

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

**SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN RATLARDA
RESVERATROLÜN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ VE
KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ÖZGE KOLKESEN ŞAHİN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. MÜGE ÇINA AKSOY

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 3241-D1-12 Proje numarası ile desteklenmiştir
Tez. No: 99**

2014-İSPARTA

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

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

Tez Savunma Tarihi: 02/06/2014

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Timuçin BAYKUL

Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Üye : Prof. Dr. Zafer Özgür PEKTAŞ

Başkent Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Zuhale YETKİN AY

Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Periodontoloji Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülperi KOÇER

Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

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

Doç. Dr. Nejdettin ADANIR

Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

‘Sigara Dumanına Maruz Bırakılan Ratlarda Resveratrolün Oksidatif Stres Parametreleri ve Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Araştırılması’ adlı doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesine uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Dt. Özge KOLKESEN ŞAHİN

İmza

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY

İmza

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca çok yakın ilgi ve desteğini hissettiğim, doktora tezimin her aşamasında bilgisini ve emeğini esirgemeyen, ilk doktora öğrencisi olduğum için gurur duyduğum, hem akademik hem insani duruşuyla örnek aldığım, hayatım boyunca benim için yeri hep ayrı olacak olan çok sevdiğim ve en derin saygılarımı sunduğum değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Müge Çına Aksoy'a;

Bilgi ve tecrübesiyle bize rehber olan, bulunduğu her platformda farkını fark ettiren değerli anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Timuçin Baykul'a,

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

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

Araştırma verilerimin histomorfometrik değerlendirmesini gerçekleştiren Prof. Dr. Mustafa Cihat Avunduk'a;

Araştırma verilerimin Biyokimyasal değerlendirmesini gerçekleştiren Doç. Dr. Efkan Uz'a;

Araştırmamın istatistiksel değerlendirmesini yapan Yrd. Doç. Dr. Özgür Koşkan'a;

Araştırmamın materyal ve metod aşamasında katkı sağlayan Prof. Dr. Suat Özkorucuklu'ya;

Her an bizim iyiliğimizi düşündüğünü bildiğimiz sevgili hocamız Yrd. Doç. Dr. Gülperi Koçer'e;

Doktora eğitimim süresince önce bilgisine güvendiğim arkadaşım sonra hocamız olan Yrd. Doç. Dr. Yavuz Fındık'a,

SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim dalı klinik ve ameliyathane personeline;

Doktora eğitimim boyunca birbirimizden destek aldığımız, onlar olmadan hiçbir şeyin böylesine güzel olmayacağı tüm asistan arkadaşlarıma;

Doktora eğitimim süresince onlarla herşeyin tadı başkaydı, uzaktayken bile varlıklarını bilmenin içimi rahatlattığı arkadaştan öte dostlarım Nesligül Niyaz Kökdere, Betül Taş, Olgun Topal'a,

Eğitim sürecim boyunca ve hayatımın her aşamasında bana destek olan, kendimi her durumda güvende hissetmemi sağlayan, annem Dursen Kolkesen'e, babam Ali Kolkesen'e ve biricik kardeşim, canım Emre Kolkesen'e;

Hayatımın neredeyse yarısını birlikte geçirdiğim, ömrüm boyunca benden sevgisini, emeğini, fedakarlığını, sabrını esirgemeyen, varlığıyla herşeye anlam katan, hayatımın anlamı olan Mehmet Şahin'e teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
BEYAN	iii
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KEMİK	3
2.1.1. Kemik Dokusunun Özellikleri	3
2.1.2. Kemik Hücreleri	3
2.1.3. Kemik Matriksi	6
2.1.4. Kemiği Saran Yapılar	6
2.1.5. Kemik Dokusu Tipleri	7
2.1.6. Kemik Yapımı Mekanizmaları.....	8
2.1.7. Kemik İyileşmesi Safhaları.....	9
2.1.8. Kemik Metabolizmasını Etkileyen Faktörler	11
2.1.9. Kemik Metabolizması Belirteçleri	12
2.2. SİGARA	14
2.2.1. Sigaranın İçerdiği Kimyasal Maddeler	14
2.2.2. Sigaranın Ağız ve Diş Sağlığına Etkileri	15
2.3. OKSİDATİF STRES	23
2.3.1. Serbest Radikaller	23
2.3.2. Oksidatif Denge	25
2.3.3. Sigara ve Oksidatif Stres	25
2.4. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ VE ANTIOKSİDANLAR	27
2.4.1. Enzimatik Savunma Sistemleri	28
2.4.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri.....	28
2.4.3. Resveratrol.....	29
2.4.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Biyobelirteçleri	36

2.4.5. Total Antioksidan Kapasite/Total Oksidan Kapasite	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
3.1. DENEY HAYVANLARI.....	39
3.1.1. Gruplar	39
3.1.2. Sigara Dumanının Oluşturulması	41
3.2. CERRAHİ GİRİŞİM.....	42
3.3. POSTOPERATİF TAKİP.....	45
3.4. RESVERATROLÜN HAZIRLANMASI VE VERİLMESİ	45
3.5. DENEY HAYVANLARININ SAKRİFİKASYONU VE KAN İLE DİL ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ.....	47
3.6. DENEY HAYVANLARINDAN KEMİK ÖRNEKLERİNİN ELDE EDİLMESİ	47
3.7. KESİT HAZIRLAMA YÖNTEMİ	48
3.7.1. Fiksasyon ve Formalinden Arındırma İşlemi	49
3.7.2. Dekalsifikasyon İşlemi.....	49
3.7.3. Doku Takip İşlemi.....	49
3.7.4. Bloklama İşlemi.....	50
3.7.5. Kesit Alma İşlemi.....	51
3.7.6. Hematoksilen Eozin İle Boyama İşlemi	52
3.7.7. Kesitleri Kapama İşlemi.....	52
3.8. HİSTOMORFOMETRİK ANALİZ	53
3.9. BİYOKİMYASAL ANALİZ YÖNTEMİ	55
3.10. İSTATİSTİK	56
4. BULGULAR.....	57
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARI.....	57
4.2. CANLI AĞIRLIK BULGULARI.....	57
4.3. HİSTOMORFOMETRİK BULGULAR	58
4.3.1. Osteoblast Sayımı	58
4.3.2. Osteoklast Sayımı.....	59
4.3.3. Yeni Kemik Alanı	60
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR	60
4.5. BİYOKİMYA VE HİSTOMORFOMETRİ BULGULARININ KORELASYONU	63

5. TARTIŞMA	65
6. SONUÇLAR	85
ÖZET.....	86
ABSTRACT	87
KAYNAKLAR	88
EKLER.....	107
EK 1: SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü.....	107
EK 2: SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı.....	108
ÖZGEÇMİŞ.....	109

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

- ACTH: Adreno Kortiko Tropik Hormon
ALP : Alkalen Fosfataz
AMP: Adenozin Mono-Fosfat
ATP: Adenozin Tri-Fosfat
B-ALP: Kemik Alkalen Fosfataz
BMD: Kemik mineral yoğunluğu
BMC: Kemik mineral içeriği
BMP : Kemik Morfogenetik Proteini
CAT: Katalaz
CO: Karbon Monoksit
COX: Siklooksijenaz
CTX : C-Telopeptitleri
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA: Enzyme-Linked Immuno
eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GPx: Glutatyon Peroksidaz
GR: Glutatyon redüktaz
GST: Glutatyon S transferaz
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
HCl: Hidroklorür
HE: Hematoksilen Eozin
HSV: Herpes Simplex Virüs
HX/PO: Ksantin oksidaz
IGF-1: insülin-like growth factor-1
IM: İntramuskuler
IP: İntra peritoneal
K: Kontrol
Kg: Kilogram
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

MDA: Malondialdehit
mg: Miligram
ml: Mililitre
MPO: Miyeloperoksidaz
NO: Nitrik Oksid
NO₂: Azot Dioksit
NOS: nitrik oksit sentaz
NTX : N-Telopeptit
O₂ : Oksijen
O₂⁻: Süperoksit Anyonu
OB: Osteoblast
OC: Osteoklast
OH: Hidroksil Radikali
PAF: Trombosit Aktive Edici Faktör
PET: Pozitron Emisyon Tomografi
PMNL: Polimorfo Nükleer Lökosit
ppm: Milyonda Bir Birim
R: Resveratrol
RANK: Nükleer Faktör Kappa B
RANKL: Nükleer Faktör Kappa B Ligand
RNT:Reaktif Nitrojen Türlerini
ROT: Reaktif Oksijen Türlerini
ROP: Reaktif Oksijen Partikülleri
rpm: Dakikadaki devir sayısı
S: Sigara
SDÜ: Süleyman Demirel Üniversitesi
SOD: Süper Oksit Dismutaz
SR: Sigara+Resveratrol
TAK: Total Antioksidan Kapasite
TOK: Total Oksidan Kapasite
TRAP: Tartarata Dirençli Asit Fosfataz
TXA₂: Tromboksan A₂
µg : Mikrogram

μM : Mikro Mol

15-LO: 15-lipooksijenaz

4-kumaril-CoA: 4-kumarol koenzim A

8-OhdG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Osteoblast oluşumu ve düzenleyici sistemler.....	5
Şekil 2. Sigaranın kemiğe etkileri.....	19
Şekil 3. (a) Gaz faz, (b) Partiküler faz.....	26
Şekil 4. Trans-resveratrol, Cis Resveratrol.....	29
Şekil 5. Stilben fitoaleksinlerinin biyosentez yolu.....	30
Şekil 6. Gruplar.....	40

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.Sigara dumanının oluşturulması ve verilmiş yöntemi.....	42
Resim 2.Duman jeneratörü.....	42
Resim 3.Operasyon alanının traşlanarak tüylerden arındırılması.....	43
Resim 4.Cilt kesisi.....	43
Resim 5.a. Femur kemiğinin açığa çıkarılması, b. 3 mm'lik frezler ile defekt açılması.....	44
Resim 6.Operasyon alanının suture edilmesi.....	44
Resim 7.a,b. Resveratrol.....	45
Resim 8.DMSO.....	46
Resim 9.Gavaj uygulaması.....	46
Resim 10.Vena cavadan kan alınması.....	47
Resim 11.Femurun rezeksiyonu ve iyileşen defekt.....	48
Resim 12.Kemiklerin formalin solüsyonunda fikse edilmesi.....	48
Resim 13.a,b. Örneklerin kasetlenmesi.....	49
Resim 14.Otomatik doku takip cihazı.....	50
Resim 15.Bloklama cihazı ve bloklama yöntemi.....	50
Resim 16.Mikrotom cihazı.....	51
Resim 17.a,b. Mikrotom cihazıyla kesit alınması.....	51
Resim 18.a,b. Kurutma fırını ve preparatlar.....	52
Resim 19.Shandon Consul Coverslipper.....	52
Resim 20.OB: Osteoblast, OC: Osteoklast.....	54
Resim 21.Yeni kemik alanı.....	54
Resim 22.Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programı ile mavi tonlamaya tutulması.....	55

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Kemik Metabolizması Belirteçleri	13
Tablo 2. Serbest Radikal Türleri	24
Tablo 3. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanlar	27
Tablo 4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Biyobelirteçleri	37
Tablo 5. Çalışma Dışı Bırakılan ve Çalışmaya Dahil Edilen Ratların Gruplara Göre Dağılımı	57
Tablo 6. Deney Sonunda Grupların Ortalama Ağırlık Bulguları	58
Tablo 7. Osteoblast Sayılarının İstatistik Değerleri	59
Tablo 8. Osteoklast Sayılarının İstatistik Değerleri	59
Tablo 9. Yeni Kemik Alanı İstatistik Değerleri	60
Tablo 10. TAK Dil İstatistik Değerleri.....	61
Tablo 11. TOK Dil İstatistik Değerleri.....	61
Tablo 12. TOK Serum İstatistik Değerleri	62
Tablo 13. TAK Serum İstatistik Değerleri	62
Tablo 14. BALP İstatistik Değerleri.....	63
Tablo 15. Biyokimyasal Özellikler İle Histomorfometrik Özelliklerin Korelasyonu	64

1. GİRİŞ

Kemik iyileşmesi ve yeni kemik oluşumu, dayanıklılığı ve rejenerasyonu çok sayıda sistemik ve lokal düzenleyicilere bağlı olan ve hücrel yapıların karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir süreçtir. Kemik iyileşmesi, bölgede hematoma ve granülasyon dokusu oluşumuyla başlayıp, daha sonra bunların yerini iyileşme dokusunun (kallus) aldığı ve kemiğin yeniden şekillenmesiyle sona eren olaylar zincirini içermektedir. Kemik iyileşmesini etkilediği bildirilen bir çok olumlu veya olumsuz, lokal ve sistemik faktör vardır (1). Kemik dokusu oral ve maksillofasiyal cerrahi operasyonlarda iyileşmesi ve rekonstrüksiyonu kritik öneme sahip olan bir dokudur. Kemik iyileşmesini etkileyen faktörler ve iyileşmenin hızlandırılması, günümüzde araştırmacıların üzerinde çalıştığı önemli konulardan birisidir. Sigaranın lokal ve sistemik etkileri ile, kemik dokularının yeniden yapılanmasını geciktirdiği ve komplikasyon riskini artırdığı yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (2,3).

Sigaranın kemikler üzerine olan etkilerinin mekanizmasına ilişkin farklı görüşler vardır. Bazı araştırmacılar bu etkilerin östrojenin hidroksilasyonunun artması sonucu, kadınlarda serumdaki biyolojik aktif serbest östrojen, erkeklerde testosteron seviyesinin düşmesine bağlı olabileceğini bildirmektedir (3,4). Sigaranın insanlarda osteokalsin düzeyini etkilediği ve neden olduğu direkt veya hormonal değişikliklerle kemik üzerine etki ettiği belirtilmiştir (4). Bazı kaynaklarda sigaranın ana etken maddesi olan nikotinin vücutta D vitamini depolanmasını ve osteoblast aktivitesini azalttığı bildirilmektedir. Ayrıca sigaranın kemikler üzerinde direkt olarak toksik etkisinin olabileceği de düşünülmektedir (5).

Oksidatif stres, serbest radikallerin yol açtığı, hücrelere fiziksel hasar veren bir süreçtir. Vücutta serbest radikaller oksidatif fosforilasyon, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal olaylar sonucu sürekli olarak oluşur (6). Organizmada serbest moleküllerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak da adlandırılan bu durum

özetle, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına neden olmaktadır (7). Sigara dumanında bulunan ya da kimyasalların biyotransformasyona uğraması sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerle çok sayıda organ ve doku hasara uğramaktadır (8). Sigara içerdiği çok sayıdaki zararlı madde ve neden olduğu bilinen hastalıklar nedeniyle serbest radikal hasarının izlenebileceği bir model oluşturmaktadır.

Sigaranın kemik iyileşmesindeki ve kemik metabolizmasındaki olumsuz etkilerini azaltmak ya da ortadan kaldırmak için D vitamini, E vitamini gibi çeşitli vitaminlerle, hormonlarla ve antioksidanlarla ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır (9). Ancak bu maddeler ya yalnızca osteoblast yapımını artırıcı ya da osteoklast oluşumunu inhibe edicidir. Yapılan çalışmalar güçlü bir antioksidan olan resveratrolün, osteoklastları inhibe ederken osteoblastların farklılaşmasını arttırdığını göstermektedir (10,11).

Bu araştırmada, kemik iyileşmesini bozan faktörlerden biri olan sigara ve osseogenezde olumlu etkileri kanıtlanmış bir antioksidan olan resveratrolün kemik iyileşmesi ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerinin deneysel olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

2.1.1. Kemik Dokusunun Özellikleri

Kemik, embriyolojik olarak mezenşimal hücrelerden endokondral ya da membranöz kemikleşme yolu ile farklılaşan ileri derecede özelleşmiş bir bağ dokusu türüdür. Vücudun hareketini ve postürünü sağlamak amacıyla kas ve tendonlara destek olur, iskelet sistemini oluşturup kaslarla birlikte hareketi sağlar, kranial ve torasik boşluklardaki hayati organları çevreleyip korur, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini ve hemopoetik hücreleri içerir, kalsiyum deposu olarak görev alır (12). Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarını sabit düzeyde tutabilmek için, bu önemli iyonların kontrollü olarak salıverilmelerini ya da depolanabilmelerini sağlamaktadır (13). Kemik bütünleşmiş birçok hücreden oluşan, metabolik ve biyolojik açıdan dinamik bir dokudur. Bu yönden kemiğin büyüme ve iyileşmesi çok sayıda biyokimyasal, biyomekanik, hücresel, hormonal ve patolojik olayın zincirleme reaksiyonu gibi düşünülebilir (14).

2.1.2. Kemik Hücreleri

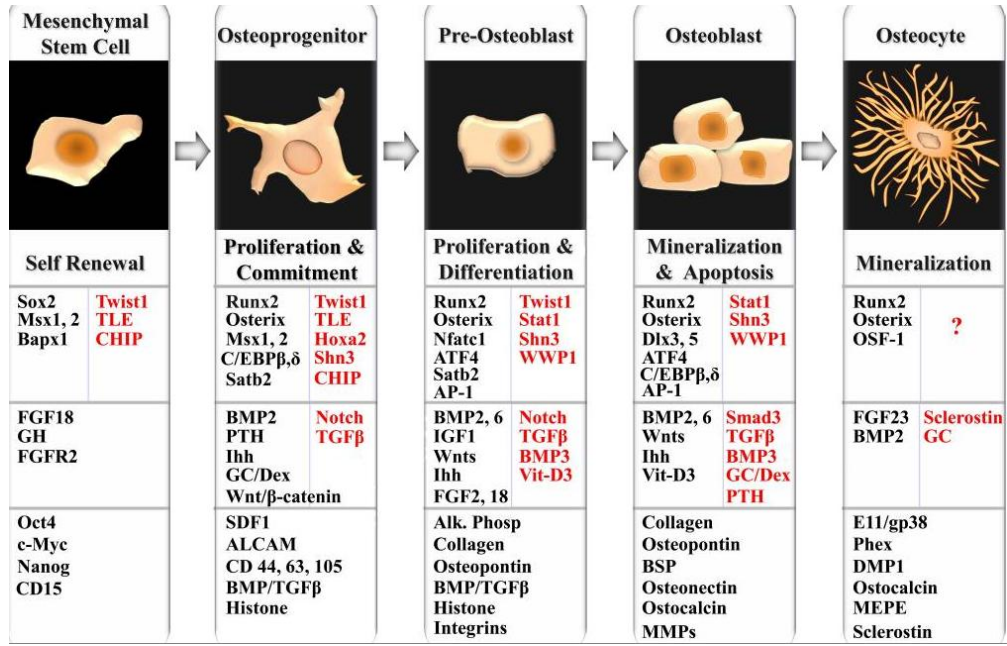
Kemik hücreleri morfoloji, fonksiyon ve karakteristik özelliklerine göre osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve farklılaşmamış (osteoprogenitör) hücreler olarak 4 gruba ayrılmıştır. Osteoblast, osteosit ve osteoprogenitör hücrelerin her biri diğerine dönüşebilir. Osteoklastlar ise dolaşımda bulunan bütün hücreleri içine alan hematopoetik hücre ailesine aittir ve monositlerden köken almaktadır (13).

2.1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenşimden köken alan, periostun iç kısmında ve endotelde yer alan hücrelerdir. Kemığın normal büyümesi sırasında aktif olan bu hücreler, erişkinlerde pasif durumdadırlar ancak farklılaşma ya da çoğalma uyarısı ile aktive olurlar (15).

2.1.2.2. Osteoblastlar

Matürasyon evreleri açısından hücreler pre-osteoblast, osteoblast ve osteosit basamaklarını takip ederler (16),(Şekil 1). Osteoblastlar kemik oluşumunda sorumlu hücreler olup, Tip I ve Tip V kollajen salgılamalarının yanı sıra alkalin fosfataz (ALP) gibi fenotipik belirteçler, kemik mineralizasyonu için önemli olan, glikoproteinler, proteoglikanlar, osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegerin, kemik morfogenetik proteini (BMP) gibi sitokinleri salgırlar. Alkalin fosfataz ve Tip I kollajen, osteoblastik aktivitenin erken dönem belirteçleridir (17). Osteonektin, osteopontin ve osteokalsin ise osteoblastik aktivitenin geç dönem belirteçleridir (18). Osteoblastlar 20-50 µm çapında mononükleer hücrelerdir. Elektron mikroskopunda osteoblastların çok sayıda girintili çıkıntılı endoplazmik retikulumları, bol serbest ribozom ve poliribozomları olduğu görülür. Aktif osteogenezin olmadığı bölgelerde kemik yüzeyinde düzleşmiş, endoplazmik retikulumdan daha fakir bölgeler gözlenmektedir (13). Kemik yapıcı görevleri sona erdiğinde, yeni sentez edilmiş matriks içinde kalarak osteositlere dönüşürler (19)



Şekil 1. Osteoblast oluşumu ve düzenleyici sistemler. Mezenşimal kök hücreden osteoblast daha sonra da osteosit oluşumu şeklinde özetlenmiştir. Resimlerin altında her evrenin özelliği belirtilmiştir. Alt satırda osteoblast farklılaşmasındaki temel faktörler ve düzenleyici proteinler özetlenmiştir. Kırmızı ile yazılan faktörler osteoblast farklılaşmasını olumsuz etkilemektedirler. Son satırda, osteoblast farklılaşması sırasında farklı gelişim evrelerinde salınan fenotipik gen belirteçleri özetlenmiştir (16).

2.1.2.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar, monositlerin birleşmesiyle meydana gelen, kemik rezorpsiyonundan sorumlu, fagositoz yapma yetenekleri bulunmayan, çok çekirdekli hücrelerdir (15). Osteoklastlar salgıladıkları asit fosfataz ile kemiğin mineral matrisini yıkar, lizozomal enzimler aracılığı ile de kollajen ve diğer organik matris yapılarını sindirerek rezorpsiyonu gerçekleştirirken kemik rezorpsiyonu sırasında meydana gelen atıkların da dokularca emilmesini sağlamaktadırlar (13). Osteoklastların diferansiasyonu ve aktiviteleri, primer olarak nükleer faktör kappa B ligand (RANKL) ve osteoprotegerin ile düzenlenir. RANKL osteoklast aktivasyonuna sebep olurken, osteoprotegerin osteoklastları inhibe eder (20).

2.1.2.4. Osteositler

Kemik matriksine kalsiyum tuzlarının birikmesiyle osteoid madde içinde kalan osteoblastlar osteositlere dönüşür. Osteositler kemiğin esas hücreleri olup olgun kemik hücresi adını almaktadır (13). Osteositlerin kemiğin diğer hücre tiplerine dönüşebilirler. Osteoblastlardan farklı olarak ALP sentezlemezler. Kemik matriksinin devamlılığı için aktif rol oynar, kan kalsiyum düzeyini, vücut mineral kompozisyonunu dengede tutar ve besin maddelerinin hücre içine geçişini sağlarlar (13).

2.1.3. Kemik Matriksi

Kemik matriksi; organik ve inorganik matriks olmak üzere iki bölümden oluşur. Organik matriks kemiğe şeklini verir ve gerilme dayanıklılığı sağlar. İnorganik matriks ise kemiğe sıkışmaya karşı direnç kazandırır. Kuru kemik ağırlığının %60-70'ini inorganik matriks, %30-35'ini ise organik matriks oluşturur (13). Kemik matriksinin organik kısmını büyük oranda Tip I kollajen oluşturur. Kalan kısmını ise glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asit), glikoproteinler (osteonectin, osteopontin, sialoprotein), kemiğe özgü K vitamini bağımlı proteinler (osteokalsin, matriks gla-protein, protein S) ve Tip V kollajen oluşturur. İnorganik matriks, kalsiyum ve fosfattan oldukça zengindir. İçerdiği diğer mineraller ise bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyumdur (13).

2.1.4. Kemiği Saran Yapılar

Kemiğin iç yüzeyini örten tabakaya endosteum, dış yüzeyini örten tabakaya ise periosteum denir. Periosteum eklem ve kırıkta yüzeyleri, tendon, ligament ve eklem kapsülü hariç kemiğin dış yüzeyini örten kaba, vasküler, bağ dokusu tabakasıdır. Fibröz tabaka olarak adlandırılan dış tabaka ve osteojenik tabaka olarak

adlandırılan iç tabakadan oluşur. Fibröz tabakanın yapısında temel olarak kollajen ve elastik lifler bulunur. Sharpey lifleri adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe bağlanmaktadır. Hücreden daha zengin olan gevşek bağ doku içeren periostun iç tabakası ise bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahip hücreler bakımından zengindir (13).

Endosteum ve periosteumun temel işlevleri; kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları aralıksız olarak sağlamalarıdır. Bu nedenle kemik cerrahisinde periosteum ve endosteumun korunmasına çok dikkat edilir (13).

2.1.5. Kemik Dokusu Tipleri

Kemik dokusu, birincil kemik dokusu ve ikincil kemik dokusu olarak iki ayrı başlık altında incelenmektedir. Birincil kemik, gelişim ve kemik iyileşmesi sırasında üretilir. Geçici bir kemik yapısı olup, yetişkinlerde kafadaki yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgeler gibi birkaç yer dışında 3 yaşından sonra yerini lameller kemiğe bırakır (13).

İkincil kemik dokusu erişkinlerde bulunan kemik dokusudur. Kemik hücreleri birincil kemik dokusuna göre daha az sayıdadır ve mineralizasyon tamamlanmıştır. Bulunduğu yere ve fonksiyona göre özelleşerek, kortikal (kompakt) kemik ve spongioz (kansellöz-trabeküler-süngerimsi) kemik olarak bulunur.

Kortikal kemik, tüm kemiklerin dış tabakasını kaplar. Kortikal kemik dokusunda, içerisinden kan damarları geçen havers ve volkmann kanalları vardır (13).

Spongioz kemik, kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ve yassı kemiklerin iç yüzeylerinde bulunur. Geniş trabeküler aralıkları vardır, daha yavaş bir yaşam döngüsüne sahiptir (13).

2.1.6. Kemik Yapımı Mekanizmaları

Kemik oluşumu iki şekilde olur. Birincisi osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan doğruya mineralizasyonu ile gerçekleşen intramembranöz kemikleşme ya da daha önce varolan kıkırdak matriksinin üzerine kemik matriksinin çökmesi ile oluşan endokondral kemikleşmedir (13).

2.1.6.1. İnamembranöz Kemik Yapımı

Frontal, parietal, oksipital, temporal kemikler ile maksilla ve mandibulanın bazı bölgeleri intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. Bu tip kemikleşmede herhangi bir kartilaj çatı oluşumu görülmeden, mezenşim hücrelerinin birikimi ve osteoblastlara dönüşümü ile kemik yapımı olur. Bağ dokusunun kemikleşmeye katılmayan bölümleri ise periosteum ve endosteumu oluştururlar (13).

2.1.6.2. Endokondral Kemik Yapımı

Endokondral kemikleşmede, önce mezenşim doku kıkırdak model oluşturur ve kemiğin kıkırdak model içinde gelişmesi için bu kıkırdak dokunun yıkılması gerekir. Farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin kıkırdağı rezorbe etmeleri, osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerlerinden oluşan osteojenik tomurcukların, dejenere olmuş kıkırdak hücrelerinden geriye kalan aralıklara girmesi ve osteoblastların oluşması ile kemik yapımı gerçekleşir. Kıkırdak yıkımı ve kemik yapımının yan yana seyretmesi nedeniyle endokondral kemik oluşumu daha karmaşık seyreder (13).

2.1.7. Kemik İyileşmesi Safhaları

Kemik iyileşmesi, vücuttaki onarım olayları içinde, skar dokusu oluşmadan, orjinaline en yakın biçimde yeniden yapılanma ile karakterize yara iyileşmesidir. Kemik iyileşmesi ve yeni kemik oluşumu, dayanıklılığı ve rejenerasyonu çok sayıda sistemik ve lokal düzenleyicilere bağlı olan ve hücrel yapıların karşılıklı etkileşimini içeren karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin esas patofizyolojisi ve iyileşme evreleri şimdiye kadar iyi tanımlanmıştır ancak hala aydınlatılmayı bekleyen birçok nokta vardır. Kemik iyileşmesi; bölgede hematoma ve granülasyon dokusu oluşumuyla başlayıp, daha sonra bunların yerini iyileşme dokusunun (kallus) aldığı ve kemiğin yeniden şekillenmesiyle sona eren olaylar zincirini içermektedir. Radyolojik ve histolojik olarak üç dönemde incelenir. Bu dönemler inflamatuvar dönem, tamir dönemi ve remodelizasyon dönemidir. Histolojik olarak iyileşme sürecindeki evreler birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayrılmaz. Her evre kendinden önceki veya sonraki evre içinde bulunur. En uzun süren dönem remodelizasyon dönemidir (21). Kemik iyileşmesini etkilediği bildirilen bir çok olumlu veya olumsuz, lokal ve sistemik faktör vardır (1).

