

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
AĞIZ DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**ANKAFERD BLOOD STOPPER' IN KEMİK DOKUSU  
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN  
DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Dt. Akın ÖZTEMEL**

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK

ANKARA  
Nisan 2013

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
AĞIZ DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**ANKAFERD BLOOD STOPPER' IN KEMİK DOKUSU  
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN  
DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Dt. Akın ÖZTEMEL**

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
03/2010-19 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA  
Nisan 2013

TC.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Ana bilim Dalı Doktora Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/04/2013

PROF. DR. İNCİ RANA KARACA  
Gazi Üniversitesi  
Jüri Başkanı

PROF. DR. MUSTAFA ÖZTÜRK  
Gazi Üniversitesi

PROF. DR. İHSAN LEVENT ARAL  
Gazi Üniversitesi

PROF. DR. SİBEL ELİF GÜLTEKİN  
Gazi Üniversitesi

PROF. DR. MUSTAFA SAYSEL  
Hacettepe Üniversitesi

## **İÇİNDEKİLER**

<b>KABUL ve ONAY</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ŞEKİLLER</b> .....	IV
<b>RESİMLER</b> .....	V
<b>TABLolar</b> .....	VIII
<b>SEMBOLLER ve KISALTMALAR</b> .....	IX
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Kemik Doku .....	4
2.2. Ankaferd Blood Stopper .....	27
2.3. Biyomateryaller.....	29
2.4. Osteokalsin.....	52
2.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü .....	53
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	58
3.1. Deneysel Çalışma Grupları .....	58
3.2. Kullanılan Malzemeler .....	60
3.3. Cerrahi Protokol .....	62
3.4. Histopatolojik Analiz .....	67
3.5. İmmünohistokimyasal Yöntem.....	69
3.6. İstatistiksel Değerlendirme .....	72
<b>4. BULGULAR</b> .....	74
4.1. Histopatolojik Bulgular .....	74
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	83
4.3. İstatistiksel Sonuçlar.....	86
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	96
<b>6. SONUÇ</b> .....	123

<b>7. ÖZET</b> .....	125
<b>8. SUMMARY</b> .....	127
<b>9. KAYNAKLAR</b> .....	129
<b>10. EKLER</b> .....	154
10.1. Etik Kurul Onayı .....	154
10.2. Teşekkür.....	155
<b>11. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	156

## ŞEKİLLER

Şekil 1: Kemik İyileşmesi Dönemleri A: İnflamasyon Dönemi B: Onarım Dönemi C: Yeniden Şekillenme Dönemi.....	22
Şekil 2: VEGF' nin anjiyogenezis ve osteogenezis üzerine olan etkilerinin şematik görünümü. ....	56

## **RESİMLER**

Resim 1: a- Glycrrhiza Glabra, b- Vitis Vinifera, c- Alphina Officinarum, d- Urtica Dioica, e: Thymus Vulgaris.....	27
Resim 2: Kullanılan ksenojenik kemik greft materyali. ....	60
Resim 3: Ankaferd Blood Stopper.....	61
Resim 4: Çalışmada kullanılan çelik trefan frezler. ....	62
Resim 5: Cilt insizyonu. ....	63
Resim 6: Diseksiyon sonrası tibianın görünümü. ....	63
Resim 7: Her iki tibiada açılan 5mm çapındaki kemik defektleri. ....	64
Resim 8: Greft materyali ve ABS karışımı. ....	65
Resim 9: Sol tibiadaki proksimal defekte Greft + ABS yerleştirilmesi. ....	65
Resim 10: Cilt altı dokuların suture edilmesi. ....	66
Resim 11: Yara bölgesinin primer kapatılması. ....	66
Resim 12: Dekalsifiye edilmiş blok materyalin görünümü. ....	67
Resim 13: Defekt sınırları (Oklar), greft materyali (G), oluşan yeni kemik dokusu (YK) ve kemik iliği (Ki)(x20, HE) (1A + Grubu). ....	74
Resim 14: Greft materyali çevresinde fibrin eksuda (FE) ve genç fibroblastlar bağ dokusu (BD) (x40, HE) (1A + Grubu).....	75
Resim 15: Defekt sınırı (Ok) tüm defekti kaplayan fibrin eksuda görünümü (FE) (x40, HE) (1B - Grubu).....	76
Resim 16: Defekt sınırından (Ok) itibaren izlenen yeni kemik yapımı (YK)(x100, HE) (2B - Grubu).....	77

Resim 17: Konak kemiğin hemen altında endosteal kemikleşme (EK) ve rezorbe olan greft partikülleri (G) (x40 HE) (2A - Grubu). .....	77
Resim 18: Greft materyali (G) çevresinde aktif görünümdeki osteoblastlar ve yeni kemik yapımı (Oklar) (x200, HE) (2A - Grubu). .....	78
Resim 19: Defekt sınırlarını (Oklar) neredeyse tümüyle kapatan yeni kemik dokusu (YK) ve kemik iliği (Ki) (x20, HE) (3B + Grubu). .....	79
Resim 20: Greft partikülleri (G) çevresinde belirgin yeni kemik (YK) yapımı ve selüler bağ dokusu ( x100, HE) (3B + Grubu) .....	80
Resim 21: Konak kemikte endosteal kemikleşme (EK) ve vaskülarize bağ dokusunda henüz rezorbe olmamış greft partikülleri (G) (x100, HE) (3A + Grubu). .....	81
Resim 22: Defekt sınırlarından (Oklar) itibaren defekt tavanı tamamen yeni kemik (YK) ile dolmuştur (x20, HE) (4 B - Grubu). .....	82
Resim 23: Defekt sınırında (Ok) ve greft partikülleri (G) etrafındaki yeni kemik oluşumu ve kemik iliği (Ki) görünümü (x40,HE) (4A + Grubu). .....	83
Resim 24: Yeni üretilmiş kemik matriksinde ekstraselüler OC pozitifliği (Oklar). (x200, ABC)(2B + Grubu). .....	84
Resim 25: Greft partikülleri çevresinde görülen OC pozitifliği (Oklar) (x200, ABC) (3 A + Grubu) .....	84
Resim 26: VEGF eksprese eden endotel hücreleri (Siyah oklar) ve bağ dokusu fibroblastları (Sarı oklar) (x400, ABC) (3B + Grubu). .....	85
Resim 27: VEGF pozitif boyanmış osteoblastlar (Oklar) (x400, ABC) (2B + Grubu). .....	86



## **GRAFİKLER**

Grafik 1: Kemik Dolum Miktarının Gruplara Göre Dağılımı. .... 87

Grafik 2: 2. Grup İnflamasyon Düzeyi Grafiği. .... 91

## TABLolar

Tablo 1: Kemik iyileşmesini etkileyen sistemik ve lokal faktörler.....	26
Tablo 2: Yeni oluşan kemik dokusu verilerinin gruplara göre dağılımı. ....	87
Tablo 3: İnflamasyon Skorlarının Gruplara Göre Yüzdesel Dağılımı. ....	89
Tablo 4: Endosteal Kemikleşme Skorlarının Gruplara Göre Yüzdesel Dağılımı. ....	92
Tablo 5: İmmünohistokimyasal Değerlendirme Skorlarının Gruplara Göre Dağılımı. ....	94

## **SEMBOLLER ve KISALTMALAR**

<b>BMP</b>	Kemik Morfojenik Protein
<b>TGF</b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörleri
<b>TGF- <math>\beta</math></b>	Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta
<b>PRP</b>	Trombositten Zengin Plazma
<b>PRF</b>	Trombositten Zengin Fibrin
<b>ABS</b>	Ankaferd Blood Stopper
<b>[Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>]</b>	Hidroksiapatit Kristali
<b>IL-1</b>	İnterlökin-1
<b>IL-6</b>	İnterlökin-6
<b>PDGF</b>	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
<b>PMN</b>	Polimorfonükleer Lökositler
<b>PTH</b>	Paratiroid Hormon
<b>IGF</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri
<b>IGF-1</b>	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü- Tip 1
<b>FGF</b>	Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörleri
<b>LPS</b>	Lipopolisakkarit
<b>NO</b>	Nitrik Oksit
<b>HbsAg</b>	Hepatit B Yüzey Antijeni
<b>HbcAb</b>	Hepatit B Çekirdek Antikoru
<b>HcAb</b>	Hepatit C Antikoru
<b>HIV</b>	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
<b>HIV-1</b>	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü Tip-1
<b>HIV-2</b>	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü Tip-2
<b>HIV-p24</b>	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü p24 antijeni
<b>OC</b>	Osteokalsin
<b>VEGF</b>	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>HE</b>	Hematoksilen- Eozin
<b>ABC</b>	Avidin-Biyotin Kompleks
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit

<b>SPSS</b>	Statistical Package for the Social Sciences
<b>PBS</b>	Fosfatla Tamponlanmış Serum
<b>KBD</b>	Kritik Boyutlu Defekt
<b>MRSA</b>	Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus
<b>DBM</b>	Deminerelize Kemik Matriksi

## 1. GİRİŞ

Oral ve maksillofasial bölgede meydana gelen kemik defektlerinin yapısal ve fonksiyonel rekonstrüksiyonunun sağlanmasıyla estetik, konfor, fonksiyon ve sağlığın bireye yeniden kazandırılması modern cerrahinin en zor uğraşlarından biridir.<sup>1, 2</sup> Kemik defektleri, konjenital ya da gelişimsel malformasyonlar, tümör cerrahisi, kist enükleasyonları, gömülü diş operasyonları, travma veya enfeksiyonlar gibi çeşitli sebeplerle oluşabilmektedir.<sup>3-6</sup> Çene kemiklerinde meydana gelen kemik defektleri, günümüz cerrahisinde giderek yaygınlaşan kemik içi implant uygulamalarında engel teşkil etmektedir.<sup>7</sup>

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda çeşitli kemik greft materyallerinin uygulanması, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu veya distraksiyon osteogenezi gibi yöntemler kullanılmaktadır.<sup>8</sup> Günümüze kadar bu defektlerin onarımında pek çok kemik greft materyali başarıyla kullanılmıştır. Yüksek derecede osteojenik özellikte olmaları, minimal antikor cevabı, nozokomiyal enfeksiyon riskinin olmaması, mükemmel damarlanma ve primer kallus oluşumu sağlanması gibi özelliklere sahip olması nedeniyle otojen greftler “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Fakat ikinci bir cerrahi saha oluşturulması, hasta morbiditesindeki artış ve istenilen miktarda greft materyalinin alınamaması gibi dezavantajları bulunması araştırmacıları sentetik yollarla elde edilen kemik greft materyallerinin kullanımına yönlendirmiştir.<sup>9-12</sup>

Ksenojenik kemik greftlerinin insanlarda kullanımı 17. yüzyıla dayanmaktadır.<sup>13</sup> Çeşitli hayvanlardan elde edilebilmelerine karşın sığır kaynaklı kemik greftleri daha çok tercih edilmektedir.<sup>14</sup>

Kemik greft materyallerinin iyileşme süresinin uzun olması, araştırmacıları bu süreci hızlandırmaya yönelik çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu çalışmalarda kemik morfojenik protein (BMP)- 2, osteojenik protein-1, büyüme faktörleri, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-  $\beta$ ), Trombositten Zengin Plazma (PRP), Trombositten Zengin Fibrin (PRF) gibi ajanlar greft materyalleri ile kombine edilerek kullanılmıştır. Rekombinant teknik bu moleküllerin izolasyonuna, üretimine ve uygulanmasına olanak sağlamaktadır.<sup>15</sup> Ancak bu ajanların hazırlanması zor ve maliyetleri yüksektir.<sup>15</sup> Günümüzde kemik iyileşmesini hızlandıracak yeni materyallerin araştırılması halen sürmektedir.

Ankaferd Blood Stopper (ABS), Glycrrhiza Glabra (Meyan), Vitis Vinifera (Koruk), Alphina Officinarum' un (Havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstreleri, Urtica Dioica' nın (Isırgan) kurutulmuş kök ekstresi ve Thymus Vulgaris' in (Kekik) kurutulmuş ot ekstresilerini içeren, Türk tıbbında hemostatik ajan olarak kullanılan ilk bitki ekstratıdır.<sup>16-23</sup> Bu bitkisel karışımın damar endoteli, kan hücreleri, anjiyogenez, hücre proliferasyonu üzerine etkileri olduğu ve anti-inflamatuar özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir.<sup>22, 23</sup>

Literatürde ABS' nin kanama durdurucu<sup>19, 21, 24</sup> etkilerini konu alan çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini konu alan çalışma sayısı azdır.<sup>25, 26</sup>

ABS' nin bildirilen etkileri göz önüne alındığında, kemik defektlerinin onarımı sürecinde yeni kemik dokusu oluşum miktarını arttırabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmada, deneysel

olarak açılan kemik defektlerine ABS, kemik greft materyalleri ile birlikte yerleştirilmiştir.

Çalışmamızın amacı; Oral ve maksillofasiyal cerrahide sıklıkla karşılaşılan kemik defektlerinin iyileşme sürecine ABS' nin etkilerini histopatolojik ve imünohistokimyasal olarak incelemektir. Bu çalışmada ABS' nin, kemik defektlerinde kullanımının klinik olarak güvenilirliği ve kemik iyileşmesini hızlandıran ajanlara bir alternatif olup olmayacağı hakkında bilgiler elde etmek amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kemik Doku

Kemik dokusu ilk olarak 500 milyon yıl önce Paleozoik çağda yaşayan canlılarda tanımlanmıştır.<sup>27</sup> Kollajen matriks içerisinde kalsiyum, fosfat ve hidroksiapatit kristallerinin oluşturduğu konnektif dokunun özel bir formu olan kemik doku<sup>28</sup>, vücutta bulunan sert yapılardan biridir.<sup>29</sup>

Hidroksiapatit, kollajen, düşük miktarda proteoglikanlar, kollajen olmayan proteinler ve sudan oluşan bileşimi kemik dokuya değişik yapısal özellikler kazandırmaktadır.<sup>30</sup>

Kemik dokunun inorganik bileşenleri sert ve basınca karşı dayanıklı olmasını sağlarken, organik bileşenleri ise gerilime karşı dirençli olmasından sorumludur. Bu yapısal özellikler türlere, yaşa, cinsiyete ve hastalıklara bağlı olarak değişebilmektedir.<sup>30</sup>

Kemik doku vital organları fiziksel olarak koruyan ve harekete izin veren yapısal bir iskelet oluşturur. Böylelikle mekanik destek sağlar. İçerdiği kemik iliği ile kan hücresi yapımını sağlayarak mineral homeostazında rol oynar.<sup>28, 29, 31, 32</sup> Yetişkin iskeletin ana yapısını oluşturan kemik dokusu, kas yapılarını destekler, kafatasının üst kısmı ve göğüs kafesi boşluklarında olduğu gibi yaşamsal önem taşıyan organları korur.<sup>32, 33</sup> Fonksiyonel ihtiyaçlara göre kütle ve morfolojisini adapte edebilme, skar bırakmaksızın kendini tamir edebilme ve metabolik gereksinim durumunda mineral depolarını hızla harekete geçirebilme gibi önemli özelliklere sahiptir.<sup>34</sup>



Kemik dokusunda yoğun bir damar ağı bulunmaktadır ve bu doku metabolik açıdan çok aktif durumdadır. Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlara ait bir depo olarak işlev gören kemik doku bu önemli iyonların tutulumunu ya da salıverilmelerini sağlayarak vücut sıvılarındaki derişimlerinin sabit kalmasını sağlar. Kemikler iskelet kaslarının kasılmaları ile oluşan kuvvetleri çoğaltarak bunları vücut hareketlerine dönüştüren bir kaldıraç sistemi oluştururlar. İskelete mekanik ve metabolik işlevler kazandırırılar.<sup>33</sup>

Kemiklerin iç ve dış yüzeyleri, kemik yapımı ve onarımından sorumlu hücreleri içeren, iç yüzeylerde endosteum, dış yüzeylerde periostun oluşturduğu doku tabakaları ile örtülüdür.<sup>33</sup>

## **2.1.1. Kemik Hücreleri**

### **2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler**

Osteoprogenitör hücreler mezenşimal kök hücrelerden oluşmaktadırlar. Periosteumun iç hücre katmanı, havers kanalları, endosteum, volkman ve medüller kanallarda bulunurlar.<sup>29, 35, 36</sup> İnaktif şekillerinin morfolojik yönden tanımlanması güçtür. Bunlar kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenşim hücrelerdir. Ancak herhangi bir nedenle kemik yapımı uyarıldığında, hem sayıca artmaları hem de kemik yapıcı hücrelere dönüşmeleriyle ayırt edilirler.<sup>37</sup> Osteoprogenitör hücreler iğ şeklinde ve oval çekirdeklidirler. Sitoplazmaları açık renk boyanır.<sup>29</sup> Osteoprogenitör hücreler kemiklerin normal büyümesi sırasında aktiftirler.<sup>29, 38</sup> Erişkinlerde yukarıda söz edilen bölgelerde inaktif (hareketsiz) dururken; kemikte yaralanma ve kırıkların iyileşme bölgelerinde ve kemiğin içten yeniden düzenlenmesi sırasında aktive edilerek mitozla bölünüp

çoğalırlar. Çoğalan bu hücrelerin bir bölümü kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür. Osteogenez (kemik yapımı) durduğunda osteoblastlar da osteoprogenitor hücrelere dönüşebilirler.<sup>38</sup> Düşük oksijen konsantrasyonlarında kondrojenik hücrelere dönüşebilirler.<sup>36</sup>

### 2.1.1.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, Tip1 kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ile osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi organik matriks bileşenlerinin sentezinden sorumludurlar.<sup>32, 36, 39, 40</sup> Kemik iliği mezenşimal kök hücreleri, endosteum ve periosteumdan köken almaktadırlar.<sup>41, 42</sup> Kemiğin inorganik kısımlarının çökebilmesi, canlı osteoblastların varlığına bağlıdır. Osteoblast ömrü genç tavşanlarda ortalama 3 gün, insanlarda ise ortalama 8 haftadır. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, tek katlı epiteli andıran şekilde yan yana bulunurlar. Osteoblastlar aktif olarak matriks sentezledikleri dönemde şekilleri kübikten prizmatiğe kadar değişebilir ve sitoplazmaları bazofilik izlenir.<sup>33, 34</sup> Osteoblastların birbirine doğru uzanan kısa çıkıntıları vardır. Osteoblast uzantıları arasında neksus tipi bağlantı birimleri bulunur. Kemik yapımının aktif olduğu dönemde osteoblastlar yüksek düzeyde alkalin fosfataz salgırlar ve bu enzim kanda yükselir.<sup>29, 32</sup> Üretim işlevleri azalmaya başladığında, yassılaşırlar ve sitoplazmadaki bazofilik özellik azalmaya başlar.<sup>33</sup> Matriksin sentezi esnasında osteoblastlar, aktif protein sentezi yapıp salgılayan hücrelerin ince yapısına sahiptir.<sup>32</sup>

Osteoblastlar kutuplaşmış hücrelerdir. Matriks elemanları osteoblastlar ile önceden meydana gelmiş kemik arasında **osteoid** adı verilen ancak henüz kalsifiye olmamış matriks tabakasını oluştururlar. Osteoid doku, dokunun sentezi ile kalsifikasyonu arasındaki **osteoblast matürasyon periyodu** adı verilen ve ortalama olarak 10 gün kadar süren

bir süreçte ortaya çıkmaktadır.<sup>32</sup> Bu süreç, kemik apozisyonu henüz meydana gelmiş matriks üzerine kalsiyum tuzlarının tortulanmasının ardından tamamlanır.<sup>33</sup>

### 2.1.1.3. Osteositler

Osteositler kemiğin esas hücreleri olup, osteoblastların fonksiyonlarının ve morfolojik özelliklerinin değişmesiyle meydana gelirler. Kemiğin hücresel yapısının % 90'ını oluşturmaktadır.<sup>39</sup> Yassı oval biçimli kemik hücreleridir. Kalsifiye olmuş kemik matriksinde lakünalar içinde bulunurlar. Sitoplazmik uzantıları kanaliküllerin uçlarına kadar uzanıp, komşu hücreler ile bağlanırlar. Aralarında bulunan neksuslar, hücreler arasında iyon ve küçük moleküllerin geçişini sağlarlar. Çekirdekleri heterokromatiktir. Granüllü endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi az olmasına rağmen hücreler oldukça aktiftir. Matriks kalsifiye olduğu için madde taşınması osteositler üzerinden gerçekleşir.<sup>29, 33, 37</sup> Osteositler, hücreler ve kemik dokunun hücresel olmayan bölümüyle geniş temas alanı oluşturacak şekilde organize olur. Bu düzenleme sayesinde kan- kalsiyum homeostazının düzenlenmesi, mekanik yükün algılanması ve bu bilginin kemik içindeki diğer hücrelere iletilmesi gibi işlevleri yerine getirir.<sup>39, 43</sup>

Yapısal olarak inaktif görünüm sergilemelerine rağmen osteositler kemik matriksinin devamlılığında aktif rol oynarlar ve ölümlerini takiben matriks degradasyonu görülür.<sup>33</sup> Osteositlerin canlılığı etrafındaki kemik matriks yapının devamlılığı açısından oldukça önemlidir. Kemiğin kimyasal ve mekanik çevresinde oluşan değişikliklere karşı çok hızlı yanıt üretmektedirler. Bu özellikleri ile kemiğin çevresel değişkenlere karşı geliştireceği adaptif fonksiyonlarda yönetici rol oynamaktadırlar.<sup>29, 34</sup>

#### 2.1.1.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik iliğinde monosit-makrofaj hücrelerinden köken alan, çok büyük yapıya sahip, hareket edebilen hücrelerdir. Genişlemiş hücre gövdesinde ortalama 50 çekirdeği vardır. Osteoklastlar kemikteki enzimatik olarak açılmış Howship lakünaları adı verilen derin kemik rezorpsiyon bölgelerine yayılmışlardır. Osteoklastlar kemik matriksine hücum eden asit, kollajenaz, proteolitik ve hidrofilik enzimleri salgırlar. Osteoklastların görevi salgıladıkları enzimlerle kemiğin organik, inorganik matriksini ve kalsifiye kartilajı eritmektir. Osteoklast aktivitesi osteoblastlar tarafından stimüle edilir, kalsitonin, interlökin-10 ve östrojen tarafından regüle edilmektedir.<sup>29, 32-34, 39</sup> Bir osteoklast hücresi, 100 osteoblast tarafından sentezlenen mineralize dokuyu rezorbe edebilmektedir.<sup>44</sup> Osteoklast hücre membranında, hücre merkezine doğru uzanan düzensiz, derin katlantılar mevcuttur. Kemik dokuyla temasta olan bu katlantılar hücrenin aktivite göstereceği yüzeye daha etkin tutunarak fizyolojik rezorpsiyonu kolaylaştırmaktadır.<sup>32, 41</sup>

#### **2.1.2. Kemik Matriksi**

Kemik dokusunun büyük kısmını matriks adı verilen hücreler arası madde oluşturmaktadır. Kemik matriksi organik madde ve inorganik madde olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.<sup>30,33,34</sup>

##### 2.1.2.1. İnorganik Madde

Kemik matriksinin kuru ağırlığının % 50'sini oluşturmaktadır. İnorganik yapı içerisinde yüksek oranlarda kalsiyum ve fosfat bulunur. Bu moleküller kemikte hidroksiapatit kristalini  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  oluştururlar.

Bu kristal yapıların 20-40 nm uzunluğa ve 3-6 nm genişliğe sahip iğne biçimli kristaller olduğu bilinmektedir. İnorganik matriks içerisinde ayrıca magnezyum, bikarbonat, sodyum, hidroksil, potasyum, klor, sitrat ve flor da bulunmaktadır. Hidroksi apatitlerin hidrate olmuş yüzey iyonlarının oluşturduğu tabakaya hidrasyon tabakası (kabuğu) adı verilmektedir. Hidrasyon tabakası kristaller ile vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini sağlamaktadır.<sup>29, 32, 33</sup>

#### 2.1.2.2. Organik Madde

Kemik matriksinin organik komponentinin % 90-95' lik kısmı tip 1 kollajenden oluşmaktadır. Kollajen dışında organik matriks yapı içerisinde amorf yapıda glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşan temel madde bulunmaktadır.<sup>32, 41, 45</sup>

#### **2.1.3. Kemik Doku Tipleri**

Mikroskobik olarak primer ve sekonder kemik dokusu olmak üzere iki farklı kemik doku tipi bulunmaktadır.<sup>30,34</sup>

##### 2.1.3.1. Primer Kemik Dokusu

Fötal gelişim ve kemik onarımı sırasında ilk oluşan olgunlaşmamış kemik dokusudur. Primer kemik dokusunda kollajen lifleri düzensiz sıralanmıştır. Mineral içerik miktarı azdır. Sekonder kemik dokusuna oranla daha fazla osteosit içermektedir. Primer kemik dokusu geçicidir. Gelişim sürecinde kafatası suturaları, tendonların insersiyon bölgeleri, dişlerin alveolleri gibi bölgeler dışında primer kemik dokusu yerini sekonder kemik dokusuna bırakmaktadır.<sup>30,34</sup>

### 2.1.3.2. Sekonder Kemik Dokusu

Sekonder kemik dokusu, 3-7 mikron kalınlığında, birbirine paralel ya da bir damar kanalı etrafında dairesel olarak yerleşmiş lamellerden oluşan bir yapı göstermektedir. Bir lamelde bulunan kollajen lifler birbirine paralel uzanırken komşu lameldeki liflere çapraz yönde ya da spiraller yaparak seyretmektedirler. Sekonder kemik dokusunun hücreleri olan osteositler komşu lamellerin arasına düzenli aralıklarla sıkışmışlardır. Primer kemik dokusuna oranla daha kalsifiye ve güçlüdür. Sekonder kemik dokusunun süngerimsi kemik ve kortikal kemik olmak üzere iki tipi bulunmaktadır.<sup>29, 33</sup>

#### 2.1.3.2.1. Süngerimsi Kemik Dokusu

Birbirleriyle anastomoz yapan kemik trabeküllerinden oluşmaktadır. Trabeküllerin aralarında kemik iliği ve kan damarları ile dolu düzensiz boşluklar bulunmaktadır. Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ve yassı kemiklerin iç yüzleri süngerimsi kemikten oluşmaktadır. Süngerimsi kemik dokusu Havers ve Wolkmann kanalları içermez. Beslenmesi kemik iliğinde bulunan kan damarlarından olmaktadır.<sup>29</sup> Kemiğin metabolik açıdan en aktif olan kısmı süngerimsi kemik alanlarıdır.<sup>37</sup>

#### 2.1.3.2.2. Kortikal Kemik Dokusu

Kortikal kemik dokusu makroskobik olarak homojen ve sert yapıda izlenmektedir. Mikroskobik incelemede kan damarları taşıyan kanallar sistemi ve özel biçimde yerleşmiş lameller izlenmektedir. Organizmada tüm kemiklerin dış yüzeylerini ve yassı kemiklerin iç ve dış

tabakalarını kortikal kemik oluşturur. Kortikal kemik dokusunda iki tür kanal bulunmaktadır.<sup>29</sup>

#### 2.1.3.2.2.1. Havers Kanalları

Kortikal kemiğin uzun eksenine paralel, belli aralıklarla yerleşmiş kanallardır. Enine kesitlerde yuvarlak biçimli izlenmektedir.<sup>29</sup> Kan damarları, sinir ve interstisyel sıvı ile dolu boşluk içermektedir. Havers kanal duvarı yassı hücreler ile kaplanmıştır.<sup>46</sup>

#### 2.1.3.2.2.2. Volkmann Kanalları

Komşu havers kanallarını birbirine bağlayan yan kanallardır. Kemiklerin yüzeylerindeki besleyici deliklerden giren kan damarları Volkmann kanallarından geçerek Havers kanallarına girerler. Böylece kan damarları kortikal kemiğin tümüne dağılarak içteki ilik boşluğuna (Cavitas medullaris) geçer. Kemik dokusunun matriksi ve hücreleri bu damarlardan çıkan besin maddelerinin difüzyonu ile beslenir. Kanallardaki damarlar ince, gevşek bir bağ dokusu ile kaplıdır.<sup>30,34</sup>

#### 2.1.3.2.2.3. Kortikal Kemik Lamelleri

##### 2.1.3.2.2.3.1. Havers Lamelleri

Havers kanallarının çevresinde iç içe yerleşmiş halkalar şeklindeki lamellerdir. Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanalın etrafını saran dairesel kemik kanalcıklarından oluşan sisteme “Havers lameller sistemi” ya da “osteon” adı verilmektedir. Her

havers sistemini çevreleyen, amorf madde çökeltisinden oluşan, içerisinde az miktarda kollajen lif içeren mineralleşmiş matrikse sement (yapıştırıcı madde) adı verilmektedir. Osteonlar kortikal kemik dokunun çoğunluğunu oluşturmaktadır. Havers sistemi uzun, sık dallanan, diyafizin uzun eksenine paralel bir silindirdir. Çevresi 4 – 20 dairesel lamelcik ile sarılı merkezi kanaldan meydana gelmektedir. Endosteum ile örtülü her kanalda kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu vardır. Havers kanalları kemik iliği boşluğu, periosteum ve birbirleri arasında, enine veya çapraz volkmann kanalları ile ilişkilidir.<sup>30,34</sup>

#### 2.1.3.2.2.3.2. Ara Lameller

Osteonların aralarında kalan alanları dolduran, üçgenimsi ya da düzensiz şekillenmiş, değişik yönde uzanan lamellerdir. Bunlar, kemik büyüme ve yeniden modellenme sürecinde, yıkılmış havers sistemlerinin lamelciklerinden arta kalan yapılardır.<sup>30,34</sup>

#### 2.1.3.2.2.3.3. İç ve dış dairesel lameller (Sirkumferensiyal Lameller)

Kompakt kemiklerin iç ve dış yüzeylerinde üst üste daireler şeklinde bulunan lamellerdir. İç dairesel lameller kemik iliği boşluğunun etrafında, dış dairesel lameller ise hemen periosteumun altında yer alırlar. Dış lamellerin sayısı iç lamellerin sayısından daha fazladır.<sup>29, 33</sup>



## **2.1.4. Kemik Zarları**

### **2.1.4.1. Periosteum**

Kemiği dıştan saran, kollajen lif ve fibroblastlardan oluşan kılıftır. Eklem yüzeyleri hariç tüm kemikleri dıştan çevreler.<sup>29, 33, 45</sup> Kemik dokusunun beslenmesinde, gelişiminde ve tamir olaylarında önemli rol oynar. Gelişme evresinde iki katlıdır. Dış kat az miktarda fibroblast kapsayan düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşmuştur. Periosteumun içteki, hücreden daha zengin tabakası, fibroblastlara benzeyen, bölünüp farklılaşarak osteoblastları meydana getirme potansiyeline sahip osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır. Gelişmekte olan kemikte kemik dokusunun yüzeyine oturan hücreler, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan osteoblastlardır. Periosteumun kollajen lif demetlerinden oluşan sharpey lifleri matriks içerisine girerek yüzeye yakın ara lamellerin derinliklerine kadar iner ve periosteumu kemiğe bağlar.

