



**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**LOKAL OLARAK UYGULANAN RİFAMİSİNİN BONE  
MORFOGENETİK PROTEİN SALINIMI VE YENİ KEMİK  
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK  
İNCELENMESİ**

**EMİN CELALETTİN ÜN**

**DOKTORA TEZİ**

**AĞIZ DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**SİVAS  
2013**



CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LOKAL OLARAK UYGULANAN RİFAMİSİNİN BONE  
MORFOGENETİK PROTEİN SALINIMI VE YENİ KEMİK OLUŞUMU  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

EMİN CELALETTİN ÜN

DOKTORA TEZİ

AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI  
DOÇ. DR. İLKER ÖZEÇ

SİVAS  
2013

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. Suphi MÜDERRİS	_____
Üye	Prof. Dr. Hasan YELER	_____
Üye	Prof. Dr. Erkan ERKMEN	_____
Üye	Doç. Dr. H. Hüseyin KÖŞGER	_____
Üye (Danışman)	Doç. Dr. İlker ÖZEÇ	_____

#### ONAY

Bu tez çalışması, 28/03/2013 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ömer POYRAZ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

## ÖZET

### LOKAL OLARAK UYGULANAN RİFAMİSİNİN BONE MORFOGENETİK PROTEİN SALINIMI VE YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Emin Celalettin ÜN

Doktora Tezi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlker ÖZEÇ

2013, 78 Sayfa

Kemik dokusu rejenerasyon özelliğine sahip bir dokudur. Ancak geniş kemik defektlerinde defektin iyileşme süreci fibröz doku dolumu ile sonuçlanabilmekte ve bu durum defektin rekonstrüksiyonunu engelleyebilmektedir. Yapılan çalışmalar, defekt alanında “Bone Morfogenetik Protein (BMP)” konsantrasyonunun artmasının defektin kemik dokusu dolumuyla iyileşmesini sağladığını göstermiştir. Bu nedenle araştırmacılar kemik dokuda BMP salınımını artıracak yöntem ve faktörler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Antimikrobiyal ajanların yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Ancak antimikrobiyal bir ajan olan rifamisin BMP salınımı ve yeni kemik oluşumu üzerine etkileri konusunda yeterli bilgi mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı kemik defektine lokal olarak uygulanan rifamisin BMP salınımı ve yeni kemik oluşumu üzerine etkilerini incelemektir.

Çalışmamızda 24 adet Wistar Albino rat kullanılmıştır. Deney hayvanları her birinde 8 rat olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. 5mm çapında standart kritik boyutta kemik defekti, sağ mandibula angulus bölgesinde oluşturulmuştur. Kontrol grubunda herhangi işlem yapılmamıştır, ilk deney grubunda defekt rifamisin ile irrig edilmiştir, ikinci deney grubunda ise defekte rifamisin emdirilmiş spongostan kollajen yerleştirilmiştir. Tüm hayvanlar 21. günde sakrifiye edilmiştir. Histolojik olarak immünohistokimyasal (bone morfogenetik protein-2 anti-bodies) ve histomorfometrik değerlendirme yapılmıştır. İstatistiksel yöntem olarak Kruskal Wallis analizi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Sonuç olarak rifamisin kritik boyutta kemik defektinin iyileşmesine anlamlı derecede katkı sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Rejenerasyon, bone morfogenetik protein, rifamisin, histomorfometri.

## **ABSTRACT**

### **AN EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF LOCALLY APPLIED RIFAMYCIN EFFECTS ON RELEASE OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN AND NEW BONE FORMATION**

Emin Celalettin ÜN

Doctorate Thesis, Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Supervisor: Doç. Dr. İlker ÖZEÇ

2013, 78 pages

Bone is a tissue that have regeneration. But time of defect healing might be concluded with fibrosis in large bone defect and this condition might be inhibit defect's reconstruction. The certain studies showed that to increase of "Bone Morphogenetic Protein (BMP)" concentration in defect area provide to healing the defect with bone tissue. So the researcher have study about the method or factor that increased BMP release and new bone formation. There is various studies that research to effect of antimicrobial agents to new bone formation. However rifamycin is an antimicrobial agent, there is no enough information about the effect of BMP release and new bone formation. In this study, we aimed to investigate the effects on release of BMP and new bone formation of locally applied rifamycin to bone defects.

24 adult Wistar Albino rats were used in our study. Experimental group animals were divided into 3 groups of to include 8 rats for each group. Standardized 5.0 mm diameter critical size bone defect was created in right mandible angulus. In the control group there has not been any process, the defect was irrigated with rifamycin in the first experimental group, rifamycin impregnated spongostan collagen was placed in defect in the second experimental group. All the rats were sacrificed at 21<sup>th</sup> day after surgery. Histological evaluation was performed as histomorphometric and immunohistochemistry analysis (bone morphogenetic protein-2 anti-bodies). Data were analysed using Kruskal Wallis analysis and Mann Whiyney U test.

In conclusion rifamycin contributing significantly to healing to critical size bone defect.

**Key Words:** Regeneration, Bone Morphogenetic Protein, Rifamycin, Histomorphometry

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve bu çalışmamda beni yönlendiren danışmanım Sayın Doç. Dr. İlker ÖZEÇ'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cihat AVUNDUK ve Yrd. Doç. Dr. Hasan ESEN'e teşekkür ederim.

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

Teze katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ufuk TAŞDEMİR'e teşekkür ederim.

Doktora eğitimimiz sürecine birlikte başladığımız, birçok zorluğu beraber göğüslediğimiz sayın Dt. Mustafa KIRTAY'a ve bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Maddi ve manevi katkılarından dolayı Dt. Nur Efşan CENGİZ'e teşekkür ederim.

Her konuda sabırla yardımlarını esirgemeyen ve benim bu günlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kemik Doku.....	4
2.1.1 Kemiğin Yapısal Elemanları.....	6
2.1.1.1 Hücresel Elemanlar.....	6
2.1.1.1.1 Osteoblastlar.....	6
2.1.1.1.2 Osteositler.....	7
2.1.1.1.3 Osteoklastlar.....	8
2.1.1.1.4 Osteoprogenitör Hücreler.....	10
2.1.1.2 Kemik Matrisi.....	10
2.1.1.2.1 Organik Matris.....	11
2.1.1.2.2 İnorganik Matris.....	11
2.1.2 Kemik Türleri.....	11
2.1.2.1 Primer Kemik Dokusu (Woven Kemik).....	12
2.1.2.2 Sekonder Kemik Dokusu.....	12
2.1.3 Kemikleşme Çeşitleri.....	14
2.1.3.1 Intramembranöz Kemikleşme.....	14
2.1.3.2 Endokondral Kemikleşme.....	16
2.1.4 Kemik İyileşmesinin Fizyopatolojisi.....	19
2.1.4.1 Pıhtı Oluşumu.....	20
2.1.4.2 Yaranın Temizlenmesi.....	20
2.1.4.3 Yeni Doku Oluşumu.....	20
2.1.4.4 Oluşan Yeni Dokuda Modeling ve Remodeling.....	21
2.1.5 Kritik Boyutlu Defekt.....	22
2.2 Bone Morfogenetik Protein.....	22
2.3 Rifamisin.....	26
3 MATERYAL ve METOD.....	29
3.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	29
3.2 Cerrahi Teknik.....	30
3.3 Ratların Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması.....	38
3.4 Histomorfometrik Yöntem.....	38
3.5 İmmünohistokimyasal Yöntem.....	39
3.6 İstatistiksel Yöntem.....	41



4	BULGULAR.....	42
4.1	Klinik Bulgular.....	42
4.2	Histopatolojik Bulgular.....	42
4.2.1	Yeni Oluşan Kemik Alanlarının Değerlendirilmesi.....	46
4.2.2	Osteoblast Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi.....	47
4.2.3	Osteoklast Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi.....	48
4.2.4	Fibroblast Hücre Sayılarının Değerlendirilmesi.....	49
4.2.5	Yeni Damar Oluşumunun Değerlendirilmesi.....	50
4.3	İmmunohistokimyasal Bulgular.....	51
5	TARTIŞMA.....	56
6	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	66
	KAYNAKLAR.....	67
	ÖZGEÇMİŞ.....	78

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Yassı kemikte iç ve dış yüzeylerdeki kompakt kemik ve arasındaki süngerimsi kemiğin şematik görünümü.....	5
Şekil 2.2	Kemik hücrelerinin farklılaşma yollarının şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3	Osteositin kanalikül içerisindeki sitoplazmik uzantısının uzunlamasına kesiti.....	8
Şekil 2.4	Rezorbsiyon alanındaki bir osteoklastın şematik görüntüsü.....	10
Şekil 2.5	Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik olarak mikroskopik görüntüsü.....	13
Şekil 2.6	İntramembranöz kemikleşmenin şematik gösterimi .....	16
Şekil 2.7	Endokondral kemikleşmenin şematik gösterimi.....	18
Şekil 3.1	Rat mandibulasında oluşturulan defektin şematik gösterimi.....	30
Şekil 3.2	Operasyon sahasının traş edilmesi.....	32
Şekil 3.3	Operasyon sahasının betadine kullanılarak boyanması.....	32
Şekil 3.4	Operasyon sahasının örtülmesi ve cilt insizyonu.....	33
Şekil 3.5	Denek mandibulasında defekt oluşturulacak kemiğin görüntüsü.....	33
Şekil 3.6	Deney aşamasında kemik defekti oluşturmak için kullanılan trefin frez.....	34
Şekil 3.7	5 mm çapında kemik osteotomisi.....	34
Şekil 3.8	Osteotomi sonrasında oluşan kritik boyutta kemik defekti.....	35
Şekil 3.9	Deney aşamasında kullanılan rifamisin solüsyonu.....	35
Şekil 3.10	Defekt bölgesinin rifamisin ile irigasyonu.....	36
Şekil 3.11	Deney aşamasında kullanılan insülin enjektörü.....	36
Şekil 3.12	25 mg rifamisinin spongostan kollajene emdirilmesi.....	37
Şekil 3.13	Spongostan kollajenin defekte yerleştirilmesi.....	37
Şekil 3.14	Defekt bölgesine implante edilmiş spongostan kollajen.....	38
Şekil 3.15	Clemex PE 3.5 görüntü analiz programı ile yeni oluşan kemik bölgelerinin gösterimi.....	39
Şekil 4.1	Hematoksilen boyama ile hücrelerin gösterilmesi.....	42
Şekil 4.2	Kontrol grubuna ait histolojik görüntü.....	43
Şekil 4.3	1.Deney grubuna (rif grubu) ait histolojik görüntü.....	44
Şekil 4.4	2.Deney grubuna (spg grubu) ait histolojik görü.....	45
Şekil 4.5	Gruplara ait 21. gündeki ortalama yeni kemik oluşumu alanı değerlerinin dağılımı.....	46
Şekil 4.6	Gruplara ait 21. gündeki ortalama osteoblast hücre sayılarının dağılımı.....	47
Şekil 4.7	Gruplara ait 21. gündeki ortalama osteoklast hücre sayılarının dağılımı.....	48
Şekil 4.8	Gruplara ait 21. gündeki ortalama fibroblast hücre sayılarının dağılımı.....	49
Şekil 4.9	Gruplara ait 21. gündeki ortalama yeni damar oluşumunun dağılımı.....	50

Şekil 4.10 Gruplara ait 21. gündeki ortalama Anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısının dağılımı.....	52
Şekil 4.11 Kontrol grubunda Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi.....	53
Şekil 4.12 Rif irrigasyon grubunda Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi.....	54
Şekil 4.13 Spongostanlı grupta Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi.....	55

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Çalışma gruplarının şematik gösterimi.....	30
Çizelge 4.1 Tüm gruplara ait ölçümlerin karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.2 Her üç gruba ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması.....	55

## SİMGELER DİZİNİ

Ca	Kalsiyum
Ca(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Kalsiyum fosfat
Ca(PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	Hidroksi apatit kristalinin kimyasal yapısı
cm	Santimetre, metrenin yüzde biri
gram(+)	Gram pozitif
gram(-)	Gram negatif
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm <sup>2</sup>	Milimetre kare
μ	mikron
μg	mikrogram
ph	Bir sıvının ya da ortamın asit veya bazlık derecesini gösteren değer
PO <sub>4</sub>	Fosfat
vb.	Ve benzeri
Yy	Yüzyıl

## KISALTMALAR DİZİNİ

ACS	Absorbable collagen sponge
Ark.	Arkadaşları
BFF	Büyüme farklılaşma faktörü
BMP	Bone morfogenetik protein
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
HA	Hidroksi apatit
HIF 1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$
IGF	Insulin like growth factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü)
IM	İntramüsküler
MÖ	Milattan önce
MRSA	Metisiline dirençli streptococcus aureus
OP	Osteojenik protein
PAF	Platelet aktive eden faktör
PF	PEGylated fibrinogen
PRP	Platelet rich plasma
rhBMP	Rekombinant human bone morfogenetik protein
RNA	Ribo nükleik asit
TGF	Transforming growth factor (Transforming büyüme faktörü)
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta (Transforming büyüme faktörü beta)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotelial büyüme faktörü)

## 1. GİRİŞ

Kemik, vücudun yapı iskeletini oluşturmak için özelleşmiş bir bağ dokusudur. Ancak kemik dokunun görevi sadece diğer dokulardan teşekkül eden yapıları desteklemekle sınırlı değildir. Aynı zamanda çeşitli vücut boşluklarındaki hayati organları korumak, kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğini barındırmak ve kalsiyum, fosfor gibi mineraller için depo oluşturmak gibi vazifeleri de görür. Kemik doku organizmanın yaşamı boyunca oluşabilecek bir yaralanmaya, bazen skar dokusu dahi oluşmadan, tamirle cevap verebilen yüksek derecede rejenerasyon özelliğine sahip bir dokudur. Yaralanan kemik yapı, şekil ve fonksiyonunu yeniden kazanabilmektedir. Fakat yaralanma boyutu büyük olduğu zaman iyileşme sınırlı kalabilmektedir (Özeç ve ark., 2007; Kruse ve ark., 2010; Donos ve ark., 2011). Kritik boyutlu defekt; kemik dokuda, canlının yaşamı boyunca şekil ve fonksiyon olarak kendiliğinden tamamen iyileşmesinin mümkün olmayacağı boyuttaki defekt anlamına gelir. Bu tip defektler, kemik dokudan çok fibröz bağ dokusuyla dolmuş ve iyileşme göstermektedir (Develioğlu, 2003; Özeç ve ark., 2007; Schmidmaier ve ark., 2009).

Kemik defektlerinin tamiri ve restorasyonunun çok eski bir tarihi vardır. M.Ö. 3000’li yıllarda maden devrinde cerrahlar rekonstrüksiyon amacıyla altın ve gümüş tabakaları greft materyali gibi kullanıyorlardı (Kahnberg, 2005). Özellikle 20. Yy.da greft materyalleri üzerine çalışmalar iyice yoğunlaşmış ve otojen, allojen, ksenogreftler geniş kullanım alanı bulmuştur.

Kendiliğinden tamiri mümkün olmayan defektlerde tedavi için otojen greft uygulaması altın standart olarak kabul edilir (Özeç ve ark., 2007). Ancak otojen kemik greftlerinin bazı dezavantajları, bu greft türünün kullanımını ciddi anlamda kısıtlayabilmektedir. Günümüzde araştırmacılar kritik boyutta kemik defekti iyileşmesini sağlamak amacıyla çeşitli büyüme faktörlerini defekt alanına lokal uygulamış ve iyileşmede pozitif etkilerini görmüşlerdir (Srouji ve ark., 2005; Gomez ve ark., 2006; Santana ve Trackman, 2006).

Takagi ve Urist (1982), 6 aylık Srague Dawley ratlarında 8 mm.lik defekt oluşturup iyileşmeyi histolojik yönden incelemişlerdir. Defektin kemik iyileşmesiyle çapının 5 mm’ye düştüğünü gözlemlemişlerdir. Ancak defektin merkezi fibröz bağ dokusuyla iyileşme göstermiştir. Halbuki “Bone Morfogenetik Protein (BMP)” uygulanmış deney defektlerinde neredeyse tamamen bir iyileşme olmuştur.

BMP ailesi kritik boyutlu defektin iyileşmesinde olumlu etki yapan faktörler arasında en yüksek osteoindüktif etkiye sahip gruptur (Özeç ve Yeler, 2003; Özeç ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2009; Kanczler ve ark., 2010). Defekt alanına lokal olarak uygulanması veya ilgili alanda BMP salınımının artması iyileşmede olumlu etkiler oluşturur (Özeç ve Yeler, 2003).

BMP'ler transforming growth faktör beta (TGF- $\beta$ ) süperfamilyası üyesidir. Günümüzde 15 adet BMP tanımlanmıştır. BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'nin en etkin osteoindüktif özelliklere sahip olduğu ve bu üçü arasında da BMP-2'nin kemik induksiyonu özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür (Yasko, 1992; Wozney, 1995; Kusumoto ve ark., 1996; Boyne ve ark., 1997; Kusumoto ve ark., 1997; Kubler ve ark. 1998; Ripamonti ve Duneas, 1998; Groeneveld ve Burger, 2000; Seto ve ark., 2001; Özeç ve Yeler, 2003; Özeç ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2009).

Son zamanlarda in vivo ortamda yapılan BMP çalışmaları daha çok BMP salınımını ve dolayısıyla kemik oluşumunu artıracak biyomateryaller üzerinedir. Örneğin serum kolesterol seviyesini düşürmek için kullanılan bir ilaç olan statinlerin kemik oluşumunu artırdığı görülmüştür. Olayın mekanizmasının incelenmesi sonucunda, statinlerin kemik hücrelerinden BMP-2 salınımını artırarak kemik oluşumunu stimüle ettikleri belirlenmiştir (Özeç ve ark., 2007).

Rifamisin günümüzde tüberküloz tedavisinde ve meningokok bakterilerin yol açtığı hastalıkların profilaksisinde sıklıkla kullanılan bir antibiyotiktir (Şehitoğlu ve ark., 1992; Kayaalp, 2009). Streptomyces Meditarranei'dan üretilmiş ve Rifamisin A, B, C, D ve E diye adlandırılan 5 alt gruba ayrılmıştır (Kayaalp, 2009). Rifamisin sıklıkla açık ve kapalı yaraların irrigasyonunda, enfekte olmuş cerrahi ya da kutanöz yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (Taşdemir, 2011). Rifamisin'in yan etkileri oldukça azdır. Genellikle ilacı aralıklı alan kişilerde grip benzeri semptomlar görülmektedir. Rapor edilen diğer yan etkiler interstisyel nefrit, trombositopeni ve hemolitik anemidir (Kayaalp, 2009; Taşdemir, 2011).

Diş hekimliğinde rifamisin kök kanalı ve pulpal kavite enfeksiyonlarında, abse formasyonunda, maksiller sinüs veya fistül temizlenmesi gibi gram(+) organizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda lokal olarak kullanılır (Carvalho ve ark., 1997). Carvalho ve ark. (1997) yaptıkları bir çalışmada 64 ratta diş çekimi yapmış ve çekim soketlerinde fibrinolitik alveolit oluşmasını sağlamışlardır. Daha sonra ratları 4 gruba ayırmışlardır. 1. grupta bir tedavi uygulanmamış, 2. grupta sokete Gelfoam yerleştirilmiş, 3. grupta soket Rifosin M (75 ml) ile irrig edilmiş, 4. grupta ise sokete



Rifosin M emdirilmiş Gelfoam yerleştirilmiştir. 21 günün sonunda araştırmacılar yapılan histolojik incelemede 1. ve 2. grupta belirgin bir iyileşme olmadığını, 4. grupta ise seyrek kemik yapımlarını izlemişlerdir. Buna karşın 3. grupta soketin servikal ve orta üçlüsünün tamamen farklılaşmış kemikle dolduğunu belirtmişlerdir. Taşdemir ve ark. (2011) yaptığı başka bir çalışmada kontamine olan otojen grefti, rifamisin ile dekontamine ederek uygulamış ve 21.günde sakrifiye edilen deney grubunda greft alanındaki BMP-2 miktarının, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3 kat fazla olduğunu ve bunun istatistiksel anlamlı olduğunu grmştir.

Bu projenin hipotezi, yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçlarına bağlı olarak kurgulanmış ve antimikrobiyal bir ajan olan ve lokal olarak cerrahi işlemlerde sıklıkla kullanılan rifamisinin, BMP-2 salınımı ve yeni kemik oluşumu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kemik Doku

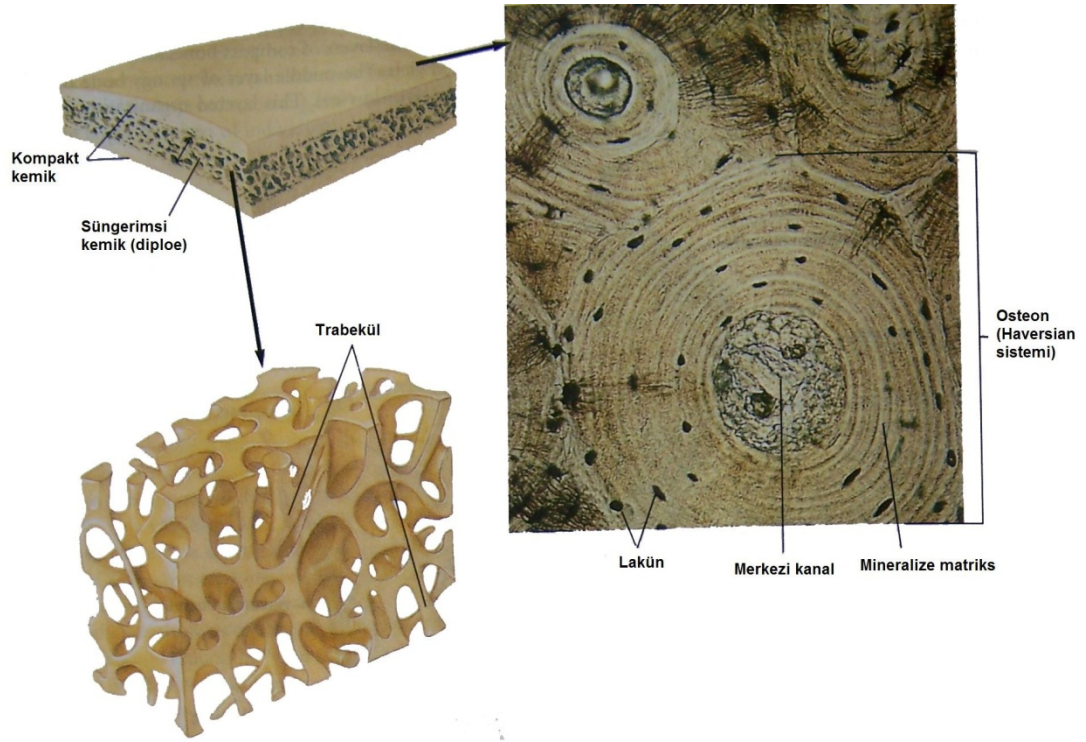
Kemik, vücuttaki birçok fonksiyonu yerine getirebilmek için özelleşmiş, hücre dışı matriksin kalsifikasyon olarak adlandırılan bir işlemle kalsiyum ve fosfat tuzlarına doyması ile oluşan sert, bükülmez bir bağ dokusudur. En önemli görevi vücudun yapı iskeletini oluşturmaktır. Ayrıca çeşitli vücut boşluklarındaki hayati organları korumak, kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğini barındırmak, kalsiyum ve fosfor gibi mineraller için depo oluşturmak gibi görevleri de vardır (Altay, 2006; Kierszenbaum, 2006; Özyiğit, 2007).

Kemik dokuda dikkat çeken diğer bir özellik de yapısal organizasyonudur. Kemik oldukça dayanıklı bir yapı olmasına karşın hafiftir ve vücut ağırlığının sadece onda birini oluşturur (Özyiğit, 2007). Gerilme ve kırılmaya karşı direnci doğadaki birçok metalden fazla olmasına rağmen esnek ve elastik bir yapıya sahiptir. Fizyolojik sınırları aşmayan kuvvetlerle eğildiğinde ya da büküldüğünde eski formuna dönebilir. Kemiğin direncinin en düşük olduğu kuvvetler rotasyonel kuvvetlerdir (Nordin ve Frankel, 1990; Özyiğit, 2007).

Kemik dokusu; kortikal (kompakt veya lamellar) ve spongioz (süngerimsi veya kansellöz) kemik olarak ikiye ayrılır. Kortikal kemik, yassı kemiklerin (kafatası, göğüs kemikleri vb.) iç ve dış tabakalarını ve uzun kemiklerin (tibia, femur vb.) dış yüzünü oluşturur. Kortikal kemiğin ana yapısını “osteon” denen bir sistem oluşturur. Osteon; vertikal dizili vasküler kanalları (havers kanalları) saran silindirik şekilli vasküler kemik dizisidir. Horizontal dizilimli kanallar (volkmann kanalları) ise komşu osteonları birleştirir. Kortikal kemiğin mekanik dayanımı bu osteonların sıkı dizilimine bağlıdır (Young ve Heath, 2000; Kalfas, 2001; Altay, 2006). Spongioz kemik ise kortikal kemik yüzleri arasını doldurur. Balpeteği görünümlü, hematopoetik elemanlar içeren kemik iliğini barındırır. Bal peteği görünümü kemik iliği tarafından doldurulan boşluğu sınırlayan trabeküllerin oluşturduğu bir ağ örgüsünden kaynaklanır. Trabeküller genellikle kortekse dik yerleşimli uzanır. Spongioz kemiğin bu yapısı, baskı ve gerilim tipi streslere karşı mekanik dayanımını artırır (Gehron-Robey ve Boskey, 1996; Gorski, 1998; Tanaka ve ark., 2000; Kalfas, 2001; Alturfan ve Akalın, 2002; Altay, 2006; Taşdemir, 2011) (Bkz. Şekil 2.1).

Bütün kemiklerin iç ve dış yüzeyleri, kemik yapan ve tamir eden hücreler içeren, dış yüzeylerde “periosteum” ve iç yüzeylerde “endosteum” olarak adlandırılan doku

tabakaları ile örtülüdür (Park ve Bronzino, 2002; Junqueira ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2006). Periosteum, eklem yüzeyleri hariç kemiği dıştan saran sıkı bağ dokusudur. Kemiğe sıkıca bağlantısı “sharpey lifleri” denen, dik veya oblik yönde uzanarak dış esas lamellere kadar kemiğe sokulan periostal kollajen lifler ile sağlanmıştır. Periosteum; dışta sıkı fibröz, içte gevşek ve hücreden zengin (kambiyum tabakası) olmak üzere iki tabakadan oluşur. Kemik progenitör hücreleri ve büyüme faktörleri periosteumun kambiyum tabakasında bulunur (Kierszenbaum, 2006; Özyiğit, 2007). Endosteum, kemik iliğini barındıran iç kemik boşluklarının yüzeyini örten ince retiküler bağ dokusu tabakasıdır. Hem kemik hem de kan hücreleri yapma potansiyeline sahiptir (Kierszenbaum, 2006; Durmuş, 1995).



**Şekil 2.1** Yassı kemikte iç ve dış yüzeylerdeki kompakt kemik ve arasındaki süngerimsi kemiğin şematik görünümü (Thibodeau, G.A. and Patton, K.T. (2003). *Anatomy and Physiology*, 5 ed., Mosby Inc., China, 190–202p)

## **2.1.1 Kemiğin Yapısal Elemanları**

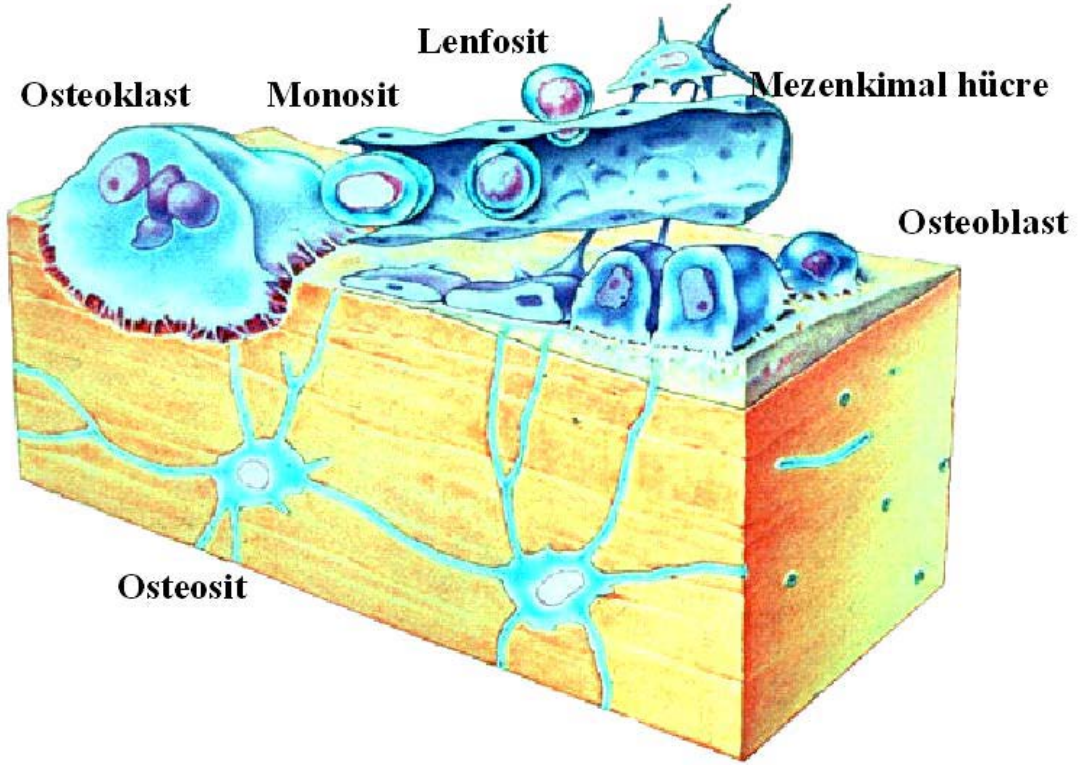
### **2.1.1.1 Hücresel Elemanlar**

#### **2.1.1.1.1 Osteoblastlar**

Kemik matriksinin organik bileşenlerinin (kollajen, proteoglikan, glikoprotein vb.) sentezinden ve mineralizasyonundan sorumlu, yeni kemik oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir. Ayrıca kemiğin inorganik bileşenlerinin organik matriks içerisinde çökmesi yine osteoblast varlığına bağlıdır. Embriyonel yaşamda mezenkim hücrelerinden, daha sonraları da bağ dokusunun genç fibrositlerinden (fibroblastlar) farklılaşır ve etraflarına kemik doku matriksini salgılayarak doku içerisinde kalır ve mineralizasyondan sonra osteositlere değişirler. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde tek katlı epitelyum hücreleri gibi yan yana tek sıra olarak dizilmişlerdir. Kübik veya prizmatik şekilli ve bazofilik sitoplazmaya sahiptirler. Bazofilik sitoplazmaları RNA'dan zengin ribozomların çok bol miktarda bulunmasından kaynaklanır. Büyüme faktörleri, protein ve kollajen gibi organik bileşenler salgıladıklarından granüler endoplazmik retikulumları ve golgi aparatları çok iyi gelişmiştir (Altay, 2006; Junqueira ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2006).