2.1.7.1. Enflamasyon Evresi (1-4 gün)

Tüm doku travmalarında ilk verilen yanıt enflamasyondur. Kemikte meydana gelen hasar sonucunda, bölgedeki kan damarları zarar görür ve kanama oluşur. Hasar oluşumundan hemen sonra periosteum, çevre kaslar ve damarlar yırtılır ve kan, lenf ve doku sıvıları hematomu oluşturur. Hasar sonrası vazodilatasyon ve beraberinde plazma eksudasyonu nedeniyle ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Bölgeye lökositler başta olmak üzere akut enflamasyon hücreleri göç eder. Buradaki osteositler lizise uğrayarak yerlerini boş lakunalara bırakırlar. Hasar bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden zengin bir yapı oluşur. Polimorfonükleer lökositler ve makrofajların damar dışına göçüyle fibrin matriks oluşur ve kemik yapımında gerekli olan hücre çoğalması başlar. Hematom bölgesinde hücrel yanıtlar oluşurken pH 7.4'ten 5.2'ye düşer. Bu osteogenezisi uyarır. Onarım ilerledikçe ortam alkalileşir,

pH yükselir, ALP düzeyi optimal düzeydedir. ALP, pH 7'nin üzerinde aktivite gösterir (1,22).

Bu hematoma, kemik iyileşmesinin erken döneminde kritik öneme sahip hücresel faaliyetlerin başlamasını sağlayan interlökin ve sitokinler içerir. Bu tip sitokinlerin salınımlarının devam etmesi defekt alanında kemik köprünün oluşumunu sağlayan fibroblastların, endotel hücrelerin ve osteoblastların bölgede faaliyetlerinin başlamasını sağlarlar (23). Enflamatuvar hücreler (makrofajlar, monositler, lenfositler ve polimorfonükleer hücreler) ve fibroblastlar, prostoglandin etkileşimi ile kemiğe infiltre olurlar. Bu gelişmelerle hasar bölgesinde granülasyon dokusu oluşumu, vasküler doku ve mezenşimal hücre göçü oluşur. Deneysel olarak hematoma organize olduktan sonra çıkarıldığında osteojenik uyarının büyük bir kısmının yok olduğu bildirilmiştir (1).

2.1.7.2. Onarım Evresi (2-40 gün)

Onarım evresi hasar oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer (1,22). Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezenşimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücrelerdir. Üçüncü günde hasar bölgesinde, yoğun mezenşimal hücre vardır. Periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, granülasyon dokusu oluşur (1). Bu dokunun içindeki makrofajlar oluşan debris temizlemeye yardım ederler. Granülasyon dokusu, makrofajların rezorbe ettiği sahalara doğru yayılır. Periosteum ve endosteumdan gelişen fibroblastlar bölgeye göç ederler. Fibroblastların salgıladığı kollajen fibriller ile kondroblastlara farklılaşarak kartilaj sentezleyen fibroblastlar, fibrokartilaj bir yapı olan yumuşak kallusu oluştururlar. Hücre farklılaşması sonucunda fibroblastlar osteoblastlara dönüşür ve yeni kemik dokusu oluşmaya başlar (23).

2.1.7.3. Osteoid Doku Oluşumu (12-21 gün)

Fibröz kıkırdak mineralizasyona uğrar ve mineral kümeleri kondrosit grupları çevresinde yerleşir. Yeterli mineralizasyon için kalsiyum ve fosfat iyonlarının yeterli yoğunlukta olması, kalsifiye olabilecek matriks varlığı, matriks vezikülleri ve kollajen olması ve düzenleyici etkenlerin kontrolü gereklidir. Bu evrede kemikleşmede duraklama, fibröz doku ile iyileşmeye yol açar (24). Fibröz kıkırdak kaynama alanını fibroosseoz kemikleşmeye bırakarak sert kallus oluşur. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyon süresi 4-16 haftadır. Daha sonra kalsifiye olan fibröz kıkırdak kısmen rezorbe olur. Onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzaması ile yeniden şekillenme evresi başlar (25).

2.1.7.4. Geçici Kallusun Kalsifikasyonu (21. günden sonrası)

Osteoidin mineralizasyonu, sert kallusun oluşumu ve yapısal stabilite için gereklidir. Kalsiyum tuzları, osteoid dokunun üzerine tam olarak çöker ve lameller kemik oluşmaya başlar. Bu dönemde hareketlilik azalmıştır. Bölge daha sonra periosteum ile kaplanır ve tamir işlemi tamamlanmış olur. Bundan sonra kemikte remodelling meydana gelir (23).

2.1.8. Kemik Metabolizmasını Etkileyen Faktörler

Kemik metabolizmasını etkileyen faktörler sistemik ve lokal faktörler olarak değerlendirilir. Paratiroid hormon, kalsitonin, glikokortikoidler, östrojen ve androjen gibi sistemik hormonlar, kan kalsiyum düzeyinin dengelenmesi gibi tüm vücut seviyesindeki kan değerleri üzerinde etkili olurlarken aynı zamanda hedef hücrelerden lokal düzenleyici faktörlerin üretimini de kontrol ederler.

Kemik iyileşmesini etkileyen diğer bazı sistemik faktörler ise diyabet, anemi, tüberküloz, raşitizm gibi hastalıklar, hastanın yaşı, beslenme bozuklukları, D

vitamini eksikliği, enfeksiyon varlığı, sigara kullanımı olarak sıralanabilir. Hasar bölgesinin beslenmesinin yetersiz olması kemik iyileşmesini geciktirirken; prostoglandinler, büyüme hormonu, kemik morfojenik proteinler ise kemik hücre proliferasyonunu arttıran lokal faktörlerdir (13).

2.1.9. Kemik Metabolizması Belirteçleri

Kemik doku aktif ve dinamik bir dokudur. Yaşam süresince kemik dokunun canlılığını sağlayan, birbirini takip eden rezorpsiyon, formasyon ve mineralizasyon döngüsüdür. Erişkin bir insanda iskeletin boyutunda herhangi bir değişiklik meydana gelmese de kemik dokusu devamlı olarak yıkılır ve yapılır, yani kemik yapıcı hücreler ile kemiği rezorbe eden hücrelerin aktiviteleri bir denge halindedir. Kemik kaybı, bu iki aktivitenin bozulması veya dengesiz hale gelmesiyle dengenin rezorpsiyon hücrelerinden yana kayması ile oluşur (26).

Kemik metabolizmasının biyokimyasal belirteçleri kemiğin mikromimarisindeki bozulmanın tespit edilmesini sağlar. Bu amaçla kemik kökenli moleküllerin serum veya idrarda tespiti yapılmaktadır (Tablo 1). Kemik döngüsünde osteoblastik aktivite belirteçlerinden sıklıkla kullanılanlar; kemik alkalen fosfataz (BALP), Tip I kollajen propeptidleri, kemik matriks proteinleridir (osteokalsin, prokollajen, osteonektin, kemik sialoprotein veya osteopontin). Osteoklastik aktivite belirteçleri; Tip I kollajen telopeptitlerden olan N-telopeptitleri (NTX), C-telopeptitleri (CTX), piridinolin, deoksipiridinolin, asit fosfotaz, tartarata dirençli asit fosfataz (TRAP), hidroksilizin ve hidroksiprolindir (27,28).

Tablo 1. Kemik Metabolizması Belirteçleri

	Yapım göstergeleri	Yıkım göstergeleri
Serum	Kemik alkale fosfataz Total alkale fosfataz Osteokalsin Prokollajen Tip 1 peptitleri <ul style="list-style-type: none"> - Prokollajen Tip 1 aminoterminal peptid - Prokollajen Tip 1 karboksiterminalpeptid 	Tartarat rezistans asit fosfataz (TRAP) Serbest prinidolin/deoksiprinidolin Kemik sialoprotein N-terminal telopeptid çapraz bağları C-spesifik telopeptid çapraz bağları
İdrar		Hidroksiprolin Hidroksilizin glikozitleri Kalsiyum N-terminal telopeptid çapraz bağları C-spesifik telopeptid çapraz bağları

2.1.9.1. Kemik Alkale Fosfataz

Fosfatazlar, organik fosfat esterlerini hidrolize ederek inorganik fosfat iyonlarını meydana getiren enzimlerdir. Optimal aktivite gösterdikleri pH bölgesine göre asit fosfatazlar ve alkale fosfatazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (29). Alkale fosfataz pH 7'nin üzerinde aktivite gösteren, alkali ortamda fosfatları hidrolize eden bir moleküldür. Karaciğer, kemik, bağırsak, böbrek, plasenta ve kemik dokuda bulunan bir enzimdir. Kemik alkale fosfataz, osteoblastların membranında lokalizedir ve osteoblastlardan salgılanarak dolaşıma katılır ve osteoblast fonksiyonu, kemik yapımı ve mineralizasyonunu gösterir (30). Alkale fosfataz enziminin kandaki seviyesi bazı hastalıkların tanısında ve tedavisinde önemlidir. Alkale fosfataz aktivitesi birçok karaciğer hastalığında, kemik hastalıklarında, kemik rejenerasyonu meydana gelen hastalıklarda yükselebilmektedir (31). Kemik alkale fosfataz aktivitesi en sık kullanılan kemik yapımı belirleyicilerindendir. Menopozdan hemen sonraki dönemde kemik döngüsündeki genel artış nedeniyle serum ALP

düzeyi normalin iki katına kadar yükselebilir. Osteomalazi, hiperparatiroidi, Paget hastalığı, tirotoksikoz ve kemik metastazlarında ALP artmaktadır (32).

Kemiğe spesifik alkalin fosfatazın yarılanma ömrü 1-2 gündür. Hücre kültürlerinde farklı kemik dokularından izole edilen osteoblastlardan salgılanan alkalin fosfataz 7 ila 14. günlerde pik yapar (33,34).

Sonuç olarak biyokimyasal belirteçler kemik rezorpsiyonunun tanısında birincil öneme sahip olmasa da, osteoporoz tedavisinde kullanılan antirezorptif ajanların etkinliğini ve kemik mineral yoğunluğu (BMD) değişikliklerini hızlı bir şekilde değerlendirme imkanı verir.

2.2. Sigara

2.2.1. Sigaranın İçerdiği Kimyasal Maddeler

Tütünün yanması ile distilasyon ve oksitlenme sonucu, kompleks bir aerosol olan sigara dumanı ortaya çıkar. Sigara dumanı, karsinojenik, toksik ve mutajenik olduğu bilinen 4000'den fazla kimyasal madde içerir. Sigara dumanı süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil ve peroksinitril radikalleri gibi çeşitli reaktif oksijen türlerini (ROT) ve reaktif nitrojen türlerini (RNT) içermesi ve oluşturması açısından önemli bir serbest radikal kaynağıdır (35,36,37). Poliaromatik hidrokarbonlar, heterosiklik hidrokarbonlar, aldehitler, N-nitrozaminler, volatil karsinojenler, inorganik bileşikler ve radyoaktif bileşikler olmak üzere yaklaşık 55 adet karsinojen bileşik tarif edilmiştir (38).

Sigara dumanı, ana duman ve yan duman denilen iki dumandan oluşur. Ana duman, sigara dumanı içe çekildiğinde, yanan sıcak sigara bölümünde oluşur, tütün kitlesi içinden geçerek sigaranın ağız bölümünden dışarı çıkar. Yan duman ise, sigara kendiliğinden yanarken havaya yayılan dumandır. Yan duman oluşurken yanma ısısının daha düşük olması nedeniyle ana dumana göre daha tehlikelidir (39).

2.2.1.1. Sigara Dumanının Katran Fazı ve Gaz Fazı

Sigara dumanı, gaz ve katran (partikül) olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Sigara dumanı içerisindeki 0,1 µM'den büyük partiküllerin %99,9'u sigara filtresi tarafından tutulur ve filtrede tutulan kısmı katran fazını oluşturur. Katran fazı ana sigara dumanının %8'ini, gaz şeklinde olan bölümü yaklaşık %92'sini oluşturur (36). Katran fazı stabil ve kompleks bir karışımdır, nikotin, normikotin, ağır metaller gibi yaklaşık 3500 farklı kimyasal maddeden oluşur (37). Pek çok organik bileşiğin yanısıra kinon ve polisiklik aromatik hidrokarbon radikalleri gibi stabil radikalleri içerir. Kinon/hidrokinon radikalleri oksijeni indirgeyerek süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH) oluşumuna yol açarak toksisiteye neden olur (36).

Sigara dumanının gaz fazı, filtrenin içinden geçebilen materyaldir. Gaz fazının içinde karbon monoksit, karbon dioksit, amonyak, nitrojen, hidrojen siyanid ve benzen de dahil yaklaşık 500 farklı gaz bulunur. Yanma sonucu kendi kendine oluşan karbon ve oksijen merkezli serbest radikalleri yüksek konsantrasyonlarda içerir. Bu radikaller çok kısa ömürlüdür. Gaz fazının diğer önemli ve radikal oluşumuna sebep olan içeriği azot monoksittir (NO) ve 300-500 ppm gibi yüksek oranlarda bulunur (36).

2.2.2. Sigaranın Ağız ve Diş Sağlığına Etkileri

Sigara dumanına ilk maruz kalan alan ağız boşluğudur. Buradaki etkileri; ağızdaki enzimatik ve biyokimyasal değişiklikler, ağız florasının değişmesi, periodontitis, diş eti ve kemik dejenerasyonu, çürük insidansında artma, pigmentasyon ve kanserler olarak sayılabilir (40,41). Ayrıca periodontal cerrahi veya diş çekim yaralarının iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi vardır (42).

Sorensen'in yaptığı araştırmada (2012) genel cerrahi, torasik, ortopedik, plastik ve rekonstrüktif cerrahi kaynaklı çalışmalar dahil edilerek sigara kullanan, kullanmayan ve bırakmış hastalarda iyileşme komplikasyonları (yara nekrozu,

gecikmiş iyileşme, cerrahi alanın enfeksiyonu, dehissens) değerlendirilmiştir. Erken ve geç dönemde yara iyileşmesinde gecikme ve yara dehissensi insidansı sigara içenlerde içmeyenlere göre 2 kat daha yüksek bulunmuştur. Sigarayı bırakmış hastalar ile sigara kullanımına devam eden hastalarda yara iyileşmesinin karşılaştırıldığı çalışmalarda postoperatif yara iyileşmesinde komplikasyon insidansı 1,3 kat daha fazla bulunmuştur. Cerrahi öncesinde 2 ile 8 hafta arasında sigara kullanımı kesilerek yapılan çalışmalarda iyileşme komplikasyonlarında anlamlı bir farklılık bulunamamış fakat cerrahi bölge enfeksiyonu anlamlı derecede azalmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre sigara içenler; hiç sigara içmemiş ve sigarayı bırakmış olan hastalara göre postoperatif iyileşme komplikasyonları açısından daha yüksek bir risk altındadır (43).

2.2.2.1. Sigaranın Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri

Sağlıklı bir doku iyileşmesi, fibroblasttan zengin granülasyon dokusunun oluşmasıyla alakalı bir dizi mekanizmayla gerçekleşir. Bu sürecin bozulması ciddi sonuçlara neden olur. Sigara içmenin bu biyolojik süreci bozduğu düşünülmektedir (44).

Sigaranın yara iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkilerine içeriğindeki hangi maddelerin yol açtığı henüz tam olarak bilinmemekle birlikte sigaranın yara iyileşmesini bozmasında etkili mekanizmalar; cerrahi bölgesinde iskemiye neden olan vazokonstrüksiyon ve hipoksi, inflamatuvar iyileşme cevabının bozulmasıyla bakteriosit mekanizmaların hasar görmesi ve kollajen metabolizmasının bozulması olarak açıklanmaktadır (43).

Sigara mukozal yüzeylerde enflamasyonu arttırır ve eksojen antijenlere karşı verilen konak cevabını değiştirir (45). Sigara dumanına maruziyetin kandaki inflamatuvar mediatörlere etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, enflamasyon ve oksidatif hasarın engellenmesinde rol oynayan myeloperoksidaz miktarında artış gözlenmiştir (46).

Yara iyileşmesindeki gecikmeden özellikle nikotin, CO ve hidrojen siyanid sorumlu tutulmaktadır (47). Dumanın farmakolojik olarak en etkili bileşeni olan nikotinin yara iyileşmesini olumsuz yönde etkileyen özellikleri şu şekildedir;

1. Nikotinin kemik üzerindeki hücresel seviyede etkisi osteoblastlar, osteoklastlar, fibroblastlar ve makrofajlar üzerinden gerçekleşir. Yüksek dozlarda osteoblastlara negatif etki ederken osteoklastları stimüle etmektedir ve kemik dokuda rezorpsiyona neden olmaktadır (48). Lee et al. (2010)'in yaptığı çalışmada nikotin uygulamasının alkalen fosfataz, osteokalsin gibi osteoblastik farklılaşma belirteçlerinde azalmaya ve insan periodontal ligament hücrelerinde nükleer faktör-Kappa- β ligant reseptör aktivatöründe artışa neden olduğu rapor edilmiştir (20). Fibroblast ve makrofajlar iyileştirici maddelerin (büyüme faktörleri ve sitokinler) yara alanına taşınmasında rol alırlar. Nikotin yüksek dozlarda eritrosit, fibroblast ve makrofajların proliferasyonunu ve migrasyonunu azaltır (5,44).
2. Trombosit adezyonunu arttırmasıyla mikropıhtı oluşmasına neden olur ve mikroperfüzyonu azaltır. Mikroperfüzyonun azalması trombotik mikrovasküler tıkanıklığa ve doku iskemisine neden olmaktadır. Kan viskozitesi ve fibrinojen seviyeleri artar, hiperkoagülasyonu indükler böylece polistemi ve mikrovasküler pıhtı oluşumuna yol açar (49).
3. Nikotinin plazma hormonlarına önemli ve çeşitli etkileri vardır. Sigara içenlerde kanda β -endorfin, adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortizol seviyeleri yüksek bulunmuştur. Katekolamin salınımı epitel oluşumunu azaltan ve yara iyileşmesini geciktiren hormonların oluşumunu stimüle etmektedir (47). Adrenal ve periferel katekolaminlerin salınması kalp hızını, kan basıncını, O₂ ihtiyacını arttırır ve dokudaki kan akımını ve oksijenlenmeyi azaltarak ciltte vazokonstrüksiyona yol açar (4). Sigara içimini takiben akut dönemde de orta ve büyük çaplı arterlerde kan akımının azaldığı rapor edilmiştir (50). Ancak Sorensen et al. (2009) yaptıkları çalışmada, nikotinin vazokonstrüktör etkisinin, sigaranın neden olduğu vazokonstrüksiyon kadar belirgin olmadığı sonucuna varmışlardır (50).

Sigaranın major komponentlerinden olan nikotin, gingival fibroblastlar ve periodontal ligament hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmektedir (42).

Dumadaki CO, hemoglobine oksijenden 200 kat daha fazla ilgi duymaktadır böylece hemoglobinin oksijen taşıma kapasitesini azaltmakta ve dokulara ulaşan oksijen konsantrasyonunu azaltmaktadır. On dakika sigara içilmesi dokularda O₂'nin 1 saat azalmasına neden olur, günde 20 adet sigara içen bir insanda 20 saat doku hipoksisi olur (51). Sonuç olarak hücrel hipoksi oluşmakta ve yara iyileşmesi gecikmektedir.

Hidrojen siyanidin en önemli etkisi hücrel seviyede oksijen taşınmasının ve oksidatif metabolizma için gerekli enzimlerin inhibisyonudur (47).

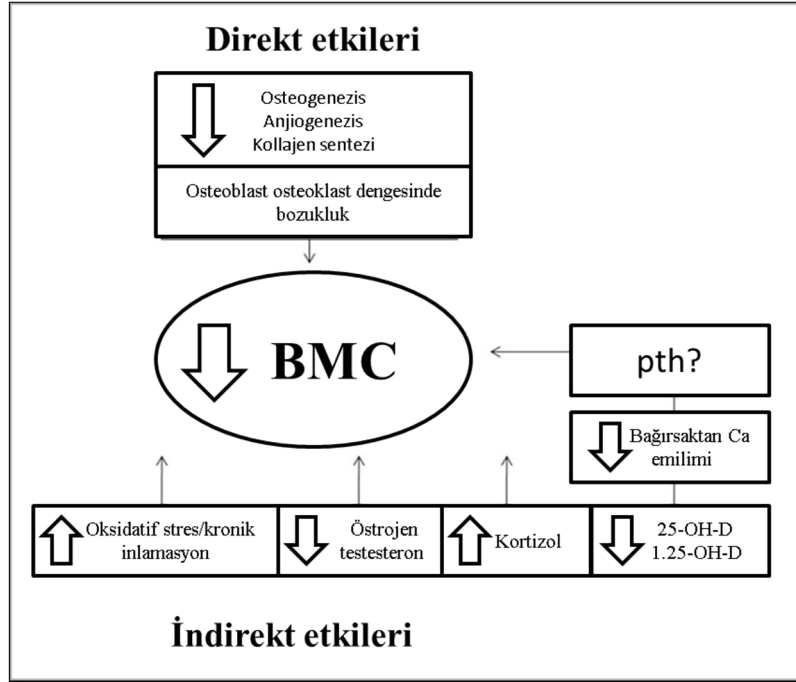
Sigara dumanı içerisinde bulunan pek çok toksik ve iritan kimyasal maddenin damar endotelinde hasara neden olduğu belirtilmiştir (6). Endotel hasarının görüldüğü bölgelerde trombositlerin aktive oldukları ve bu bölgelerde agregre olarak damar çapını daralttıkları ve salgıladıkları vazokonstrüktör maddeler nedeni ile kan akımını azalttıkları bilinmektedir (52). Sigara dumanı içinde bulunan oksidan maddelerin endotel membranındaki lipidlerde peroksidasyona yol açtığı gösterilmiştir. Lipid peroksidasyon ürünlerinin de yine endotel hücrelerine toksik etki yaptıkları bilinmektedir (6). Bu etkiler sigara ve doku nekrozu riski arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Sigaranın trombositlerde bulunan tromboksan A₂ (TxA₂) üretimini de uyardığı bilinmektedir. TxA₂ inaktif durumdaki trombositleri aktive eder, damarlar üzerinde kuvvetli vazokonstrüktör etki gösterir. TxA₂ sentezindeki artış da sigara içimi sonrası arteriyel kan akımında görülen akut azalmanın bir nedeni olabilir (53).

Johnson and Bain (2000) yara iyileşmesinin bozulmasını, sigara tüketiminin ardından plazmada artmış adrenal ve noradrenalin seviyelerinin periferel vazokonstrüksiyona ve polimorfonükleer lökositlerin fonksiyonlarının bozulmasına neden olmasıyla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (54).

2.2.2.2. Sigara ve Kemik Metabolizmasına Etkisi

Yapılan çalışmalarda sigaranın kemik metabolizmasına olan etkilerinin çeşitli mekanizmalar ile bağlantılı olabileceği rapor edilmiştir. Bunlar kemik anjiogenezinde (55), kollajen metabolizmasında (56), kalsiyotropik hormon metabolizması ve bağırsaklardan kalsiyum emilim mekanizmasındaki bozukluk (57), seks hormonlarının üretimi ve metabolizmasındaki düzensizlik, adrenalkortikal hormon metabolizmasındaki (4) ve Nükleer faktör-Kappa B Ligand reseptör aktivatörü (RANKL), Nükleer faktör-Kappa B reseptör aktivatörü (RANK) ve osteoprotegerin sistemdeki (RANK-RANKL-OPG) bozukluk (58) ve sigaranın kemik hücreleri üzerine direkt (59) hücresele etkileridir (Şekil 1).



Şekil 2. Sigaranın kemiğe etkileri (59)

İskeletsel gelişim süresince ve yaralanmaya bağlı olarak çok sayıda büyüme faktörü salgılanır. Büyüme faktörleri, kemiğin anjiogenezinde, kondrosit diferansiasyonu, osteoblast ve osteoklast oluşumu gibi kemik oluşumunun farklı aşamalarında gereklidir (60). Sigara, anjiogenez (55), lökosit gelişimini, sitokin fonksiyonlarını ve seviyelerini etkiler (61). Benzer şekilde sigara, osteoklastoprotegerin seviyelerini baskılar ve kemik oluşumunun azalması ile ilişkili

olabilir. Ancak sigaranın kemik iyileşmesi üzerindeki zararlı etkilerinden hangi mekanizmaların sorumlu olduğu kesin olarak açıklanamamıştır (58).

Sigaranın ana etken maddesi olan nikotinin vücutta D vitamini depolanmasını ve osteoblast aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (5). Sigara içiminden sonra artan kortizolün (62) ve sigarada yoğun olarak bulunan kadmiyumun kemik yoğunluğunu azaltabileceği de belirtilmiştir (63).

Sigaranın kemikler üzerinde direkt toksik etkisinin de olabileceği düşünülmektedir (3). Yapılan çalışmalarda kırıkların (37,64,65) veya kemik greftlerinin daha geç iyileştiği (66) ve iyileşen kemiklerde kemik gerilim direncinin önemli ölçüde azaldığı (64,65) rapor edilmektedir.

Prospektif çalışmaların değerlendirildiği meta-analiz çalışmasında sigara içme ve kemik miktarı arasında önemli derecede ilişki saptanmıştır. Sigara içenlerde kemik miktarı içmeyenlere göre oldukça düşük bulunmuştur (67).

2.2.2.3. Sigara ve Dental İmplantlar

Sigara tüketimi implant kaybı riskini %15,8 oranında arttırmakta ve günde 20 adetten fazla sigara tüketimi bu riski %30,8'e çıkarmaktadır (68). Sigara içenlerde yüzeyi iki kez asitlenerek pürüzlendirilen implantların kullanımı tavsiye edilmiştir (69).

Kasat and Ladda'nın (2012) yaptıkları çalışmada sigara ve dental implant arasındaki ilişki şu şekilde özetlenmiştir; sigara tüm vücutta olduğu gibi, implant tedavisinin de dahil olduğu, oral kavitedeki tedavilerin sonuçlarını da olumsuz etkiler, Sigara kullananlarda implant kalıcılığını arttırmak için implantları yerleştirmeden 1 hafta önce ve ameliyat sonrasında iki ay sigara kullanımına ara verilmesi tavsiye edilebilir. Sigara içen hastalarda implanta yükleme yapılmadan önce daha uzun süre beklenmeli ve implant komplikasyonlarının erken tesbit edilebilmesi için sık kontrole çağrılmalıdırlar (70).

2.2.2.4. Sigara ve Diş Çekimi

Giorgetti et al. (2012)'in yaptığı, sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda diş çekimi sonrası kemik iyileşmesinin histomorfometrik olarak değerlendirildiği çalışmada test grubunda, iyileşmenin yedinci gününde non-mineralize dokuda belirgin düşüş, iyileşmemiş alanda artış olduğu görülmüştür ve sigaranın erken dönemde kemik iyileşmesini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (71).

Meechan et al. (1988)'in yaptığı çalışmaya göre sigaranın neden olduğu fibrinolitik aktivite diş çekiminden sonra alveolün kanla dolmasını engeller ve bu nedenle alveolit sigara içenlerde sıklıkla görülür. 2417 hastada, 3541 diş çekilerek ağrılı soketlerin değerlendirildiği çalışmada postoperatif olarak soket yeterince kanlanmadığında ağrı olma olasılığı daha yüksek bulunmuştur. Sigara içenlerde, içmeyenlere göre soketin kanla dolması belirgin olarak azalmıştır (72).

Özkan ve arkadaşlarının (2014) ratlarda diş çekimi yaparak çekim soketindeki kemik iyileşmesini 3, 7, 15 ve 28. günlerde immünohistokimyasal yöntemle inceledikleri çalışmalarında sigara dumanının kemik iyileşmesini erken ve geç dönemde olumsuz etkilediğini rapor etmişlerdir (73).

2.2.2.5. Sigara ve Distraksiyon Osteogenezisi

Sigaranın intra oral distraksiyon osteogenezisine etkisinin değerlendirildiği klinik çalışma bulunmamakla beraber bir çalışmada tavşan modelinde yapılan mandibuler distraksiyonda düşük ve yüksek doz nikotin verilerek kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak yüksek doz nikotin verilen grupta diğer gruplara göre distraksiyon bölgesinde anlamlı derecede kemik yoğunluğu düşük bulunmuştur (30). Ayrıca sigaranın tibiada yapılan distraksiyonda mineralizasyonda gecikmeye ve yeni oluşan kemikte mekanik dayanıklılıkta azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (75).

