kollajen lifleri periosteal bölgeye oranla daha az idi. Kırık uçları arasında az miktarda kırık dokusu elemanlar gözlemlendi.

Kemik iliği hücreden zengindi.

9 ve 10. günlerde, periosteal lameller kemiğin oluştuğu, fibroblastik aktivitenin hala varlığı ve kollajen demetleri saptandı. Kollajen miktarı 7 ve 8. güne oranla daha fazla idi. Osteoplastların, osteosite farklılaşmaya başladıkları gözlenen bir diğer bulgu idi. Kırık uçlarında periosteal ve endosteal kırık dokusu yapı daha fazla olarak saptandı.

Endosteal kemik oluşumu, lameller yapı ve kollajen lifler gözlemlendi. Kırık dokusu hücrelerinde yer yer dejenerasyon başlamıştı.

11 ve 12. günlerde, çevre kas dokusunda iltihabi reaksiyon diğer günlere göre çok azdı. Düzensiz nodüler yapılar oluşturan, daha çok kırık dokusu hakimiyeti gösteren, bununla devam eden fibroz ve kemik doku gelişimi saptandı. Kırık dokusu-kemik doku oranı eşit idi ve çevrelerinde kollajen demetleri oluşmuştu. Kollajen miktarı 9 ve 10. günlere oranla artmıştı.

Periosteal kallus oluşmuş ve osteoplastik aktivite hakimiyeti vardı.

Kırık uçları arasında, hala fibrin ve granülasyon dokusu gözlemlendi.

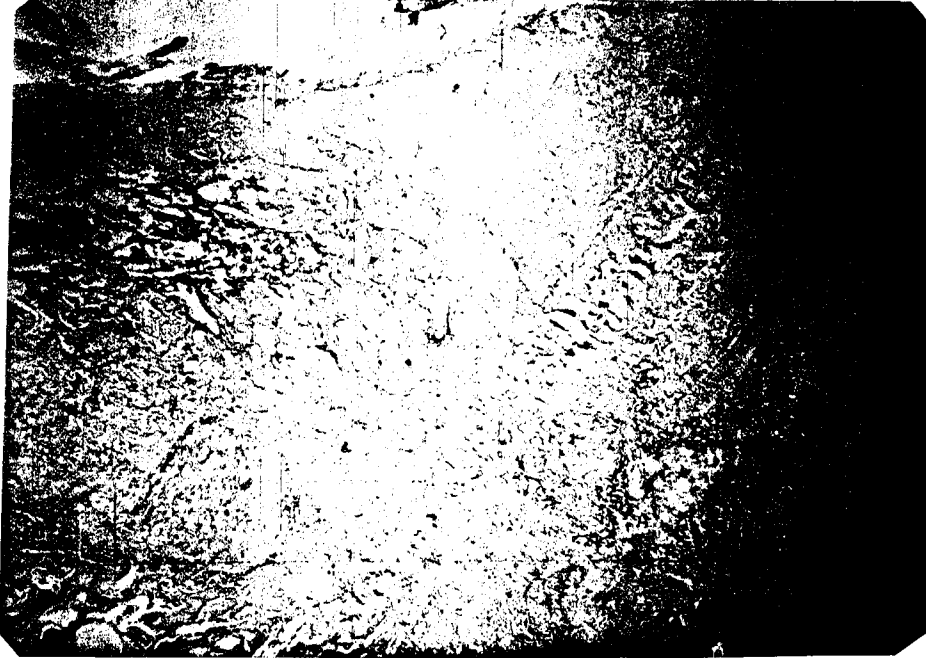
Endosteal kallus oluşmuştu. Osteoplastik hakimiyet ve kollajen demetleri diğer günlere oranla fazla olarak saptandı.

Kemik iliği, normosellüler olarak gözlemlendi.

13 ve 14. günlerde, çevre yumuşak dokuda reaksiyon gözlenmedi. İç ve dış kallus tam olarak oluşmuştu.

Periostun dış tabakasında kırıkta ve fibroz doku reaksiyonu yanında belirgin kemik yapımı saptandı.

Kambiyum tabakasında aşırı osteoblastik aktivite ile lameller kemik ve trabeküler yapı oluşumu gözlemlendi. Trabeküller ortasında çevresi kemikleşen kırıkta ve kapiller proliferasyon saptanan diğer bir bulgu idi (Resim 11).



RESİM 11: Kırıktan sonra ikinci haftada kırık bölgesinde küçük kırıkta ve geniş kemik trabekülleri dikkati çekmekte. (Alcian Blue, x 30).

Kemik, kırıkta ve fibroz doku yanında kollajen demetleri gözlemlendi. Medüller boşluk kapanmıştı. Ortada kırıkta dokusu oluşumu saptandı.

3. Hafta : Kırık uçlarında tam bir kaynama oluşmuştu. Medüller boşluk kapalı, trabeküler yapı ve kompakt kemik oluşumu gözleniyordu. Kemik lamelleri çevresinde demetler halinde kollajen dikkati çeken diğer bir bulgu

idi. Kollajen demetleri ikinci haftaya oranla artmıştı. Periosteal fibroblastik aktivite iyice azalmış, kırık dokusu ve osteoplastik aktivite artmış olarak saptandı.

Kırık bölgesinde, büyüme plağını andıran kırık dokusu ve bunu çevreleyen yeni oluşmuş trabeküler kemik gözlemlendi. Az miktarda osteoplastik aktivite saptandı.

4. Hafta : Periostta küçük kırık adaları çevresinde yeni kemik oluşumu, matür kemik oluşumu, yer yer osteoplastik aktivite gözlemlendi. Kollajen lifleri üçüncü haftaya oranla daha az idi. Kaynama alanında, büyüme plağını andıran düzenli dizilim gösteren kondroblastlar ve çevresinde kemik trabekülleri ve lamelleri saptandı.

Endosteumda, lameller ve trabeküler kemik, osteoplastik ve az oranda osteoplastik aktivite gözlenen diğer bir bulgu idi. Kemik iliği normosellüler olarak saptandı.

5. Hafta : Yeniden şekillenmenin başlamış olduğu, yer yer lameller ve kompakt kemik oluşumu saptandı. Osteoplastik aktivite devam ediyordu, az miktarda osteoplastik aktivite vardı. Olgun kemik dokusu gelişmişti. Kırık dokusu gözlenemedi, çok az kollajen demetler izlendi. Medüller boşluk rekanalize olmaya başlamıştı.

6. haftada, kompakt kemiğin oluştuğu, arada yer yer lameller kemik ve trabeküllerde incelme saptandı. Medüller boşluk tam olarak açılmıştı.

II. GRUP : Bu grubu 30 ppm florlu su alan deney hayvanları oluşturuyordu.

Kırık oluşturulduktan sonra 1 ve 2. günde kontrol grubu ile belirli bir fark gözlenmedi.

3 ve 4. günlerde periosteal ve endosteal osteoblastik aktivitenin ve kollajen demetlerin kontrole oranla az olduğu saptandı.

Periosteal fibroblastik aktivitede artma, kırık dokunun fazlalığı ve çevre dokuda kollajen lifleri gözlemlendi.

Kemik iliği kontrole oranla hücreden fakir idi.

5 ve 6. günlerde, periosteal ve endosteal kemik yapımının devam ettiği, osteoblastların az olduğu, kırık dokunun periost ve kırık boşluğunda geniş bir sahayı kapladığı dikkati çekti.

7 ve 8. günlerde, periostun dış tabakasında bol fibroblast ve kırık dokusu gözlemlendi. Periosteal lamellöz kemik yapımı, dış kaynamanın başladığı saptandı. Endosteal kemik yapımı, periosteal bölgeye oranla daha az idi.

Osteoklastik aktivite yer yer, endosteal bölgede göze çarpıyordu. Kollajen demetleri 5 ve 6. günlere göre artmış, fakat kontrole oranla azalmıştı.

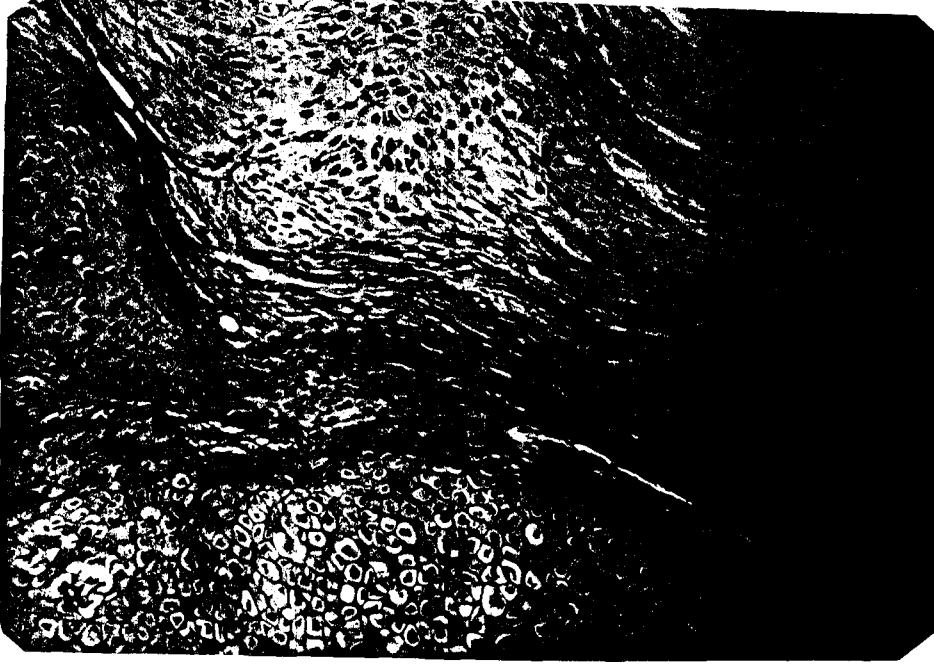
9 ve 10. günlerde, periosteal ve endosteal kallusun teşkil etmeye başladığı, medüller boşluğun kısmen kapandığı, kırık dokunun geniş bir sahayı kapladığı saptandı.

11 ve 12. günlerde, periostun dış tabakasında genç bağ dokusu elemanları ve fibroblastik aktivitenin bulunduğu gözlemlendi. Periosteal geniş kırık dokusu sahaları ve kollajen demetleri dikkati çekiyordu (Resim 12).

Lamellöz kemik teşkili, örgü kemik, yer yer osteoblastik ve osteoklastik aktivite saptanan diğer bulgulardı. Örgü kemik aralarında birbirleri ile kaynaşmış kollajen demetleri gözlemlendi.

Kollajen demetleri 9 ve 10. günlere oranla artmış, kontrole oranla azalmış idi.

Medüller boşluk kapanmaya başlamıştı.



RESİM 12 : Geniş kırıkta doku adaları arasında, fibroblastik hücreler ve kollajen demetleri.  
(H.E., x 75).

13 ve 14. günlerde, kırıkta elemanların fazlalığı, hem kırık boşluğunda, hem de periost da dikkati çekiyordu. İç ve dış kallus tamamen teşkil etmişti. Örgü kemik ve arada kollajen demetleri gözlemlendi. Örgü kemik kırıkta yapı içine ilerleme gösteriyordu.

