



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİ (VİTİS VİNİFERA) VE DÜŞÜK
DOZ LAZER TEDAVİSİNİN (DDL T) KIRIK İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN HİSTOMORFOMETRİK
OLARAK İNCELENMESİ**

Bilal EGE

DOKTORA TEZİ

AĞIZ DIŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Mutan Hamdi ARAS

Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN

GAZİANTEP

2014

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DIŞ ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİ (VİTİS VİNİFERA) VE DÜŞÜK
DOZ LAZER TEDAVİSİNİN (DDLT) KIRIK İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN HİSTOMORFOMETRİK
OLARAK İNCELENMESİ**

Bilal EGE

Tez Savunma Tarihi: 06.06.2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Doktora” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Metin GÜNGÖRMÜŞ
Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Mutan Hamdi ARAS
Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN
Tez danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Doktora” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Metin GÜNGÖRMÜŞ

.....

Prof. Dr. Serkan POLAT

.....

Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN

.....

Doç. Dr. Mutan Hamdi ARAS

.....

Doç. Dr. Kemal ÜSTÜN

.....

BEYAN

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

06.06.2014

Bilal EGE

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mutan Hamdi ARAS'a, doktora eğitimim ve tezimin hazırlanmasına katkıda bulunan ikinci tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN'a,

Doktora eğitimi ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen; desteğini her zaman yanımda hissettiğim hocam Sayın Doç. Dr. M. İsa KARA'ya

Asistanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve birikimlerinden yararlandığım hocam Sayın Prof. Dr. Sinan AY'a,

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan AKGÜL'e, histolojik analizlerin değerlendirilmesinde Sayın Prof. Dr. Sevinç İNAN ve Araş. Gör. Işıl AYDEMİR'e, biyokimyasal analizlerin değerlendirilmesinde ise Sayın Prof. Dr. Seyithan TAYSI'ya,

Tez çalışmam ve tüm asistanlık dönemimde beraber çalıştığım başta Dt. Mehmet DEMİRKOL olmak üzere sevgili asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni daima destekleyip hiçbir özveriden kaçınmayan canım annem İffet EGE; babam Mustafa EGE ve ablam Münevver YÜCEL'e,

Hayata dair ihtiyaç duyduğum her anda, desteğini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Miray EGE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından DHF.13.03 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| TEŞEKKÜR | İ |
| İÇİNDEKİLER | İİ |
| KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ..... | V |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | Vİİ |
| RESİMLER LİSTESİ..... | İX |
| TABLolar LİSTESİ | Xİ |
| ÖZET | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 3 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 6 |
| 2.1. Kemik Dokusu ve Histolojisi | 6 |
| 2.1.1. Kemik Matriksi | 8 |
| 2.1.2. Kemik Hücreleri..... | 9 |
| 2.1.3. Kemik Büyüme ve Gelişim Evreleri | 11 |
| 2.1.4. Kemik Oluşum Tipleri | 11 |
| 2.2. Kırık..... | 14 |
| 2.2.1. Kırık İyileşmesi..... | 15 |
| 2.2.1.1. Kırık İyileşmesi Tipleri | 15 |
| 2.2.1.2. Kırık İyileşmesinin Kontrolü..... | 19 |
| 2.2.1.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler | 20 |
| 2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres | 23 |
| 2.3.1. Serbest Radikaller | 23 |
| 2.3.2. Serbest Radikallerin Kaynakları | 24 |
| 2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri | 25 |
| 2.3.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri..... | 27 |
| 2.3.4.1. Serbest Radikallerin Fizyolojik Etkileri | 28 |
| 2.3.5. Oksidatif Stres..... | 30 |
| 2.3.5.1. Oksidatif Stres ve Kırık İyileşmesi..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri | 33 |
| 2.4.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları | 33 |
| 2.4.2. Antioksidanların Sınıflandırılması | 34 |
| 2.4.2.1. Endojen Antioksidanlar | 34 |
| 2.4.2.2. Eksojen Antioksidanlar | 36 |
| 2.5. Proantosiyanidinler | 36 |
| 2.5.1. Proantosiyanidinlerin Antioksidan Özellikleri | 37 |
| 2.5.2. Proantosiyanidinlerin Metabolizma ve Toksisitesi | 40 |
| 2.6. Düşük Doz Lazer Tedavisi | 41 |
| 2.6.1. Lazerin Tanımı ve Tarihsel Gelişimi | 41 |
| 2.6.2. Lazer Işığının Özellikleri | 42 |
| 2.6.3. Lazer Doku Etkileşimi | 44 |
| 2.6.4. Diş Hekimliğinde Kullanılan Lazerler | 47 |
| 2.6.5. Düşük Doz Lazer Tedavisi | 49 |
| 2.6.5.1. Düşük Doz Lazer Tedavisinin Etki Mekanizması | 50 |
| 2.6.5.2. Dozaj ve Hesaplaması | 51 |
| 2.6.5.3. DDLT'nin Kemik İyileşmesine Etkisi | 51 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 54 |
| 3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler | 54 |
| 3.2. Çalışma Planı | 55 |
| 3.3. Deney hayvanları ve grupları | 55 |
| 3.3.1. Deney Hayvanlarının Sınıflandırılması | 56 |
| 3.3.2. Gruplara Göre Çalışma Teknikleri | 57 |
| 3.4. Cerrahi yöntem ve Postoperatif Bakım | 57 |
| 3.5. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Elde Edilmesi | 64 |
| 3.5.1. Ekstrenin Hazırlanması ve Uygulanması | 64 |
| 3.6. Düşük Doz Lazerin Uygulanması | 65 |
| 3.7. Sakrifikasyon | 65 |
| 3.8. Klinik İnceleme | 66 |
| 3.9. Biyokimyasal İnceleme | 67 |
| 3.10. Histolojik ve Histomorfometrik İncelemeler ve Örneklerin Hazırlanması | 67 |
| 3.10.1. Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme | 70 |

| | |
|--|------------|
| 3.11. İstatistiksel Yöntem..... | 71 |
| 4. BULGULAR..... | 72 |
| 4.1. Gözlemsel Bulgular..... | 72 |
| 4.2. Vücut Ağırlıkları | 72 |
| 4.3. Klinik İnceleme Bulguları | 74 |
| 4.4. Biyokimyasal Bulgular..... | 75 |
| 4.5. Histolojik, Histomorfometrik Analiz Bulguları | 77 |
| 4.5.1. 7. Gün Grupları | 77 |
| 4.5.2. 21. Gün Grupları | 81 |
| 4.5.3. Histolojik Değerlendirmeler | 84 |
| 4.5.3.1. Kontrol Grubu..... | 84 |
| 4.5.3.2. Ekstre Grubu..... | 86 |
| 4.5.3.3. Lazer Grubu..... | 89 |
| 4.5.3.4. Ekstre+Lazer Grubu | 91 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 94 |
| 6. KAYNAKLAR | 109 |
| 7. EKLER | 130 |
| 8. ÖZGEÇMİŞ | 131 |

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

| | |
|-----------------------------------|--|
| DDLT | Düşük Doz Lazer Tedavisi |
| ÜÇE | Üzüm Çekirdeği Ekstresi |
| PG | Prostaglandin |
| PGE1 | Prostaglandin E1 |
| PGE2 | Prostaglandin E2 |
| EGF | Epidermal Büyüme Faktörü |
| TGF-α | Transforme Edici Büyüme Faktörü - Alfa |
| PDGF | Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü |
| TGF-β | Transforme Edici Büyüme Faktörü - Beta |
| BMP | Kemik morfogenetik protein |
| FGF | Fibroblast Büyüme Faktörü |
| IGF | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü |
| IL | İnterlökin |
| PTH | Paratiroid Hormon |
| SR | Serbest Radikaller |
| SOR | Serbest Oksijen Radikalleri |
| ROT | Reaktif Oksijen Türevleri |
| O₂^{•-} | Süperoksit radikali |
| H₂O₂ | Hidrojen peroksit |
| OH[•] | Hidroksil radikali |
| GSH | Glutasyon |
| VİT E | E vitamini |
| VİT C | C vitamini |
| VİT A | A vitamini |
| GSH-Px | Glutasyon peroksidaz |
| SRT | Serbest Radikal Toplama |
| He-Ne | Helyum Neon |
| GaAlAs | Galyum Aliminyum Arsenid |
| NADH | Nikotinamid Adenin Dinükleotit |
| ALP | Alkalen Fosfotaz |

| | |
|------------|----------------------------|
| TAS | Total Antioksidan Seviyesi |
| TOS | Total Oksidan Seviyesi |
| OSI | Oksidatif Stres İndeks |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 1: Matür kemik dokusunun mimari yapısı..... | 7 |
| Şekil 2: Kemiğin hücresel elemanları ve osteoblastlarca yeni kemik matriksinin oluşturulması..... | 10 |
| Şekil 3: İntramembranöz kemikleşme, mezenkimal bağ dokusundan direkt kemik şekillenmesi | 12 |
| Şekil 4: Endokondral kemikleşme, birincil kemikleşme merkezinin oluşumu | 13 |
| Şekil 5: Kırık tipleri | 15 |
| Şekil 6: Sekonder kemik iyileşme dönemleri | 16 |
| Şekil 7: Kırık iyileşme aşamaları..... | 18 |
| Şekil 8: Serbest radikallerin temel yapısı | 23 |
| Şekil 9: Oksijen molekülünün dört aşamalı indirgenme tepkimeleri | 26 |
| Şekil 10: Serbest radikallerin hücreye etkileri | 27 |
| Şekil 11: ROT'nin vücuttaki etkileri | 29 |
| Şekil 12: Oksidatif stresin meydana geldiği durumlar..... | 31 |
| Şekil 13: Antioksidanların serbest radikali nötralize etmesi | 33 |
| Şekil 14: Lazer ışığının özellikleri..... | 43 |
| Şekil 15: Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan dental lazerlerin elektromanyetik spektrumdaki yerleri | 44 |
| Şekil 16: Lazerin doku tarafından absorpsiyonu, dokudan doğrudan geçişi, yansıması ve saçılması..... | 45 |
| Şekil 17: Çeşitli doku bileşenlerinin çeşitli dalga boylarındaki absorpsiyon eğrileri.... | 46 |
| Şekil 18: K7, E7, L7 ve EL7 gruplarına ait ortalama TAS değerleri | 76 |
| Şekil 19: K21, E21, L21 ve EL21 gruplarına ait ortalama TAS değerleri | 77 |
| Şekil 20: 7. gün gruplarının kapiller, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı ve kollajen lif skorlarına ait ortalama değerler | 79 |

| | |
|---|----|
| Şekil 21: K7, E7, L7 ve EL7 gruplarına ait ortalama kemikleşme ve osteoblast sayı değerleri | 80 |
| Şekil 22: 21. gün gruplarının kapiller, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı ve kollajen lif skorlarına ait ortalama değerler | 82 |
| Şekil 23: K21, E21, L21 ve EL21 gruplarına ait ortalama kemikleşme ve osteoblast sayı değerleri | 83 |

RESİMLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Resim 1: Ratların gruplandırılarak kafeslere yerleştirilmesi | 56 |
| Resim 2: Operasyon öncesi görünüm | 58 |
| Resim 3: a) Sağ mandibulada antero-posterior yönde yapılan insizyon, b) Diseksiyon sonrası mental sinir ve masseterin linea obliqua externaya yapışma yeri | 59 |
| Resim 4: Mandibulada rehber mikrovida deliğinin hazırlanması..... | 60 |
| Resim 5: Plağın gevşek şekilde yerleşimi..... | 61 |
| Resim 6: Rehber olukların oluşturulması | 61 |
| Resim 7: Kırık hattının freze edilmesi..... | 62 |
| Resim 8: Gevşek konumlu mikroplağın tam kırık sonrası sabitlenmesi | 62 |
| Resim 9: Operasyon sahasının propilen dikişler ile kapatılması | 63 |
| Resim 10: a) Üzüm çekirdeği ekstresi b) Orogastrik gavaj uygulaması..... | 64 |
| Resim 11: DDLT uygulaması | 65 |
| Resim 12: İntrakardiyak kan alımı ve santrifüye edilmesi | 66 |
| Resim 13: K7 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok: kapiller, ok başı: enflamatuar alan, K: Kemik, Hematoksilen eozin X40)..... | 84 |
| Resim 14: K7 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok: kapiller, ok başı: enflamatuar alan, K: kemik, Masson Trikrom x100)..... | 85 |
| Resim 15: K21 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok başı: enflamatuar alan, K: kemik, Hematoksilen eozin X40) | 85 |
| Resim 16: K21 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok: kapiller, ok başı: enflamatuar alan, K: kemik, Masson Trikrom x100)..... | 86 |
| Resim 17: E7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin X40)..... | 87 |
| Resim 18: E7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, Masson Trikrom x40)..... | 87 |

| | |
|--|----|
| Resim 19: E21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (İK: Kemik oluşumu, K: kemik, Hematoksilen eozin X40) | 88 |
| Resim 20: E21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x100)..... | 88 |
| Resim 21: L7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin X100)..... | 89 |
| Resim 22: L7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x40)..... | 90 |
| Resim 23: L21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin x100)..... | 90 |
| Resim 24: L21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x40)..... | 91 |
| Resim 25: EL7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin X100)..... | 92 |
| Resim 26: EL7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x100)..... | 92 |
| Resim 27: EL21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin x100)..... | 93 |
| Resim 28: EL21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x100)..... | 93 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Tablo 1: Kırık iyileşmesinin doğal süreci şu evreleri kapsamaktadır..... | 15 |
| Tablo 2: Serbest radikallerin kaynakları..... | 25 |
| Tablo 3: Hücre içi temel reaktif oksijen türleri..... | 26 |
| Tablo 4: Endojen antioksidanlar | 34 |
| Tablo 5: DeneY hayvanlarının gruplandırılması | 56 |
| Tablo 6: Klinik olarak kallus dokusunun değerlendirilmesi..... | 66 |
| Tablo 7: Parafin takip protokolü..... | 67 |
| Tablo 8: Hematoksilen-eozin boyama protokolü..... | 68 |
| Tablo 9: Mason trikrom boyama protokolü..... | 69 |
| Tablo 10: Histolojik değerlendirilmesinde kullanılan skorlama sistemi | 70 |
| Tablo 11: Histolojik değerlendirme kriterleri..... | 71 |
| Tablo 12: Başlangıç ağırlık ve deneY sonu ağırlık karşılaştırmaları | 72 |
| Tablo 13: DeneY sonunda gruplar arasındaki ağırlık farklarının karşılaştırılması | 73 |
| Tablo 14: Grupların klinik inceleme skorları | 74 |
| Tablo 15: K7, E7, L7 ve EL7 gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları | 75 |
| Tablo 16: K21, E21, L21 ve EL21 gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları | 76 |
| Tablo 17: İncelenen değişkenlere göre K7, E7, L7 ve EL7 gruplarının skorlarına ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları | 78 |
| Tablo 18: İncelenen değişkenlere göre K21, E21, L21 ve EL21 gruplarının skorlarına ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları | 81 |

ÖZET

ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİ (VİTİS VİNİFERA) VE DÜŞÜK DOZ LAZER TEDAVİSİNİN (DDLTL) KIRIK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN HİSTOMORFOMETRİK OLARAK İNCELENMESİ

Bilal EGE

Doktora Tezi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mutan Hamdi ARAS

Tez Ortak Danışmanı: Doç. Dr. Sevil KAHRAMAN

Haziran 2014, 145 sayfa

Bu çalışmanın amacı üzüm çekirdeği ekstresi (ÜÇE) takviyesi ve düşük doz lazer tedavisi (DDLTL)'nin deneysel mandibula kırıklarında kırık iyileşmesi, oksidan ve antioksidan sistem üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Çalışmamızda 48 adet yetişkin erkek Wistar Albino rat kullanılmıştır. Tüm deneklerin sağ mandibularında molar dişler arasından geçen dikey bir kırık hattı oluşturulmuş ve kırık dört delikli bir mikropalak ve dört mikrovida yardımıyla internal olarak fikse edilmiştir. Denekler her biri 12 hayvan içerecek şekilde rastgele önce 4 ana gruba (Kontrol, ÜÇE, DDLTL, ÜÇE+DDLTL), sonrasında bu gruplar kendi içerisinde 7. ve 21. günler olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Toplamda 8 (n=6) grup oluşturulmuştur. ÜÇE deneklere sakrifiye edilecekleri güne kadar 300 mg/kg/gün olacak şekilde verilmiştir. DDLTL uygulaması ise 7. gün gruplarında 7 gün; 21. gün gruplarında ise 14 gün süreyle 48 saat aralıklarla kırık hattı boyunca 2 farklı noktaya 23 J/cm² dozda uygulanmıştır. Biyokimyasal incelemeler sonucu gruplarda gerek 7. gün gerekse 21. günde sadece TAS değerleri açısından istatistiksel anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur. Histolojik incelemeler sonucunda mandibular kırık iyileşmesinin ÜÇE+DDLTL ve ÜÇE gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha iyi olduğu bulunmuştur. Tek başına DDLTL grubu ise iyileşme için yeterli etkiyi gösterememiş, ancak ÜÇE+DDLTL kombine uygulandığında kemikleşmenin en yüksek seviyede olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Düşük doz lazer tedavisi, Kırık iyileşmesi, Oksidatif stres, Serbest Radikaller, Üzüm çekirdeği ekstresi.

ABSTRACT

HISTOMORPHOMETRIC ANALYSIS OF THE EFFECTS OF GRAPE SEED EXTRACT (VITIS VINIFERA) AND LOW-LEVEL LASER THERAPY (LLLT) ON FRACTURE HEALING

Bilal EGE

Ph.D Thesis, Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Supervisors:

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mutan Hamdi ARAS

Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Sevil KAHRAMAN

June 2014, 145 pages

The aim of this study was to research the effect of Grape Seed Extract (GSE) and Low Laser Level Therapy (LLLT) on the healing of experimentally fractured mandible and their effect on the oxidant and antioxidant system. Our study included 48 adult male Wistar Albino rats. A vertical fracture line were performed in right mandibule passed between the molar teeth of all experimental animals, then the fracture line were fixed internally with four-holed microplate and four micro screw. Subjects were divided randomly to four groups (Control, GSE, LLLT, GSE+LLLT) so that each group included 12 animals, then each group were subdivided to two groups according to the 7th and 21st day of the experiment and thus 8 (n=6) groups were formed. GSE was given to the subjects as 300 mg/kg/day until the day they were sacrificed. LLLT was applied to the 7th day groups for 7 days and to the 21st day for 14 days with 48 hour intervals on 2 different points along the fracture line at a dose of 23 J/cm². According to the biochemical investigations made in both 7.th and 21st day, only TAS values were found to be statistically significant difference. The histological examinations showed that the fracture healing in GSE+LLLT and GSE groups were found to be significantly better than the control group. Only the LLLT group was not able to show sufficient efficacy for healing, however when it used combined with the GSE, the highest level of ossification was detected.

Keywords: Low-level Laser therapy, Fracture healing, Oxidative stress, Free radicals, Grape seed extract

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kemik dokusu; organ ve sistemlerin korunmasında ve organizmanın metabolik açıdan desteklenmesinde görev alan önemli bir dokudur (1). Kemiğin mevcut anatomik bütünlük ve devamlılığının doğrudan ya da dolaylı müdahaleler sonucu bozulması ise kırık olarak adlandırılır.

Günümüzde gelişen teknolojiyle beraber artan trafik ve iş kazalarına bağlı olarak kırıkların sık görülmesi; kırık iyileşmesini hastalar açısından önemli bir sağlık problemi haline getirmiştir (2). Ülkemizde de her yıl yaşlı ve genç tüm popülasyonda pek çok insan çene ve yüz yaralanmalarına maruz kalmakta ve bunların birçoğu kırık ile sonuçlanmaktadır. Kırık oluşumunun sıklığı ve tedavisinin zorluğu düşünüldüğünde bu konu; kişi adına hem beden ve ruh sağlığı açısından, hem de ekonomik açıdan oldukça zor bir süreçtir. Bu açıdan çene kırıklarında, kemiğin komplikasyonsuz ve kısa sürede iyileşmesi tedavinin başarısında büyük öneme sahiptir.

Kırık oluşumu sadece kemiğin değil, çevre yumuşak dokuların da değişik oranlarda zarar gördüğü bir olaydır. Mevcut kırığın iyileşmesi ise ancak kompleks birtakım hücresel ve biyokimyasal süreçler sonunda gerçekleşir (3). Fakat beslenme bozuklukları, yaş, sigara ve alkol kullanımı, sistemik hastalıklar, hormonlar ve büyüme faktörlerinin yanı sıra; yaralanmanın şiddeti, kemik ve yumuşak dokudaki hasarın boyutu, kırık bölgesindeki lokal kan akımının azalması gibi kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etki yapabilen pek çok lokal ve sistemik faktör ile iyileşme süreci sağlıklı bir şekilde devam edememektedir (4). Bu nedenle hücresel aktivitenin stimüle edilerek kemik iyileşmesini hızlandırmak ve dolayısıyla hastaların işlevlerini daha kısa sürede kazanmalarını sağlamak amacıyla çeşitli kimyasal uyarılar, otojen kemik greftleri, biyomateryaller, kemik morfogenetik proteinleri, hiperbarik oksijen, elektromanyetik alan ve ultrason gibi çeşitli uygulamalar gerçekleştirilmektedir (5-7). Ancak günümüzde her ne kadar yeni tedavi yöntemleri ve cerrahi teknikler kullanılsa da kırık vakalarının % 5-10 civarında hala kaynamama veya geç kaynama gibi problemler görülmektedir (8, 9). Bu nedenle kırık iyileşmesinin bilinmeyen yönlerini ortaya koyacak, bu süreci olumlu ya da olumsuz yönde etkileyen faktörleri daha net tanımlayacak çalışmalar devam etmekte ve halen güncelliğini korumaktadır.

Bu açıdan günümüzde kullanılan güncel bir diğer tedavi yaklaşımı da yumuşak ve sert doku iyileşmesi üzerine antienflamatuvar, biyostimülan ve yara iyileştirici etkilere sahip olduğu belirlenen Düşük Doz Lazer Tedavisi (DDLTL)'dir. Lazer tedavisinin kemik hücrelerinin proliferasyonunu hızlandırdığı ve yeni kemik oluşumunu arttırdığı, kemik iyileşme süresini kısalttığı yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (10-12). Literatürde bu amaçlarla farklı dalga boyu ve dozlarda birçok uygulamanın yapıldığı görülmektedir. Ancak çalışmaların çoğunda lazerin olumlu etkileri gözlemlenirken henüz standart bir tedavi protokolü bulunmamaktadır.

Cerrahi işlemi takiben ilk bir aylık süreç gerek ossifikasyonun oluşmaya başlaması gerekse bu dönemin kemik iyileşmesinde ki en kritik iyileşme dönemi olması nedeniyle oldukça önemlidir. Son yıllarda serbest oksijen radikallerinin de kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi olan faktörler arasında bulunduğu ve bu radikallerin özellikle kırık iyileşmesinin erken dönemlerinde fazla miktarda açığa çıktığı belirtilmiştir (13).

Serbest oksijen radikalleri; dış yörüngelerinde en az bir adet eşleşmemiş elektron içeren yüksek reaktiviteye sahip, yarı ömrü kısa moleküllerdir. Diğer radikallerle ya da radikal olmayan normal hücre bileşenleriyle kolaylıkla tepkimeye girip DNA'nın, proteinlerin ve hücre membran lipidlerinin yıkımı gibi birçok hücre hasara yol açarlar (14). Yapılan araştırmalar, diabetes mellitus, aterosklerozis, kalp hastalıkları, otoimmün hastalıklar, kanser gibi pek çok hastalığın ortaya çıkmasında ve yaşlanmanın patogeneğinde önemli bir etken olan hücre hasarının, serbest radikallere bağlı olarak ortaya çıkabildiğini göstermiştir (15).

Vücutta oluşabilecek bu hasarı engellemeye yarayan moleküllere ise antioksidan denilmektedir ve organizmada oksidan ve antioksidan sistem hassas bir dengeye sahiptir. Kırık oluşumu ve takiben erken dönemde gelişen olaylar sonucu bu dengenin bozularak iyileşme sürecinde oksidatif stresin ortaya çıkıyor olması araştırmacıları antioksidan özelliği bilinen moleküllerin, ajanların bu süreç üzerine olan etkilerini incelemeye sevk etmiştir. Antioksidanların bir kısmı vücutta üretilebildiği gibi serbest radikallerin aşırı miktarda açığa çıktığı durumlarda gereksinim duyulduğunda dışarıdan da alınabilmektedir. Eksojen kaynaklı antioksidanlara verilebilecek en güzel örneklerden bir tanesi de proantosiyanidinlerdir. Yapılan çalışmalarda proantosiyanidinlerin güçlü antioksidan özellikleri ile oksidatif hasara neden olan

serbest radikallerin inhibisyonunu sağladıkları gösterilmiştir (16). Botanik terminolojisinde Vitis Vinifera olarak tanımlanan, dünyada yaygın bir şekilde üretimi yapılan ve tüketilen bir meyve olan üzüm özellikle proantosiyanidinler açısından oldukça zengin bir kaynaktır.

Deneysel hayvan modellerinde, bilinen antioksidanlardan olan vitamin C, vitamin E, allopurinol ve N-asetil sisteinin kırık iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ancak literatürde E ve C vitaminleri gibi antioksidan etkinliği iyi bilinen maddelere kıyasla daha güçlü bir antioksidan olan üzüm çekirdeği ekstresinin kırık iyileşmesi üzerine etkisi henüz araştırılmamıştır. Ayrıca DDLT'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen çalışmalar çok sayıda bulunsa da ÜÇE ile birlikte kemik veya kırık iyileşmesi üzerine etkinliğini inceleyen herhangi bir çalışmaya da rastlanılmamıştır.

Tüm bu nedenlerle çalışmamızda diş hekimliği ve özellikle ağız, diş ve çene cerrahisi pratiğinde önemli bir yere sahip olan mandibula kırıklarında ÜÇE ve DDLT'nin kırık iyileşmesi ve oksidan / antioksidan sistem üzerine olan etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu ve Histolojisi

Kemik dokusu; organizmanın ana iskelet yapısını oluşturan ve üzerine yapışan kasların düzenli kasılması ile vücudun hareket etmesini sağlayan ekstrasellüler matriksi kalsifiye olmuş özel bir bağ dokusudur. Hayati önem taşıyan organları hem koruması hemde destek olmasının yanında yapısında kemik iliğini barındırır ve böylece kan hücrelerinin sentezlenmesinde aktif rol oynar. Ayrıca kalsiyum, fosfat ve diğer temel iyon ve minerallerin vücuttaki konsantrasyonunun sağlanmasında bir depo olarak görev alır. Vücudun en sert dokularından biri olmasının yanında üzerine gelen fizyolojik ve mekanik uyarılara göre kendini şekillendirebilen dinamik bir yapıdır ve bu özelliği sayesinde kendini onarabilip yenileyebilmektedir (17).

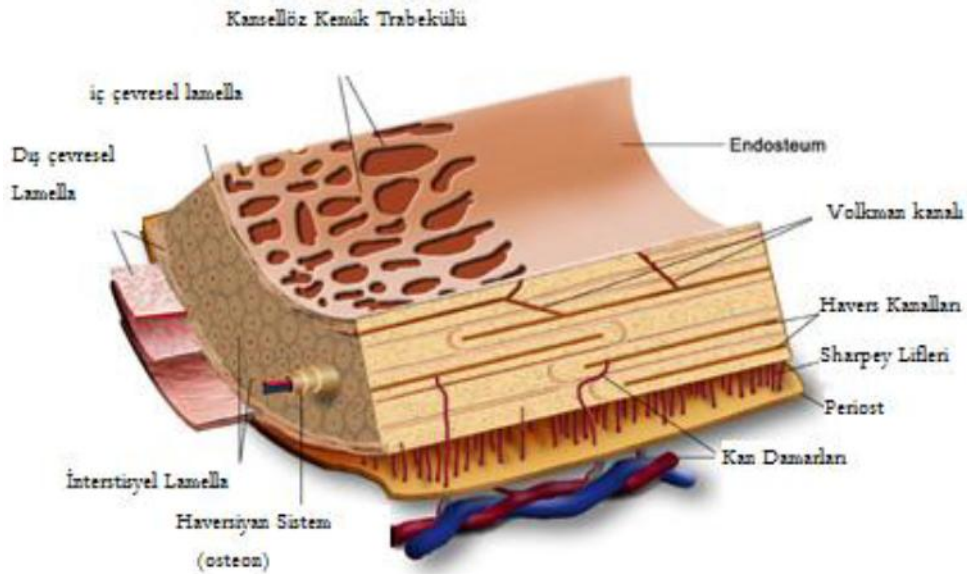
Kemik esas itibarıyla hücreler arası kalsifiye matriks ve bu matriks içinde dizilim gösteren hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler osteositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteoprogenitör hücrelerdir. Kemik matriksi ise kemiğe esnekliğini veren organik maddeler ve sertliğini veren inorganik tuzlar olmak üzere iki ana kısımdan meydana gelir. Bunlardan kemiğin kuru ağırlığının 2/3'lük kısmını oluşturan inorganik matriks, temel olarak hidroksiapatit kristallerinden oluşurken; organik matriks ise temel olarak %90-95 oranında Tip-1 kollajen ve bunun yanında glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşmaktadır (18).

Olgun kemiğin yapısı makroskopik olarak incelendiğinde merkezinde yağlı ya da hematopoetik doku içeren kemik iliği, bunu çevreleyen kemik dokusu ve bu dokunun iç ve dış yüzeyini örten kemik zarlarından meydana gelir. Bu zarlardan kemiğin dış yüzeyi; osteoprogenitör hücrelerce zengin ve kemikle doğrudan teması olan periosteum ile kaplıyken; iç yüzeyi ise kan damarlarından zengin, osteoprogenitör ve osteoblastlardan oluşan özel ince bir bağ dokusu olan endosteum ile örtülüdür (19). Mikroskopik düzeyde incelendiğinde ise yeni kemik dokusu içerdiği liflerin oryantasyonuna göre başlangıçta woven (örgü) kemik olarak adlandırılan kalın, düzensiz kollajen organizasyonu ile karakterize bir formdadır. Yapım ve yıkım döngüsü artmıştır ve dolayısıyla immatür kemik daha zayıf ve esnektir. Örgü kemik kırık iyileşmesinin erken aşamasında oluşur ve sonrasında organize olarak kollajen liflerin

daha düzenli konumlandığı lamellar kemiğe dönüşür. Lamellar kemik ise mevcut kemik yüzeyi üzerinde devam eden kemik apozisyonu sonucu çok katlı yapıya sahiptir. Bu süreç sonunda osteon olarak adlandırılan çok katmanlı birimler oluşmaktadır (20).

Lameller kemik, yapısal olarak kortikal (kompakt) kemik ve kanselloz (spongiöz) kemik olmak üzere iki tipe ayrılır. Kortikal kemik makroskobik düzeyde bakıldığında homojen görümlü, mikroskobik düzeyde ise kemiğin uzun eksenine ve birbirlerine paralel uzanan, çapları 20–110 mikrometre arasında değişen Havers kanallarından oluşur. Ayrıca kemiğin uzun eksenine dik ya da oblik yönde uzanan ve havers kanallarını besleyen damarları ihtiva eden, kanalları birbirlerine bağlayan Volkmann kanalları bulunmaktadır (Şekil 1) (20, 21).

Spongiyöz kemik ise etrafı kompakt kemik ile sarılı ve iç kısmında üç boyutlu ağ şeklinde bağlantı yapmış sünger yapısındaki kemik trabeküllerinden oluşur. Bu tip kemik içerisinde ise havers ve volkmann kanalları nadir olarak seyreder (22).



Şekil 1: Matür kemik dokusunun mimari yapısı (23)

2.1.1. Kemik Matriksi

Kemik matriksi; kemiğe esnekliğini veren organik ve sertliğini veren inorganik maddeler olmak üzere iki ana bileşenden meydana gelmektedir.

Organik madde

Organik kısım kemiğin kuru ağırlığının % 35'ini oluşturur ve Tip I kollajen lifleri, (% 90-95) kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asitten zengin proteoglikanları ve kollajen olmayan proteinleri içermektedir (24). Organik matriksin kalsifikasyonu Tip 1 kollajenlerin sonlanma bölgelerinde bulunan boşluklara mineral birikimiyle sağlanmaktadır. Osteoblastlar tarafından sentezlenen kemik glikoproteinleri (osteokalsin, osteopontin ve osteonektin) bu kalsifikasyonunun başlatılmasından sorumludurlar (24). Dolayısıyla vücutta Tip I kollajen içeren ancak bu kemik glikoproteinlerini içermeyen diğer dokular ise kalsifiye olamazlar (25).

İnorganik madde

İnorganik kısım ise kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık % 65'ini oluşturur ve başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere; bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum gibi mineralleri içermektedir. Bu mineraller kollojen fibrillerinin arasında ve içinde genel formülü $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ olan hidroksiapatit kristalleri şeklinde yer alır ve Tip I kollajen lifleri boyunca uzanırlar (19, 25). Ayrıca hidroksiapatit kristallerin üzerinde su ve iyonlardan oluşan, hidrasyon kabuğu denilen bir tabaka bulunmaktadır. Bu tabaka ile vücut sıvı-iyon dengesi sağlanır (25).

Kemiğin gerek sertliği ve gerekse dayanıklılığı; yapısını oluşturan kollajen ile bu hidroksiapatit kristallerinin birlikteliğine bağlıdır. Örneğin kemik doku dekalsifiye edildiğinde normal şeklini korur ancak oldukça esnek bir hal alır. Şayet organik bölüm kemikten uzaklaştırılırsa kemik şeklini yine korur ancak bu kez oldukça kırılma eğilimindedir (19).

2.1.2. Kemik Hücreleri

Kemiğin temel hücresel elemanları mezenkimal kaynaklı osteoblastlar, osteositler ve bu hücrelerin öncü hücreleri olan osteoprogenitor hücreler ile hematopoetik sistem kaynaklı osteoklast hücrelerinden oluşmaktadır (26).

Osteoprogenitör hücreler

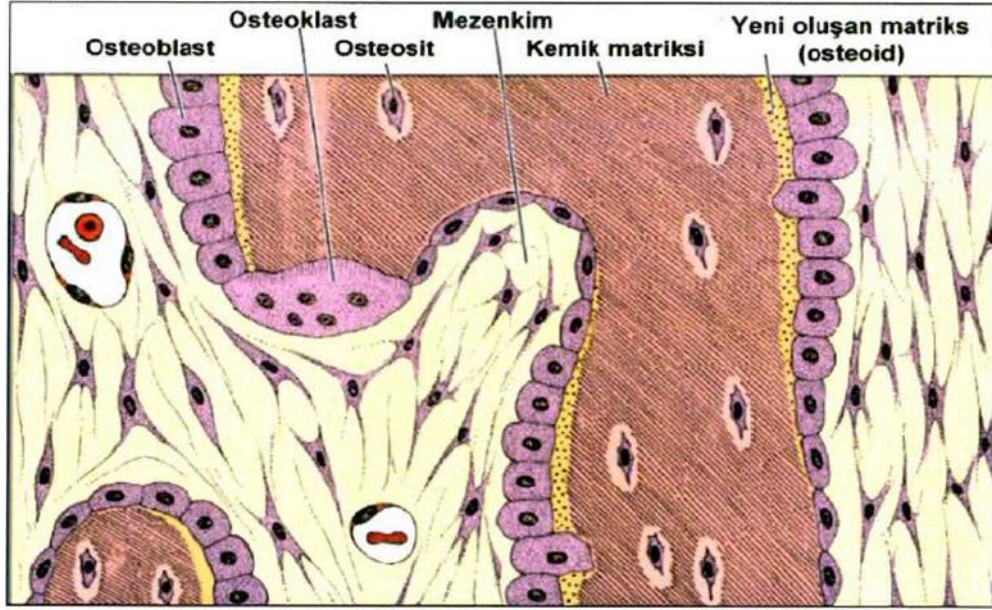
Bu hücreler çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahip olup, postnatal yaşam boyunca kemiğin yapısında bulunurlar. İğsi şekilli olup periosteumun sellüler iç tabakasında ve havers kanallarını çevreleyen endosteumda bulunurlar.

İhtiyaç halinde erişkin hayatında kemik internal reorganizasyonu, kırık iyileşmesi veya farklı tipteki yaralanma durumlarında aktive olarak, osteoblast veya osteoklast gibi diğer tip kemik hücrelerine de dönüşebilirler (24, 27). Ayrıca bu hücreler düşük oksijen basıncı altındaki belli durumlarda kondrojenik hücrelere de farklılaşabilirler.

Osteoblastlar ve Osteositler

Osteoprogenitör hücrelerden köken alan osteoblastlar, kübik ya da silindirik şekillidirler ve tek tabaka halinde aktif kemik oluşumunun olduğu bütün bölgeleri kaplarlar. Kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden sorumlu olan bu hücreler mineralize olmamış organik matriksin (osteoid) kalsifikasyonunu başlatır ve kontrol ederler (Şekil 2) (19, 25).

Osteoblastlar, kemik proteinlerinin %90'ını oluşturan Tip 1 kollajeni, kemik matriks proteinlerini ve büyüme faktörlerini salgırlar. Bunun yanısıra osteoklastlarla beraber kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde de etkilidir. Osteoblastlar kemik oluşumu tamamlandıktan sonra sert matriks içine gömülerek osteosit adını alır ve kendi çevrelerine az miktarda matriks sentezleyerek bölünemez bir yapıya bürünürler (19). Osteositler laküna denen lameller arasındaki küçük boşluklarda yer alırlar. Komşu lakünalar lameller boyunca ilerleyen kanaliküller ile birbirlerine bağlanarak besin maddelerinin hücreden hücreye geçişini sağlarlar. Kemiğin ekstrasellüler matriksinin devamlılığının korunması için önemli rol oynayan osteositler kemik matriksinin bakımından da sorumludurlar ve herhangi bir nedenle ölümlerini takiben matrikste çözünmeler görülür (25).



Şekil 2: Kemiğin hücresel elemanları ve osteoblastlarca yeni kemik matriksinin oluşturulması (17)

Osteoklastlar

Osteoklastlar ise kemik iliğindeki monosit-makrofaj progenitör hücrelerden köken alan, çok çekirdekli büyük hücrelerdir. Kemiğin rezorbsiyonundan sorumludurlar ve Howship lakünleri adı verilen yüzeysel çukurların içine yerleşmişlerdir (19). Hücrelerin kemik matriksine bakan yüzünde düzensiz yapıda fırçamsı kenarları bulunur ve bu bölge kemik rezorbsiyonu için mikro çevre oluşturmakla görevlidir. Kemik matriksini rezorbe edebilen asit, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerin osteoklastlarca salınması ve bu enzimlerin hedef kemik matriksine bağlanması ile rezorbsiyon için pH'nın yaklaşık 3,5 olduğu asidik bir çevre meydana gelir. Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi çözünür serbest hale getirirler. Ayrıca kemik rezorbsiyonu sırasında meydana gelen atıkların da ortadan kaldırılmasını sağlarlar (28). Bu süreç çeşitli bölgelerdeki kemiğin rezorbsiyonunu takiben osteoblastlar tarafından oluşturulan yeni kemik ile yer değişimini içerir. Osteoklastlar, bu şekilde kemiğin yapım ve yıkım olayları sonucu yeniden şekillenmesinde osteoblastlarla beraber önemli rol almış olurlar.

