



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA OLUŞTURULAN KRİTİK BOYUTLU KEMİK
DEFEKTLERİNE SIĞIR KAYNAKLI DEPROTEİNİZE KEMİK
GREFTİYLE BİRLİKTE UYGULANAN SİSTEMİK
RESVERATROLÜN YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Dt. Tuğçe ÇEVİK
UZMANLIK TEZİ

SİVAS
2016



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



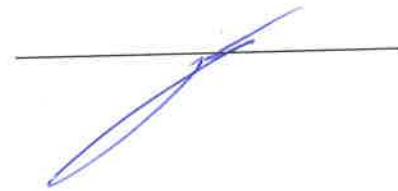
RATLARDA OLUŞTURULAN KRİTİK BOYUTLU KEMİK
DEFEKTLERİNE SIĞIR KAYNAKLI DEPROTEİNİZE KEMİK
GREFTİYLE BİRLİKTE UYGULANAN SİSTEMİK
RESVERATROLÜN YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE OLAN
ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Dt. Tuğçe ÇEVİK
UZMANLIK TEZİ

Yrd. Doç. Dr. Turgay Peyami HOCAOĞLU
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

SİVAS
2016

“Ratlarda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine sığır kaynaklı deproteinize kemik greftiyle birlikte uygulanan sistemik resveratrolün yeni kemik oluşumu üzerine olan etkilerinin deneysel olarak incelenmesi” adlı Uzmanlık Tezi, jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

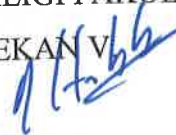
	AD SOYAD	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hasan YELER	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turgay Peyami HOCAOĞLU	
Üye	Doç. Dr. Erdem KILIÇ	

ONAY

Bu tez çalışması, 07.11.2016 tarihinde Fakülte Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan HUBBEZOĞLU
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

DEKAN V.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve beni yönlendiren danışmanım Yrd. Doç Dr. Turgay Peyami HOCAOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ceylan HEPOKUR'a teşekkür ederim.

Verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesine katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Ziyne ÇINAR'a teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Dt. Ezgi AYDIN'a, Dt. Gül FİKİRLİ'ye, Dt. Esra ALTUNSOY'a ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her konuda sabırla yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde büyük emekleri olan aileme sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

ÖZET

RATLARDA OLUŞTURULAN KRİTİK BOYUTLU KEMİK DEFEKTLERİNE SIĞIR KAYNAKLI DEPROTEİNİZE KEMİK GREFTİYLE BİRLİKTE UYGULANAN SİSTEMİK RESVERATROLÜN YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Dt. Tuğçe ÇEVİK

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Sivas

2016

Ağız diş ve çene cerrahisinde, çoklu diş çekimine bağlı alveolar kayıplar, kist-tümör operasyonları, onkolojik rezeksiyonlar, travma, enfeksiyon, gelişimsel anomaliler nedeniyle kemik dokuda defektler meydana gelmektedir. Çeşitli etyolojilerle meydana gelen defektlerin hızla ve anatomik forma en uygun şekilde onarımı gereklidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda araştırmacılar, kemik defektlerinin onarımında yeni kemik oluşumunu uyarıcı nitelikte olan greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışma yapmaktadırlar. Ayrıca bazı antioksidan ajanların yeni kemik oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmaktadır.

Antioksidan bir bileşik olan resveratrol (3,4,5-trihidroksistilben); başlıca üzüm olmak üzere, yer fıstığı, ahududu, dut, erik, böğürtlen gibi sebze ve meyvelerde, kırmızı şarapta ve *Polygonum cuspidatum* adlı bitkinin köklerinde yüksek oranda bulunur. Doğal fitoaleksinin yapısında olup, aynı zamanda antienflamatuvar, antineoplastik, antitrombositler özelliğe sahip olan bir bileşiktir.

Bu çalışmada, ratlarda deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerine, antioksidan özellik gösteren ve osteoblastik aktiviteyi artırıcı özelliği bulunan resveratrolün sistemik uygulanmasının, yeni kemik oluşumu üzerine olan etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Böylece kemik iyileşmesine olumlu yönde katkıda bulunabilecek yeni ajanların geliştirilmesine yardımcı olmak amaçlanmıştır.

Çalışmada 56 adet erkek Wistar albino cinsi rat kullanılarak 14'erli 4 grup oluşturulmuştur. Her grup kendi içerisinde sakrifikasyon günleri açısından 14. ve 28.

günler olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Tüm gruplarda ratların sağ mandibulasında 5 mm çapında defekt oluşturulmuştur. 1. Deney grubu olan olan kontrol grubuna (K) herhangi bir işlem yapılmamıştır. 2. deney grubunda (G) oluşturulan defekt sığır kaynaklı kemik grefti ile doldurulmuştur. 3. deney grubunda oluşturulan defekt boş bırakılıp, sistemik resveratrol (10mg/kg) verilmiştir. 4. deney grubunda oluşturulan defekt hem sığır kaynaklı kemik greftiyle doldurulmuş hem de sistemik resveratrol (10mg/kg) verilmiştir.

14. ve 28. günlerdeki histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirme sonuçlarına göre; ossifikasyon derecesi, fibrozis, anjiyogenez, enflamatuvar hücre yoğunluğu, BMP-2 ve TNF- α miktarı bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Sonuç olarak; sistemik resveratrolün kemik iyileşmesine olumsuz etkisi olmadığı ve kritik boyutlu kemik defektlerine kemik grefti ile birlikte uygulandığında kemik iyileşmesinin daha iyi sonuçlandığı gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kritik boyutlu defekt, resveratrol, sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti

ABSTRACT**EXPERIMENTAL STUDY OF THE EFFECTS OF ADMINISTERING
BOVINE ORIGIN BONE GRAFT WITH SYSTEMIC RESVERATROL ON
EXPERIMENTALLY INDUCED CRITICAL SIZE BONE DEFECTS IN
RATS REGARDING NEW BONE FORMATION****Dt. Tuğçe ÇEVİK****Department of Oral and Maxillofacial Surgery****Sivas****2016**

In oral and maxillofacial surgery, defects in bone tissue emerge due to alveolar loss after multiple tooth extraction, cyst-tumor operations, oncologic resections, trauma, infection and developmental abnormalities. It is necessary to repair defects caused by various etiologies rapidly and in the appropriate way for anatomical form. In recent studies, researchers conduct studies on grafts and biomaterials that can stimulate the new bone formation in the repair process of bone defects. Furthermore the effects of antioxidant agents on new bone formation is under research.

Resveratrol (3,4,5-trihydroxystilbene) is present at a high rate mainly in raisins, peanuts, raspberries, mulberries, plums, blackberries and such fruit and vegetables, red wine and Polygonum cuspidatum plant's root. Natural phytoalexin is a compound having a structure of antioxidant, anti-inflammatory, antineoplastic properties.

In this study, it is intended to examine the effects of systemic implementation of resveratrol having antioxidant and osteoblastic activity-enhancing features on new bone formation using histopathological and biochemical methods on the experimentally induced bone defects in rats and contribute to the development of new agents for bone healing. Thus, the aim of this study is to develop new agents which can contribute to bone healing in a positive way.

In the study, 56 male Wistar albino rats were used to form 4 groups of 14 rats. Each group is divided into 2 groups based on 14 and 28 days of sacrifice within themselves. In each group of rats defects of 5 mm in diameter were formed in the right mandibles. Without taking any action on the control group; bovine origin bone graft (G) was applied to first experimental group, systemic resveratrol (10mg/kg) was applied to second experimental group and systemic resveratrol with bovine origin bone graft (10mg/kg) was applied to the third experimental group.

According to the histopathological and biochemical evaluation results of 14th and 28th days, significant difference of ossification degree, fibrosis,

angiogenesis, inflammatory cell density, BMP-2 and TNF- α was observed between different groups. As a result, when systemic resveratrol is applied together with graft, bone healing was observed to be better in the critical size bony defects.

Key words: Critical size defect, resveratrol, bovine origin deproteinized bone graft.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kemik Dokusu.....	3
2.1.1 Kemik Hücreleri.....	4
2.1.2 Kemik Matriksi.....	5
2.1.3 Kemik Türleri.....	6
2.1.4 Kemikte Gelişim ve Büyüme.....	7
2.1.5 Kemik İyileşmesi.....	9
2.2 Kemik İyileşmesi Komplikasyonları.....	10
2.3 Kritik Boyutlu Defekt.....	11
2.4 Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Greft Materyalleri.....	12
2.4.1 Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Greft Endikasyonları	13
2.4.2 Kemik Greft Materyallerinin Sınıflandırılması.....	14
2.5 Bone Morfogenetik Protein (BMP).....	17
2.6 Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α).....	19
2.7 Resveratrol.....	20
2.7.1 Resveratrol Kaynakları.....	21
2.7.2 Resveratrolün Yapısı ve Fiziksel Özellikleri.....	22
2.7.3 Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	23

3. MATERYAL METOT.....	24
3.1 Çalışma Gruplarının Tanımlanması.....	24
3.2 Cerrahi Teknik.....	25
3.3 Resveratrol Solüsyonunun Hazırlanması ve Uygulanma Şekli.....	31
3.4 Deney Hayvanlarının Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması.....	33
3.5 Değerlendirme Yöntemleri.....	34
3.5.1 Histopatolojik Yöntem.....	34
3.5.2 ELISA Yöntemi.....	35
3.6 İstatistiksel Yöntem.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1 Klinik Bulgular.....	37
4.2 Histopatolojik Bulgular.....	37
4.2.1 Ossifikasyonun Değerlendirilmesi.....	37
4.2.2 Anjiyogenezin Değerlendirilmesi.....	40
4.2.3 Fibrozis Miktarının Değerlendirilmesi.....	42
4.2.4 İnflamatuar Hücre Miktarının Değerlendirilmesi.....	44
4.2.5 Nekroz Mevcudiyetinin Değerlendirilmesi.....	47
4.3 Biyokimyasal Bulgular (ELISA Bulguları.....	48
4.3.1 BMP-2 Miktarının Değerlendirilmesi.....	48
4.3.2 TNF- α Miktarının Değerlendirilmesi.....	50
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	78
EKLER	
EK-1	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Ark.....	Arkadaşları
BMP.....	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bFGF.....	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hidroksiapatit kristalinin kimyasal yapısı
GDF.....	Growth differentiation factor
HA.....	Hidroksiapatit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IL.....	İnterlökin
lt.....	Litre
mg.....	Miligram
mm.....	Milimetre
MMP.....	Matriks Metalloproteinaz
nm.....	Nanometre
NF- κB.....	Nuclear factor kappa B
OPG.....	Osteoprotegerin
PBS.....	Phosphate-Buffered Saline
PDGF.....	Platelet derived growth factor
pg.....	Pikogram
pH.....	Bir sıvının ya da ortamın asit veya bazlık derecesini gösteren değer
PHEMA.....	Polihidroksietil metakrilat
PMMA.....	Polimetil metakrilat
TCP.....	Trikalsiyum Fosfat
TGF-β.....	Transforme edici büyüme faktörü
TNF-α.....	Tumor Necrosis Factors-α
YKR.....	Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu

μm	Mikrometre
μg	Mikrogram
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
μl	Mikrolitre



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1:** *Polygonum Cusbidatum* bitkisinin genel görünümü
- Şekil 2.2:** Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı
- Şekil 3.1:** Operasyon sahasının traş edilmesi
- Şekil 3.2:** Operasyon sahasının betadin ile boyanması
- Şekil 3.3:** Cilt insizyonu
- Şekil 3.4:** Çalışmada kullanılan trefin frez (Ø 5mm)
- Şekil 3.5:** 5 mm çapında kemik osteotomisi
- Şekil 3.6:** Osteotomi sonrası oluşan kritik boyuttaki kemik defekti
- Şekil 3.7:** Sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti
- Şekil 3.8:** Kritik boyutta kemik defektine uygulanan greft materyali
- Şekil 3.9:** Operasyon sonrası kasların suture edilmesi
- Şekil 3.10:** Operasyon sonrası cildin suture edilmesi
- Şekil 3.11:** Resveratrolün ticari formu
- Şekil 3.12:** Oral gavaj yöntemiyle resveratrolün uygulanması
- Şekil 3.13:** Santrifüj cihazı
- Şekil 3.14:** Histopatolojik analiz cihazları
- Şekil 3.15:** ELISA reader cihazı
- Şekil 4.1:** Greft+resveratrol grubu 28. güne ait histopatolojik görüntü
- Şekil 4.2:** Greft+resveratrol grubu 14. güne ait histopatolojik görüntü
- Şekil 4.3:** Greft+resveratrol grubu 28. güne ait histopatolojik görüntü
- Şekil 4.4:** Greft+resveratrol grubu 14. güne ait histopatolojik görüntü
- Şekil 4.5:** Kontrol grubu 14. güne ait histopatolojik görüntü
- Şekil 4.6:** Kontrol grubu 14. güne ait histopatolojik görüntü

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1: İnsan kemik morfogenetik proteinleri ve temel fizyolojik özellikleri

Tablo 3.1: Çalışma gruplarının şematik gösterimi

Tablo 4.1: Histopatolojik skorlamada kullanılan kriterler

Tablo 4.2: Tüm gruplara ait ossifikasyon derecesinin karşılaştırılması

Tablo 4.3: Günlere ait ossifikasyon derecesinin karşılaştırılması

Tablo 4.4: Tüm gruplara ait anjiyogenez miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.5: Günlere ait anjiyogenez miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.6: Tüm gruplara ait fibrozis miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.7: Günlere ait fibrozis miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.8: Tüm gruplara ait enflamatuvar hücre miktarlarının karşılaştırılması

Tablo 4.9: Günlere ait enflamatuvar hücre miktarlarının karşılaştırılması

Tablo 4.10: Tüm gruplara ait nekroz miktarlarının karşılaştırılması

Tablo 4.11: Günlere ait nekroz miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.12: Tüm gruplara ait BMP-2 miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.13: Günlere ait BMP-2 miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.14: Tüm gruplara ait TNF- α miktarının karşılaştırılması

Tablo 4.15: Tüm gruplara ait TNF- α miktarının karşılaştırılması

1.GİRİŞ

Ağız, diş ve çene cerrahisinin çalışma alanının temelini kemik dokusu oluşturur. Kemik; organizmanın yaşamı boyunca oluşabilecek bir yaralanmaya karşı, genellikle skar dokusu dahi oluşmadan, tamirle cevap verebilen yüksek derecede rejenerasyon özelliğine sahip bir dokudur. Kemik iyileşmesinde amaç, kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamaktır. Küçük boyutlardaki kemik defektlerinde cerrahi müdahaleye gerek kalmadan rejenerasyon gözlenirken, belli bir boyutun üzerindeki kemik defektlerinde gözlenmez. Cerrahi müdahale ile bu durumu düzeltmek gerekir (1, 2).

Kemik defektlerinin tamiri ve rekonstruksiyonuna ait ilk veriler eskilere dayanmaktadır. M.Ö. 3000'li yıllarda maden devrinde çene yüz defektlerinde rekonstruksiyon amacıyla altın ve gümüş tabakaları greft materyali olarak kullanılmıştır (3).

Geçmişten günümüze araştırmacılar, kemik defektlerinin onarımında yeni kemik yapımını stimüle edebilecek nitelikte olan greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar. Daha sorunsuz ve hızlı bir iyileşme sağlamak ve istenmeyen etkilerin oluşmasını engellemek için, greft materyallerini kullanarak deneysel ve klinik çalışmalar yapmaktadırlar. Ağız, diş ve çene cerrahisinde, hastanın kendisinden (otojen), başka insanlardan (allogreft), diğer canlılardan (ksenogreft) alınan veya sentetik (alloplastik) kaynaklı çeşitli greft materyalleri; alveolar kret defektlerinde, dudak-damak yarıklarının greftlenmesinde, fasiyal kemiklerin ogmentasyon işlemlerinde, sinüs tabanı ogmentasyonunda, kist kavitelerinin onarımında kullanılmaktadır. Bu materyallerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Kendiliğinden tamiri mümkün olmayan defektlerde tedavi için otojen greft uygulaması altın standart olarak kabul edilir (4). Ancak otojen greftler elde edilirken ikinci bir cerrahi operasyon alanına ihtiyaç duyulur ve istenilen miktarda greft elde edilemeyebilir. Donör sahada morbidite riski ve ağrı gibi komplikasyonlar da bu greftin kullanımını sınırlamaktadır. Bundan dolayı diğer greft türlerinin (allogreft, ksenogreft, alloplastik) kullanımı ve kombine tedavilerle etkinliklerinin araştırılması gündeme gelmektedir (5).

Çeşitli hayvan türlerinden (sığır, mercan, domuz, at) elde edilebilen ksenogreftlerin, immün reaksiyon oluşmasını önlemek amacıyla bütün organik komponentleri uzaklaştırılmıştır. Literatürde sığır kaynaklı ksenogreftler üzerine pek çok çalışma yapılmıştır (6-10). Sığır kaynaklı kemik grefti, insan kansellöz kemiğine yapısal olarak çok benzer, osteokondüksiyon ve biyouyumluluk özelliklerine sahiptir (8, 11, 12). Bu nedenlerden dolayı günümüzde sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti çeşitli cerrahi operasyonlarda sık olarak kullanılmaktadır (13-15).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest radikallerin kemik iyileşmesi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir. Polifenolik maddeleri içeren bazı bitkilerin ve değişik bitki ekstratlarının, serbest radikaller üzerinde yüksek antioksidan aktivite gösterdiği bulunmuştur (16).

Resveratrol (3,4,5-trihidroksistilben) başlıca üzüm olmak üzere, yer fıstığı, ahududu, dut, erik, böğürtlen gibi sebze ve meyvelerde, kırmızı şarapta ve *Polygonum cuspidatum* adlı bitkinin köklerinde yüksek oranda bulunan doğal fitoaleksin yapısında, antioksidan özelliğe sahip olan bir bileşiktir (17). Bu bileşiğin bitkiler tarafından travmatik zedelenmeye, ultraviyole ışınına maruziyete ve fungal saldırılara karşı cevap olarak sentezlendiği ortaya konmuştur (18). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, resveratrolün trombosit agregasyonunu engellediği, kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisi olduğu ve antikarsinojenik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (19-21). Aynı zamanda resveratrolün osteoklastların formasyonunu önlediğini ve osteoblastların proliferasyonunu ve indüksiyonunu teşvik ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (22, 23). Bu çalışmada, son yıllarda yapılan deneysel araştırmalarda kemik yapımı üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu gösterilen, resveratrolün, sistemik olarak uygulanmasının kemik defektlerine olan etkilerinin değerlendirilmesi ve oluşacak yeni kemik miktarı ve kalitesinin artırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik Dokusu

Kemik dokusu; organizmanın ana iskelet yapısını oluşturan ve üzerine yapışan kasların düzenli kasılması ile vücudun hareket etmesini sağlayan özel bir bağ dokusudur. Hayati önem taşıyan organları hem koruyup hem de destek olmasının dışında, yapısında kan hücrelerinin sentezlendiği kemik iliğini bulundurur. Kalsiyum, fosfat ve diğer temel iyon ve minerallerin vücuttaki konsantrasyonunun sağlanmasında bir depo olarak görev alır. Vücudun en sert dokularından biri olduğu halde, üzerine gelen fizyolojik ve mekanik uyarılar doğrultusunda kendini şekillendirebilen dinamik bir yapıdadır ve bu özelliği sayesinde kendini onarıp yenileyebilmektedir (24).

Kemiklerin iç ve dış yüzeyleri; dış yüzeylerde periosteum, iç yüzeylerde endosteum olarak adlandırılan ve kemik oluşturan hücreleri içeren tabakalarla örtülüdür (24). Periosteum, eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreleyen kaba, vasküler, konnektif bağ dokusudur. Kemiğe destek sağlayıp, kemiğin beslenmesinde, gelişiminde ve tamirinde önemli rol oynar. Yapısındaki Sharpey lifleri adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe sıkıca bağlanır. Periosteum, dışta fibröz tabaka ve içte osteojenik tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Dış tabaka metabolizmada rol oynayan damarları ve lenfatikleri içerir. İç tabaka ise gevşek bağ dokusunda olup, yeni kemik oluşumu sağlayan hücreleri içerir. Endosteum tabakası, kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemini çevreleyen ince retiküler bir bağ dokusudur. Endosteum, periosteumdan daha incedir ve tek tabaka osteojenik hücre içerir. Bu tabakanın kemik doku yapabilme özelliği dışında hematopoetik hücreleri yapabilme özelliği vardır (24-26).