Endosteal osteoklastik aktivite saptanan bir diğer bulgu idi.

Kollajen demetleri kontrole oranla daha azdı.

3. hafta : Kırıkta dokusu periosteal bölgede ve kırık uçları arasında, 2. haftaya oranla azalmıştı. Periosteumda fibroblastik ve osteoblastik aktivite, trabeküler kemik teşkili, örgü kemik ve kollajen demetleri saptandı.

Yer yer kompakt kemik teşkili başlamıştı. Kollajen demetleri 2. haftaya oranla artmış, fakat kontrole oranla azalmıştı.

Damarlanmanın ve kapiller proliferasyonun daha az olduğu gözlemlendi.

4. Hafta : Medüller boşluk rekanalize olmaya başlamıştı. Örgü kemik, arada kıkırdak doku mevcudiyeti, yer yer osteoblastik aktivite ve kollajen demetleri saptandı. Endosteal osteoklastik aktivite artmış, kemik iliği normosellüler, kollajen demetleri üçüncü haftaya ve kontrole oranla daha az olarak gözlendi. Kompakt kemik oluşmaya başlamıştı.

5 ve 6. haftalarda, periosteal ve endosteal trabeküler ve kompakt kemik oluşumu kemik lamelleri arasında kıkırdak dokunun varlığı, altıncı haftada örgü kemiğin hala mevcudiyeti dikkati çeken bulgulardı. Medüller boşluk rekanalize olmuştu. Kıkırdak doku ve çevresinde çok az kollajen lifleri mevcuttu.

III. GRUP : Bu grubu 100 ppm florlu su içen deney hayvanları oluşturuyordu.

Kırıktan sonra 1 ve 2 ci günlerde kontrol grubundan farklı olarak periostun fibroz tabakasındaki reaksiyon daha belirgindi. Çok az kollajen demetleri vardı.

3 ve 4. günlerde, periostun dış tabakasında fibroblastik aktivitenin fazlalığı, osteoblastik aktivitenin ise kontrole oranla azlığı, örgü kemik teşkili saptandı. Bu hücrelerin çevresinde kontrole oranla daha az kollajen demeti varlığı dikkati çekiyordu (Resim 13)

Kemik iliği normosellülerdi ve damarlanmanın az olduğu gözlendi.

5 ve 6. günlerde, periosteal ve endosteal osteoblastik aktivite kontrol grubuna göre, belirgin azalma gösteriyordu. Fibroblastik ve kıkırdak hücre aktivitesinin fazlalığı, çevre ara maddede kollajen lifler saptandı. Damarlanma ve kapiller proliferasyon kontrole oranla çok azdı.



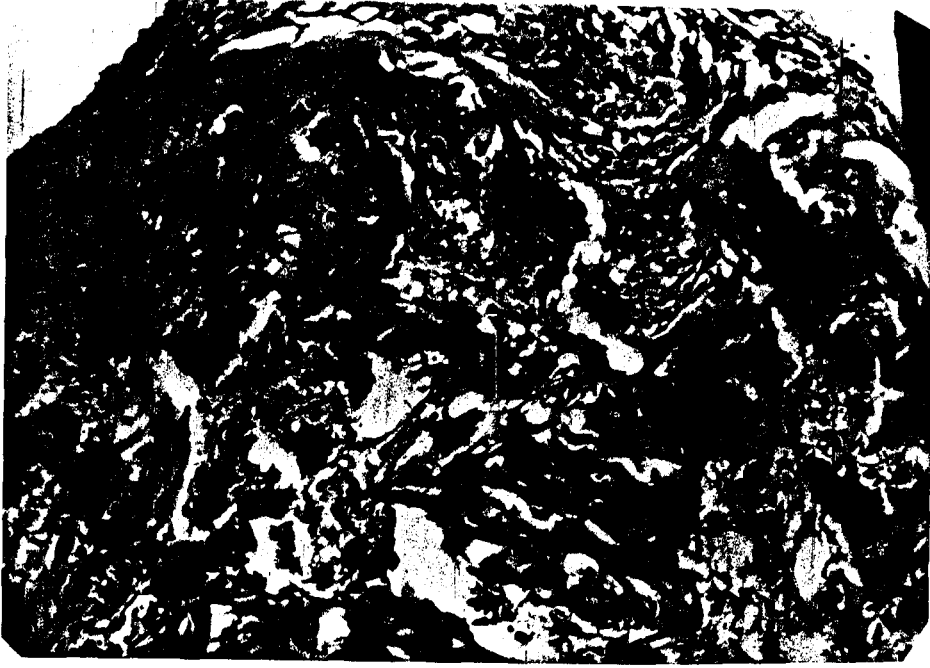


RESİM 13 : Periosteumda, örgü kemik ile devam eden belirgin osteoprogenitör ve fibroblastik hücre proliferasyonu ve kollajen demetleri.  
(Van Gieson, x 200).

7 ve 8. günlerde, periosteal osteoblastik aktivite ve kollajen demetler beş ve altıncı günlere oranla artmış, kontrol grubuna oranla ise azalmıştı. Dış kallusun yavaş yavaş oluşmaya başladığı gözlemlendi.

Periosteal ve endosteal kırık dokusu, hücreler arasında kollajen demetleri saptandı. Kırık dokusu, kontrol ve ikinci gruba oranla çok fazla idi. Endosteal belirgin osteoklastik aktivite saptanan bir diğer bulgu idi (Resim 14).

9 ve 10. günlerde, periosteal ve endosteal osteoblastik aktivite ve kollajen sentezi saptandı. Kırık uçları arasındaki ve periosteumdaki kırık dokusu geniş bir alanı kapsıyordu. Kırık dokusu hücreleri etrafında kollajen demetleri gözlemlendi. Kemik yapımı, kontrol grubuna oranla çok az idi.



RESİM 14 : Belirgin osteoklastik ve osteoblastik aktivite gösteren genç kemik dokusu. (H.E., x 200).

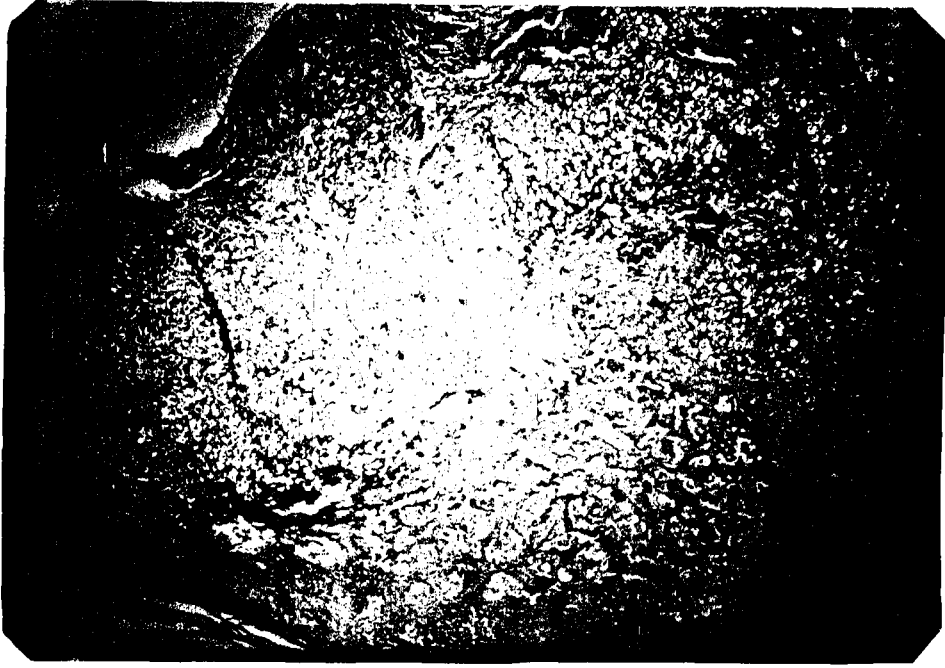
11 ve 12. günlerde, periostun dış tabakasında fibroblastik aktivitenin fazlalığı, yer yer yoğun kollajen lifleri gözlemlendi. Periosteal lameller kemik oluşumu az miktarda saptandı. Örgü kemik mevcudiyeti ve kollajen lifleri gözlenen diğer bir bulgu idi.

Kıkırdak-Kemik oranı, kıkırdak doku lehine idi. Kıkırdak elemanları etrafında yoğun kollajen demetleri dikkati çekiyordu.

Dış kallus oluşmuştu. Medüller kanalın kapanmaya başladığı gözlemlendi. Lameller kemik etrafında, kontrole oranla kollajen liflerin azlığı dikkati çekiyordu.

13. ve 14. günlerde, periosteal fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin fazlalığı, kollajen demetleri, lameller ve örgü kemik varlığı gözlemlendi. Örgü kemik arasında geniş kıkırdak dokusu vardı (Resim 15). Lameller kemik, düzensiz bir dizilim gösteriyordu. Kıkırdak doku elemanları arasında yer yer yoğun kollajen demetleri oluşmuştu. Kollajen demetleri 11 ve 12. güne oranla

fazla, kontrol grubuna oranla ise azalmış olarak gözlemlendi. Kıkırdak dokuda ise, kollajen demetleri kontrol grubuna oranla fazla olarak saptandı.



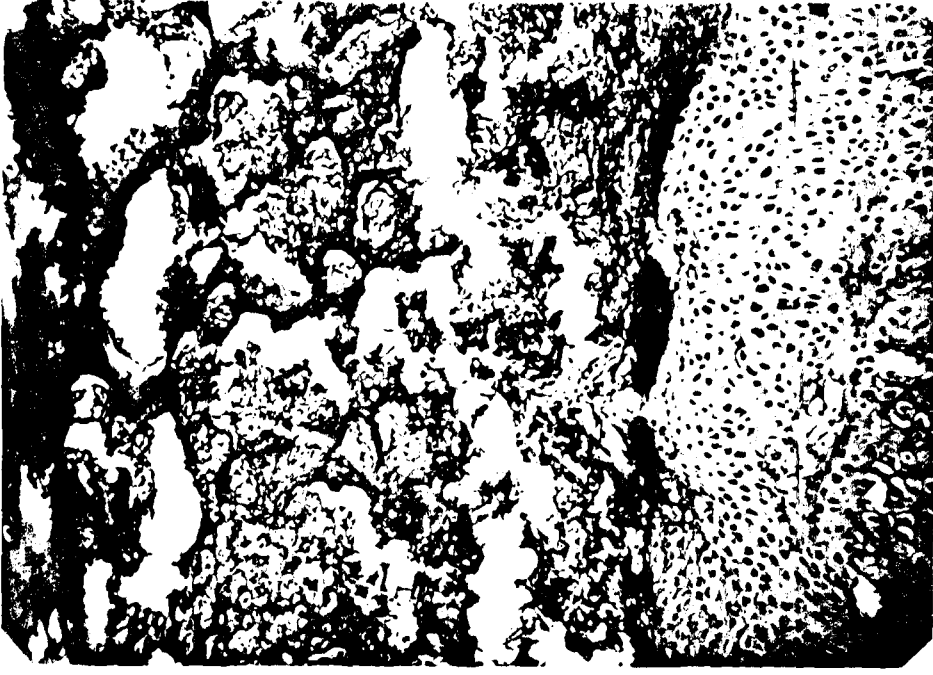
RESİM 15 : Kallusda geniş kıkırdak dokusunun oluşumuna karşın, yeni kemik teşkilinin azlığı. (Alcian Blue, x 30).

