



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CAPPARIS SPINOSA EKSTRESİNİN DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
KEMİK DEFEKTLERİNDE YENİ KEMİK OLUŞUMUNA ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

MUSTAFA KIRTAY

DOKTORA TEZİ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
SİVAS-2012

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CAPPARIS SPINOSA EKSTRESİNİN DENEYSEL OLARAK
OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNDE YENİ KEMİK
OLUŞUMUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dt. MUSTAFA KIRTAY

DOKTORA TEZİ

AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HASAN YELER

SİVAS
2012

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

CAPPARIS SPINOSA EKSTRESİNİN DENEYSSEL OLARAK OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNDE YENİ KEMİK OLUŞUMUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Mustafa KIRTAY

Doktora Tezi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hasan YELER

2012, 90 sayfa

Ağız, çene ve yüz defektlerinin etiolojisinde enfeksiyöz, enflamatuar, kistik ve neoplastik nedenlerle oluşan patolojik durumlar, travma ve konjenital deformiteler sayılabilir. Buna benzer etiolojilerle meydana gelen defektlerin hızla ve anatomik forma en uygun şekilde onarımı gereklidir. Yıllardan beri araştırmacılar, kemik defektlerinin onarımında yeni kemik yapımını stimüle edebilecek nitelikte olan greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar. Kemik iyileşme sürecindeki istenmeyen etkilerin oluşmasını engellemek, daha sorunsuz ve hızlı bir iyileşme sağlayabilmek amacı ile greft materyalleri kullanılarak deneysel ve klinik çalışmalar yapılmış ve halen de yapılmaktadır. İyileşmeyi olumlu etkileyebileceği düşünülen materyaller tek başına ya da greft materyalleri ile birlikte kullanılarak kıyaslamalı çalışmalar devam etmektedir.

Bu çalışmanın amacı; antioksidan özelliği gösteren, osteoblastik aktiviteyi artırıcı özelliği bulunan flavanoid ve quercetin molleküllerini içeren Capparis spinosa ekstresinin (CSE) sistemik kullanımı neticesinde, ratlarda deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerindeki osteoblastik aktiviteye etkisini histopatolojik olarak incelemektir.

Çalışmada 48 adet erkek Wistar cinsi albino rat kullanılarak 8'erli 6 grup oluşturulmuştur. Bütün gruplarda ratların sağ mandibulasında 5 mm çapında defekt oluşturulup bu defekt at kaynaklı bir ksenogreft (Bio-gen®-BGM) ile doldurulmuştur. İlk 3 grup 7. günde, ikinci 3 grup ise 28. günde sakrifiye edilmiştir. Deney gruplarına iki

farklı dozda CSE (2. ve 5. gruplara 20 mg/kg, 3. ve 6. gruplara 40 mg/kg) verilerek deney sonrasındaki yeni kemik formasyonuna etkisi değerlendirilmiştir.

Histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak yapılan değerlendirme sonuçlarına göre; erken dönemde kemik iyileşmesini etkileyen parametrelerin (BMP-2, VEGF, Osteonektin, Osteokalsin) anlamlı bir şekilde artış göstermesine rağmen, 7. ve 28. günde gruplar arasında yeni oluşan kemik alanı değerleri açısından anlamlı bir artış gözlenememiştir.

Anahtar kelimeler: Capparis spinosa, kemik rejenerasyonu, ksenogreft

ABSTRACT

THE EVALUATION OF CAPPARIS SPINOSA EXTRACT EFFECT ON BONE DEFECTS FORMED EXPERIMENTALLY

Mustafa KIRTAY

Doctorate Thesis, Department of Oral and Maxillofacial Surgery
Supervisor: Prof. Dr. Hasan YELER

2012, 90 pages

Etiology of oral and maxillofacial defects are infections, inflammation, cystic and neoplastic causes of pathological conditions, trauma and congenital deformities. Defects which occurring similar etiologies are required to repair rapidly and accordance with anatomic form. Researchers have worked on grafts and biomaterials repair bone defects and stimulation on new bone formation for years. clinical and experimental studies have been done by using graft materials maintaining faster, uncomplicated healing and preventing adverse effects in the process of bone formation. Comparative studies have been still performed to determine healing process promoter.

This study aimed to examine the histopathologic effects of an antioksidan Capparis spinosa Extract (CSE) that contain flavonoids and quarcetin biomolecules which have ability to increase osteoblastic activity determine osteoblastic activities on bone defect that formed experimentally in rats.

In this study, 48 male Wistar albino rats were used. Six groups created and each group has 8 rats. In all groups, 5 mm diameter bone defect formed on right mandibula of rats and then defects were filled with equine bone grafts (Bio-gen[®]-BGM). The first three groups in 7th days and second three groups were sacrificed in 28th days after surgery. CSE was given two different doses (group 2 and 5 20 mg/kg, group 3 and 6 40 mg/kg) on the experimental groups to evaluate new bone formation.

Histomorphometric and immunohistochemical results were assessed; in early stage although it has shown significant increase in the parameters (BMP-2, VEGF, Osteonectin, Osteocalcin) effect bone healing, there is no significant increase between 7th and 28th days among groups in terms of the newly formed bone area.

Key words: Capparis spinosa, bone regeneration, ksenograft

TEŐEKKÖR

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ve beni yönlendiren danışmanım Sayın Prof. Dr. Hasan YELER'e sonsuz teőekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakóltesi 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.

Maddi ve manevi desteklerinden ve teze katkılarından dolayı Doç. Dr. İsa KARA ve Yrd. Doç. Dr. Ufuk TAŞDEMİR'e teşekkür ederim. Doktora eğitimi sürecine birlikte başladığımız, iyi ve kötü günde yan yana olduğumuz Sayın Dt. Emin ÜN'e ve bütün çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

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

Merhum babamın ismiyle büyüyecek oğlum Ali Senai ve eşim Neslihan'a ithafen...

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------|
| TEŞEKKÜR..... | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xvi |
| KISALTMALAR DİZİNİ | xviii |
| 1 GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2 GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1 Kemik dokusu..... | 3 |
| 2.2 Kemik Hücreleri..... | 4 |
| 2.3.1 Osteoprogenitör hücre | 4 |
| 2.3.2 Osteoblastlar | 4 |
| 2.3.3 Osteositler | 5 |
| 2.3.4 Osteoklastlar | 5 |
| 2.3.5 Kemik matriksi..... | 6 |
| 2.3.6 Periost ve endosteum..... | 7 |
| 2.4 Kemik tipleri | 8 |
| 2.4.1 Primer kemik dokusu | 8 |
| 2.4.2 Sekonder kemik dokusu | 8 |
| 2.5 Kemik oluşumu | 9 |
| 2.5.1 İntramembranöz kemik oluşumu | 10 |
| 2.5.2 Endokondral kemik oluşumu | 10 |
| 2.6 Kemik iyileşmesinde görülen fizyopatolojik durumlar | 11 |
| 2.7 Kemik Greftleri..... | 13 |
| 2.7.1 Otojen kemik greftleri | 13 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.7.2 | Heterojen greftler (Heterogreft veya ksenogreft) | 14 |
| 2.7.3 | Homojen greftler (Homogreft veya allogreft) | 15 |
| 2.7.4 | Alloplastik greftler | 16 |
| 2.8 | Kemik Greftlerinin Fonksiyonları..... | 16 |
| 2.8.1 | Osteogenezis | 16 |
| 2.8.2 | Osteoindüksiyon | 17 |
| 2.8.3 | Osteokondüksiyon..... | 17 |
| 2.9 | İdeal greft materyallerinin özellikleri..... | 17 |
| 2.10 | Bone morphogenic protein (BMP)..... | 18 |
| 2.11 | Vascular endothelial growth factor (VEGF)..... | 19 |
| 2.12 | Osteonektin ve Osteokalsin | 21 |
| 2.13 | Antioksidanlar | 22 |
| 2.14 | <i>Capparis spinosa</i> | 23 |
| 3 | MATERYAL ve METOD | 27 |
| 3.1 | Çalışma Gruplarının Tanımlanması | 27 |
| 3.2 | Cerrahi teknik..... | 28 |
| 3.3 | <i>Capparis spinosa</i> Hazırlanışı ve Uygulanma Şekli | 34 |
| 3.4 | Deney hayvanlarının bakımı ve deneyin sonlandırılması | 35 |
| 3.5 | Değerlendirme Yöntemleri | 35 |
| 3.5.1 | Histomorfometrik yöntem | 35 |
| 3.5.2 | İmmünohistokimyasal yöntem..... | 36 |
| 3.6 | İstatiksel yöntem | 37 |
| 4 | BULGULAR..... | 38 |
| 4.1 | Klinik bulgular | 38 |
| 4.2 | Histopatolojik bulgular | 38 |
| 4.2.1 | Yeni kemik alanlarının değerlendirilmesi | 42 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.2 | Osteoblast sayılarının değerlendirilmesi | 43 |
| 4.2.3 | Osteoklast sayılarının değerlendirilmesi | 45 |
| 4.2.4 | Fibroblast sayılarının değerlendirilmesi | 47 |
| 4.3 | İmmunohistokimyasal bulgular | 51 |
| 4.3.1 | Anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi | 51 |
| 4.3.2 | Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi..... | 54 |
| 4.3.3 | Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi | 57 |
| 4.3.4 | Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi | 60 |
| 5 | TARTIŞMA..... | 66 |
| 6 | SONUÇ ve ÖNERİLER..... | 75 |
| 7 | KAYNAKLAR | 76 |
| 8 | ÖZGEÇMİŞ..... | 90 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1 <i>Capparis spinosa</i> tomurcukları | 24 |
| Şekil 2.2 <i>Capparis spinosa</i> bitkisi | 25 |
| Şekil 3.1 Çalışma gruplarının tanımlanması..... | 28 |
| Şekil 3.2 Oluşturulan kemik defekti bölgesinin şematik görüntüsü | 29 |
| Şekil 3.3 Deney yapılacak tarafın traş edilmesi..... | 30 |
| Şekil 3.4 Operasyon sahasının delikli örtü ile örtülmesi..... | 30 |
| Şekil 3.5 Deney aşamasında kemik defekti oluşturmak için kullanılan trefin frez..... | 31 |
| Şekil 3.6 Defektlerin doldurulmasında kullanılan kemik greftinin görüntüsü | 31 |
| Şekil 3.7 Defekt oluşturulacak bölgedeki deri insizyonu | 32 |
| Şekil 3.8 Mandibulada defekt oluşturulacak sahanın görüntüsü..... | 32 |
| Şekil 3.9 5 mm çapında kemik osteotomisi | 33 |
| Şekil 3.10 Osteotomi sonrası boş kemik defektinin görüntüsü | 33 |
| Şekil 3.11 Oluşturulan defektin kemik grefti ile doldurulması | 34 |
| Şekil 3.12 Clemex PE 3.5 görüntü analiz programı ile yeni oluşan kemik bölgeleri mavi renkte gösterilmektedir | 36 |
| Şekil 4.1 Hematoksilen boyama ile hücrelerin gösterilmesi (ob: osteoblast, oc: osteoklast, fb: fibroblast, Boya: HE)..... | 38 |
| Şekil 4.2 K-7 (7. gün kontrol) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE) | 39 |
| Şekil 4.3 CSE20-7 (7. gün 20mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE).. | 39 |
| Şekil 4.4 CSE40-7 (7. gün 40mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE).. | 40 |
| Şekil 4.5 K-28 (28. gün kontrol) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE) | 40 |
| Şekil 4.6 CSE20-28 (28. gün 20mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE) | 41 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.7 CSE40-28 (28. gün 40mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE) | 41 |
| Şekil 4.8 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama yeni kemik alanı değerlerinin dağılımı..... | 42 |
| Şekil 4.9 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama yeni kemik alanı değerlerinin dağılımı..... | 43 |
| Şekil 4.10 gruplara ait 7. ve 28. günlerdeki osteoblast değerlerinin dağılımı | 44 |
| Şekil 4.11 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama osteoblast değerlerinin karşılaştırılması | 45 |
| Şekil 4.12 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama osteoklast değerlerinin dağılımı | 46 |
| Şekil 4.13 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama osteoklast değerlerinin karşılaştırılması | 47 |
| Şekil 4.14 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama fibroblast değerlerinin dağılımı..... | 48 |
| Şekil 4.15 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama fibroblast değerlerinin karşılaştırılması | 49 |
| Şekil 4.16 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-BMP 2 ile boyanan hücre sayısının dağılımı | 52 |
| Şekil 4.17 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-BMP 2 ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması..... | 53 |
| Şekil 4.18 Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Monoclonal Antihuman Pro-BMP-2 Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler) | 54 |
| Şekil 4.19 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-VEGF ile boyanan hücre sayılarının dağılımı..... | 55 |
| Şekil 4.20 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti- VEGF ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması | 56 |
| Şekil 4.21 Anti- VEGF ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Anti-human VEGF Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler) | 57 |
| Şekil 4.22 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayılarının dağılımı | 58 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.23 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması | 59 |
| Şekil 4.24 Anti-Osteonektin ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Anti-human Osteonectin Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler | 60 |
| Şekil 4.25 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayılarının dağılımı | 61 |
| Şekil 4.26 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-osteokalsin ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması | 62 |
| Şekil 4.27 Anti-Osteokalsin ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Anti-human Osteocalcin Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler) | 63 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 4.1 Üç grupta 7. güne ait ölçümlerin karşılaştırılması..... | 49 |
| Çizelge 4.2 Üç grupta 28. güne ait ölçümlerin karşılaştırılması..... | 50 |
| Çizelge 4.3 Kontrol grubuna ait histolojik ölçümlerin karşılaştırılması | 50 |
| Çizelge 4.4 20 mg/kg oranında <i>Capparis spinosa</i> Ekstresi verilen gruplara ait histolojik ölçümlerin karşılaştırılması | 50 |
| Çizelge 4.5 40 mg/kg oranında <i>Capparis spinosa</i> Ekstresi verilen gruplara ait histolojik ölçümlerin karşılaştırılması | 51 |
| Çizelge 4.6 Her üç grupta 7. güne ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması | 63 |
| Çizelge 4.7 Her üç grupta 28. güne ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması | 64 |
| Çizelge 4.8 Kontrol grubuna ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması..... | 64 |
| Çizelge 4.9 20 mg/kg oranında <i>Capparis spinosa</i> Ekstresi verilen gruplara ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması | 65 |
| Çizelge 4.10 40 mg/kg oranında <i>Capparis spinosa</i> Ekstresi verilen gruplara ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması | 65 |