2.1.3. Kemik Büyüme ve Gelişim Evreleri

Kemiğin enine büyümesi ya da genişlemesi yüzeyindeki periost tabakasından kaynağını alan osteoblastlar sayesinde gerçekleşirken; boyuna uzama ise kırıldak taslağın zamanla yeni kemik dokusuyla düzenli olarak yer değiştirmesi sayesinde olur.

Şekillenme (modelling)

Kemik dokuda büyüme ve şekillenme süreçleri birbirlerine eşlik eden olaylardır. Rezorpsiyonu takiben yeni kemik yapım mekanizmaları sayesinde kemik yüzeylerine daha fazla kemik dokusu eklenmesi ya da var olan kemik dokusunun azalması şeklinde oluşabilmektedir. Bu şekilde kemiklerin ve eklemlerin büyüklük, şekil, hacim ve büyümesi kontrol edilir. Korteks ve ilik kaviteilerinin genişlemesi, uzun kemiklerin uç kısımlarının şekillendirilmesi veya kraniyal boşluğun genişlemesi bu şekillenmenin bir sonucudur. Şekillenme kişinin doğumdan olgunlaşma dönemine kadar olan süreçte artarken; erişkinlik döneminde ise etkinliğini kayberder (29).

Yeniden şekillenme (remodelling)

Kemiğin yeniden şekillenmesi ile biyomekanik ve metabolik olarak çevre şartlarına uygun bir kemik elde edilmiş olunur. Eksilen kemiğin yerine konması ve düşük kaliteli kemiğin yerine yeni lameller kemik yapımı süreçleri de yeniden şekillenme ile tamamlanır. Sonuçta yeniden şekillenme ile kemiğin mikro mimari yapısı düzenlenmiş olur. Yeniden şekillenme, şekillenmenin aksine bireyin hayatı boyunca devam eder (30).

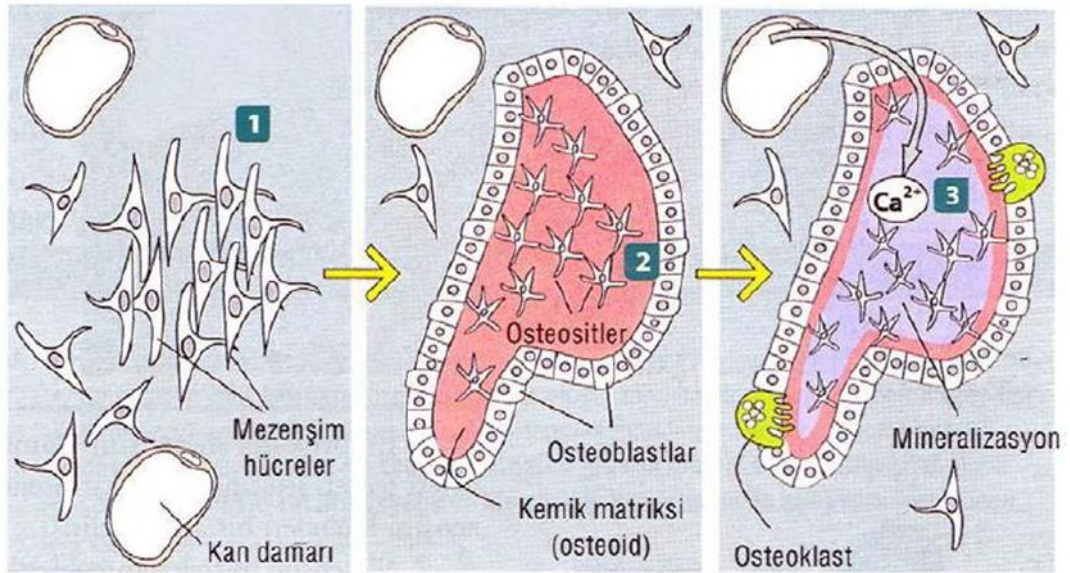
2.1.4. Kemik Oluşum Tipleri

Kemik oluşumu, osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu ile (intramembranöz) kemikleşme, kırıldak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile (enkondral) kemikleşme veya mevcut kemiğin üzerine yeni kemiğin birikmesi (appozisyonel kemikleşme) mekanizmaları ile gerçekleşir (24, 25).

İntramembranöz kemikleşme

İntramembranöz kemikleşmede kıkırdak bir model bulunmamakla beraber bağ doku desteğiyle matriksin doğrudan doğruya kalsifikasyonu gerçekleşir. Farklılaşmamış mezenkimal hücreler kemik yapım sahasına tabakalar halinde birikir ve dokunun kan damarlarından zenginleşmesi ile mezenkim doku içinde bol miktarda kapiller içeren bir ağ oluşur. Sonrasında mezenkim hücreleri kan damarı, fibroblast ve osteoprogenitör hücreleri içeren organik matriksi sentezler. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşür ve osteoblastlar da daha sonra mineralize olacak olan organik kemik matriksini biriktirir. Bu matriksin yüzeyini zamanla osteoblastlar kaplar ve hızla yeni kemik matriksini ilave ederler. Matriksle çevrelenen osteoblastlar ise osteositlere dönüşür. Sonuçta oluşan osteoid matriks mineralize olarak olgun kemik halini alır (Şekil 3) (21).

Bu kemikleşme tipi; vücudumuzda mandibula, kraniyum kubbesi, pariyetal kemikler, oksipital ve temporal kemiklerin skuamöz kısımları, ilium, klavikula ve skapula gibi yassı kemiklerin embriyolojik gelişiminde aktif rol alır. Bunun yanında kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında da rol oynar. Ayrıca doğumdan sonra, kemik defektlerinin rejenerasyonu ve kırık iyileşmesi sırasındaki periosteal iyileşmesi de bu mekanizma ile gerçekleşir (31).

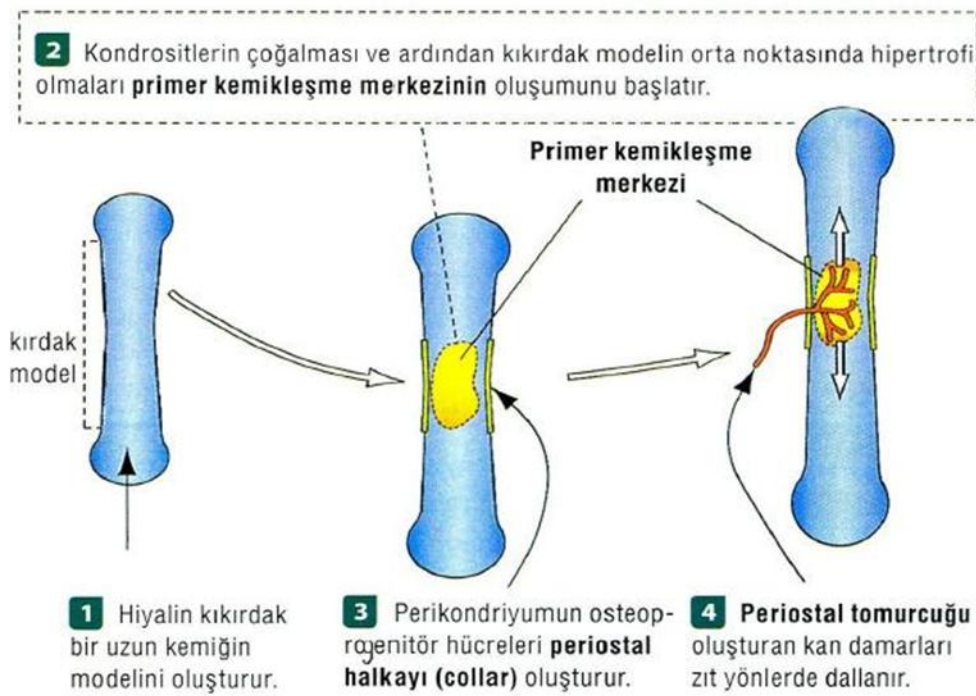


Şekil 3: İntramembranöz kemikleşme, mezenkimal bağ dokusundan direkt kemik şekillenmesi (24)

Endokondral kemikleşme

Bu kemikleşme tipi ise mineralize kıkırdağın, taslak olarak kullanılıp kemik dokuya çevrilmesiyle oluşur, yani kemik oluşumu için mezenkim dokudan önce hiyalin yapıda kıkırdak bir çatının varlığı gereklidir. İki aşamada oluşur. Öncesinde hiyalin bir kıkırdak çatının oluşması ve takiben yeni kemik oluşumdur. Hiyalin kıkırdaktan indirekt olarak kemik oluştuğu ve bu kıkırdağın da yıkımı gerektiği için intramembranöz kemikleşmeye göre çok daha karmaşık bir süreçtir.

Endokondral kemikleşme farklılaşmamış hücrelerin bir araya gelerek kondrositlere dönüşmesi ve bu hücrelerin de kıkırdak matriksi sentezlenmesiyle başlar. Bazı bölgelerde kıkırdak matriksi mineralize olurken, kondrositler genişler, damarlardan kıkırdağa doğru invazyon olur ve kan yoluyla gelen hücreler kıkırdağın merkezini rezorbe ederek medüller boşluğu oluştururlar. Bölgedeki osteoprogenitör hücreler ise osteoblastlara dönüşür ve mineralize kıkırdakta osteoid matriksi oluştururlar (Şekil 4).



Şekil 4: Endokondral kemikleşme, birincil kemikleşme merkezinin oluşumu (24)

Daha sonra osteoklastlar bu kalsifiye kıkırdak ve olgunlaşmamış kemiği rezorbe eder ve takibinde osteoblastlar rezorbe olan kalsifiye kıkırdak ve olgunlaşmamış kemik karışımının yerine olgun lameller kemiği oluşturur (31, 32). İskelet sistemimizi

oluşturan kemiklerin büyük çoğunluğu endokondral kemikleşme ile meydana gelir. Ayrıca doğumdan sonra sabit fiksasyon yapılamayan koşullardaki kırık iyileşmesinde rol alır.

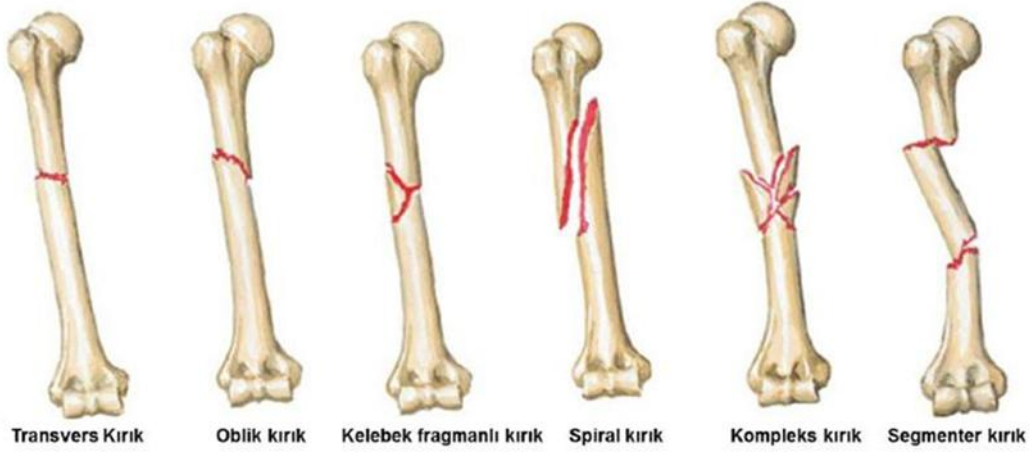
Appozisyonel kemikleşme

Kemiğin enine genişlemesi ve remodelasyonu ise bu şekilde olur. Periost içindeki osteoblastlarca sentezlenen osteoid ile tabakalar halinde yeni kemik oluşumu gerçekleşir. Endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin aksine mevcut kemik yüzeyinde osteoblastların doğrudan birikmesi ile başlar. Bu hücreler osteoid dokuyu sentezlerler ve sonrasında bu dokunun kalsifikasyonu ile tabakalar halinde lameller kemik oluşur (20).

2.2. Kırık

Kırık, kemiğin anatomik bütünlüğünün doğrudan ya da dolaylı müdahaleler sonucu bozulmasıyla ortaya çıkan patolojik bir olaydır.

Kırık oluşumuna sebep olan kuvvetler sadece kemik dokuyu etkilemekle kalmaz; kaslar, tendonlar, ligamentler, damar sinir paketi ve cilt gibi çevre yumuşak dokuları ve hatta komşuluğundaki organları dahi hasara uğratabilir (31, 33). Kırıklar bu duruma neden olan kuvvetlerin şiddetine ve kemiğin bu kuvvetleri absorbe edebilme yeteneğine göre ufak bir çatlaktan (fissür), bir veya birçok kemiğin kırılmasına ve hatta komşu eklemlerde çıkık oluşturabilmesine kadar değişiklik gösterebilirler (Şekil 5). Kırık oluşmasından sonra kemik iliği boşluğu, korteks, periosteum ve dış yumuşak dokularda mekanik, moleküler ve biyolojik faktörlerin etkileşimi ile bozulan bütünlüğün yeniden sağlanmasına yönelik çeşitli fizyolojik reaksiyonlar başlar (34).



Şekil 5: Kırık tipleri (35)

2.2.1. Kırık İyileşmesi

Kırık iyileşmesi yaralanma anından başlayıp skar bırakmaksızın, düzenli kemik doku ile kemik uçları birleşinceye kadar devam eden bir süreçtir. Ayrıca birçok özelleşmiş hücre tipinin rol oynadığı kırık iyileşmesi, iyileşme evrelerinin kesin sınırlarla birbirinden ayrılmadığı, her bir evrenin kendisinden önceki ya da sonraki evre ile ilişkili olduğu fizyolojik bir süreçtir (Tablo 1) (34).

Tablo 1: Kırık iyileşmesinin doğal süreci şu evreleri kapsamaktadır: (36)

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

2.2.1.1. Kırık İyileşmesi Tipleri

Kemiklerde meydana gelen kırıkların iyileşmesi 2 yolla gerçekleşir ve kemiğin kırığa vereceği biyolojik cevap uygulanan tedavi yöntemi ile değişebilir.

Primer (direkt) iyileşme

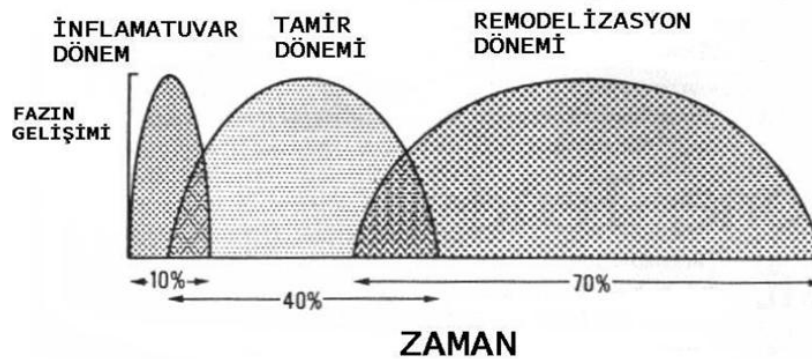
Kırık uçlarının tam redüksiyonu (internal fiksasyon) sonrası görülen iyileşme türüdür. Primer (direkt) kırık iyileşmesinde en önemli koşul tam anlamıyla sabit bir tespit (stabilizasyon) ve mükemmel bir anatomik redüksiyon sağlanmasıdır (34). Bu da genelde en iyi kompresyon plakları ile sağlanmaktadır. Kompresyon plakları, kemiğe sabitlenirken kırık uçlarını da birbirine iyice yaklaştıran araçlardır. Bu sıkı temas sonucu ise kırık uçları arasına hücrel invazyon gerçekleşemez ve kallus oluşmaz. Bu bölgede eğer tespit tam olarak sağlanabilirse; fibröz ve kondral iyileşme safhaları olmadan doğrudan kortikal remodilazasyon yoluyla intramembranöz kemikleşmeyle sonuçlanır. Bu tür iyileşme kırık bölgesinde kesin hareketsizlik gerektirdiğinden daha nadir rastlanan bir iyileşme modelidir.

Sekonder (indirekt) iyileşme

Bu iyileşme türü rijit fiksasyon olmaksızın kırık hattında tam bir hareketsizlik sağlanamazsa meydana gelen doğal iyileşme şeklidir. Anatomik olmayan redüksiyonlar sonrası kallus gelişimi ile kendiliğinden oluşmakta olup kırık iyileşmesinin çok büyük bir bölümünü oluşturmaktadır.

Sekonder kırık iyileşmesi dört evrede gerçekleşir (Şekil 6) (34, 37).

- Enflamasyon fazı
- Granülasyon dokusu fazı
- Kallus fazı
- Yeniden şekillenme fazı



Şekil 6: Sekonder kemik iyileşme dönemleri

Enflamasyon fazı

Tüm doku travmalarında olduğu gibi kırık oluşumunda da ilk verilen yanıt enflamasyondur. Travmanın şiddetine bağlı olarak kemiğin kırılmasıyla sadece kemik değil; kan damarları, kas ve periosteum da zarar görür.

Kırık oluşumunu takiben önce geçici arteriyel daralma; sonrasında ise hem arteriol ve venüller hem de kılcal damarlarda genişleme gözlenir. Böylece, aktif enflamatuar mediatörlerin yardımıyla vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem meydana gelir. Pıhtılaşmanın başlamasıyla da kırık uçları arasında ve etrafında hematoma meydana gelir. Hematom; kırık iyileşmesinde kritik öneme sahip hücre göçü, periostal hücre çoğalması ve matriksinin sentezi gibi hücresel faaliyetlerin başlamasını sağlayan büyüme faktörü, prostaglandinler ve sitokinleri içerir. Oluşan hematoma 48 saat içinde organize olmasıyla fibrinden bir yapı oluşur. Sonrasında enflamatuar hücreler, polimorf çekirdekli lökositler ve ardından makrofajlar ve lenfositler kırık bölgesine göç ederler. Bu dönemde kırık alanını dolduran hematoma, takip eden 3 ya da 4 gün içinde fibrovasküler granülasyon dokusu ile yer değiştirir (19, 20, 34)

Granülasyon dokusu fazı

Bu süreçte öncü hücreler yeni damarlaşma, fibroblast, hücreler arası madde ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşarak var olan hematoma organize etmeye başlarlar. Böylece öncü hücrelerin organizasyonu ve ayrışmasıyla oluşan yumuşak granülasyon dokusu kırık bölgesinde bir miktar stabilite temin eder. Kallus adı verilen ve yara bölgesini bir zarf gibi çevreleyip bölgenin hareket etmemesini sağlayarak iyileşmeye yardımcı olduğu düşünülen bu yapı fibröz doku, kırıldaktan ve olgunlaşmamış kemik dokusundan oluşur (38).

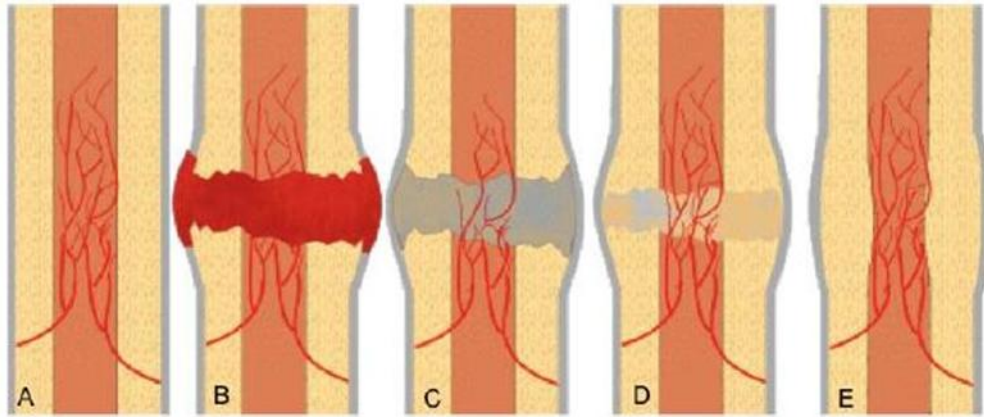
Tamir sürecinde rol oynayan bu öncü hücrelerin büyük bir kısmının granülasyon bölgesinden, periosteum ve endosteumdan salgılandıkları, mezenkimal kaynaklı oldukları ve kollajen, kırıldak ve kemik dokusunu oluşturdukları bilinmektedir. Fibroblastlar kollajen, kondroblastlar kollajen ve glikoaminoglikanları, osteoblastlar ise osteoid maddeyi salgırlarlar.

Kallus fazı

Bu dönemde esas itibariyle osteoid doku ve kırıkta daki matriksin mineralizasyonu söz konusudur. Osteoid doku mineralizasyonu osteoblastlar tarafından başlatılır ve devam ettirilir. Bu süreç içinde kalsifiye doku içinde kalan osteoblastlar ise osteositlere dönüşerek dağınık şekilli trabeküler kemik ağının yapımını üstlenirler. Osteoblastlar ayrıca tropokollajen salgılayarak kollajen liflerin dizilimini de düzenlerler ve bu yapıların üzerine kalsiyum iyonlarının çökmeye başlamasıyla da sert kallus meydana gelir. Kalsifiye doku içinde kalan kondrositler difüzyonla beslendiklerinden ölmeye başlarlar ve sonuçta buldukları yerlerde lakünalar oluşur. Rezorbe olan bu kalsifiye kırıkta daki matriks yerinde osteoblastlarca osteoid doku meydana getirilir ve yeni kemik yapımına bağlı olarak kırıkta daki doku ile kemik dokusu yer değiştirir. Bahsedilen bu süreç yani kallus mineralizasyonu için yaklaşık 4-16 hafta arasında zaman gerekmektedir (38).

Yeniden yapılanma fazı

Kemik iyileşmesinin en uzun süren fazı olan bu dönemde, mekanik olarak kuvvetli fakat mikroskobik olarak düzensiz yapıda olan kallus dokusu; kemik iliğinin bulunduğu bölgede osteoklastlar tarafından rezorbe edilir ve normal kemiğin lameller içeriği ile yer değiştirir ve böylece kemik dokusu olağan matür görünümünü kazanır (Şekil 7) (34).



Şekil 7: Kırık iyileşme aşamaları:(39) A) Normal kemik görüntüsü, B) Kırık hattında hematoma oluşması, C) Kırık hattında yumuşak kallus ve revaskularizasyon, D) Kırık bölgesinde yumuşak kallusla birlikte sert kallus, E) İyileşmiş kemiğin remodelasyon sonrası

2.2.1.2. Kırık İyileşmesinin Kontrolü

Kırık oluşumu esnasında bölgede kemik dengesinin korunabilmesi için çeşitli faktörlere ihtiyaç vardır (34, 40). Bu dönemde iyileşmede etkin rol alan öncü ve destek hücreler; kılcal damar, lenf ve sinir sistemi ve yerel aracılı mekanizmalarla sağlanır. Bu hücreler tarafından salgılanan ve sinyal molekülleri olarak fonksiyon gören faktörler hedef hücrede otokrin, parakrin veya endokrin etkilere sahip olup; hücre farklılaşmasını, adezyonunu, çoğalmasını ve migrasyonunu direkt olarak etkilerler (2). Bu faktörler arasında prostoglandinler ve kemik uyarıcı faktörler sayılabilir.

Prostoglandinler

Hücre membranında bulunan araşidonik asitten siklooksijenaz enzimleri vasıtasıyla sentezlenen ve osteojenik etkilere sahip olan yağ asitleridir (2). Enflamatuvar hücrelere kemotaktik etkiye sahiptirler ve akut enflamasyonun önemli araçlarındandır. Güçlü vazodilatatör etkiye sahiptirler, hücre çoğalmasını hızlandırır ve lenfositlerin antikor yapımını düzenlerler. PGE1 ve PGE2 yeni kemik yapımını artırır (34). Ayrıca kemik geri emiliminde yer alan epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- α), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), bradikinin ve trombin etkilerini PGE2 aracılığıyla göstermektedir.

Kemik uyarıcı faktörler

Farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin mitozunu destekler ve bu şekilde yeni kemik hücrelerinin oluşumunu sağlarlar. Bu faktörlerin başlıcaları şunlardır:

Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β): İltihap ve doku tamirinden sorumludur ve tüm hücreler bu faktörün reseptörüne sahiptir. Makrofajlardan salınan en güçlü kemotaktik ajan olan bu faktörün en önemli kaynağı ise kemiğin hücre dışı matriksi ve trombositlerdir. Hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matriks bileşenlerinden olan kollajen, fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder (2).

Kemik morfojenik proteini (BMP): Kemik kaynaklı morfojenetik bir proteindir. Mitojenik ve dönüştürücü etkiye sahip BMP'nin mezenşimal hücrelerin kırıkta ve

kemik hücrelerine farklılaşmasına, ektopik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (34). Lokal olarak sentezlenir ve 15 farklı tip tanımlanmıştır (2).

Fibroblast kaynaklı büyüme faktörü (FGF): Anjiogenezi, endotelial hücre migrasyonunu uyarır ve fibroblastlar, kondrositler, osteoblastlar için mitojeniktir. Kallus bölgesini genişletir ve mineral içeriğini artırır (2).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): Trombosit, makrofaj ve endotelial hücreler gibi birçok hücre tarafından sentezlenir. Kırık sahasında lokal olarak bulunabildiği gibi kan dolaşımında da bulunmaktadır. Güçlü mitojenik özelliklere sahip olup osteoblastların çoğalmasını uyarır. Ayrıca fibroblast çoğalmasını, mezenşimal hücre mitozunu, monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü ve bağ dokusunda kollajen sentezini artırır (34).

İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF): İki tipi tanımlanmıştır. Bunlardan IGF2 kemikte en çok bulunan büyüme faktörü olmasına rağmen IGF1 büyümeyi arttırmada daha yüksek potansiyele sahip olup her iki tipi de kemik matriks oluşumunu hızlandırır (2).

İnterlökinler (IL): Makrofaj ve monosit kökenlidirler. IL1 fibroblast çoğalması, kollajenaz ve PGE2 üretiminde etkilidir. Bunun yanında osteoklastlar üzerine etkisiyle kemik geri emilimini de etkilemektedir.

Diğerleri: Plazma fibronektini; yeni damar oluşumu için mitojeniktir. Epidermal büyüme faktörü (EGF); kemik geri emilimini hızlandırır. Epidermal hücre kaynaklı büyüme faktörü (ECGF); kırıkta ve kemik için mitojeniktir. Endotelial hücre kaynaklı büyüme faktörü (ECDGF); yeni damar oluşumu için mitojeniktir. Kondroblast kökenli büyüme faktörü (CDGF) ve makrofaj kaynaklı büyüme faktörü (MDGF) kırık iyileşmesi üzerine etki eder (34).

2.2.1.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Bunlar yaralanmanın şekline, hastanın durumuna, tedavi yöntemlerine ve yaralanan kemik dokusuna bağlı nedenler olarak veya kırık iyileşmesini olumlu / olumsuz yönde etkileyen faktörler şeklinde de incelenebilir (2, 34, 41).

Yaralanmaya bağlı etkenler

Yaralanmanın Şiddeti, geniş yumuşak doku hasarı bulunması, kırık uçların birbirinden ayrılması, araya yumuşak dokuların girmesi, besleyici damarların hasar görmesi, kırığın transvers, parçalı veya segmenter olması, kemik kaybı olması gibi yaralanmayla ilişkili birçok durum kırık iyileşmesini olumsuz olarak etkiler (2, 34, 41).

Hastaya bağlı etkenler

İskelet sisteminin olgunlaŐması tamamlanana kadar arada geçen süreçte yaŐın kırık iyileşmesi üzerine doğrudan etkisi bulunmaktadır. Çocuklarda yeni damar oluşumunun ve mezenkimal hücre farklılaŐmasının çok hızlı olması nedeniyle kaynama daha hızlı oluşmaktadır. İskeletin olgunlaŐması tamamlandıktan sonra ise yaŐın kırık iyileşmesi üzerine etkisi azalmaktadır (2, 34, 42). Ayrıca kemik iliği hücreleri ve fonksiyonları yaŐla birlikte azalmaktadır (43).

İyileşme sürecinde gerçekleşen hüresel olaylar büyük boyutlarda enerji gerektirir. Bunun yanında kallus oluşumu, kollajen bağ oluşumu ve mineralizasyon aŐamalarında da gereken elementlerin (kalsiyum, çinko, fosfor) sağlanması açısından yeterli beslenmenin kırık iyileşmesinde önemi büyüktür. Bu yüzden hastanın iyileşme kapasitesini en üst seviyede tutabilmek için yeterli beslenme sağlanmalıdır (44).

Diyabet, anemi, tüberküloz, raŐitizm gibi sağlıklı metabolizmayı etkileyen her türlü sistemik hastalık da kırık iyileşmesini geciktirir. İltihabi olaylar (tüberküloz, kronik hastalıklar), hiperemi nedeniyle artan lökositlerin proteolitik enzimleri, matriksin bozulmasına neden olur ve osteoid oluşumunu engeller (45). Birçok hormon ve metabolik faktör de iyileşme sürecinde pro-osteojenik karakterde etki edebilmektedir. Örneğin büyüme hormonu, tiroid hormonu, A vitamini, D vitamini, androjenler, kalsitonin, paratiroid hormon (PTH), ve insülin yeni kemik oluşumunu uyarmaktadır (46, 47). Diğer yandan bazı hormanlar, ilaçlar ve metabolik faktörler kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir. Özellikle kortikosteroidler; mezenkimal hücrelerden osteoblast farklılaşmasını ve dolayısıyla kemik organik matriks sentezini azaltarak kırık iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Bunların yanında indometazin ve diğer nonsteroidal antienflamatuar ilaçların da kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkileri bulunmuştur (2, 34). Kondroitin sülfat, hiyalüronidaz ve dikumaral kırık iyileşmesine yardım ederken K

vitamini antagonistleri genel olarak kırık iyileşmesini olumsuz etkiler (34). Bunların aksine deneysel çalışmalarda L-Dopa ve klonidinin büyüme hormonunu arttırarak kırık iyileşmesini olumlu etkilediği de gösterilmiştir (34, 48).

Sigara kullanımı da anjiogenezis ve osteogenezisi engelleyerek kırık iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörlerdendir. Cobb ve ark. sigara içen bireylerde kırık segmentlerin birleşmeme riskinin, sigara içmeyen bireylere kıyasla 3,5-16 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (49).

Yaralanan kemik dokusuna bağlı etkenler

Kortikal ve spongioz kemik kırıklarının kaynama potansiyelleri karşılaştırıldığında daha fazla yüzey alanına, hücre içeriğine, damar yapısı ve kanlanmaya sahip olan spongioz kemik daha avantajlıdır. Kemiğin yapısının yanında osteoporoz, osteomalazi, kemik tümörleri, paget hastalığı ve hiperparatroidi gibi patolojik yapıda kemiğe neden olan hastalıklar da hem kırık oluşumuna yol açabilmekte hem de kırık iyileşmesini geciktirebilmektedir. Ayrıca kırık bölgesinde lokal ya da sistemik enfeksiyon varlığı kırık iyileşmesini olumsuz etkilemektedir (2).

Tedavi yöntemlerine bağlı etkenler

Kırık uçlarının redüksiyonunun sağlanarak aradaki mesafenin azaltılması iyileşme üzerine olumlu etkilidir ve uygulanacak tedavinin ana hedefini oluşturur. Ancak tekrarlayan redüksiyon uygulamaları ise kırık hematomunun bütünlüğüne zarar vererek kallus gelişiminin bozulmasına sebep olur ve böylece iyileşmeyi geciktirir (2). Ayrıca uygulanan tespitin stabilitesi ve bu stabilitenin yarattığı mekanik ortam da iyileşmeyi etkilemektedir. Kırık hattının tamamen stabil olduğu durumda mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşümü uyarılırken; mikrohareket varlığında kondrojenik hücre dizilerine dönüşümü; aşırı hareket varlığında ise fibröz doku gelişimi görülür ve bu gibi durumlarda gecikmiş kaynama veya kaynamama görülebilir.

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörlerden bir diğeri de yüklenmedir. İyileşme sürecinde yüklenme ve mikro hareketin önemli olduğu ve kaynamayı stimüle ettiği ve yüklenmenin azaldığı durumlarda da kaynamanın yavaşladığı gösterilmiştir (50). Osteoprogenitör hücre kaynağı olan ve kemiğin dolayısıyla kırık bölgesinin

beslenmesinde önem taşıyan periostun korunduğu kırık vakalarında da iyileşme daha hızlı olmaktadır. Dolayısıyla kırık sahasında yumuşak doku ve periostun korunması oldukça önemlidir.

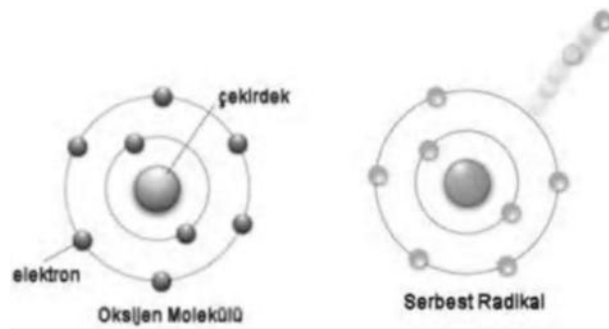
Özetle kırık iyileşmesi üzerine olumlu ya da olumsuz yönde etki eden pek çok lokal ve genel faktör bulunmaktadır. Buna ilaveten son yıllarda yapılan çalışmalar bu faktörler arasında serbest radikallerin de bulunduğunu göstermektedir. Kırık iyileşmesinde özellikle de biyolojik etkileşimlerin en yoğun gözlemlendiği erken dönemin fazlaca serbest radikallerin meydana geldiği ve oksidatif stresin doku ve hücreler üzerine olan yıkıcı etkilerinden dolayı iyileşme sürecinin bozulduğu gösterilmiştir (13, 51, 52).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

2.3.1. Serbest Radikaller

Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarından dolayı kararlı bir yapı gösterirler. Ancak bu kararlı yapı; eşleşmemiş elektron varlığında bozulmaktadır.

Radikal terimi de dış yörüngelerinde en az bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, molekül ağırlığı düşük moleküller olarak tanımlanmaktadır (Şekil 8) (53). Radikal ve serbest radikal terimleri birbirlerinin yerine kullanılsa da serbest radikal (SR) terimi daha çok, bağımsız olarak ortamda varlık gösterebilen radikaller için kullanılır.



Şekil 8: Serbest radikallerin temel yapısı (54)

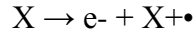
Serbest radikallerin ortaklanmamış elektronlarından dolayı tepkimeye girme yetenekleri oldukça yüksektir ve kendi yörüngelerindeki eşleşmemiş elektronları eşleyip yörüngelerini tamamlayarak daha stabil bir hale ulaşmak için komşu moleküllere adeta

saldırırlar ve onlarla hızla reaksiyona girerler. Kimyasal olarak yazımları esnasında sembolün üzerine bir nokta konur, bu serbest radikal türlerine özgü bir işarettir.

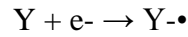
SR'ler ayrıca tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilir, radikal olmayan moleküller ile reaksiyona girip onları da radikal yapabilir ve hücrelerin tüm fonksiyonları sonucunda oluşabilir (55). Serbest radikallerin fazla üretimi ise hücrede lipit, protein, DNA, karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerde yapısal bozulmalara ve sonrasında hücre ölümüne neden olmaktadır (56, 57).

Biyolojik sistemlerde üretilen SR'ler 3 yolla meydana gelmektedir: (56)

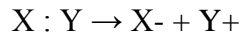
- Radikal olmayan atom veya molekülden bir elektron kaybı ile;



- Radikal olmayan atom veya molekülün bir elektron kazanması ile;



- Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonrası her bir parçada ortak elektronlardan birinin kalması ile oluşmaktadır.



Canlı organizmada görüldüğü gibi en fazla elektron transferi ile meydana gelen SR'ler pozitif veya negatif yüklü ya da nötral olabilmektedirler (54).

2.3.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Mitokondriyal metabolizma gibi hücresele fonksiyonlar yolu ile oluşan endojen kaynaklı ROT'lerin yanısıra organizmada ayrıca ısı, ultraviyole ışınlar, terapötik ilaçlar ve radyasyon gibi kaynaklar dışarıdan etki ederek ekzojen kaynaklı ROT oluştururlar. (Tablo 2) Bunların yanında sigara kullanımı, kronik aşırı egzersiz gibi bazı davranışsal aktiviteler de ROT meydana getirmektedir (58-60).

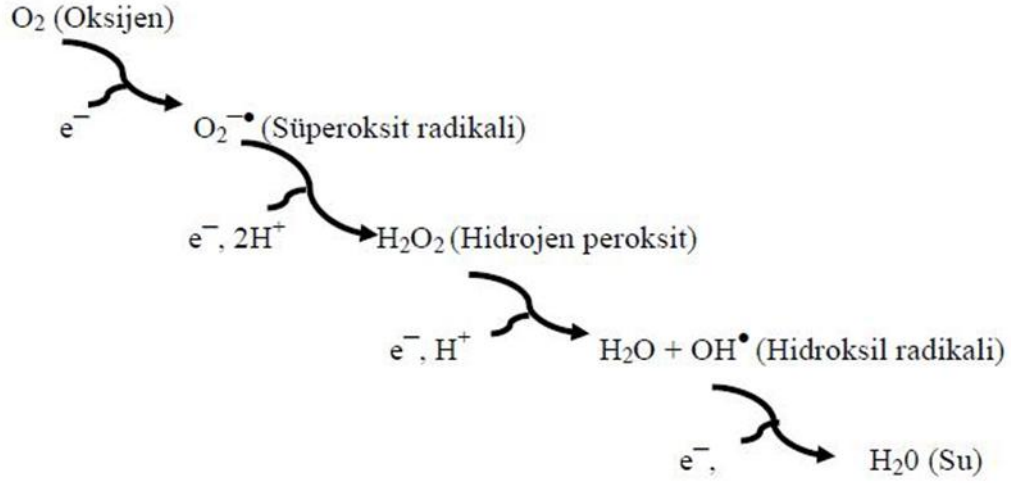
Tablo 2: Serbest radikallerin kaynakları

| Endojen kaynaklı | Ekzojen kaynaklı |
|--|---------------------------|
| Otooksidasyon | Antineoplastik maddeler |
| Oksidan enzim reaksiyonları | İyonize radyasyon |
| Mitokondriyal elektron transferi | Alkol ve uyuşturucu |
| Mikromozal Membran Elektron Transferi Zincirleri | Çevresel ajanlar |
| Peroksizomlar | Stres |
| Araşidonik Asit Metabolizması | Isı şoku |
| Fagositik hücreler | Ultraviyole ve X ışınları |

2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli SR'ler oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen doğada dioksijen (O₂) olarak bulunan kararsız, aerob organizmaların yaşamı için gerekli olan bir elementtir ve bu kararsız yapısını giderebilmek için başka bir oksijen atomunun dış yörüngesindeki iki elektronu ortaklaşa kullanarak reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturur (61).

Oksijen moleküllerinin büyük bir kısmı (%95-99) oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriyal sitokrom oksidazları ile indirgenerek suya dönüştürülmekte ve ATP sentez edilmektedir (55). Fakat bu süreçte O₂'nin % 1-3 kadarı tam olarak suya dönüşemez ve ara ürün olarak serbest oksijen radikalleri meydana gelmektedir (Şekil 9) (55).



Şekil 9: Oksijen molekülünün dört aşamalı indirgenme tepkimeleri (62)

ROT moleküler düzeyde, serbest oksijen radikalleri (SOR) ve radikal olmayan moleküller olmak üzere iki kategoride incelenebilir. Radikal olmayanlar (non-radikaller) gerçekte hasar oluşturabilecek radikal özelliklere sahip olmamalarına rağmen serbest radikal oluşturma potansiyeline sahip moleküllerdir (63). Ayrıca her iki grup moleküllerin birbirleriyle reaksiyona girerek yeni bir radikal oluşumuna neden olabilmeleri her iki grup için de önemli bir özelliktir. Hücre içi temel reaktif oksijen türleri Tablo 3 gösterilmiştir.