3. Hafta : Kondroblastik aktivitenin fazlalığı, kıkırdak hücrelerinde hipertrofik, hücre içinde ve dışında kollajen demetleri dikkati çekiyordu. Fibroblastik aktivite hala belirgindi. Kompakt kemik oluşmaya başlamıştı.

Medüller boşluk kapalıydı. Osteoplastik aktivite, düzensiz kemik lamelleri, örgü kemik ve kemik dokusunda kontrole oranla kollajen lifleri azlığı saptandı.

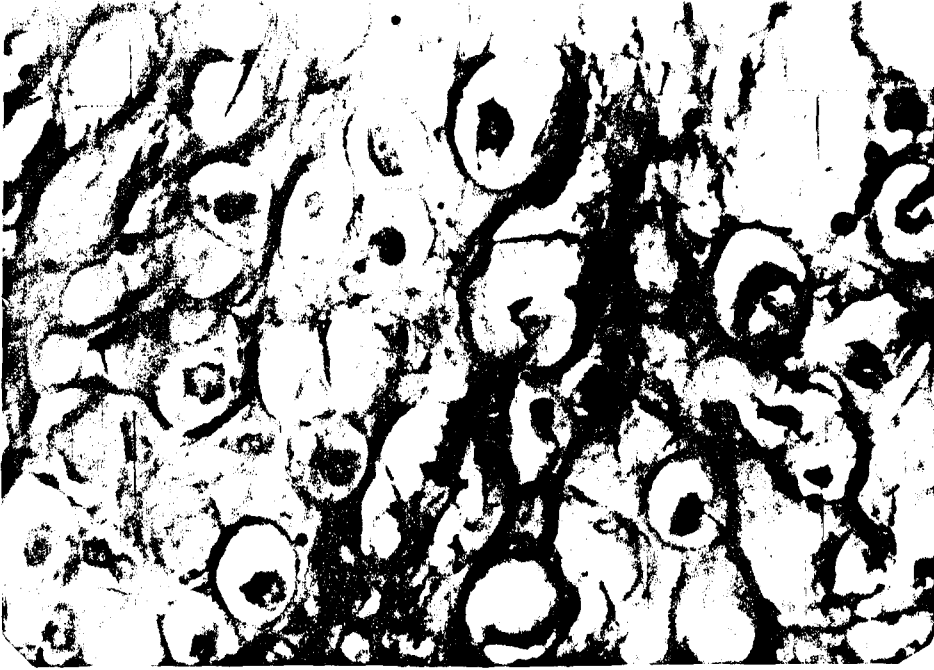
Osteoklastik aktivite bilhassa endosteal bölgede çok belirgindi.

4. Hafta : Kıkırdak elemanların fazlalığı dikkati çeken bir bulguydu. Örgü kemik varlığı, düzensiz kemik lamelleri, trabeküler kemik, kıkırdak ile ilişkili kollajen demetleri gözlemlendi (Resim 16).



*RESİM 16 : Belirgin osteoblastik ve osteoklastik aktivite gösteren yeni kemik dokusu (Örgü kemik) ve bununla devam eden kıkırdak dokusu izlenmekte. (Van Gieson, x 75).*

*Kıkırdak doku, kondroblastlar çevresinde kollajen demetleri saptandı (Resim 17). Kollajen sentezi 3. haftaya oranla belirgin bir azalma gösteriyordu.*



*RESİM 17 : Dördüncü haftada, yüksek florlu grupta kondrositler çevresinde kollajen demetlerin varlığı. (Van Gieson, x 420).*

Endosteal bölgede belirgin osteoklastik aktivite ve medüller kanalın rekanalize olmaya başladığı saptandı.

Kollajen yapımında, üçüncü haftaya oranla belirgin bir azalma mevcuttu.

5. hafta : Yer yer kompakt kemik oluşumunun yanı sıra osteoblastik ve osteoklastik aktivite, kırık dokudan kemik dokuya geçişin gecikmiş olduğu, bol miktarda kırık dokusunun varlığı dikkati çekiyordu (Resim 18).



RESİM 18 : 5. haftada kırık bölgesinde, değişik yaşta kemik ve kırık dokunun oluşturduğu mozaik görünümü. İnce kemik lamelleri ve arada kırık doku adası izlenmekte. (Van Gieson, x 80).

Osteoblastik aktivitenin azaldığı, osteoklastik aktivitenin ise endosteal bölgede daha fazla olmak üzere arttığı gözlemlendi. Kollajen lifleri kontrol grubuna ve dördüncü haftaya oranla azalmıştı.

6. hafta : Medüller boşluk, tamamen rekanalize olmuş olarak saptandı. Kompakt kemik oluşumu, kemik lamelleri arasında yer yer kırık doku varlığı, trabeküllerde kontrol grubuna oranla aşırı bir incelmeye saptandı.

Örgü kemik, belirli sahalarda hala göze çarpıyordu.

*PROTEİN ve HİDROKSİPROLİN DEĞERLERİ :*

*Deney grubumuzu oluşturan hayvanların kırık bölgesinden alınan doku örneklerinde, protein ve hidroksiprolin tayinleri yapıldı. Ayrıca tüm deney süreci için, hidroksiprolin özgül aktivite değerleri hesaplandı. Elde edilen veriler Tablo 4 de gösterilmiştir.*

*Tablo 5 de gösterilen hidroksiprolin özgül aktivite değerlerinin kontrol grubu ile florsu su içen gruplar arasında önemli bir farklılık gösterip göstermediğinin anlaşılması için istatistiksel değerlendirme yapıldı (Tablo 6).*

*Tablo 6 da görüldüğü gibi kontrol grubu ile 30 ppm NaF lu distile su içen (Grup II) ve 100 ppm NaF lu su içen grup (Grup III) arasındaki fark önemli ( $p < 0.05$  ve  $p < 0.01$ ), grup II ile grup III arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p > 0.50$ ).*

TABLO 4 : DOKU ÖRNEKLERİNDEKİ PROTEİN, HİDROKSİPROLİN VE HİDROKSİPROLİN ÖZGÜL AKTİVİTE DEĞERLERİ.

Kırık sonrası gün	GRUP I			GRUP II			GRUP III		
	PROTEİN $\mu$ g/mg	HİDROKSİ PROLİN $\mu$ g/mg	HİDROKSİ PROLİN ÖZGÜL AKTİVİTE	PROTEİN $\mu$ g/mg	HİDROKSİ PROLİN $\mu$ g/mg	HİDROKSİ PROLİN ÖZGÜL AKTİVİTE	PROTEİN $\mu$ g/mg	HİDROKSİ PROLİN $\mu$ g/mg	HİDROKSİ PROLİN ÖZGÜL AKTİVİTE
1	41	306	0.134	33	290	0.133	27	270	0.100
2	41	285	0.144	29	254	0.144	32	278	0.115
3	34	248	0.137	28	256	0.109	34	254	0.134
4	39	212	0.184	37	266	0.139	31	215	0.144
5	36	192	0.187	32	210	0.152	20	207	0.096
6	41	238	0.172	29	225	0.129	28	170	0.164
7	39	176	0.221	30	165	0.222	33	166	0.198
8	40	186	0.215	32	180	0.170	25	175	0.143
9	34	179	0.190	37	185	0.200	29	160	0.181
10	42	203	0.206	26	211	0.123	24	180	0.133
11	39	197	0.198	41	235	0.174	31	185	0.167
12	35	210	0.166	30	215	0.139	27	152	0.177
13	42	212	0.198	30	210	0.143	34	192	0.177
14	44	205	0.214	42	204	0.205	43	208	0.206
21	48	230	0.209	56	254	0.200	40	225	0.178
28	61	325	0.187	48	310	0.155	41	280	0.146
35	49	412	0.118	46	398	0.115	43	380	0.113
42	59	480	0.122	52	457	0.113	49	435	0.113

TABLO 5 : Tüm Gruplardan Alınan Doku Örneklerinde Bulunan Hidroksiprolin Özgül Aktivite Değerleri.

Kırık Sonrası Gün	GRUP I	GRUP II	GRUP III
1	0.134	0.133	0.100
2	0.144	0.144	0.155
3	0.137	0.109	0.134
4	0.184	0.139	0.144
5	0.187	0.152	0.096
6	0.172	0.129	0.164
7	0.221	0.222	0.198
8	0.215	0.170	0.143
9	0.190	0.200	0.181
10	0.206	0.123	0.133
11	0.198	0.174	0.167
12	0.166	0.139	0.177
13	0.198	0.143	0.177
14	0.214	0.205	0.206
21	0.209	0.200	0.178
28	0.187	0.155	0.146
35	0.118	0.115	0.113
42	0.122	0.113	0.113



TABLO 6 : Kırık Bölgesinden Alınan Doku Örneklerindeki Hidroksiprolin özgül aktivite değerlerinin istatistiksel incelenmesi.

Grup	n	$\bar{x}$	S.S.	S.H.	Önemlilik Testi		
I	18	0.178	0.0335	0.0076	$t_{1-2} : 2.14$	$t_{1-3} : 2.56$	$t_{2-3} : 1.15$
II	18	0.154	0.0343	0.0081	SD : 34	SD : 34	SD : 34
III	18	0.149	0.0335	0.0084	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p > 0.50$

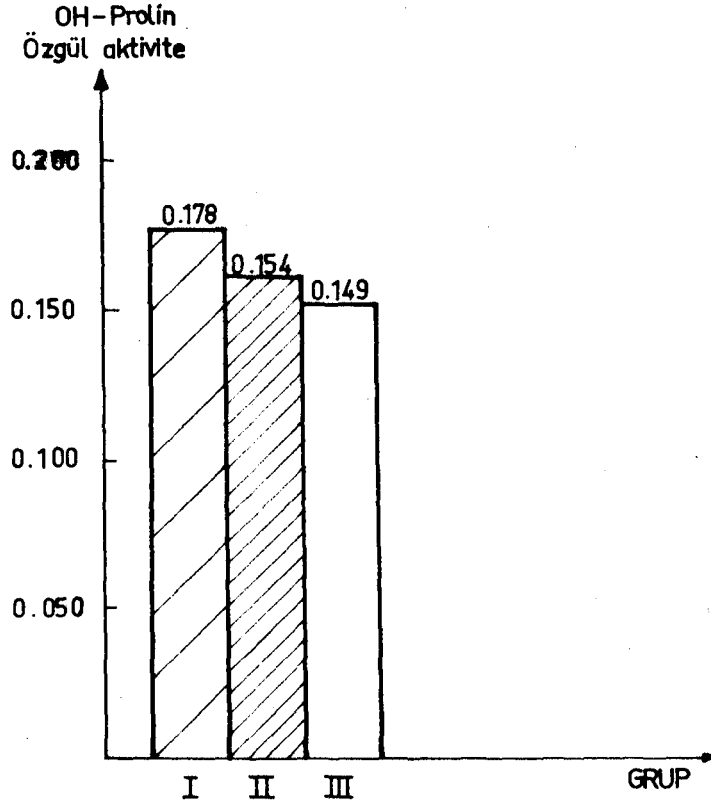
n : Her gruptaki denek sayısı

$\bar{x}$  : Ortalama

S.S: Standart sapma

S.H: Standart hata

SD : Serbestlik derecesi ( $n_1 + n_2 - 2$ )



ŞEKİL - 7. Hidroksiprolin özgül aktivite değerleri.