SİMGELER DİZİNİ

| | | |
|--|---|---|
| $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ | : | Hidroksi apatit kristalinin kimyasal yapısı |
| Cm | : | Santimetre |
| G | : | Gram |
| μm^2 | : | Mikrometrekare |
| mcg | : | Mikrogram |
| ml | : | Mililitre |
| mm^2 | : | Milimetrekare |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|--------------|---|--|
| CS | : | <i>Capparis spinosa</i> |
| CSE | : | <i>Capparis spinosa</i> ekstresi |
| BMP | : | Bone Morphogenetic Protein |
| Ark | : | Arkadaşları |
| HA | : | Hidroksi apatit |
| TCP | : | Trikalsiyum fosfat |
| DDH | : | Deli Dana Hastalığı |
| FGF | : | Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor) |
| PDGF | : | Platelet Derived Growth Factor |
| PLGF | : | Plasental growth factor |
| TGF | : | Transforming Growth Factor |
| TGF- β | : | Transforming Growth Factor- β |
| VEGF | : | Vascular Endothelial Growth Factor |
| RhBMP | : | Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein |
| OP | : | Osteojenik Protein |
| VPF | : | Vascular permeability factor |
| IGF | : | Insulin growth factor |
| HE | : | Hematoksilen eozin |
| IL-1 | : | İnterleukin-1 |
| IL-6 | : | İnterleukin-6 |
| CJD | : | Creutzfeldt-jakob hastalığı |
| HIV | : | İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü |
| HBV | : | Hepatit B virüsü |
| HCV | : | Hepatit C virüsü |

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Oral ve maksillofasiyal cerrahide çalışma alanının temelini kemik dokusu oluşturur. Diş çekimi, dental implant uygulaması, travmatik veya patolojik nedenlere bağlı olarak oluşan çene kemiği kırıklarında, büyük iltihabi lezyonlar, kist ve tümör eksizyonları sonrası oluşan büyük defektlerin rekonstrüksiyonunda, ortognatik cerrahi, distraksiyon osteogenezi gibi operasyonlarda, kemiğin komplikasyonsuz ve kısa sürede iyileşmesi, tedavinin başarısında çok önemlidir. Operasyon sonrası kemik oluşumunun başladığı ilk ay komplikasyonların en sık görüldüğü, iyileşmenin de en kritik olduğu dönemdir. Bu kritik dönemde uygulanacak tedavi protokolü, cerrahi işlemin başarısını doğrudan etkileyecektir. Bu nedenle araştırmalar kemik iyileşmesini olumlu etkileyen faktörler üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Ağız ve çene yüz cerrahisinin temel hedeflerinden birisi de çene yüz bölgesinde oluşan kemik defektlerin onarılması ve kaybolan fonksiyonun yeniden kazanılmasını sağlamaktır. Kemik defektlerinin tamiri ve rekonstrüksiyonunun tarihi geçmişi eskilere dayanmaktadır (Kahnberg, 2005). Kemiğin yerini alması için kullanılan kemik ve benzeri yapılara kemik grefti denmektedir (Stevenson, 1999). İskelet sisteminin diğer bölgelerinde olduğu gibi ağız ve çene yüz bölgesinde de, çeşitli nedenlerden dolayı oluşan deformitelerin tedavisinde kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Urist ve ark., 1994).

Kemik defektlerinin tedavi yöntemini belirlerken defektin büyüklüğüne göre karar verilmektedir. Bu alanda genel olarak 2 cm'den küçük kemik defektlerinin primer olarak kapatılması, 2 cm'den daha büyük olanlarında ise ölü boşlukların ortadan kaldırılması, enfeksiyon oluşmaması ve yara iyileşmesinin düzgün bir şekilde tamamlanması için greftlenmesinin gerekli olduğu görüşü benimsenmektedir (Ellis III., 1998; Artzi ve ark., 2008). Büyük kemik defektlerinin tamirinde iyileşmeye yardımcı olmak amacıyla, hastanın kendisinden (otojen), başka insanlardan (allogreft), diğer canlılardan (heterogreft) alınan veya sentetik (alloplastik) kaynaklı çeşitli greft materyalleri kullanılmaktadır (Mayfield ve ark., 2001; Bozkaya ve ark., 2008).

Kemik defektlerinin tamirinde biyoyumlu ve hızlı revaskülerize olmalarından dolayı otojen kemik greftlerinin kullanılması altın standart olmasının yanı sıra, otojen greftin elde edilmesindeki zorluk, ikinci bir cerrahi operasyon alanına ihtiyaç

duyulması, istenilen miktarda greftin her zaman temin edilememesi, operasyon sonrası morbidite, ağrı gibi komplikasyonlar bu greftin kullanımını sınırlamaktadır. Bundan dolayı diğer greft türlerinin (allogreft, ksenogreft, alloplastik) kullanımı ve kombine tedavilerle etkinliklerinin artırılması gündeme gelmektedir (Banwart ve ark., 1995; Hadjipovlou ve ark., 2000; Göğüş ve ark., 2001; Heary ve ark., 2002).

Biyomedikal teknolojilerin gelişmesiyle, ksenogreftlerin kullanım alanları artmıştır. Farklı hayvan türlerinden elde edilen ksenogreftler (sığır, mercan, domuz, at), günümüzde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Biz de çalışmamızda, kolay elde edilebilirliği, yeterli osteokondüktif özelliğe sahip olması, deantijenik özellikte olması nedeniyle at kaynaklı bir ksenogreft olan Bio-gen® (bioteck, italy) kullanılmıştır.

Kemik iyileşmesine olumlu ya da olumsuz yönde etki eden pek çok lokal ve genel faktör bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kemik iyileşmesi üzerine etkili olan faktörler arasında serbest radikallerin de bulunduğunu göstermektedir. Biyolojik etkileşimlerin en yoğun gözlemlendiği kırık iyileşmesinin erken döneminde serbest radikallerin meydana geldiğini ve bu radikallerin kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinin olduğunu belirten çalışmalar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar polifenolik maddeleri (örn. flavonoidler ve tanninler) içeren bazı bitkilerin ve değişik bitki ekstraktlarının antioksidan aktiviteler gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (Kahkonen ve ark., 1999). Bazı gıda maddelerinin radikal süpürücü etkileri dolayısıyla antioksidan aktivitelerinin olduğu bilinmektedir (Rathee ve ark., 2006). Akdeniz ve Ege bölgesinde yaygın olarak yetişen, çiçek tomurcukları ile meyveleri halk arasında ağrı kesici, kuvvet verici, idrar söktürücü, skorbit ve romatizma hastalığını tedavi edici, karaciğer fonksiyonlarını düzenleyici, yara iyileştirici olarak bilinen Capparidaceae familyasından *C.spinosa*'nın antioksidan ve radikal giderme aktivitesi bulunmaktadır (Nadaroğlu ve ark., 2008).

Bu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan 5 mm çapında kritik boyutlu defektlerde yeni kemik oluşumunun artırılması ve hızlandırılması amaçlandı. Bunun için yapılan literatür taraması sonucunda osteoblastik aktiviteyi ve yeni kemik oluşumunu artırıcı özelliği belirlenen, *quercetin* ve flavanoid biyomoleküllerini içeren, CSE'yi günde bir kez oral olarak uyguladık ve histopatolojik inceleme ile yeni oluşan kemik miktarını değerlendirmeyi amaçladık.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kemik dokusu

Kemik, yetişkin iskeletin en önemli yapısını oluşturan ve birçok spesifik özelliğinden dolayı vücuttaki özel bir bağ dokusu çeşididir. Kafatasını, göğüs kafesi boşluklarını, hayati önem taşıyan organları ve kas yapılarını korur ve destekler ayrıca kan hücrelerinin oluşumunu sağlayan kemik iliğini bünyesinde bulundurur. Kemik ayrıca başlıca kalsiyum, fosfat olmak üzere birçok diğer iyonları da bulundurduğundan bu iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarının sabit tutulabilmesi için kontrollü olarak salınıp depolanmasını sağlar. Kemikğin en önemli özelliklerinden biri de dışarıdan gelen etkenlere karşı kendini yenileyebilmesidir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kemik yapısal olarak kortikal (kompakt) ve kansellöz (süngerimsi, spongioz, trabeküller) olmak üzere ikiye ayrılır. Kortikal kemik yassı kemiklerin iç ve dış yüzeylerini, uzun kemiklerin ise dış yüzeylerini oluşturur. Kortikal kemik çok serttir ve dış kuvvetlere dayanıklıdır. Kansellöz kemik daha yumuşaktır ve içinde kemik iliğini barındırır. Kortikal kemiğe göre daha zayıf olmasının yanı sıra, strese ve gerilimlere karşı kortikal kemiğe göre daha dayanıklıdır (Tanaka ve ark., 2000).

Kemikğin mekanik özelliklerini belirleyen unsurlar arasında kemikğin mineral içeriği, gözenekli yapısı ve kemikğin kollajen dokusu önem taşımaktadır (Currey, 1988). Oldukça sert ve dayanıklı bir yapıya sahip olan kemik dokusunun % 70'i inorganik, % 30'u organik yapıdadır. Organik kısım çoğunlukla Tip I kollajenden ve daha az oranda glikoproteinler ve glikozaminoglikanlardan oluşmaktadır. İnorganik kısmında çoğunlukla kalsiyum ve fosfat bulunmakla birlikte, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da mevcuttur (Erdoğan ve ark., 1999; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kemik dokusunda, kemik iliği hücrelerinden başka dört tür kemik hücresi vardır. Bunlar osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır (Bancroft, 1996; Gartner ve Hiatt, 2001).

2.2 Kemik Hücreleri

2.3.1 Osteoprogenitör hücre

Bu hücreler kemik yapıcı öncül hücreler olup periostun iç katmanında, havers kanallarında ve endosteumda bulunurlar. Mitozla bölünebilen mezankim kökenli bu hücreler osteoblastlara farklılaşabilirler. Osteoprogenitör hücreler iğ şeklinde ve oval çekirdekli dirler (Erdoğan ve ark., 1999). Sitoplazmaları açık renk boyanır ve tek çekirdekli dirler. Kemikte büyümenin yoğun olduğu dönemlerde daha aktifirler. (Fawcett ve Jensch, 2002; Gartner ve Hiatt, 2001; Duthie, 1989).

2.3.2 Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik matriksinin organik bileşenlerinin sentezinden sorumludurlar. Kemiğin inorganik kısımlarının çökebilmesi için canlı osteoblast hücrelerinin bulunması gereklidir. Osteoblastlar kemik yüzeylerinde yan yana dizilir ve tek katlı yassı epitele benzer şekilde bir görüntü verir. Osteoblastlar aktif olarak matriks sentezledikleri dönemde sitoplazmaları baziktir ve şekilleri kübikten prizmatığe kadar değişim gösterebilir (Erdoğan ve ark., 1999; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Bazı osteoblastlar yeni meydana gelmiş matriks ile kuşatılarak osteosit haline gelirler. Bu işlem sırasında laküna adı verilen boşluklar oluşur. Lakünaların içinde osteosit, osteosit uzantıları ve bununla birlikte az miktarda kireçlenmemiş hücre dışı matriks vardır. Osteoblastlar kutuplaşmış hücrelerdir. Daha önceden sentezlenen kemik matriksi le yakın ilişkide olan hücrelerden salgılanan matriks elemanları, osteoblastlar ile önceden meydana gelen kemik arasında henüz kireçlenmemiş osteoid adı verilen matriks tabakasını oluşturur. Bu yeni oluşan matriks tabakasının üzerine kalsiyum tuzlarının çökmesiyle kemik apozisyonu gerçekleşmiş olur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Osteoblastlar kemik yapıcı hücrelerdir. Osteoid dokuyu, kemik matriksini oluşturan Tip 1 kollajeni, glikoproteinleri, proteoglikanları, osteonektin, osteopontin, osteokalsin, osteoprotegerin gibi bazı proteinleri salgırlar. Kemik yapıcı görevleri sonlandığında ise osteositlere dönüşürler (Cormack, 1993; Lynch, 1999b; Gartner ve Hiatt, 2001).

2.3.3 Osteositler

Osteositler, osteoblastlardan türeyen hücrelerdir ve kemik matriksinin lamelleri arasındaki boşluklarda (laküna) bulunurlar. Bu her laküna içerisinde sadece bir osteosit bulunur. Osteosit uzantıları, ince silindirik matriks kanalcıklarının içinde bulunur. Osteosit hücreleri arasındaki moleküler geçiş, komşu hücre uzantıları arasındaki bağlantılardan (gap junction) sağlanır. Osteositlerle kan damarları arasındaki moleküler geçiş kemik matriksi arasında bulunan bir miktar hücre dışı madde aracılığıyla da gerçekleşir. Bu moleküler geçişler sayesinde yaklaşık 15 hücrelik bir zincirin beslenmesi sağlanmış olur. Osteoblastlarla kıyaslandığında badem şekilli yassı osteositlerin endoplazmik retikulumu ve golgi cisimciği daha küçük, ayrıca çekirdek kromatini yapısı daha yoğundur. Aktif olarak kemik matriksinin bakımını sağlayan bu hücreler öldüklerinde matriks erimesi görülür (Junqueira ve Carneiro, 2006; Gartner ve Hiatt, 2001).

2.3.4 Osteoklastlar

Osteoklastlar monositlerden oluşan makrofajlardır. Oldukça büyük, dallanmış, hareket edebilen ve kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücrelerdir (Kalfas, 2001; Junqueira ve Carneiro, 2006). Genişlemiş olan hücre gövdesi içerisinde 5 ila 50 veya daha fazla hücre çekirdeğine sahiptir. Osteoklastlar, kemiğin eritilerek emildiği alanlarda Howship boşluğu adı verilen enzimlerle oyulan lakünaların içinde yer alır. Kemik iliğinden köken alan osteoklastlar mononükleer hücrelerin birleşmesiyle meydana gelirler (Erdoğan ve ark., 1999; Junqueira ve Carneiro, 2006).

Aktif osteoklastlarda, kemik matriksine bakan yüzey düzgün değildir ve buradaki uzantılar yeni başka uzantılarla düzensiz katlantılar şeklinde kıvrımlar oluşturarak büzgülü bir kenar meydana getirirler. Bu büzgülü kenarı hücre organellerini içermeyen, aktin flamanlardan zengin saydam bir sitoplazma kuşağı çevreler. Bu kuşak osteoklastların kemik matriksine tutunduğu yerdir ve hücre ile kemik arasında, kemik yıkımının gerçekleştiği mikro alanı oluşturur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Osteoklastlar, kollejenaz ve diğer enzimleri hücre altındaki cebe salgılayıp, protonları pompalar, kalsiyum tuzlarının eritilerek emilmesini ve bölgesel kollajen sindirimini başlatır. Osteoklastlar yerel arabuluculuk işlevi yürüten küçük sinyal proteinleri (sitokinler) ve hormonlar ile kontrol edilir. Osteoklastların tiroitten salgılanan kalsitonin için reseptörleri olmasına karşın paratiroid hormonu reseptörleri

yoktur. Bununla beraber osteoblastlarda paratiroid hormon reseptörü vardır ve bu hormon salgılandığında osteoklast uyarıcı faktör denilen sitokini üretirler (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.3.5 Kemik matriksi

Kemik matriksi iki bölümde incelenir. Bunlar: organik matriks ve inorganik matrikslerdir. Organik matriksi kollagen ve esas (ana) maddeden, mineral matriks ise kalsiyum, fosfor ve diğer bazı elementlerden oluşur (Soydan, 1992).