2.2.2.6. Sigara ve Greftleme

Hollinger et al. (1999) yaptıkları çalışmada nikotinin osteoblast fonksiyonlarını bozarak kemik iyileşmesini olumsuz etkilediği ve otojen kemik grefti morbiditesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (66). Sigara dumanının neden olduğu ısı artışı, nikotin, CO ve hidrojen siyanit gibi tütünün yanmasıyla açığa çıkan ürünler, maksiller sinüs augmentasyonu gibi greftleme prosedürlerinde başarıyı etkileyen risk faktörlerindedir (76).

2.2.2.7. Sigara ve Kırık İyileşmesi

Sigara kırık iyileşmesini geciktirmekte, kemik mineral yoğunluğunu olumsuz etkilemekte ve osteomyelit riskini arttırmaktadır (77). Bu bulgular Benson'un (2006) 43 enfekte mandibula fraktürünü kapsayan çalışmasıyla desteklenmektedir. Bu çalışmada hastaların çoğunun günde 1 paketten daha fazla sigara içtiği gözlenmiştir (78).

Serena-Gomez and Passeri (2008) madde (sigara, alkol, hap) bağımlılarında postoperatif komplikasyon riskinin madde bağımlılığı olmayanlara göre 3,6 kat artabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmada post-operatif enfeksiyonun eşlik ettiği mandibula fraktürlerinin %37,5'ini sigara içen hastalar oluşturmaktadır (79). Sigaranın fraktür bölgesinde enfeksiyon gelişimi, yara dehissensi, kemik doku rejenerasyonunda bozulmaya neden olabileceği düşünülmektedir (33,80).

Sigara kemik iyileşmesini yavaşlatır, kemik mineral yoğunluğunu azaltır ve osteomyelit riskini de artırır (77). Sigaranın etkileri kullanım süresi, miktarı ve vücut ağırlığına göre değişmektedir. Sigaraya maruziyetin artması kemik yoğunluğunda daha fazla azalmaya neden olur.

Yapılan çalışmalarda çeşitli cerrahi işlemler öncesinde sigaranın kesilmesinin cerrahi bölge enfeksiyonlarını azalttığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda etkili olan en kısa ara verme süresi cerrahi öncesinde 2 hafta, sonrasında 10 gündür. Sigarayı bırakanlarda postoperatif komplikasyon riski, sigara içenlere göre daha düşük

bulunmuştur (43). Karbon monoksitin vücuttan atılma süresi minimum 12 saattir, bu süre göze alınarak cerrahi öncesinde en azından 12 saat sigara içilmemelidir (81).

2.3. Oksidatif Stres

2.3.1. Serbest Radikaller

Orbitallerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron içeren ve yüksek reaktivliğe sahip atom veya moleküllere ‘serbest radikal, oksidan molekül ya da reaktif oksijen türleri (ROT) denir (82). Birçok molekül elektron kazanarak veya kaybederek serbest radikal haline gelebilir fakat sınırlı bir kısmı patolojik olaylarda yer alırlar. Serbest radikaller molekülün sağ üst köşesine konulan nokta veya çizgi ile gösterilir (R^{\cdot} , R^{-}).

Serbest radikaller fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar esnasında oluşabilirler. Serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinin savunma mekanizmaları için ve bazı hücre sinyalizasyon süreçlerinde gereklidir fakat serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (83). Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi önemli bileşiklerine etki ederek yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijen ve azottan (84)oluşan radikallerdir (Tablo 2).

Serbest radikal hasarı hücreyi oluşturan organeller ve bu organellerin içerdiği bileşiklerle ilişkilidir. Bu organeller mitokondriler, endoplazmik retikulum, plazma membranı, lizozomlar, peroksizomlar ve nükleusdur. Bunların hepsinin membranları vardır ve hücreler için gerekli yapılardır. Bu yapıların en temel bileşikleri proteinler, lipidler ve karbonhidratlardır (85).

Tablo 2. Serbest Radikal Türleri

REAKTİF OKSİJEN VE AZOT TÜRLERİ		
	Radikaller	Radikal olmayanlar
REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROT)	Süperoksit, $O_2^- \cdot$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
	Hidroksil, $OH \cdot$	Hipokloröz asit, $HOCl$
	Peroksil, $ROO \cdot$	Hipobromöz asit, $HOBr$
	Alkoksil, $RO \cdot$	Ozon, O_3
	Hidroperoksil, $HO_2 \cdot$	Singlet oksijen, O_2^-
REAKTİF AZOT TÜRLERİ (RNT)	Nitrik oksit, $NO \cdot$	Nitröz asit, HNO_2
	Azot dioksit, $NO_2 \cdot$	Nitrozil katyonu, NO^+
		Nitroksil anyonu, NO^-
		Diazot tetroksit, N_2O_4
		Diazot trioksit, N_2O_3
		Peroksi nitrit, $ONOO^-$
		Peroksi nitröz asit, $ONOOH$
		Nitronyum katyonu, NO_2^-
	Alkil peroksinitritler, $ROONO$	

2.3.1.1.1 Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Organizmada en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Oluşan serbest radikal eşleşmemiş tek elektron nedeniyle çok reaktiftir ve bu tek elektronu başka bir moleküle verebilir (redüksiyon) ya da başka bir molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilir (oksidasyon). Sonuç olarak non-radikal bir yapıyı radikal haline getirebilir. Bu özellikleri ile reaktif oksijen türleri, radikaller ve radikal olmayanlar olmak üzere iki ana başlık altında incelenir. Radikal oksijen türevi olan bileşikler hidroksil, süperoksit, nitrik oksit iken, radikal olmayan oksijen türevi bileşikler olarak hidrojenperoksit, singlet oksijen, ozon, hipoklorit sayılabilir (86).

2.3.1.2. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikallerin hücre içi kaynakları; mitokondri, endoplazmik retikulum, nükleer membran ve mikrozomal elektron transport zinciri, küçük moleküllerin oto-oksidasyonu, oksido-redüksiyon reaksiyonları, peroksizomlar ve oksidazlar, çözümler

enzimler ve proteinler, plazma membranı, araşidonik asit metabolizması, prostaglandin sentezi gibi mekanizmalardır. Eksojen kaynaklı serbest radikaller olarak doymamış yağ asitleri, hayvansal proteinler, aşırı demir ve bakır alımı, alkol, iyonize edici radyasyon, güneş ışığı, ısı şoku, ilaçlar ve sigara sayılabilir (87).

2.3.2. Oksidatif Denge

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak tanımlanır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmez. Serbest radikallerin oluşum hızında artma veya ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak tanımlanan bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarı, kanser, diyabet ve ateroskleroz gibi patolojik durumların gelişmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (7,88,89).

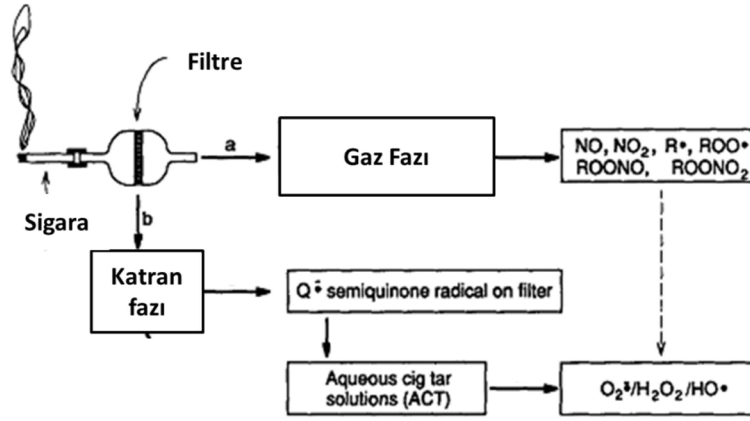
ROT, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH), nitrik oksit (NO), peroksil radikali (ROO) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (82).

2.3.3. Sigara ve Oksidatif Stres

Sigara, içerdiği çok sayıda zararlı madde ve yol açtığı hastalıklar nedeniyle serbest radikal hasarının izlenebileceği bir model oluşturmaktadır. Bu serbest radikaller gaz fazda 5 dakikadan uzun süre etkili olmaktadır (36). Akciğerlere bir nefeste çekilen sigara dumanı toplam 10^{17} oksidan molekül içerir ve bunların 10^{14} 'ü reaktif oksijen türleridir (35). Sigara dumanının gaz fazında bulunan süperoksit ve nitrojen oksit radikalleri hızlıca reaksiyona girerek peroksinitrite dönüşürler. Katran fazındaki hidrokinon redoks döngüsüne girerek süperoksit radikal ve hidrojen peroksit yolu ile semikinona, sonuç olarak da oksidatif strese neden olmaktadır (36),(Şekil 3). Hidrokinon ve hidrojen peroksit hücre içine girerek çekirdekteki

DNA'nın hasarına neden olurlar. Nitrik oksit fizyolojik olaylar için önemlidir ancak yüksek miktarlarda toksiktir. Sigara dumanındaki nitrik oksit 500 ppm'e kadar yükselebilir. Sigara dumanındaki nitrik oksit ve diğer serbest radikaller oksidasyon reaksiyonlarını tetikleyerek membran ve proteinlerin yapısını değiştirirler (90). Sigara dumanındaki nitrik oksitin yavaş bir şekilde dakikalar içinde nitrojen dioksit (NO_2) dönüştüğü gösterilmiştir (35). Süperoksit anyonu ile NO'nun yıkılması vazodilatasyonu engeller. Süperoksit anyonlarının artmasıyla NO hızlı bir şekilde inaktive olur ve endotele bağlı vazodilatasyonun bozulmasına katkıda bulunur (91).

Sigara içen ve içmeyen bireyler oksidatif stres açısından karşılaştırıldığında sigara içenlerde GSH-Px ve SOD antioksidan enzim düzeylerinin düşük olduğu ve lipid peroksidasyon, MDA seviyesi gibi oksidatif stres belirteçlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (92).



Şekil 3. (a) Gaz faz, (b) Partiküler faz. Gaz faz karbon ve oksijen radikallerini içerir. Katran fazı semikinon ve hidroksil radikallerini içerir (36)

Sigara dumanında bulunan ya da kimyasalların biyotransformasyona uğraması sonucunda ortaya çıkan serbest radikallerle hasara uğrayan çok sayıda organ ve doku bulunmaktadır. Özellikle oksijen ve karbon merkezli radikaller, nitrik oksid (NO) ve azot dioksit (NO_2) gaz fazında bulunur. Gaz fazdaki partiküller kısa ömürlüdür. Katran fazında temel olarak hidrokinon-kinon siklusu tarafından üretilen ve suda eriyebilen radikaller vardır (93). Partiküler fazdaki bazı radikaller DNA'yı etkileyebilmektedir. Bu bilgilere dayanarak, serbest radikallere maruziyet ve oluşturdukları hasarı belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır ve sigara içenlerde görülen etkiyi araştırmak önem taşımaktadır (8).

Sigara dumanının mutajenik ve karsinojenik etkileri pek çok çalışmada gösterilmiştir. Sigara kullanımı ile oluşan serbest radikaller DNA'ya etki ederek karsinogenezde önemli rol oynarlar. Endojen antioksidanların seviyesi oksidatif strese ve kansere karşı duyarlılığı belirler (84).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanlar

Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere 'antioksidan' adı verilir (94,95). Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayanlar olarak iki gruba ayrılır (96),(Tablo 3).

Tablo 3. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanlar

ANTIÖKSİDAN SİSTEMLER			
Enzimatik antioksidanlar	Non-enzimatik antioksidanlar		
	Süpürücü Antioksidanlar	Koruyucu Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar
Süperoksit dismutaz	Askorbik asit (C vitamini)	Transferrin	N-asetilsistein
Glutasyon peroksidaz	α -tokoferol (E vitamini)	Albumin	Allopurinol
Paraoksonaz	Tiyoller	Seruloplasmin	Probakol
Katalaz	B-Karoten	Ferritin	Penisilinamin
	Ürik asit		Deferoksamin
	Polifenoller		Butil-hidroksitoluen
	Koenzim Q		

2.4.1. Enzimatik Savunma Sistemleri

Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, glutatyon-s-transferaz vücudun enzimatik savunma sistemlerini oluştururlar. SOD, O_2^- radikaline karşı koruyucu olan enzimlerin en önemlisidir. Hücre dışı SOD, damar düz kas hücrelerinde üretilir ve hücre dışına salınır. CAT, peroksizomlarda lokalize bir hemoproteindir. Bitkiler, hayvanlar ve aerobik bakterilerde bulunan bir enzimdir. En yüksek reaksiyon hızına sahip olan enzimdir. Karaciğer ve eritrositlerde yüksek aktiviteye sahiptir (97). Glutatyon oksidatif hasar durumunda DNA onarımını sağlar, OH^{\cdot} radikalini ve singlet oksijeni doğrudan süpürür, lipid peroksitleri ve hidrojen peroksitleri detoksifiye eder, antioksidan etkili vitaminlerin yenilenmesini sağlar. GPx, Hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroksiperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur (98). Glutatyon redüktaz, GPx tarafından yükseltgenen okside glutatyonu NADPH koenziminin katalizörlüğünde redükte form olan GSH'a dönüştürür. GPx ile birlikte glutatyon redoks döngüsünde hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasını sağlar (99).

2.4.2. Enzimatik Olmayan Savunma Sistemleri

Sentetik ve doğal antioksidanlardır. Sentetik antioksidanlar genel olarak gıda koruyucu olarak kullanılmaktadırlar (100). C ve E vitamini, karotenoidler, polifenolik bileşikler doğal antioksidanlardan bazılarıdır. Güçlü bir indirgeyici ajan olan C vitamini, süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler (101). E vitamini, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkilerinden korur, lipid peroksidasyonunu inhibe eder (102). Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren aromatik yapılardır. Polifenollerin serbest radikal süpürücü aktivite için ideal kimyasal yapıya sahip oldukları ve α -tokoferol ve C vitamininden daha etkin antioksidan özellik gösterdikleri ispatlanmıştır. Molekül yapılarına bağlı olarak alt sınıflarda incelenebilirler. Resveratrol polifenol grubuna mensup bir antioksidandır (103).

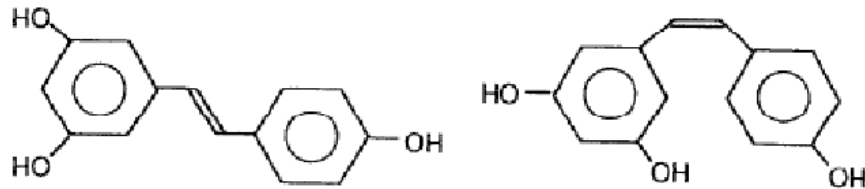
2.4.3. Resveratrol

Resveratrol (3,4',5-Trihydroxystilbene), bitkilerin büyüme ve gelişme aşamalarının herhangi bir döneminde stres olarak tanımlanan susuzluk, ultraviyole ışık, ozon maruziyeti, fungal enfeksiyonlar ve çevresel stres gibi bazı etkiler ile karşılaştıklarında, dayanıklılık mekanizmasının oluşturulması amacıyla bitki tarafından üretilen polifenolik bir fitoaleksinin olarak adlandırılan, ikincil bitki metabolitidir (104).

Resveratrol ilk olarak 1940 yılında Veratrum Album'dan izole edilmiştir ve 4500 yıl öncesinde uzak doğuda ilaç olarak kullanıldığı öğrenilmiştir (105). 1970'li yıllarda ise yapılan epidemiyolojik çalışmalar Fransa'nın güneyinde yağlı diyet ve yüksek sigara tüketimine rağmen kalp-damar hastalıklarının az görülmesinin nedeni olarak şarap tüketiminin fazla olması ile ilişki bulmuşlardır ve bu durumu 'Fransız Paradoksu' olarak isimlendirmişlerdir. Bu konu ile yapılmış olan çalışmalar paradoksun etkeni olarak resveratrolü göstermektedir (106,107). Üzümün kabuğunda yaklaşık olarak 50-100 µg/g resveratrol bulunmaktadır. Üzüm dışında dut, yaban mersini, böğürtlen, yer fıstığı gibi çok sayıda besin maddesinde bulunur (105).

2.4.3.1. Resveratrolün Kimyasal Yapısı

Resveratrolün molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$, molekül ağırlığı 228,25 daldondur. Resveratrol cis ve trans izomeri halinde bulunur (Şekil 4). Trans formunun biyolojik aktiviteleri, cis formundan daha yüksektir. Koruyucu etkisinden de trans formunun sorumlu olduğu gösterilmiştir (104).



Şekil 4. Trans-resveratrol

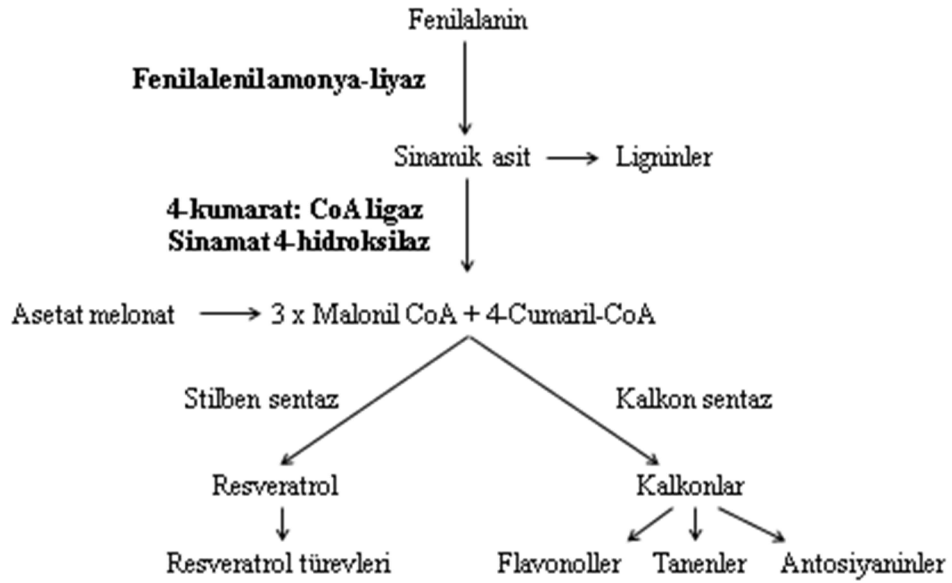
Cis-resveratrol

2.4.3.2. Resveratrolün Farmakolojisi

2.4.3.2.1 Biyosentezi

Resveratrol biyosentezi fenilalanininden başlar. Fenilalaninin deamilasyonu ile sinamik asit oluşur. Sinamik asit, 4-kumarik asitle yükseltgenir, 4-kumarol koenzim A (4-kumaril-CoA) ile ester yapısına dönüşür ve sentezi yapısal değil indüklenebilir. 1 molekül 4-kumarol-CoA ve 3 molekül malonil-CoA tetraketid yapısını oluşturur. Ortamda resveratrol sentaz varsa ürün olarak resveratrol, kalkon sentaz varsa flavonoid oluşur (105), (Şekil 5).

Resveratrol esas olarak albumine bağlanarak kanda taşınır. Lipoproteinlere de bağlandığı bildirilmiştir. Hücre içine taşıyıcı aracılı geçiş ve pasif difüzyonla alınmaktadır (108).



Şekil 5. Stilben fitoaleksinlerinin biyosentez yolu (105).

2.4.3.2.2 Resveratrolün Biyotransformasyonu

Resveratrolün farklı doz ve veriliş süreleriyle ilgili yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre, resveratrol oral yoldan alındıktan kısa bir süre sonra

bağırsaklardan emilir ve 1 saat gibi kısa bir sürede kana geçer. Karaciğer, böbrek, kalp ve beyin başta olmak üzere vücuda dağılır. Biyotransformasyonu esas olarak karaciğer mikrozomlarında ve az miktarda da bağırsaklarda olur. Oksidoredüksiyon reaksiyonlarına uğrar ve idrarla atılır (109).

2.4.3.3. Resveratrolün Biyolojik Aktiviteleri

Resveratrol biyolojik olarak oldukça geniş bir aktiviteye sahiptir. En çok bilinenleri antioksidan, osteojenik, antiinflamatuvar, analjezik, kardiyoprotektif, nöroprotektif, vasküler hücrelerde adezyon önleyici, yaşlanmayı önleyici, antitümör etkilerdir (109,110).

2.4.3.3.1 Resveratrol ve Kemik Metabolizması

Literatürdeki çalışmalar resveratrolün, osteoklastogenezisi ve kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiğini, osteoblastogenezisi artırdığını, kemik iliğindeki osteoblast öncü hücrelerinde, D vitamini reseptör ekspresyonunu stimüle ettiğini bildirmiştir (10,20,111,112,113,114). Resveratrolün anti-inflamatuvar özelliğinin, inflamatuvar mediatörlerin aşırı salgılanmasına bağlı osteoklast aktivitesinin artmasıyla oluşan kemik rezorpsiyonunu engellediği rapor edilmiştir (115). Resveratrolün kemik mineral yoğunluğunu (116,117), kemikleşme miktarını, BMP proteinlerini ve osteopontin düzeyini artırdığı (118) bildirilmiştir. Song et al. (2006) ile Dai et al. (2007) östrojen reseptörlerinin NO/cGMP sinyal yolunu direkt olarak etkilemesiyle resveratrolün osteoblast oluşumunu artırdığını bildirmişlerdir (112,119).

Resveratrol doza bağlı olarak osteoblastlardan alkalen fosfataz ve prolilhidroksilaz ekspresyonunu artırır (120). Osteoblastik farklılaşmayı artırdığı gibi RANKL'in indüklediği osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu da inhibe eder (20). Ayrıca resveratrolün intermaksiller sutura enjeksiyonunun yeni kemik alanını ve osteoblast sayısını artırdığı rapor edilmiştir (121).

Resveratrol osteoklast farklılaşmasında temel rol oynayan RANKL sinyalizasyonunu engellemektedir (10). Resveratrolün, osteoklast farklılaşmasını engellemesinde farklı mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir. Periferal kandaki mononükleer hücreler, makrofaj-koloni-stimulan-faktör ve RANKL ile muamele edilmişlerdir. Bu hücre kültürlerine resveratrol ilave edildiğinde tartarat rezistant asit fosfataz (TRAP-osteoklast belirteci) oluşumunu ve katepsin-K (osteoklastik kemik rezorpsiyonunda anahtar bir proteaz) artışıını inhibe ettiği rapor edilmiştir (122).

2.4.3.3.2 Antioksidan Etki

Resveratrolün güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir ancak serbest oksijen radikallerini toplayıcı ve nötralize edici etki mekanizması net olarak anlaşılammıştır (123). Resveratrol, C vitaminine göre 20-50 kat daha fazla etkili bir antioksidandır ve immün sistemi güçlendirmektedir (124).

Delmas et al. (2005)'in yaptığı çalışmada resveratrolün antioksidan etkisinde bazı enzimatik sistemlerin ya da makrofajların rol oynadığı gösterilmiştir (125). Metal iyonu ile uyarılmış düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunda endotel hücrelerinde NADPH bağımlı oksidaz, hipoksantin, ksantin oksidaz (HX/PO), 15-lipooksijenaz (15-LO), miyeloperoksidaz (MPO) nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri üzerinden etki göstermektedir (105). Bu enzimler hücre içi serbest oksijen radikallerinin endoteldeki oluşumunu azaltırken lökosit adezyonunu da inhibe etmektedir (126).

Resveratrolün H_2O_2 üretimini azalttığını, miyeloperoksidaz aktivitesini ve okside glutasyon redüktaz miktarını düzenlediğini gösteren araştırmalar bulunmaktadır (127,128).

Resveratrol serbest radikal oluşumunu engellemektedir. Antioksidan aktivitesi ribonükleotide, redüktaz inhibisyon yeteneğine ve DNA polimeraz aktivitesindeki siklooksijenaz transkripsiyon yeteneğine bağlanmaktadır (105). OH^\cdot ve $O_2^{\cdot-}$ radikallerini süpürür, OH^\cdot radikalının neden olduğu lipit peroksidasyonunu inhibe eder, OH^\cdot ve H_2O_2 'in neden olduğu DNA hasarını önler. Protein

oksidasyonunu engeller. Serum antioksidan kapasitesini arttırır. LDL oksidasyonunu önlemektedir (105,123). Domuzlarda yapılan bir araştırmada LDL oksidasyonu sırasında doymamış yağ asitlerinin yıkım ürünleri ölçülmüş ve trans resveratrolün serbest radikallerle şelat oluşturduğu gözlenmiştir (105). Cis izomerinin şelasyon kapasitesinin trans izomerinin yarısı kadar olduğu ve bunun nedeninin hidroksil grubunun yerinin şelasyon yeteneğine etkisi olduğu belirtilmiştir (128).

Resveratrol vital hücrelerde oksidatif strese bağlı gelişen zararlı etkileri azaltır. Sıçanlarda yapılan dopaminerjik nöronal hücre modelinin oluşturulduğu çalışmada demir ve etanolün neden olduğu lipid peroksidasyonuna resveratrolün etkisi araştırılmıştır. Bu hücreler serbest radikaller ve hafif metal iyonlarına duyarlıdırlar. Çalışmada resveratrolün, hücreleri oksidatif stres ve doku hasarından koruduğu bulunmuştur (129). Baur et al. (2006)'in yüksek kalorili diyetle beslenen orta yaştaki fareler üzerinde yaptıkları çalışmada resveratrolün fizyolojiyi değiştirerek yaşam süresini belirgin derecede arttırdığı bulunmuştur (130). Resveratrol; artmış insülin sensitivitesi, azalmış insülin-like growth factor-1 (IGF-1) seviyesi, artmış AMP-activated protein kinase (AMPK) ve peroksizom proliferatör gamma ko-aktivatör 1 alfa aktivitesi, artmış mitokondri sayısı, gelişmiş motor fonksiyon gibi uzun yaşam süresiyle alakalı değişikliklere neden olur (130). Resveratrolün sirtuinleri taklit ederek hücrelerin canlılık süresini arttırdığı, alzheimer ve parkinsonda koruyucu rolü olduğu bildirilmiştir (131).

2.4.3.3 Antiinflamatuvar Etki

Resveratrolün proteazlar, kompleman sistemi, bradikininler, sitokinler, protaglandinler, NO ve adezyon molekülleri gibi endojen enflamasyondan sorumlu maddelerin oluşumunu inhibisyonu ile antiinflamatuvar etki ortaya çıkmaktadır. Siklooksijenaz (COX) enzim inhibisyonu, NO oluşumu ve salınımının engellenmesi antiinflamatuvar özellikle etkilidir. Trombositlerde araşidonik asit ürünleri lipooksijenaz yolağı, COX ve prostoglandin H sentaz yolağında sentezlenmektedir. Resveratrol lipooksijenaz yolağını inhibe ederek bazı enflamatuar maddelerin salınmasını engellemektedir (132). Araşidonik asit ve prostaglandin E-2 üretiminde

inhibitör etki göstermiştir. Böylece resveratrolün hem antiproliferatif hem de antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Resveratrol hem COX-2'yi direkt inhibe ederek hem de reaktif oksijen türevlerini inhibe ederek antiinflamatuvar etki göstermektedir (103). Ratlarda deneysel olarak kolit oluşturulduktan sonra 3 mg/kg resveratrol verilerek histopatolojik değişiklikler, inflamatuvar belirteçler, kilo kaybı ve kanama durumu incelenmiştir. Resveratrolün enflamasyonu anlamlı şekilde azalttığı, prostoglandin E sentaz-1, siklooksijenaz-2, nitrik oksit sentaz protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (133).

2.4.3.3.4 Yaşlanmayı Önleyici Etki

Resveratrolün orta yaşlı yüksek kaloriyle beslenen farelerin ömrünü, insülin duyarlılığını ve mitokondri sayısını artırarak uzattığı gösterilmiştir. 114 haftalık deney protokolü sonunda yüksek kalorili diyetle beslenen sıçanların %58 'i, yüksek kalorili diyetle birlikte resveratrolle beslenen sıçanların %42'si, standart diyetle beslenen sıçanların ise %45'inin öldüğü görülmüştür (130).

2.4.3.3.5 Antiviral Etki

HSV-1 ile enfekte olan ratlara resveratrol topikal olarak %12,5-25 oranında infeksiyondan sonraki 1-6 saat içinde uygulanmasında cilt lezyonunu azalttığı gözlenmiştir (134).