Tablo 3: Hücre içi temel reaktif oksijen türleri (64)

| Radikaller | Radikal olmayanlar |
|--|--|
| Süperoksit anyonu (O ₂ ^{-•}) | Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) |
| Hidroksil radikali (OH [•]) | Hipoklorik asit (HOCl) |
| Peroksil radikali (RO ₂ [•]) | Ozon (O ₃) |
| Alkoksil radikali (RO [•]) | Singlet oksijen (O ₂) |
| Hidroperoksil radikali (HO ₂ [•]) | Peroksinitrit (ONOO ⁻) |

Süperoksit radikali (O₂^{-•}): Hemen hemen bütün aerobik hücrelerde moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan süperoksit

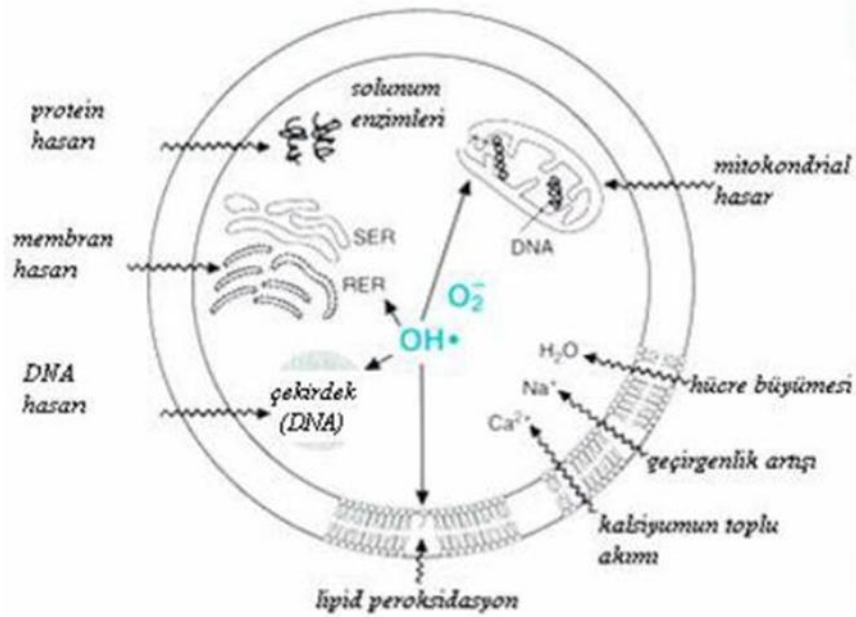
radikali oluşur. Süperoksit radikali süperoksit dismutaz enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksit'e dönüştürüldüğü için nadir olarak oksidatif hasara neden olur (65).

Hidrojen peroksit (H₂O₂): Serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve SR'ler içerisinde önemli bir rol oynar. Süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturur.

Hidroksil radikali (OH•): Hidroksil radikali ise oksidan gücü son derece yüksek olan bir radikaldir ve çok kısa yarılanma ömrüne sahiptir. Bu özelliğiyle reaktif oksijen türlerinin içinde en tehlikelidir (65).

2.3.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

SR'ler yüksek oranda reaktif bileşiklerdir. Sahip oldukları bu reaktivite ile hücre membranının yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, DNA'daki nükleotidler ve proteinlerin sülfidril grupları ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olurlar (Şekil 10) (56).



Şekil 10: Serbest radikallerin hücreye etkileri

Lipid peroksidasyonu: SOR lipid peroksidasyonunu uyararak, hücrenin fosfolipid zarlarının temel bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitlerine zarar verirler. Bu radikaller, doymamış yağ asidinin çift bağından bir hidrojen atomu alır ve ortama O₂

eklendiğinde zincirleme tepkime yayılır. Sonrasında lipid peroksil radikalleri ve lipid peroksitler oluşur. Bu reaksiyon lipid peroksidasyonunu başlatır (66). Bu durum hücre zararının akışkanlığını ve permeabilitesini azaltarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açar. Lipidlerin parçalanması sonucunda ise malondialdehit (MDA), etan ve pentan oluşur (67). MDA kanda ve idrarda saptanabildiğinden dolayı serbest radikal hasarının göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

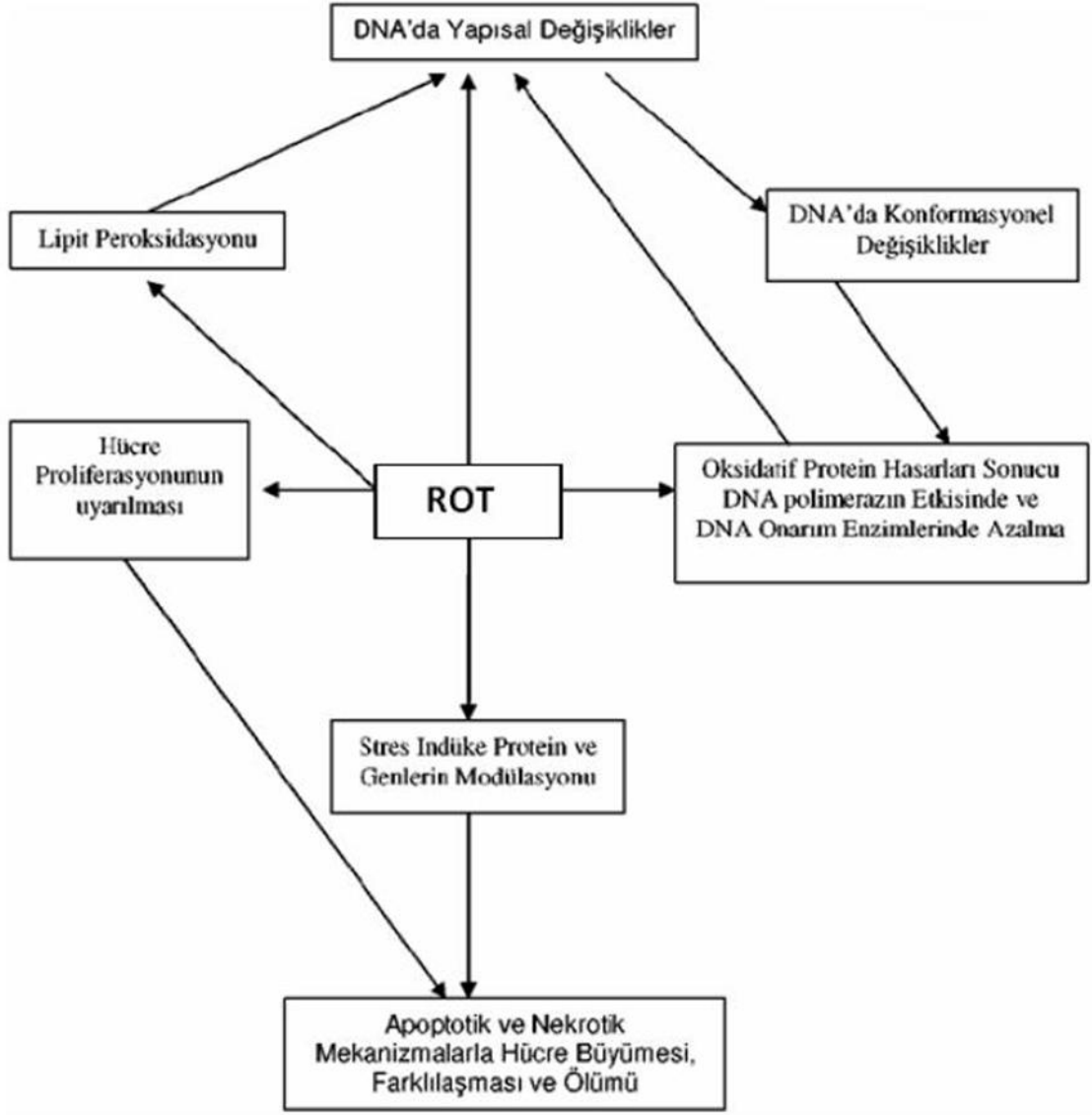
Protein oksidasyonu: Proteinler SOR'a karşı duyarlı moleküllerdir ve radikal ajanların proteinlerin sülfhidril veya amino gruplarıyla etkileşimi sonucu proteinlerin fragmantasyonu, amino asitlerin modifikasyonu, çapraz bağlanmalar, proteinlerin agregasyonu ve enzim aktivitelerinin inhibisyonu, ve proteolize karşı aşırı duyarlılık gibi yapısal değişiklikler oluşmaktadır (68). Ayrıca radikaller, membran proteinleri ile reaksiyona girerek enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarının bozulmasına da neden olabilirler.

DNA oksidasyonu: Hem nükleer hem de mitokondriyal DNA SOR'dan olumsuz etkilenmektedir. SOR'un DNA ile tepkimesi sonucunda baz modifikasyonları, baz delesyonları, zincir kırılmaları, mutasyonlar ve hücre disfonksiyonu hatta ölümü oluşmaktadır (69). Bu radikaller DNA hasarının ana kaynağını oluştururlar ve kanserin, hücre yaşlanmasının en temel faktörlerinden birisidir (70).

Karbonhidrat Hasarı: SR'in karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri bulunmaktadır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler oluşmaktadır (71). Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinelere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar (72). Bir diğer etki ise enflamatuvar eklem hastalıklarında da sinoviyal sıvıya geçen SOR tarafından önemli bir mukopolisakkarit olan hyalüronik asidin parçalanmasıdır (73).

2.3.4.1. Serbest Radikallerin Fizyolojik Etkileri

SOR vücutta birçok zararlı etkilerinin yanında (Şekil 11) hücresel düzeyde çeşitli fizyolojik işlevlerin düzenlenmesinde önemli role sahiptir.



Şekil 11: ROT'nin vücuttaki etkileri (74)

SOR bağışıklık sisteminin patojenlere özellikle de fagositoz esnasında antijenlere karşı koymasına yardım eder. Makrofaj ve nötrofillerden açığa çıkan ROT'lar antijene özgül yanıt verilebilmesi için bağışıklık sisteminin aktivasyonuna yardım eder (53, 75). Bu rolleri enflamasyon esnasında artar.

Serbest radikaller ayrıca düz kaslarda gevşemeyle damar tonusunun düzenlenmesi, ventilasyonun kontrolü ve kas kasılmasında rol oynarlar. Bunun yanında hücrelerin biyogenezinde çok çeşitli membran reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimine etki ederler

ve oksidasyon-redüksiyon (redoks) durumunu düzenlerler (15). ROS'lar ayrıca enzim aktivasyonundan, ilaçların detoksifikasyonunda da etkilidirler (53).

2.3.5. Oksidatif Stres

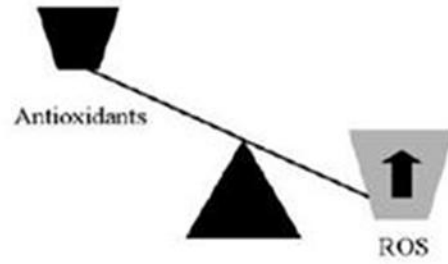
Sağlıklı organizma normal koşullarda reaktif radikalleri etkisizleştirme yeteneğine sahiptir ve SR'in zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar üretmektedir.

Uygun hücrel homeostazın korunabilmesi için SR'in oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızları arasında bir denge bulunur ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Ancak bazı patolojik durumlarda hücrel savunma sistemlerinin etkisizleştirilebileceğinden daha fazla reaktif radikal oluşur. İşte varolan bu oksidan / antioksidan sistem arasındaki dengenin SR'den yana kayması ise oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Şekil 12) (56, 76). Total oksidan seviyenin total antioksidan seviyeye yüzde olarak oranı ise oksidatif stres indeksini vermektedir.

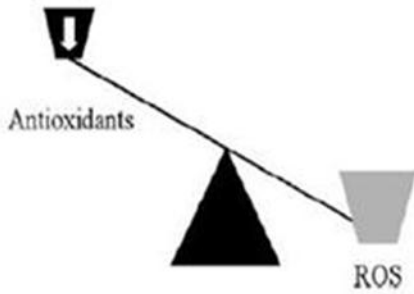
Son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte oksidatif stresin artık malign hastalıklar, diabetes mellitus, ateroskleroz, kronik enflamasyon, otoimmün hastalıklar, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, HIV enfeksiyonu, iskemi – reperfüzyon yaralanması gibi birçok klinik tablonun gelişiminde ve yaşlanmanın etiyolojisinde rol oynadığı bilinmektedir (15, 77-83).



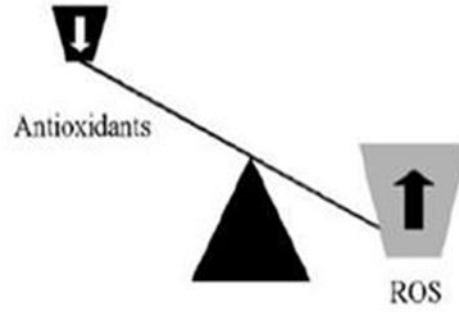
Normal şartlar altında ve sağlıklı bireylerde belli bir miktar ROS üretimi vardır, ama bunlar enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistemler tarafından yeterince tamponlanır. Böylece ROS üretimi ve uzaklaştırılması arasında bir denge oluşur ve ROS'da net bir artış söz konusu değildir.



Oksidatif stresin gelişmesinde olduğu gibi yeterli bir enzimatik ve nonenzimatik antioksidan kapasiteye rağmen ROS üretiminde belirgin artış antioksidan sistemi yenebilir.



Enzimatik veya nonenzimatik antioksidan savunma elemanlarındaki genel veya seçici bir azalmadan dolayı normal ROS üretiminde herhangi bir artış olmaksızın oksidatif stres gerçekleşebilir.



En kötü senaryo ROS üretimindeki artışla birlikte antioksidan kapasitenin azalmasıdır. Çeşitli hastalıklar antioksidan savunmada kronik azalmaya ve ROS üretiminde belirgin artışa neden olur.

Şekil 12: Oksidatif stresin meydana geldiği durumlar (84)

2.3.5.1. Oksidatif Stres ve Kırık İyileşmesi

SOR kemik metabolizması üzerine fizyolojik ve patolojik durumlara göre iki yönlü etki edebilmektedir. Organizmada normal şartlarda kemik dokuda osteoklastlar tarafından üretilen SR, kalsifiye dokunun yıkımını artırarak kemiğin remodelasyonuna katkı sağlar (85). Ancak herhangi bir sebepten dolayı kemik dokuda kırık meydana geldiğinde ise oldukça yüksek miktarda serbest radikal oluşur ve doku üzerinde istenmeyen sonuçlar doğurur (13).

Kırık oluşuktan sonra erken dönemde kan akımının durmasıyla, yani iskemiyle başlayan kompleks biyokimyasal olaylar zinciri açığa çıkar ve sonrasında arteriyel

vazodilatasyon, enflamatuar hücrelerin alana göçü ve yeni damarların oluşmasıyla reperfüzyon dönemi başlar. İşte bu dönemde reperfüzyonla birlikte hem enflamatuar hücreler hem de osteoklastlarca SOR üretmektedir (86, 87).

SOR'nin yol açtığı hücresel hasarlanmanın en iyi göstergelerinden birisi lipid peroksidasyonudur ve bu hasar serumda ya da dokuda lipid peroksidasyonu ile açığa çıkan malondialdehit (MDA) düzeyi ile ölçülebilmektedir. Yüksek MDA düzeyleri, yüksek SOR varlığına işaret etmektedir. Kırığın da iyileşme sürecinde SOR üretiminde bir artış olduğu, kan ya da kemik dokularında MDA düzeylerinin araştırıldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

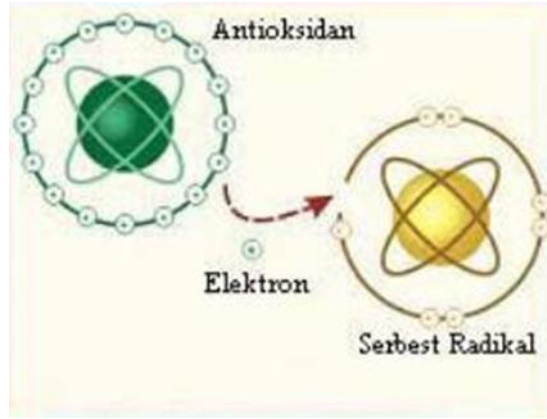
Petrovich ve ark. deneysel mandibula kırığı oluşturdukları ratların kan MDA düzeylerini incelemiş ve bu değerin birinci ve ikinci haftalarda yüksek, dördüncü haftada ise azalmış olduğunu belirtmişlerdir (88). Yeler ve arkadaşları da ratlarda fibula kırığı sonrası kan MDA düzeyini araştırdıkları çalışmalarında SOR üretiminin en fazla enflamatuar dönemde olduğunu, onarım döneminde ise bu üretimin devam ettiğini saptamışlardır (89). Turgut ve arkadaşları ise rat tibiasında fraktür oluşturmuş ve kemik dokudaki MDA düzeyini değerlendirmişlerdir. İyileşmenin 7. ve 14. günlerinde MDA düzeyinde anlamlı artışa bağlı olarak, oksidatif stresin daha çok iyileşmenin enflamatuar ve kallus yani erken dönemlerinde oluştuğunu saptamışlardır (90).

Bu deneysel çalışmaların yanı sıra oksidatif stres gelişimi insan çalışmalarında da değerlendirilmiştir. Basit ve multiple kırıklar sonrası açığa çıkan plazma MDA düzeyleri sağlıklı bireylerle karşılaştırılmış ve sonuç olarak kırık sonrası ilk birkaç günde diğer çalışmalarla benzer şekilde oksidatif stres değerlerinde belirgin bir değişim olmadığı ve bunun da muhtemelen lokal iskemiden kaynaklandığını; aksine ikinci ve üçüncü haftalarda ise oksidan seviyelerinin arttığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar oksidatif stres değerlerinde görülen bu artışın kırık sonrası oluşan iskemik dönemden ziyade sonrasında gerçekleşen reperfüzyon, anjiogenezis ve kallus formasyonundan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir (91).

Bu çalışmaların sonucu olarak, kırık iyileşmesi sürecinde oksidatif stresin var olduğu söylenebilmektedir (51, 52).

2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

SOR'nin canlı organizma üzerinde olası ciddi zararlarına karşı hücreler, açığa çıkan toksik ürünleri hızla metabolize edecek antioksidan adıyla savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Antioksidanlar biyolojik sistemlerde çok düşük konsantrasyonlarda bile lipit, protein, DNA ve karbonhidrat gibi okside olabilen substrat ile karşılaştığında substratın oksidasyonunu geciktiren veya önleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır (92). Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunabilen bu antioksidanlar; kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize ederken, (Şekil 13) elektron verdikleri halde kendileri serbest radikallere dönüşmezler çünkü antioksidanlar her iki formda da kararlıdır (93).



Şekil 13: Antioksidanların serbest radikali nötralize etmesi (94)

2.4.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu önleyerek ya da oluşmuş radikaller üzerinden dört ayrı etki mekanizması üzerinden etki gösterirler. Bunlar: (92, 95)

- **Toplayıcı Etki:** SOR'u tutan veya reaktif olmayan yeni bir moleküle çevrilmesini sağlayan etkidir. Antioksidan enzimler bu tipte etki gösterirler.
- **Bastırıcı Etki:** SOR'dan bir hidrojen atılması ile aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren etkidir. Vitaminler ve flavonoidler bu yolla etki gösterirler.
- **Onarıcı Etki:** SR'lerin oluşturdukları oksidatif hasarı tamir edebilen etkidir.
- **Zincir Kırıcı Etki:** SOR'u kendilerine bağlayıp zincirlerini kırmak suretiyle fonksiyonlarını engelleyen etkidir. Bu mekanizmada hemoglobin, serüloplazmin ve ağır

metaller kullanmaktadır. Bu etki mekanizmasında, antioksidanların birleşme sonucu tükenmesi söz konusudur.

2.4.2. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar enzimatik aktiviteye sahip olup olmamaları, suda ya da yağda çözünmeleri, endojen ya da eksojen kaynaklı olmalarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

2.4.2.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar ise enzimatik aktiviteye sahip olanlar ve olmayanlar olmak üzere tablo 4’de gösterildiği gibi ikiye ayrılmaktadır.

Tablo 4: Endojen antioksidanlar

| Enzimatik | Nonenzimatik | |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------|
| Süperoksit dismutaz (SOD) | Glutasyon (GSH) | Albümin |
| Katalaz (KAT) | α -Tokoferol (Vit E) | Seruloplazmin |
| Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) | Askorbat (Vit C) | Transferrin |
| Glutasyon S-transferaz (GST) | β -Karoten (Vit A) | Laktoferrin |
| Glutasyon redüktaz (GSSG-R) | Flavonoidler | Melatonin |
| Mitokondriyal Sitokrom oksidaz | Ürat | Sistein |
| | Bilirubin | |

Enzimatik aktiviteye sahip olan antioksidanlar

Bu enzimatik antioksidanlar ortamda SOR oluştuğundan sonra bu radikallerin hedef moleküllerle tepkimeye girmelerine fırsat tanımadan ortamdan temizlerler. Bunlar: (96)

Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikalinin H₂O₂ ve O₂'ye dönüşümünü katalize eder. Oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bu yolla hücrede oksijen düzeyleri kontrol altında tutulur (96).

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Aşırı H₂O₂ varlığında glutasyonun yükseltgenmiş glutatona oksidasyonunu katalize ederken, diğer yandan da H₂O₂'yi suya çevirir. Özellikle eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzimdir (97).

Glutasyon S-transferazlar (GST): Lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler. Selenyuma bağlı olmayan GSH-Px olarak adlandırılır. Bu katalitik etkilerinin yanında, hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolleri de vardır (98).

Glutasyon redüktaz (GR): GSH-Px tarafından H₂O₂ ve diğer lipit peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyonu okside glutatyona dönüştürür.

Katalaz (CAT): Bütün hücrelerde ama özellikle de peroksizomlarda bulunur. Peroksizomların toksik maddeleri detoksifiye etmek için oksijen kullanımı sonucu H₂O₂ üretilir. Katalaz, ise H₂O₂'nin suya ve oksijene parçalanma tepkimesini katalize eder. Bu şekilde hücrede oluşmuş olan H₂O₂'nin tehlike arz eden hidroksil radikali oluşturması önlenmiş olur (97).

Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz, süperoksit radikalini ortadan kaldırır. Ancak süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidanlar devreye girip detoksifikasyonu sağlarlar (95).

Enzimatik aktiviteye sahip olmayan endojen antioksidanlar

Vit E, beta karoten ve melatonin yağda çözünen nonenzimatik antioksidanlardandır. Seruloplazmin, transferin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin, bilirubin, glutasyon, sistein, metionin, laktoferrin ve albümin ise suda çözünme özelliğine sahip endojen antioksidanlardandır (95).

Vit E çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir ve hücreleri lipid peroksit radikalleri ile tepkimeye girerek peroksidasyonunun reaktif ürünlerinden ve doku hasarından korur. Kendisi ise oksidasyon sonucu alfa-tokoferol radikaline dönüşür. Ayrıca tepkime sonrası vit C ve GSH tarafından tekrar indirgenerek; önceki kimyasal yapısına döner. Vit C ise kan ve plazmada serbest radikallere karşı ilk savunmayı yapar ve lipit peroksidasyonunu engeller. Ayrıca vit E'nin rejenerasyonunu sağlayarak antioksidan etkinliğini artırır, doku yapımında ve onarımında rol alır (99, 100).

Vitamin A olarak da bilinen β -Karoten yağda çözünen bir antioksidandır ve buda lipid peroksidasyonunu engeller. β -karoten hücre membranlarında bulunur ve vücudun ihtiyacına göre vit A'ya dönüştürülür. Melatonin hidroksil radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir endojen antioksidandır (101). Bilirubin, albumin ve sistein serbest radikal toplayıcısı olarak antioksidan aktivite gösterirken seruloplazmin, transferin, laktoferrin, miyogloblin, hemogloblin, ferritin ise metal bağlayıcı özelliği olan antioksidanlardır. Bu özellikleri sayesinde tepkimeler sırasında katalizör işlevi gören metalleri ortamdan uzaklaştırırlar (95, 102). Tüm bu organizmada bulunan antioksidanlar vücudun antioksidan savunma sisteminin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar.

2.4.2.2. Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar vitaminler, ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler. Vit E, C, A ve folik asit dışarıdan alınabilen antioksidan etkinliğe sahip vitaminlerdir. Bu antioksidanların dışında özellikle son zamanlarda kanser önleyici bir ajan olarak bitki fenolik bileşikleri de büyük ilgi görmektedir. Bu bileşiklerin antioksidan etkinliği, özellikle flavonoidler ve fenol karbonik asitlerin anomerik hidroksil grubundan lipit radikallerine bir hidrojen atomu vererek lipid oksidasyonunu engellemesi ile gerçekleşir.

Fenolik bileşikler içinde flavonoidler üye sayısı itibari ile en büyük grubu oluşturup flavonlar, flavonoller, flavan 3-oller, izoflavonlar, flavanonlar ve antosiyanidinler olmak üzere altı alt sınıfa ayrılırlar. Çok sayıda sentetik ve doğal antioksidanın insan sağlığında ve hastalıkların önlenmesinde faydalı etkilerinin olduğu bilinmekte ve bundan yola çıkılarak proantosiyanidinlerin SOR'un nedenleri arasında olduğu pek çok hastalık grubunda kullanılabileceği bildirilmektedir (93, 103, 104).

2.5. Proantosiyanidinler

Proantosiyanidinler meyvelerde, sebzelerde, kuruyemişlerde, çekirdeklerde ve kabukta bulunan doğal antioksidanlardır ve serbest oksijen radikallerine karşı biyolojik, farmakolojik ve terapotik etkileri vardır. Üzüm çekirdeği ise özellikle proantosiyanidinlerden hem nicelik ve hem de nitelik açısından oldukça zengin bir kaynaktır.

20. yüzyılın sonlarına doğru yapılan epidemiyolojik çalışmalarda Fransızların her ne kadar diyetlerinde tereyağı gibi yüksek oranda doymuş yağdan zengin besinleri kullanmaları, sigara tüketiminin fazla olması, yeterli egzersiz yapmıyor olsalar da kardiyovasküler hastalıklardan ölüm risklerinin diğer ülkelerle karşılaştırıldığında daha az olduğu gözlenmiştir. Bu tezat durum ilk defa 1979'da St. Leger ve arkadaşları daha sonra ise 1992'de S. Renaud ve arkadaşları tarafından 'Fransız Paradoksu' olarak tanımlanmıştır. Ortaya çıkan bu paradoksun nedeni olarak da Fransızların içinde yüksek konsantrasyonda proantosiyanidin bulunduran kırmızı şarabı fazla tüketiyor olmaları gösterilmiştir. O dönemde şarabın farmakolojik etkilerinin olduğu bilinmekteyken; bu olumlu etkinin alkolden kaynaklandığı düşünülmüştür. Fakat zamanla bu etkinin kaynağının alkol değil sonraları yapılan çalışmalarla üzüm çekirdeği içerisinde bulunan proantosiyanidinler olduğu gösterilmiştir (105-107).

Proantosiyanidinler, polifenolik bileşikler olan flavonoidlerin spesifik bir grubu olup ayrıca kondanse taninler grubunda bulunmaktadırlar. ÜÇE'nin antioksidan kapasitesi içerdiği bu flavanoller ve proantosiyanidinlerden kaynaklanmaktadır ve bu bileşenler üzümün %60-70 oranı çekirdeğinde iken yaklaşık %4'ü de üzümün pulpa kısmında bulunmaktadır. Kabuk kısmında da ayrıca antosiyanidin olarak adlandırılan başka bir tip polifenol de vardır (108).

ÜÇE'deki ana bileşik, monomer olarak adlandırılan oligomerik proantosiyanidin kompleks (OPCs) yapılarıdır. Temel olarak kateşin ve epikateşin olarak adlandırılan 2 proantosiyanidin monomeri vardır ve bunlar yapısal olarak dimer, trimer ve diğer proantosiyanidinleri oluştururlar. Düşük molekül ağırlıklı olup, su ve etanolde çözünebilen bu monomerler bağırsaklardan emilerek tüm dokulara ve plazmaya kolayca dağılırlar ve bunun yanında diğer suda eriyen antioksidanlardan farklı olarak plazma ve dokuda 7-10 gün boyunca mevcudiyetlerini sürdürerek güçlü antioksidan özelliklerinin devamını sağlarlar (16, 105)

2.5.1. Proantosiyanidinlerin Antioksidan Özellikleri

Proantosiyanidinler indirgeyici ajanlardır ve bir elektron vererek SR'leri ortamdan süpürürler. Üzüm çekirdeğinden elde edilen ve içerisinde oldukça güçlü antioksidan olan proantosiyanidinler bulunan birçok farmositik ürün başta Fransa olmak üzere

Avrupa’da, venöz-lenfatik yetmezlik ve periferik kapiller permeabilite artışı gibi mikrosirkülasyon bozukluklarının tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır.

Proantosiyandinlerin antioksidatif özelliği, oksidatif stresle karakterize hastalıklardaki tedavi edici etkinliğiyle ölçülmüştür. Proantosiyandinlerin bu serbest radikal toplayıcı (SRT) ve antioksidan etkinliklerini; sahip oldukları vazodilatör, antikarsinojenik, antiallerjik, antiinflamatuvar, antibakteriyal, kardiyoprotektif, immünostimülan, antiviral özellikleri ile bu teropatik etkilerin oluşmasında rol alan siklooksijenaz, fosfolipaz A2 ile lipooksijenaz inhibisyonu yaparak gösterirler (16, 108-110).

Bu özellikleri nedeniyle ÜÇE içindeki proantosiyandinler oksidatif stres ile hasara uğrayan dokuların korunmasında çok etkilidirler. Sonuçta proantosiyandinlerin mevcut bu özelliklerinden faydalanarak bu ajanların kullanıldığı alanlarda bir o kadar fazladır. Vücutta ödemin azaltılması, periferik dolaşımın ve görme keskinliğinin artırılması, kardiovasküler hastalıklardan koruma, hiperkolestrolemi tedavisi, yumuşak dokunun stabilizasyonu, allerjik ve enflamatuvar cevabın azaltılması ile immün sistemin desteklenmesi ve sağlıklı yaşamın devamının sağlanması bunlardan bazılarıdır (105).

Proantosiyandinler güçlü antioksidan özellikleri ile oksidatif hasara neden olan SR’lerin inhibisyonuna neden oldukları hem in-vivo hem in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Üzüm çekirdeğinin süperoksit anyonları süpürme etkisi vit C, E ve diğer antioksidanlardan daha güçlüdür. Yapılan bir çalışmada ÜÇE ile vit C ve E’nin SRT özellikleri adına çeşitli konsantrasyonlarda karşılaştırılmıştır. 50 mg/L ÜÇE ile vit E karşılaştırıldığında; süperoksit anyonu için %84, hidroksil iyonu için %98 ÜÇE’nin daha etkin olduğu; 100 mg/L ÜÇE ile vit C karşılaştırıldığında ise süperoksit anyonu için % 439, hidroksil iyonu için % 575 ÜÇE’nin daha fazla SRT etkinliğinin olduğu saptanmıştır. Sato ve arkadaşları ise ÜÇE’nin peroksil iyonu için etkinliğini inceledikleri çalışmalarında miyokardiyal iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda 3 hafta boyunca 100 mg/kg verilen ÜÇE takviyesinin dokuda özellikle kardiyoprotektif etki yarattığını vurgulamışlardır (16, 111). Ray ve ark.’ da aynı dozu daha kısa süre uyguladıkları çalışmalarında 9 gün boyunca günlük 100 mg/kg ÜÇE verdikleri yetişkin farelerde kardiyotoksisiteyi önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir (112).

Bu çalışmaların dışında hiperkolesterolemik diyetle 50 veya 100 mg/kg ÜÇE eklenmesi ile hamsterlarda aterosklerotik indekste sırasıyla % 50 ve % 63; total plazma kolesterol düzeylerinde sırasıyla % 25 ve % 23, trigliserit seviyelerinde de sırasıyla % 10 ve % 34 oranında azalma tespit etmişlerdir (113). Yapılan in vitro bir çalışmada da hücre kültürleri üzerine sadece H₂O₂ ve ÜÇE ile kombine H₂O₂ ile uygulanmıştır. ÜÇE verilen kültür ortamında H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif hasarın %70'lere varan oranlarda daha az olduğu görülmüştür (114).

Tüm bu özelliklerinin yanında ayrıca Shenoy ve ark ÜÇE'nin postmenopozal kadınlarda 8 hafta boyunca 400 mg/gün kullanımının trombosit fonksiyonları üzerine yararlı etki gösterdiği (115); Balu ve ark. ise yaşlanmaya bağlı oksidatif stresin oluşturduğu nöronal hasarda proantosiyanidinlerin oksidatif DNA hasarının birikimini inhibe ettiğini göstermiştir (116). ÜÇE'nin antikarsinojenik etkinliğine yönelik yapılan bir çalışmada da farelerde proantosiyanidin alımının hem ultraviyole ışınlarının neden olduğu deri kanserini hem de malignite oluşumunu önlemede de etkili olduğu görülmüştür (117).

Literatürde mikrovasküler hastalıklar ve ÜÇE ile ilgili yapılan deneysel çalışmaların sonucunda proantosiyanidinlerin şu özellikleri gösterilmiştir: (105)

- Özellikle serbest hidroksil radikallerine karşı spesifiktir.
- Lipid peroksit ürünleri ve SR'leri toplayabilmektedir.
- Şelasyon yapıcı etkisiyle prooksidan etkili demir ve bakır gibi geçiş metallerini inaktive ederek oksidatif strese karşı direnci artırır.
- Oksidan moleküllerin açığa çıkmasında rol oynayan enzim aktivitelerini inhibe ederler. Örneğin; SR oluşumuna neden olan ksantine oksidaz enzimini nonkompetatif inhibe ederler.
- Hiyaluronidaz, elastaz ve kollajenaz enzimlerini inhibe ederek; yumuşak doku yapısının bozulması ve permeabilite artışını engellerler.

Bütün bu biyolojik belirteçlerin cevabı ekstrenin dozuna bağlıdır ve aynı konsantrasyonda vit E, C veya beta-karotenle beslenenlerle kıyasla ÜÇE'de daha güçlü bir antioksidatif cevap oluşmaktadır (118).

2.5.2. Proantosiyanidinlerin Metabolizma ve Toksisitesi

Besinlerdeki fenollerin absorpsiyonunu ve metabolizmasını belirleyen birincil faktör kimyasal yapılarıdır. Dimer, trimer ve tetramerik proantosiyanidinler düşük moleküler ağırlıklı olup, su ve etanolde çözünürler ve diğer suda eriyen antioksidan moleküllerden farklı olarak plazma ve dokuda 7-10 gün süre boyunca bulunurlar. Bu özellikleri proantosiyanidinler için diğer suda çözünen antioksidan vitaminlere göre belirgin bir avantaj sağlamaktadır.

Midenin asidik ortamı oral alınan flavonoid ve proantosiyanidinlerin parçalanması için uygun bir ortam değildir ve bu yüzden üst gastrointestinal sistemden emilimleri daha az gerçekleşir. Alkol ve suda çözülüp oral alındığında ise emilimleri daha iyi gerçekleşmektedir. Monomer, dimer ve trimer yapılar kolona ulaştıklarında hızla emilirler, fakat polimerler emilmezler ve kısmen hücre yüzeyine yapışırlar. Kolondaki mikroflora ise bu yapıları düşük moleküler ağırlıklı aromatik bileşiklere çevirir ve barsak lümeninden emildikten sonra glukronid ile bağlanıp serumda karaciğere kadar albümin ile taşınır.

Karaciğer polifenollerin metabolizmasından sorumlu temel organdır ve burada proantosiyanidinler metilasyon, dehidroksilasyon, oksidasyon, glukronik asitle veya sülfatla konjügasyon gibi biyotransformasyon reaksiyonları ile metabolitlerine kadar ayrılırlar. Bu ayrışma sonrası proantosiyanidinlerin maksimum konsantrasyona ulaşma süreleri 45 dakikadır ve yarılanma ömürleri 5 saattir (16, 119). ÜÇE bileşikleri tek doz oral alımı sonrasında bile hızlı şekilde plazmada görülürler.

Proantosiyanidinler metabolitleri temel olarak idrar ve feçes ile az oranda da karbondioksit ile elimine edilirler. Örneğin tek doz 50 mg/kg oral uygulamadan sonra; uygulanan dozun %70'i ilk 24 saat içinde idrar ve %45'i feçes ile atılır. Temel idrar metabolitleri hippürik asit, etikkatekol ve m-hidroksifenilpropionik asittir. Önemli feçes metaboliti ise etikkatekol'dür. Temel safra metabolitleri ise; vanilik asit ve m-hidroksifenilpropionik asittir (16, 119).

Proantosiyanidinlerin toksisite ve mutajenik etkilerine dair literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan toksik doz çalışmalarında bu bileşiklerin yüksek dozlarda (1400-

1500 mg/kg/gün) bile toksik veya mutajenik herhangi bir etkisine rastlanılmamış ve ÜÇE uzun yıllardır FDA onayı ile besin takviyesi olarak kullanılmaktadır (16, 120).

Ayrıca 1 yıl gibi uzun bir süre boyunca erkek farelere günlük 100 mg/kg veya 6 ay boyunca dişi farelere 500 mg/kg ÜÇE verilmesi sonucunda deneklerin hayati organlarının histolojisinde ve serum biyokimyasında gözlenen bir yan etki olmadığı belirtilmiştir (121). Diğer bir çalışmada Yamakoshi ve ark. farelerin diyetlerine ağırlıkça % 0.02, 0.2 ve 2 oranlarında ÜÇE ilavesi yapmış ve 90 günlük deneme süresi boyunca deneklerde herhangi bir toksisite belirtisi gözlemlenmemiş bunun yanında ÜÇE'nin pek çok gıdada kullanılabileceği bildirilmiştir (108).

ÜÇE'nin doz aralığı geniş ve güvenlidir ve oral alım dozu olarak 50-150 mg /gün ya da 1 mg/kg/gün önerilse de günlük 300 mg önerenler de bulunmaktadır. Ancak hamilelerin ve emziren bayanların kullanması önerilmemektedir. Bunun yanında ÜÇE'nin bilinen herhangi bir ilaç reaksiyonu yoktur. Ancak, yapılan bazı in vitro çalışmalarda platelet agregasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu nedenle antiagregan ilaçlarla birlikte alınacağı zaman dikkatli olunmalıdır (108, 122, 123).

Daha önce bahsedildiği gibi organizmada polifenollerin küçük bir kısmı absorbe edilir. Ancak bu düşük konsantrasyon değerinde dahi in vivo olarak güçlü antioksidan etki gösterebilirler. Brannan ve ark. ÜÇE'nin % 0.1 gibi düşük konsantrasyonlarda bile kas dokusunda SR'leri etkisiz hale getirebildiğini belirlemişlerdir (124). ÜÇE'yi oral alım ve metabolizasyonları sonrası çeşitli dokularda saptamak mümkündür. Literatürde buna yönelik proantosiyanidinlerin rat ve şıçanların beyin, endotel hücresi, kalp, böbrek, dalak, pankreas, prostat, uterus, ovaryum, meme bezleri, testis, mesane, kemik ve deri gibi pek çok dokusunda bulunduğu saptanmıştır (125).