### **2.1.4.2. Endosteum**

Kortikal kemiklerin iç yüzeyleri ve süngerimsi kemik trabekülleri endosteum ile örtülüdür. Retiküler bağ dokusundan oluşan endosteumun kemik dokusuna komşu kısmında tek sıra halinde osteoprogenitör hücreler bulunmaktadır. Perisoteuma göre daha ince bir tabakadır.<sup>29, 32, 33</sup>

### **2.1.5. Kemik Yapımı (Osteogenezis)**

Kemik yapımı intramembranöz ve endokondral kemikleşme olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Her iki yolda da meydana çıkan

ilk kemik primer kemik dokusudur. Primer kemik dokusu geçici bir dokudur ve kısa sürede sekonder kemikle yer değiştirmektedir.<sup>33</sup>

#### 2.1.5.1. İntramembranöz Kemikleşme

Osteoblastların salgıladıkları matrikse doğrudan minerallerin çökmesi ile gerçekleşen kemik şekillenmesidir. Kapillerlerin mezenşimal bölgeye invazyonu ve mezenşimal hücrelerin matür osteoblastlara dönüşmesi ile karakterizedir. Osteoblastlar kollajen lifleri ve şekilsiz temel maddeyi sentezleyip bu maddelerin içine gömülü kalırlar. Başlangıçta odaklar halinde olan bu dokunun aralarında kalan mezenşim dokusu içinde bol kapiller damarlar biçimlenir. Bu damarlardan çıkıp osteoid dokuya giren kalsiyum ve fosfor iyonları, buradaki osteoblastların salgıladıkları alkali fosfotaz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerini oluştururlar. Böylece osteoid doku kalsifiye olup primer kemik dokusu halini alır.<sup>30,34</sup>

Değişik şekil ve boyuttaki kemik parçacıklarına kemik trabekülü adı verilmektedir. Trabeküller içindeki osteoblastlar ara maddeyi salgılayarak osteosit halini alırlar. Şekillenen kemik trabeküllerinin yüzeylerine yeniden oluşan osteoblastlar tek sıra dizilerek kemik lamellerini oluşturmaya başlarlar. Bu oluşumun yinelenmesi sonucu kemik trabeküllerinin yüzeylerinde sekonder kemik yapısında katmanlar oluşur. Böylece süngerimsi kemik dokusu biçimlenir. Osteoklastlar da bu kemikleri iç yüzeyden rezorbe ederler. Süngerimsi kemikler son şekillerini aldıklarında primer kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar. Geriye sadece sekonder kemik trabekülleri kalır. Bu kemiklerin iç ve dış yüzeylerine intramembranöz yolla bir miktar kompakt kemik eklenip

kemikleşme tamamlanır. Trabeküllerin arasındaki mezenşim dokusundan da kırmızı kemik iliği şekillenmektedir.<sup>30,34</sup>

Kafatasının frontal ve pariyetal kemiklerinin yanı sıra oksipital ve temporal kemik gibi yassı kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı kısımları, kısa ve uzun kemiklerin kortikal bölümleri intramembranöz kemikleşmeyle oluşmaktadır. Kısa kemiklerin büyümesi ve kemik kalınlaşması da bu yolla gerçekleşmektedir.<sup>29, 33, 40, 47, 48</sup>

#### 2.1.5.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme, küçük bir hiyalin kıkırdak model içinde meydana gelmektedir. Başlangıçta ilk beliren kemik dokusu kıkırdak modelin orta kısmını saran içi boş kemik silindiridir. Kemik halkası olarak adlandırılan bu yapı, o bölgedeki perikondriumun içinde zar içi kemikleşme ile meydana gelmektedir. Kıkırdak modelin merkezindeki kondrositlerin hipertrofiye uğramasından sonra kıkırdak matriks kalsifiye olur, ardından kondrositlerin programlanmış hücre ölümleri gerçekleşir. Sonuçta kalsifiye olmuş kıkırdak matriksinden oluşan 3 boyutlu yapı ortaya çıkar.<sup>30,34</sup>

Kıkırdak modelin diyafiz bölgesinde perikondriumun iç katında bulunan mezenşim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, bunlar da osteoblastlara farklılaşırlar.<sup>29, 33</sup> Osteoblastlar da üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar (İntramembranöz Kemikleşme). Böylece oluşan kıkırdak modelin diyafizinde, oluşan yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak doku arasında silindir biçimde kemik manşet ortaya çıkar. Oluşan kemik manşet, kondrositlerin difüzyonla beslenmesine engel olarak hücrelerin dejenere olmasına neden olur. Önce hipertrofiye uğrayan kondrositler

daha sonra diyafizin orta kısmından başlayarak dejenere olup ölürler. Ölen kondrositlerin aralarında ince septumlar halinde kıkırdak matriksi kalır. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur (kemik iliği kavitesi). Bu sırada periosteumda bulunan osteoklastlar kemik manşeti yer yer delerek foramen nutrisyumları oluşturur. Periosteumdaki kan damarlarının bir kısmı buradan girerek septumların arasında ilerler. Damarlar ile gelen kalsiyum ve fosfor iyonları açığa çıkan alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek septumlar halinde kıkırdak matriksine çöker ve kalsifiye olmasına neden olur. Böylece diyafizde primer kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Ortaları kalsifiye kıkırdak, yüzeyleri ise kemik dokusundan meydana gelen kemik trabekülleri oluşur.<sup>30,34,41</sup>

Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasındaki bölgede kondrositler mitoz ile devamlı çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar (Epifiz Plağı). Böylece kıkırdak taslağın boyu da devamlı olarak uzar. Kemik manşet de gelişmesine devam ederek kalınlaşır ve epifizlere doğru uzanır, kondrositlerin bulunduğu bölgeyi dıştan sarar ve buradaki kondrositler irileşip ölmeye başlarlar. Kemikleşme merkezinde olduğu gibi önce kıkırdak matriks kalsifiye olur ardından da kemik trabekülleri oluşur. Endokondral kemikleşme epifizlere yaklaşıncaya epifizlerin içlerinde kemikleşme merkezleri belirir. Benzer olayların gerçekleştiği bu bölgede sadece kemik manşet oluşumu gözlenmez. Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece kıkırdak yapıdaki epifiz plağı kalır. Kemikleşme sona erinceye kadar epifiz plağındaki kıkırdak hücreleri diyafiz yönüne doğru bölünüp çoğalarak devamlı kıkırdak dokusunu yapar. Oluşan bu kıkırdak dokusu da devamlı olarak yerini kemik dokusuna bırakır. En sonunda epifiz plakları da kalsifiye olarak aktivitesini yitirir.<sup>29, 33, 40, 47, 48</sup>

Kemiğin boyuna uzamasını sağlayan epifiz plağının genişliği 20 yaşına kadar aynen kalmaktadır. Kemiğin enine büyümesi ise apozisyonel büyüme ile olur. Periosteumun osteojenik hücreleri, osteoblasta dönüşür. Yeni oluşan kemik subperiosteal kemik yüzeyine eklenir ve kemik matriksi genişler.<sup>47</sup> Uzun kemikler, vertebra, pelvis ve kafatası kemiğinin tabanını oluşturan kemikler, endokondral kemikleşme ile oluşmaktadır.<sup>30,34,41,48</sup>

### **2.1.6. Kemik İyileşmesi**

Kemik iyileşmesi birbirini izleyen ve birbirleriyle iç içe geçmiş morfolojik dönemlerden oluşmaktadır.<sup>49</sup> (Şekil 1)

1. İnflamatuar Dönem ( 1 - 4 gün )
2. Onarım (Reperasyon) Dönemi ( 2 - 40 gün)
3. Yeniden Şekillenme Dönemi (25 - 100 gün )

#### **2.1.6.1. İnflamatuar Dönem**

Kemik dokunun iyileşmesi, yara iyileşmesine benzer olarak birbiri içine geçmiş safhalardan oluşmaktadır. Yumuşak doku iyileşmesinde, yaralanan doku yerini fibröz skar dokuya bırakmaktadır. Ancak kemik doku iyileşmesi, yaralanan dokunun yerini, yeni kemik dokunun alması ile skarsız olarak sonlanmaktadır.<sup>51,52</sup>

Kemikte meydana gelen travma matrikste hasara, hücrelerde ölüme, periosteum ve endosteumda yırtıklara neden olur. Tüm doku travmalarında olduğu gibi kemik travmalarında da ilk verilen yanıt

inflamasyondur. İnflamasyon 48 saatte pik seviyeye ulaşır ve travmadan sonraki 1 hafta içerisinde tamamen sona erer. Travmayı takiben çevre yumuşak dokular ve periost yırtılarak, damarlar yaralanır. Kan, lenf ve doku sıvıları bölgede hematoma oluşturur(Şekil 1-A).<sup>50, 51</sup> Hematom, kemik iyileşmesi için gerekli iki önemli faktörü sağlar. Birinci olarak; oluşan hematom kemik ucu ve komşu yumuşak dokuların arasını doldurarak travma bölgesinde az da olsa mekanik bir stabilite sağlar. İkinci olarak hematom bölgeye matriks oluşumunu başlatan, osteoblastlara ve kondroblastlara dönüşen, osteoblast ve kondrosit prekürsör hücrelerini getirir.<sup>52</sup> Ayrıca hematom içerisindeki trombositlerden ve zarar görmüş kemik ve yumuşak dokulardan salgılanan inflamatuvar mediatörler, kan damarlarının vazodilatasyonuna, plazma ekstravazyonuna ve travma bölgesinde ödem oluşumuna neden olurlar. Bu mediatörler başlıca inflamatuvar hücrelerden salgılanan interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) ile trombositlerden salgılanan dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ve trombosit kökenli büyüme faktörüdür (PDGF). Bu mediatörler başlıca polimorfik hücre göçü, proliferasyonu ve mezenşimal kök hücre farklılaşmasından sorumludurlar.<sup>53</sup> Trombositlerden ve ölü hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler kan damarlarının dilatasyonuna ve plazma eksüdasyonuna sebep olarak defektin erken safhasındaki inflamasyona öncülük eder. Bölgeye inflamatuvar hücrelerden polimorfonükleer lökositler (PMN) ve takiben makrofaj ve lenfositler göç eder. Bu hücreler anjiogenezden sorumlu sitokinleri salgırlar. İnflamatuvar cevap azalırken nekrotik doku ve eksüda rezorbe olur. Fibroblast ve kondrositler bölgede görülmeye başlar ve yeni matriks yapımıyla kallus oluşmaya başlar. Kemik tamirini uyaran faktörler muhtemelen inflamasyon fazında kırık sahasından serbestlenen kemotaktik faktörleri ve kemiğin bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak ortaya çıkan sitokinleri içermektedir. Travma sonrası oluşan inflamasyon tüm defektlerde aynı sırayı takip etmesine rağmen tamir dokusu miktarı ve tamir hızı her defekt için farklıdır. Bu farklılık defektin spongiöz kemikte, epifizde, metafizde, diafizde ve kortikal kemikte

olmasına, hastaya ait faktörlere, kemiği çevreleyen yumuşak doku hasarına, travma türüne bağlı olarak değişmektedir.<sup>54, 55</sup>

#### 2.1.6.2. Onarım ( Reperasyon ) Dönemi

Onarım dönemi kemik iyileşmesinin en önemli kısmıdır. İnflamatuar hücreler nekrotik dokuları rezorbe ederken, fibroblastlar bölgeye gelerek tamir dönemini başlatırlar. İlk basamak hematoma organize olmasıdır. Tamir döneminde ilk 48 saat içinde periost, endosteum ve defekte yakın yerlerdeki Havers kanallarının tabakalarından hücre proliferasyonu başlar; defekt hattı boyunca rezorbsiyon devam eder. Hücre proliferasyonu sonucu defekt uçlarındaki boşluklar hücrelerle dolar. Lokal aracılı mekanizmalarla öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya başlarlar. Kırık hattındaki hücresel aktivitenin başlaması için gerekli uyarım karmaşıktır. Kimyasal, elektriksel ve mekanik faktörler söz konusudur. Tamir için gerekli hücre çoğalmasının oluşumu, muhtemelen travma bölgesindeki elektriksel akımla başlamaktadır. Bu akım, kırık sonrası en yüksektir ve daha sonraki 2–3 hafta içinde yavaş yavaş azalır. Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7–12 gün sürer. Onarım olayında rol oynayan hücreler mezenşimal kökenli, çok yönlü gelişim gücüne sahip olan (pluripotent) hücrelerdir. Bu hücreler çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusunun içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakasından ve daha az oranda da endosteumdan köken alırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kapillerle hematoma içine giren fibroblastlardır. Üçüncü günde karşı kırık uçlarında, yoğun olarak mezenşimal hücreler bulunur. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluştururlar. Periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki

fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, bir granülasyon dokusu gelişir. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdği kollajen miktarıyla yakın ilişkilidir.<sup>50, 52, 55-57</sup>

Zamanla her iki kırık parçasının ucunda oluşan manşet tarzındaki kitle birleşerek, kırığa bütünlük sağlayan dış kallusu meydana getirir. Aynı şekilde ilik boşluğunda da benzer olaylar birbirini takip eder. İç kemik zarı ve iliğin kemik yapıcı hücrelerinden gelişen trabeküllerle, iliğin köprülenmesi oluşur ve iç kallus meydana gelir. İlk 7- 12 günün sonrasında yumuşak kallus kitlesi, fibröz doku ve kıkırdaktan oluşmuştur(Şekil 1-B).<sup>36, 56</sup> Kemik defekti uçları, iç ve dış kallus gelişimiyle çok sağlam bir yapıya kavuşur. Kallus oluşumu, yetişkinlerde çocuktan ve kompakt kemikte trabeküler kemikten daha yavaş meydana gelir. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve mineralizasyonu 4-16 hafta arasında zaman gerektirir. Kallus oluşumuyla beraber kaynamanın oluştuğu söylenebilir. Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir. Onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi başlar.<sup>58</sup>

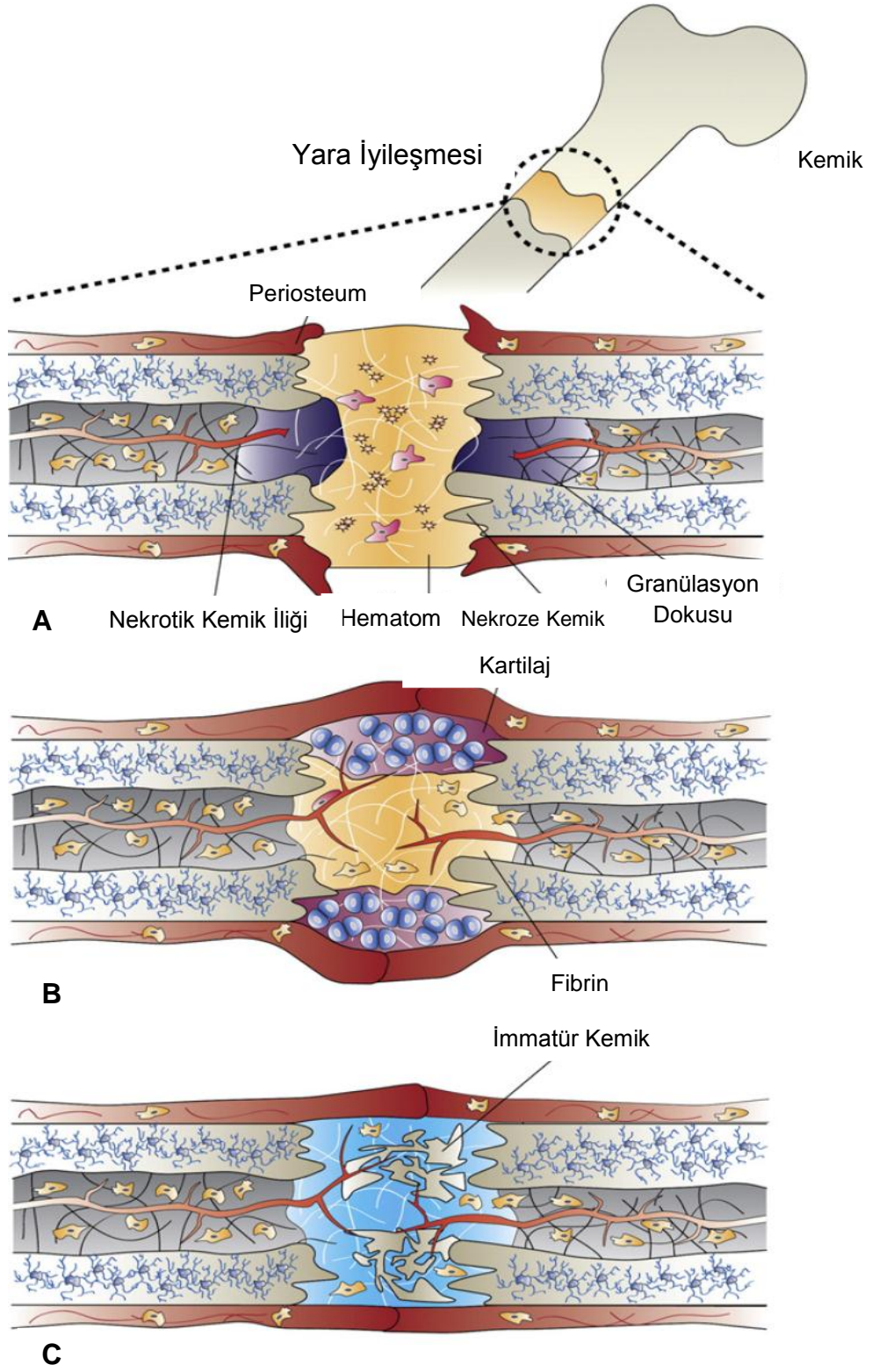
### 2.1.6.3. Yeniden Şekillenme Dönemi

Kemiğin yeniden şekillenme dönemi en uzun evre olup, aylar hatta yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir.



Yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

- 1- Kalsifiye kırırdak, osteoid dokuyla yer değiştirir böylece bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.
- 2- Lameller kemik bu dokunun yerini alır.
- 3- Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.
- 4- İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir (Şekil 1-C).



Şekil 1: Kemik İyileşmesi Dönemleri A: İnflamasyon Dönemi B: Onarım Dönemi C: Yeniden Şekillenme Dönemi.<sup>59</sup>

Wolf kanuna göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir. Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hakim olduğu konveks yüzde rezorpsiyon osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani, kırığın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında rezorpsiyon olur. Kemik yüzeyinin eski haline döndüğü yeniden şekillenme evresi 1–2 yıl sürer. Fakat bu süre 6–9 yıla kadar uzayabilmektedir.<sup>56, 60, 61</sup>

### **2.1.7. Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Kemik yapımı, şekillenmesi, yeniden şekillenmesi ve tamiri gibi hücresel işlevlerin uyumlu bir şekilde yürütülebilmesi için çeşitli sistemik ve lokal düzenleyici faktörlere ihtiyaç vardır. Sistemik hormonlar, tüm vücut seviyesindeki değerler doğrultusunda etkili olurken, aynı zamanda da hedef hücrelerden lokal düzenleyici faktörlerin salınımını kontrol ederler. Lokal düzenleyici faktörler ise sınırlı alanlarda özellikli işlevlerin kontrolünü üstlenirler.<sup>62</sup>

#### **2.1.7.1. Sistemik Faktörler**

Kemik metabolizmasının düzenlenmesinde, sistemik hormonların önemli etkileri vardır.<sup>62</sup>

Paratiroid hormon (PTH), kemik ve böbrekler üzerinde etkili olarak, kanda ve ekstraselüler sıvıda kalsiyum düzeyinin yüksek

tutulmasını, osteoblast reseptörlerini etkileyerek, yeni kemik yapımının durdurulmasını ve osteoklast uyarıcı faktörün salgılanmasını sağlayarak, kemik matriksinin rezorbe olması sayesinde kalsiyumun serbest kalmasını sağlar.<sup>62</sup>

Kalsitonin, PTH' nin antagonistidir. Hem kompakt, hem de trabeküler kemik yapımını arttırır. Olgunlaşmış osteoklastlar üzerinde, osteoklastik aktivitelerini engelleyici bir etkisi vardır.<sup>61</sup>

Glukokortikoidler, anabolik ve katabolik etkisi olan PTH ve IGF-1 (insülin benzeri büyüme faktörü- tip 1) gibi hormonların etkinliğini arttırmaktadırlar. Glukokortikoidlerin aktif osteoblastlar üzerindeki etkilerinin çoğu engelleme yönündedir. Osteoblastların apoptozisine neden olarak, kemik yapımını engellerler.<sup>63</sup>

Östrojen ise kemik kütlesinin korunmasında etkilidir. Östrojenlerin TGF- $\beta$  üretimini uyararak osteoklast ölümünde artışa yol açtığı düşünülmektedir.<sup>64</sup>

#### 2.1.7.2. Lokal Düzenleyici Faktörler

Kemik metabolizmasını etkileyen büyüme faktörleri, trombositler, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından salgılanmaktadır. Kemik iyileşme sürecinde damarlanmasını, sertliğini, mekanik olarak işlev görmesini sağlayan bu proteinler genel olarak, kemik iyileşmesini hızlandıran proteinler, BMP, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), dönüştürücü büyüme faktörleri (TGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörleri

(PDGF) ve fibroblast kaynaklı büyüme faktörleri (FGF)' dir. Bu proteinler monosit ve fibroblast gibi mezenşim kökenli hücrelerin göç etmesini, çoğalmasını ve kemik hücrelerine farklılaşmasını düzenlerler. PDGF, osteoprogenitör hücreleri ve protein sentezini uyarır. FGF, osteoblast proliferasyonunu ve kollajen sentezini artırır. IGF, preosteoblastik proliferasyonu stimüle ederler ve kollajen yıkımını azaltır.<sup>65</sup>

TGF ise, osteoblast oluşturan öncül hücreleri uyararak hücrel olgunlaşmada görev alır. TGF- $\beta$  salınımı ile Tip I kollajen sentezi arasında ilişki bulunmaktadır.

Büyüme hormonu ise, osteoblastlar tarafından IGF-1 yapımını artırarak etki gösterir. Prostaglandinler, prostanoik asit adı verilen doymuş yağ asidinin türevi olup, osteoblastik hücrelerde adenilat siklazı aktive ederek PTH' ye karşı verilen tepkilere benzer yanıtlar elde edilmesine yol açarlar.<sup>65</sup> Kemik iyileşmesini etkileyen sistemik ve lokal faktörler Tablo-1' de gösterilmiştir.

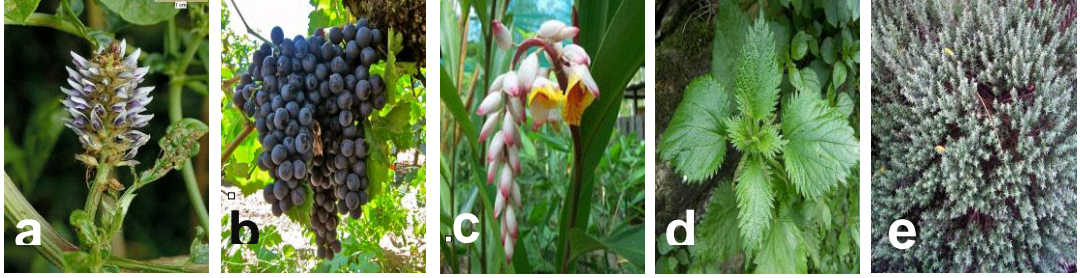
**Tablo 1: Kemik iyileşmesini etkileyen sistemik ve lokal faktörler.**

<b>Sistemik Faktörler</b>		<b>Lokal Faktörler</b>	
<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>	<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>
Büyüme Hormonu	Osteoporozis	İyi vasküler destek	Radyasyon
Tiroid Hormonu	D Vitamini Eksikliği	Geniş temas alanı	Tümör
Somatomedinler	Kortikosteroidler	Mekanik stabilite	Lokal Kemik Hastalığı
A Vitamini	NSAİ İlaçlar	Büyüme faktörleri	Enfeksiyon
D Vitamini	Kemoterapi	BMP	Mekanik anstabilite
İnsülin	Sigara Kullanımı	Elektriksel Stimülasyon	Kemik mumu
Paratiroid Hormonu	Anemi	Mekanik Kuvvet	Denervasyon
Kalsitonin	Romatoid Artrit		
Anabolik Steroidler	Sepsis		
	Diabet		
	Malnütrisyon		
	Orak Hücreli Anemi		
	Talasemi Major		
	Uyumsuz Antidiüretik Hormon Salınımı Sendromu		

Boden ve Schimandle tarafından modifiye edilmiştir.<sup>66</sup>

## 2.2. Ankaferd Blood Stopper

ABS, Türk tıbbında hemostatik ajan olarak kullanılan ilk tıbbi bitki ekstratıdır.<sup>16-21</sup> İçeriğinde, *Glycyrrhiza Glabra* (Meyan), *Vitis Vinifera* (Koruk), *Alphina Officinarum*' un (Havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstreleri, *Urtica Dioica*' nın (Isırgan) kurutulmuş kök ekstresi ve *Thymus Vulgaris*' in (Kekik) kurutulmuş ot ekstresi bulunmaktadır (Resim 1).<sup>20</sup> Bu bitkisel karışımın damar endoteli, kan hücreleri, anjiogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri vardır.<sup>23</sup>



Resim 1: a- *Glycyrrhiza Glabra*, b- *Vitis Vinifera*, c- *Alphina Officinarum*, d- *Urtica Dioica*, e- *Thymus Vulgaris*.

*Glycyrrhiza glabra* yani meyan kökünün antianjiyojenik aktivite gösterdiği ve VEGF oluşumunu azalttığı bildirilmiştir.<sup>67</sup> Çeşitli araştırmalarda bu bitkinin antiinflamatuvar, antitrombotik, antioksidan ve antiaterosklerotik etkileri gösterilmiştir.<sup>68, 69</sup> Ayrıca meyan kökünün, mineralokortikoid etki nedeniyle kan basıncını yükselttiği bildirilmiştir.<sup>70</sup>

*Thymus vulgaris* aterosklerozla ilişkili lipid peroksidasyonu gibi canlıdaki oksidatif hasarı azaltacak anti-oksidan etki gösterir.<sup>71</sup>

*Vitis vinifera* antiaterosklerotik ve antitümöral etkilere sahiptir.<sup>72</sup>

Alpinia officinarum, lipopolisakkaridlerle (LPS) aktive olmuş fare peritonundan izole edilen makrofajlarda nitrik oksit (NO) üretimini inhibe eder.<sup>73</sup>

Urtica dioica, NO'nun serbest bırakılması, potasyum kanallarının açılması ve kasılma gücünün azalmasıyla meydana gelen vazodilatör bir etki aracılığıyla endotelial hipotansif etkiler yapabilmektedir.<sup>74</sup>

ABS içeriğindeki bu bitkiler hiçbir pıhtılaştırma faktörünün etkisini bozmadan doku oksijenasyonunu ve fizyolojik hemostatik süreci sağlamaktadır.<sup>23</sup>

### **2.2.1. Ankaferd Blood Stopper' ın Etki Mekanizması**

ABS' nin etkisini, fibrinojen başta olmak üzere kan proteinleri ve eritrositlerin plazma ve serumda "Protein ağı" meydana getirmesi suretiyle gösterdiği bildirilmektedir. ABS' nin etkisi çok hızlı başlamakta, eritrosit ve kan proteinlerinin birleşmesiyle meydana gelen enkapsüle protein ağı formasyonu 1 saniyeden daha kısa bir sürede meydana gelmektedir.<sup>23, 75</sup>

ABS'nin etki mekanizmasının pıhtılaştırma faktörlerinden bağımsız olması sebebiyle, kanama diyatezi olan hastalarda etkin olduğu gösterilmiştir. ABS kullanımını takiben plazma fibrinojen aktivitesinde ve fibrinojen miktarında azalma olduğu, buna bağlı olarak trombin zamanının uzadığı bildirilmektedir. Ayrıca bu tıkaç etkisi gösteren protein ağı oluşumu



sırasında plazmada; total protein, globulin ve albumin seviyelerinin de anlamlı ölçüde düştüğü görülmüştür. Bu yüzden, ABS, fibrinojen-eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkilemekte ve sonuçta eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturmaktadır.<sup>23, 75</sup>

### **2.3. Biyomateryaller**

Yaşayan sisteme implante edilmek, organ ve dokuların işlevlerini kısmen veya tamamen üstlenmek üzere tasarlanmış materyallere *biyomateryal* adı verilmektedir.<sup>76, 77</sup> Bir defekte yerleştirilmek üzere vücuttan tüm bağlantısı kesilerek alınan doku parçasına ise greft denir.<sup>78</sup>

Greft terimi canlı dokununun direkt transplantasyonu anlamında kullanılmaktadır.<sup>78</sup> Bir veya birkaç biyomateryalden oluşan epitel yüzeyinin altına kısmen ya da tamamen yerleştirilen tıbbi materyale ise implant adı verilmektedir. Tabiatıta doğal olarak bulunan mineraller, kıymetli taşlar ve altın gibi metaller yıllardan beri implant materyali olarak kullanılmıştır.<sup>76, 77</sup>

#### **2.3.1 Biyomateryallerin Taşınması Gereken Özellikler**

Kullanılacak olan biyomateryallerin sahip olması gereken bazı temel özellikler vardır:

1. Biyolojik yönden uyumlu olması; Uygulanan biyomateryaller doku tarafından kabul edilebilir olmalıdır. Spesifik ve non spesifik

mekanizmaları harekete geçirmeyecek ve immün sistem tarafından tolere edilebilen bir madde olmalıdır.

2. Kimyasal açıdan inert ve stabil olmalıdır.
3. Osteojenik veya osteokondüktif olmalıdır.
4. İmmediat stabilizasyon özelliği olmalıdır.
5. Toksik olmamalıdır.
6. Kolayca sterilize edilebilmelidir.
7. Enfeksiyona karşı dirençli olmalıdır.
8. Çevre dokuları etkileyebilecek renk özellikleri bulunmamalıdır.
9. Kolay uygulanabilir olmalıdır. Uygulama esnasında minimal travmaya neden olmalıdır.
10. Kırılmaya ve bükülmeye karşı dirençli olmalıdır. Elastik olmalı ve elastisitesi uygulandığı dokuya yakın olmalıdır.
11. Yeterli mekanik kuvvete sahip olmalıdır.
12. Uygun ağırlık ve dansiteye sahip olmalıdır.
13. Uygulama sırasında şekillendirilebilmelidir.
14. Rezorbsiyona karşı dirençli olmalıdır.
15. Uygulama hasta tarafından kabul edilebilir olmalıdır.
16. Uygulaması kesin sonuçlar verebilmelidir.
17. Başarısızlık durumunda kolaylıkla çıkartılabilmelidir.
18. Ekonomik olmalıdır.
19. Saklanması ve muhafaza edilmesi kolay olmalıdır.<sup>76, 77</sup>

### 2.3.2. Biyomateryallerin Sınıflandırılması

#### A. Kemik Kaynaklı Biyomateryaller

##### a- Otojen kemik grefti (Otogreftler)

1-Kortikal Kemik

2- Kansellöz Kemik

-Ağız içi kaynaklı

-Ağız dışı kaynaklı

3- Kortiko-kansellöz Kemik

b- Homojen kemik grefti (Homogreft)

1- İzogreft: Taze kansellöz kemik iliği

2- Allogreft

- Taze dondurulmuş kemik

- Dondurulmuş kurutulmuş kemik

- Dondurulmuş kurutulmuş dekalsifiye kemik

- Solventlerle dehidrate edilmiş kemik

c-Heterojen kemik grefti (Heterogreft, Ksenogreft)

1- Demineralize edilmiş kemik

2- Deproteinize edilmiş kemik

B- Kemik kaynaklı olmayan sentetik biyomateryaller

a- Doku Kaynaklılar

1- Dentin

2- Sement

3- Kıkırdak

4- Sklera

5- Duramater vs.

b- Metaller

c- Jelatin Film

d- Polimerler

1- Polimetilmetakrilat

2- Proplast

3- Polidioksanon

4- Poliamid Meç

5- Poliglaktin 910

6- Sert doku replasmanı

7- Polietilenler

8- Polipropilen

9- Silikonlar

10- Politetraflouroetilen (Teflon)

e- Seramikler

1- Kalsiyum Sülfat (Paris alçısı)

2- Kalsiyum Alimunat

3- Kalsiyum Karbonat

4- Biyoaktif cam ve cam seramikler

5- Kalsiyum Fosfatlar

a- Rezorbe Olanlar

1-Trikalsiyumfosfat

2-Hidroksilapatit

b- Rezorbe Olmayanlar

1-Yoğun Hidroksilapatit

2-Poröz Hidroksilapatit

C- Doğal Materyaller

a- Kollajen

b- Demineralize kemik matriksi (DBM)

c- Kemik morfojenik proteinler (BMP)

d- Trombositten zengin plazma (PRP).<sup>77</sup>

2.3.3. Kemik Kaynaklı Greft Materyalleri

Çok eski zamanlardan beri insanlar, hastalıklı ya da zarar görmüş olan dokuları sağlıklı olanlarıyla değiştirmeye çalışmışlardır. Kemik kaynaklı biyomateryaller travma, kemik enfeksiyonları, kas-iskelet sistemi tümör cerrahisi, revizyon artroplasti cerrahisi ve spinal cerrahi gibi rekonstrüktif işlemler sırasında oluşan kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla ve konjenital defektlerin, ortognatik deformitelerin, kozmetik problemlerin düzeltilmesinde, preprotetik cerrahi tedavide artan sıklıkla

kullanılmaktadır.<sup>4, 13, 79-82</sup> Kemik defektlerinin rejenerasyonunu sağlayarak kemiği orijinal durumuna çevirmek amacıyla Amerika'da her yıl 500.000 adet kemik grefti uygulaması yapılmaktadır.<sup>4</sup>

### 2.3.3.1. Terminoloji

Greft uygulamalarında transplante edilen materyaller immünolojik kaynaklarına göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır.

1. Otojen greftler; aynı bireyde bir bölgeden başka bir sahaya nakledilen dokulardır.
2. Homojen greftler; alıcı ile aynı türden olan canlılardan alınan dokulardır.
  - a) İzogen greftler; alıcı ile benzer genetik yapıya sahip canlıdan alınan dokulardır.
  - b) Allojen greftler; aynı türden fakat alıcıyla genetik olarak hiçbir benzerliği olmayan canlılardan alınan dokulardır.
3. Ksenojen greftler; alıcıdan farklı bir türden olan vericiden alınan dokulardır.<sup>13, 55, 79, 81, 83</sup>

Kemik greftleri, doku içeriklerine göre kansellöz kemik, kortikal kemik, kortikokansellöz kemik veya osteokondral kemik olarak sınıflandırılabilir.<sup>81</sup>

### 2.3.3.2. Kemik Greftlerinin Tarihçesi

1739 yılında Duhammel, osteogenezis konusunda bilinen ilk bilimsel çalışmayı gerçekleştirmiştir. Subperiosteal olarak yerleştirdiği gümüş tellerin etrafında haftalar sonra yeni kemik oluşumu gözlemlediği

rapor edilmiştir. Oluşan bu yeni kemik dokusunun periosteumun osteojenik özelliği ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. 1763 yılında Von Haller tarafından periosteumun zengin bir vasküler yapısı olduğu ve osteogenezisin arterlerden çıkan eksüdasyon sonucu oluştuğu bildirilmiştir. Flourens tarafından yapılan çalışmada 1842 yılında periosteumun osteojenik kapasitesinin kemik defektlerinin iyileşmesinde en önemli etken olduğu rapor edilmiştir. 1858 yılında Ollier tarafından modern histolojik teknikler ve aseptik cerrahi yöntemlerle çeşitli deney hayvanları üzerinde ilk gerçek bilimsel çalışmalar yürütülmüştür. Bu araştırmacı 1867 yılında çalışmalarını konu alan literatürü yayınlamış ve periosteuma yapışık canlı kemik dokunun en iyi greft formu olduğunu, havers kanallarının ve endosteumun kemik rejenerasyonunda önemli rol oynadığını bildirmiştir.<sup>84,</sup>

85

1800' lü yılların sonunda, Barth yaptığı çalışmalarda transplante edilen kemik, kemik iliği ve periosteumun canlılığını kaybettiğini ve bu dokuların çevre dokularla yer değiştirdiğini bildirmiştir. 1899 yılında Grohe tarafından, 0 ila 40 dereceler arasında, 100 saat saklanan periostun, intramüsküler transplantasyonunda osteogenezisi arttırdığı saptanmıştır. Osteogenezis ve kemik transplantasyonu üzerine en kapsamlı ve bilimsel çalışmalar, 1907 yılında Axhausen tarafından yürütülmüştür.<sup>84, 85</sup> Bu araştırmacı, deney hayvanları üzerinde yaptığı çalışmalarda yumuşak doku içine kemik transplantasyonu, otojen greft, allogreft ve ksenogreft uygulamaları gerçekleştirmiştir. Çalışmaları sonucunda:

1. Kemik iliği içeren kemik greftlerinde yeni kemik oluşumunun vasküler doku ile temas eden kemik iliğinden köken aldığını,

2. Allogreftlerin canlı kalma oranının ve proliferasyonunun, otojen greftlere göre daha düşük olduğunu,
3. Ksenogreftlerin, enkapsüle ya da abzorbe olduğunu ve proliferasyon göstermediğini, yeni kemik oluşumu için bir iskelet vazifesi gördüğünü,
4. Canlı periost ile kaplı greftte hücresel proliferasyonun daha fazla olduğunu,
5. Greftin kompakt kemik kısmının büyük bölümünün boş hücre alanları içerdiğini saptamıştır.<sup>84, 85</sup>

1909 yılında Nakahara ve Dilger, 1911 yılında Sasaki, 1912 yılında ise Jakoi, kemik ve periosttan elde ettikleri emülsiyonlarda osteojenik aktiviteyi saptamışlardır.<sup>84, 85</sup>

Osteokondral greft gereksinimi veya greft transplantasyonu yapılacak olan hastada yeterli kemik kaynağının bulunmaması gibi nedenlerle araştırmacılar çalışmalarını allogreftlere yönlendirmişlerdir. Ancak allogreftlerin ihtiyaç anında tedarik edilememesi nedeniyle kaynatma, dondurma, deproteinize etme ve radyasyona maruz bırakma gibi yöntemlerle allogreftleri saklayıp sterilize ederek kullanmışlardır.<sup>84, 85</sup>

Allojenik kemik greftlerinin bazı yöntemler kullanılarak hazırlanıp transplante edilmesi amacıyla 1917' de Groves kaynatılmış – soğutulmuş greftleri, 1942 yılında Inclan + 2 ° C derecede, sitratlı kan içerisinde 3- 63 gün sakladığı allojenik greftleri, 1947 yılında Bush canlı donörlerden alıp – 24 °C derecede steril cam kaplarda sakladığı greftleri transplante etmişler ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.<sup>86</sup>

Macewen 1878 yılında tibiadan elde ettiği grefti humerus defektine transplante ederek ilk başarılı allogreft uygulamasını gerçekleştirmiştir. Herndon ve Chase, 1952-1954 yıllarında otojen, taze allogreft ve saklanmış alogreftler kullanarak 129 köpeğe patella transplantasyonu uygulamışlardır. Takibini tamamladıkları 56 adet denekten elde ettikleri sonuçları yayınlamışlardır. Dondurma işlemi uygulanmış allogreftlere karşı gelişen immün cevabın azaldığını saptamışlardır. Bu çalışmalar osteokondral greftlerin kullanımının yaygınlaşmasını sağlamıştır.<sup>84, 85</sup>

Ülkemizde kemik greftleri ve kemik bankası üzerine yapılan ilk derleme 1955 yılında, Kazım İsmail Gürkan ve Hayrullah Kocaoğlu tarafından yayınlanmıştır. Bu yayında ksenogreftlerin ve homojen greftlerin alınma tekniği, donör seçimi ve kemik greftlerinin saklanma teknikleri hakkında o güne kadarki gelişmeleri bildirmişlerdir. 1962 yılında Rıdvan Ege, deney hayvanları üzerinde yaptığı vertebra füzyonunda kullandığı çeşitli greft materyallerini karşılaştırmıştır. En başarılı sonuçları, otojen kemik greftleri kullandığı vakalarda elde ettiğini bildirmiştir.<sup>86</sup>

#### 2.3.3.3. Kemik Greftlerinin İyileşme Mekanizmaları

Farklı greft materyalleri, farklı mekanizmalar ile kemik iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Bu mekanizmalar osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyondur.<sup>79, 87</sup>



#### 2.3.3.3.1. Osteogenezis

Osteogenezis, greft materyali içerisindeki hücreler elemanların, transplantasyon sonrası hayatta kalarak nakledilen bölgede yeni kemik oluşturabilmesidir.<sup>79, 87</sup> Greftin alıcı bölgede canlı hücrelerle yeni kemik oluşumunu sağlayabilmesi, greftin osteojenik özelliğini gösterir. Taze otojen greftleri ve otolog kemik iliği hücreleri osteojenik özelliğe sahiptir. Otojen greftlerde osteositler canlılığını kaybederek lakünaların boşalmasına neden olmaktadır. Ancak preosteoklastlar, preosteoblastlar ve osteoklastlar canlılığını sürdürmektedir.<sup>88</sup>

#### 2.3.3.3.2. Osteoindüksiyon

Osteoindüksiyon, kemik indüktif proteinlerinin etkisiyle mezenşimal hücrelerin diferensiyasyonu ve stimülasyonu ile yeni kemik oluşumunun sağlanmasıdır.<sup>8, 12, 79, 87, 89, 90</sup>

Osteoindüktif greftler, indiferansiye dokuyu kemik oluşum yönünde diferansiye eden faktörleri sağlamaktadır. Farklılaşmamış primitif mezenşimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını uyarma yeteneği bir greftin osteoindüktif özelliğini göstermektedir.<sup>88</sup>

Osteoindüksiyon terimi, 1931 yılında Huggins<sup>91</sup> tarafından tanımlanmıştır. Levander<sup>92</sup> ise 1934 yılında yaptığı çalışmada kas dokusuna enjekte ettiği işlenmemiş alkol özütünün, kemik formasyonunu indüklediğini göstermiştir.