Kemik dokusu mikroskobik olarak, hücreler ve hücreler arasında bulunan kemik matriksi olmak üzere iki temel yapıdan oluşur.

2.1.1 Kemik Hücreleri

2.1.1.1 Osteoprojenitör hücreler (Osteojenik prekürsör hücreler)

Farkılaşma ve çoğalma kapasitesine sahip olan bu hücreler, kemiğin yapısında postnatal yaşam boyunca bulunurlar. İğsi şekilli olup, havers kanallarını çevreleyen endosteum ve periosteumun hücreden zengin iç tabakasında bulunurlar. Erişkin dönemde kemiğin internal reorganizasyonu, kırık iyileşmesi veya yaralanma durumlarında aktive olarak, osteoblast veya osteoklast gibi diğer kemik hücrelerine dönüşebilirler (24, 26).

2.1.1.2 Osteoblastlar

Osteoprojenitör hücrelerden köken alan osteoblastlar, kübik ya da silindirik şekillidirler. 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 (24, 27).

Osteoblastlar, kemik proteinlerinin %90'ını oluşturan Tip I kollajeni, kemik matriks proteinlerini ve büyüme faktörlerini salgırlar. Bunun yanısıra osteoklastlarla beraber kemik rezorpsiyonunun düzenlenmesinde de etkilidirler. Osteoblastlar kemik oluşumu tamamlandıktan sonra sert matriks içine gömülerek osteosit adını alır ve kendi çevrelerine az miktarda matriks sentezleyerek bölünemez bir yapıya dönüşürler (27).

2.1.1.3 Osteositler

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 sorumludurlar ve herhangi bir nedenle ölümlerini takiben matrikste çözümler gözlenir (24).

2.1.1.4 Osteoklastlar

Kemik iliğindeki monosit-makrofaj progenitör hücrelerden köken alan osteoklastlar, çok çekirdekli büyük hücrelerdir. Kemiğin rezorpsiyonundan sorumlu olan bu hücreler, Howship lakünası adı verilen yüzeysel çukurların içerisine yerleşmişlerdir (27).

Osteoklastların kemik matriksine bakan yüzünde düzensiz yapıda fırçamsı kenarları bulunur ve bu bölge kemik rezorpsiyonu 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 rezorpsiyon için pH'nın yaklaşık 3,5 olduğu asidik bir çevre meydana gelir. Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi çözünür serbest hale getirirler. Ayrıca kemik rezorpsiyonu sırasında meydana gelen atıkların da ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Bu süreç çeşitli bölgelerdeki kemiğin rezorpsiyonunu 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 alırlar (24, 28).

2.1.2 Kemik Matriksi

Kemik matriksinin, %10-29'unu su, %60-70'ini inorganik matriks, %30-40'ını da organik yapı oluşturur.

2.1.2.1 İnorganik matriks

Kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %65'ini oluşturan inorganik matriks, başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere; bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum gibi mineralleri içermektedir. Bu mineraller kollajen fibrillerin arasında hidroksiapatit ($[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$) kristalleri şeklinde yer alır ve Tip I kollajen lifleri boyunca uzanırlar. Hidroksiapatit kristallerin üzerinde su ve iyonlardan oluşan, hidrasyon kabuğu denilen vücudun sıvı-iyon dengesini sağlayan bir tabaka bulunmaktadır (24, 27).

Kemiğin sertliği ve dayanıklılığı; yapısını oluşturan kollajen ile bu hidroksiapatit kristallerinin birlikteliğine bağlıdır. Örneğin kemik doku dekalsifiye

edildiğinde normal şeklini korur ancak oldukça esnek bir hal alır. Organik kısım kemikten uzaklaştırıldığında ise, kemik şeklini yine korur ancak bu kez oldukça kırılabilir (27).

2.1.2.2 Organik matriks

Organik kısım kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık % 35'ini oluşturur ve Tip I kollajen lifleri (% 90-95), kondroitin sülfat, keratan sülfat, hyaluronik asitten zengin proteoglikanları ve kollajen olmayan proteinleri içermektedir. Organik matriksin kalsifikasyonu, Tip I kollajenlerin sonlanma bölgelerinde bulunan boşluklara mineral birikimiyle sağlanmaktadır. Osteoblastlar tarafından sentezlenen kemik glikoproteinleri (osteokalsin, osteopontin ve osteonektin) bu kalsifikasyonun başlatılmasından sorumludurlar (26). Dolayısıyla vücutta Tip I kollajen içeren ancak bu kemik glikoproteinlerini içermeyen diğer dokular ise kalsifiye olamazlar (24).

2.1.3 Kemik Türleri

Kemik mikroskopik olarak incelendiğinde, primer ve sekonder olmak üzere iki farklı tipte kemik doku olduğu görülür. Primer kemik embriyolojik gelişim sürecinde, kırık ve diğer onarım olaylarında ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Primer kemik geçicidir ve yetişkinlerde yerini sekonder kemiğe bırakır (29).

2.1.3.1 Primer kemik dokusu

İntrauterin hayatta şekillenir ve geçicidir. Olgunlaşmamış kemik dokusu, nonlameller kemik (*Woven, reticulated*) olarak da adlandırılır. Yetişkinlerin kafasındaki yassı kemik eklemleri, alveol kemiği ve tendonların kemiğe tutunduğu yerler gibi birkaç yer dışında, yerini sekonder kemiğe bırakır. Sekonder kemiğe oranla daha fazla osteosit ve daha az mineral içerir. Primer kemik dokusunda kollajen lifler dağınık seyrederek ağ yapar. Nonlameller kemikte embriyonik dönemde ve kırık iyileşme sürecinde kallus oluşumu vardır. Daha sonra yeniden yapılanma ile kortikal veya kanselloz kemiğe dönüşür (29, 30).

2.1.3.2 Sekonder kemik dokusu

Erişkinlerde sadece sekonder kemik dokusu bulunur. Lamelli bir yapı gösterir. Her lamelde bulunan kollajen fibriller birbirine paraleldir, komşu lamellerdeki kollajen

fibrillere çapraz yönde ve spiraller yaparlar. Bu özel seyir sekonder kemiğe dayanıklılık kazandırır. Primer kemik dokusuna göre, sekonder kemik daha kalsifiye ve daha güçlüdür. Primer kemik dokusunda osteositler dağınık yerleşirken, sekonder kemik dokusunda komşu lamellerin arasına sıkışmışlardır ve sayıları daha azdır. Sekonder kemik dokusu, sponjiöz (kansellöz, süngerimsi) ve kortikal (lameller, kompakt) kemik olmak üzere iki türdür (24).

2.1.3.2.1 Sponjiöz kemik

Yassı kemiklerin iç yüzeyleri ile, kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımlarında bulunan sponjiöz kemik, birbiriyle anastomozlaşan ince kemik trabeküllerinden oluşmuştur. Trabeküllerin araları kemik iliği ile doludur ve düzensiz şekilli boşlukları vardır. Besin maddelerini stoplazma uzantıları aracılığıyla, kemik iliğinde çok sayıdaki kan damarlarından alırlar (24).

2.1.3.2.2 Kortikal kemik

Tüm kemiklerin dış yüzeyinde bulunan kortikal kemik, primer kemikten yeniden yapılanma sonucu oluşur. Uzun kemiklerin dış yüzeylerini, yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarını oluşturur. Kortikal kemiğin ana yapısı Havers sistemi olarak da adlandırılan osteondur. Osteon; uzunlamasına dizili Havers kanallarını saran, silindirik şekilli vasküler kemikten oluşur. Ayrıca kortikal kemikte, kemiğin uzun eksenine dik ya da oblik yönde uzanan ve Havers kanallarını besleyen damarları içeren, kanalları birbirlerine bağlayan Volkmann kanalları bulunmaktadır. Volkman kanalları komşu osteonları birleştirir. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı dizilimine bağlıdır (31, 32).

2.1.4 Kemikte Gelişim ve Büyüme

Kemikte gelişim ve büyüme embriyonik dönemde başlayıp, genç erişkin döneme kadar devam eder. Kemik oluşumu, osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu ile (intramembranöz) veya kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile (enkondral) gerçekleşir (24, 26).

2.1.4.1 İntramembranöz kemikleşme

İntramembranöz kemikleşme, matriksin bağ doku desteğiyle doğrudan doğruya kalsifikasyonu sonucu gerçekleşir. Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin kemik yapım sahasına tabakalar halinde birikmesi ve dokunun kan damarlarından zenginleşmesi ile mezenkim doku içinde bol miktarda kapiller içeren bir ağ oluşur. Mezenkim hücreleri; kan damarı, fibroblast ve osteoprojenitör hücreleri içeren organik matriksi sentezler. Osteoprojenitör 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 biriktirirler. Matriksle çevrelenen osteoblastlar ise osteositlere dönüşür. Sonuçta oluşan osteoid matriks mineralize olarak olgun kemik halini alır (32).

İntramembranöz kemikleşme, vücutta kraniyum kubbesi, mandibula, pariyetal kemikler, oksipital ve temporal kemiklerin skuamöz kısımları, klavikula, ilium ve skapula gibi yassı kemiklerin embriyolojik gelişiminde aktif rol alır. Uzun kemiklerin kalınlaşmasında ve kısa kemiklerin büyümesinde görev alır. Ayrıca doğumdan sonra, kemik defektlerinin rejenerasyonu ve kırık iyileşmesi sırasındaki periosteal iyileşme de bu mekanizma ile gerçekleşir (33).

2.1.4.2 Enkondral kemikleşme

Bu tip kemikleşmede, kemik oluşumu için mezenkim dokudan önce hiyalin yapıda kıkırdak bir çatının varlığı gereklidir. İki aşamada oluşur. Önce hiyalin bir kıkırdak çatı oluşur ve arkasından yeni kemik oluşumu gerçekleşir.

Enkondral kemikleşme farklılaşmamış hücrelerin bir araya gelerek kondrositlere dönüşmesi ve bu hücrelerin de kıkırdak matriksi sentezlemesiyle başlar. Bazı bölgelerde kıkırdak matriks mineralize olurken, kondrositler genişler, damarlardan kıkırdağa doğru invazyon olur ve kan yoluyla gelen hücreler kıkırdağın merkezini rezorbe ederek medüller boşluğu oluştururlar. Bölgedeki osteoprojenitör hücreler, osteoblastlara dönüşür ve mineralize kıkırdakta osteoid matriksi oluştururlar. 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 (33, 34).

Enkondral kemikleşme daha çok kısa ve uzun kemiklerin oluşmasından sorumludur. Ancak bu tür kemikleşme en belirgin olarak uzun kemiklerde görülür. Ayrıca doğumdan sonra sabit fiksasyon yapılamayan kırık iyileşmesinde rol alır (24, 26).

2.1.5 Kemik İyileşmesi

İyileşme; yaralanmayı takiben birbirine bağlantılı hücresele, hümorele ve vaskülele olayların sonucunda, hücreye yapı ve fonksiyonunu kazandıran doku cevabıdır. Kemik; bir çatı içerisinde entegre olmuş metabolik olarak hücrelerden oluşmuş, dinamik, biyolojik yönden aktif bir dokudur. Bu özelliği dikkate alındığında, kırık kemik hattında ve defekt sahasında iyileşme çok sayıda biyokimyasal, biyomekanik, hücresele, hormonal ve patolojik süreçler tarafından etkilenir (35, 36).

Kemik dokudaki iyileşme, yaralanmanın karakterine göre rejenerasyon veya tamir olgularını içerir. Kemik iyileşmesi, temelde bir bağ dokusu iyileşmesidir. Yumuşak doku yaralanmalarının iyileşme sürecinde meydana gelen olaylar; enflamasyon, fibroplazi ve remodeling fazları, kemik defektlerinin onarımı sürecinde de gerçekleşir. Yumuşak dokulardaki iyileşme sürecinden farklı olarak hasar gören ossifiye dokunun remodelasyon ve rekonstrüksiyonunda osteoblast ve osteoklastlar işe karışmaktadır (37, 38).

Kemik iyileşmesi 3 önemli safhadan oluşur. Bunlar enflamatuvar, proliferatif ve maturasyon safhalarıdır.

2.1.5.1 Enflamatuvar safha

Bu safhada dokudaki debrisler uzaklaştırılıp yara temizlenir, vaskülele destek sağlanır ve yeni iskeletsel matriks oluşturma amaçlanır. Doku yaralanmasında da karşılaşılan adozin difosfat, serotonin, protoglandin ve tromboksan A2 gibi platelet agregasyonunu sağlayan enflamatuvar elemanlar salınır. Böylece hemostatik tıkaç oluşur.

Akut iyileşmede hücresele enflamatuvar cevap gözlenir ve nötrofiller başroldele. Görevleri fagozitoz yapmak, debris ve hasarlı dokuyu yok etmek olan nötrofillerin bölgeye göçü, yaralanmanın 3-4. gününde en yüksek seviyededir. 5.

günde ise makrofajlar baskın hale gelir ve onarım süreci boyunca ortamda bulunmaya devam eder. Makrofajların görevi sadece yara alanındaki artıkların uzaklaştırılması değildir. Aynı zamanda yeni doku oluşumu safhasında, mezenkimal hücrelerin defekt alanına göçünü ve farklılaşmasını sağlayacak olan büyüme faktörleri ve sitokinler, makrofajlar tarafından ortama salınırlar (39, 40).

2.1.5.2 Proliferatif safha

Bu safhada çevre kemik dokulardan bölgeye doğru mikrovasküler büyüme gerçekleşir ve bu olaya “neovaskülarizasyon” denir. Hücresel farklılaşma, çoğalma ve aktivasyon sonucu sonradan remodele olacak immatür bir matriks üretilir. Fibroblastlar, osteoblastlar ve progenitör hücreler çoğalarak yara bölgesinde kollajen oluşturmaya başlarlar. Böylece kollajene ve zengin kapiller kaynağa sahip granülasyon dokusu oluşur. Ayrıca platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) de anjiyogenezi stimüle eder.

Lokal mezenkimal hücreler; fibroblast, osteoblast ve kondroblastlara farklılaşırlar. Böylece kollajen, glikozaminoglikan, glikolipid ve glikoprotein içeren bir ekstraselüler matriks oluştururlar. Baştaki zemin maddesi ve fibröz doku sonunda fibrokartilaj kallusa dönüşür. Böylece ilk oluşan kemiğe “örgü kemik” adı verilir ve bu kemik iyileşmenin 4-6. haftasına kadar baskın halde gözlenir (40).

2.1.5.3 Maturasyon safhası

Kemik iyileşmesinin en uzun süren bu safhasında, immatur bağ doku oluştuktan sonra osteogenez devam eder. Osteoblastik hücreler farklılaşarak matriks mineralizasyonuna yardım ederler. Oluşan örgü kemik osteoklastik aktivite ile yıkılmaya başlar ve primer osteonlar yerini kademeli bir şekilde lamellar kemiğe ve kemik iliğine bırakır. Böylece sekonder osteonlar oluşur. Primer kemik oluşumu birkaç hafta gibi kısa bir süredir, ancak bu kemiğin yerini lamellar kemiğe bırakması aylar alır (39-42).

2.2 Kemik İyileşmesi Komplikasyonları

Ağız boşluğu ve çene bölgesi vücudun giriş kapılarından biri olup dış ortamla direkt temas halinde olan ve sosyal hayatı etkileyen önemli bir yapıdır. Operasyonlar

sonrasında bu bölgede oluşan defektlerle; hastalarda fonksiyon, fonasyon, estetik ve sosyal açılardan problemler oluşabileceği için postoperatif iyileşme çok önemlidir (43).

Kemik defektlerinin iyileşmesi sırasında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri kemik iyileşmesinin istenilen biçimde gerçekleşmemesidir. İyileşme bozukluğuna, özellikle bikortikal kemik defektlerinde sıklıkla rastlanabilir. Kemik defektlerinin iyileşme sürecini engelleyen faktörlerden biri mevcut kemik boşluğunun yumuşak bağ dokusu hücreleri ile dolmasıdır. Bu komplikasyon hastanın daha uzun süre muayene edilmesine sebep olur. Hasarlı bölgenin revizyon amacı ile tekrar opere edilmesi gerekebilir.

Kemik iyileşmesi bağ dokusuna özgü bir olay olup, bu iyileşme osteoblastları içeren hücresel proliferasyonu gerektirir (44-46). İyileşmenin tamamlanması endosteum veya kemik iliğinden diferansiye olan osteoblastlarla sağlanır. Defekt, istenmeyen bir şekilde skatrisyel bağ dokusu ile de dolabilmektedir. Defektin dolması iyileşmenin bittiği anlamına gelmemektedir. Spontan olarak iyileşmeye bırakılan kemik defektlerinde, kavitenin fibröz konnektif doku ile dolması ve başlangıçta yeterli yeni kemik formasyonunun meydana gelememesi, ideal greft materyallerine duyulan gereksinimi artırmaktadır.

Büyük kemik defektleri söz konusu olduğunda kemik konturlarının normal morfolojisinin korunması ve iyileşmenin bağ dokusu migrasyonu olmadan sağlanması esastır. Patolojik oluşumların çıkartılmasıyla oluşan büyük kemik defektleri ve bunların büyüklükleriyle doğru orantılı olarak ortaya çıkan estetik veya fonksiyonel bozukluklar çeşitli biyomateryallerin ve otojen, allojen ve alloplastik kemik greftlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (47).

2.3 Kritik Boyutlu Defekt

Son yıllarda kemik kırıklarının veya defektlerinin iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu ve düşünülen kemik greftleri, kemik benzeri ürünler, hastadan elde edilen büyüme faktörü içeren kan ürünleri veya rekombinant büyüme faktörleri gibi pek çok materyal kullanılmaktadır. Her yeni maddenin etkinliğini diğeriyle karşılaştırabilmek için standart bir hayvan modeline ihtiyaç vardır. Literatürde bu amaçla, “kritik

boyutta kemik defekti” olarak adlandırılan, dairesel, tam kat ve hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden kapanma şansı olmayan en küçük boyutta kemik defektleri tanımlanmıştır (1, 2, 48, 49). Bu defektlerde iyileşme kemikleşmeden ziyade bağ dokusu dolumu ile gerçekleşmektedir (50-52).

Kemik defektlerinde iyileşme, defektin büyüklüğüne ve kullanılan deney hayvanının türüne göre farklılık göstermektedir. Farklı kaynaklarda değişik rakamlar verilse de, kraniyumda kritik boyutta kemik defekti rat için 8 mm, tavşan için 15 mm, köpek ve maymun için 20 mm olarak genel geçerlilik kazanmıştır (1, 2, 48). Mandibulada yapılan çalışmalarda ratlarda kritik boyutta kemik defektinin 5 mm olduğu bulunmuştur (53-55).

2.4 Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Greft Materyalleri

Kemik rejenerasyonu oral ve maksillofasiyal cerrahide en temel amaçlardan biridir. Küçük boyutlardaki kemik defektlerinde iyileşme kendiliğinden olurken, kritik boyutlu kemik defektlerinde iyileşme kendiliğinden olmaz ve bu yüzden iyileşmeyi tetiklemek için birçok alternatif kullanılır. En ideal yöntem defektin büyüklük, şekil ve antijenik olarak benzer özelliklere sahip başka bir kemik doku ile doldurulmasıdır (56, 57).

Greft terimi; transplantasyondaki diğer anlamlarından farklı olarak, kemik yapımını uyaran tüm materyaller için kullanılır (58). Sert doku, yumuşak doku veya kombine defektlerin onarımında kullanılan greft materyallerinin esas görevi, defektlerin en kısa sürede, anatomik forma en uygun şekilde kapatılmasını ve yeni oluşacak dokulara rehberlik etmesini sağlamaktır. İdeal bir greft materyali osteokondüktif, osteoindüktif, osteogenetik özelliklere sahip olmalı, herhangi bir enfeksiyon riski taşımamalı, kullanıma hazır olmalı, doku ile uyumlu olmalı, yabancı cisim ve fibrotik reaksiyona neden olmamalıdır. Ayrıca ucuz olmalı ve kolay elde edilebilmelidir (59).