2.3.5.1 Organik Matriks

Kemiğin organik matriksi erişkinlerde kemik ağırlığının % 25'ini, hacim olarak da % 38'ini oluşturur. Organik maddelerin %95'i kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşur. Kemikte bulunan organik maddeler arasında en çok osteokalsin bulunmaktadır. Osteokalsin kemiğin lifsel çatısını oluşturmaktadır. Kemik dokusu kollajeni üzerine mineral matriks çökeldiğinden osteokollajen adını alır ve diğer kollajenlere göre özgün bir yer tutar (Soydan, 1992; Dietz ve Bartholmes, 1998; Satan ve ark., 1998). Kemik kollajeni; dokularda mekanik stabiliteyi sağlayan lifli bir proteindir ve diğer kollajenlerden farklılık gösterir (Dietz ve Bartholmes, 2004).

Kemiğin organik yapısını büyük oranda oluşturan kollajen liflerin sentezi mezenkimal kaynaklı osteoblastlarda meydana gelir. Sonrasında osteoblastlar, kendi meydana getirdikleri kemik matriksi tarafından sarılarak osteosit adını alırlar. Bu hücreler, artık sürekli kemik oluşturma yeteneklerini yitirmişlerdir. Kemikte bulunan diğer çok çekirdekli, büyük tip hücreler ise osteoklastlardır. Bu hücreler, kemiğin sürekli *remodelling* işleminin bir bölümü olan kemik rezorpsiyonu ile ilgilidirler (Adem, 2007).

Kollajen lifciklerinin arasında esas madde bulunur. Esas madde çoğunlukla osteosit boşlukları ve kanalcıklar çevresinde yoğunluk gösterir. Esas maddenin kemikteki proteoglikan fraksiyonuna osteomükoid de denmektedir (Soydan, 1992).

2.3.5.2 İnorganik matriks

İnorganik maddeler, kemiğin kuru ağırlığının %50'sini oluşturmaktadır. İçerisinde özellikle kalsiyum ve fosfor oranı yüksektir. Ayrıca mangnezyum, potasyum, sodyum, bikarbonat ve sitrat da bulunur. Röntgen ışını difraksiyon yöntemi ile yapılan çalışmalar

sonucunda kalsiyum ve fosforun, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ bileşiminde hidroksiapatit kristallerini meydana getirdiği görülmüştür (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kemiğin organik ve mineral matriks oranı kemiğin cinsine ve yaşına bağlıdır. Mineral matriks oluşumu, organik matriks oluşumundan hemen sonra %90 oranında gerçekleşir. Geriye kalan %10'luk kısım ise dokuların iyonlara geçirgenliğinin azalmasından dolayı yavaş bir çökme gösterir. Mineral matriks içeriği yaşlanmaya bağlı olarak değişir; kalsiyum ve karbonat oranı artarken, magnezyum, fosfat ve su oranı azalır. Ca/P oranı, fosfat yerine karbonat tutulması nedeniyle giderek yükselir. Organik matriksin mineral matrikse oranı ve bileşimi çeşitli patolojik nedenlere bağlı olarak da değişebilmektedir (Soydan, 1992).

Kemik, barındırdığı minerallerin sabit bir deposu değildir. Osteoblastik ve osteoklastik aktiviteler ile kemik bileşiminin sabitliği, dinamik bir denge halinde devam etmektedir. Kemiğin bu devamlı yeniden sentezlenmesi ve rezorpsiyonu büyüme tamamlandıktan sonra bile uzun süre boyunca devam eder. Buna kemiğin yeniden şekillenmesi (*remodelling*) denmektedir. Kemik oluşumu ve rezorpsiyonu normal durumlarda sıkı bir şekilde bağlantılıdır (Adem, 2007).

2.3.6 Periost ve endosteum

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri, tabakalar halinde, kemik yapan hücreler ve bağ dokusu ile örtülüdür. Dıştaki tabakaya periost, içtekinе ise endosteum adı verilir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Periost, kollajen liflerden ve fibroblastlardan oluşur. Bu kollajen lif demetlerinden oluşan sharpey lifleri matriks içerisinden geçerek periostun kemiğe bağlanmasını sağlar. Periostun hücreden daha zengin olan tabakası osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır. Bu osteoprogenitör hücreler fibroblastlara benzerler ve bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyeline sahiptirler. Aynı zamanda kemik büyümesi ve tamirinde önemli bir rol oynarlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Endosteum, kemik içerisindeki bütün boşlukları sarar ve tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitör hücreler ile oldukça az miktarda bağ dokusundan oluşur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Periostun ve endosteumun başlıca görevi kemik dokusunun beslenmesi ve sürekli yeni osteoblast oluşumunu sağlayarak kemiğin büyüme gelişimini ve onarımını gerçekleştirmektir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.4 Kemik tipleri

Kemik kesitleri çıplak gözle incelendiğinde, kemik dokusu boşluk bulunmayan yoğun alanlar yani kompakt kemik ve çok sayıda boşluklar içeren süngerimsi kemik yapı gözlenmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kemik dokusu, mikroskopik olarak incelendiğinde ise iki farklı kemik tipi bulunduğu ortaya çıkmıştır: Primer (birincil, olgunlaşmamış veya örgü kemik) ve sekonder (ikincil, yetişkin, olgun veya lamelli kemik) olmak üzere kemik dokusu iki kısımda incelenir (Ballı, 2004; Revell, 1986; Junqueira ve ark., 1998; Jee ve Cowin, 2001).

Birincil kemik, embriyonun gelişiminde, kırık iyileşmesi ve diğer onarım aşamalarında oluşan ilk kemik dokusudur. İkincil kemikteki düzgün sıralanmış lameller halinde düzenlemiş kollajenin aksine rastgele dağılmış ince kollajen lifleri vardır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.4.1 Primer kemik dokusu

Primer kemik embriyolojik gelişim sürecinde, kırık ve diğer nedenlerle ilişkili onarım işlemlerinde ilk ortaya çıkan kemik tipidir (Aslan, 2002; Junqueira ve ark., 1998). Geçici bir kemik yapısı olup yetişkinlerde, kafatası yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe bağlandığı bölgelerde bulunur. Bu sayılan birkaç yer dışında üç yaşından sonra yerini lameller kemiğe bırakır. Primer kemik oldukça az mineral içerir ve mekanik direnci azdır. Lameller kemiğe oranla ömürleri daha kısadır. Primer kemik rastgele ve değişik yönlerde dağılmış ince kollajen liflere sahiptir. Lamelsizdir ve sekonder kemik dokusuna oranla daha fazla osteosit içerir (Martin ve Burr, 1989; Aslan, 2002; Junqueira ve ark., 1998).

2.4.2 Sekonder kemik dokusu

Sekonder kemik, genellikle yetişkinlerde bulunan kemik dokusudur. Sekonder kemik dokusu iki farklı tipte görülür. Bunlardan biri homojene yakın bir yapısı olup mikroskop büyütmelerinde bazı enine ve boyuna kanal kesitleri gösteren kompakt kemik, diğeri ise birbiriyle kesişerek üç boyutlu bir ağ yapan kemik trabeküllerinden oluşan süngerimsi

ya da kansellöz kemik dokusudur (Leeson ve Leeson, 1981). Kompakt kemik, uzun kemiklerin diyafiz ve metafizinin dış yüzeylerini kaplayan katı ve kompakt bir yapıdadır. Yetişkin insan iskeletinin yaklaşık %80' i kortikal kemikten meydana gelir. Kompakt kemik içerisinde kanallar mevcuttur. Çoğunlukla kemiğin uzun eksenine ve birbirine paralel seyreden bu kanallara Havers kanalları denir. Uzunlamasına Havers kanalları bazı yerlerde oblik anastomozlarla birbirine bağlanmıştır. Bu kanalların çapı 20-110 mikron kadardır. Küçük kanallarda bağ dokusu içerisinde kılcak damarlar bulunur. Geniş kanallarda ise yine etrafında bağ dokusu ile çevrili bir arteriyol ve venül bulunur. Diğer transversal kanallar kemiğin dış tabakasında periost altından başlayıp, kemiğin uzun eksenine dik veya oblik yönde seyreder ve kemiğin iç yüzeyine uzanarak kemik iliğine ulaşırlar. Bunlara Volkmann kanalları adı verilir. Volkmann kanalları, transversal uzantıları ile Havers kanallarını birbirine bağlarlar. Bu kanalların içerisinde periosttan ve meduller kanal içindeki kemik iliğinden gelen damarlar ve bağ dokusu bulunur. Kemik dokusunu, birbiri üzerine paralel bir şekilde tabakalanmış, 3-7 mikron kalınlığında kemik lamelleri oluşturur. Bu kemik lamelleri kompakt ve kansellöz kemikte farklı şekillerde görülür. Kompakt kemikte lamellar düzen, bulunduğu yere göre Havers lamelleri, interstisiyel lameller, dış esas lameller ve iç esas lameller olarak görülür (Soydan, 1992; Duthie 1989; Arpacı, 2010)

Kansellöz kemik süngerimsi ya da spongiyöz kemik olarak da bilinmektedir. Kansellöz kemik, vücuttaki kemiklerinin hacim olarak %20' sini oluşturur. Kansellöz kemik, mikroskopik olarak kompakt kemikten farklılıklar gösterir. Kompakt kemikte osteon bulunurken, kansellöz kemikte osteon bulunmaz. Makroskopik olarak gözlenebilen ve trabekül olarak adlandırılan plaklar ve gözeneklerden oluşur. Bunların içinde kan damarları ve kemik iliği bulunur. Besin maddelerini, sitoplazma uzantıları sayesinde kemik iliğinde bolca bulunan kan damarları aracılığıyla alırlar. Kemik trabeküllerin dizilimi düzenli ve organize bir yapı gösterir. Bu trabeküller gelen streslere, uygulanan kuvvetlere ve kemiğin yapısına bağlı olarak adaptasyon gösterirler (Sikavitsas, 2001; Jee ve Cowin, 2001).

2.5 Kemik oluşumu

Kemik iki şekilde oluşur: Osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu (intramembranöz kemikleşme) ya da önceden var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile oluşur (endokondral kemikleşme). Her iki şekilde de meydana çıkan ilk kemik, birincil veya örgü kemiktir. Birincil kemik

geçici bir dokudur ve kısa sürede tam lameller veya ikincil kemikle yer değiştirir. Kemik büyümesi esnasında, birincil kemik alanları, rezorbsiyon alanları ve lameller kemik sahaları yan yana görülürler. Bu kemik yapımı ve rezorpsiyonu (yeniden şekillendirme) süreci büyüyen kemiklerin yanısıra yetişkinlerde de hayat boyu sürer ancak yetişkinlerde hızı oldukça yavaştır (Junqueira ve Carneiro, 2006; Jee ve Cowin, 2001).

2.5.1 İntramembranöz kemik oluşumu

Frontal ve parietal kemikler ile oksipital ve temporal kemikler, mandibula ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. İntramembranöz kemikleşmenin kısa kemiklerin büyümesinde ve kemiklerin kalınlaşmasında da rolü vardır. Mezenkim dokusunun yoğunlaştığı alanda kemikleşmenin başladığı ilk noktaya primer kemikleşme merkezi denir. Kemikleşme bir grup hücrenin osteoblasta dönüşmesi ile başlar. Osteoblastlar kemik matriksini yaparlar ve bunu kireçlenme izler, sonuçta bazı osteoblastlar kireçlenmiş matriks ile kuşatılarak osteosit olur. Gelişen bu kemik adacıkları kılcak kan damarları, kemik iliği hücreleri ve farklılaşmamış hücreleri içeren uzamış boşlukların duvarlarını oluşturur. Böyle birkaç grup, kemikleşme merkezinde hemen hemen aynı zamanda ortaya çıkar, bunların duvarları kaynaştığında ise kemik süngerimsi bir yapıya kavuşur. Büyüyen kan damarları ve farklılaşmamış mezenkim hücreleri, kemik duvarları arasında kalan bağ dokusu içine girerek kemik iliği hücrelerini meydana getirir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kafatasının üst kısmını oluşturan düz kemiklerin gerek iç ve gerekse dış yüzeylerinde kemik yapımının yıkıma oranla belirgin üstünlüğü vardır. Böylece iki tabaka kompakt kemik (iç ve dış plakalar) şeklinde belirirken merkezdeki kısım süngerimsi özelliğini korur. Bağ dokusu tabakasının kemikleşmeyen kısımları zar içinde gelişen kemiğin endosteum ve periostunu yapar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.5.2 Endokondral kemik oluşumu

Endokondral kemikleşme, ilk etapta meydana getirilecek kemiğin şeklini akla getiren küçük bir hiyalin kırkırdak model içinde meydana gelir. Bu tip bir kemikleşme daha çok kısa ve uzun kemiklerin oluşmasını sağlamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Bir uzun kemiğin endokondral kemikleşme ile meydana gelmesinde şu olaylar birbirini izler. Başlangıçta ilk beliren kemik dokusu kırkırdak modelin orta kısmını saran

içi boş kemik silindiri şeklindedir. Kemik halkası adı verilen bu yapı, o bölgedeki perikondriyumun içinde intramembranöz kemikleşme ile meydana getirilir. Bir sonraki aşamada, bu bölgedeki kıkırdak, hücre hipertrofisi ve matriks kireçlenmesi gibi programlanmış hücre ölümleri ile yıkım sürecine girer ve sonuçta kireçlenmiş kıkırdak matriksinden oluşan üç boyutlu yapı ortaya çıkar. Bu süreç, kıkırdak modelin merkezinde bir süre önce osteoklastlar tarafından kemik halkasında açılan ve kan damarlarının içeri girdiği boşluk olan bölgeden osteoprogenitör hücrelerin taşınmasıyla başlar. Daha sonra, osteoblastlar kireçlenmiş kemik matriksine yapışırlar ve kıkırdak matriksinden kalan artıklar çevresinde sürekli birincil kemik tabakalarını oluştururlar. Bu aşamada, kireçlenmiş kıkırdak bazofilik görünür. Birincil kemik ise eozinofiliktir. Bu şekilde birincil kemikleşme merkezi ortaya çıkar. Sonra ikincil kemikleşme merkezleri kıkırdak modelin uçlarındaki şişkinliklerde (epifizler) görülür. Bunların genişlemesi ve yeniden şekillenmesi esnasında, birincil ve ikincil kemikleşme merkezleri giderek kemik iliği ile dolan boşlukları oluşturur. Kemik yapının aralarında osteoklastlar sayesinde periosteal delikler açılır ve bu delikler osteoprogenitör hücreler, hematopoetik hücreler ve kan damarları ile kıkırdak modele gerekli besin ve oksijeni sağlarlar. Damarlar yolu ile gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığı ile birleşerek kıkırdak matrikse çökeler ve bu şekilde diyafizde bir kemikleşme merkezi meydana gelir. Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması sonucu kalsifiye kıkırdak/ kalsifiye kemik kompleksi halini alır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.6 Kemik iyileşmesinde görülen fizyopatolojik durumlar

Kemik dokusuna gelen herhangi bir travma sonrası kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasına kırık denir. Bu bölgede oluşan fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Kemikte skar dokusu oluşmaz ve yeniden yapılanmayla iyileşir. Kırık iyileşmesi, kırık olduğu andan itibaren başlar, düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar devam eder. (Kılıçoğlu, 2002). Kemikte kırık iyileşmesi ve dolayısıyla yeni kemik oluşumu oldukça karmaşık bir sistem ile kontrol edilmektedir. İki kırık ve arasında yeni bir kemik köprüsü oluşmasının matriks oluşumu, mineralizasyon ve *remodelling* gibi safhaları birbirlerine karşı çalışan sistemler gibi görünen hücrelerden ve hormonlardan meydana gelen bir sistemin bütün halinde çalışması sonucunda gerçekleşmektedir (Çetnus, 2000).