Osteoid, osteoblastlar tarafından oluşturulan, özellikle tip I kollajen ve proteoglikanlardan zengin henüz kalsifiye olmamış matriks tabakasıdır. Bu tabaka yan yana dizilmiş osteoblastlar ile olgunlaşmış kemik yüzeyi arasında bulunur. Osteoblastlardaki alkalin fosfatazın osteoid içerisine geçmesiyle ortamda bulunan organik fosfat esterlerinden ayrılan fosfat grubu, kan ve doku sıvısı içerisinde bulunan kalsiyum tuzlarıyla birleşip kalsiyum fosfat halinde çökmesiyle kalsifikasyon gerçekleşmiş olur. Böylece kalsifiye kemik içerisinde kalmış olan osteoblastlar, osteositlere dönüşmüş olur (Junqueira ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2006) (Bkz Şekil 2.2).

Osteoblastlar; tip I kollajen, glikoprotein, proteoglikan, osteonektin, osteokalsin gibi proteinleri salgırlar. Ayrıca kemik rejenerasyonunda hayati önemi olan “bone morphogenetic protein (BMP)”, “transforming growth factor (TGF)”, “Insulin growth factor (IGF)” gibi büyüme faktörleri ve sinyal proteinlerini de sentezleyen osteoblastların yüzeyinde çeşitli hormonlar, vitaminler ve reseptörler de bulunur (Cormack, 1993; Bancroft ve Stevens, 1996; Lynch ve ark., 1999; Gartner ve Hiatt, 2001; Fawcett ve Jensch, 2002; Altay, 2006; Özyiğit, 2007).



**Şekil 2.2** Kemik hücrelerinin farklılaşma yollarının şematik gösterimi (Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık (Çeviri Ed.: Prof. Dr. Ramazan Demir), İstanbul)

#### 2.1.1.1.2 Osteositler

Kalsifikasyondan sonra olgunlaşmış kemik içerisinde kalan osteoblastlardan farklılaşmış hücrelerdir. Matriks kanalcıkları arasındaki boşluklarda (laküna) bulunurlar. Farklılaşma sırasında, damar yapıyla ve komşu hücrelerle iletişim halinde olmak için çevreye sitoplazmik uzantılar gönderirler. Bu uzantılar sayesinde kemik sıvısı en derinde bulunan osteositlere kadar uzanmış olur ve dolayısıyla gerekli metabolitlerin ve iyonların transfer edilebilmesi sağlanır (Mundy ve Martin, 1993; Garant, 2003; Fonseca ve ark., 2005; Junqueira ve Carneiro, 2006) (Bkz. Şekil 2.3).

Osteositler, içinde buldukları laküna ile aynı şekilde olup kesitlerinde yassı ve ovaldirler. Kemiğe gelen kuvvetler karşısında salgıladıkları faktörler sayesinde pre-osteoblastlar sayıca artar ve kemikte remodelasyon ve apozisyon mekanizması çalışır (Bancroft ve Stevens, 1996; Gartner ve Hiatt, 2001).





**Şekil 2.3** Osteositin kanalikül içerisindeki sitoplazmik uzantısının uzunlamasına kesiti (Fonseca, R.J., Walker, R.V., Betts, N.J., Barber, H.D., Powers, M.P. (2005). *Oral and Maxillofacial Trauma*, 3 rd edition, Elsevier Saunders, China, Vol. 1)

### 2.1.1.1.3 Osteoklastlar

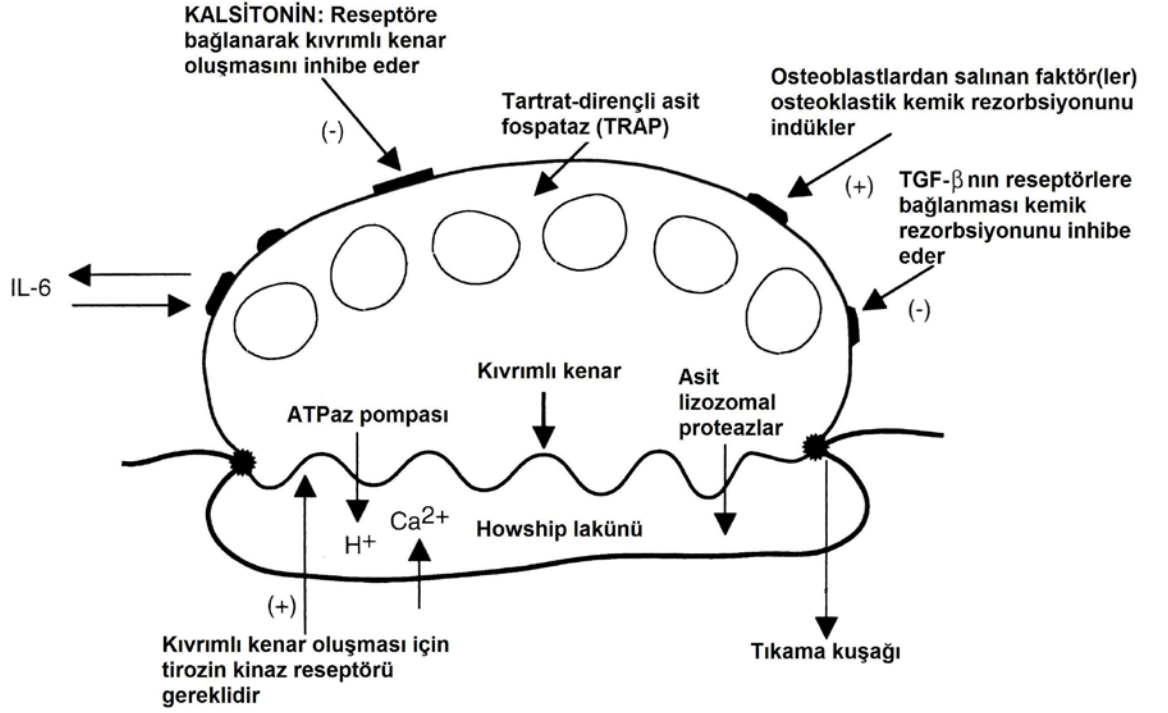
Diğer kemik hücrelerine nazaran çok daha büyük, çok çekirdekli (2-100 çekirdek), genellikle düzensiz şekilli, hareket edebilen hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro, 2006; Özyiğit, 2007). Osteoklastlar; osteoprogenitör kök hücreler, mononükleer fagosit sistemi hücreleri, dolaşımdaki farklılaşmamış mononükleer hücrelerden (pre-osteoklast) köken alırlar (Özyiğit, 2007). Osteoklastlar, “howship lakünası” denen, kemiğin enzimlerle eritilip oyulduğu çukurcuklara yayılmışlardır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Osteoklastların sitoplazmalarında asit fosfataz içeren granüller bulunur. Aktif osteoklastlarda kemik matriksine bakan yüzey düzensizce katlanıp fırçamsı bir kenar oluşturur. Bu kenarın etrafında organel içermeyen sitoplazmik bir bölge (şeffaf bölge)

oluşur. Bu bölge aktin flamanlarından zengindir. Burası osteoklastın kemik matriksine tutunduğu alandır ve rezorbsiyon için mikroçevre oluşturur (Ballı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006). Hidrojen iyonları, serbest radikaller, asit fosfatazlar ve katepsin gibi lizozomal proteazlar kıvrımlı kenardan salınırlar. Bu ajanlar alttaki kemiğin rezorbe olmasını sağlar (Bkz. Şekil 2.4). Rezorbsiyon alanı osteoklastın tıkaç kuşağı ile sınırlandırılır. Bu kuşakta integrin, vitronektin ve osteopontin bulunmaktadır (Özyiğit, 2007). Aktif kemik rezorbsiyonu, kemik yüzeyindeki howship lakünalarında osteoklast varlığı ile tanımlanır. Bu şekildeki rezorbsiyon alanı düzensiz görünümde ve osteoid içermez. Bu durum osteoklastların sadece mineralize kemik matriksinin bulunduğu alanlarda aktif olduğu düşüncesine götürür (Ballı, 2004).

Kemik çözünmesi sağlandıktan sonra osteoklastlar, kollajen yıkımı ve kalsiyum tuzlarının eritilerek emilmesi için kollajenaz ve diğer enzimleri salgırlar. Böylece açığa çıkan yıkım ürünlerini hücre altındaki cebe pompalarlar. Daha sonra bu ürünler, kapillere geçirilerek dolaşıma katılmış olur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Osteoklastların etkinlikleri; bifosfonatlar, kalsitonin ve östrojen hormonlarının etkileriyle azalırken tiroksin, paratiroid hormonlar ve D vitamini ile artar (Yang ve ark., 1996; Wozney, 1998). Ancak osteoklastların paratiroid hormon reseptörleri yoktur. Buna karşılık osteoblastlarda paratiroid hormon reseptörü vardır ve bu hormon ile uyarıldıklarında osteoklast uyarıcı faktör olan “sitokin” üretirler (Junqueira ve Carneiro, 2006).



**Şekil 2.4** Rezorbsiyon alanındaki bir osteoklastın şematik görüntüsü (Fonseca, R.J., Walker, R.V., Betts, N.J., Barber, H.D., Powers, M.P. (2005). *Oral and Maxillofacial Trauma*, 3 rd edition, Elsevier Saunders, China, Vol. 1)

#### 2.1.1.1.4 Osteoprogenitör hücreler

Mezenkim kaynaklı ana hücrelerin alt grubunu oluştururlar. Osteoprogenitör hücreler mitoz bölünme yeteneğine sahip olup çeşitli kemik hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Bu hücreler kemik yüzeyi yakınlarında, periosteumun iç yüzeyinde, endosteumda ve kompakt kemiğin vasküler kanallarında bulunur. Osteoprogenitör hücreler iğ şeklinde ve oval çekirdekli dirler (Erdoğan ve ark., 1999).

Elektron mikroskop ile yapılan çalışmalarda iki tip osteoprogenitör hücre tespit edilmiştir. Birincisi, gelişmemiş endoplazmik retikulum ve az gelişmiş golgi cisimciği ile karakterize pre-osteoblastlardır. İkincisi ise belirgin mitokondri ve çok sayıda serbest ribozomları ile karakterize osteoklastlara öncülük eden hücrelerdir (Kocaelli, 2000). Ayrıca bu hücrelerin düşük oksijen konsantrasyonlarında kondroblastlara dönüşme kapasiteleri de vardır (Gartner ve Hiatt, 2001; Fawcett ve Jensh, 2002).

#### 2.1.1.2 Kemik Matriksi

Organik materyal ve inorganik tuzlardan oluşmaktadır. Tipik olarak lamellar kemiğin % 8'i su, % 92'si katı materyallerden oluşmaktadır. Katı materyalin de % 21'ini organik matriks, %71'ini de inorganik matriks oluşturur (Fonseca ve ark., 2005).



### **2.1.1.2.1 Organik Matriks**

Organik matriks, inorganik tuzların depolanıp kristalleşmesi için kemiğe formunu verir. Matriksin %90'ı kollajen, geri kalanı proteindir. En sık rastlanılan proteinler; osteonektin, osteokalsin, osteopontin ve kemik siyaloproteindir. İşlevleri tam olarak bilinmeyen bu proteinlerin minaralizasyonda rol aldıkları sanılmaktadır. Kemik kollajeni Tip I kollajendir. Elektron mikroskop incelemelerinde, hidroksiapatit kristallerinin kollajen liflerin yanına tabakalar halinde yatmış olduğu ve etraflarının ara madde ile sarılı olduğu tespit edilmiştir. Minerallerin kollajen liflerle ilişkisi, kemik dokusunun sertliği ve direncinden sorumlu olmalarından kaynaklanır. Kemik, dekalsifiye edildiğinde şeklini korur ancak bir tendon kadar esnek hale gelir. Çoğunluğunu kollajenin oluşturduğu organik matriks kemikten uzaklaştırıldığında ise yine şeklini korur ancak kırılabilir hale gelir, dokunulduğunda kırılır ve ufalanır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

### **2.1.1.2.2 İnorganik Matriks**

Kemiğe sertliğini veren mineralize yapısı, kalsiyum ve fosfatın yüksek oranda özelleşmiş hidroksiapatit (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) denilen kristallerin depolanmasından kaynaklanır. Ayrıca inorganik matriks içeriğinde bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyuma da rastlanır. Bununla beraber inorganik matriks yapısında kristalize olmayan kalsiyum fosfat da mevcuttur (Oral, 2000; The Orthoteers Orthopedic Education Resource, 10 January 2001; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Hidroksiapatit kristallerinin kollajen lifler ile yaptığı özel dizilimde kemik kristallerinin, kollajen lifler arasındaki mikroskobik boşluklara, uzun eksenleri kollajen liflerin uzun eksenlerine paralel olacak şekilde yerleştiği görülür. Bu dizilim kemiğin, stres ve mekanik deformasyonlara karşı en iyi direnci kazanmasını sağlar (Özyiğit, 2007).

### **2.1.2 Kemik Türleri**

Kemiğin mikroskobik olarak incelenmesi sonucu iki farklı tip kemik bulunduğu ortaya çıkmıştır: Primer (woven, birincil, olgunlaşmamış ya da örgün) kemik ve sekonder (ikincil, olgun ya da lameller) kemik. Primer kemik, embriyolojik gelişim sürecinde, kırık ve diğer nedenlerle ilişkili onarım işlemlerinde ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Sekonder kemik, genellikle yetişkinlerde bulunan, kortikal ve spongios olarak iki yapısal türe ayrılan kemiktir (Ballı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006).

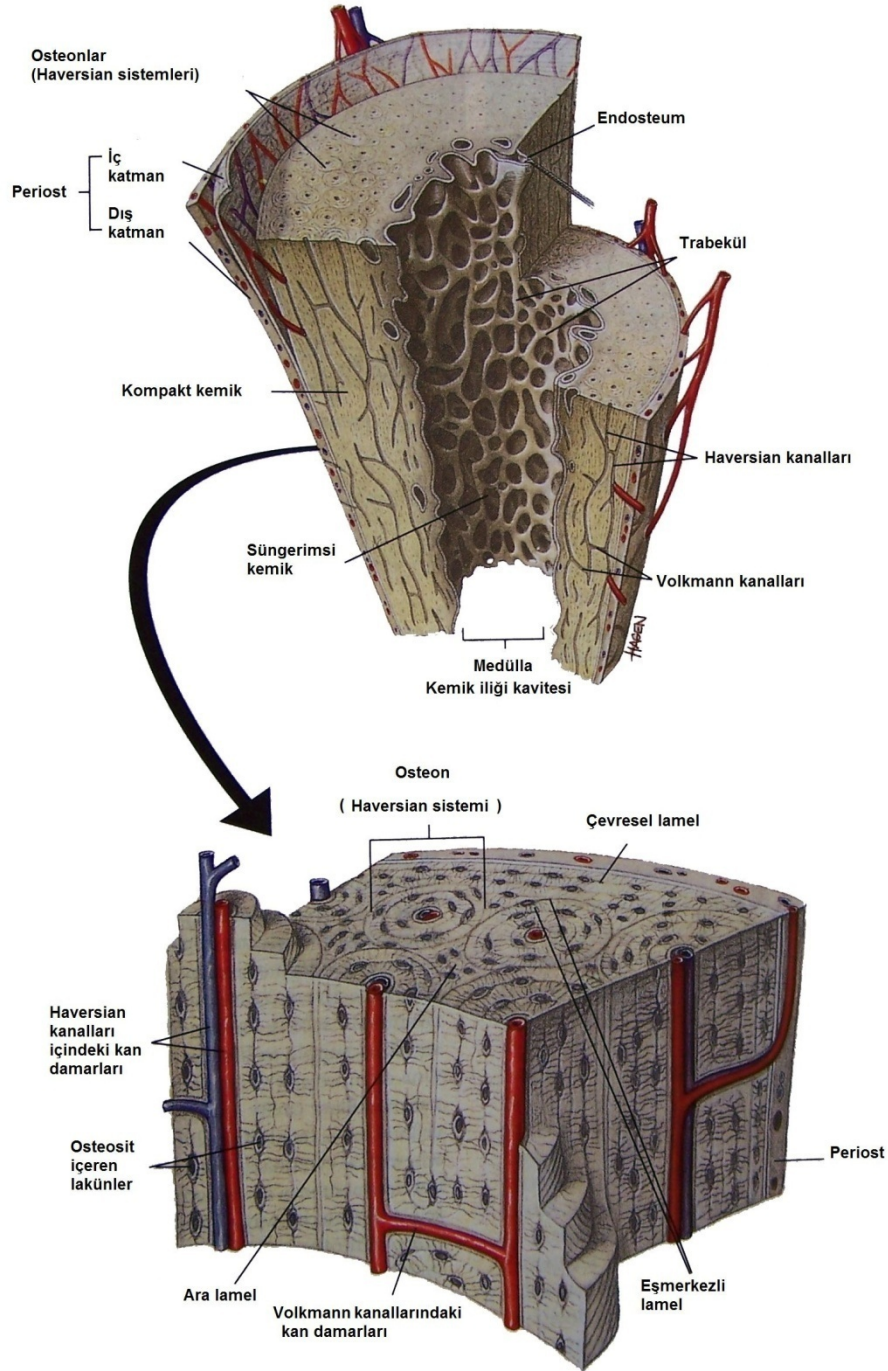
### **2.1.2.1 Primer Kemik Dokusu (Woven Kemik)**

Primer kemik, embriyolojik gelişim sürecinde, kırık ve diğer nedenlerle ilişkili onarım işlemlerinde ilk ortaya çıkan kemik türüdür (Aslan, 2002). Kan damarlarının yakınındaki osteoprogenitör hücreler tarafından üretilir. Sekonder kemiğin lameller halinde organize olmuş kollajen lif dağılımının aksine, primer kemik, rastgele ve değişik yönlere dağılmış ince kollajen lifleri ile özellik kazanmaktadır. Geçici bir kemik yapısı olup yetişkinde kafatasındaki yassı kemik eklemlerinde, dış alveollerinde ve tendonların kemiğe tutunduğu bölgeler gibi birkaç bölge dışında yerini 3-4 yaşından sonra lamellar kemiğe bırakır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

### **2.1.2.2 Sekonder Kemik Dokusu**

Sekonder kemik dokusu genellikle yetişkinlerde bulunan, kortikal ve spongioz olarak iki yapısal türe ayrılan kemiktir. Burada kollajen lifler tipik olarak birbirine paralel ya da vasküler bir kanal etrafında dairesel olarak yerleşmiş lameller şeklinde düzenlenmiştir. Kan damarlarını, sınırları ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe “Havers Sistemi” ya da “Osteon” denir (Kocaelli, 2000; Ballı, 2004; Bölükbaşı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006). Kemik yüzeyine dik olarak konumlanan diğer bir kanal sistemine ise “Volkmann Kanalları” denir. Volkmann kanalları içindeki damarlar Havers Kanallarının içindekilerle bağlantılıdır. Böylece kemiğin iç ve dış yüzeyleri arasında bağlantı sağlanmış olur (Altay, 2006).

Kortikal kemik yassı kemiklerin dış ve iç lamelleri ile uzun kemiklerin dış yüzeylerini oluşturur. Spongioz kemik ise yassı kemiklerin kortikal tabakaları arasında ve uzun kemiklerin metafizinde bulunur. Her ikisinde de aynı histolojik elemanlar vardır. Kortikal kemiğin ana ünitesi Havers Sistemidir. Spongioz kemiğin ana ünitesi ise “Trabekül” denen gözeneklerdir. Spongioz kemikte Havers sistemi bulunmaz. Trabeküller ince, düzensiz kemik lamelleri ve bunların içerisinde osteositleri bulunduran lakünalardan oluşmuştur. Bunların içinde kan damarları ve kemik iliği bulunur. Her bir trabekül endosteum adı verilen tabaka ile örtülüdür (Kocaelli, 2000; The Orthoteers Orthopedic Education Resource, 10 January 2001; Ballı, 2004; Bölükbaşı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006;) (Bkz. Şekil 2.5).



**Şekil 2.5** Kompakt ve süngerimsi kemiğin şematik olarak mikroskopik görüntüsü  
 (Thibodeau, G.A. and Patton, K.T. (2003). *Anatomy and Physiology*, 5 ed., Mosby Inc., China, 190–202p.)

### **2.1.3 Kemikleşme Çeşitleri**

Kemik yapımına, kemikleşme veya ossifikasyon adı verilir ki; bu da intramembranöz ve endokondral kemikleşme şeklinde iki yolla oluşur. Pek çok yassı kemiğin kaynak aldığı intramembranöz kemikleşmeye, mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde olduğundan bu isim verilmiştir. Endokondral kemikleşmede ise meydana gelecek kemiğin şekli, yapısı hiyalin kıkırdak olan küçük bir model içinde oluşur. Uzun ve kısa kemiklerin oluşumu genellikle endokondral kemikleşme ile olur. Her iki kemikleşme çeşidinde de oluşan ilk kemik primer (birincil veya örgü) kemiktir. Birincil kemik geçici bir kemik dokusu olduğundan kısa bir süre sonra yerini sekonder (ikincil veya lamellar) kemiğe bırakır. Bu kemik yapımı ve sonrasında yeniden modellenme sistemi büyüyen kemiklerde daha hızlı, yetişkinlerde ise daha yavaş olarak hayat boyu devam eder (Müftüoğlu, 1993; Junqueira ve Carneiro, 2006).

#### **2.1.3.1 İntramembranöz Kemikleşme**

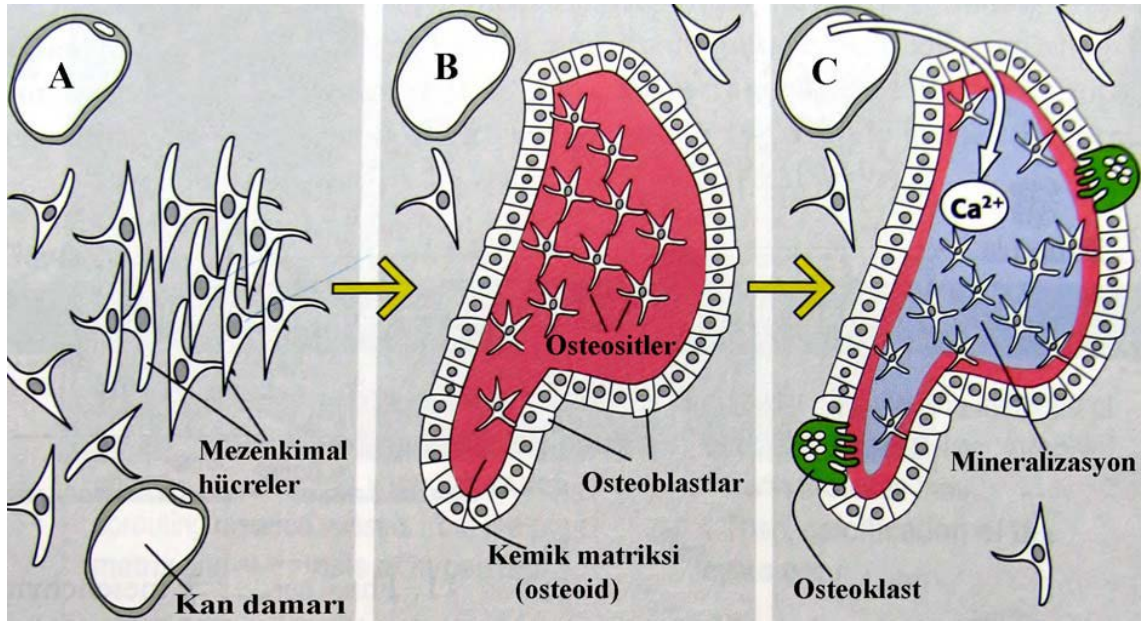
Pek çok yassı kemiğin kaynağı olan “intramembranöz kemikleşme”, mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde olduğu için bu adı almıştır. Frontal ve pariyetal kemiklerin tamamı ile oksipital ve temporal kemikler, mandibula ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. İntramembranöz kemikleşmenin kısa kemiklerin büyümesinde ve uzun kemiklerin kalınlaşmasında da rolü vardır (Oktaç, 1992; Junqueira ve Carneiro, 2006).

İntramembranöz kemikleşmenin meydana geleceği bölgelerdeki mezenkim hücrelerinde fibroblastlar oluşmaktadır. Fibroblast hücreleri kollajen fibrilleri yaparak, membran şeklinde bağ doku alanları meydana getirmektedirler. Bu zar oluşumunu takiben yine etraftaki mezenkim hücreleri, osteoblastların kaynağını oluşturacak olan osteoprogenitör hücrelere farklılaşır (The Orthoteers Orthopedic Education Resource, 10 January 2001). Mezenkim yoğunlaşması içinde kemikleşmenin başladığı ilk noktaya “primer kemikleşme merkezi” denir. Osteojenik ve osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşır. Yani olay bir grup mezenkimal hücrenin osteoblasta dönüşmesi ile başlar. Yeni kemik matrisinin oluşmasını kalsifikasyon takip eder, bunun sonucunda bazı osteoblastların etrafları sarılır ve daha sonra bu hücreler osteosit haline gelirler. Gelişmekte olan ve içerisinde kılcak kan damarları, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreleri içeren bu kemik adacıklarına histolojik kesitlerdeki görüntülerinden ötürü “spikül (iğnecik)” adı verilir. Kemikleşme merkezinde hemen

hemen aynı zamanlarda böyle birkaç grup ortaya çıkar ve bunlar birleşerek, zamanla süngerimsi yapıyı meydana getirirler (Oktay, 1992; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Mezenkimal doku yoğunlaşması içindeki hücreler bölünerek, kemikleşme merkezinin devamlı olarak büyümesinden sorumlu olan, daha fazla sayıda osteoblastı meydana getirirler. Birkaç kemikleşme merkezi ışınsal olarak büyüüp birleşerek başlangıçtaki orijinal bağ dokusunun yerini alırlar. Bebeklerdeki bingıldaklar (fontanellalar) buna bir örnek olarak gösterilebilirler. Bunlar bağ dokusundan oluşan, kafatasının henüz kemikleşmemiş yumuşak bölgelerine karşılık gelmektedirler (Oktay, 1992; Junqueira ve Carneiro, 2006)

Özellikle doğumdan sonra kafatasının yassı kemiklerinin gerek iç gerekse dış yüzeylerindeki intramembranöz kemik yapımının kemik yıkımına nazaran belirgin bir üstünlüğü vardır. Kafatası gelişmelere paralel olarak genişlemek zorundadır. Bu nedenle kafatası kemikleri devamlı olarak iç yüzeylerinden osteoklastlar tarafından yıkılırken aynı anda dış yüzeylerine osteoblastlar tarafından yeni kemik lamelleri eklenmekte ve böylece gelişme sona erdiğinde kompakt kemik şekillenmektedir. Böylece iki tabaka kompakt kemik (iç ve dış tabakalar) ortaya çıkar ama merkezi kısım süngerimsi yapısını korur. Bağ dokusu tabakasının kemikleşmeyen kısımları ise intramembranöz kemiğin endosteum ve periosteumunu yapar (Oktay, 1992; Ballı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006) (Bkz. Şekil 2.6).



**Şekil 2.6** İnamembranöz Kemikleşmenin Şematik Gösterimi. **A:** Mezenkimal hücrelerin göçü **B:** Mezenkimal hücrelerin önce osteoprogenitör hücrelere sonra osteoblastlara dönüşmesi **C:** Kılcal damarlardan osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonlarının taşınması, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonun sağlanması (Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık (Çeviri Ed.: Prof. Dr. Ramazan Demir), İstanbul)

### 2.1.3.2 Endokondral Kemikleşme

Bu tip kemikleşmede bağ dokusu veya mezenkim içinde kemiğe öncülük eden hiyalin kıkırdak dokusu oluşur; daha sonra bu kıkırdak taslağı yavaş yavaş ortadan kaldırılırken (kondro-rezorbsiyon) yerine yine mezenkim veya bağ dokusu tarafından oluşturulan kemik dokusu geçer. Kemiğe öncülük eden kıkırdak modeli, embriyoda kemiğin oluşmasından önce farklılaşan yumuşak doku ve kaslara destek ve tutunma dokusu olarak vazife görür. Kafatası tabanı ve omurga kemikleri gibi kemikler endokondral kemikleşme ile kemikleşirler. Endokondral kemikleşme, kıkırdak modelin yüzeyinde veya içinde oluşmasına göre perikondral ve endokondral olmak üzere iki şekilde olur. Perikondral kemikleşmede; kıkırdak rezorbsiyonu söz konusu değildir, mezenkim veya bağ dokusundan perikondrium, intramembranöz kemikleşmede olduğu gibi kemik dokusu oluşturularak kıkırdak yüzeyine yığılar. Bu şekilde oluşan kemik kompakt kemiktir. Endokondral kemikleşme ise kıkırdak taslağının ortasında olur. Burada bazı değişimlere uğrayan kıkırdak doku parçalanır ve yerini, perikondriumdan itibaren dejenere

kıkırdak içine kan damarları etrafında sokulan mezenkimin oluşturduğu kemik trabekülleri alır. Endokondral kemikleşme ile oluşan kemik spongios kemiktir (Ballı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2006).