1965 yılında Urist<sup>93</sup>, tavşan ve ratlar üzerinde yaptığı çalışmada, kas içine demineralize kemik matriksi implantasyonu sonucu oluşan ektopik kemik indüksiyonunu tanımlamıştır. Bu çalışma, kemik matriksi içindeki kemik indüksiyonunu sağlayan maddenin araştırılmasına öncülük etmesi açısından önemlidir.<sup>90</sup>

Kemik matrikste kırık sonrası oluşan kemik rezorpsiyonunu takiben kimyasal işlemlerle salınan indüktif faktörler bulunur. BMP, TGF- $\beta$  ve osteogenin, tanımlanan osteoindüktif faktörlerdir.<sup>88</sup>

#### 2.3.3.3.3. Osteokondüksiyon

Osteokondüksiyon, alıcı kemikten vasküler ve perivasküler yapıların grefte ilerlemesi için greft materyalinin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir.<sup>8, 12, 79, 89, 94</sup>

Osteokondüktif materyaller, greftleme alanında kemiğin iyileşmesini başlatacak olan hücrelerin adezyonu, migrasyonu ve dağılımı için gerekli uygun ortamı sağlar. Yapısal iskeleti ve uygun ortamı sağlayan bu materyallerin aynı zamanda biyolojik olarak çözünebilir olması gereklidir. Bu materyaller genellikle osteoprogenitör hücreleri kendilerine çekme, migrasyonlarını kolaylaştırma ve neovaskülerizasyonu başlatma özelliğindedir. Yeni kemik formasyonu başladıktan sonra materyalin işlevi tamamlanır ve zararlı artıklar bırakmadan emilmesi beklenir.<sup>95</sup>

#### 2.3.3.4. Kemik Greftlerinde Patofizyoloji

Greft uygulanan bölgede operasyondan hemen sonra dakikalar içinde o alanda trombosit agregasyonu gözlenir. Trombositler, FGF, IGF gibi büyüme faktörlerini salgırlar. 18 saat içinde polimorfonükleer lökosit kemotaksisi ve akümüasyonu gerçekleşir. 1 -3 gün içerisinde mezenşim hücreleri göçü ve çoğalması görülür. 5 – 9. günlerde kondrosit farklılaşması; 10 – 12. günlerde osteoblast farklılaşımı ve primer kemik doku oluşumu; 12 – 18. günlerde atmış osteoblastik aktivite ile kemik remodellingi izlenir. 21. günden sonra ise kemik iliği oluşumu başlar.<sup>81</sup>

Kansellöz kemik greftleri genellikle tamamen rezorbe edilip alıcının kemik dokusu ile yer değiştirirken; kortikal kemik greftleri tamamen rezorbe edilemezler. Kansellöz kemikte ikinci günden itibaren revaskülarizasyon başlarken, osteoklastlar aracılığıyla greftin rezorpsiyonu da başlamış olur. Revaskülarizasyon greft çevresinde başladığından, kansellöz kemik greftinin orta kısmında nekrotik bir alan oluşabilir. Oluşan bu nekrotik alan radyolojik olarak dansite artışı olarak izlenebilmektedir. İnflamasyon, revaskülarizasyon ve osteoindüksiyon çok erken başlayan, dinamik bir süreçtir. Ancak remodelling ve osteokondüksiyon aylarca devam etmektedir.<sup>81</sup>

Kemik greftinin osteogenezise kaynaklık yapmak ve mekanik destek sağlamak gibi iki ana fonksiyonu bulunmaktadır. Kuvvet taşımayan bölgelerdeki kemik defektlerinde kansellöz kemik grefti tercih edilirken, kuvvet taşıyan bölgelerdeki kemik defektlerinde ise kortikal ya da kortiko-kansellöz kemik greftleri kullanılır.<sup>81</sup> Vasküler olmayan kemik grefti hücreleri transplante edildiği bölgelerde yaşayamazlar. Önce nekroze

edilip rezorbe olur daha sonra bu alan canlı yeni kemikle yer değiştirir. Bu mekanizma “adım adım yerine geçme” olarak adlandırılır.<sup>81, 96</sup>

### 2.3.3.5. Greftin Başarısını ve Devamlılığını Etkileyen Faktörler

#### 2.3.3.5.1. Vasküler Destek

İyi vaskülarize bir kemik yatağı yerleştirilen serbest bir kemik greft için optimal revaskülarizasyon koşulları sağlar. Eğer greftin konak kemiğe temas eden yüzeyi yetersizse iyileşme süreci problemli olabilir. Vaskülarize greftler alıcı sahanın kanlanmasından etkilenmemektedir.<sup>3, 97</sup>

#### 2.3.3.5.2. Stabilite

Kemik oluşumu için kemik-kemik, kemik-greft ya da kemik-implant ara yüz stabilitesi çok önemlidir. İyileşme sahasında mikrohareketler varlığında mezenşimal hücreler fibroblastlara ya da kondroblastlara dönüşerek iyileşmeyi bozabilir. Greft, vida ya da tellerle fikse edilebilir.<sup>3, 97</sup>

#### 2.3.3.5.3. Biyouyumluluk

İnsan vücuduna yerleştirilen herhangi bir biyolojik ya da inorganik materyal cerrahi işleme bağlı olarak veya kendiliğinden bir doku reaksiyonuna neden olabilir. Transplante edilen materyale ya da implanta karşı gelişen doku cevabı, spesifik bir immünolojik reaksiyon olabileceği gibi nonspesifik bir karakterde de olabilir. Spesifik reaksiyon donör ve alıcı arasındaki majör histouyumlu antijenlerin eşleşmesine bağlıdır. B ve T

lenfositlerinin aktivasyonu sonucu antikorlar üretilir. T lenfositleri ile yabancı hücreler arasında direkt etkileşim sonucu transplante edilen materyal alıcı tarafından reddedilebilir. Bu spesifik bir reaksiyondur. Nonspesifik reaksiyon ise daha çok implant yüzeyi ile ilgili olup implant-kemik arasındaki biyomoleküllerden ve hücrelerden etkilenir.<sup>3, 97</sup>

#### 2.3.3.5.4. Yumuşak Dokunun Defekt İçine Doğru Büyümesinin Engellenmesi

Geniş kemik defektlerinin, yumuşak dokunun kavite içine büyümesi veya kollabe olması gibi nedenlerle tamamen dolması beklenemez. Kemik iyileşmesi, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği ile daha verimli hale getirilebilir. Bariyer, yumuşak dokunun kavite içine doğru büyümesini engellerken sadece kemik hücrelerinin göçüne izin verir. Greftin entegrasyonu aşamasında yumuşak doku ve kemik dokunun birlikte aksiyonu gözlenir. Kansellöz greftler gibi pöröz greftlerde, kortikal greftlere göre defekt içine doğru daha fazla yumuşak doku göçü beklenir. Teorik olarak kortikokansellöz greftler daha iyi entegrasyon sağlar. Çünkü kansellöz kısım defekte uyum sağlarken kortikal tabaka bariyer görevi görür. Ayrıca defektin içini partikül greft materyali ile doldurmanın da yumuşak doku göçünü engelleyeceği bildirilmiştir.<sup>3, 97</sup>

#### 2.3.3.5.5 Yükleme

Fonksiyon görmeyen ve yükleme yapılmayan greftlerin zaman içerisinde rezorbe olduğu bilinmektedir. Birçok çalışmada içerisinde implant yerleştirilmiş ve yükleme yapılmış greftlerin boyutlarını koruduğu bildirilmektedir.<sup>3</sup>

### 2.3.3.6. Kemik Greftleri Çeşitleri

#### 2.3.3.6.1. Otojen Kemik Greftleri

Osteojenik hücreler içeren, osteoindüktif ve osteokondüktif potansiyele sahip olan otojen kemik greftleri, kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda öncelikli olarak tercih edilirler. Günümüzde otojen kansellöz kemik grefti halen “altın standart” olarak kabul edilmektedir.<sup>9, 95, 98-103</sup>

Otojen kemik greftleri canlı hücre kapasitesine sahip olduklarından, alıcı bölgede osteoblastları stimüle etmektedirler. Bu greftler, bireyin yine kendisine uygulandığı için HIV ya da hepatit virüsleri gibi patojenlerin bulaşması ya da immün reaksiyona neden olması söz konusu değildir.<sup>9, 95, 98-103</sup>

Otojen kemik greftlerinin; ikinci bir cerrahi işleme ihtiyaç duyulması, cerrahi işlem süresini uzatması, kan kaybını arttırması, donör bölgede ağrı, parestezi, hareket kısıtlılığı oluşturması verici sahada morbidite riskinin bulunması, alınabilecek greft miktarının sınırlı olması, % 8-10 oranında enfeksiyon riskinin bulunması, postoperatif bakım süresinin uzaması gibi dezavantajları bulunmaktadır.<sup>13, 80, 95, 104-106</sup>

#### 2.3.3.6.1.1. Kansellöz Kemik Greftleri

Kansellöz kemik greftleri, transplante edildiğinde en fazla sayıda canlı kalma kapasitesine sahip hücreler içeren,<sup>83</sup> kolayca ve hızla yeniden damarlanan ve konak yatağına entegre olan, hızlı kemik üretimi

sağlayan kemik greftleridir.<sup>107</sup> Otojen kansellöz kemik greftleri, osteojenik kemik ve yüksek osteojenik hücre konsantrasyonuna sahip hematopoetik kemik iliği hücreleri, osteokondüktif kollajen ve mineral matriksi, matriks proteinleri ve osteoindüktif matriks proteinleri içerir.<sup>3, 79</sup>

Burwell 1960'lı yıllarda yaptığı çalışmalarda, otojen greft uygulaması sonrası gelişen yeni kemik dokusunda primitif osteojenik hücrelerin nakil sonrası hayatta kalarak ileri dönemde osteoblastlara dönüştüğünü göstermiştir.<sup>79</sup> Kansellöz kemik greftleri transplante edildiği dokuya yapısal destek sağlamamasına rağmen, 6 – 12 ay içerisinde kortikal kemiğin dayanıklılığına ulaşabilmektedir.<sup>81, 94</sup> Bu greftlerin iyileşmesi, revaskülarizasyonu ve kaynaşması diğer greft türlerine göre daha hızlıdır.<sup>81</sup>

Ağız içerisinden kansellöz kemik alınabilecek bölgeler tüber maksilla, mandibular simfiz, diş çekim soketleri ya da retromolar bölgedir. Büyük miktarda greftin gerekli olduğu durumlarda ise iliak krestten kansellöz kemik grefti alınabilmektedir.<sup>3</sup> Ekstraoral kansellöz kemik grefti alınabilecek diğer bölgeler gerdy tüberkülü, radius distal ucu ve tibia distalidir.<sup>79</sup>

Otojen kansellöz kemik greftlerinin 5 – 6 cm' den küçük kemik kayıplarında kullanımı uygundur. Ayrıca kemik kist kavitelerinin ya da redüksiyon sonrası oluşan kemik boşluklarının doldurulmasında tercih edilebilir.<sup>94</sup> Alınan kansellöz kemik grefti steril salin solüsyonu içinde saklanmalıdır. Hipertonik ya da hipotonik solüsyonlar transplantasyon öncesi osteojenik hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Ağız içerisinden alınan greftlerin aksine iliak krestten alınan kansellöz greft endokondral

kemikten alındığı için rezorbsiyona daha yatkındır. Kansellöz kemik greftleri allojenik, alloplastik ve ksenojenik kemik greftleri ile kombine edilerek kullanılabilir. Böylece greft materyalinin hacmi arttırılmış olur.<sup>3</sup>

#### 2.3.3.6.1.2. Kortikal Kemik Greftleri

Kortikal kemik greftlerinin biyolojik uyum oranı, otojen kansellöz kemik greftlerine göre daha düşüktür.<sup>79</sup> Osteoindüktif özellikleri yok denilecek kadar azdır. Çoğunlukla osteokondüktif özelliklere sahip olmalarına rağmen canlı kalan osteoblastlar, osteojenik özellik gösterebilmektedirler.<sup>94</sup> Kortikal kemiğin porözitesinin az olması nedeniyle vasküler yapıların greftin içine doğru ilerlemesi zor ve yavaştır. Kortikal kemik, trabeküler kemiğe göre daha az sayıda osteoblastik progenitör hücre içerir. Kortikal kemik hücrelerinin oksijen difüzyonu ve besin aktarımının az olması nedeniyle nakledilmeye dirençleri daha azdır.<sup>79</sup>

Kortikal kemik greftlerinin başlıca avantajları; mekanik olarak dayanıklı olmaları ve büyük kemik defektlerinin doldurulmasında miktar olarak yeterli olmalarıdır. 5- 6 cm' nin üzerindeki kemik kayıplarında otojen kortikal kemik greftleri kullanılabilir. Ancak 12 cm' nin üzerindeki kemik kayıplarında, vaskülarize olmayan greftlerin başarısızlık oranının % 25 - 50 olması nedeniyle, vasküler greftler tercih edilir.<sup>79</sup>

Kortikal greftlerin periosteumunda osteojenik potansiyeli olan az sayıda hücre canlı kalabilmiş olsa da greftteki osteositlerin çoğu, nakil sonrasında canlılığını kaybeder. Kalan matriks, alıcı sahadan gelen ve osteojenik özellikleri olan hücrelerin üzerine yerleşebilecekleri cansız iskelet görevi görür. Nekrotik trabeküllerden oluşan iskeletin üzerine yeni



kemik oluşumu ve ardından nekrotik yapıların rezorpsiyonu ile iyileşen kansellöz kemik greftlerinin aksine, kortikal greftler yeni kemik oluşumu öncesinde nekrotik osteonların rezorpsiyonuna ihtiyaç duyarlar. Bu durum kortikal greftte porözitenin artmasına ve torsiyonel dayanıklılığın azalmasına yol açar. Sonuçta, yeniden damarlanma ve onarım için oluşan kortikal porözite, özellikle büyük kortikal greftlerde görülen greft kırılması, iyileşme gecikmesi ya da iyileşme sorunlarına neden olmaktadır.<sup>79</sup>

Kortikal greftler başlangıçta yapısal dayanıklılığa sahiptirler. Fakat 6- 8 ay arasında süren yeniden damarlanma ve yeniden yapılanma evrelerinde dayanıklılığının yaklaşık olarak üçte birini kaybederler. Yaklaşık olarak 2 yıl içerisinde normal kortikal kemik yapısına ulaşmaktadır. Ancak greft içerisinde yer yer rezorbe olmamış, canlılık kazanamayan kemik adacıkları varlığını sürdürmektedir.<sup>79</sup>

#### 2.3.3.6.1.3. Kortikokansellöz Kemik Greftleri

Kortikokansellöz kemik greftleri, kortikal kemik ve altında bulunan kansellöz kemiği içeren greftlerdir. Hem canlı osteoblastları içerirler hem de yapısal dayanıklılık sağlarlar. Kortikal kemik tabakası porözsüz bir yapıya sahip olduğundan dolayı kortikokansellöz greftlerin kansellöz greftler kadar osteogenezisi arttırıcı etkileri bulunmamaktadır.<sup>13,</sup>

<sup>108</sup> Genel olarak kaburga ve iliumdan elde edilebilirler.<sup>13</sup>

#### 2.3.3.6.2. Allojenik Kemik Greftleri

Allojenik kemik greftleri immünolojik potansiyelleri nedeniyle 2. Dünya Savaşı'na kadar popülerite kazanamamış, ancak savaş

sırasında kemik bankalarında saklanabilmeleri için yeni metodların geliştirilmesiyle daha sık kullanılmaya başlanmıştır.<sup>13</sup> Allojenik kemik greftleri, pöröz yapıları içinde progenitör hücrelerin tutunduğu birçok kimyasal ajan içermektedirler. Aynı zamanda, osteoklastlar tarafından rezorbe edildiklerinde serbest kalan kemik matriks içerisinde büyüme faktörleri de içermektedirler. Allojenik kemikte, osteoindüktif özellik taşıyan az miktarda BMP de bulunmaktadır.<sup>79</sup>

Allojenik kemik greftlerinin immünolojik komplikasyonlarını ve hastalık taşıma potansiyellerini ortadan kaldırmak amacıyla hazırlanmaları esnasında dondurma, dondurup kurutma gibi kriyobiyolojik metodlar ile radyasyona tabi tutma gibi prosedürler uygulanmaktadır.<sup>77, 79</sup> Ayrıca bu amaçla kloroform-metanol, perasetik asit veya hidrojen peroksit uygulama gibi kimyasal işlemler kullanılmaktadır.<sup>3</sup>

Modern allogreft kemik elde etme işlemleri sırasında uygulanan ileri yıkama basamakları ile greft içerisinde kalan hücre sayısı azalmaktadır. Bu basamaklar ile immünojenik antijenler ve virüs kaynaklı hastalık geçme riski de azaltılmış olur.<sup>79</sup> Allojenik kemik grefti, seçilmiş vericiden postmortem 24 saat içinde ameliyat şartlarında alınır. Greft alınacak donörler, hepatit B yüzey antijeni (HbsAg), hepatit B çekirdek antikoru (HbcAb), Hepatit C antikoru (HcAb), sifiliz, insan T lenfotrofik virüs antikoru, HIV-1 ve HIV-2 antikoru, HIV-p24 (kanda saptandığında bulaşıcılığın yüksek olduğunu gösteren İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü çekirdek antijeni) antijeni serolojik testlerle taranmaktadır. Bu testlere rağmen allojen kemik grefti uygulanan hastalara yaklaşık % 0.1 oranında viral enfeksiyon geçme riski bulunmaktadır.<sup>81</sup> Alınan allojenik kemik grefti – 20 °C derecede 1 yıl veya daha fazla süre saklanarak immünojenik etkileri azaltılır. Dondurarak kurutma işlemi ile immünojenite daha da

azaltılır. Bu işlem sonrası greftin mekanik dayanıklılığı da %50 oranında azalmaktadır. Allojenik greftlerin standart otojen greftlere göre büyük kemik kayıplarında yeterli miktarda greft sağlanabilmesi, jel, toz, fiber ve macun olarak çeşitli formlarının bulunması ve otojen kemik alımı sırasında meydana gelen morbiditenin olmaması gibi avantajları bulunmaktadır.<sup>79</sup>

#### 2.3.3.6.3 Ksenojenik Kemik Greftleri

İnsanlarda ksenojenik greftler 17. yüzyıldan beri kullanılmaktadır.<sup>13</sup> Ortopedik cerrahide geniş kullanım alanı bulmuş greft materyalleridir. Değişik türler arasında yapılan tranplantasyonda kullanıldığı için, alıcıda ciddi immün yanıt oluşmasına neden olmaktadır.<sup>88</sup> Bu nedenle kullanıma hazırlanırken antijenitelerinin elimine edilmesi gerekmektedir. Taze alınan greftler su ile yıkandıktan sonra hidrojen peroksit ile oksidize edilirler, protein yapının bir kısmı bu işlem ile kaybolur. Yağ çözücüler ile delipidize edilir, aseton ile kurutulur. Daha sonra gama ışınları ile sterilize edilir. Sonuçta elde edilen ürün yapısal olarak güçlü, antijenik olarak zayıftır. Deproteinize edici süreç induktif faktörleri de yok ettiği için elde edilen materyal osteokondüktif etki gösterir.<sup>88</sup>

Ksenojenik kemik greftleri, memeli hayvanların kemiklerinden ya da mercan kabuklarından elde edilirler. At, domuz ve sığaçangillere ait kemiklerin de kullanılabilir olmasına karşın sığaç kaynaklı kemik greftleri daha çok tercih edilmektedir.<sup>14</sup>

İnorganik sığaç kaynaklı kemik greftlerinin kemik defektlerinin tamirinde kullanılması 1889 yıllarına dayanmaktadır. Bu materyal, alveoler

kret rekonstrüksiyonunda, periodontal ve periapikal lezyonlara bağlı oluşan kemik kayıplarında, kemik defektlerinin onarımında ve hemostatik ajan olarak kullanılmıştır.<sup>109</sup> Sığır kaynaklı kemik grefti transplantasyonunu takiben bir takım immün sistem hastalıklarının oluşmasıyla 1960'lı yıllarda popülaritesine kaybetmiş olmasına rağmen 1990'lı yıllarda kemik partiküllerinin deproteinizasyon metodlarının gelişmesiyle tekrar popülarite kazanmıştır. Kemiğin organik komponenti neredeyse tamamen ortadan kaldırılarak greftin antijenitesi azaltılmış ve alıcı dokunun toleransı arttırılmıştır.<sup>14</sup>

Ksenojenik greft materyalleri sıklıkla sığır kemiklerinin tam olarak deproteinize edilmesi ile elde edilirler. Doğal sığır kemiğinin organik bileşenleri tümüyle elimine edilir. Geri kalan inorganik bölüm, poröz hidroksiapatit partikülleridir ve yapısal olarak insan kansellöz kemiğine benzemektedir. Alıcı doku tarafından iyi tolere edilirler ve iyileşmeye osteokondüktif katkı gösterirler.<sup>110</sup>

Mercan kaynaklı kemik greftleri osteokondüktif, hazırlaması kolay, biyouyumlu ve maliyeti düşük olan greftlerdir. Kemiğe yapısal olarak yakın olması ve biyolojik olarak inert bir madde olması sebebiyle ideal bir greft materyalidir. Mercan greftleri, direkt osteoblastik apozisyonlanma için iskelet görevi görür. Bu tür greftlerde, kemik iliğinden gelen hücreler porlara göç eder ve daha sonra damarlanma başlar. Bunu takiben, bir yandan osteoklastlar greft maddesinin rezorpsiyonunu sağlarken, diğer yandan osteoblastlar yeni kemik oluşumunu başlatırlar. Doğal mercan uygulandığında, osteoblastik ve osteoklastik süreç 8-24 hafta arasında gözlenebilmektedir. Doğal mercan osteoklastlar tarafından yavaş yavaş rezorbe edilirken, serbest kalsiyum iyonları osteoblastlar tarafından kullanılarak yeni kemik oluşturulur. Ancak, rezorpsiyon derecesi kullanılan

greft materyalinin büyüklüğü ile ilgilidir. Greft materyali aşırı büyük olduğunda rezorpsiyon gecikmekte ya da parsiyel olmaktadır. Yeni kemik oluşumunda osteokondüktif etki gösterirler. Bu greft mükemmel bir doku uyumu göstererek iyileşme süreci içinde tümüyle rezorbe olur.<sup>13, 110-112</sup>

Ksenojenik kemik greftleri, farklı boyut ve şekillerde piyasaya sunulmuştur. Blok formları, plastik ve rekonstrüktif cerrahi ile maksillofasiyal cerrahide onley greft olarak kullanılırken, granül formları periodontal kemik defektlerinde, çekim kaviterinde, küçük kist operasyonlarında ve hem fonksiyonel hem de estetik kayıplarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.<sup>13, 113</sup>

#### 2.3.3.6.4. Alloplastik Kemik Greftleri

Otojen kemik greftleri ve allojen kemik greftlerinin dezavantajlarından kaçınmak amacıyla son yirmi yıldır biyouyumlu sentetik greft materyalleri kullanılmaktadır.<sup>114, 115</sup>

#### 2.3.3.6.4.1 Biyoaktif Camlar

İlk kez 1970'li yıllarda tanımlanan biyoaktif camlar sert materyallerdir.<sup>114, 115</sup> Sodyum oksit (%24,5), kalsiyum oksit (%24,5), fosfor pentoksit (%6) ve silikon dioksitten (%45) oluşmaktadır. Uygulandığında kollajen, büyüme faktörleri ve fibrine bağlanarak osteojenik hücrelerin ilerlemesini sağlayan poröz matriks oluşturur.<sup>79, 114</sup>

Biyoaktif camların karakteristik özelliği, yüzeyinin dokular ile bağ oluşumunu sağlayan, biyoaktif hidroksikarbonapatit tabakasından oluşmasıdır. Bu özellik sayesinde, biyoaktif camlar çevre sert dokuya ve yumuşak dokuya kimyasal olarak bağlanabilmektedir.<sup>116</sup>

Biyoaktif camların en önemli özellikleri; enzimatik faaliyetleri, üç boyutlu vasküler yapı oluşumunu desteklemeleri, kemik doku ile organik bağlarla bağlanmaları ve kemik dokudaki mezenşimal hücrelerin farklılaşmasına yardımcı olmalarıdır.<sup>116</sup>

#### 2.3.3.6.4.2. Kalsiyum Sülfat

Kalsiyum sülfat, paris alçısı olarak da adlandırılmaktadır. İlk kez 10. yüzyılda kırık tedavisinde Araplar tarafından kullanıldığı bildirilmektedir. Paris alçısı, 1892 yılında Dreesman tarafından uzun kemiklerde gelişen tüberküloz osteomyelitini iyileştirmek amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.<sup>114</sup>

Kalsiyum sülfat; kan damarları, fibrojenik ve osteojenik hücreler için osteokondüktif matriks görevi görmektedir. 5-7 hafta içerisinde rezorbe olabilmektedir. Kansellöz kemiğe göre basınca karşı dayanıklılığı daha yüksek, gerilime dayanıklılığı daha düşüktür. Kalsiyum sülfat kuru bir ortama uygulanmalıdır. Nem ile karşılaştığında yumuşayarak parçalanabilmektedir. Primer kullanım alanları kemik içi kaviteilerin doldurulmasıdır.<sup>114</sup> Yapılan insan çalışmalarının çoğunda bu materyal diğer greft materyalleriyle kombine olarak kullanılmaktadır.<sup>115</sup>

#### 2.3.3.6.4.3. Trikalsiyum Fosfat

Kalsiyum fosfat seramiğin en bilinen bileşiği trikalsiyum fosfattır. Trikalsiyum fosfat, kalsiyum fosfatın toz şeklinin naftalin gibi bir taşıyıcı ile sıkıştırılmasıyla üretilir. Daha sonra taşıyıcı olarak kullanılan naftalin ortamdan uzaklaştırılır ve poröz yapı ortaya çıkar. Yapılan bazı deneysel çalışmalar, bu materyalin segmentlerinin vücutta implantasyondan 10 yıl sonra bile kaldığını göstermiştir.<sup>95</sup>

Trikalsiyum fosfat greftler, kortikokansellöz kemik ile karıştırılarak skolyoz operasyonlarında, benign tümör eksizyonu ve travma sonrası oluşan defektlerin onarımında kullanılmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır.<sup>95</sup>

#### 2.3.3.6.4.4. Beta Trikalsiyum Fosfat

Beta trikalsiyum fosfat, kemik greft materyali olarak kullanılan en eski kalsiyum fosfat bileşiklerindedir. 1920 yılında Albee ve Morrison tarafından segmental kemik defektindeki boşluğa beta trikalsiyum fosfat enjekte edilen vakalarda kemik iyileşme oranının arttığını bildirilmiştir.<sup>114</sup>

Beta trikalsiyum fosfatın poröz, solid, partiküllü ya da blok formları bulunmaktadır. Poröz yapıdaki formunun basınç ve gerilim dayanıklılığı kansellöz kemiğe yakındır. 6-18 ay içerisinde rezorbe olabilmektedir. Klinikte daha az rezorbe olan greftlerle ya da otojen kemik greftleriyle birlikte kullanımı uygundur.<sup>114</sup>

#### 2.3.3.6.4.5. Sentetik Hidroksiapatit

Klasik olarak yavaş emilen kalsiyum fosfat seramiği hidroksiapatit olarak adlandırılır. Yüksek derecede kristalize hidroksiapatit stabil bir bileşiktir ve yılda % 5-15 emilim gösterir. Yapılan deneysel çalışmalarda poröz hidroksiapatit implantların öncelikle fibrovasküler doku ile kaplandığı ve zamanla bu dokunun olgun lameller kemiğe dönüştüğü saptanmıştır. Hidroksiapatitin osteokondüktif özellikleri bu materyallerin kemiğe sıkı yapışmasına da olanak sağlar.<sup>88</sup>

Urist<sup>117</sup> yaptığı çalışmada, hidroksiapatitin lokal büyüme faktörlerine, özellikle kemik BMP' lere karşı kuvvetli kimyasal bağlanma eğilimi olduğunu göstermiştir.