2.6. Düşük Doz Lazer Tedavisi

2.6.1. Lazerin Tanımı ve Tarihsel Gelişimi

Lazer, İngilizce "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" kelimelerinin baş harfleri alınarak oluşturulmuş bir akronim kelimedir ve dilimize çevrildiğinde "Radyasyonun Uyarılmış Emisyonu ile Işığın Güçlendirilmesi" anlamına gelmektedir. Işık, yüzyıllar boyunca farklı medeniyetlerde terapötik ajan olarak

kullanılmaktadır. Yunan antik döneminde güneş ışığı hastaları tedavi edici olarak uygulanmıştır. Çinliler de cilt hastalıklarını ve hatta bazı psikozları bile güneşle tedavi etmeye çalışmışlardır.

Lazer ile ilgili ilk teoriler 1864 yılında Maxwell tarafından, 1905 yılında Plank tarafından Quantum teorisi ile ortaya atılmıştır. Atomik yapı ile ilgili teoriler ise 1913 yılında Bohr tarafından ortaya konmuştur. Günümüzde kullanılan lazerlerin ana temelleri ise 1917 de Albert Einstein tarafından atılmıştır. Einstein, Işığın Kuantum Kuramı adlı çalışmasında ilk kez ışık fotonlarını kavramsal olarak açıklamıştır (126).

Lazer cihazlarının tarihsel gelişimi ise 1960'lı yıllarda Maiman tarafından ilk yakut lazerin geliştirilmesi ile başlamıştır. Takip eden yıllarda lazer, tıp ve diş hekimliği alanında hızla yayılan bir kullanım alanı bulmuştur. Sonrasında Maiman, değişik tür lazerler üzerine de çalışarak 1961'de Helyum Neon (He-Ne) ve Nd: Yag lazeri, 1962'de Argon lazeri ve 1964 yılında da CO2 lazeri araştırmış ve uygulamaya koymuştur. Böylelikle çeşitli lazer tipleri farklı dozlarda ve farklı tedavi prosedürleri çerçevesinde araştırmacılar tarafından kullanılabilir hale gelmiştir. Zamanla lazer teknolojisinin gelişimiyle günümüzde artık daha geniş tedavi spektrumu sağlayabilecek çok sayıda lazer cihazı üretilmiş ve hizmete sunulmuştur (127, 128).

2.6.2. Lazer Işığının Özellikleri

Işık bir elektromanyetik enerji formudur ve bu enerjinin temel yapı taşı foton oluşturur. Aynı zamanda ışık insan gözüyle görülebilen ve görülemeyen formu olan bir enerji yayılımıdır. Bu açıdan lazer ışığı ile görünür sıradan ışık birbirlerinden kesin çizgilerle ayrılırlar.

Normal şartlar altında doğada bulunmayan lazer ışığı, aynı dalga boyuna sahip, eş frekanslı ve birbirine paralel hareket sergileyen fotonlardan meydana gelen, yönlendirilebilir, bağdaşık, güçlü bir ışık demetidir. Normal ışıkta ise, ışığı oluşturan fotonların her biri farklı dalga boyundadır, birbirleriyle koordineli hareket etmezler ve saçılım gösterirler. Odaklanamazlar ve güçlü bir foton enerjisine sahip değildirler. Sıradan bir ışık bir prizmadan geçirilecek olursa, görünür spektrumdaki birçok farklı renkte ışık olarak birbirinden ayrılır. Bu monokromatik (tek renk) yapıdaki lazer ışığı ise görünür veya görünmez olabilmektedir. Lazer ışını bu özelliklerinden başka

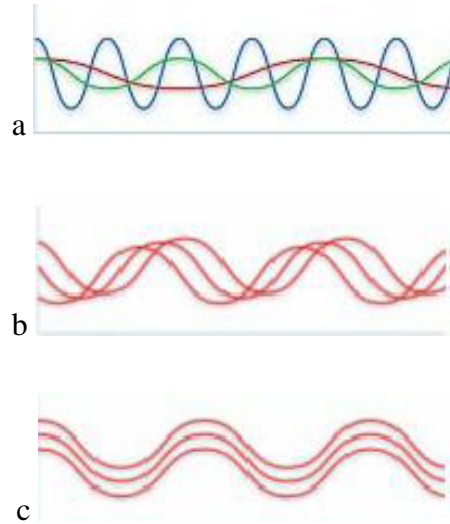
kolimasyon, kohorent, güç yoğunluğu ve etkinlik gibi karakteristik özelliklere sahiptir (127, 129).

•**Koherent (uyumluluk):** Lazer ışını belli bir dalga boyunda aynı fazda bulunur ve ışın birbirine paraleldir (Şekil 14). Lazer ışınının yayılımı sırasında dalga şekli, yüksekliği ve derinliği bozulmaz ve bu lazerin ışınının çok parlak olmasını doğurur.

•**Kolimasyon ve diverjans (doğrusallık):** Kolimasyon terimi çıkan ışının paralellliğini tarif eder. Lazer ışını yüksek derecede kolimasyon gösterir ve çok az diverjans (saçılma) gösterir. Güneş ışığı ya da elektrik ampulü gibi kaynaklar çevreye dağınık ışık verirler.

•**Güç ve güç yoğunluğu:** Lazer ışınlarının büyük bir elektromanyetik alan gücü vardır ve lazerin enerjisi istenilen şekilde ayarlanabilir ve yönlendirilir.

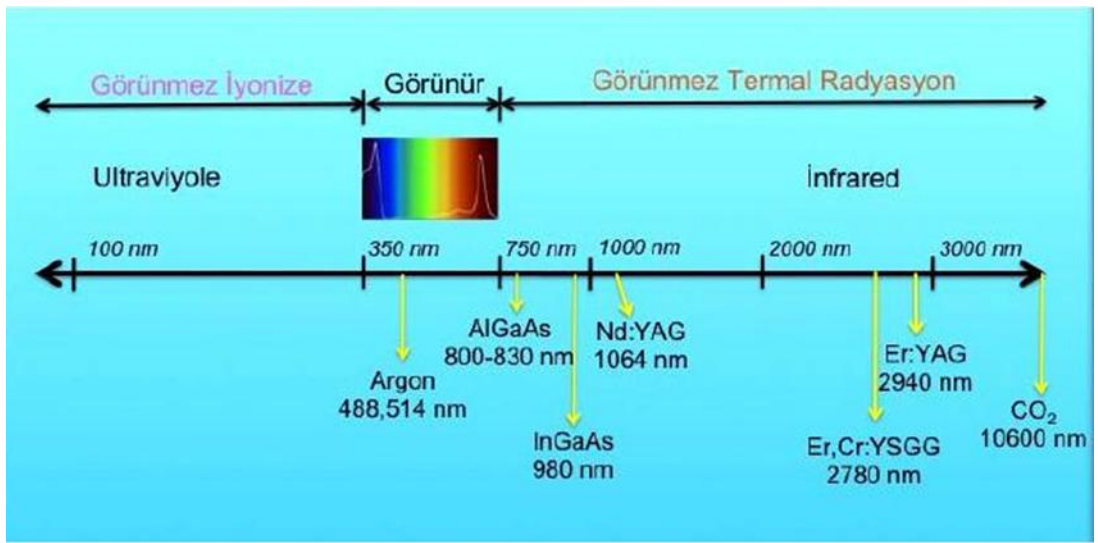
•**Etkinlik:** Lazer ışını kaynaktan çıktığı güçte herhangi bir kayba uğramadan hedefe ulaşır. Oysaki sıradan bir ampulü ele aldığımızda aydınlatma özelliğinin ortaya konabilmesi için etrafa çok yüksek miktarda ısı yaymaktadır.



Şekil 14: Lazer ışığının özellikleri a) Farklı renklerde ve dalga boylarında güneş ışığı dalgaları b) Monokromatik fakat koherent olmayan ışın c) Monokromatik ve koherent lazer ışını (130)

Lazer tarafından üretilen foton dalgalarını tanımlayan üç önemli kriter vardır. Bunlardan birincisi ışığın hızı, ikincisi ışığın büyüklüğü yani dalganın tepe noktasıyla dip noktası arasındaki mesafedir. Dalga büyüklüğü arttıkça lazerin etkinliği yükselir. Üçüncüsü ise dalga boyu yani horizontal aks boyunca simetrik iki nokta arasındaki mesafedir.

Dalga boyuyla ilgili diğer bir özellik frekansıdır. Frekans saniyede salınım yapan dalganın sayısının bir ölçümüdür ve dalga boyuyla ters orantılıdır. Düşük dalga boyu yani yüksek frekanslardaki lazerler yüksek enerji taşıırken; yüksek dalga boyu yani düşük frekanstaki lazerler ise düşük enerji taşırlar. Tüm klinik olarak kullanılan lazerlerin dalga boyları Şekil 15’da gösterilmiştir.

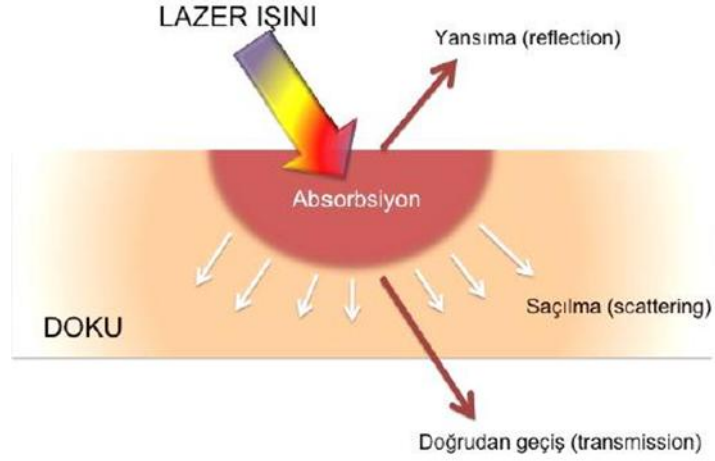


Şekil 15: Günümüzde tedavi amaçlı kullanılan dental lazerlerin elektromanyetik spektrumdaki yerleri (131)

2.6.3. Lazer Doku Etkileşimi

Lazer doku etkileşimi, kullanılan lazerin dalga boyuna ve dokunun özelliklerine göre birbirleriyle ilişkili dört farklı etkileşimde gerçekleşir (132). Bunlar Şekil 16’da gösterilmiştir.

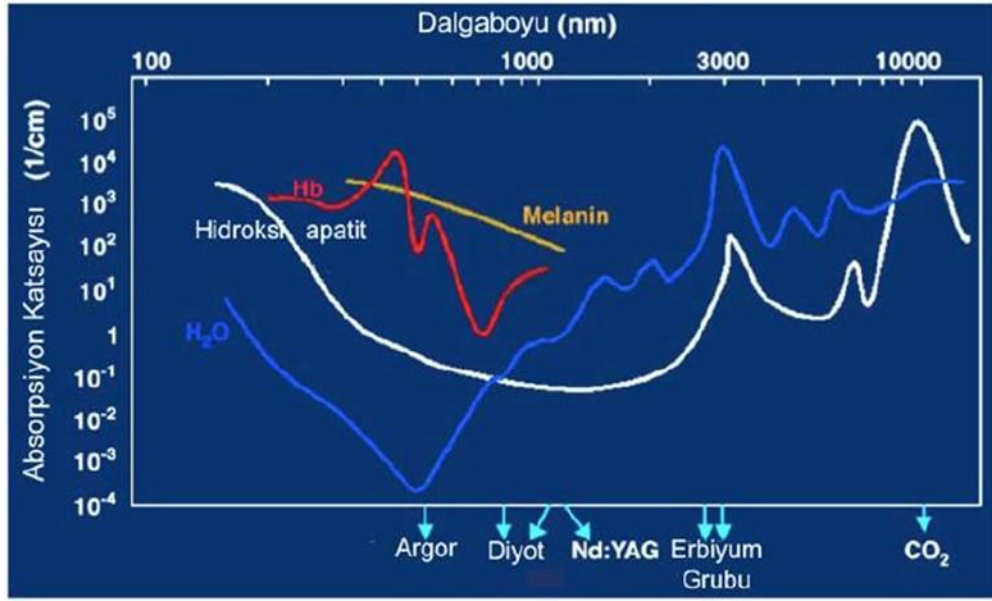
- Işığın bir kısmı hiçbir etkiye yol açmadan doku içinde saçılım gösterir (saçılma)
- Diğer bir kısmı doku yüzeyinden yansır (refleksiyon)
- Kalan kısımları doku tarafından emilir (absorbsiyon) ve
- Derin dokulara ulaşır (penetrasyon)



Şekil 16: Lazerin doku tarafından absorpsiyonu, dokudan doğrudan geçişi, yansıması ve saçılması (39)

Bu etkileşimler içerisinde emilim, hedef dokuda olması kaydıyla en çok istenilenidir. Doku tarafından emilen enerji miktarı; pigmentasyon oranı, su içeriği gibi dokunun karakteristik özelliklerine ve lazerin dalga boyu ve emisyon modeline göre değişiklik göstermektedir.

Emilimi etkileyen bir diğer etken ise belirli dalga boyunda ışığı absorbe eden kromofor olarak adlandırılan dokuya renk veren bileşenlerdir. Etkileşimin derecesi ayrıca lazer uygulanan dokunun bulunduğu ortama da bağlıdır. Dokunun içerdiği sıvı, hemoglobin ve kan lazerin absorpsiyonunu etkiler. Örnek olarak o bölgede kan akımının az olması doku tarafından absorbe edilen enerji miktarını azaltır. Genel olarak daha düşük dalga boyları (500-1000 nm) pigmente dokular ve kan elementleri tarafından iyi emilir. Argon lazer, hemoglobin tarafından yüksek oranda tutulur. Aksine Diyot ve Nd:YAG lazerlerin ise melanine afinitesi daha yüksek iken, hemoglobinle daha az etkileşimleri bulunmaktadır. Daha yüksek dalga boylarının ise su ve hidroksiapatit ile etkileşimleri daha fazladır. Su için en fazla emilim, dalga boyu 3000 nm'nin hemen altında olan Er:YAG lazerlerde gerçekleşir ve aynı zamanda hidroksiapatitler tarafından da iyi absorbe edilirler (Şekil 17).



Şekil 17: Çeşitli doku bileşenlerinin çeşitli dalga boylarındaki absorpsiyon eğrileri (131)

İkinci etkileşim ise, absorpsiyonun aksine, lazer ışığının hedef dokuda etki oluşturmaksızın dokudan doğrudan geçişidir. Bu özellik büyük oranda ışığın dalga boyu ile ilişkilidir. Örneğin su; Argon, Diyot ve Nd:YAG gibi dalga boyu kısa lazerler için geçirgendir; oysa Er: YAG ve CO2 lazerler için ise yüzeysel tabakalardaki doku sıvıları ve su yüksek emilim gösterir ve böylece çevre dokulara enerji iletimi düşük düzeyde kalır. Er: YAG lazerler 0,01 mm kadar bir penetrasyon gösterirken, 810 nm dalga boyundaki diyot lazerler ise 10 mm' ye kadar penetrasyon gösterirler (133).

Üçüncü etkileşim ışığın yansımadır. Yansıyan ışık kendince yeni yönler alır ve hedef dokuda etki gösteremez. Çürük tespiti için kullanılan lazerler yansıyan ışığı toplayarak çalışır.

Dördüncü ve son etkileşim ise ışığın saçılmasıdır. Bu etkileşim tipinde, saçılan ışından dolayı istenilen miktarda enerji aktarımı sağlanamaz ve yararlı bir biyolojik etki görülemez. Saçılan ışınların cerrahi alana komşu olan dokulara ısı iletimine ve buna bağlı olarak oluşan istenmeyen termal hasarlara sebep olabileceği bildirilmiştir (133)

2.6.4. Diş Hekimliğinde Kullanılan Lazerler

Lazerler aktif ortamlarına, dalga boylarına, iletim sistemlerine, doku emilimlerine ve klinik uygulama yöntemlerine göre adlandırılırlar. Diş hekimliğinde sıklıkla kullanılan lazerleri sınıflayacak olursak:

- Görülebilir Işık Lazerleri (350–693 nm)
 - Argon Lazerler (488 – 514 nm)
 - Diyot Lazerler (800 – 980 nm)

- Kızıl Ötesi Lazerler (730 – 12,000 nm)
 - Nd: YAG Lazerler (1,064 nm)
 - Ho: YAG Lazerler (2,100 nm)
 - Er: YAG ve Er, Cr: YSGG Lazerler (2,900 nm)
 - CO2 Lazerler (10,600 nm)

Erbiyum Lazer (Er: YAG ve Er, Cr: YSGG Lazerler)

İki farklı dalga boyuna sahip erbiyum lazer vardır. Er: YAG lazer 2940 nm dalga boyunda iken, Er, Cr: YSGG lazer ise 2780 nm dalga boyundadır. Er: YAG lazer, aktif ortamı içerisine erbiyum yerleştirilen katı yitrium alüminyum garnet kristalinden oluşurken; Er, Cr: YSGG lazer ise aktif ortam olarak içerisine erbiyum ve krom yerleştirilen yitrium, skandiyum, galyum garnet kristalinden oluşur. Her iki lazerin dalga boyu, spektrumun noniyonize, görünmez ve orta infrared kısmındadır.

Er, Cr:YSGG lazerler yalnız fiber optik iletim sistemine sahipken; Er:YAG lazerler ise fiber optik kablo ile kullanılır. Fiber optik sistemlerin oluşturulması güçtür ve ergonomileri diğer lazerlere oranla daha sınırlıdır. Her iki lazer sistemi de serbest atımlı konumda ışına yapar. Ayrıca uygun cerrahi için etkili hava soğutması gerekmektedir. Her iki lazer de yüksek oranda su içermesinden dolayı yumuşak dokuda kullanılabilir. Ancak diğer lazerler gibi koagülasyon etkisine sahip değildirler. Bu tip lazerler özellikle sert dental dokular ve hidroksiapatit için en yüksek emilim oranına sahiptir ve dolayısıyla sert doku işlemleri oldukça kolaydır.

Er: YAG lazerler dokuda fotoablasyon yaparak etki gösterir. Fotoablasyon etkisiyle sert dokuların uzaklaştırılmasında dokulardaki mikro patlamalar ve erimeler meydana gelir.

Ancak bu lazer grubunda cerrahi alana ulaşma zorluğunun yanı sıra, çevre dokuları koruma amaçlı hava ve su spreyi gerekliliği ve bu uygulamanın amfizeme neden olma olasılığı unutulmamalıdır (134, 135).

Nd: YAG Lazer

Nd: YAG lazerler aktif ortamlarında yeryüzünde ender olarak bulunan yitrium ve alüminyum elementleri ve neodmiyum iyonlarının kombinasyonu ile oluşan garnet kristali bulunduran lazerlerdir. Katı aktif bir ortama sahip olan Nd:YAG lazer 1064 nm dalga boyunda, elektromanyetik spektrumda görünmez ışığa yakın bir yerdedir. Bu lazer yalnız serbest atım konumunda, mikro-saniyenin yüzde biri atım aralığı süresinde çalışır. Çok ince dokularda çalışırken çevre dokularda ısı oluşturmadan işlem yapılabilir. Küçük çaplı, esnek, ucu açık ve dokuya temas eden fiberlerle kullanılır. Yumuşak dokuların kesilmesi, koagülasyonu sırasında genellikle diğer lazerlere oranla daha fazla su soğutması ile çalışır ve iyi bir hemostaz sağlar. Bu lazer kavernoöz hemanjiomaların, vasküler malformasyonların tedavisinde başarılı ve güvenli bir şekilde kullanılmaktadır. Diş sert dokularından çok az emildikleri için bu lazer grubu ile dişlere yakın yumuşak bölgelerde güvenle çalışılabilir (131, 136).

CO2 Lazerler

CO2 lazerler aktif ortamlarında CO2 gazı içermektedir. Dalga boyu 10.600 nm olup elektromanyetik spektrumun sonunda yer alır. İletim sistemi sürekli veya atımlı konumdadır. Minimal skar oluşumuyla birlikte güçlü hemostatik ve bakterisidal etkisi vardır. Yumuşak dokuyu hızlı bir şekilde kaldırabilir ve koagülasyonda da kullanılabilirler. CO2 hidroksiapatite en fazla absorpsiyonu olan lazerdir ve bu oran erbiyumdan yaklaşık 1000 kat daha fazladır. Bu nedenle, işlem bölgesine yakın sert dokuların, lazer ışınlarından mutlaka korunması gerekir. Sert dokularda kullanımı kısıtlıdır (131, 137, 138).

Argon Lazerler

Kesintisiz veya atımlı emisyon şekilleri olan, fiber optik iletim sistemli ve elektromanyetik spektrumun görünür ışın bölümünde olan tek cerrahi lazer grubudur. Diş hekimliğinde iki ayrı dalga boyunda kullanılır. Biri 488 nm mavi renkli; diğeri ise 514 nm mavi-yeşil renklidir. 514 nm dalga boylu olan Argon lazerin en fazla emilimi,

hemoglobin, hemosiderin ve melanin içeren dokularda gerçekleşir. Bu nedenle yüksek hemostatik kapasiteye sahiptir. Akut enflamasyonlu periodontal hastalıklar ve hemanjiyom gibi vaskülarizasyondan zengin lezyonlar argon lazer tedavisi için en uygun endikasyonlardır. Mine ve dentinde zayıf emilimi vardır. Bu özellik gingival dokuların kesilmesi ve şekillendirilmesi sırasında dişin sağlam dokularına zarar verilmeden çalışılmasına olanak sağlar (139).

Diyot Lazerler

Aktif ortamı alüminyum olanlarda dalga boyu 810 nm olurken, indiyum olanlarda ise 980 nm'dir. Hem kesintisiz hem de atımlı formda fiber optik sistemle iletilmektedir. Diyot lazerler argon lazer gibi pigmente dokular tarafından iyi emilirken, diş dokuları tarafından daha az emilirler. Bu sayede argon lazerlere benzer şekilde çevre yumuşak dokulardaki cerrahi işlemler dişlere zarar vermeden yapılabilir. Ancak hemostaz özellikleri argon lazerde olduğu kadar iyi değildir.

En büyük avantajı mükemmel yumuşak doku cerrahisi sunan küçük, portatif bir lazer ünitesi olmasıdır. Diyot lazerler argon lazerler gibi sürekli dalga emisyon modunda çalıştıkları zaman hedef dokuda hızlı ısı artışına neden olurlar. Bu yüzden operasyon bölgesi hava ve su ile soğutulmalı ya da lazerin ucu cerrahi alan üzerinde hafifçe hareket ettirilerek uygulanmalıdır.

Diyot lazerlerin oral cerrahide kullanım alanları oldukça geniştir. Vasküler lezyonların tedavisinde, yumuşak doku küretajında, periimplantitis tedavisinde, mukozal insizyonlarda, fibrotik dokuların eksizyonunda güvenle kullanılmaktadır. Ayrıca diyot lazerler düşük doz lazer tedavisinde biostimülasyon ve ağrı kontrolünde kullanılabilir (131, 140, 141).

2.6.5. Düşük Doz Lazer Tedavisi

Düşük doz lazer tedavisi (DDLTL) literatürde; terapötik lazer tedavisi, lazer ile biyostimülasyon gibi farklı şekillerde adlandırılır ve yapılan tedaviye biyostimülasyon veya biyomodülasyon adı verilir. Bu tedavi şeklinin özelliği, non-invaziv olmasının yanısıra yara iyileşmesini hızlandırması, ödemi, enflamasyonu ve ağrıyı azaltması, kemik ve sinir rejenerasyonunu hızlandırması gibi etkilerinin bulunmasıdır.

Bu açıdan özellikle postoperatif yaraların iyileşmesinde, ağrı tedavisinde, nörolojide, spor yaralanmalarında, dermatolojik lezyonların tedavisinde, iç kulak rahatsızlıklarında ve tıbbın diğer dallarında başarıyla kullanılmaktadır (140, 142). DDLT ile ilgili ilk çalışmalarda 632,8 nm dalga boyuna sahip He-Ne gaz lazerler kullanılırken, günümüzde artık klinik uygulamalarda 635 nm, 810 veya 830 nm dalga boylu galyum arsenid veya galyum alüminyum arsenid diyot lazerler (GaAlAs) tercih edilmektedir.

2.6.5.1. Düşük Doz Lazer Tedavisinin Etki Mekanizması

DDL T'nin mekanizması karmaşıktır. Bu mekanizma görünür kırmızı ve infrarede yakın dalga boyundaki ışıkların hücre içinde ve özellikle mitokondri membranındaki fotoreseptörler tarafından emilimi gerçeğine dayanır (143). Işığın hücrenin özellikle solunum zinciri bileşenleri tarafından absorpsiyonuyla başta solunum zinciri ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) havuzu oksidasyonunda kısa süreli aktivasyonuna neden olur ve böylece DDL T hücre aktivasyonunda artışa yol açar.

Oksidatif fosforilasyonun uyarılması, hücre sitoplazmasında ve mitokondride redoks düzeyinde değişikliğine neden olur. Elektron taşıma zinciri ile ATP desteğinin artması sonucu hücreye daha fazla destekleyici güç sağlanır. Bu durum ayrıca mitokondri membranının elektrik potansiyelinin ve sitoplazmanın alkalizasyonunun artması ile nükleik asit sentezinin aktivasyonunda da rol oynar (141, 142, 144). DDL T'nin kompleks olan bu etki mekanizması sonucu birçok biyolojik etkisi vardır. Bunlar: (140)

- Reseptör hassasiyetini azaltması
- Hücre membranındaki potansiyeli değiştirmesinden dolayı ağrıya toleransı arttırması
- İnflamasyon safhasını kısaltması
- Doku ve damarlarda mikrosirkülasyondaki oksijen tüketiminin arttırılması
- Kollateral yeni damarların sayısını arttırması
- Hücre içi ödemin önlenmesi ve azaltılması
- Mikrofloradaki bakterisit etkisi
- İmmün reaksiyonlarındaki baskılayıcı etkisi
- Hücresel aktiviteyi arttırması ve hızlanmış intraselüler metabolizma
- Kollajen ve fibroblast formasyonunu arttırarak yara iyileşmesini hızlandırmasıdır.

2.6.5.2. Dozaj ve Hesaplaması

DDLTL uygulamalarında en önemli unsurlardan biri de optimum dozun uygulanmasıdır. Optimum doz ayarlamasında ise şu şekilde hesaplanır:

$$\text{Verilen enerji (mJ)} = \text{Güç (mW)} \times \text{Zaman (sn)}$$

$$\text{Doz (J/cm}^2\text{)} = \text{Verilen Enerji (J)} / \text{Uygulanan Alan (cm}^2\text{)}$$

Örneğin; 100 mW'lık bir lazerin 10 sn süreyle 0,5 cm²'lik bir alana uygulanması ile 100 mW x 10 s = 1000 mJ = 1 J enerji elde edilir. Verilen doz ise 1 J / 0.5 cm² = 2 J/cm² olarak hesaplanır.

Lazer enerjisinin dokulara aktarılmasında dokunun türü ve kalınlığı da göz önünde bulundurulmalıdır. Lazerin mukoza ve yağ dokusundan iletkenliği fazla iken; kas dokusunun yanı sıra; pigment ve hemoglobinden zengin dokulardan ise daha azdır. Bir diğer önemli hususta açık yaralar dışında DDLTL'nin dokuya kontak konumda uygulanmasıdır.

2.6.5.3. DDLTL'nin Kemik İyileşmesine Etkisi

Literatürde yapılan çalışmalarda GaAlAs, He-Ne ve Argon lazerlerin kemik rejenerasyonunu hızlandırıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. DDLTL'nin kemik iyileşmesi üzerine stimüle edici bu etkisi genel anlamda artmış vaskülarizasyona, hematoma absorpsiyonuna, makrofaj aksiyonuna, fibroblast proliferasyonuna, artmış kondrosit ve osteoblastik aktiviteye bağlanmıştır (140). Kemik iyileşmesinde lazerin iyileşme üzerine stimülatif etkisi özellikle aktif osteogenezis ve osteoklastik aktivite üzerine olmaktadır (145).

DDLTL mitokondride ATP sentezini indükler ve hücrel ve dolaşımsal motiliteyi artırır. Aynı zamanda intersitisyel doku ve yüzeysel katmanlarda permeabilite artışını geliştirmektedir. Tüm bunlar lenfatik akımda ve sonuçta etkilenmiş kemik içi sirkülasyonda da artmaya neden olmaktadır. Böylece DDLTL'nin kemik iyileşmesinde iltihabi cevabı kısalttığı ve erken dönemde kemik oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (11). Bunun yanında DDLTL'nin kemiğin erken iyileşme döneminde hücre proliferasyonu ve farklılaşmamış osteoprogenitör hücreler üzerine etkili olduğu da bildirilmiştir. Ancak araştırmacılar tarafından iyileşmenin geç dönemlerinde uygulanan

DDLT'nin kemik iyileşmesine olumlu bir katkısının olmadığı düşünülmektedir (146-148).

Diğer bir görüşe ise DDLT kemik iyileşmesi üzerine etkisini doğrudan değil de dolaylı yoldan göstermektedir. Buna göre lazer damarlanmayı ve antiinflamatuvar etkiyi artırarak aktif mediatör salınımı ve mikrovaskülarizasyonu artırmaktadır (132). Nicola ve ark. kemiğin yapısal özellikleri ve hücrel aktivite üzerine DDLT'nin etkisini inceledikleri çalışmalarında DDLT uygulanan kemikte operasyonu takip eden 5.günde kemik hacminde önemli derecede artış olduğunu, ayrıca yine lazer grubunda 5. günde osteoklast yüzeyi, 15. günde osteoblast yüzeyi ve 25. günde osteoid hacminin kontrol grubundan fazla olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuçla DDLT'nin kemik dokuda iyileşmenin başlangıç safhasında özellikle de osteoklastların aktivitesi arttırdığı kanısına varılmıştır (10).

Barushka ve ark. rat tibialarında bulunan defektlere He-Ne lazer uygulamasının iyileşme sahasında osteoblast ve osteoklast popülasyonunda artışa neden olduğunu ve kemik iyileşme hızının kontrol grubuna göre iki kat daha hızlı olduğunu bildirmişlerdir (149). Diğer bir çalışmada 3 hafta boyunca her gün He-Ne lazer irradyasyonu uygulanan farelerde kemik kırıklarında daha sıkı bir ağ yapısına sahip trabekül oluşumu gözlenmiş ve dolayısıyla kemik dokusunun daha hızlı oluştuğu saptanmıştır (150). Glinkowski ve ark. ise farelerde deneysel oluşturdukları tibia kırıklarına, DDLT uygulayarak kırık bölgesinde yeni oluşan kemik dokusunu radyolojik yönden incelemişler ve lazer uygulanmış grupta kontrol grubuna oranla daha yüksek optikal dansitede kemik oluştuğunu saptamışlardır (151).

DDLT kemikteki her türlü defektte ve özellikle erken dönemde uygulandığı takdirde, osteoblastlar başta olmak üzere hücrel proliferasyonu ve alkalen fosfataz (ALP) aktivitesini stimüle etmektedir (149). ALP kemiğin normal gelişme ve tamiri sürecinde kırıkta ve kemiğin kalsifikasyonu için önemli bir enzim olarak kabul edilmektedir. Ozawa ve ark. 830 nm dalga boyunda GaAlAs lazer kullandıkları in vitro çalışmalarında erken dönemdeki lazer uygulamasının hücrel proliferasyonu, ALP aktivitesini ve osteokalsin gen ekspirasyonunu kayda değer derecede stimüle ettiği saptanmıştır (152).

DDLT'nin kemik iyileşmesi üzerindeki etkisi ile ilgili çalışmalar lazerin olumlu etkisini gösterirken; bir kısım çalışma sonuçları ise DDLT'nin klinik kullanılmadan önce daha fazla deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir (153, 154).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu proje kapsamında Cumhuriyet Üniversitesi (C.Ü.) Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulundan 04.11.2013 tarihinde B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/81, 399 sayı ile gerekli izin alındıktan sonra çalışmamızın deneysel kısmı C.Ü. Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında 48 adet Wistar Albino cinsi ortalama 350 ± 50 gr ağırlığında yetişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Çalışmamızda kullanılan gereçler şunlardır:

- 48 adet Wistar Albino cinsi ortalama 350 ± 50 gr ağırlığında yetişkin erkek sıçan
- 48 adet 4 delikli mikroplak (Bahadır, Samsun, Türkiye)
- 192 adet 1 mm çapında 4 mm boyunda mikrovida (Escomed, Adana, Türkiye)
- Tornavida (Escomed, Adana, Türkiye)
- 0,8 mm çap ve 5 mm boyda delici frez (Escomed, Adana, Türkiye)
- Taşınabilir motor ve piyasemen (Escomed, Adana, Türkiye)
- 1 mm çapında fissür piyasemen frezi (Escomed, Adana, Türkiye)
- Kemik keski ve cerrahi çekiç (Kohler)
- Ameliyat seti (bisturi sapı #3, bisturi ucu #15, cerrahi dişli penset, dişli ekartörler, periost elevatörü, presel, kıvrık hemostat, portegü, cerrahi makas)
- Ağrı kontrolü için Rimadyl® flakon (Carprofen, Pfizer, Türkiye)
- Enfeksiyon profilaksisi için Novosef ® i.m. flakon 0.5 gr, 2 ml (Seftriakson sodyum, Zentiva, Türkiye)
- Genel anestezi için Rompun® flakon (Xlazine HCL, Bayer, Türkiye),
- Genel anestezi için Ketalar® flakon (Ketamin HCL, Pfizer, Türkiye),
- 10 cc'lik insülin enjektörleri
- 4,0 prolene dikiş ipliği (Ethicon, Medikal-Turkey)
- Formaldehit (% 10'luk formol)
- Siyah üzüm çekirdeği (Çalkarası, Denizli, Türkiye)
- Düşük doz lazer cihazı (Fotona XD-2 diode laser, Fotona, Ljubljana, SLOVENIA)
- % 0.9 serum fizyolojik

3.2. Çalışma Planı

Çalışmamızda sırasıyla; cerrahi işlemler, cerrahi sonrası bakım, hayvanlara ÜÇE ve DDLT uygulamaları, sakrifikasyon, biyokimyasal ve histomorfometrik incelemeler gerçekleştirildi.

Cerrahi işlemler, cerrahi sonrası bakım ve sakrifikasyon aşamaları C.Ü. Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında; üzüm çekirdeği ekstresi elde edilmesi ve hazırlanması Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında; biyokimyasal incelemeler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarlarında; histomorfometrik incelemeler Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.3. Deney hayvanları ve grupları

Hayvanlar, operasyondan önceki 1 hafta boyunca genel sağlık durumu ve vücut ağırlığı yönünden takibe alındı. Bu süre zarfında kilo kaybeden, genel sağlıkları bozulan ratlar çalışmadan çıkartıldı. Bunun sonucunda çalışmada kullanılmak üzere seçilen 48 adet Wistar Albino cinsi, ortalama 350 ± 50 gr ağırlığında yetişkin erkek sıçan deney süreleri boyunca standart deney kafesleri içerisinde yem ve su kısıtlaması yapılmaksızın hayvan odasında (22-24 oC de, %55-70 nem, 12 saat aydınlık/karanlık oda) tutuldu. Ratlar ameliyat sonrası altı denek aynı metal kafesler içinde altlarında kuru talaş olacak şekilde özel odalarında suya ve standart sıçan yemine rahatlıkla ulaşabilir durumda barındırıldılar. (Resim 1)



Resim 1: Ratların gruplandırılarak kafeslere yerleştirilmesi

3.3.1. Deney Hayvanlarının Sınıflandırılması

Denekler rastgele seçilerek Üzüm çekirdeği ekstresi, Düşük doz lazer tedavisi, Üzüm çekirdeği ekstresi + Düşük doz lazer tedavisi ve Kontrol olmak üzere 4 ana gruba ayrıldı. Bu gruplar da kendi içerisinde 7 ve 21. gün olarak üzere 2 alt gruba daha ayrılarak toplamda her grupta 6'şar rat olacak şekilde 8 grup oluşturuldu (Tablo 5).

Tablo 5: Deney hayvanlarının gruplandırılması

| Grup | Kod | Alt gruplar | n |
|-----------------------------------|------|--|---|
| Kontrol grubu | K7 | Grup 1: Kontrol grubu- 7. gün | 6 |
| | K21 | Grup 2: Kontrol grubu- 21. gün | 6 |
| Deney grubu (Ekstre) | E7 | Grup 3: Deney grubu, Ekstre- 7. gün | 6 |
| | E21 | Grup 2: Deney grubu, Ekstre- 21. gün | 6 |
| Deney grubu (DDLTL) | L7 | Grup 2: Deney grubu, DDLTL- 7. gün | 6 |
| | L21 | Grup 2: Deney grubu, DDLTL- 21. gün | 6 |
| Deney grubu (Ekstre+DDLTL) | EL7 | Grup 2: Deney grubu, Ekstre + DDLTL- 7. gün | 6 |
| | EL21 | Grup 2: Deney grubu, Ekstre + DDLTL- 21. gün | 6 |

3.3.2. Gruplara Göre Çalışma Teknikleri

Tüm hayvanlara aynı cerrahi prosedür ve cerrahi sonrası bakım uygulandı. Tüm kontrol ve deney grubundaki ratlarda kırığın oluşturulduğu gün 0. gün olarak kabul edilmiştir. Belirlenen ana ve alt gruplar aşağıdaki gibidir:

1. Kontrol Grubu (K7-K21): Bu gruptaki deneklere çalışmanın standardizasyonu açısından sakrifiye edilene kadar orogastrik yolla 1 cc serum fizyolojik verildi ve denekler 7.ve 21. günlerde sakrifiye edildi.

2. Deney grubu, Ekstre (E7-E21): Bu deney grubundaki hayvanlarına ilk ekstre uygulaması operasyondan 1 saat önce verilmiş olup toplamda 7 ve 21 gün süreyle orogastrik yolla 300 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstratı verildi ve denekler 7. ve 21. günlerde sakrifiye edildi.

3. Deney grubu, DDLT (L7-L21): Bu gruptaki deneklere cerrahi işlemin yapıldığı gün başlamak üzere 48 saat aralıklarla 7 ve 14 gün süreyle kırık hattı boyunca 2 farklı noktaya 0.3 W çıkış gücünde, devamlı çalışma modunda GaAlAs Diode lazer ile (810 nm, model; Fotona XD-2 diode laser, Fotona, Ljubljana, SLOVENIA) ve her bir noktaya 25 sn olacak şekilde (50 sn) 23 J/cm² dozda cilde temas ettirilerek uygulandı ve denekler 7. ve 21. günlerde sakrifiye edildi.

4. Deney grubu, Ekstre + DDLT (EL7-EL21): Bu deney grubundaki hayvanlarına ilk ekstre uygulaması operasyondan 1 saat önce verilmiş olup toplamda 7 ve 21 gün süreyle orogastrik yolla 300 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstratı verildi. Bununla birlikte cerrahi işlemin yapıldığı gün başlamak üzere 48 saat aralıklarla 7 ve 14 gün süreyle kırık hattı boyunca 2 farklı noktaya 0.3 W çıkış gücünde, devamlı çalışma modunda GaAlAs Diode lazer ile (810 nm, model; Fotona XD-2 diode laser, Fotona, Ljubljana, SLOVENIA) ve her bir noktaya 25 sn olacak şekilde (50 sn) 23 J/cm² doz cilde temas ettirilerek uygulandı ve denekler 7. ve 21. günlerde sakrifiye edildi.

3.4. Cerrahi yöntem ve Postoperatif Bakım

Deneklere intraperitoneal 70 mg/kg ketamin ve 13 mg/kg ksilazin enjekte edilerek genel anestezi sağlanmıştır. Deneklerin sağ yanak bölgesi tıraşlanıp antibakteriyel iyot

solüsyonu ile silinmiş ve böylece denekler cerrahi işleme hazır hale getirilmiştir (Resim 2).