Endokondral kemikleşme daha çok kısa ve uzun kemiklerin meydana getirilmelerinden sorumludur. Ancak bu tür kemikleşmenin karakteristik özellikleri en belirgin olarak uzun kemiklerde görülür (Ballı, 2004; Junqueira ve Carneiro, 2006; Kierszenbaum, 2006).

Uzun kemikler, genişlemiş iki uç (epifiz) ve silindirik bir gövdeden (diyafiz) oluşmuş hiyalin kıkırdak modellerden meydana gelir. Ortaya çıkacak olan ilk kemik dokusu diyafizleri saran perikondriumun içindeki intramembranöz kemikleşme yoluyla oluşur. Böylece kıkırdağı saran perikondriumun iç kısmında “kemik manşeti” adı verilen silindirik bir kemik tabakası meydana gelir. Yeni oluşan kemiği sardığı için bundan böyle perikondriyuma da periosteum adı verilir. Periosteumun oluşmasına paralel olarak kıkırdak hücreleri büyüyüp olgunlaşmakta ve alkalın fosfataz enzimi salgılamaktadırlar. Ara maddeye geçen bu enzim ise kalsiyum (Ca) ve fosfat ( $PO_4$ ) iyonlarından kalsiyum fosfatın ( $Ca(PO_4)_2$ ) şekillenmesine yardımcı olmakta, bunun sonucunda ise kireçlenen ara maddeye besinler ulaşmamaktadır. Böylece kıkırdak hücreleri yan yana gelerek ölü hale geçmektedirler. Yeni meydana gelen kemik manşetin içinde kalan kondrositler dejenere olur, kıkırdak matriksinin devamlılığını sağlama yetenekleri de ortadan kalkar; kalsiyum çökmeye başlar ve kıkırdak matriksi kalsifiye olur (Oktay, 1992; Cowin, 2001; Junqueira ve Carneiro, 2006).

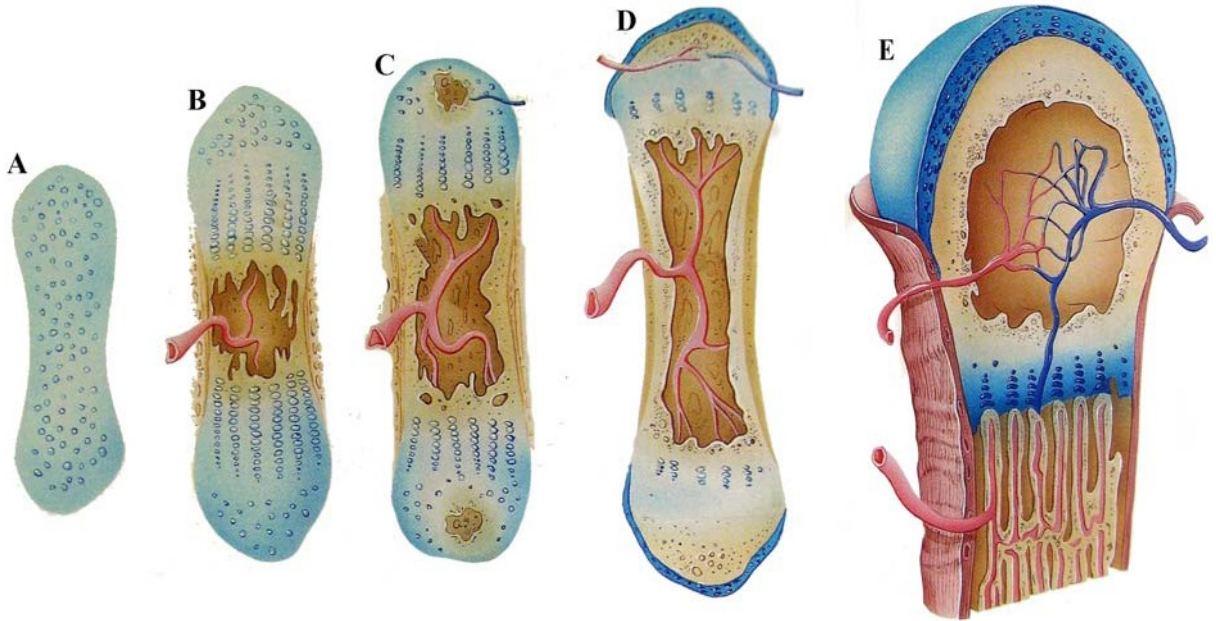
Periosteumdan kaynaklanan osteojenik tomurcuğun kan damarları, osteoklastlar tarafından kemik manşette açılan deliklerden geçerek kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi içine girer. Kan damarlarının yanı sıra osteoprogenitör hücreler de bu alana girerler. Prolifere olarak osteoblastları oluştururlar. Osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matriksi üzerinde aralıksız bir tabaka oluşturarak kemik matriksini sentezlemeye başlarlar. Böylece, kalsifiye olmuş kıkırdak artıkları üzerinde primer kemik sentezi başlar (Oktay, 1992; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Tanımlanan şekilde diyafizde ortaya çıkan kemikleşme merkezine “primer kemikleşme merkezi” adı verilir. Kemiğin uzun eksenindeki hızlı büyüme diyafizin tamamı kemikleştiğinde sona erer. Embriyonal gelişimin ileri aşamalarında, epifizlerin ortasında “sekonder kemikleşme merkezleri” meydana gelir. Ancak bu merkezlerin gelişimi bir kemikte bile aynı zamanlara isabet etmez. Bu merkezlerin fonksiyonları da primer merkezlerinkine benzer ancak büyüme merkezleri uzun eksene paralel değil



işinsaldır. Ayrıca eklem kıkırdaklarında perikondrium olmadığı için burada kemik manşeti benzeri bir yapı da oluşamaz (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Sekonder kemikleşme merkezlerinin oluşturduğu kemik dokusu epifizleri kapladığı zaman kıkırdak iki yerde hapsolür. Bunlardan biri hayat boyu kalıcı olan ve kemik yapımına katılmayan eklem kıkırdağı, diğeri ise epifizleri diyafizlere bağlayan “epifiz plağı ya da epifiz kıkırdağı”dır. Epifiz plağının kıkırdağı büyüdükçe bunun yerini çoğunluğu diyafiz merkezinde oluşan yeni kemik alır. Epifiz plağının büyümesi sona erdiğinde kemik uzaması da durur (Junqueira ve Carneiro, 2006) (Bkz. Şekil 2.7).



**Şekil 2.7** Endokondral Kemikleşmenin Şematik Gösterimi. **A:** Hyalin kıkırdak model **B:** Diyafiz kıkırdağını örten perikondriumun iç katındaki mezenkimal hücreler osteoprogenitör hücrelere, onlar da osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar üst üste yerleşen kemik lamellerini yapar. Böylece yeni kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında kemik manşet oluşur. **C:** Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesini bozarak, kondrositlerde hipertrofiye, ardından ölümlerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında kemik iliği kavitesi oluşur. **D:** Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler çoğalarak alt alta dizilen gruplar yaparlar. **E:** Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece epifiz plağı kalır (Garner, L.P. and Hiatt, J.L. (2001). Color Textbook Of Histology. Second edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Chapter 7, Cartilage and Bone).



#### 2.1.4 Kemik İyileşmesinin Fizyopatolojisi

İyileşme; yaralanmanın ardından birbirine bağlantılı hücresel, hümorale ve vasküler olayların sonucunda hücre yapı ve fonksiyonunu kazandıran doku cevabıdır. Kemik iyileşme kapasitesi, içindeki ve etrafındaki mezenkimal dokuların latent pozisyonu ile ilgilidir. Bu durum defekte karşı bölgesel bir tepkidir. Bu geçici osteojenik tepkinin başlayıp ilerlemesi ile defekt iyileşmesi ivme kazanır. Kötü iyileşme (non-union) ya da geciken iyileşme vakalarında bile tekrar aktivasyon sağlanabilir (Kocaelli, 2000).

İskelet sisteminin tüm sert doku elemanlarında kist, tümör operasyonları, travma, iç ve dış stresler gibi nedenlerle kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasına “kemik defektleri” denir. Kemik dokusu rejenerasyon özelliğine sahip bir dokudur. Fizyolojik reaksiyonlar bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Kemik iyileşmesi defekt oluştuğu andan itibaren başlar ve düzenli kemik doku ile defekt tamamen kapanıncaya kadar devam etmek ister (Alturfan ve Akalın, 2002; Kılıçoğlu, 2002).

Kemik dokudaki iyileşme, yaralanmanın karakterine göre rejenerasyon veya tamir olgularını içerir. Örneğin stabilize bir yeşil ağaç kırığında iyileşme rejenerasyon şeklinde olurken, kemikteki daha geniş bir defekt tamir ile iyileşir. 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 cereyan eder. Fakat yumuşak dokulardaki iyileşme sürecinden farklı olarak hasar gören ossifiye dokunun remodelasyon ve rekonstrüksiyonunda osteoblast ve osteoklastlar işe karışmaktadır (Peterson ve ark., 1993; Cotran ve ark., 1994).

Kemik dokudaki iyileşme de tüm bağ doku iyileşmelerinde olduğu gibi 4 safhada gerçekleşmektedir:

1. Pıhtı oluşumu
2. Yaranın temizlenmesi
3. Yeni doku oluşumu
4. Oluşan yeni dokuda modeling ve remodeling (Güngörmüş, 1996; Thibodeau ve Patton, 2003; Fonseca ve ark., 2005; Özyiğit, 2007)

#### **2.1.4.1 Pıhtı Oluşumu**

Yaralanmanın hemen ardından bölgedeki hasar gören damarlardan gelen kan defekt alanını doldurur. Damarlardan ve hasar görmüş hücrelerden ortaya çıkan proteinler, fibrinojenden fibrin ağı oluşumunu sağlayan bir dizi mekanizmayı başlatır. Plateletler, agregatları oluşturur ve fibrin ağı ile etkileşimde bulunarak kan pıhtısı oluşumu gerçekleştirilir. Oluşan pıhtı yaralanan damarları etkili bir şekilde tıkayarak kanamayı durdurur. Aynı zamanda fibrinopeptit, platelet aktive eden faktör (PAF) ve çeşitli büyüme faktörleri gibi mediyatörlerin de ortaya çıkmasını sağlar. Bu mediyatörlerin, vasküler geçirgenliği artırmak, mezenkimal hücrelere etki ederek farklılaşmalarını sağlamak ve lökositlerin kemotaksisini sağlamak gibi görevleri vardır (Ameto ve ark., 1996; Güngörmüş, 1996; Lindhe ve ark., 2003; Özyiğit, 2007).

#### **2.1.4.2 Yaranın Temizlenmesi**

Doku yaralanmalarını takiben makrofajlar derhal fagositik aktiviteyi başlatarak ilk savunma hattını oluştururlar. Enflamasyon alanında serbestleşen lökosit indükleyici faktör ya da granülosit serbestleyici faktörler öncelikle kana sonra da kemik iliğine geçerek burada daha önce yapılmış ve depolanmış lökositleri ve nötrofilleri mobilize ederler. Bu şekilde nötrofiller dolaşıma katılmış olur. Aynı zamanda bölgedeki enflamasyon lökosit yapımını da hızlandırmıştır. Bu hücreler defekt alanında yeni doku oluşumu başlamadan önce yaranın temizliğinden sorumludurlar. Makrofajların görevi sadece yara alanındaki artıkların uzaklaştırılmasıyla sınırlı değildir. Ayrıca defekt alanında, yeni doku oluşumu safhasında mezenkimal hücre göçü ve farklılaşmasını sağlayacak olan büyüme faktörleri ve sitokin salınımını da sağlar. Nötrofiller yara alanındaki görevlerini tamamladıktan sonra programlı hücre ölümü (apoptozis) denen sürece girer ve makrofajların fagositik aktiviteleri ile ortamdan uzaklaştırılırlar. Daha sonra makrofajlar yara yerinden uzaklaşırlar (Güngörmüş, 1996; Lindhe ve ark., 2003; Özyiğit, 2007).

#### **2.1.4.3 Yeni Doku Oluşumu**

Kemik iliği gibi yerlerden yara alanına göç eden mezenkimal hücreler ve fibroblastlara öncü hücreler, ekstraselüler alanda çoğalmaya ve matriks proteinlerini depo etmeye başlarlar. Bu şekilde oluşan dokuya “granülasyon dokusu” denir. Oluşan bu yeni doku kan pıhtısının yerini almaya başlar. Granülasyon dokusunun erken oluşum evresinde çok sayıda makrofaj, daha az sayıda mezenkimal hücre, kollajen lif demetleri ve yeni

damar tomurcukları bulunur. Sonraki aşamada makrofaj sayısı giderek azalır, fibroblast benzeri hücreler ve matriks içerisinde oluşan kan damarları giderek artar. Bu aşamadaki doku granülasyon dokusunun geç evresidir. Fibroblast benzeri hücreler büyüme faktörleri salmaya, çoğalmaya, çoğalan hücrelerin büyümesine rehberlik edecek ekstraselüler matriks depolamaya ve böylece dokunun daha fazla farklılaşmasını sağlamaya devam eder. Yeni oluşan kan damarları, giderek artan hücrelerin besin ve oksijen ihtiyacını karşılar. Mezenkimal hücreler tarafından gerçekleştirilen yeni matriks sentezi işlemine “fibroplazi”, bol miktarda yeni kan damarları oluşumuna da “anjyogenez” adı verilir. Fibroplazi ve anjyogenez işlemlerinin neticesinde oluşacak yeni kemik dokuya öncülük edecek bağ dokusu meydana gelir (Güngörmüş, 1996; Lindhe ve ark., 2003; Thibodeau ve Patton, 2003; Özyiğit, 2007).

Öncü bağ dokudan kemik yapıya geçiş, oluşan kan damarları boyunca gerçekleşir. Osteoprogenitör hücreler, kan damarları etrafında toplanırlar. Bu hücreler, osteoblastlara dönüşerek kollajen liflerle örülü ağsı bir kalıp oluştururlar. Böylece osteoid oluşur ve merkezden itibaren mineralizasyon başlar. Osteoblastlar osteoid yığmaya devam ettiklerinden hücreler mineralize yapı içinde hapsolür ve osteoid halini alırlar. Böylece oluşan kemiğe “ağsı kemik” adı verilir. Ağsı kemik, çevresinde oluşmaya devam eden kan damarlarına parmaksı uzantılar şeklinde teşekkül eder. Ağsı kemiğin trabekülleri, kan damarlarını çevreler ve giderek kalınlaşır. Böylece stabil bir kemik iskeleti oluşmuş olur (Güngörmüş, 1996; Lindhe ve ark., 2003; Thibodeau ve Patton, 2003; Özyiğit, 2007).

#### **2.1.4.4 Oluşan Yeni Dokuda Modeling ve Remodeling**

İlk kemik oluşumu süreci hızlı bir süreçtir. Kısa bir zaman içinde tüm defekt ağsı kemik ile dolar. Ağsı kemik, defekt için stabil bir iskelet oluşturmuş olur. Ayrıca bu yapı bol miktarda osteoprogenitör hücre kaynağıdır ve hücre işlevi, matriks gibi mineralizasyonu için de kan desteği sağlar (Nordin ve Frankel, 1990; Güngörmüş, 1996; Lindhe ve ark., 2003; Thibodeau ve Patton, 2003; Fonseca ve ark., 2005; Özyiğit, 2007).

Osteoklastik aktivite ile ağsı kemik yıkılmaya başlar ve primer osteonlar kademeli bir şekilde yerini lamellar kemiğe ve kemik iliğine bırakır. Böylece sekonder osteonlar oluşur. Primer kemik oluşumu birkaç hafta gibi kısa bir süreçtir ancak bu kemiğin yerini lamellar kemiğe bırakması aylar alır (Nordin ve Frankel, 1990; Güngörmüş, 1996; Lindhe ve ark., 2003; Thibodeau ve Patton, 2003; Fonseca ve ark., 2005; Özyiğit, 2007).

### **2.1.5 Kritik Boyutlu Defekt**

Kemik dokusu rejenerasyon özelliğine sahiptir ve yaralanan kemik doku şekil ve fonksiyonunu yeniden kazanabilmektedir. Fakat yaralanma boyutu büyük olduğu zaman iyileşme sınırlı kalabilmektedir (Özeç ve ark., 2007; Kruse ve ark., 2010; Donos ve ark., 2011). “Kritik boyutlu defekt”; kemik dokuda, canlılığın yaşamı boyunca şekil ve fonksiyon olarak kendiliğinden tamamen iyileşmesinin mümkün olmayacağı boyuttaki defekt anlamına gelir. Bu tip defektler, kemik dokudan çok fibröz bağ dokusuyla dolmuş ve iyileşme göstermektedir (Develioğlu, 2003; Özeç ve ark., 2007; Schmidmaier ve ark., 2009).

Takagi ve Urist (1982), 6 aylık Srague Dawley ratlarında 8 mm’lik defekt oluşturup iyileşmeyi histolojik yönden incelemiştir. Defektin kemik iyileşmesiyle çapının 5 mm’ye düştüğünü gözlemlemiştir. Ancak defektin merkezi fibröz bağ dokusuyla iyileşme göstermiştir.

Kendiliğinden tamiri mümkün olmayan defektlerde tedavi için otojen greft uygulaması altın standart olarak kabul edilir (Özeç ve ark., 2007). Ancak otojen kemik greftlerinin bazı dezavantajları, bu greft türünün kullanımını ciddi anlamda kısıtlayabilmektedir. Günümüzde araştırmacılar kritik boyutta kemik defektini iyileşmesini sağlamak amacıyla çeşitli büyüme faktörlerini defekt alanına lokal uygulamış ve iyileşmede pozitif etkilerini görmüşlerdir (Srouji ve ark., 2005; Gomez ve ark., 2006; Santana ve Trackman, 2006).

### **2.2 Bone Morfogenetik Protein**

Kemik, insan vücudunda yaralanma sonrası rejenerasyon yeteneğine sahip form ve fonksiyonunu yeniden oluşturabilen bir dokudur. Deneğin hayatı boyunca spontan olarak iyileşmesi mümkün olmayan en küçük kemik içi yara, kritik boyutta defekt olarak tanımlanmaktadır (Develioğlu, 2003; Özeç ve ark., 2007; Schmidmaier ve ark., 2009).

Kemik defektlerinin tamiri ve restorasyonunun çok eski bir tarihi vardır. M.Ö. 3000’li yıllarda maden devrinde cerrahlar rekonstrüksiyon amacıyla altın ve gümüş tabakalarını greft materyali gibi kullanıyorlardı (Kahnberg, 2005). 20. Yy.’a geldiğimizde greft materyalleri üzerine çalışmalar iyice yoğunlaşmış ve otojen, allojen, ksenogreftler geniş kullanım alanı bulmuştur. Kist ve tümör operasyonlarında, konjenital defektlerde, implant uygulamalarında ve kanser cerrahisi sonrası oluşan

kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda en sık otojen kemik greftleri kullanılmaktadır ve “altın standart” olarak tanımlanmaktadır (Peterson ve Ellis III, 1998; Kökden ve Türker, 1999; Güven ve Keskin, 2001; Chacon ve ark., 2004; Peleg ve ark., 2004; Kahnberg, 2005; Alfaro, 2006; Schlegel ve ark., 2006; Tezulaş ve Özkan, 2008). Çünkü otojen kemik greftlerdeki kemik oluşum hızı, kemik kalitesi ve iyileşme kullanılan diğer rekonstrüktif materyallere göre daha iyidir. Fakat, verici bölgede oluşan ikinci bir yaranın oluşması, işlem süresinin uzaması, istenilen miktarda elde edilememesi, hasta için travmatik olması ve greftin alındığı bölgeye göre farklılık gösteren çeşitli komplikasyonların oluşabilmesi gibi durumlar otojen greftlerin kullanımını oldukça kısıtlayabilmektedir (Oikarinen ve ark., 1997; Akay, 1998; Raghoobar ve ark., 2001; Marchena ve ark., 2002). Bu dezavantajlar, araştırmacıları özellikle yüzyılın son çeyreğinde, kritik boyuttaki defektin dahi doğal fizyolojik süreçle iyileşmesini sağlayacak büyüme faktörleri kullanımına yönlendirmiştir.

Kemik indüksiyonunu sağlayan proteinlerin izolasyonu ilk olarak 1979 yılında Urist tarafından gerçekleştirilmiş ve bu ürünün kemik morfogenetik aktivitesinin demineralize kemikten daha fazla olduğu görülmüştür. Bu proteinler Urist tarafından “Bone Morphogenetic Protein” veya “Osteogenic Protein (OP)” olarak isimlendirilmiştir (Wolfe ve ark., 1999; Suzuki ve ark., 2001; Özeç ve Yeler, 2003).

Yapılan çalışmalar; BMP’lerin birçok doku ve organın oluşumunda erken morfogenez sırasında olan epiteliyal mezenkimal etkileşimlerde morfogenerler olarak rol oynadıklarını göstermiştir. Suzuki ve ark. (2001) BMP-2’nin gelişmekte olan diş germelerinde, çene kemiğinde, çizgili ve düz kaslarda, spinal kord, nasal, trakeal ve özefagal epitelde lokalize olduğunu belirlemiştir. Embriyojenik hücrelerin BMP’lere cevap vererek kartilaj ve kemik hücrelerine diferansiye olmaları da, BMP’lerin embriyojenik iskelet sisteminin oluşmasında rol aldıklarını göstermektedir. BMP’nin osteojenik etkisi direk olarak olgun olmayan, primitif hücreler üzerinedir. Olgun osteoblastların BMP’ye cevap verme yeteneğini kaybettikleri tespit edilmiştir (Groeneveld ve Burger, 2000; Özeç ve Yeler, 2003).

BMP’ler, transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) süper ailesinin üyelerince salgılanan sinyal proteinleridir. Bu proteinlerin hedef hücreleri ise mezenkimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler BMP reseptörlerinin tümünü bulundurlar (Wozney ve ark., 1988; Yıldırım ve ark., 2009). Bu proteinler ilk defa kemiricilerin kas dokusuna implante edildiğinde ektopik kemik oluşumunu uyardıklarından molekül olarak tanımlanmışlardır (Kronenberg, 2003; Yıldırım ve ark., 2009). Bu işlevde,

mezenkimal prekürsör hücreler yoğunlaşır ve kıkırdak plak ile plağı çevreleyen perikondrium olmak üzere iki farklı dokuya farklılaşır. Ardından kıkırdak plak içerisinde yer alan kondrositler, proliferasyon, hücre siklusunda duraklama, hipertrofi, kalsifikasyon ve en sonunda hücre ölümü gibi, bir dizi süreçlerden geçer. Hipertrofik tabakanın etrafında yer alan kalsifiye matriksin kemikleşmesi, bu bölgedeki osteoblast hücrelerinin vaskülarizasyonu ile sağlanır (Kawabata ve Miyazono, 2000; Yıldırım ve ark., 2009).

BMP'lerin hem *invivo* hem de *invitro* olarak osteoblast farklılaşmasında etkili oldukları gösterilmiştir (Miyazono ve ark., 2005). BMP'ler Tip-I ve Tip-II transmembran serin/tireonin kinaz reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler (Karsenty, 2000). BMP-2,3,4,5,6,7 ve büyüme-farklılaşma faktör-5 (BFF-5)'in gelişen iskelet yapılarından salınmaları, bu BMP'lerin farklılaşma ve gelişimde rol alabileceklerini işaret etmektedir (Zhang ve ark., 1996; Yıldırım ve ark., 2009). BMP'lerin fizyolojik rollerini açığa çıkarmak için, birçok BMP yoksun fare üretilmiş ve homozigotik BMP-2 ve BMP-4 defektli farelerin iskelet gelişimi başlamadan öldükleri izlenmiştir (Winnier ve ark., 1995; Daluiski ve ark., 2001; Yıldırım ve ark., 2009).

Günümüzde 15 adet BMP tanımlanmıştır. Aminoasit diziliş benzerliklerine göre altgruplara ayrılmışlardır. BMP-2 ve 4 birinci altgrubu, BMP-5 ve 8 ikinci bir altgrubu oluşturmaktadır. BMP-4, BMP-5, BMP-6 ve BMP-7 de BMP-2 ye benzer yolla kemik indüksiyonu yapabilmektedir. Bu proteinler arasında BMP-2'nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür (Yasko, 1992; Wozney, 1995; Kusumoto ve ark., 1996; Boyne ve ark., 1997; Kusumoto ve ark., 1997; Kubler ve ark. 1998; Ripamonti ve Duneas, 1998; Groeneveld ve Burger, 2000; Seto ve ark., 2001; Özeç ve Yeler, 2003; Özeç ve ark., 2007; Yıldırım ve ark., 2009).

Yetişkin memelilerde BMP osteoblastlar ve osteositler tarafından sentez edilmekte ve primer olarak kemik ve dentinde yer almaktadır. Wozney (1988) bir çalışmada BMP'nin DNA zincirinin klonlanmasını gerçekleştirmiş ve bu işlemle BMP'lerin rekombinant olarak istenilen miktarlarda üretilmesi sağlanmıştır. Klinikte, BMP'nin rekombinant formunun pürüfiye edilerek elde edilen formundan daha güvenli olarak kullanılabilceği düşünülmektedir. Bessho ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada recombinant human bone morphogenetic protein-2'nin (rhBMP-2) ve insan kemik matriksinden pürüfiye edilerek elde edilen BMP-2'nin kemik indüktif özellikleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak recombinant olarak elde edilen BMP'nin pürüfiye olarak elde edilenin onda biri oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Günümüzde rekombinant human bone morphogenetic protein-2'nin (rhBMP-2) çoğunluğu chinese hamster over hücreleri kullanılarak elde edilmektedir. Esherichia coli veya chinese hamster over hücreleri kullanılarak elde edilen rhBMP-2'nin osteoindüktif özelliklerinin karşılaştırılması sonucunda iki proteinin indüktif aktivitelerinin benzer olduğu görülmüştür (Bessho ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalar ile 0,5-115 mikrogram rhBMP-2 implantasyonunun 7 günde kartilaj formasyonu ve 14 günde kemik formasyonu oluşturduğu görülmüştür. rhBMP-2 dozuna bağımlı olarak kemik indüksiyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (Yasko ve ark., 1992; Bostrom ve ark., 1996; Zellin ve Linde, 1999; Sciadini ve Johnson, 2000). İmplant edilen rhBMP-2'nin optimal konsantrasyonu uygulanacak olan bölgeye ve deneğin cinsine göre farklılık göstermektedir (Marukawa ve ark., 2001).

BMP'lerin heterotopik bölgelerde endokondral yol ile kemik formasyonu indüksiyonu yaptığı birçok hayvan çalışmasında gösterilmiştir (Alpaslan ve ark., 1996; Omura ve ark., 1998; Fujimoro ve ark., 2001). BMP'lerin uygun bir taşıyıcı ile implante edildikleri zaman; undiferansiye mezenkimal hücrelerin kemotaksis ile aktive edilerek migrasyonlarına ve osteoblastlara dönüşmelerine, kemik matriksi depolanmasına, yeni depo edilen kemik matriksinin mineralizasyonuna ve kemik iliği diferansiyasyonuna neden oldukları gösterilmiştir (Ripamonti ve Duneas, 1998; Reddi, 2000).

BMP tarafından sağlanan osteoindüksiyonun klinik olarak kullanılmasında beş çeşit iskeletsel rekonstrüksiyon metodu bulunmaktadır; ( Özeç ve Yeler, 2003)

Birinci metod, BMP'nin direk olarak iskeletsel defekt bölgesine implante edilmesidir. Bu metod kullanılarak yapılan hayvan çalışmaları ile hayvanın hayatı boyunca spontan olarak iyileşemeyecek, kritik boyutta defekt olarak adlandırılan kemik defektlerinin tedavisi yapılmaya çalışılmıştır (Toriumi ve ark., 1991; Toriumi ve ark., 1999; Kusumoto ve ark., 2000; Boyne, 2001; Özeç ve Yeler, 2003).

İkinci metod, BMP onlay grefti kullanılarak iskelet augmentasyonunun sağlanmasıdır. Bu metod kullanılarak rhBMP-2'nin uygun taşıyıcı ile birlikte onlay implant olarak uygulanması sonucunda orijinal kemik ile direk bağı bulunan kemik formasyonunun olduğu tespit edilmiştir (Gordh ve ark., 1999; Murata ve ark., 1999; Kusumoto ve ark., 2000; Özeç ve Yeler, 2003).

Üçüncü metod defektten uzak bir bölgede BMP indüksiyonu ile kemik oluşturulması ve bu kemiğin serbest kemik grefti olarak kullanılmasıdır. Dördüncü metod BMP indüksiyonu ile oluşturulan kemiği de içeren flebin kullanılmasıdır. Üçüncü ve dördüncü metod rekonstrüktif operasyon öncesi BMP tarafından

osteoinduksiyonun sağlanabilmesi için belirli bir zaman gerektirmektedir. Beşinci metod donör bölgeye BMP implante edilmesi ve aynı zamanda konvansiyonel kemik greftinin, serbest kemik greftinin veya vaskularize kemik greftinin uygulanmasıdır (Kusumoto ve ark., 2000; Özeç ve Yeler, 2003).

### 2.3 Rifamisin

Rifamisinler, *Streptomyces mediterranei*'den üretilmiştir ve Rifamisin A, B, C, D ve E diye adlandırılan beş antibiyotik elde edilmiştir. Rifamisin B' den de üç yarı-sentetik antibiyotik türetilmiştir. Rifamid, rifamisin sodyum ve rifampisin (rifampin) adı verilmiş olan bu antibiyotikler, duyarlı bakterilerde DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezini, RNA polimeraz enzimini inhibe ederek bozarlar. Bakterisid etki gösterirler. Rifamid, kullanılması terk edilmiş bir ilaçtır. Rifamisin sodyum ise parenteral veya topikal olarak seyrek kullanılan bir ilaçtır (Taşdemir, 2011). Rifampin tüberküloz tedavisinde izoniazidden sonra ikinci önemli ilaçtır. *M. Tüberkülozis*'den başka *M. Leprae*, gram (+) ve gram (-) koklara, koliform basillere, klamidia grubu mikroorganizmalara ve poks virüslerine karşı da etkilidir. Mikobakterilerde rifamisine karşı direnç gelişimi, diğer bakterilerde olduğundan daha yavaştır. Fakat yine de tüberküloz tedavisinde tek başına kullanılmaz. Rezistans gelişimini önlemek için izoniazid, etambutol veya başka bir ilaçla kombine kullanılır (Kayaalp, 2009; Taşdemir, 2011).