#### **2.4. Osteokalsin**

OC, osteoblastlar, odontoblastlar ve hipertrofik kondrositlerden sentezlenen, kemikte en çok bulunan nonkollajenaz kemiğe ait spesifik bir proteindir.<sup>118-120</sup> OC, 5900 dalton molekül ağırlıklı olup üç adet g-karboksi glutamat içeren ve hidroksiapatite bağlanan 49 aminoasitli nonkollajenik matriks proteinidir. Kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bir protein olan OC' nin sentezi, K vitaminine bağımlıdır.<sup>118, 119, 121</sup>

OC, kemikteki total protein miktarının % 2' sini oluşturmaktadır. Kortikal ve trabeküler kemikte dağılmış durumdadır. Osteoblastik aktivitenin düzenlenmesi ve hidroksiapatite bağlanmada



önemlidir. OC' nin kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde önemli olduğu düşünülmektedir.<sup>122</sup>

Kemik döngüsünün arttığı durumlarda serum OC düzeyi artmaktadır. Ayrıca puberte, primer hiperparatiroid, hipertiroid, renal osteodistrofi, tedavi edilmemiş osteomalazi ve metastatik kemik hastalıklarında serum OC seviyesi artmaktadır. Hipoparatiroid, hipotiroid, cushing sendromu, multipl myelom ve malign hiperkalsemi gibi glukokortikoidle tedavi edilen hastalıklarda ve östrojen kullanımında osteokalsin düzeyi düşmektedir.<sup>123-125</sup>

OC' in dolaşımdaki yarılanma ömrü 5 dakikadır. Serumdaki glomerular filtrasyon ile hızlı temizlenmektedir. OC ve alkalin fosfataz osteoblastların ürünü olmasına rağmen konsantrasyonları her zaman birbirine paralel olmamaktadır.<sup>121</sup> Serum OC seviyesinin artması, kemik mineral yoğunluğunun azalmasına ve osteoporötik kırık oluşma riskinin artmasına neden olmaktadır.<sup>126</sup>

## **2.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü**

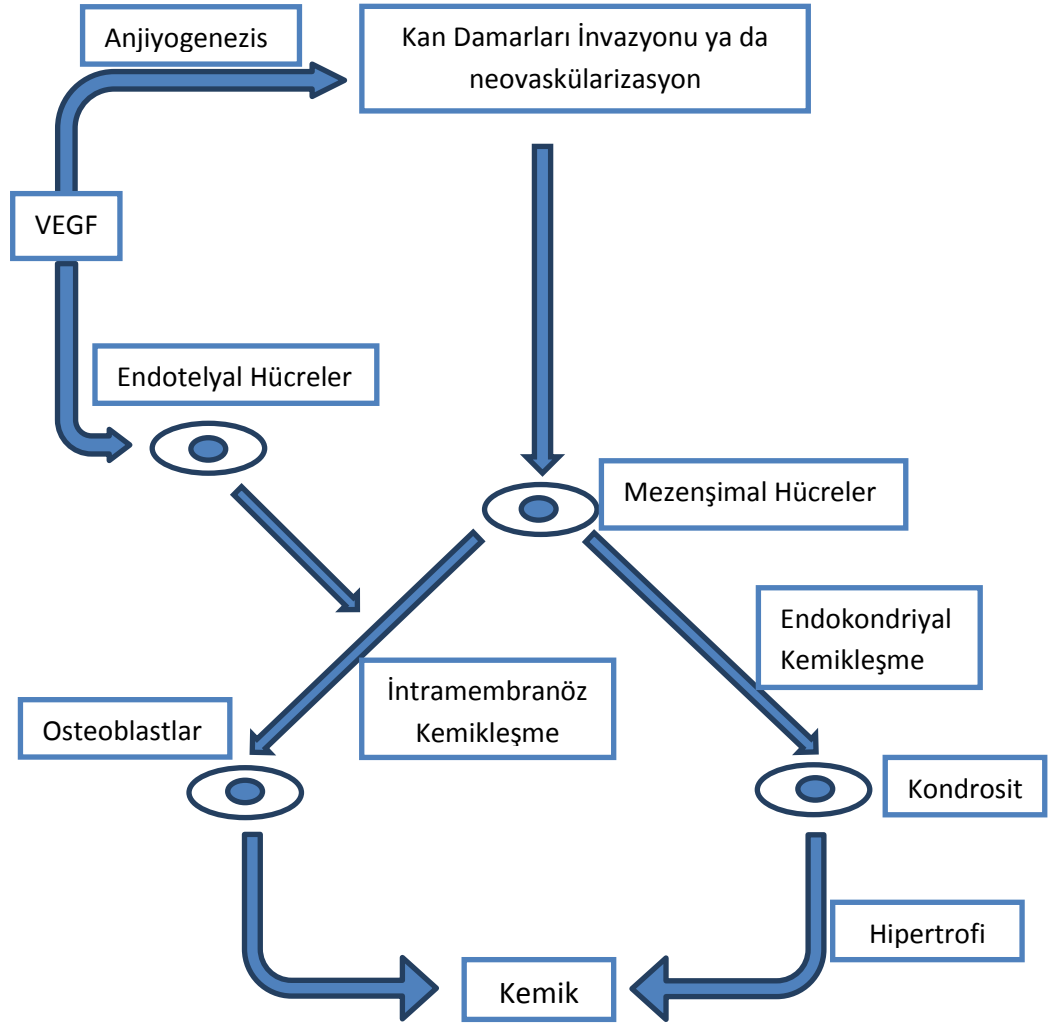
VEGF, özellikle endotel hücrelerine spesifik etkilere sahip olan multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir.<sup>127</sup> İlk kez 1983 yılında Senger ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada damar geçirgenliğini arttırdığını saptadıkları "Tümör Vasküler Permeabilite Faktörü"nü tanımlamışlardır.<sup>128-130</sup> 1989 yılında Ferrara ve Henzel endotel hücre mitojeni olarak tanımladıkları faktörü VEGF olarak isimlendirmişlerdir.<sup>129-</sup><sup>131</sup> Daha sonra yapılan DNA çalışmalarında, bulunan bu iki faktörün aslında aynı olduğu saptanmıştır.<sup>129</sup>

VEGF, endotel hücrelerinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferansiasyonuna neden olur. Hem gelişim dönemindeki bireyde hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir. Bu büyüme faktörü, özellikle damar oluşumunda kritik rol oynarken, embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardiyal iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artirit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan endotel hücrelerinin yaptığı birçok fizyolojik ve fizyopatolojik olayda görev almaktadır.<sup>127, 132</sup>

VEGF, kemik damarlanmasına, kondrosit ve osteoblastların diferensiasyonuna aracılık ederek normal endokondriyal kemikleşme sırasında önemli bir rol oynamaktadır.<sup>133</sup> Epifiziyal büyüme plakları içerisinde bulunan ve yeni kemik oluşumu için kartilaj invazyonunu destekleyen hipertrofik kondrositlerin, VEGF eksprese ettikleri saptanmıştır.<sup>130</sup> Ayrıca fraktür iyileşmesinin erken dönemlerinde osteoprogenitörlerden güçlü VEGF ekspresyonu tespit edilmiştir.<sup>133</sup>

Son yıllarda VEGF üzerine yapılan çalışmalar, bu ailenin Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri (PDGF) süperailisinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur.<sup>127</sup> VEGF gen ailesi içinde VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve Plasental Büyüme Faktörü olmak üzere 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır. Temel olarak anjiogenez, lenfanjiogenez ve damar permeabilitesini düzenleyen bu faktörlerin VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır.<sup>129</sup>

VEGF-A, anjiogenezisle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek faktördür.<sup>129</sup> Çalışmalarda genellikle VEGF olarak ifade edilen faktör aslında VEGF-A'dır.<sup>127, 129</sup> Vaskülogenez, anjiogenez ve lenfanjiogenez düzenler. Damar permeabilitesinde artışa neden olur. Endotel hücrelerinin büyüme ve farklılaşması için gereklidir. Ayrıca monositler için kemotaktiktir. Endotel hücrelerinde apoptozisi engelleyerek hücrel devamlılığı sağlar. Nöron koruyucu etkileri bulunmaktadır. Pro-inflamatuar etkilidir ve lökositlere bağlanabilmektedir.<sup>129</sup> VEGF-A, mezenşimal hücrelerin kartilaj ya da subperiosteal konnektif dokulara dönüşümünün gerçekleştiği anjiyogenezis sürecinde görev almaktadır. Bu süreç içerisinde intramembranöz kemikleşme ya da endokondral kemikleşme ile kemik formasyonu başlamaktadır. VEGF' nin anjiyogenezis ve osteogenezis üzerine olan etkileri Şekil- 2' de gösterilmiştir.<sup>134</sup>



**Şekil 2: VEGF' nin anjiyogenezis ve osteogenezis üzerine olan etkilerinin şematik görünümü.**<sup>134</sup>

VEGF-B, monositlerin aktivasyonu ve farklılaşması, hücre adezyonu ve göçünde rol oynamaktadır.<sup>127, 129</sup>

VEGF-C ve VEGF-D, VEGF-benzeri protein olarak da bilinir. Vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde mitojenik etki yapar.<sup>127</sup> Yara iyileşmesinde rol oynar.<sup>129</sup> Ayrıca VEGF-C' nin kaposi sarkomunda önemli

oranda rol aldığı saptanmıştır.<sup>135</sup> VEGF-D, VEGF-C' ye benzer işlevler yerine getirmektedir.<sup>129</sup>

VEGF-E ve VEGF-F, VEGF-A' nın insanlar dışındaki canlılarda bulunan homologlarıdır.<sup>129</sup>

Plasental Büyüme Faktörü, VEGF ailesinin ilk tanımlanan ve endotel hücrelerinde en çok bulunan üyesidir.<sup>127, 129</sup> VEGF-A' ya bağlı endotel hücre çoğalmasını indüklemektedir.<sup>129</sup>

İmmünohistokimyasal analiz, araştırma ve tanısal amaçlı patolojide 1950'lerden beri kullanılan, belirlenmek istenen antijenlerin lokalizasyonu ile doku morfolojisini karşılaştırma olanağı sağlayan bir tekniktir. Bu teknik görüntülenmek istenen spesifik antijenlere bağlanan antikörlerin çeşitli boylarla görünür hale gelmesini sağlayan enzimatik bir kimyasal reaksiyon temeline dayanmaktadır. İmmünohistokimyasal analiz, taze doku ve aspirasyon sitolojilerinde olduğu kadar parafin bloklara gömülü doku kesitlerine de uygulanabilmektedir.<sup>136</sup>

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu çalışmaya, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 12.02.2010 tarih ve B.30.2.GÜN.0.05.06.00/37-2375 sayılı izni alınarak başlanmıştır. Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne doktora tez projesi olarak sunulmuş ve onay alınmıştır.(03/2010-19) Çalışmanın deneysel kısmı Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nin araştırma laboratuvarında, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler ise Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Patoloji Ana Bilim Dalı'nda yapılmıştır.

#### **3.1. Deneysel Çalışma Grupları**

Çalışmada ortalama 2,5 kg ağırlığında 7-7,5 aylık 24 adet erişkin Yeni Zelanda tipi beyaz erkek tavşan kullanılmıştır. Tüm deney hayvanları, Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Serum Çiftliği'nden temin edilmiştir. Çalışma süresince bakımları Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde yapılmıştır. Çalışma ortamına alışmaları açısından 1 hafta süreyle herhangi bir işleme tabi tutulmadan bekletilmişlerdir. Bütün deney hayvanlarının bakımları aynı oda içerisinde, her kafese 2 adet tavşan yerleştirilerek yapılmıştır. Çalışma süresince tavşanlar, kuru pelet yem ve çeşme suyu ile beslenmiştir.

Çalışmadaki bütün tavşanlara aynı şartlar altında aynı cerrahi işlem uygulanmıştır. Her tavşanın sağ ve sol tibialarına 5mm çapında ikişer kemik defekti açılmıştır.

Sağ tibiadaki proksimal defekte greft materyali ve Serum Fizyolojik (SF) (İzotonik NaCl Solüsyonu, Eczacıbaşı- Baxter) karışımı yerleştirilmiş, distal defekte ise sadece SF uygulanmıştır.

Sol tibiadaki proksimal defekte ise greft materyali ve ABS karışımı yerleştirilmiş, distal defekte ise sadece ABS uygulanmıştır.

24 adet tavşan her grupta 6 adet tavşan olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır.

**1. Grup:** Bu grupta yer alan 6 tavşan işlemden sonra postoperatif 7. günde sakrifiye edilmiştir.

**2. Grup:** Bu grupta yer alan 6 tavşan işlemden sonra postoperatif 15. günde sakrifiye edilmiştir.

**3. Grup:** Bu grupta yer alan 6 tavşan işlemden sonra postoperatif 30. günde sakrifiye edilmiştir.

**4. Grup:** Bu grupta yer alan 6 tavşan işlemden sonra postoperatif 45. günde sakrifiye edilmiştir.

Her gruptaki 6 adet tavşana toplam 24 adet kemik defekti açılmıştır. Defektler dört alt grupta değerlendirilmiştir:

**A (+) Grubu:** Açılan kemik kavitesi içerisine kemik greft materyali ve ABS karışımı yerleştirilmiştir.

**A (-) Grubu:** Açılan kemik kavitesi içerisine kemik greft materyali ve SF karışımı yerleştirilmiştir.

**B (+) Grubu:** Açılan kemik kavitesi içersine sadece ABS uygulanmıştır.

**B (-) Grubu:** Açılan kemik kavitesi içersine sadece SF uygulanmıştır. Grup isimleri oluşturulurken önce grup numarası ardından alt grup numarası yazılmıştır. [1 A(+), 3 B(-), 4 A(-) vs.]

### 3.2. Kullanılan Malzemeler

#### 3.2.1. Greft Materyali

Bu çalışmada kemik greft materyali olarak Bio-Gen® Mix ( Bioteck, Vicenza, Italy) kullanılmıştır (Resim 2). Tamamen abzorbe edilebilir özellik taşıyan Bio-Gen®, kollajen olmayan, antijenden arındırılmış ve at kemiğinden elde edilen ksenojenik kemik malzemesidir. Spongioz ve kortikal granüller içermektedir. Bio-Gen® Mix; 0,5 mm'lik kortikal taneleri ve 1 mm'lik spongioz karışımdan meydana gelmektedir.



**Resim 2: Kullanılan ksenojenik kemik greft materyali.**



### 3.2.2. Ankaferd Blood Stopper

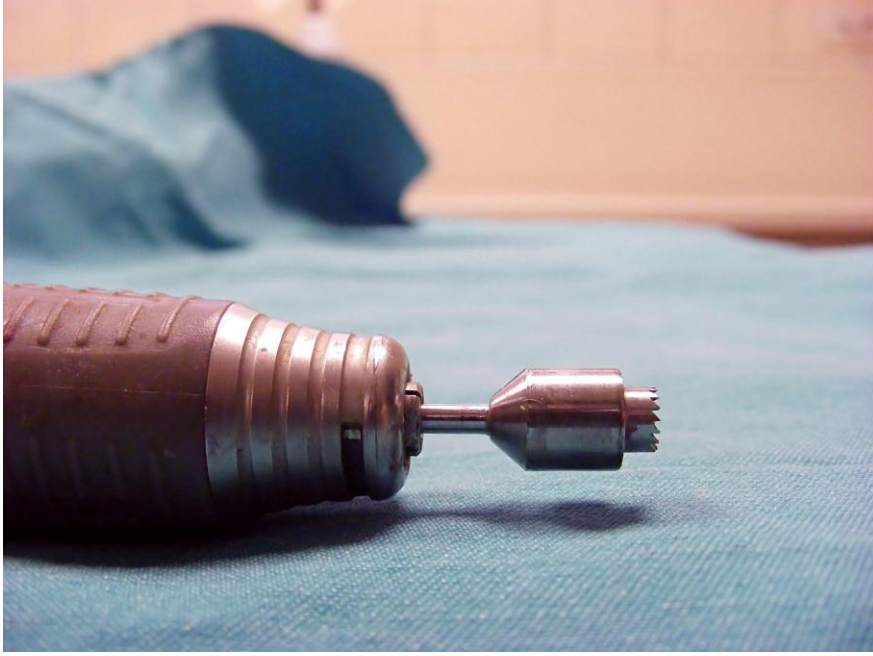
Çalışmamızda deney hayvanlarının sol tibialarına açılan kemik defektlerine kemik iyileşmesine olan etkilerini incelemek için ABS (Ankaferd İlaç Kozmetik A.Ş, İstanbul, Türkiye) uygulanmıştır(Resim 3).



**Resim 3: Ankaferd Blood Stopper.**

### 3.2.3. Trefan Frez

Kemik defektlerini oluşturmak amacıyla çapı 5 mm olan çelik trefan frezler (Elektron Medikal, Ankara, Türkiye) kullanılmıştır (Resim 4).

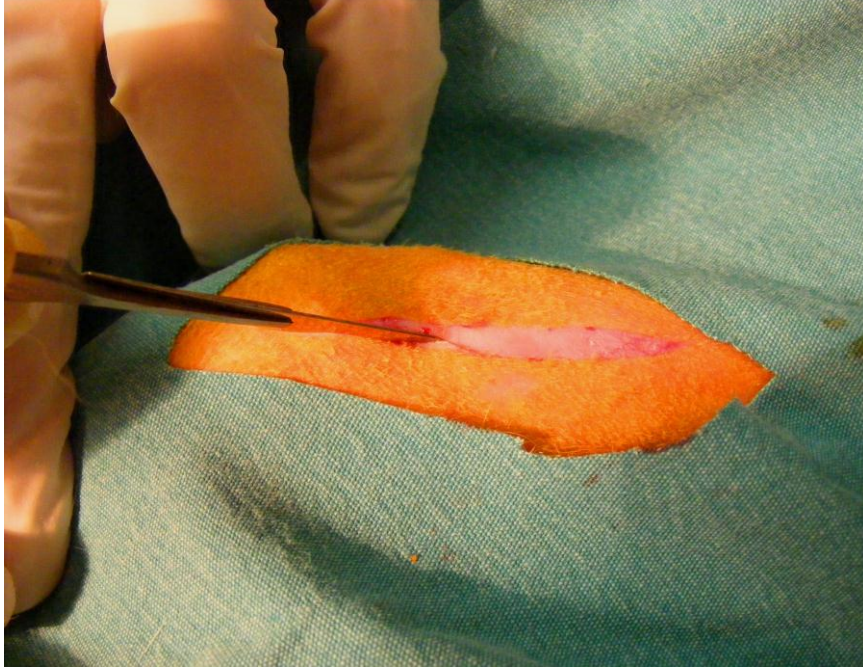


**Resim 4: Çalışmada kullanılan çelik trefan frezler.**

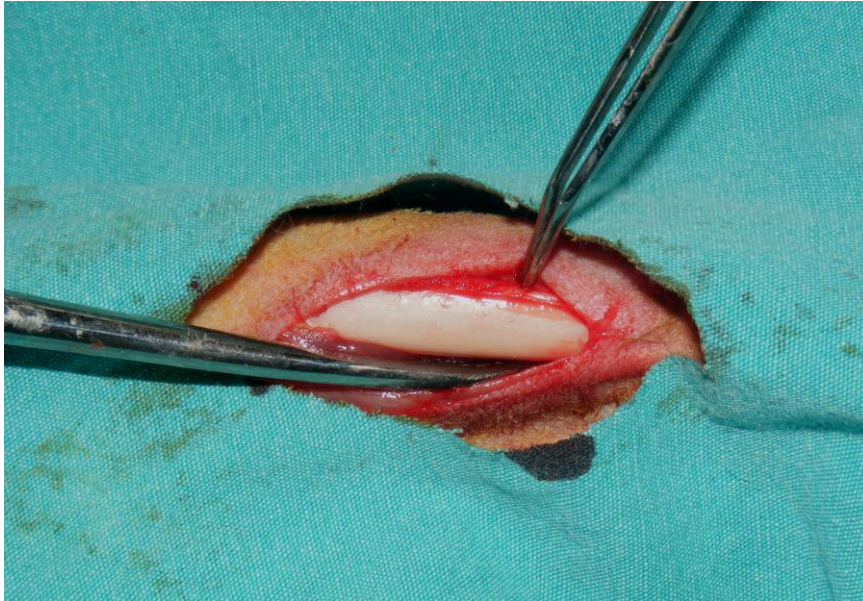
### **3.3. Cerrahi Protokol**

Çalışmaya alınan 24 adet tavşana 25-35 mg/kg Ketamin HCl (Ketasol %10, Richter Pharma) ve 5 mg/kg Ksilazin HCL (Rompun %2, Bayer) intramusküler olarak verilerek genel anestezi sağlanmıştır.

Uygulanan tüm cerrahi işlemler steril cerrahi koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Her iki arka bacak iç bölgeleri traş edilerek ilgili bölge Povidone-iodine (Batticon<sup>®</sup>, Adeka) ile silinmiştir. Her iki tibia medial bölgesine yaklaşık 4 cm uzunluğunda cilt insizyonu yapıldıktan sonra (Resim 5), cilt altı, kas ve periost diseke edilerek kemiğe ulaşılmıştır (Resim 6).

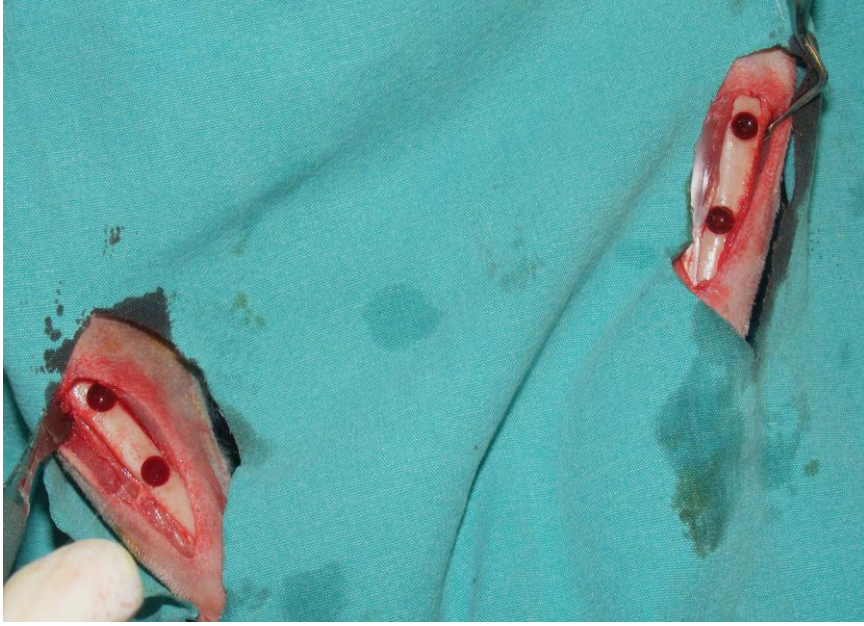


**Resim 5: Cilt insizyonu.**



**Resim 6: Diseksiyon sonrası tibianın görünümü.**

Her iki tibiaya çelik trefan frezle SF irrigasyonu altında aralarında 1 cm mesafe bırakılarak iki adet 5 mm çapında kemik kaviteleri açılmıştır (Resim 7).



**Resim 7: Her iki tibiada açılan 5mm çapındaki kemik defektleri.**

Defektler yıkanıp hemoraji kontrol altına alındıktan sonra sol tibiada açılan proksimal defektin içerisine Bio-Gen® Mix ve ABS karışımı ile hazırlanan kemik greft materyali, taze kemik yarasını tam olarak dolduracak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 8, 9).

Sol tibiada açılan distal defekte ise insülin enjektörüne çekilen 0,1 cc ABS uygulanmıştır.

Sağ tibiada açılan proksimal defektin içerisine taze kemik yarasını tam olarak dolduracak şekilde Bio-Gen® Mix ve SF karışımı ile hazırlanan kemik greft materyali yerleştirilmiştir.

Sağ tibiada açılan distal defekte ise insülin enjektörüne çekilen 0,1 cc SF uygulanmıştır.



**Resim 8: Greft materyali ve ABS karışımı.**



**Resim 9: Sol tibiadaki proksimal defekte Greft + ABS yerleştirilmesi.**

Kanama kontrolü sağlandıktan sonra kas ve cilt altı dokuları 4/0 Sterigut Chromic rezorbe olabilen sütür (SSM A.Ş, Türkiye) ile cilt ise 3/0 Plain Catgut rezorbe olabilen sütür (Huaian Angel, China) ile primer olarak kapatıldıktan sonra yara bölgesi Povidone-iodine ile silinmiştir. (Resim 10, 11)



**Resim 10: Cilt altı dokuların sütüre edilmesi.**



**Resim 11: Yara bölgesinin primer kapatılması.**

1. gruptaki tavşanlar postoperatif 7.günde, 2.gruptaki tavşanlar postoperatif 15.günde, 3.gruptaki tavşanlar postoperatif 30.günde, 4.gruptaki tavşanlar ise postoperatif 45.günde kas içi yüksek doz ketamin enjeksiyonuyla sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen deneklerin sağ ve sol tibiaları eksize edilerek % 10'luk formalin solüsyonu içerisinde fikse edilmiştir.

### 3.4. Histopatolojik Analiz

Sakrifiye edilen hayvanların ilgili bölgelerinden alınan blok biyopsiler, %10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 24 – 72 saat fikse edildikten sonra %10'luk formik asitle ortalama 3 hafta süre ile dekalsifikasyonları sağlanmıştır(Resim 12). Rutin doku takip prosedürünü takiben örnekler parafin bloklara gömülmüştür. Dokulardan adheziv lamlara (Surgipath, X-tra Adhesive Microslides, Illinois, USA) 4µm kalınlığında bir adet hematoksilin-eozin (HE) boyaması için olmak üzere toplam 3 adet, yaklaşık 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır.



Resim 12: Dekalsifiye edilmiş blok materyalin görünümü.

Histopatolojik inceleme ve histomorfometrik ölçüm için rutin HE boyanan kesitler, 65°C'de etüv içinde deparafinize edilip, sırasıyla 30'ar dakika ksilol ve alkolde bekletildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp boyama işlemine tabi tutulmuştur.

Vakalara ait tüm histopatolojik değerlendirmeler Leica DM 4000 B (Leica Microsystems GmbH. Wetzlar, Germany) ışık mikroskopunda yapılmıştır.

Örneklerin HE boyalı kesitlerinde, defekt alanının genel durumu, kemik dolum miktarı, inflamasyon, olası yabancı cisim reaksiyonu, endosteal kemik varlığı ve yoğunluğu değerlendirilmiştir. Yapılan bütün histomorfometrik ölçümler Leica QWin Plus v3.3.1 görüntü analizi programı (Leica Microsystems GmbH. Wetzlar, Germany) kullanılarak yapılmıştır.

Kemik dolum düzeyi değerlendirilirken, her bir örnek için çekilen fotoğraf üzerinde, defekt tabanından defekt üst sınırına kadar olan alan içerisinde yeni oluşan mineralize kemik miktarı Leica QWin Plus v3.3.1 görüntü analizi programı ile ölçülerek defekt alanının tamamına oranı yüzdesel olarak skorlanmıştır.

İnflamasyon yoğunluğunun değerlendirilmesi, x400 büyütmede bağ dokusunda yer alan inflamatuvar hücrelerin Leica QWin Plus v3.3.1 görüntü analizi programı yardımıyla sayılması ile gerçekleştirilmiştir. Hirshberg ve arkadaşlarının<sup>137</sup> yaptıkları çalışmada kullandıkları skorlamaya benzer olarak, HE kesitlerde rastgele seçilen beş



büyük büyütme alanındaki inflamatuvar hücreler sayılmış ve inflamasyon yoğunluğu dört dereceli bir sistem ile skorlanmıştır:

**0:** İnflamasyon yok

**1:** Alan başına 15 inflamatuvar hücreden az (Hafif)

**2:** Alan başına 15–50 inflamatuvar hücre (Orta)

**3:** Alan başına 50 veya daha fazla inflamatuvar hücre (Şiddetli).

Endosteal kemikleşme düzeyi değerlendirilirken, defekt tabanında oluşan endosteal kemikleşme miktarının defekt alanının alt yarısına olan oranı Leica QWin Plus v3.3.1 görüntü analizi programı kullanılarak dört dereceli bir sistem ile skorlanmıştır:

**0:** Endosteal Kemikleşme Yok

**1:** % 0 - 30 arası endosteal kemikleşme mevcut

**2:** % 30 – 70 arası endosteal kemikleşme mevcut

**3:** % 70 – 100 arası endosteal kemikleşme mevcut

### **3.5. İmmünohistokimyasal Yöntem**

VEGF ve OC Monoklonal antikoları için Avidin-Biyotin Kompleks (ABC) metodu ile immünohistokimyasal olarak boyanma yapılmıştır.

Kesitler etüv içerisinde 56°C'de 12 saat bekletildikten sonra 30 dakika süreyle ksilol ile muamele edilerek deparafinizasyon, 5'er dakika süreyle sırasıyla %100, %96 ve %90'luk etil alkolde bekletilerek dehidratasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Kesitler 1 dakika çeşme suyunda yıkanıp distile sudan geçirildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için distile su içinde hazırlanmış %3 hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 10 dakika süreyle uygulanmıştır. Kesitler fosfatla tamponlanmış serum (PBS, Fosfat Buffer Solüsyonu, pH:7,60) ile püskürtme yöntemi kullanılarak iyice yıkanmıştır. Formalin fiksasyonu ve parafin bloklama nedeniyle dokuda maskelenmiş olan antijenik yapıları açığa çıkarmak amacıyla her iki antikorun da uygulanacağı kesitler, antijen retrieval solüsyonu (0,01M sodyum sitrat buffer, pH:6,00) içerisinde ilk 10 dakika orta, son 5 dakika yüksek derecede olmak üzere toplam 15 dakika mikrodalga fırında işleminden geçirilmiştir. Takiben kesitler oda ısısında 30 dakika bekletilip, distile su ve arkasından PBS ile üç kez yıkanmıştır.

Her iki antikor boyaması için Zymed Histostain Plus Broad Spectrum (Lot 1385070, Zymed laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA) kullanılmıştır.

Kesitler 5-10 dakika süreyle non-immün bloklama serumunda bekletildi. Daha sonra OC (Anti-osteocalcin antibody, Lot: ab13420) ve VEGF (Anti-VEGF antibody, Lot: ab28775) primer antikorlarıyla oda ısısında 2 saat süreyle muamele edilmiştir. PBS ile 5 dakika püskürtme yöntemi ile yıkanıp kurulandıktan sonra biyotine bağlanmış bağlayıcı (sekonder) antikor 20-30 dakika uygulanmıştır. Kesitler yeniden PBS ile yıkanıp kurulandıktan sonra streptavidin ile konjuge alkalen fosfataz uygulanarak 20-30 dakika bekletilmiştir. Takiben kesitler PBS ile yıkanarak kurulanmıştır.

Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla yaklaşık 5-8 dakika süre ile 3-3' diaminobenzidine tetrachloride solüsyonu (DAB, substarate kit, Lot: 11067520, Zymed S.San Francisco, California, USA) ile inkübe edilmiştir. Kesitler üç kez distile sudan geçirilmiştir. Zemin boyaması için Harris hematoksilende 5 saniye bekletilmiştir. Kesitler önce çeşme suyunda ardından distile suda yıkandıktan sonra 5 dakika % 96 alkolde fiksasyonları sağlanmıştır. Ksilol içinde 5 dakika bekletilen kesitler entellan (Clearmount, Lot:10364117, Zymed S.San Francisco, California, USA) kullanılarak üstleri kapatılmıştır.

Pozitif kontrol olarak OC için osteosarkom, VEGF için ise hemanjiyom dokusu kullanılmıştır. Primer antikor uygulanması aşamasında PBS içerisinde bekletilen kesitler negatif kontrol olarak kabul edilmiştir.

VEGF ekspresyonu, vasküler yapıların duvarlarında, endotel hücrelerinde sitoplazmik olarak kahverengi boyanmış alanlarda değerlendirilmiştir.

Greft materyali üzerinde gelişen matrikste, ekstraselüler olarak greft çevresindeki osteoid alanlarında, sitoplazmik olarak osteoblast ve osteositlerde izlenen kahverengi boyanmalar, OC için pozitif kabul edilmiştir.

VEGF ekspresyonu değerlendirilirken, daha önceki çalışmalarda da uygulandığı gibi, pozitif boyanan vasküler yapıların boyanmayanlara oranı, OC ekspresyonu değerlendirilirken ise pozitif

boyanan hücre ve alanların, boyanmayanlara oranı göz önüne alınarak bu alanlar arası skorlama yapılmıştır:

**0:** Boyanan alan yok

**1:** % 0 – 30 arası pozitif boyanan alan varlığı

**2:** % 30 – 70 arası pozitif boyanan alan varlığı

**3:** % 70 – 100 arası pozitif boyanan alan varlığı

Osteokalsin ve VEGF pozitif alanlar Leica QWin Plus v3.3.1 görüntü analizi programı kullanılarak hesaplanmıştır.

### **3.6. İstatistiksel Değerlendirme**

Bu çalışmada bütün istatistiksel analizler, bu alanda kullanılan bir program olan Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 15.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. ABS' nin yeni kemik dolum miktarı, endosteal kemikleşme düzeyi, inflamasyon derecesi, VEGF ve OC skorlaması üzerine etkileri istatistiksel olarak değerlendirilirken; model denklemi kurularak varyans analizi yapılmıştır. Faktörlerin cevap değişkenleri üzerinde etkili olup olmadığı Anova Testi ile araştırılmıştır. Çalışmadaki grupların dağılımının normal dağılıma uygun olup olmadığı incelenirken Shapiro Wilk, varyans homojenliği incelenirken ise Levene testi kullanılmıştır.

Alt gruplar içinde ikili gruplar arasında kemik dolum miktarı açısından yapılan analizde parametrik test koşulları sağlandığında t testi,

sağlanmadığında ise Mann Whitney U testi, grup sayısı 2' den fazla olduğunda Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

Endosteal kemikleřme dűzeyi, inflamasyon miktarı, VEGF ve OC skorlamaları deđerlendirilirken Ki- Kare testi kullanılmıřtır. Tűm kararlar % 95 gűven dűzeyinde alınmıřtır.

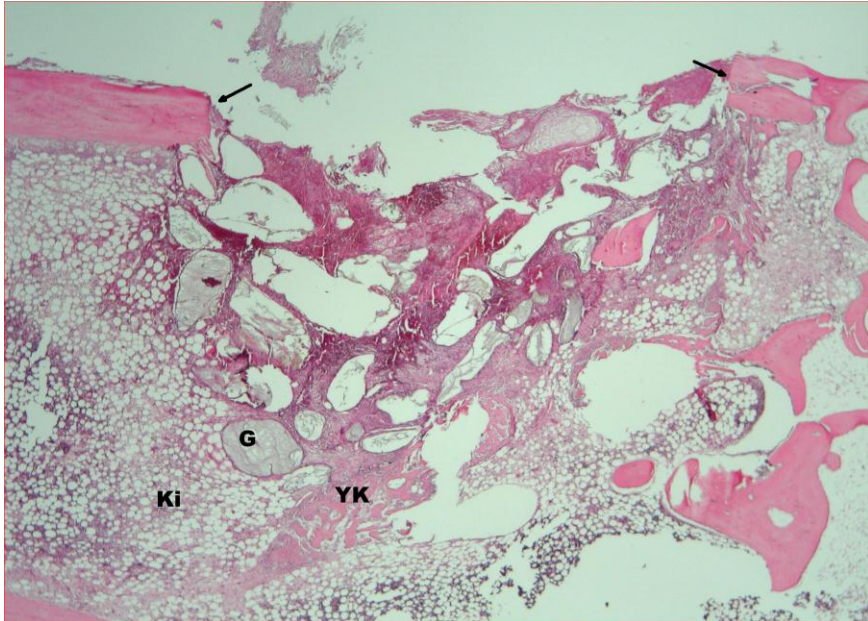
## 4. BULGULAR

### 4.1. Histopatolojik Bulgular

Elde edilen örneklerden alınan kesitler, gruplara göre sınıflandırılarak histopatolojik olarak değerlendirilmiştir.

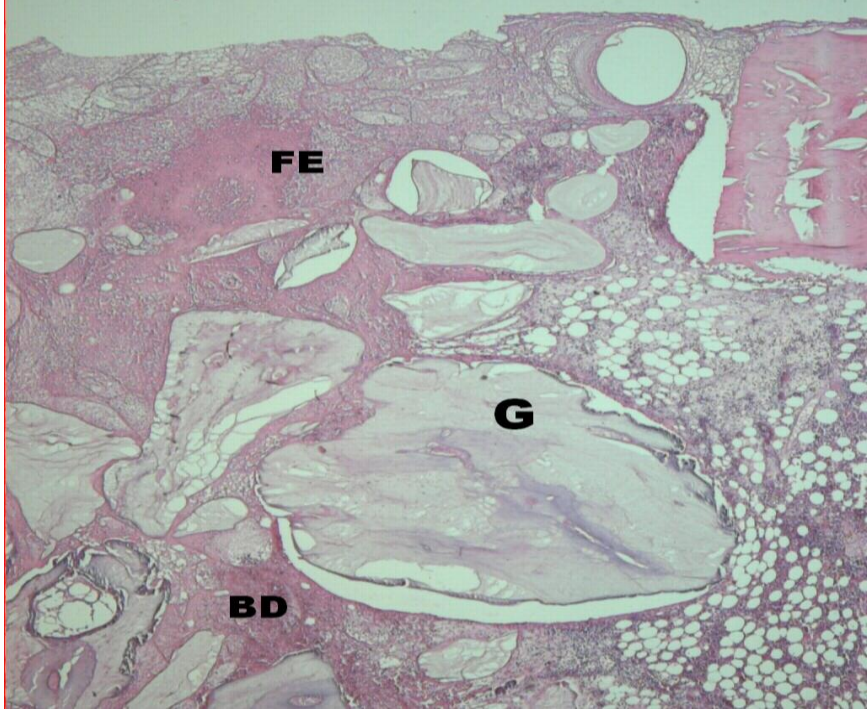
#### 4.1.1. Birinci Grup

Bu gruptaki örneklerin tümünde açılan kemik defekti sınırları ve kemik iliği net bir şekilde izlenmiştir. Açılan kemik defektlerinin tabanında konak kortikal kemik üzerinde reaktif endosteal kemikleşme dikkati çekmiştir (Resim 13). Örneklerin çoğunda defektlerin içerisinde ya da defekt kenarlarında yeni kemik formasyonu gözlenmemiştir.