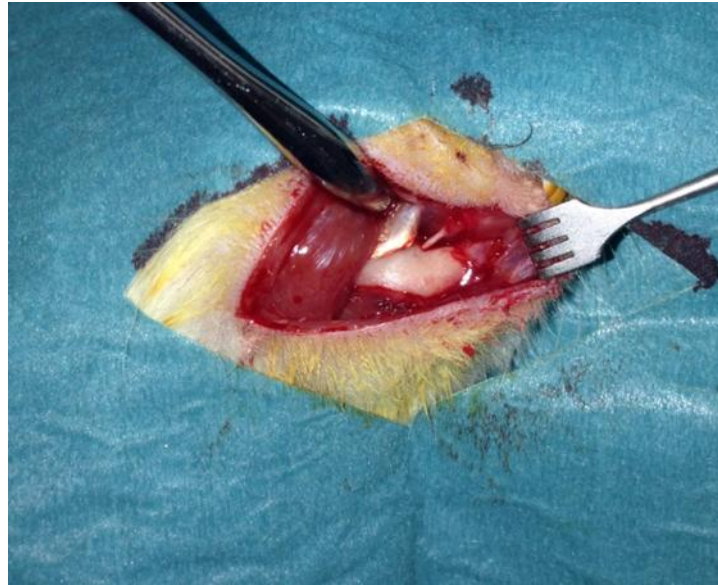


Resim 2: Operasyon öncesi görünüm

Deneklerin sağ mandibulalarında yaklaşık 20 mm uzunluğunda ön-arka yönde submandibüler insizyon yapılmıştır (Resim 3a). Cilt altı dokular foramen mentale bölgesinden başlanarak küt bir şekilde diseke edilmiş ve sonrasında yumuşak dokular ekarte edilmiştir. Takiben periostun sıyırılmasıyla mandibulanın dış yüzeyine ulaşılmıştır. Bu bölgede masseter kası ekarte edilerek kasın linea obliqua externaya yapışma yeri görünür hale getirilmiştir (Resim 3b).



a)



b)

Resim 3: a) Sağ mandibulada antero-posterior yönde yapılan insizyon, b) Diseksiyon sonrası mental sinir ve masseterin linea obliqua externaya yapışma yeri

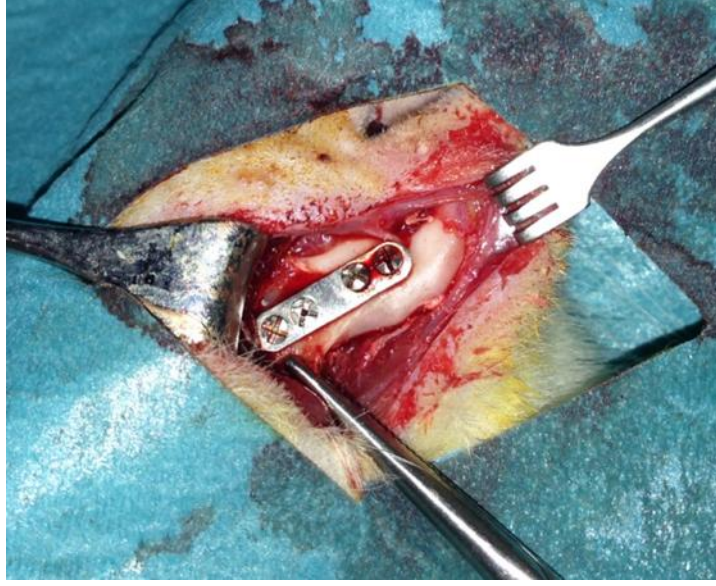
Sonrasında masseterin bu yapışıklığı insize edilerek serbestleştirilmiş, periost elevatörü ve dişli ekartörler yardımıyla ramus mandibula yönünde masseter ekarte edilerek mandibulanın korpus ve ramusuna ulaşılmıştır. Opere edilecek alan rahatlıkla görünür

hale getirildikten sonra serum fizyolojik irrigasyonu altında tur motoru piyasamenine takılan 0,8 mm çapında, 5 mm boyunda delici titanyum frez ile linea obliqa externanın yaklaşık 1 mm posteriorundan mikroplağın nden ikinci deliği hizasına denk gelecek şekilde mandibulada mikrovida yuvası hazırlanmıştır (Resim 4).



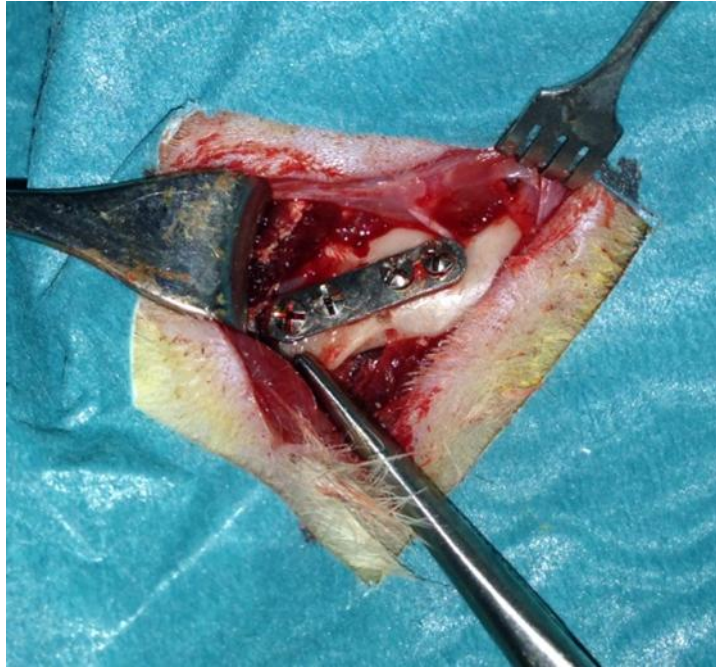
Resim 4: Mandibulada rehber mikrovida deliğinin hazırlanması

1 mm çapındaki mikrovida ile 4 delikli mikroplak bu rehber noktadan kemiğe gevşekçe adapte edilmiştir. Bu şekilde mikroplakta istenen hareketsizlik elde edilerek diğer 3 mikrovida yuvası da yine titanyum delici frez ile serum irrigasyonu altında hazırlanmıştır. Sonrasında mikroplağın önce en posteriordaki, sonra en anteriordaki ve son olarakta kalan yuvaya sırasıyla 1,0 mm çap ve 4,0 mm uzunluğundaki mikrovidalar çok sıkıştırılmadan gevşek bir şekilde adapte edilmiştir (Resim 5).

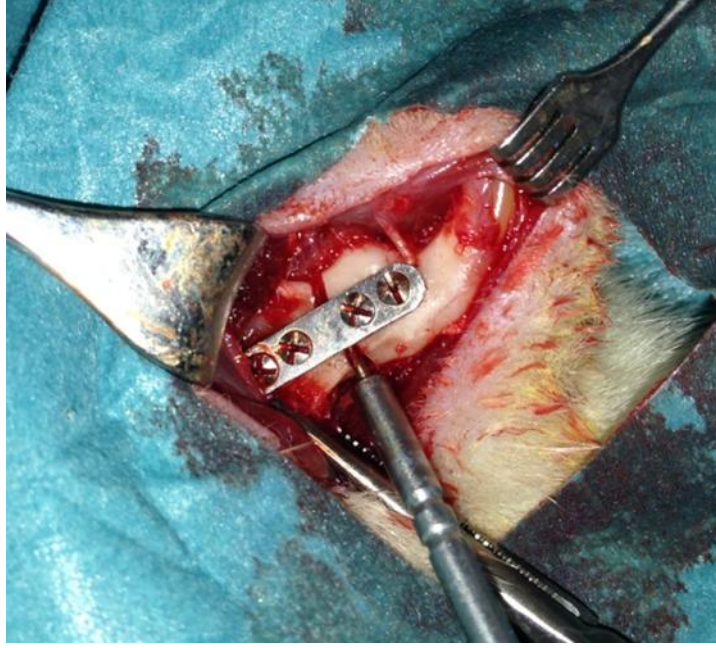


Resim 5: Plağın gevşek şekilde yerleşimi

Bunu takiben mandibulada premolar ile molar dişler arasından başlayıp vertikal yönde korpus mandibulanın alt kenarına kadar dikey bir kortikomi hattı oluşturacak şekilde rehber oluklar hazırlanmıştır (Resim 6). Ardından mandibulanın medial duvarı ve çevre yumuşak dokular korunarak frez yardımıyla bu oluklar birleştirilmiştir (Resim 7).

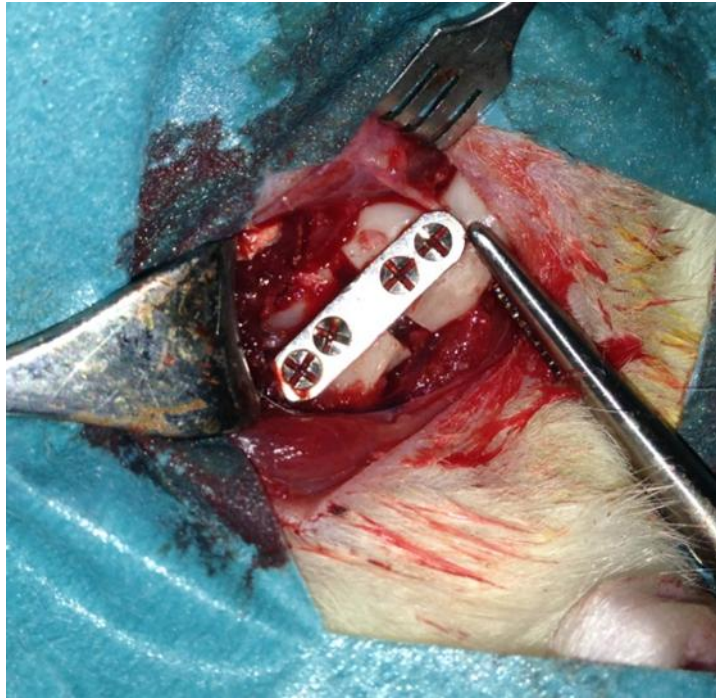


Resim 6: Rehber olukların oluşturulması



Resim 7: Kırık hattının freze edilmesi

Son olarak kortikotomi hattı rehber alınıp cerrahi keski yardımıyla kemikte tam bir kırık hattı oluşturulmuştur. Segmentlerin birbirinden tamamen ayrıldığı görüldükten sonra mikroplak mikrovidalar sıkıştırılarak kemiğe rijit bir şekilde tespit edilmiştir (Resim 8).



Resim 8: Gevsek konumlu mikroplağın tam kırık sonrası sabitlenmesi

Ameliyat sahası serum fizyolojik ile yıkandıktan ve herhangi bir yabancı cisim veya doku artığı kalmadığından emin olduktan sonra masseter kasın lifleri 5,0 katgüt; cilt ise 4,0 propilen dikişlerle kapatılmıştır (Resim 9).



Resim 9: Operasyon sahasının propilen dikişlerle kapatılması

Kırık iyileşmesinde gecikmeleri önlemek amacıyla tüm deneklerde cerrahi aşamada gereğinden fazla periosteum ve yumuşak doku sıyrılmamasına dikkat edilmiştir.

Post-operatif bakım

Postoperatif erken dönemde metal kafeslerde uyanma odasına alınan tüm denekler olası komplikasyon gelişimi açısından yakın takip edilmiştir. Ayrıca ağrı kontrolü amacıyla operasyondan hemen sonra ve günde bir kez olmak üzere Carprofen (Rimadyl® flakon) ve enfeksiyon profilaksisi amacıyla 5 gün boyunca günde bir kez olmak üzere Seftriakson sodyum (Novosef® i.m.) uygulanmıştır. Çenelerindeki kırık nedeniyle ilk 7 gün sadece yumuşak diyet (kek) ve su ile beslenen hayvanlar birinci haftadan itibaren normal diyetleriyle beslenmeye başlanmıştır. Sonrasında yem olarak standart rat pelet yemi kullanılmıştır. Ayrıca çalışma süresince tüm deneklerin kilo takibi yapılmıştır.

3.5. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan kara üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera* L.) Çalkarası cinsi olup Denizli ilinden Ağustos 2012 yılında toplanmıştır. Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarında sağlıklı tohumlar seçilerek kurutulmuş ve mekanik parçalayıcıda küçük parçalar haline getirilmiştir. Parçalanmış tohumlar 100'er gram tartılarak Soxhlet Cihazının (Gerhardt EV 14) kartuşlarına yerleştirilmiştir. Soxhlet cihazında her kartuş için 500 mL saf etil alkol (Merck) ile 50-60 °C'de 6 saat özütmeye tabi tutulmuştur. Elde edilen özütler Whatman no: 4 ile filtre edildikten sonra yüksek vakum altında Rotary Evaporatörde (Heildolph Heizbad HB Digit) 40°C'de yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen özütler +4°C'de deney başlayana kadar muhafaza edilmiştir.

3.5.1. Ekstrenin Hazırlanması ve Uygulanması

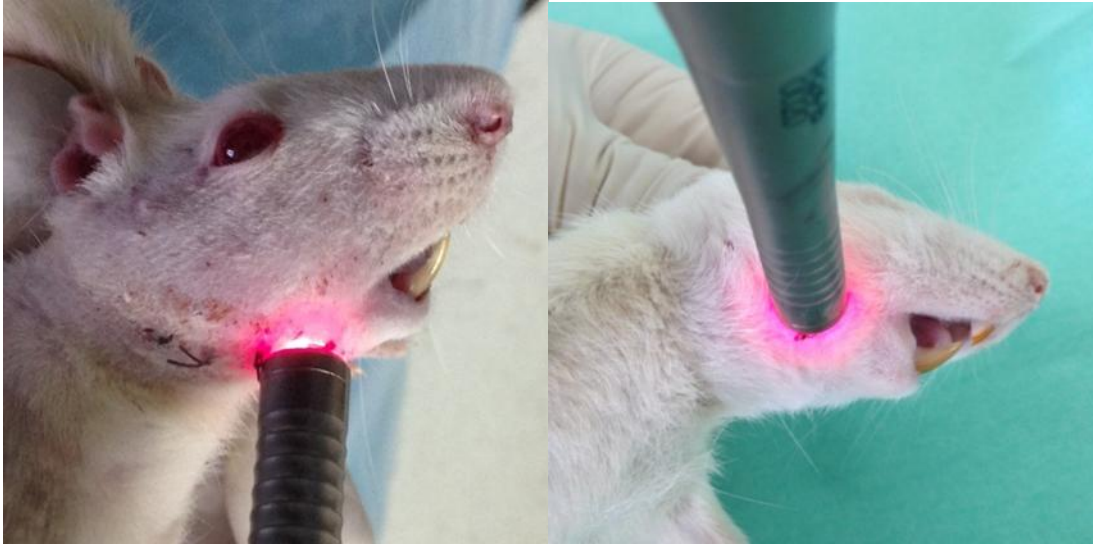
ÜÇE 1 ml serum fizyolojikte 100 mg olacak şekilde seyreltilerek orogastrik gavaj için hazır hale getirilmiştir (Resim 10).



Resim 10: a) Üzüm çekirdeği ekstresi b) Orogastrik gavaj uygulaması

3.6. Düşük Doz Lazerin Uygulanması

Çalışmamızda 810 nm, dalga boyunda Fotona XD-2 diode lazer, Fotona (Fotona, Ljubljana, SLOVENIA) 0.3 W çıkış gücünde, devamlı çalışma modunda GaAlAs Diode lazer ile kırık hattı boyunca iki noktaya ve her bir noktaya 25 sn olacak şekilde (50 sn) 23 J/cm² doz cilde temas ettirilerek uygulanmıştır (Resim 11). Lazer uygulamasında ilk doz cerrahi uygulamadan hemen sonra başlanarak standardizasyonun sağlanması açısından her 48 saatte bir aynı saatte uygulanmıştır.



Resim 11: DDLT uygulaması

3.7. Sakrifikasyon

Çalışmanın sonlandırılacağı 7. ve 21. günlerde ratlar ötenazi edilmeden önce vücut ağırlıkları tartılmıştır. Tüm gruplardaki ratlar i.m. 45 mg/kg ketamin hidroklorür ve 2,5 mg/kg xylozin hidroklorür ile genel anestezi altına alınmış ve daha sonra deneklerden intrakardiyak kan alınmıştır. Takibinde tüpler 10 dakika x 4000 g'de santrifüje edilmiş (Resim 12) ve elde edilen serum örnekleri laboratuvar incelemesine kadar -80 C°'de saklanmıştır. Sakrifikasyondan sonra yumuşak dokular diseke edilerek tüm mandibula çıkartılmış ve mandibulalar orta hatlarından ikiye ayrıldıktan sonra kırık taraftaki miniplak ve vidalar sökülmüştür. Çıkarılan dokular daha sonra % 10' luk formol içine konulmuştur.



Resim 12: İnttrakardiyak kan alımı ve santrifüye edilmesi

3.8. Klinik İnceleme

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra sağ mandibulaları TME ve simfiz bölgelerinden ayrıştırıldı. Mandibula üzerindeki kaslar ve diğer yumuşak dokular plak ve vidalara zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırılarak kırık hattının klinik açıdan değerlendirilmesi yapıldı (155).

Kırık hattında iki planda (ön-arka ve yan) hiç hareket olmaması tam kaynama (2 puan), bir planda hareket olması orta derecede kaynama (1 puan), her iki planda hareket olması kaynamama (0 puan) olarak yorumlandı (Tablo 6).

Tablo 6: Klinik olarak kallus dokusunun değerlendirilmesi

| Skor | Kırık bölgesindeki klinik bulgular |
|------|---|
| 0 | Kaynamama (her iki planda hareket olması) |
| 1 | Orta derecede (tek planda hareket olması) |
| 2 | Tam kaynama (hiç hareket olmaması) |

3.9. Biyokimyasal İnceleme

Serum örneklerinden total oksidan (TOS), total antioksidan (TAS) seviyeleri ve oksidatif stres indeksi (OSİ) ölçümleri yapıldı. Biyokimyasal analizler Gaziantep Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.10. Histolojik ve Histomorfometrik İncelemeler ve Örneklerin Hazırlanması

Hematoksilen-Eozin Boyaması

Gruplardan elde edilen örnekler % 10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat tespit edildi. Örnekler EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) solüsyonu içerisinde (100 ml 0.1 M fosfat tamponda çözünmüş pH: 7.1) 2 günde bir değiştirilerek, + 4°C'de 8 hafta süreyle, kontrol edilerek dekalsifiye edildi. Distile su ile yıkanan örnekler, derecesi giderek artan alkol serileri ile dehidratasyonu takiben, ksilen ile şeffaflaştırma işlemi uygulandı ve sonrasında parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi. Uygulanan parafin doku takip protokolü Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7: Parafin takip protokolü

| İşlem | Kullanılan Madde | Süre |
|-------------------------------|----------------------|-------------|
| A. Tespit | % 10 Formalin | 48 Saat |
| B. Dekalsifikasyon | Edta 0.1 M | 5 Hafta |
| B. Dehidratasyon | % 50 Alkol | ½ Saat |
| | % 60 Alkol | ½ Saat |
| | % 70 Alkol | ½ Saat |
| | % 80 Alkol | ½ Saat |
| | % 90 Alkol | 1 Saat |
| | % 95 Alkol | 1 Saat |
| | % 100 Absolü Alkol | 1 Saat |
| C. Şeffaflaştırma | Alkol: Ksilen (1:1) | ½ Saat |
| | Ksilen | 1 Saat |
| | Ksilen | 1 Saat |
| D. İnfiltrasyon (60°C Etüvde) | Ksilen-Parafin (1:1) | ½ Saat |
| | Parafin | 1-1: 2 Saat |
| E. Gömme | Parafin | |

Bloklardan alınan 5 µm kalınlıktaki seri kesitler histolojik değerlendirme için, 1 gece 60° etüvde ve 1 saat ksilende deparafinize edildikten sonra, rehidratasyon işlemi uygulanarak hematoksilen-eozin (Surgipath, 01562E, 01602E, Peterborough, UK) ile boyandı. Uygulanan hemotoksilen-eozin boyama protokolü Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8: Hematoksilen-eozin boyama protokolü

| İşlem | Madde | Süre |
|------------------|--------------|-------------|
| Deparafinizasyon | 60°c Etüvde | 1 Gece |
| Deparafinizasyon | Ksilen | 30 Dakika |
| | Ksilen | 30 Dakika |
| Rehidratasyon | % 95 Alkol | 2 Dakika |
| | % 80 Alkol | 2 Dakika |
| | % 70 Alkol | 2 Dakika |
| | % 60 Alkol | 2 Dakika |
| Yıkama | Akar Su | 5 Dakika |
| Boyama | Hematoksilen | 3 Dakika |
| Yıkama | Akar Su | 5 Dakika |
| Diferansiasyon | Asit-Alkol | 1-2 Saniye |
| Yıkama | Akar Su | 5 Dakika |
| Boyama | Eozin | 2 Dakika |
| Yıkama | Akar Su | 5 Dakika |
| | % 80 Alkol | 1 Dakika |
| | % 95 Alkol | 1 Dakika |
| | Ksilen | 1 Saat |
| Kapama | Entellan | |

Ayrıca kesitlerin bir kısmı yine 1 gece 60° etüvde ve 1 saat ksilende deparafinize edildikten sonra, rehidratasyon işlemi uygulanarak Mason Trikrom (HT15, Sigma) ile Tablo 9’da yer alan protokolü kullanılarak boyandı.

Tablo 9: Mason trikrom boyama protokolü

| İşlem | Madde | Süre |
|------------------|--------------------------------------|---------------|
| Deparafinizasyon | 60°C Etüvde | 1 Gece |
| Deparafinizasyon | Ksilen | 30 Dakika |
| | Ksilen | 30 Dakika |
| Rehidratasyon | % 95 Alkol | 2 Dakika |
| | % 80 Alkol | 2 Dakika |
| | % 70 Alkol | 2 Dakika |
| | % 60 Alkol | 2 Dakika |
| Yıkama | Akar Su | 5 Dakika |
| Mordantlama | Bouin Solusyonu | 15 Dakika |
| Yıkama | Akar Su | 5 Dakika |
| Boyama | Weigert Demirli Hematoksilen | 10 Dakika |
| Yıkama | Akar Su | 10 Dakika |
| Boyama | Biebrich Scarlet-Asit Fuksin | 5 Dakika |
| Yıkama | Distile Su | 10 Dakika |
| Boyama | Fosfotungstik/ Fosfomolibdik Asit | 5 Dakika |
| Boyama | Anilin Mavisi | 5 Dakika |
| Mordantlama | % 1'lik Asetik Asit | 2 Dakika |
| Yıkama | Distile Su | 5 Dakika |
| Dehidratasyon | % 96 Alkol | Hızlı Geçilir |
| | % 100 Alkol | 3 Dakika |
| | % 100 Alkol | 3 Dakika |
| Şeffaflaştırma | Ksilen | 1 Saat |
| Kapama | Entellan | |

3.10.1. Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme

Bu çalışmada, ratların mandibulalarında oluşturulan kırık iyileşme modelinde kontrol, ekstre, lazer ve lazer + ekstre birlikte uygulanmak (her bir ana grup=12) üzere 4 ana grup altında değerlendirme yapılmıştır. Her grup kendi içerisinde 7. ve 21. gün olmak üzere alt gruplara ayrılarak histopatolojik olarak incelenmiştir.

Tüm grupların kesitlerinde kemik kırık alanı, fibröz ve bağ doku, kıkırdak doku ayrıca yeni ve olgun kemik oluşumları açısından inceleme yapıldı. Gruplarda mandibulada oluşturulan kırık iyileşmesi 7. ve 21. günlerde histolojik düzen, fibröz doku, kıkırdak, yeni kemik ve olgun kemik oluşum oranlarına göre Huo ve arkadaşlarının önermiş olduğu skala kullanılarak değerlendirildi (Tablo 10)(156).

Tablo 10: Histolojik değerlendirilmesinde kullanılan skorlama sistemi

| | |
|----------|--|
| Grade 1 | Fibröz doku |
| Grade 2 | Ağırlıklı fibröz doku, az miktarda kıkırdak |
| Grade 3 | Eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku |
| Grade 4 | Ağırlıklı kıkırdak doku, az miktarda fibröz |
| Grade 5 | Kıkırdak doku |
| Grade 6 | Ağırlıklı kıkırdak doku, az miktarda immatür kemik |
| Grade 7 | Eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik doku |
| Grade 8 | Ağırlıklı immatür kemik, az miktarda kıkırdak doku |
| Grade 9 | İmmatür kemik ile kırık iyileşmesi |
| Grade 10 | Matür kemik ile kırık iyileşmesi |

Ayrıca tüm gruplarda kırık bölgesinde iyileşmeye bağlı olarak oluşan bağ doku elemanları aşağıdaki şekilde incelenerek skorlama yapılmıştır. X 400'lük büyütme alanında kapiller sayısı ve genişliği, enflamatuar hücre sayısı, aktif fibroblast hücre sayısı, kollajen lifler ve osteoblast sayısı aşağıda Tablo 11'de belirtildiği şekilde skorlanmıştır.

Tablo 11: Histolojik değerlendirme kriterleri

| X400 büyütmede birim alanda | Kapiller sayısı ve genişliği | Enflamatuar hücre | Fibroblast Sayısı | Kollajen Lifler | Ostoblast Sayısı |
|-----------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| | 1: az | 1: az | 1-30 : 1 | 1: normal | 1: 1-10 |
| | 2: orta | 2: orta | 30-60: 2 | 2: orta | 2: 10-20 |
| | 3: artmış | 3: artmış | > 60 : 3 | 3: artmış | 3: >20 |

3.11. İstatistiksel Yöntem

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluk kontrolünde Shaphiro wilk testi kullanılmıştır. İki'den fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında normal dağılıma sahip değişkenler için tek yönlü ANOVA ve LSD çoklu karşılaştırma testleri, normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Kruskal Wallis testi ve Dunn çoklu karşılaştırma testlerinden faydalanılmıştır. Tek yönlü ANOVA'da varyansın homojenitesi Levene testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler için SPSS Windows versiyon 22.0 paket programı kullanılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Gözlemsel Bulgular

Çalışmamızda uyguladığımız cerrahi yöntem tüm hayvanlar için standart tutulmuş olup, deney süresince ve postoperatif dönemde belirgin bir komplikasyona rastlanılmamıştır. Yapılan klinik değerlendirme sonrasında ratların tamamının cerrahi operasyonu genel olarak iyi tolere ettikleri gözlenmiştir. Deneklerin hiçbirinde, kullanılan mikrovidalarda gevşeme gözlenmemiştir. Cerrahi bölgesinde herhangi bir enfeksiyon bulgusu veya yarada tekrar açılma gözlenmedi. Ancak buna karşın, kontrol ve deney gruplarına ait bazı deneklerde dudak komissurasına en yakın yerleştirilmiş mikrovidanın bulunduğu kısımda cilde doğru hafif düzeyde açıklık olduğu gözlenmiştir. Antiseptik ve pansuman yapılmasıyla açıklık hızlı bir şekilde zamanla kapanmıştır. Tüm denekler cerrahi sonrası dönemi rahat bir şekilde geçirmiş, cerrahi veya anestezi sırasında, postoperatif dönemde ölen veya çeşitli sebeplerden dolayı çalışma dışına alınan herhangi bir hayvan olmamıştır.

4.2. Vücut Ağırlıkları

Tüm gruplardaki ratların deneyin başladığı ve bittiği günlerde ölçülen vücut ağırlık değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi yapılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12: Başlangıç ağırlık ve deney sonu ağırlık karşılaştırmaları

| Gruplar | n | Ağırlık Değişimi (g) | p |
|---------|----|----------------------|---------------|
| K7 | 6 | -38.5 | 0,006* |
| E7 | 6 | -59,66 | 0,001* |
| L7 | 6 | -35,34 | 0,001* |
| EL7 | 6 | -48,83 | 0,001* |
| K21 | 6 | -4,17 | 0,655 |
| E21 | 6 | +7,34 | 0,588 |
| L21 | 6 | -28,33 | 0,070 |
| EL21 | 6 | -9 | 0,030* |
| Toplam | 48 | -27,06 | |

Her bir grubun preoperatif ve postoperatif ağırlık değerleri kendi içinde karşılaştırılmıştır. Yapılan varyans analizinde, 7. gün gruplarından K7 (0,006), E7 (0,001), L7 (0,001) ve EL7 (0,001) gruplarının hepsinde işlem öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri açısından istatistiksel anlamlı fark vardı yani grupların hepsinde istatistiksel olarak anlamlı kilo kaybı meydana gelmiştir. 21. gün gruplarından ise işlem öncesi ve sonrası ağırlık değişimleri açısından sadece EL21 (0,03) grubunda istatistiksel bir kilo kaybı olduğu belirlenmiştir. Ancak K21, E21, L21 gruplarının işlem öncesi ve sonrası arasında ağırlık değişimleri açısından istatistiksel fark bulunamamıştır. Tüm gruplar içerisinde sadece E21 grubunda kilo artışı tespit edilirken diğer grupların tamamında kilo kaybı görülmüştür.

Çalışmanın sonunda kontrol ve deney grupları arasında birbirleriyle yapılan ağırlık farkı karşılaştırılmasında Tablo 13’de gösterilmiştir. Buna göre;

Tablo 13: Deney sonunda gruplar arasındaki ağırlık farklarının karşılaştırılması

| P=0.001 | K7 | E7 | L7 | EL7 | K21 | E21 | L21 | EL21 |
|----------------|-----------|---------------|-----------|---------------|---------------|---------------|------------|---------------|
| K7 | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,688 | 0,384 | 1,000 | 1,000 |
| E7 | 1,000 | | 1,000 | 1,000 | 0,009* | 0,003* | 1,000 | 0,023* |
| L7 | 1,000 | 1,000 | | 1,000 | 0,766 | 0,431 | 1,000 | 1,000 |
| EL7 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | | 0,053 | 0,025* | 1,000 | 0,120 |
| K21 | 0,688 | 0,009* | 0,766 | 0,053 | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| E21 | 0,384 | 0,003* | 0,431 | 0,025* | 1,000 | | 1,000 | 1,000 |
| L21 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | | 1,000 |
| EL21 | 1,000 | 0,023* | 1,000 | 0,120 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | |

* $p < 0.05$

7. gün grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında grupların hiçbirinde istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p > 0,05$) Benzer bir şekilde 21. gün gruplarında da birbirleriyle karşılaştırıldığında hiçbirinde istatistiksel anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p > 0,05$)

7.ve 21. gün grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında ise;

- E7 ile K21, E21 ve EL21 grupları arasında E7 grubunun aleyhine anlamlı bir kilo kaybı oluşmuştur.

- EL7 ile sadece E21 grubu arasında EL7 grubunun aleyhine anlamlı bir kilo kaybı oluşmuştur.
- K7, L7 ve L21 gruplarının diğer gruplarla karşılaştırılmasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

4.3. Klinik İnceleme Bulguları

Grupların sakrifikasyon sonrası kaynamanın klinik açıdan değerlendirilmelerine ait ortalama değerleri Tablo 14’da gösterilmiştir.

Tablo 14: Grupların klinik inceleme skorları

| n | K7 | E7 | L7 | EL7 | K21 | E21 | L21 | EL21 |
|-----------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 |
| 3 | 0 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 4 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 5 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 6 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Ortalama | 0,33 | 1,33 | 1,5 | 1,33 | 1,33 | 1,83 | 1,66 | 1,83 |

7. gün grupları arasında her iki planda hareketsizlik açısından en iyi skorlar L7 grubuna ait iken; E7 ve EL7 grupları birbirine benzer bulgulara; K7 grubunun ise en kötü skorlara sahip olduğu bulunmuştur.

21. gün grupları arasında ise en iyi skorlar E21 ve EL21 gruplarına aitken; bunları sırasıyla L21 ve K21 grupları izlemekteydi. Ayrıca K21 grubunun 3 haftada elde edebildiği ortalamaya; E7, L7 ve EL7 gruplarının 1.haftanın sonunda sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.4. Biyokimyasal Bulgular

7. gün grupları arasında TAS değerleri bakımından anlamlı farklılık gözlenirken (0,042*); TOS ve OSİ değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. ($p>0,05$) 7. gün gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılığı Tablo 15 ve Şekil 18’ de gösterilmiştir.

Tablo 15: K7, E7, L7 ve EL7 gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları

| | Ortalama değer ± Standart sapma | | | | p |
|------------|---------------------------------|-----------------|---------------|---------------|--------|
| | K7 (n=6) | E7 (n=6) | L7 (n=6) | EL7 (n=6) | |
| TAS | 1,03 ± 0,14 | 1,09 ± 0,21 §,¶ | 0,85 ± 0,13 ‡ | 0,89 ± 0,10 ‡ | 0,042* |
| TOS | 53,61 ± 20,37 | 62,03 ± 17,31 | 35,70 ± 15,73 | 41,05 ± 21,38 | 0,097 |
| OSİ | 5,06 ± 1,29 | 6,09 ± 1,32 | 4,07 ± 1,14 | 4,42 ± 1,70 | 0,092 |

* $p<0.05$ (TAS değeri için gruplar arası değerlendirme)

† K7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında $p<0.05$

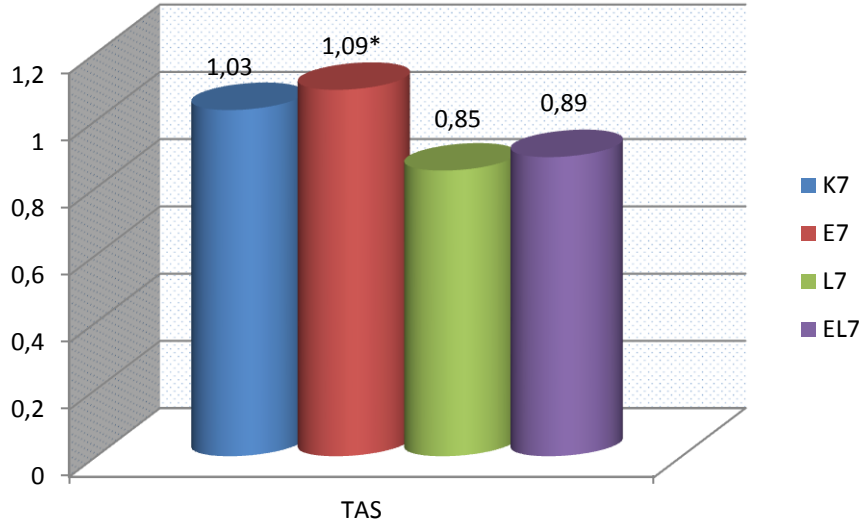
‡ E7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında $p<0.05$

§ L7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında $p<0.05$

¶ EL7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında $p<0.05$

7. gün grupları arasında TAS, TOS ve OSİ değerleri açısından;

- E7 grubu ile L7 ($p=0,014$) ve E7 grubu ile EL7 ($p=0,037$) grupları arasında TAS değerleri açısından aralarında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur.



Şekil 18: K7, E7, L7 ve EL7 gruplarına ait ortalama TAS değerleri

21. gün grupları arasında da benzer şekilde TAS değerleri bakımından anlamlı farklılık gözlenirken (0,005*); TOS ve OSİ değerleri bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. (p>0,05) 21. gün gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılığı Tablo 16 ve Şekil 19’ da gösterilmiştir.

Tablo 16: K21, E21, L21 ve EL21 gruplarının TAS, TOS ve OSİ değerlerine ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları

| | Ortalama değer ± Standart sapma | | | | p |
|------------|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|--------|
| | K21 (n=6) | E21 (n=6) | L21 (n=6) | EL21 (n=6) | |
| TAS | 0,76 ± 0,05§,¶ | 0,89 ± 0,07¶ | 0,92 ± 0,18† | 1,05 ± 0,12†,‡ | 0,005* |
| TOS | 24,92 ± 9,18 | 27,23 ± 14,66 | 30,80 ± 20,29 | 45,22 ± 18,19 | 0,160 |
| OSİ | 3,25 ± 1,04 | 2,95 ± 1,27 | 3,13 ± 1,45 | 4,21 ± 1,31 | 0,352 |

* p<0.05

† K21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

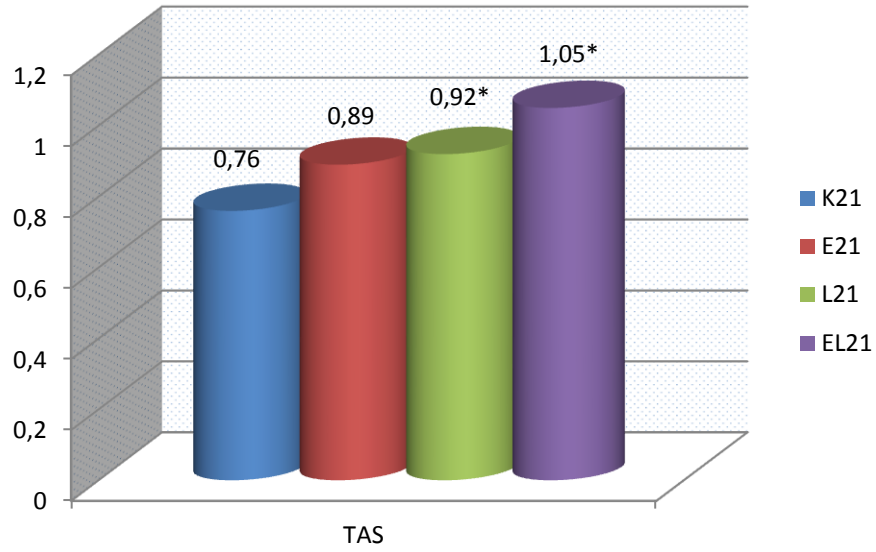
‡ E21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

§ L21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

¶ EL21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

21. gün grupları arasında TAS, TOS ve OSİ değerleri açısından;

- K21 grubunun L21 grubu ($p=0,027$) ve EL21 ($p=0,001$) grupları arasında TAS değerleri açısından;
- E21 grubunun EL21 grubu ($p=0,036$) ile TAS değerleri açısından istatistiksel anlamlı farklılık bulunmuştur.



Şekil 19: K21, E21, L21 ve EL21 gruplarına ait ortalama TAS değerleri

4.5. Histolojik, Histomorfometrik Analiz Bulguları

4.5.1. 7. Gün Grupları

7. gün gruplarının kapiller sayı ve genişliği, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı, kollajen lif ve kemikleşme skorlarına ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları Tablo 17 ve Şekil 20-21’de gösterilmiştir.