Kırık iyileşmesi, esasında bir bağ dokusu iyileşmesi şeklindedir. Yumuşak dokudan farklı olarak, osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri ile özelleşmiş kalsifiye kemik

dokusu oluşturmasıdır (Altunatmaz, 2004). Kemikte kırık meydana gelir veya herhangi bir nedenle bütünlük bozulursa, ayrılan kırık parçanın dolaşımı da bozulmaktadır (Kekilli, 2005). Kırık oluşumundan sonra kemik bütünlüğünün yeniden sağlanabilmesi amacıyla organizmada birçok rejeneratif değişiklikler meydana gelir. Komplike bir olay olan kırık iyileşmesini 3 safhada inceleyebiliriz. Bunlar: Enflamasyon, yenilenme (*reperation*), yeniden şekillenme (*remodelling*). Bu safhalar birbirleriyle sıkı ilişkilidir ve bazen geçici olarak birbiri ile iç içe girebilir (Altunatmaz, 2004).

Kırık oluşumu sonrasında o bölgede enflamasyon başlar ve yaklaşık 2-3 hafta devam eder. Kallus şekillenmesini aktive etmede önemli rol oynayan enflamasyon, kırıkta da kemik formu oluşuncaya kadar devam eder. Kemik rejenerasyonunda etkili olan parathormon, kalsitonin, vitamin D metabolitleri ve alkalın fosfataz gibi birçok faktörün kan plazmasındaki seviyeleri artış gösterir (Altunatmaz, 2004).

Kırık iyileşmesinde hematoma iki önemli etkisi vardır. Bunlardan ilki, oluşan hematoma ya da kan pıhtısı, kemik ucu ve komşu yumuşak dokuların arasına girerek kırık bölgesinde az da olsa mekanik bir stabilite sağlar. Hematomun ikinci önemli etkisi ise; kırık bölgesine matris oluşumunu başlatan olgunlaşmamış osteoblast ve kondrosit hücrelerini getirir ve bunların da osteoblastlara ve kondroblastlara dönüşebilme yeteneği vardır. Yara bölgesindeki hematoma IL-1 (interleukin-1), IL-6 (interleukin-6), PDGF, TGF ve VEGF (venöz endotelial büyüme faktörü) gibi çeşitli büyüme faktörleri salgılanmaktadır (Junqueira ve ark., 1998; Kılıçoğlu, 2002; Altunatmaz, 2004; Barnes ve ark., 1999).

Kırık iyileşmesinin ikinci safhası yenilenme fazıdır. Bu safhada, osteogenezis devam eder ve kırık alanındaki köprü kallus oluşumu sürmektedir (Altunatmaz, 2004). Kırık bölgesinde bağ dokusunda ortaya çıkan küçük kırıkta bölümlerinde endokondral kemikleşme yoluyla primer kemik oluşur. Kırık kallusun aynı zamanlarda farklı alanlarında intramembranöz ve endokondral kemikleşme oluşumu görülür (Barnes ve ark., 1999).

Kırık bölgesindeki yumuşak fibröz kallusun oluşumu, pıhtının oluşturduğu fibrin ağları ve fibroblastlardan salgılanan kollajenlerin meydana getirdiği genç granülasyon dokusuna, osteoblast ve kondroblastların yaklaşık bir hafta sonra gelmesiyle meydana gelir. Başlangıçta oluşan bu fibröz kallus oldukça yumuşak bir yapıya sahiptir. Sonrasında osteoblastlardan osteoid üretilir ve kondroblastlar da osteoblastlara dönüşür. Yavaş yavaş bu alana kalsiyum tuzlarının (hidroksiapatit) da çökmesi sonucu ön kallus

(fibrokartilagenöz) meydana gelmiş olur. Böylelikle meydana gelen kallus serttir (sekonder kemik) ancak hala çok dayanıklı değildir. Ön kallusun yerini 4-6 hafta içerisinde yavaş yavaş kemiksi kallus alır (Altunalmaz, 2004).

Kırık alanı, kallus ile köprülendiği zaman üçüncü safha olan yeniden şekillenme aşaması başlar. Kemikleşme ilerledikçe kırık parçaların hareketi gittikçe kısıtlanır ve kırık bölgesinde daha sağlam bir yapı meydana gelir. Bu sağlamlık derecesi, kırık bölgesinin başarılı iyileşmesinde önemli rol oynamaktadır. Kallusun primer kemik dokusu zamanla rezorbe olur ve yerini sekonder kemiğe bırakır. Bu şekilde kemiğin özgün yapısı olan, Havers sistemi bulunan lamellar kemik yapısı yeniden oluşmaktadır. (Appel ve ark., 2002; Junqueira ve ark., 1998; Altunalmaz, 2004).

2.7 Kemik Greftleri

Oral ve maksillofasiyal bölgede konjenital, travmatik, dejeneratif, enflamatuar, enfeksiyöz, kistik ve neoplastik kaynaklı deformitelerin tedavisinde ve atrofik maksilla ve mandibulanın rekonstrüksiyonunda kemik greftlerine gereksinim duyulmaktadır. Günümüzde bu amaçla otojen kemik grefti, heterojen, allojen ve alloplastik kemik greft materyalleri kullanılmaktadır. (Bifano, 1998; Jee, 2001; Oral, 2000; Yukna, 2002)

2.7.1 Otojen kemik greftleri

Aynı canlının bir bölgesinden alınıp diğer bölgesine uygulanan kemik greftleridir. Verici bölgeden herhangi bir yumuşak doku bağlantısı kalmadan alınırlarsa serbest greft diye adlandırılırlar. Alınan greftlerin canlı kalabilmeleri tamamen alıcı bölgedeki şartlara bağlıdır (Fonseca ve Dawis, 1995a).

Maksillofasiyal bölgede kullanılmak üzere alınan otojen greftler, alındıkları bölgeye göre ekstraoral ve intraoral olarak ikiye ayrılırlar. Ekstraoral bölgeler; calvarium, tibia, iliac crest, ilium, rib; intraoral bölgeler ise, mandibular simfiz, mandibular ramus, alveolar zigomatik butress, maksiller tüber bölgesi, retromolar bölge, zigomatik ark ve ekzositozlar şeklinde sayılabilir (Schwartz-Arad ve ark., 2005; Bernstein ve ark., 2006; Gellrich ve ark., 2007; Proussaefs ve Lozada, 2006; Levin ve ark., 2007; Mannai, 2006; Aalam ve Nowzari, 2007).

Otogreftler, antijenik özellik göstermemeleri, osteokondüktif, osteoindüktif ve osteogenezis potansiyelleri bulundurmaları nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedirler (Schlegel ve ark., 2006; Peleg ve ark., 2004; Chacon ve ark., 2004; Peterson ve Ellis III, 1998; Alfaro, 2006). Bu özelliklerine karşın, 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 dezavantajları da vardır (Akay, 1998; Marchena ve ark., 2002; Raghoobar ve ark., 2001).

2.7.2 Heterojen greftler (Heterogreft veya ksenogreft)

Bir türden diğer bir türe taşınan greftlerdir. Heterogreft olarak da adlandırılırlar. Bu greftler farklı türlere ait oldukları için immünolojik reaksiyonlara neden olabilmektedirler. Bu tür greftlerin yerleştirildikleri bölgelerde varlıklarını uzun süre koruyamadan rezorbe oldukları ve kemik oluşumunda primer rol oynayamadıkları belirtilmiştir. Ksenogreftler, yerleştirildikleri bölgede oluşacak yeni kemik için yer tutma özelliğine sahiptirler (Dayangaç, 2008; Fonseca ve Dawis, 1995b).

Yapılan araştırmalar, ksenogreftlerin sentetik hidroksiapatitlerden daha kompleks bir yapıya sahip olmalarına rağmen, alloplastlara göre daha biyouyumlu bir materyal olduklarını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda porozite ve yüzey özellikleri alloplastlardan daha iyi olduğundan osteointegrasyon başarısı alloplastlara oranla daha yüksektir. Kortikal ve kansellöz kemiğe benzer mekanik özellikler gösterirler ve sentetik hidroksiapatitlere göre daha iyi rezorbe olma özelliğine sahiptirler (Adem, 2007; Okumuş ve Yıldırım, 2005; Nasr ve ark., 2000; Shors, 1999).

Ksenogreftler, memeli hayvanların kemiklerinden veya mercan kabuklarından elde edilirler. At, domuz ve sığır ağıllara ait kemiklerin de kullanımı uygundur ancak sığır kemikleri daha çok tercih edilmektedir (Revell, 1986). İnorganik sığır kemiğinin, kemik tamirinde kullanılması 1889 yıllarına dayanır. Bu materyal, alveol kemiğinde, periodontal veya periapikal lezyonların meydana getirdiği kemik kayıpları ve kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda ve hemostatik ajan olarak da kullanılmıştır (Pinheiro ve ark., 2003).

İnsanlarda sığır grefti transplantasyonunu takiben bir takım otoimmün hastalıkların oluşmasıyla 1960'lı yıllarda popülaritesini yitirmiş, 1990' da ise kemik partiküllerinin deproteinizasyon metodlarının gelişmesiyle bu ürünlerin içeriği de yenilenmiştir. Kemiğin organik bileşeni neredeyse tamamen yok edilerek greftin antijenitesi azaltılmış ve alıcı dokunun toleransı artırılmıştır.

Ksenogreftler genellikle sığır kemiklerinin tam olarak deproteinize edilmesi ile elde edilirler. Sığır kemiğinin organik bileşenleri tümüyle elimine edilir. Geri kalan

inorganik bölüm, poröz hidroksiapatit partikülleridir ve yapısal olarak insan kansellöz kemiğiyle benzerlik gösterir. Alıcı doku tarafından iyi tolere edilir ve o bölgedeki iyileşmeye osteokondüktif katkı gösterirler (Adem, 2007).

Sığır kaynaklı kemik grefti uygulamaları, son zamanlarda sağlık alanında önemli bir yer tutan, prionlarla bulaşan Deli Dana Hastalığını (DDH) (bovine spongiform encephalopathy) ve bunun insanlardaki varyasyonu olan Creutzfeldt-Jakop hastalığını (CJD) gündeme getirmektedir. Ancak prionların kemik dokusunun tümüyle deproteinize ediliyor olması nedeniyle böyle bir risk söz konusu değildir. Aynı zamanda, Dünya Sağlık Örgütü de kemik dokusunu prion hastalıkları için güvenilir olduğunu açıklamıştır (Adem, 2007; Efeoğlu, 2002; Rekow, 2003).

Günümüzde DDH yüzünden sığır kaynaklı ksenogreftlerin insanlarda uygulanması hala tartışma konusu olabilmektedir. Bu gibi enfeksiyonlardan kaçınmak için son zamanlarda at kaynaklı ksenogreftler üretilmiştir. Günümüze kadar atlardan bulaşan DDH bildirilmemiştir (Nienhuijsa ve ark., 2006).

Ksenogreftler, piyasada farklı boyut ve şekillerde bulunmaktadır. Blok formları, plastik ve rekonstrüktif cerrahi ile maksillofasial cerrahide onlay greft olarak kullanılırken, granül formları periodontal kemik defektlerinde, çekim kavitelerinde ve küçük kist operasyonlarında, hem fonksiyonel hem de estetik kayıplarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Daha güçlü materyallerle birleştirilerek kombine olarak da kullanılabilirler (Adem, 2007; Kökden ve Türker, 1999).

2.7.3 Homojen greftler (Homogreft veya allogreft)

Aynı türde fakat farklı kalıtsal özellikteki bireyler arasında taşınan kemik greftleridir. Homogreft ya da allogreft olarak da bilinmektedirler (Fonseca ve Dawis, 1995; Manson, 1994). Kemik allogreftleri, değişik genetik tipte farklı insanlardan ve kadavralardan elde edilirler. Daha sonra çeşitli işlemlere tabi tutularak kemik bankalarında saklanırlar. Bunlar osteokondüktif olup ayrıca otogreftlerle kıyaslanabilir düzeyde osteoindüktif özellikleri de vardır.

Allogreftler, dondurulmuş kemik, dondurulmuş-kurutulmuş kemik, demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik şeklinde sınıflandırılabilirler (Garg, 1999). Kemik dokusunun, alıcı bölgeye uygulanmadan önce bulaşabilir bir patolojik özelliği kalmayacak şekilde aseptik bir doku haline getirilmesi konusunda çok önemlidir. Aksi halde insan bağışıklık yetmezliği virusu (HIV), Hepatit B virusu (HBV), Hepatit C

virusu (HCV), CJD, Treponema pallidum, Mycobacterium tuberculosis kolay bir şekilde alıcılara bulaşabilir. Alınan bütün tedbirlere karşın, henüz teşhis edilmemiş HIV + bir donörden allogreft alınması olasılığı yaklaşık 1:1,600,000 olarak rapor edilmiştir. Ayrıca bu greftler alıcı tarafından reddedilme, aşırı rezorbsiyon gibi dezavantajlara da sahiptirler (Akay, 1998, Boyan ve ark., 1999; Dayangaç, 2008).

2.7.4 Alloplastik greftler

Yapay yoldan elde edilmelerine rağmen kemiğin inorganik yapısına benzeyen çeşitli sentetik greft materyalleri, kullanım kolaylıkları ve otojen greftlerin neden olduğu riskleri taşımamaları nedeniyle bir alternatif olarak karşımıza çıkarlar (Timoçin ve ark., 1993). Kolay elde edilebilirlik gibi avantajlarının yanında yabancı cisim reaksiyonu göstermek gibi dezavantajları vardır. Son zamanlarda oral ve maksillofasiyal cerrahide sıkça çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu materyallerin kullanımı immün reaksiyon ve antijenite oluşturabilir ve de hastaya ek bir maliyete sebep olabilir (Yıldız, 2006)

Sentetik greft materyalleri arasında Polimetilmetakrilat, titanyum, Poliortoester, Silikon, Bioglass, kalsiyumfosfat grubu seramikler [(HA) ve trikalsiyum fosfat (TCP)] sayılabilir. Bunlar ayrı ayrı uygulanabildikleri gibi, otojen ya da allojen kemik greftleri ile birlikte de kullanılabilir (Tidwell ve ark., 1992; Block ve ark., 1987). Günümüzde en popüler olan ve geniş kullanım sahası bulunan fosfat grubu seramikler, başlıca iki materyal HA ve TCP'tan oluşurlar ve bu materyallerin biyoyumlulukları oldukça iyidir (Mocan ve Kişnişçi, 1990; İçten ve ark., 1989; Yıldız, 2006).

Osteokondüktif etkiye sahip olan bu sentetik kemik materyallerinin en büyük dezavantajları osteojenik ve osteoindüktif aktivitelerinin olmamasıdır (Tomak ve ark., 2000).