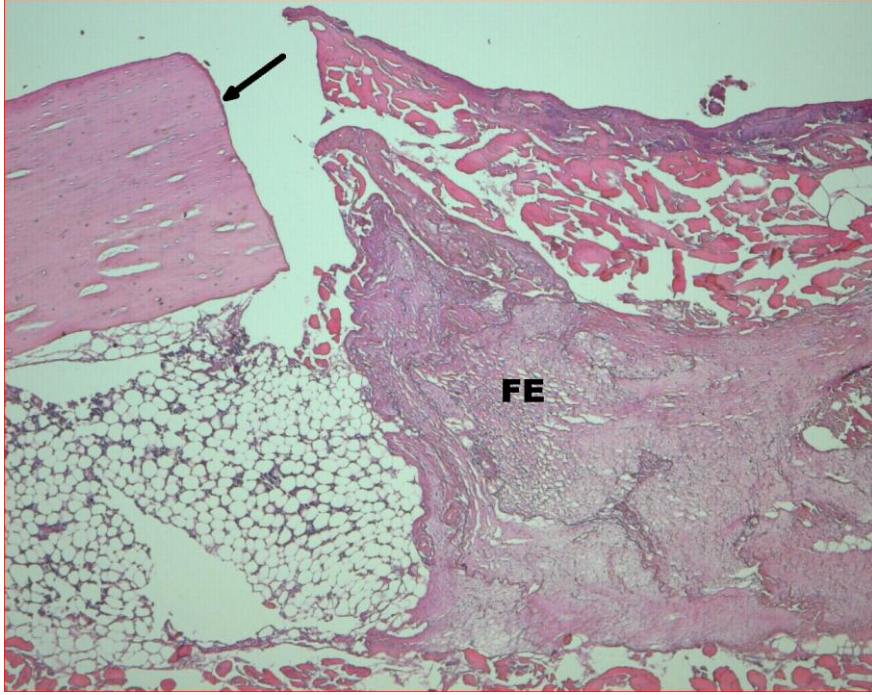
Resim 13: Defekt sınırları (Oklar), greft materyali (G), oluşan yeni kemik dokusu (YK) ve kemik iliği (Ki)(x20, HE) (1A + Grubu).

Greft materyali yerleştirilen örneklere defektlerin içerisinde henüz rezorbe olmamiş greft partikülleri ve partiküllerin çevresinde genç fibroselüler bağ dokusu ve fibrin eksuda grmştr (Resim 14).



**Resim 14: Greft materyali (G) evresinde fibrin eksuda (FE) ve genç fibroselüler bağ dokusu (BD) (x40, HE) (1A + Grubu).**

Greft materyali yerleştirilmeyen örneklere ise defektlerin tamamen fibrin eksuda ve kanama alanları ile dolu olduğu izlenmiştir. Bazı örneklere fibrin eksuda ve kanama alanlarının yerini granülasyon dokusuna bıraktığı görülmüştür (Resim 15).



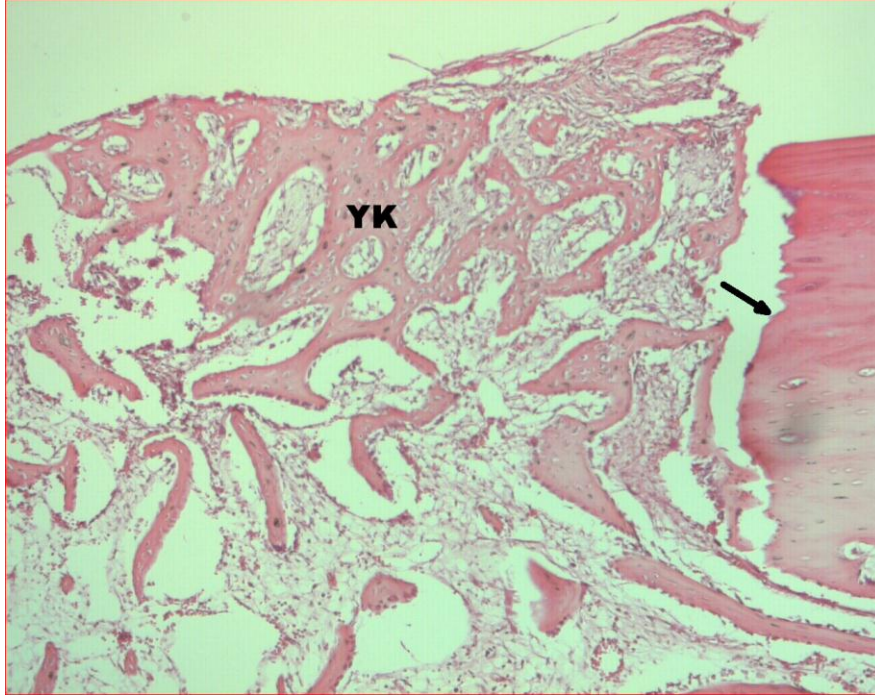
**Resim 15: Defekt sınırı (Ok) tüm defekti kaplayan fibrin eksuda görünümü (FE) (x40, HE) (1B - Grubu).**

ABS uygulanan örneklerde diğer örneklerle kıyasla daha az inflamasyon saptanmıştır. Ayrıca reaktif endosteal kemikleşmenin ABS uygulanan örneklerde daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Hatta bazı örneklerde endosteal kemikleşmenin defekt tavanında da meydana geldiği saptanmıştır.

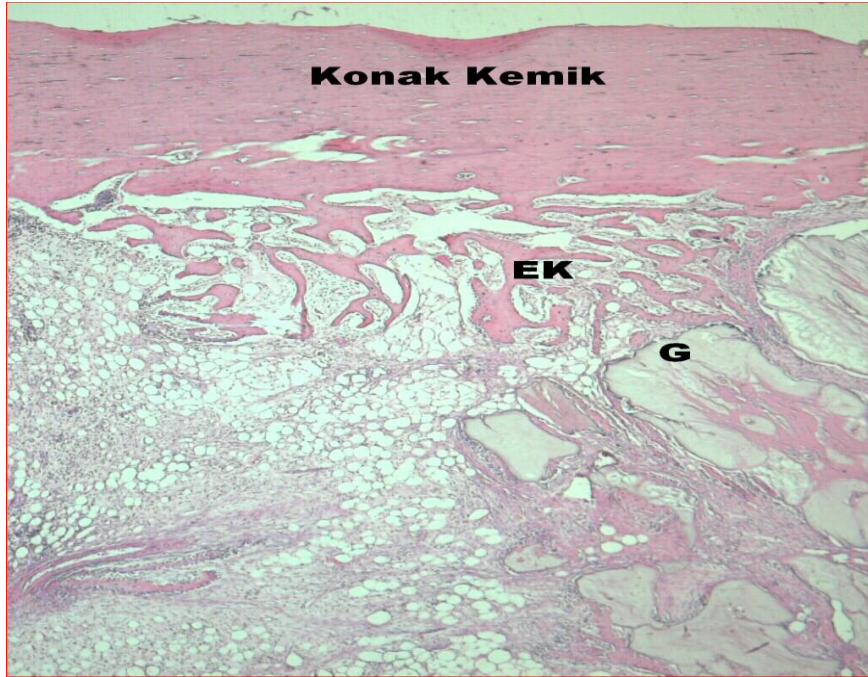
#### 4.1.2. İkinci Grup

Bu gruptaki örneklerde 1. gruba kıyasla daha az olmakla birlikte inflamasyon, fibrin eksuda ve serbest kanama alanları saptanmıştır. Örneklerin çoğunda reaktif endosteal kemikleşmede 1. gruba göre artış görülmüştür. Fibrin eksuda ile dolu olan çoğu defekte defekt kenarlarından başlayan yeni kemik formasyonu dikkati çekmiştir (Resim 16, 17).



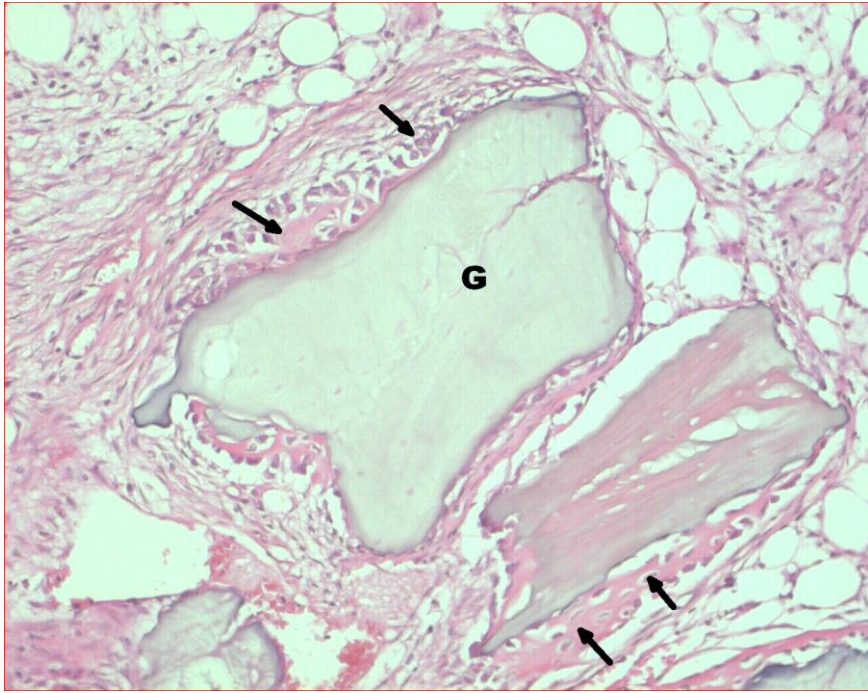


Resim 16: Defekt sınırından (Ok) itibaren izlenen yeni kemik yapımı (YK)(x100, HE) (2B - Grubu).



Resim 17: Konak kemiğin hemen altında endosteal kemikleşme (EK) ve rezorbe olan greft partikülleri (G) (x40 HE) (2A - Grubu).

Greft materyali yerleştirilen defektlerde greft partiküllerinin rezorbe olmaya başladığı görölmüştür. Bazı örneklere greft partikülleri çevresinde ve konak kemik komşuluğundaki defekt sınırlarında yeni kemik formasyonu izlenmiştir(Resim 18). Ayrıca greft uygulanmış örneklerin hiçbirinde yabancı cisim dev hücre varlığı ya da alerjik reaksiyonu düşündürebilecek eozinofilik infiltrasyon saptanmamıştır.

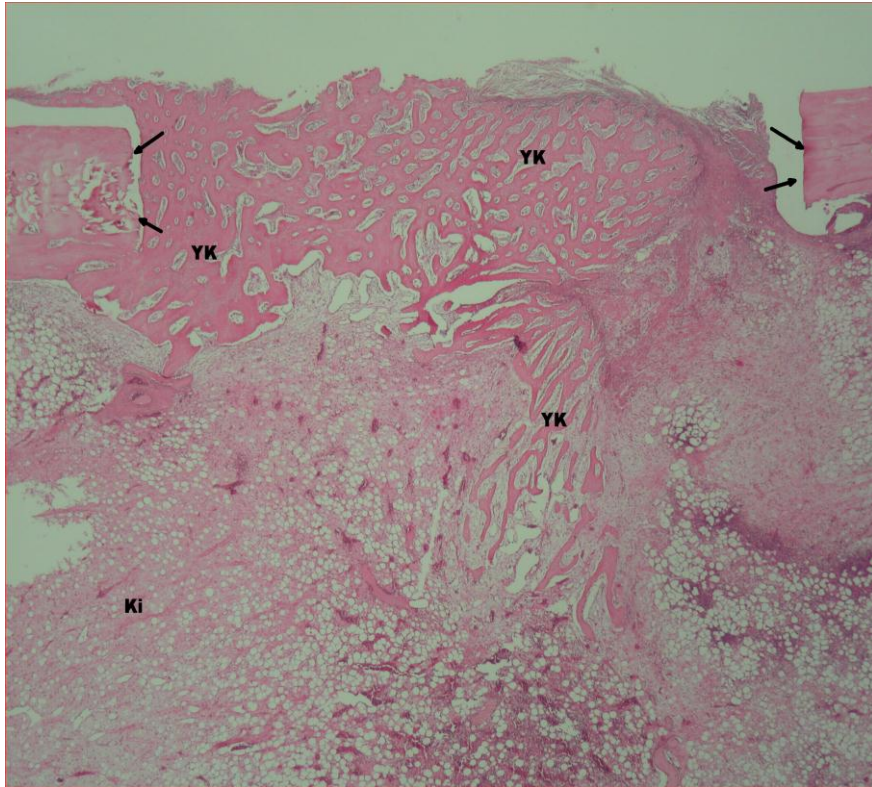


**Resim 18: Greft materyali (G) çevresinde aktif görünümdeki osteoblastlar ve yeni kemik yapımı (Oklar) (x200, HE) (2A - Grubu).**

ABS uygulanan örneklere diğer örneklere kıyasla endosteal kemikleşmenin ve endosteal kemik miktarının daha fazla olduğu ve inflamasyonun daha az ve sınırlı olduğu dikkati çekmiştir.

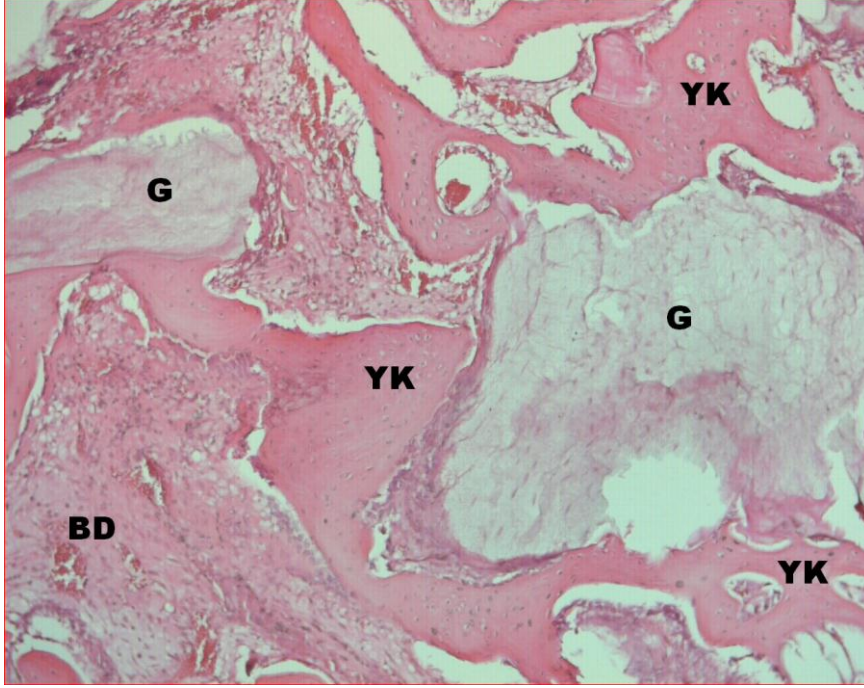
### 4.1.3. Üçüncü Grup

Bu gruptaki örneklerin çoğunda genel iyileşmenin büyük ölçüde tamamlandığı görülmüştür. Ayrıca yeni kemik formasyonunda ikinci gruptaki örneklerle kıyasla artma saptanmıştır. Bazı örneklerde minimal düzeyde inflamasyon izlenmiştir. Endosteal kemikleşme 1. ve 2. gruba kıyasla az olmakla birlikte halen mevcut olduğu görülmüştür. Örneklerin çoğunda defekt tavanının hemen hemen tümüyle yeni kemik ile kapanmış olduğu saptanmıştır (Resim 19).



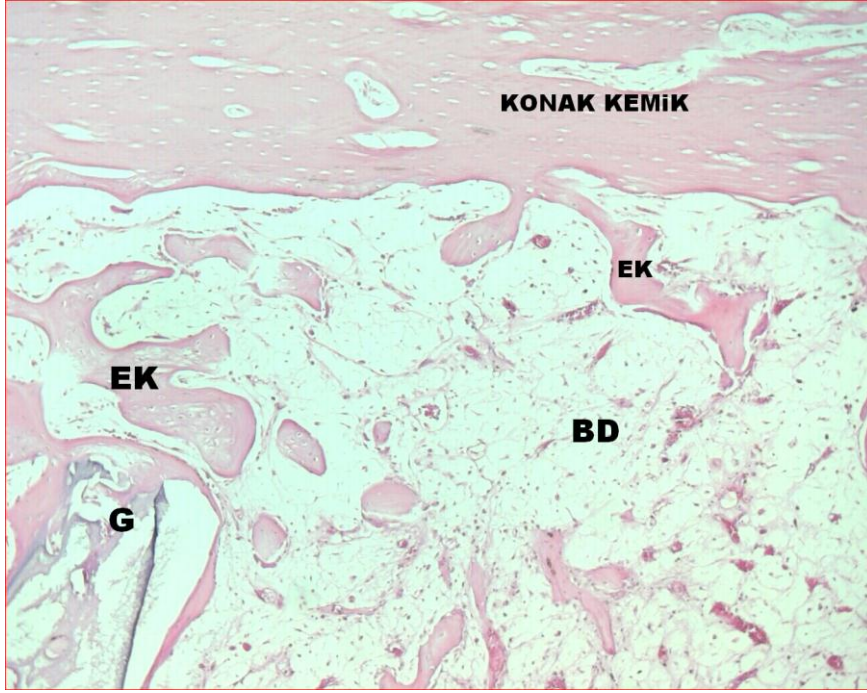
**Resim 19: Defekt sınırlarını (Oklar) neredeyse tümüyle kapatan yeni kemik dokusu (YK) ve kemik iliği (Ki) (x20, HE) (3B + Grubu).**

Greft materyali uygulanan defektlerin çoğunda greft partikülleri çevresinde yeni kemik formasyonu izlenmiştir. Bazı örneklerde ise partiküllerin çevresinde genç bağ dokusu görülmüştür (Resim 20).



**Resim 20: Greft partikülleri (G) çevresinde belirgin yeni kemik (YK) yapımı ve selüler bağ dokusu ( x100, HE) (3B + Grubu)**

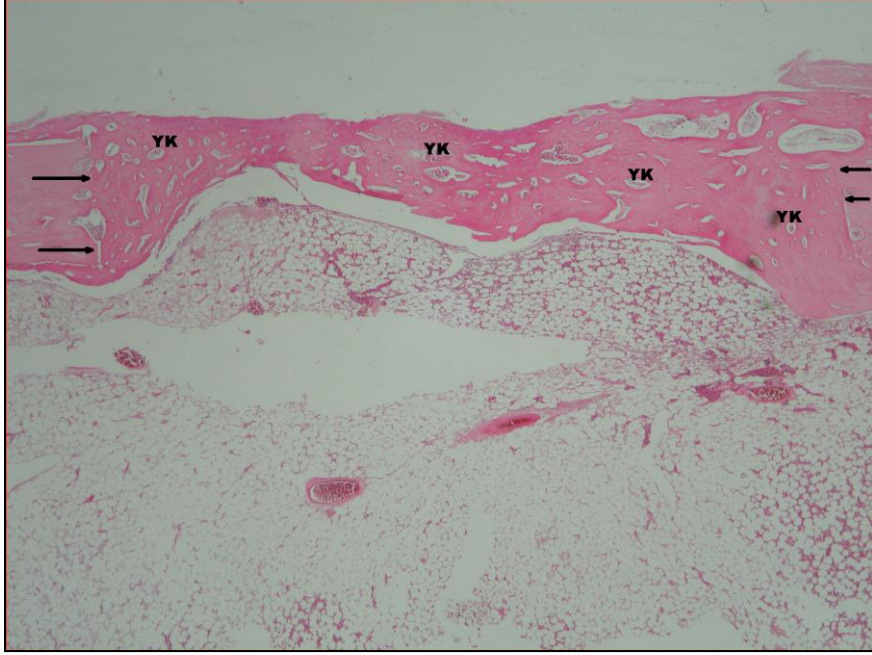
ABS uygulanan defektlerdeki endosteal kemik yapımının diğer örneklere kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür (Resim 21).



**Resim 21: Konak kemikte endosteal kemikleşme (EK) ve vaskülarize bağ dokusunda henüz rezorbe olmamış greft partikülleri (G) (x100, HE) (3A + Grubu).**

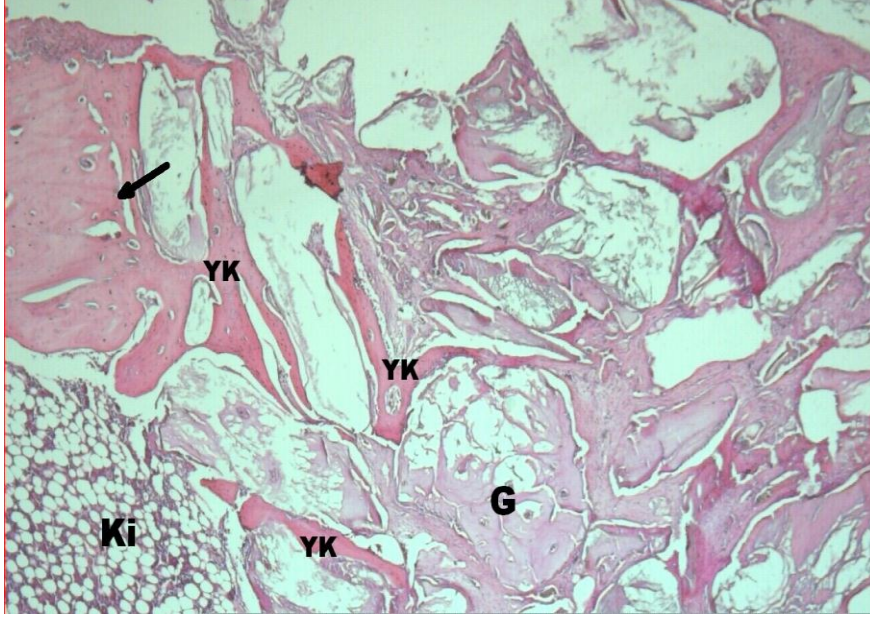
#### 4.1.4. Dördüncü Grup

Bu gruptaki örneklerde kemik iliğine ait hematopoetik hücreler dışında inflamatuvar hücre varlığı saptanmamıştır. Çok küçük serbest kanama alanları izlenmiştir. Defekt kenarlarından başlamak üzere hemen hemen tüm defektlerin içerisini kapsayan matür ve lamellar yapıda yeni kemik formasyonu dikkati çekmiştir (Resim 22). Sadece bir örnekte yüzeyde tek tük mikroorganizma kolonisi görülmüştür. Örneklerin hiçbirinde inflamasyon ve endosteal kemik formasyonu izlenmemiştir.



**Resim 22: Defekt sınırlarından (Oklar) itibaren defekt tavanı tamamen yeni kemik (YK) ile dolmuştur (x20, HE) (4 B - Grubu).**

Greft uygulanan örneklerde yavaş yavaş greft partiküllerinin rezorbe olmaya başladığı görülmüştür. Rezorbe olmamış partiküller ve çevresinde yeni kemik formasyonu izlenmemiştir (Resim 23). Bu örneklerin hiçbirinde yabancı cisim reaksiyonu saptanmamıştır. Bazı örneklerde partiküllerin çevresinde genç bağ doku ve yeni kemik dokusu izlenmiştir. Greft uygulanmayan örneklerde yeni kemik formasyonunun greft uygulanan örneklere kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür.



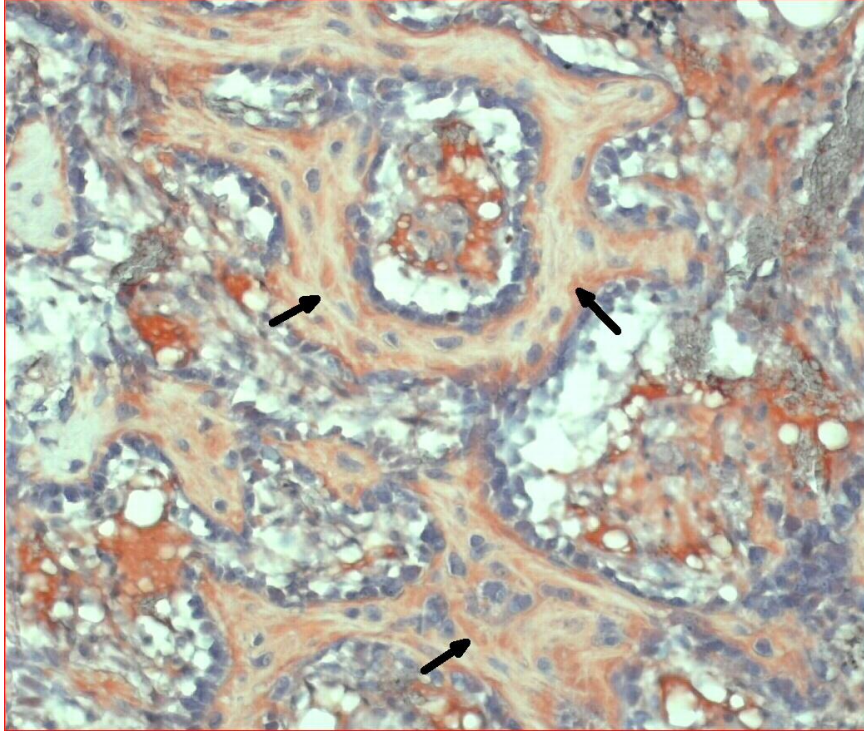
Resim 23: Defekt sınırında (Ok) ve greft partikülleri (G) etrafındaki yeni kemik oluşumu (YK) ve kemik iliği (Ki) görünümü (x40, HE) (4A + Grubu).

## 4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

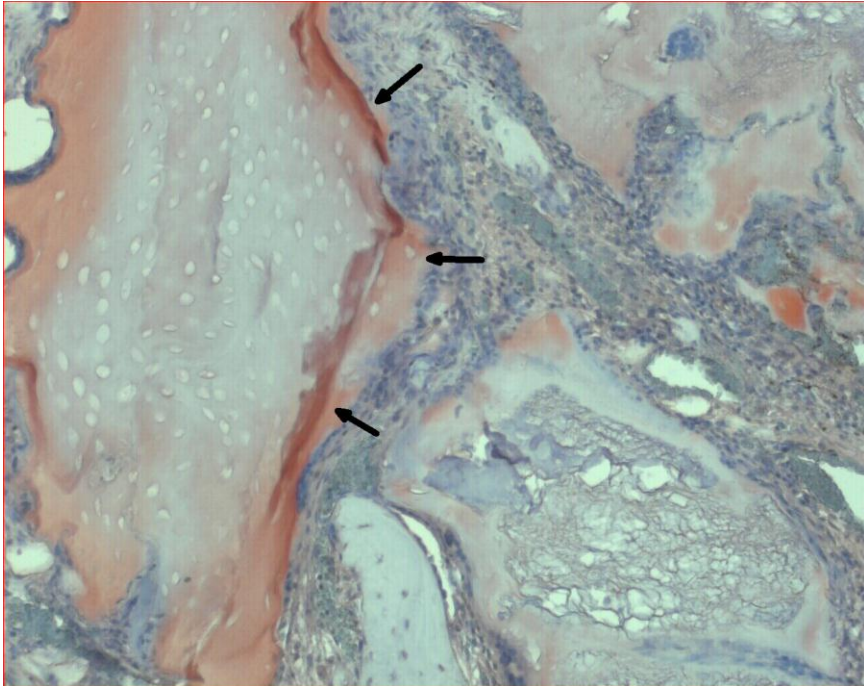
Örnekler, VEGF ve OC ekspresyonu açısından incelenmek üzere immünohistokimyasal olarak analiz edilmiştir.

### 4.2.1. Osteokalsin

OC ekspresyonu yeni yapılan osteoid matriks etrafında dizelenen osteoblastlarda sitoplazmik olarak izlenmiştir. (Resim 24) Aynı zamanda kalsifiye olmaya başlamış kemik matriks üzerinde de ekstraselüler olarak pozitiflikler izlenmiştir. Osteoblastik aktivitenin arttığı greft partikülleri çevresinde, OC pozitifliğinde artış görülmüştür. (Resim 25)



**Resim 24: Yeni üretilmiş kemik matrisinde ekstraselüler OC pozitifliği (Oklar). (x200, ABC)(2B + Grubu).**



**Resim 25: Greft partikülleri çevresinde görülen OC pozitifliği (Oklar) (x200, ABC) (3 A + Grubu)**

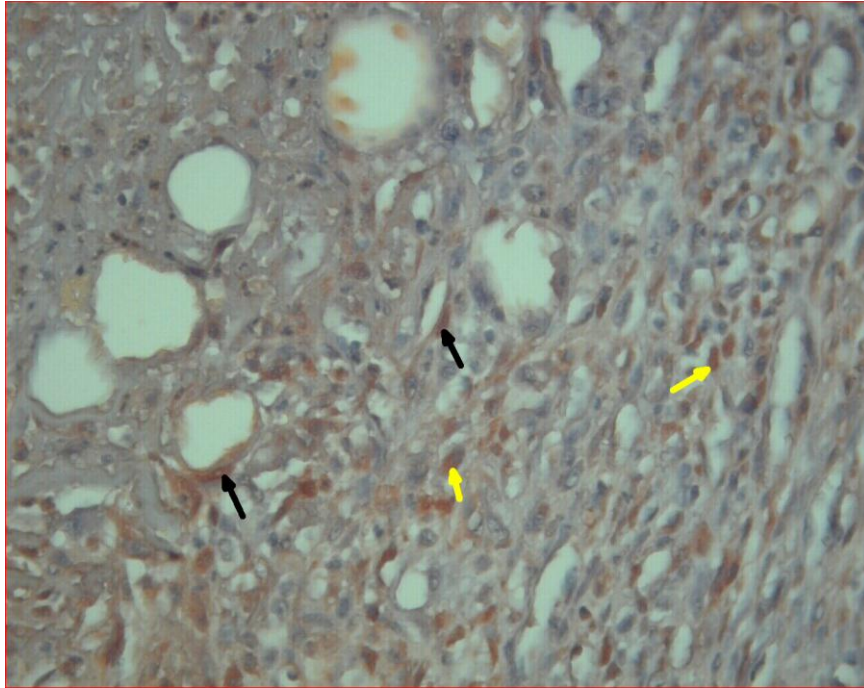


Gruplar arasında boyanma yoğunluğu arasındaki fark değerlendirildiğinde, 4. Gruba ait örneklerde selüler boyanma azalmış ancak kemik matrisi üzerindeki pozitiflik artmıştır.

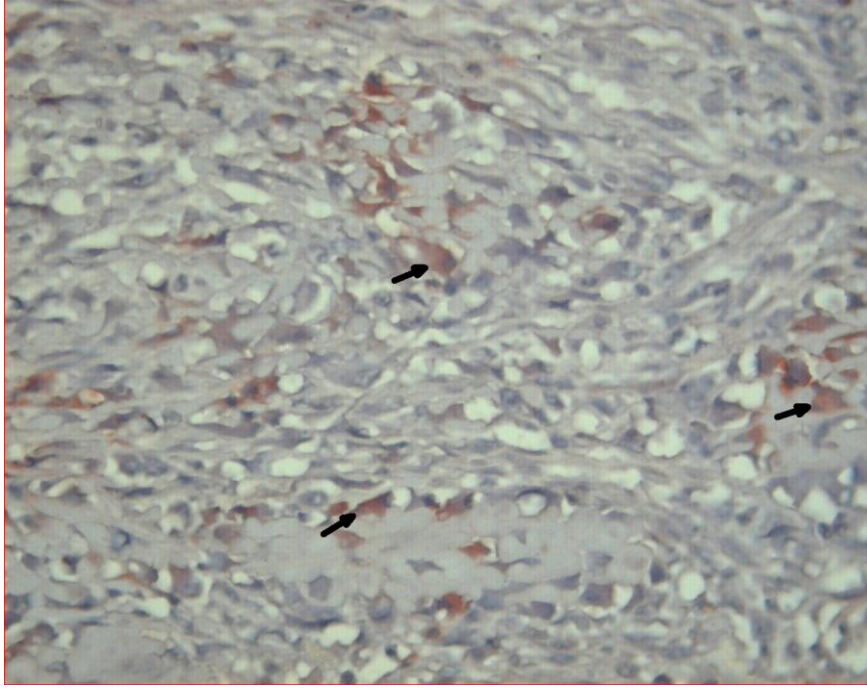
#### 4.2.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

Yapılan boyamalarda yoğunlukları değişmekle birlikte tüm örneklerde VEGF pozitifliği saptanmıştır.

VEGF pozitifliği beklendiği gibi kapilleri döşeyen endotellerde, bağ dokusu fibroblastlarında (Resim 26) ve birkaç osteoblastta (Resim 27) izlenmiştir. Kullanılan kromojene göre kırmızı, kahverengi sitoplazmik ve nükleer boyanmalar pozitif olarak değerlendirilmiştir.



**Resim 26: VEGF eksprese eden endotel hücreleri (Siyah oklar) ve bağ dokusu fibroblastları (Sarı oklar) (x400, ABC) (3B + Grubu).**



**Resim 27: VEGF pozitif boyanmış osteoblastlar (Okular) (x400, ABC) (2B + Grubu).**

Gruplar arasında boyanma yoğunluğu arasında belirgin bir fark izlenmemiştir. Ancak 1. ve 2. gruba ait örneklerde, VEGF ekspresyonunun daha fazla olması, granülasyon dokusunun ve dolayısıyla damarlanmanın daha fazla olduğunu göstermiştir. Gruplar arasında ABS kullanılan örnekler ile kullanılmayan örnekler arasında VEGF ekspresyonu açısından farklılık izlenmemiştir.

#### **4.3. İstatistiksel Sonuçlar**

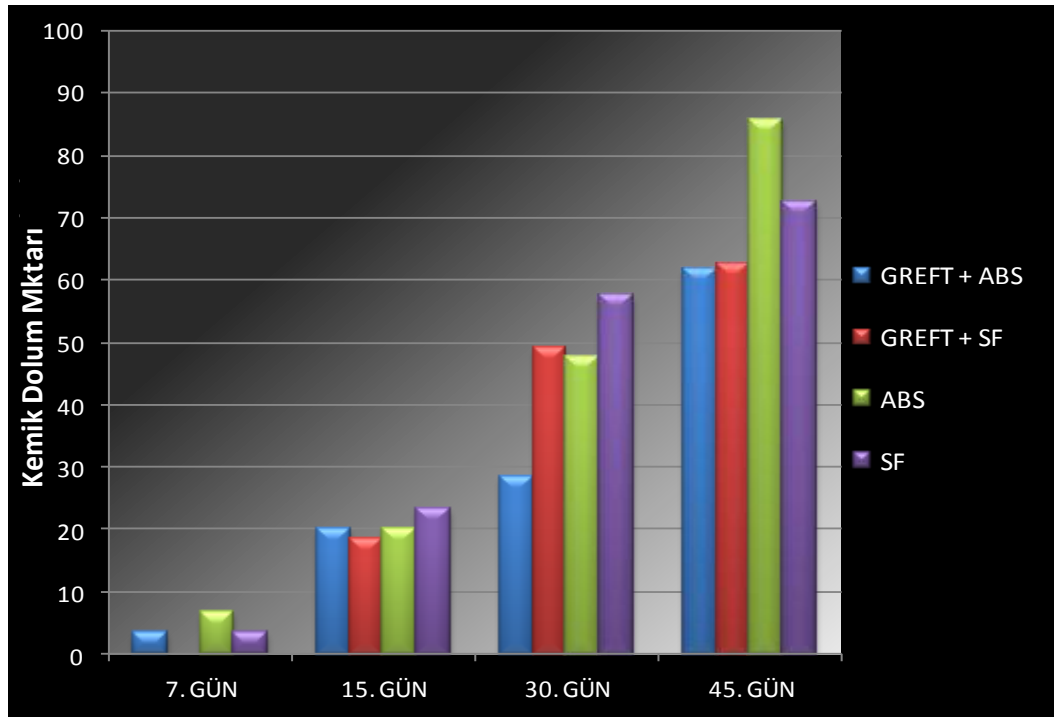
Yapılan histomorfometrik ve immünohistokimyasal analizler sonucunda elde edilen verilerin anlamlılığı istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

### 4.3.1 Yeni Oluşan Kemik Dokunun Değerlendirilmesi

Histopatolojik incelemede yeni oluşan kemik dokunun, defekt alanının bütününe göre oranı göze alınarak skora yapılmıştır. Yeni kemik dolun miktarı verilerinin gruplara göre dağılımı Tablo-2 ve Grafik-1' de gösterilmiştir.