Tablo 17: İncelenen değişkenlere göre K7, E7, L7 ve EL7 gruplarının skorlarına ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları

| Değişkenler | Ortalama değer ± Standart sapma | | | | p |
|----------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| | K7 (n=6) | E7 (n=6) | L7 (n=6) | EL7 (n=6) | |
| Kapiller sayı ve genişliği | 2,50 ± 0,54 | 2,33 ± 0,51 | 1,50 ± 0,54 | 2,50 ± 0,54 | 0,107 |
| Enflamatuar hücre sayısı | 1,33 ± 0,51 | 2,33 ± 0,51 | 1,50 ± 0,54 | 2,33 ± 0,51 | 0,074 |
| Fibroblast sayısı | 1,33 ± 0,51 | 2,16 ± 0,40 | 1,16 ± 0,51 | 2,50 ± 0,54 | 0,097 |
| Kollajen lifler | 2,66 ± 0,51 | 2,00 ± 0,63 | 2,16 ± 0,75 | 2,50 ± 0,54 | 0,256 |
| Osteoblast sayısı | 1,00 ± 0 | 2,16±0,40† | 1,33 ± 0,51 | 2,50±0,54†,§ | 0,001* |
| Kemikleşme | 1,66 ± 0,51 | 6,00±0,63† | 4,50 ± 0,54 | 7,50±0,54†,§ | 0,000* |

* p<0.05

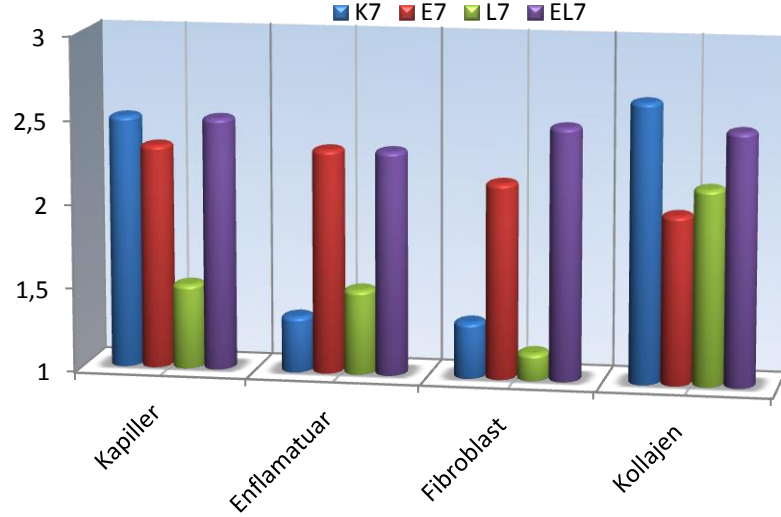
† K7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

‡ E7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

§ L7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

¶ EL7 ile diğer 7. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

Yapılan istatistik analiz sonucu 7. gün grupları (K7, E7, L7, EL7) arasında kapiller sayısı, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı ve kollajen lif değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).



| | Kapiller | Enflamatuar | Fibroblast | Kollajen |
|-------|----------|-------------|------------|----------|
| ■ K7 | 2,5 | 1,33 | 1,33 | 2,66 |
| ■ E7 | 2,33 | 2,33 | 2,16 | 2 |
| ■ L7 | 1,5 | 1,5 | 1,16 | 2,16 |
| ■ EL7 | 2,5 | 2,33 | 2,5 | 2,5 |

Şekil 20: 7. gün gruplarının kapiller, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı ve kollajen lif skorlarına ait ortalama değerler

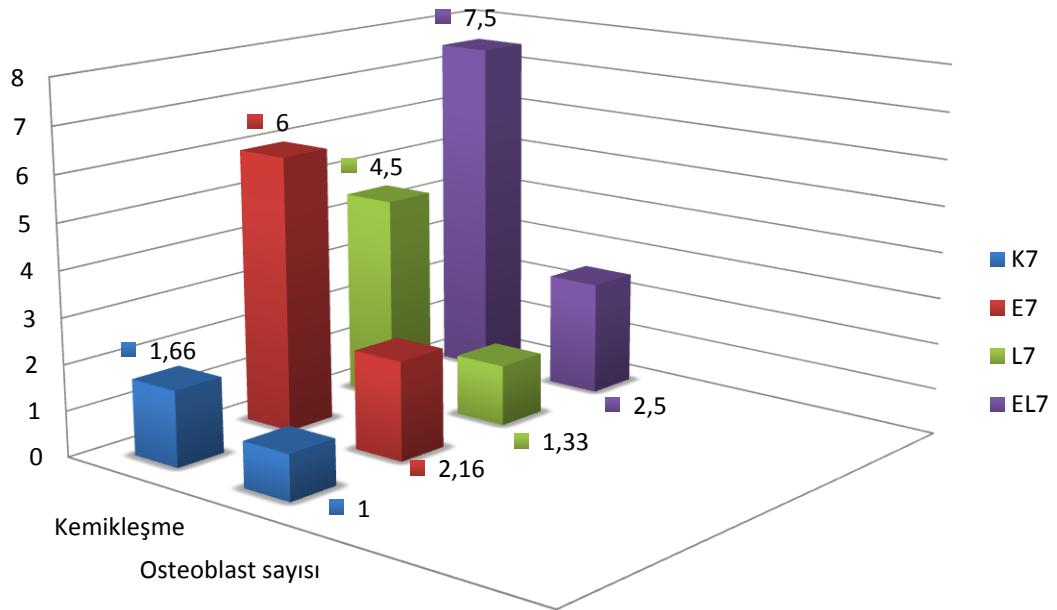
Ancak kemikleşme ve osteoblast sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$)

Gruplar arasında osteoblast sayı miktarı açısından ise;

- EL7 ile K7 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0,002$)
- E7 ile K7 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0,018$)
- EL7 ile L7 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p=0,042$)
- Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0,05$).

Gruplar arasında kemikleşme skorları açısından;

- K7 ile L7 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,730)
- K7 ile E7 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,018)
- K7 ile EL7 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,000)
- L7 ile E7 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,927)
- L7 ile EL7 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,026)
- E7 ile EL7 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,927)



Şekil 21: K7, E7, L7 ve EL7 gruplarına ait ortalama kemikleşme ve osteoblast sayı değerleri

4.5.2. 21. Gün Grupları

21. gün gruplarının kapiller sayı ve genişliği, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı ve kollajen lif ve kemikleşme skorlarına ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları Tablo 18 ve Şekil 22-23'da gösterilmektedir.

Tablo 18: İncelenen değişkenlere göre K21, E21, L21 ve EL21 gruplarının skorlarına ait ortalama, standart sapma değerleri ve istatistiksel farklılıkları

| Değişkenler | Ortalama değer ± Standart sapma | | | | p |
|----------------------------|---------------------------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| | K21 (n=6) | E21 (n=6) | L21 (n=6) | EL21 (n=6) | |
| Kapiller sayı ve genişliği | 2,33 ± 0,51 | 2,16 ± 0,75 | 1,16 ± 0,51 | 2.83 ± 0,40 | 0,055 |
| Enflamatuar hücre sayısı | 1,50 ± 0,54 | 2,16 ± 0,40 | 1,16 ± 0,51 | 2.66 ± 0,51 † | 0,009* |
| Fibroblast sayısı | 1,50 ± 0,54 | 2.50 ± 0,54 | 2.16 ± 0,75 | 2.66 ± 0,51 † | 0,031* |
| Kollajen lifler | 2.50 ± 0,54 | 2.16 ± 0,40 | 2.16 ± 0,75 | 2.50 ± 0,54 | 0,573 |
| Osteoblast sayısı | 1,50 ± 0,54 | 2,33 ± 0,51 | 1,50 ± 0,54 | 2.83±0,40 †,§ | 0,003* |
| Kemikleşme | 1.66 ± 0,51 | 6.33±0,51 † | 5.00 ± 0,63 | 7.66±0,81 †,§ | 0,000* |

* p<0.05

† K21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

‡ E21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

§ L21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

¶ EL21 ile diğer 21. gün grupları karşılaştırıldığında p<0.05

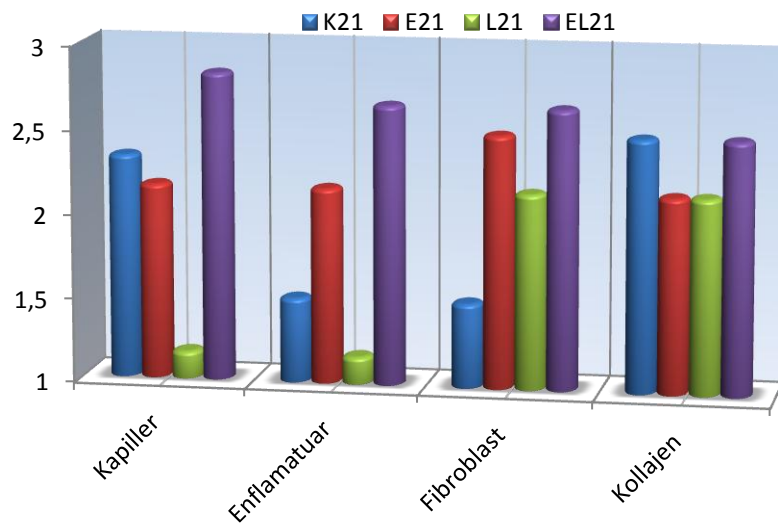
Yapılan istatistik analiz sonucu 21. gün grupları (K21, E21, L21, EL21) arasında kapiller sayısı ve kollajen değerleri açısından grupların hiçbirinde anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak enflamatuar hücre, fibroblast sayısı, osteblast ve yeni kemikleşme değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. (p<0.05)

Gruplar arasında enflamatuar hücre sayısı açısından;

- Sadece EL21 ile K21 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,013)
- Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Gruplar arasında fibroblast sayısı açısından;

- Sadece EL21 ile K21 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,034)
- Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).



| | Kapiller | Enflamatuar | Fibroblast | Kollajen |
|------|----------|-------------|------------|----------|
| K21 | 2,33 | 1,5 | 1,5 | 2,5 |
| E21 | 2,16 | 2,16 | 2,5 | 2,16 |
| L21 | 1,16 | 1,16 | 2,16 | 2,16 |
| EL21 | 2,83 | 2,66 | 2,66 | 2,5 |

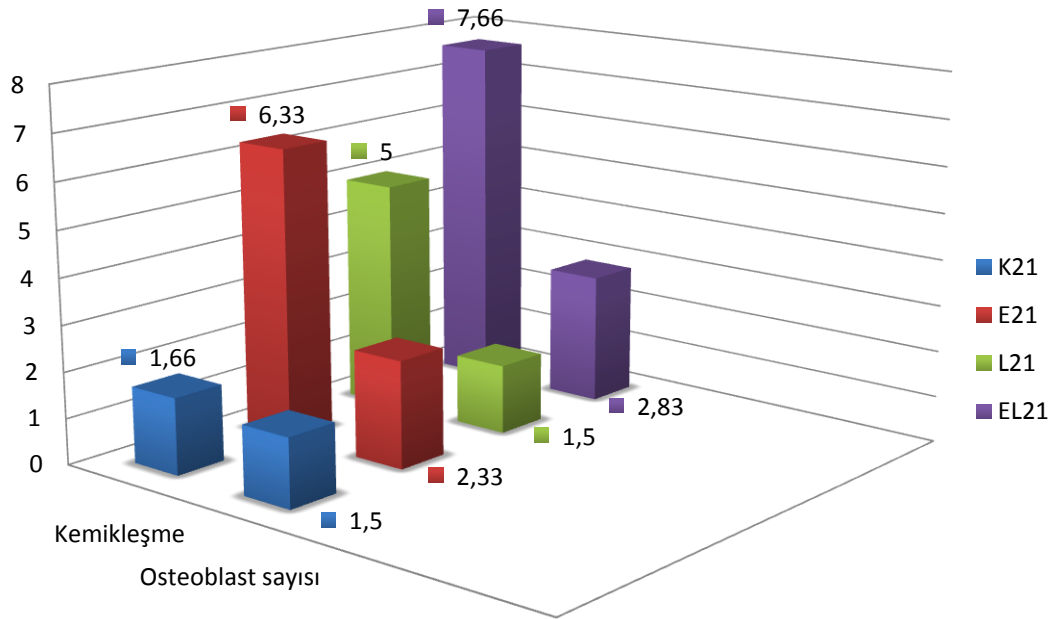
Şekil 22: 21. gün gruplarının kapiller, enflamatuar hücre, fibroblast sayısı ve kollajen lif skorlarına ait ortalama değerler

Gruplar arasında osteoblast sayı miktarı açısından ise;

- EL21 ile K21 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,012)
- Ayrıca EL21 ile L21 grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,012)
- Diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05).

Gruplar arasında kemikleşme skorları açısından ise;

- K21 ile L21 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,695)
- K21 ile E21 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,015)
- K21 ile EL21 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,000)
- L21 ile E21 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=0,885)
- L21 ile EL21 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (p=0,033)
- E21 ile EL21 grupları arasında kemikleşme skor dağılımları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p=1,000)



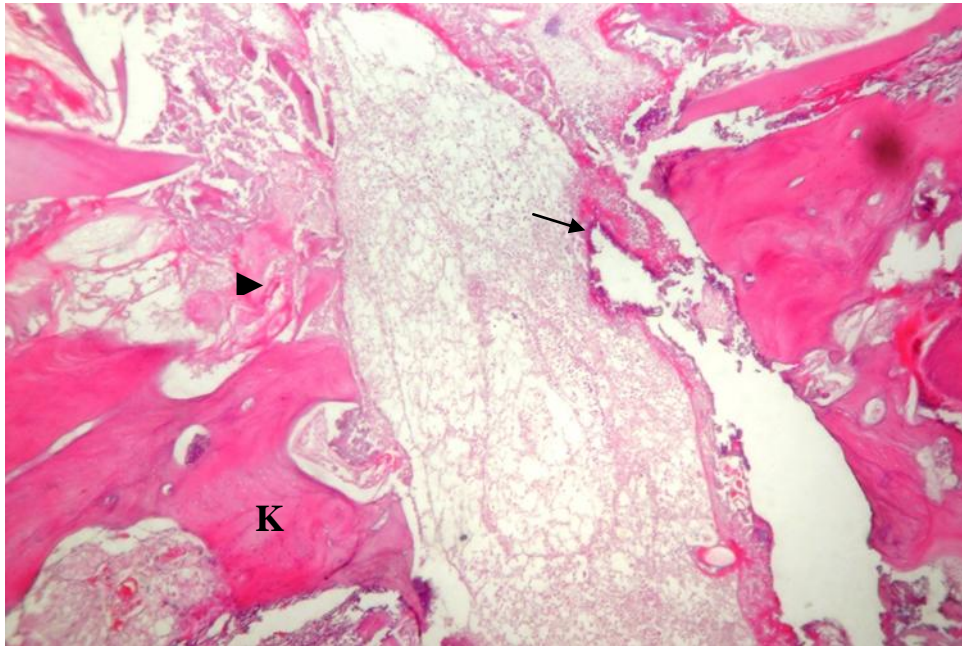
Şekil 23: K21, E21, L21 ve EL21 gruplarına ait ortalama kemikleşme ve osteoblast sayı değerleri

4.5.3. Histolojik Değerlendirmeler

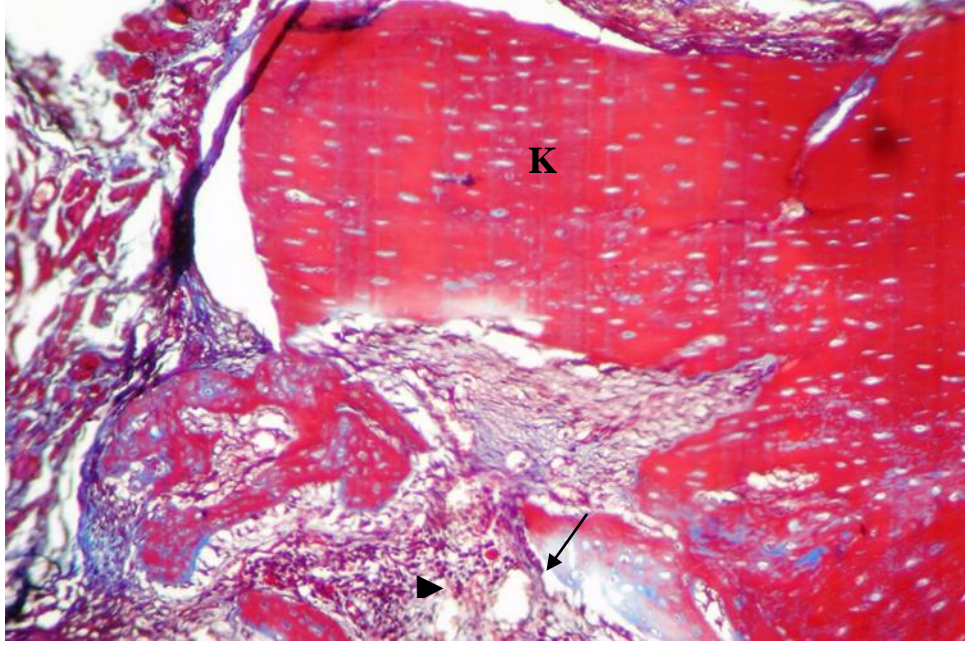
4.5.3.1. Kontrol Grubu

Mandibulada kırık oluşturulan deneklerin hematoxilen-eozin ve Mason trikrom yöntemleri ile boyanan kesitleri incelendiğinde kırık bölgesinde belirgin olarak yer alan skar dokusunun varlığı ile gözlemlendi. 21. gün örnekleri 7. gün örnekleri ile karşılaştırıldığında ise 7. günde bu bölgede başlıca aynı yönde yerleşmiş fibroblastlar ve kollajen liflerin devamlılığında bozulmalar ve az sayıda kan damarı içerdiği izlendi. 21. günde iyileşme sürecinin henüz yoğun fibröz doku ve az miktarda kırıkta şekline olduğu gözlemlendi. Ayrıca az sayıda oval, bazofilik sitoplazmalı osteoblastlar ve az sayıda Howship lakunalarında yerleşmiş çok çekirdekli asidofilik sitoplazmalı osteoklastlar görüldü. Kırık bölgesi dışındaki sağlam dokuda kemik içinde osteositler kemik matrisi içinde normal yapılarında gözlemlendi.

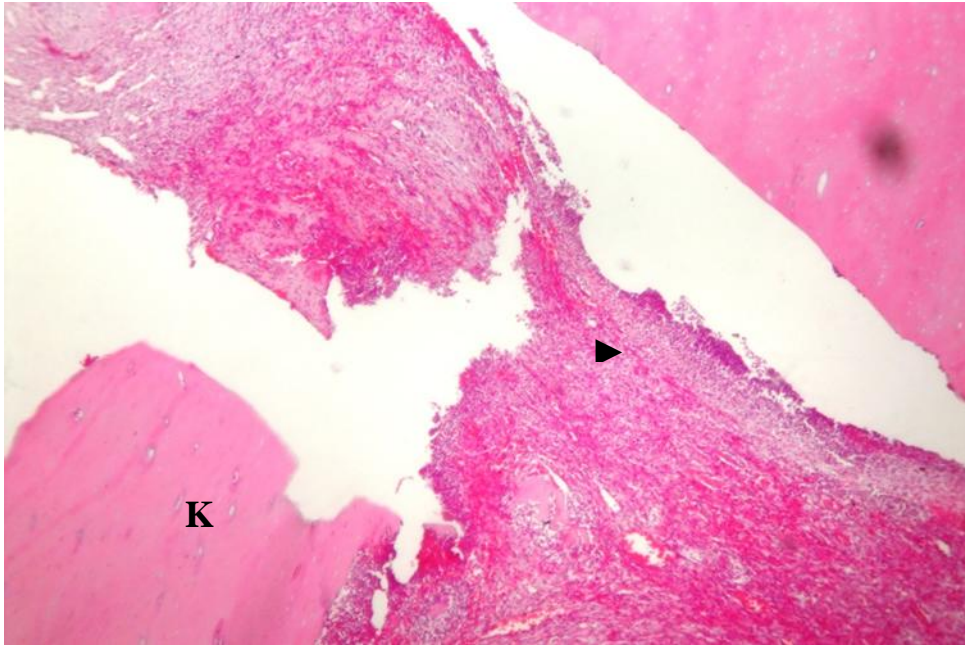
Kontrol gruplarında görülen histopatolojik bulgulara ait mikroskopik fotoğraf örnekleri de aşağıda gösterilmiştir.



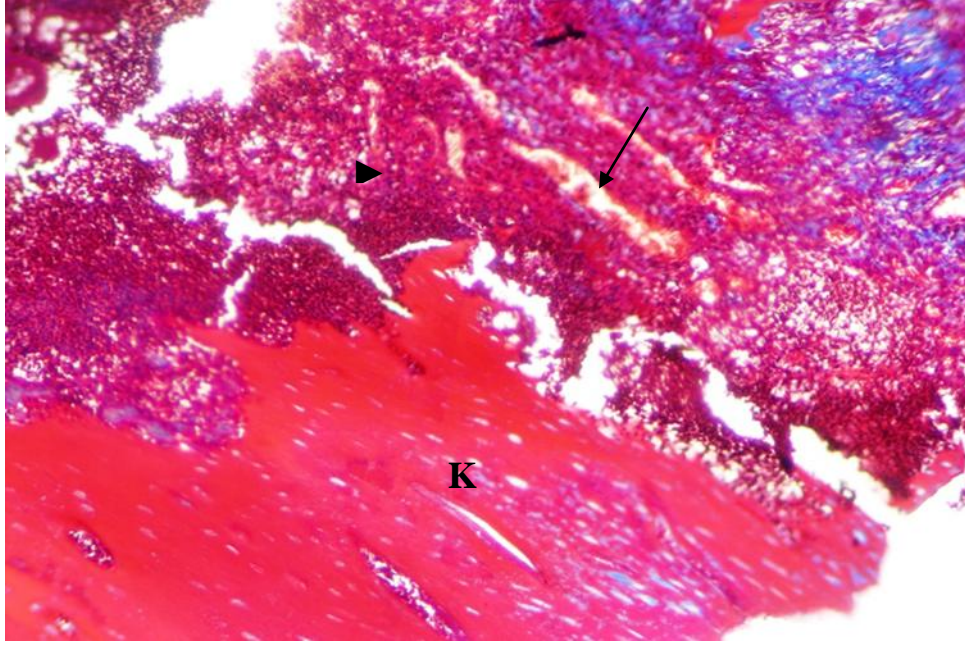
Resim 13: K7 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok: kapiller, ok başı: enflamatuvar alan, K: Kemik, Hematoxilen eozin X40)



Resim 14: K7 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok: kapiller, ok başı: enflamatuar alan, K: kemik, Masson Trikrom x100)



Resim 15: K21 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok başı: enflamatuar alan, K: kemik, Hematoksilen eozin X40)

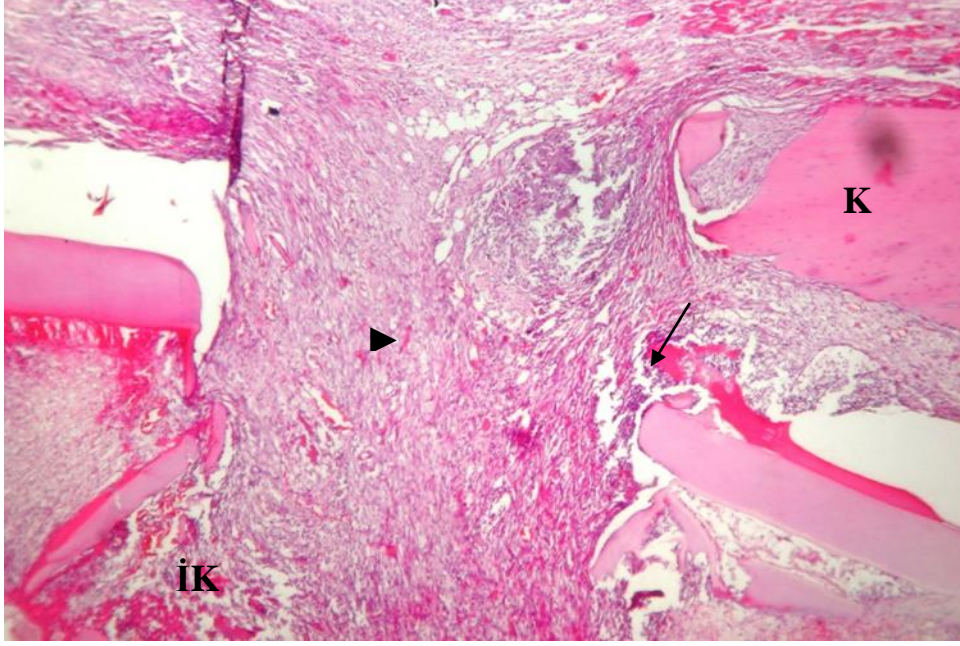


Resim 16: K21 grubuna ait kırık hattının görünümü (Ok: kapiller, ok başı: enflamatuar alan, K: kemik, Masson Trikrom x100)

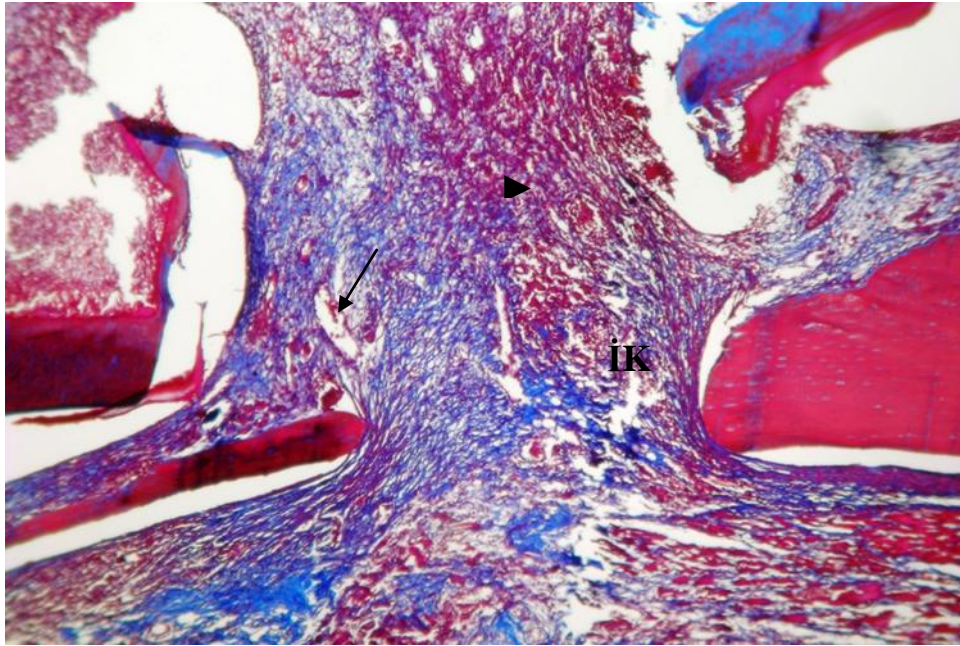
4.5.3.2. Ekstre Grubu

Mandibulada deneysel olarak oluşturulan kırık sonrası ekstre uygulanan grupta hem 7. gün hem de 21. gününde elde edilen kesitlerin hematoksilen-eozin ve Mason Trikrom ile boyanmaları incelendiğinde, kontrol ve lazer uygulanan gruplara göre belirgin bir iyileşme olduğu, kırıkta ve immatür kemik oluşumunun başladığı izlendi. Fibroblastların ve kollajen sentezinin artmış olduğu, enflamasyonun ve kan damarlarının orta derecede artmış olduğu, ve yeni kemikleşmenin düzensiz olarak bulunduğu görüldü. Kemik alanında bazofilik sitoplazmalı oval aktif osteoblastlar izlendi ve bu alanda yeni kemik yapımının belirginleştiği gözlemlendi.

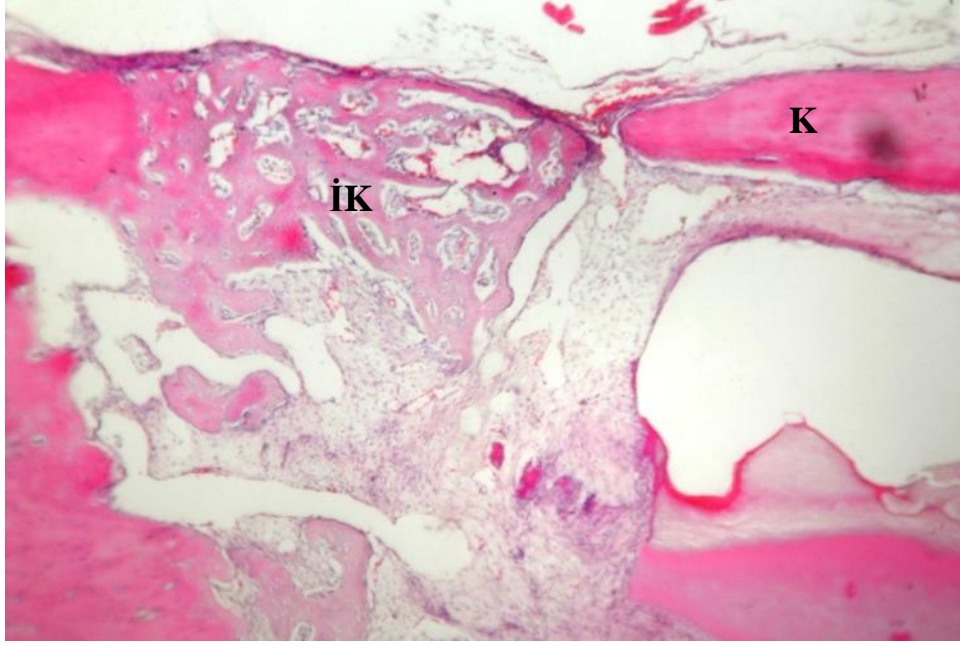
Ekstre gruplarında görülen histopatolojik bulgulara ait mikroskopik fotoğraf örnekleri de aşağıda gösterilmiştir.



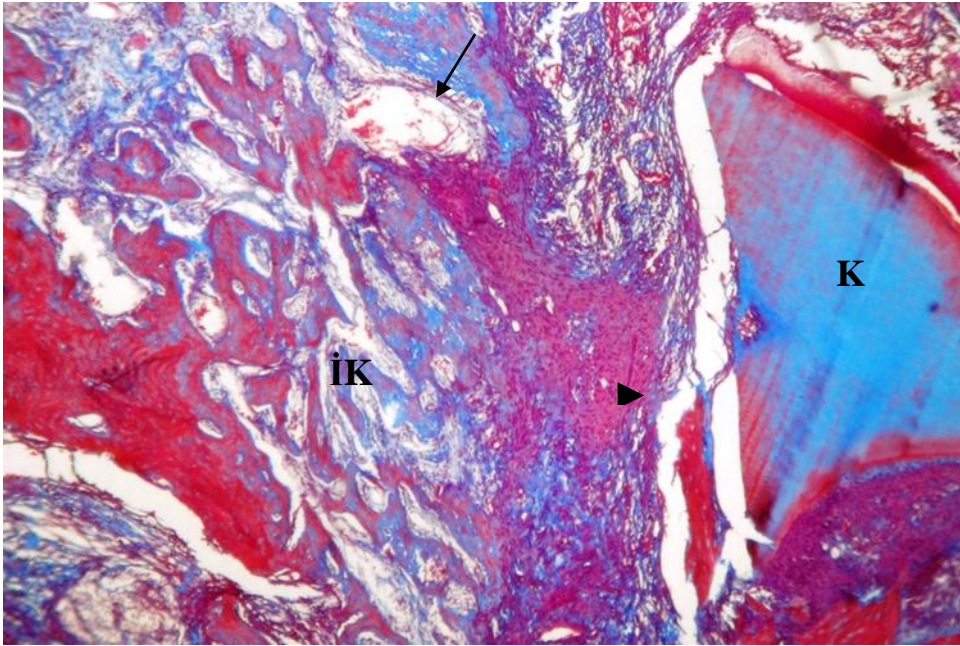
Resim 17: E7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin X40)



Resim 18: E7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, Masson Trikrom x40)



Resim 19: E21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (İK: Kemik oluşumu, K: kemik, Hematoksilen eozin X40)

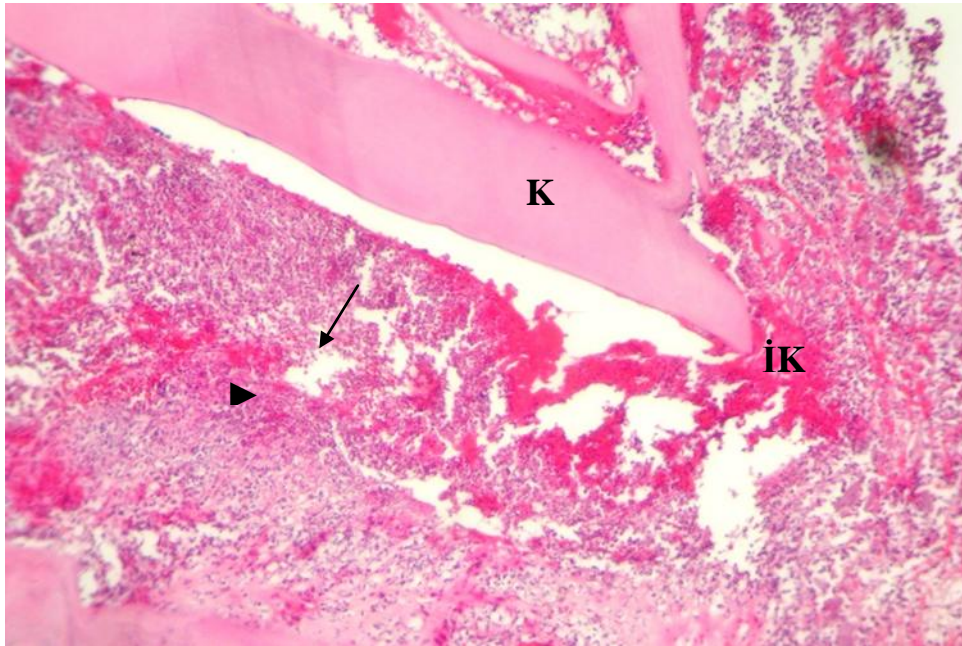


Resim 20: E21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x100)

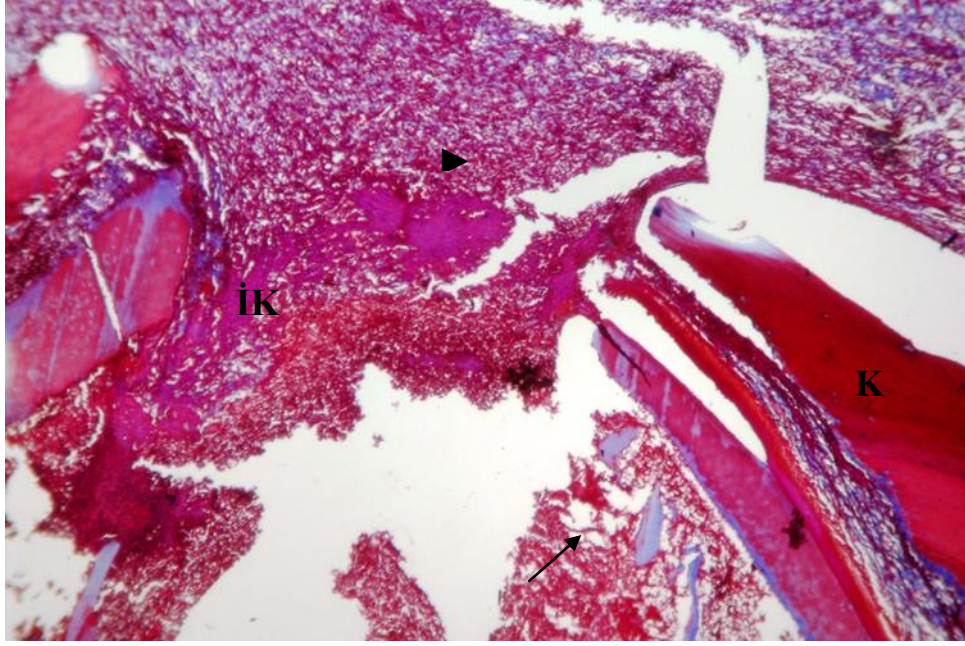
4.5.3.3. Lazer Grubu

Deneysel kırık modeline lazer uygulanması sonucu 7. ve 21. gün örneklerinde kontrol grubuna göre iyileşme görülmeyle birlikte ekstre ve ekstre+lazer gruplarına oranla tam bir iyileşme saptanmadı. Kırık bölgesinde belirgin skar dokusu ile birlikte osteoblast, kapiller sayısında ve kollajen lif miktarında az da olsa artış izlendi. Ayrıca kırıkta ve az miktarda fibröz doku ile kırık iyileşme sürecinin başladığı ve iyileşmenin 21. günde 7. güne göre daha iyi olduğu izlendi.

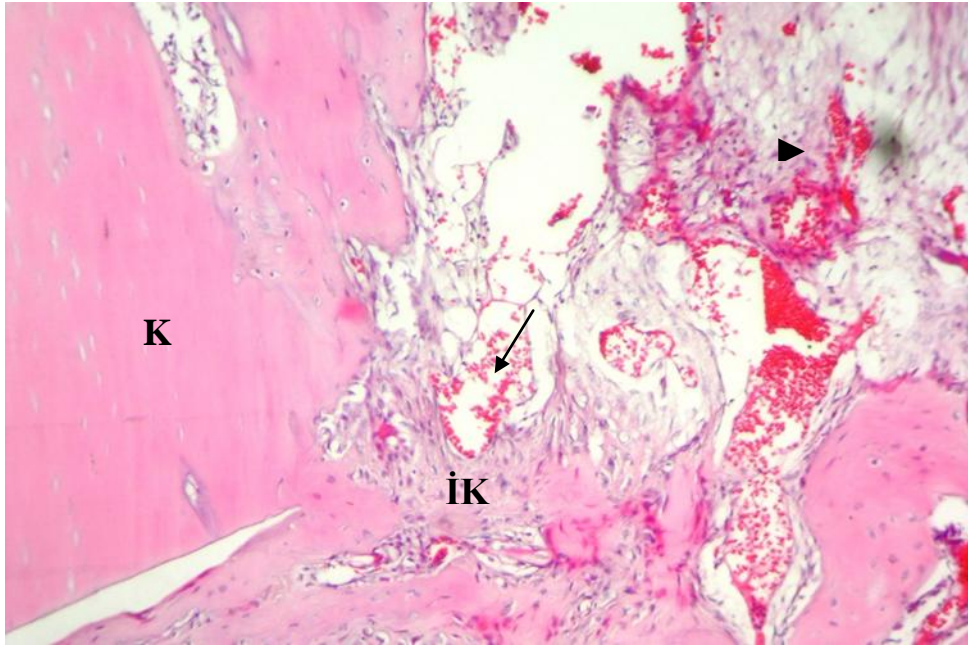
Lazer gruplarında görülen histopatolojik bulgulara ait mikroskopik fotoğraf örnekleri de aşağıda gösterilmiştir.