2.8 Kemik Greftlerinin Fonksiyonları

Greft materyalleri osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon olmak üzere üç farklı mekanizma ile kemik iyileşmesine katkıda bulunurlar. Bu işlemler alıcı yerin durumu ve greftin tipine bağlıdır (Güven ve Keskin, 2001; Efeoğlu, 2009).

2.8.1 Osteogenezis

Osteogenezde kemik greft materyalleri, içermiş oldukları organik materyalleri ile direkt olarak osteoblast hücrelerinden kemik oluşturma özelliğine sahiptir. Dokuda farklılaşmamış mezenkim hücrelerinin olmadığı ortamlarda bile bu tür organik

maddeler osteogenez yeteneğine sahiptir. Osteogenetik materyaller canlı kemik hücrelerinin bir birleşimidir. Greft hücreleri de yeni kemik oluşturma özelliklerine sahiptir. Bu nedenle osteogenez yapabilme özelliğine sahip tek greft materyali otojen kemiktir (Adem, 2007; Marx ve Saunders, 1986).

2.8.2 Osteoindüksiyon

Osteoindüksiyon, genel olarak osteoblastik aktiviteyi arttırarak kemik olusumunun sağlanmasını ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Otojen greftler ve demineralize kemikler osteoindüktif etkiye sahiptir. Osteoindüksiyon oluşum mekanizması, mezenkimal hücrelerin ve fibroblastların kemik yapan hücrelere dönüşmesiyle meydana gelir (Aybar ve Gümrü, 2000; Adem, 2007; Tomak ve ark., 2000).

2.8.3 Osteokondüksiyon

Osteokondüksiyon otojen, allojenik veya alloplastik materyallere bir iskele oluşturup, greft içinde ve çevresindeki kapillerlerin ve osteoprogenitör hücrelerin alıcı bölgede artış göstermesiyle meydana gelen kemik oluşturma sürecidir. Greft veya biyoimplant yeni kemik formasyonu için bir süre iskele gibi davranır (Adem, 2007).

Genellikle kemik ürünleri, osteogenez için gerekli olan hücresel elementleri sağlayamazlar ve osteoindüktif olarak düşünülemezler. Sadece yeni kemik oluşumu için iskele hazırladıklarından osteokondüktiftirler (Thorwarth ve ark., 2005). Yapılan çalışmalar, biyomateryallerin osteoindüktif olabilmesi için bazı parametrelerin ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Biyomateryallerle yapılan osteoindüksiyon etkili bir yöntem olmasına rağmen, mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir (Habiboviç ve ark., 2005).

2.9 İdeal greft materyallerinin özellikleri

- Kullanılan greft materyali biyoyumlu olmalıdır,
- Biyoinert, biyoyumlu olmalıdır,
- Osteoindüktif ve konduktif özellikleri olmalıdır
- Revaskülarizasyonu, osteogenezisi ve osteoindüksiyonu kolaylaştırmalıdır,
- Yeterli destek ve stabiliteyi sağlayabilmelidir,
- Yüzey pörözitesi olmalıdır,
- Kolay sterilize edilebilmelidir,
- Enfeksiyona dirençli olmalıdır,

- Toksik ya da antijenik etkiye sahip olmamalıdır,
- Karsinojenik olmamalıdır,
- Kolay şekillendirilebilmelidir,
- Kırılmaya ve bükülmeye karşı dirençli olmalıdır,
- Rezorbsiyona dirençli olmalıdır,
- Uygulama hasta tarafından kabul edilebilir olmalıdır,
- Operatif ve postoperatif komplikasyonu minimal olmalıdır,
- Başarısızlık durumunda kolaylıkla çıkarılabilmeli veya kesilebilmelidir,
- Saklanması ve depolanması kolay olmalıdır,
- Defekt için yeterli miktarda temin edilebilir olmalıdır,
- Pahalı olmamalı ve kolay elde edilebilmelidir.

2.10 Bone morphogenic protein (BMP)

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

BMP'ler 7 adet disülfid bağ ile bağlanmış dimerler içerirler. BMP'ler iki benzer zincir içeren homodimer olarak veya farklı zincirler içeren heterodimer olarak iki şekilde de aktiftir. Günümüzde 15 adet BMP tanımlanmıştır. Aminoasit diziliş benzerliklerine göre alt gruplara ayrılmışlardır. BMP-2 ve 4 birinci alt grubu, BMP-5 ve 8 ikinci bir alt grubu 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 (Taşdemir U., 2011; Boyne ve ark., 1997; Groeneveld ve Burger, 2000; Kubler ve ark. 1998; Kusumoto ve ark., 1997; Seto ve ark., 2001).

Yapılan çalışmalar; BMP'lerin birçok doku ve organın oluşumunda erken morfogenez sırasında olan epitelial mezenkimal etkileşimlerde morfogenerler olarak rol oynadıklarını göstermiştir. Suzuki ve ark., (2001) BMP-2'nin gelişmekte olan diş jermelerinde, çene kemiğinde, çizgili ve düz kaslarda, spinal kord, nasal, trakeal ve özefegal 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 (Özeç ve Yeler, 2003; Groeneveld ve Burger, 2000).

BMP'ler memelilerde mevcut olan asıl *morphogendirler*. Embriyojenik dönem ve doğum sonrasında kemik ve birçok dokuda var oldukları belirlenmiştir. Hayat boyunca büyüme faktörlerinin hedefi diferansiye olmuş hücreler olmasına karşın BMP'lerin hedef organı undiferansiye perivasküler bağ dokusu hücreleridir. BMP kemik gelişimi ile ilgili bazı genleri aktive ederek kırık iyileşmesinde indüksiyon yapması sonucunda yeni kemik formasyonunu sağlamaktadır (Suzuki ve ark., 2001).

BMP'lerin ve kallusun kırık iyileşmesi sürecindeki rolleri henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Ancak BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 ve BMP-7'nin kırık iyileşmesi sırasında anjiogenez ve hücrelerin farklılaşması ile ilgili proteinler olduğu bilinmektedir. Hücre grupları ve büyüme faktörlerinin karşılıklı etkileşimi sonucunda 6-8 hafta içerisinde kırığın fonksiyonel iyileşmesi sağlanmış olur (Lynch, 1999b).

2.11 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Anjiogenez damarların oluşmasından önceki evrede endotel hücrelerinin kümelenmesi ile oluşan kapillerlerin dallanması ve genişlemesi ve küçük damarların büyüüp filizlenmesidir. Kısaca anjiogenez, yeni damar gelişimi olarak tanımlanmaktadır. Anjiogenik faktörler; tümör hücrelerinden, ortamdaki fibroblast ve monosit gibi hücrelerden ve kollojen matriksin yıkılması sonucu ortaya çıkarlar. Anjiogenezi uyaran en önemli sitokinler; VEGF ve bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)'dür. VEGF kemik oluşumunda anjiogenik protein olarak merkezi bir rol oynar. Çünkü yeni kemik yapısı için kan damarı ve beslenme yollarının oluşumunda çok önemlidir (Fayette ve ark., 2005; Hocaoğlu, 2009).

VEGF ilk olarak vascular permeability factor (VPF) olarak 1983'de tanımlanmıştır ancak tam olarak 1989'da anlaşılmış ve nitelendirilmiştir. VEGF, homodimerik, heparin-bağlayan glukoprotein yapısında bir molekül olup çeşitli alt grupları belirlenmiştir (Neufeld ve ark. 1999; Turgut ve ark., 2007). Üzerinde birçok çalışma yapılmış temel büyüme faktörü olan VEGF-A; VEGF-A,B,C,D,E ve plasental büyüme faktörünü (PLGF) içeren ailenin bir üyesidir. VEGF-A,B,D,E ve PLGF anjiyogenezi etkilerken, VEGF-C lenfatik damarları etkiler. VEGF olarak adlandırdığımız VEGF-A'nın çeşitli insan izoformları vardır. (Wiostko ve ark., 2008)

Aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 gibi izoformları bulunan (Mohammad ve ark., 2008; Turgut ve ark., 2007) VEGF, biyolojik aktivitesini endotel hücreleri üzerindeki VEGF-R1 ve VEGF-R2 ile lenf damarları üzerindeki VEGF-R3 adlı üç reseptörü ile gerçekleştirir (Breen, 2007; Wirostko ve ark., 2008; Turgut ve ark., 2007; Hoccoğlu, 2009). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar (Turgut ve ark., 2007).

Anjiyogenez kemik iyileşmesi ve yeni kemik oluşumunda en önemli parametrelerden birisidir. Çünkü bir dokunun yaşamını sürdürebilmesi vaskülarizasyonuna bağlıdır. Anjiyogenez, iyileşen ya da yeni oluşan dokuya beslenmesini sağlayacak yeni damarların oluşturulmasıdır. Vasküler endotelial hücreler için oldukça spesifik, mitojenik bir faktör olan VEGF, (Şencan ve ark., 2007; Neufeld ve ark., 1999; Ferrara ve ark., 2003; Breen, 2007; Hoccoğlu, 2009) anjiyogenez ve vaskülogenezin doku gelişimi ve organ tamir işlemlerinde de rol oynayan hayati bir moleküldür (Breen, 2007; Wirostko ve ark., 2008). Başka bir ifadeyle VEGF endotel hücreleri için bir sağ kalım faktörüdür. Mikrovasküler geçirgenliği artmasına sebep olan bu faktör, aynı zamanda güçlü bir vazodilatördür (Ferrara ve ark., 2003; Breen, 2007; Wirostko ve ark., 2008).

VEGF'nin kritik kemik defektlerin iyileşmesinde önemli bir rol alabileceği ve osteoprogenitör hücreleri direk etkileyebileceği, osteoblast diferansiyasyonuna katkı sağlayabileceği ve rejenere olan kemiğin mineralizasyonunu artırabileceği bildirilmektedir (Keramarisa, 2008). VEGF vasküler endotelial hücrelerin gelişmesine öncülük etmekte, arter, ven ve lenfatik damarlara farklılaşmasını sağlamaktadır (Augustin, 2007; Giannoudis ve ark., 2006).

VEGF'nin kemik oluşumu ve tamiri üzerine etkileri günümüzde araştırılan popüler konulardandır. Son yıllarda yapılan çalışmalar VEGF'nin kemik hücrelerine etkisi üzerine yoğunlaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda VEGF'nin osteoblast diferansiyasyonu üzerinde direkt otokrin etkisi olduğu ve VEGF inhibisyonu ile kortikal kemik defektlerinde iyileşmenin olumsuz etkilendiği göstermiştir (Street ve ark., 2002). VEGF'nin kemik mineralizasyon ve kemik dansitesinde artışa öncülük ettiği (Geiger ve ark., 2005; Kleinheinz ve ark., 2005; Leach ve ark., 2006; Hoccoğlu, 2009) ve VEGF'nin azalmasıyla kemik mineral ve dansitesinde azalma olabileceği, VEGF'nin

endotelial hücrelerin osteojenik faktörleri sentezlemesini stimüle ederek indirek olarak kemik formasyonuna katkıda bulunabileceği rapor edilmektedir (Wang ve ark., 1997; Bouletreau ve ark., 2002).

Yapılan bir çalışmada VEGF'nin kemik oluşumu ve tamirinde yalnız olmadığı, mezenkimal kök hücreleri üzerine BMP-4 ve BMP-2 gibi diğer büyüme ve diferansiyasyon faktörleri ile işbirliği yaptığı ve sinerjistik etki gösterdiği, hücrel yaşam ve kartilaj formasyonunda endokondral kemik formasyonunun erken döneminde bu etkileşimin olduğu rapor edilmektedir (Vaibhav ve ark., 2007).

Deneysel modellerde ekstremite iskemisinde eksojen verilen VEGF'nin anjiogenezi başlatarak vasküler kaynağı, bazı çalışmalarda da vasküler yaralanmanın ardından uygulandığında yeniden endotel oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir (Hsu ve ark., 2004). Corral ve arkadaşları tarafından topikal olarak yaralara uygulandığında olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Petersen ve arkadaşları da 2002'de tendon anjiogenezinin ana belirleyicisinin VEGF olduğunu bulmuşlardır (Petersen ve ark., 2003).

VEGF kemik iyileşmesi bölgesine osteoblastlar, osteoklastlar ve mezenkimal hücrelerden yoğun olarak salınır. Kırık bölgesinde yeni damar oluşumu arttırarak kemik iyileşmesine yardımcı olur (Boden, 1999; Khan ve ark., 2000; Mathes, 2006).

2.12 Osteonektin ve Osteokalsin

Kemik matriksinin esas maddesi, Tip 1 kollajen (% 90) ve (%10) non-kollajen bölümünden oluşur. Non-kollajen bölüm içerisinde; osteonektin, osteokalsin, osteopontin, kemik sialoproteini (Motyckova ve ark. 2002), büyüme faktörleri, sitokinler, proteoglikanlar, fosfoproteinler ve fosfolipidler yer alır. Bunlar, kemik mineralizasyonu ve kemik yapım-yıkım eşleşmesini düzenleyen faktörlerdir (Tanakol, 2004).

Osteonektin, mineralizasyonun başlangıç fazında önemli bir rol oynadığı düşünülen kemik matriksinin bir komponentidir (Çetiner ve Engel, 2000) ve kemik dokuda osteoblast ve osteositleri kollajen ipliklere bağlarlar (Şimşek, 2012). Ayrıca osteonektin, hücre migrasyonunda ve adezyonunda etkili bir ekstrasellüler matriks proteindir. (Ayan ve ark., 2007)

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteindir. Kemikte en çok bulunan, glutamik asitten zengin 49 aminoasitli nonkollajenik matriks protein olup kemiğe oldukça spesifiktir. Bununla birlikte dentinde de bulunur.

Osteokalsin, kalsiyum iyonunu kemik matriksine bağlayan bir proteindir. Osteokalsin gelişen kemikte mevcuttur ve kemik oluşumuna katkıda bulunur. Osteokalsin sentezi, vitamin D aracılığıyla olur. Vitamin D, osteokalsin gen transkripsiyonunu regüle eder. Vitamin D eksikliği olan deney hayvanlarının kemiklerinde, normale göre %50 daha az osteokalsin olduğu saptanmış ve 1.25 (OH)₂ D₃ verilmesi ile serum osteokalsin düzeyi arttırılmıştır. Osteokalsin, mineral depolanmasında ve kemiğin yeniden şekillenmesinde önemli rol oynar (Haspolat ve Söker, 2002; Watts, 1999). Menopoz sonrası ortalama serum osteokalsin artışı, kırık riskinin arttığını gösterir. Osteokalsin düzeyleri sirkadyen bir ritm göstererek sabahtan öğleye kadar azalır, gece yarısından sonra ise artar (Eastell, 1996).