Greft materyalleri osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon olmak üzere üç farklı mekanizma ile kemik iyileşmesine katkıda bulunurlar. Alıcı yerin durumu ve greftin tipine bağlı olarak bu mekanizmalar değişmektedir (60).

Osteogenez, bir greft materyalinin doğrudan osteoblastlar ile yeni kemik oluşturabilmesi durumudur. Osteogenezde greft materyalinin içinde yeni kemik oluşturma yeteneğine sahip olan osteoprojenitör hücreler mevcuttur. Osteogenezin gerçekleşmesi için defektin içine yerleştirilecek greft materyaline, canlı osteoblastlar veya öncül osteoblastlar nakledilmelidir. Ancak bu şekilde kemik oluşum merkezleri sağlanmış olur. Canlı kansellöz kemik, kemik iliği ve otogreftler içerdikleri hücreler ile nakledildikleri yerde doğrudan yeni kemik oluşumunu başlatırlar. Kemik oluşturmada etkili tek greft materyali otojen kemiktir ve bu yüzden tüm greft materyalleri arasında “altın standart” olarak değerlendirilir (24, 61).

Osteoindüksiyon, greftteki kemik indükleyici proteinlerin veya kemik morfojenik proteinlerin etkisiyle mezenkimal hücrelerin osteoprojenitör hücrelere değişimidir. Demineralize kemik grefti bu özellikte bir greft materyalidir (62-64).

Osteokondüksiyon, alıcı kemikteki vasküler ve perivasküler yapıların ve osteoprojenitör hücrelerin grefte doğru ilerlemesi için greft materyalinin *scaffold* (çatı) görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu desteklemesidir. Osteokondüktif materyaller biyouyumludur. Herhangi bir toksik reaksiyon olmadan kemik veya yumuşak dokuda apozisyon meydana gelir (65).

2.4.1 Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Greft Endikasyonları

1. Cerrahi operasyon sonrası oluşan defektler (kist, gömülü diş, tümör rezeksiyonları sonrası),
2. Travmatik defektler (çene kırığı, travmatik diş çekimi, sinüs açılması),
3. Preprotetik operasyonlar, kret ogmantasyonu ve sinüs tabanı yükseltilmesi operasyonu,
4. Estetik amaçlı,
5. Kemik içi implantların çevresinde oluşan defektler,
6. Ortognatik cerrahi işlemler esnasında gelişen defektler,
7. Trafik kazaları, radikal onkolojik işlemler gibi aşırı derecede doku kayıplarının meydana geldiği vakalar,
8. Enfeksiyonel osteomyelit vakaları,

9. Neoplazmlar, yumuşak doku tümörlerinin çıkartılması ve bu tümörlerin kemiğe invazyonu sonucu kemiğin rezeksiyonu,
10. Mikrognati, retrognati, dudak-damak yarıkları gibi konjenital maksillofasial defektler,
11. TME artroplastisi,
12. Periodontal defektler,
13. Endodontik defektler (1, 66).

2.4.2 Kemik Greft Materyallerinin Sınıflandırılması

Kemik greftleri, elde edildikleri dokulara ya da üretildikleri maddelere göre; otojen greftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik materyaller olarak 4 grupta incelenebilirler (67).

2.4.2.1 Otojen Greftler

Otojen greftler, kişinin kendisinden alınan greft materyalleridir. Alınan greft uzak bir sahaya transplante edilebilir (Heterotopik) veya aynı bölgede kullanılabilir (Ortotopik). Otojen greftler altın standart olarak kabul edilmektedir. Kişinin kendisinden alındıkları için osteoindüktif, osteokondüktif, osteogenetik özelliklere sahiptirler ve enfeksiyon taşıma riskini ortadan kaldırır (67). Otogreftler en sık olarak iliak kemikten, tibiadan, kostalardan ve kalvaryumdan; ağız içinden ise simfizden, ramustan, tüber bölgesinden, ekzostozlardan, iyileşme durumundaki diş çekim socketinden ve interseptal alveol kemiğinden elde edilir (68).

Otojen kemik greftlerinin avantajları ilikteki osteoprogenitör hücreler ve canlı osteoblastlar ile direkt osteogenez, kollajen matriks ile osteokondüksiyon, *Bone morphogenetic protein (BMP)*'ler ile osteoindüksiyon yapabilmeleridir (69). Ayrıca otojen kemik greftleri kısa sürede mükemmel damarlanma gösterir, kişinin kendisinden alındığı için çapraz enfeksiyon ve immün reaksiyon riski yoktur (56, 57).

Otojen greft her ne kadar altın standart olarak kabul edilse de alınabilecek greft miktarının sınırlı olması, hastada ikinci bir operasyon sahası oluşturulması ve buna bağlı olarak operasyon süresinin uzaması, morbidite ve enfeksiyon riskinin

bulunması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Bu durum zaman zaman çalışmacıları farklı greft materyalleri kullanmaya yönlentmektedir (67).

2.4.2.2 Allogreftler

Allogreftler, aynı türden fakat farklı genotipe sahip farklı bireylerden elde edilen greft materyalleridir. İnsanda kullanılan kemik allogreftleri farklı bir insandan elde edilen osseöz, transplante dokulardır. Allogreftler, kadavralardan elde edilir, işlenir, çeşitli şekillerde ve boyutlarda hazırlanır ve ileride kullanılmak üzere uygun şartlarda kemik bankalarında saklanır (70, 71).

Hazırlanma yöntemlerine göre, dondurulmuş kemik (*deep-freezing*), dondurulmuş kurutulmuş kemik (*freeze-drying*), demineralize kemik, deproteinize kemik, taze dondurulmuş ve solventlerle dehidrate edilmiş kemik olarak gruplandırılabilir (60, 72, 73).

Allogreftlerin avantajları; donör alan cerrahisi ve morbiditesinin olmayışı, geniş kemik defektindeki başarı oranının % 60-90 arasında olması, intraoperatif kan kaybının ve postoperatif ağrının olmamasıdır (74-76). Bununla birlikte bakteriyel enfeksiyon, viral hastalıkların taşınması (hepatitler, HIV), donörden donöre değişen kemik kalitesi, ucuz olmaması, yabancı cisim reaksiyon potansiyeli dezavantajlarından bazılarıdır. Postoperatif dönemde ise allogreftte kırılma, kaynaşma olmaması ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar bildirilmiştir (75, 77).

2.4.2.3 Ksenogreftler

Bu tür kemik greftlerinde alıcı ile vericinin türleri birbirlerinden farklıdır. Genellikle memeli hayvanların kemiklerinden ya da mercanların dış iskeletlerinden elde edilirler. Memeli hayvanlardan at, sığır ve domuz sıklıkla greft kaynağı olarak kullanılır. Sığır kaynaklı kemik en çok tercih edilen ksenogrefttir (78, 79).

Ksenogreftler 1960'larda popüler hale gelmiş, ancak sığır kaynaklı kemik transplantasyonu sonrası rapor edilen bazı otoimmün hastalıklar greftin kullanımını azaltmıştır (78). 1990'larda kemik partiküllerinin deproteinize edilmesinin gerçekleştirilmesiyle birlikte antijenik özellikleri azaltılmış ve tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Sonuç olarak kemiğin organik komponentinin tamamen

uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Bunun sonucu olarak da organik kısmın osteoindüktif kabiliyeti kaybedilmiş olur ve greft osteokondüktif özellik gösterir. Sığır kemiği organik komponentlerinden ayrıldıktan sonra kalsiyum matris sterilize edilerek greft kullanıma hazır hale getirilir. Bu greft, alıcıda herhangi bir immün reaksiyona sebep olmayacak şekilde hazırlanır (78, 80).

Ksenogreftlerin kullanıldığı deneysel hayvan çalışmaları materyalin ideal bir yapı iskeletine sahip olduğunu göstermektedir. Ksenogreftlerin iyileşme mekanizmaları incelendiğinde alıcı sahadaki kemikteki osteojenik hücrelerin rehberliğinde kemik büyümesi başladığı görülmektedir. Bu durumda greft partikülleri arasında örgü kemikten oluşan köprüler meydana gelir. Yeni oluşan kemik köprüsü ve ksenogreftten oluşan bu yapı total mineralize doku olarak adlandırılır. Örgü kemik kombinasyonu ile oluşmuş bu olgunlaşmamış doku yeniden şekillenme ve yer değiştirme periyotları ile lameller kemiğe dönüşür (81, 82).

Ksenogreftlerle ilgili tartışılan önemli bir konu rezorpsiyon süresidir. Osteokondüktif özelliğe sahip olan materyalin zamanla rezorbe olarak yerini yeni oluşan kemiğe bırakması beklenir. Ksenogreftlerin hızlı bir şekilde konakçı kemiği ile yer değiştirdiğini belirten raporlar mevcuttur (83). Buna karşın ksenogreftlerin çok yavaş rezorbe olduğu veya hiç rezorbe olmadan uzun süre varlığını koruyabileceği görüşünü savunan çalışmalar daha baskındır (84, 85).

Ksenogreftler, farklı boyut ve şekillerde piyasaya sunulmuştur. Blok formları, plastik ve rekonstrüktif cerrahi ile maksillofasiyal cerrahide onlay greft olarak kullanılırken, granül formları periodontal kemik defektlerinde, çekim kavitealarında ve küçük kist operasyonlarında başarılı bir şekilde hem fonksiyonel hem de estetik kayıplarda kullanılmaktadır. Daha güçlü materyallerle kombine olarak da kullanılabilirler (68, 72, 86).

2.4.2.4 Alloplastik Materyaller

Alloplastik kemik greftleri, canlı dokulardan elde edilmeyen, sentetik olarak üretilen maddelerdir. Biyouyumlu olan bu materyaller belli oranda osteokondüktif özelliğe sahiptirler (67, 79). Alloplastik materyaller 4 ana gruba ayrılabilirler (64):

- * Seramikler (sentetik hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TCP), biyoaktif cam),
- * Kalsiyum karbonat,
- * Kompozit polimerler (rezorbe olan ve olmayan),
- * Kalsiyum sülfat

Alloplastik materyaller otojen greftlerin neden olduğu riskleri taşımamaları nedeniyle bir alternatif olarak karşımıza çıkarlar. Kolay elde edilirler, ancak bu materyallerin kullanımı immün reaksiyon, antijenite oluşturabilir ve hastada ek bir maliyete sebep olabilir (87).

2.5 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Kemik indüksiyonunu sağlayan proteinler ilk olarak 1979 yılında Urist tarafından izole edilmiştir. Kemik morfogenetik aktivitesinin demineralize kemikten daha fazla olduğu görülen bu proteinler *Bone Morphogenetic Protein* veya *Osteogenic Protein (OP)* olarak isimlendirilmiştir (69, 88, 89). Embriyojenik ve doğum sonrası dönemde kemik ve birçok dokuda var oldukları belirlenmiştir (90). Hayat boyunca büyüme faktörlerinin hedefi diferansiye olmuş hücreler olmasına karşın, BMP'lerin hedef organı undiferansiye perivasküler bağ dokusu hücreleridir (89).

Kemik morfogenetik proteinler, *transforming growth faktor-β* (TGF-β) ailesi üyeleri içinde bulunan büyüme ve farklılaşma faktörleridir. Hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, hücre adezyonu ve motilitesini düzenlediği çeşitli türlerde tanımlanmıştır (91). Bu proteinlerin hedef hücreleri mezenşimal kök hücrelerdir ve mezenkimal kök hücreler BMP reseptörlerinin tümünü bulundururlar (90, 92).

Kemik morfogenetik proteinler aminoasit diziliş benzerliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır. Günümüzde 15 adet kemik morfogenetik proteini tanımlanmıştır (Tablo 2.1). BMP-2 ve 4 birinci alt grubu, BMP 5 ve 8 ikinci alt grubu, BMP-3 ve GDF-10 üçüncü alt grubu oluşturmaktadır. BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7 de, BMP-2'ye benzer şekilde kemik indüksiyonu yapmaktadır. Bu proteinler arasında osteoindüktif özelliği en fazla olan BMP-2'dir (90).

Tablo 2.1: İnsan Kemik Morfogenetik Proteinleri ve Temel Fizyolojik Özellikleri

BMP	Adlandırma	Temel Rolü
BMP-2	BMP-2a	Kemik ve kıkırdak morfogenezi ve kalp oluşumu
BMP-3	Osteogenin	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar
BMP-3b	GDF-10	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar
BMP-4	Bmp-2b	Kemik ve kıkırdak morfogenezi ve böbrek oluşumu
BMP-5	-	Kemik morfogenezi ve ekstremite oluşumu
BMP-6	Vrg1, Dvr6	Kemik ve kıkırdak morfogenezinde hipertrofi
BMP-7	OP-1	Kıkırdak ve kemik morfogenezi ve böbrek formasyonu
BMP-8	OP-2	Kemik morfogenezi/spermatogenez
BMP-8b	OP-3	Spermatogenez
BMP-9	GDF-2	Kemik morfogenezi ve kolinerjik nöronların oluşumu
BMP-10	-	Kalp morfogenezi
BMP-11	GDF-11	Aksiyal iskelet, göz, böbrek ve pankreas gelişimi
BMP-12	CDMP-3, GDF-7	Tendon, ligament ve duyu nöronlarının gelişimi
BMP-13	CDMP-2, GDF-6	Kıkırdak gelişimi ve hipertrofi
BMP-14	CDMP-1, GDF-5	Kondrogenez ve anjiyogenez
BMP-15	GDF-9b	Yumurta fizyolojisi
BMP-16	-	Embriyonik gelişim
BMP-17	-	Embriyonik gelişim
BMP-18	-	Embriyonik gelişim

Yapılan çalışmalar; BMP'lerin birçok doku ve organın oluşumunda erken morfogenez sırasında olan epiteliyal mezenkimal etkileşimlerde morfogenerler olarak rol oynadıklarını göstermiştir. BMP-2'nin gelişmekte olan diş germlerinde, çene kemiğinde, çizgili ve düz kaslarda, spinal kord, nasal, trakeal ve özefagal epitelde lokalize olduğu belirtilmiştir (89). Embriyogenik hücrelerin BMP'lere cevap vererek kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşması da, BMP'lerin embriyogenik iskelet sisteminin oluşmasında rol oynadıklarını göstermektedir (90).

BMP'lerin hem in vivo hem de in vitro olarak osteoblast farklılaşmasında etkili oldukları gösterilmiştir. Kemik iyileşmesinde BMP'ler pluripotent kök hücrelerinin osteoblastik dönüşümünde rol alırlar (93, 94). Bu sayede farklılaşmamış

mezenşimal hücreler osteojenik hücelere dönüşerek yeni oluşan kemiğin ekstraselüler matriksinin sentezlenmesinde ve kalsifikasyonunda görev alırlar. Ayrıca BMP'ler, olgun osteoblast ve kemik iliği osteoprojenitör hücreleri üzerinde kemotaktik özelliğe sahiptir (90).

Kemik yaralanmasının mezenkimal hücreleri etkilediği ve bu hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmelerini sağlayacak mekanizmayı tetiklediği düşünülmektedir. Literatürde kemik yaralanması sonrasında yapısı bozulan kemikten veya rezorbe olan matriksten ortama salınan BMP'lerin mezenkimal hücre göçünde rol oynadıkları savunulmaktadır. Mezenkimal hücreler yaralanma bölgesinde proliferasyon ve diferansiyasyonlarını tamamlayarak osteoblastik hücelere dönüşürler (95). Yeni gelişen osteoblastik hücelerden üretilen BMP'ler bu döngüyü kuvvetlendirerek kemik iyileşmesini hızlandırır (96).

2.6 Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α)

TNF; doğal bağışıklık, hücre regülasyonu, hücre farklılaşması ve apoptoz süreçlerinde önemli rollere sahip olup aynı zamanda kanserli hücrelerin yıkımını da sağlayan polipeptid yapıda bir sitokindir. TNF'nin α ve β olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. TNF- α , çoğunlukla aktif makrofajlar ve monositler tarafından salınmaktadır. Ancak aktif T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler (*nature killer*=NK), mast hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, *kupffer* hücreleri, düz kas hücreleri, bazofiller ve tümör hücreleri gibi çeşitli hücelerden de sentezlenebilir. TNF- β ise başlıca T lenfositlerden salınır. Konak hücre üzerindeki etkileri TNF- α gibidir fakat ondan daha zayıf etki gösterdiği bilinmektedir. İki biyomolekül arasındaki amino asit benzerliği çok düşük olmasına rağmen, etki mekanizmaları aynıdır (97, 98).

TNF- α enflamatuvar yanıtın oluşmasına yol açan, 26 kDa membran bağlı protein olarak sentezlenen bir sitokindir (99). Makrofajlar ve monositler tarafından üretilen ve kaşektin olarak da bilinen TNF- α , çeşitli hücre popülasyonları üzerinde bir grup enflamatuvar ve immün düzenleyici etki gösterir (100).

TNF- α , enflamatuvar ajanlar ve doku yaralanmaları gibi uyarılara cevap vererek, nötrofilleri aktive ederek, vasküler endotelial hücrelerin özelliklerini

değiştirerek ve lokal kan pıhtılaşması oluşturarak tümorisidal aktiviteyi artırdığı gibi, diğer hücrelerin metabolik aktivitelerini de düzenleyerek tüm vücutta dolaşır. İmmün sistemdeki çeşitli işlevlerinden dolayı TNF- α 'nın kaşeksi, otoimmün hastalıklar, organ transplantının reddi, ateroskleroz gibi pek çok hastalığın patogenezinde rol alabileceği öne sürülmüştür (101, 102). TNF- α , eklemlerin ve diğer dokuların enflamatuvar hastalıklarının patogenezinde de önemli rol oynar (103).

TNF- α 'nın kemik rezorpsiyonu, kemik formasyonunun inhibisyonunda önemli rolleri olduğu belirtilmektedir. Genel olarak biyolojik etkileri şunlardır: fibroblastları uyararak kollejenaz salınması için uyarır, vasküler permeabiliteyi artırır, IL-1 α ve β , IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin ve MMP lerin salınımını indükler, adezyon moleküllerinin üretimini artırır, osteoprotegrin (OPG) ve NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*)'nin reseptör aktivatör faktörü gibi osteoklast farklılaşmasında görevli faktörlerin üretimini etkiler, ayrıca IL-1'le sinerjik etki göstererek kemik rezorpsiyonunu artırır (100,104). TNF- α osteoblast fonksiyonlarını ve farklılaşmasını inhibe ettiği bilinmektedir. Osteoblastik fenotipin baskılanması tip I kollajen gibi ekstrasellüler matriks komponentlerinin üretiminde azalma olması ve hücre proliferasyonunun inhibisyonu ile gerçekleşir. TNF- α alkalen fosfataz ve osteokalsin salınımını da inhibe etmektedir (105).

2.7 Resveratrol

Hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için çok çeşitli doğal ürünlerin klinik potansiyelleri dikkat çekmektedir. Bu doğal ürünler içinde bir polimer grubu olan viniferinler, güçlü antifungal özelliktedir ve bitki antibiyotikleri olarak bilinen fitoaleksinleri de kapsar. Resveratrol doğal fitoaleksinlerden olup, ilk olarak 1940 yılında beyaz çöpleme (*White hellebore-Veratrum grandiflorum O. Loes*) otunun köklerindeki bir yapı olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Japonya' da *Kojo-kon* (idatori çayı) olarak adlandırılan *Polygonum cuspidatum* bitkisinin (Şekil 2.1) köklerinde bulunmuştur (106). Resveratrol miktarının en yüksek olduğu bildirilen bu bitkinin Japon ve Çin halk tıpında laksatif etkisi olduğu, damar sertliği ve kalp ritim bozukluklarında kullanıldığı belirtilmektedir (107, 108).



Şekil 2.1: Polygonum Cusbidatum bitkisinin genel görünümü

Trans-resveratrol 1976 yılında Langcake ve Pryce tarafından *Vitis vinifera* bitkisinden izole edilmiştir ve bu araştırmacılar bileşiğin genellikle *Botrytis cinerea* adlı mantarın saldırısına karşı veya ultraviyole ışığa maruz kalan bitkinin yaprak dokularında üretildiğini bulmuşlardır. Bitkilerde çeşitli dış etkenlere karşı savunma maddeleri olarak sentezlenen bu ikincil metabolit maddelere fitoaleksinler (Bitki koruyucular) adı verilmiştir.