İn vitro deneylerde rifampin'in 0.005-0.2 µg/ml konsantrasyonlarında *M. Tüberkülozis*'i inhibe ettiği gösterilmiştir (Kayaalp, 2009).

Rifamisin sodyum suda fazla çözünen kırmızı renkli bir maddedir. Kırmızı rengi nedeniyle vücut sıvılarını, idrar ve salgıları (salya, gözyaşı ve balgam gibi) kırmızımtrak bir renge boyayabilir. Buna bazı kaynaklarda kınak (kırmızı insan sendromu) denir (Kayaalp, 2009).

Rifamisin sodyum gastrointestinal kanaldan çok az rezorbe edildiği için ağızdan kullanılmaz; sadece parenteral kullanılır. Buna karşılık rifampin, gastrointestinal kanaldan iyi absorbe edilir ve esas olarak ağızdan kullanılır. Rifampin' in vücut sıvılarına dağılımı iyidir, serebrospinal sıvıya da yeterli derecede geçer. Plazmada % 60-90 oranında proteine bağlanır. Her iki ilaç da büyük kısımları itibariyle karaciğerden safra içine itrah edilir. Safradaki konsantrasyonları, plazmadakinden çok daha yüksektir (Kayaalp, 2009).



Rifamisinler 1963'den itibaren sıklıkla açık ve kapalı yaraların irrigasyonunda, enfekte olmuş cerrahi ya da kutanöz yaraların tedavisinde kullanılmaktadır. Rifamisinin ilk lokal kullanımı, tüberkülozlu hastalarda akciğer kavitelerinin temizlenmesinde görülür (Taşdemir, 2011). Rifamisinlerdeki yara iyileşmesi diğer lokal antibiyotiklere göre daha iyi olmakta ve bu nedenle enfekte kutanöz yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (Köşüş ve ark., 2010; Taşdemir, 2011).

Rifamisinin yan etkileri oldukça azdır. Genellikle ilacı aralıklı alan kişilerde grip benzeri semptomlar görülmektedir. Rapor edilen diğer yan etkiler interstisyel nefrit, trombositopeni ve hemolitik anemidir. Rifamisinin lokal uygulanmasıyla nadir olarak alerjik kontak dermatitis görüldüğü ve yine çok nadir olarak rifamisinin cerrahi yaralarda uygulanmasıyla anaflaktik reaksiyon geliştiği söylenmektedir (Cardor ve ark., 1995; Laxenaire ve ark., 1996; Köşüş ve ark., 2010; Taşdemir, 2011). Rifampin'in ise hepatotoksik etki potansiyeli vardır. Karaciğer hücrelerinden bilirubin itrahını azaltabilir ve bilirubinemi yükseltir. Ayrıca bilirubin ölçüm yöntemlerini bozduğu için yanlış olarak hiperbilirubinemi teşhisine yol açabilir. Hepatoselüler zedelenme yapar ve serum transaminazların düzeyini yükseltir. Hepatit oluşturabilir. Rifampin ve izoniazid birlikte kullanıldığında hepatotoksik etkileri birbirine eklenir (aditif toksik etkileşme) (Kayaalp, 2009).

Rifampin karaciğerde bazı mikrozomal enzimleri güçlü ve selektif bir şekilde indükler. Buna bağlı olarak klinik önemi bulunan şu etkileşmeleri yapar;

i) Oral antikoagülan bir ilaç olan varfarin'in yıkımını azaltır, etkinliğini azaltır. Rifampin tedavisi sırasında varfarin dozunun yükseltilmesi gerekir.

ii) Östrojenlerin yıkımını artırır. Oral kontraseptiflerin etkinliğini azalttığından bu ilacı kullananlarda istenmeyen gebeliklere ve ara kanamalara neden olabilir.

iii) Oral antibiyotiklerin ve kortikosteroidlerin de yıkımını artırarak etkinliğini azaltır.

iv) Metadon'un yıkılmasını artırdığından metadon ikamesi yapılan opioid bağımlılarında rifampin tedavisi sırasında yoksunluk sendromu ortaya çıkabilir (Kayaalp, 2009).

İselin (1990) el yaralanmalarında topikal rifamisin kullanımının yararlı olduğunu, Rifamisin'in hem enfeksiyonu kontrol altına aldığını hem de yara iyileşmesini kontrol grubuna göre hızlandırdığını rapor etmektedir. Bir başka çalışmada da rifamisinin yara iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi olmadığı rapor edilmektedir (Saydam ve ark., 2005; Taşdemir, 2011).

Rifamisinin gram (+) ve gram (-) patojenlere karşı etkili olduğu için polimikrobik enfeksiyonların tedavisinde etkili olduğu (ArmaceuSweetman, 2005) ve ortopedik protezlerle ilişkili kemik doku içerisine yayılmış enfeksiyonlar ile osteomyelit tedavisinde sıklıkla kullanıldığı rapor edilmiştir (Drancourt ve ark., 1997; Taşdemir, 2011).

### 3. MATERYAL ve METOD

Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (CÜBAP) tarafından desteklenen DİŞ-108 kodlu bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmaya başlamadan önce, 05.05.2011 tarih ve 248 sayılı Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurul onayı alındı ve çalışma sırasında Cumhuriyet Üniversitesi Etik Kurulu yönergelerinin 13. maddesinde belirtilen "Etik kurallara uygunluk esası" kararına uyuldu.

Çalışmanın deneysel kısmı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen ağırlıkları yaklaşık 250-300 gram olan, ortalama 12 haftalık yetişkin 24 adet Wistar cinsi albino rat üzerinde yapıldı.

Bu çalışma için kullanılacak olan ratlar, Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Denekler, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu sağlanacak şekilde tutularak, serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Oda sıcaklığı  $22 \pm 2$  °C' de sabit tutuldu. Buldukları odanın nispi nem oranı % 30-45 arasında tutularak, odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önendi. Ratlar kafeslerde tek olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı.

#### 3.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Deneysel hayvanları 3 gruba ayrıldı ve her grup 8 deneysel hayvanından oluşturuldu. Kontrol grubunda mandibula angulus bölgesinde 5 mm çapında kritik boyutlu defekt oluşturulduktan sonra herhangi bir işlem uygulanmadı. Deneysel gruplarının birinde oluşturulan defekt operasyon sırasında rifamisin (RİFETEM 250 mg 3 ml lik IM ampul, İ.E. ULAGAY İlaç Sanayi Topkapı - İstanbul) ile irrigedildi ve post operatif 1, 3 ve 7. günlerde defekt alanına IM olarak 25 mg rifamisin insülin enjektörü kullanılarak enjekte edildi. Diğer deneysel grubunda ise defekte 25 mg rifamisin, spongostan kollajene (Spongostan, Haemostatic absorbable gelatin sponge, Ferrosan, Denmark) emdirilerek uygulandı. Tüm deneysel hayvanları 21. günde sakrifiye edildi.

<b>ÇALIŞMA GRUPLARI</b>		<b>Grup başına hayvan adedi</b>
<b><u>Kontrol grubu</u></b>	Defekte herhangi bir işlem uygulanmadı	8
<b><u>1. Dene grubu</u></b>	Operasyon sırasında defekt rifamisin ile irrigate edildi ve post-op 1, 3, 7. günlerde defekt alanına IM olarak 25 mg. rifamisin enjekte edildi (rif grubu)	8
<b><u>2. Dene grubu</u></b>	Defekt bölgesine 25 mg. rifamisin emdirilmiş spongostan kollajen yerleştirildi (spg grubu)	8
<b>Kullanılan toplam hayvan adedi</b>		24

**Çizelge 3.1** Çalışma Gruplarının Şematik Gösterimi



**Şekil 3.1** Rat mandibulasında oluşturulan defektin şematik gösterimi

### **3.2 Cerrahi Teknik**

Deneklerin yiyecek ve içecek alımı operasyondan 24 saat önce kesildi. Dene hayvanlarının anestezisi intramusküler enjeksiyon yöntemi ile 3 mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul, Turkey) ve 90 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı-

Warner Lambert, İstanbul, Turkey) kullanılarak sağlandı. Yeterli bir anestezi derinliği için göz kapağı refleksinin kaybolması beklenildi ve çift taraflı olarak mandibula angulus bölgesindeki deri traş edildi (Bkz Şekil 3.2). Betadine kullanılarak mandibula çevresi boyandı (Bkz Şekil 3.3). Steril örtüler kullanılarak deneğin üstü ve yüzü örtülerek operasyona hazır hale getirildi (Bkz Şekil 3.4). Kullanılacak olan el aletleri dahil olmak üzere bütün malzemeler otoklavda sterilize edildi. Operasyonda asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edilerek steril olarak çalışıldı.

Mandibula angulus bölgesinde bazis mandibulanın 1 cm altından olacak şekilde ve 1 cm uzunluğunda deri, subkutan doku ve periostu içine alacak şekilde insizyon yapıldı (Bkz Şekil 3.4). Kemik yüzeyi açığa çıkacak şekilde flep kaldırıldı (Bkz Şekil 3.5). Standart kritik boyutta 5 mm çapında bikortikal kemik fragmanı trefin frez kullanılarak irrigasyon altında çıkarıldı (Bkz Şekil 3.6- Bkz Şekil 3.7- Bkz Şekil 3.8). Deney gruplarının birinde oluşturulan defekt operasyon sırasında rifamisin ile irrigate edildi ve post operatif 1, 3 ve 7. günlerde defekt alanına IM olarak 25 mg. rifamisin insülin enjektörü kullanılarak enjekte edildi (Bkz Şekil 3.9- Bkz Şekil 3.10- Bkz Şekil 3.11). Diğer deney grubunda ise defekte 25 mg. rifamisin, spongostan kollajene emdirilerek uygulandı (Bkz Şekil 3.12- Bkz Şekil 3.13- Bkz Şekil 3.14). Daha sonra deri flebi sırasıyla; önce kas ve cilt altı fasyalar 5-0 poliglaktin 910 (Vicril Jonson&Johnson/Ethicon) sutur kullanılarak, deri ise 5-0 ipek sutur (Jinhuan Medical Products / P.R.C.) kullanılarak orjinal pozisyonuna suture edildi.



**Şekil 3.2** Operasyon sahasının traş edilmesi

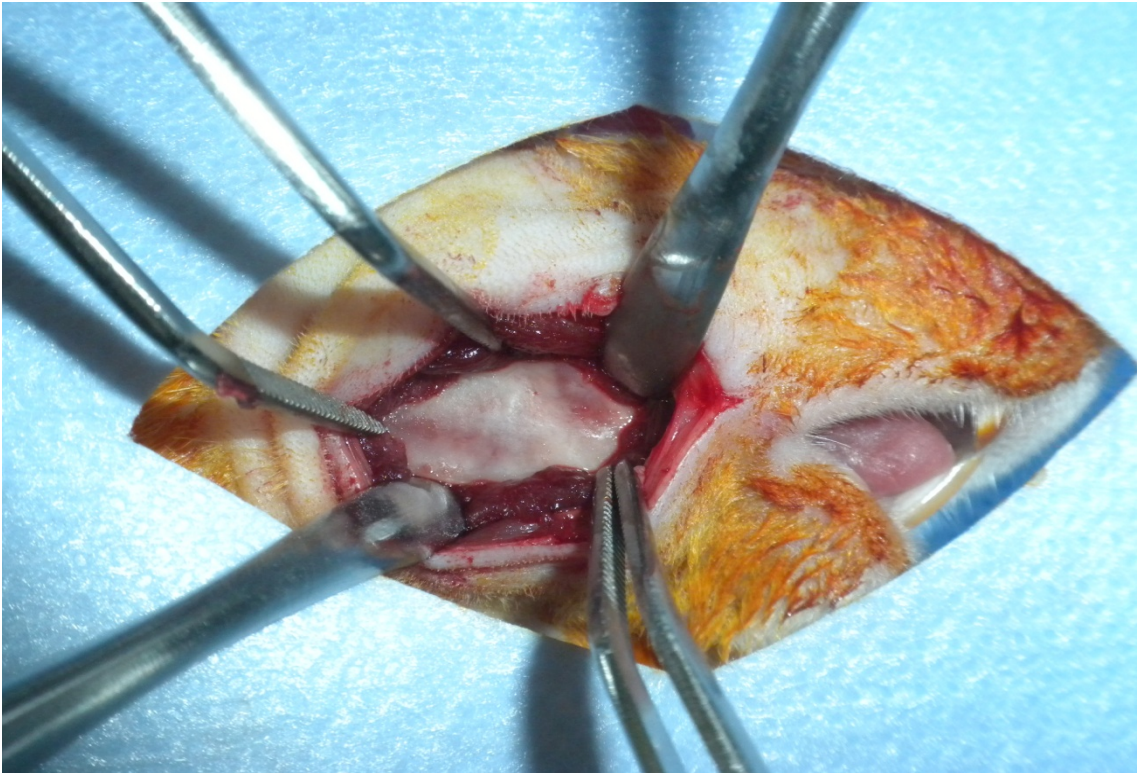


**Şekil 3.3** Operasyon sahasının Betadine kullanılarak boyanması





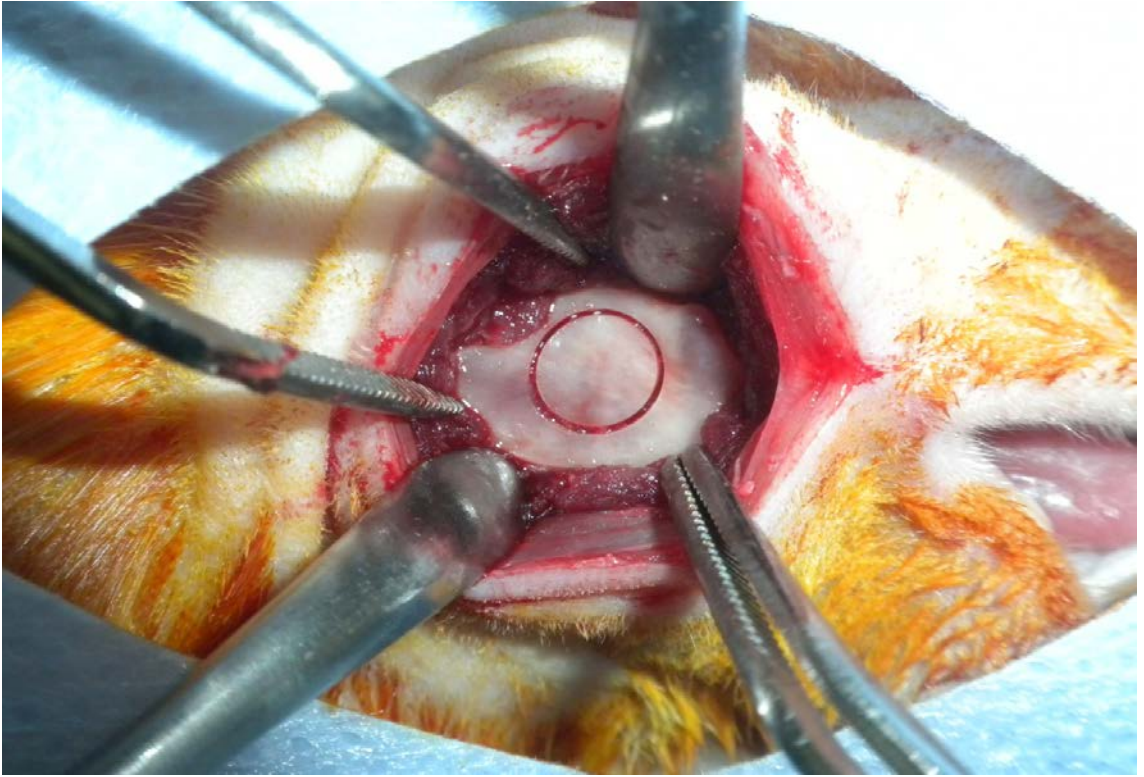
**Şekil 3.4** Operasyon sahasının örtülmesi ve cilt insizyonu



**Şekil 3.5** Denek mandibulasında defekt oluşturulacak kemiğin görüntüsü

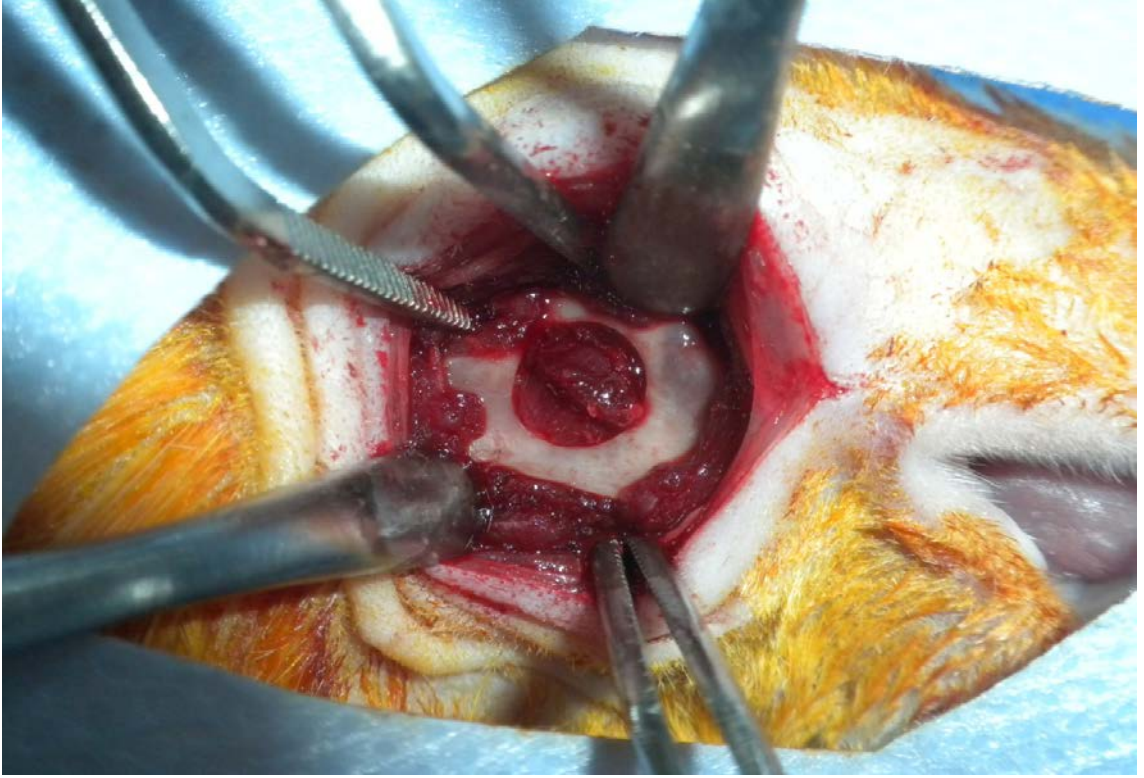


**Şekil 3.6** Deney aşamasında kemik defekti oluşturmak için kullanılan trefin frez



**Şekil 3.7** 5 mm. çapında kemik osteotomisi

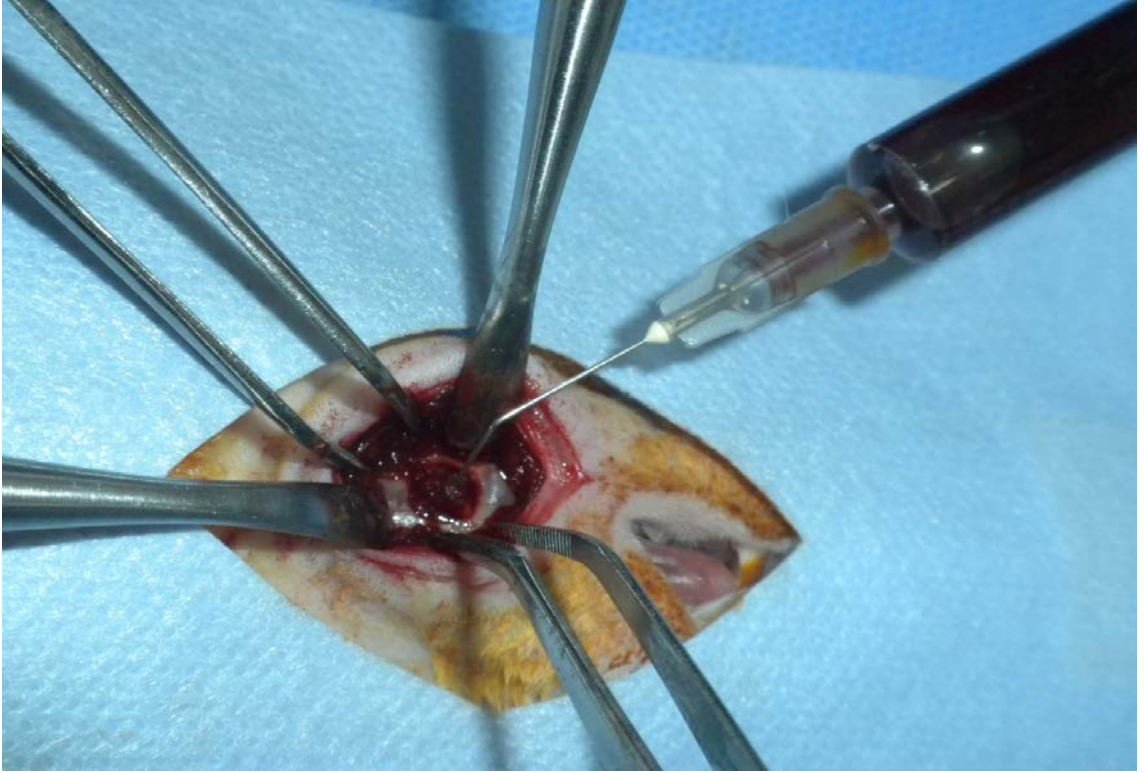




Şekil 3.8 Osteotomi sonrası oluşan kritik boyutta kemik defekti



Şekil 3.9 Deney aşamasında kullanılan rifamisin solüsyonu



**Şekil 3.10** Defekt bölgesinin rifamisin ile irrigasyonu

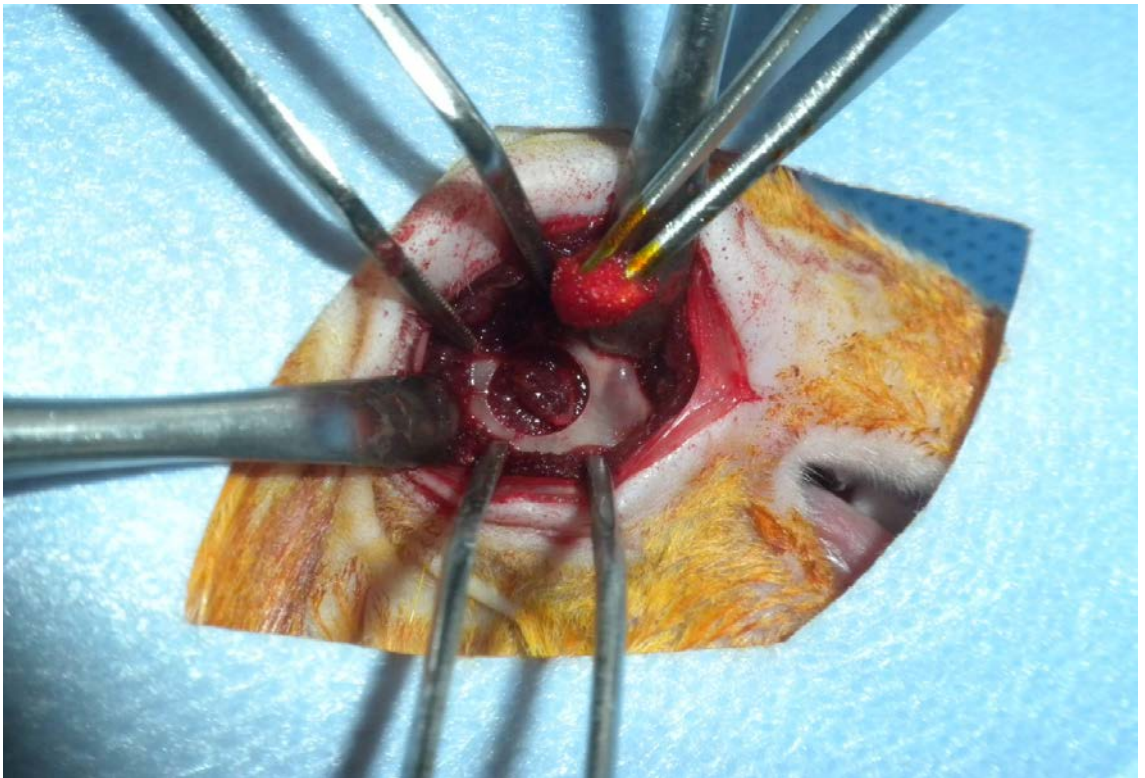


**Şekil 3.11** Deney aşamasında kullanılan insülin enjektörü

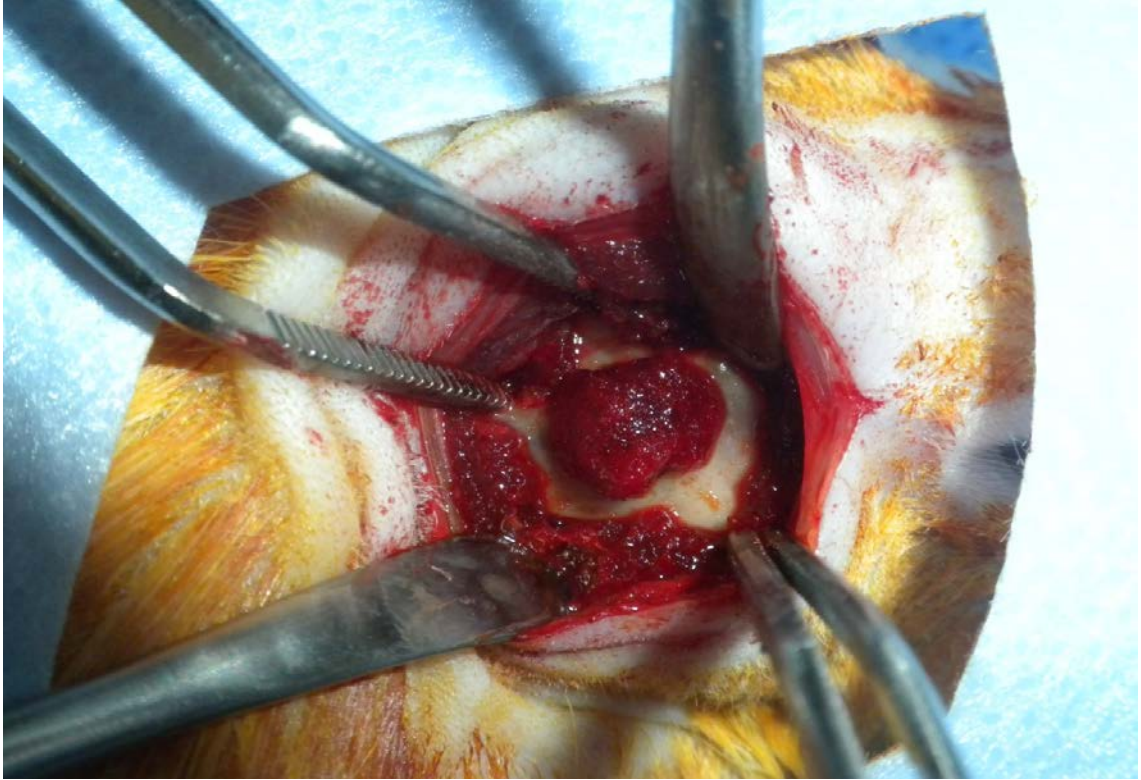




**Şekil 3.12** 25 mg. Rifamisinin spongostan kollajene emdirilmesi



**Şekil 3.13** Spongostan kollajenin defekte yerleştirilmesi



**Şekil 3.14** Defekt bölgesine implante edilmiş spongostan kollajen

### **3.3 Ratların Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması**

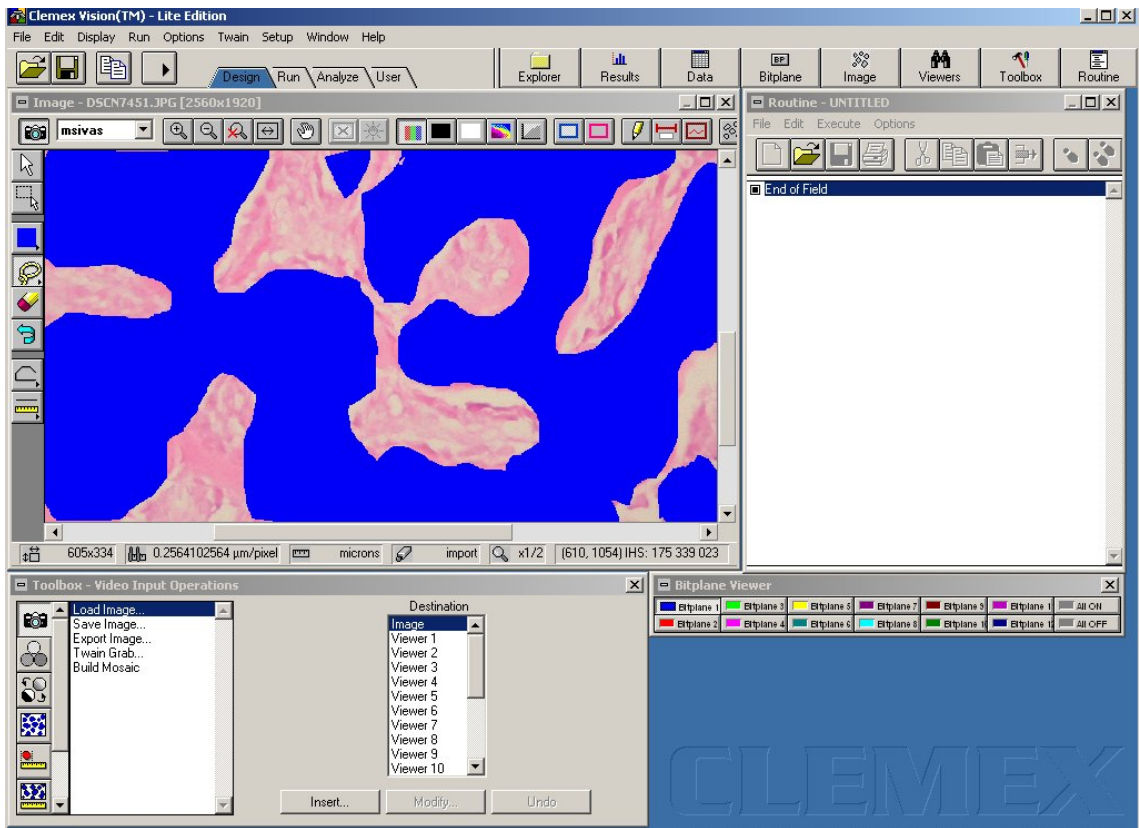
Postoperatif olarak deney hayvanlarına analjezik olarak Carprofen 4mg/kg (Rimadyl, Pfizer) ve antibakteriyel olarak Ceftriaxon 25 mg/kg (Rocephin, Roche) 5 gün süre ile intramusküler yöntemle uygulandı. Tüm deney hayvanları işlem sonrası 21. günde 200mg/kg sodyum pentobarbital (Petotal, Abbot, ABD) kullanılarak sakrifiye edildi. Defekt bölgesini içine alacak şekilde rat mandibulaları diseksiyon yapılarak çevresindeki yumuşak dokuyla birlikte çıkarılarak %10'luk formol içine konuldu.