2.4.3.3.6 Antikanserojen Etki

Resveratrol kanserin başlangıç safhasındaki inhibitör aktivitesini çeşitli mekanizmalar üzerinden gerçekleştirir (135);

- Serbest radikal oluşumunu engeller,
- Sitokrom P450 gibi Faz 1 enzim aktivitelerinin engellenmesi,

- Küron redüktaz ve transferaz gibi Faz 2 enzimlerinin aktive edilmesi.

Kanserin ilerlemesindeki inhibitör aktivitesini COX₂ enzim aktivitesini inhibe ederek gerçekleştirir. Kanserin yayılmasını ise p53 tümör baskılayıcı genin ekspresyonunu arttırarak ve kanser proteini olarak bilinen Bcl-2 ekspresyonunu da azaltarak önlediği kabul edilmektedir (136).

2.4.3.3.7 Kemosensitizasyon/Radyosensitizasyon

Kemoterapotik ajanlar tümör hücrelerine etki ederken aynı zamanda sağlam hücrelere de zarar vermektedirler. Resveratrolün kemoterapotik ajanların neden olduğu kemosensitivasyonu Bcl-2 inhibisyonu ile azalttığı bilinmektedir (134).

Resveratrolün iyonize radyasyonun etkisini sağlıklı dokularda azaltma etkisi bulunmaktadır (134).

2.4.3.3.8 Kardiyovasküler Koruma:

Resveratrol koroner kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır (123) ve ateroskleroz oluşumunun farklı basamaklarında etki göstermektedir. Bu basamaklar (125); lipit birikimi, LDL oksidasyonu, monosit ve lenfosit infiltrasyonu, düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu, trombosit agregasyonudur.

2.4.3.3.9 Vazodilatör Etki:

Hemodinamik değişim durumlarında endotelden salınan vazodilatör, antitrombotik ve antimikotik faktörler etkilidir (137). Resveratrol ile ilgili yapılan çalışmalarda vazodilatör etkisinden pek çok mekanizmanın sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Bunlardan bir tanesi resveratrolün düz kaslar üzerine olan etkisi ile açıklanmıştır (138). Ayrıca resveratrol östrojene benzerliği nedeniyle bir fitoöstrojen

olarak değerlendirilir ve östrojenlere benzer şekilde eNOS (endotelyal nitrik oksit sentaz) aktivitesini arttırarak vazodilatasyona aracılık edebilir (139).

2.4.4. Oksidatif Stres ve Antioksidan Biyobelirteçleri

Oksidatif stres, genelde lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA, oksidatif DNA hasar göstergesi olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OhdG), protein oksidasyonu, SOD, GPx, CAT, glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler, α -tokoferol, askorbik asit, glutatyon, ubikinon, sistein gibi antioksidanların ölçümü ile belirlenir (95). Oksidatif stres durumunu değerlendirmek için sıklıkla kullanılan belli başlı yöntemler Tablo .4'te özetlenmiştir.

Tablo 4.Oksidatif Stres ve Antioksidan Biyobelirteçleri

Parametreler	
1.Radikallerin ölçümü	Elektron paramagnetik rezonans spektroskopisi
2.Oksidatif hasar biyobelirteçlerinin ölçümü	<p>a. Lipit peroksidasyon ürünlerinin belirlenmesi <i>Malondialdehit (MDA)</i> <i>Aldehitler</i></p> <p>b. Protein hasarının belirlenmesi</p> <p>c. DNA hasarının belirlenmesi <i>8-hidroksi-2'guanozin (8-OhdG)</i></p>
3.Antioksidan savunma sisteminin ölçümü	<p>a.Antioksidan enzimlerin değerlendirilmesi <i>Süperoksit dismutaz (SOD)</i> <i>Glutasyon peroksidaz (GPx)</i> <i>Katalaz (CAT)</i> <i>Glutasyon S transferaz (GST)</i> <i>Glutasyon redüktaz (GR)</i></p> <p>b.Total antioksidan kapasitenin belirlenmesi</p> <p>c.Düşük molekül ağırlıklı antioksidanların ölçümü <i>a-tokoferol</i> <i>Askorbik asit</i> <i>Glutasyon</i> <i>Melatonin</i></p>
4.Enzim kofaktörlerinin ölçümü	Cu, Zn, Mn, Se, Fe elementleri

2.4.5. Total Antioksidan Kapasite/Total Oksidan Kapasite

Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini total antioksidan kapasite (TAK), oksidanların toplam etkisini ise total oksidan kapasite (TOK) yansıtır. Plazmada tüm oksidanlar etkileşim halindedir. Bu etkileşimden dolayı bileşiklerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilmektedir. Vücudun antioksidan/oksidan durumu antioksidan enzimlerin aktivitesi ve antioksidan/oksidan moleküllerin konsantrasyonu ayrı ayrı ölçülerek değerlendirilebilmekle birlikte genel antioksidan/oksidan durumu TAK ve TOK ölçümü ile daha kolay

değerlendirilmektedir (140,141). Bu metodla, lipit, protein ve DNA gibi biyomoleküllerdeki oksidatif hasara yol açan potansiyel serbest radikal reaksiyonlarına karşı özellikle hareket eden serum ve dokuda TAK ve TOK ölçülebilir (142).

Sigaranın dokularda oksidatif hasara yol açtığı ve kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. Sigaranın neden olduğu bu oksidatif hasarı önlemek için çeşitli antioksidanlarla çalışmalar yapılmaktadır. Flavonoid grubundan bir antioksidan olan resveratrol, antioksidan özelliğinin yanı sıra osteoblast stimülasyonu ve osteoklast inhibisyonuna neden olmaktadır. Bu çalışmada sigaranın ve resveratrolün oksidatif stres ve kemik iyileşmesi üzerine etkilerinden yola çıkarak sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda yeni kemik oluşumu ve oksidatif sistem üzerine resveratrolün etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü tarafından 3241-D1-12 proje numarasıyla desteklenmiştir (Ek 1). Araştırmamız Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından hayvan etiği açısından uygun görülmüştür ve 14.08.2012-10 numarası ile kabul edilmiştir (Ek 2). Çalışmamızda deney hayvanı olarak kullanılmak üzere 38 adet iskeletsel gelişimini tamamlamış 6-8 aylık, erkek, ortalama 250-300 gram ağırlığında Spraque-Dawley cinsi rat, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı Başkanlığından temin edilmiştir. Çalışmada etik kurallara uygun olarak deneye tabi tutulan her hayvan deney süresince 21-22⁰C oda sıcaklığında, %50 nem ayarlı, optimize edilmiş küçük hayvan odalarında tabanı talaş ile kaplı Eurotype 4 kafeslerde (Radon, Türkiye), bir kafeste en fazla 10 hayvan olacak şekilde barındırılmıştır. Ratlar, normal şehir suyu ve %21 protein içeren hazır standart pelet yem ile bazal miktarda (ad libitum) beslenmiştir. Gün içerisinde yapılan kontrollerde ratların genel sağlık durumları, genel güçsüzlük, yem ve su alımında azalma, dispne, cilt-tüy değişikliği, kafes temizliği ve haftalık kontrollerde ağırlıkları takip edilmiştir.

3.1.1. Gruplar

Deney hayvanları kontrol grubunda 8, deney gruplarında 10 hayvan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Deneyin ilk 4 haftasında sigara dumanına maruz bırakılan gruplara gaz odasında, duman jeneratörü bölgesinde üretilen sigara dumanı verildi. Sigaraya maruz bırakılmayan kontrol grubu ve resveratrol grubuna gaz odasının düzeneğiyle aynı şekilde oluşturulan cam kafeste duman jeneratörü olarak kullanılan fan ile oda havasına maruz bırakılmışlardır. Bu sayede bütün gruplarda stres şartlarının aynı olması hedeflenmiştir. Dört haftalık sigara maruziyeti

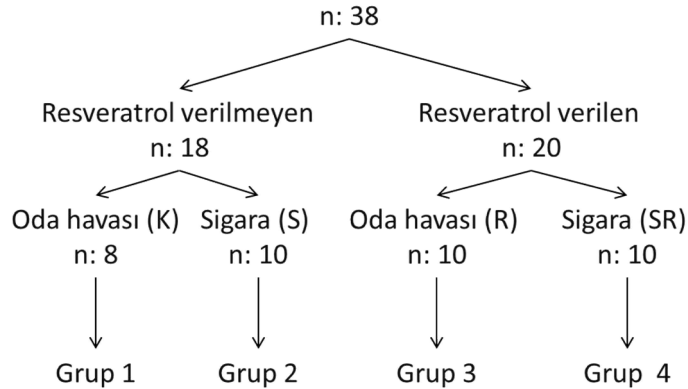
sonrasında tüm deney hayvanlarında kemik defektleri oluşturuldu. Aynı gün resveratrol verilecek gruplara, dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülmüş resveratrol (20 mg/kg) su ile 1 ml'ye tamamlanarak gavaj yoluyla verildi. Resveratrol verilmeyen gruplara da 20 mg/kg dozunda resveratrolü çözecek miktardaki DMSO (sulandırılarak) verildi. Ratlar cerrahi sonrasında 28. günde genel anestezi altında egzanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sağ femurlar, kan ve dil örnekleri alındı. Biyokimyasal ve histomorfometrik değerlendirme yapıldı (Şekil 6).

1. Grup (Kontrol); 4 hafta günde iki seans, toplam 80 dakika, oda havası verildi, 28. günde trefin frezle femurda 3 mm çapında defekt oluşturuldu ve 4 hafta boyunca gavajla DMSO çözücüsü verildi (20 mg/kg resveratrolü çözecek miktarda).

2. Grup (Sigara); 4 hafta, 3 sigara/seans olmak üzere günde iki seans sigara dumanı verildi, 28. günde trefin frezle femurda 3 mm çapında defekt oluşturuldu ve 4 hafta boyunca gavajla DMSO çözücüsü verildi (20 mg/kg resveratrolü çözecek miktarda), deney sonuna kadar sigara dumanı verilmeye devam edildi.

3. Grup (Resveratrol); 4 hafta günde iki seans temiz hava verildi, 28. günde trefin frezle femurda 3 mm çapında defekt oluşturuldu ve 4 hafta boyunca gavajla DMSO çözücüsü içinde 20 mg/kg resveratrol verildi.

4. Grup (Sigara+Resveratrol); 4 hafta, 3 sigara/seans olmak üzere günde iki seans sigara dumanı verildi, 28. günde trefin frezle femurda 3 mm çapında defekt oluşturuldu ve 4 hafta boyunca gavajla DMSO çözücüsü içinde 20 mg/kg R verildi, deney sonuna kadar sigara dumanı verilmeye devam edildi.



Şekil 6. Gruplar

3.1.2. Sigara Dumanının Oluşturulması

Deneyin ilk 4 haftasında sigara dumanına maruz bırakılacak deney gruplarına (Grup 2 ve 4) 75x75x50 ölçülerindeki cam kafeste, içeriğinde 10 mg zifir, 1 mg nikotin ve 10 mg karbonmonoksit bulunan Tekel 2000 marka sigaradan elde edilen sigara dumanı verildi. Kafes, üzerinde fan çapında açıklığı bulunan cam kapaklar ile kapatıldı (Resim 1).

Deney hayvanlarını sigara dumanına maruz bırakmak için hazırlanan düzenek bu çalışma için tarafımızdan özel olarak hazırlandı. Sigara dumanı herhangi bir borudan geçmeden, sigara özel bir süzgeç içinde yakılarak küllerinin kafesin içine dökülmesi engellendi (Resim 2). Duman jeneratörü olarak 25x15x15 cm ebadında üzerinde 2 cm²'lik bir çıkış deliğı olan cam bir hazne kullanıldı. Tabanı açık olan bu haznenin içinde 1 sigara/10 dak olmak üzere sigara dumanı üretildi ve yakılan sigaranın hem ucundan hem de filtresinden çıkan duman, kapak üzerine sabitlenmiş fan yardımı ile cam kafesin içine aspire edildi. Her sigaradan sonra cam kafes 5 dakika havalandırıldı. Deney hayvanları, günde iki seans, sabah ve öğleden sonra olarak dumana maruz bırakıldı. Bir sigaranın yanma süresi 10 dakika ve havalandırma süresi 5 dakika olmak üzere bir seansta 3 sigara yakılarak, günde toplam 80 dakika bu protokol uygulandı.

Böylece deney hayvanları gaz odasında günde iki seans, toplam 6 adet sigara dumanına maruz bırakıldı.



Resim 1. Sigara dumanının oluşturulması ve verilif y6ntemi



Resim 2. Duman jenerat6r6

3.2. Cerrahi Girişim

Ratlara preanestezik ajan olarak 10 mg/kg Xylazine HCl (Alfazyne, Ege-Vet, T6rkiye) ve genel anestezik ajan olarak 80 mg/kg ketamin HCl (Alfamine®, Ege-Vet, T6rkiye) İP enjeksiyonu yapılarak genel anestezi sağlandı. Anesteziden sonra

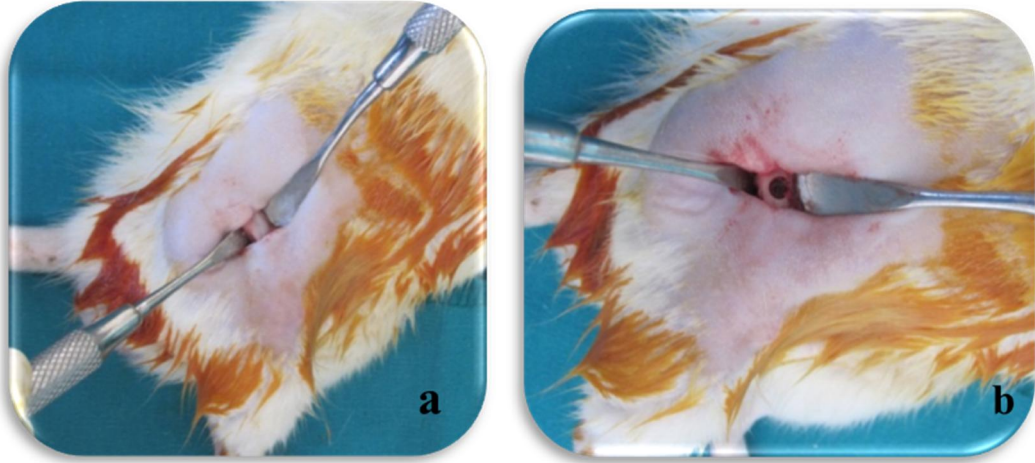
hayvanların sağ femur b6lgesi iyot solusyonu ile dezenfekte edildi ve traşlandı. Steril koşullar altında femurun dış medial tarafında yaklaşık 1 cm uzunluğunda cilt insizyonu yapılarak künt diseksiyonla kaslar ve periost eleve edildikten sonra femurun yüzeyine ulaşıldı (Resim 3,4). Serum fizyolojik irrigasyonu altında tur motoru piyasemenine takılı 3 mm çapındaki yuvarlak uçlu cerrahi trefin frez yardımı ile korteksten medullaya ulaşan 3 mm çapında monokortikal kemik defekti oluşturuldu (Resim 5 a,b).



Resim 3. Operasyon alanının traşlanarak tüylerden arındırılması

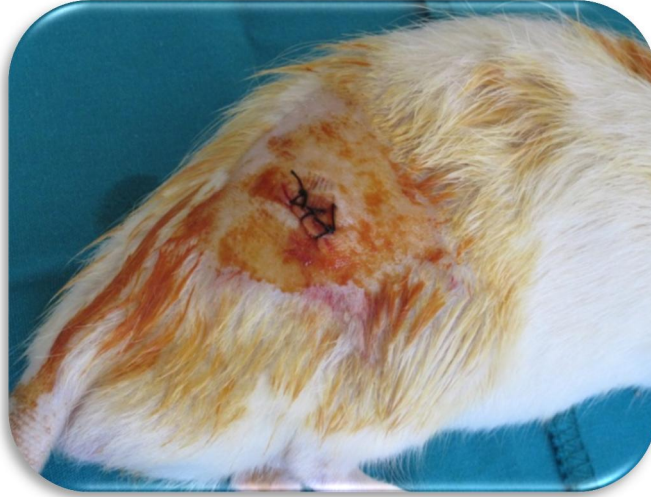


Resim 4. Cilt kesisi



Resim 5. a. Femur kemiğinin açığa çıkarılması, b. 3 mm'lik frezler ile defekt açılması

Defektler açıldıktan sonra cerrahi alan serum fizyolojik ile yıkandı ve kemik yüzeyinden diseke edilen kaslar 3/0 katgüt suture (Doğsan, Trabzon, Türkiye) ile, cilt ise 3/0 ipek suture (Doğsan, Trabzon, Türkiye) kullanılarak primer olarak dikildi (Resim 6).



Resim 6. Operasyon alanının suture edilmesi

3.3. Postoperatif Takip

Ameliyat sonrası enfeksiyon kontrolü için beş gün süreyle tüm ratlara intramuskuler 5 mg/kg/gün Amikasin sülfat (Amikozit®, Zentiva, Türkiye) antibiyotik ve ağrı kontrolü için 3mg/kg/gün Ketoprofen (Profenid® ampul, Sanofi Aventis, Türkiye) analjezik verildi.

3.4. Resveratrolün Hazırlanması ve Verilmesi

Resveratrol (Sigma, USA) üretici firmanın önerisi doğrultusunda 16 mg resveratrol/1 ml DMSO olacak şekilde DMSO (Sigma, USA) çözücüsü içinde çözdürüldü (Resim 7,8).



Resim 7. a,b. Resveratrol



Resim 8. DMSO

Hergün taze olarak hazırlanan resveratrol 20 mg/kg olacak şekilde insülin enjektörüne çekildikten sonra su ile 1 ml'ye tamamlanarak gavaj iğnesi ile deney hayvanlarına verildi (Resim 9).



Resim 9. Gavaj uygulaması

3.5. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu ve Kan ile Dil Örneklerinin Elde Edilmesi

Deney hayvanları, cerrahi sonrasında 28. günde genel anestezi altında egzanguinasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Vena cavadan yaklaşık 8 ml kan alındı (Resim 10). Alınan kanlar kırmızı kapaklı jelli biyokimya tüplerine alındı ve santrifüj işleminden önce 5 dakika bekletildi. Kanlar santrifüj edildi ve serumları ayrılarak -86 °C’de saklanmak üzere kaldırıldı. Dil dokusu çıkartılarak alüminyum folyo içinde -86 °C dolaba alındı.



Resim 10. Vena cavadan kan alınması

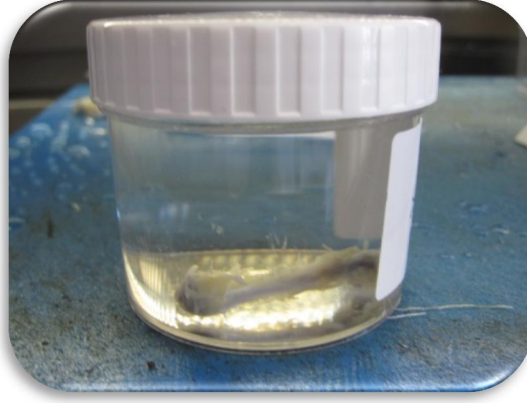
3.6. Deney Hayvanlarından Kemik Örneklerinin Elde Edilmesi

Sakrifikasyondan sonra ratların sağ bacaklarındaki femuru çevreleyen yumuşak dokular diseke edilerek femura ulaşıldı ve rezeke edildi (Resim 11).



Resim 11.Femurun rezeksiyonu ve iyileşen defekt

Defekt bölgelerinin içine alan femoral kemik örnekleri tek tek %10'luk formalin (Merck, Darmstadt, Almanya) içerisinde histomorfometrik analiz uygulanmak üzere muhafaza edildi (Resim 12).



Resim 12. Kemiklerin formalin solüsyonunda fikse edilmesi

3.7. Kesit Hazırlama Yöntemi

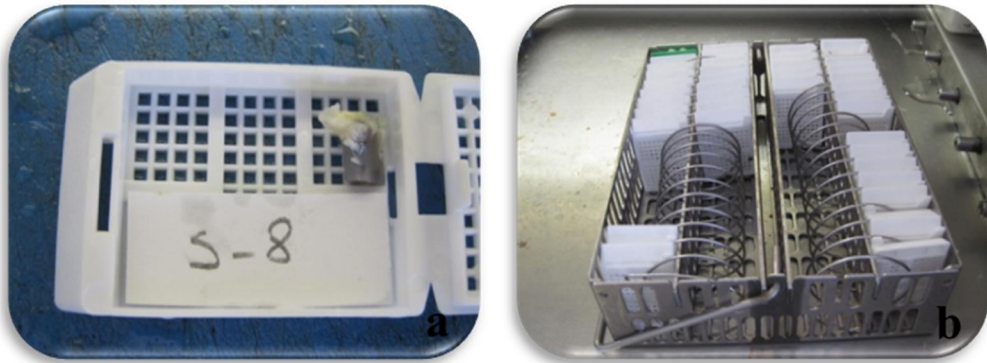
Elde edilen örnekler (Resim 12), kemik dokusunun histomorfometrik analizine izin verecek şekilde histolojik kesit hazırlama aşamalarından geçirildi.

3.7.1. Fiksasyon ve Formalinden Arındırma İşlemi

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

3.7.2. Dekalsifikasyon İşlemi

%15'lik tamponlu formik asit solüsyonunda (Merck, Darmstadt, Almanya) 7 gün bekletilerek dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Tüm örnekler dekalsifiye olduktan sonra 3-4 saat akan suda yıkandı. Kemik örnekleri, üzerine örnek numaraları yazılan doku takip kasetleri ile kasetlenerek doku takibi işlemine geçildi (Resim 13 a,b).



Resim 13. a,b. Örneklerin kasetlenmesi

3.7.3. Doku Takip İşlemi

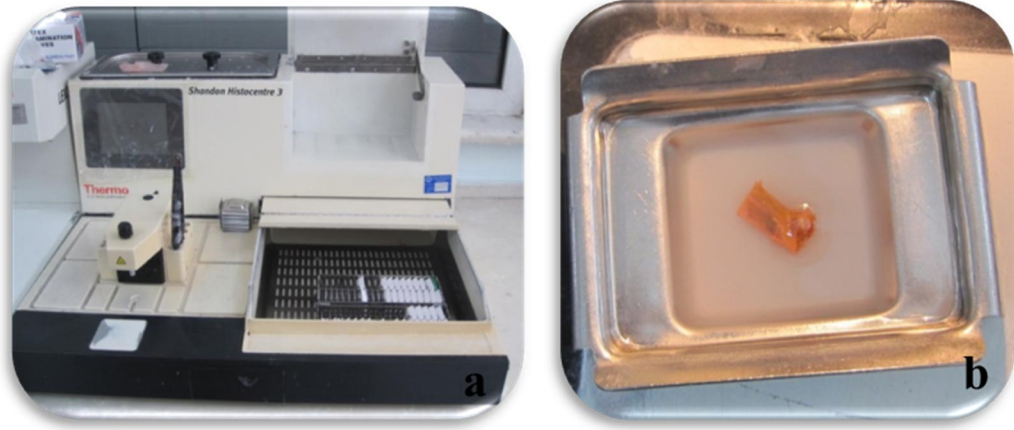
Doku takip işlemi kapalı devre otomatik ototeknikon cihazında gerçekleştirildi ve doku takibi için parafin blok tekniği tercih edildi. Bu takip cihazı ile doku takip kasetleri içerisindeki dokulara ısı, pres, vibrasyon ve titrasyon uygulamaları otomatik olarak gerçekleştirildi (Resim 14).



Resim 14. Otomatik doku takip cihazı

3.7.4. Bloklama İşlemi

Takip işlemi tamamlanan dokular bloklama işlemine tabi tutuldu. Bu işlem doku takip kaseti içerisinde gerçekleştirildi (Resim 15). Parafin bloklara defekt alanı alta gelecek şekilde gömüldü.



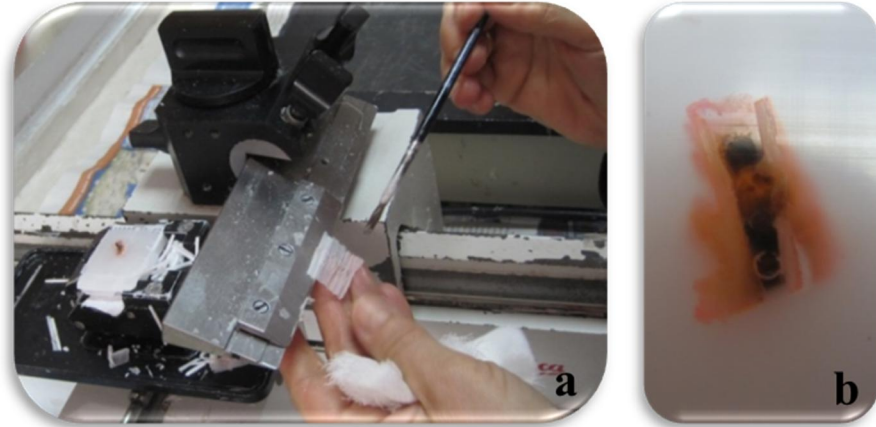
Resim 15. Bloklama cihazı ve bloklama yöntemi

3.7.5. Kesit Alma İşlemi

Mikrotom yardımıyla daire şeklindeki defekt hattına paralel olacak şekilde Kemik yüzeyinden 4 µm kalınlığındaki kesitler elde edildi (Resim 16,17). Bu kesitler sıcak su banyosuna alınarak dokuların kırışıklığının açılması sağlandıktan sonra lam üzerine taşındı ve kurutuldu.



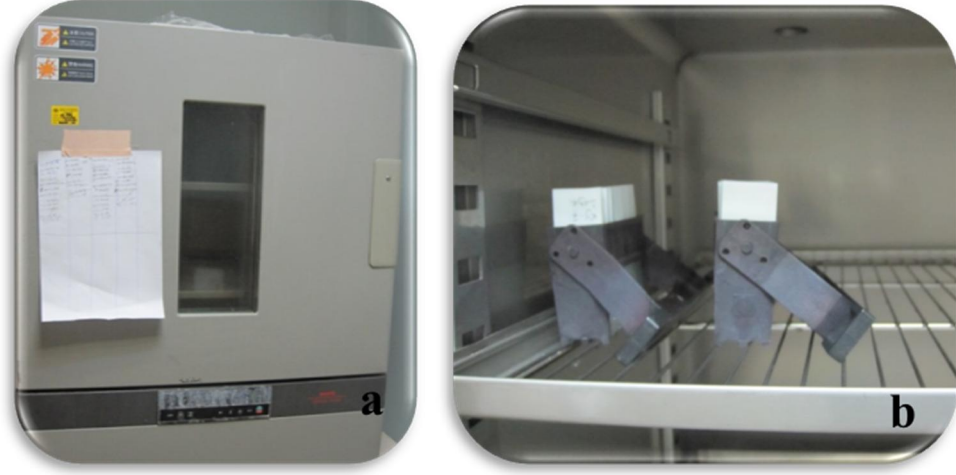
Resim 16. Mikrotom cihazı



Resim 17. a,b. Mikrotom cihazıyla kesit alınması

3.7.6. Hematoksilen Eozin İle Boyama İşlemi

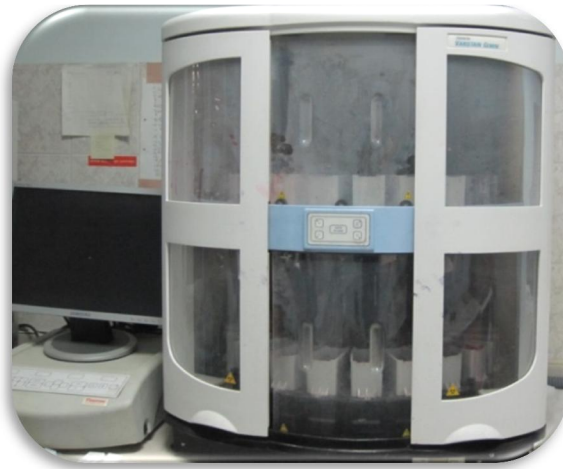
Preperatlar kurutma fırınında (Sanyo Drying Oven, Japonya) bekletildikten sonra Thermo Scientific Varistain® Gemini cihazı ile hematoksilen eozinle (HE) boyandı (Resim 18).