FLOR DEĞERLERİ :

Her deney grubundan alınan tibialarda yapılan flor tayin değerleri Tablo 8 de gösterildi.

TABLO 8 : Tüm Gruplarda, Tibialarda Bulunan Flor Değerleri.

	GRUP I	GRUP II	GRUP III
	% 0.072 mg	% 0.098 mg	% 0.210 mg
	% 0.078 mg	% 0.110 mg	% 0.175 mg
	% 0.100 mg	% 0.180 mg	% 0.320 mg
	% 0.053 mg	% 0.110 mg	% 0.195 mg
	% 0.048 mg	% 0.126 mg	% 0.295 mg
Ort.	% 0.0702	% 0.1284	% 0.2390

Tablo 8 de gösterilen kemikteki flor değerlerinin kontrol grubu ile florlu su içen gruplar arasında fark gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla ile istatistiksel analiz yapıldı (Tablo 9).

Tablo 9 : Deney Gruplarımızda Kemikte Flor Değerlerinin İstatistiksel İncelenmesi.

Grup No	İçilen Sudaki NaF miktarı	n	$\bar{x}$	S.S.	S.H.	Önemlilik Testi
I	-	5	0.0702	0.02086	0.0093	$t_{1-2} : 3.168$ SD : 8 p < 0.01
II	30 ppm NaF	5	0.1248	0.0324	0.0145	$t_{1-3} : 5.576$ SD : 8 p < 0.0005
III	100 ppm NaF	5	0.2390	0.0644	0.0290	$t_{2-3} : 3.542$ SD : 8 p < 0.005

Tablo 9 da görüldüğü gibi kontrol grubu ile florlu su içen gruplar karşılaştırıldığında, grup I ile grup II arasındaki fark ( $p < 0.01$ ) ve Grup II ile grup III arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ( $p < 0.005$ ), Grup I ile Grup III arasındaki fark ise çok önemli bulunmuştur ( $p < 0.0005$ ).

**MİKRODANSİTOMETRİK İNCELEME :**

Araştırmamızda yer alan deney hayvanlarının kırık tibialarında çekilen filmler Resim 19 da ve ölçülen dansite değerleri Tablo 10 da gösterilmiştir.



**RESİM 19 :** 5. ve 6.haftada kontrol grubu ile aşırı flor alan gruptaki deney hayvanlarının kırık tibialarının filmlerinde, kallus oluşumundaki belirgin fark gözlenmektedir.

Hata oranını hesaplayabilmek için, kırık sonrası çekilen filmlerde alüminyum basamağın 7 mm, bölümüne rastlayan kısımlardaki dansite değerleri saptanmıştır (Tablo 10). Bu dansite değerlerinin ortalaması alınıp, daha önce tesbit edilen dansite değerleri ile arasındaki fark bulundu. Bu fark aynı

anda kırık bölgesinde çekilen filmlerin dansite değerlerine eklendi veya çıkartıldı.

TABLO 10 : Deney Gruplarındaki Sıçanların Tibialarında Kırık İyileşme Süreci İçinde Radyodansitometrede Okunan Değerler.

GÜN	Aliminyum Basamakta Dansite			Tibiada Kırık Bölgesinde Dansite		
	Grup I	Grup II	Grup III	Grup I	Grup II	Grup III
1	0.77	0.78	0.76	0.93	1.03	1.07
4	0.75	0.76	0.77	0.98	1.08	1.10
7	0.82	0.80	0.81	0.99	1.09	1.13
11	0.64	0.63	0.65	0.94	0.87	0.88
14	0.69	0.60	0.72	0.80	0.91	0.94
21	0.67	0.76	0.69	0.77	0.78	0.87
28	0.61	0.61	0.72	0.79	0.84	0.85
35	0.78	0.79	0.79	0.75	0.80	0.84
42	0.65	0.74	0.78	0.72	0.75	0.82
Ortalama	0.71	0.72	0.74	0.85	0.91	0.94

Tablo 10 da da görüldüğü gibi flor alan gruplarda dansite değerlerinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu saptandı.

## T A R T I Ő M A

Fazla miktarda flor alınımı sonucu oluşan kronik flor zehirlenmesi, g¼n¼m¼zde d¼nyanın birçok ¼lkesinde ve memleketimizde ¼nemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Daha ¼nce de belirtildiği gibi flor organizmaya sanayi dumanları ve end¼striyel tozlarla da girebilmekte ve end¼striyel florozise sebep olmaktadır<sup>35,36,65,87</sup>. Hızlı ve d¼zensiz sanayileŐme s¼reçine girmiŐ olan ¼lkemizde birçok sanayi kuruluŐları kentlerin içinde veya çok yakınında bulunmaktadır. Bu nedenle florozis sorunu yalnızca endemik y¼relerde değil, sanayileŐme sonucu yaygın olarak da karşımıza çıkabilecektir. ¼lkemizde bu konuda hen¼z yeterli bir çalışma bulunmamaktadır.

Endemik ve end¼striyel florozisli b¼lgelerde yaşayan insanlar ve deneysel olarak flor zehirlenmesi oluşturulan hayvan ¼zerinde yapılan çalışmalarda, florun ¼ncelikle iskelet ve diŐlere olmak ¼zere çeşitli organlarda toksik etkilere yol açtığı saptanmıştır<sup>8,10,31,35,36,84,87</sup>.

Eskişehir y¼resinde, endemik florozis saptadığımız bir k¼yden seçtiğimiz bir olguda, kronik flor zehirlenmesinin iskelet sisteminde, kemik dokusunda oluşturduğu değişiklikleri g¼zlemek ve bu noktadan hareket ederek deneysel bir çalışmaya girmek için, radyolojik ve histolojik tetkik yapıldı. Bu olguda radyolojik olarak, kemiklerde dansitenin arttığı, kemiğin beyaz tebeşir gibi bir g¼r¼nt¼ verdiği, ligaman yapışma yerleri ve inter-

osseos membranlarda kalsifikasyon oluşumu gözlemlendi (Resim 1) . Histopatolojik olarak iliak kemik biyopsisinde, kemikte lameller dizilim ve matriks dağılımında düzensizlik, haversien sistemde genişleme, osteositlerde piknoz ve lakunalarda genişleme saptandı (Resim 2,3). Bu bulgularımızı literatür verileri ile uyum gösteriyordu<sup>7,35,36,62,83,94,109</sup>.

Bu olguda elde ettiğimiz sonuçların ışığı altında konunun başka yönleri ile derinlemesine araştırılması amacıyla deneysel bir çalışma planlandı. Günümüze kadar florun kollajen sentezine olan etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalar yapılmıştır<sup>8,10,11,25,39,104</sup>. Ancak kırık iyileşmesinde florun kollajen sentezine olan etkileri konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmadı. Bu konuyu ayrıntılarıyla incelemek amacı ile üç gruba ayrılan sıçanlar üzerinde deneysel bir çalışma yapıldı.

Deney gruplarımızı oluşturan sıçanların tibialarında yapılan flor tayininde, grup II ve Grup III de flor seviyesinin kontrol grubuna (Grup I) oranla daha yüksek olduğu saptandı (Tablo 8). Bu fazla flor seviyesinin, kontrol grubu ile florlu gruplar arasında farklılık gösterip göstermediği istatistiksel olarak değerlendirildi. Kontrol grubu ile Grup II arasındaki fark önemli (p 0.01), kontrol grubu ile Grup III arasındaki fark çok önemli (p 0.0005) ve Grup II ile Grup III arasındaki fark ise önemli (p 0.005) bulundu (Tablo 9). Verdiğimiz flor miktarı ve süresi arttıkça, bununla doğru orantılı olarak kemikte flor seviyesinde de bir artma gözlemlendi.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, florun kemikte tutulma oranının yaşa, alındığı miktara ve süreye bağlı olduğu belirtilmektedir<sup>62,84,104</sup>. Çalışmamızda 100 ppm florlu sudan 35 gün süre ile içen deney hayvanlarının tibialarındaki flor seviyesinin, 30 ppm florlu sudan 15 gün süre ile içenlerden daha fazla olması, yukarıdaki literatür verilerini desteklemektedir.

Literatürde, floroziste kemik dansitesinin ölçümü için yeterli bir

çalışmaya rastlanılamadı. Değişik araştırmacılar floroziste rontgen filmlerinde kemik dansitesinin kabaca arttığını belirtmişlerdir<sup>29,31,35,62,83,86,87,94</sup>. Odland ve arkadaşları<sup>109</sup>, bizim kullandığımız step-wedge tekniği ile endemik florozisli bölgelerde yaşayan insanlar üzerinde yaptıkları dansimetrik çalışmalarda, kemik dansitelerinde normale oranla fazla bir fark bulamadılar. Ancak araştırmacılar, 1 ppm gibi düşük florlu su seviyesi içeren bir bölgede çalışmışlardır. Gerçek anlamda iskelet florozisinin oluşabilmesi için en az 4 ppm flor içeren sudan uzun süre içmek gerekmektedir<sup>83,86,94,109</sup>. Baylink ve arkadaşları<sup>8</sup> ise, florozis oluşturulmuş deney hayvanlarında X-ray dansitometresi ile artmış kemik dansitesi saptamışlardır.

Florozisde kemik dansitelerindeki artımı saptamak amacı ile deney gruplarımızda yapılan mikrodansimetrik çalışmalarda, Grup II ve Grup III de deney hayvanlarının tibialarındaki dansite ölçümleri, kontrol grubuna oranla daha yüksek bulundu (Tablo 10). Grup III de dansite artımı, Grup II den fazla idi. Bu bulgular değerlendirildiğinde, verilen florun kemikte dansite artımına neden olduğu, bu artımın verilen flor miktarı ve süresi ile orantılı olduğu saptandı. Bu bulgularımız literatür verileri ile paralellik göstermektedir<sup>8,109</sup>.

Shambaugh ve Petrovic<sup>83</sup>, florozisli deney hayvanlarında kırık sonrası, kırık uçlarındaki osteoporozun daha az olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da florozisli gruplarda kırık sonrası kontrol grubuna oranla daha düşük düzeyde dansite azalması gözlemlendi.

Deney gruplarımızı oluşturan hayvanların tibialarındaki flor seviyeleri ile mikrodansimetrik ölçümler birlikte değerlendirildiğinde, verilen florun kemikte tutulduğu, bu tutulmanın verilen doz ve süre ile orantılı olduğu ve sonuçta kemik dansite artımına yol açtığı saptandı.