2.7.1 Resveratrol Kaynakları

Çeşitli bitkiler tarafından üretilebilen resveratrol, stres koşullarına cevap olarak üretilir. Fitoaleksinler denilen savunma molekülleri sınıfından olup, enfeksiyon ve ultraviyole (UV) irradasyon hasarına karşı koruyucu özelliktedir (109).

Resveratrol ve analogları (*piceatannol ve pterostilben*); üzüm (*Vitis spp.*), yer fıstığı (*Arachis spp.*), yumuşak meyveler (böğürtlen, yaban mersini, *lingonberries*, tüm *Vaccinium spp.*) ve ravent (*Rheum spp*) gibi çeşitli yenilebilir doğal ürünlerde bulunabilmektedir. İlk *Polygonum cusbidatum*' dan (İdatori çayı) elde edilen resveratrol, bitki aleminde geniş dağılım gösteren birçok bitkide bulunabilir (109).

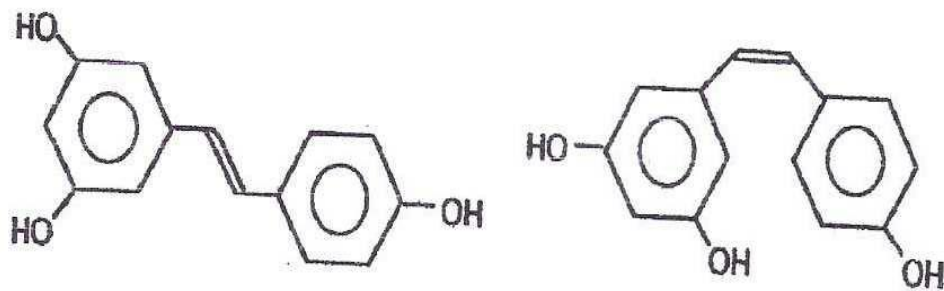
Üzümde resveratrol 1976 yılında yaprak epidermislerinde ve üzüm zarında tanımlanmıştır. Üzüm zarı 50-100 µg/g resveratrol içerir (106). Üzümlerde resveratrol sentezinin özellikle kabuk kısmında yer aldığı, meyve etinde ya çok

düşük konsantrasyonda bulunduğu ya da hiç olmadığı ifade edilmektedir. Bu durum, üzümlerin küflenmeye karşı dirençlerinin özellikle kabuk kısmında oluştuğunu göstermektedir (110).

Şarapta da bulunan resveratrol, beyaz şaraba oranla kırmızı şarapta daha yüksek miktarda bulunur. Resveratrol kabuk tarafından üretilir ve kırmızı üzüm kabuğu ile birlikte fermentasyona uğratıldığı için kırmızı şarapta yaklaşık 5 mg/lt bulunmasına rağmen beyaz şarapta çok daha az miktarda bulunur. Beyaz şarap yapımında kabuk fermente olmaz (111).

2.7.2 Resveratrolün Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Antioksidan özellikleri olan polifenolik bileşikler; flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler ve stilbenlerden oluşan geniş bir sınıftır. Fenilalanin türevi olan tüm bu bileşiklerin alt grubu olan stilbenler içinde 3,4,5 trihidroksistilben adı ile de bilinen resveratrol bulunur. Resveratrolün cis ve trans izomerik formları bulunur. (Şekil2.2) (112). Trans-resveratrol ışıktan korunduğu sürece sabit kalır ve üzüm ekstrelerinde de bu formu bulunur. Bu yüzden çalışmalarda daha çok bu izomer kullanılmaktadır (111, 113).



Şekil 2.2: Trans- ve cis- resveratrolün kimyasal yapısı

Molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ olan resveratrolün molekül kütlesi 228,25 g/mol dır. Etanolde kolayca çözünür, dimetilsülfoksitte az ve suda daha az çözünür. Kaynama noktası 253-255 °C olup, hafif grimsi beyaz renkte katı-toz halindedir

(114). Resveratrolün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (115).

2.7.3 Resveratrolün biyolojik etkileri

Resveratrolün etkileri günümüze kadar birçok biyolojik dokuda araştırılmıştır. Bu etkiler arasında; lipid peroksidasyonun inhibisyonu, bakır şelasyonu, serbest radikal süpürücü etki, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, antienflamatuvar aktivite, vazorelaksan aktivite, lipid metabolizmasının düzenlenmesi, antikanser aktivite, östrojenik aktivite gibi etkiler bulunmaktadır (115).

Resveratrolün güçlü antioksidan özelliği E vitamininden 50 kat, C vitamininden ise 30 kat daha fazladır (116).

Resveratrol, hücre membranlarını koruyarak yaşayan hücrelerde oksidatif stresin zararlı etkilerini azaltmaktadır (115).

Resveratrolün antienflamatuvar etkisi, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimini inhibe etmesi, bazı enflamatuvar sitokinleri baskılaması, endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltması ve NFκB (nükleer faktör kappa B) inhibisyonu yapmasına bağlanmıştır (17, 117, 118). Resveratrol TNF-α, interlökin-1β ve interlökin-6 gibi enflamasyonda etkili olan sitokinleri baskılamaktadır (119).

Yeni kapiller damar gelişmesi, yara iyileşmesinde ve organ hipertrofisi gibi fizyolojik olaylar döneminde görülmektedir. Resveratrolün, hidrojen peroksit gibi radikalleri engelleyerek büyüme faktörünü artırdığı ve kapiller damar gelişimini hızlandırarak yara iyileşmesine olumlu etkide bulunduğu bildirilmiştir (120).

Resveratrolün osteoklast formasyonunu önleyip, osteoblast farklılaşmasını ve indüksiyonunu teşvik ettiği bildirilmiştir (22, 23).

Yapılan bir çalışmada kültür ortamında insan kemik iliğinden elde edilmiş mezenşimal kök hücrelerinin resveratrolün etkisiyle östrojen reseptörü üzerinden osteoblastik farklılaşmaya uğradığı gösterilmiştir (121).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma; deneysel, biyokimyasal ve histopatolojik olarak üç bölüm altında gerçekleştirilmiştir. Deneysel kısmı, Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, biyokimyasal değerlendirilmesi Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, histopatolojik değerlendirmesi ise Cumhuriyet Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce 12.12.2014 tarihli ve 74 sayılı Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurul onayı alınmış ve çalışma sırasında Cumhuriyet Üniversitesi Etik Kurulu yönergesinin 13. Maddesinde belirtilen "Etik kurallara uygunluk esası" kararına uyulmuştur.

Bu çalışma için kullanılacak olan ratlar, Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Çalışma, veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen ağırlıkları yaklaşık 250-300 gram olan, ortalama 12 haftalık yetişkin 56 adet erkek Wistar albino rat üzerinde yapılmıştır. Denekler 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu sağlanacak şekilde tutularak, serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Oda ısısı 22 ± 2 °C'de sabit tutulmuştur. Buldukları odanın nispi nem oranı %30-45 arasında tutularak, odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenmiştir. Ratlar kafeslerde tek olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırılmıştır.

3.1. Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Toplamda 56 adet ratın kullanıldığı deney hayvanları ilk önce 4 ana gruba (K, R, G, GR) ayrılmıştır (Tablo 3.1). Bu gruplar da kendi aralarında 14 ve 28 gün yaşatılan gruplar olmak üzere 2 alt gruba ayrılmıştır (n=7).

K: Kontrol grubu

R: Sistemik resveratrol grubu

G: Greft uygulanan grup

GR: Greftle birlikte sistemik resveratrol uygulanan grup

Tablo 3.1: Çalışma gruplarının şematik gösterimi

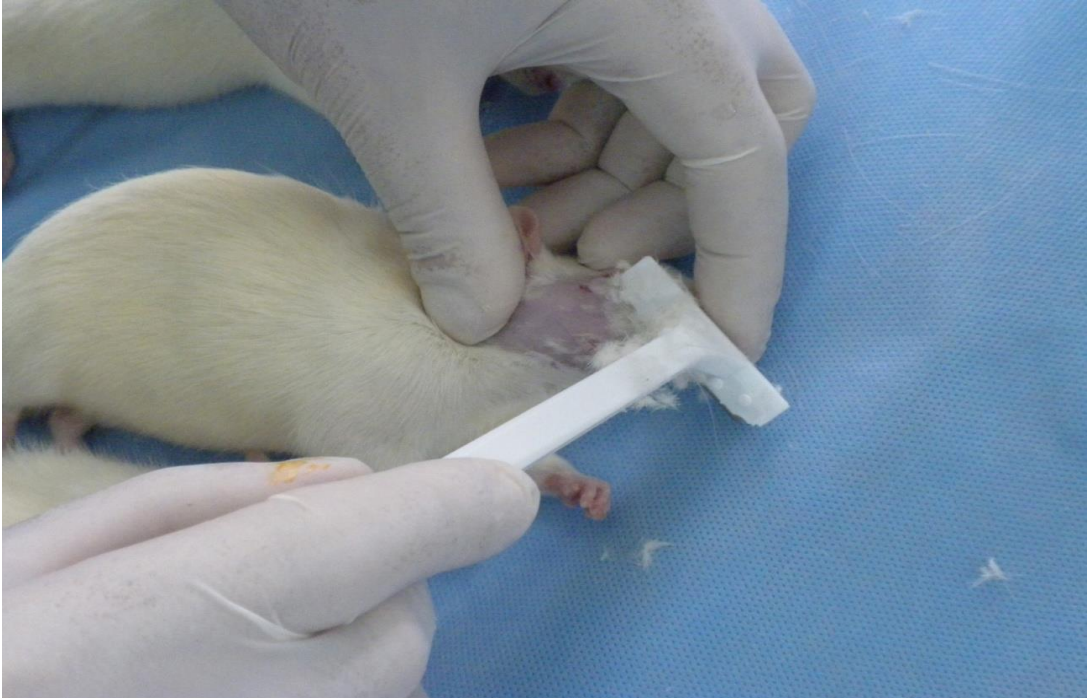
Gruplar	14. gün sakrifiye edilecek grup	28. gün sakrifiye edilecek grup	Grup başına hayvan adedi
Kontrol (K)	7	7	14
Greft (G)	7	7	14
Resveratrol (R)	7	7	14
Greft + Resveratrol (GR)	7	7	14
Toplam	28	28	56

3.2 Cerrahi Teknik

Deneklerin yiyecek ve içecek alımı operasyondan 24 saat önce kesilmiştir. Deney hayvanlarının anestezisi intramuskuler enjeksiyon yöntemi ile 3mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul, Turkey) ve 90 mg/kg Ketamin HCL (Ketalar, Eczacıbaşı-Warner Lambert, İstanbul, Turkey) kullanılarak sağlanmıştır. Yeterli bir anestezi derinliği için göz kapağı refleksinin kaybolması beklenmiştir.

Deney hayvanlarının sağ mandibula angulus bölgesindeki deri traş edilip (Şekil 3.1), operasyon sahası povidon iyot (Batticon standart solüsyon, Adeka, Türkiye) ile silinip steril örtüler operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtülmüştür (Şekil 3.2). Kullanılacak olan el aletleri dahil olmak üzere bütün malzemeler

otoklavda sterilize edilmiştir. Operasyonda asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edilerek steril çalışılmıştır. Daha sonra, mandibula angulus bölgesinde bazis mandibulanın 1cm altından olacak şekilde ve 1 cm uzunluğunda deri, subkutan doku ve periostu içine alacak şekilde insizyon yapılmıştır (Şekil 3.3). Kemik yüzeyi açığa çıkacak şekilde flep kaldırılmıştır. Standart kritik boyutta 5 mm çapında bikortikal kemik fragmanı trefin frez kullanılarak serum fizyolojik irrigasyonu altında çıkarılmıştır (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Kontrol (K) grubunda ve resveratrol (R) uygulanacak grupta mandibula angulus bölgesinde 5mm çapında kritik boyutlu defekt oluşturulduktan sonra defekt bölgesine herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Greft (G) ve greftle birlikte resveratrol (GR) uygulanacak gruplarda ise kritik boyutlu kemik defekti, sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland) ile doldurulmuştur (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Daha sonra deri flebi sırasıyla önce kas ve cilt altı fasyalar ve cilt 5-0 poliglaktin 910 (Vikril Jonson&Johnson/ethicon) suture kullanılarak orijinal pozisyonuna suture edilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10).



Şekil 3.1: Operasyon sahasının traş edilmesi



Şekil 3.2: Operasyon sahasının betadin ile boyanması



Şekil 3.3: Cilt insizyonu



Şekil 3.4: Çalışmada kullanılan 5 mm çapında trefin frez



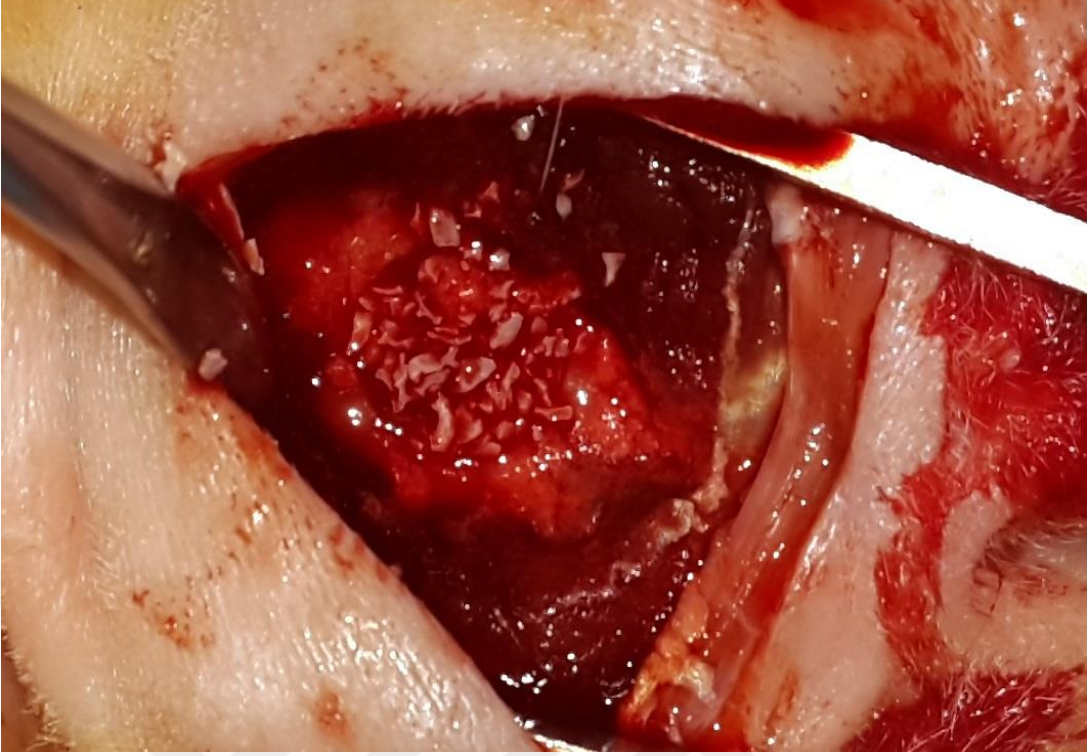
Şekil 3.5: Denekte 5 mm çapında kemik osteotomisi



Şekil 3.6: Osteotomi sonrası oluşan kritik boyuttaki kemik defekti



Şekil 3.7: Sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland)



Şekil 3.8: Kritik boyutta kemik defektine uygulanan greft materyali



Şekil 3.9: Operasyon sonrası kasların suture edilmesi



Şekil 3.10: Operasyon sonrası cildin suture edilmesi

3.3 Resveratrol Solüsyonunun Hazırlanışı ve Uygulanma Şekli

Her rat için 10mg/kg/gün olacak şekilde resveratrol (Sigma, katalog no: R5010, USA) tartılmıştır. Resveratrol (Şekil 3.11) etanolde çözüldükten sonra serum fizyolojik ile (1:3) dilüe edilmiş ve solüsyon günlük olarak hazırlanmıştır.

Operasyon gününden itibaren, günlük 10 mg/kg resveratrol solüsyonu R ve GR grubu ratlara, oral gavaj yöntemi ile sistemik olarak günde 1 kez ve her gün aynı saatte uygulanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.11: Resveratrolün ticari formu



Şekil 3.12: Oral gavaj yöntemiyle resveratrolün uygulanması

3.4 Deneý Hayvanlarının Bakımı ve Deneýin Sonlandırılması

Postoperatif dönemde deneý hayvanlarına analjezik olarak Carprofen 4 mg/kg (Rimadyl, Pfizer) ve antibakteriyel olarak Ceftriakson 25 mg/kg (Rocephin, Roche) 5 gün süre ile intramusküler yöntemle uygulanmıştır. R ve GR gruplarına oral gavaj ile günlük 10 mg/kg resveratrol verilmiştir. Deneý hayvanları 14. ve 28. günlerde, kanları alındıktan sonra 200 mg/kg sodyum pentobarbital (Petothal, Abbot, ABD) kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Deneý yapılan taraftaki rat mandibulaları, diseksiyon yapılarak çevresindeki yumuşak doku ile beraber çıkarılmış ve histopatolojik inceleme için %10'luk formol içerisine konulmuştur. Alınan kanlar ELISA yöntemiyle inceleme için kan tüplerine konulup santrifüj cihazı ile (NF 1200R) santrifüj edilmiştir (şekil 3.13).



şekil 3.13: Santrifüj cihazı

3.5 Değerlendirme Yöntemleri

3.5.1 Histopatolojik Yöntem

Çalışma sonunda ötenazi edilen ratların mandibulaları çıkarılarak alınmıştır. Sağ mandibula angulus bölgeleri % 10'luk formaldehit içinde fikse edilmiştir. Fikse işleminden sonra, yumuşak dokular uzaklaştırılarak kemik doku %1'lik nitrik asit ile dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyondan sonra dokular rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlanmıştır. Hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 mikron kalınlığındaki kesitler histopatolojik inceleme için hematoksilin eozin ile boyanmıştır. Kesitler ışık mikroskobunda (Leica DM 2500); ossifikasyon, anjiyogenez, nekroz, enflamatuvar hücre ve fibrozis bakımından incelenerek kemik iyileşmesi değerlendirilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: Işık mikroskobu

3.5.2 Biyokimyasal Yöntem (ELISA Yöntemi)

Biyokimyasal yöntem, kitte yazılı olan protokollere uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Seri dilüsyonlarla konsantrasyonları; BMP-2 için, 62.5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml; TNF- α için, 15.6 pg/ml, 31.2 pg/ml, 62.5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml olacak şekilde standartlar hazırlanmış ve tüm kuyucuklara yerleştirilmiştir. Kontrol kuyucuğuna 100 μ l *sample diluent buffer*, 100 μ l örnek, 100 μ l standart kuyucuklara ilave edilerek, 37 °C de 90 dakika inkübe edilmiştir. Kapak açılıp *plate* içeriği uzaklaştırıldıktan sonra, her bir kuyucuğa 100 μ l *biotinlated anti-rat TNF- α antibody* konulmuştur. 37 °C de 60 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra *plate* 0,01 M PBS ile 1'er dakika olmak üzere 3 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 0,1 ml hazırlanmış ABC solüsyonu eklenmiş ve *plate* 37 °C de 30 dakika inkübe edilmiştir. 5 kez yıkama işleminden geçirdikten sonra, 90 μ L hazırlanmış TMB renkli *reagent* solüsyonu konularak 37 °C de 25-30 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak kuyucuklara 100 μ l TMB *stop* çözeltisi konulmuş ve sarı renk elde edilerek reaksiyon durdurulmuştur. *Stop* solüsyonu eklendikten sonra 30 dakika içerisinde, 450 nm'de ELISA okuyucuda (Thermo Multiskan GO) değerlendirilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: ELISA reader cihazı

3.6 İstatistiksel Yöntem

Çalışmamızdan elde edilen veriler SPSS (Ver: 22.0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde parametrik test varsayımları yerine getirilemediğinde Kruskal-Wallis testi, Man Whitney U testi; parametrik varsayımlar yerine getirildiğinde Varyans Analizi ve Tukey testi kullanılmıştır. Yanılma düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Klinik Bulgular

Deneysel çalışma süresince ratların uygulanan cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, operasyona bağlı herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlenmiştir.