2.13 Antioksidanlar

Antioksidanlar için uluslararası bir tanım bulunmamakla birlikte çeşitli şekillerde tanımlanmaktadır. Genel olarak antioksidanlar, kolaylıkla oksidasyona uğrayabilen lipidler, proteinler, DNA ve karbonhidratlar gibi moleküllerin oksidasyonunu önleyebilen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Antioksidan etki, enerji bağları ve standart indirgeme potansiyelleri ile değerlendirilmektedir. Antioksidan etkinin değerlendirilmesi değişik durumlarda farklı antioksidan mekanizmaların aydınlatılmasına dayanmaktadır. Polifenolik bileşikler, bitkiler, baharatlar ve çayların antioksidan etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda değişik sonuçlar alındığı saptanmıştır (Bastianetto ve Quirion, 2002; Amarowicz ve ark., 2004; Nagai ve ark., 2005; Wei ve ark., 2006). Flavonoidler, tanenler, kumarinler gibi çeşitli fenolik antioksidanların ve son zamanlarda prosiyanidinlerin doza bağlı olarak, radikaller üzerine süpürücü etkilerinin olduğu ve bu nedenle serbest radikallerin neden olduğu patolojilerde terapötik ilaç olarak kullanılabilecekleri bildirilmektedir (Kim ve ark., 2003; Fenglin ve ark., 2004; Ljubuncic ve ark., 2005; Maiga ve ark., 2006; Djeridane ve ark., 2006).

Son yıllarda bu serbest radikallere karşı koruyucu önlem olarak, doğal ürünler ve antioksidan maddelerin giderek önemi artmıştır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde farmasötik ajanların pahalılığından dolayı bazı hastalıkların ve sağlık problemlerinin tedavisinde, bitkisel ürünlerle alternatif tedavi olarak karşımıza çıkmaktadır. Türkiye’de halk arasında çeşitli amaçlarla kullanılan ve bilimsel aktivitesi bilinmeyen pek çok bitki bulunmaktadır. Bazı bitki ekstraları ve bitkisel ürünlerin ise antioksidan etkinliklerini gösteren çalışmalar bilinmektedir fakat çalışma sayısı kısıtlıdır (Gençaslan, 2007; Kartal ve ark., 2007; Tepe ve ark., 2006; Couladis ve ark., 2003).

2.14 Capparis spinosa

Capparis, Capparidaceae familyasının en geniş iki genusundan biri olup, dünya üzerinde 350 tür ile temsil edilmektedir. Türkiye'de *Capparis ovata* ve *spinosa* türleri bulunmaktadır. Arkeolog Krügerin araştırmasına göre, 7800 yıldan beri bu bitki bilinmektedir. Aristo ve Hipokrat zamanlarında da (M.Ö. 384-322, M.Ö. 400) bu bitkiden söz edilmektedir. Pişirilmiş 100 g madde de; Protein = 5,4 g, yağ = 0,2 g, Ca = 33 mg, Fe = 2,8 mg, Beta karoten = 25 mcg, Vitamin B1 = 0,01 mg, Kcal = 92 bulunmaktadır. İşlenmiş CS'nin 100 g. da ise Protein = % 29,3, Yağ = % 0,7, Fiber = % 2,7, Nişasta = % 39,5, Sukroz = % 4,3, D-glikoz = % 0,2, D-fruktoz = % 0,7, Amino asit (g [16g N]-1): Aspartik asit = 7,7 g, Treonin = 1,7 g, Serin = 2,3 g, Glutamik asit= 9,0 g, Prolin = 6,5 g, Glisin = 3,5 g, Alanin = 3,2 g, Valin = 4,5 g, Sistein = 1,3g, Metyonin = 1,8 g, İzolösin = 2,9 g, Lösin = 7,0 g, Tirozin = 2,3 g, Histidin = 1,3 g, Lizin = 1,5 g, Arginin = 15,1 g, Çinko = 4,2 mg bulunmaktadır (Duman, 2009; Anonim, 1991).

Akdeniz mutfağının mevsimsel malzemelerinden olup özellikle İspanya, Fas ve İtalya tarafından ihraç edilmektedir. Son yıllarda Türkiye'den de Avrupa ülkelerine *C.spinosa* ürünlerinin ihracatı başlamıştır. Halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılan *C.spinosa* bitkisinin tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayide kullanılmaktadır (Bağcı ve Şimşek, 1999).

Akdeniz ülkelerinde ilk çağlardan bu yana gıda ve tedavi amaçlı kullanılan *C.spinosa* bitkisinden İspanyollar köklerinden yaptıkları ilaçları, hemoroitin tedavisinden kalça rahatsızlıklarının giderilmesine, kadınların regl dönemlerinin düzenlenmesinden sancıların giderilmesinde kullanmışlar. Sirkesinden diş ağrılarının giderilmesinde faydalanılmış. Yine köklerinden zehirlenmelere karşı panzehir elde etmişler.

Avrupa'da meyveleri ve çiçek tomurcukları, müshil (kabızlık giderici) ve diüretik (idrar söktürücü) olarak kabul edilmekte, uyarıcı ve iskorbüt hastalığını önleyici olarak değerlendirilmektedir. Yaprakların ezilmesiyle hazırlanan lapa ise gut hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca kan bozuklarının giderilmesinde yine *C.spinosa* başvurulmaktadır (Tesoriere ve ark., 2007).

C.spinosa ile ilgili bugüne kadar sadece bir vakada epikondilit nedeni ile cilt üzerine *C.spinosa* L.'nin solüsyonundan ıslak kompres yapan bir kadında allerjik kontakt dermatit oluştuğunu bildiren bir olgu sunumu bulunmaktadır. *C.spinosa*'nın

içermiş olduğu glukokapparin adlı protein enzimatik hidroliz ile (mirosinaz) izotiyosiyanaata dönüştürülebilen bir izotiyoglukoziddir. İzotiyosiyanatları içeren bitkilerin iritan dermatite ve allerjik kontakt dermatite yol açtıkları bilinmektedir. Bunun haricinde yan etki veya toksisite ile karşılaşılmasıdır (Angelini ve ark., 1991).



Şekil 2.1 *Capparis spinosa* tomurcukları



Şekil 2.2 *Capparis spinosa* bitkisi

C.spinosa farklı aktif kimyasal bileşenlerden oluşmuştur. Tomurcuklarında lipid, alkaloid, glukokapparin gibi glukozinatlar ve antioksidan özelliği olan flavonoidler ve diğer polifenoller bulunur (Tesoriere ve ark., 2007). Bunlardan en önemlisi flavonoidlerdir. Bitkide diğer bileşenlere göre daha yüksek oranda bulunmaktadır. Flavonoidler bir çok biyolojik etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları antienflamatuar, antialerjik, antiviral ve antikanserojenik etkilerdir. Flavonoidler antioksidan ve metal bağlayıcı özelliğe sahiptirler (Pratt, 1965). Flavonoidlerin antioksidan etkisi yaklaşık 40 sene önce gösterilmiştir (Cavallini ve ark., 1978). Flavonoidler polifenoldürler ve antioksidan özelliğini hidroksil süstitüentlerinden hidrojen atomunu ayırmasıyla kazanır. Bununla beraber hidroksil gruplarının sayısı, pozisyonu ve bağlı grupların sayısı flavonoidlerin antioksidan özelliğini etkileyen önemli faktörlerdir (Larson, 1988). 10 g *C.spinosa*'dan 65 mg flavonoid glycoside ve 40 mg eşdeğerinde *quercetin* elde edilebilir. CS'nin içerdiği flavonoidlerden birisi olan *quercetin*'in yeni kemik oluşumuna olumlu etkisi gösterilmiştir (Wong ve Rabie, 2008).

C.spinosa ve *decidua* ekstrelerinin anti-enflamatuar özellikleri çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır (Al Said ve ark., 1988; Agel ve ark., 1986). Ayrıca deciduanın antipiretik özelliği olduğu fakat her ikisinin analjezik özelliklerinin olmadığı gösterilmiştir (Agel ve ark., 1986). *Capparis zeylanica*'nın analjezik ve antipiretik özelliği (Ghule ve ark., 2007) ve yine *C.spinosa*'nın antialerjik özelliği bulunduğu yeni yayınlar arasında belgelenmiştir (Trombetta ve ark., 2005).

3 MATERYAL ve METOD

Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (CÜBAP) tarafından desteklenen bu çalışma deneysel ve histopatolojik olarak iki bölüm altında gerçekleştirildi. Deneysel kısmı; Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, histopatolojik değerlendirmesi ise Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

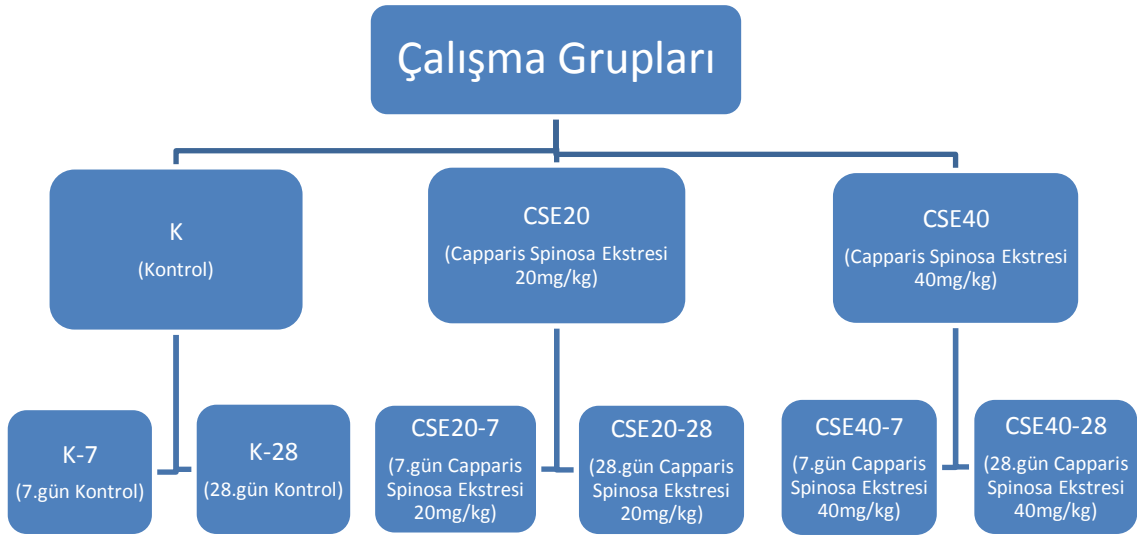
Çalışmaya başlamadan önce, 13.07.2011 tarih ve 263 sayılı Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurul onayı alındı ve çalışma sırasında Cumhuriyet Üniversitesi Etik Kurulu yönergelerinin 13. maddesinde belirtilen "Etik kurallara uygunluk esası" kararına uyuldu.

Çalışmanın deneysel kısmı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu 13.07.2011 tarih ve 263 sayılı kararı ile onay alındıktan sonra Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Bu çalışma için kullanılacak olan ratlar, Cumhuriyet Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışma, veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen ağırlıkları yaklaşık 250-300 gram olan, ortalama 12 haftalık yetişkin 48 adet tamamı erkek Wistar cinsi albino rat üzerinde yapıldı. Denekler, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusu sağlanacak şekilde tutularak, serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlandı. Oda ısısı 22 ± 2 °C' de sabit tutuldu. Buldukları odanın nispi nem oranı % 30-45 arasında tutularak, odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenildi. Ratlar kafeslerde tek olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı.

3.1 Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Toplamda 48 adet ratın kullanıldığı deneysel hayvanları ilk önce 3 ana gruba (K, CSE20, CSE40) ayrıldı (n=16). Bu gruplarda kendi aralarında 7 gün ve 28 gün yaşatılan gruplar olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı (n=8). (Şekil 3.1)



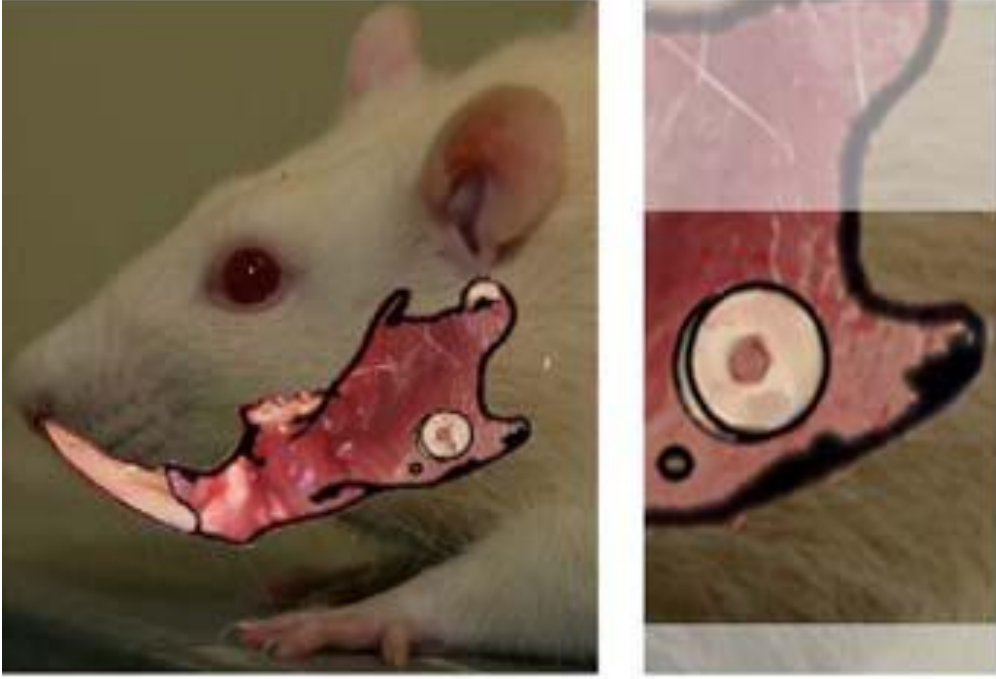
Şekil 3.1 Çalışma gruplarının tanımlanması

3.2 Cerrahi teknik

Deneklerin yiyecek ve içecek alımı operasyondan 24 saat önce kesildi. Deney 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.