Resim 18. a,b. Kurutma fırını ve preparatlar

3.7.7. Kesitleri Kapama İşlemi

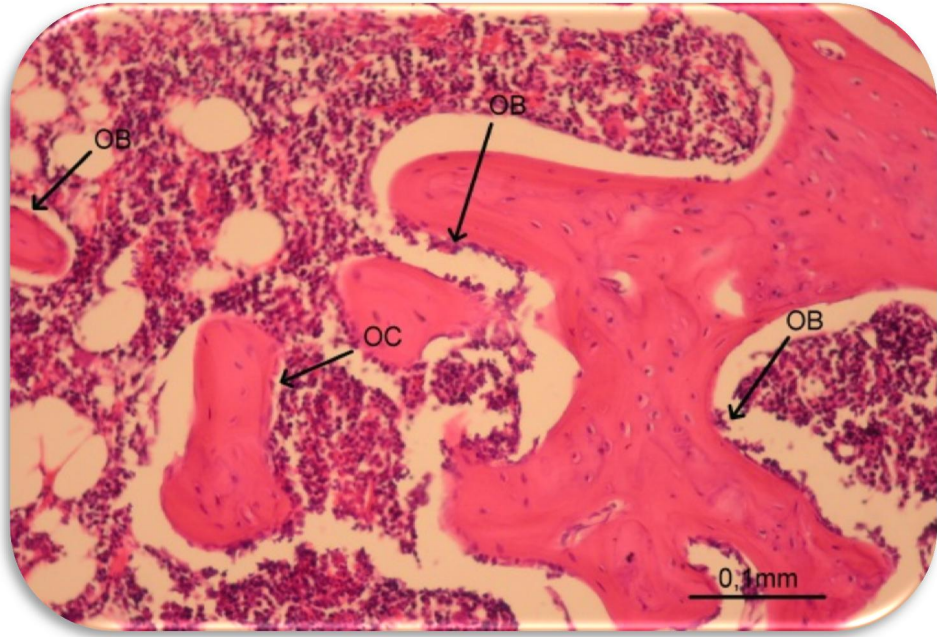
Kesitler Shandon Consul Coverslipper cihazı ile kapatıldı (Resim 19).



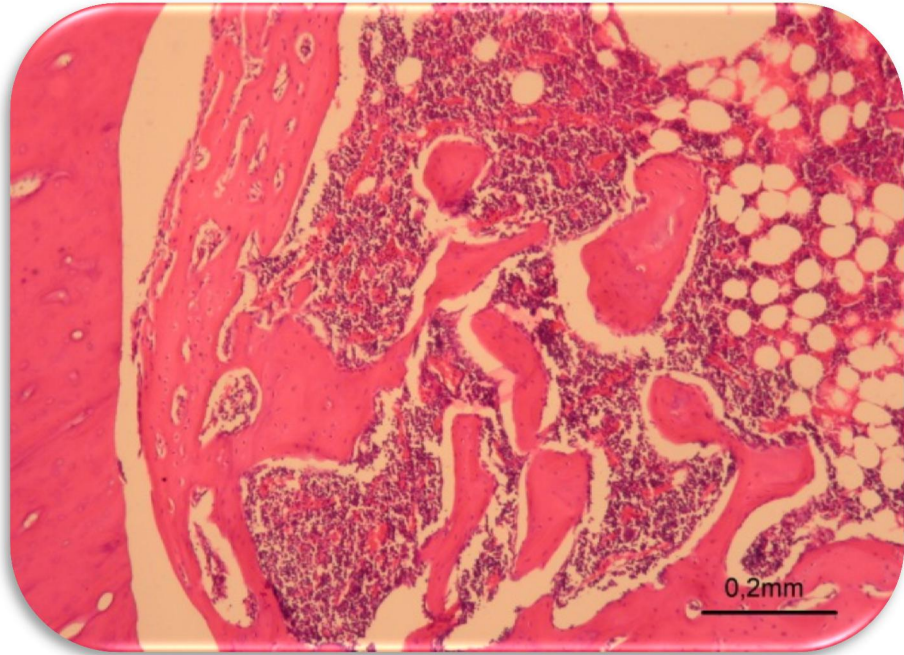
Resim 19. Shandon Consul Coverslipper

3.8. Histomorfometrik Analiz

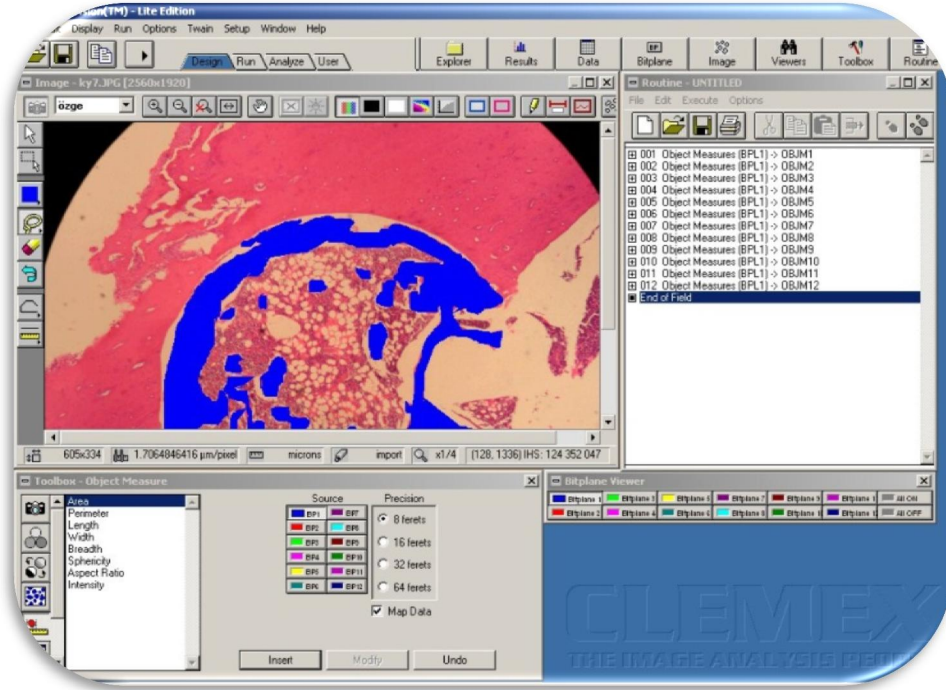
Hematoksilen eozin ile hazırlanan preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Değerlendirme esnasında aynı zamanda ışık mikroskobuna bağlı bulunan fotoğraf makinası (Nikon Coolpix 5000) ile fotoğraflandı. Fotoğraflar çekilirken aynı mikroskop büyütmesinde (Nikon micrometer microscope slide MBM11100 Stage Micrometer Type A) görüntü dijital olarak kaydedildi. Tüm görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı ve Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programı (Clemex Technologies, Quebec, Kanada) ile değerlendirildi. Değerlendirmede ilk olarak uzunluk kalibrasyonu yapıldı. Daha sonra her preparat için mümkün olduğunca aynı bölgeleri içeren $562375,2 \mu\text{m}^2$ 'lik alanlar seçildi ve tüm işlemler bu birim alanda gerçekleştirildi. Her olguda $562375,2 \mu\text{m}^2$ 'lik alandaki osteoblast ve osteoklastlar işaretlenerek adı geçen görüntü analizi sistemi ile otomatik olarak saydırıldı (Resim 20, 21). Yeni kemik oluşum alanları da aynı birim alanda görüntü analizi programı ile hesaplandı. Bu hesaplama işlemi için yeni kemik alanları dijital mavi tonlamaya tabi tutuldu. Sonunda bu renkli alanlar μm^2 cinsinden hesaplandı. Alan hesaplamasındaki bu işlemlerin tümü Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programı (Resim 22) ile gerçekleştirildi. Görüntü analizini yapan kişi grupları ve olguları bilmeden değerlendirdi.



Resim 20. OB: Osteoblast, OC: Osteoklast



Resim 21. Yeni kemik alanı



Resim 22. Clemex Vision Lite 3.5 Image Analysis programı ile mavi tonlamaya tutulması

3.9. Biyokimyasal Analiz Yöntemi

Alüminyum folyo içerisinde -86°C 'de muhafaza edilen dil örnekleri ve ependorf tüpleri içerisinde muhafaza edilen serum örnekleri çalışma günü çözdürüldü, soğuk zincire uyularak fosfat tamponu ile 5 kat dilüe edildi. Önce homojenizatör ile daha sonra sonikasyon işlemi ile homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika süre ile 10000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Bu süpernatantlarda ve serumda, Rel assay Diagnostic Assay Kitleri ve Beckman Coulter AU 5888 otomatize biyokimya analizörü ile spektrofotometrik yöntemle, TAK ve TOK parametreleri incelendi. Homojenize edilen dil dokularının mikroprotein düzeyleri Beckman Coulter AU 5800'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar mikroprotein düzeyine bölünerek hesaplandı.

Serumdaki kemik spesifik alkalen fosfataz düzeyi ticari ELİSA kitleri (Cusabio Biotech Co., LTD, Wuhan, China) kullanılarak belirlendi.

3.10. İstatistik

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

Osteoblast, osteoklast özellikleri bakımından sayılarak elde edilen veriler kare kök transformasyonuna tabi tutulduktan sonra parametrik testlerin ön şartını sağladıkları için gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi tekniği ile irdelenmiştir. Yine grupların arasındaki farklılıklar çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi ile irdelenmiştir.

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

Biyokimya analizinde, TAK serum ve BALP özellikleri bakımından elde edilen veriler parametrik testlerin ön şartlarını sağladığı için tek yönlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmişlerdir. Grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi ile analiz edilmişlerdir.

TAK dil, TOK dil ve TOK serum özellikleri parametrik testlerin ön şartını sağlamadığı için Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmişlerdir.

Hayvanların deney başlangıç canlı ağırlıkları bakımından, grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi tekniği ile irdelenip, grup ağırlıklarının homojen olduğu gösterilmiştir. Deney sonunda elde edilen canlı ağırlıkları da yine tek yönlü varyans analizi tekniği ile irdelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grupları

Araştırmaya dahil edilen 38 adet Spraque-Dawley deney hayvanının 1 adedi anestezi sırasında, 1 adedi cerrahi işlem sonrasında 2 adedi gavaja bağlı, 3 adedi de nedeni belirlenemeyen ölüm nedeniyle ve 1 adedi femur da fraktür sebebiyle çalışma dışı bırakıldı. Kontrol grubunda nedeni belirlenemeyen ölümler nedeniyle 5 hayvan kaldı ve gruptaki kalan hayvanlar çalışma dışı bırakılarak kontrol grubu 8 yeni hayvan ile tekrarlandı. İncelemeler 33 hayvan üzerinde gerçekleştirilmiştir. Operasyon sonrasında ve sakrifikasyon işlemine kadar hiçbir denekte osteomyelit, abse formasyonu, yara yüzeyinde açılma görülmedi (Tablo 5).

Tablo 5. Çalışma Dışı Bırakılan ve Çalışmaya Dahil Edilen Ratların Gruplara Göre Dağılımı

Grup	n	Anestezi	Gavaj	Nedeni belirlenemeyen ölüm	Femur fraktürü	Çalışmaya dahil edilen denek sayısı
1 (K)	8			3		0
1 (Yenilenen Kontrol)	8					8
2 (S)	10		1			9
3 (R)	10	1			1	8
4 (SR)	10	1	1			8
Toplam	46	2	2	3	1	33

4.2. Canlı Ağırlık Bulguları

Canlı ağırlık özelliği bakımından yapılan varyans analizi sonucunda ‘zamanXağırlık’ ilişkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Ağırlıkların ortalamaları arasındaki farklar haftalık ölçümlerde sabit kalmayıp değişmiştir. Deney başlangıcında grupların ortalama ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yok iken, deney sonunda grupların ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($p<0,05$). Tukey testi sonuçları Tablo 6'da ortalamalar üzerinde latin harfleri ile gösterilmiştir. Deney sonunda kontrol grubunda ağırlık ortalaması, sigara ve resveratrol gruplarından yüksek bulunmuştur.

Tablo 6. Deney Sonunda Grupların Ortalama Ağırlık Bulguları

Grup	N	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	360,50 ^a	19,47	325	396
2 (S)	9	319,78 ^b	37,81	254	376
3 (R)	8	308,75 ^b	36,11	266	335
4 (SR)	8	337,50 ^{ab}	29,22	302	376

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

4.3. Histomorfometrik Bulgular

4.3.1. Osteoblast Sayımı

Osteoblast sayımı sonucunda elde edilen veriler ($\sqrt{X+3/8}$) transformasyonuna tabi tutulduktan sonra yapılan varyans analizi sonucunda uygulamaların ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Tukey testi sonuçları Tablo 7'de gösterilmiştir. Osteoblast sayısı Resveratrol grubunda en yüksek sayıdadır ve Sigara gruplarından anlamlı olarak yüksektir. Sigara grubunda osteoblast sayısı en düşüktür.

Tablo 7. Osteoblast Sayılarının İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	57,88 ^{ab}	15,33	42,0	87,0
2 (S)	9	38,11 ^c	9,60	22,0	51,0
3 (R)	8	75,25 ^a	24,89	44,0	119,0
4 (SR)	8	48,88 ^{bc}	10,11	37,0	71,0

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

4.3.2. Osteoklast Sayımı

Osteoklast sayımı sonucunda elde edilen veriler ($\sqrt{X+3/8}$) transformasyonuna tabi tutulduktan sonra yapılan varyans analizi sonucunda uygulamaların ortalamaları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). Osteoklast sayısı yalnızca Kontrol grubunda Sigara grubundan anlamlı olarak yüksektir ve en düşük osteoklast sayısı Sigara grubundadır (Tablo 8).

Tablo 8. Osteoklast Sayılarının İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	4,000 ^a	1,927	2,0	8,0
2 (S)	9	2,444 ^b	0,726	1,0	3,0
3 (R)	8	3,750 ^{ab}	1,581	2,0	7,0
4 (SR)	8	2,625 ^{ab}	0,916	1,0	4,0

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

4.3.3. Yeni Kemik Alanı

Yeni kemik oluşumu özelliği bakımından elde edilen veriler logaritmik transformasyona tabi tutulduktan sonra parametrik testin ön şartlarını sağladığından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda uygulamaların rank ortalamaları arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,074$). İstatistik olarak anlamlı fark olmasa da yapılan histomorfometrik değerlendirmede en yüksek kemik alanı Resveratrol grubunda görülmektedir. Resveratrol ve Kontrol gruplarının yeni kemik oluşum alanları Sigara ve Sigara+Resveratrol gruplarından yüksektir ancak bu fark istatistik olarak anlamlı değildir (Tablo 9).

Tablo 9. Yeni Kemik Alanı İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Rank ortalaması	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	1429279	21,0	605549	532283	2377681
2 (S)	9	847179	11,9	743041	42348	2460250
3 (R)	8	1506195	22,0	746670	485277	2716080
4 (SR)	8	884297	13,8	215486	664151	1266354

4.4. Biyokimyasal Bulgular

TAK dil, TOK dil ve TOK serum özellikleri bakımından parametrik testlerin ön şartını sağlamadığı için Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmişlerdir.

TAK dil özelliği bakımından yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda uygulamaların rank ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($p < 0,05$). Bonferroni-Dunn testi sonuçları rank ortalamaları üzerinde Tablo 10'da gösterilmiştir. TAK dil özelliği Sigara+Resveratrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksektir.

Tablo 10.TAK Dil İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Rank ortalaması	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	0,12875 ^b	12,8	0,02232	0,11000	0,18000
2 (S)	9	0,1533 ^b	16,4	0,0624	0,1200	0,2900
3 (R)	8	0,12000 ^b	10,1	0,01069	0,11000	0,14000
4 (SR)	8	0,2838 ^a	28,8	0,0403	0,2100	0,3400

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

TOK dil özelliği bakımından elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ($p<0,05$), Sigara+Resveratrol grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksektir (Tablo 11).

Tablo 11.TOK Dil İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Rank ortalaması	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	1,161 ^b	9,8	0,814	0,650	3,090
2 (S)	9	1,367 ^{ab}	17,8	0,269	0,970	1,750
3 (R)	8	1,416 ^{ab}	16,7	0,505	0,930	2,360
4 (SR)	8	1,572 ^a	23,6	0,200	1,200	1,850

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

TOK serum özelliği bakımından elde edilen verilere yapılan Kruskal-Wallis testi sonucunda grupların rank ortalamaları arasındaki fark istatistik olarak önemli değildir (Tablo 12).

Tablo 12.TOK Serum İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Rank ortalaması	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	8,12	23,6	3,88	4,96	15,88
2 (S)	9	5,173	16,1	1,455	3,040	7,150
3 (R)	8	4,770	14,0	2,320	1,020	8,770
4 (SR)	8	4,886	14,4	1,156	3,350	6,460

TAK serum ve BALP özellikleri bakımından elde edilen veriler parametrik testlerin ön şartlarını sağladığı için tek yönlü varyans analizi tekniği ile analiz edilmişlerdir. Grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi ile analiz edilmişlerdir.

TAK serum özelliği bakımından elde edilen verilere yapılan tek yönlü varyans analizi sonucunda grupların ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemli değildir (Tablo 13).

Tablo 13. TAK Serum İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	1,0225	0,1130	0,7600	1,1200
2 (S)	9	0,9900	0,0492	0,9200	1,0700
3 (R)	8	1,0075	0,1031	0,8200	1,0900
4 (SR)	8	1,0113	0,0792	0,9000	1,1200

BALP özelliği bakımından elde edilen verilere yapılan varyans analizi sonucunda grupların ortalamaları arasındaki farklar istatistik olarak önemlidir ($p < 0,05$). Tukey testi sonuçları Tablo 14'te ortalamalar üzerinde gösterilmiştir. Kontrol grubunda BALP, Resveratrol ve Sigara+Resveratrol grubundan anlamlı olarak yüksektir. Resveratrol grubunda BALP en düşük seviyededir.

Tablo 14.BALP İstatistik Değerleri

Grup	N	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maksimum
1 (K)	8	18,00 ^a	2,249	15,30	22,60
2 (S)	9	16,863 ^{ab}	2,281	15,050	22,300
3 (R)	8	13,32 ^c	3,33	7,30	17,40
4 (SR)	8	13,874 ^{bc}	2,355	10,900	17,700

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

4.5. Biyokimya ve Histomorfometri Bulgularının Korelasyonu

Biyokimyasal özellikler ile histomorfometrik özellikler arasında doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı Pearson korelasyon kat sayısı hesaplanarak irdelenmiştir. BALP özelliği ile osteoblast özelliği arasında hesaplanan Pearson korelasyon katsayısı -0,075 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemli değildir ($P=0,679$). Yani iki özellik arasında doğrusal bir ilişkinin varlığından söz edilemez. Osteoklast ve yeni kemik alanı için korelasyon katsayısı 0,559 bulunmuş olup özelliklerden birisi artarken diğeri de artmaktadır ve bu artışın derecesi %55,9'dur ($p=0,001$). TAK dil özelliği ile osteoblast özelliği arasında hesaplanan korelasyon katsayısı 0,471 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir ($p=0,006$). Bunun anlamı özelliklerden birisi artarken diğeri de artmakta ve bu artışın derecesi % 47,1'dir. Osteoblast ile osteoklast özelliği arasında hesaplanan korelasyon katsayısı 0,790 olarak bulunmuş olup istatistik olarak önemlidir ($p=0,00$). Bunun anlamı özelliklerden biri artarken diğeri azalmaktadır ve bu azalışın derecesi %79'dur. Yeni kemik alanı ile osteoblast arasında hesaplanan korelasyon kat sayısı 0,633 bulunmuş olup, istatistik olarak önemlidir ($p=0,00$). Bu ilişkinin derecesi %63,3'tür.

Tablo 15. Biyokimyasal Özellikler İle Histomorfometrik Özelliklerin Korelasyonu

	TAK dil	TOK dil	TAK serum	TOK serum	BALP	OB	OC
TOK dil	0,237 0,185						
TAK serum	-0,026 0,888	0,30 0,869					
TOK serum	-0,237 0,184	-0,288 0,104	0,081 0,652				
BALP	-0,168 0,351	-0,316 0,073	-0,032 0,862	0,304 0,085			
Osteoblast	0,471 0,006	0,327 0,063	0,012 0,947	-0,025 0,891	-0,075 0,679		
Osteoklast	0,208 0,246	0,345 0,050	0,062 0,733	0,089 0,623	0,077 0,668	0,790 0,000	
Yeni kemik	0,135 0,452	0,290 0,102	-0,040 0,826	0,182 0,312	0,020 0,913	0,633 0,000	0,559 0,001

5. TARTIŞMA

Kemik iyileşmesini etkileyen lokal ve sistemik faktörler ve iyileşmenin hızlandırılması, günümüzde araştırmacıların üzerinde çalıştığı önemli konulardan biridir. Oral cerrahide yapılan operasyonlarda başarı büyük oranda kemikteki iyileşmeye bağlıdır. Diş çekimi, distraksiyon osteogenezisi, implant osseointegrasyonu gibi oral cerrahi işlemlerin neredeyse tümünü ilgilendirdiği için kemik iyileşmesini hızlandırmak ve kemik hacmini artırmak amacıyla çok sayıda çalışma yapılmaktadır (2,3). Bu araştırmada, kemik iyileşmesini bozan faktörlerden biri olan sigara ve osteogenezde olumlu etkileri kanıtlanmış bir antioksidan olan resveratrolün (118) kemik iyileşmesi üzerine etkileri deneysel olarak incelenmiştir. Bu amaçla denekler sigaraya maruz bırakılarak kronik sigara içiciliği modeli oluşturduktan sonra femurda defekt açılmıştır. Yeni kemiğin oluştuğu dönemde deneklere resveratrol verilmiştir ve yeni oluşan kemiğe sigaranın ve bir antioksidan olan resveratrolün etkileri incelenmiştir.

Ağız ve çene bölgesinde yapılan operasyonlarda başarıyı artırmak, yeni materyal ve teknikleri denemek gibi amaçlarla yapılacak işlemlerin insanlardan önce deney hayvanlarında denemesi gerektiği bilinmektedir. Geçerli sonuçlar alındığı takdirde insan çalışmaları yapılmalıdır. İnsanlarda yapılan işlemlerin sonuçlarının değerlendirilmesi için doku ve kesitlerin alınması mümkün olmadığı için radyografik ya da biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilir (143). Literatürdeki çalışmalar büyük hayvanlar ile çalışmanın temin, bakım, maliyet açısından zorlukları olması ve çalışmanın yapılabilmesi için uygun doku, boyut ve anatomiye sahip ve filogenetik olarak en düşük olan hayvan üzerinde yapılması gerekliliği nedeniyle çoğunlukla rat ve tavşan gibi küçük deney hayvanları üzerinde yapılmıştır. Bizim çalışmamızda temin edilme, barındırma ve beslenmesinin kolay olması, ucuz olması, büyük hayvanlara göre daha kolay müdahale edilmesi, fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunması ve enfeksiyona olan dirençleri nedeniyle Sprague-Dawley cinsi rat modeli tercih edilmiştir (144,145)

Çene kemiklerinin oluşumu ve kemik defektlerinin iyileşmesi genel olarak intramembranöz kemikleşme yoluyla gerçekleşmektedir. Kemikleşme tipleri

birbirinden farklı olsa da yapılan araştırmalar sonucu vücutun herhangi bir bölgesindeki kemik dokusunun iyileşmesi ile ilgili elde edilen bulguların başka bir bölgedeki kemik iyileşmesi için de geçerli olabileceği belirtilmiştir (23). Ratların maksillofasiyal bölgelerinde cerrahi uygulama yapılmasının çeşitli zorlukları olduğundan parietal, femur, tibia gibi kemik modelleri üzerinde çalışmalar yapılabilir. Araştırmamızda; cerrahi işlemin ciddi beslenme bozukluğuna yol açarak hayvanlarda genel güçsüzlüğe neden olabilmesi (146), postoperatif dönemde operasyon bölgesinin herhangi bir nedenle ağız ortamı ile ilişkiye geçmesi halinde ağız florasındaki yüksek miktarda mikroorganizma ile enfekte olma riski, uzun kemiklerin manipülasyonlarının kolay olması ve postoperatif dönemde iyileşmenin daha az riskli olması gibi nedenlerle çalışma için kemik modeli olarak maksillofasiyal kemikler yerine femur tercih edilmiştir (145).

Menstruel döngü ve östrojen hormonun kemik iyileşmesine etkilerinden dolayı çalışma erkek ratlar ile gerçekleştirilmiştir (145). Çalışmada kullanılan 38 adet ratın vücut ağırlığı haftalık, beslenmeleri ve genel sağlık durumları günlük kontrol edilmiştir. Deney başlangıcından son haftaya kadar grupların ağırlık ortalamaları arasında anlamlı fark yok iken 8. haftada sigara ve resveratrol grupları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda daha az kilo almışlardır. Resveratrol grubundaki kilo alımının az olması Backesjo et al. (2009)'in resveratrolün adipoz doku oluşumunu azalttığını rapor ettikleri çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur (113). Sigara grubundaki azalma ise Tsuji et al. (2013)'in sigaranın kilo alımını azalttığını bildirdikleri çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir (147).

Ventura et al. (2014), kalvaryumda açılan defektleri pozitron emisyon tomografi ile incelemişlerdir ve kallusun mineralize olmaya başladığı ve kemikte remodelasyonun başladığı 4. haftada maksimum matriks depozisyonu olduğunu bildirmişlerdir (148).

Yıldırım ve arkadaşları (1994), rat tibialarında defekt oluşturup, 7, 14, 21 ve 30. günlerde kemik iyileşmesini değerlendirmişlerdir. 7. günde kavitede organize hematoma, çevrede birkaç yeni kemik trabekülü, lenfosit ve plazma infiltrasyonu görülmüştür. 14. günde kavite fibroblast ve fibrositlerden oluşan fibröz dokuyla

dolmuştur, yeni kemik trabekülleri, az sayıda lenfosit ve plazma hücresi infiltrasyonu görülmüştür. 21. günde kavite fibröz doku ile doludur ve fibröz doku içinde geniş alanlarda yeni kemik yapımı gözlenmiştir. 30. günde kavitenin büyük bölümü yeni kemik trabekülleri ile doludur (149).

Taguchi et al. (2005), kontrol grubunda defekt oluşturulmasından 2 hafta sonra yeni oluşan kemiğin ağısı kemiği ortaya çıkaracak şekilde daha kalın trabekülasyon gösterdiğini ve çok sayıda osteoblast içerdiğini bildirmiştir (150).

Namkung-Matthai et al. (2001), defekt oluşturduktan sonra deneyi 3 hafta sürdürmüşlerdir. 1., 2. ve 3. haftalarda sakrifiye edilen ratlarda kemik iyileşmesini değerlendirmişlerdir. İkinci haftada sert kallus oluştuğunu ancak kemik remodellinginin oluşması için 3 hafta gerektiğini bildirmişlerdir (151).

Sartori et al. (2008)'in, 2, 4, 6 ve 8. haftalarda kemik iyileşmesini değerlendirdikleri çalışmalarında 60 gün sonunda sakrifiye edilen hayvanlarda önceki haftalarda sakrifiye edilen hayvanlara göre osteoblast sayısı oldukça az bulunmuştur. Bunun nedeni olarak 8. haftada kemik iyileşmesinin artık ileri safhada olması ve osteoblastların mineralize olarak osteoide dönüştüğünü rapor etmişlerdir (3).

Literatürde kemik iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda ilk haftadan itibaren 4 haftalık zaman diliminin osteoblast, osteoklast ve yeni kemik oluşumunu gözlemlemek için uygun bir süre olduğu bildirilmiştir (152,153). Bizim çalışmamızda da defekt alanında osteoblastların aktif olduğu, yeni kemiğin ve remodellingin olduğu 28 günlük süreçteki kemik iyileşmesinin durumu değerlendirilmiştir.

Kemik iyileşmesini değerlendirmek için klinik, histolojik, histomorfometrik ve/veya radyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Dual-enerji X-ray absorpsiyometri (DEXA), ultrasonografi, radyografik yöntemler, single/dual foton absorpsiyometri kemiğin non-invaziv değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerdir. Gala Paniagua et al. (1998) single/dual foton absorpsiyometri ve volumetrik tomografinin DEXA'dan daha değerli sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (154). Skorslama ile yapılan histolojik inceleme hata payını artırmaktadır ve sonuçların objektifliğini tartışılır hale

getirmektedir. Histolojik incelemelerin bilgisayar programı desteği ile sayı, yüzey ve hacim ölçümü yapılabilen bir yöntem olan histomorfometrik inceleme; kemik yapım, yıkım parametreleri ve yapısal parametrelerinin ölçülerek sayısal değerler elde edilmesi, kemikleşme potansiyeli olan dokuları göstermesi nedeniyle en detaylı ve değerli inceleme yöntemidir. Elde edilen sayısal değerler özellikle yeni oluşan kemiğin değerlendirilmesinde ideal bir yöntemdir ve kemiğin mikromimari yapısının değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (155). Bu nedenle bizim çalışmamızda, kemik rejenerasyon araştırmalarında son yıllarda objektif ve sayısal sonuç elde edilen, iyileşmenin çeşitli aşamalarını doku ve hücre seviyesinde değerlendiren bilgisayar destekli histomorfometrik inceleme tercih edilmiştir (153,155,156).