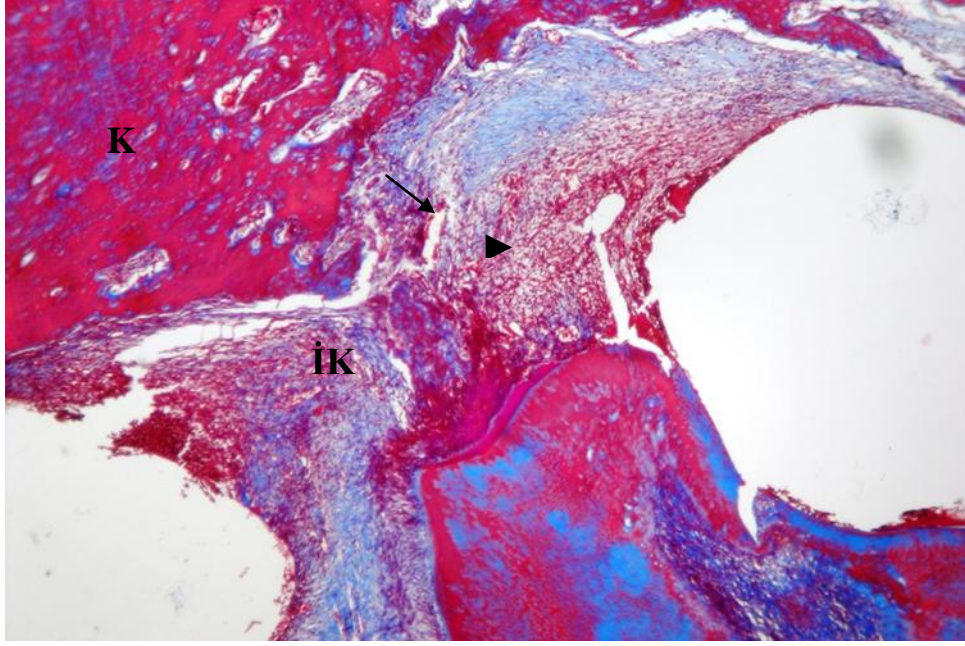
Resim 21: L7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin X100)



Resim 22: L7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x40)



Resim 23: L21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin x100)



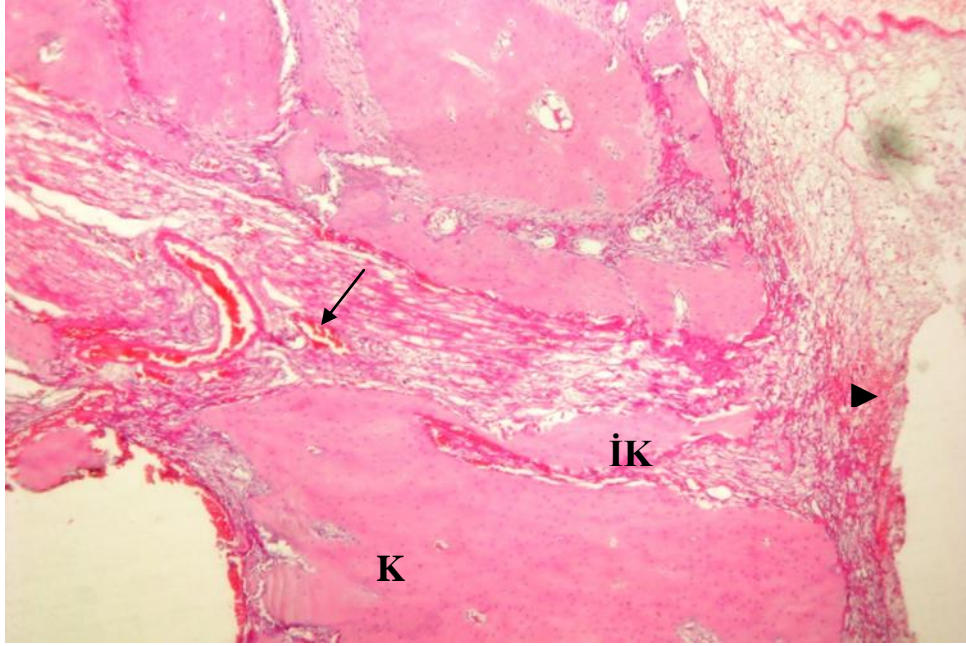
Resim 24: L21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x40)

4.5.3.4. Ekstre+Lazer Grubu

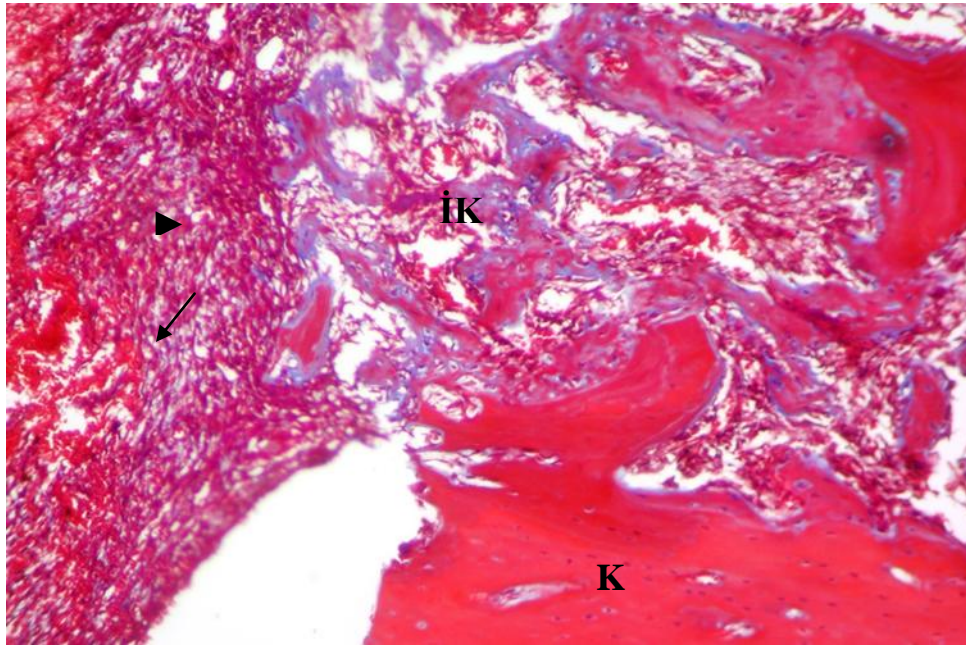
Mandibulada oluşturulan deneysel kırık sonrası ekstre ile lazer birlikte uygulandığında en çok iyileşmenin bu grupta olduğu, az miktarda kırıkla birlikte immatür kemik yapımının arttığı görüldü. Tam bir kırık kapanması olmamakla birlikte yeni oluşan kemik dokuda yer alan bazofilik sitoplazmalı oval aktif osteoblastlar izlendi. Enflamasyon ve kan damarlarının sayısının ve genişliğinin, fibroblastların ve kollajen sentezinin belirgin şekilde artmış olduğu gözlemlendi. Hem 7. gün hem de 21. gününde elde edilen kesitlerin hematoksilin-eozin ve Mason Trikrom ile boyanmaları karşılaştırıldığında 21. günde kemik yapımının daha fazla olduğu, kollajen lif ve osteoblast sayısında artış saptandı.

Tüm gruplar karşılaştırıldığında kemik yapımının, osteoblast, fibroblast, kapiller ve enflamasyonun artışına bağlı olarak en çok iyileşmenin ekstre ile lazerin birlikte uygulandığı grupta saptandı. Sadece ekstre ve sadece lazer uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sadece ekstre uygulanan gruptaki örneklerde iyileşmenin daha fazla olduğu izlendi. Kontrol grubu, uygulama gruplarına göre iyileşmenin oldukça yavaş ve az olduğu incelenen parametreler açısından oldukça düşük değerlere sahip olduğu

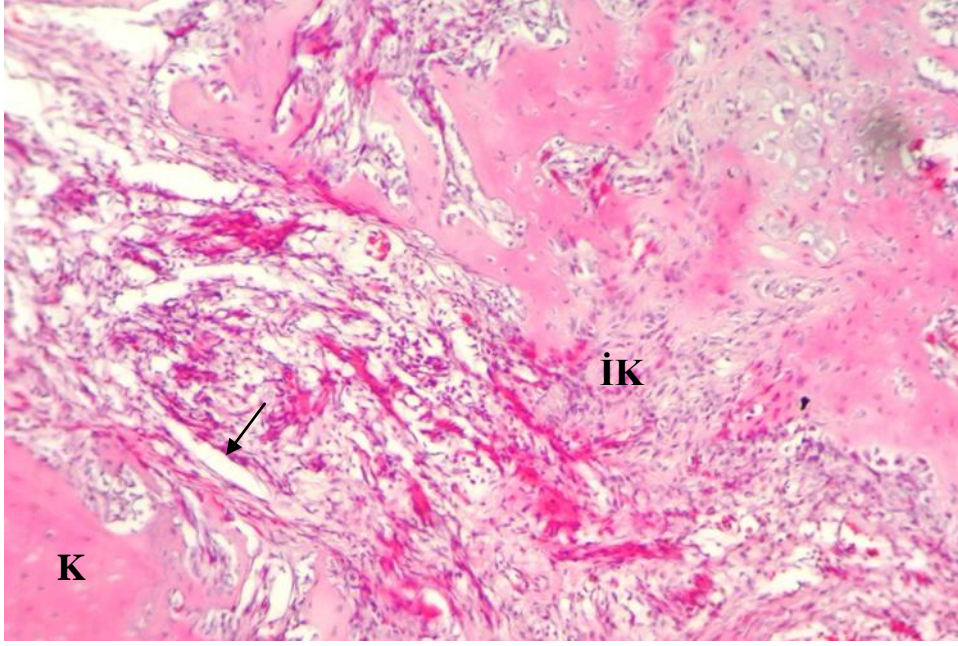
görüldü. Ekstre + Lazer gruplarında görülen histopatolojik bulgulara ait mikroskopik fotoğraf örnekleri de aşağıda gösterilmiştir.



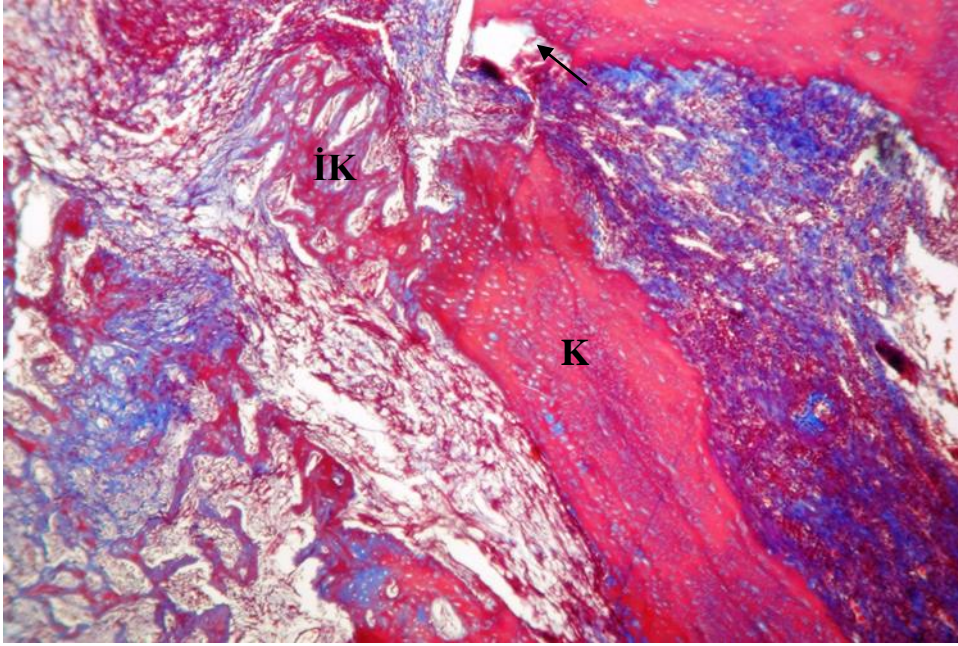
Resim 25: EL7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin X100)



Resim 26: EL7 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, Ok başı: enflamatuar alan, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x100)



Resim 27: EL21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Hematoksilen eozin x100)



Resim 28: EL21 grubuna ait kırık hattında yeni kemik oluşumu (Ok: kapiller, İK: Kemik oluşumu, K: Kemik, Masson Trikrom x100)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, düşük doz lazer tedavisi, güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen proantosiyandinlerce zengin üzüm çekirdeği ekstresi ve her ikisinin kombine kullanımının; ratlarda mandibular kırık iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Yedinci ve 21. günlerde deneyin sonlandırılması ile tüm ratların deneysel kırık modeli oluşturulan sağ mandibulaları üzerinde histolojik, histomorfometrik incelemeler; serum örnekleri üzerinde ise biyokimyasal incelemeler yapılmıştır. Literatürde, ÜÇE'nin etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmasına rağmen kırık iyileşmesi üzerine nasıl etki ettiğini inceleyen herhangi bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır. Ayrıca DDLT'nin kemik iyileşmesi üzerine farklı dozlar kullanılarak etkinliğini araştırılan birçok çalışma rapor edilmesine karşın, ÜÇE ile kombine kullanımının nasıl bir etki yaptığına dair yeterli bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların oksidan / antioksidan sistem ve kırık iyileşmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Günümüzde birçok insan çeşitli nedenlerden dolayı maksillofasiyal travmalara maruz kalmakta ve bunun sonucunda çeşitli nedenlerle kemik dokuda kırıklar meydana gelmektedir. Oysaki kırık sadece kemiği değil aynı zamanda çevre yumuşak dokuları da ilgilendiren bir olaydır ve bazen bu kırıklar morbidite ve mortalitenin en önemli belirteçleri dahi olabilmektedir. Bu nedenle kırık iyileşmesi günümüzde halen diş hekimliği pratiğinde önemli bir sorun teşkil etmektedir.

Kırık iyileşmesi hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve ekstrasellüler matriksin birbirleriyle mükemmel işleyişini kapsayan bir süreçtir (8, 157) ve sorunsuz bir kaynama ancak bir dizi iç içe geçmiş kompleks hücresel ve biyokimyasal aşamalar sonucunda gerçekleşir. Bu aşamalar enflamasyon ile başlar, intramembranöz ossifikasyon, kondrogenesis, endokondral ossifikasyon ile devam eder ve remodeling ile tamamlanır. Sonuçta kırık iyileşmesi remodelasyon yeteneği sayesinde diğer dokulardan farklı olarak skar dokusu bırakmadan, şekil ve fonksiyon olarak orjinaline en yakın şekilde iyileşmektedir (157, 158). Bu fazlardan herhangi birinin gecikmiş olması, herhangi bir nedenden veya faktörden olumsuz etkilenmesi ile kaynamada gecikmeler görülmektedir. Travmanın şekli, kırık tedavi seçeneği, tespit şekli, sistemik

problemler bunlardan sadece bazılarıdır. Bu nedenle bütün kırık olgularında kırık iyileşmesi istenildiği gibi oluşmamakta ve kırıkların yaklaşık %5–10'luk bir bölümünde kaynamama veya geç kaynama gibi problemler meydana gelmektedir (8). Bu nedenle kaynama oranlarını en üst düzeye çıkararak kişiyi en kısa sürede normal hayatına döndürmek amacıyla kırık iyileşmesi ve özellikle iyileşmenin hızlandırılması araştırmacıların üzerinde çalıştığı önemli konularından biri olmuştur. Bu amaçla çeşitli lokal ve sistemik faktörler, otojen kemik greftleri, biyomateryaller, kemik morfogenetik proteinleri, ultrason, hiperbarik oksijen ve elektromanyetik alan ile uyarı gibi çeşitli uygulamalar gerçekleştirilmiş ve günümüzde bunların bir kısmı klinikte kullanım alanı bulmuştur (5-7).

Bu uygulamaların canlı organizmada meydana getireceği etkiler ve sonuçları incelenirken çoğunlukla laboratuvar hayvanlarından yararlanılmıştır (159). Yapılacak çalışmalarda ise tek bir hayvan modelinin ideal olmasını beklemek yerine, çalışmanın amacına yönelik uygun modelin seçilmesi daha doğru bir yaklaşımdır.

Literatürde de kırık iyileşmesi üzerine yapılan deneysel çalışmalarda rat, fare, tavşan, köpek, koyun, maymun ve domuz gibi çok sayıda hayvan çeşidinin kullanıldığı görülmektedir (160, 161). Ancak büyük hayvanlar; pahalı olmaları, temin edilmesinin ve bakımlarının zor olması gibi birçok dezavantaja sahiptir. Bu nedenle bizde çalışmamızda denek sayısının fazla olması, şartlara hızlı uyum sağlama ve enfeksiyona dirençli olmaları, izogenetik olmalarının yanı sıra temin edilebilme kolaylığı, ucuz olmaları, daha fazla örnek alma imkanı sunmaları ve fizyolojileri hakkında yeterli kaynak bulunması gibi avantajları nedeniyle kırık modeli için rat kullanmayı tercih ettik (162).

Literatürde de kırık iyileşmesi ile ilgili birçok çalışmanın ratlar üzerinde yapılmış olmasının yanında; rat mandibula modelinin insan çenesine benzer şekilde diş, inferior alveolar damar ve sinir paketi gibi anatomik oluşumları da içermesi bu konuda tercihimizi desteklemektedir (52, 161, 163, 164). Dişi memeli hayvanların dönemsel hormonal farklılıklara bağlı olarak stabil olmayan bir metabolizmaları vardır. Çalışmamızda da menstrual döngü ve östrojen salgılarının kemik iyileşmesine olası etkilerinden dolayı dişi ratlar dâhil edilmemiştir. Kemik iyileşmesini etkileyen diğer bir hususta matürasyondur. Herhangi bir canlı türüne ait immatür hayvanlar genellikle

matür olanlara oranla kemik iyileşmesini daha hızlı tamamlamaktadır. Bu sebepten kemik iyileşmesi üzerine etkisi incelenecek olan ajan veya uygulamalar hakkında doğru bilgilere ancak matürasyonunu tamamlamış bir hayvan kullanılarak ulaşılabildiği belirtilmiştir (165). Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmamızda yetişkin ve erkek ratlar kullanılmıştır.

Önemli olan diğer bir konu da hayvan modellerinden elde edilen sonuçların bilimsel olarak kabul görmesi adına insanlara uyarlanabilmesidir. Bu anlamda yapılan bazı deneysel hayvan çalışmaları ratlardaki kemik onarımının insanlardaki kırık iyileşmesini iyi yansıttığını göstermiştir (166). Çalışmamızda da deneysel kırık modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabileceği düşünülmüştür. Yapılan araştırmaların bir çoğunda kemik modeli olarak; kolay ulaşılması ve manipülasyon kolaylığı gibi nedenlerden dolayı tibia ve femur gibi uzun kemikler kullanılmıştır. Bunun yanı sıra başta mandibula olmak üzere kraniyofasiyal kemiklerin kullanıldığı çalışma sayısı azdır. Rat mandibulası üzerinde çalışmak her ne kadar bazı zorlukları beraberinde getirirse de son yıllarda çalışmalarda deneysel model olarak tercih edildiği görülmektedir (163, 167). Çene-yüz kemiklerinde kırık iyileşmesi üzerine etkisi araştırılmamış olan ÜÇE'nin bu anlamda etkisini değerlendirmek amacıyla araştırmamızda model olarak mandibula kemiği seçilmiştir. Ayrıca mandibula kırıklarının diş hekimliği cerrahi pratiğinde sıkça rastlanan olgular olmasının çalışmamızın klinik değerini artıracakını düşünmekteyiz.

Deneysel modelin mandibula olması hayvanlar açısından bazı sorunlar oluşturmaktadır. Çoğu kemirgen olan bu hayvanlarda özellikle operasyon sonrasında ağrı ve çenelerin cerrahiden etkilenmesi ile diyetlerinde zorunlu olarak değişiklik yapmak gerekmektedir. Benzer şekilde çalışmamızda da mandibulalarındaki kırık nedeniyle hayvanlar ilk haftada normal diyetlerinden farklı olarak sadece sıvı ve yumuşak diyet (kek) ile beslenmiştir.

Deneysel mandibula kırıklarında meydana gelen en önemli komplikasyonların birisi de enfeksiyondur ve oluşturulan mandibula kırığının ağız ortamıyla yakın ilişkisi nedeniyle enfeksiyon riski daha da artmaktadır. Birçok çalışmada da postoperatif çeşitli zamanlarda görülen enfeksiyonlar nedeniyle deneklerin öldüğü ve çalışmadan çıkarıldıkları bildirilmiştir (168, 169). Bunların dışında intraoperatif veya postoperatif

dönemde kullanılan fiksatorlerde kırılma ya da vidalarda gevşeme görülebilir. Ancak çalışmamızda bu şekilde enfeksiyon, mikrovida ve plaklarda herhangi bir oynama, gevşeme olmamıştır. Tüm bu komplikasyonların yanı sıra çalışmamızda ise bazı ratlarda dudak komissurasına en yakın mikrovida cilde ekspozite olduğu görülmüştür. Bölgenin kas dokusunun yoksun, ince bir tabakası ile kaplı olmasının yanı sıra hayvanların çenelerinin her hareketinde mevcut mikrovidanın ciltte yarattığı travmanın buna sebep olabileceği düşünülmüştür.

Kırık iyileşmesinin incelendiği hayvan araştırmalarında oluşturulacak kırık modelinin de oldukça önemli olduğu belirtilmiştir (160, 170). Bunlar arasında kapalı kırık, açık osteotomi ile oluşturulan kırık ve segmental kırık örnek verilebilir. Kapalı kırık literatürde birçok çalışmada tercih edilmiş bir yöntem olmasına rağmen açık osteotomi ile oluşturulan kırık modeli kaynamanın geç olması veya oluşmaması nedeniyle kullanılacak tedavi yönteminin etkinliğinin incelenebilmesi açısından çok daha başarılı bir yöntemdir (170). Çalışmamızda da bu nedenle ÜÇE ve DDLT'nin etkinliğinin incelenebilmesi için Steinbrech ve ark. tarafından kullanılan modele benzer şekilde deneklerin ikinci ve üçüncü molar dişleri arasından geçecek şekilde açık kırık modeli oluşturulmuştur (171). Böylece her kırık hattının yerinin tespitinde kapalı kırık modeline nazaran daha iyi bir düzeyde standardizasyon sağlanabilmiştir.

Kırık oluşumundan sonra ise ideal bir kırık iyileşmesi sağlanabilmesi için kemik segmentlerinin rijit bir şekilde hareketsizliğinin sağlanması gerekir. Bu amaçla literatürde bazı tekniklerin bahsi geçmektedir. Plak osteosentezi, intramedullar tespit gibi internal uygulamaların yanı sıra eksternal fiksatorler bunlardan birkaçıdır (171-173). Özellikle tibia ve femur gibi uzun kemiklerin kapalı kırık modellerinde Kirschner telleri ile tedavisi kabul edilen bir tekniktir ve halen kullanılmaktadır (168). Ancak bu metodun en büyük dezavantajı iyi bir tespit sağlamasına karşın kırık kallusunda aşırı bir fibrotik doku artışına neden olabilmesidir (174). Miniplak ve vidalar yardımıyla uygulanan plak osteosentezi yöntemi ise mandibula kırıklarının tespiti için kullanılabilir alternatif yöntemlerin başında gelmektedir (168, 172). Bu yöntemde çok daha iyi bir iyileşme ortamı sağlanmakta, postoperatif IMF süresi mümkün olduğunca kısaltılmakta ve eksternal fiksatorlerde oluşabilen enfeksiyon riski de elimine

edilmektedir. Çalışmamızda da fiksasyon metodu olarak literatürle uyumlu olacak şekilde mikroplak kullanımı uygun bulunmuştur.

Mandibulanın çok yönde ve sürekli hareket eden bir kemik olması sonucu diğer kemiklerle kıyaslandığında kaynamama riski daha yüksektir (175). Literatürde yapılan çalışmalarda bu durumun oluşmaması için mikroplakların fiksasyonunda genel anlamda 4 vida kullanıldığı görülmektedir (168, 169). Ancak bunun aksine 2 vida kullanılarak fiksasyon sağlanan çalışmalar da bulunmaktadır. Çalışmamızda ise 4 vidanın 2 vidaya oranla çok daha iyi bir stabilizasyon sağlayacağını düşünülerek literatüre uygun şekilde 4 delikli düz bir mikroplak ve 4 mikrovida yardımıyla rijit fiksasyon sağlanmıştır.

Kırık iyileşmesinde kırık uçlarının arasındaki mesafe de kırık iyileşmesini yakından ilgilendirir ve iyileşme için kritik boyutta bir defekt aralığı mevcuttur (165). Bu kritik değerin aşıldığı durumunda ise iyileşme süreci olumsuz etkilenmekte ve kırık iyileşmesi kemik yerine daima fibröz bağ dokusu oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalarda bu kritik boyuttaki defektin rat mandibulası için yaklaşık 4 mm olduğu belirtilmekle beraber (176); Deppe ve ark. ise çalışmalarında bu defekt boyutunu 5 mm olarak kabul etmişlerdir (167). Çalışmamızda ise rat mandibulasının anatomisine uygun özel yapım mikroplak kullanımıyla kırık uçları arasındaki mesafenin kritik boyuttaki defekt miktarından daha az olması sağlanmıştır.

Literatürde kırık iyileşmesini konu alan çalışmalarda birçok farklı zaman diliminin rehber alınarak iyileşme süreçlerinin değerlendirildiği de görülmektedir. İşlem sonrası 1., 3., 7., 10., 14., 21., 24., 28. ve 38. günlerde sakrifikasyon uygulanmış çalışmalar olduğu gibi sakrifikasyon süresinin 10. haftaya kadar uzatıldığı çalışmalar da bulunmaktadır (172, 177). Kırığı takiben özellikle ilk birkaç hafta içerisinde bazı biyolojik olaylar iyileşme sürecini olumsuz etkiler. Yapılan çalışmalarda kırık iyileşmesi sırasında oksidatif stresin ortaya çıktığını ve SOR'nin de kırık iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (13, 51, 178). Ratlarda yapılmış olan deneysel çalışmalarda SOR'a bağlı hasarın kırık sonrası 7. ve 14. günlerde yüksek olduğu dördüncü haftada ise düşmeye başladığı gösterilmiştir (88, 90). Göktürk ve ark.'da SOR'nin kırık iyileşmesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında ratlarda kırık sonrası 22. günde yaptıkları incelemelerde artan radikal üretiminin kırık iyileşmesini bozduğunu göstermişlerdir (52). Buradan anlaşıldığı üzere

kırığın tam olarak kaynayabilmesi için erken dönemler oldukça önem arz etmektedir (38). Bu amaçla çalışmamızda da kullanılacak olan ÜÇE ve DDLT'nin erken dönemde SOR ve olası doku hasarı üzerine etkilerini incelemek amacıyla 7. ve 21. günlerdeki iyileşme süreçlerini değerlendirmeyi uygun bulduk (62). Yirmibir günlük bu iyileşme sürecinin olgunlaşmamış kemik dokusu için yeterli olacağını ve uygulanacak olan tedavi prosedürlerinin iyileşme hızını ne derece etkileyeceğini göstermesi açısından da belirlenen bu sürelerin anlamlı olduğunu düşünmekteyiz.

Normal şartlarda sağlıklı canlı organizma, serbest radikallerin etkisinden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptir. Mevcut bu sistemin yetersiz kalması sonucu ise SOR'nin doku üzerine yapmış oldukları yıkımın derecesi ve karşı savunma mekanizması tarafından bu durumun ne düzeyde baskılanabildiği serum TAS, TOS ve OSİ değerleri incelenerek bakılabilmektedir. Bizde çalışmamızda açık cerrahi yöntemiyle oluşturulan deneysel kırık modelin ve tedavisine yönelik uygulanan ÜÇE ve DDLT'nin oksidan/antioksidan sistem üzerine etkinliklerini incelemek amacıyla serum TAS, TOS ve OSİ parametreleri kullandık.

Araştırmamızda elde ettiğimiz biyokimyasal sonuçlara göre 7. gün gruplarında sadece TAS bakımından E7 grubu ile L7 ve EL7 grupları arasında anlamlı fark bulunmakta olup; E7 grubunun ortalama TAS değeri sayısal olarak her iki gruba göre daha yüksek çıkmıştır. Bu anlamlı farklılığın ekstremin antioksidan kapasitesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bununla birlikte yedinci günde ekstre grubuna (E7) göre lazer verilen gruplardaki (L7, EL7) TAS değerlerindeki bu düşüşün, uygulanan lazer dozunun ve süresinin yüksekliğinin erken dönemdeki etkisi ile alakalı olabileceği düşünülmüştür. 21. gün grupları arasında da sadece TAS değerleri bakımından anlamlı farklılıklar görülmüştür. 7. gün gruplarında E7 grubunda EL7 grubuna kıyasla anlamlı görülmüş olan farklılık; 21. günde ise E21 ve EL21 grupları arasında kıyaslandığında bu sefer EL21 grubunda daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte L21 ve EL21 grupları ile K21 grubu arasında deney grupları lehine anlamlı bir fark görülmektedir. Bu sonuçlar lazerin 7. günde TAS üzerine olumlu bir etki yapmadığı hatta daha da düşürdüğü, bunun aksine 21. günde ise erken döneme kıyasla daha etkin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca EL21 grubunda K21 grubuna göre TAS değerlerinde artış görülürken; E21 grubunda K21 grubuna göre anlamlı bir artış görülmemesi bu artışın ekstremin kaynaklanmadığını

düşündürmüştür. Enfeksiyon, enflamasyon, travma gibi serbest radikallerin fazla miktarda oluştuğu bazı durumlarda endojen antioksidanlar yetersiz kalabilmektedir. Bu gibi durumlarda Halliwell ve ark.'da oluşan bu doku hasarını azaltmak amacıyla antioksidanlar bakımından zengin gıdaların alınması gerektiği belirtmişlerdir (179). Bizde çalışmamızda SOR ve dolayısıyla oksidatif stresin arttığı kırık ve sonrasında ki iyileşme döneminde mevcut savunma sistemini destekleyici bir eksojen antioksidanın yeterli doz ve sürede alınmasının ise yararlı olabileceğini düşünmekteyiz. Bagchi ve ark. vit E, C ve her ikisinin kombinasyonlarından daha iyi koruyucu özellikte olan ÜÇE'nin günlük diyetle ilave edilebilecek kadar güvenli, biyolojik olarak kullanılabilir antioksidanlardan birisi olduğunu vurgulamıştır (16).

Yakın dönemde gerek biyolojik ve gerekse farmakolojik özelliklerinden dolayı ÜÇE ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. ÜÇE'nin insan sağlığı üzerinde antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanserojenik etkileri olduğu bilinmektedir (180). Ayrıca ekstrenin içerdiği oligomerik proantosiyandinlerin anti-enflamatuvar, antitümoral aktivite gösterebildiği; kalp hastalıkları ve yaşlanmayı önleyebildiği, iskemik perfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu da belirtilmiştir (180-182). Khanna ve ark. proantosiyandinlerin yara iyileşmesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında ise ratların sırtlarında eksizyonel yara oluşturulup topikal ÜÇE'yi 100 mg/ml 5 gün boyunca uygulamışlar. Topikal ÜÇE uygulanan grupta kontrol grubuna göre yaranın daha hızlı bir şekilde kapandığını gözlemlemişlerdir (183).

Farklı alanlarda ÜÇE'nin kullanıldığı birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen; son zamanlarda kemik doku üzerine yapılmış olan çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalardan Park ve ark. ÜÇE'sinin otoimmün enflamatuvar artritte görülen kemik yıkımını önleme konusunda faydalı olabileceğini belirtmektedir (184).

Diğer bir çalışmada Woo ve ark ise diz eklemlerinde monosodyum iyodoasetat ile indüklenen artrit modeli geliştirilmiş oldukları ratlarda monosodyum iyodoasetat enjeksiyonu sonrası 4 hafta boyunca haftada 3 kez oral yolla 100 mg/kg ve 300 mg/kg ÜÇE'nin kondrosit ve proteoglikanların kaybının yanı sıra osteofit oluşumunu azalttığı böylelikle eklem hasarına karşı koruyucu olduğunu ve osteoartrit için umut verici bir tedavi olabileceğini belirtmişlerdir (185). Diğer bir çalışmada Yahara ve ark. kalsiyumdan yoksun beslenen ratlarda standart yemlerine karıştırdıkları ÜÇE'nin

ratların tibia diafizleri üzerine olan etkisini araştırmış sonuçta ÜÇE'nin kemik dokunun formasyonu, mineral içeriği ve dayanıklılığı gibi mekanik özelliklerini artırdığını tespit etmişlerdir (186). Benzer çalışmalarda da yine yemlerine ÜÇE ilavesi yapılan ratlarda mandibular kondilin formasyonunun, dayanıklılığının ve mekaniksel özelliklerinin daha iyi düzeyde gerçekleştiği görülmüştür (187, 188).

Gelişim dönemindeki ratlarda ÜÇE'nin mandibula üzerine ne gibi etkisi olduğu araştırılmış olup; standart yemlerine kombine ÜÇE ile beslenen ratların mandibuların da kortikal kemik yoğunluğu, kortikal ve trabeküler kemiğin mineral içeriğinin daha fazla olduğu bunun yanında kemiğin formasyonu, kalitesi ve dayanıklılığını gibi mekaniksel özelliklerini de arttığı gösterilmiştir (189, 190). Bu sınırlı sayıdaki çalışmalara bakıldığında ÜÇE'nin kemik doku üzerine oldukça etkili olduğu görülmektedir. Ancak ÜÇE'nin kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda ÜÇE'nin kırık iyileşmesi üzerine olan olası etkilerinin neler olduğu incelenmiştir.

Daha önce de vurgulandığı gibi ÜÇE'nin doz aralığının geniş olması ve toksisitesinin olmayışı, oral alınan son doz sonrası 7-10 gün süreyle belirli bir serum düzeyini devam ettirmesi onun en önemli özelliklerindedir (16, 119). Literatürde ayrıca proantosiyandinlerin akut ve kronik toksisitesi üzerine literatürde yapılmış çalışmalar mevcuttur. Genel olarak proantosiyandinlerin yüksek dozlarda (1400-1500 mg/kg/gün) bile toksik ve mutajenik etkisine rastlanılmadığı belirtilmektedir (122). Yamakoshi ve ark. da ratlarda ÜÇE'nin akut ve subkronik oral toksisite çalışmalarında, 14 gün boyunca verilen 2 ve 4 g/kg dozlarda dahi oral toksisite ve mutajenitenin oluşmadığını belirtmiştir (108). Ayrıca uzun süre ÜÇE'nin kullanımının etkisi de incelenmiştir. Ray ve ark. 1 yıl boyunca erkek B6C3F1 farelere günlük 100 mg/kg veya 6 ay boyunca dişi farelere 500 mg/kg ÜÇE takviyesi sonucunda deneklerin hayati organların da gözlenen bir yan etki oluşmadığı bildirilmiştir (121). Tüm bu çalışmaların yanı sıra erkek ve dişi albino ratlara gastrik entübasyon yoluyla verilen ÜÇE'nin LD50 değerinin 5000 mg/kg'dan fazla olduğu da belirtilmektedir (120).

Yapılan çalışmalarda herhangi bir yan etkisinin olmadığı gösterilen proantosiyandinler aynı zamanda uzun yıllardır Amerika ve Avrupa'da kullanılan bir besin takviyesidir ve bu özelliklerinden dolayı FDA tarafından genel olarak güvenli kabul edilen besin

statüsünde yer almaktadır ve tavsiye edilen ÜÇE'nin dozu günlük 100 ila 300 mg arasında değiştiği belirtilmektedir (120). Ancak literatürde ÜÇE'nin kırık iyileşmesi üzerine etkisini araştıran yapılmış herhangi bir çalışma bulunmadığından dolayı uygulama dozu, uygulama süresi ve uygulama rejimi ilk defa çalışmamız kapsamında denenmiştir. Tüm bu bilgilerin ışığında deneklere literatürde belirtilen güvenli doz aralığı içinde kalacak şekilde 300 mg/kg/gün orogastrik yolla sakrifiye edilecekleri güne kadar uygulanmıştır (16).

Son yıllarda kemik dokuda iyileşme sürecini hızlandırmak amacıyla kullanılan tekniklerden birisi de DDLT'dir. Yapılan çalışmalarda DDLT'nin terapötik etkileri ilk bağ dokusunda incelenmiş olup; zaman içerisinde ise DDLT'nin enflamasyonu azalttığı, fibroblast proliferasyonu ve kollajen üretimini stimüle ettiği, lokal mikrovaskülarizasyonu arttırdığı ve kemik mineralizasyonunu arttırdığı, osteoblastik aktiviteyi stimüle ederek implant osteointegrasyonunda arttırıcı etki gösterdiği belirtilmiş ve lazerin bu özellikleriyle kemik iyileşmesi üzerine olumlu etki gösterdiği kanıtlanmıştır (142, 153, 191).

Literatürde mevcut bu biyostimülatif etkilerinden dolayı yara iyileşmesinde önceleri sıklıkla He-Ne lazerleri tercih edilmiş; sonraları bu lazerleri Galyum Arsenid diyot lazer ve Galyum Alüminyum Arsenid (GaAlAs) lazerlerinin kullanımı takip etmiştir. DDLT'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisinin incelendiği araştırmalara bakıldığında da GaAlAs ve He-Ne lazerlerin sıklıkla kullanıldığı görülmektedir. David ve ark. rat tibialarında kırık oluşturarak, intrameduller tellerle tespit ettikten sonra 2 ve 6 hafta boyunca He-Ne lazer uygulamışlar ve lazerin etkilerini histolojik ve mekanik olarak değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak iyileşmenin lazer uygulanan grupta kontrol grubuna göre artma olmadığını hatta lazer uygulanan gruptaki bazı kemiklerin kontrol grubuna göre mekanik olarak daha dayanıksız olduğunu görmüşlerdir (192). Diğer bir çalışmada ise Bayat ve ark. tavşan femurları üzerinde açtıkları defektlere 2, 4, 8 ve 16 hafta sürelerle He-Ne lazer tedavisi uygulamış ve histolojik değerlendirme sonrası lazer uygulanan gruplarda kontrol gruplarına göre anlamlı farklılıklar saptayamamışlardır. Araştırmacılar bu sonuç doğrultusunda He-Ne lazerlerin defekt bölgesine yeterince penetre olamadığını düşünmüşlerdir (193). Yapılan çalışmalarda bu tip lazerlerin kullanıldığı çalışmalarda kemik iyileşmesi üzerine olan etkinlikleriyle ilgili

araştırmacılar arasında çelişkili görüşler olduğu görülmektedir. GaAlAs lazerler ise son 10 yıl içerisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve yüksek penetrasyon özelliği nedeniyle pratik uygulamalarda daha etkili ve olumlu sonuçlar sunmaktadır (194). Çalışmamızda da bu nedenlerden dolayı GaAlAs lazer tercih edilmiştir.

DDLDT'nin biyostimülasyon etkisini etkileyen faktörlerden bir diğer de lazerin dalga boyudur. Ancak DDLDT'nin gerçekleştirdiği biyostimülatif etkinin lazerin dalga boyundan bağımsız olduğunu belirten yazarlar da bulunmaktadır. Qadri ve ark. alışmalarında periodontal ve gingival enflamasyonun lazerin dalga boyundan etkilenmediği sonucunu belirtmişlerdir (195). Bu görüşün aksine Walsh ve ark. yaptıkları in vitro çalışmada hücre kültüründe 630 nm, 670 nm ve 830 nm dalga boyundaki DDLDT'yi kemik hücrelerine ve fibroblastlara uygulamış, sonuçta en iyi ve etkili sonucu 830 nm ile fibroblastlardan ziyade kemik hücrelerinde olduğunu gözlemlemişlerdir (196). 810 nm dalga boyundaki diyot lazerlerin ise 10 mm' ye kadar penetrasyon gösterebildikleri ve derin dokularda da stimüle edici özellikleri olduğu bilinmektedir (114). Bu bilgilerden yola çıkarak ve çalışmamızda da ekstraoral olarak kullanılacak olan lazerin kemik dokuda etki gösterebilmesi adına 810 nm dalga boyu tercih edilmiştir.

DDLDT kullanımında doz ayarlaması da önemli olan diğer bir konudur. Genel olarak lazerin düşük dozlarının bir etkisi yokken, yüksek dozlarda ise inhibitör etkisinin oluşabileceği ve bu sebeple lazer uygulamalarının tedavi edici bir doz aralığının mevcut olduğu söylenmiştir (197). Ancak literatürde DDLDT ve kemik iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda kullanılacak dozla ilgili bazı araştırmacıların günlük doz olarak 10 J/cm², 16 J/cm²; 120 J/cm² gibi yüksek dozların uygulanmasını savunurken (142, 192, 198); bazı yazarlar ise günde 0.3 J/cm², 0.9 J/cm²; 3 J/cm² şekilde düşük dozların daha iyi sonuçlar verdiğini savunmaktadır (199).