Tablo 2: Yeni oluşan kemik dokusu verilerinin gruplara göre dağılımı.

	GREFT+ABS	GREFT+SF	ABS	SF
1. GRUP	3.333±3.3333 (0 – 20.0)	0.000 (0 – 0)	6.667±6.6667 (0 -40.0)	3.333±3.3333 (0 – 20.0)
2. GRUP	20.000±11.2916 (0 – 50.0)	18.333±7.9232 (0 – 55.0)	20.000±10.000 (0 – 60.0)	23.333±11.9490 (0 – 70.0)
3. GRUP	28.333± 10.2198 (0 – 55.0)	49.167±12.2758 (5.0 – 85.0)	47.500±15.2616 (0 – 90.0)	57.500±16.1116 (0 – 100.0)
4. GRUP	61.667± 5.8689 (40.0 – 75.0)	62.500± 8.7321 (40.0 – 100.0)	85.833±2.3863 (80.0 – 95.0)	72.500±13.4629 (15.0 – 100.0)



Grafik 1: Kemik Dolun Miktarının Gruplara Göre Dağılımı.

Veriler incelendiğinde beklenildiği gibi yeni oluşan kemik dokusu miktarının sakrifikasyon günleriyle doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir:

Kemik dolum miktarı sakrifikasyon günleri açısından değerlendirildiğinde 4 grup arasında anlamlı fark bulunmuştur. ( $p= 0,000<0,05$  Kruskal Wallis)

1. grup ile 2. gruptaki yeni kemik dolum miktarları karşılaştırıldığında, 2. gruptaki kemik dolum miktarının, 1. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $p= 0,001<0,05$  Mann Whitney U Testi).

2. grup ile 3. gruptaki yeni kemik dolum miktarları karşılaştırıldığında, 3. gruptaki kemik dolum miktarının, 2. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $p= 0,006<0,05$  Mann Whitney U Testi).

3. grup ile 4. gruptaki yeni kemik dolum miktarları karşılaştırıldığında, 4. gruptaki kemik dolum miktarının, 3. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $p=0,010<0,05$  Mann Whitney U Testi).

ABS' nin kemik iyileşmesine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla dört grup kendi içinde kemik dolum miktarı açısından istatistiksel

olarak değerlendirildiğinde gruplar arasından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$  Mann Whitney U Testi).

#### 4.3.2. İnflamasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi

Yapılan histopatolojik incelemede, defekt alanlarındaki inflamatuvar hücreler sayılarak skorlama yapılmıştır (Tablo 3). Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 3: İnflamasyon Skorlarının Gruplara Göre Yüzdesele Dağılımı.**

GRUPLAR	İNF. YOK		HAFİF		ORTA		ŞİDDETLİ	
	0		1		2		3	
	n	%	n	%	n	%	n	%
1 A (+)	4	66.6	2	33.3	0	0.0	0	0.0
1 A (-)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
1 B (+)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
1 B (-)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
2 A (+)	1	16.6	4	66.6	1	16.6	0	0.0
2 A (-)	2	33.3	0	0.0	4	66.6	0	0.0
2 B (+)	2	33.3	4	66.6	0	0.0	0	0.0
2 B (-)	2	33.3	2	33.3	2	33.3	0	0.0
3 A (+)	4	66.6	2	33.3	0	0.0	0	0.0
3 A (-)	1	16.6	4	66.6	1	16.6	0	0.0
3 B (+)	3	50.0	3	50.0	0	0.0	0	0.0
3 B (-)	2	33.3	3	50.0	1	16.6	0	0.0
4 A (+)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
4 A (-)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
4 B (+)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0
4 B (-)	6	100	0	0.0	0	0.0	0	0.0

24 adet tavşana açılan 96 adet kemik defekti, sakrifikasyon günleri ve greft kullanımı göz önüne alınmadan sadece ABS uygulanan ve uygulanmayan defektler olarak iki gruba ayrılarak incelenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda ABS uygulanan defektlerdeki inflamasyon düzeyinin, ABS uygulanmayan defektlerdeki inflamasyon düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ( $p= 0,031 < 0,05$  ki kare testi).

Açılan 96 defekt kemik greft materyali yerleştirilip yerleştirilmemesi açısından iki gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Yapılan istatistiksel inceleme sonucunda iki grup arasında inflamasyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p= 0,565 > 0,05$  ki kare testi)

Greft materyali yerleştirilmiş 48 defekt ABS uygulanıp uygulanmaması açısından iki gruba ayrılarak, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde iki grup arasında inflamasyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p= 0,135 > 0,05$  ki kare testi).

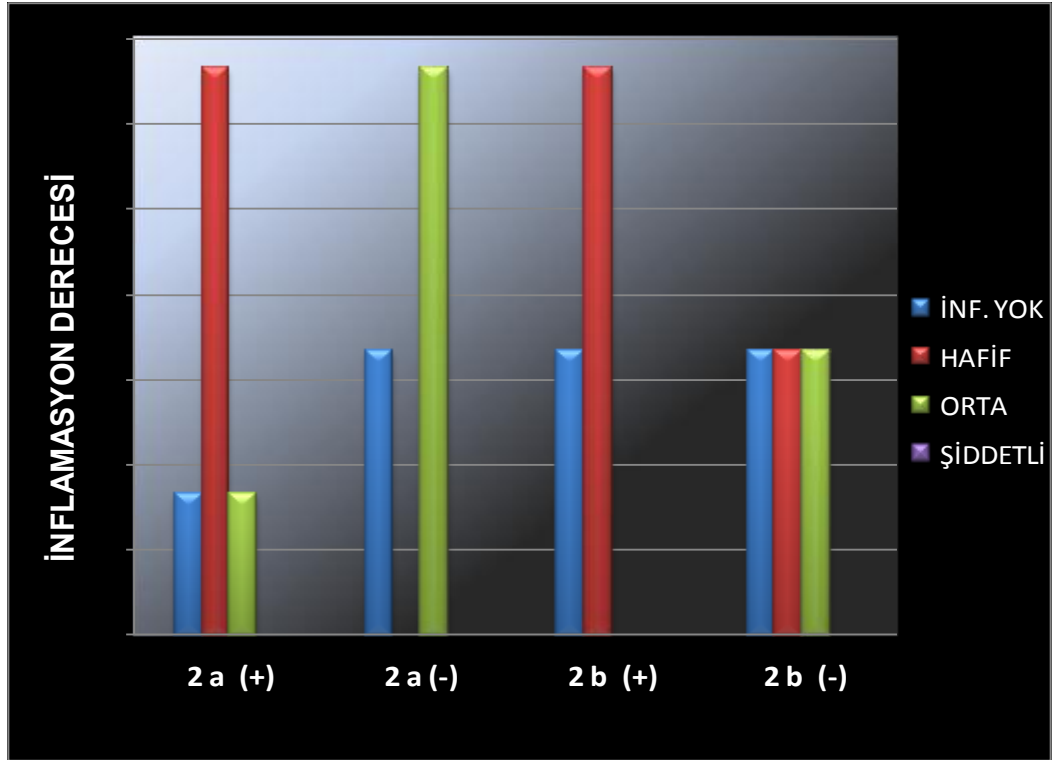
Greft materyali yerleştirilmemiş 48 defekt ABS uygulanması açısından iki gruba ayrılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda iki grup arasında inflamasyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p= 0,186 > 0,05$  ki kare testi).

Gruplar içerisinde, ABS kullanımının inflamasyon düzeyine olan etkileri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda 1., 3., ve 4. Gruplarda ABS uygulanan defektler ile ABS

uygulanmayan defektler karşılaştırıldığında inflamasyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

2. grupta yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda ABS uygulanan defektlerdeki inflamasyon düzeyinin, ABS uygulanmayan defektlerdeki inflamasyon düzeyine göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ( $p=0,026 < 0,05$  ki kare testi).

Yine 2. grup içerisindeki 2A (+) grubu ile 2A (-) grubu inflamasyon düzeyi açısından karşılaştırıldığında, 2A (+) grubundaki inflamasyon düzeyinin anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ( $p=0,047 < 0,05$  ki kare testi). (Grafik 2)



Grafik 2: 2. Grup İnflamasyon Düzeyi Grafiği.

### 4.3.3. Endosteal Kemikleşme Düzeyi

Yapılan histopatolojik değerlendirmede, defekt bölgelerindeki endosteal kemikleşme düzeyleri skorlanmıştır. Elde edilen veriler yüzdesel ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Endosteal kemikleşme düzeylerinin gruplara göre yüzdesel dağılımı Tablo- 4' te gösterilmiştir.

**Tablo 4: Endosteal Kemikleşme Skorlarının Gruplara Göre Yüzdesel Dağılımı.**

Endosteal Kemikleşme Skorları	0		1		2		3	
	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Gruplar</b>								
1 A (+)	0	0.0	5	83.3	1	16.6	0	0.0
1 A (-)	3	50	3	50	0	0.0	0	0.0
1 B (+)	2	33.3	4	66.6	0	0.0	0	0.0
1 B (-)	5	83.3	0	0.0	1	16.6	0	0.0
2 A (+)	3	50	0	0.0	3	50	0	0.0
2 A (-)	3	50	1	16.6	2	33.3	0	0.0
2 B (+)	4	66.6	0	0.0	2	33.3	0	0.0
2 B (-)	5	83.3	0	0.0	1	16.6	0	0.0
3 A (+)	1	16.6	5	83.3	0	0.0	0	0.0
3 A (-)	4	66.6	1	16.6	1	16.6	0	0.0
3 B (+)	1	16.6	3	50.0	2	33.3	0	0.0
3 B (-)	5	83.3	0	0.0	1	16.6	0	0.0
4 A (+)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
4 A (-)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
4 B (+)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
4 B (-)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0



Toplam açılan 96 defekt, ABS uygulanan defektler ve ABS uygulanmayan defektler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda ABS uygulanan defektlerdeki endosteal kemikleşme düzeyi, ABS uygulanmayan defektlerdeki endosteal kemikleşme düzeyine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,006 < 0,05$  ki kare testi).

Çalışmada yer alan gruplar incelendiğinde ise;

1. grup içerisinde ABS uygulanan defektlerdeki endosteal kemikleşme düzeyi, ABS uygulanmayan defektlerdeki endosteal kemikleşme düzeyine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,037 < 0,05$  ki kare testi). Ayrıca 1B (+) grubundaki endosteal kemikleşme miktarı 1 B (-) grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p= 0,043 < 0,05$  ki kare testi).

2. grup içerisinde ABS uygulanan ile uygulanmayan defektler arasında endosteal kemikleşme düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p= 0,457 > 0,05$  ki kare testi).

3. grup içerisinde ABS uygulanan defektlerdeki endosteal kemikleşme düzeyi, ABS uygulanmayan defektlerdeki endosteal kemikleşme düzeyine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,007 < 0,05$  ki kare testi).

4. grup içerisindeki hiçbir defekte endosteal kemikleşme saptanmamıştır.

#### 4.3.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal inceleme yapılırken pozitif boyanan hücreler ve alanların oranı değerlendirilerek skora yapılmıştır. (Tablo 5).

Tablo 5: İmmünohistokimyasal Değerlendirme Skorlarının Gruplara Göre Dağılımı.

GRUPLAR \ SKORLAR	VEGF				OC			
	0	1	2	3	0	1	2	3
1 A (+)	0	4	2	0	1	3	1	1
1 A (-)	1	4	1	0	0	3	2	1
1 B (+)	2	3	1	0	2	2	1	1
1 B (-)	4	2	0	0	2	2	2	0
2 A (+)	1	3	2	0	0	2	2	2
2 A (-)	1	5	0	0	0	5	1	0
2 B (+)	1	4	0	1	0	3	1	2
2 B (-)	3	3	0	0	1	5	0	0
3 A (+)	1	2	3	0	1	3	1	1
3 A (-)	1	5	0	0	0	5	0	1
3 B (+)	2	1	1	2	1	1	3	1
3 B (-)	1	3	2	0	0	3	3	0
4 A (+)	2	1	3	0	0	3	2	1
4 A (-)	3	3	0	0	0	1	5	0
4 B (+)	0	3	3	0	0	2	1	3
4 B (-)	2	3	1	0	1	4	1	0

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda;

- ◆ Açılan 96 defekt VEGF ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında; ABS uygulanan defektlerdeki VEGF ekspresyonunun, ABS uygulanmayan defektlere göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $p= 0.006 < 0.05$  ki kare testi)
  
- ◆ Açılan 96 defekt OC ekspresyonu açısından karşılaştırıldığında ABS uygulanan gruptaki OC ekspresyonunun, ABS uygulanmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ( $p= 0.031 < 0.05$  ki kare testi)
  
- ◆ Açılan 96 defekt greft materyali uygulanan ile greft materyali uygulanmayan olarak iki gruba ayrıldığında, gruplar arasında VEGF ve OC ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$  ki kare testi).
  
- ◆ Çalışmadaki alt gruplar kendi içerisinde, ABS ve kemik greftinin VEGF ve OC ekspresyonu üzerine olan etkileri açısından karşılaştırıldığında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$  ki kare testi).

## 5. TARTIŞMA

Travma, enfeksiyon, tümör rezeksiyonu, gelişimsel ya da konjenital malformasyonlara bağlı olarak, diş çekimi, apikal rezeksiyon ya da kist enükleasyonu operasyonları sonrası, oral ve maksillofasiyal bölgede meydana gelen kemik defektlerinin onarımı rekonstrüktif cerrahi için büyük bir problemdir.<sup>138, 139</sup> Oral kavitede meydana gelen kemik defektleri protetik rehabilitasyonu ve dental implant uygulamalarını zorlaştırmaktadır.<sup>140</sup>

Kemik defektlerinin onarım sürecini hızlandırarak tedavi sürecini kısaltmak böylelikle hasta konforunu arttırmak amacıyla birçok çalışma yapılmış ve halen yapılmaya devam edilmektedir.<sup>140, 141</sup> Bu çalışmada Oral ve maksillofasiyal cerrahide sıklıkla karşılaşılan problemlerden olan kemik defektleri ve kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu konusu ele alınmıştır.

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda yıllardır başarıyla kullanılmakta olan kemik greftleri, defekte destek olan ve biyolojik onarımı hızlandıran materyallerdir.<sup>142</sup> Her yıl dünya çapında yaklaşık 2.2 milyon kemik grefti uygulaması gerçekleştirilmektedir.<sup>142, 143</sup>

Otojen kemik greftleri osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik özelliklerin tümünü içeren tek greft materyali olması sebebiyle günümüzde halen “altın standart” olarak değerlendirilmektedir.<sup>138, 144, 145</sup> Osteojenik özelliğe sahip olduklarından dolayı konak dokuda kemik formasyonunu direkt olarak osteoblastlar üzerinden stimüle ederler. Otojen kansellöz kemik greftlerinde revaskülarizasyon günde yaklaşık 1 mm

oluşmakta ve ortalama 2 haftada tamamlanmaktadır. Otojen kortikal kemik greftlerinde ise revaskülarizasyon 2 aydan daha uzun bir sürede tamamlanmaktadır.<sup>145</sup> Otojen kemik greftleri, şiddetli atrofik dişsiz alveol kretlerin augmentasyonu, damak yarıklı hastaların alveol defektlerinin onarımı ve tümör cerrahisi ya da travma sonrası meydana gelen defektlerin rekonstrüksiyonu gibi pek çok alanda yıllardır kullanılmaktadır.<sup>146</sup>

Otojen kemik greftlerinin kullanımının ikinci bir cerrahi alan oluşturulması, operasyon zamanının uzaması, kanama miktarının artması, donör saha komplikasyonları riskinin bulunması ve yeterli miktarda kemik grefti alınamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır.<sup>45</sup> Otojen kemik grefti alınan donör sahada ciddi morbidite ve komplikasyonlar görülebilmektedir. Bu komplikasyonlar greft alınan bölgeye göre değişmekle birlikte majör ve minör komplikasyonlar olarak değerlendirilebilir. Küçük çaplı hematomlar, yüzeysel enfeksiyonlar, ve seromalar gibi minör komplikasyonların görülme sıklığı % 3.1 ile % 39 arasında değişmektedir. En fazla karşılaşılan minör komplikasyon donör sahada hiperestezi, dizestezi ya da hipoestezi şeklinde his değişiklikleridir. Direkt olarak yapılan yumuşak doku diseksiyonu miktarı ile ilişkili olan bu komplikasyon hastaların % 10 ila % 25' inde görülebilmektedir.<sup>147</sup>

Otojen kemik greftlerinin dezavantajları ve kullanımının yol açtığı komplikasyonlar araştırmacıları alternatif greft materyalleri kullanımına yönlendirmiştir.<sup>146, 148</sup>

Ksenojenik kemik greftleri 1960'larda yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ancak sığır kemik greftlerinin transplantasyonu

sonrası hastalarda ortaya çıkan immün hastalıklar nedeniyle popülaritesini kaybetmiştir. Kemik partiküllerinin deproteinize edilmesiyle antijinitesi azaltılan ve böylece konak doku tarafından tolere edilmesi sağlanan ksenojenik kemik greftleri, 1990'larda tekrar kullanılmaya başlanmıştır.<sup>149</sup> Doğal hayvan dokularından elde edilmesi sebebiyle osteokondüktif özellikleri yüksek olan ve elde edilmesi kolay olan ksenojenik greftler en sık kullanılan greft materyalleridir. Ksenojenik kemik greftlerinin klinik başarısı birçok çalışma tarafından kanıtlanmış ve kullanımı doktorlar ve hastalar tarafından geniş kabul görmüştür. Ancak yüksek maliyet ve üretim sürecinin uzun olması gibi dezavantajları bulunmaktadır.<sup>150</sup>

Riachi ve arkadaşları<sup>151</sup>, Mannai<sup>152</sup>, Papa ve arkadaşları<sup>153</sup>, Kim ve arkadaşları<sup>154, 155</sup> ve Rickert ve arkadaşları<sup>156</sup> yaptıkları çalışmalarda maksiller sinüs lift operasyonlarında, ksenojenik kemik greftlerini kullanmışlar ve olumlu sonuçlar aldıklarını bildirmişlerdir.

Baldini ve arkadaşları<sup>157</sup> ksenojenik kemik greftlerini periodontal defektlerin onarımı, çekim soketlerinin doldurulması, peri-implant bölgesi rekonstrüksiyonu ve alveoler kret augmentasyonu gibi çeşitli operasyonlarda kullanarak başarılı sonuçlar elde etmişlerdir.

Heineman ve arkadaşları<sup>158</sup> yaptıkları klinik çalışmada çekim kavitelerine yerleştirdikleri ksenojenik kemik greftinin, vertikal kemik boyutundaki değişimlere olan etkisini değerlendirmişlerdir. Ksenojenik greft materyali yerleştirdikleri soketlerdeki vertikal kemik boyutu kaybının, kontrol grubuna göre daha az olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar biyouyumlu olmaları, alıcı bölgeye kolayca adapte olmaları, diğer greft materyalleri ile kombine edilerek kullanılabilmeleri ve postoperatif komplikasyon oranlarının çok düşük olması gibi nedenlerle ksenojenik kemik greftlerinin Oral ve maksillofasial Cerrahi pratiğinde güvenle kullanılabileceğini bildirmektedirler.<sup>155</sup>

Bu çalışmada da; deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda klinik kullanımı çok yaygın olan ve literatürde yer alan birçok çalışmada çeşitli dentoalveoler cerrahi proseüdürlerinde başarıyla kullanılan ksenojenik kemik grefti kullanılmıştır.

Kemik defektlerindeki iyileşmenin hücrenel anlamda incelenmesinin daha anlamlı olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır. Ancak histopatolojik ve immünohistokimyasal analiz için kemik dokudan biyopsi alınması gerekmektedir. İnsanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda biyopsi alınması etik olarak uygun görülmemektedir. Bu nedenle, bu alandaki araştırmalarda deneysel hayvan çalışmalarının yapılması daha fazla kabul görmektedir.<sup>159</sup>

Deneysel kemik defekti modeli oluşturulan birçok çalışmada deney hayvanları kullanılmaktadır. Schortinguis ve arkadaşları<sup>160</sup> rat mandibulasında, Zwingerberger ve arkadaşları<sup>161</sup>, He ve arkadaşları<sup>162</sup> fare femurunda, Shirasu ve arkadaşları<sup>163</sup>, Toker ve arkadaşları<sup>164, 165</sup> rat kalvaryasında, Bayat ve arkadaşları<sup>166</sup> kedi maksillasında, Klaue ve arkadaşları<sup>167</sup> koyun femurunda oluşturdukları kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunu konu aldıkları çalışmaları yayınlamışlardır.

Bu çalışmada yukarıda bahsedilen çalışmalara paralel olarak çalışma koşullarının uygun olması, barındırma ve bakım şartlarının kolay olması ve literatürde karşılaştırma yapılabilecek benzer çok sayıda çalışmanın bulunması sebebiyle kemik içi defekt modeli oluşturmak amacıyla deney hayvanı olarak tavşan kullanılmıştır. Ayrıca yüksek kemik metabolizma hızına sahip olmalarından dolayı tavşanlarda kemik iyileşmesi çok kısa sürede tamamlanmaktadır. Bu özellikleri çalışma süresinin kısa tutulabilmesine olanak sağlamaktadır.<sup>168</sup>

Haugen ve arkadaşları<sup>169</sup>, Chung ve arkadaşları<sup>170</sup>, Karunratanakul ve arkadaşları<sup>171</sup>, Casap ve arkadaşları<sup>172</sup> tavşan tibiasında, Zhang ve arkadaşları<sup>150, 173</sup> tavşan femurunda ve mandibulasında, Borie ve arkadaşları<sup>174</sup>, Cavalcanti ve arkadaşları<sup>175</sup>, Min ve arkadaşları<sup>176</sup>, Behnia ve arkadaşları<sup>177</sup> tavşan kalvaryasında yaptıkları çalışmalarda kemik içi defektlerin rekonstrüksiyon yöntemlerini konu almışlardır.

Araştırmacılar defekt oluşturmaya uygun, geniş, düzgün ve konveks bir yüzeye sahip olması, kas yapışıklıklarının az olmasına bağlı olarak kemik dokuya ulaşımın kolay olması gibi nedenlerden dolayı kemik içi defektlerin konu alındığı çalışmalarda tavşan tibiasının uygun bir model olduğunu bildirmişlerdir.<sup>178</sup> Bu çalışmada literatürde yer alan birçok çalışmaya benzer olarak kemik içi defekt modeli oluşturmak için tavşan tibiası kullanılmıştır.

1986 yılında Schmitz ve Hollinger<sup>179</sup> kritik boyutlu defekti (KBD) “ Herhangi bir materyal kullanılmadan hayat boyu spontan olarak



iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası” olarak tanımlamıştır.

1988 yılında Dahlin ve arkadaşlarının<sup>180</sup> yaptıkları çalışmada tavşan tibiasında KBD çapı 5mm olarak saptanmıştır. 1994 yılında ise Aaboe ve arkadaşları<sup>181</sup> Kopenhag beyaz tavşan tibiasında unikortikal KBD çapının 8 mm’ den fazla olduğunu bildirmişlerdir. Ancak aynı çalışmada Kopenhag beyaz tavşan tibiasında anatomik olarak 8 mm’ den geniş bir defektin oluşturulmasının mümkün olmadığını ifade etmişlerdir.

Wohlfahrt ve arkadaşları<sup>182</sup> yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında tavşan tibiasındaki KBD çapını 3 mm olarak bildirmişlerdir.

Veis ve arkadaşları<sup>183</sup> yaptıkları çalışmada beyaz Yeni Zelanda tavşanı tibiasında 6 mm çapında kemik içi defekt oluşturmuşlar ve kontrol grubundaki defektlerin tamamen iyileştiğini bildirmişlerdir. Yazarlar tavşan tibia çapının ortalama 8 mm olduğunu ve büyük çaplı defekt oluşturmanın fraktürlere neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Cacchioli ve arkadaşları<sup>178</sup> tavşan tibiasında açılacak 8 mm çapındaki bir defektin özellikle genç tavşanlarda anatomik yapıya bağlı olarak fraktürlere neden olacağını bildirmişlerdir.

Lee ve arkadaşları<sup>184</sup> yaptıkları deneysel çalışmada, bizim çalışmamıza benzer olarak, tavşan tibialarına 2 adet sağ tibiada, 2 adet

sol tibiada olmak üzere 3.5 mm çapında 4 adet kemik defekti oluşturmuşlardır.

Walsh ve arkadaşları<sup>185</sup> tavşan tibialarında bilateral olarak iki adet 5 mm çapında kemik defekti açarak yerleştirdikleri çeşitli greft materyalleri ile birlikte kemik iyileşmesini değerlendirmişlerdir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalar incelenerek ve tavşan tibia anatomisi göz önüne alınarak bu çalışmada kemik içi defekt modeli oluşturmak amacıyla 24 adet beyaz Yeni Zelanda tavşanında 5 mm çapında sağ ve sol tibialarda ikişer adet olmak üzere toplam 4 adet kemik defekti açılmıştır. Tibiada açılan iki defektin kemik yapısının zayıflamasına neden olacağı düşünülerek olası fraktür riski ve buna bağlı olarak meydana gelebilecek hayvan kayıplarına sebebiyet vermemek açısından defekt çapı 5 mm olarak planlanmıştır.

ABS, içeriğinde Glycrrhiza Glabra (Meyan), Vitis Vinifera (Koruk), Alphina Officinarum' un (Havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstreleri, Urtica Dioica' nın (Isırgan) kurutulmuş kök ekstresi ve Thymus Vulgaris' in (Kekik) kurutulmuş ot ekstresi bulunduran, Türk tıbbında hemostatik ajan olarak kullanılan ilk tıbbi bitki ekstratıdır.<sup>16-21, 23</sup>

ABS, fibrinojen başta olmak üzere plazma ve serumda bulunan kan proteinleri ile eritsositlerden oluşan bir "Protein ağı" meydana getirir. Bu protein ağı enkapsüle yapıdadır ve 1 saniyeden daha kısa bir sürede oluşmaktadır.

ABS' nin, damar endoteli, kan hücreleri, anjiogenez ve hücre proliferasyonu üzerine etkileri olduğu bildirilmektedir.<sup>23</sup> İçeriğinde bulunan bitkilerin sahip oldukları etkiler:

- Antianjiyojenik aktivite,
- Antiinflamatuvar etki,
- Antitrombotik, antioksidan ve antiaterosklerotik etkiler,
- Kan basıncında yükselme,
- Antitümoral etki,
- Endotelyal hipotansif etkilerdir. <sup>23, 67-70, 72, 73</sup>

ABS, Mayıs 2007' de T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü tarafından eksternal kanamaların kontrolünde kullanılmak üzere ara ürün olarak ruhsatlandırılmıştır. Acil Servis ve 112 İlk Yardım ambulanslarında da rutin kullanıma girmiştir.

ABS' nin lokal hemostatik ajan olarak kanama durdurmadaki etkinliği, literatürdeki birçok çalışmada bildirilmiştir. <sup>19, 21, 24, 186-190</sup>

İçeriğindeki bitkilerin endotel, kan hücreleri, damar oluşumu, hücresel proliferasyon, vasküler dinamikler ve mediyatörler üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu etkileri göz önüne alınarak, ABS' nin olası diğer etkilerini araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaya devam etmektedir.

ABS' nin antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada, antibiyotiğe dirençli nazokomiyal enfeksiyonların etkenleri olan

aralarında Metisiline Dirençli Staphylococcus Aureus (MRSA), Escherichia Coli ve Pseudomonas Aeruginosa' nın da bulunduğu 102 mikroorganizma üzerinde çalışılmıştır. ABS' nin çalışmada kullanılan bütün mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir.<sup>191</sup> Antifungal etkisinin de araştırıldığı bir çalışmada ise ABS' nin antifungal etkisinin olmadığı saptanmıştır.<sup>20</sup>

ABS'nin yara iyileşmesi üzerine olan etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, 80 yaşındaki kadın hastada travmaya bağlı olarak gelişen yumuşak doku laserasyonu üzerine ABS uygulanmıştır. 24 saat sonra yapılan kontrolde yara ağzının kapanmaya başladığı tespit edilmiştir. ABS' nin yara iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir.<sup>192</sup>

Özaslan ve arkadaşları<sup>193</sup>, serviks kanseri nedeniyle aldığı radyoterapi sonrası rektal kanama ve ciddi, nekroze alanlar içeren radyasyon koliti gelişen 71 yaşındaki kadın hastaya, ABS uyguladıkları bir vaka raporu yayımlamışlardır. Uygulamadan birkaç saniye sonra kanamanın durduğunu, daha sonra yapılan kontrolde ise geniş ülser lezyonun neredeyse tamamının iyileştiğini gözlemlemişlerdir. Yazarlar, kolay uygulanabilir olması, etki süresinin kısalığı, toksik olmaması ve ucuz olması gibi avantajlarından dolayı radyasyon kolitinin tedavisinde ABS' nin kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Aktop ve arkadaşları<sup>194</sup> yaptıkları hayvan çalışmasında 24 adet ratın 12 tanesine sistemik Warfarin uygulamışlar, 12 tanesini kontrol grubu olarak kullanmışlardır. Ratların sırt derisine birbirlerinden 2 cm aralıklı, 2 cm uzunluğunda 3 adet bistüri insizyonu yapılmıştır. Yaralardan

birine kitosan, diğetine ABS uygulanırken diğeyaraya hiçbir hemostatik ajan uygulanmamıştır. Sonuç olarak her iki ajanın da kanama kontrolünde etkili olduğunu, ABS' nin özellikle makroskopik olarak klinik gözlemler açısından iyileşme üzerine olumlu etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan deneysel bir çalışmada ABS' nin karaciğere olan etkilerini araştırmak amacıyla 21 rat üç gruba ayrılarak, birinci gruptaki ratların karaciğerlerine SF, ikinci gruptaki ratların karaciğerlerine etanol, üçüncü gruptaki ratların karaciğerlerine ise eşit miktarlarda ABS enjekte edilmiştir. 5. gün sonunda sakrifiye edilen ratların karaciğerleri incelenmiştir. ABS uygulanan gruptaki nekroz oranı diğeyarulara oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yapılan histopatolojik incelemede sinüzoidal boşluklarda ve safra kanalında eritrosit agregasyonu saptanmıştır.<sup>195</sup>

Bu çalışmada da kemik greft materyali ile birlikte kullanımının kemik iyileşmesi ve inflamasyonu üzerine olan olası etkilerini araştırmak amacıyla tavşan tibialarında açılan kemik defektlerine ABS uygulanmıştır. Literatürde ABS' nin kemik greft materyali ile birlikte kullanımının kemik defektlerindeki iyileşme üzerine olan etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışma, bu alandaki ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmamızda ABS' nin etkileri hem histopatolojik hem de immünohistokimyasal analiz tekniğı ile incelenmiştir. Bu tekniğı tercih etmemizin nedenleri; özellikle doku morfolojisi ile antijenlerin lokalizasyonunu karşılaştırma imkanı sağlaması, bu teknik hakkında yeterli tecrübeye sahip olunması ve kolay uygulanabilir olmasıdır.

OC, çoğunlukla osteoblastlar tarafından üretilen, kalsiyum iyonlarına yapışma özelliğine sahip, küçük boyutta gama-karboksigliutamat proteindir. Kemikte en çok bulunan, non-kollajen kemik matriks proteindir.<sup>196</sup> OC' nin kemik içerisindeki görevi halen açıklanamamakla birlikte kemik mineralizasyonu ve kemik döngüsünü düzenleyici etkileri kesin olarak ortaya konulmuştur.<sup>119, 196</sup>

Serum OC düzeyinin, kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde alkalen fosfataz aktivitesine göre daha güvenilir ve hassas olduğu bildirilmektedir. OC' nin kemik dokudaki etkilerinin araştırıldığı in vitro ve in vivo çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bazı çalışmalar OC' nin, osteoblastları ve osteoklastik aktiviteyi etkileyerek kemik remodellingini düzenlediğini ortaya koymuştur. Bazı araştırmacılar ise OC'nin kemik formasyonunu arttırdığını ve hızlandırdığını bildirmişlerdir.<sup>196</sup> Yapılan in vivo bir çalışmada elde edilen sonuçlar OC' nin anjiyogenezisi stimüle ettiğini göstermiştir. Aynı çalışmada OC' nin kemik iyileşmesinde görev aldığı, burdan yola çıkarak OC'nin kemik formasyonunda da önemli bir yeri olduğu sonucuna ulaşılabileceği bildirilmiştir.<sup>197</sup>

Theyse ve arkadaşları<sup>198</sup> yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında OC' nin yeni kemik formasyonu sırasındaki etkinliğini araştırmışlardır. Çalışmada 12 adet köpeği üç gruba ayırmışlar, birinci gruptaki deneklerin tibialarına distraksiyon osteogenezisi operasyonu, ikinci gruptaki deneklerin ise tibia kemiğine osteotomi uygulamışlardır. Üçüncü gruptaki deneklere ise yalancı cerrahi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda birinci ve ikinci gruptaki postoperatif OC değerinin preoperatif OC değerine göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır. Ancak

çalışmanın hiçbir sürecinde gruplar arasında, OC plazma konsantrasyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Chaves ve arkadaşları<sup>199</sup> yaptıkları bir çalışmada 24 adet tavşana bilateral sinüs lift operasyonu uygulamışlardır. İki gruba ayırdıkları deneklerden, birinci gruptakilere otojen kemik grefti, ikinci gruptaki deneklere sığır kaynaklı kemik grefti yerleştirmişlerdir. Yaptıkları immünohistokimyasal inceleme sonucunda gruplar arasında OC ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptamamışlardır.

Paskalev ve arkadaşları<sup>200</sup> yaptıkları çalışmada deneysel olarak femoral kırık modeli oluşturdukları 6 adet köpekte serumdaki kemik markerlarının değişimlerini incelemişlerdir. Serum osteokalsin seviyelerinin osteosentez döneminde preoperatif döneme göre yükseldiğini ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir.

OC, hidroksiapatite bağlanabilen, osteoblastik aktivitenin düzenlenmesinde ve kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde görev alan, önemli bir proteindir. Kemik dönügüsünün arttığı durumlarda serum OC seviyesi de artmaktadır. Ayrıca anjiyogenezisi stimüle ettiği bildirilmektedir.<sup>200</sup>

Yaptığımız çalışmanın immünohistokimyasal analizi aşamasında, yukarıda bahsedilen özelliklerinden dolayı, OC antikoru ile çalışılmıştır. Ayrıca bu antikorun ekstraselüler bölgeyi de boyaması, greft partikülleri çevresindeki osteoblastik aktiviteyi göstermesi ve kalsifikasyon

odaklarının izlenebilmesini sağlaması gibi özellikleri de göz önüne alınmıştır.