Kemik yapımını veya yıkımını değerlendirmek için biyokimyasal yöntemler de kullanılmaktadır. Biyokimyasal incelemede, radyografik ve histolojik yöntemlere göre kemik metabolizması hakkında daha erken dönemde bilgi sahibi olunması avantajdır ancak her zaman kesin sonuç vermemektedir. Kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde; kemik yapımı için sıklıkla osteokalsin ve ALP, kemik yıkımı için ise NTX, CTX ve TRAP incelenmektedir (26). Serum alkalin fosfataz; kemik yapım belirteçlerinden en sık kullanılanıdır. Alkalin fosfataz karaciğer, kemik, böbrek, bağırsak ve plasentada bulunur. Kemik spesifik ALP; osteoblastların membranlarından salgılanan bir enzimdir ve fosfat esterlerinden fosfat iyonunu serbestleştirerek kalsiyumun çökmesini sağlar. Diğer dokularda da bulunduğu için, spesifikite ve sensitivitesini artırmak amacıyla kemik izoenzimleri ölçülür. Serumdaki kemik spesifik ALP, kemik oluşumunun değerlendirilmesinde önemli bir belirteçtir (17). Mezenkimal kök hücre kültüründe osteojenik besi yerinde normalde alkalin fosfataz pikinden sonra hücreler özelleşmeye başlayıp mineralizasyon artışı görülür. Bu pik dönemi ortalama olarak kültürün 14-21. günleri arasındadır (157). Mineralizasyonun başlamasıyla beraber alkalin fosfataz aktivitesi azalmaya başlar. Mineralizasyonun başladığı dönemde hücreler daha çok özelleşme yoluna giderler ve hücre proliferasyon hızı azalır (158). Alkalin fosfataz osteoblastik farklılaşmanın belirteci olduğu gibi mineralizasyonda da rol oynayan bir enzimdir (158). Osteoblast hücre membranı alkalin fosfataz yönünden zengindir. Aktif kemik oluşumu esnasında, bu hücreler yüksek düzeyde ALP salgırlar ve kandaki enzim seviyesini

yükseltirler. Salgılanan fosfat; 1. Kemik matriksinin oluşumunu ve olgunlaşmasını stimüle eder. 2. Hidroksiapatit içindeki kemik mineral kristallerinin gelişimine katkıda bulunur. Total ALP ölçümünde kemik dışı kaynakların da olması nedeniyle kemiğe spesifik ALP'nin (BALP) bakılması daha doğru bir yaklaşımdır (27). Bu nedenle çalışmamızda kemik yapımının biyokimyasal belirteci olan BALP ölçümü için rat spesifik kemik-ALP kiti kullanılmıştır.

Çeşitli lokal ve sistemik faktörler kemik iyileşmesini olumsuz etkilemektedirler. Sigara kemik iyileşmesini bozan, kemik mineral yoğunluğunda azalmaya neden olan faktörlerden birisidir. Sigara kullanımı insan vücudundaki neredeyse bütün organları etkilemektedir. Koroner kalp hastalığı, felç, ateroskleroz, solunum sistemi hastalıkları ve çok sayıda kanser türüyle ilişkilidir (159). Sigara oral dokuları da etkileyerek ağız ve farinkste çeşitli pre-kanseröz ve kanseröz lezyonlara (41) neden olmakla birlikte periodontal cerrahi veya diş çekim yaralarının iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi vardır (42).

Periferik bir vazokonstriktör olan sigara, içerdiği nikotinle birlikte trombosit adezyonunu ve mikrovasküler tıkanıklığı artırarak dokuda iskemiye neden olur. Sigara içilmesiyle salınan katekolamin de damarlarda vazokonstriksiyona yol açar ve doku perfüzyonu azalır. Sigaranın, enfeksiyonlara karşı savunmada ilk önce görev alan nötrofil fonksiyonlarını bozarak, doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sistemini baskılayarak enfeksiyonlara yatkınlığı arttırdığı düşünülmektedir (160).

Kemik iyileşmesi; osteojenik hücrelerin osteoblastlara farklılaşması, proliferasyonu ve migrasyonuna bağlıdır (23). Sigara osteoblast oluşumunu bozarak ve osteoklastik rezorpsiyonu artırarak kemik metabolizmasına etki etmektedir (161). Sigaranın içerdiği nikotinin osteoblastik hücreleri inhibe ederek ve paratiroid hormon seviyelerini bozarak kemiğin histolojisini değiştirdiği, kemik yoğunluğunu ve D vitamini depolanmasını azalttığı rapor edilmiştir (4,5). Sigara içiminden sonra artan kortizolün de kemik yoğunluğunu azaltabileceği belirtilmiştir (62). Sigarada yoğun olarak bulunan kadmiyumun kemik yoğunluğu üzerine olumsuz etkisi olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (63). Sigaranın kemikler üzerinde direkt toksik etkisinin de olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda kırıkların (37,64,65)

veya kemik greftlerinin daha geç iyileştiği (66) ve iyileşen kemiklerde kemik gerilim direncinin önemli ölçüde azaldığı (64,65) rapor edilmektedir.

Nikotinli tütünün, nikotinsiz tütünün ve yalnızca nikotinin femur fraktüründe iyileşmeye olan etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, ratlar 4 hafta boyunca bu maddelere maruz bırakılmışlardır. Birinci haftanın sonunda fraktürler oluşturulup, 3 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Femurların mekanik dayanıklılıkları test edilmiştir. Tütün ekstratlarının iyileşen rat femurlarında mekanik dayanıklılığı azalttığı, ancak nikotinin mekanik dayanıklılığı etkilemediği bildirilmiştir (162).

Sigaranın içeriğinde bulunan kimyasallardan kemik metabolizmasını en fazla etkileyenlerin aril hidrokarbonlar olabileceği bildirilmiştir. Benzoapren ve 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioksin, güçlü aril hidrokarbonlardır ve cytochrome P450 1a/1b genini aktive ederek osteoklastik kemik rezorpsiyonunu indüklerler. Aril hidrokarbonlar kemik oluşumunun hücre farklılaşması ve osteoblast oluşumu döneminde etkili olarak osteoblastların farklılaşmasını baskılar ve kemik oluşumunu inhibe ederler. Resveratrol güçlü bir aril-hidrokarbon reseptör antagonistidir. Sigaranın kemik iyileşmesi üzerindeki etkisiyle birlikte aril-hidrokarbon reseptör bağlayıcılarının kemik farklılaşması ve iyileşmesi üzerine etkili olduğu varsayımıyla resveratrolün bu olası zararlı etkilere karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada resveratrolün aril-hidrokarbonların neden olduğu osteoblast farklılaşmasının inhibisyonunu bloke ettiği (163) ve osteoklast formasyonunu azaltabileceği/durdurabileceği rapor edilmiştir (161).

Osteoblast ve osteoklastlar arasındaki dengenin bozulması; hormonal değişiklikler, inflamatuvar sitokinlerin aşırı salgılanması, büyüme faktörlerindeki değişiklikler gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanmaktadır ve kemik kütlelerinde azalma ya da artma ile sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda kemik turnoverinin Nükleer faktör-Kappa B Ligand reseptörünün aktivasyonu ve osteoprotegerin arasındaki ilişki ile kontrol edildiği bildirilmiştir (164). Nükleer faktör-Kappa B Ligand reseptör aktivatörü, Nükleer faktör-Kappa B reseptör aktivatörü ve osteoprotegerin, osteoklastogenezis koordinasyonunda ve dolayısıyla alveoler kemik rezorpsiyonunda önemlidirler. Benzer şekilde sigara, osteoklastoprotegerin seviyelerini baskılar ve kemik oluşumunun azalması ile ilişkili olabilir. Ancak sigaranın kemik iyileşmesi

üzerindeki zararlı etkilerinden hangi mekanizmaların sorumlu olduğu kesin olarak açıklanamamıştır (58).

Literatürde deneysel sigara modeli oluşturmak için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar temel olarak yalnızca burundan maruziyet ve tüm vücudun maruz kalmasıdır (165,166). Yalnızca burundan yapılan sigara maruziyeti özel ekipman gerektirmektedir ve hayvanların sabitlenmesi gerektiği için stresi artırmaktadır. Tüm vücudun sigaraya maruz bırakıldığı model için farklı yöntemler kullanılmıştır. Deneklerin bulunduğu kafesin altında başka bir odacıkta sigara dumanı oluşturulması (58), deneklerin bulunduğu odanın içinde sigara yakılması (167), hava pompası yardımıyla başka bir odacıkta oluşturulan dumanın deneklerin bulunduğu odaya verilmesi (168) gibi çeşitli sistemler kullanılmıştır. Yaptığımız çalışmada sigara dumanı, cam odacığı kapatan kapakların üzerine yerleştirilen, altı açık olan duman jeneratöründe üretilerek cam odacığın kapağındaki açıklığa yerleştirilen fan yardımıyla deneklerin sigara dumanına maruz bırakıldığı özgün bir deney düzeneği oluşturulmuştur. Fan ile, oluşan dumanın hepsinin aşağıdaki cam odacığa yönlendirilerek, tam olarak dağılması sağlanmıştır. Özel bir süzgeç yardımıyla sigaranın küllerinin deneklerin bulunduğu cam kafese dökülmesi engellenmiştir.

Literatürde sigara modelleri oluşturulurken çok farklı sayıda ve sürede sigara kullanılmıştır. Akciğerde kronik sigara içiciliğinin bir belirteci olarak, bronşiol duvarlarında kalınlaşmanın izlenebilmesi için en az 6 ay (7 sigara/gün) süresince deney hayvanlarının sigara dumanına maruz bırakılması gerekmektedir (169). Sigaranın kemiğe etkilerinin değerlendirildiği çalışmaları bazılarında; 5 ay süresince günde 30 adet (165), 3 gün süresince günde 30 adet (170), 6 hafta boyunca günde 6 adet (171) sigaradan duman elde edilmiştir.

Cesar-Neto et al. (2005) sigara içilmesinin ve sigarayı bırakmanın kemik yoğunluğuna etkilerini radyografik olarak değerlendirmişlerdir. Ratlar 3 gruba ayrılarak kontrol grubuna temiz hava, 2. gruba 5 ay süresince sigara dumanı (30 sigara/gün) verilmiştir, 3. gruba 3 ay sigara dumanı verilip sonraki 2 ay sigara kesilmiştir. Deney sonunda tibiadan radyograflar alınarak fotodensitometrik analiz yapılmıştır. Beş ay süresince sigara maruziyetinin kemik yoğunluğunu, kontrol

grubundan ve sigaranın kesildiği gruptan anlamlı olarak düşürdüğü sonucuna varılmıştır (165).

Günde 30 adet sigaradan elde edilen dumana maruz bırakılan ratlardan üç gün sonra diş çekimi yapılan çalışmada 3, 7, 10, 14. günlerde histomorfometrik yöntemle kemik iyileşmesi değerlendirilmiştir. Diş çekimi sonrası kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde sigaranın kemiğin yeniden şekillenmesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (170).

Andrade et al. (2013)'in ratlar üzerinde yaptığı çalışmada sigara ve kahve tüketiminin kemik iyileşmesine etkileri değerlendirilmiştir. Ratlar altı hafta süresince günde 6 adet sigaraya ve/veya kahve tüketimine maruz bırakıldıktan sonra tibia ve parietal kemikte defektler açılmıştır. Deney protokolünün devam ettiği 10 haftalık iyileşme periodu sonunda sakrifiye edilen ratlardan alınan örneklerin histomorfometrik incelemesinde sigara ve kahve tüketiminin yeni oluşan kemik hacminde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (171).

Luchese et al. (2008), sub-kronik sigara içiciliğinin modeli olarak 4 hafta süresince 1-4 adet sigara dumanı maruziyetinin uygun bir süre olduğunu bildirmişlerdir (172).

Literatürde Sprague-Dawley cinsi ratlar üzerinde sigara ve nikotinle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (5,37,172). Bizim çalışmamızda da sigara için uygun bir model olması ve dayanıklı kemik yapıları nedeniyle Sprague-Dawley cinsi rat kullanılmıştır ve sigaranın kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilebilmesi için 8 hafta süresince günde 6 adet sigaradan elde edilen sigara dumanına maruz bırakılmışlardır.

Sigaranın kemik iyileşmesindeki ve kemik metabolizmasındaki olumsuz etkilerini azaltmak ya da ortadan kaldırmak için D vitamini, E vitamini gibi çeşitli maddelerle ve hormonlarda ilgili çok sayıda çalışma yapılmaktadır (9,173). Ancak bu maddeler ya yalnızca osteoblast yapımını artırıcı ya da osteoklast oluşumunu inhibe edicidir. Yapılan in vitro çalışmalar resveratrolün, osteoklastları inhibe ederken osteoblastların farklılaşmasını arttırdığını göstermektedir (10,11).

Literatürdeki, resveratrolün değişik dozlarda ve veriliş süreleriyle yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre; oral olarak alındıktan sonra bağırsaklardan hızla emilir ve kısa sürede kana geçer ve karaciğer, böbrek, kalp, ve beyin başta olmak üzere çeşitli organlara dağılır ve idrarla atılır (174). Resveratrolün toksik dozunun araştırıldığı bir çalışmada 28 gün boyunca 300, 1000 ve 3000 mg/kg gavaj yoluyla resveratrol verilen ratlarda 3 g/kg resveratrolün böbrekte toksisiteye neden olduğu diğer dozlarda toksik etki görülmediği sonucuna varılmıştır (175).

Resveratrolün çeşitli yollarla kemik iyileşmesini artırabileceği düşünülmektedir; AMP-aktive protein kinaz (AMPK) aktivasyonunu stimüle eder. Aktive AMPK osteoblast farklılaşması ve proliferasyonunda etkilidir. Kemik rezorpsiyonunu gösteren RANKL üzerine negatif etki eder (20,111). Sirtuin 1 aktivasyonu ile adiposit gelişimini azaltır ve osteoblast diferansiasyonunu artırır (113).

Resveratrol, osteoblastogenezisin artırılması ve kemik oluşumunda önemli rol oynayan Wnt sinyalizasyonunu düzenler. Wnt proteinleri, Frizzled ailesi adı verilen 7 adet transmembran reseptöründen oluşan komplekse bağlanarak hücre içi B-katenin salgısına sebep olurlar. B-katenin de hücre içindeki transkripsiyon faktörlerini harekete geçirerek kemik oluşumunda pozitif etkiye neden olur (114). B-kateninin mezenkimal kök hücrelerde ya da erken osteoblastik hücrelerde inaktivasyonu osteoblastik farklılaşmayı engeller (114).

Literatürde resveratrolün osteojenik etkileriyle ilgili in vivo çalışma az sayıda bulunmaktadır. Yaşamlarının 12. ayından itibaren günde 400 mg/kg resveratrolle beslenen farelerde, standart yem ile beslenen farelere göre kemik mineral yoğunluğunda anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (117).

Lin et al. (2005)'in yaptığı çalışmada, overektomi yapılan ratlara 90 gün boyunca 5, 15, 45 mg/kg dozunda resveratrol verilmiştir ve kemik yoğunluğu değerlendirilmiştir. Resveratrol verilen bütün gruplarda kemik yoğunluğu overektomi yapılan gruptan daha yüksek bulunmuştur. Overektomi sonrasında oluşan kemik yoğunluğundaki azalmanın resveratrol ile önlenebileceği sonucuna varılmıştır (176).

Uysal ve arkadaşları (2011), inter-premaksiller sutur genişletmesi yapılan ratların sutur hattına tek doz 10 µmol/kg resveratrol enjekte etmişlerdir. 20 gün sonra sakrifiye edilen ratlardan çıkarılan yeni kemik alanın bulunduğu maksilla, histomorfometrik yöntemle incelenmiştir. Resveratrol enjeksiyonu yapılan grupta yeni kemik alanı ve osteoblast sayısı kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (121).

Boissy et al. (2005), yaptıkları *in vitro* çalışmada resveratrolün, osteoklastogenezisi ve kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiğini, osteoblastogenezisi artırdığını bildirmişlerdir (10).

Karimian et al. (2013), prepubertal dönemdeki Yeni Zelanda tavşanlarına 16 hafta boyunca günde 200 mg/kg dozunda resveratrol vermişlerdir. Resveratrolün tibia ve vertebra kemik miktarlarında artışa neden olduğunu ve uzunluklarını artırdığını bildirmişlerdir (177).

Elmalı ve arkadaşları (2007), yeni zelanda tavşanlarında eklem içine lipopolisakkarin enjekte ederek artrit modeli oluşturmuşlardır ve 14 gün süresince 10 µmol (22,8 mg)/gün resveratrolü eklem içi enjeksiyon yoluyla vermişlerdir. Yaptıkları histomorfometrik incelemede resveratrolün kartilaj destrüksiyonunu belirgin şekilde azalttığı bildirmişlerdir. Resveratrolün sinovyal inflamasyonu da azalttığını rapor etmişlerdir (178).

Casarin et al. (2014), kalvaryumda defekt açarak ve tibiaya implant yerleştirerek resveratrolün kemik iyileşmesine etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında ratlara 30 gün boyunca 10 mg/kg resveratrol vermişlerdir. Defektlerin resveratrol grubunda kontrol grubuna göre daha fazla kemikle dolduğunu ve tibia yerleştirilen implantların daha yüksek tork gücüyle çıkarılabildiğini rapor etmişlerdir. Resveratrol grubunda BMP-2, BMP-7 ve osteopontin gen ekspresyonlarını kontrol grubundan daha yüksek bulmuşlardır (118).

Safra kanalı obstrüksiyonu yapılan ratlara 28 gün boyunca 10 mg/kg resveratrol verilerek kemik mineral yoğunluğu ve kırılma dayanıklılığı test edilmiştir. Safra kanalı obstrüksiyonu yapılan ratların kemik mineral yoğunluğunun kontrol ve resveratrol verilen gruplardan düşük bulunduğu rapor edilmiştir. Ancak

femurları kırmak için gerekli olan kırma kuvvetinin kontrol grubu için deney gruplarının her ikisinden de yüksek olduğu bildirilmiştir (179).

Dai et al. (2007)'in yaptığı in vitro çalışmada, resveratrolün hücre proliferasyonunu artırmasının doza ve süreye bağlı olduğu, insan kemiği kaynaklı mezenşimal kök hücre kültürlerinde [3H]-thymidine katılımı, ALP aktivitesi ve kalsiyum birikimi ile gösterilmiştir (112). Resveratrole bağlı hücre stimülasyonu östrojen reseptör sinyalizasyonu ile ilişkilidir ve ekstraselüler hücre düzenleyici kinaz 1/2 aktivitesini artırır. Resveratrolün indüklediği östrojen reseptör sinyalizasyonu ve ekstraselüler hücre düzenleyici kinaz 1/2 aktivitesi osteoblast üreme ve farklılaşmasında en önemli faktör olan, RUNX2/CBFA1 osteojenik genleri osteoblastik (osteoblast farklılaşma faktörü) ve osteokalsin ile birlikte artırır. Resveratrol östrojenik etkisiyle, östrojen reseptör aktivasyonu sonucunda osteoblast farklılaşmasını ve proliferasyonunu artırır (112). Resveratrolün anti-inflamatuar özelliği de inflammatuar mediatörlerin aşırı salgılanmasına bağlı osteoklast aktivitesinin artmasıyla oluşan kemik rezorpsiyonunu engellediği bildirilmiştir (115). Resveratrolün, sigaranın artırdığı inflamasyonu baskılaması ile de kemik iyileşmesini arttırabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürdeki çalışmalar resveratrolün kemik iyileşmesini osteoblast oluşumunu ve farklılaşmasını stimüle ederek arttırdığını rapor etmişlerdir (119,120). Resveratrolün osteoblastlara etkisi farklı mekanizmalar ile olabilmektedir. Mizutani et al. (1998), resveratrolün, östrojen benzeri etkisiyle osteoblastik proliferasyonu ve farklılaşmayı arttırdığını, kök hücrelerden osteoklast farklılaşmasını inhibe ettiğini bildirmişlerdir (120). Boissy et al. (2005), resveratrolün kemik iliğindeki osteoblast öncü hücrelerinde, D vitamini reseptör ekspresyonunu stimüle ettiğini rapor etmişlerdir (10). Song et al. (2006) ve Dai et al. (2007) östrojen reseptörlerinin NO/cGMP sinyal yolunu direkt olarak etkilemesiyle resveratrolün osteoblast oluşumunu arttırdığını bildirmişlerdir (112,119).

Bizim çalışmamızda da osteoblast farklılaşmasını arttırması, osteoklast oluşumunu azaltma özelliklerine sahip bir antioksidan olan resveratrol tercih edilmiştir. Resveratrol deney hayvanlarına 20 mg/kg dozunda 28 gün boyunca gavaj ile verilmiştir. Sigaranın ve resveratrolün yeni oluşan kemiğe etkilerini

değerlendirmek için histomorfometrik olarak osteoblast ve osteoklast sayıları ve yeni kemik alanı parametreleri değerlendirilmiştir.

Resveratrol B-katenini sabitleyerek mezenşimal kök hücrelerdeki Wnt sinyal yolunu düzenler ve bu da osteoblastik farklılaşmada etkili genlerin ekspresyonunu artırır (114). Resveratrolün östrojen reseptörüne bağımlı mitojen-aktive protein kinaz yolu ile hücre proliferasyonunu, osteoblast farklılaşmasını ve osteojenik gen ekspresyonunu stimüle ettiği rapor edilmiştir (112). Bizim çalışmamızda da osteoblast sayısı en yüksek Resveratrol grubunda bulunmuştur, sonra sırasıyla Kontrol ve Sigara+Resveratrol gruplarında, en düşük osteoblast sayısı da Sigara grubundadır. Resveratrol grubu ve Sigara grubu arasında istatistik olarak anlamlı fark vardır. Fakat ‘Resveratrol-Kontrol grubu’ arasındaki ve ‘Sigara-Sigara+Resveratrol grubu’ arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlara dayanarak literatürdeki Boissy et al. (2005)’in resveratrolün in vitro olarak osteoblastogenezisi arttırdığını gösteren çalışmalarıyla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da resveratrol osteoblast oluşumunu arttırmıştır (10). Uysal ve arkadaşlarının (2011) yaptığı, resveratrolün yeni kemik alanı ve osteoblast sayısını arttırdığını gösteren ratlar üzerinde yaptıkları çalışmalarıyla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (121). Sigara dumanının kemik hücrelerini direkt olarak etkilediği (2) ve osteoblastik farklılaşmayı inhibe etmesiyle kemik oluşumunu bozduğu bildirilmiştir (163). Literatürde sigara dumanının osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiğini gösteren ve BMD, kemik mineral içeriği (BMC) (180), osteoblast, osteoklast alanlarını değiştirerek (2), kemik turnoverini bozduğunu bildiren çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da sigaranın osteoblast sayısını azalttığı bulunmuştur ve sigarayla birlikte verilen resveratrolün osteoblast sayısını Kontrol grubuyla benzer sonuçlara yaklaştırdığı görülmüştür.

Resveratrolün, osteoklast farklılaşmasını engellemesinde farklı mekanizmaların etkili olduğu düşünülmektedir. Periferik kandaki mononükleer hücreler, makrofaj-koloni-stimulan-faktör ve RANKL ile muamele edilmişlerdir. Bu hücre kültürlerine resveratrol ilave edildiğinde tartrat rezistant asit fosfataz (TRAP-osteoklast belirteci) oluşumunu ve katepsin-K (osteoklastik kemik rezorpsiyonunda anahtar bir proteaz) artışını inhibe ettiği rapor edilmiştir (122). Resveratrol osteoklast

farklılaşmasında temel rol oynayan RANKL sinyalizasyonunu engellemektedir (10). Resveratrol, sigarada bulunan, osteoklastogenezise neden olan aril hidrokarbonlara antagonist etki ederek osteoklast oluşumunu inhibe eder (161) Yapılan in vivo çalışmalarda resveratrolün osteoklastın neden olduğu, kemikteki azalmayı inhibe ettiği veya osteoblast oluşumunu stimüle ettiği bildirilmiştir (10). Bizim çalışmamızda osteoklast sayısı en yüksek Kontrol grubunda, sonra sırasıyla Resveratrol ve Sigara+Resveratrol gruplarında, en düşük de Sigara grubunda bulunmuştur. Sadece Kontrol grubu ile Sigara grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Çalışmamızda; osteoklast sayısının, Resveratrol grubunda Kontrol grubundan düşük olması, resveratrolün osteoklastları inhibe etme özelliğinden kaynaklandığını düşündürmüştür ve bu sonuç Boissy et al. (2005) ve Iqbal et al. (2013)'in çalışmalarıyla uyumludur (10,161). Sigara verilen gruplarda yeni kemik alanının daha düşük olması ve az sayıda osteoblast bulunması nedeniyle kemik iyileşmesinin daha geç başladığını dolayısıyla osteoklastların da yeni oluşmaya başladığı düşünülebilir.

Deney hayvanlarını sigara dumanına maruz bırakarak yapılan bir çalışmada, sigara gruplarında yeni kemik alanının belirgin şekilde azaldığı ve düşük seviyeli lazer uygulamasının bu azalmayı düzeltmediği rapor edilmiştir (181). Resveratrolün kemik oluşumu üzerine etkilerinin değerlendirildiği çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda resveratrolün adenozin mono fosfat kinaz (AMPK) aktivasyonu, Sirtuin-1 aktivasyonu, B-katenin salınımını artırması gibi yollar aracılığıyla osteoblastogenezisi ve yeni kemik oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (20,111,113,114). Sigaranın hormonal değişiklikler, inflamatuvar sitokinlerin aşırı salgılanması, büyüme faktörlerindeki değişiklikler, osteoklastoprotegerin seviyesini baskılaması gibi değişikliklere neden olarak osteoblast ve osteoklast arasındaki dengeyi bozarak kemik oluşumunun azalmasına neden olabileceği bildirilmiştir (55,58,61). Pearson et al. (2008), ratlara doğumlarının 12. ayından itibaren yaşamları boyunca (30-33 ay) 100 mg/kg/gün ve 400 mg/kg/gün resveratrol verdikleri çalışmalarında resveratrol verilen grupta kemik mineral yoğunluğu ve hacmi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (117). Literatürde kemik iyileşmesi üzerine resveratrolün ve sigaranın her ikisinin birlikte değerlendirildiği in vivo çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki in vitro

çalışmalarda resveratrol ve sigaranın kemik üzerine etkileri birbirinden bağımsız olarak ayrı çalışmalarda açıklanmıştır. Bizim yaptığımız in vivo çalışmada hücresele düzeydeki çalışmalarla uyumlu olarak, yeni kemik alanı en yüksek Resveratrol grubunda, sonra sırasıyla Kontrol ve Ssigara+Resveratrol gruplarında, en düşük de Sigara grubunda bulunmuştur ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p=0,07$).

Oksidatif stres, BALP ile histomorfometrik özellikler arasında doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı Pearson korelasyon kat sayısı hesaplanarak irdelenmiştir. Yeni kemik alanı ile osteoblast arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur. Literatürde de osteoblast sayısı ile yeni kemik alanı arasında doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir (182). Yeni kemik oluşumu, osteoblastların aktivitesi ve mineralizasyona bağlı olduğu için beklenen bir durumdur. Osteoblast sayısı ile osteoklast sayısı arasında da güçlü bir ilişki olduğu, aralarındaki dengeyi salgıladıkları proteinlerle sağladıklarının ilk olarak Rodan and Martin (1981) tarafından açıklandığı Phan et al. (2004)'in çalışmalarında bildirilmiştir (183,184). Osteoblastlar arttıkça yeni kemik artar ve kemikteki remodellingi sağlayan osteoklastlar da artar. Osteoklast sayısı ve yeni kemik alanı arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur, yani yeni kemik alanı arttıkça osteoklast sayısı da artmaktadır. Bu durumun yeni oluşan kemikteki remodelingin kanıtı olduğu düşünülmüştür (185).