4.2 Histopatolojik Bulgular

Histopatolojik olarak gruplara ait kesitlerin mikroskopik değerlendirilmesinde (Tablo 4.1), ossifikasyon, anjiyogenez, nekroz, enflamatuvar hücre, fibrozis durumları incelenerek skorlanmıştır (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6).

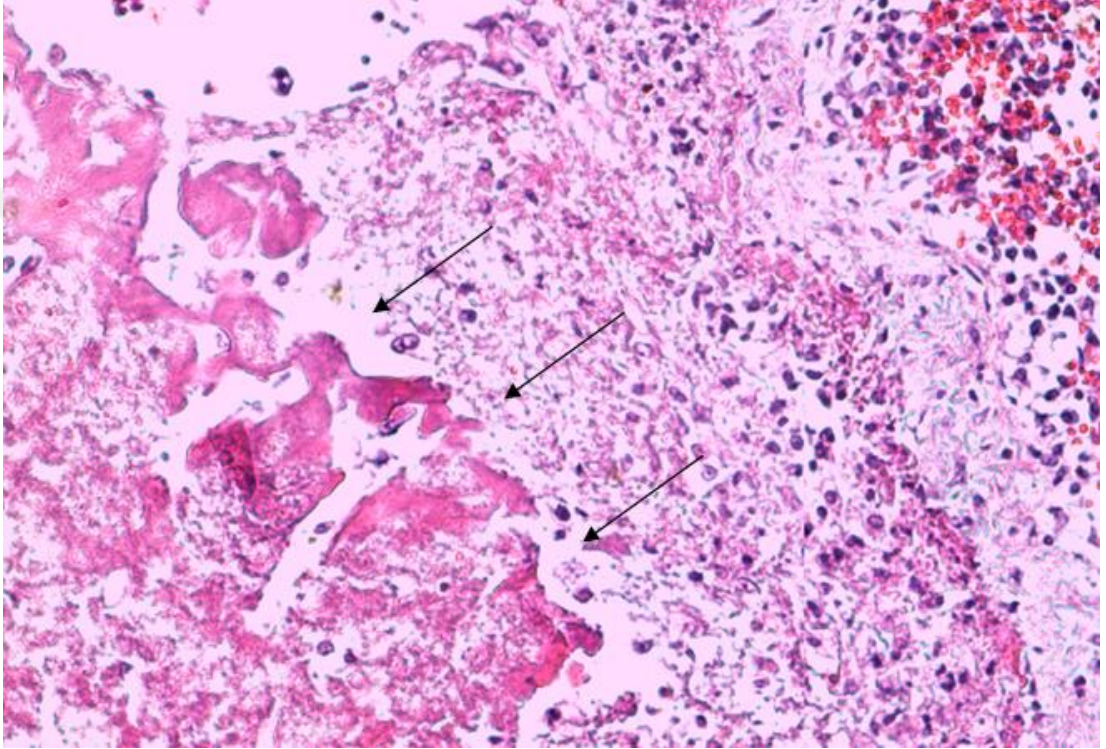
Tablo 4.1: Histopatolojik skorlamada kullanılan kriterler

Skor	Ossifikasyon	Anjiyogenez	Nekroz	Enflamatuvar Hücre	Fibrozis
0	Kemikleşme yok	Yok	Yok	Yok	Yok
1	Yetersiz kemikleşme	Bir mikroskop sahasında 1-3 adet kapillar	Bir mikroskop sahasında 1-2 adet fokal nekroz alanı	Bir mikroskop sahasında 0- 5 hücreden oluşan fokal hücre infiltrasyonu	Fibrosit sayısı fibroblast sayısına oranla daha az
2	Orta derecede kemikleşme	Bir mikroskop sahasında 3-6 adet kapillar	Bir mikroskop sahasında üçten fazla adet fokal nekroz alanı	Bir mikroskop sahasında 10 dan fazla hücreden oluşan birden fazla fokal hücre infiltrasyonu	Fibrosit sayısı fibroblast sayısına oranla daha fazla
3	Normal histolojik yapıya benzer kemik yapımı	Bir mikroskop sahasında 6 adetten fazla kapillar	Mikroskop sahasında yaygın nekroz alanları	Mikroskop sahasında yaygın yangısal hücre infiltrasyonu	Yoğun fibrosit ve kollajen doku oluşumu

4.2.1 Ossifikasyonun Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün ossifikasyon değerleri karşılaştırıldığında (Tablo 4.2), gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Gruplara ilişkin değerler ikişerli karşılaştırıldığında; K ile G, G ile GR, G ile R arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p < 0.05$), diğer gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$).

Gruplara ilişkin 28. gün ossifikasyon değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında; K ile GR, G ile GR, G ile R arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p < 0.05$), diğer gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$).



şekil 4.1: GR grubu 28. güne ait histopatolojik görüntü. Yeni kemik yapımı (siyah oklar), Hematoksilen-eozin x 200

Tablo 4.2: Tüm gruplara ait ossifikasyon derecelerinin karşılaştırılması

Gruplar	14. gün		28. gün	
	$\bar{X}\pm Ss$	Medyan	$\bar{X}\pm Ss$	Medyan
K	1,00±0,00	1	1,14±0,37	1
G	0,28±0,48	0	0,57±0,53	0
R	1,28±0,48	1	1,71±0,48	2
GR	1,57±0,53	2	2,00±0,00	2
Sonuç	KW= 15,58 p= 0,001*		KW= 18,36 p= 0,001*	

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standat sapma, KW: Kruskal Wallis Testi *: (p<0,05)

Her bir grupta 14. gün ve 28. gün skoları karşılaştırıldığında (Tablo 4.3), gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur. (p>0,05).

Tablo 4.3: Günlere ait ossifikasyon derecelerinin karşılaştırılması

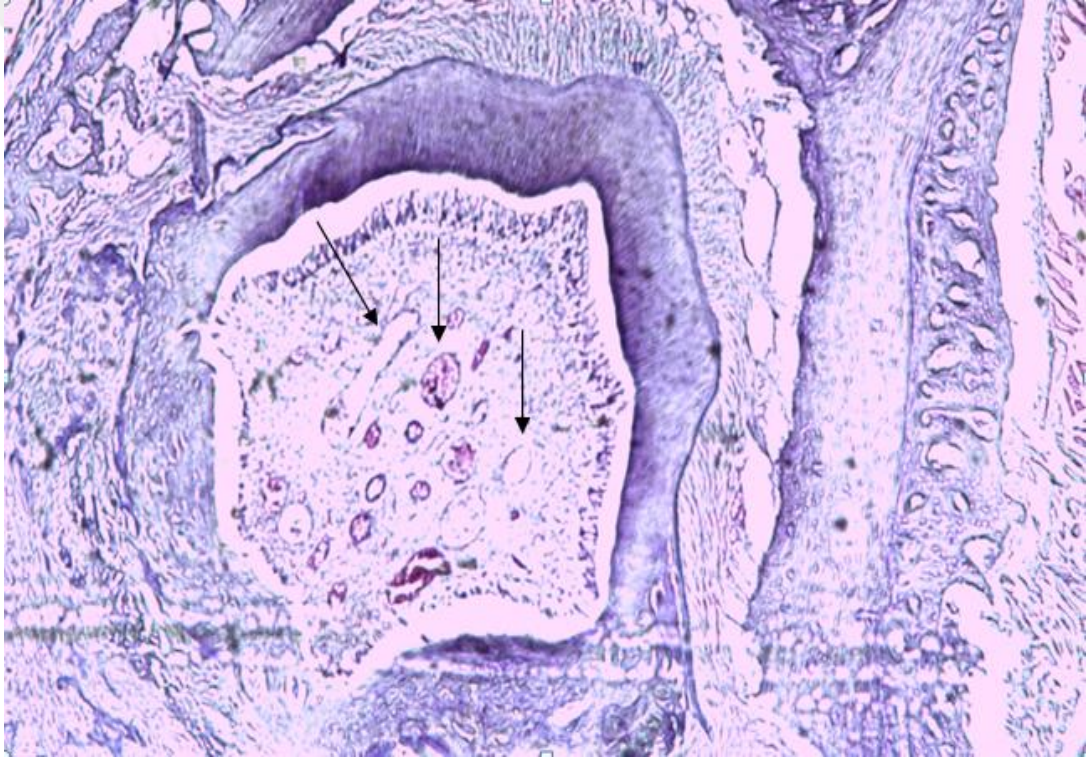
Gruplar	14. gün $\bar{X}\pm Ss$	28. gün $\bar{X}\pm Ss$	Sonuç
K	1,00±0,00	1,14±0,37	p=0,317
G	0,28±0,48	0,57±0,53	p=0,157
R	1,28±0,48	1,71±0,48	p=0,083
GR	1,57±0,53	2,00±0,00	p=0,083

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standat sapma

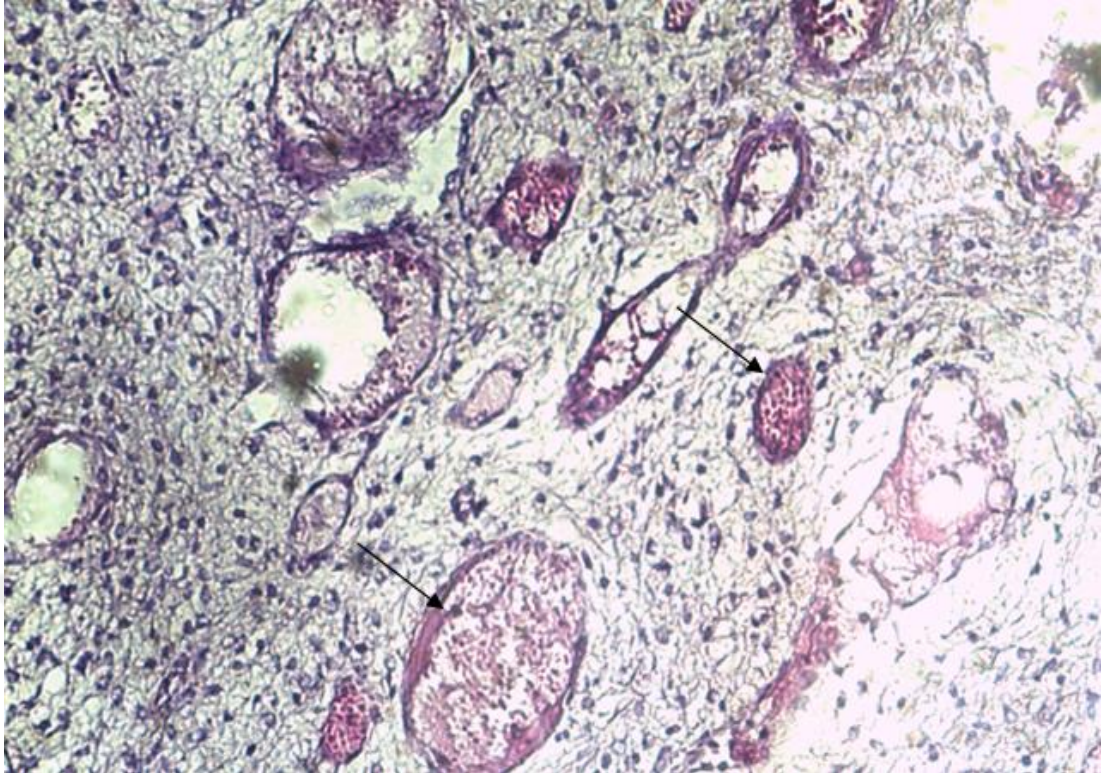
4.2.2 Anjiyogenezin Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün skor değerleri karşılaştırıldığında (Tablo 4.4), gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K ile GR, R ile GR arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p<0,05$), diğer gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Gruplara ilişkin 28. gün skorları karşılaştırıldığında, gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur. Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında, K ile GR arasındaki farklılık önemli bulunurken ($p<0,05$) diğer gruplar arasındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).



Şekil 4.2: GR grubuna ait 14. gün histopatolojik görüntü. Vaskülarizasyonda artış (siyah oklar), Hematoksilen-eozin x 200



Şekil 4.3: GR grubuna ait 28. gün histopatolojik görüntü. Vaskülarizasyonda artış (siyah oklar), Hematoksilen-eozin x 360

Tablo 4.4: Tüm gruplara ait anjiyogenez miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün		28. gün	
	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan
K	1,14±0,37	1	1,28±0,48	1
G	1,57±0,53	2	1,57±0,53	2
R	1,28±0,48	1	1,42±0,53	1
GR	2,14±0,37	2	2,14±0,37	2
Sonuç	KW= 12,31 p= 0,006*		KW= 8,92 p= 0,030*	

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standat sapma, KW: Kruskal Wallis Testi *: (p<0,05)

Her bir grupta 14. gün ve 28. gün skorları karşılaştırıldığında (Tablo 4.5), gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$).

Tablo 4.5 Günlere ait anjiyogenez miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün $\bar{X}\pm Ss$	28. gün $\bar{X}\pm Ss$	Sonuç
K	1,42±0,37	1,28±0,48	p=0,564
G	1,57±0,53	1,57±0,53	p=1,000
R	1,28±0,48	1,42±0,53	p=0,564
GR	2,14±0,37	2,14±0,37	p=1,000

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standat sapma ($p>0,05$)

4.2.3 Fibrozis Miktarının Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün fibrozis skorları değerlendirildiğinde (Tablo 4.6), gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında; K ile GR arası farklılık önemli bulunurken, diğer gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Gruplara ilişkin 28. gün fibrozis skorları değerlendirildiğinde, gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

Tablo 4.6: Tüm gruplara ait fibrozis miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün		28. gün	
	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan
K	1,28±0,48	1	1,57±0,53	2
G	1,71±0,48	2	2,14±0,37	2
R	1,57±0,53	2	1,85±0,69	2
GR	2,14±0,37	2	2,42±0,53	2
Sonuç	KW= 8,76 p= 0,033*		KW= 8,92 p= 0,052	

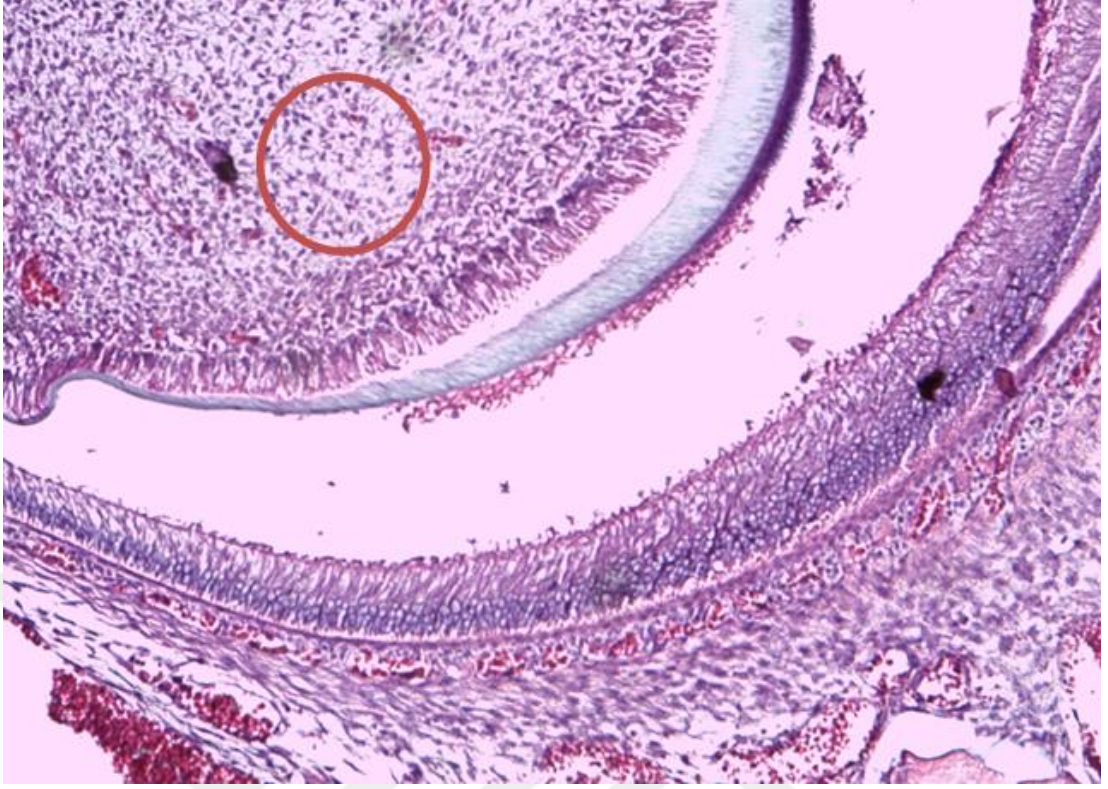
\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standat sapma, KW: Kruskal Wallis Testi *: (p<0,05)

Her bir grupta 14. gün ve 28. gün skorları karşılaştırıldığında (Tablo 4.7), gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Tablo 4.7: Günlere ait fibrozis miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün $\bar{X} \pm Ss$	28. gün $\bar{X} \pm Ss$	Sonuç
K	1,18±0,48	1,57±0,53	p=0,157
G	1,71±0,48	2,14±0,37	p=0,083
R	1,57±0,53	1,85±0,69	p=0,317
GR	2,14±0,37	2,42±0,53	p=0,157

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standat sapma

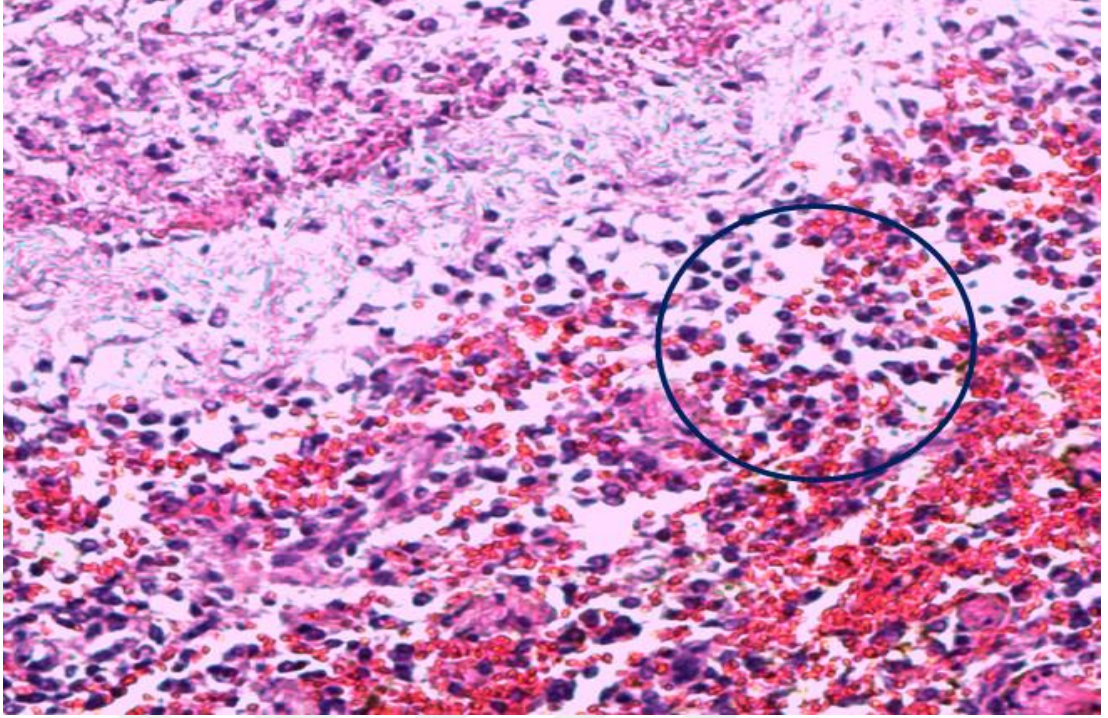


Şekil 4.4: GR grubuna ait 14. gün histopatolojik görüntü. Fibrozis (Kırmızı daire), Hematoksilen, eozin x 140

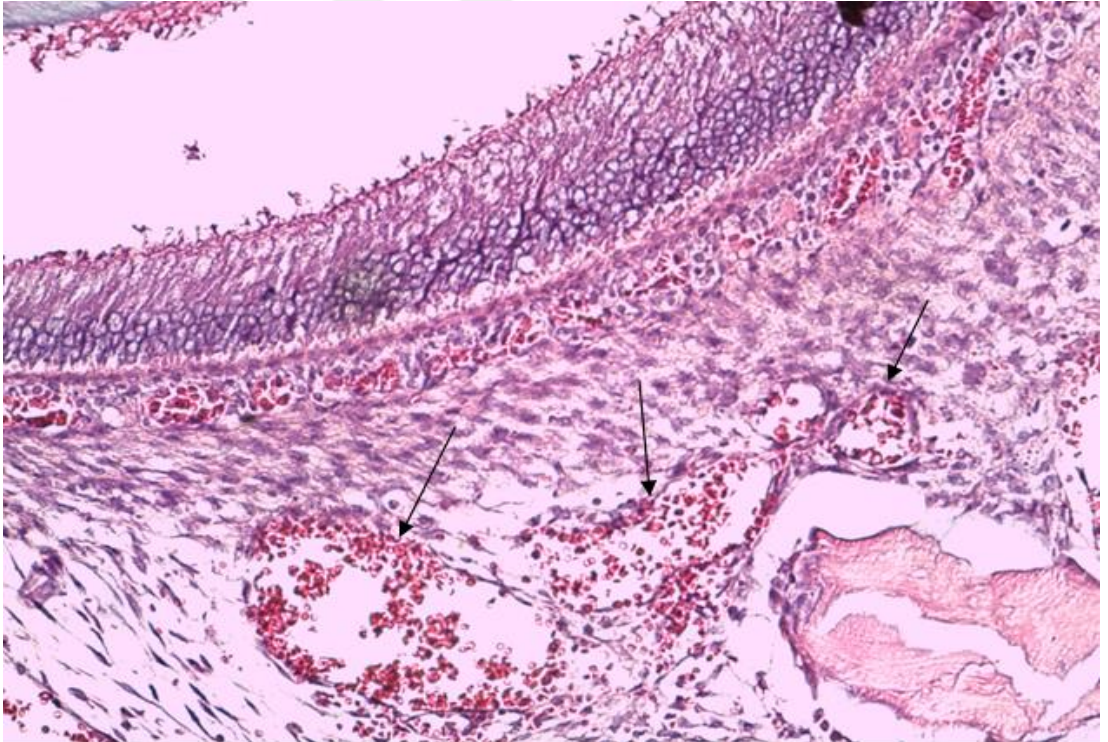
4.2.4 Enflamatuvar Hücre Miktarının Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün enflamatuvar hücre skorları değerlendirildiğinde (Tablo 4.8), gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında, K ile GR arası farklılık önemli bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Gruplara ilişkin 28. gün enflamatuvar hücre skorları değerlendirildiğinde, gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).