Kırık iyileşmesi konusunda klinikte ve deney hayvanları üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmasına karşın, henüz açıklığa kavuşturulamamış birçok sorun vardır. Kırık iyileşmesinde ana olaylardan biri olan kollajen sentezi konusunda önemle durulmuş ve çeşitli otoradyografik, enzimolojik ve elektron mikroskopik çalışmalar yapılmıştır<sup>19,43,46,54,67,82,107</sup>. Bu çalışmalarda, kemikte kollajen sentezinin osteoblast, kondroblast ve fibroblastlar tarafından gerçekleştirildiği, kırık iyileşme sürecinde periosteal ve çevre mezenşimal dokunun önemli bir rol oynadığı, ilk haftada mukopolisakkarit sentezinin fazla olduğu, ikinci haftada kollajen sentezinin artmaya başladığı belirtilmiştir. Kollajen seviyesinin beş ve altıncı haftalarda normale döndüğü saptanmıştır<sup>14,27,40,50,59,68,70,99</sup>.

Kontrol grubumuzda yapılan otoradyografik ve histopatolojik çalışmalarda, kırık iyileşme sürecinde kollajen sentez ve salgılanmasının temel olarak osteoblastlar tarafından, daha az oranda kondroblastlar ve fibroblastlar tarafından yapıldığı gözlemlendi. Otoradyografik çalışmalarımızda, osteoblastların sitoplazma ve çevrelerinde bol otoradyografik taneciklerin, kondroblast ve fibroblastların sitoplazma ve çevrelerinde daha az oranda otoradyografik taneciklerin görülmesi bu bulguları kanıtlamaktadır. Otoradyografik ve histopatolojik bulguların değerlendirilmesinde, kollajen sentez ve salgılanmasının birinci hafta sonuna doğru artmaya başladığı ve üçüncü haftada en yüksek düzeye ulaştığı, daha sonra ise düşmeye başladığı saptandı. Bu bulgular literatür verileri ile uyum göstermektedir<sup>27,50,59,68,70,99</sup>.

Kırık iyileşmesinde kollajen sentezi daha sonraki inorganik dönemin oluşması için gereklidir. Eğer kollajen sentezinde ve salgılanmasında herhangi bir azalma ya da bozukluk olursa, kırık iyileşmesi olayında da bir eksiklik olacaktır. Birçok araştırmacı, kollajen sentezine etkin olan nedenler üzerinde çalışmalar yapmışlardır<sup>14,27,38,42,48,55</sup>.



Bolognani<sup>14</sup>, sıçanlarda deneysel kırık iyileşmesinde kırık kallusun-  
da hekzosamin seviyesinin aminoasetonitril ile beslenenlerde daha az oldu-  
ğunu, hidroksprolin seviyesinin değişmediğini saptamıştır. Duthie<sup>27</sup>, sıçan-  
larda yaptığı deneysel kırık çalışmalarında kırık bölgesine lokal olarak  
hiyaluronidaz ve histamin liberatörleri verildiğinde, kırık iyileşmesinin  
gerilediğini gözlemiştir. Gray ve arkadaşları<sup>42</sup> in vitro farelerin kafata-  
sı kemiklerinde yaptıkları çalışmalarda oksijen tansiyonundaki artışın kol-  
lajen yapım yıkım oranını arttırdığını bulmuşlardır. Pentinen<sup>70</sup>, sıçanlar-  
da kırık iyileşmesini incelemiş ve hiperbarik oksijenin hidroksprolin ve  
hekzosamin seviyelerine fazla bir etkisi olmadığını, asıl etkinin kallusun  
mineralizasyonuna olduğunu belirtmiştir. Golub ve arkadaşları<sup>38</sup>, yavru  
farelerin pariyetal kemiklerinde in vitro beta aminopropionitrilin kemik  
kollajen sentezine etkisini incelemişler ve kollajen yapımının azaldığını,  
rezorbsiyonda ve çözünebilir kollajende artma olduğunu saptamışlardır.

Literatürde florun kemik üzerine etkilerini inceleyen çeşitli çalış-  
malar vardır<sup>5,8,10,31,35,39,77,104</sup>. Ancak, florun kırık iyileşmesinde kol-  
lajen sentezine olan etkileri konusunda herhangi bir araştırmaya rastlana-  
mamıştır.

Histopatolojik ve otoradyografik değerlendirmelerde, florlu su ile  
beslenen sıçanların (Grup II ve Grup III) kırık tibialarında deney süre-  
cinde kontrol grubundan farklı olarak, periostun fibroz tabakasında fibro-  
blastik proliferasyon ve aktivasyonun daha fazla olduğu gözlemlendi. Perios-  
teal bölge ve kırık uçları arasındaki kırık dokusu fazlalığı ile bunların  
sitoplazma ve çevre matrikslerinin kontrol grubuna oranla daha fazla oto-  
radyografik tanecik içerdiği saptandı. Altıncı haftada, florlu gruplarda  
kırık dokunun hala kaybolmadığı, sitoplazma ve çevrelerinde az miktarda  
otoradyografik tanecik içermeleri çok az olsa da halâ sentez ve salgıla-  
ma fonksiyonlarına devam ettiklerini gösteren bir bulgu olarak değerlendirildi-

rildi. Periosteal bölgede osteoblastik aktivite azlığı, kollajen sentez ve salgılanmasının düşük düzeyde olması, otoradyografik tanecik sayısının osteoprogenitör hücreler ve osteoblastların sitoplazma ve çevre matrikslerinde kontrol grubuna oranla daha az olması ile belirlendi.

Endosteal bölgede, osteoprogenitör hücrelerde ve osteoblastların sitoplazma ve çevre matrikslerindeki otoradyografik tanecikler bulunması, bu bölgede kollajen sentez ve salgılanmasını gösteriyordu. Ancak, bu fonksiyonun kontrol grubuna ve periosteal bölgeye oranla daha az olduğu dikkati çekti. Birçok çalışmacı, floroziste endosteal kemik yapımının, periosteal kemik yapımına oranla daha az olduğu konusunda aynı görüştedirler<sup>8,31,35,91,102,109</sup>. Çalışmamızda florlu gruplardaki otoradyografik ve histopatolojik değerlendirmelerde de aynı sonuçlar elde edildi.

Literatürde, florun kırık iyileşmesinde kollajen sentezine olan etkileri konusunda herhangi bir değerlendirmeye rastlanamamıştır. Ancak, florun kemik üzerine etkisini araştıran çeşitli çalışmalar vardır.

Golub ve arkadaşları<sup>39</sup>, kemik doku kültüründe florun yüksek dozlarda kollajen sentezini azalttığını saptamışlardır. Belanger ve arkadaşları<sup>9,10,11</sup>, domuz ve sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda, florun yüksek dozlarda dişte dentin dokusunun oluşumunu bozduğunu, kollajen lif diziliminin düzensiz geliştiğini ve ameloblastlarda atrofiye neden olduğunu bildirmişlerdir. Proffit ve Ackerman<sup>74</sup>, sıçan kemik kültüründe, DNA ve protein yapımında florun etkisini incelemişler, kültür ortamında 20 ppm ve üzerindeki florun mitotik aktivitede azalmaya ve kırık hücrelerinde büyüme bozukluğuna neden olduğunu saptamışlardır. Goldhaber<sup>25</sup>, kemik doku kültüründe florun etkilerini incelemiş ve florun 1 ppm nin yapımı arttırdığını, 3.8 ppm in yapım ve yıkımı arttırdığını, 9.5 ppm in ise yapımı azalttığını gözlemiştir. Peck ve arkadaşları<sup>109</sup>, 1 ay ve 10 ay süre ile 10 ppm florlu su

ile beslenen farelerde, kafatası kemiklerinde kollajen sentezinde değişiklik olmadığını, 1 ay süre ile 50 ppm florlu su ile beslenen farelerde ise kollajen sentezinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Nichols ve Flanagan<sup>65</sup>, 10 ay süre ile 10 ppm yada 2-4 hafta süre ile 50 ppm florsu su içen sıçanların kafatası kemiklerinde yeni kollajen sentezinin azaldığını H<sup>3</sup>-Prolin seviyesi ile saptamışlardır. Aynı çalışmacılar, insanda rezorbtif kemik hastalıklarında C<sup>14</sup>-Prolin çalışmalarında, 1 yıl süre ile günde 15-30 mg flor verildiğinde, kollajen sentezinin azaldığını saptamışlardır.

Çalışmamızda, kırık iyileşmesi sürecinde florun kollajen sentezi üzerindeki saptadığımız etkileri, literatürde kemik doku kültürlerinde uygulanan araştırmaların verileri ile uyum göstermektedir. Literatür verilerinde, az dozlarda ve kısa sürede verilen florun kollajen sentezini etkilemediği belirtilmektedir<sup>5,25,39,53,65,74,109</sup>. Ancak, çalışmamızda kısa süre içinde az dozda flor verdiğimiz grupta da kollajen sentezinde bir baskılanma görüldü. Bizim bulgularımız ile bu literatür verileri arasındaki bu uyumsuzluk, kırık iyileşmesinin apayrı bir olay olarak yorumlanmasıyla açıklanabilir.

Histopatolojik değerlendirmelerde, florlu gruplarda kemik iliğinin kontrol grubuna oranla hücreden fakir olduğu gözlemlendi. Literatür verilerinde bu konuda ayrıntılı bir çalışmaya rastlanılmadı. Epker<sup>31</sup>, Singh ve arkadaşları<sup>87</sup>, florozisde görülen aneminin kemik iliğindeki değişiklikler nedeni ile oluştuğunu belirtmişlerdir. Shupe<sup>84</sup>, hayvanlarda deneysel florozisde kemik iliğinin fibrotik olduğunu saptamıştır. Histopatolojik olarak saptadığımız bulgularımız, bu çalışmacıların verileri ile paralellik göstermektedir.

Kırık iyileşmesi konusunda yapılan çalışmalarda, iyileşmenin ilk dönemlerinde örgü kemik oluştuğu ve daha sonra bunun yerini yavaş yavaş normal kemik dokusunun aldığı tesbit edilmiştir<sup>18,22,23,46,80,99</sup>. Çalışmamızda,

florlu gruplarda örgü kemiğin altıncı hafta sonunda halâ görülmesine karşın, kontrol grubunda üçüncü haftada bütünüyle kaybolduğu ve yerini normal kemik dokusunun aldığı saptandı. Literatürde, florozisde geniş örgü kemik oluştuğu, bunun özellikle metaplastik kemik formasyonu olan sahalarda gözlemlendiği bildirilmiştir<sup>9, 84, 87, 89, 102</sup>. Yukarıdaki literatür verileri ile bu bulgularımız desteklenmektedir.