### **3.4 Histomorfometrik Yöntem**

Doku örnekleri %10'luk formik asit kullanılarak dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında örnekler defekt bölgesine komşu kemik fragmanlarını içine alacak şekilde defekt bölgesinin uzun aksına paralel parçalara ayrılarak, ototeknikon takibine alındı. Takip sırasında parafine gömülen doku örneklerinden mikrotom yardımı ile 5µm lik kesitler lama alınarak Hematoksilen Eozin ile boyandı. Boyanan preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Bu değerlendirme sırasında mümkün olduğunca aynı bölgeler seçilerek ışık mikroskobuna bağlı Nikon Coolpix 5000 dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı. Fotoğraflama esnasında kalibrasyon amacı ile



Nikon Stage Micrometer TypcA (MBM 11100) görüntüsü de aynı mikroskobik büyütmelelerde alındı. Tüm görüntüler PC ortamına aktarıldı ve Clemex PE 3.5 görüntü analizi programı ile değerlendirildi (Bkz Şekil 3.15). İlk olarak her olguda 0,4 mm<sup>2</sup>'lik alanlar görüntü analiz programı ile seçildi. Seçilen alanlardaki osteoblastlar ve osteoklastlar işaretlenerek otomatik olarak saydırıldı. Ayrıca seçilen aynı 0,4mm<sup>2</sup> alandaki yeni kemik oluşum alanları da Hematoksilen Eozin ile boyalı preparatların dijital fotoğraflarından aynı görüntü analizi programı yardımı ile hesaplandı.



Şekil 3.15 Clemex PE 3.5 görüntü analiz programı ile yeni oluşan kemik bölgeleri mavi renkte gösterilmektedir

### 3.5 İmmünohistokimyasal yöntem

İmmünohistokimyasal yöntem yazılı olan protokollere uyularak yapıldı. %10'luk formolle fikse edilip rutin takipten sonra parafin bloklara gömülen seçilmiş doku bloklarından poly-L lizin kaplı lamlara 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 56<sup>0</sup>C' lik etüvde 16 saat bekletilerek deparafinize edildi. 30 dakika ksilolde bekletildi. %100,

%95 ve %90'lık alkollerde sırasıyla 5'er dakika bekletilerek rehidrate edildi. Daha sonra distile suda hidrate edildi. 5 dakika Mikrodalga fırında Monoklonal Anti-human Pro-BMP-2 Antibody, yeterli ısıda, EDTA tampon solüsyonu bulunan şale içinde 3 kez, 5 dakika bekletildi. Düküklü tencerede P53, P27, CerbB2, Survivin yüksek ısıda, sitrat buffer tampon solüsyonu içinde 20 dakika bekletildi. İşlem sonrası, oda ısısında 20 dakika buldukları solüsyon içerisinde soğumaya bırakıldı. Distile suda 5 dakika bekletildi. Dokuların etrafı Pappen kalem ile çizildi. PBS solüsyonunda (pH: 7.6) 5 dakika yıkandı. Kesitler nemli ve kapaklı bir ortama yerleştirildi. Doku kesitleri üzerine Hidrojen Peroksit damlatıldı ve 20 dakika süre ile inkübe edildi. Distile su ile yıkandı. PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı. Large Volume Ultra V Blok (Lab.Vision, Cat; TA-125-UB) solüsyonu damlatıldı ve 5-10 dakika inkübe edildi. PBS'ten hızlı geçirilerek lamlar silkelendi ve primer antikor (rhPro-BMP-2, clone: 253717, mouse monoklonal) damlatıldı. 60 dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkandı. PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı. Sekonder antikor Biotinli Goat Anti- Polyvalent (lab vision, kat: TP- 125-BN) damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkandı. PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı. Large Volume Streptavidin Peroxidase (Lab. Vision. Cat: TS-125-HR) damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi. Distile su ile yıkandı. PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı. Kromogen uygulaması olarak Lab. Volume DAB substrade (lab Vision Kat: TA-012-HDC) damlatıldı ve 10-15 dakika inkübe edildi. Kesitler lam boyama kabına alındı ve distile suda yıkandı. Mayer Hematoksilen ile 2 dakika süre ile zıt boyama yapıldı. Çeşme altında 5 dakika süre ile yıkandı. Distile sudan geçirildi. Amonyaklı distile suda matlık giderildi. Distile suda 5 dakika yıkanarak amonyak giderildi. Su bazlı kapama malzemesi ile kapatıldı. Böylelikle kesitler fotoğraflamaya hazır hale getirildi. Anti-BMP-2 ile boyalı preparatlarda 0,4 mm<sup>2</sup> lik alanlar seçildi. Bu alanlar seçilirken aynı bölgelerin seçimine dikkat edildi ve ışık mikroskobuna bağlı Nikon Coolpix 5000 dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı. Fotoğraflama esnasında kalibrasyon amacı ile Nikon Stage Micrometer görüntüsü de aynı mikroskobik büyütmelemlerde alındı. Tüm görüntüler PC ortamına aktarıldı ve Clemex PE 3.5 görüntü analizi programı ile değerlendirildi (Bkz Şekil 3.15).

Anti-BMP-2 ile immünohistokimyasal olarak boyanan preparatların fotoğraflarında aynı görüntü analizi sistemi ile 0,4mm<sup>2</sup>'lik alan seçilerek bu alanlardaki pozitif boyanan hücreler işaretlenerek otomatik olarak saydırıldı.

### **3.6 İstatistiksel Yöntem**

Çalışmanın verileri SPSS (Ver; 14.0 for Windows) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi kullanıldı. Veriler tablolarda aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alındı.

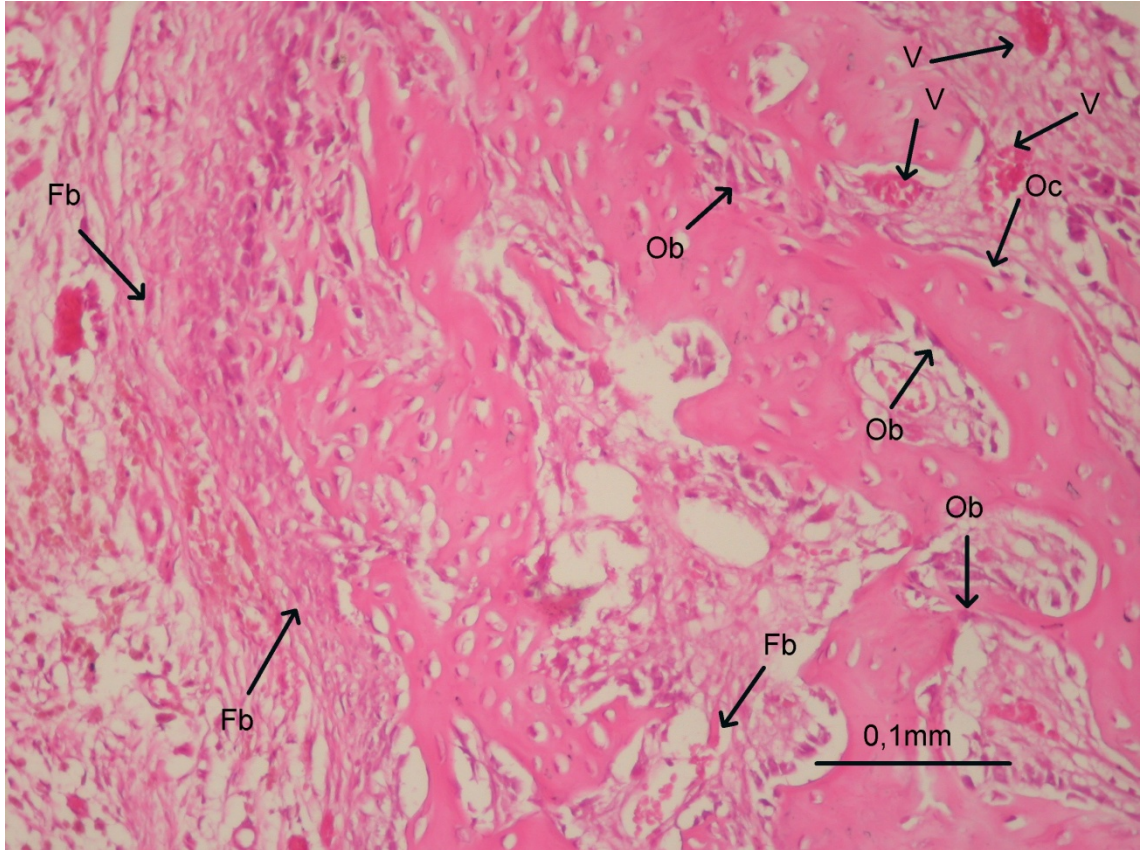
## 4. BULGULAR

### 4.1 Klinik bulgular

Deneyisel 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 gözlemlendi.

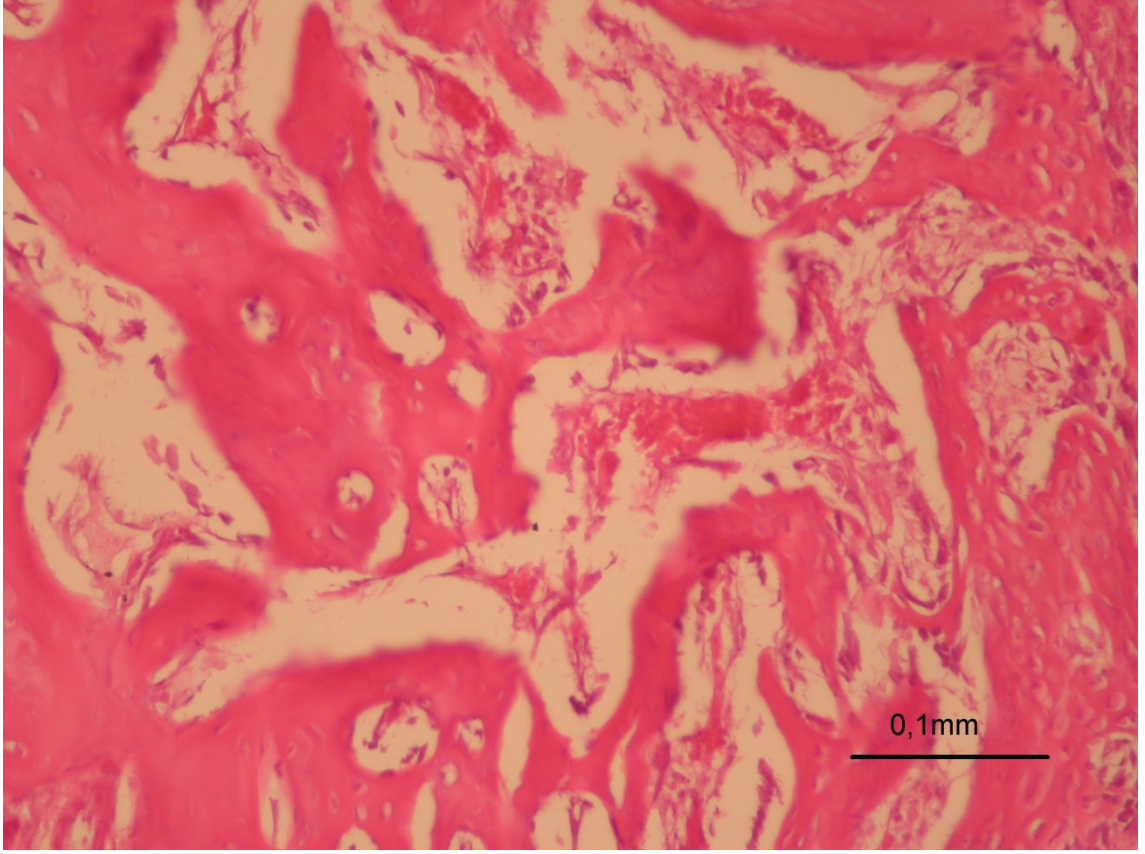
### 4.2 Histopatolojik bulgular

Histolojik olarak kesitlerde her bir gruba ait yeni oluşan kemik alanı, osteoblast, osteoklast, fibroblast ve yeni oluşan damar sayısına bakılmıştır (Bkz Şekil 4.1).

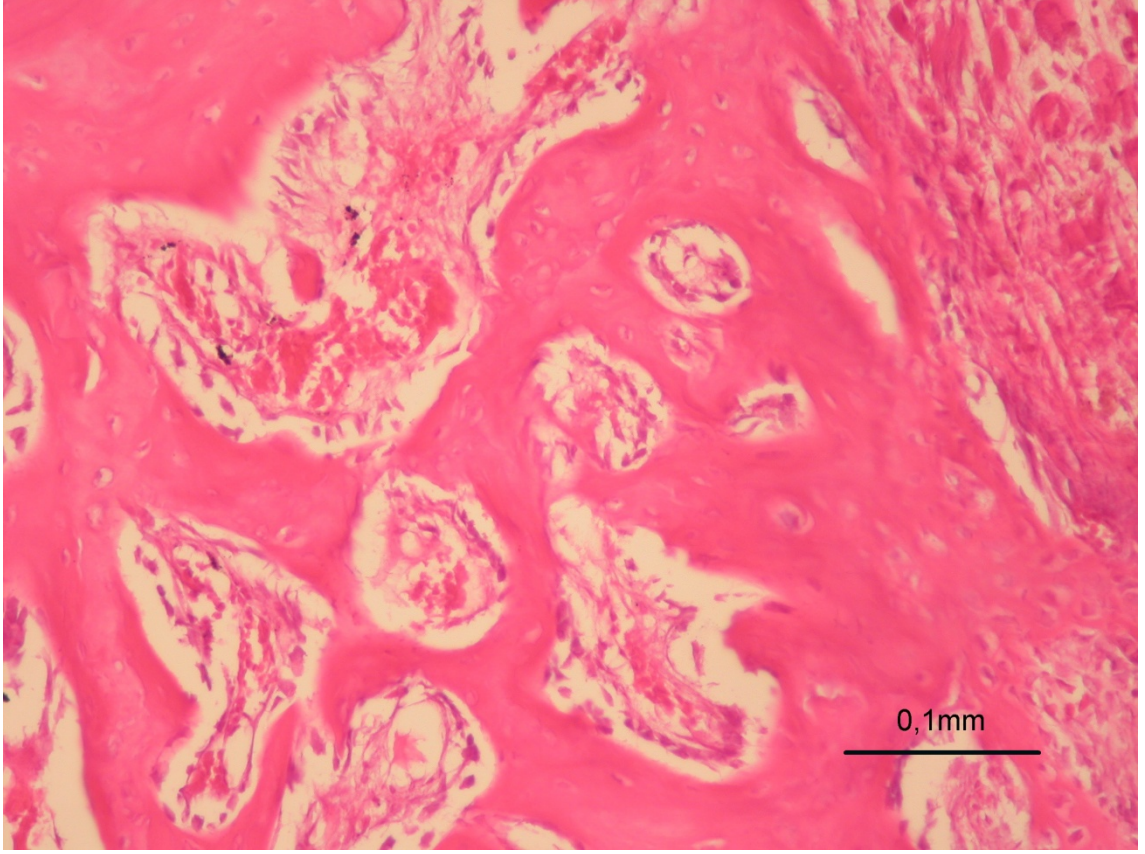


**Şekil 4.1** Hematoksilen boyama ile hücrelerin gösterilmesi (Ob: osteoblast, Oc: osteoklast, Fb: fibroblast, V: Ven (Damar)) (Boya: HE)

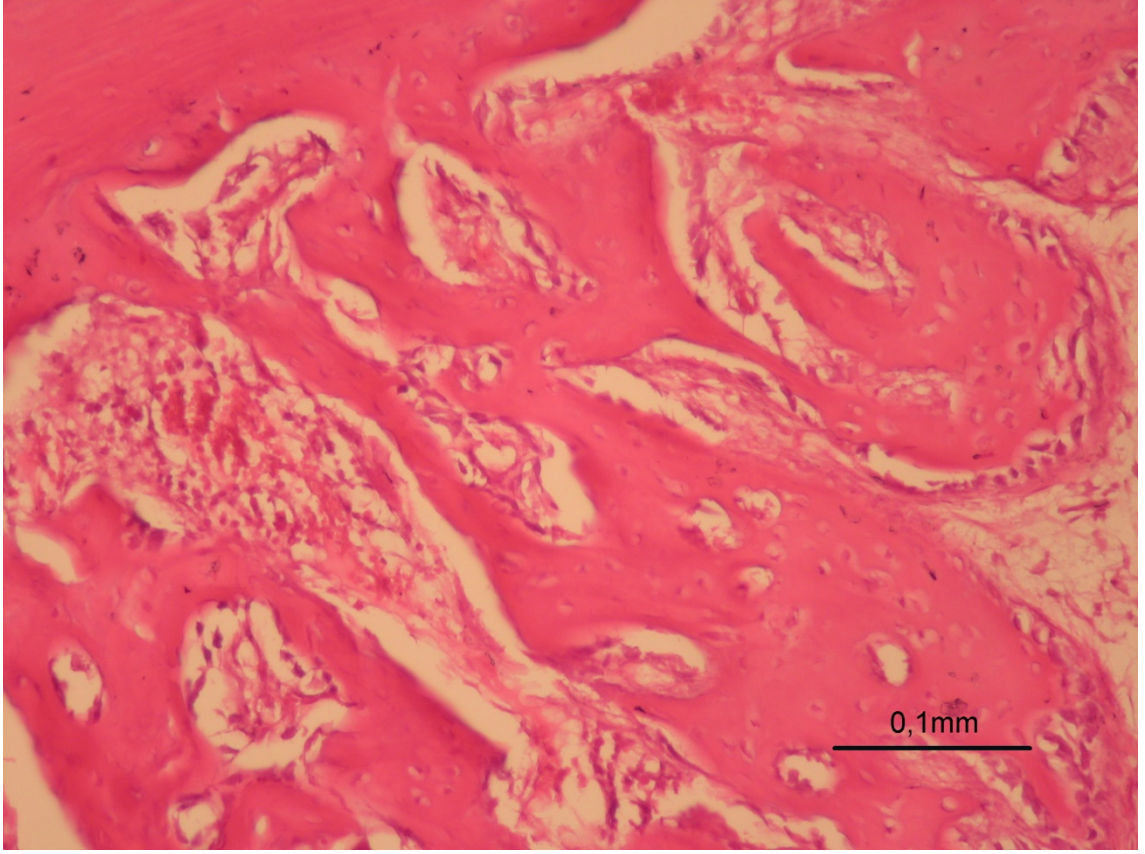




**Şekil 4.2** Kontrol grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)



**Şekil 4.3** 1. Deney grubuna (rif grubu) ait histolojik görüntü (Boya: HE)

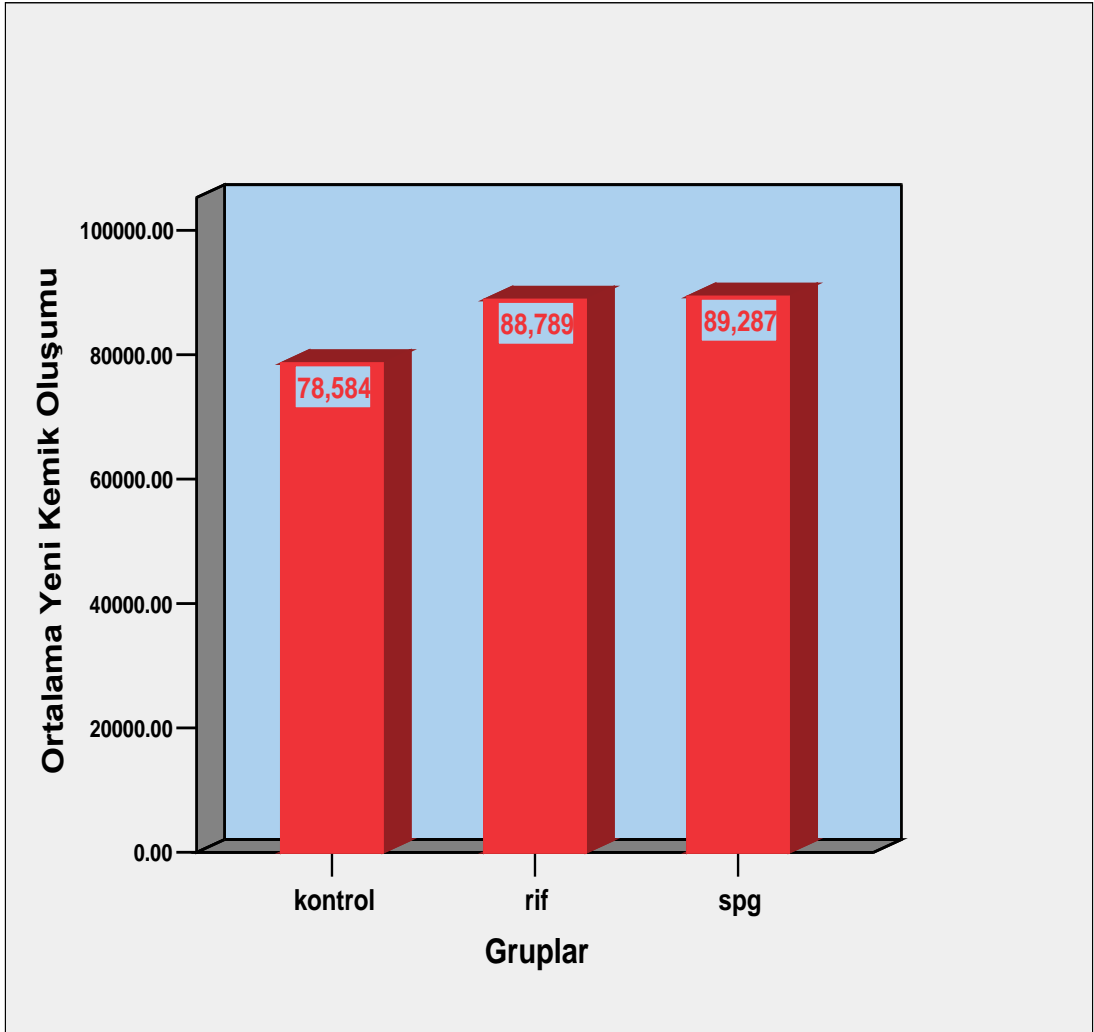


**Şekil 4.4 2.** Deney grubuna (spg grubu) ait histolojik görüntü (Boya: HE)

#### 4.2.1 Yeni oluşan kemik alanlarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 21. gündeki yeni oluşan kemik alanları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında kont-rif ve kont-spg grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, rif-spg grupları arası farklılık önemsiz bulunmuştur.

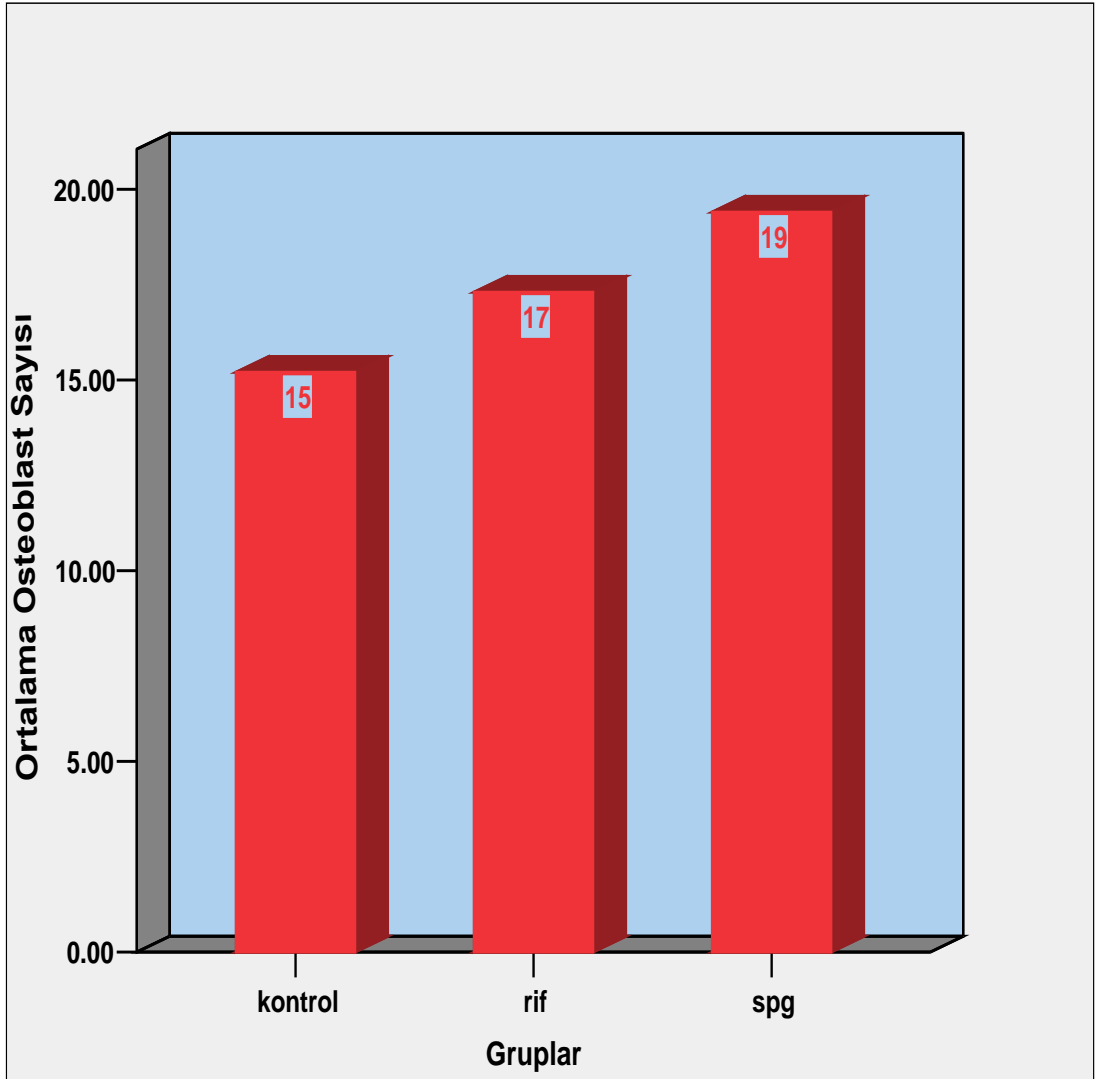


Şekil 4.5 Gruplara ait 21. gündeki ortalama yeni kemik oluşumu alanı değerlerinin dağılımı

#### 4.2.2 Osteoblast hücre sayılarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 21. gündeki osteoblast hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında kont-spg grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, kont-rif ve rif-spg grupları arası farklılık önemsiz bulunmuştur.