VEGF, özellikle endotel hücrelerine özgün, önemli fonksiyonlara sahip birçok üyesi bulunan bir büyüme faktörü ailesidir. Bu ailenin VEGF- A, VEGF- B, VEGF- C, VEGF- D, VEGF- E, VEGF- F ve Plasental Büyüme Faktörü olarak isimlendirilmiş 7 üyesi bulunmaktadır. Başta VEGF-A olmak üzere ailenin tüm üyelerinin; vaskülogenez, anjiyogenez veya kemotaksi gibi vücutta meydana gelen birçok fizyolojik olayda ve kanser, neovasküler hastalıklar veya kronik inflamatuvar hastalıklar gibi çeşitli patolojik olaylarda rol almalarından ötürü son yıllarda oldukça popüler hale gelmiştir.<sup>201</sup> VEGF, anjiyogenezis sürecinde görev alan en önemli mediatördür.<sup>134, 202</sup> Ayrıca endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin her ikisinde birden rol almaktadır. Kondrosit ve osteoblast diferansiyasyonunu da içeren kemik gelişiminde etkilidir.<sup>134</sup>

VEGF, osteoblastların çeşitli fonksiyonlarıyla ilişkilidir. Yapılan çalışmalar VEGF'nin primer insan osteoblastları ve insan mezenşimal progenitör hücrelerine, doza bağımlı kemoatraktif etkisini göstermiştir. Ayrıca VEGF'nin osteoblast diferansiyasyonunda düşük düzeyde, mineralizasyon safhasında yüksek düzeyde eksprese olduğu bildirilmiştir.

Emad ve arkadaşları<sup>203</sup> yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında 18 adet tavşanın parietal kemiğinde 36 adet kemik defekti oluşturmuşlardır. 12 defekte demineralize kemik grefti + VEGF, 12 defekte sadece demineralize kemik grefti yerleştirmişlerdir. Kontrol grubunu oluşturan 12 defekt ise boş bırakılmıştır. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik değerlendirme sonucunda demineralize kemik grefti + VEGF



yerleştirilen gruptaki yeni kemik oluşunu diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Li ve arkadaşları<sup>204</sup> yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında üç gruba ayırdıkları 23 adet tavşanın tibiasında segmental kemik defekti oluşturmuşlardır. 1. gruptaki tavşanlara VEGF ve fibroblast, 2. gruptaki tavşanlara sadece fibroblast, 3.gruptaki tavşanlara ise salin uygulanmıştır. 1. gruptaki kemik iyileşmesinin diğer iki gruba göre anlamlı derecede daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır. Yazarlar hücre bazlı VEGF gen tedavisinin anjiyojenik ve osteojenik etkilerinin sonucu olarak uzun kemiklerdeki segmental defektlerin iyileşmesinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Tete ve arkadaşları<sup>205</sup> yaptıkları çalışmada, iliak krestten aldıkları kemik grefti ile çene kemiklerindeki defektleri onarmışlardır. Yaptıkları immünohistokimyasal analiz sonucunda operasyondan 4 ay sonra VEGF ekspresyonunun anlamlı derecede yükseldiğini saptamışlardır.

Reis- Filho ve arkadaşları<sup>206</sup> yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında bilateral maksiller ikinci molar dişlerini çektikleri 32 adet ratın çekim soketlerinden birine çekilen dişten elde ettikleri demineralize dentin grefti yerleştirmişler, diğer soketi ise boş bırakmışlardır. Yaptıkları histolojik, morfometrik ve immünohistokimyasal analizler sonucunda demineralize dentin grefti uyguladıkları soketlerdeki kemik iyileşmesinin daha hızlı ve VEGF ekspresyonunun ise daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Bu çalışmada ABS' nin kemik iyileşmesi, anjiyogenezis ve damar endoteli üzerine olan olası etkilerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi amacıyla VEGF antikoru ile çalışılmıştır. VEGF tercih etmemizin nedeni ise; endotel hücreleri için özgün etkilere sahip, anjiyogenezis ve vaskülogenezis gibi fizyolojik olaylarda görev alan önemli bir büyüme faktörü olmasıdır.

Kemik iyileşmesi genel olarak inflamatuvar dönem, tamir dönemi ve yeniden şekillenme dönemi olmak üzere 3 morfolojik evrede incelenmektedir. Histolojik olarak iyileşme sürecindeki evreler birbirinden zaman olarak kesin sınırlarla ayrılamamaktadır. Her evre daima kendinden önceki ya da sonraki evre içinde bulunmaktadır.<sup>50</sup>

İnflamatuvar evre kemik yapı ve çevre yumuşak dokuya gelen travma ile başlamakta, kartilaj ya da kemik doku oluşumunun başlamasına kadar devam etmektedir. Yaklaşık olarak 3-4 gün sürebilen inflamatuvar evre, travmanın şiddetine göre uzayabilmektedir.<sup>207</sup>

Kemik iyileşmesinin ikinci evresi olan tamir dönemi travmadan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi yaklaşık 10 gün sürmektedir.<sup>50</sup> Defekt bölgesindeki pıhtının oluşturduğu fibrin ağları ve fibroblastlardan salgılanan kollajenlerin meydana getirdiği genç granülasyon dokusuna, yaklaşık 1 hafta sonra osteoblast ve kondroblastların da gelmesiyle yumuşak fibröz kallus şekillenmektedir. Başlangıçta oluşan bu kallus yumuşak yapıdadır ve radyolojik olarak izlenememektedir. Yavaş yavaş ortama kalsiyum tozlarının da çökmesi sonucu ön kallus şekillenmektedir. Bu süreç yaklaşık 2- 3 hafta

sürmektedir. 4- 6 haftalık bir süre sonucunda oluşan kallus yerini kemiksi yapıdaki sert kallusa bırakmaktadır.<sup>52</sup>

Yeniden şekillenme dönemi, onarım döneminin ortasında, defektin kallus ile köprülendiği zaman başlamakta ve yıllar boyunca devam etmektedir.<sup>50, 52</sup>

Abedi ve arkadaşları<sup>208</sup> tibial defekt oluşturdukları tavşanlardaki kemik iyileşmesini radyolojik olarak değerlendirmek amacıyla yaptıkları hayvan çalışmasında, 15., 30., 45. ve 60. günde radyografi alarak kemik iyileşmesini incelemişlerdir.

Sotoudeh ve arkadaşları<sup>209</sup> tibia defekti oluşturdukları 44 tavşanda farklı greft materyallerinin kemik iyileşmesine olan etkilerini değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, sakrifikasyon zamanlarını 2., 4. ve 6. hafta olarak belirlemişlerdir.

Tavşan fibulasında osteotomi modeli oluşturulan bir çalışmada 1., 2. ve 4. haftalarda sakrifikasyon uygulanmıştır. 1. haftada sakrifiye edilen grupta yoğun hücre varlığı, büyük miktarda lamelsiz kemik ve az miktarda lameller kemik izlenmiştir. 2. haftada sakrifiye edilen grupta lamelsiz kemikte azalma, lameller kemikte artış saptanmıştır. 4. haftada sakrifiye edilen grupta ise hücre yoğunluğunda azalma gözlenmiştir.<sup>210</sup>

Zhang ve arkadaşları<sup>173</sup> kalsiyum sitratın kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada tavşan femurlarına kemik defekti oluşturmuşlardır. Üç gruba ayırdıkları denekleri 4., 6. ve 8. haftada sakrifiye etmişlerdir.

Tavşan tibiasında oluşturulan defektlere farklı greft materyalleri yerleştirilerek kemik iyileşmesinin değerlendirildiği çalışmalarda Calasans-Maia ve arkadaşları<sup>211</sup> sakrifikasyon zamanlarını 7., 14. ve 28.gün, Kanthan ve arkadaşları<sup>212</sup> ise 3., 7. ve 11. hafta olarak belirlemişlerdir.

Al- Huwaizi ve arkadaşları<sup>213</sup> kemik iyileşmesinde inflamasyonu değerlendirdikleri deneysel hayvan çalışmasında tibial kemik defekti oluşturdukları 20 adet tavşanı 3., 7., 14. ve 28. günde sakrifiye etmişlerdir.

ılbır ve arkadaşları<sup>1</sup> ise demineralize kemik greftinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında çene defekti modeli oluşturdukları tavşanları 1., 2., ve 4. haftaların sonunda sakrifiye etmişlerdir.

Bu çalışmada kullanılan deneklerin sakrifikasyon günleri tavşanlardaki kemik iyileşme hızı ve literatürdeki benzer çalışmalar göz önüne alınarak planlanmıştır. ABS' nin kemik iyileşmesinin erken döneminde inflamasyon üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla tavşanların bir kısmı 7. ve 15. günde sakrifiye edilmiştir. ABS' nin, kemik iyileşmesinin geç dönemlerinde meydana gelen sert kallus, matür kemik

ve lameller kemik oluşumu üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla diğer sakrifikasyon zamanları 30. ve 45. günler olarak belirlenmiştir.

Mooren ve arkadaşları<sup>214, 215</sup>, PRP' nin kansellöz kemik ve ksenojenik kemik greftiyle birlikte kullanımının erken ve geç dönem kemik iyileşmesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında 7. günde inflamatuvar reaksiyon ve az miktarda fibröz doku oluşumu izlemişlerdir. Yeni kemik dokusu oluşumu ya da greft rezorpsiyonuna rastlamamışlardır.

Bu çalışmada 7. gün grubunda yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda ABS uygulanan defektlerdeki inflamasyon düzeyinin, ABS uygulanmayan defektlere göre düşük olduğu saptanmıştır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Yukarıdaki çalışmadaki sonuçlara benzer olarak bizim çalışmamızda da, 7. günde inflamatuvar dönem hakim olduğundan yeni kemik dokusu oluşumu ya da greft materyalinde rezorpsiyon izlenmemiştir.

15. gün grubunda, ABS uygulanan örneklerdeki inflamasyon düzeyi, uygulanmayan örneklerdeki inflamasyon düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. Bu durumun, ABS'nin lokal hemostatik etkisiyle daha hızlı pıhtı formasyonunun gelişmesine ve inflamatuvar hücre göçünün azalmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

ABS' nin içeriğinde bulunan Glycyrrhiza glabra' nin anti-inflamatuvar etkisinin incelendiği bir hayvan çalışmasında bu bitkinin inflamasyonu baskıladığı ve doza bağımlı olarak lökosit migrasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir.<sup>216</sup> Çalışmamızda ABS uygulanan gruplarda

inflamasyon düzeyinin daha düşük bulunması, içeriğindeki bu bitkinin anti-inflamatuar etkisinin bir sonucu olabileceğini düşündürmüştür.

İşler ve arkadaşları<sup>26</sup> ABS' nin erken dönem kemik iyileşmesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada 16 adet ratın tibiasına bilateral olarak 3 mm çapında ve 2 mm derinliğinde kemik defekti oluşturmuşlardır. Defektlerden birine 1 cc ABS sprey uygulamışlar, diğer defekte ise herhangi bir işlem uygulamamışlardır. 7. günde sakrifiye edilen ratlardan aldıkları örnekleri histopatolojik olarak enfeksiyon, nekrozis, fibrozis ve yeni kemik oluşumu açısından değerlendirmişlerdir. Çalışmamıza benzer olarak ABS uygulanan gruptaki inflamasyon oranını daha düşük bulmuşlardır.

Ratlarda diş çekimi sonrasında uygulanan ABS' nin doku iyileşmesi üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, 24 adet rata bilateral diş çekimi işlemi uygulanmıştır. 1. gruptaki ratların çekim kavitelerine ABS, 2. gruptakilere kitosan uygulanmış, 3. gruptakilere herhangi bir işlem yapılmamıştır. 2., 7. ve 21. günde sakrifiye edilen deneklerden elde edilen örnekler histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. İnflamasyon düzeyi açısından yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.<sup>25</sup>

ABS' nin sinüs mukozası üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 35 adet tavşanın sinüs mukozası travmatize edilerek bir gruba ABS diğer gruba SF uygulanmıştır. İki grup inflamasyon şiddeti açısından karşılaştırıldığında, ABS uygulanan grupta inflamasyonun daha şiddetli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.<sup>217</sup>

Bu iki çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak, ABS' nin anti-inflamatuar etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Yıldırım<sup>217</sup>, yaptığı çalışmada ABS' nin kontrol grubuna göre daha fazla yabancı cisim reaksiyonuna neden olduğunu bildirmiştir. Ancak ABS' nin kemik dokusu iyileşmesine etkilerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda<sup>25, 26</sup> bizim çalışmamıza benzer olarak ABS uygulanan grupta herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu bulgusuna rastlanmamıştır. Bu durum, ABS' nin biyolojik olarak uyumlu bir materyal olması ile ilişkilendirilebilir.

Mooren ve arkadaşları<sup>214, 215</sup> çalışmalarında 6. haftada inflammatuar hücre sayısının azaldığını, 12. haftada ise herhangi bir inflammatuar hücre görülmediğini bildirmişlerdir.

Yukarıdaki çalışmaya benzer olarak bu çalışmada da, 30. günde bazı örneklerde hafif düzeyde inflamasyon izlenirken, 45. günde herhangi bir inflamasyon bulgusuna rastlanmamıştır. Bu sonuç, inflamasyonun kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde görülen bir reaksiyon olması ile ilişkilendirilebilir.

Goshima ve arkadaşları<sup>218</sup> tavşan tibiasında segmental kemik defekti oluşturdukları çalışmanın histolojik analizinde; 2. haftada granülasyon dokusu, inflammatuar hücreler ve az miktarda immatür kemik formasyonu saptamışlardır. 4. haftada ise granülasyon dokusunun mineralize olmaya başladığını ve osteoklastların ortaya çıktığını izlemişlerdir. 6. ve 8. hafta incelemelerinde ise greft partiküllerinin bir

kısının rezorbe olmaya başladığını ve yeni kemik adacıklarının oluştuğunu saptamışlardır.

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bizim çalışmamızın histolojik analizinin sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

Kemik dokusu iyileşmesini hızlandırmak amacıyla PRP ve BMP gibi çeşitli preparatların<sup>212, 219-224</sup>, IGF-1 ve TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörlerinin<sup>225-228</sup> ve düşük enerji seviyeli lazerler gibi biyostimülan cihazların<sup>229-236</sup> kullanımını konu alan ve başarılı sonuçlar elde edilen birçok çalışma mevcuttur.

Literatürde ABS' nin kemik dokusu iyileşmesi üzerine olan etkilerini konu alan çalışma sayısı sınırlıdır.

Arpacı<sup>25</sup> lokal hemostatik ajanlar olan ABS ve kitosanın, ratlarda diş çekimi sonrası çekim soketinin iyileşmesine etkisini değerlendirdiği çalışmada, bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer olarak, ABS ve kitosanın yeni kemik dokusu oluşumu üzerine olumlu etkileri olmadığı sonucuna ulaşmıştır.

İşler ve arkadaşları<sup>26</sup> ABS' nin erken dönem kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmada ABS uygulanan gruptaki yeni kemik dokusu oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamıştır. Bu çalışmada yazarlar ABS' nin yeni kemik



oluşumunu stimüle ettiğini, ABS uygulanan grupta kontrol grubuna göre nekrozis ve fibrozisin daha az görüldüğünü bildirmiştir.

ABS' nin kemik yüzeylerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 30 adet ratın femuruna bilateral olarak 3 mm çapında kemik defekti oluşturulmuştur. Sağ femurdaki defektlere 0,5 ml ABS uygulanmış, sol femura herhangi bir madde uygulanmamıştır. Ratlar 7., 28. ve 42. günlerde sakrifiye edilerek alınan örnekler incelenmiştir. Yapılan histopatolojik inceleme sonucunda 7. gün sonuçlarına göre ABS uygulanan grupta yeni kemik yapımının daha fazla olduğu saptanmıştır. 28. ve 42. günlerde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yazarlar ABS' nin erken dönem kemik iyileşmesini hızlandırdığını ve herhangi bir yabancı cisim reaksiyonuna neden olmadığını bildirmişlerdir.<sup>237</sup>

Bu iki çalışmada, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olarak, ABS' nin erken dönem kemik iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda ABS' nin erken dönemde endosteal kemikleşme üzerine olumlu etkileri olduğu görülmüştür. Ancak defekt bölgesi ve tavanında oluşan yeni kemik dokusu üzerine anlamlı etkileri olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Literatürde ABS' nin etkilerinin immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği çalışma sayısı sınırlıdır.

Nagata ve arkadaşlarının<sup>238</sup> kemik defektlerinin tamirinde PRP' nin otojen kemik grefti ile birlikte kullanımını immünohistokimyasal

analiz ile değerlendirdikleri çalışmada, PRP kullanılan grupta OC ve Osteopontin ekspresyonunun anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Yazarlar PRP' nin kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Chaves ve arkadaşları<sup>199</sup> yaptıkları çalışmada 24 adet tavşanı iki gruba ayırarak bilateral sinüs lift operasyonu uygulamışlardır. 1. gruptaki tavşanların sinüsleri otojen kemik grefti ile 2. gruptaki tavşanların sinüsleri ksenojenik kemik grefti ile doldurulmuştur. 14. gün ve 30. günde mikroskopik ve immünohistokimyasal inceleme yapılmıştır. 14. günde greft partiküllerinin çevresinde yoğun vaskülarizasyon gösteren granülasyon dokusu, 30. günde ise artmış osteojenik aktivite saptamışlardır. Immünohistokimyasal analiz sonucunda ksenojenik kemik greftinin otojen kemik greftine yakın oranda OC ekspresyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir.

Yapılan deneysel bir hayvan çalışmasında çeşitli greftlerin kemik matriks proteinlerinin ekspresyonuna etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmada sinüs lift operasyonu uygulanan 42 adet tavşan, 4 gruba ayrılmıştır. 1. gruba DBM, 2. gruba kısmi saflaştırılmış BMP, 3. gruba BMP ve DBM karışımı ve 4. gruba ise otojen kemik grefti yerleştirilmiştir. İlerinde OC' nin de bulunduğu 6 adet proteinin ekspresyonu immüno histokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Yapılan 2. ve 8.hafta analizlerinde OC ekspresyonunun BMP ve BMP+DBM uygulanan grupta daha yüksek olduğu bildirilmiştir. 8. haftada OC ekspresyonunun diğer markerlara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>239</sup>

Yaptığımız çalışmada da, osteoblastik aktivitenin yüksek olduğu greft partikülleri çevresinde, OC pozitifliğinin arttığı izlenmiştir. Ayrıca ABS uygulanan örneklerde OC ekspresyonunun daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuç ABS' nin osteoblastik aktiviteyi stimüle ettiğini düşündürse de yeni kemik oluşumu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kemik grefti uygulanan örneklerde ise kontrol grubuna göre OC ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Renno ve arkadaşları<sup>240</sup> yaptıkları çalışmada 60 adet ratın tibiasında 2,5 mm çapında defekt oluşturmuşlardır. Defekt bölgelerine ultrason tedavisi uyguladıkları denekleri, postoperatif 7., 13. ve 25. günde sakrifiye etmişlerdir. Yapılan histopatolojik değerlendirmede gruplar arasında anlamlı fark bulamamışlardır. İmmünohistokimyasal analiz sonucunda ise 7. ve 13. günlerde OC ekspresyon seviyesinin yükseldiğini saptamışlardır.

Hasegawa ve arkadaşları<sup>241</sup> in-vitro koşullarda tavşan kalvaryasından elde ettikleri osteoblastik hücrelere BMP ekleyerek protein ekspresyonuna etkilerini araştırmışlardır. OC seviyesinin 7. ve 10. günlerde anlamlı şekilde yükseldiğini bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada ise, OC pozitifliğinin günlere göre değişiminin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 27 kemik defekti vakası üç gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki defektler vaskülarize kemik grefti ve ksenojenik kemik greftiyle, ikinci gruptaki defektler sadece vaskülarize kemik greftiyle,

üçüncü gruptaki defektler ise sadece ksenojenik kemik grefti ile onarılmıştır. Serum VEGF ekspresyon düzeyi preoperatif ve postoperatif 2, 4, 6 ve 8.haftalarda ölçülmüştür. 2. ve 4. hafta serum VEGF değerleri bütün gruplarda preoperatif ölçüme göre yüksek bulunmuştur. 1. ve 2.gruptaki serum VEGF düzeyinin 3. gruba göre yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak her üç grupta da preoperatif serum VEGF düzeyi ile 6. ve 8.hafta düzeyleri arasında fark bulunmamıştır. Yazarlar serum VEGF düzeyinin kemik transplantasyonunun erken evresinde yükseldiğini bildirmişlerdir.<sup>242</sup>

Bu çalışmaya benzer olarak, çalışmamızda kemik iyileşmesinin erken dönemlerinin incelendiği 1. ve 2. grupta, VEGF ekspresyonunun diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, inflamasyon döneminde damarlanmanın daha fazla olması ile ilişkilendirilebilir.

ABS' nin gingival fibroblastlar ile in-vitro koşullarda etkileşiminin değerlendirildiği bir çalışmada, ABS uygulanan grup ile kontrol grubu arasında, VEGF ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.<sup>243</sup> Bu çalışmada da ABS uygulanan örneklerdeki VEGF ekspresyonu, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Nakamura ve arkadaşları<sup>244</sup> sistemik enjeksiyonunun FGF' nin endosteal kemik formasyonu üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. Yazarlar postoperatif 4. günden sonra endosteal kemikleşme miktarının anlamı derecede arttığını bildirmişlerdir.

Slaets ve arkadaşları<sup>245</sup>, erken dönem kortikal kemik iyileşmesini değerlendirdikleri deneysel hayvan çalışmasında, 12 adet tavşan tibiasına implant yerleştirmişlerdir. 3., 7., 14., 28. ve 42. günlerde denekleri sakrifiye etmişlerdir. Yaptıkları histolojik inceleme sonucunda endosteal kemik oluşumunun 28. güne kadar artarak pik seviyesine ulaştığını, 42. günde ise azaldığını bildirmişlerdir. Yazarlar yeni kemik oluşum sürecinin ilk olarak, osteojenik hücreler içeren endosteum ve periosteumda başladığını bildirmişlerdir.

Literatürde ABS' nin endosteal kemikleşmeye etkisinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, 7. ve 30. günlerde, ABS uygulanan örneklerdeki endosteal kemikleşme miktarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Endosteal kemik oluşumunun, cerrahi işlem sırasında meydana gelen travmaya karşı gelişen reaktif bir cevap olduğu düşünülmüştür. 45. gün grubundaki hiçbir defektte endosteal kemik formasyonunun izlenmemesi bu düşünceyi destekler niteliktedir. İşler ve arkadaşları<sup>26</sup> yaptıkları çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak, ABS' nin 7. günde yeni kemik oluşumunu arttırdığını bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada endosteal kemik oluşumu ile ilgili bir bilgidir söz edilmemiştir.

ABS' nin endosteumda bulunan osteoblastların diferansiyasyonunu hızlandırdığı ve osteoblastik aktiviteyi stimüle ettiği düşünülebilir. Ancak çalışmamız sonucunda defekt bölgesinde ve defekt kenarlarında oluşan yeni kemik dokusu miktarı açısından deney ve kontrol grubu arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. 45. günde sadece ABS uygulanan defektlerdeki yeni kemik miktarının, SF uygulanan defektlerdeki yeni kemik miktarından daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak bu fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bu alışma sonucunda ABS' nin kemik defektlerine uygulandığında yeni kemik dolumunu anlamlı derecede arttırmadığı görülmüştür. Lokal hemostatik ajan olarak başarıyla kullanılan ABS' nin, deneysel olarak tavşan tibiasında açılan kemik defektlerindeki iyileşmenin erken dönemlerinde inflamasyonu baskıladığı ve endosteal kemik oluşumunu stimüle ettiği görülmüştür.

## 6. SONUÇ

Ankaferd Blood Stopper' in ksenojenik kemik grefti ile birlikte ya da tek başına kullanımının, kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği bu çalışmada;

- ABS' nin kemik iyileşme sürecinde inflamasyonu baskıladığı,
- ABS' nin uygulandığı defektlerde herhangi bir yabancı cisim reaksiyonuna yol açmadığı,
- ABS' nin ksenojenik kemik grefti ile birlikte ya da tek başına kullanımının yeni oluşan kemik doku miktarı üzerine anlamlı etkileri olmadığı,
- ABS uygulanan örneklerde OC ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı,
- ABS uygulanan örneklerde VEGF ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı,
- ABS' nin kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde endosteal kemik oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı sonuçlarına ulaşılmıştır,

Bu çalışma ABS' nin kemik greft materyali birlikte kullanımını konu alan, literatürdeki ilk çalışmadır. Lokal hemostatik ajan olarak

başarıyla kullanılan ABS' nin, biyouyumlu bir ajan olduğu ve kemik doku tarafından iyi tolere edildiği görülmüştür. ABS'nin inflamasyonu baskılaması, oral ve maksillofasiyal cerrahi uygulamaları sonrasında görülen inflamasyon bulgularına olumlu etkileri olabileceğini göstermiştir. Bu çalışma sonucunda ABS' nin kemik defektlerinin onarım sürecinde, yeni kemik oluşumu üzerine anlamlı etkileri olmadığı görülmüştür.

ABS' nin klinik etkinliğinin tam olarak aydınlatılması amacıyla, postoperatif ve uzun dönem sonuçlarının değerlendirildiği çalışmalar yapılmasının faydalı olacağı düşünülmüştür.



## 7. ÖZET

### **Ankaferd Blood Stopper' ın Kemik Dokusu İyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi**

Oral ve maksillofasiyal bölgede, konjenital ya da gelişimsel malformasyonlar, travma, enfeksiyon gibi çeşitli nedenlerle kemik defektleri oluşabilmektedir. Oluşan kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu modern cerrahinin en zor uğraşlarından biri olarak kabul edilmektedir. Günümüze kadar pek çok araştırmacı kemik defektlerinin hızlı ve başarılı bir şekilde onarımını sağlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapmıştır.

Bu çalışmada, lokal hemostatik ajan olan Ankaferd Blood Stopper' ın (ABS) kemik dokusu iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada 24 adet Yeni Zelanda tipi beyaz erkek tavşan kullanılmıştır. Tavşanların tibiasında, bilateral olarak 5 mm çapında 2 adet kemik defekti oluşturulmuştur. Sol tibiadaki proksimal defekte ksenojenik kemik grefti (Bio-Gen Mix) ve ABS karışımı yerleştirilmiş, distal defekte ise 0,1 cc ABS uygulanmıştır. Sağ tibiada açılan proksimal defekte ksenojenik kemik grefti ve serum fizyolojik (SF) karışımı yerleştirilmiş, distal defekte ise 0,1 cc SF uygulanmıştır. 24 adet tavşan 4 eşit gruba ayrılarak, 7., 15.,30. ve 45. günde sakrifiye edilmiştir. Elde edilen örnekler histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan histopatolojik değerlendirme sonucunda ABS uygulanan örnekler ile kontrol grubundaki örnekler arasında, kemik dolum miktarı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. ABS uygulanan örneklerde 15. günde inflamasyon düzeyinin daha düşük olduğu görülmüştür. 7. ve 30. gün guplarında ABS uygulanan defektlerdeki endosteal kemikleşme miktarı daha yüksek bulunmuştur. Hiçbir örnekte yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmamıştır. Yapılan immünohistokimyasal analizde ABS uygulanan örneklerdeki Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Osteokalsin (OC) ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Ankaferd Blood Stopper, kemik iyileşmesi, ksenojenik kemik grefti, vasküler endotelyal büyüme faktörü, osteokalsin

## **8. SUMMARY**

### **Effects of Ankaferd Blood Stopper on Bone Healing: An Experimental Study**

Bone defects in oral and maxillofacial region might appear as a result of many factors such as trauma, congenital or developmental malformations and infections. The reconstruction of bone defects still poses a significant problem in modern surgery. Many studies were performed to repair bone defects successfully by researchers until now.

The aim of this study is to investigate the effects of Ankaferd Blood Stopper (ABS) on bone healing histopathologically and immunohistochemically.

In this study 24 New Zealand White male rabbits were used. Two bone defects (5mm in diameter) were created in rabbit tibias. In the left tibia, the proximal defect was filled with xenogenic bone graft (Bio-Gen Mix) and ABS mixture, 0,1 cc ABS was applied to the distal defect. In the right tibia, the proximal defect was filled with xenogenic bone graft (Bio- Gen Mix) and sterile saline mixture, 0,1 cc sterile saline was applied to the distal defect. 24 rabbits were divided into four groups according to the sacrifice days (7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup> and 45<sup>th</sup> days respectively). Histopathological and immunohistochemical examinations were performed on all samples.

According to the histopathological examination results; there was no statistical difference in the amount of new bone formation between ABS and control groups. However, the inflammation scores were statistically lower in the ABS group than the control group on the 15<sup>th</sup> day. On the 7<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days, the amount of endosteal new bone formation was higher in ABS groups. No foreign body reaction was seen in all samples. According to the immunohistochemical examination results; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Osteocalcin (OC) expression scores were statistically higher in the ABS group than the control group.

**Key Words:** Ankaferd Blood Stopper, bone healing, xenogenic bone graft, vascular endothelial growth factor, osteocalcin

## 9. KAYNAKLAR

1. ılbr HÖ, Karaca İ, Sabuncuođlu B, Akbay C. Demineralize kemik tozunun kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi 1999;2(2):117-21.
2. Archer WH. Oral and maxillofacial surgery. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 1975.
3. Greenberg AM, Prein J. Craniomaxillofacial Reconstructive and Corrective Bone Surgery. New York: Springer; 2002.
4. Abe Y, Takahata M, Ito M, Irie K, Abumi K, Minami A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) in a rat spinal arthrodesis model. Bone 2007;41(5):775-85.
5. Sarkar MR, Augat P, Shefelbine SJ, Schorlemmer S, Huber-Lang M, Claes L, et al. Bone formation in a long bone defect model using a platelet-rich plasma-loaded collagen scaffold. Biomaterials 2006;27(9):1817-23.
6. Oral R, Oral O. Diş Hekimliği ve Osteoporoz. Haseki Tıp Bülteni 2010;48:9-13.
7. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone Augmentation Procedures in Implant Dentistry. The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 2009;24:238-59.
8. Aybar B, Gümrü O. Oral Cerrahide Kemik Defektlerinin Onarımı. İst. Tıp Fak. Mecmuası 2000;63(3):318-20.
9. Özeç İ, Kılıç E, Öztürk M, Göze F. Ektopik Olarak Uygulanan Düşük Doz Rekombinant İnsan Kemiği Morfogenetik Proteini-2'nin Kemik Oluşumunu Başlatıcı Etkisinin Değerlendirilmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi 2007;10(1):5-9.
10. Babbush CA. Dental Implants-The Art and Science: W.B. Saunders Co; 2001.

11. Güven O, Keskin A. Çağdaş Preprotetik Cerrahi.2. Baskı. Ankara; 2001.
12. Miloro M. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. Philadelphia: BC Decker Inc; 2004.
13. Kökden A, Türker M. Oral ve maxillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 1999;2:134-40.
14. Revell PA. Pathology of Bone. Great Britain: Springer - Verlag. Berlin Heidelberg; 1986.
15. Kaya A, Tuncay C, Kaya Ü, Demirörs H. Periost dokusunun otoklavize kemik grefti-alıcı kemik bütünleşmesine etkisi: Tavşanlarda deneysel çalışma. Eklem Hastalık Cerrahisi 2010;21(3):159-65.
16. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Bağcioglu M, Germiyanoglu C. First clinical experience of Ankaferd Blood Stopper as a hemostatic agent in partial nephrectomy. Kaohsiung J Med Sci 2010;26(9):493-5.
17. Shorbagi A, Sivri B. Successful management of a difficult case of radiation proctopathy with Ankaferd BloodStopper: a novel indication (with video). Gastrointest Endosc 2010;72(3):666-7.
18. Tuncer I, Doganay L, Ozturk O. Instant control of fundal variceal bleeding with a folkloric medicinal plant extract: Ankaferd Blood Stopper. Gastrointest Endosc 2010;71(4):873-5.
19. Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Germiyanoglu C. Hemostasis in retropubic radical prostatectomy with Ankaferd BloodStopper: a case report. Kaohsiung J Med Sci 2009;25(8):445-7.
20. Çiftçi S, Keskin F, Özcan SK , Erdem MA, Çankaya B, Bingöl R, et al. In vitro antifungal activity of Ankaferd blood stopper against Candida albicans. Current Therapeutic research 2011;72(3):120-26.
21. Arslan S, Haznedaroglu IC, Oz B, Goker H. Endobronchial Application of Ankaferd Blood Stopper to Control Profuse Lung

Bleeding Leading to Hypoxemia and Hemodynamic Instability. Respiratory Medicine CME 2009;2:144-46.

22. Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, Kahya V. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2009;73:1742-5.
23. Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y, et al. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. J Int Med Res 2008;36(1):163-70.
24. Akarsu C, Kalayci MU, Yavuz E, Özkara S. Sıçanlarda karaciğer laserasyon modelinde Ankaferd Blood Stopper ve fibrin yapıştırıcının hemostatik etkinliğinin karşılaştırılması. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 2011;17(4):308-12.
25. Arpacı SE. Sıçanlarda Diş Çekimi Sonrasında Uygulanan Lokal Hemostatik Ajan Ankaferd' in Doku İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2010.
26. İşler SC, Demircan S, Çakarer S, Çebi Z, Keskin C, Soluk M, et al. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper® on early bone healing. J Appl Oral Sci. 2010;18(4):409-14.
27. Hollinger JO, Brekke J, Gruskin E, Lee D. Role of bone substitutes. Clin Orthop Relat Res 1996(324):55-65.
28. Ganong WF. Review of medical physiology. 23 rd ed. New York: Lange Medical Books / McGraw-Hill; 2010.
29. Erdoğan D, Görgün M, Hatiboğlu MT, Ilgaz C. Genel Histoloji. 2. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 1999.
30. Doblaré M, García JM, Gómez MJ. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. Engineering Fracture Mechanics 2004;71(13-14):1809-40.
31. Bilezikian J, Raisz L, Martin TJ. Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, CA. 3rd ed; 2008. p. 29-30.

32. ay FH, Sezer N. Kemik yapısı ve kemik döngüsü üzerine bir derleme. Fiziksel tıp 2002;5:177-84.
33. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji Text &Atlas. 11th ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006.
34. Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. Eur Spine J 2001;10 Suppl 2:86-95.
35. Mills SE. Histology for Pathologists. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2007.
36. Gartner LP, Hiatt JL Cartilage and Bone. In: Gartner LP, Hiatt JL, editors. Color Textbook of Histology. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 131-56.
37. Soydan N. Genel Histoloji. İstanbul: Beta Yayıncılık; 1992.
38. Erkoak A. Histoloji. İstanbul: Beta Basın Yayın Dağıtım; 1987.
39. Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodelling and healing. Surgery 2011;29(4):141-45.
40. Akay MT. Textbook of Histology (Genel Histoloji). 6th ed. Ankara: Palme Publishing Ltd; 2006.
41. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarron M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2006;11(1):47-51.
42. Doblare M, Garcia JM. On the modelling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. Acta scientifica venezolana 2003;54(1):58-75.
43. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Clinical Periodontology and Implant dentistry. Denmark: Blackwell Munksgaard. 4th ed; 2003.
44. Schell H, Lienau J, Epari DR, Seebeck P, Exner C, Muchow S, et al. Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing. Bone 2006;38(4):547-54.



45. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 2001;10(4):7-10.
46. Qiu S, Fyhrie DP, Palnitkar S, Rao DS. Histomorphometric assessment of Haversian canal and osteocyte lacunae in different-sized osteons in human rib. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2003;272(2):520-5.
47. Dağdeviren A. *Histoloji Embriyoloji Fizyoloji*. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2004.
48. Stevens A, Lowe J. *Histology*. New York: Gower Medical Publishing; 1992.
49. Cruess RL. *Healing of bone,tendon and ligament :Fractures*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Co; 1984.
50. Kılıçoğlu S. Mikroskopi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. *Ankara Üniv. Tıp. Fak. Mecm* 2002;55(2):143-50.
51. Ovalle WK, Nahirney PC, Netter FH. *Netter's essential histology*. 1st ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008.
52. Altunatmaz K. Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg* 2004;30:141-47.
53. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Rel Res* 1998:7-21.
54. Lavine LS, Grodzinsky AJ. Electrical stimulation of repair of bone. *J Bone Joint Surg Am* 1987;69(4):626-30.
55. Lieberman JR, Friedlaender GE. *Bone Regeneration and Repair. Biology and Clinical Applications*. Totowa NJ: Humana Press; 2005.
56. Miller MD. Bone. In: Miller MD, Thomson SR, Hart JA, editors. *Review of Orthopaedics*. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 1996. p. 1-22.
57. Ham AW, Cormack DH. *Ham's histology*. 9th ed. Philadelphia: Lippincott; 1987.
58. Li G, White G, Connolly C, D M. Cell Proliferation and Apoptosis During Fracture Healing. *J Bone Miner Res* 2002;17(5):791-99.

59. Lienemann PS, Lutolf MP, Ehrbar M. Biomimetic hydrogels for controlled biomolecule delivery to augment bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64(12):1078-89.
60. Brand RA, Rubin CT. Fracture Healing. In: Albright JA, Brand RA, editors. *The scientific basis of orthopaedics*. 2nd ed. Norwalk/Connecticut: Appleton & Lange; 1987. p. 325-40.
61. Aksoy C. Kırık İyileşmesi. *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi Dergisi* 2004;43(3):1-4.
62. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV. Effects of selenium-containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bull Exp Biol Med* 2004;137(1):74-7.
63. Kream BE, Petersen DN, Raisz LG. Cortisol enhances the anabolic effects of insulin-like growth factor I on collagen synthesis and procollagen messenger ribonucleic acid levels in cultured 21-day fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1990;126(3):1576-83.
64. Duthie RB. *Bone and Joint Tissues. Scientific Foundations of Surgery*. 4th ed. London: Heinemann Medical Books; 1989.
65. Fonseca RJ, Walker RV. *Oral and Maxillofacial Trauma*. Philadelphia: WB Saunders; 1991.
66. Boden SD, Schimandle JH. *Biology of lumbar spine fusion and bone graft materials*. Philadelphia: WB Saunders; 1996.
67. Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol* 2006;6(3):494-8.
68. Francischetti IM, Monteiro RQ, Guimaraes JA. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(1):259-63.

69. Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res* 1998;11(6):355-61.
70. Van Rossum TG, Vulto AG, Hop WC, Brouwer JT, Niesters HG, Schalm SW. Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14(11):1093-9.
71. El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hathout AS, Hassan NS, Aly SE, Abdel-Wahhab MA. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol* 2011;57(7-8):984-91.
72. Barka EA, Belarbi A, Hachet C, Nowak J, Audran JC. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186(1):91-5.
73. Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem* 2006;14(1):138-42.
74. Legssyer A, Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Serhrouchni M, et al. Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. in isolated rat heart and aorta. *Phytother Res* 2002;16(6):503-7.
75. Tatar C, Güler H, Şençift K. İki Farklı Hemostatik Ajanın (Ankaferd Blood Stopper ve Traneksamik Asit) Kan Hücrelerindeki Morfolojik Görüntüsü ve Kanama Faktörleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. *Yeditepe Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 2012;3(3):45-53.
76. Özalp Y, Özdemir N. Biyomateryaller ve biyoyumluluk. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi* 1996;25(2):57-72.

77. Tuskan C. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateryaller.2.Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları 2002.
78. Adem A. Yağlı kalsiyum hidroksit süspansiyonun ve ksenogreft + trombosit zengin plazma (tzp) karışımının deneysel olarak kemik defektlerinde uygulanmasının kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak histolojik değerlendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2007.
79. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi 2004;3:3-4.
80. Atay M, Yılmaz R. İki farklı kemik greftinin histopatolojik olarak incelenmesi. Dicle Tıp Dergisi 2005;32(4):172-78.
81. Kekilli E, Yağmur C, Ertem K, Türkbilen B. Kemik greftlerinde nükleer tıp uygulamaları. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005;25:261-79.
82. Kazakos K, Lyras DN, Thomaidis V, Agrogiannis G, Botaitis S, Drosos G, et al. Application of PRP gel alone or in combination with guided bone regeneration does not enhance bone healing process: An experimental study in rabbits. J Craniomaxillofac Surg 2011;39(1):49-53.
83. Ersu B. İmplant Diş Hekimliğinde Kullanılan Ağız İçi Otojen Kemik Greftleri. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi 2007;10(2):135-40.
84. Chase SW, Herndon CH. The fate of autogenous and homogenous bone grafts. J Bone Joint Surg Am 1955;37(4):809-41.
85. Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG. Bone Grafts, Derivatives and Substitutes. Cambridge: Butterworth-Heinemann Ltd; 1994.
86. Aykurt M. Kemik Bankası Kurulması Tıbbi Prensipleri ve Yasal Yönleri (1). J Kartal TR 1990;1(1):19-30.

87. El-Fayomy S, El-Shahat A, Omara M, Safe I. Healing of bone defects by guided bone regeneration (GBR): An Experimental Study. Egypt. J. Plast. Reconstr. Surg. 2003;27(2):159-66.
88. Özgürbüz LM. Sert doku onarımı için zenogreft üretimi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2006.
89. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J 2001;10:96-101.
90. Tuominen T. Native bovine bone morphogenetic protein in the healing of segmental long bone defects. Oulu: University of Oulu; 2001.
91. Huggins CB. The formation of bone under the influence of epithelium of the urinary tract. Arch Surg 1931;22(3):377-408.
92. Levander G. On the formation of new bone in bone transplantation. Acta Chir Scand 1934;74:425-6.
93. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science 1965;150(3698):893-9.
94. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume 2002;84(3):454-64.
95. Tomin E, Beksaç B, Lane JM. Amerika Birlesik Devletlerinde Ortopedik Girişimlerde Otogreftlerin Yerine Kullanılan Materyallere Toplu Bakış. Journal Of Arthroplasty & Arthroscopic Surgery 2002;13(2):114-29.
96. Aksoy MC, Yazıcı M, Alpaslan M. Legg-Calve-Perthes Hastalığı. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Dergisi 2005;4(3-4):138-48.
97. Albrektsson T, Sennerby L, Tjellström A. Advanced bone healing concepts in craniomaxillofacial reconstructive and corrective bone surgery. London: Springer; 2002.
98. Al-Sayyad MJ, Abdulmajeed TM. Fracture of the anterior iliac crest following autogenous bone grafting. Saudi Med J 2006;27(2):254-8.
99. Helm GA, Dayoub H, Jane JA, Jr. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. Neurosurg Focus 2001;10(4):1-4.

100. Peleg M, Garg AK, Misch CM, Mazor Z. Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(12):1535-44.
101. Puricelli E, Corsetti A, Ponzoni D, Martins GL, Leite MG, Santos LA. Characterization of bone repair in rat femur after treatment with calcium phosphate cement and autogenous bone graft. *Head & face medicine* 2010;6:6-10.
102. Şençimen M, Gülses A, Varol A. Mandibuler Simfiz Bölgesinden Kemik Grefti Alınmasına Yönelik İki Basit Cerrahi Teknik. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2010;3:12-16.
103. Vaccaro AR. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002;25(5):571-8.
104. Margonar R, dos Santos PL, Queiroz TP, Marcantonio E. Rehabilitation of atrophic maxilla using the combination of autogenous and allogeneic bone grafts followed by protocol-type prosthesis. *J Craniofac Surg* 2010;21(6):1894-6.
105. Dodabassappa SN, Shah HH, Joseph B. Donor site morbidity following the harvesting of cortical bone graft from the tibia in children. *Journal of children's orthopaedics* 2010;4(5):417-21.
106. Sim R, Liang TS, Tay BK. Autologous marrow injection in the treatment of delayed and non-union in long bones. *Singapore Med J* 1993;34(5):412-7.
107. Kömürcü E, İnanmaz ME, Işık C, Akan B, Köse KÇ. Kemik Yerine Geçen Biyomateryaller 1. Kısım: İnsan Kaynaklı Greftler. *Düzce Tıp Dergisi* 2011;13(2):59-61.
108. Alan H, Unlu G. Graft materials used in oral and maxillofacial surgery. *Journal of International Dental and Medical Research* 2009;4(3):150-54.
109. Pinheiro AL, Limeira Junior Fde A, Gerbi ME, Ramalho LM, Marzola C, Ponzi EA. Effect of low level laser therapy on the repair of bone

- defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz Dent J* 2003;14(3):177-81.
110. Rekow D. Informatics challenges in tissue engineering and biomaterials. *Adv. Dent. Res* 2003;17:49- 54.
111. Efeoğlu A. Periodontal tedavide kemik greftleri. *Akademik Dental Dişhekimliği Dergisi* 2002;4(1):1-13.
112. Habal MB, Reddi AH. *Bone Grafts and Bone Substitutes*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1992.
113. Tofe AJ, Watson BA, Bowerman MA. Solution and cell mediated resorption of grafting materials. *J.Oral Implantol.* 1991;17:345.
114. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001;71(6):354-61.
115. Precheur HV. Bone graft materials. *Dent Clin North Am* 2007;51(3):729-46.
116. Kulan M, Ulukapı I. Diş hekimliğinde biyoaktif camlar. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi* 2011;45(1):65-70.
117. Urist M. The search for and the discovery of bone morphogenetic protein (BMP). In: Urist M, Burwell RG, editors. *Oxford: Butterworth-Heinemann; 1994. p. 315-62.*
118. Haspolat K, Söker M. Kemiğe Ait Biyokimyasal Değerler ve Onkoloji. *Dicle Tıp Dergisi* 2002;29(3):83-90.
119. Tekin Y, Bozdemir AE, Barutđuođlu B. Osteoporoz Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Göstergeler. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2005;3(2):73-83.
120. Torun D, Sezer S, Arat Z, Özdemir FN. Hemodiyaliz Hastalarında Serum Osteokalsin Düzeyiyle Albümin Arasındaki İlişki. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2003;12(4):225-28.
121. Swaminathan R. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2001;313(1-2):95-105.

122. Rammelt S, Neumann M, Hanisch U, Reinstorf A, Pompe W, Zwipp H, et al. Osteocalcin enhances bone remodeling around hydroxyapatite/collagen composites. *J Biomed Mater Res A* 2005;73(3):284-94.
123. Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ, Stepan J. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int.* 2000;11(6):2-17.
124. Seibel MJ, Robins SP, Blezikian JP. *Markers of bone metabolism*: Lippincott Company; 1995.
125. Kargın F, Fidancı UR. Kemik Metabolizmasının İzlenmesinde Biyokimyasal Belirteçler ve Klinik Önemi. *Türk Veteriner Hekimliği Dergisi* 2002;14(1):52-55.
126. Binkley NC, Krueger DC, Engelke JA, Foley AL, Suttie JW. Vitamin K supplementation reduces serum concentrations of under-gamma-carboxylated osteocalcin in healthy young and elderly adults. *Am J Clin Nutr* 2000;72(6):1523-8.
127. Yazır Y, Gonca S, Filiz S, Dalçık H. Endotel Hücreleri İçin Önemli Bir Protein Ailesi; Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf), Ailenin Üyeleri, Yapısı ve Sentezi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2004;26(4):181-84.
128. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219(4587):983-5.
129. Erol N. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü ve Anti-VEGF Ajanlar. *Ret-Vit* 2007;15(Özel Sayı):35-40.
130. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury* 2008;39 Suppl 2:S45-57.



131. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161(2):851-8.
132. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25(4):581-611.
133. Wang CJ, Huang KE, Sun YC, Yang YJ, Ko JY, Weng LH, et al. VEGF modulates angiogenesis and osteogenesis in shockwave-promoted fracture healing in rabbits. *J Surg Res* 2011;171(1):114-9.
134. Yang YQ, Tan YY, Wong R, Wenden A, Zhang LK, Rabie AB. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci* 2012;4(2):64-8.
135. Skobe M, Brown LF, Tognazzi K, Ganju RK, Dezube BJ, Alitalo K, et al. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and its receptors KDR and flt-4 are expressed in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *J Invest Dermatol* 1999;113(6):1047-53.
136. Sengüven B. Odontojenik Keratokist ve Ameloblastomalarda İnterlökin-1 Alfa ve İnterlökin-6 Ekspresyonunun ve Gen Polimorfiziminin İncelenmesi. Doktora Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2008.
137. Hirshberg A, Lib M, Kozlovsky A, Kaplan I. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. *Oral oncology* 2007;43(3):278-82.
138. Rossi AC, Freire AR, Perussi MR. Use Homologous Bone Grafts in Maxillary Sinus Lifting. *Int. J. Odontostomat* 2012;6(1):19-26.
139. Markovic A, Todorovic L. The Influence of Low-power Laser on Healing of Bone Defects after Periapical Surgery: A Clinical Study. *J Oral Laser Applications* 2006;6(3):163-68.
140. Wilczewska JS, Koszowski R, Pająk J. Comparison of postoperation bone defects healing of alveolar processes of maxilla and mandible with the use of Bio-Gen and Bio-Oss. *J Clin Exp Dent* 2010;2(2):60-6.

141. Vertenten G, Gasthuys F, M C, Schacht E, Vlaminck L. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010;23(3):153-62.
142. Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury, Int. J. Care Injured* 2011;42(2):56-63.
143. Mamidwar SS. Preface: bone graft materials. *J Long Term Eff Med Implants* 2010;20(4):269.
144. Dumitrescu AL. *Chemicals in Surgical Periodontal Therapy*. Berlin: Springer-Verlag; 2011.
145. Allegrini S, Koenig B, Allegrini MRF, Yoshimoto M. Alveolar Ridge Sockets Preservation With Bone Grafting – Review. *Annales Academiae Medicae Stetinensis Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej W Szczecinie* 2008;54(1):70-81.
146. Merckx MAW. *Autogenous Bone and Bovine Bone Mineral as Grafting Materials in Maxillofacial Surgery*. Benda BV, Nijmegen: Univ; 2000.
147. Truumees E HH. Alternatives to Autologous Bone Harvest in Spine Surgery. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal* 1999;12:77-88.
148. Silva RV, Camilli JA, Bertran CA, Moreira NH. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2005;34(2):178-84.
149. Sandor GKB. Bone Regeneration of the Cranio-maxillofacial and Dento-alveolar Skeletons in the Framework of Tissue Engineering In: Ashammakhi N, Ferreti P, editors. *Topics in Tissue Engineering*. Oulu, Finland; 2003.
150. Zhang X, Cai Q, Liu H, Heng BC, Peng H, Song Y, et al. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler

cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41(11):1330-7.

151. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, Aboelsaad N, Aboushelib MN, Berberi A, et al. Influence of material properties on rate of resorption of two bone graft materials after sinus lift using radiographic assessment. *Int J Dent* 2012;2012:1-7.
152. Mannai C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet-rich plasma in 97 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(9):1420-6.
153. Papa F, Cortese A, Maltarello MC, Sagliocco R, Felice P, Claudio PP. Outcome of 50 consecutive sinus lift operations. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2005;43(4):309-13.
154. Kim YK, Kim SG, Park JY, Yi YJ, Bae JH. Comparison of clinical outcomes of sinus bone graft with simultaneous implant placement: 4-month and 6-month final prosthetic loading. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111(2):164-9.
155. Kim YK, Yun PY, Kim SG, Lim SC. Analysis of the healing process in sinus bone grafting using various grafting materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107(2):204-11.
156. Rickert D, Slater JJ, Meijer HJ, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus lift with solely autogenous bone compared to a combination of autogenous bone and growth factors or (solely) bone substitutes. A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012;41(2):160-7.
157. Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater* 2011;27(1):61-70.
158. Heinemann F, Hasan I, Schwahn C, Bourauel C, Mundt T. Bone level change of extraction sockets with Bio-Oss collagen and implant placement: A clinical study. *Ann Anat* 2011;194(6):508-12.
159. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.

160. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol* 2003;48(2):155-60.
161. Zwingenberger S, Niederlohm E, Vater C, Rammelt S, Matthys R, Bernhardt R, et al. Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *J Surg Res* 2012.
162. He YX, Zhang G, Pan XH, Liu Z, Zheng LZ, Chan CW, et al. Impaired bone healing pattern in mice with ovariectomy-induced osteoporosis: A drill-hole defect model. *Bone* 2011;48(6):1388-400.
163. Shirasu N, Ueno T, Hirata Y, Hirata A, Kagawa T, Kanou M, et al. Bone formation in a rat calvarial defect model after transplanting autogenous bone marrow with beta-tricalcium phosphate. *Acta Histochem* 2010;112(3):270-7.
164. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol* 2012;57(11):1545-50.
165. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and histomorphometric study in a rat calvarial defect model. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 2012;114(5):146-52.
166. Bayat M, Momen-Heravi F, Marjani M, Motahhary P. A comparison of bone reconstruction following application of bone matrix gelatin and autogenous bone grafts to alveolar defects: an animal study. *J Craniomaxillofac Surg* 2010;38(4):288-92.
167. Klaue K, Knothe U, Anton C, Pflugger DH, Stoddart M, Masquelet AC, et al. Bone regeneration in long-bone defects: tissue compartmentalisation? In vivo study on bone defects in sheep. *Injury* 2009;40:95-102.
168. Lansdowne JL. *Preclinical Models for Bone Defects*. Davos. Platz 7270, Switzerland: AO Research Institute Davos; 2010.

169. Haugen HJ, Monjo M, Rubert M, Verket A, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, et al. Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model. *Acta Biomater* 2012;9(2):5390-9.
170. Chung CY, Choi IH, Yoo WJ, Cho TJ, Gong HS, Kwon ST. Distraction osteogenesis for segmental bone defect. Physeal change after acute bone shortening followed by gradual lengthening in a rabbit tibia model. *Injury* 2005;36(12):1453-9.
171. Karunratanakul K, Kerckhofs G, Lammens J, Vanlauwe J, Schrooten J, Van Oosterwyck H. Validation of a finite element model of a unilateral external fixator in a rabbit tibia defect model. *Medical Engineering & Physics*.
172. Casap N, Brand M, Mogyros R, Alterman M, Jensen OT. Island osteoperiosteal flaps with interpositional bone grafting in rabbit tibia: preliminary study for development of new bone augmentation technique. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(12):3045-51.
173. Zhang W, Wang W, Chen QY, Lin ZQ, Cheng SW, Kou DQ, et al. Effect of calcium citrate on bone integration in a rabbit femur defect model. *Asian Pac J Trop Med* 2012;5(4):310-4.
174. Borie E, Fuentes R, Del Sol M, Oporto G, Engelke W. The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: a pilot study. *Ann Anat* 2011;193(5):412-7.
175. Cavalcanti SC, Pereira CL, Mazzonetto R, de Moraes M, Moreira RW. Histological and histomorphometric analyses of calcium phosphate cement in rabbit calvaria. *J Craniomaxillofac Surg* 2008;36(6):354-9.
176. Min S, Sato S, Saito M, Ebihara H, Arai Y, Ito K. Micro-computerized tomography analysis: dynamics of bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106(6):892-5.

177. Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, Khoshzaban A, Abbas FM, Bashtar M, et al. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*.
178. Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM. The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* 2006;26:97-110.
179. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986;205:299-308.
180. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81(5):672-6.
181. Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E. Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg* 1994;5(3):201-3.
182. Wohlfahrt JC, Rønold, Ellingsen, Lyngstadaas SP. Porous titanium granules and EMD in rabbit tibia critical size peri-implant osseous defects. 18th Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration. Monaco, France; 2009.
183. Veis A, Kougias K, Tsirlis A, Parisis N, Papadopoulou C, Romanos GE. Evaluation of the osteogenic potential in experimental defects, with and without bone marrow, in the rabbit tibia: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24(6):1054-60.
184. Lee MJ, Sohn SK, Kim KT, Kim CH, Ahn HB, Rho MS, et al. Effect of hydroxyapatite on bone integration in a rabbit tibial defect model. *Clin Orthop Surg* 2010;2(2):90-7.
185. Walsh WR, Vizesi F, Michael D, Auld J, Langdown A, Oliver R, et al. Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials* 2008;29(3):266-71.

186. Ercetin S, Haznedaroglu IC, Kurt M. Safety and efficacy of Ankaferd. Blood Stopper in dental surgery. UHOD 2010;20:1-5.
187. Fındıkçioğlu K, Fındıkçioğlu F. Ankaferd® Kanama Durdurucunun Plastik Cerrahi Pratiğinde Kullanım Alanları: Olgu Sunumları. Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi 2010;17(3):149-52.
188. İylen I, Bozkus F, San I, Alatas N. The hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in adenoidectomy. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2011;75(10):1292-5.
189. Kelles M, Kalcioglu MT, Samdanci E, Selimoglu E. Ankaferd Blood Stopper Is More Effective Than Adrenaline Plus Lidocaine and Gelatin Foam in the Treatment of Epistaxis in Rabbits. Current Therapeutic Research 2011;72(5).
190. Turgut M, Tutkun F, Celebi N, Muglali M. Topical Ankaferd Bloodstopper in the Management of Critical Bleedings due to Hemorrhagic Diathesis. International Journal of Hematology and Oncology 2011;21(3):160-65.
191. Tasdelen Fisgin N, Tanriverdi Cayci Y, Coban AY, Ozatli D, Tanyel E, Durupinar B, et al. Antimicrobial activity of plant extract Ankaferd Blood Stopper. Fitoterapia 2009;80(1):48-50.
192. Arslan S, Yeşil Y, Ülger Z, Cankurtaran M, Göker H , Haznedaroğlu İC. Yaşlı Bir Hastada Yumuşak Doku Travmasına Bağlı Gelişen Yara İyileşmesinde Ankaferd. Akad Geriatri 2010;2:58-60.
193. Ozaslan E, Purnak T, Yıldız A, Akar T, Avcioglu U, Haznedaroglu IC. The effect of Ankaferd blood stopper on severe radiation colitis. Endoscopy 2009;41(321-322).
194. Aktop S, Alturfan EE, Özer C, Gönül O, Garip H, Yarat A, et al. Ankaferd Blood Stopper ve Celox'un Varfarin Verilmiş Sıçan Derisinde Glutasyon ve Lipid Peroksidasyon Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. MÜSBED 2012;2(1):32-42.
195. Tas A, Koklu S, Beyazit Y, Karaca G, Astarci HM, Akbal E, et al. Percutaneous ankaferd injection to in vivo liver tissue in comparison

- to ethanol in an experimental rat model. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35(8-9):549-53.
196. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: Skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol* 2012.
197. Cantatore FP, Crivellato E, Nico B, Ribatti D. Osteocalcin is angiogenic in vivo. *Cell Biol Int* 2005;29(7):583-5.
198. Theyse LF, Mol JA, Voorhout G, Terlouw M, Hazewinkel HA. The efficacy of the bone markers osteocalcin and the carboxyterminal cross-linked telopeptide of type-I collagen in evaluating osteogenesis in a canine crural lengthening model. *Vet J* 2006;171(3):525-31.
199. Chaves MD, Nunes LSS, Oliviera RV, Holgado LA, Filho HN, Matsumoto MA. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2012;40(8):315-20.
200. Paskalev M, Krastev S, Filipov J. Changes in Some Serum Bone Markers After Experimental Fracture and Intramedullary Osteosynthesis in Dogs. *Trakia Journal of Sciences* 2005;3(5):46-50.
201. Yazır Y. Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vegf):Reseptörleri ve Fonksiyonları. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2007;29(3):128-36.
202. Nakagawa M, Kaneda T, Arakawa T, Morita S, Sato T, Yomada T, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. *FEBS Lett* 2000;473(2):161-4.
203. Emad B, Sherif el M, Basma GM, Wong RW, Bendeus M, Rabie AB. Vascular endothelial growth factor augments the healing of demineralized bone matrix grafts. *Int J Surg* 2006;4(3):160-6.
204. Li R, Stewart DJ, von Schroeder HP, Mackinnon ES, Schemitsch EH. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *J Orthop Res* 2009;27(1):8-14.



205. Tete S, Vinci R, Zara S, Zizzari V, De Carlo A, Falco G, et al. Long-term evaluation of maxillary reconstruction by iliac bone graft. *J Craniofac Surg* 2011;22(5):1702-7.
206. Reis-Filho CR, Silva ER, Martins AB, Pessoa FF, Gomes PV, de Araujo MS, et al. Demineralised human dentine matrix stimulates the expression of VEGF and accelerates the bone repair in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol* 2012;57(5):469-76.
207. Griffon DJ. Fracture healing. In: Johnson AL, Houlton JEF, Vannini R, editors. *Principles of Fracture Management in the dog and cat*. New York: Thieme,; 2005. p. 72-97.
208. Abedi G, Alizadeh R, Asghari A, Sedghani P. Radiographic evaluation of androgen on tibial bone defect healing in rabbit. *European Journal of Experimental Biology* 2012;2(4):1315-19.
209. Sotoudeh A, Jahanshahi G, Jahanshahi A, Takhtfooladi MA, Shabani I, Soleimani M. Combination of poly L-lactic acid nanofiber scaffold with omentum graft for bone healing in experimental defect in tibia of rabbits. *Acta Cir Bras* 2012;27(10):694-701.
210. Matos MA, Araujo FP, Paixao FB. Histomorphometric evaluation of bone healing in rabbit fibular osteotomy model without fixation. *J Orthop Surg Res* 2008;3:4.
211. Calasans-Maia MD, Ascoli FO, Novellino ATN, Rossi AM, Granjeiro JM. Comparative histological evaluation of tibial bone repair in rabbits treated with xenografts. *Acta Ortop Bras* 2009; 17(6):340-3.
212. Kanthan SR, Kavitha G, Addi S, Choon DS, Kamarul T. Platelet-rich plasma (PRP) enhances bone healing in non-united critical-sized defects: a preliminary study involving rabbit models. *Injury* 2011;42(8):782-9.
213. Al-Huwaizi HF, Al-Rubayi A, Al-Najjar A. The cytotoxic effect of different intracanal medicaments. *J College Dentistry* 2005;17(1):1-5.
214. Mooren RE, Dankers AC, Merckx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ. The effect of platelet-rich plasma on early and late

- bone healing using a mixture of particulate autogenous cancellous bone and Bio-Oss: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39(4):371-8.
215. Mooren RE, Merckx MA, Bronkhorst EM, Jansen JA, Stoelinga PJ. The effect of platelet-rich plasma on early and late bone healing: an experimental study in goats. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2007;36(7):626-31.
216. Nirmala P, Selvaraj T. Anti-inflammatory and anti-bacterial activities of *Glycyrrhiza glabra* L. *Journal of Agricultural Technology* 2011;7(3):815-23.
217. Yıldırım B. Hemostatik Ajan Olan Ankaferdin Sinüs Mukozası Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Zonguldak: Zonguldak Karaelmas Üniversitesi; 2010.
218. Goshima K, Nakase J, Xu Q, Matsumoto K, Tsuchiya H. Repair of segmental bone defects in rabbit tibia promoted by a complex of beta-tricalcium phosphate and hepatocyte growth factor. *J Orthop Sci* 2012;17(5):639-48.
219. Fıratlı E, Özyuvacı H, Nelsen K, Hildebrand D. Histological evaluation of sinus lifting procedures with various graft materials. *IADR/AADR/CADR 82nd General*; 2004. p. 10-13.
220. Issa JP, do Nascimento C, Iyomasa MM, Siessere S, Regalo SC, Defino HL, et al. Bone healing process in critical-sized defects by rhBMP-2 using poloxamer gel and collagen sponge as carriers. *Micron* 2008;39(1):17-24.
221. Latalski M, Elbatrawy YA, Thabet AM, Gregosiewicz A, Raganowicz T, Fatyga M. Enhancing bone healing during distraction osteogenesis with platelet-rich plasma. *Injury* 2011;42(8):821-4.
222. Lima AF, Rahal SC, Volpi Rdos S, Granjeiro JM, Taga R, Cestari TM. Effect of bovine bone morphogenetic proteins on radius fracture healing in rabbits. *Acta Cir Bras* 2007;22(4):260-5.

223. Mariano R, Messori M, de Moraes A, Nagata M, Furlaneto F, Avelino C, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109(1):72-8.
224. Simman R, Hoffmann A, Bohinc RJ, Peterson WC, Russ AJ. Role of platelet-rich plasma in acceleration of bone fracture healing. *Ann Plast Surg* 2008;61(3):337-44.
225. Blumenfeld I, Srouji S, Lanir Y, Laufer D, Livne E. Enhancement of bone defect healing in old rats by TGF-beta and IGF-1. *Exp Gerontol* 2002;37(4):553-65.
226. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing--a biomechanical and histological study. *Bone* 2003;33(4):628-37.
227. Raschke M, Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone* 2001;29(4):368-73.
228. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gabelein T, Flyvbjerg A, Bail HJ, et al. Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1. *Bone* 2002;31(1):165-72.
229. Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R. Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. *J Orthop Surg Res* 2010;5:1.
230. Blaya DS, Guimaraes MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract* 2008;9(6):41-8.
231. De Souza Merli LA, De Medeiros VP, Toma L, Reginato RD, Katchburian E, Nader HB, et al. The low level laser therapy effect on

the remodeling of bone extracellular matrix. *Photochem Photobiol* 2012;88(5):1293-301.

232. Kazem Shakouri S, Soleimanpour J, Salekzamani Y, Oskuie MR. Effect of low-level laser therapy on the fracture healing process. *Lasers Med Sci* 2010;25(1):73-7.
233. Khadra M, Kasem N, Haanæs HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:693-700.
234. Oliveira P, Sperandio E, Fernandes KR, Pastor FA, Nonaka KO, Renno AC. Comparison of the effects of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound on the process of bone repair in the rat tibia. *Rev Bras Fisioter* 2011;15(3):200-5.
235. Ribeiro TP, Nascimento SB, Cardoso CA, Hage R, Almeida JD. Low-Level Laser Therapy and Calcitonin in Bone Repair: Densitometric Analysis. *International Journal of Photoenergy* 2012:1-5.
236. Thanoon MG, Ibrahim SM. Effect of bone marrow and low power lasers on fracture healing with destruction of both periosteum and endosteum in rabbits. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2010;24(1):5-9.
237. Şimşek HO. Beş farklı bitki ekstresinden elde edilen kanama durdurucu ajanın (Ankaferd) kemik yüzeylerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi. Doktora Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2010.
238. Nagata M, Messori M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone* 2009;45(2):339-45.

239. Hu Z, Peel SA, Ho SK, Sandor GK, Su Y, Clokie CM. The expression of bone matrix proteins induced by different bioimplants in a rabbit sinus lift model. *J Biomed Mater Res A* 2010;95(4):1048-54.
240. Renno AC, Favaro-Pipi E, Fernandes K, Tim C, Ribeiro DA. Ultrasound therapy modulates osteocalcin expression during bone repair in rats. *Ultrasonics* 2012;52(1):111-6.
241. Hasegawa Y, Shimada K, Suzuki N, Takayama T, Kato T, Iizuka T, et al. The in vitro osteogenetic characteristics of primary osteoblastic cells from a rabbit calvarium. *J Oral Sci* 2008;50(4):427-34.
242. Wang X, Wang C. Expression of vascular endothelial growth factor in repairing bone defect with vascularized bone graft- reconstituted bone xenograft]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2005;19(6):435-8.
243. Ünlü L. Gingival Fibroblastların Ankaferd ile in Vitro Koşullarda Etkileşimi [Doktora Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2010.
244. Nakamura T, Hanada K, Tamura M, Shibunushi T, Nigi H, Tagawa M, et al. Stimulation of endosteal bone formation by systemic injections of recombinant basic fibroblast growth factor in rats. *Endocrinology* 1995;136(3):1276-84.
245. Slaets E, Naert I, Carmeliet G, Duyck J. Early cortical bone healing around loaded titanium implants: a histological study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res* 2009;20(2):126-34.

## 10. EKLER

### 10.1. Etik Kurul Onayı



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

12.02/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/37-2375  
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Mustafa ÖZTÜRK  
Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı  
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-10.016 kod numaralı ve *"Ankaferd Blood Stopper'ın kemik dokusu iyileşmesi üzerine olan etkilerinin deneysel olarak incelenmesi"* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.016 and entitled *"Experimental study of the effects of Ankaferd Blood Stopper on bone healing"* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

  
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN  
Gazi Üniversitesi  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

## 10.2. Teşekkür

Tüm doktora eğitim sürecimde beni her konuda destekleyen, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli doktora danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK'e,

Tez çalışma sürecinde bana yol gösteren ve bu tezin oluşmasında büyük katkıları olan Sayın Prof. Dr. İnci Rana KARACA' ya ve Sayın Prof. Dr. Sibel Elif GÜLTEKİN'e,

Doktora hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başta Prof. Dr. Barış ŞİMŞEK, Doç. Dr. Mustafa Sancar ATAÇ ve Dr. Süleyman BOZKAYA olmak üzere tüm değerli bölüm hocalarıma,

Öğrencilik dönemim ve doktora eğitimim sürecinde her zaman yanımda olan, kendisinden çok şey öğrendiğim kıdemlim, ağabeyim Dr. M. Kağan DEĞERLİYURT'a ve tüm kıdemlilerime,

Tez çalışma sürecimin her aşamasında bana yardımcı olan başta Dr. Burcu SENGÜVEN ve Dr. Emre BARIŞ olmak üzere tüm Oral Patoloji ailesine,

Destek ve sevgilerini benden esirgemeyen ve tez çalışmalarımda bana yardımcı olan başta Dr. Erkan ÇIRAK, Dt. Merve ÇAKIR ve Dt. Ezgi KARAÇELEBİ olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Sonsuz sevgi ve emekleriyle beni bugünlere getiren, her zaman bana destek olan sevgili annem Fatma ÖZTEMEL, sevgili babam İsmail ÖZTEMEL' ve sevgili ağabeyim Kerim ÖZTEMEL'e,

Son olarak sevgisini ve sonsuz sabrını benden esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim yol arkadaşım ve meslektaşım Dr. Başak KURDOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Akın

**Soyadı:** Öztemel

**Doğum Yeri ve Tarihi:** Ağrı – 17.06.1983

**Doktora:** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Cerrahisi AD. (2007-2013)

**Üniversite:** Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2001-2006)

**Ortaokul- Lise:** Afyon Kocatepe Anadolu Lisesi (1995-2001)

**İlkokul:** Edirne Kurtuluş İlkokulu (1990-1993)

Sinanpaşa İlköğretim Okulu (1993-1995)

**Yabancı Dili:** İngilizce

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:** Türk Oral ve Maksillofasiyal Cerrahi Derneği

**Projeler:** Ankaferd Blood Stopper'ın Kemik Dokusu İyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi (03/2010-19)