Florozisli insanlarda ve deneysel florozis oluşturulmuş hayvanlarda histopatolojik olarak düzensiz lameller dizilim, lameller kemik aralarında kırık dokular, trabeküllerde aşırı incelme gözlenen bulgulardır<sup>7, 84, 86, 87, 102</sup>. Bazı araştırmacılar, florozisdeki histolojik görünümü osteomalaziye benzetirler<sup>7, 16, 31, 84</sup>. Histopatolojik çalışmamızda, literatür verilerinde belirtildiği gibi, florlu grupların tibialarında trabeküllerde aşırı incelme, düzensiz lameller dizilim ve kemik yapımı, kemik yapıları arasında kırık dokular, mozaik görünümü saptandı.

Otoradyografik ve histopatolojik bulguların tümünün birlikte değerlendirilmesinde, florozis oluşturulmuş deney hayvanlarında osteoblastik aktivitenin ve kollajen sentezinin azaldığı, fibroblastik ve kondroblastik aktivitenin arttığı ve buna paralel olarak kemik-kırık dokular oranının kırık dokular lehine olduğu, florozisde kırık iyileşmesinde kollajen yapımının baskılandığı saptandı. Bu baskılanmaya ek olarak kemik yapımında ve kırık iyileşmesinde bir gecikmeye neden olduğu gözlemlendi. Gerçekten de, mikrodansitometrik değerlendirmeler sırasında çekilen filmlerde, altıncı hafta sonunda florlu gruplarda kırık uçlarının hala kaynamaması ve kırık iyileşmesinin gecikmesi belirgin olarak dikkati çekiyordu (Resim 19).

Çalışmamızda, kırık iyileşmesinde florun kollajen sentezine etkisi otoradyografik ve histopatolojik değerlendirmenin yanı sıra kimyasal olarak da araştırıldı.

Bilindiği gibi hidroksiprolin kollajene özgü bir proteindir. Tıbbi kaynakların incelenmesinde, Repo ve Mitchel<sup>79</sup>, tavşan eklem kıkırdağında, Firschein ve Urist<sup>34</sup>, sığınlarda kemik implantında, Sakamoto ve arkadaşları<sup>82</sup> embriyonik civciv kemik kültüründe kollajen sentezini hidroksiprolin seviyesi ölçümleri ile yapmışlardır. Çalışmamızda doku örneklerinde, altı hafta süre ile protein ve hidroksiprolin seviyelerinin ölçümleri yapıldı (Tablo 4). Hidroksiprolin seviyelerinin, yaş dokunun taşıdığı protein miktarına oranlanması hidroksiprolin özgül aktivite değerlerini verir. Bu değerler, dolaylı olarak o dokudaki kollajen seviyesini gösterir. Bu yöntemle saptanan hidroksiprolin özgül aktivite değerleri incelendiğinde, kontrol grubu ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ( $p < 0.05$ ), kontrol grubu ile Grup III arasındaki fark önemli ( $p < 0.01$ ) ve Grup II ile Grup III arasındaki fark ise önemsiz bulundu ( $p > 0.50$ ) (Tablo 6).

Yapılan çalışmalarda, normal kırık iyileşmesinde hidroksiprolin seviyesinin birinci hafta sonunda yükselmeye başladığı, üçüncü haftada en yüksek düzeye ulaştığı ve sonra giderek azaldığı ve normal düzeye döndüğü bildirilmiştir<sup>14,28,50,58,70,99</sup>. Kontrol grubumuzda elde ettiğimiz bulgular bu verilerle bir uyum içindedir. Flor alan gruplarda ise, deney sürecinde verilen flor dozu ve süresi ile ilişkili olarak azaldığı gözlemlendi.

Golub ve arkadaşları<sup>39</sup>, kemik doku kültüründe kollajen sentezini  $H^3$ -Prolin ile incelemişler ve kültür ortamına düşük dozlarda flor ilavesinde kollajen sentezinde herhangi bir değişiklik olmadığını, yüksek dozlarda ise  $H^3$ -Prolin ve  $H^3$ -Hidroksiprolin oranının azaldığını belirtmişlerdir. Anasuya<sup>3</sup>, florozisli bölgelerde yaşayan insanlarda idrarda hidroksiprolin peptidlerini ölçmüş ve yeni sentez edilen kollajeni dialize edilemeyen hidroksiprolinin, katabolizmayı ise dialize edebilen hidroksiprolin peptidlerin yansıttığını belirtmiştir. Araştırmacı bu olgularda, dialize edilemeyen

hidroksiprolin peptidlerini düşük bulmuş, bunun ya yeni sentez edilen kollajenin az olmasından ya da matriks yapımında fazla kullanılmasından olduğunu bildirmiştir. Reddy ve arkadaşları<sup>109</sup> ise, tavşanda deneysel florozis üzerinde çalışmalarda florun kollajen sentezine etkisi olmadığını savunmuşlardır.

Çalışmamızda saptanan bulgular Golub ve arkadaşları<sup>39</sup>'nın, Nichols ve Flanagan<sup>65</sup>'in ve Pack ve arkadaşları<sup>109</sup>'nın bulguları ile desteklenmektedir. Florlu gruplarda kırık iyileşme sürecinde hidroksiprolin özgül aktivite değerleri ile saptanılan kollajen sentezinin azalması, otoradyografik ve histopatolojik bulgularla da desteklenmektedir.

Çalışmamızda kırık iyileşme sürecinde rezorbsiyonun endosteal bölgede daha fazla arttığı saptandı. Literatür verilerinde, florun belirli dozlarda rezorbsiyonu artırdığı, belirli dozlarda ise azalttığı yayımlanmıştır<sup>7,8,31,39,61,78,97,102</sup>.

Golub ve arkadaşları<sup>39</sup>, yüksek doz florun kemik doku kültüründe rezorbsiyonu arttırdığını saptadılar. Çalışmacılar florun direkt olarak kemik rezorbsiyonuna neden olmadığını, sekonder hiperparatiroidizme yol açarak rezorbsiyonu artırdığını ileri sürdüler. Shupe<sup>84</sup>, Burkhart<sup>16</sup>, Belanger ve arkadaşları<sup>9,11</sup> deneysel flor zehirlenmesi oluşturulmuş hayvanlarda florun indirekt yoldan rezorbsiyonu etkilediği fikrini savunmuşlardır. Burkhart<sup>16</sup>, maymunlarda flor zehirlenmesinde lamina dura kaybı gözlemiştir. Baylink ve arkadaşları<sup>8</sup>, florozis oluşturulmuş sığırlarda rezorbsiyonun artmasının, belki de florun kemikte adenil siklaz aktivitesini artırması ve bunu takiben siklik AMP konsantrasyonunun yükselmesi sonucu olduğu görüşünü ileri sürdüler. Bilindiği gibi siklik AMP, parathormonun kemik üzerine etkisinde mediatör rol oynamaktadır. Sidhu ve arkadaşları<sup>85</sup>, endemik florozisli 2 olgunun otopsisinde paratiroid hiperplazisi gözlemişlerdir. Faccini ve Coe<sup>85</sup>,

kuzularda florozisde immünoassay yöntem ile dolaşan paratiroid hormonun fazla olduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda, florlu gruplarda kontrol grubuna oranla gözlediğimiz rezorbsiyon artışının, literatür verilerinde savunulduğu gibi florun direkt etkisine bağlı olarak değil, indirekt yoldan parathormon seviyesini etkilemesi sonucu olduğu varsayımına katılıyoruz.

Literatür verilerinde, florozisde orta derecede bir anjiyopati oluştuğu, damar permeabilitesinin ve tonusunun azaldığı<sup>7</sup>, glikolizisin baskılandığı ve fosfataz aktivitesinin azaldığı<sup>103</sup> ileri sürülmüştür. Deney sürecinde, florlu gruplarda kırık dokusunun fazlalığı ve altıncı haftada bile bu dokunun halâ varolmasını bu görüşlerle açıklayabiliriz. Bilindiği gibi kırık iyileşmesinde damarlanmanın ve oksijen basıncının azalması, kırık dokusunun fazla olmasına neden olmaktadır<sup>6,30,46,58,99</sup>. Yetersiz oksijen basıncı, enerji metabolizmasındaki bozukluk ve fosfataz aktivitesinin baskılanması encondral ossifikasyonu geciktirir. Deneylerimizde florlu gruplarda saptadığımız kırık dokusunun kontrol grubuna oranla fazla olması ve altıncı hafta sonunda bile halâ kırık dokusunun varlığı, florlu gruplarda encondral ossifikasyonda bir gecikmeyi göstermektedir. Belki de bu gecikme, literatür bulgularında saptanan anjiyopati, glikolizis ve fosfataz aktivitesinin baskılanmasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak, tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, florun kırık kemik iyileşmesinde osteoblastların kollajen sentez ve salgılanma fonksiyonunu baskıladığı, kırık doku artımına neden olduğu, kırık hücrelerinin daha fazla kollajen sentez ve salgılanmasına yol açtığı, encondral kemikleşmeyi geciktirdiği ve osteoklastik rezorbsiyonu artırdığı saptandı. Bu nedenlerle floroziste kırık iyileşmesi oldukça önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

## S O N U Ç

Kırık iyileşmesinde, florun kollajen sentezine etkisini incelemeyi amaçlayan çalışmamızdan şu sonuçlar elde edilmiştir.

1. Trityumlu prolin ile yapılan otoradyografik çalışmada, kemikte kollajen sentezi ve salgılanmasının osteoblastlar tarafından yapıldığı, kondroblast ve fibroblastların da azda olsa kollajen sentezine katkıda buldukları,
2. Kollajen sentezinin, periosteal bölgede endosteal bölgeye oranla daha yoğun olduğu,
3. Kırık iyileşmesi tamamlandıkça, hücrelerin kollajen sentez ve salgılama görevlerinin azaldığı,
4. Florozis oluşturulan deney hayvanlarında osteoblastların kontrol grubuna oranla daha az kollajen sentez edip salgıladıkları,
5. Florlu gruplarda, kırık dokusunun daha geniş bir alanı kapsadığı, kondroblastların kontrol grubuna oranla daha fazla kollajen sentez edip salgıladıkları,
6. Kırık doku - kemik doku oranının florlu gruplarda, kırık dokusu lehine olduğu,
7. Kırık dokunun kemikleşmesinin florozisli gruplarda geciktiği,



8. Kemik rezorbsiyonunun florozis oluşturulmuş hayvanlarda kontrol grubuna oranla endosteal bölgede daha fazla olmak üzere ileri derecede artmış olduğu,

9. Florotik hayvanlarda kemik dansitesinin artmış olduğu saptandı.

Saptanan bu bulgulara göre, florozisde kırık iyileşmesinde bir gecikme olmaktadır. Memleketimizde florozis sorunu üzerine yeteri kadar eğilinmemiştir. Bu nedenle yurdumuzda geniş çapta bir araştırma yapılması, florozisli bölgelerin tesbit edilmesi, bu bölgelerden gelecek olan kırıklı hastalarda tesbit süresinin uzatılması ve iyileşme süresinin üzerinde özenle durularak, uygun önlemlerin alınması gerektiği sonucuna varılmıştır.