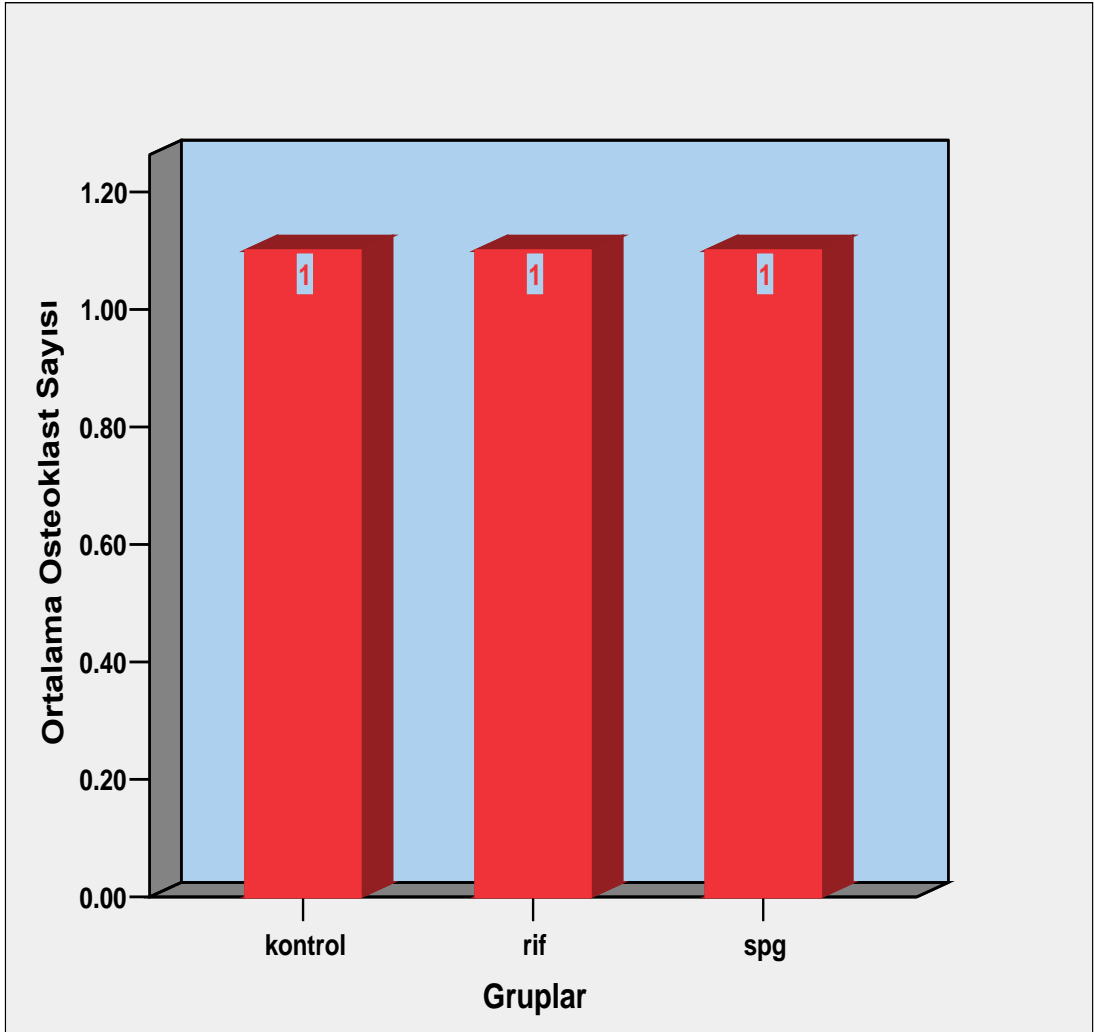


Şekil 4.6 Gruplara ait 21. gündeki ortalama osteoblast hücre sayılarının dağılımı

#### 4.2.3 Osteoklast hücre sayılarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 21. gündeki osteoklast hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Gruplar arasındaki fark önemsiz olduğundan gruplar arası ikişerli değerlendirme yapılmamıştır.



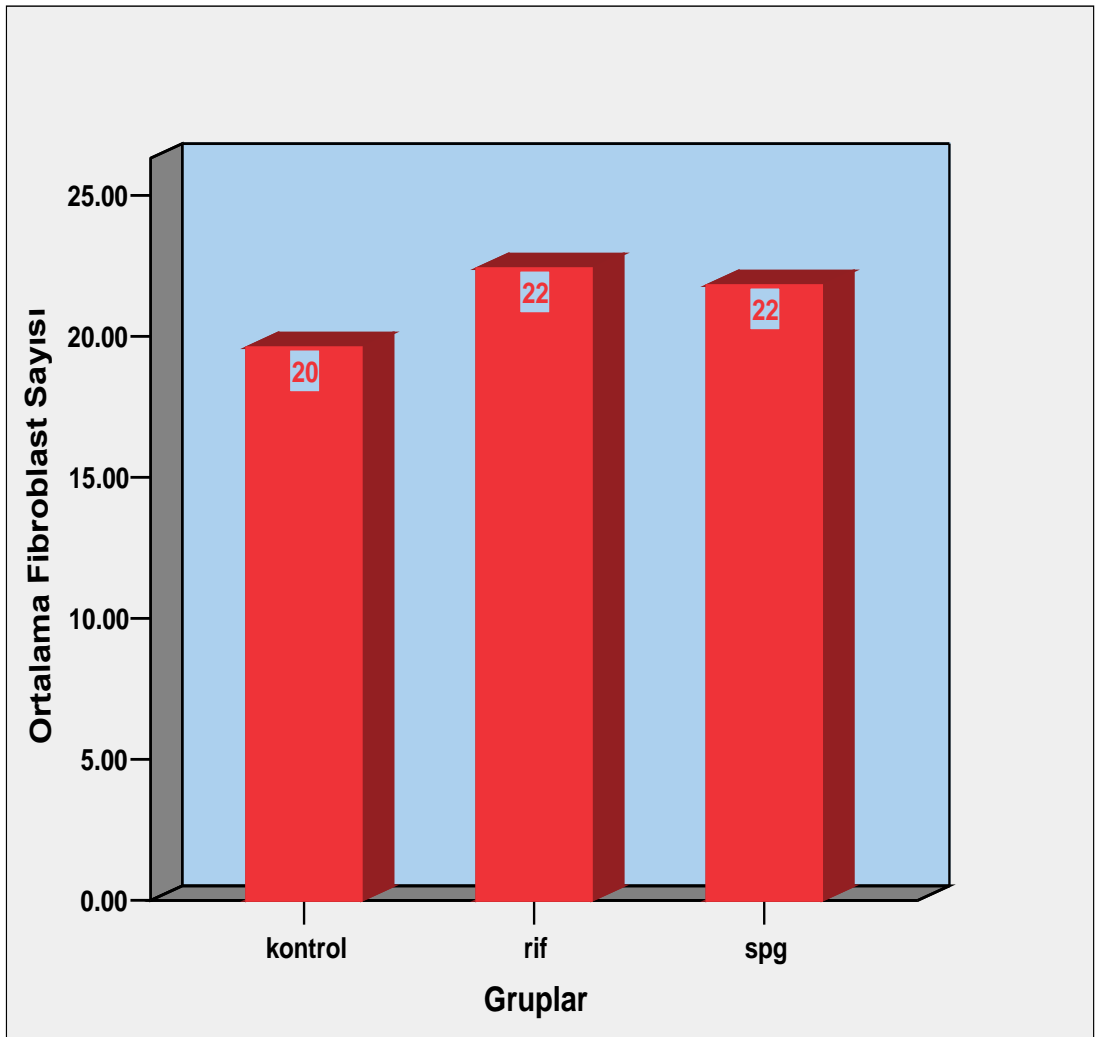
Şekil 4.7 Gruplara ait 21. gündeki ortalama osteoklast hücre sayılarının dağılımı



#### 4.2.4 Fibroblast hücre sayılarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 21. gündeki fibroblast hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında kont-rif grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, kont-spg ve rif-spg grupları arası farklılık önemsiz bulunmuştur.

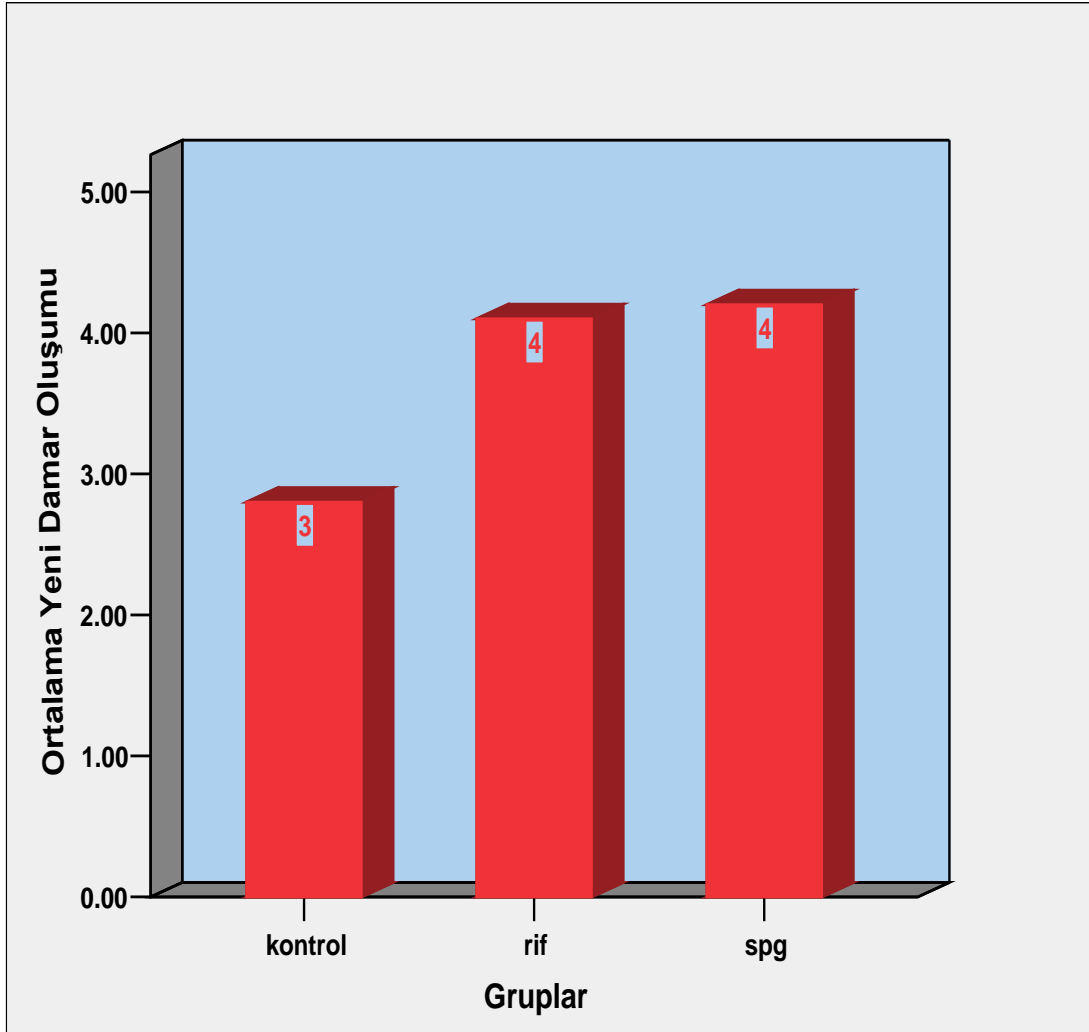


Şekil 4.8 Gruplara ait 21. gündeki ortalama fibroblast hücre sayılarının dağılımı

#### 4.2.5 Yeni damar oluşumunun değerlendirilmesi

Gruplara ait 21. gündeki yeni damar oluşumu, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Gruplara ait değerler ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında kont-rif ve kont-spg grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, rif-spg grupları arası farklılık önemsiz bulunmuştur.



Şekil 4.9 Gruplara ait 21. gündeki ortalama yeni damar oluşumunun dağılımı



**Çizelge 4.1** Tüm gruplara ait ölçümlerin karşılaştırılması

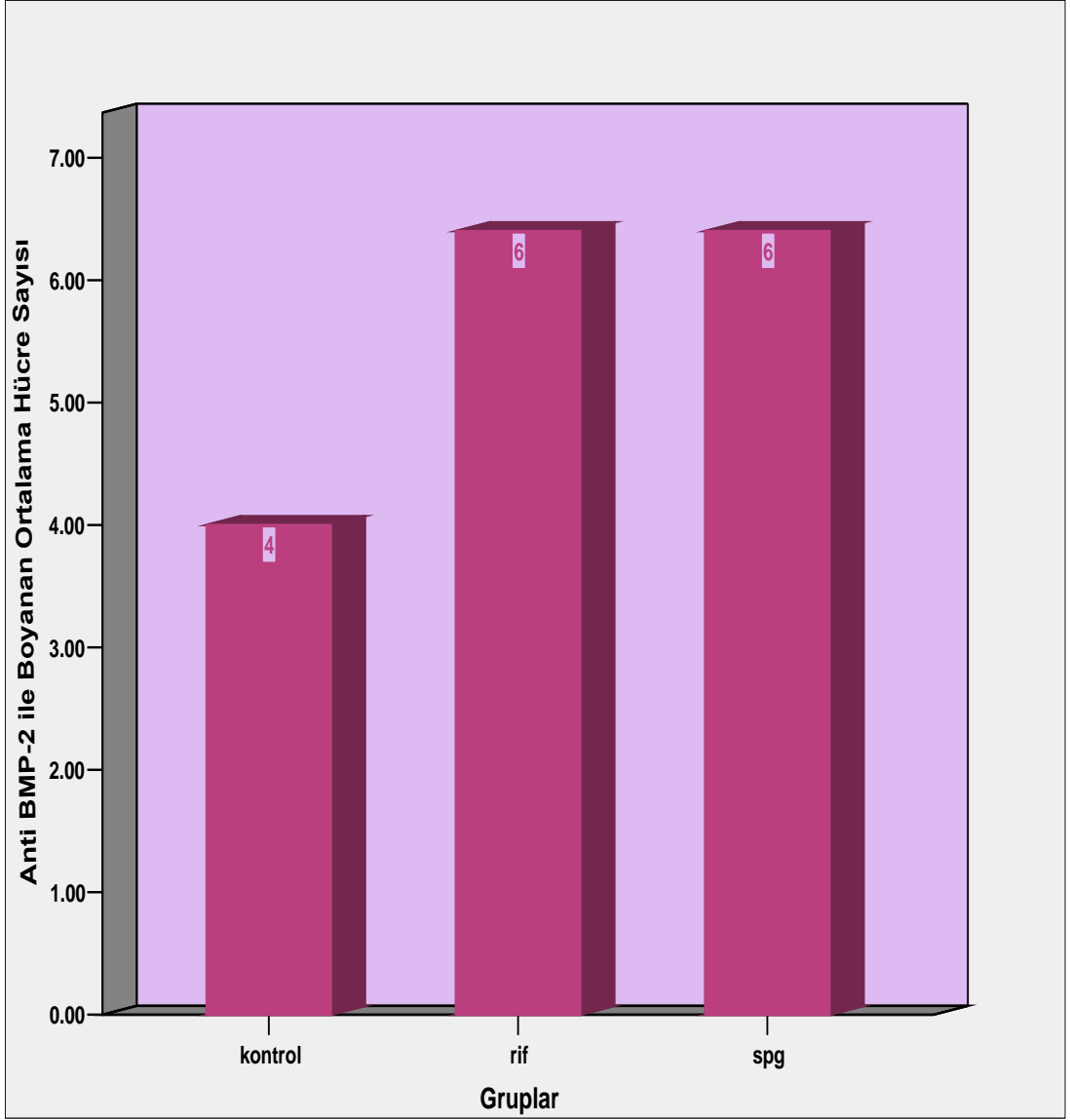
Gruplar	Yeni kemik alanı $\bar{X}\pm Ss$	Osteoblast sayısı $\bar{X}\pm Ss$	Osteoklast sayısı $\bar{X}\pm Ss$	Fibroblast sayısı $\bar{X}\pm Ss$	Yeni damar oluşumu $\bar{X}\pm Ss$
K	78583,71±4834,92	15,20±2,69	1,10±1,37	19,60±2,67	2,80±0,78
RİF	88789,09±3643,30	17,30±1,63	1,10±0,56	22,40±2,87	4,10±0,73
SPG	89287,44±3413,64	19,40±2,06	0,70±0,67	21,80±2,65	4,20±0,78
Sonuç	KW:12,62 P:0,001*	KW:4,75 P:0,029*	KW:0,69 P:0,403	KW:4,52 P:0,033*	KW:8,49 P:0,004*

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

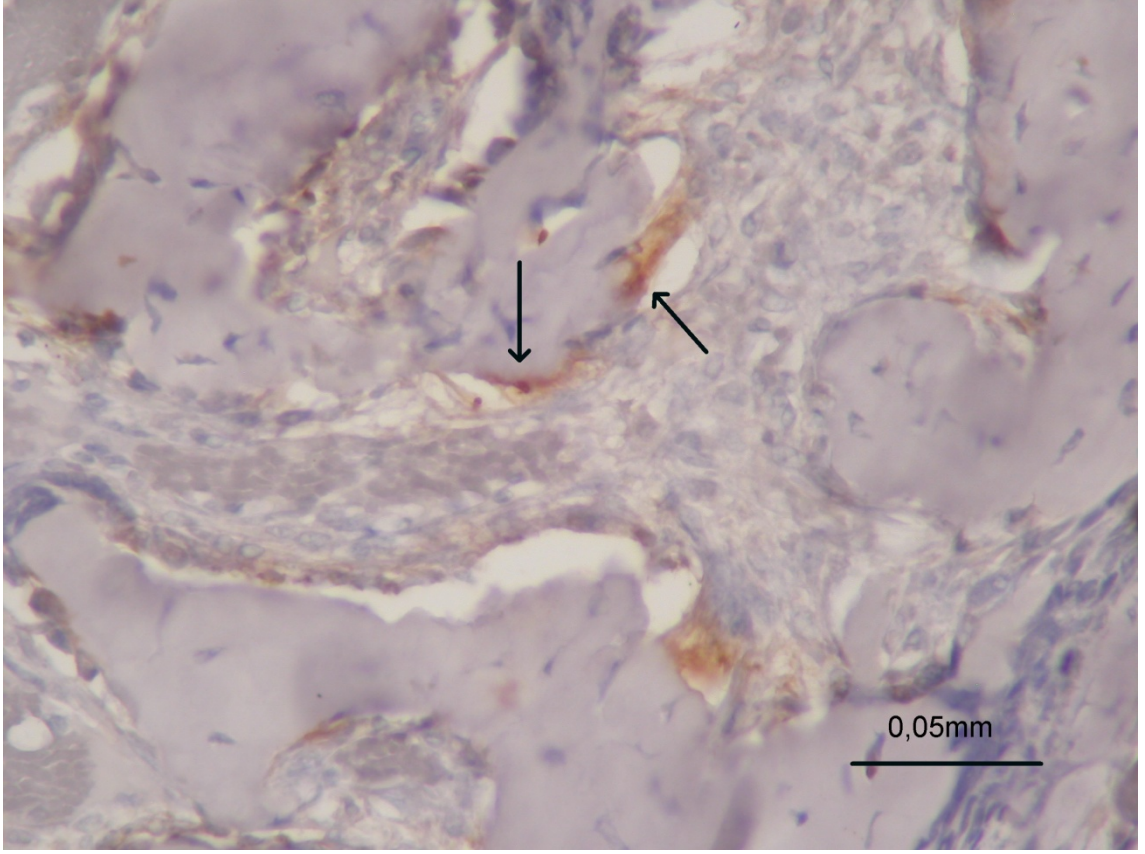
### 4.3 İmmunohistokimyasal bulgular

Gruplara ait BMP-2 antikoruna ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler işaretlenerek 0,4 mm<sup>2</sup> lik alanda görüntü analizi programı ile otomatik olarak saydırılmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırıldığında gruplara ait 21. gündeki BMP-2 antikoruna ile pozitif boyanan hücre sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0,05).

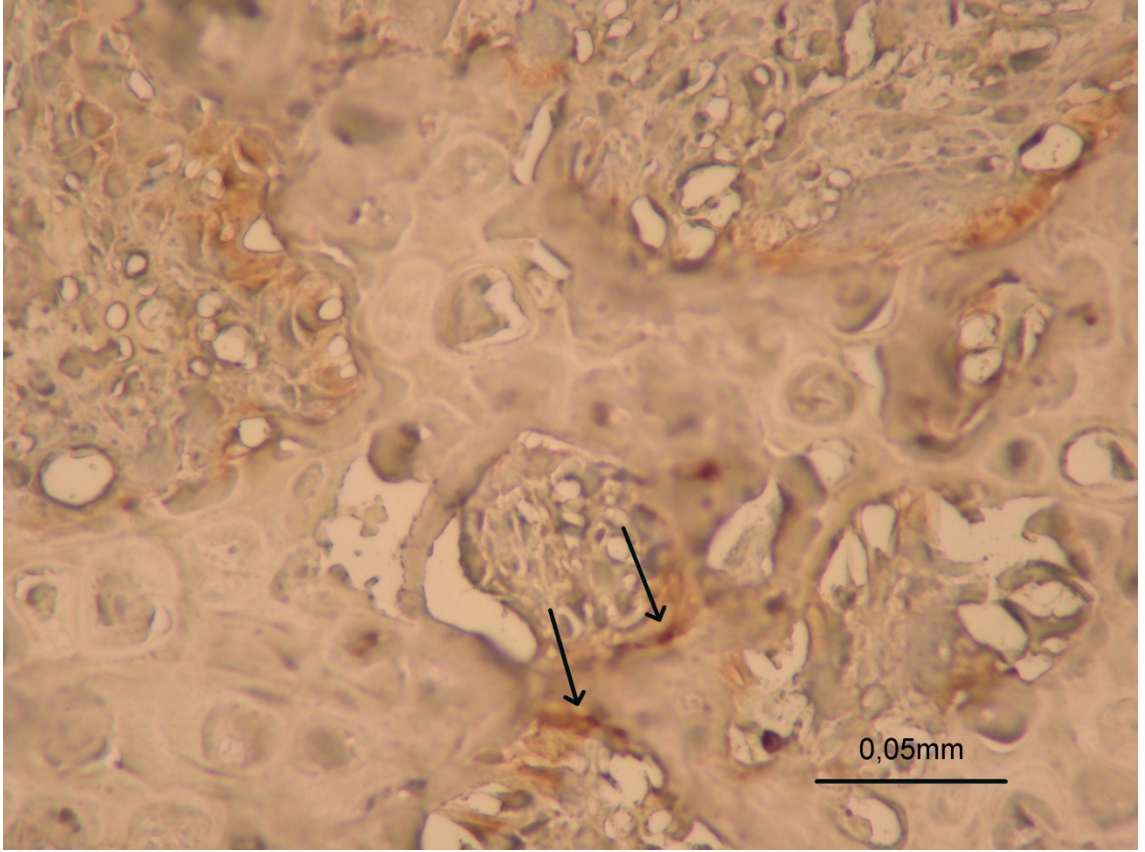
Gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında kont-rif ve kont-spg grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, rif-spg grupları arası farklılık önemsiz bulunmuştur.



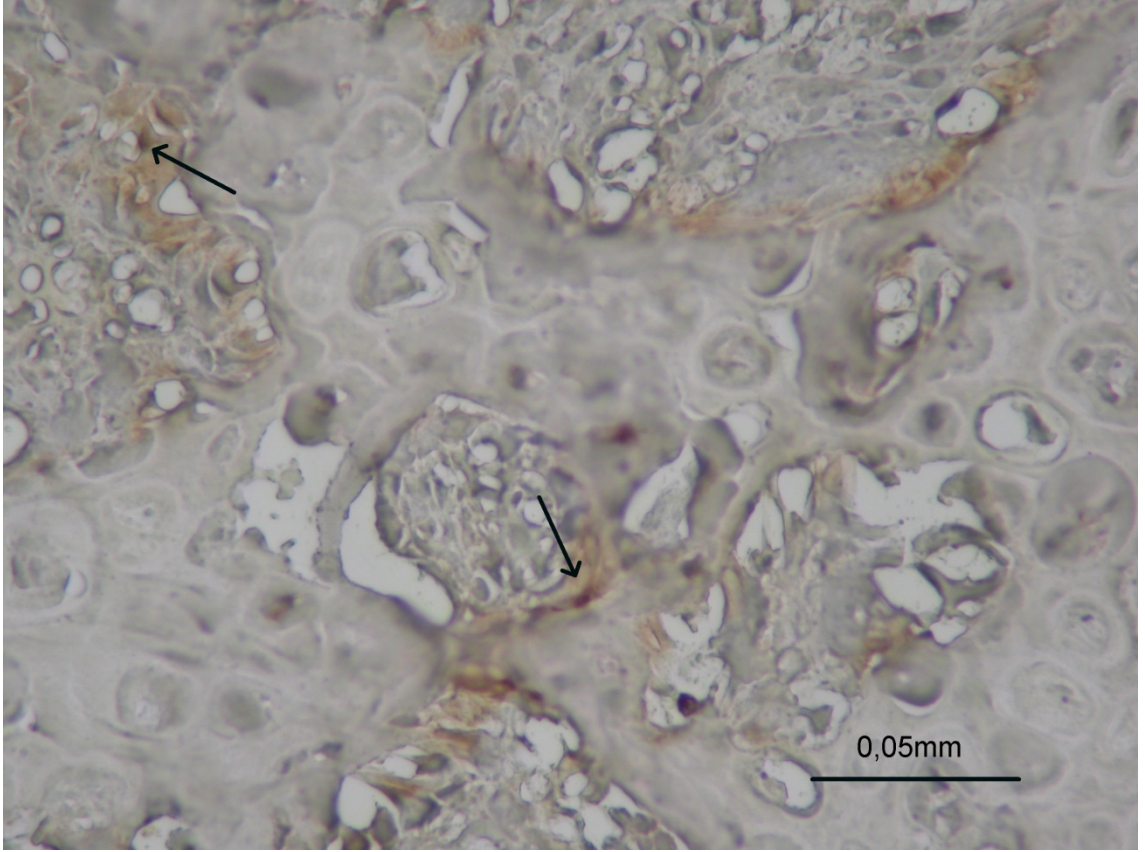
Şekil 4.10 Gruplara ait 21. gündeki ortalama Anti-BMP 2 ile boyanan hücre sayısının dağılımı



**Şekil 4.11** Kontrol grubunda Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi  
(*Monoclonal Antihuman Pro-BMP-2 Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler*)



**Şekil 4.12** RİF irrigasyon grubunda Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (*Monoclonal Antihuman Pro-BMP-2 Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler*)



**Şekil 4.13** SPG grubunda Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (*Monoclonal Antihuman Pro-BMP-2 Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler*)

**Çizelge 4.2** Her üç gruba ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması

Gruplar	Anti-BMP2 ile boyanan hücre sayısı $\bar{X} \pm Ss$
K	4,00±0,94
RİF	6,40±0,96
SPG	6,40±0,96
Sonuç	KW:12,27 P:0,001*

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

## 5. TARTIŞMA

İskelet sisteminin diğerelemanlarında olduğu gibi maksillofasiyal bölgede de kemik bütünlüğünü bozan etkenlerin başında akut ya da kronik travmalar, benign ve malign kemik lezyonları ile çenelerde dişlerin çoklu çekimine bağılı alveolar kayıplar gelir. Benign kemik lezyonlarında daha çok intralezyonel cerrahi yapılırken malign lezyonlarda marjinal rezeksiyon tercih edilir. Bu tedavilerde, lezyonun lokal kontrolünün sağlanması ve fonksiyon ve estetiğın korunması amaçlanır (Kollender ve ark., 2002; Çankaya, 2006).

Lewandrowski ve ark. (2000) yaptıkları bir çalışmada özellikle travma cerrahisi ve tümör operasyonları olmak üzere, dünyada yılda yaklaşık 2.2 milyon kemik cerrahisi girişiminde bulunulduğunu bildirmişlerdir. Bu işlemler neticesinde kemikte oluşan kayıplar organizma tarafından her zaman kendiliğinden tolere edilemeyebilir.

Kritik boyutta kemik defekti; canlıda herhangi bir nedenle meydana gelen kemik kaybının o canlının yaşamı boyunca, iyileşmeyi indükleyici bir materyal kullanılmadan, kendiliğinden iyileşemeyecek boyutta olmasına denir. Bu boyuttaki bir defekt, spontan olarak, kemik dokusuyla değil bağ dokusu dolumuyla iyileşebilir. Kritik boyuttaki defekt için genel bir standart belirtmek pek mümkün değildir. Kemik dokudaki bir yaralanmanın kritik boyutta olmasını; canlının türü, yaşı, sistemik durumu, defekt lokalizasyonu, defektin derinliğı gibi etkenler belirler (Develioğlu, 2003; Özeç ve ark., 2007; Schmidmaier ve ark., 2009; Kruse ve ark., 2010; Donos ve ark., 2011). Buna göre araştırmacılar çeşitli hayvan türlerinde farklı görüşler bildirmişlerdir. Kritik boyutlu defektin boyutunu, Takagi ve Urist (1982), ratta 8 mm, fare ve tavşanda 15 mm; Prolo (1984) köpekte ve maymunda 20 mm olarak rapor etmişlerdir. Buna karşın Freeman (1973) ve Turnbull (1974) ratların pariyetal kemiklerine açtıkları 2mm çaplı defektin 12 hafta sonunda ideal olarak iyileşmediğini görmüşlerdir (Develioğlu, 2003'den). Ayrıca başka bir çalışmada Mulliken (1980) ve Glowacki (1981) Charles River ratlarının pariyetal kemiklerinde 2 mm çaplı defekt oluşturmuşlar ve 6. ayın sonunda ideal bir kemik dolumu bulamamışlardır (Develioğlu, 2003'den). Çalışma sonuçları arasındaki bu tutarsızlıklar farklı şekillerde açıklanmaktadır. Periostun sutureasyonu, ameliyat sırasındaki travma, gözlem süresi, yara bölgesindeki enfeksiyonlar gibi nedenlerin sonuçları etkileyebileceğı görüşü mevcuttur (Develioğlu, 2003). Ancak son zamanlardaki çalışmalarda ratlarda baş boyun bölgesinde 5 mm çaplı defektin kritik



boyutta defekt olduğu kabul görmektedir (Baldık ve ark., 2000; Taşdemir, 2011 ). Bu nedenle bizler de çalışmamızda rat mandibulasında 5mm çapında defekt oluşturduk.

Kritik boyutta kemik defektlerinin onarımları maksillofasiyal cerrahinin önde gelen uğraş alanlarından biridir. Bu amaçla araştırmacılar klinik ve deneysel çalışmalar yapmış ve elde ettikleri sonuçlara göre bu defektlerin onarımlarına katkı sağlayabilecek yöntemler ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemler arasında greft uygulamaları, çeşitli büyüme faktörlerinin implantasyonu, kök hücre çalışmaları ve doğal büyüme faktörlerinin salınımını artıracak uygulamalar sayılabilir. Bizler de çalışmamızı doğal büyüme faktörlerinin salınımını artırmaya yönelik olarak planladık.