Kemik iyileşmesini değerlendirdiğimiz çalışmamızda histomorfometrik yöntemin yanısıra biyokimyasal olarak, osteoblast aktivitesini gösteren kemik alkalele fosfataz seviyeleri incelenmiştir. Resveratrolün osteojenik farklılaşmaya etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, osteoblastik farklılaşmanın erken dönem belirteci olan ALP aktivitesi 14. günde değerlendirilmiştir ve resveratrol verilen grupta yüksek bulunurken kontrol grubunda düşük seviyededir. 8 haftanın sonunda yapılan histomorfometrik incelemede yeni kemik oluşumu resveratrol verilen ratlarda yüksekken, kontrol grubunda düşük bulunmuştur. Resveratrolün kemik oluşumunu artırdığı hem histomorfometrik olarak hem de ALP seviyesine bakılarak gösterilmiştir (33). Kamath et al. (2014)'in yaptığı çalışmada mezenşimal kök hücrelere resveratrol içeren iskelele eklenerek 8. ve 12. Günlerde ALP aktivitesi ölçülmüştür. Resveratrol grubunda kontrol grubuna göre 8. günde 1,6 kat, 12. Günde

1,4 kat daha fazla bulunmuştur. Resveratrol erken dönemde ALP aktivitesini kontrol grubuna göre artırmıştır (186). Kemiğe spesifik alkalen fosfatazın yarılanma ömrü 1-2 gündür. Hücre kültürlerinde farklı kemik dokularından izole edilen osteoblastlardan salgılanan alkalen fosfataz 7 ila 14. günlerde pik yapar (34). Kemik yoğunluğu ile kemik-alkalen fosfataz seviyesi arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmada 4 ay boyunca ratlara sigara dumanı verilmiştir. Üçüncü ayda sigara grubunda alkalen fosfataz seviyesi kontrol grubundan düşük bulunmuştur. Dördüncü ayda sigara grubunda, alkalen fosfataz seviyesiyle birlikte kemik mineral yoğunluğu da azalmıştır. Sigara kemik oluşumunun azalmasına neden olmuştur ve alkalen fosfataz seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (187). Resveratrolün güçlü bir aril hidrokarbon reseptör antagonisti olmasından yola çıkarak tavuktan elde edilen periosteal osteogenezis kültürü oluşturulmuştur ve bu kültüre dioksin ve resveratrol eklenerek kemik oluşumu incelenmiştir. Dioksin verilen grupta kontrol grubuna göre ALP aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir ancak resveratrol verilmesiyle bu azalmanın bir miktar engellendiği bildirilmiştir (163). Benzer bir çalışma olan Ramesh et al. (2010)'in yaptığı çalışmada, 90 gün boyunca günde 7 sigaradan elde edilen dumanı verilen ratlarda serum alkalen fosfataz seviyeleri değerlendirilmiştir ve sonuç olarak sigara grubunda BALP kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur (188). Bizim çalışmamızda da BALP en yüksek Kontrol grubunda, daha sonra sırasıyla Sigara ve Sigara+Resveratrol grubunda en düşük de Resveratrol grubunda bulunmuştur. Kontrol grubu ve Resveratrol grupları arasındaki fark anlamlı iken, yalnızca sigara verilen grupla aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu sonuç Kontrol grubundaki osteoblastların aktivitesinin hala yüksek olduğunu buna karşın resveratrol grubundaki osteoblast sayısının yüksek olmasına rağmen osteoblastik aktivitenin azalmaya başladığını düşündürmüştür. Sigara grubu ile Resveratrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken, sigarayla resveratrolün birlikte verilmesi Resveratrol grubuyla aradaki farkı anlamsızlaştırmıştır. Sigara gruplarında alkalen fosfataz seviyesinin yüksek olması, sigaranın kemik iyileştirmesini geciktirmesi sonucunda diğer gruplara göre bu grupta osteoblastik aktivitenin yeni başlıyor olmasından kaynaklandığını düşündürmüştür.

Serbest radikaller son yıllarda yoğun olarak araştırılmaktadır. Serbest radikal kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı oluşan savunma mekanizmalarının aydınlatılması çok sayıda klinik durumun patogeneze açıklık getirecektir. Serbest radikallerin aşırı miktarda oluşması antioksidanlarla aralarındaki dengenin bozulmasına neden olur ve bu da yaşlanmaya, dokularda inflamasyona ve dejenerasyona neden olur (84). Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engeller, oluşanları ortadan kaldırırlar ve neden oldukları hasarı giderirler. Antioksidanlar biyolojik sistemlerde, serbest radikalleri yakalayarak, daha zararsız bir moleküle dönüştürerek, reaksiyon zincirini kırarak veya oluşan hasarı onararak etki ederler (94). Endojen-eksojen kaynaklı, süpürücü-koruyucu, enzimatik-enzimatik olmayanlar şeklinde sınıflandırılır. Enzimatik olanlar SOD, glutaton, GPx, paraoksanaz, katalaz gibi enzimlerdir. Artan oksidatif strese karşı hücre içi antioksidan savunma mekanizmalarını oluştururlar. Süperoksit anyonunu ve hidrojen peroksitleri elimine ederler, serbest radikal oluşumunda zincir reaksiyonları önlerler. Enzimatik olmayanlar vit C, vit E, β -karoten, transferrin, albumin, polifenoller gibi antioksidanlardır (96). Polifenol grubunda bulunan güçlü bir antioksidan olan resveratrol hücre içi antioksidan miktarını artırabilir, GPX, GST ve glutatyon redüktaz gibi birçok antioksidan enzimin de artışına neden olabilir (104).

Resveratrolün antioksidan özelliği farklı mekanizmalar ile açıklanmıştır. ROP oluştuğunda oksidatif zincir kompleksini azaltmak bunlardan birisidir. Diğer, mitokondride oluşan süperoksit radikalini yakalamaktır. Sonucusu fenton reaksiyonu ürünleri nedeniyle indüklenen lipid peroksidasyonunun inhibisyonudur (105,189).

Resveratrolün kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmada, ratlara 5 gün boyunca 10 mg/kg resveratrol verilmiştir. İncelemeler serum ve dokularda yapılmıştır. Serum ALT ve AST aktiviteleri, doku TBARS ve GSH düzeyi, resveratrol ve kontrol gruplarında kadmiyum gruplarından daha düşük çıkmıştır. Doku (karaciğer, böbrek, beyin, kalp) SOD aktivitesi kadmiyum verilen gruplarda düşük çıkmıştır. Kadmiyumla birlikte resveratrol verilmesinin, değerleri kontrol grubuna yaklaştırdığı bildirilmiştir (190).

Sigara içerdığı çok sayıdaki zararlı madde ve neden olduğu bilinen hastalıklar nedeniyle serbest radikal hasarının izlenebileceği bir model oluşturmaktadır. Sigaranın vücutta hasara neden olan etkilerinin dokularda oluşturduğu oksidatif strese bağlı olduğu bilinmektedir. Bu hasar antioksidan maddelerle önlenmeye ve giderilmeye çalışılır (6,191). Keskin ve arkadaşları (1999) serbest radikallerin kemik iyileşmesine olumsuz etkileri olduğunu ve bu etkinin antioksidanlarla engellenebileceğini bildirmişlerdir (192). Resveratrol osteogenezis özelliğinin yanında oldukça güçlü bir antioksidandır. Bu noktadan yola çıkarak çalışmamızda sigaranın ve resveratrolün hem kemik iyileşmesine hem oksidatif kapasiteye etkileri hem de kemik iyileşmesine oksidatif ve antioksidan kapasitenin etkileri değerlendirilmiştir.

Güncel çalışmalar ROP'lerin kemik hücre fonksiyonunda ve intraselüler sinyal iletiminde anahtar rol oynayabileceğini göstermiştir (193). Reaktif oksijen partikülleri, osteoprogenitör hücrelerden osteoblast oluşumunu inhibe ederek ve osteoklastogeneziste rol alarak osteoporozda majör rol oynar (194). Osteoprotegerin, RANK ve RANKL, kemik remodelinginde çok önemli bir yere sahiptir ve osteoblast osteoklast eşleşmesinde esas moleküler bağ olarak görev alırlar. ROP osteoklast sayısını ve RANKL ve TNF α ekspresyonunu stimüle ederek rezorpsiyonu artırır. Artmış osteoklastik aktivite süperoksit anyon üretimini artırabilir ve/veya süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini inhibe edebilir (195). ROP'lar kırıldak homeostazına ve bozulmasına neden olmaktadır ve özellikle de osteoartrit oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir (196).

Kemik iyileşmesinde çok büyük önemi olan, yaklaşık 5 gün süren başlangıç fazında, hasar alanına gelen polimorfo nükleer lökositlerin ürettiği serbest radikallerin granülasyon dokusunu bozduğu, yara iyileşmesini geciktirdiği bildirilmiştir (197).

Literatürdeki osteoblast hücre kültürlerini sigara dumanı ektratına maruz bırakılarak yapılan çalışmalarda ROP miktarında artış, hücre canlılığında azalma ve antioksidan verilmesiyle ROP'in azaldığını osteoblastlar üzerinde koruyucu etki sağladığı rapor edilmiştir (198,199). Çetin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sigara

içen kadınlarda içmeyenlere göre antioksidan enzim düzeyleri düşük, oksidatif stres ürünleri yüksek, kemik mineral yoğunluklarının azaldığı rapor edilmiştir (200).

Valenca et al. (2008), 5 gün süresince günde 6 adet sigara dumanına maruz bıraktıkları farelerde plazma SOD, CAT, GPx seviyelerine bakmışlardır. Sigaraya maruz bırakılan farelerde ilginç olarak SOD ve CAT yükselmiştir ve GPx azalmıştır. SOD ve CAT'ın yüksek değerlerde çıkmalarının plazmadaki anlık değişimlerden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (201).

İnsan akciğer epitel hücrelerinde transpozisyona yol açan, sigaranın neden olduğu oksidatif stresin, resveratrol ile engellenebileceği bildirilmiştir. Çalışmada sigara GSH seviyelerinde azalmaya neden olmuştur ancak resveratrol verilmesi GSH seviyelerini yükseltmiştir (202).

6 hafta boyunca 6 sigara/gün sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda, sigaranın ve resveratrolün (10 mg/kg/gün) trakea hücrelerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda sigaranın trakea epitel hücrelerinde deskuamasyona neden olduğu ve resveratrol verilmesiyle deskuamasyonu azalttığı görülmüştür (168).

Sigaranın ROP'ni arttırarak, rat karotid arterlerindeki asetilkoline bağlı gevşemeyi bozduğu fakat resveratrol verilmesiyle bu bozulmanın azaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada sigaranın rat karotid arterinde inflamatuvar belirteçleri arttırdığı, resveratrolün antiinflamatuvar belirteçleri ortadan kaldırdığı rapor edilmiştir (203).

Plazma ve serumda antioksidanlar etkileşim halindedirler ve genel olarak sinerjist çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerlerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Total antioksidanların ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir. Bu nedenle kanda antioksidan durumu değerlendirmede antioksidanların bireysel değerlerinden çok toplam antioksidan değerini veren total antioksidan kapasite ölçümü yaygın olarak kullanılmaktadır. Vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini total antioksidan kapasite (TAK), oksidanların toplam etkisini ise total oksidan kapasite (TOK) yansıtır. Vücutun

antioksidan/oksidan durumu antioksidan enzimlerin aktivitesi ve antioksidan/oksidan moleküllerin konsantrasyonu ayrı ayrı ölçülerek değerlendirilmekle beraber, genel antioksidan/oksidan durumu TAK ve TOK ölçümü ile daha kolay değerlendirilebilmektedir (140,141).

TAK ölçümü için en çok kullanılan yöntemler; kolorimetri, floresans ve kemilüminesans yöntemlerdir. Floresans ve kemilüminesans yöntemler karmaşık yöntemlerdir. Bizim çalışmamızda da kullanmış olduğumuz ABST yöntemi en çok kullanılan kolorimetrik yöntemdir (141).

Çalışmamızda Erel tarafından geliştirilen ve günümüzde en popüler metod olarak kabul edilen yöntemlerle total antioksidan ve total oksidan kapasite değerlendirildi (140,141). Bu metod ucuz, hassas ve güvenilir olup, bilirubin, lipidler, heparin ve okzalal gibi bileşenlerden etkilenmez.

Oksidatif stres altında total antioksidan kapasitenin tükenmesi durumunda başlangıçta karaciğer ve yağ dokusu gibi depolandıkları organlardan endojen antioksidanların salınımı artar, antioksidan enzimler aktive olur. Oksidatif stresin daha ileri döneminde ise antioksidanların tükenmesine bağlı olarak antioksidan kapasite düşer (204).

İnsanlarda yapılan pek çok çalışmada antioksidanların verilmesiyle total antioksidan kapasitenin arttığı bildirilmiştir (205,206).

13 hafta boyunca sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda testis dokusunda glutatyon peroksidaz aktivitesi ve lipid peroksidasyonu artmıştır ve total antioksidan kapasite, SOD ve CAT aktiviteleri azalmıştır. Antioksidan olarak bal verilen grupta lipid peroksidasyonu azalmıştır, TAK artmıştır, GPx, SOD, CAT seviyeleri düzelmiştir (207).

Organlar ve dokular antioksidanlar gibi özel bileşikleri depolama ve sentezleme özelliğine sahipken, kanın böyle bir özelliği yoktur. Kanın görevi molekülleri dokulara taşımak ve dokulardan uzaklaştırmaktır. Bu nedenle farklı dokularda antioksidan konsantrasyonları değişiklik gösterir ve dokudaki konsantrasyon ile kandaki konsantrasyon arasında fark olması normaldir. Kandaki antioksidan seviyeleri belli bir seviyenin üzerine çıkmazken bir limit olmadan dokularda konsantrasyonları artabilir. Berry and Kohen'in (1999) bildirdiğine göre Dutton (1978) kandaki antioksidan durumun, dokuların oksidatif stresle başa çıkma

yeteneğini göstermekten çok beslenme alışkanlıklarını ve dokudaki absorpsiyon ve salgı dengesini gösterdiğini rapor etmiştir (208,209). Bizim çalışmamızda da serum TAK ve TOK değerlerinde anlamlı fark olmaması, serumdaki değerlerin anlık değişim göstermesinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Gruplar arasında TAK serum ve TOK serum özellikleri bakımından anlamlı fark bulunamamıştır. Sigara+Resveratrol grubunda, dil dokusunda total antioksidan ve oksidan kapasite yükselmiştir ve bu yükselme Prior et al. (1999)'in çalışmalarında rapor ettikleri toksik molekülle karşılaşmaya bağlı antioksidan savunma sisteminin devreye girmesiyle uyumludur (206). Yalnızca Resveratrol verilen grupta, Kontrol grubuna göre dil dokusundaki TAK ve TOK'da herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Resveratrolün farklı dozlarda verilmesiyle total antioksidan kapasite üzerine etkilerinin daha net değerlendirilebileceği düşüncesindeyiz.

Oksidatif stres, BALP ile histomorfometrik özellikler arasında doğrusal bir ilişkinin olup olmadığı Pearson korelasyon kat sayısı hesaplanarak irdelenmiştir. Dildeki TAK seviyesi arttıkça osteoblast sayısının da arttığı görülmüştür. Osteoblastların antioksidan seviyeden etkilendiği daha önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (210,211).

Çalışmamızda ratlara 4 hafta verilen 20 mg/kg resveratrol muhtemel antiinflamatuvar ve osteojenik etkisi nedeni ile sigaranın kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerini azaltmıştır. Hem sigaranın yarattığı oksidatif hasarın, hem de resveratrolün etki ettiği iyileşmenin daha açık gösterilebilmesi ve diğer yandan sigara kullananların koruyucu olarak resveratrol kullanmasını önerebilmek için ileri biyokimyasal tetkikler ile oksidan ve antioksidan enzim düzeylerinin incelenmesine ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Sigara dumanı ürettiğimiz ve denekleri oluşan dumana maruz bıraktığımız özgün düzenek, birden fazla sayıda hayvanının aynı anda dumana maruz bırakılmasını sağlamıştır. Malzemeleri kolay temin edilebilir, yapımı ucuzdur, motor filtresi gibi sigara dışındaki faktörlerin etkisi olmayarak direk sigara dumanı çekilmesine olanak tanır ve sigaranın kemik üzerindeki olumsuz etkilerini göstermekte etkili olduğu görülmüştür.
2. Dört hafta preoperatif, dört hafta da postoperatif sigara maruziyetinin sigaranın yeni kemik oluşumundaki olumsuz etkilerinin görülmesi için uygun bir süre olduğu sonucuna varılmıştır.
3. Kemik defekti oluşturmak için Sprague-Dawley ratlarda 3 mm çapında trefin frez kullanılması kemik dayanıklılığını azaltmadığı için uygun bulunmuştur.
4. Kemikte defekt oluşturularak iyileşmenin değerlendirildiği çalışmamızda 8 hafta boyunca günde 6 adet sigaranın osteoblast, osteoklast sayısını, yeni kemik alanını azalttığı sonucuna varılmıştır.
5. Resveratrolün 20 mg/kg dozunda yeni oluşan kemikte osteoblast, osteoklast sayısını ve yeni kemik alanını, kontrol ve sigara gruplarına göre arttırdığı bulunmuştur. Oksidatif stres üzerine etkilerinin görülebilmesi için daha farklı dozlarla daha uzun süreli yeni çalışmalar yapılabilir.
6. Grupların osteoblast, osteoklast sayıları ve yeni kemik alanları arasındaki farklar, resveratrol ve sigaranın kemik iyileşmesi safhalarını değiştirdiklerini göstermiştir.
7. Sigaranın toksik etkisiyle antioksidan sistemi uyararak total antioksidan kapasiteyi arttırdığı görülmüştür.
8. Serumda TAK ve TOK değerleri anlık değişimler göstermektedir ve bu parametrelerin dokuyla birlikte bakılması daha uygundur.

ÖZET

SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN RATLARDA, RESVERATROLÜN OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ VE KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Kemik iyileşmesi biyolojik, mekanik ve sistemik faktörlerin etkisinde olan karmaşık bir süreçtir. Sigaranın kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Sigaranın neden olduğu bu hasarı önlemek için çeşitli gıdalar, vitaminler, antioksidanlar ve ilaçlarla çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bunların hepsi ya yalnızca osteoblastlara ya da osteoklastlara etki etmektedir. Polifenol yapıda bir antioksidan olan resveratrol, antioksidan özelliğinin yanı sıra hem osteoblast stimülasyonu ve hem de osteoklast inhibisyonuna neden olmaktadır.

Bu çalışmanın amacı deneysel olarak sigara dumanına maruz bırakılan ratlarda kronik sigara içiciliği modeli oluşturarak, sigaranın ve resveratrolün kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin ve oksidatif stres ile kemik iyileşmesi arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır. Bu amaçla denekler 4 hafta süresince 6 sigara/gün sigaraya maruz bırakılarak kronik sigara içiciliği modeli oluştuktan sonra trefin frezle femurda 3 mm çapında defekt açılmıştır. Defektin oluşturulduğu gün başlanarak yeni kemiğin oluştuğu 28 günlük dönemde deneklere 20 mg/kg dozunda resveratrol verilmiştir. Histomorfometrik incelemede osteoblast, osteoklast sayıları, yeni kemik alanı, biyokimyasal incelemede kemik-alkalen fosfataz, serumda ve dil dokusunda total oksidan/antioksidan kapasite değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları sigaranın kemik iyileşmesini olumsuz etkilediğini ve resveratrol verilmesinin bu olumsuz etkiyi azaltmakta yardımcı olduğunu göstermiştir. Resveratrolün total oksidan/antioksidan kapasite üzerine etkilerinin değerlendirilebilmesi için daha farklı dozlarıyla çalışmalar yapılabilir.

Anahtar Kelimeler: Sigara, Resveratrol, Osteoblast, Osteoklast, Yeni kemik alanı, Oksidatif stres

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF RESVERATROL ON CIGARETTE SMOKE EXPOSED RATS, ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND BONE HEALING

Bone healing is a complex process that is influenced by biological, mechanical and systemic factors. Cigarette is known to have negative effects on bone healing. A variety of nutrients, vitamins and drugs are being studied to prevent bone damage that caused by cigarette. But all these materials effect only osteoblastogenesis or osteoclastogenesis. Resveratrol is a polifenolic antioxidant that modulate bone metabolism that have both osteoblastic stimulation effect and leads to inhibition of osteoblasts.

The aim of this experimental study is to investigate the effects of smoking and resveratrol on bone healing and relationship between oxidative stress and bone healing in rats exposed to cigarette smoke by creating models of chronic cigarette smoking. For this purpose, rats exposed 6 cigarettes/day during 4 weeks to establish chronic cigarette smoker model and defects was created in the femur by 3 mm diameter trephine bur. Starting from the day of creation of the defect to 28-day period that new bone healing occurred, the subjects were given 20 mg/kg resveratrol. Histomorphometric examination of osteoblast, osteoclast numbers, new bone area, bone-alkaline phosphatase biochemical examination, total oxidant/antioxidant capacity of serum and tongue tissue was evaluated.

The results of this study are;smoking have adverse effects on the bone healing and administration of resveratrol might help to reduce these negative effects. In order to asses the effects of resveratrol on total oxidative/antioxidative capacity further studies with different resveratrol doses are needed.

Key Words: Cigarette, Resveratrol, Osteoblast, Osteoclast, New bone area, Oxidative stress.

KAYNAKLAR

1. Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002; 55(2): 143-150.
2. Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H, Reed E, Rennard SI. Differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med* 2001; 137(3): 208-219.
3. Sartori AR, Moreira J, Santos AMM, Cintra DEC, Sartori LR, Baraúna MA, Canto RST. Bone repair process in normal and osteopenic female rats. tibiae: a comparative study. *Acta Ortop Bras* 2008; 16(1): 37-40.
4. Kapoor D, Jones TH. Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *Eur J Endocrinol* 2005; 152(4): 491-499.
5. Fung YK, Iwaniec U, Cullen DM, Akhter MP, Haven MC, Timmins P. Long-term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85(4): 181-187.
6. Kalra J, Chaudhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol* 1991; 72(1): 1-7.
7. Serafini M., Del Rio, D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Report* 2004; 9(3): 145-152.
8. Petruzzelli S, Puntoni R, Mimotti P, Pulerà N, Baliva F, Fornai E, Giuntini C. Plasma 3-nitrotyrosine in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(6): 1902-1907.
9. Laird E, Ward M, McSorley E, Strain JJ, Wallace J. Vitamin D and bone health: potential mechanisms. *Nutrients* 2010; 2(7): 693-724.
10. Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaisse JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res* 2005; 65(21):9943-9952.

11. Kupisiewicz K, Boissy P, Abdallah BM, Hansen FD, Erben RG, Savouret JF, et al. Potential of resveratrol analogues as antagonists of osteoclasts and promoters of osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 2010; 87(5): 437-449.
12. Bancroft, John D, Gamble, Marilyn. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6th ed. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier, 2008.
13. Junquiera LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji* 8. Baskı, İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Sti., 1998.
14. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology* 10th ed., New York: McGraw-Hill, 2003.
15. Öber A, İzzetoğlu GT. *Histoloji* 1. Baskı, Ankara: Nobel Basımevi, 2006.
16. Javed A, Chen H, Ghorı FY. MD. Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2010; 22(3): 283-293.
17. Li H, Daculsi R, Grellier M, Bareille R, Bourget C, Amedee J. Role of neural-cadherin in early osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells cocultured with human umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(2): 422-430.
18. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993; 14(4): 424-442.
19. Lieberman JR and Friedlaender GE. *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Humana Press Inc Totowa, NJ. 2005
20. Lee YS, Kim YS, Lee SY, Kim GH, Kim BJ, Lee SH, et al. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone* 2010; 47(5): 926-937.
21. Rubin C, Turner AS, Mallinckrodt C, Jerome C, McLeod K, Bain S. Mechanical strain, induced noninvasively in the high-frequency domain, is anabolic to cancellous bone, but not cortical bone. *Bone* 2002; 30(3): 445-452.
22. Khan SN, Tomin E, Lanr JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am* 2000; 31(3): 389-396.

23. Hall BK, Miyake T. Divide, accumulate, differentiate: Cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol* 1995; 39(6): 881-893.
24. Schenk RK. Biology of fracture repair. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG, eds. *Skeletal Trauma*. 2th ed. Philadelphia: WB Saunders Company: 1998, p. 33-78.
25. Buckwalter JA, Grodzinsky AJ. Loading of healing bone, fibrous tissue, and muscle: implications for orthopaedic practice. *J Am Acad Orthop Surg* 1999; 7(5):291-149.
26. Gürer N, Başak R, Bahadır C, Koç H, Nur H, Polat Y, ve ark. Kemik Mineral Yoğunluğu ile Kemik Döngüsünün Biyokimyasal Göstergelerinin İlişkisi. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg* 2005; 51(2): 54-57.
27. Garnero P, Delmas P. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27(2): 303-23.
28. Delmas PD, Eastell R, Garnero P. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2000; 11(6): 2-17.
29. Uzunoğlu N. Alkalen Fosfataz Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1998; 18(2): 69-76
30. Ecer S, Dikici B, Haspolat K. Kronik karaciğer hastalıklarında kemik mineral metabolizması. *Dicle Tıp Dergisi* 2005; 32(2): 57-62.
31. Dere E, Bakır S, Atalay A. Malathion'un Karaciğer, Böbrek ve İnce Bağırsak Alkalen Fosfataz Aktivitesi Üzerine Etkisi. *Turkish Journal of Zoology* 1999; 23: 709-713.
32. Lian JB, Stein G. Osteoblast biology. In: Marcus R, Feldman DD, Kelsey J (Eds): *Osteoporosis*, San Diego, Academic Press, 2001; p: 21 -71.
33. Xu L, Lv K, Zhang W, Zhang X, Jiang X, Zhang F. The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB, BMSCs, and β -TCP scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23(4): 1073-1084.
34. Reichert JC, Gohlke J, Friis TE, Quent VMC, Huttmacher DW. Mesodermal and neural crest derived ovine tibial and mandibular osteoblasts display distinct molecular differences. *Gene* 2013; 525(1): 99-106.

35. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985; 64: 111-126.
36. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann NY Acad Sci* 1993; 686: 12-27.
37. Porter SE, Hanley EN. The musculoskeletal effects of smoking. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9(1): 9-17.
38. Hecht SS1, Hoffmann D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis* 1988; 9(6): 875-884.
39. Brunneman KD, Yu L, Hoffmann D. Assessment of carcinogenic volatile N-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes. *Cancer research* 1977; 37(32): 18-22.
40. Sandhu HS. A Practical Guide to Tobacco Cessation in Dental Offices. *J Can Dent Assoc* 2001; 67(3): 153-157.
41. Gandini S, Botteri E, Iodice S, Boniol M, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Boyle P. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008; 122(1): 155-164.
42. Johnson GK, Slach NA. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ* 2001; 65(4): 313-321.
43. Sorensen LT. Wound Healing and Infection in Surgery. *Arch Surg* 2012; 147(4): 373-383.
44. Wong LS, Martins-Green M. Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: Implications for impaired healing. *Wound Repair Regen* 2004; 12(4): 471-484.
45. Lee J, Taneja V, Vassallo R. Cigarette smoking and Inflammation: Cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* 2012; 91(2): 142-149.
46. Bosken CH, Doerschuk CM, English D, Hogg JC. Neutrophil kinetics during active cigarette smoking in rabbits. *J Appl Physiol* 1991; 71(2): 630-637.
47. Silverstein P. Smoking and wound healing. *Am J Med* 1992; 93(1A): 22-24.

48. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol* 2003; 74(10): 1440-1446.
49. Black CE, Huang N, Neligan PC, Levine RH, Lipa JE, Lintlop S, Forrest CR, Pang CY. Effect of nicotine on vasoconstrictor and vasodilator responses in human skin vasculature. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281(4):R1097-104.
50. Sorensen LT, Jorgensen S, Petersen LJ, Hemmingsen U, Bülow J, Loft S, Gottrup F. Acute effects of nicotine and smoking on blood flow, tissue oxygen, and aerobic metabolism of the skin and subcutis. *J Surg Res* 2009; 152(2): 224-230.
51. Krupski WC. The peripheral vascular consequences of Smoking. *Ann Vas Surg* 1991; 5(3): 291-304.
52. Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 1985; 5(1): 2-8.
53. Caro CG. Cigarette smoking causes acute changes in arterial wall mechanics and the pattern of arterial blood flow in healthy subjects: Possible insight into mechanisms of atherogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1990; 273:273-280.
54. Johnson NW, Bain CA. Tobacco and oral disease. EU-working group on tobacco and oral health. *Br Dent J* 2000; 189(4): 200-206.
55. Michaud SE1, Ménard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *FASEB J* 2003; 17(9): 1150-1152.
56. Sorensen LT, Toft BG, Rygaard J, Ladelund S, Paddon M, James T. Effect of smoking, smoking cessation, and nicotine patch on wound dimension, vitamin C, and systemic markers of collagen metabolism. *Surgery* 2010; 148(5): 982-990.
57. Krall EA, Dawson-Hughes B. Smoking increases bone loss and decreases intestinal calcium absorption. *J Bone Miner Res* 1999; 14(2): 215-220.
58. Cesar-Neto JB, Duarte PM, De Oliveira MC, Tambeli CH, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking modulates interleukin-6: interleukin-10 and RANKL: Osteoprotegerin ratios in the periodontal tissues. *J Periodontal Res* 2007; 42(2): 184-191.
59. Abate M, Vanni D, Pantalone A, Salini V. Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013; 3(2): 63-9.