## Ö Z E T

Florun kollajen sentezi üzerine etkileri araştırılmış olmakla beraber, kırık iyileşmesi sürecinde kollajen sentezine olan etkileri yönünden herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Kırık iyileşmesinde kollajen sentezine florun etkileri konulu çalışmamızda, 108 sıçan üç gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu idi ve çift distile florsuz su ile, Grup II 15 gün süre ile 30 ppm florlu su ile ve Grup III 35 gün süre ile 100 ppm florlu su ile beslendi. Kırık oluşturulmadan önce tüm hayvanlara beher gramları başına 0.5 mikrocuri Tritiyumla işaretli Prolin periton içi yolla verildi. Tüm gruplardaki hayvanların sağ arka bacak tibiaları, parmakla zorlama yöntemi ile kırılarak, birinci günden ondördüncü güne kadar her gün ve 3, 4, 5, ve 6. haftalarda ikişer hayvan olmak üzere toplam 108 hayvan öldürüldü. Kırık bölgesinden yapılan kemik biyopsilerinde protein ve hidroksprolin tayinleri yapıldı. Deney hayvanlarının tibialarında flor seviyesi ölçümleri yapıldı. Ayrıca, kırık tibialar otoradyografik, histopatolojik ve mikrodansitometrik yöntemle değerlendirildi.

Bu çalışmalar sonucu, kırık iyileşmesinde florun osteoblastların kollajen sentez ve salgılama fonksiyonunu baskıladığı, kırık dokü aktivitesini artırdığı, encondral ossifikasyonu geciktirdiği ve endosteal bölgede fazla olmak üzere rezorbsiyonu artırdığı saptandı.

Florun kırık iyileşmesini kollajen sentezini baskılıyarak geciktirdiği saptanan bu çalışmadan sonra, florozisli yörelerden gelecek kırıklı hastaların tedavileri sırasında, üzerlerinde daha özenle durulması sonucuna varıldı.

K A Y N A K L A R

1. Adams, J.C. : *Outlines of Fractures*. 4th Edition. Edinburg and London, E.S. Livingstone, 1965.
2. Altner, P.C. : *The Callus Problem (Gerhard Küntscher'den çeviri)*. St. Louis, Warren H. Green Inch., 1974.
3. Anasuya, A., Narasinga, B.S. : *Hydroxyproline peptides of Urine in Fluorosis*. *Clinica Chimica Acta*, 56: 121-123, 1974.
4. Arey, L.B. : *Human Histology*. Fourth Edition, 96-97, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1974.
5. Armstrong, W.D., Blomquist, C.H., Singer, L., Pollock, M.E., Mc Lean, L.C. : *Sodium Fluoride and Cell Growth*. *Br. Med. J.* 486-488, Feb. 1965.
6. Basset, L.A. : *Current Concept of Bone Formation*. *J. Bone Joint Surg.*, 44-A: 1217-1240, 1962.
7. Baylink, D., Bernstein, D.S. : *The Effect of Fluoride Therapy on Metabolic Bone Disease*. *Clin. Orthop.* 55: 51-85, 1967.
8. Baylink, D., Wergedal, J., Stauffer, M., Rich, C. : *Effect of Fluoride on Bone Formation, Mineralization and Resorption in the Rat*. *Fluoride in Medicine*, 37-69, Hans-Huber Publ., Bern-Stuttgart-Vienna, 1970.
9. Belanger, L.F., Lotz, W.E., Visek, W.J., Comar, C.L. : *Autoradiographic Visualization with Ca-45 of Normal Growth of the Incisor of Pigs and the Effect of Fluorine Feeding*. *Anat. Rec.* 119: 53-70, 1954.
10. Belanger, L.F., Visek, W.J., Lotz, W.E., Comar, C.L. : *The Effect of Fluoride Feeding on the Organic Matrix of Bones and Teeth of Pigs as Observed by Autoradiography after in vitro uptake of Ca-45 and S-35*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3(4): 559-569, 1957.
11. Belanger, L.F., Visek, W.J., Lotz, W.E., Comar, C.L. : *The Effect of Fluoride Ingestion on the Organic Matrix of the Teeth of Growing Pigs*. *J. Dent.Res.*, 37(2): 264-275, 1958.
12. Bergman, I., Loxley, R. : *Two Improved and Simplified Method for Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline*. *Anal. Chem.*, 35: 1961, 1963.

13. Bloom, W., Fawcett, D.W. : *A Textbook of Histology*. 8th Edition. 176-178, Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1976.
14. Bolognani, L. : *Hexosamine and Hydroxyproline Content of Fracture Callus in Normal and Aminoacetonitrile Treated Rats*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 108: 70-71, 1961.
15. Briggs, G.M., Phillips, P.H. : *Development of Fluorine Toxicosis in the Rabbit*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80: 30-33, 1952.
16. Burkhart, J.M., Jowsey, J. : *Effect of Variations in Calcium Intake on the Skeleton of Fluoride-Fed Kitten*. *J. Lab. Clin. Med.* 72(6): 433-449, 1968.
17. Burwell, R.G. : *The Fate of Bone Grafts*. In *Recent Advances in Orthopaedics*. Edited by. A.G. Apley, 115-207. London. J. and A. Churchill Ltd. 1969.
18. Cameron, D.A. : *Fine Structure of Bone and Calcified Cartilage*. *Clin. Orthop.* 26: 199-227, 1963.
19. Carnerio, J., Leblond, C.P. : *Role of Osteoblast and Odontoblast in Secreting the Collagen of Bone and Dentin. As Shown by Radioautography in Mice Given Tritium-Labelled Glycine*. *Exp. Cell Res.* 18: 291-300, 1959.
20. Chapman, J.A. : *Fibroblasts and Collagen*. *Brit. Med. Bull.* 18(3): 233-237, 1962.
21. Clark, J.M. (Editor) : *Modern Trends in Orthopaedic, 4. Science of Fracture*. p. 37, London, Butterworth, 1964.
22. Clyde, B.K., Wray, J.B. : *Cellular Proliferation in the Formation of Fractures in the Rat Tibia*. *Clin. Orthop.* 91: 197, 1973.
23. Cohen, J., Lacroix, P. : *Bone and Cartilage Formation by Periosteum*. *J. Bone Joint Surg.* 37-A: 717-730, 1955.
24. Collins, H.D. : *Pathology of Bone*. Prepared for Publication by O.G. Dodge. 42-61. London, Butterworths, 1966.
25. David, L. : *Liquid Emulsion Autoradiography with Tritium*. *Lab. Invest.* 8(1): 131-138, 1958.
26. Diem, K. (Editor) : *Scientific Tables, Documenta Geigy*. Sixth Edition, 252, J.R.Giegy, S.A.Basle, Switzerland, 1962.
27. Duthie, R.D. : *A Histochemical Study of the Repair of Experimental Fractures*. *J. Bone Joint Surg.* 39-A: 1431, 1957.
28. Eastoe, J.E. : *The Organic Matrix of Bone*. *Biochem. and Phys. of Bone*. 81, Edited by G.H. Bourne. New York, Academic Press Inc. 1971.
29. Edeiken, J., Hodes, P.J. : *Roentgen Diagnosis of Diseases of Bone*. Vol 2, 1155-1156, Second Edition, The Williams and Wilkins Comp. Baltimore, 1973.

30. Ege, R. : Ortopedi (İlkeler ve Uygulamaları) (Dr. Samuel Turek'ten Çeviri). Cilt I, 34-39, 100-101, 1980.
31. Epker, N.B. : A Quantitative Microscopic Study of Bone - Remodelling and Balance in a Human Skeletal Fluorosis. Clin. Orthop. 55: 87-93, 1967.
32. Evans, G., Wood, J.L. : Mechanical Properties and Density of Bone in a Case of Severe Endemic Fluorosis. Acta Orthop. Scand. 47: 489-495, 1976.
33. Fessler, L.I., Burgeson, R.E., Morris, N.P., Fessler, J.H. : Collagen Synthesis : A Disulfide-Linked Collagen Precursor in Chick Bone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70(10): 2993-2996, 1973.
34. Firshein, H.E., Urist, M.R. : Enzyme Induction, Accumulation of Collagen and Calcification in Implants of Bone Matrix. Clin. Orthop. 84: 263-275, 1972.
35. Franke, J., Horn, V. : Scanning Electron Microscopic Studies in Human Industrial Fluorosis. Fluoride, 9(3): 127-137, 1976.
36. Franke, J., Runge, H., Fengler, F. : Endemic and Industrial Fluorosis. Symposium CEMO "Fluoride and Bone", 129-143, Oct. 1977.
37. Goldhaber, P. : The Inhibition of Bone Resorption in Tissue Culture by Non-toxic Concentration of Sodium Fluoride. Isr. J. Med. Sci. 3(5): 617-626, 1967.
38. Golub, L., Stern, B., Glimcher, M., Goldhaber, P. : The Inhibition of the Maturation of Newly Synthesis Bone Collagen by Beta Aminopropionitril in Tissue Culture. Proc. Soc. Biol. Med. 129: 465, 1968.
39. Golub, L., Glimcher, M.J., Goldhaber, P. : The Effect of Sodium Fluoride on the Rates of Synthesis and Degradation of Bone Collagen in Tissue Culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129: 973-977, 1968.
40. Göthlin, G., Ericsson, J.L.E. : On the Histogenesis of the Cells in Fracture Callus. Virchows Arch. Abt. B. Zell Path. 12: 318-329, 1973.
41. Granth, R.A., Horne, R.W. : New Model for Tropocollagen Macromolecule and its Mode of Agregation. Nature, 207: 822-826, 1965.
42. Gray, D.H., Katz, J.M., Speak, K.S. : The Effect of Varying Oxygen Tensions on Hydroxyproline Synthesis in Mouse Calvaria in vitro. Clin. Orthop. 146: 276-281, 1980.
43. Gross, J. : Collagen. Sci. Amer., 204- 121, 1967.
44. Gülesen, Ö. : Halk Sağlığı Kürsüsü Eğitim Merkezine Bağlı Beş Sağlık Ocağı Köy İçme Sularında Flor Miktarının Saptanması. Diyarbakır Tıp Fakültesi Dergisi, 5(3-4): 473-479, 1976.
45. Hall, B.K. : Histogenesis and Morphogenesis of Bone. Clin. Orthop. 74: 244-269, 1971.