Kemiği içeren her türlü cerrahi uygulamalarda kemik greftlemesi sıklıkla kullanılmakta olan bir yöntemdir. Bu amaçla günümüzde pek çok malzeme kullanılmakta ve yenileri geliştirilmeye devam etmektedir. Kemik greftlemede kullanılan materyaller kemik iyileşmesine olan etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar (Pietrzak ve ark., 2005; Eryılmaz, 2008). Osteokondüktif materyaller kemik ortama yerleştirildiklerinde kemik oluşturan hücrelerin tutunması ve çoğalması, yeni damarların oluşumu, kemik matriksinin oluşumu ve kalsifikasyonu için bir yapı iskeleti olarak işlev gören materyallerdir (Clokie ve ark., 2002; Eryılmaz, 2008). Osteoindüktif materyaller ise, yerleştirildiği ortamdaki farklılaşmamış mezenkimal kök hücreleri kemik oluşturan hücrelere dönüşmeleri yönünde uyararak işlev gören materyallerdir (Clokie ve ark., 2002; Pietrzak ve ark., 2005; Eryılmaz, 2008). İdeal kemik grefti materyalinin hem osteokondüktif, hem de osteoindüktif özelliği olmalıdır (Colnot ve ark., 2005; Öztürk ve ark., 2006; Eryılmaz, 2008). Otojen kemik grefti tüm bu özellikleri taşıması nedeniyle günümüzde hala altın standarttır. Ancak, ikinci bir cerrahi alan gerektirmesi, şekillendirme güçlüğü, enfeksiyon, rezorbsiyon ve donör alan morbiditesi gibi dezavantajları mevcuttur (Clokie ve ark., 2002; Öztürk ve ark., 2006; Eryılmaz, 2008). Bu dezavantajlardan kaçınmak ve ideal bir kemik grefti kaynağı olarak kullanılmak üzere pek çok malzeme geliştirilmiştir.

Allogreftler, alloplastik greftler ve ksenogreftler otogreftlere alternatif olarak üretilen greft çeşitleridir. Bunlardan allogreftler aynı türden fakat farklı genetik yapıya sahip canlılardan elde edilen greftlerdir. Genellikle farklı genetik yapıda insanlardan veya kadavralardan elde edilir. Alloplastik greftler, kemik mineral yapısına benzer olarak üretilen sentetik materyallerdir. Ksenogreftler ise mercan kabuklarından veya farklı türden canlılardan elde edilen greft materyalleridir. Kemik defektlerinin

onarımında daha sıklıkla ksenogreftler, ksenogreftler arasında da en çok sığır kaynaklı olanlar kullanılmaktadır (Revell, 1986; Timoçin ve ark., 1993; Fonseca ve Davis, 1995).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kritik boyutta kemik defektlerinin onarımında kemik greftlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, çeşitli büyüme faktörlerinin (Bone morfogenetik protein (BMP), Vasküler endotelial growth factor (VEGF), Fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor (TGF) vb. ) tek başına ya da greftlerle kombine edilerek kullanımı yoğun olarak araştırılmaktadır. Inui ve ark. (1998), tavşan femurunda 10 mm'lik defekt oluşturmuş ve defekte bir taşıyıcı ile beraber FGF yerleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre FGF uygulanan defekte yeni kemik ve kartilaj oluştuğunu gözlemlemiş, buna göre de FGF'nin defekt alanında oluşan kallus miktarını artırdığı bildirmişlerdir.

Nakamura ve ark. (1998) ve Thoren ve Aspenberg (1993), FGF-2'nin kemik greftleriyle kombine edilmesinin enflamatuvar cevabı düzenlediğini, iyileşme aşamalarını daha erken başlatarak osteoblast aktivitesini uyardığını ve kemik gelişimini artırdığını bildirmişlerdir.

Edwards ve ark. (2004), ratların femurlarında deneysel olarak oluşturulan kırık hattına perkutanöz rhBMP uygulamışlardır. Post operatif 1., 2., 3. ve 4. haftalarda deneklerden elde edilen histolojik bulgular incelendiğinde kırık hattındaki kallusun deney grubunda daha büyük olduğunu, kırık hattının her iki tarafında da periostal kemik oluştuğunu ve oluşan yeni kemik alanındaki vaskülarizasyonun daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmaya göre perkutanöz uygulanan rhBMP'nin kırık iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir.

Özeç (2003), koyunlar üzerinde distraksiyon osteogenezisi uyguladığı çalışmasında denek mandibulalarını bilateral olarak uzatmıştır. Deney grubunda operasyon sırasında 3 µg rhBMP-2 kollagen sponge taşıyıcısı kullanılarak osteotomi hattına fragmanlar arasına yerleştirmiş, kontrol grubuna yerleştirmemiştir. Bu şekilde distraksiyon perioduna 10 gün devam etmiştir. Çalışmadan elde edilen histolojik ve radyolojik değerlendirme sonuçlarına göre rhBMP-2'nin, distraksiyon osteogenezisi erken dönem konsolidasyonu üzerinde olumlu etkisi olduğu görülmüştür.

Bu çalışmaların yanında doku mühendisliği alanında son zamanlardaki gelişmeler kök hücre teknolojisini kemik defektlerinin tamirinde kullanmaya olanak sağlamış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ağacayak ve ark.'nin (2012) yaptıkları bir çalışmada ratların kafatasında kritik boyutta defekt oluşturulmuştur. Bu defekte kültür ortamında üretilmiş mezenkimal kaynaklı kök hücre ve Platelet Rich Plasma (PRP) ile karıştırılmış



bifazik kalsiyum fosfat kemik seramik yerleştirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda mezenkimal kaynaklı kök hücre ile karıştırılan PRP grubunda sadece PRP ve sentetik kemik materyali kullanılmasına göre çok daha fazla kemik oluşumu gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak Khojasteh ve ark.'nin (2007) yaptıkları başka bir çalışmada yine rat kafatasında kritik boyutta defekt oluşturulmuş ve defekte kültür ortamında çoğaltılan mezenkimal kaynaklı kök hücre PRP ile karıştırılarak doğal kemik mineralleri taşıyıcısı ile defekt alanına implante edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan kombinasyonun sadece kemik minerali veya sadece PRP uygulanan gruplara göre çok daha fazla miktarda kemik oluşumuna katkı sağladığı rapor edilmiştir.

Jafarian ve ark.'nın (2008) yaptıkları bir çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre kültür ortamında üretilmiş ve bu hücreler bifazik kalsiyum fosfat ve doğal kemik minerali içerikli blok taşıyıcılar ile köpeklerin masseter kasına implante edilmiştir. Daha sonra gelişen yapılar hayvanların alt çene kanin diş bölgelerinde oluşturulan defekte yerleştirilmiştir. 6 hafta sonra yapılan incelemede defekt alanındaki kemik iyileşmesinin bifazik kalsiyum fosfat taşıyıcısında daha fazla gerçekleştiği ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Doku mühendisliğindeki gelişmelere paralel olarak genetik alanındaki gelişmeler de kritik boyutta kemik defektlerinin iyileşmesine katkı sağlamaktadır. Zou ve ark.'nın (2011) yaptıkları bir çalışmada gen terapisinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) vasküler reaktivite ve anjiyogenezde asıl düzenleyici gendir. Bu çalışmada araştırmacılar HIF-1 $\alpha$  fonksiyonu optimize edilmiş mezenkimal kök hücreleri kültür ortamında çoğaltarak rat modellerde kalsiyum-magnezyum fosfat sement taşıyıcısında kritik boyutta defekte yerleştirmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre bu uygulama sonucunda defekt alanında defekti neredeyse tamamen dolduran yüksek dansitede yeni kemik oluşumuna rastlanmıştır. Yine Zou ve ark.'nın (2011) yaptıkları farklı bir çalışma sonucunda HIF-1 $\alpha$  isimli genin anjiyogenik ve osteogenik mekanizmaların düzenlenmesinde en önemli gen olduğu bildirilmiştir. Bu gen fonksiyonları optimize edilmiş kök hücreler çeşitli taşıyıcılarla defekt alanına yerleştirildiğinde tamamen sağlam ve olgun kemik oluştuğu rapor edilmiştir. Çalışmada bu yöntemle kemik defektlerinde defekt alanında kemik volümü, mineral yoğunluğu, kan damarları sayısı, damarlanma alanının arttığı canlı ortamda gösterilmiştir.

Bizler de çalışmamızda yukarıda bahsedilen yöntemlerden daha basit bir uygulamayla deneysel olarak oluşturduğumuz defekt alanına lokal olarak rifamisin

uyguladık ve deney gruplarında defekt alanlarında yeni oluşan kemik miktarının anlamlı derecede arttığını gördük.

Kemik indüksiyonunu sağlayan proteinlerin izolasyonu ilk olarak 1979 yılında Urist tarafından gerçekleştirilmiş ve bu ürünün kemik morfogenetik aktivitesinin demineralize kemikten daha fazla olduğu görülmüştür. Bu proteinler Urist tarafından “Bone Morphogenetic Protein (BMP)” veya “Osteogenic Protein (OP)” olarak isimlendirilmiştir (Wolfe ve ark., 1999; Suzuki ve ark., 2001; Özeç ve Yeler, 2003). Urist’in bu keşfinden sonra araştırmacılar kemik defektlerinde ve iyileşmeyen kırıklarda BMP uygulanmasına yönelik yoğun bir şekilde çalışmaya başlamışlardır.

BMP’lerin fizyolojik rollerini açığa çıkarmak için, birçok BMP yoksun fare üretilmiş ve homozigotik BMP-2 ve BMP-4 defektli farelerin iskelet gelişimi başlamadan öldükleri izlenmiştir (Winnier ve ark., 1995; Daluiski ve ark., 2001). Donati ve ark. (2008) koyunların uzun kemiklerinde kritik boyutta defekt oluşturup lokal olarak BMP-7 uygulamışlar ve defektte kallus formasyonunun ve kemik remodellinginin çok daha hızlı gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Chen ve ark. (2006) ise ratların femurlarında kronik enfekte segmental defekt oluşturmuş ve BMP-7 uygulamışlardır. BMP uygulanan grupta, kontrol grubuna nazaran çok daha fazla mineralize kallus oluştuğu tespit edilmiştir. Jones ve ark. (2006) kortikal defektli diyafiziyal tibia kırıkları olan hastalarda BMP-2’nin güvenle kullanılabileceğini ve en az otojen greft kadar etkin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Clokie ve ark. (2008) mandibularlarında ameloblastoma veya osteomyelit cerrahi tedavisi için yapılan rezeksiyon sonucunda major defekt oluşan hastaları, BMP-7 eklenmiş DBM ile başarılı bir şekilde tedavi etmişlerdir. Warnke ve ark. (2004) yaptıkları farklı bir çalışmada, insanda geniş bir mandibular defekti kapatmak için geleneksel vaskülarize kemik greftinin transplantasyonu üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada taşıyıcı olarak titanyumdan ağ şekilli bir kafes üretmiş ve içerisine, BMP-7 infiltre ettikleri mineral bloklar yerleştirmişlerdir. Bu yapıyı latissimus dorsi kasına implante etmişlerdir. 7 hafta sonunda oluşturdukları dokuyu, serbest kemik-kas flebi şeklinde mandibular defektin tamirinde başarılı bir şekilde transplante etmişlerdir.

BMP suda çözünen düşük moleküler ağırlıklı bir proteindir. Vücut sıvılarında kolayca erir. Bu durum BMP uygulamasında bir taşıyıcı gereksinimini ortaya çıkarmıştır (Seeherman ve ark., 2002). En yaygın olarak kullanılan taşıyıcı kollajendir ve genellikle tip I kollajen tercih edilir. Howel ve ark. (1997) diş çekimi sonrası alveol kemiğin korunması amacıyla “Absorbable Collagen Sponge (ACS)” taşıyıcısı

aracılığıyla çekim soketine BMP uygulamışlar ve hem hızlı bir şekilde kemikleşme olduğunu hem de çekim sonrası alveol kretin korunduğunu tespit etmişlerdir.

Yetişkin memelilerde BMP osteoblastlar ve osteositler tarafından sentez edilmekte ve primer olarak kemik ve dentinde yer almaktadır (Özeç ve Yeler, 2003). Wozney (1988) bir çalışmada BMP'nin DNA zincirinin klonlanmasını gerçekleştirmiş ve bu işlemle BMP'lerin rekombinant olarak istenilen miktarlarda üretilmesi sağlanmıştır. Klinikte, BMP'nin rekombinant formunun pürüfiye edilerek elde edilen formundan daha güvenli olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir. Bessho ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada "Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2)"nin ve insan kemik matriksinden pürüfiye edilerek elde edilen BMP-2'nin kemik indüktif özellikleri karşılaştırılmış ve sonuç olarak rekombinant olarak elde edilen BMP'nin pürüfiye olarak elde edilenin onda biri oranında aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Maksillofasiyal bölgedeki defektlerin tamirinde BMP kullanımı bilinen bir yöntemdir ancak rhBMP elde etmesi zor ve oldukça pahalı bir ajandır. Ancak buna rağmen uygulama alanından çok kolay uzaklaşabilen bir ajan olduğu için kritik boyutta defektlerde defekti kapatmak için çok yüksek miktarlarda kullanımını gerektirir. Bu durum rhBMP'nin klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu sebeple araştırmacılar rhBMP'nin ortama kontrollü salınımını sağlayacak yöntemler veya kemik dokudan salınan doğal BMP'yi artıracak faktörler üzerinde yoğunlaşmışlardır (Mundy ve ark., 1999; Sugiyama ve ark., 2000; Maeda ve ark., 2003; Özeç ve ark., 2007). Ben-David ve ark., (2013) yaptıkları bir çalışmada PEGylated fibrinogen (PF) ile düşük dozda rhBMP-2'yi kombine etmişler ve rat modellerin kafatasında oluşturdukları kritik boyutta defekte bu kombinasyonu implante etmişlerdir. 6 hafta sonunda yapılan incelemede düşük dozdaki rhBMP ve PF kombine grupta sadece PF uygulanan gruba göre oldukça anlamlı derecede fark oluşturacak şekilde kemikleşmenin arttığını tespit etmişlerdir.

Kemik dokudan salınan doğal BMP'yi artıran faktörlere örnek olarak statinler gösterilebilir. Statinler, serum kolesterol seviyesini düşürmek için kullanılan bir ilaç grubu olmasına rağmen yapılan çalışmalar ile kemirgenlerde in vivo ve in vitro olarak kemik oluşumunu artırdıkları ve bu etkinin BMP-2 salınımını artırmak yoluyla olduğu belirlenmiştir (Mundy ve ark., 1999; Sugiyama ve ark., 2000; Özeç ve ark., 2007). Wong ve Rabie (2005) yaptıkları çalışmada simvastatin ile greftlenmiş kemik defektlerinde, greftlemeden sonraki 3. günde VEGF salındığını, 4. günde BMP-2 salındığını ve 5. günde de yeni kemik oluştuğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca Özeç ve ark.

(2007) yaptıkları bir çalışmada rat mandibulasında defekt oluşturmuş ve lokal olarak defekte 3 farklı dozda simvastatin uygulamışlardır. Çalışmanın sonucuna göre de simvastatinin kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu ve doz artışına bağlı olarak da belirli bir noktaya kadar yeni oluşan kemikte de artış olduğunu bildirmişlerdir. Bizler de çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlarda, kritik boyuttaki kemik defektine lokal olarak uyguladığımız rifamisin BMP salınımını önemli derecede artırdığını gördük. Buna göre, zor elde edilmesine rağmen uygulama alanından kolaylıkla uzaklaşabilen ve buna ek olarak oldukça pahalı bir ajan olan rhBMP'nin kullanımına alternatif olarak maliyeti oldukça düşük olan rifamisin ile doğal BMP salınımının artmasının çok değerli bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz.

Rifamisinler, *Streptomyces mediterranei*'den üretilen bakterisid etkili bir antibiyotik grubudur. Açık yada kapalı yaraların irrigasyonunda, enfekte olmuş cerrahi yada kutanöz yaraların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Köşüş ve ark.'nin (2010) yaptıkları bir çalışmaya göre sezeryan yapılan yaklaşık 1200 civarında hasta 2 gruba bölünmüştür. Bir grupta sadece povidon-iyodin ile cilt antisepsisi sağlanmış diğer grupta ise povidon iyodin ve rifamisin SV birlikte uygulanmıştır. Elde edilen veriler post-op enfeksiyon açısından karşılaştırılmış ve rifamisin SV'nin yumuşak doku cerrahisinde cerrahi alan antisepsisinde etken bir antibiyotik olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada Carvalho ve ark. (1997) deney hayvanlarında diş çekimi yapmış ve çekim soketlerinde fibrinolitik alveolit oluşmasını sağlamışlardır. Daha sonra deney gruplarından birinde soketleri Rifosin M ile irrigate etmiş, başka bir deney grubunda ise sokete Rifosin M emdirilmiş Gelfoam yerleştirmişlerdir. Yapılan değerlendirme sonucunda sokete Rifosin emdirilmiş Gelfoam yerleştirilen grupta seyrek kemik yapımları izlenirken, irrigasyon yapılan grupta ise farklılaşmış kemikle dolmuş olduğu bildirilmiştir. Bizlerde çalışmamızda deney gruplarından birinde defekti rifamisin ile irrigate ettik, diğer grupta ise defekte rifamisin emdirilmiş spongostan kollajen yerleştirdik. Yaptığımız değerlendirme sonuçlarına göre; her iki deney grubunda da kontrol grubuna kıyasla defektin önemli miktarda kemik dokusu ile dolduğunu tespit ettik.

Tuzuner-Oncul ve ark.'nin (2009) sundukları bir vaka raporunda mandibular simfiz bölgesinde osteomyeliti olan hastanın rutin amoksisilin grubu antibiyotik tedavisine cevap vermediğini bildirmişlerdir. Daha sonra hastaya yapılan antibiyogram sonucu metisiline dirençli staphylococcus aureus (MRSA) tespit edildiğini, hastaya 10 gün parenteral klindamisin verildiğini ve bu süre boyunca da defekt alanının rifamisin

ile irriga edildiğini belirtmişlerdir. 12 ay sonunda osteomyelit alanında enfeksiyon kalmadığını ve alanın kemikle dolduğunu tespit etmişlerdir.

Daptomisin, MRSA da dahil olmak üzere gram pozitif organizmalara karşı etkili bir antibiyotiktir. Lefebvre ve ark.'nın (2010) yaptıkları bir çalışmada akut osteomyeliti olan hastalara rifamisin ile kombine edilen daptomisin uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre MRSA'nın etken olduğu osteomyelitlerde dahi bu kombinasyonun iyileşmede etkili olduğu bildirilmiştir.

O'reilly ve ark.'nın (1992) yaptıkları deneysel bir çalışmada ratların tibiyal medullar kavitesi MRSA implantasyonu ile enfekte edilmiştir. Bu alana işlemden 10 gün sonra 21 gün boyunca farklı deney gruplarında tek olarak azitromisin, klindamisin ve rifamisin; kombine olarak da azitromisin+rifamisin ve klindamisin+rifamisin kombinasyonları verilmiştir. Yapılan değerlendirmeye göre tek olarak verilen ajanlardan enfeksiyona karşı en etkin cevabı rifamisin sağlamıştır. Bunun yanında kombine verilen ilaçlarda iki grup arasında anlamlı fark olmamakla birlikte etkili bir iyileşme gerçekleşmiştir. Buna göre stafilokokal osteomyeliti olan hastalarda kombine ilaç kullanımının, kombinasyona da rifamisin eklenmesinin en etkili yöntem olduğu bildirilmektedir.

Taşdemir ve ark.'nın (2011) yaptığı farklı bir deneysel çalışmada ise deney hayvanlarından alınan otojen greft kontamine edilmiş ve rifamisin ile dekontaminasyonu sağlanmıştır. Dekontamine edilen greft, deney hayvanına implante edilmiş ve 21 günün sonunda yapılan histolojik değerlendirmeye göre greft alanında salınan BMP miktarının, beklenmedik şekilde, anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür. Bizler de çalışmamızın sonucunda lokal olarak uyguladığımız rifamisinin kritik boyuttaki kemik defektlerinin iyileşmesine ve o alandan salınan BMP miktarının artmasına olumlu etkiler sağladığını tespit ettik. Ayrıca Taşdemir ve ark.'nın çalışması haricinde literatürde çalışmamıza benzer bir çalışma bulunmamaktadır.

VEGF salınımı kemik formasyonunda önemli bir faktördür. Büyüyen farelerde VEGF aktivitesinin blokajı sonucu hipertrofik kartilaj alanının genişlediği, metafizyel kan damarlarının kaybı ve trabekuler kemik formasyonunun azaldığı ve bozulduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre normal anjiyogenez doku tamirinin merkezidir ve VEGF kemik tamiri boyunca anjiyogenezis ve osteogenezis çifti için major sinyal olabilir. VEGF endotelyal hücreler, osteoblast, osteoklast gibi çeşitli hücre tiplerinin kemotaksisini, proliferasyonunu ve yaşam aktivitelerini etkilemektedir (Filvaroff, 2003).

Yapılan bir çalışmada VEGF salınımının olgunlaşmamış kemikte osteoblastların yanında gözlemlendiği ve anjiyogenezin, osteogenezden önce indüklendiği rapor edilmektedir (Sojo ve ark., 2005). Ayrıca yapılan çeşitli çalışmalarda VEGF'nin osteoblast diferansiyasyonu üzerinde direkt otokrin etkisi olduğu ve endotelial hücrelerin osteojenik faktörleri sentezlemesini stimüle ederek indirekt olarak kemik formasyonuna katkısı olabileceği rapor edilmektedir (Wang ve ark., 1997; Bouletreau ve ark., 2002; Street ve ark., 2002).

Taşdemir'in ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada rifamisin ile dekontamine edilen otojen greftin implante edildiği alanda VEGF'nin arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Yaptığımız çalışmamızın histomorfometrik değerlendirmesi sonucunda deney gruplarında defekt alanında yeni oluşan kan damarlarının kontrol gruplarına göre anlamlı derecede daha fazla olduğunu gördük. Bu sonucun o alanda VEGF'nin artmasından kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Lokal olarak uygulanan rifamisinin VEGF salınımını artırdığına dair literatürde bir bilgiye rastlanmamaktadır. Bize göre de yaptığımız çalışmamızın eksik kalan yönü, rifamisinin VEGF salınımı üzerine etkisini incelemek için immunohistokimyasal değerlendirme yapılmamasıdır.

Medikal alanda gerçekleştirilen tüm laboratuvar çalışmaları içerisinde hayvan çalışmaları büyük önem taşır. Bu çalışmalarda kullanılacak hayvan modelinin seçiminde, hayvanın vücut immünitesi ile insan immünitesinin benzerlik göstermesine dikkat edilmelidir. Stevenon ve ark. hayvan çalışması denek seçiminde, çalışmanın gerektirdiği koşullara uygunluk ve konuyla ilgili yeterli kaynak bulunmasının belirleyici etkenler olduklarını bildirmişlerdir (Stevenson ve ark., 1996; Çankaya, 2006). Buna göre deney hayvanlarından domuz, köpek, tavşan ve rat en uygun modeller olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat etik olarak ülkemizde köpekler üzerinde son 7 yıldır çalışma yapılmamaktadır. Domuzlarda ise bakım işleminin ve cerrahi işlemin yapılması zordur. Sonuçta kolay bulunması, barınma ve beslenmesinin kolaylığı ve ucuz olmasından dolayı tavşan ve ratlar deneysel hayvan çalışmalarında en sık kullanılan modellerdir. Bizde çalışmamızı ratlar üzerinde gerçekleştirdik.

Yapılan bazı çalışmalarda araştırmacılar ilk haftadan itibaren 4 haftalık sürenin ratlarda yeni kemik oluşumu ve anjiyogenezini gözlemlemek için yeterli bir süre olduğunu bildirmişlerdir (Schmid ve ark., 1997; Boo ve ark., 2002; Herron ve ark., 2003; Kerem, 2007). Buna karşılık özellikle son zamanlarda kemik iyileşmesini incelemek için yapılan çalışmalarda araştırmacılar, çalışmayı sonlandırmak için 21

günlük süreyi seçmişler ve bu sürenin ratlardaki kemik iyileşmesi için ideal süre olduğunu tespit etmişlerdir (Kuşkucu ve ark., 1991; Göksan ve ark., 1997; Ertaş ve ark., 2004; Özeç ve ark., 2007; Şahin ve ark., 2009; Aydın ve ark., 2011; Taşdemir, 2011). Bizde çalışmamızı sonlandırmak için 21 günlük süreyi seçtik.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut çalışmada deneysel olarak oluşturulan kritik boyutlu defekte lokal olarak uygulanan rifamisin defekt alanındaki kemikleşmeyi ve BMP salınımını artırdığı tespit edilmiştir. Buna göre rifamisin çeşitli nedenlerle oluşan kemik defektlerinde güvenle kullanılabilir. Ayrıca yeni oluşan kan damarlarındaki artış rifamisin VEGF'yi de artırabileceğini düşündürmektedir. Rifamisin yeni kemik oluşumuna, BMP ve muhtemel VEGF salınımına olumlu etkilerinden ve bu sonuçlara literatürde rastlanmamasından dolayı çalışmamızın sonuçları önem arz etmektedir. Ancak bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. İhtiyaç duyulduğunu düşündüğümüz yapılması muhtemel literatür çalışmalarında; rifamisin dozunun kemik hücrelerine, kemikleşmeye veya salınan BMP miktarına etkisi olup olmadığı, klinik uygulamalarda rifamisin kemik defektlerinin iyileşmesine ne derecede etki ettiği, kemik defektlerine rifamisini taşıyıcı olarak ne tip farklı materyaller kullanılabilirliği ve bunun iyileşmeye etkisi olup olmayacağı gibi soruların cevapları aranmalıdır.

Sonuç olarak kemik defekti oluşan her türlü cerrahi işlemde, lokal rifamisin kullanımını önermekteyiz.



## KAYNAKLAR

- Agacayak, S., Gulsun, B., Ucan, M.C., Karaöz, E., Nergiz, Y. (2012). Effect of mesenchymal stem cells in critical size bone defect, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16, 679-86.
- Akay, M.C. (1998). Çeneler Bölgesinde Meydana Gelen Kemik Defektlerinin Solvent Dehidrate Allojen Spongioz Kemik Greftleri İle Tedavisi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, s.3-33.
- Alfaro, F.H. (2006). Bone Grafting in Oral İmplantology Techniques and Clinical Applications, Quintessence Publishing Co Ltd, UK.
- Alpaslan, C., Irie, K., Takahashi, K., Ohashi, N., Sakai, H., Nakajima, T., Ozowa, H. (1996). Long term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system, *Br J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 34, 414-418.
- Altay, A. (2006). Düşük yoğunluklu atılımlı ultrasonun deney hayvanlarında kemik iyileşmesi üzerine etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 83s.
- Alturfan, A.K. ve Akalın, Y. (2002). Ortopedik Travmatoloji, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 10-14s.
- Ameto, P.S., Martinez-Hernandez, A., Trelstad, R.L. (1996). Repair and regeneration in Anderson's pathology, St. Louis Mosby Co.
- ArmaceuSweetman, S. (2005) The Complete Drug Reference. [Internet database]. London: Phtical Press. Electronic version, Greenwood Village, Colo: Thomson Micromedex. Updated periodically.  
<http://www.micromedex.com/products/martindale>.
- Aslan, M. (2002). Kemik defektlerinin iyileşmesinde heterojen kemik greftinin ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu yönteminin etkilerinin incelenmesi ve karşılaştırılması, Doktora tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Aydın, K., Şahin, V., Gürsu, S., Mercan, A.Ş., Demir, B., Yıldırım, T. (2011). Effect of pentoxifylline on fracture healing: an experimental study, *Eklem Hastalık Cerrahisi*, 22(3), 160-165.
- Baldık, Y. (2000). Nitrik oksidin kemik iyileşmesindeki rolü, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul.
- Baldık, Y., Talu, U., Altinel, L., Bilge, H., Toker, G.A. (2000). Nitrik oksitin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisinin radyolojik incelenmesi: sıçanlarda deneysel çalışma, *Acta Orthop Traumatol Turc.*, 34, 190-197.
- Ballı, B. (2004). Kemik dokusu, iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler, Bitirme Tezi, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, İstanbul, 70s
- Bancroft, J.D. and Stevens, A. (1996). Theory And Practice Of Histological Techniques. Fourth edition, Churchill Livingstone, New York, Chapter 15, Bone, p.309-339.
- Ben-David, D., Srouji, S., Shapira-Schweitzer, K., Kossover, O., Ivanir, E., Kuhn, G., Müller, R., Seliktar, D., Livne, E. (2013). Low dose BMP-2 treatment for bone repair using PEGylated fibrinogen hydrogel matrix, *Biomaterials*, 34, 2902-10.
- Bessho, K., Konishi, Y., Kaihara, S., Fujimura, K., Okubo, Y., Iizuka, T. (2000). Bone induction by Escherichia coli – derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Br J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 38, 645-49.