Deney hayvanlarının sağ mandibula angulus bölgesindeki deri traş edildi. (Şekil 3.3) Operasyon sahası povidon iyot (Batticon standart solüsyon, Adeka, Türkiye) ile silinip, steril örtüler ile operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtüldü. (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. Daha sonra, mandibula angulus bölgesinde bazis mandibulanın 1 cm altından olacak şekilde ve 1 cm uzunluğunda deri, subkutan doku ve periostu içine alacak şekilde insizyon yapıldı. Kemik yüzeyi açığa çıkacak şekilde flap kaldırıldı. (Şekil 3.8) Standart kritik boyutta 5 mm çapında bikortikal kemik osteotomisi trefin frez kullanılarak serum fizyolojik irrigasyonu altında yapıldı. (Şekil 3.9- 3.10) Bu şekilde bütün gruplarda oluşturulan kritik boyuttaki kemik defekti, at kaynaklı ksenogreft Bio-gen®- BGM (bioteck, italy) ile dolduruldu. (Şekil 3.11) Daha sonra deri flebi sırasıyla önce kas ve

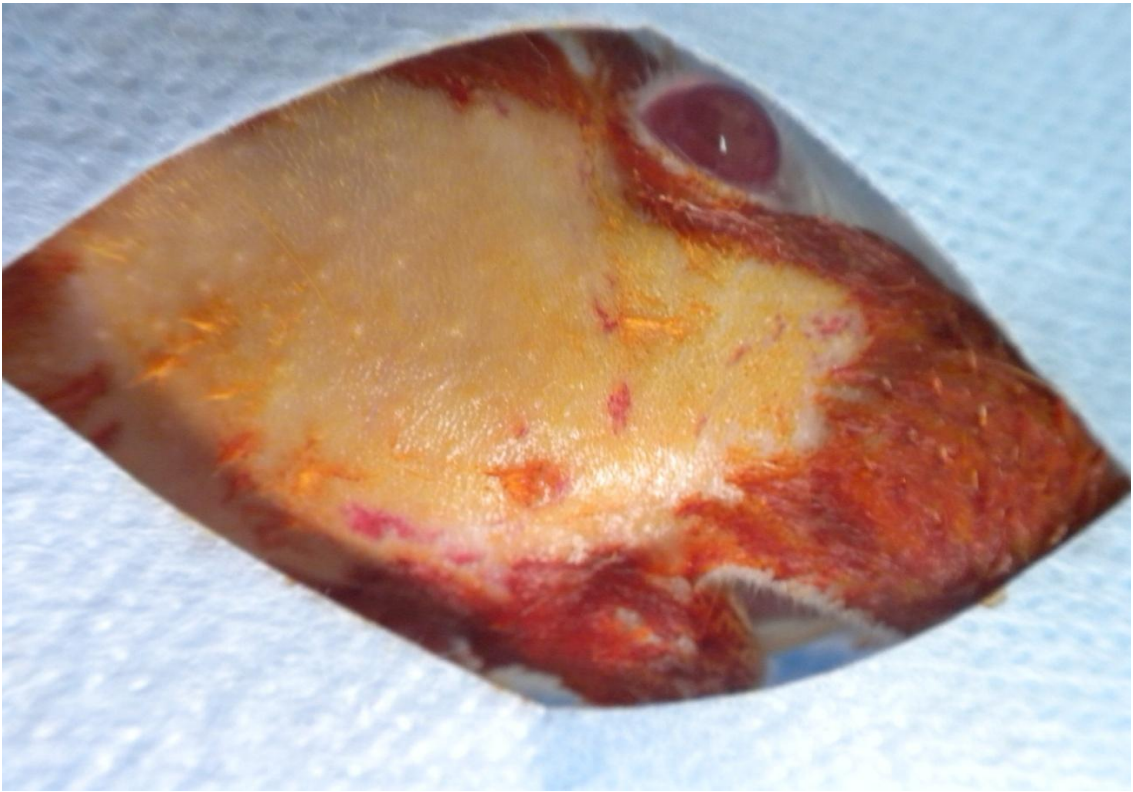
cilt altı fasyalar ve cilt 5-0 poliglaktin 910 (Vikril Jonson&Johnson/ethicon) suture kullanılarak ilk pozisyonuna suture edildi.



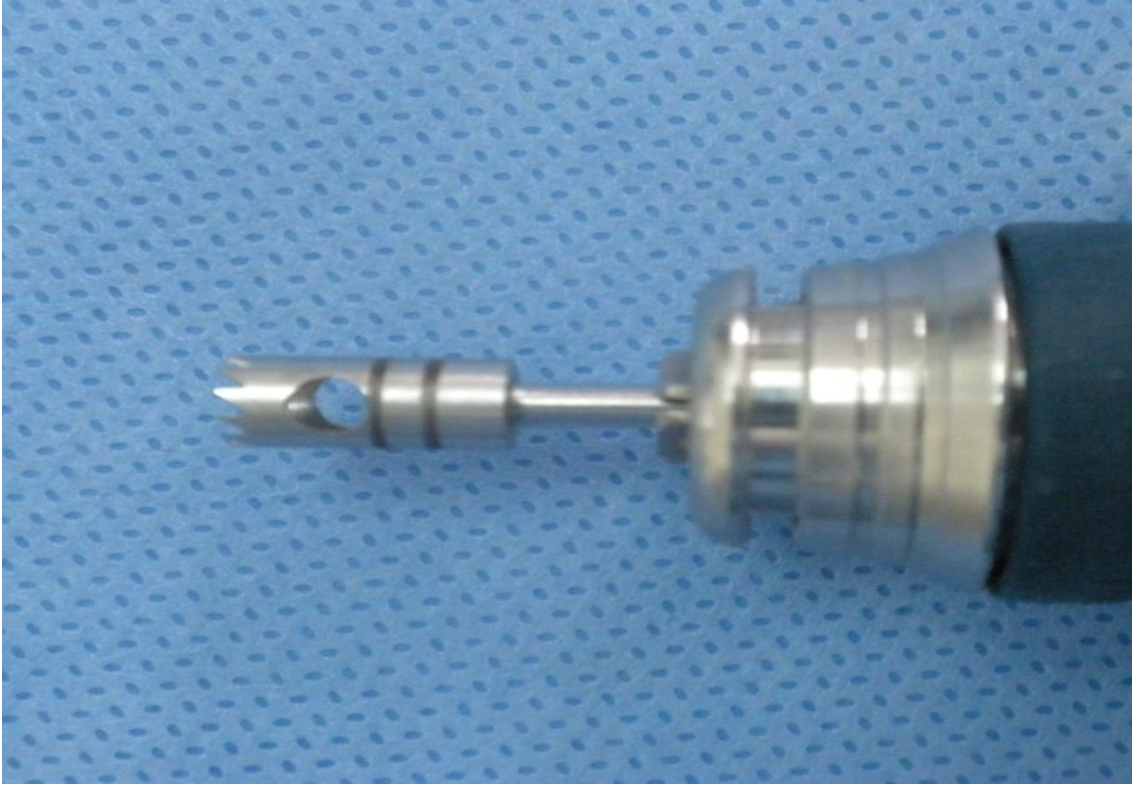
Şekil 3.2 Oluşturulan kemik defekti bölgesinin şematik görüntüsü



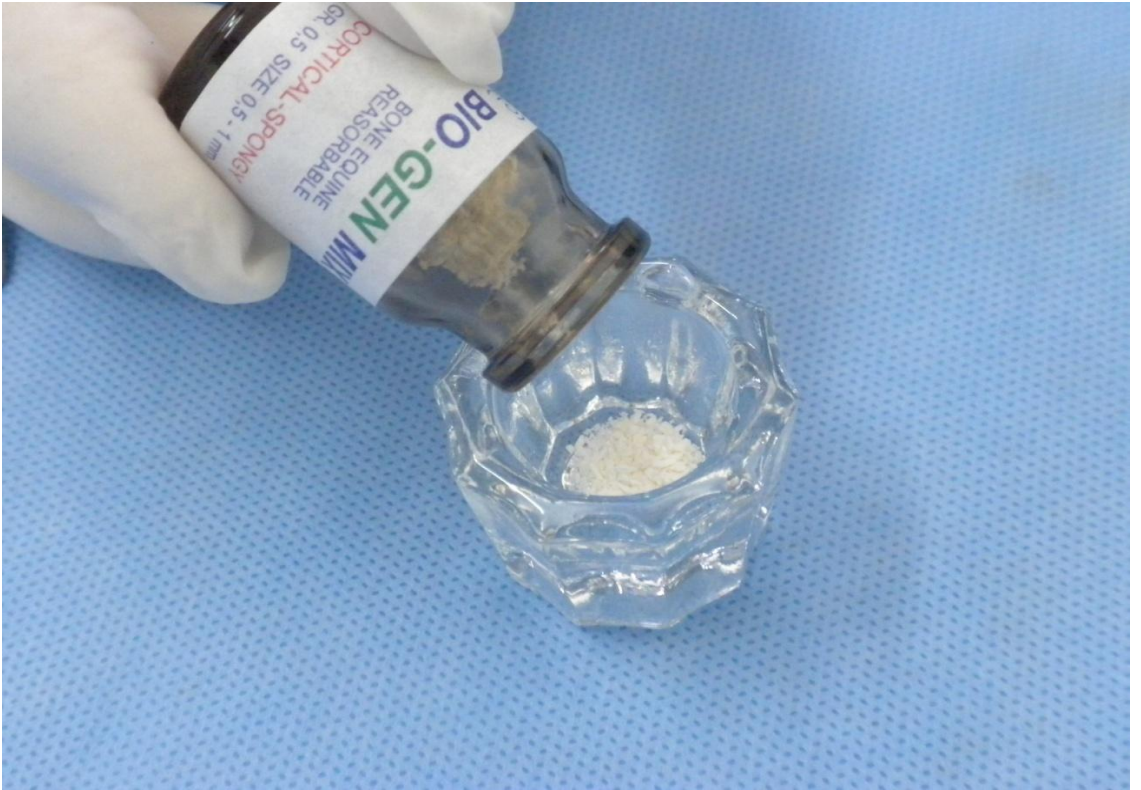
Şekil 3.3 Deney yapılacak tarafın traş edilmesi



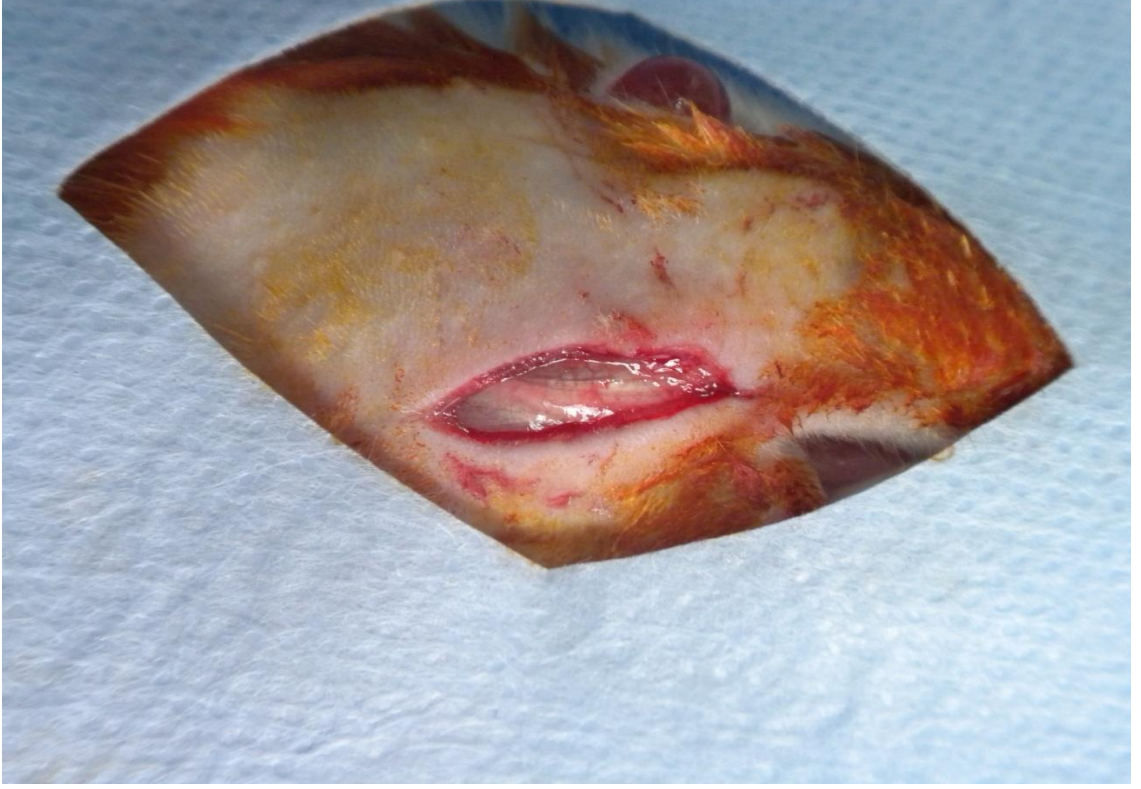
Şekil 3.4 Operasyon sahasının delikli örtü ile örtülmesi



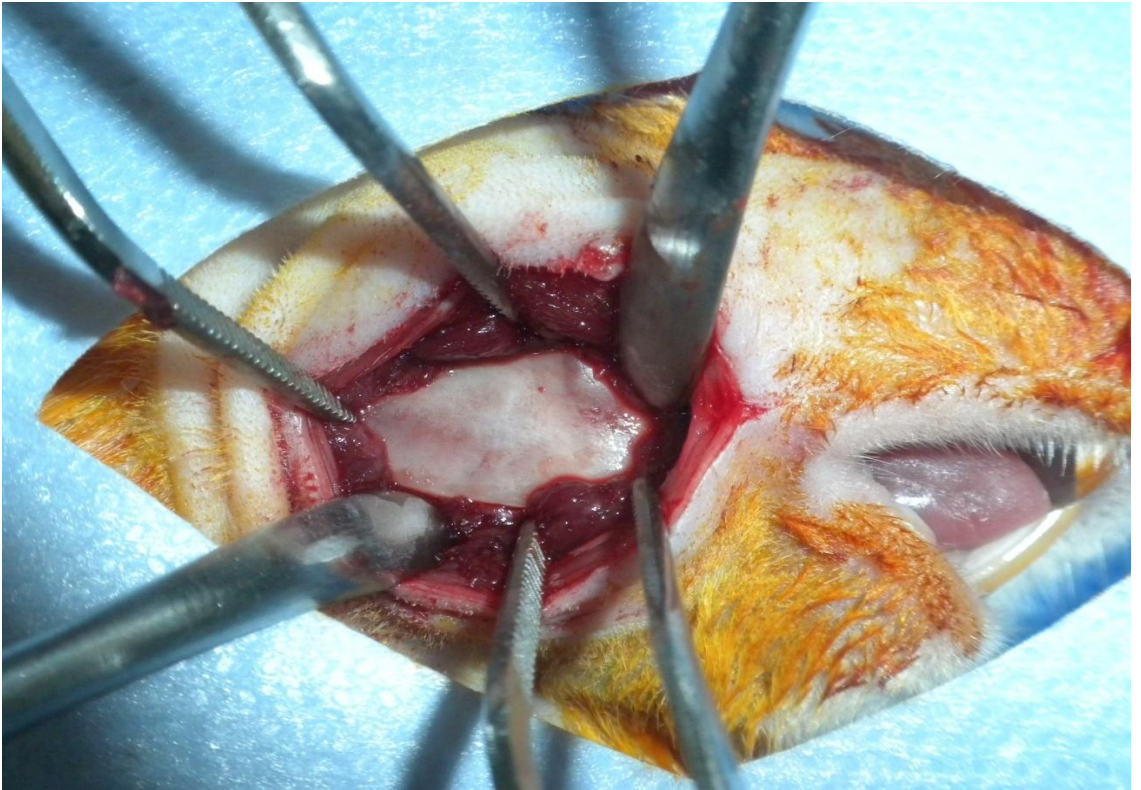
Şekil 3.5 Deney aşamasında kemik defekti oluşturmak için kullanılan trefin frez