46. Ham, A.W., Harris, W.R. : Repair and Transplantation of Bone. *Biochem. and Phys. of Bone*. Vol 3. Development and Growth. Second Edition. Edited by G.H.Bourne. 358-401, New York, Academic Press, 1971.
47. Hegsted, D.M. : Osteoporosis and Fluoride Deficiency. *Post. Grand. Med.* 41-A: 49-53, 1967.
48. Heikkinen, E., Viersari, T., Pentinen, R. : Effect of Previous Exercises on Fracture Healing. A Biochemical Study with Mice. *Acta Orthop. Scand.* 45(4): 481, 1974.
49. Herring, G.M. : The Chemical Structure of Tendon, Cartilage, Dentin and Bone Matrix. *Clin. Orthop.* 60: 261, 1968.
50. Hugh, C.B. : Resume of Fracture Healing. *Vet. Clin. North Amer.* 5(2): 147-156, 1975.
51. Indian Council of Medical Research : Microestimation of Fluoride. *Special Report Series*. No 50, New Delhi, 1967.
52. Iowler, L.J., Dailey, A.J. : Current Concepts of the Crosslinking in Bone Collagen. *Clin. Orthop.* 85: 193, 1972.
53. Irving, J.T. : Connective Tissue Response to Fluorosed Bone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121: 1031-1033, 1966.
54. Jackson, D.S. : Biosynthesis of Collagen Fibres. *J. Bone Joint Surg.* 52-B: 181, 1970.
55. Jackson, S.H., Heiningger, J.A. : Proline Recycling During Collagen Metabolism as Determined by Concurrent  $O_2^{18}$  and  $H^3$  Labelling. *Biochem. Biophys. Acta*, 381: 359-367, 1973.
56. Jofte, D.L. : Liquid Emulsion Autoradiography with Tritium. *Lab. Invest.* 8(1): 131-138, 1959.
57. Kernek, C.B., Wray, J.B. : Cellular Proliferation in the Formation of Fracture Callus in the Rat Tibia. *Clin. Orthop.* 91: 197-209, 1973.
58. Ketenjian, A.Y., Arsenis, C. : Morphological and Biochemical Studies During Differentiation and Calcification of Fracture Callus Cartilage. *Clin. Orthop.* 107: 266, 1975.
59. Kuhlmann, R.E., Bakowski, M.J. : The Biochemical Activity of Fracture Callus in Relation to Bone Production. *Clin. Orthop.* 107: 258-265, 1975.
60. Lane, J.M., Prockop, D.J., Rosenbloom, J. : Biosynthesis of Collagen Hydroxyproline in Bone and Cartilage in Vitro. *J. Bone Joint Surg.* 53-A: 798, 1971.
61. Lindeman, G. : Experimental Chronic Fluorosis in Young Rats Receiving Supplementary Doses of Vitamin D. *Acta Odont. Scand.* 23: 575-592, 1965.
62. Marier, J.R., Dyson Rose, Boulet, M. : Accumulation of Skeletal Fluoride and its Implication. *Arch. Environmental Health.* 6: 664-671, 1963.

63. Mason, L.R. : Bone Density Measurements in vivo. Improvement of X-ray Densitometry. *Science*, 150: 221, 1965.
64. Miller, E.J., Martin, G.R. : The Collagen of Bone. *Clin. Orthop.* 59: 195, 1968.
65. Nichols, G.Jr., Flanagan, B. : Osteoporosis-a Disorder of Bone Cell Metabolism. *Fed. Proc.* 25: 922-927, 1966.
66. Nusgens, B., Chantraine, A., Lapierre, M. : The Protein in the Matrix of Bone. *Clin. Orthop.* 88: 252-274, 1972.
67. Owen, M. : Studies on Osteogenic Cell. *J. Bone and Joint Surg.* 50-B: 234, 1968.
68. Payne, R.W. : The Metabolism of Fracture Healing. *J. Bone Joint Surg.* 42-A: 357, 1960.
69. Pelc, S.R. : The Stripping Film Technique of Autoradiography. *Intern. J. Appl. Rad. Isotop.* 1: 172-177, 1956.
70. Pentinen, R. : Biochemical Studies on Fracture Healing in the Rat. *Suppl. Acta Chir. Scand.* 432, 1972.
71. Poltnick, J.I., Sinkins, B.A. : A Technique for Standardized Serial Dental Radiographs. *J. Periodont.*, may, 297, 1971.
72. Poltnick, J.I. : The Effect of Variations in the Opposing Dentition on Changes in the Partially Edentulous Mandible. Part. 2 : Densitometric Measurements. *J. Prost. Dent.* 33(4): 403, 1975.
73. Pritchard, J.J. : The Osteoblast. Chapter 2, *Biochem. and Phys. of Bone.* Vol. 2, Structure, Second Edition. Edited by G.H.Bourne, 21-44, New York and London, Academic Press, 1972.
74. Proffit, W.R., Ackerman, J.L. : Fluoride : Its Effect on Two Parameters of Bone Growth in Organ Culture. *Science*, 145: 932-933, 1964.
75. Prockop, D.J. : Biosynthesis of Collagen. *Yearbook of Orthopaedics Traumatic Surgery.* Edited by H.H.Young, Year Book Medical Publishers, Chicago, 3, 1973.
76. Radiochemical Amersham : *Radyoaktif Prolin ile Yollanan Prospektus*, 1980.
77. Ranganathan, S. : Studies on Experimental Fluorine Poisoning in Rats. *Ind. J. Med. Res.* 32: 233-236, 1964.
78. Reddy, G.S., Srikantia, S.G. : Effect of Dietary Calcium, Vit. C and Protein in Development of Experimental Skeletal Fluorosis. *Metabolism*, 20: 642-656, 1971.
79. Repo, R.U., Mitchell, N. : Collagen Synthesis in Mature Articular Cartilage of the Rabbit. *J. Bone Joint Surg.* 53-B: 541-548, 1971.
80. Rockwood, C.A., Green, D.P. (Editor) : *Fractures.* Vol I, 97, J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 1975.

81. Rosenquist, J. : Effect of Supply and Withdrawal of Fluoride. *Acta. Path. Microbiol. Scand.* 5: 630-636, 1973.
82. Sakamoto, M., Sakamoto, S., Parsons, D.B., Glimcher, J.M. : Collagen Synthesis in Embryonic Chick-Bone Explants. *J. Bone Joint Surg.* 61-A: 1042-1052, 1979.
83. Shambaugh, G.E., Petrovic, A. : Effects of Sodium Fluoride on Bone. *J A M A*, 204: 969-973, 1968.
84. Shupe, J.W. : Vertebral Biopsies in the Diagnosis of Bovine Fluorosed Toxicosis. *Amer. J. Vet. Res.* 28(124): 709-712, 1967.
85. Sidhu, S.S., Singh, P., Singh, G. : The Parathyroid in Human Fluorotic Syndrome. *Fluoride*, 113(1): 17-19, 1980.
86. Singh, A., Dass, R., Singh, S.H., Jolly, S.S. : Skeletal Changes in Endemic Fluorosis. *J. Bone Joint Surg.* 44-B: 806-815, 1962.
87. Singh, A., Jolly, S.S., Sansal, B., Mathur, C. : Endemic Fluorosis. *Medicine*, 42: 229-246, 1963.
88. Spinelli, M.A., Brudevold, F., Moreno, E. : Mechanism of Fluoride uptake by Hydroxyapatite. *Arch. Oral Biol.* 16: 187-203, 1971.
89. Srikantia, S.G., Siddiqui, A.H. : Metabolic Studies in Skeletal Fluorosis. *Clin. Sci.* 28: 477-485, 1965.
90. Steider, A., Gedalia, I., Schwarz, A., Rodan, A. : Effect of Vitamin D<sub>2</sub> and Fluoride on Experimental Bone Fracture Healing in Rats. *J. Dental Res.* 46: 675-686, 1967.
91. Suttie, J.W. : Vertebral Biopsies in the Diagnosis of Bovine Fluoride Toxicosis. *Amer. J. Vet. Res.* 28(124): 709-712, 1967.
92. Sümbüloğlu, K. : Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik. *Matiş Yayınları*, 52, 1978.
93. Tanyeri, K. : Doğu Anadolu Bölgesinde Endemic Fluorosis. *Atatürk Üniv. Tıp Fak. Bülteni*, 3: 209, 1975.
94. Teotia, M., Teotia, S.P.S., Kunwar, K.B. : Endemic Skeletal Fluorosis. *Arch. Dis. Child.* 46: 686-691, 1971.
95. Tietz, N.W. (Editor) : *Fundamentals of Clinical Chemistry*. 188, W.B. Saunders Comp., Philadelphia, London, Toronto, 1970.
96. Tonna, E.A., Cronkite, E.P. : Cellular Response to Fracture Studied With Tritiated Thymidine. *J. Bone Joint Surg.* 43-A: 352-361, 1961.
97. Tuncel, E. : Endemic Florozisli Olgularda Ateroma Kalsifikasyonu. *Anadolu Tıp Dergisi*, 2(2): 247-254, 1980.
98. Udenfriend, S. : Formation of Hydroxyapatite in Collagen. *Year Book Orth. and Traum. Surg.* 291-292, 1966-1967.



99. Udupa, K.N., Prasad, G.C. : Chemical and Histochemical Studies on the Organic Constituents in Fracture Repair in Rats. *J. Bone Joint Surg.* 45-B: 770-779, 1963.
100. Usmen, E. : Isparta il, ilçe ve Köylerinde Diş Florozisi. *İstanbul Üniv. Dişhekimliği Fak. Dergisi*, 10(4): 285-296, 1976.
101. Wassermann, F. : Fibrillogenesis in the Regenerating Rat Tendon with Special Reference Growth and Composition of the Collagen Fibrils. *Amer. J. Anat.* 94: 399-437, 1965.
102. Weatherell, J.A., Weidman, S.M. : The Skeletal Changes of Chronic Experimental Fluorosis. *J. Path. Bact.* 78: 233-241, 1959.
103. Weidmann, S.M., Weatherell, J.A., Whitehead, R.G. : The Effect of Fluorine on the Chemical Composition and Calcification of Bone. *J. Path. Bact.* 78: 435-445, 1959.
104. Weidman, S.M., Weatherell, J.A. : The Uptake and Distribution of Fluorine in Bones. *J. Path. Bact.* 78: 243-255, 1959.
105. Weinstock, M., Leblond, C.P. : Elaboration of Collagen Precursors by Osteoblast in Rat Alveolar Bone. *Anat. Rec.* 175: 466, 1973.
106. Weinstock, M., Leblond, C.P. : Formation of Collagen. *Fed. Proc.* 33(5): 1205-1218, 1974.
107. Weinstock, M., Leblond, C.P. : Synthesis, Migration and Release of Precursor Collagen by Odontoblast as Visualized by Radioautography after  $H^3$ -Proline Administration. *J. Cell Biol.* 60: 92-127, 1974.
108. Weinstock, M. : Elaboration of Collagen by Odontoblast of the Rat Incisor. *J. Cell Biol.* 55: 277, 1977.
109. World Health Organization Monograph Series No. 59 : Fluoride and Human Health, Geneva, 1970.
110. Wolff, W.A., Kerr, E.G. : The Composition of Human Bone in Chronic Fluoride Poisoning. *Amer. J. Med. Sci.* 195: 493-497, 1938.
111. Wuerhrmann, A.H., Manson, H. : Dental Radiology. 2nd. Edition. Saint Louis, C.V. Mosby Comp. 28, 74, 90, 1969.
112. Young, R.W. : Autoradiographic Studies on Postnatal Growth of the Skull in Young Rats Injected with Tritiated Glycine. *Anat. Rec.* 143: 1-13, 1962.
113. Young, R.W. : Nucleic Acids, Protein Synthesis and Bone. *Clin. Orthop.* 26: 147-160, 1962.
114. Zipkin, I., Scow, R.O. : Fluoride Deposition in Different Segments of the Tibia of the Young Growing Rat. *Amer. J. Physiol.* 185: 81-84, 1956.