Şekil 4.5: Kontrol grubuna ait 14. gün histopatolojik görüntü. Enflamatuvar hücre artışı (siyah daire), Hematoksilen-eozin x 200



Şekil 4.6: Kontrol grubuna ait 14. gün histopatolojik görüntü. Hiperemi (siyah oklar), Hematoksilen-eozin x 140

Tablo 4.8: Tüm gruplara ait enflamatuvar hücre miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün		28. gün	
	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan
K	2,71±0,48	3	2,42±0,53	2
G	2,14±0,69	2	1,71±0,48	2
R	2,28±0,75	2	2,28±0,48	2
GR	1,71±0,48	2	1,71±0,48	2
Sonuç	KW= 7,94 p= 0,047*		KW= 7,94 p= 0,052	

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma, KW:Kruskal Wallis Testi *: (p<0,05)

Her bir grupta 14. gün ve 28. gün skorları karşılaştırıldığında (Tablo 4.9), gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur (p>0,05).

Tablo 4.9: Günlere ait enflamatuvar hücre miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün $\bar{X} \pm Ss$	28. gün $\bar{X} \pm Ss$	Sonuç
K	2,71±0,48	2,42±0,53	p=0,414
G	2,14±0,69	1,71±0,48	p=0,083
R	2,28±0,75	2,28±0,48	p=1,000
GR	1,71±0,48	1,71±0,48	p=1,000

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma

4.2.5 Nekroz Mevcudiyetinin Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün nekroz skorları değerlendirildiğinde (Tablo 4.10), gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Gruplara ilişkin 28. gün nekroz skorları değerlendirildiğinde, gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.10: Tüm gruplara ait nekroz mevcudiyetinin karşılaştırılması

Gruplar	14. gün		28. gün	
	$\bar{X}\pm Ss$	Medyan	$\bar{X}\pm Ss$	Medyan
K	0,28±0,48	0	0,14±0,37	0
G	0,00±0,00	0	0,00±0,00	0
R	0,14±0,37	0	0,14±0,37	0
GR	0,14±0,37	0	0,14±0,37	0
Sonuç	KW= 2,25 p= 0,0522*		KW= 1,08 p= 0,782	

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma, KW: Kruskal Wallis Testi *: ($p<0,05$)

Her bir grupta 14. ve 28. gün skorları karşılaştırıldığında (Tablo 4.11), gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.11: Günlere ait nekroz miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün $\bar{X} \pm Ss$	28. gün $\bar{X} \pm Ss$	Sonuç
K	0,28±0,48	0,14±0,37	p=0,317
G	0,00±0,00	0,14±0,37	p=1,000
R	0,14±0,37	0,14±0,37	p=1,000
GR	0,14±0,37	0,14±0,37	p=1,000

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma

4.3 Biyokimyasal Bulgular (ELİSA Bulguları)

Biyokimyasal olarak BMP-2 ve TNF- α miktarı hesaplanarak kemik iyileşmesi değerlendirilmiştir.

4.3.1 BMP-2 Miktarının Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün BMP-2 miktarları değerlendirildiğinde (Tablo 4.12) gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında; K ile GR, G ile R, R ile GR arası farklılık önemli bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Gruplara ilişkin 28. gün BMP-2 miktarları değerlendirildiğinde gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında, K ile G, G ile R, R ile GR arası farklılık önemli bulunurken ($p < 0,05$), diğer gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Tablo 4.12: Tüm gruplara ait BMP-2 miktarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün		28. gün	
	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan	$\bar{X} \pm Ss$	Medyan
K	1,45±0,24	1,57	1,31±0,21	1,33
G	1,21±0,32	1,15	0,94±0,13	0,94
R	1,44±0,20	1,40	1,57±0,30	1,16
GR	2,26±0,42	2,06	1,20±0,14	1,16
Sonuç	KW= 2,25 p= 0,0522*		KW= 1,08 p= 0,782	

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma, KW: Kruskal Wallis Testi, *: (p<0,05)

Günlere ait BMP-2 miktarları karşılaştırıldığında; G ve GR gruplarında 14. ve 28. günler arasındaki farklılık önemli bulunurken (p<0,05), diğer gruplar arasındaki farklılık önemsiz bulunmuştur (p>0,05) (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: Günlere ait BMP-2 miktarlarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün $\bar{X} \pm Ss$	28. gün $\bar{X} \pm Ss$	Sonuç
K	1,45±0,24	1,31±0,21	p=0,128
G	1,21±0,32	0,94±0,13	p=0,018*
R	1,44±0,20	1,57±0,30	p=0,091
GR	2,26±0,42	1,20±0,14	p=0,018*

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma, *: (p<0,05)

4.3.2 TNF- α Miktarının Değerlendirilmesi

Gruplara ilişkin 14. gün TNF- α miktarları değerlendirildiğinde (Tablo 4.14) gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında; K ile R, K ile GR arası farklılık önemli bulunurken ($p<0,05$), diğer gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Gruplara ilişkin 28. gün TNF- α miktarları değerlendirildiğinde (Tablo 4.14) gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$). Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında; K ile R, K ile GR, G ile R, G ile GR arası farklılık önemli bulunurken ($p<0,05$), diğer gruplar arası farklılık önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.14: Tüm gruplara ait TNF- α miktarlarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün $\bar{X}\pm Ss$	28. gün $\bar{X}\pm Ss$
K	82,27 \pm 3,67	65,00 \pm 2,43
G	75,88 \pm 5,29	66,51 \pm 4,07
R	69,70 \pm 6,07	57,48 \pm 4,55
GR	70,05 \pm 5,00	56,77 \pm 5,55
Sonuç	F=9,48 p=0,001*	F=9,54 p=0,001*

\bar{X} : Ortalama değer, Ss: Standart sapma, Varyans analizi: Tukey testi $p<0,05$

Günlere ait TNF- α miktarları karşılaştırıldığında (Çizelge 4.15), tüm gruplarda 14. ve 28. günler arasındaki farklılık önemli bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 4.15: Günlere ait TNF- α miktarlarının karşılaştırılması

Gruplar	14. gün	28. gün	Sonuç
	$\bar{X} \pm Ss$	$\bar{X} \pm Ss$	
K	82,27 \pm 3,67	65,00 \pm 2,43	t=14,61 p=0,001*
G	75,88 \pm 5,29	66,51 \pm 4,07	t=5,25 p=0,002*
R	69,70 \pm 6,07	57,48 \pm 4,55	t=5,81 p=0,001*
GR	70,05 \pm 5,00	56,77 \pm 5,55	t=3,65 p=0,011*

\bar{X} :ortalama değer, Ss: standart sapma, Varyans Analizi: Tukey testi: p<0,05

5. TARTIŞMA

Yetişkin iskeletinin en önemli yapı taşını oluşturan kemik doku, kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini barındırır. Vücutta yumuşak dokuları destekler, kafatası ve göğüs boşluklarında bulunan hayati organları korur. Kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların kontrollü salınımlarını veya depolanmalarını sağlar, böylece bu iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonları belirli bir düzeyde tutulur (24).

Kemik doku ile ilgilenen araştırmacılar, kırık iyileşmesini hızlandıracak, kemik defektlerinin kendiliğinden ve hızlı bir biçimde kapanmasını sağlayacak, daha büyük defektlerde rekonstrüksiyon amacıyla kullanılacak kemik grefti veya kemik benzeri alloplastik maddelerin daha hızlı ve daha az komplikasyonla kemikle bütünleşmesine yardımcı olacak yöntemler üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada kemik iyileşmesi, ratlarda deneysel olarak oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerinde histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmiş ve değerlendirilmiştir.

Kemik doku, mineralize yapıda özelleşmiş bir bağ dokusudur. Sert ve dayanıklı bir yapıya sahip olan kemik dokusunun, %10-29'unu su, %60-70'ini inorganik matriks, %30-40'ını da organik yapı oluşturur (24).

Kemiğin hücresel elemanlarını osteoblastlar, osteositler, osteoprojenitör hücreler ve osteoklastlar oluşturmaktadır (79). Osteoblastlar, kemik matriksinin organik kısmının üretilmesinden sorumludurlar (24). Osteoklastlar, kemik matriksinin rezorpsiyonundan sorumludurlar. Kemiğin yeniden şekillenmesinde osteoklastlarla beraber görev alırlar (24, 28). Bu çalışmada; rat mandibulasında oluşturulan kemik defektlerinden alınan doku örnekleri incelenerek, osteoblast ve osteoklastların yoğunluğuna göre ossifikasyon derecesi değerlendirilmiştir.

Kemik iyileşmesi, enflamatuvar, proliferatif ve maturasyon olmak üzere üç önemli safhadan oluşur. Yumuşak dokudaki iyileşme sürecinden farklı olarak, kemik dokunun remodelasyon ve rekonstrüksiyonunda osteoblast ve osteoklastlar da rol oynar (38). Genel olarak, kemikleşme sürecinin birinci haftanın sonunda başlayıp altıncı haftanın sonunda büyük ölçüde tamamlandığı bildirilmiştir (122, 123). Yapılan çalışmalarda, ratlarda anjiyogenez ve kemik oluşumunu gözlemlemek için 4

haftalık sürenin yeterli bir süre olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kemik iyileşmesini gözlemek için ratlar 14. ve 28. günlerde sakrifiye edilmiş, enflamatuvar hücre yoğunluğu ve yeni damar oluşumu değerlendirilmiştir.

Kemik iyileşmesi bağ dokusuna özgü bir olaydır ve osteoblastları içeren hücrel proliferasyonu gerektirir (44, 45, 46). Kemik defektlerinin iyileşmesinde, defekt bazen istenmeyen bir şekilde skatrisyel bağ dokusu ile dolabilmektedir. Kemik defektindeki iyileşme miktarı büyük ölçüde yara büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle iyileşmenin değerlendirilmesi için kullanılan deneysel kemik yarası, spontan olarak iyileşebileceği boyuttan büyük olmalıdır (56). Bu özelliklere sahip deneysel kemik yarası “kritik boyutlu defekt” olarak adlandırılır.

Kritik boyutlu defekt, herhangi bir müdahale olmaksızın kendiliğinden iyileşemeyecek boyuttaki kemik defekti olarak tanımlanır (124, 125). Bir canlının yaşamı boyunca tamamen iyileşemeyecek durumdaki en küçük boyuttaki kemik defektidir. (49, 126, 127) Kritik boyutlu defekt çalışmalarının yapıldığı anatomik bölgeler kalvaryaya, mandibula ve tibia gibi kemiklerdir. Rat, fare, tavşan ve kobay gibi küçük deney hayvanlarında mandibulada devamlılığı olmayan bir defekt oluşturmak, cerrahi olarak bölgeye ulaşmanın sınırlı olması nedeniyle oldukça güçtür ve bu nedenle küçük hayvanlarda mandibuler ramusta bikortikal (*through and through*) defektler oluşturmak tek yoldur (127).

Araştırmacılar kritik boyutlu defektin boyutuyla ilgili farklı görüşler bildirmişlerdir. Ratlarda kalvaryumda genel olarak kritik boyutlu defektin boyutu 4-5 mm olarak bildirilmiştir. Nyan ve ark. (128), Calixto ve ark. (129) ve Lima ve ark. (130) rat parietal kemiğinde yaptıkları çalışmada kritik boyutlu defekt boyutunun çapını 5 mm olarak tercih etmişlerdir. Ratlarda mandibula angulusunda en küçük çaplı kritik boyutlu defektin çapı 4 mm olarak belirlenmiştir. Oluşturulan defekt mandibula ramusu ve alt kenarından 1 mm güvenlik sınırı bırakılacak şekilde sınırlandırılmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ratlarda baş boyun bölgesinde oluşturulan 5 mm çaplı defektin kritik boyutlu defekt olduğu kabul gördüğünden (131-133), bu çalışmada rat mandibulasında 5 mm çapında defekt oluşturulmuştur.

Modern rejeneratif tıpta, özellikle kraniyomaksillofasiyal cerrahide büyük kemik kayıplarının tamiri güçlük çıkarmaktadır. Kemik dokunun tamir potansiyeli büyük olmasına rağmen, bazı durumlarda defektin büyüklüğüne bağlı olarak rejenerasyon tamamen gerçekleşmeyebilir. Bunun nedeni, defektin etrafını çevreleyen bağ dokuda, hücre proliferasyon ve göçünün kemik dokudan daha hızlı olup defekt alanını işgal etmesidir. Bu nedenle, kemik tamiri ile bağlantılı olarak kemik greftlerinin kullanımı göz önünde bulundurulmalıdır (134).

Otogreftler; osteokondüksiyon ve osteoindüksiyonun mükemmel kombinasyonu olmaları nedeniyle 'altın standart' olarak kabul edilmektedirler. Ancak, rezorpsiyon oranının düzensiz olması, ağrı, donör bölgedeki morbidite, ek cerrahi işlem gerektirmesi gibi dezavantajları vardır. Bu sınırlamalar allogreftler, ksenogreftler, alloplastik materyaller gibi alternatiflerin araştırılmasına yol açmıştır (135, 136).

Hayvan kaynaklı ksenogreftler, kemik rejenerasyonunda uygun alternatif materyal olmuştur. Ksenogreftlerdeki protein içeriğinin uzaklaştırılmasıyla, immün reaksiyon ve hastalık bulaşma riski azalmıştır (137). Cohen ve ark. (138) yaptıkları bir çalışmada, sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti (Bio-Oss) uyguladıkları ratlarda, proteinlerin yokluğuna bağlı olarak herhangi bir immün yanıt veya alerji gelişmediğini görmüşlerdir.

Sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti, inorganik bileşimi ve izomerik kristal boyutları bakımından, insan kemiğine benzer fiziksel ve kimyasal bir yapıya sahiptir (139). Artzi ve ark. (140) yaptıkları bir çalışmada, 15 hastadaki taze çekim soketlerine sığır kaynaklı kemik grefti (Bio-Oss) uygulamışlar ve greftlenen bölgeyi 9 ay sonra histolojik olarak incelemişlerdir. İlgili dokunun ortalama %23 bağ doku, %30 greft partikülleri ve %64 kemik dokudan oluştuğu görülmüştür. Sonuç olarak, sığır kaynaklı kemik greftinin taze çekim soketlerindeki kemiği korumada uygun, biyouyumlu bir materyal olduğunu belirtmişlerdir.

Sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti, yeni oluşan kemikle temasa geçtiğinde osteokondüktif özellik gösterir (141). Bozkaya ve ark. (142) yaptıkları çalışmada, ratlarda oluşturdukları çeşitli boyutlardaki kemik defektlerine

uyguladıkları sığır kaynaklı deproteinize kemik greftlerinin kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. 24 adet kobayın deney hayvanı olarak kullanıldığı çalışmada denekler 3 gruba ayrılmıştır. Deneklerin mandibularında her segmentte 2'şer adet olacak şekilde 1.grupta 3 mm çapında, 2. grupta 4 mm çapında ve 3. grupta 5 mm çapında bikortikal defektler oluşturulmuştur. Her segmentteki defektten birine sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti (Bio-Oss) uygulanmış, diğer defekt kontrol amacı ile boş bırakılmıştır. 4. ve 8. haftalarda sakrifiye edilen deneklerden alınan örnekler histopatolojik olarak incelenmiştir. 3 mm lik defektlerde spontan iyileşmenin gözlemlendiği, deproteinize kemik grefti uygulanan defektlerde kemik yapımının kontrol grubuna göre daha iyi olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, sığır kaynaklı deproteinize kemik greftinin biyouyumlu, yeni kemik yapımını aktive eden yararlı bir materyal olduğu ve kobaylarda oluşturulan bikortikal 4 mm çapındaki defektin kritik boyutlu defekt olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir.

Develioğlu ve ark. (143) yaptıkları bir çalışmada, ratların parietal kemiklerinde oluşturdukları kritik boyutlu kemik defektlerinde, sığır kaynaklı kemik greftinin kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini histopatolojik olarak incelemişlerdir. Bu amaçla 14 adet rat kullanmışlardır. Ratların parietal kemiklerinde 5 mm çapında kritik boyutlu kemik defekti oluşturmuşlardır. Sağ tarafta ksenogreft uygulanmıştır, sol taraf kontrol amacıyla boş bırakılmıştır. 30 gün sonra sakrifiye edilen ratlardan alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde, deney grubundaki defekt alanında greft partiküllerinin fibröz dokuyla çevrelendiği gözlenirken, kontrol grubunda defekt alanında yoğun kollajen doku görülmüştür. Sonuç olarak, incelenen ksenogreftin biyouyumlu olduğu ve kemik defektlerinin doldurulmasında potansiyel bir malzeme olarak kullanılabilirdiği düşünülebilir.

Sığır kaynaklı kemik greftinin; kemik defektlerinin doldurulması, sinüs yükseltme gibi operasyonlarda başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (140, 144). De Santis ve ark. (145) yaptıkları bir çalışmada , 12 adet laboratuvar köpeğinin 2. kesici dişlerini çekip dental implant yerleştirmişlerdir. Çekim socketinin bukkal bölgesinde kemik defekti oluşturmuşlardır. Bir gruba otojen kemik grefti, diğer gruba deproteinize sığır kaynaklı kemik grefti (Bio-Oss) uygulamışlardır. Deney hayvanlarını 2. ve 4. aylarda sakrifiye etmişler ve histopatolojik olarak

incelemişlerdir. İyileşmenin 2. ayında bütün implantlarda osseintegrasyon mevcut olduğu, oluşturulan bukkal defektlerin kapandığı gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, hem otojen hem de sığır kaynaklı kemik greftlerinin yüksek derecede kemik rejenerasyon yeteneği gösterdiği ve sığır kaynaklı kemik greftlerinin de kritik boyutlu kemik defektlerinde tatmin edici sonuçlar gösterdiği belirtilmiştir.