Oliveira P ve ark. rat tibiasında oluşturdukları kemik defektlerine 830 nm, GaAlAs lazer ile 60 ve 120 J/cm² dozlarda DDLDT uyguladıkları çalışmalarında kontrol grubuna kıyasla lazer uygulanan gruplarda daha düşük düzeyde kemikleşme olduğunu belirtmişlerdir (200). Ancak yazarın diğer bir çalışmasında ise aynı defekt modeli üzerine 120 J/cm² dozda DDLDT ile 30 mW/cm² yoğunluğunda ultrasonun iyileşmesi üzerine etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak her iki uygulamanın kontrol grubuyla

kıyaslandığında kemiğin biyomekanik özellikleri açısından anlamlı fark bulunmazken; yine kontrol grubuna göre her iki uygulamanın yapıldığı grupta yüksek oranda örgü kemik oluştuğu belirtilmiştir (198). Javadieh F ve ark. ise diabetik ratlarda tibia defektleri üzerine yüksek doz olarak 23.3 J/cm² ve düşük doz olarak 11.6 J/cm² uyguladıkları çalışmalarında kontrol grubuna kıyasla düşük doz verdikleri DDLT grubunda kemiğin mekanik özellikleri açısından daha iyi bir iyileşme gerçekleştiğini göstermişlerdir (201).

Görüldüğü gibi DDLT tedavisinin geniş bir terapötik doz aralığı mevcuttur ve DDLT'nin kemik dokusu üzerinde etkili doz ve dalga boyu standart olmadığından mevcut bir protokol henüz oluşturulamamıştır (202). Ancak son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda 23 J/cm² uygulandığı ve olumlu sonuçların alındığı görülmektedir.

Khadra ve ark. ratlarda pariyatel kemikte oluşturdukları defekler üzerine 830 nm dalga boyunda GaAlAs lazeri 6 gün boyunca her gün 23 J/cm² doz uygulamışlar ve 14. ve 28.günlerde sakrifikasyon sonrası yapılan incelemelerde lazer grubunda kemik ve bağ dokusunda revaskülarizasyon ve yeni kemik oluşumunda anlamlı artış olduğunu tespit etmişlerdir (12). Aynı yazarın diğer bir çalışmasında da titanyum implantların kemik ile bağlantısı üzerine tavşanların tibialarında implant yuvaları hazırlamışlar ve aynı dalga boyunda GaAlAs diyot lazer ile 10 gün süreyle hergün yine 23 J/cm² doz uygulamışlardır. Sekizinci haftada elde edilen sonuçlara göre lazer grubunda kontrol grubuna göre daha fazla implant kemik kontak yüzeyi ve kalsiyum fosfor miktarında artış oluştuğu görülmüştür (127).

Bizde çalışmamızda literatürde mandibular kırık iyileşmesi üzerine DDLT'nin etkisinin incelendiği herhangi bir hayvan çalışmasının bulunmaması ve Khadra ve ark. çalışmalarının gösterdiği olumlu etkiden yola çıkarak 810 nm, GaAlAs diyot lazer ile 23 J/cm² doz uygulamayı tercih ettik.

Lazerin uygulama periodu konusunda ise her gün yapılan irradyasyonları tercih eden araştırmacılar olduğu gibi son zamanlarda 48 saatte bir yapılan uygulamaları tercih edenlerde vardır (199). Gerbi ve ark. ratlarda femur defektini oluşturdukları çalışmalarında, 15 gün boyunca, 48 saat arayla ve her seansta 16 J/cm² enerji yoğunluğunda olmak üzere DDLT uygulamış ve yaptıkları histolojik analizlerde 15., 21.

ve 30. günlerde ki medüller doku, granülasyon dokusu, kollajen lifler ve yeni oluşan kemiğin kalitesini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonunda yazarlar 15. gün lazer grubunda kollajen lif miktarında anlamlı derecede artışın yanında havers kanallarının şekillenmeye başladığı hızlı bir iyileşme gözlemlerken; 30. gün lazer grubunda ise artık organize olmuş kemik trabeküllerinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca 21. gün grubunda ki iyileşmenin de 30. günde görülen histolojik bulgulara benzer olduğu vurgulanmıştır (203). Araştırmacılar lazerin erken dönemde uygulanmasının kemik iyileşmesini hızlandırdığını, geç dönemde uygulanmasının ise kemik rejenerasyonunda önemli bir rol oynamadığını vurgulamışlardır. Bizde benzer şekilde çalışmamızda DDLT'nin fibroblastik aktivite ve osteoblastik farklılaşmayı stimüle ederek kırık iyileşmesini hızlandırmasını amaçladık. Buna yönelik 7. gün gruplarına 7 gün süreyle; kemikleşme üzerine etkisini incelemek adına 21. gün gruplarında 14 gün süreyle 48 saatte bir lazer uygulamasının yapılmasını planladık.

Lazerin yapılan çalışmalarda farklılaşmış hücrelerin çoğalma, olgunlaşma ve kemik matriks salınımı üzerine etki gösterdiği bilinmektedir. Böylece damarlanma ve iltihabi yanıtın erken başlamasını tetikleyerek kemik matriks yapımını hızlandırdığı da belirtilmektedir (204). Ancak yapılan bazı çalışmalarda her ne kadar DDLT'nin sert ve yumuşak doku iyileşmesi üzerindeki olumlu etkisi gösterilmiş olsa da iyileşme üzerine beklenen etkinin görülmediği veya lazerin olumsuz etki gösterdiği literatürde görülmektedir (192, 193, 200).

Khadra ve ark. ratların kafatasında açtıkları defektlere 6 gün boyunca hergün 23 J/cm² dozda lazer tedavisi uygulamışlardır. Diğer çalışmalarının aksine 14. günde damarlanma ve fibröz doku oluşumu kontrol grubuna göre daha fazla görülürken, 28. günde deney ve kontrol grupları arasında fark görülmemiştir (12). Garavello ve ark. rat tibialarında oluşturdukları defektleri He-Ne lazer ile cerrahiden 24 saat sonra başlamak üzere 7. ve 14. gün gruplarına 31.5 J/cm² ve 94.5 J/cm² olacak şekilde DDLT uygulamış ve grupları anjiogenezis ve yeni kemik oluşumunu açısından değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak yüksek doz verilen 7. gün lazer grubunda damarlanmanın anlamlı şekilde arttığını ancak 14.gün grubunda ise kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde kaldığını göstermişlerdir (205). Garavello ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada ise lazerin uzun dönem kullanımı sonucu trabeküler kemik oranının azaldığını ve 2. haftanın sonunda

uyguladıkları DDLT sonucu matriks sentezi ve anjiogeneziste azalma olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarını sonucunda lazerin uygulama süresine bağlı olarak pozitif veya negatif etkilerinin olabileceğini belirtmişlerdir (199).

Araştırmamızın sonunda uyguladığımız süre ve dozda ÜÇE'nin kemikleşme üzerine oldukça etkili olduğu, kemik iyileşmesini hızlandırdığı görülmüştür. İstatistiksel olarak hem 7. gün hem de 21. günde ekstre (E7, E21) ve ekstre+lazer (EL7, EL21) uygulanan gruplarda kontrol gruplarına (K7, K21) göre yeni kemik oluşumu ve osteoblast sayısı açısından anlamlı derecede bir artış bulunmuştur. Bununla birlikte yine hem 7. gün hem de 21. günde ekstre+lazer (EL7, EL21) uygulanan gruplarda sadece lazer (L7, L21) uygulanan gruplara göre benzer şekilde yeni kemik oluşumu ve osteoblast sayısı açısından anlamlı derecede bir artış bulunmuştur.

Çalışmamız sonucunda elde edilen diğer önemli bir hususta E7 ve E21 gruplarının ortalama kemikleşme ve osteoblast değerlerinin birbirine yakın olmasıdır. Bu sonuç ile ÜÇE'nin kırık iyileşmesinde erken dönemde de iyi düzeyde kemikleşme elde edilmesinde etkili olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda ayrıca sadece lazer uygulanan grupları (L7, L21) kontrol gruplarıyla (K7, K21) kıyaslandığında kemikleşme açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Lazer gruplarının ortalama osteoblast sayı değerlerinin kontrol grupları ile birbirine oldukça yakın olduğu görülmüştür. Bunun aksine ortalama kemikleşme değerlerinin ise her iki lazer grubunda (L7, L21) kontrol gruplarına nazaran (K7, K21) daha yüksek olduğu görülmektedir.

Proantosiyanidinlerin doku hasarına karşı oldukça etkili oldukları, yara iyileşmesi ve anjiogenezisi artırdığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Çalışmamızda ise kapiller sayısı, enflamatuar hücre, fibroblast ve kollajen lifler açısından hem 7. gün hem de 21. gün grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu duruma postoperatif birinci haftada anjiogenezisin yeterli oluşmaması ve düşük oksijen saturasyonu sonucu osteojenik aktivitenin olumsuz etkilenmesinin neden olabileceğini düşünmekteyiz (206). Ancak gruplar arasında sadece EL21 grubunda K21 grubuna göre hem enflamatuar hücre hemde fibroblast sayısı açısından anlamlı bir fark gözlenmiştir. Bu farklılığın ortaya çıkmasında ise ÜÇE ile kombine uygulanan DDLT'nin uzun dönemde yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda tüm deney gruplarında kontrol gruplarına nazaran genel olarak iyi düzeyde kemikleşme meydana gelmiştir. Aynı zamanda hiçbir denekte iyi bir postoperatif bakımın ve kırık hattında kritik defekt boyutunun aşılmamış olmamasının da etkisiyle kırık uçlar arasında kaynamama sıkıntısı oluşmamıştır. Bu nedenle gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamayan ve bağ doku iyileşme kriterleri olarak incelenen kapiller ve fibroblast sayısı, enflamatuar hücre ve kollajen lif miktarı gibi histolojik iyileşme parametreleri çalışmamız kapsamında önem arz etmediğini düşünmekteyiz.

Literatürde, ÜÇE'nin etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmasına rağmen kırık iyileşmesi üzerine nasıl etki ettiğini inceleyen herhangi bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır. Ayrıca literatürde DDLT'nin gerek kırık iyileşmesi gerekse kemik iyileşmesi üzerine farklı dozlar kullanılarak etkinliğini inceleyen birçok çalışma rapor edilmesine karşın, ÜÇE ile kombine kullanımının nasıl bir etki yaptığına dair yeterli bir bilgi bulunmadığından, çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçların oksidan/antioksidan sistem ve kırık iyileşmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Bu bulgulara göre;

- Deneysel kırık oluşturulan tüm ratlarda postoperatif dönemde herhangi bir sebepten dolayı rat ölümü ile karşılaşmadığı; deneklerin işlem öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları kıyaslandığında E21 grubu hariç tüm gruplarda kilo kaybı görüldüğü ancak bu kayıp hiçbir hayvanın çalışma dışında tutulmasını gerektirecek düzeyde olmadığı,
- Biyokimyasal olarak yapılan incelemelerde hem 7. gün hem de 21. günde oksidan ve antioksidan sistem üzerine gruplar arasında sadece TAS değerleri açısından anlamlı farklılık görüldüğü, 7. gün TAS değerlerinde sadece ekstre grubunda anlamlı fark görülürken; lazer uygulamasının burada TAS üzerine olumsuz bir etkisi olduğu,
- 21. gün gruplarında ise TAS değerleri açısından 7. günde gözlemlenen sonuçların aksine burada ekstre grubundan ziyade en iyi sonuçların lazer ve ekstre+lazer grubunda görüldüğü ve lazerin uzun dönemde TAS üzerine olumlu yönde etki gösterdiği,
- Operasyon sonrası 7. ve 21. günlerde ekstre verilen gruplarda (E7, EL7, E21, EL21) kontrol grubuna kıyasla yeni kemik oluşumu ve osteoblast sayısı istatistiksel olarak

anlamalı bir şekilde arttığı ve en iyi sonuçların ise ekstrenin lazer ile kombine uygulandığı gruplarda (EL7, EL21) gözlemlendiği,

- Uygulanan doz ve sürede lazerin ekstre ile beraber kullanıldığında ekstrenin etkinliğini artırdığı, bununla birlikte DDLT'nin tek başına kemik oluşumu üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin görülmediği,

- Ayrıca ekstrenin kullanıldığı deney gruplarında (E, EL) 7. günde elde edilen kemik oluşumunun aynı grupların 21. gününde görülen kemikleşmeye yakın bir ortalama değere sahip olduğu ve böylece ekstrenin 7. günde de oldukça iyi iyileşme potansiyeli oluşturduğu söylenebilir. Ancak bu noktada ajanların uzun dönem etkilerini inceleyen daha fazla sayıda detaylı araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, Oral ve Maksillofasiyal cerrahi kliniğinde sıkça karşılaşılan mandibula kırıklarında kırık iyileşmesini hızlandırmak ve dolayısıyla hastaların işlevlerini daha kısa sürede geri kazanmalarını sağlamak amacıyla kullanılacak yöntemlerden birisinin de 300 mg/kg/gün dozda verilen Üzüm Çekirdeği Ekstresi olabileceği, bununla birlikte ekstre ile kombine olacak şekilde uygulanan 23 J/cm² dozda (0.3 W, 810 nm GaAlAs) DDLT'nin kemikleşme ve iyileşme süreci üzerine olumlu etkilerinin olduğu ve bu şekilde ÜÇE ile birlikte kullanımının klinik kullanım açısından daha iyi sonuçlar vereceği kanatine varılmıştır.

Literatürde ÜÇE ve bunun DDLT ile kombine kullanımının mandibular kırık iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen herhangi bir çalışmanın bulunmaması ve takibinde araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Tüm bunlara karşın, oluşan kemikleşme paterninin kesin sebebini söyleyebilmek için daha ileri değerlendirmeler gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- 1.Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya: Pelikan yayınları, 2004.
- 2.Bucholz RW, Heckman JD, Court-Brown C. Rockwood and Green's Fractures in Adults, 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: p.297-330.
- 3.Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36:1392-1404.
- 4.Adell R, Eriksson B, Nylén O, Ridell A. Delayed healing of fractures of the mandibular body. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1987;16:15-24.
- 5.Bouxsein ML, Turek TJ, Blake CA, D'Augusta D, Li X, Stevens M, Seeherman HJ, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83:1219-1230.
- 6.Higgins TF, Dodds SD, Wolfe SW. A biomechanical analysis of fixation of intra-articular distal radial fractures with calcium-phosphate bone cement. *J Bone Joint Surg Am*. 2002;84:1579-1586.
- 7.Doetsch AM, Faber J, Lynnerup N, Wätjen I, Bliddal H, Danneskiold-Samsøe B. The effect of calcium and vitamin D3 supplementation on the healing of the proximal humerus fracture: a randomized placebo-controlled study. *Calcif Tissue Int*. 2004;75:183-188.
- 8.Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355 Suppl:S7-21.
- 9.Rozen N, Lewinson D, Bick T, Meretyk S, Soudry M. Role of bone regeneration and turnover modulators in control of fracture. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2007;17:197-213.
- 10.Nicola RA, Jorgetti V, Rigau J, Pacheco MT, dos Reis LM, Zangaro RA. Effect of low-power GaAlAs laser (660 nm) on bone structure and cell activity: an experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2003;18:89-94.

- 11.Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:487-494.
- 12.Khadra M, Kasem N, Haanaes 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.
- 13.Symons M. Radicals generated by bone cutting and fractures. *Free Radical Biol Med.* 1996;20:831-835.
- 14.Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994;344:721-724.
- 15.Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.
- 16.Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology.* 2000;148:187-197.
- 17.Jungueria CL, Carnerio J, Kelley O. Bone. In: *Basic Histology.* New Jersey: Appleton and Lange, 1995: p.132-151.
- 18.Hobar P. Implantation: bone, cartilage, and allografts. *Selected Readings Plast Surg.* 1992;7:1-2.
- 19.Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*, 2nd ed. Pennsylvania, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001: p.134-154.
- 20.Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop.* 2000;11:403-412.
- 21.Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone.* 1992;13 Suppl1:S3-6.
22. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. Part 1: Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77:1256-1275.

- 23.Dökmeci Ö. İbandronat'ın Rat Tibia Modelinde Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi. 2011, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 74 sayfa, Kahramanmaraş, (Dr. Özer Dökmeci).
- 24.Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Demir R, Palme yayıncılık, Ankara, 2006:118-145.
- 25.Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. Temel Histoloji, Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006:141-159.
26. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R. Skeletal Growth and Development: Clinical Issues and Basic Science Advances, 1st Ed. Illinois: American Academy of Orthopaedic Surgeons Press, 1998.
- 27.Carneiro Jv. Basic Histology, 10th ed. New York: McGraw-Hill, 2003.
28. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006;11:E47-51.
29. Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC, Skinner HB. Bone remodeling do to continuously applied loads. Calcified Tissue International. 1984;36 Suppl1:25-30.
- 30.Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC (Ed). Bone Mechanics Handbook. 2th ed. Florida: CRC Press; 2001: p.1- 68.
- 31.Schenk RK. Biology of fracture. In: Browner B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (Eds). Skeletal Trauma. Philadelphia: Saunders; 2003: p.29-74.
- 32.Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology-II. Instructional Course Lectures AAOS. 1996;41:387-399.
- 33.Rhee ST, Tong L, Buchman SR. Fracture healing and bone graft repair. In: Thaller SR, McDonald WS (Eds). Facial Trauma. Newyork: Marcel Dekker Inc; 2004: p.95-136.

- 34.Serinoğlu S. Mikroskobik düzeyde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2002;55:143-150.
- 35.Küçükalp A. İmmünnutrisyonun (Glutamin-Alanin) Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi. 2012, Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ortopedi Ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 53 sayfa, Bursa, (Prof. Dr. Kemal Durak).
- 36.Browner BD JM, Levine AM, Trafton MD. Skeletal Trauma,2nd Ed. 1997.
- 37.Doblaré M, García JM. On the modelling bone tissue fracture and healing of the bone tissue. Acta Cient Venez. 2003;54:58-75.
38. Frost, H.M. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. Clin Orthop Relat Res. 1989;248:283-293.
- 39.Kan B. Düşük Yoğunluklu Lazer Uygulamasının Distraksiyon Osteogenezisi Üzerine Etkilerinin Histomorfometrik Ve Radyolojik Olarak Karşılaştırmalı İncelenmesi: Deneysel Araştırma. 2011, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 133 sayfa, Ankara, (Prof. Dr. Ferda Taşar).
- 40.Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 2000;31:375-388.
- 41.Weinstein SL and Buckwalter JA. Turek's orthopaedics : principles and their application. Turek Ortopedi İlkeler ve Uygulamaları, Alpaslan AM, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009:57-71.
- 42.Calori GM, Albisetti W, Agus A, Iori S, Tagliabue L. Risk factors contributing to fracture non-unions. Injury. 2007;38 Suppl2:11-18.
- 43.Fernández-Ferrero S, Ramos F. Dyshaemopoietic bone marrow features in healthy subjects are related to age. Leuk Res. 2001;25:187-189.
- 44.Fischer JE. Metabolism in surgical patients protein, carbohydrate, and fat utilization by oral and parenteral routes. In: Townsend K (Ed). Sabiston Textbook of surgery. St.Louis: W.B. Saunders; 2001: p.100-130.

- 45.Us Ali Kemal. Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları, Ankara, 2005.
- 46.Gennari C. Calcium and vitamin D nutrition and bone disease of the elderly. *Public Health Nutr.* 2001;4:547-559.
- 47.Steier A, Gedalia I, Schwarz A, Rodan A. Effect of vitamin D2 and fluoride on experimental bone fracture healing in rats. *J Dent Res.* 1967;46:675-680.
- 48.Costa ER, Weinhold P, Tayrose GA, Hooker JA, Dahners LE. The effect of levodopa or levodopa-carbidopa (sinemet) on fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2006;20:470-475.
- 49.Cobb TK, Gabrielsen TA, Campbell DC 2nd, Wallrichs SL, Ilstrup DM. Cigarette smoking and nonunion after ankle arthrodesis. *Foot Ankle Int.* 1994;15:64-67.
- 50.Buckwalter JA. Bone and Joint Healing. In: Buchholz R, Heckman J, Court- Brown C (Eds). *Rockwood and Green's Fractures in Adults.* Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006.
- 51.Duygulu F, Yakan B, Karaoglu S, Kutlubay R, Karahan OI, Ozturk A. The effect of zymosan and the protective effect of various antioxidants on fracture healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007;127:493-501.
- 52.Göktürk E, Turgut A, Bayçu C, Günal I, Seber S, Gülbas Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand.* 1995;66:473-475.
- 53.Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988;5:156-170.
- 54.Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12:1161-1208.
- 55.Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49:481-493.

56. Atlan N, Sepici Dinçel A, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi*. 2006;31:51-56.
57. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*. 1993;26:351-357.
58. Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:915-948.
59. Miyasaki KT, Wilson ME, Brunetti AJ, Genco RJ. Oxidative and nonoxidative killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by human neutrophils. *Infect Immun*. 1986;53:154-160.
60. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res*. 1999;428:17-22.
61. Naqui A, Chance B, Cadenas E. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:137-166.
62. Biçer EK. Taurinin Deneysel Kırık İyileşmesi Üzerine Etkisi. 2010, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 123 sayfa, İzmir, (Prof Dr. Akın Kapubağlı).
63. Canakçi CF, Çiçek Y, Canakçi V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70:619-628.
64. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2002;33:110-118.
65. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15:186-190.
66. Gros L, Ishchenko AA, Saparbaev M. Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat Res*. 2003;531:219-229.
67. Palmieri B, Sblendorio V. Current status of measuring oxidative stress. *Methods Mol Biol*. 2010;594:3-17.

68. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev.* 2000;32:307-326.
69. Peng T, Shen HM, Liu ZM, Yan LN, Peng MH, Li LQ, Liang RX, Wei ZL, Halliwell B, Ong CN. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes and its association with expression and polymorphisms of hOGG1: a study of adolescents in a high risk region for hepatocellular carcinoma in China. *World J Gastroenterol.* 2003;9:2186-2193.
70. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:450-456.
71. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:463-499.
72. Maxwell SR, Thomason H, Sandler D, LeGuen C, Baxter MA, Thorpe GH, Jones AF, Barnett AH. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem.* 1997;34:638-644.
73. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1995.
74. Yiyenoglu ÖB. Tekrarlayan Gebelik Kayıplarında Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye ve Oksidatif Stres İndeksi Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi: Prospektif Kontrollü Klinik Çalışma. 2010, Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Gaziantep.
75. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *Am J Pathol.* 1982;107:395-418.
76. Olinescu R. Physiologic effects of oxygen stress. In: Boriotti S, Dennis D (Eds). *Free Radicals in Biology and Medicine.* New York, ABD: Nova Science Publishers; 2002.

77. Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis.* 1993;52:659-666.
78. De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des.* 2009;15:3003-3026.
79. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer.* 2007;121:2381-2386.
80. Jeremy JY, Yim AP, Wan S, Angelini GD. Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. *J Card Surg.* 2002;17:324-327.
81. Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2002;86:41-59.
82. Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:83-106.
83. Trougakos IP, Gonos ES. Chapter 9: Oxidative stress in malignant progression: The role of Clusterin, a sensitive cellular biosensor of free radicals. *Adv Cancer Res.* 2009;104:171-210.
84. Belviranlı M. Üzüm Çekirdeği Ekstresinin Sıçanlarda Akut Ve Kronik Egzersizin Neden Olduğu Oksidatif Hasar Ve Antioksidan Savunma Üzerine Etkileri. 2009, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 133 sayfa, Konya, (Prof.Dr. Hakkı Gökbel).
85. Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism. *Clin Chim Acta.* 2002;318:145-148.

- 86.Cetinus E, Kiliç M, Uzel M, Inanç F, Kurutaş EB, Bilgic E, Karaoguz A. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? Arch Orthop Trauma Surg. 2005;125:376-380.
- 87.Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. J Clin Invest. 1990;85:632-639.
- 88.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;137:74-77.
- 89.Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. Cell Biochem Funct. 2005;23:137-139.
- 90.Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Oztürk HS, Seber S, Acar S. Oxidant status increased during fracture healing in rats. Acta Orthop Scand. 1999;70:487-490.
- 91.Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON. Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. Acta Orthop Belg. 2003;69:546-551.
- 92.Frankel EN, Meyer AS. The Problems of Using One-Dimensional Methods to Evaluate Multifunctional Food and Biological Antioxidants. J Sci Food Agric. 2000;80:1925-1941.
- 93.Kaur C, Kapoor HC. Antioxidants in fruits and vegetables the millennium's health. Int J Food Sci Technol. 2001;36:703-725.
- 94.Çimen T. Hatay Yöresindeki Çeşitli Bitkilerden Elde Edilen Doğa Bileşiklerinin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi. 2012, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 93 sayfa, İstanbul, (Prof. Dr. Ayşe Ogan).
- 95.Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi. 1999;8:42-47.

- 96.Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med.* 2006;40:341-347.
- 97.Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med.* 1996;21:213-238.
- 98.Mannervik B. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1985;113:490-495.
- 99.Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 1999;13:1007-1024.
- 100.Packer L, Weber SU, Rimbach G. Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr.* 2001;131:369S-373S.
- 101.Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997;29:363-372.
- 102.Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987;1:358-364.
- 103.Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13:572-584.
- 104.Ardağ A. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Analitik Açıdan Karşılaştırılması. 2005, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 70 sayfa, Aydın, (Prof. Dr. A. Ersin Karagözler).
- 105.Fine AM. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev.* 2000;5:144-151.
- 106.Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;339:1523-1526.

107. St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*. 1979;1:1017-1020.
108. Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol*. 2002;40:599-607.
109. Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1997;95:179-189.
110. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20:933-956.
111. Sato M, Maulik G, Ray PS, Bagchi D, Das DK. Cardioprotective effects of grape seed proanthocyanidin against ischemic reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1289-1297.
112. Ray SD, Patel D, Wong V, Bagchi D. In vivo protection of dna damage associated apoptotic and necrotic cell deaths during acetaminophen-induced nephrotoxicity, amiodarone-induced lung toxicity and doxorubicin-induced cardiotoxicity by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2000;107:137-166.
113. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 2001;156:67-72.
114. Bagchi D, Kuszynski CA, Balmoori J, Bagchi M, Stohs SJ. Hydrogen peroxide-induced modulation of intracellular oxidized states in cultured macrophage J774.1 and neuroactive PC-12 cells, and protection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Phytother Res*. 1998;12:568-571.
115. Shenoy SF, Keen CL, Kalgaonkar S, Polagruto JA. Effects of grape seed extract consumption on platelet function in postmenopausal women. *Thromb Res*. 2007;121:431-432.

116. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res Bull.* 2006;68:469-473.
117. Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis.* 2003;24:1379-1388.
118. Beecher GR. Proanthocyanidins: Biological Activities Associated with Human Health. *Pharmaceutical Biology.* 2004;42:2-20.
119. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:418-425.
120. Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract.* 2006;60:1484-1492.
121. Ray S, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC, Preuss HG, Stohs SJ. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2001;109:165-197.
122. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1989;38:181-188.
123. Pütter M, Grotemeyer KH, Würthwein G, Araghi-Niknam M, Watson RR, Hosseini S, Rohdewald P. Inhibition of smoking-induced platelet aggregation by aspirin and pycnogenol. *Thromb Res.* 1999;95:155-161.
124. Brannan RG, Mah E. Grape seed extract inhibits lipid oxidation in muscle from different species during refrigerated and frozen storage and oxidation catalyzed by peroxynitrite and iron/ascorbate in a pyrogallol red model system. *Meat Sci.* 2007;77:540-546.

- 125.Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727-747.
- 126.Karu TI, Tiphova OA, Fedoseyeva GE. Biostimulating action of lowintensity monochromatic visible light: is it possible? *Laser Chemistry.* 1984;5:19-25.
- 127.Khadra M, Ronold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haanaes HR. Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15:325-332.
- 128.Wagner RF JR, Brown T, McCarthy EM. (2000) What is low level laser therapy. *Dermatologic Surgery.* 2000;26:7237.
- 129.Guttenberg SA, Emery RW 3rd. Laser physics and tissue interaction. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2004;16:143-147.
- 130.Gürler G. Düşük Enerji Seviyeli Lazerin Distraksiyon Osteogenezisinde Biyostimülatif Etkisinin İncelenmesi. 2010, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 119 sayfa, İstanbul, (Prof. Dr. Bahar Gürsoy).
- 131.Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: science and instruments. *Dent Clin North Am.* 2004;48:751-770.
- 132.Baxter GD. Therapeutic Lasers: Theory and Practice. Churchill Livingstone, 1994: p.35-40.
- 133.Hall A, Girkin JM. A review of potential new diagnostic modalities for caries lesions. *J Dent Res.* 2004;83:C89-94.
- 134.Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Lasers Surg Med.* 1989;9:338-344.
- 135.Tokonabe H, Kouji R, Watanabe H, Nakamura Y, Matsumoto K. Morphological changes of human teeth with Er:YAG laser irradiation. *J Clin Laser Med Surg.* 1999;17:7-12.

- 136.White JM, Goodis HE, Rose CL. Use of the pulsed Nd:YAG laser for intraoral soft tissue surgery. *Lasers Surg Med.* 1991;11:455-461.
- 137.Akal ÜK, Karasu HA, Sayan NB. Oral kavitenin yumuşak doku tümörleri ve mukozal lezyonlarında CO2 lazer kullanımını klinik olarak değerlendirilmesi. *Turkiye Klinikleri J Dental Sci* 2003;9:47-54.
- 138.Aoki A, Sasaki KM, Watanabe H, Ishikawa I. Lasers in nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2004;36:59-97.
- 139.Finkbeiner RL. The results of 1328 periodontal pockets treated with the argon laser: selective pocket thermolysis. *J Clin Laser Med Surg.* 1995;13:273-281.
- 140.Kahraman SA. Low-level laser therapy in oral and maxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2004;16:277-288.
- 141.Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 2. Hard tissue applications. *Aust Dent J.* 1997;42:302-306.
- 142.Cerqueira A, Silveira RL, Oliveira MG, Sant'ana Filho M, Heitz C. Bone tissue microscopic findings related to the use of diode laser (830 nm) in ovine mandible submitted to distraction osteogenesis. *Acta Cir Bras.* 2007;22:92-97.
- 143.Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys.* 1989;56:691-704.
- 144.Soares DM, Ginani F, Henriques AG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers Med Sci.* 2013; [Epub ahead of print].
- 145.Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med.* 1985;5:31-39.
- 146.Coombe AR, Ho CT, Darendeliler MA, Hunter N, Philips JR, Chapple CC, Yum LW. The effects of low level laser irradiation on osteoblastic cells. *Clin Orthod Res.* 2001;4:3-14.

147. Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:161-166.
148. Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. *J Bone Miner Metab.* 2003;21:67-73.
149. Barushka O, Yaakobi T, Oron U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone.* 1995;16:47-55.
150. Dörtbudak O, Haas R, Mallath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11:540-545.
151. Glinkowski W, Rowinski J. Effect of low incident levels of infrared laser energy on the healing of experimental bone fractures. *Laser Therapy.* 1995;7:67-70.
152. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone.* 1998;22:347-354.
153. Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007;39:441-450.
154. Miloro M, Miller JJ, Stoner JA. Low-level laser effect on mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:168-176.
155. Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B, Aksoy B. Sıçan tibia kırıkları sonrası uygulanan diklofenak sodyum'un kırık kaynaması üzerine etkileri. *Hacettepe Ortopedi Dergisi.* 2001;11:55-60.
156. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res.* 1991;9:383-390.

- 157.Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19:459-466.
- 158.Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *J Cell Biochem.* 2010;109:302-311.
- 159.O'Loughlin PF, Morr S, Bogunovic L, Kim AD, Park B, Lane JM. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl1:79-84.
- 160.Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;355 Suppl:S56-65.
- 161.Hausman MR, Schaffler MB, Majeska RJ. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone.* 2001;29:560-564.
- 162.Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2005;16 Suppl2:S129-138.
- 163.Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2003;41:173-178.
- 164.Bi LX, Mainous EG, Zeng Y, Buford WL Jr. Osteoformin accelerates fresh fracture healing in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:2470-2474.
- 165.Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986;205:299-308.
- 166.Chakkalakal DA, Strates BS, Mashoof AA, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McGuire MH. Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone.* 1999;25:321-332.
- 167.Deppe H, Stemberger A. Effects of laser-modified versus osteopromotively coated titanium membranes on bone healing: a pilot study in rat mandibular defects. *Lasers Med Sci.* 2004;18:190-195.

168. Wildemann B, Bamdad P, Holmer C, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G. Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone*. 2004;34:862-868.
169. Pampu AA, Dolanmaz D, Tüz HH, Avunduk MC, Kişnişci RS. Histomorphometric evaluation of the effects of zoledronic acid on mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66:905-910.
170. Jackson RA, McDonald MM, Nurcombe V, Little DG, Cool SM. The use of heparan sulfate to augment fracture repair in a rat fracture model. *J Orthop Res*. 2006;24:636-644.
171. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105:2028-2038.
172. Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AA, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004;42:315-322.
173. Eckardt H, Christensen KS, Lind M, Hansen ES, Hall DW, Hvid I. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 enhances bone healing in an experimental model of fractures at risk of non-union. *Injury*. 2005;36:489-494.
174. Conflitti J, Graves M, Russell G, Tucci M, Benghuzzi H. Plating of rat femoral shaft osteotomies: report of a technique and preliminary results. *Biomed Sci Instrum*. 2003;39:278-283.
175. Rodriguez-Merchan EC, Forriol F. Nonunion: general principles and experimental data. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;(419):4-12.
176. Kaban LB, Glowacki J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. *J Dent Res*. 1981;60:1356-1364.

177. Bulbul M, Esenyel CZ, Esenyel M, Ayanoglu S, Bilgic B, Gulmez T. Effects of calcitonin on the biomechanics, histopathology, and radiography of callus formation in rats. *J Orthop Sci.* 2008;13:136-144.
178. Zhu W, Murrell GA, Lin J, Gardiner EM, Diwan AD. Localization of nitric oxide synthases during fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17:1470-1477.
179. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd Ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
180. Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe DV, Vlietinck AJ. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Curr Med Chem.* 2004;11:1345-1359.
181. Zhao J, Wang J, Chen Y, Agarwal R. Anti-tumor-promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis.* 1999;20:1737-1745.
182. Maffei Facinó R, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G, Bombardelli E, Morazzoni P. Procyanidines from *Vitis vinifera* seeds protect rabbit heart from ischemia/reperfusion injury: antioxidant intervention and/or iron and copper sequestering ability. *Planta Med.* 1996;62:495-502.
183. Khanna S, Venojarvi M, Roy S, Sharma N, Trikha P, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1089-1096.
184. Park JS, Park MK, Oh HJ, Woo YJ, Lim MA, Lee JH, Ju JH, Jung YO, Lee ZH, Park SH, Kim HY, Cho ML, Min JK. Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. *PLoS One.* 2012;7:e51377.
185. Woo YJ, Joo YB, Jung YO, Ju JH, Cho ML, Oh HJ, Jhun JY, Park MK, Park JS, Kang CM, Sung MS, Park SH, Kim HY, Min JK. Grape seed proanthocyanidin extract

ameliorates monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Exp Mol Med.* 2011;43:561-570.

186.Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima K, Kojima Y, Kimura M. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5:162-169.

187.Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *Eur J Oral Sci.* 2005;113:47-52.

188.Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2004;4:301-307.

189.Gunjima M, Tofani I, Kojima Y, Maki K, Kimura M. Mechanical evaluation of effect of grape seed proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dent Mater J.* 2004;23:67-74.

190.Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis.* 2004;10:27-31.

191.Blaya DS, Guimarães MB, Pozza DH, Weber JB, de Oliveira MG. Histologic study of the effect of laser therapy on bone repair. *J Contemp Dent Pract.* 2008;9:41-48.

192.David R, Nissan M, Cohen I, Soudry M. Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats. *Lasers Surg Med.* 1996;19:458-464.

193.Bayat M, Javadieh F, Dadpay M. Effect of He-Ne laser radiation on healing of osteochondral defect in rabbit: a histological study. *J Rehabil Res Dev.* 2009;46:1135-1142.

194.Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 2000;26:282-291.

195. Qadri T, Miranda L, Tunér J, Gustafsson A. The short-term effects of low-level lasers as adjunct therapy in the treatment of periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*. 2005;32:714-719.
196. Walsh L, Goharkhay K, Verheyen P, Moritz A. Low Level Laser Therapy (LLLT). In: Moritz A (Ed). *Oral Laser Application*. Berlin: Quintessenz; 2006: p.521-539.
197. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg*. 2001;19:29-33.
198. 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;15:200-205.
199. Garavello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B*. 2003;70:81-99.
200. Oliveira P, Ribeiro DA, Pipi EF, Driusso P, Parizotto NA, Renno AC. Low level laser therapy does not modulate the outcomes of a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate) on bone consolidation in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21:1379-1384.
201. Javadieh F, Bayat M, Abdi S, Mohsenifar Z, Razi S. The effects of infrared low-level laser therapy on healing of partial osteotomy of tibia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Photomed Laser Surg*. 2009;27:641-646.
202. Parker S. Low-level laser use in dentistry. *Br Dent J*. 2007;202:131-138.
203. Gerbi ME, Marques AM, Ramalho LM, Ponzi EA, Carvalho CM, Santos Rde C, Oliveira PC, Nória M, Pinheiro AL. Infrared laser light further improves bone healing when associated with bone morphogenic proteins: an in vivo study in a rodent model. *Photomed Laser Surg*. 2008;26:55-60.

204. Salate AC, Barbosa G, Gaspar P, Koeke PU, Parizotto NA, Benze BG, Foschiani D. Effect of In-Ga-Al-P diode laser irradiation on angiogenesis in partial ruptures of Achilles tendon in rats. *Photomed Laser Surg.* 2005;23:470-475.
205. Garavello I, Baranauskas V, da Cruz-Höfling MA. The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol.* 2004;19:43-48.
206. Krawczyk A, Kuropka P, Kuryszko J, Wall A, Dragan S, Kulej M. Experimental studies on the effect of osteotomy technique on the bone regeneration in distraction osteogenesis. *Bone.* 2007;40:781-791.

7. EKLER

Ek 1: Yerel etik kurul karar metni

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/81
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

07.11.2013

Sayın
Doç.Dr.Mutan Hamdi ARAS
Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 07.11.2013 tarihinde Prof.Dr.Ömer POYRAZ başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Doç.Dr.Mutaf Hamdi ARAS'ın yürütücülüğünü yapmış olduğu 04.11.2013 tarih ve 399 sayılı "Üzüm çekirdeği (Vitis Vinifera) ekstresi ve düşük doz lazer tedavisinin (DDL) kırık iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histomorfometrik olarak incelenmesi" isimli Doktora Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Eray BULUT
Üye

Prof.Dr.Mustafa TURAN
Üye

Doç.Dr.İhsan HUBBEZOĞLU
Üye

Doç.Dr.Zübeyda AKIN POLAT
Üye

Doç.Dr.Bülent SARAÇ
Üye

Doç.Dr.Mehmet TUZCU
Üye

Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye

Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye – Başkanvekili

Semiha EKİNCİ
Sivil Üye

Turhan DUYMUŞ
Sivil Üye

Prof.Dr.Ömer POYRAZ
Başkan

8. ÖZGEÇMİŞ

13.06.1987 yılında ERZURUM/İSPİR’de doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise eğitimimi İstanbul’da tamamladım. Lisans eğitimime 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde başlayarak 2010 yılında mezun oldum. Aynı yıl doktora eğitimime Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında başladım. 2012 yılında Adıyaman Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’ne Araştırma Görevlisi olarak atandım ve aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’ne görevlendirmem yapıldı ve bu şekilde halen Gaziantep Üniversitesi bünyesinde doktora eğitimi ve görevimi sürdürmekteyim.