60. Dai J, Rabie AB. VEGF: An essential mediator of both angiogenesis and endochondral ossification. *J Dent Res* 2007; 86(10): 937-950.
61. Rawlinson A, Grummitt JM, Walsh TF, Ian Douglas CW. Interleukin 1 and receptor antagonist levels in gingival crevicular fluid in heavy smokers versus nonsmokers. *J Clin Periodontol* 2003; 30(1): 42-48.
62. Law MR, Cheng R, Hackshaw AK, Allaway S, Hale AK. Cigarette smoking, sex hormones and bone density in women. *Eur J Epidemiol* 1997; 13(5): 553-558.
63. Bhattacharyya MH. Cadmium Osteotoxicity in Experimental Animals: Mechanisms and Relationship to Human Exposures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;
64. Ueng SW, Chao EK, Lee SS, Shih CH. Augmentative plate fixation for the management of femoral nonunion after intramedullary nailing. *J Trauma* 1997; 43(4): 640-644.
65. Raikin SM, Landsman JC, Alexander VA, Froimson MI, Plaxton NA. Effect of nicotine on the rate and strength of long bone fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; 353(1): 231-237.
66. Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999; 45(4): 294-301.
67. Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcified Tissue Int* 2001; 68(5): 259-270.
68. Sanchez-Pérez A, Moya-Villaescusa MJ, Caffesse RG. Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. *J Periodontol* 2007; 78(2): 351-359.
69. Bain A. Implant installation in the smoking patient. *Periodontology 2000* 2003; 33: 185-193.
70. Kasat V, Ladda R. Smoking and dental implants. *J Int Soc Prevent Communit Dent* 2012; 2(2): 38-41.
71. Giorgetti APO, César Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Júnior FH. Cigarette Smoke Inhalation Influences Bone Healing of Post-Extraction Tooth Socket: A Histometric Study in Rats. *Braz Dent J* 2012; 23(3): 228-234.

72. Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *BJOMS* 1988; 26(5) :402-409
73. Özkan A, Bayar GR, Altug HA, Sencimen M, Dogan N, Gunaydin Y. The Effect of Cigarette Smoking on the Healing of Extraction Sockets: An Immunohistochemical Study. *J Craniofac Surg* 2014; jan 29 [Epub ahead of print].
74. Cheung LK, Ma L, Zheng LW. Inhibitory effect of nicotine on bone regeneration in mandibular distraction osteogenesis. *Front Biosci* 2007; 12: 3256-3262.
75. Ueng SW, Lin SS, Wang CR, Liu SJ, Tai CL, Shih CH. Bone healing of tibial lengthening is delayed by cigarette smoking: Study of bone mineral density and torsional strength on rabbits. *J Trauma* 1999; 46(1): 110-115.
76. Levin L, Schwartz-Arad D. The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. *Implant Dent* 2005; 14(4): 357-361.
77. Sloan A, Hussain I, Maqsood M, Eremin O, El-Sheemy M. The effects of smoking on fracture healing. *Surgeon* 2010; 8(2): 111-116.
78. Benson PD, Marshall MK, Engelstad ME, Kushner GM, Alpert B. The use of immediate bone grafting in reconstruction of clinically infected mandibular fractures: Bone grafts in the presence of pus. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(1):122-126. 238(3): 258-265.
79. Serena-Gómez E, Passeri LA. Complications of mandible fractures related to substance abuse. *J Oral Maxillofac Surg* 2008; 66(10): 2028-2034.
80. Zheng LW, Ma L, Cheung LK. Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone* 2008; 43(2): 355-361.
81. Sherwin MA, Gastwirth CM. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. *J Foot Surg* 1990; 29(1): 84-87.
82. Halliwell B. Free radicals antioxidants and human disease; curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344(8924): 721-724.
83. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross C. Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119(6): 598-620.

84. Halliwell B, Aruoma OR. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanisms of action and measurements in mammalian system. *FEBS Lett* 1991; 281(1-2): 9-19.
85. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity and oxygen radicals, Transition Metals and Disease. *Biochem J* 1984; 219(1): 1-14.
86. Halliwell B. Drug antioxidant effects: A basis for drug selection? *Drugs* 1991; 42(4): 569-605.
87. Delibaş N, Özçankaya R. Serbest radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 1995; 2 (3):11-17.
88. Mantha SV, Prasad M, Kaka J, Prasad K. Antioxidant enzymes in hypercholesterolemia and effects of vitamin E in rabbits. *Atherosclerosis* 1993; 101(2): 135-144.
89. Asayama K, Nakane T, Uchida H. et al. Serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res* 1994; 26(7):313-315.
90. Eiserich JP, Vossen V., O'Neill CA., Halliwell, B., Cross, C.E., van der Vliet, A. Molecular mechanism of damage by excess nitrogen oxides nitration of tyrosine by gas-phase cigarette smoke. *FEBS Lett* 1994; 10;353(1): 53-56.
91. Altuntaş I, Dane S, Gümüştekin K. Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2002; 13(1): 69-72.
92. Özbay B, Dülger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: Relation to age, gender, exercise and smoking. *Tohoku J Exp Med* 2002; 197(2): 119–124.
93. Kodama M, Kaneko M, Aida M, Inoue F, Nakayama T, Akimoto H. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. *Anticancer Res* 1997; 17(1A): 433-438.
94. Elliot, JG. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech* 1999; 53(2): 46-48.
95. Ferrari CKB. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. *Biogerontology* 2004; 5(5): 275-289.
96. Berger MM. Can oxidative damage be reated nutritionally? *Clin Nutr* 2005; 24(2):172-183.

97. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1): 44-84.
98. Demirsoy A, Türkan İ, Gündüz G. *Genel Biyoloji*. 5. baskı 2003: s. 382-383.
99. Sorg O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol* 2004; 327(7): 649-662.
100. Çoban Ö, Patır B. Antioksidan etkili bazı bitki ve baharatların gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi* 2010; 5(2) : 7-19.
101. Gardner PT, White TAC, Mcphail DB, Duthie GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry* 2000; 68(4): 471-474.
102. Landvik SV, Diplock AT, Packer L. Efficacy of vitamin E in human health and disease. In: Cadenas E, Packer L, eds. *Handbook of Antioxidants*. New York, Marcel Dekker, 1996: p. 63–87.
103. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol* 2000; 1; 59(7): 865-870
104. Pedras MSC, Ahiahonu PWK. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 2005; 66(4): 391–411.
105. Fremont L, Belguendouz L, Delpal S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Sci* 1999; 64(26): 2511-2521.
106. Cordova AC1, Sumpio BE. Polyphenols are medicine: Is it time to prescribe red wine for our patients? *Int J Angiol*. 2009 Fall;18(3):111-7.
107. Wu JM, Wang Z, Hseih JC. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic present in red wine. *Int J Molecular Medicine* 2001; 8(1): 3-17.
108. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lançon A, Latruffe N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: Plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* 2004; 68(6): 1113-1118.

109. Cottard CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudoux JL. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(1): 7-16.
110. Das S, Lin HS, Ho PC, Ng KY. The impact of Solubility and Dose on the Pharmacokinetic Profiles of Resveratrol. *Pharm Research* 2008; 25(11): 2593-2600.
111. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr* 2002; 132: 257-260.
112. Dai Z, Li Y, Quarles LD, Song T, Pan W, Zhou H, et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* 2007; 14(12): 806-814.
113. Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, Haldosen LA. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs* 2009; 189(1-4):93-97.
114. Zhou H, Shang L, Li X, Zhang X, Gao G, Guo C, Chen B, Liu Q, Gong Y, Shao C. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 2009; 315(17): 2953-2962.
115. Casati MZ, Algayer C, Cardoso da Cruz G, Ribeiro FV, Casarin RC, Pimentel SP, Cirano FR. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *J Periodontol* 2013; 84(10): 58-64.
116. Liu ZP, Li WX, Yu B, Huang J, Sun J, Huo JS, Liu CX. Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. *J Med Food* 2005; 8(1): 14-19.
117. Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinsky N, et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* 2008; 8(2): 157-168.
118. Casarin R, Casati M1, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, et al. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2014 Feb 13; pii: S0901-5027(14): 14-9.
119. Song LH, Pan W, Yu YH, Quarles LD, Zhou HH, Xiao ZS. Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of mouse

bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER/NO/cGMP pathway. *Tox In Vitro* 2006; 20(6): 915-922.

120. Mizutani K, Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(3): 859-863.

121. Uysal T, Gorgulu S, Yagci A, Karslioglu Y, Gunhan O, Sagdic D. Effect of resveratrol on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture: early bone changes. *Orthod Craniofac Res* 2011; 14(2): 80-87.

122. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, Moritz JD, Schu P, von Figura K. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(23): 13453–13458.

123. Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341(8843): 454-457.

124. Celotti E, Ferrarini R, Zironi R, Conte LS. Resveratrol content of some wines obtained from dried vapolicella grapes: Reccioto and Amarone. *J Chromatogr A* 1996; 12; 730(1-2): 47-52.

125. Delmas D, Jannin B, Latruffe N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(5): 377-395.

126. Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T, Korthuis RJ. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory induced by ischemia/reperfusion, platelet activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Me* 2003; 34(7): 810-817.

127. Jang M, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp Clin Res* 1999; 25: 65-77.

128. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: Protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol* 2004; 5;489(1-2):39-48.

129. Sun AY, Chen YM, James-Kracke M, Wixom P, Cheng Y. Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells. *Neurochem* 1997; 22(10): 1187-1192.
130. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 16 (7117): 337-342.
131. Anekonda TS. Resveratrol—A boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res* 2006; 52 (2): 316-326.
132. Kimura Y, Okuda H, Kubo M. Effects of stilbenes isolated from medicinal plants on arachidonate metabolism and degranulation in human polymorphonuclear leukocytes. *J Ethnopharmacol* 1995; 45(2): 131-139.
133. Sanchez-Fidalgo S, Cárdeno A, Villegas I, Talero E, de la Lastra CA. Dietary supplementation of resveratrol attenuates chronic colonic inflammation in mice. *Eur J Pharmacol* 2010; 633(1-3): 78-84.
134. Shishodia S, Aggrawal B, Resveratrol. A polyphenol for all season. In: Aggrawal B, Shishodia S, eds. *Resveratrol in Health and Disease* 1 st ed. Newyork: CRC, Taylor and Francis Group: 2006, p.1-17.
135. Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of Resveratrol on Human Immune Cell Function. *Life Science* 2001; 70(1): 81-96.
136. Jang MS, Cai EN, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, et al. Cancer Chemopreventive Activity of resveratrol a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275(5297): 218-220.
137. Napoli C, Ignarro IJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide* 2006; 5: 15(4): 265-79.
138. Naderali EK, Smith SL, Doyle PJ, Williams G. The mechanism of resveratrol-induced vasorelaxation differs in the mesenteric resistance arteries of lean and obese rats. *Clin Sci* 2001; 100(1): 55-60.
139. Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106(13): 1652–1658.

140. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38(12): 1103-1111.
141. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37(4): 277-285.
142. Camkerten I, Sahin T, Borazan G, Gokcen A, Erel O, Das A. Evaluation of blood oxidant/antioxidant balance in dogs with sarcoptic mange. *Vet Parasitol* 2009; 6;161(1-2):106109.
143. Ethical concerns about a study involving human subjects <http://publicationethics.org/case/ethical-concerns-about-study-involving-human-subjects> (09.03.2014).
144. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 2005; 16(2): 129-138.
145. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, et al. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone* 2011; 49(4): 591-599.
146. Erdogan O, Esen E, Ustün Y, Kürkçü M, Akova T, Gönluşen G, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on healing of mandibular fractures: An experimental study in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64(2): 180-188.
147. Tsuji H, Fujimoto H, Matsuura D, Nishino T, Lee KM, Yoshimura H. Comparison of Biological Responses in Rats Under Various Cigarette Smoke Exposure Conditions. *J Toxicol Pathol* 2013; 26(2): 159–174.
148. Ventura M, Franssen GM, Oosterwijk E, Boerman OC, Jansen JA, Walboomers XF. SPECT vs. PET monitoring of bone defect healing and biomaterial performance in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 2014; 6 doi: 10.1002/term.1862. [Epub ahead of print].
149. Yıldırım S, Olgaç V, Yıldırım S, Özyuvacı H, Katipoğlu AB. Üç farklı hemostatik maddenin deneysel kemik defektlerindeki (sıçan tibia) doku uyumluluğu ve kemik iyileşmesinin erken dönemine olan etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. *İÜ Diş Hek Fak Der* 1994; 28(4): 260-264.

150. Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials* 2005; 26(31): 6158-6166.
151. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, Mason RS, Murrell GA, Diwan AD, Diamond T. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone* 2001; 28(1): 80-86.
152. Herron S, Thordarson DB, Winet H, Luk A, Bao JY. Ingrowth of Bone into Absorbable Bone Cement: An in vivo Microscopic Evaluation. *Am J Orthop* 2003; 32(12): 581–584.
153. Ejiri S, Toyooka E, Tanaka M, Binte Anwar R, Kohno S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/ or ovariectomy. *Arch Oral Biol* 2006; 51(11): 941-950.
154. Gala Paniagua J, Díaz-Curiel M, de la Piedra GC, Castilla Reparaz C, Torralbo GM: Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 1998; 71(847): 754-758.
155. Dalle Carbonare L, Bertoldo F, Valenti MT, Zenari S, Zanatta M, Sella S, et al. Histomorphometric analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Micron* 2005; 36(7-8): 645–652.
156. Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. *J Bone Miner Res* 2005; 20(10): 1715-1722.
157. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, Scheideler M, Windhager R, Preisegger KH, Trajanoski Z. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics* 2007; 12(8): 70.
158. Vali B, Rao LG, El-Soheby A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem* 2007; 18(5): 341-347.
159. Wald NJ, Hackshaw AK. Cigarette smoking: an epidemiological overview. *Br Med Bull* 1996; 52(1): 3-11.

160. Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax* 2004; 59(8): 713-721.
161. Iqbal J, Sun L, Cao J, Yuen T, Lu P, Bab I, et al. Smoke carcinogens cause bone loss through the aryl hydrocarbon receptor and induction of Cyp1 enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(27): 11115-11120.
162. Skott M, Andreassen TT, Ulrich-Vinther M, Chen X, Keyler DE, LeSage MG, Pentel PR, Bechtold JE, Soballe K. Tobacco extract but not nicotine impairs the mechanical strength of fracture healing in rats. *J Orthop Res* 2006; 24(7): 1472-1479.
163. Singh SU, Casper RF, Fritz PC, Sukhu B, Ganss B, Girard B Jr, et al. Inhibition of dioxin effects on bone formation in vitro by a newly described aryl hydrocarbon receptor antagonist, resveratrol. *J Endocrinol* 2000; 167: 183–195.
164. Leibbrandt A, Penninger JM. TNF conference 2009: Beyond bones - RANKL/RANK in the immune system. *Adv Exp Med Biol* 2011; 691: 5-22.
165. Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FH Jr. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: A histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005; 20(5): 713-719.
166. Rinaldi M, Maes K, De Vleeschauwer S, Thomas D, Verbeken EK, Decramer M, Janssens W, Gayan-Ramirez GN. Long-term nose-only cigarette smoke exposure induces emphysema and mild skeletal muscle dysfunction in mice. *Dis Model Mech* 2012; 5(3): 333-341.
167. Delibaş N, Ozcankaya R, Altuntas İ, Sütçü R. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and NMDA receptor subunits 2A and 2B concentration in rat hippocampus. *Cell Biochemistry and Function* 2013; 21(1): 69-73.
168. Kuruş M, Söğütlü G, Fırat Y, Eşrefoğlu M, Yoloğlu S, Öztürk F, Otlu A. Sigara Dumanına Maruz Kalmış Sıçanların Tiroid Dokusunda Görülen Histopatolojik Değişiklikler ve Resveratrolün Bu Değişikliklere Etkisi. *Türk Klin J Med Sci* 2009; 29(5): 1183-1190.
169. Churg A, Wright JL. Animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive lung disease. *Contrib Microbiol* 2007; 14: 113-125.

170. Cesar-Neto JB, Rosa EF, Pannuti CM, Romito GA. Smoking and periodontal tissues: A review. *Braz Oral Res* 2012; 26(1): 25-31.
171. Andrade AR, Sant'Ana DC, Mendes JA Jr, Moreira M, Pires GC, Santos MP, et al. Effects of cigarette smoke inhalation and coffee consumption on bone formation and osseous integration of hydroxyapatite implant. *Braz J Biol* 2013; 73(1): 173-177.
172. Luchese C, Pinton S, Nogueira CW. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. *Pharmacol Res* 2009; 59(3): 194-201.
173. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporos Int* 2012; 23(8): 2081-2092.
174. Wang D, Hang T, Wu C, Liu W. Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS. *J Chromatogr* 2005; 27; 829(1-2): 97-106.
175. Crowell JA1, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci* 2004; 82(2): 614-619.
176. Lin Q, Huang YM, Xiao BX, Ren GF. Effects of resveratrol on bone mineral density in ovariectomized rats. *Int J Biomed Sci*. 2005 Jun;1(1):76-81.
177. Karimian E, Tamm C, Chagin AS, Samuelsson K, Kjartansdóttir KR, Ohlsson C, Säwendahl L. Resveratrol treatment delays growth plate fusion and improves bone growth in female rabbits. *PLoS One* 2013; 28; 8(6): e67859.
178. Elmali N, Baysal O, Harma A, Esenkaya I, Mizrak B. Effects of resveratrol in inflammatory arthritis. *Inflammation* 2007; 30(1-2): 1-6.
179. Zivna H, Micuda S, Brcakova-Dolezelova E, Zivny P. The Effect of Resveratrol on Bone Status in Rats with Bile Duct Obstruction. *Open Journal of Endocrine and Metabolic Diseases* 2013; 3(1): 46-51.
180. Gao SG, Cheng L, Li KH, Liu WH, Xu M, Jiang W, et al. Effect of epimedium pubescen flavonoid on bone mineral status and bone turnover in male rats chronically exposed to cigarette smoke. *BMC Musculoskelet Disord* 2012; 19(13): 105.
181. Franco GR, Laraia IO, Maciel AAW, Miguel NM, dos Santos GR, Fabrega-Carvalho CA, et al. Effects of chronic passive smoking on the regeneration of rat

- femoral defects filled with hydroxyapatite and stimulated by laser therapy. *Injury* 2013; 44(7): 908–913.
182. Buenzli PR1, Pivonka P, Smith DW. Bone refilling in cortical basic multicellular units: Insights into tetracycline double labelling from a computational model. *Biomech Model Mechanobiol* 2014; 13(1): 185-203.
183. Phan TC1, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol* 2004; 19(4): 1325-1344.
184. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981; 33(4): 349-351.
185. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3(3): 131-139.
186. Kamath MS, Ahmed SSSJ, Dhanasekaran M, Winkins SS. Polycaprolactone scaffold engineered for sustained release of resveratrol: Therapeutic enhancement in bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2014; 9(1): 183-195.
187. Gao SG, Li KH, Xu M, Jiang W, Shen H, Luo W, et al. Bone turnover in passive smoking female rat: relationships to change in bone mineral density. *BMC Musculoskelet Disord* 2011; 12(131):1-10.
188. Ramesh T, Sureka C, Bhuvana S, Hazeena Begum V. Sesbania grandiflora diminishes oxidative stress and ameliorates antioxidant capacity in liver and kidney of rats exposed to cigarette smoke. *J Physiol Pharmacol* 2010; 61(4): 467-476.
189. Gescher AJ, Steward WP. Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(10): 953-957.
190. Göktaş Ö. Kadmiyumun neden olduğu oksidatif stres üzerine resveratrolün koruyucu etkisi Yüksek Lisans Tezi, Malatya, (Prof. Dr. Göknur Aktay) , 2007; 45-54.
- <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/TezGoster?key=7d53ed97e31a8bd353d20ca3991cc9a53a3dcf89061587dfcbe93411167011c53aa25b24ad4672d7>. (17.01.2014).
191. Bruno RS, Traber MG. Vitamin E biokinetics, oxidative stress and cigarette smoking. *Pathophysiology* 2006; 13(3): 143-149.

192. Keskin D, Karsan O, Ezirmik N, Çiftçioğlu A. Tavşanlarda kırık iyileşmesi üzerine alfa-tokoferolün etkisi. *Artroplastik-Artroskopik Cerr* 1999; 10(2): 207-210.
193. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, et al. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med* 2009; 15(10): 468–476.
194. Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem* 2005; 29;280(17):17497-17506.
195. Sheweita SA, Khoshhal KL. Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab* 2007; 8(5): 519–525.
196. Ziskoven C, Jäger M, Zilkens C, Bloch W, Brixius K, Krauspe R. Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation. *Orthop Rev* 2010; 2(2): 95–101.
197. Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, Tuncel P, Özbek R, Turan K. Antioxidant effect of alfa-tocopherol on fracture haematoma in rabbit. *J Int Med Res* 1996; 24: 419-424.
198. Braun KF, Ehnert S, Freude T, Egaña JT, Schenck TL, Buchholz A et al. Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. *Sci World J* 2011;11:2348-2357.
199. Holzer N, Braun KF, Ehnert S, Egaña JT, Schenck TL, Buchholz A et al. Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication. *Langenbecks Arch Surg* 2012;397(3):467-474.
200. Çetin A, Muhtaroğlu S, Saraymen R, Öztürk A, Müderris İ. Smoking induced bone defects may be due to oxidative damage in postmenopausal women. *Türk Klin J med Sci* 2009; 29(4):851-8.
201. Valenca SS, Silva Bezerra F, Lopes AA, Romana-Souza B, Marinho Cavalcante MC, Lima AB, Gonçalves Koatz VL, Porto LC. Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. *Environ Res* 2008; 108(2): 199-204.
202. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against

- cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294(3): 478-488.
203. Csiszar A, Labinskyy N, Podlutzky A, Kaminski PM, Wolin MS, Zhang C, et al. Vasoprotective effects of resveratrol and SIRT1: Attenuation of cigarette smoke-induced oxidative stress and proinflammatory phenotypic alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294(6): 2721-2735.
204. Psotova J, Zahalkova J, Hrbac J, Simanek V, Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. *Biomed Papers* 2001; 145(2): 81-83.
205. Lands LC, Grey VL, Grenier C. Total plasma antioxidant capacity in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 81-87.
206. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(11-12): 1173-1181.
207. Mohamed M, Sulaiman SA, Jaafar H, Sirajudeen KN. Antioxidant protective effect of honey in cigarette smoke-induced testicular damage in rats. *Int J Mol Sci* 2011; 12(9): 5508-5521.
208. Dutton LP. Redox potentiometry: determination of midpoint potentials of oxidation-reduction components of biological electron-transfer systems. *Methods Enzymol* 1978; 54: 411-435.
209. Berry EM, Kohen R. Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Medical Hypotheses* 53, Issue 5 1999 Pages 397-401
210. Rao LG. Tomato, lycopene and bone health: *Preventing osteoporosis, Caled SciPress Scotland* 2006: p. 153-168.
211. Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in post menopausal women. *Osteoporosis Int* 2007; 18: 109-115.

EKLER

EK 1: SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Destekleme Protokolü

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

Toplantı Tarihi : 11.09.2012
Toplantı No: 2012/07

Proje No : 3241-D1-12
Proje Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. MÜGE ÇINA AKSOY
Yöneticinin Adresi : Diş Hekimliği Fakültesi , Klinik Diş Hekimliği Bil.

Proje Başlığı : Sigara Dumanına Maruz Bırakılan Ratlarda, Resveratrolün Oksidatif Stres Parametreleri ve Diş Çekimi Sonrası Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Etkilerinin Araştırılması
Yayın Şartı : SCI/SSCI/AHCI İndeksi Dışındaki İndekslere Giren Yayın
Proje Bütçesi (TL) : 15.000,50
Proje süresi : Başlangıç Tarihi : 17.10.2012 Bitiş Tarihi: 17.04.2015 - 30 ay

IMZA
Prof.Dr.İskender AKKURT
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı

IMZA
Prof.Dr.M.Cengiz KAYACAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

IMZA
Yrd.Doç.Dr.Abdullah Şevki DUYMAZ
Güzel Sanatlar Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

IMZA
Doç.Dr.Nevin AYTEMİZ
Komisyon Üyesi
(İZİNLI)

IMZA
Doç.Dr.Ramazan ERDEM
Komisyon Üyesi

IMZA
Yrd.Doç.Dr.S.Zeynep ALPARSLAN GÖK
Komisyon Üyesi

IMZA
Prof.Dr.Süleyman SEYDİ
Sosyal Bilimler Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

IMZA
Doç.Dr.İbrahim DİLER
Su Ürünleri Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

IMZA
Prof.Dr.Kamil EKİNCİ
Komisyon Üyesi

IMZA
Doç.Dr.Bahattin YAMAN
Komisyon Üyesi

IMZA
Prof.Dr.M.Fehmi ÖZGÜNER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Komisyon Üyesi

IMZA
Prof.Dr.Hüseyin YORGANCIGİL
Komisyon Üyesi

IMZA
Doç.Dr.Fevzi BEDİR
Komisyon Üyesi

IMZA
Yrd.Doç.Dr.Fatma Handan GİRAY
Komisyon Üyesi
(İZİNLI)

PROJE YÖNETİCİSİNE TEBLİGAT
Sayın: **Yrd. Doç. Dr. MÜGE ÇINA AKSOY**
Süleyman Demirel Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi

Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun yukarıdaki kararı uyarınca sunduğumuz projenin belirtilen şartlarda desteklenmesine karar verilmiştir.

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

Tarih ve Saat :


IMZA
Prof.Dr.İskender AKKURT
Rektör Yardımcısı
BAP Komisyon Başkanı

EK 2: SDÜ Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu Kararı

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

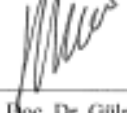



TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI
14.08.2012	26	10

Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 14 AĞUSTOS 2012 tarihinde Saat 14:00'da toplanarak aşağıdaki kararları almıştır,

Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları A.D. Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Müge ÇINA AKSOY'un yürütücüsü olduğu Prof. Dr. Mustafa Cihat AVUNDUK, Doç. Dr. Etkan UZ, Arş. Gör. Birsen Harun DAĞDEVİREN, Dt. Özge KOLKESEN ŞAHİN'in yardımcı araştırmacı olarak yer aldığı, "Sigara Dumanına Maruz Bırakılan Ratlarda, Resveratrolün Oksidatif Stres Parametreleri ve Diş Çekimi Sonrası Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Etkilerinin Araştırılması" başlıklı çalışma;

Deney Hayvanının	Türü	Cinsiyeti	Sayısı	Yaşı
	Sıçan (Sprague-Dawley)	Erkek	38	6-8 aylık / 250-300gr

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

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

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Özge	Soyadı	Kolkesen Şahin
Doğum Yeri	Dalaman	Doğum tarihi	10.02.1985

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	2008
Lise	Muğla 75. Yıl Fen Lisesi	2003
Yabancı Dil	ÜDS/ İngilizce	87,25

Yayınlar ve Kazanılmış Dereceler

AÇBİD Uluslararası Kongresi, 2012 Yılı İnteraktif Asistan Sınavı Birinciliği.

Özge Kolkesen Şahin, Müge Çına Aksoy, Mustafa Cihat Avunduk. 'Effects Of Resveratrol and Cigarette Smoke On Bone Healing: Experimental Study'. AÇBİD Uluslararası Kongresi, 2014 Yılı Poster Bildiri Birincilik ödülü.

Özge Kolkesen Şahin, Müge Çına Aksoy. 'Sigara Ve Oral Cerrahi İşlemler Üzerine Etkileri' Derleme. Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi'nde yayınlanmak üzere kabul edildi.

Müge Çına Aksoy, Gülperi Koçer, Timuçin Baykul, Özge Kolkesen Şahin. 'Bifosfonatlara Bağlı Çene Nekrozu; Atipik Klinik Görüntü' Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi'nde yayınlanmak üzere kabul edildi.