Bu çalışmada; rat mandibulasında oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerinde, kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti kullanılmıştır.

Kemik iyileşmesi sırasında; makrofajlar tarafından, defekt alanına mezenkimal hücrelerin göçünü ve farklılaşmasını sağlayacak olan çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler salınır (39, 40).

Kemik morfogenetik proteinler, *transforming growth factor- β* (TGF- β) ailesi üyeleri içinde bulunan büyüme ve farklılaşma faktörleridir.(91). Bu proteinler arasında osteoindüktif özelliği en fazla olan BMP-2'dir (90). BMP-2, osteoblast ve kondrositlerin farklılaşma ve çoğalma fonksiyonlarını etkileyerek yeni kemik oluşumunu teşvik eder (146, 147).

Kemikte tamir olayının başlatılmasında proenflamatuvar sitokinlerin (IL-1, IL-6, TNF- α) rol oynadığı gösterilmiştir (148). TNF- α , makrofajlar ve monositler tarafından üretilen ve kaşektin olarak da bilinen bir sitokindir. Çeşitli hücre popülasyonları üzerinde bir grup enflamatuvar ve immün düzenleyici etki gösterir (100). TNF- α 'nın kemik rezorpsiyonu, kemik formasyonunun inhibisyonunda önemli rolleri olduğu bildirilmiştir (100).

Bu çalışmada kemik yaranması sonrasında önemli etkinlikleri bulunan BMP-2 ve TNF- α 'nın serum düzeyleri biyokimyasal olarak incelenmiş ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Son yıllarda, antioksidan özellik gösteren bitkisel ve doğal ürünlerin kullanımını popülerite kazanmış olup alternatif tıbbi tedavi metodu olarak tüm dünyada kabul görmüştür Yeni kemik oluşumunun uyarılması amacıyla, çeşitli

büyüme faktörlerinin veya antioksidan özellik gösteren maddelerin sistemik ya da lokal kullanımı gündeme gelmiştir.

Resveratrol; polifenolik yapıda bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler, patojen mikroorganizmalar veya dış streslere karşı korunmak için, bitkiler tarafından üretilen kimyasal maddelerdir. Resveratrol, Japonya’ da *kojo-kon* adı verilen ve yıllardır kullanılan geleneksel bir bitkinin içinde bulunmaktadır (111).

Bu çalışmada; kemik iyileşmesini hızlandırmak, kemik greftinin daha hızlı ve daha az komplikasyonla kemikle bütünleşmesini sağlamak amacıyla, antioksidan özellikteki resveratrol sistemik olarak uygulanmıştır.

Uzun kemiklerde ve kraniofasiyal komplekste, kemik rejenerasyonunu arttırdığı öne sürülen farklı materyallerin etkilerini değerlendirmek için çeşitli deneysel yaklaşımlar kullanılmasına rağmen araştırmacılar arasında uygun hayvan modelinin seçilmesi konusunda tam bir fikir birliği yoktur (2, 48, 125).

Yeni kemik greft materyallerinin değerlendirilmesi için seçilen hayvan modelleri çoğunlukla immatür, karakteristik olarak osteogenez potansiyeli yüksek olan az evrimsel gelişim göstermiş türlerden oluşmaktadır. Bu nedenle greft veya implant uygulanmayan ve kontrol olarak seçilen deneysel yaralar sıklıkla spontan olarak iyileşmektedir(48). Mevcut türlerdeki immatür hayvanlarda osseöz defektler; matür olan hayvanlardaki tamir olayından daha aktif olarak gerçekleşeceğinden kemik greft materyalleri için gerçek değerlendirme matür hayvanlarda yapılmalıdır (125, 127). Seçilecek olan deney hayvanının yapılacak olan çalışmaya uygun olması gerekmektedir. Deney hayvanlarından köpek, domuz ve ratlar insan immünesi ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada; kolay bulunabilmesi, beslenmesi ve barındırılmasının kolay olması ve ucuz olması nedeniyle rat modeli kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalarda histopatolojik olarak değerlendirme günleri farklılıklar göstermiştir. Erken dönem kemik iyileşmesinin histopatolojik incelenmesinde genellikle 3, 7, 14, 21, 28. gün ve 2, 3. ay gibi süreler esas alınmıştır. Bu çalışmada kemik iyileşmesini histopatolojik olarak değerlendirmek için ratlar 14. ve 28. günlerde sakrifiye edilmiştir.

Literatürde resveratrol, birçok araştırmada 2.5-100 mg/kg dozlarda kullanılmıştır(149). Yapılan klinik ve laboratuvar araştırmalarında resveratrolde; mutajenite, karsinojenite, hücrel toksisite ve alerjik reaksiyon gibi bilinen yan etkiler saptanmamıştır (111).

Uysal ve ark. (150) yaptıkları bir çalışmada, interpremaksiller **sutur** genişletilmesinde lokal olarak uygulanan resveratrolün kemik oluşumu üzerine etkilerini incelemiştir. Ekspansiyon sonrası deney grubu ratlarının interpremaksiller suturlarına 10 mg/kg resveratrol enjekte edilmiştir ve kemik iyileşmesi histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir.

Casarin ve ark. (149), Elmalı ve ark. (151) yaptıkları çalışmalarda, deney hayvanlarına günlük 10 mg/kg resveratrolü gavaj yoluyla uygulamışlardır.

Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmaların protokolüne göre (149, 151), resveratrol gavaj yoluyla sistemik olarak 10 mg/kg şeklinde uygulanmıştır.

Çalışmaların büyük bir kısmı resveratrolün; güçlü antiinflamatuvar, immün düzenleyici, kemopreventif, kardiyoprotektif, hepatoprotektif ve antioksidan özellikte olduğunu göstermiştir. Ayrıca vasküler endotelial fonkiyonu düzenlediği ve lipid metabolizmasını arttırdığı bildirilmiştir (152).

Antioksidan maddelerin kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri bilinmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda, resveratrolün deneysel olarak oluşturulan osteoporozu, osteoblastik aktiviteyi artırarak engellediği bildirilmiştir (23).

Dai ve ark. (121) yaptıkları in vitro çalışmada; resveratrolün insanda kemik iliği kökenli hücre kültürlerinde, doğrudan hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve osteojenik gen ekspresyonunu uyardığını bildirmiştir.

Mizutani ve ark. (153) yaptıkları in vivo bir çalışmada, overektomi yapılmış ratlarda, resveratrolün kemik yıkımını engellediğini göstermişlerdir.

Casarin ve ark. (151) yaptıkları bir çalışmada, ratların kalvaryalarında 5 mm çaplı kritik boyutlu defekt oluşturmuşlardır. Deney grubuna günlük 10 mg/kg

resveratrolü gavaj yoluyla uygulamışlardır. 30 gün sonra kontrol ve deney grubundan elde edilen örneklerde yapılan histomorfometrik incelemelerde resveratrol grubunda, kontrol grubuna göre defekt boyutunun azaldığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada, kemik iyileşmesi histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. 14. ve 28. günlerde resveratrol ve greft+resveratrol gruplarında; kontrol grubuna göre, ossifikasyon derecesinde artış görülmüştür. 28. günde greft+resveratrol grubundaki ossifikasyon derecesi anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda resveratrolün fizyolojik anjiyogenezde benzersiz bir rol oynadığı belirtilmiştir. Resveratrolün ratlarda insizyonel yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada; kontrol grubuna nazaran damarlanmanın daha iyi olduğu saptanmıştır (152). Bu çalışmada 14. ve 28. günlerde diğer gruplara göre greft+resveratrol grubunda damarlanmanın daha iyi olduğu saptanmıştır.

Resveratrolün antienflamatuvar özellik gösterdiği ve bu etkiyi nötrofil, monosit ve makrofajlarda serbest radikallerin inhibisyonuna neden olarak yaptığı bildirilmiştir (154). Ayrıca makrofajlardan ve lenfositlerden çeşitli sitokinlerin salınımının resveratrol tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (155). Bu çalışmada; 14. günde diğer gruplara göre, greft+resveratrol grubunda enflamatuvar hücre yoğunluğu ve hiperemi anlamlı derecede düşük bulunmuştur. 28. günde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Kemik iyileşmesinin erken döneminde fibroblastların bölgeye göçü kollajen sentezini arttırmaktadır, ancak fibroblast aktivitesinin uzun süre devam etmesi kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir (156). Bu çalışma, fibrozis açısından değerlendirildiğinde; 14. günde greft+resveratrol grubunda kontrol grubuna nazaran anlamlı bir artış gözlenmesine rağmen, 28. günde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

BMP' ler kemiğin rekonstrüksiyonunda klinik olarak kullanılması amaçlanan osteoindüktif maddelerdir. BMP' ler insan embriyosunun diş germi, santral sinir sistemi, oral ve maksillofasiyal bölge gibi iskeletsel olmayan organ ve dokularından salınır (89, 157).

Rasubala ve ark. (158) yaptıkları bir çalışmada BMP-2 nin kırık iyileşmesi üzerine etkilerini incelemişlerdir. 30 adet ratın mandibularında tek taraflı kırık oluşturmuşlar ve deney hayvanlarını 3, 7, 14 ve 21. günlerde sakrifiye ederek BMP-2 nin etkilerini immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. BMP-2'nin iyileşmenin tüm aşamalarında salındığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak, BMP-2'nin mezenkimal hücrelerin osteblast ve kondroblastlara farklılaşması ile ilişkili olduğu ve kırık iyileşmesi üzerine belirgin düzenleyici etkileri olduğu bildirilmiştir.

Su JL (159) ve ark. yaptıkları bir çalışmada, overektomi yapılan ratlara 10 mg/kg resveratrol uygulamışlar ve serum BMP-2 konsantrasyonları ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna göre, BMP-2 konsantrasyonunun deney grubunda daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bu çalışmada, 14. günde kontrol grubuna göre; greft+resveratrol grubunda; 28. günde resveratrol grubunda BMP-2 miktarında anlamlı artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak; sistemik uygulanan resveratrolün BMP-2 artışı üzerine olumlu yönde etkisi olduğu düşünülmektedir. Histopatolojik incelemelerde resveratrol ve greft+resveratrol uygulanan gruplarda ossifikasyon skorlarının daha yüksek olması, çalışmada incelenen BMP-2 seviyeleri ile örtüşmekte ve resveratrolün kemik iyileşmesine katkı sağlayabileceği konusundaki hipotezimizi güçlendirmektedir.

Resveratrolün antienflamatuvar etkisinin, siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerini inhibe etmesi, bazı enflamatuvar sitokinleri (TNF- α , IL-1 β , VE IL-6) baskılaması, nükleer faktör kappa B (NFkB) inhibisyonu yapması ve endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltmasına bağlı olduğu bildirilmiştir (154).

Bu çalışmada, 14. ve 28. günlerde diğer gruplara göre, resveratrol uygulanan gruplarda TNF- α miktarlarının düşük olduğu saptanmıştır. Histopatolojik incelemelerde resveratrol uygulanan gruplarda enflamatuvar hücre yoğunluğunun düşük olması, çalışmada incelenen TNF- α seviyeleri ile örtüşmektedir ve resveratrolün enflamasyonun şiddetini azalttığı yönündeki hipotezimizi desteklemektedir.

Bu çalışmada antioksidan özellikleri ile bilinen resveratrolün tek başına ve sığır kaynaklı deproteinize kemik greftiyle birlikte kombine kullanımının; ratlarda

kritik boyutlu defektlerde kemik iyileşmesi üzerine olan etkileri deneysel olarak incelenmiştir. 14. ve 28. günlerde deneyin sonlandırılması ile tüm ratların kritik boyutlu defekt oluşturulan sağ mandibulaları üzerinde histopatolojik incelemeler; serum örnekleri üzerinde ise biyokimyasal (ELISA yöntemi) incelemeler yapılmıştır. Bu çalışmanın histopatolojik bulgularına göre ossifikasyon bakımından 14. günde resveratrol ve greft+resveratrol gruplarında, kontrol grubuna göre artış görülmesine rağmen anlamlı bir fark bulunmazken, 28. günde greft+resveratrol grubundaki artış anlamlı bulunmuştur. Anjiyogenez bakımından 14. ve 28. günlerde kontrol grubuna göre, greft+resveratrol grubundaki artış anlamlı bulunmuştur. Fibrozis bakımından 14. günde kontrol grubuna göre, greft+resveratrol grubundaki artış anlamlı bulunmasına rağmen, 28. günde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Enflamatuvar hücre bakımından greft+resveratrol grubunda enflamatuvar hücre yoğunluğu kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Çalışmamızın serolojik bulgularına göre, 14. günde resveratrol verilen gruplarda BMP-2 miktarında artış görülmekle birlikte, bu artış greft+resveratrol grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur. TNF- α miktarı bakımından ise; 14. ve 28. günlerde resveratrol verilen tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür.

Literatürde, resveratrolün etkinliğinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmasına rağmen kemik iyileşmesi üzerinde etkisini inceleyen yeterli çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca sığır kaynaklı kemik greftinin kemik iyileşmesi üzerine etkinliğini araştıran birçok çalışma rapor edilmesine karşın, resveratrol ile kombine kullanımının nasıl bir etki yaptığına dair bir bilgi bulunmamaktadır.

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre; sistemik olarak uygulanan resveratrolün ratlarda kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olmakla birlikte, antienflamatuvar ve vaskülarizasyonu artırıcı özellikte olduğu gözlenmiştir. Resveratrolün; yeni kemik oluşumu üzerine tam olarak etkilerinin anlaşılabilmesi ve kemik iyileşmesinde daha etkin dozun belirlenmesi için yeni çalışmalar yapılması gerektiği ve bu çalışmanın konuyla ilgili yapılacak olan araştırmalara yol göstereceği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Ratlar yapılan cerrahi işlemi iyi tolere etmiştir ve resveratrol deney hayvanlarında toksik bir etki oluşturmamıştır.
- Yapılan serolojik incelemelerde 14. günde greft+resveratrol grubunda kontrol grubuna nazaran; 14. ve 28. günlerde resveratrol grubunda greft grubuna nazaran BMP-2 miktarı anlamlı derecede yüksektir.
- Yapılan serolojik incelemelerde resveratrol uygulanan gruplarda (R, GR) kontrol grubuna nazaran, özellikle 14. günde TNF- α miktarının düşük olduğu saptanmış ve böylece oluşan enflamasyonun şiddetini azalttığı görülmüştür.
- Histolojik incelemeler sonucunda greft+resveratrol uygulanan gruplarda ossifikasyon derecesi, kontrol ve greft grubuna nazaran anlamlı derecede yüksektir.
- Histolojik incelemeler sonucunda greft+resveratrol grubunda, kontrol grubuna nazaran yeni damar oluşumu anlamlı derecede yüksektir.
- Greft+resveratrol grubunda kontrol grubuna nazaran, 14. günde enflamatuvar hücre yoğunluğu anlamlı derecede düşüktür.
- Bu çalışmada ratlarda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine sistemik uygulanan resveratrolün kemik iyileşme sürecinde olumlu etkilerinin olabileceği serum BMP-2, TNF- α seviyeleri ile ortaya konulmuştur ve bu etkileri ossifikasyon derecesi, anjiyogenez ve enflamatuvar hücre miktarı açısından histopatolojik incelemelerle desteklenmiştir.
- Elde edilen sonuçlara göre, sistemik resveratrolün kritik boyutlu defektlerde greftle beraber uygulandığında kemik iyileşmesi üzerine daha olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir.
- Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, resveratrolün kemik iyileşmesi konusunda literatüre katkı sağlayacağını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Aybar Odstrcil A, Territoriale E, Missana L. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam*, 18:63-7, 2005.
2. Dodde R, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the rabbit. *J Craniofac Surg*, 11:346-9, 2000.
3. Kahnberg K.E. *Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants*. Blackwell Munksgaard, Blackwell Publishing, Sweden, 2-1, 2005.
4. Özeç İ, Kılıç, E, Gümüş C, Göze F. Lokal olarak üç farklı dozda simvastatin uygulamasının kemik defekti iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Fak Derg*, 10(2):82-86, 2007.
5. Banwart J.C, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: A statistical evaluation. *Spine*, 20:1055–1060, 1995.
6. Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, and Brotea C. Persistent Iliac Crest Donor Site Pain: Independent Outcome Assessment. *Neurosurgery*, 50:510–516, 2002.
7. Mangano C, Scarano A, Perrotti V, Iezzi G, Piattelli A. Maxillary sinus augmentation with a porous synthetic hydroxyapatite and bovine-derived hydroxyapatite: a comparative clinical and histologic study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 22:980-986, 2007.
8. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 14(6):835-840, 1999.
9. Valentini P, Abensur D. Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 17(3):232-241, 1997.
10. Yazar TT. Sürekli Kemik Defektlerinde Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonunun Osteogenesis Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Olarak Araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 66s, 1998.

11. Boyne PJ. Osseous reconstruction of the maxilla and mandible. Chicago Quintessence, 25-74, 1997.
12. Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *J Craniofac Surg*, 3(1):25-29, 1992.
13. Lindgren C, Hallman M, Sennerby L, and Sammons R. Back-scattered electron imaging and elemental analysis of retrieved bone tissue following sinus augmentation with deproteinized bovine bone or biphasic calcium phosphate. *Clin Oral Implants Res*, 21:924-930, 2010.
14. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: A randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res*, 21:688-698, 2010.
15. Stavropoulos A, Karring T. Guided tissue regeneration combined with a deproteinized bovine bone mineral (Bio-Oss) in the treatment of intrabony periodontal defects: 6-year results from a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 37:200-210, 2010.
16. Kahkonen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauuha JP, Pihlaja K, Kujala TS. Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem*, 32:661-667, 1999.
17. Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275:218-220, 1997.
18. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J. Nutr*, 132(2):257-260, 2002.
19. Cao Z, Li Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. *Eur J Pharmacol*, 489:39-48, 2004.
20. Savouret JF, Quesne M. Resveratrol and cancer: a review. *Biomed. Pharmacother*, 56:84-87, 2002.

21. Wang Z, Zou J, Huang Y, et al. Effect of resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Chin Med J (Engl)*, 115:378-380, 2002.
22. Boissy P, Andersen TL, Abdallah BM, Kassem M, Plesner T, Delaisse' JM. Resveratrol inhibits myeloma cell growth, prevents osteoclast formation, and promotes osteoblast differentiation. *Cancer Res*, 65:9943–9952, 2005.
23. Song LH, Pan W, Yu YH, Quarles LD, Zhou HH, Xiao ZS. Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER α /NO/cGMP pathway. *Toxicol In Vitro*, 20:915–922, 2006.
24. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology. *Temel Histoloji*, Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul:141-159, 2006.
25. Bancroft JD, Stevens A: *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork, Chapter 15:309-339, 1996.
26. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology*. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Demir R, Palme yayıncılık, Ankara:118-145, 2006.
27. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*, 2nd ed. Pennsylvania, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 134-154, 2001.
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*, 11:47-51, 2006.
29. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 3:3-4, 2004.
30. Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am*, 35:469-477, 1991.
31. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop*, 11:403-412, 2000.
32. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*, 13 Suppl1:3-6, 1992.
33. Schenk RK. Biology of fracture. In: Browner B, Jupiter J, Levine A, Trafton P (Eds). *Skeletal Trauma*. Philadelphia: Saunders, 29-74, 2003.

34. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology-II. Instructional Course Lectures AAOS, 41:387-399, 1996.
35. Kafkas İ.H. Kemik İyileşmesinin Temelleri. Neurosurgical Focus, vol 10, 2001.
36. Kocaelli, H.A. Korona stimülasyonunun ağız cerrahisi girişimlerinde iyileşme sürecinin etkisinin deneysel araştırılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 88s, 2000.
37. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Robbin's pathologic basis of disease. WB Saunders Co. 5 th ed, London, 1994.
38. Peterson LJ. and Ellis III E. Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery: Surgical Reconstruction of Defects of the Jaws. chapter 28, 3rd ed. Mosby, USA, 1998.
39. Lindhe O, Brandt I, Christiansen JS, Ingebrigtsen K. Irreversible binding of o,p'-DDD in interrenal cells of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Chemosphere. 50(9):1249-1253, 2003.
40. Miloro M, Ghali GE, Larsen PE, Waite PD. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery. 2nd Ed., London, BC Decker Inc, 2004.
41. Fonseca RJ, Walker RV, Betts NJ, Barber HD, Powers MP. Oral and Maxillofacial Trauma, 3 rd edition, Elsevier Saunders, China, 1:42–55, 2005.
42. Thibodeau GA. and Patton KT. Anatomy and Physiology, 5 ed., Mosby Inc, China, 190–202, 2003.
43. Atay MH Yılmaz FR. İki Farklı Kemik Greftinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. Dicle Tıp Dergisi, 32(4), 172-178, 2005.
44. Atabek A. Otogreftler Aracılığı ile Elde Edilen Otojen Kemik Partiküllerinin ve İki Farklı Greft Materyalinin Yalın ve Kombine Uygulamalarının Histopatolojik İncelenmesi Sonuçları. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 88-95, 2003.
45. Altunatmaz K. Kırık İyileşmesinin Biyolojisi ve Biyolojik Osteosentez. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, vol 1, 2004.
46. Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E, Solheim E, Prætorius F. Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbit tibia. Clin Oral Impl Res, 4:172-176, 1993.

47. Wada T, Wu C-H, Sugita H, Sugita N, Katagiri S, Shimizu M, Hara K. Autogeneous, Allogenic and β -TCP Grafts: Comparative Effectiveness in Experimental Bone Furcation Defects in Dogs. *J. Oral Implantol*, 15:231-236, 1989.
48. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, 9:310-6, 1998.
49. Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*, 106:360-71, 2000.
50. Develioğlu H. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek. Fak. Derg.* 6(1):60-63, 2003.
51. Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*, (2):73-78, 2008.
52. Özeç İ, Yeler H. Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Fak Derg*, 6(1):31-36, 2003.
53. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*, 125(6):1685-1692, 2010.
54. Pepijn F, Gielkens PF, Schortinghuis J, De Jong JR, Raghoobar GM, Stegenga B, Bos RR. Vivosorb, Bio-Gide, and Gore-Tex as barrier membranes in rat mandibular defects: an evaluation by microradiography and micro-CT. *Clin Oral Implants Res*, 19(5):516-521, 2008.
55. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol*. 48(2):155-160, 2003.
56. Başarir K, Selek H, Yildiz Y, Sağlık Y. Nonvascularized fibular grafts in the reconstruction of bone defects in orthopedic oncology. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 39(4):300-306, 2005.

57. Tomin E, Beksaç B, Joseph M, Lane MJ. Amerika Birleşik Devletlerinde Ortopedik Girişimleri Otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. *Journal of Arthroplasty and Arthroscopic Surgery*, 13:114-129, 2002.
58. Jablonski P, Goh BL, Maguire J, Glogowski I, Howden BO, Thomson NM, Stein AN. Apoptosis and the expression of genes of the Bcl-2 family and TGF-beta1 in rat renal allografts transplanted after donor-specific blood transfusion. *Transplant Proc*, 37(1):93-95, 2005.
59. Van der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands –a systematic literature review. *Acta Biomater*, 7:739–750, 2011.
60. Güven O. ve Keskin A. *Çağdaş Preprotetik Cerrahi*, Ankara, 88-89, 2001.
61. Efeoğlu, A. *Periodontal Kemik Cerrahisi*, Şubat (http://www.istanbul.edu.tr/dishekimligi/notlar/Periodontal_Kemik_Cerrahisi.pdf), 2009.
62. Tuskan C, Yalıtık M, *Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateryaller*, 66, 2002.
63. Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*. 9th Edition. W.B.Saunders Company, Los Angeles, 2004.
64. Garg AK. *Biology, Harvesting, Grafting for Dental İmplants*. 1.ed. China, Quintessence Publishing, 21-56, 2004.
65. Benlidayı ME. *Sinüs Tabanı Greftlemesi ve Eş Zamanlı İmplant Yerleştirme İşlemlerinde Sığır Kaynaklı Spongioz Hidroksiapatit Blok ve Granül Hidroksiapatit Greft Materyallerinin Deneysel Olarak Karşılaştırılması*. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız-Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Adana, 2008.
66. Çizmeci Şenel F. *Solvent Anhidrate Yumuşak Doku Greftlerinin Doku Uyumunun Deneysel İncelenmesi*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
67. Precheur HV. *Bone Graft Materials*. *Dent Clin N Am*, 51:729–746, 2007.
68. Kökden A, Türker M. *Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri ve Biyomateryaller*. Cumhuriyet Üniversitesi Dishekimliği Fakültesi Dergisi; 2(2):134-140, 1999.

69. Wolfe MW, Salkeld SL, Cook SD. Bone Morphogenetic Proteins in the treatment of non unions and bone defects: historical perspective and current knowledge. *J Orthop Trauma*, 12(6):407-412, 1998.
70. Buck BE, Malinin TI. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop Relat Res*, Jun, (303):8-17, 1994.
71. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol*, Sep, 77(9):1555-1563, 2006.
72. Adem, A. Yağlı kalsiyum hidroksit süspansiyonun ve ksenogreft + trombosit zengin plazma (TZP) karışımının deneysel olarak kemik defektlerinde uygulanmasının kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak histolojik değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. İstanbul, 109s, 2007.
73. Laurencin, CT, Khan, Y. Bone graft substitute materials. *Medicine*. _nstant Access to the minds of medicine. www.emedicine.com/orthoepadic, 2005.
74. Moore WR, Grave SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*; 71:354-61, 2001.
75. Betz RR. Limitations of autograft and allograft. New synthetic solutions. *Orthopedics*; 25:561-570, 2002.
76. Hardin CK. Banked Bone. *Otolaryngol.Clin. North Am*, 27:911 -25, 1994.
77. Simonds RJ, Holmberg SD, Hurwitz RL, Coleman TR, Bottenfield S, Conley LJ, Kohlenberg SH, Castro KG, Dahan BA, Schable CA. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a sero-negative organ and tissue donor. *N. Engl. J. Med*, 326:726-32, 1992.
78. Ashammakhi N, Ferretti P. Topics in tissue engineering. Volume I (Electronic book), 7:1-46, 2003.
79. Kalfas HI. Principles of Bone Healing. *Neurosurg Focus*, 10(4):1-4, 2001.
80. Baslé MF, Grizon F, Pascaretti C, Lesourd M, Chappard D. Shape and orientation of osteoblast-like cells (Saos-2) are influenced by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. *J Biomed Mater Res*, 40:350-7, 1998.
81. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of

- experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg*, 50(3):241-249, 1992.
82. Abushahba F, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects: An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res*, 19:329–334, 2008.
83. Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ. Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11(1):26-34, 1996.
84. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob A. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clin Oral Implants Res*, 11(3):230-241, 2000.
85. Avera SP, Stampley WA, McAllister BS. Histologic and clinical observations of resorbable and nonresorbable barrier membranes used in maxillary sinus graft containment. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12(1):88-94, 1997.
86. Tofe, A.J., Watson, B.A., Bowerman, M.A. Solution and cell mediated resorption of grafting materials. *J Oral Implantol*, 17:345, 1991.
87. Timoçin N, Kaynar A, Öztürk S, Sungur A, Demiryont M. Biocoral Uygulanan Kemik Defektlerinde İyileşmenin Radyonüklit ve Histopatolojik Yöntemlerle İncelenmesi. *İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi Eylül* 27(3):173–78, 1993.
88. Özeç İ. Lokal olarak uygulanan Recombinant Human Bone Protein-2'nin distraksiyon osteogenezisi üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 2003.
89. Suzuki T, Bessho K, Segami N, Lizuka T, Nojima T. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein2 in the oral and maxillofacial area of the human embryo, *Br J Oral Maxillofac Surg*, 39:289-93, 2001.
90. Wozney John M. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, 27(16):2-8, 2002.
91. Tanja R, Simone B, Anja-Katrin B. Bone morphogenetic proteins induce expression of metalloproteinases in melanoma cells and fibroblasts. *Eur J, Cancer*, 44:2526–2534, 2008.

92. Yıldırım A, Tunik S, Çetin Ç, Akkuş M. Osteogenezde fibroblast büyüme faktörleri (FBF) ve kemik morfogenetik proteinlerin (KMP) rolü. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg, 10(2):135-140, 2009.
93. Jian SUN, You-cheng YU, Zhang-yu GU, Liang, GU, Wei BI. Effect of BMP-2 on osteogenesis of bone mesenchymal stem cells in rats. Shanghai Journal of Stomatology, 20(4), 2011.
94. Song I, Kim BS, Kim CS, Im GI. Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. Biochem Biophys Res Commun, 408(1):126-31, 2011.
95. Kim S, Kang Y, Krueger CA, Sen M, Holcomb JB, Chen D. Sequential delivery of BMP-2 and IGF-1 using a chitosan gel with gelatin microspheres enhances early osteoblastic differentiation. Acta Biomater, 2012.
96. Notodihardjo FZ, Kakudo N, Kushida S, Suzuki K, Kusumoto K. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. J Craniomaxillofac Surg, 2011.
97. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology, 5th. Edition. WB Saunders Company, Philadelphia, 2005.
98. Powell C, Scott S, Collins L. Comparison of TNF α and TNF- β cytolytic mechanism in human ovarian and cervical carcinoma cell lines. Gynecol Oncol, 71:258-265, 1998.
99. Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Prostack L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. J Clin Periodontol, 18:548-554, 1997.
100. Erdemir EO, Duran I, Haliloğlu S. Effects of smoking on clinical parameters and the gingival crevicular fluid levels of IL-6 and TNF- α in patients with chronic periodontitis, J. Clin. Periodontal, 31:99-104, 2004.
101. Bruunsgaard H, Skinhoj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) and atherosclerosis. Clin. Exp. Immunol, 121:255-260, 2000.
102. Tracey KJ. Tumor necrosis factor, Remick DG., Friedland JS. (Ed.) Cytokines in Health and Disease, New York, Marcel Dekker, 223-240, 1997.

103. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: Fibroblast biology. *J. Periodontol*, 74:103- 110, 2003.
104. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation*, 10(1):45-6, 2003.
105. Kong YY, Feige U, Sarosi I, et al. Activated T cell regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402:304-309,1999.
106. Aggarwal B, Shishodia S. *Resveratrol in Health and Disease*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006.
107. Soleas GJ, Angelini M, Grass L, Diamandis EP, Goldberg DM. Absorption of trans resveratrol in rats. *Methods Enzymology*, 335:145-154, 2001.
108. Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agric and Food Chemistry*, 48:253-256, 2000.
109. Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem*, Aug;16(8):449-66, 2005.
110. Jeandet P, Bessis R, Gautheron B The production of resveratrol (3,5,4'trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *Amer. J.Enol.Vitic*, 42(1):41-46, 1991.
111. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*, 66(8):663-73, 2000.
112. Pervaiz S. Resveratrol from grapevines to mamalian biology. *The FASEB Journal Vol 17*, 2003.
113. Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A. Cardioprotection of red wine: role of poyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res*, 25:115-120, 1999.
114. Haneke KE. Review of toxicological literature, trans-resveratrol (501-36-0). *Integrated Laboratory Systems*, P.O. Box 13501, Research Triangle Park, North Carolina 27709, Contract No N01-ES-65402, 2002.

115. Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, et al. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res*, 24(3):133-8, 1998.
116. Celotti E, Ferrarini R, Zironi R. Resveratrol content of some wines obtained from dried vapolicella grapes. Reccioto and Amarone. *Journal of Chromatography A*, 730:47-52, 1996.
117. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr*, 68(6):1208-14, 1998.
118. Ma ZH, Ma QY, Wang LC, et al. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res*, 54(12):522-7, 2005.
119. Marier JF, Chen K, Prince P, et al. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res*, 69(2):151-4, 2005.
120. Khanna S, Roy S, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic Biol Med*, 31(1):38-42, 2001.
121. Dai Z, Li Y, Quarles LD, et al., Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine*, 14:806-14, 2007.
122. Guglielmotti MB, Alonso C, Itoiz ME, Cabrini RL. Increased osteogenesis in alveolar wound healing elicited by demineralized bone powder. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 48(5):487-490, 1990.
123. Alberius P, Johnell O. Repair of membraneous bone fractures and defects in rats. *J Cranio Maxillofac Surg*, 19:15-20, 1991.
124. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*, 7(10):1918-1929, 2012.

125. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, 205:299–308, 1986.
126. Anderson M.L, Dhert WJ, Bruijn JD. Critical size defect in the goat's os ilium. A model to evaluate bone grafts and substitutes, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 364:231–239, 1999.
127. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials, *Journal of Craniofacial Surgery*, 1(1):60–68, 1990.
128. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci*, 104(4):384-6, 2007.
129. Calixto JC, Lima CE, Frederico L, Lima RP, Anbinder AL. The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *J Craniomaxillofac Surg*, 39(3):215- 20, 2011.
130. Lima CE, Calixto JC, Anbinder AL. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Braz Oral Res*, 25(1):42-8, 2011.
131. Baldık Y, Talu U, Altınel L, Bilge H, Toker GA. Nitrik oksitin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin radyolojik incelenmesi: sıçanlarda deneysel çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 34:190-197, 2000.
132. Özer K. Ratlarda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine doksisisiklin veya rifamisin ile karıştırılarak uygulanan sığır kaynaklı demineralize kemik greftinin kemik iyileşmesine olan etkisinin histomorfometrik olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 75s, 2014.
133. Ün EC Lokal olarak uygulanan rifamisinin bone morfogenetik protein salınımı ve yeni kemik oluşumu üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas, 78s, 2013.
134. Trotta DR, Gorny C, Zielak JC, Gonzaga CC, Giovanini AF, Deliberador TM. Bone repair of critical size defects treated with mussel powder

- associated or not with bovine bone graft: Histologic and histomorphometric study in rat calvaria. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 42(6):738-743, 2014.
135. Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*, 38(1):33-37, 2007.
136. Thaller SR, Hoyt J, Dart A, Borjeson K, Tesluk H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *Journal of Craniofacial Surgery*, 5(4):242-246, 1994.
137. Yip I, Ma L, Mattheos N, Dard M, Lang NP. Defect healing with various bone substitutes. *Clinical oral implants research*, 26(5):606-614, 2015.
138. Cohen RE, Mullarky RH, Noble B, Comeau RL, Neiders ME. Phenotypic characterization of mono-nuclear cells following anorganic bovine bone implantation in rats. *Journal of Periodontology* 65:1008–1015, 1994.
139. Accorsi-Mendonça T, Conz MB, Barros TC, Sena LÁD, Soares GDA, Granjeiro JM. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Brazilian oral research*, 22(1):5-10, 2008.
140. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorphometric evaluations at 9 months. *J. of Periodontology*, 71:1015-1023, 2000.
141. Simion, M, Trisi P, Piattelli A. Vertical ridge augmentation using a membrane technique associated with osseointegrated implants. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 14(6), 1994.
142. Bozkaya S, Karaca İ, Oygür T, Barış E. An Experimental Evaluation Of The Bone Healing. *ADO Klinik Bilimler Dergisi*, 2(2):87-97, 2008.
143. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental materials journal*, 28(4):396-400, 2009.
144. Froum SJ, Wallace SS, Elian N, Cho SC, Tarnow DP. Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting. *Int J Periodontics Restorative Dentistry* 26(6):543-551, 2006.

145. De Santis E, Botticelli D, Pantani F, Pereira FP, Beolchini M, Lang NP. Bone regeneration at implants placed into extraction sockets of maxillary incisors in dogs. *Clin Oral Implants Res*:430-437, 2011.
146. Bostrom MPG, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop*, 11:403-412, 2000.
147. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M. Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone*, 22(6):605-612, 1998.
148. Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Einhorn TA. Impaired Fracture Healing in the Absence of TNF- α Signaling: The Role of TNF- α in Endochondral Cartilage Resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(9):1584-1592, 2003.
149. Elmali N, Esenkaya I, Harma A, Ertem K, Turkoz Y, Mizrak B. Effect of resveratrol in experimental osteoarthritis in rabbits. *Inflammation research*, 54(4):158-162, 2005.
150. Uysal T, Gorgulu S, Yagci A, Karslioglu Y, Gunhan O, Sagdic D. Effect of resveratrol on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture: early bone changes. *Orthodontics & craniofacial research*, 14(2):80-87, 2011.
151. Casarin RC., Casati MZ, Pimentel SP, Cirano FR, Algayer M, Pires PR, Ribeiro FV. Resveratrol improves bone repair by modulation of bone morphogenetic proteins and osteopontin gene expression in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 43(7):900-906, 2014.
152. Yaman İ, Derici H, Kara C, Kamer E, Deniz G, Ortac R, Sayin O. Effects of resveratrol on incisional wound healing in rats. *Surg Today*, 43:1433–1438, 2013.
153. Mizutani K., Ikeda K, Kawai Y, Yamori Y. Resveratrol stimulates the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 253(3):859-863, 1998.
154. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochemical Pharmacology*, 59:865-870, 2000.

155. Feng YH, Zou JP, Li XY. Effects of resveratrol and ethanol on production of pro-inflammatory factors from endotoxin activated murine macrophages. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23:1002-1006, 2002.
156. Asikainen AJ, Hagström J, Sorsa T, Nojonen J, Kellomaki M, Juuti H. Soft tissue reactions to bioactive glass 13-93 combined with chitosan. *J Biomed Mater Res A.*; 83(2):530-7, 2007.
157. Thomadakis G, Ramoshebi LN, Crooks J, Rueger DC, Ripamonti U. Immunolocalization of bone morphogenetic protein-2 and -3 and osteogenic protein-1 during murine tooth root morphogenesis and in other craniofacial structures. *Eur J Oral Sci*, 107:368–377, 1999.
158. 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. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 41:173–178, 2003.
159. Su JL, Yang CY, Zhao M, Kuo ML, Yen ML. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and antitumor activity of resveratrol. *J Biol Chem*, 282:19385–98, 2007.

8 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Tuğçe ÇEVİK

Doğum Yeri ve Tarihi : SAMSUN, 10.01.1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dil : İngilizce

İletişim Adresi : Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 58140-SİVAS

E-posta Adresi : tugcecevik_89@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : Samsun Anadolu Lisesi, 2002-2006

Yüksek Lisans : Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2006-2011

Uzmanlık : Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 2012-halen

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Uzmanlık Öğrencisi 2012-

Katıldığı Bilimsel Aktiviteler

- 5th Annual International Symposium of Advanced Protocols in Oral Implantology, April 20-23, 2013, Antalya, Turkey
- 6th Annual International Symposium of Advanced Protocols in Oral Implantology, April 20-23, 2014, Antalya, Turkey
- MIS Oral İmplantoloji İleri Cerrahi ve Sinüs Lifting Semineri, 18 Ocak 2015, Malatya
- TAOMS 22nd International Scientific Congress in 19-22 May 2015, Bodrum, Turkey
- TAOMS 23th International Scientific Congress in 26-30 May 2016, Bodrum, Turkey

EKLER

EK-1

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : 65202830/172
Konu : Etik Kurul Kararı.

25.12.2014

Sayın

Doç.Dr. Hasan Hüseyin KÖŞGER
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş ve Çene Cerrahisi

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 25.12.2014 tarihinde Prof.Dr. Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Doç.Dr. Hasan Hüseyin KÖŞGER'in yürütücülüğünü yapmış olduğu 12.12.2014 tarih ve 74 sayılı "Ratlarda oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerine sıgır kaynaklı deproteinize kemik greftiyle birlikte uygulanan sistemik resveratrolün yeni kemik oluşumu üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi " isimli Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Eray-BULUT
Üye

Prof.Dr.Mustafa TURAN
Üye

Prof.Dr.Zübeyda Akın POLAT
Üye

Doç.Dr.İhsan HÜBBEZOĞLU
Üye

Doç.Dr.Bülent SARAÇ
Üye

Doç.Dr.Mehmet TUZCU
Üye

Yrd.Doç.Dr.Gülay YILDIRIM
Üye

Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye

Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye – Başkanvekili

Turhan DUYMUŞ
Sivil Üye
Katılmadı

Semiha EKİNCİ
Sivil Üye
Katılmadı

Prof.Dr. Haki KARA
Başkan