- Bessho, K., Kusumoto, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Ogawa, Y., Tani, Y., Iizuka, T. (1999). Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein, *Br J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 37, 2-5.
- Boo, J. S., Yamada, Y., Okazaki, Y., Hibino, Y., Okada, K., Hata, K., Yoshikawa, T., Sugiura, Y. and Ueda, M. (2002). Tissue-Engineered Bone Using Mesenchymal Stem Cells and a Biodegradable Scaffold, *J Craniofac Surg*, 13, 231-239.
- Bostrom, M., Lane, J.M., Tomin, E., Browne, M., Berberian, W. and Turek, T. (1996). Use of bone morphogenetic protein-2 in the rabbit ulnar nonunion model, *Clin Orthop*, 327, 272-82.
- Bouletreau, P.J., Warren, S.M., Spector, J.A., Peled, Z.M., Gerrets, R.P., Greenwald, J.A. and Longaker, M.T. (2002). Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing, *Plast Reconstr Surg*, 109, 2384-2397.
- Boyne, P.J. (2001). Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects, *J Bone Joint Surg Am.*, Vol. 83, 146-50.
- Boyne, P.J., Marx, R.E., Nevins, M., Triplett, G., Lazaro, E. and Lilly, L.C. (1997). A feasibility study evaluating rhbmp-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation, *Int J Periodontics Restorative Dent*, 17, 11.
- Bölükbaşı, N.(2004). Alveol kemiği implant ilişkisi, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Implantoloji Anabilim Dalı, Seminer çalışması, İstanbul.
- Cardor, E., Tillie-Leblond, I. and Jeannin, P. (1995). Anaphylactic reaction to local administration of rifamycin SV, *J Allergy Clin Immunol*, 95, 1-7.
- Carvalho, P.S.P., Mariano, R.C., Okamoto, T. (1997). Treatment of fibrinolytic alveolitis with rifamycin B diethylamide associated with gelfoam: a histological study, *Braz Dent J.*, 8(1), 3-8.
- Chacon, G.E., Ellis, J.P., Kalmar, J.R., McGlumphy, E.A. (2004). Using resorbable screws for fixation of cortical onlay bone grafts: an in vivo study in rabbits, *J Oral Maxillofac Surg.*, 62(11), 1396-1402.
- Chen, X., Schmidt, A.H., Tsukayama, D.T. ve ark. (2006). Recombinant human osteogenic protein-1 induces bone formation in a chronically infected, internally stabilized segmental defect in the rat femur, *J Bone Joint Surg.Am.*, 88, 1510-23.
- Clokie, C.M., Moghadam, H., Jackson, M.T., Sandor, G.K. (2002). Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes, *J Craniofac Surg.*, 13, 111-121.
- Clokie, C.M., Sandor, G.K. (2008). Reconstruction of 10 major mandibular defects using bioimplants containing BMP-7, *J Can Dent Assoc.*, 74, 67-72.
- Colnot, C., Romero, D.M., Huang, S., Helm, J.A. (2005). Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects, *Clin Orthop Relat Res.*, 435, 69-78.
- Cormack, D.H. (1993). *Essential Histology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Chapter 8, Dense Connective Tissue, Cartilage, Bone, and Joints, p.159-190.
- Cotran, R.S., Kumar, V., Robbins, S.L. (1994). *Robbin's pathologic basis of disease*, WB Saunders Co. 5 th ed., London
- Cowin, S.C. (2001). *Bone Mechanics Handbook*. 2<sup>nd</sup> edn. Boca, Raton, London, New York, Washington, CRC Press, Bölüm 1: 1-68, Bölüm 2: 1-24.
- Çankaya B. (2004). Kemik. İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Seminer çalışması.

- Çankaya, A.B. (2006). Deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerinde iki farklı kriyojen madde olan sıvı nitrojen ve karbondioksit gazı uygulamasının kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 138s.
- Daluiski, A., Engstrand, T., Bahamond, e M.E., vd. (2001). Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density, *Nat Genet*, Vol. 27, 84–8.
- Develioğlu, H. (2003). Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler, *Cumhuriyet Üniversitesi Dış Fak Derg.*, 6(1), 60-63.
- Donati, D., Di Bella, C., Lucarelli, E. ve ark. (2008). OP-1 application in bone allograft integration: preliminary results in sheep experimental surgery, *Injury*, 39 (Suppl 2), 65–72.
- Donos, N., Graziani, F., Mardas, N. and Kostopoulos L. (2011). The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical size calvarial defects, *Clin Oral Impl Res* xx, 000-000, 1-8.
- Drancourt, M., Stein, A., Argenson, J.N., Roiron, R., Groulier, P. and Raoult, D. (1997). Oral treatment of *Staphylococcus* spp. Infected orthopaedic implants with fusidic acid or ofloxacin in combination with rifampicin, *J Antimicrob Chemother*, 39, 235—40.
- Durmuş, E. (1995). Deneysel olarak oluşturulan kafatası kemik defektlerine yerleştirilen doğal mercan dens ve pöröz hidroksilapatitin histopatolojik ve radyolojik olarak değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 76s.
- Edwards, R.B. 3rd, Seeherman, H.J., Bogdanske, J.J., Devitt, J., Vanderby, R Jr., Markel, M.D. (2004) Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy, *J Bone Joint Surg Am.*, 86, 1425–1438.
- Ege, R. (2003). Travmatoloji. Kırıklar, Eklem ve Diğer Yaralanmalar 5. Baskı, Ankara, 55-94.
- Einhorn, T.A. (1995). Enhancement of fracture healing, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 77-A, 940-955.
- Elhan, A. (1989). Kemikler (Osteologia), Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Matbaası, Ankara, 1-7.
- Erdoğan, D., Hatipoğlu, M., Görgün, M. ve Ilgaz, C. (1999). Genel Histoloji, Hatipoğlu Yayın Evi, Ankara, s107–117.
- Eren, C. (2006). Bone morfojenetik proteinin oral cerrahideki rolü ve uygulamaları, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Dış Hek. Fak. Ağız Dış ve Çene Hastalıkları Cerrahisi AD., İzmir, 47s.
- Ertaş, Ü., Kaya, Ö., Kiki, İ., Erdoğan, F., Akçay, G. (2004). Experimental kemik defektlerinin iyileşmesinde rekombinant biyosentetik growth hormon tedavisinin ve oktreotid asetatın rolü, *Atatürk Üniv. Dış Hek. Fak. Derg.*, 14(2), 1-11.
- Eryılmaz, A.T. (2008). Demineralize kemik matriksinin farklı doku planlarında histolojik davranışının değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi AD., Ankara, 79s.
- Fawcett, D.W. and Jensch, R.P. (2002). *Bloom & Fawcett's Concise Histology*. Second Edition, Arnold, a member of the Hodder Headline Group, London, Chapter 6, Bone, p.87-99.
- Filvaroff, E.H. (2003). VEGF and bone, *J Musculoskel Neuron Interact*, 3(4),304-307.
- Fonseca, R.J., Walker, R.V., Betts, N.J., Barber, H.D., Powers, M.P. (2005). *Oral and Maxillofacial Trauma*, 3 rd edition, Elsevier Saunders, China, Vol. 1, 42–55p.

- Freeman, E. and Turnbull, R.S. (1973). The role of osseous coagulum as a graft material, *J.Periodont. Res.*, 8, 229.
- Fujimoro, K., Bessho, K., Kusumoto, K., Konishi, Y., Ogowa, Y., Lizuka, T. (2001). Experimental osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in tissue with low blood flow: a study in rats, *Br J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 39, 294-300.
- Garant, P.R. (2003). *Oral Cells And Tissues*, Quintessence Publishing Co. Inc. Illinois: Chapter 7-8, 442-57p.
- Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2001). *Color Textbook Of Histology*. Second edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Chapter 7, Cartilage and Bone, p.129-153.
- Gehron-Robey, P. and Boskey, A.L. (1996). The biochemistry of bone, in *Osteoporosis*. Marcus, E., Feldman, D., Kelsey, J., Academic Press, Chapter 4, San Diego, 74-8p.
- Glowacki, J., Altobelli, D., Mulliken, J.B. (1981). Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects, *Calsif. Tissue Int*, 33, 71.
- Gomez, G., Korhikoski, S., Gonzales, MM., Lansman, S., Ella, V., Salo, T., Kellomaki, M., Ashammakhi, N. and Arnaud E. (2006). Effect of FGF and polylactide scaffold on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer scaffolds, *J Craniofac Surg.*, 17, 935-942.
- Gordh, M., Alberius, P., Johnell, O., Lindberg, L., Linde, A. (1999). Effects of rhBMP-2 and osteopromotive membranes on experimental bone grafting, *Plast Reconstr Surg.*, Vol. 103, 1909-18.
- Gorski, J.P. (1998). Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms, *Crit Rev Oral Biol Med.*, Vol. 9, 201-23p.
- Göksan, S.B., Atalar, A.C., Eralp, L. (1997). Tenoksikamın kemik iyileşmesi üzerine etkisi: sıçanlarda biyomekanik çalışma, *Acta Orthop. Traumatol Turc.*, 31, 37-40.
- Groeneveld, E.H. and Burger, E.H. (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration, *Eur J Endocrinol*, 142, 21-25.
- Güngörmüş, M. (1996). Tavşanlarda oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine heterolog tip I kollajenin etkisinin histopatolojik ve radyolojik olarak incelenmesi, *Doktora Tezi, Erzurum*, 64s
- Güven, O. ve Keskin, A. (2001). *Çağdaş Preprotetik Cerrahi*, Ankara, s88-89.
- Herron, S., Thordarson, D. B., Winet, H., Luk, A. and Bao, J. Y. (2003). Ingrowth of Bone into Absorbable Bone Cement: An in vivo Microscopic Evaluation, *Am J Orthop*, 32, 581-584.
- Higuchi, K.W. and Branemark, P. (2000). *Osseointegrated Implants*. Chicago, Berlin, London, Tokyo, Paris, Barcelona, São Paulo, Moscow, Prague and Warsaw : Quintessence Publishing Co, Inc., 164-167.
- Howell, T.H., Fiorellini, J., Jones, A., Alder, M., Nummikoski, P., Lazoro, M. Ve ark. (1997). A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation, *Int J Periodontics Restorative Dent.*, 17, 125-39.
- Inui, K., Maeda, M., Sano, A., Fujioka, K., Yutani, Y. (1998). Local application of basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits, *Calsif Tissue Int.*, 63, 490-495.
- Iselin, F., Audren, J.L. and Gounet, O. (1990). Comparative study of the effects of a local antibiotic and a local antiseptic in emergency hand surgery, *Ann Chir Main Memb Super*, 9, 65-71.

- Jafarian, M., Eslaminejad, M.B., Khojasteh, A., Abbas, F.M., Dehghan, M.M., Hassanizadeh, R., Houshmand, B. (2008). Marrow derived mesenchymal stem cells directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 105, 14-24.
- Jones, A.L., Bucholz, R.W., Bosse, M.J. ve ark. (2006). Recombinant human BMP-2 and allograft compared with autogenous bone graft for reconstruction of diaphyseal tibial fractures with cortical defects. A randomized, controlled trial, *J Bone Joint Surg Am.*, 88, 1431-41.
- Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2006). *Temel Histoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri (Çeviri: Aytekin, Y, Solakoğlu, S.), İstanbul, s141-154.
- Kahnberg, K.E. (2005) *Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants*, Blackwell Munksgaard, Blackwell Publishing, Sweden, p2-11.
- Kalfas, I.H. (2001). Principles of bone healing, *Neurosurg Focus*, 10(4), 7-10.
- Kanczler, JM., Ginty, PJ., White, L., Clarke, NMP., Howdle, SM., Shakesheff, KM. and Oreffo ROC. (2010). The effect of the delivery of vaskular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 to osteoprogenitor cell population on bone formation, *J of Biomaterials*, 31, 1242-1250.
- Karsenty, G. (2000). Bone morphogenetic proteins and skeletal and nonskeletal development. In: Canalis MDE (ed) *skeletal growth factors*, Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 291-310.
- Kawabata, M. and Miyazono, K. (2000). Bone morphogenetic proteins. In: Canalis MDE (ed) *skeletal growth factors*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 269-90.
- Kayaalp, S.O. (2009). Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Feryal matbaacılık, Pelikan Tıp ve Teknik kitapçılık, Ankara, s-225.
- Kerem, B.A. (2007) Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi, *Uzmanlık Tezi*, İstanbul.
- Khojasteh, A., Eslaminejad, M.B., Nazarian, H. (2008). Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich plasma, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106, 356-62
- Kılıçoğlu, S.S. (2002). Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, Vol. 55(2), 143-150.
- Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık (Çeviri Ed.: Prof. Dr. Ramazan Demir), İstanbul, s.118-140.
- Kocaelli, H.A. (2000). Korona stimülasyonunun ağız cerrahisi girişimlerinde iyileşme sürecinin etkisinin deneysel araştırılması, *Doktora Tezi*, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 88s.
- Kollender, Y., Meller, I., Bickels, J. (2002). Role of adjuvant cryosurgery in intralesional treatment of sacral tumours, *Cancer*, 97, 2830-38.
- Kökden, A. ve Türker, M.(1999). Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Fak Derg*, 2, 134-140.
- Köşüş, A., Köşüş, N., Güler, A. and Çapar, M. (2010). Rifamycin SV application to subcutaneous tissue for prevention of post-cesarean surgical site infection, *Eur J Gen Med*, 7, 269-76.
- Köşüş, A., Köşüş, N., Güler, A., Çapar, M. (2010). Rifamycin SV Application to subcutaneous tissue for prevention of post-cesarean surgical site infection, *Eur J Gen Med*, 7(3), 269-76.

- Kronenberg, H.M. (2003). Developmental regulation of the growth plate, *Nature* Vol. 423, 332–6.
- Kruse, A., Jung, R.E., Nicholls, F., Zwahlen, R.A., Hammerle, C.H.F. and Weber F.E. (2010). Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite based bone substitute material, *Clin Oral Impl Res* xx, 000-000, 1-6.
- Kubler, N.R., Reuther, J.F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R. and Sebald, W. (1998). Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 27, 305-9.
- Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K. and Akioka, J. (1997). Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human bmp-2 and recombinant xenopus bmp-4/7 heterodimer, *Biochem Biophys Res Commun*, 239, 575-79.
- Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Akioka, J., Okubo, Y., Ogawa, Y., Iizuka, T. (2000). The effect of blood supply in muscle and an elevated muscle flap on endogenous tissue-engineered bone by rhBMP-2 in the rat, *Ann Plast Surg.*, Vol. 45, 408-14.
- Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K., Konishi, Y., Ogawa, Y. and Iizuka, T. (1996). Selfregenerating bone implant: ectopic osteoinduction following intramuscular implantation of a combination of rhBMP-2, atelopeptide type I collagen and porous hydroxyapatite, *J Craniomaxillofac Surg*, 24, 360-5.
- Kuşkucu, M., Kral, A., Uçmaklı, E., Kaplan, H., Elbüken, E., Kaya, T. (1991). Hiperbarik oksijen uygulamasının sıçan femur kırıklarının iyileşmesindeki etkisi, *Acta Orthop. Traumatol Turc.*, 25, 234-238.
- Laxenaire, M.C., Mouton, C., Frederic, A., Viry-Babel, F. and Bouchon, Y. (1996). Anaphylactic shock after tourniquet removal in orthopedic surgery, *Ann Fr Anesth Reanim*, 15, 179-84.
- Lefebvre, M., Jacqueline, C., Amador, G., Le Mabecque, V., Miqueville, A., Potel, G., Caillen, J., Asseray, N. (2010). Efficacy of daptomycin combined with rifampicin for the treatment of experimental meticillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) acute osteomyelitis, *Int J Antimicrobial Agents*, 36, 542-44.
- Lewandrowski, K.U., Gresser, J.D., Wise, D.L., Trantol, D.J. (2000). Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: A histological evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats, *Biomaterials*, 21, 757-64.
- Lindhe, J., Karring, T., Lang, N.P. (2003). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, Blackwell Pub, 4 th edition, USA, 867–877p.
- Lynch, S.E., Genco, R.J. and Marx, R.E. (1999). *Tissue Engineering, Applications In Maxillofacial Surgery And Periodontics*. Quintessence Publishing Co, Carol Stream, Illinois, Chapter 2, *Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy*, p.17-55.
- Maeda, T., Kawane, T., Horiuchi, N. (2003). Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation, *Endocrinology*, 144, 681-92.
- Marchena, J.M., Block, M.S., Stover, J.D. (2002). Tibial Bone Harvesting Under Intravenous Sedation: Morbidity and Patient Experiences, *J Oral Maxillofacial Surg*, 60, 1151-1154.
- Marukawa, E., Asahina, I., Oda, M., Seto, I., Alam, M.I. and Enomoto, S. (2001). Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles, *Br J Oral Maxillofac Surg*, 39, 452-9.

- Miyazono, K., Maeda, S., Imamura, T. (2005). KMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling crosstalk, *Cytokine Growth Factor Rev.*, Vol. 16, 251–63.
- Mulliken, J.B. and Glowacki, J. (1980). Induced osteogenesis for repair and and construction in the craniofacial region, *Plast. Reconstr. Surg.*, 65, 553.
- Mundy, G.R. and Martin, T.J. (1993). *Physiology and Pharmacology of Bone*, Springer Verlag, USA.
- Mundy, G.R., Garrett, .IR., Harris, S.E., Chan, J., Chen, D., Rossini, G., Boyc,e B.F., Zhao, M., Gutierrez, G. (1999). Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statinS, *Science*, 286, 1946-9.
- Murata, M., Huang, B.Z., Shibata, T., Imai, S., Nagai, N., Arisue, M. (1999). Bone augmentation by recombinant human bmp-2 and collagen on adult rat parietal bone, *J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 28, 232-37.
- Müftüoğlu, S. (1993). Kemik nasıl oluşur, *Bilim ve Teknik Derg.*, Vol. 26(313), 907.
- Nakamura, K., Kurokawa, T., Aoyama, I., Hanada, K., Tamura, M., Kawaguchi, H. (1998). Stimulation of bone formation by intraosseous injection of basic fibroblast growth factor in overiectomised rats, *Int Orthop*, 22, 49-59.
- Nordin, M. and Frankel, V.H. (1990). *Biomechanics of Whole Bone and Bone Tissue*, Lea&Febiger.
- O'reilly, T., Kunz, S., Sande, E., Zak, O., Sande, M.A., Tauber, M.G. (1992). Relationship between antibiotic concentration in bone and efficacy of treatment of staphylococcal osteomyelitis in rats: Azithromycin compared with clindamycin and rifampin, *Antimicrob Agents Chamother*, 36(12), 2693-97.
- Oikarinen, K., Kainulainen, V., Kainulainen, T. (1997). A method of harvesting corticocancellous bone chips for reconstructive maxillofacial surgery, *Int. J. Oral Maxillofac Surg.*, 26, 103-105.
- Oktaç, Z. (1992). Çocuklarda kemik dokusunun yapılmasını, korunmasını ve mineralleşmesini negatif yönde etkileyen hastalıklar, *Uludağ Üniversitesi, Bursa*.
- Omura, S., Mizuki, N., Kawabe, R., Ota, S., Kobayashi, S., Fujita, K. (1998). A carrier for clinical use of recombinant human bmp2: dehydrothermally cross linked composite of fibrillar and denatured atelocollagen sponge, *Int J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 27: 129-34.
- Oral, O. (2000). L-Dopa'nın (Allajenik greft uygulanan ve uygulanmayan) kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkilerinin deneysel araştırılması, *Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul*, 4-22s.
- Oztürk, A., Yetkin, H., Memis, L., Cila, E., Bolukbasi, S., Gemalmaz, C. (2006). Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats, *Int Orthop.*, 30, 147-152.
- Özeç İ. (2003). Lokal olarak uygulanan recombinant human bone morphogenetic protein-2'nin distraksiyon osteogenezisi üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi, *Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas*.
- Özeç, İ. ve Yeler, H. (2003). Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Fak Derg.*, 6(1), 31-36.
- Özeç, İ., Kılıç, E., Gümüş, C. ve Göze F. (2007). Lokal olarak üç farklı dozda simvastatin uygulamasının kemik defekti iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi, *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek Fak Derg.*, 10(2), 82-86.

- Özyiğit, H.A. (2007). Deneysel olarak oluşturulan defektlerde titanyum partikülleri ve değişik greft materyallerinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması, Doktora Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 89s
- Park J.B. and Bronzino, J.D. (2002). *Biomaterials: Principles and Applications*, CRC Press, USA, 5–9p.
- Peleg, M., Garg, A.K., Misch, C.M., Mazor, Z. (2004) Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft, *J Oral Maxillofac Surg.*, 62(12), 1535-1544.
- Peterson, L.J. and Ellis III E. (1998). *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery: Surgical Reconstruction of Defects of the Jaws*, chapter 28, 3rd ed. Mosby, USA.
- Peterson, L.J., Ellis, E., Hupp, J.R., Tucker, M.R. (1993). *Contemporary oral and maxillofacial surgery*, 2 nd ed, St. Louis: Mosby Co.
- Pietrzak, W.S., Perns, S.V., Keyes, J., Woodell-May, J., McDonald, N.M. (2005). Demineralized bone matrix graft: a scientific and clinical case study assessment, *J Foot Ankle Surg.*, 44, 345-353.
- Prolo, D.J., Gutierrez, R.V., DeVine, J.S., Oklund, S.A. (1984). Clinical utility of allogeneic skull discs. in human craniotomy, *Neurosurgery*, 14, 183.
- Raghoobar, G.M., Louwse, C., Kalk, W.W.I., Vissing, A. (2001). Morbidity of Chin Bone Harvesting, *Clin Oral Impl Res.*, 12, 503-507.
- Reddi, A.H. (2000). Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside, *Biochem Soc Trans*, Vol. 28, 345-9.
- Revell, P.A. (1986). *Pathology of bone*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 30, p.203-231.
- Ripamonti, U. and Duneas, N. (1998). Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins, *Plast Reconstr Surg*, 101, 227-39.
- Santana, RB. and Trackman, PC. (2006). Controlled release of fibroblast growth factor 2 stimulates bone healing in an animal model of diabetes mellitus, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 21, 711-718.
- Sayan, N.B., Duran, S., Akal, Ü.K., Günhan, Ö. (1995). Biocoral ve HTR granüllerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, Deneysel çalışma, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 22(3), 207-212.
- Saydam, İ.M., Yılmaz, S. ve Seven, E. (2005). Topikal Olarak Uygulanan Nitrofurazon Ve Rifamisin'in Tam Kalınlıkta Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri, C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi, 27, 113 – 120.
- Schlegel, K.A., Lang, F.J., Donath, K., Kulow, J.T., Wiltfang, J. (2006). The critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102(1), 7-13.
- Schmid, J., Wallkamm, B., Hammerle, C. H., Gogolewski, S. and Lang, N. P. (1997). The Significance of Angiogenesis in Guided Bone Regeneration. A Case Report of a Rabbit Experiment, *Clin Oral Implants Res*, 8, 244–248.
- Schmidmaier, G., Capanna, R., Wildemann, B., Beque, T., Lowenberg, D. (2009). Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defect: what are the options?, *Int J Care Injured*, 40, 39-43.
- Sciadini, M.F. and Johnson, K.D. (2000). Evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model, *J Orthop Res*, 18, 289-302.
- Seeherman, H., Wozney, J., Li, R. (2002). Bone morphogenetic protein delivery systems, *Spine* 25 (Suppl 1), 16-23.



- Seto, I., Asahina, I., Oda, M. and Enomoto, S. (2001). Reconstruction of the primate mandible with a combination greft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow, *J Oral Maxillofac Surg*, 59, 53-61.
- Sojo, K., Sawaki, Y., Hattori, H., Mizutani, H. and Ueda M. (2005). Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2,-4 (BMP-2,4) on lengthened rat femurs, *J Craniomaxillofac Surg*, 33, 238-45.
- Srouji, S., Rachmiel, A., Blumenfeld, I. and Livne, E. (2005). Mandibular defect repair by TGF- $\beta$  and IGF-1 released from biodegradable osteoconductive hydrogel, *J of Cranio-maxillofacial Surg.*, 33, 79-84.
- Stevenson, S., Emery, S.E., Goldberg, V.M. (1996). Factors affecting bone graft incorporation, *Clin Orthop Relat Res.*, 324, 66-74.
- Street, J., Bao, M., De Guzman, L., Bunting, S., Peale, F.V. and Ferrara, N. (2002). VEGF stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15, 656– 61.
- Sugiyama, M., Kodama, T., Konishi, K., Abe, K., Asami, S., Oikawa, S. (2000). Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 19, 688-92.
- Suzuki, T., Bessho, K., Segami, N., Lizuka, T., Nojima, T. (2001). Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein2 in the oral and maxillofacial area of the human embryo, *Br J Oral Maxillofac Surg.*, Vol. 39, 289-93.
- Şahin, S., Saygun, I., Kurt, B., Çanakçı, F.C., Akyol, M., Altuğ, H.A., Kurtiş, B., Şençimen, M. (2009). Lokal antimikrobiyal ajanların palatinal bölgeden alınan greft alanındaki doku defektinin iyileşmesi üzerine etkilerinin histomorfometrik yöntemle incelenmesi, *Gülhane Tıp Dergisi*, 51, 27-33.
- Şehitoğlu, MA., Üneri, C., Batman, Ç., Tutkun, A., Mamikoğlu, B. ve Üneri A. (1992). Maksiller sinüs lavajında rifampisin uygulamasının yeri, *ANKEM*, 6(1), 79-82.
- Takagi, K. and Urist, MR. (1982). The reaction of the dura the bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects, *Ann. Surg.*,196, 100.
- Tanaka, E., Miyawaki, Y., Del Pozo, R. and Tanne, K. (2000). Changes in the Biomechanical Properties of the Rat Interparietal Suture Incident to Continuous Tensile Force Application, *Archives of Oral Biology*, 45, 1059–1064.
- Taşdemir, OU. (2011). Rifampisin ile dekontamine edilen otojen blok kemiğin onley greft olarak kullanımının deneysel olarak incelenmesi, *Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Sivas.*
- Tezulaş, E. and Özkan, C.D. (2008). Decontamination of autogenous bone grafts collected from dental implant sites via osteotomy: a review, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106, 679-84.
- The Orthoteers Orthopedic Education Resource. (10 January 2001). Bone & fracture mechanics, Bone-structure & function, Available at: <http://www.orthoteers.co.uk>  
Giriş tarihi 24 Şubat 2004.
- Thibodeau, G.A. and Patton, K.T. (2003). *Anatomy and Physiology*, 5 ed., Mosby Inc., China, 190–202p.
- Thoren, K. ve Aspenberg, P. (1993). Effects of basic fibroblast growth factor on bone allografts: a study using bone harvest chambers in rabbits, *Ann Chir Gynaecol Suppl*, 129-35.
- Timoçin, N., Kaynar, A., Öztürk, S., Sungur, A., Demiryont, M. (1993) Biocoral Uygulanan Kemik Defektlerinde İyileşmenin Radyonüklit ve Histopatolojik Yöntemlerle İncelenmesi, *İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, Eylül 27 3, 173 - 78.

- Toriumi, D.M., Kotler, H.S., Luxenberg, D.P., Holtrop, M.E., Wang, E.A. (1991). Mandibular reconstruction with a recombinant bone-inducing factor. Functional, histologic, and biomechanical evaluation, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, Vol. 117, 1101-12.
- Toriumi, D.M., O'Grady, K., Horlbeck, D.M., Deasi, D., Turek, T.J., Wozney, J. (1999). Mandibular reconstruction using bone morphogenetic protein 2: long term follow-up in a canine model, *Laryngoscope* Vol. 109, 1481-89.
- Turnbull, R.S. and Freeman, E. (1974). Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects, *J.Periodont. Res.*, 9, 39.
- Tuzuner-Oncul, A.M., Ungor, C., Dede, U., Kişnişci, R. (2009). Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) osteomyelitis of the mandible, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107, 1-4.
- Uludag, H., D'Augusta, D., Golden, J., Li, J., Timony, G., Riedel, R., Wozney, J.M. (2000). Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model, *J Biomed Mater Res* Vol. 50, 227-38.
- Urist, M.R. (1965). Bone: Formation by autoinduction, *Science*, 150, 893-899.
- Wang, D.S., Miura, M., Demura, H. and Sato, K. (1997). Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells, *Endocrinology*, 138, 2953-2962.
- Warnke, P.H., Springer, I.N.G., Wiltfang, J., Acil, Y., Eufinger, H., Wehmöller, M., Russo, P.A.J., Bolte, H., Sherry, E., Behrens, E., Terheyden, H. (2004). Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man, *Lancet*, 364, 766-70.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A., vd. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse, *Genes Dev*, Vol. 9, 2105-16.
- Wolfe, M.W., Salkeld, S.L., Cook, S.D. (1999). Bone morphogenetic proteins in the treatment of non-unions and bone defects: historical perspective and current knowledge, *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal* Vol. 12, 1-6.
- Wong, R.W. and Rabie, A.B. (2005). Early healing pattern of statin-induced osteogenesis, *Br J Oral Maxillofac Surg.*, 43, 46-50.
- Wozney, J. M. (1998) The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci*; 106 (Suppl 1): 160166.
- Wozney, J.M. (1995). The potential role of bone morphogenetic proteins in periodontal reconstruction, *J Periodontol*, 66, 506-10.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J. vd. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities, *Science*, Vol. 42,1528-34.
- Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., Wang, E.A. (1988). Protein factors involved in bone formation, *Science*, Vol. 242.
- Yang, N.N., Byrant, H.U., Hardikar, S., Sato, M., Galvin,R.J.S., Glasebrook, A.L., Termine, J.D. (1996). Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor -3 gene expression in rat bone: A potential mechanism for estrogen- or raloxifene- mediated bone maintenance, *Endocrinology*, Vol. 137, 2075-84p.

- Yasko, A.W., Lane, J.M., Fellingner, E.J., Rosen, V., Wozney, J.M. and Wang, E.A. (1992) The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats, *J Bone Joint Surg Am*, 74, 659-70.
- Yıldırım, A., Tunik, S., Çetin, Ç., Akkuş, M. (2009). Osteogenezde fibroblast büyüme faktörleri (FBF) ve Kemik morfogenetik proteinlerin (KMP) rolü, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Derg., Vol. 10(2), 135-140.
- Young, B. and Heath, J.W. (2000). Wheather's Functional Histology 4 th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, 142-151p.
- Zellin, G. and Linde, A. (1999). Bone neogenesis in domes made of expanded polytetrafluoroethylene: efficacy of rhBMP-2 to enhance the amount of achievable bone in rats, *Plast Reconstr Surg*, 103,1229-37.
- Zhang, H., Bradley, A., vd. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development, *Development* Vol. 122, 2977-86.
- Zou, D., Zhang, Z., He, J., Zhu, S., Wang, S., Zhang, W., Zhou, J., Xu, Y., Huang, Y., Wang, Y., Han, W., Zhou, Y., Wang, S., You, S., Jiang, X., Huang, Y. (2011). Repairing critical size calvarial defects with BMSCs modified by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and a phosphate cement scaffold, *Biomaterials*, 32, 9707-18.
- Zou, D., Zhang, Z., Ye, D., Tang, A., Deng, L., Han, W., Zhao, J., Wang, S., Zhang, W., Zhu, C., Zhou, J., He, J., Wang, Y., Xu, F., Huang, Y., Jiang, X. (2011). Repair of critical size rat calvarial defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *Stem Cells*, 29, 1380-90.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Emin Celalettin ÜN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 01/01/1985
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Bölümü, 58140-Sivas
E-posta Adresi	dteminun@gmail.com

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Amasya Anadolu Öğretmen Lisesi, 1998-2002
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, 2003- 2008
Doktora	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 2008-2013

### İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi	Araştırma görevlisi, 2011-halen
-------------------------	---------------------------------