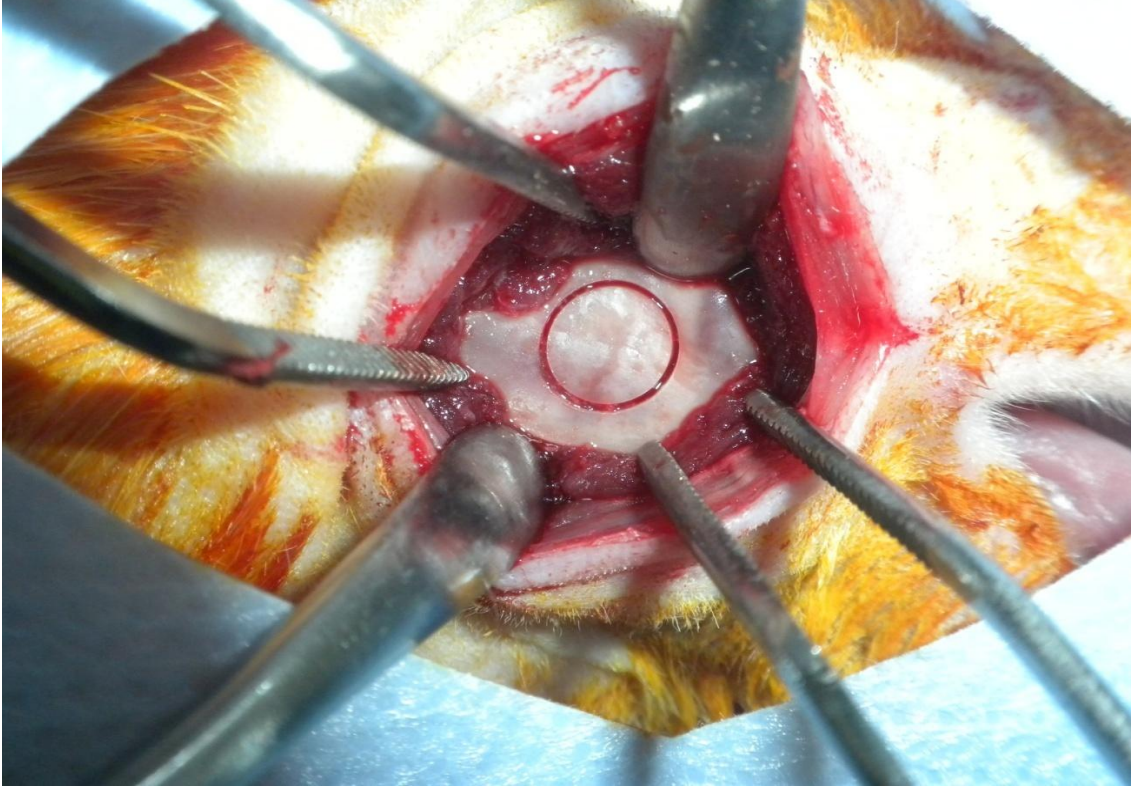
Şekil 3.6 Defektlerin doldurulmasında kullanılan kemik greftinin görüntüsü



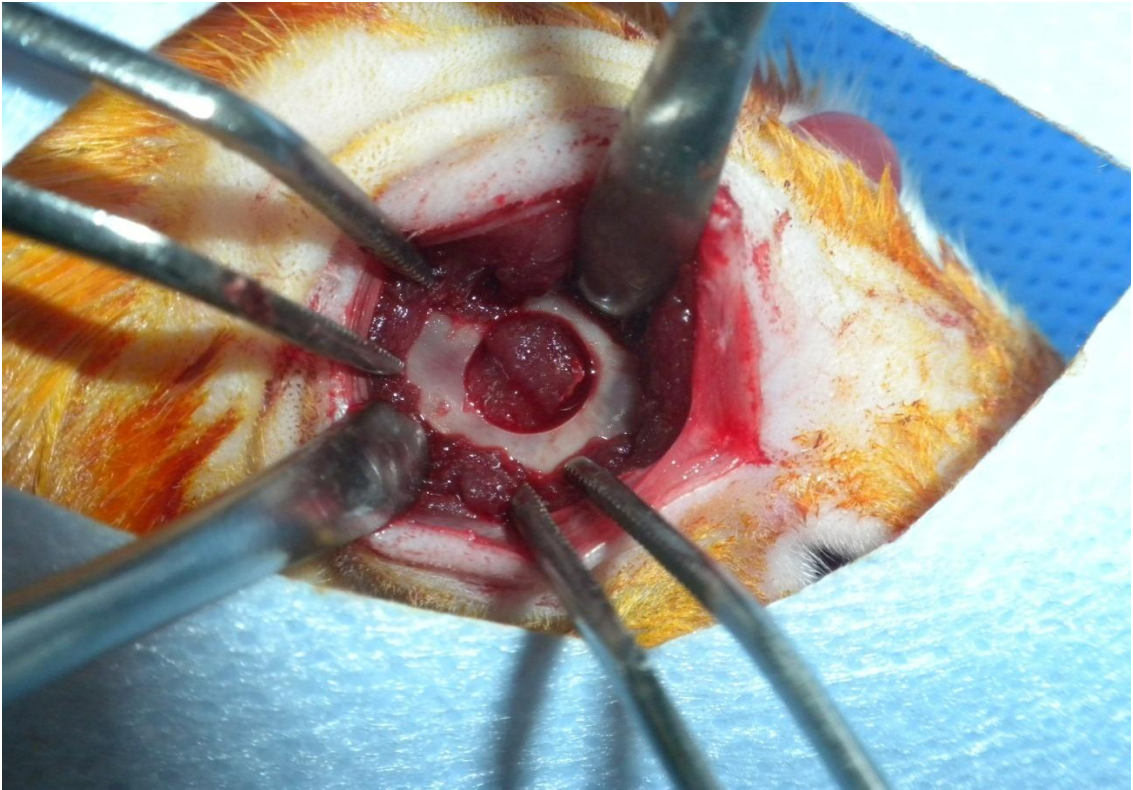
Şekil 3.7 Defekt oluşturulacak bölgedeki deri insizyonu



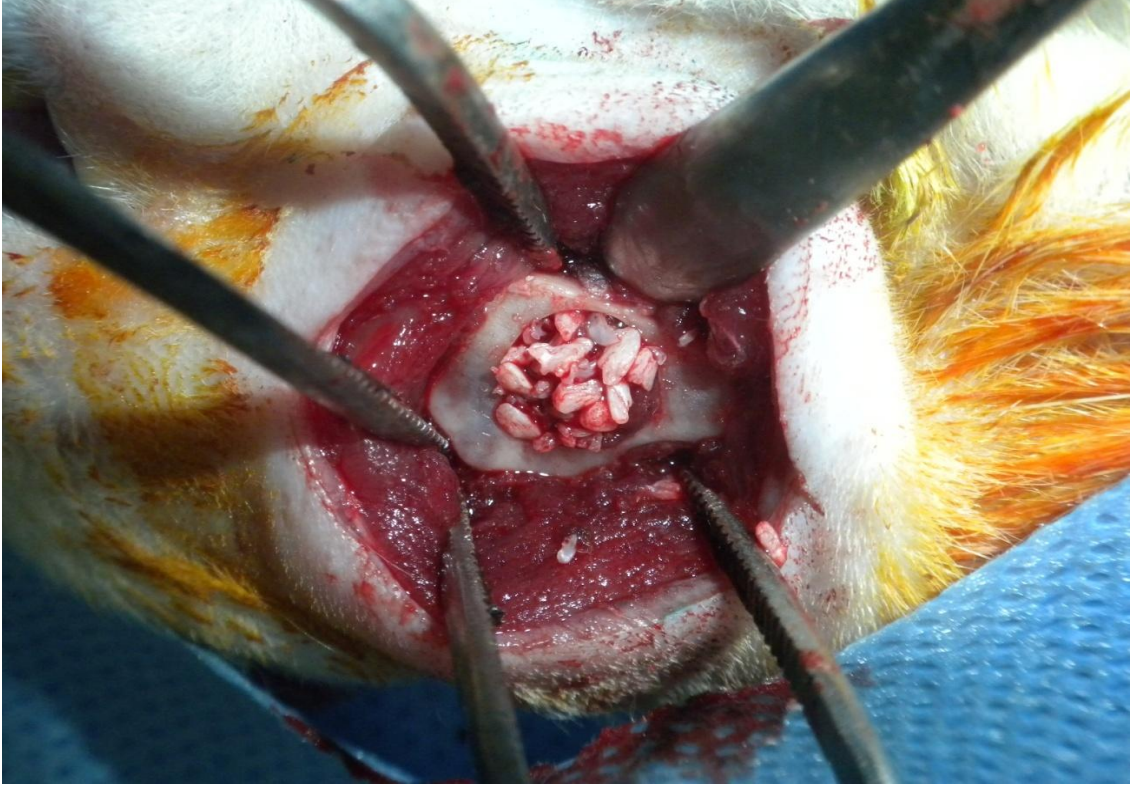
Şekil 3.8 Mandibulada defekt oluşturulacak sahanın görüntüsü



Şekil 3.9 5 mm çapında kemik osteotomisi



Şekil 3.10 Osteotomi sonrası boş kemik defktinin görüntüsü



Şekil 3.11 Oluşturulan defektin kemik grefti ile doldurulması

3.3 *Capparis spinosa* Hazırlanışı ve Uygulanma Şekli

Çalışmada kullanılan *C.spinosa* tomurcukları Gaziantep ilinden 2012 Haziran ayında toplanmıştır. Sağlıklı tomurcuklar seçilerek kurutulmuş ve mekanik parçalayıcıda küçük parçalar haline getirilmiştir. Parçalanmış tomurcuklar 100'er gram tartılarak Soxhlet Cihazının (Gerhardt EV 14) kartuşlarına yerleştirilmiştir. Soxhlet cihazında her kartuş için 500 ml %96'lık saf etil alkol (Merck) ile 60-80 °C'de 12 saat özütmeye tabi tutulmuştur. Elde edilen özütler Whatman no: 4 ile filtre edildikten sonra yüksek vakum altında Rotary Evaporatörde (Heildolph Heizbad HB Digit) 40°C'de yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen özütler +4 °C'de deney başlayana kadar muhafaza edilmiştir.

Sistemik olarak, oral gavaj şeklinde verilen CSE; CSE20-7 ve CSE20-28 gruplarına günlük 20 mg/kg, CSE40-7 ve CSE40-28 gruplarına günlük 40 mg/kg olacak şekilde günde bir kez ve her gün aynı saatte verildi.

3.4 Deney hayvanlarının bakımı ve deneyin sonlandırılması

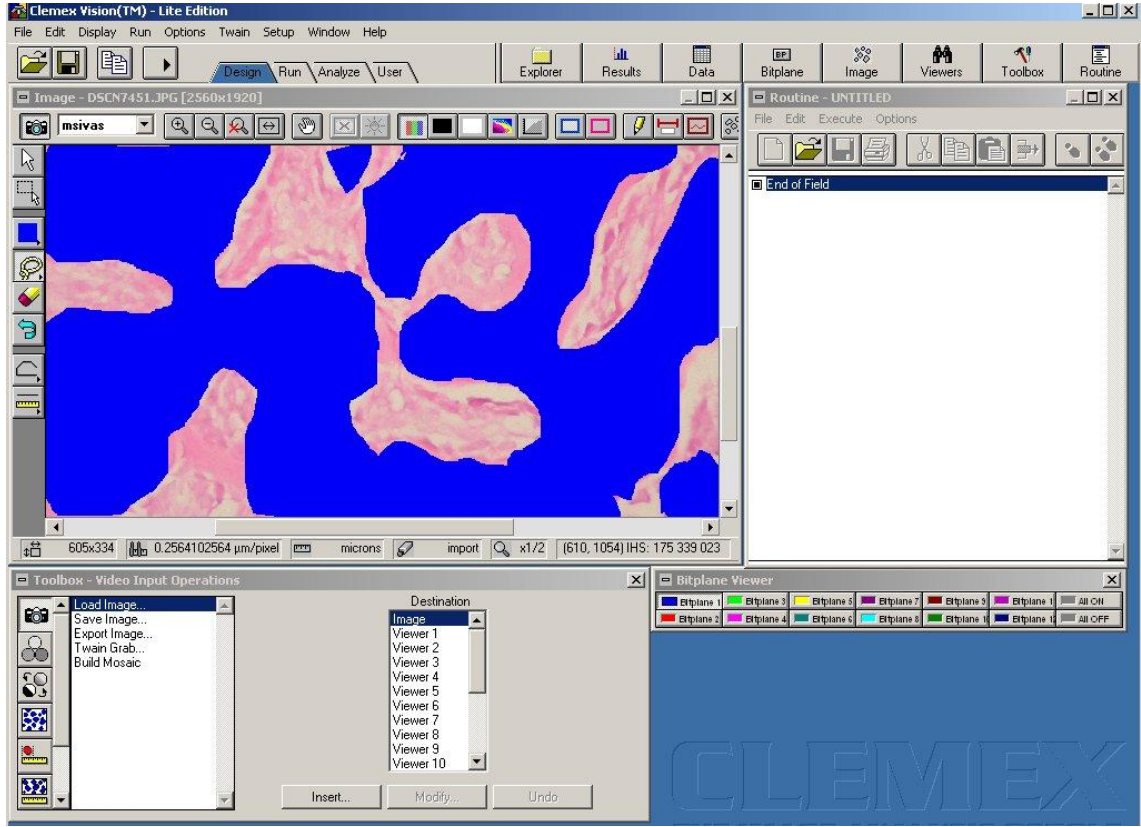
Postoperatif dönemde deney hayvanlarına analjezik olarak Carprofen 4mg/kg (Rimadyl, Pfizer) ve antibakteriyel olarak Ceftriaxon 25 mg/kg (Rocephin, Roche) 5 gün süre ile intramusküler yöntemle uygulandı. CSE, 20 mg/kg ve 40 mg/kg olmak üzere 2 farklı dozda oral gavaj olarak verildi. Deney sonunda ratlar 200 mg/kg sodyum pentobarbital (Petotal, Abbot, ABD) kullanılarak sakrifiye edildi. Deney yapılan taraftaki rat mandibulaları diseksiyon yapılarak çevresindeki yumuşak dokuyla birlikte çıkarıldı ve %10'luk formol içine konuldu.

3.5 Değerlendirme Yöntemleri

3.5.1 Histomorfometrik yöntem

Alınan doku örnekleri %10'luk formik asit kullanılarak dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında örnekler defekt bölgesine komşu kemik fragmanlarını içine alacak şekilde defekt alanının uzun aksına paralel parçalara ayrılarak, ototeknikon takibine alındı. Bu takip sırasında parafine gömülen doku örneklerinden mikrotom kullanılarak 5 µm'lik kesitler lam üzerine alınarak Hematoksilen Eozin ile boyandı. Boyanan preparatların değerlendirilmesi Nikon Eclipse E400 ışık mikroskopu ile yapıldı. 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 TypeA (MBM 11100) görüntüsü de aynı mikroskobik büyütmelemlerde alındı. Tüm görüntüler PC ortamına aktarıldı ve Clemex PE 3.5 görüntü analizi programı ile değerlendirildi. (Şekil 3.12) İlk olarak her olguda 0,4 mm²'lik alanlar görüntü analiz programı ile seçildi.

Seçilen alanlardaki osteoblastlar ve osteoklastlar işaretlenerek otomatik olarak saydırıldı. Ayrıca seçilen aynı 0,4 mm² alandaki yeni kemik oluşum alanları da Hematoksilen Eozin ile boyalı preparatların dijital fotoğraflarından aynı görüntü analizi programı yardımı ile hesaplandı.



Şekil 3.12 Clemex PE 3.5 görüntü analiz programı ile yeni oluşan kemik bölgeleri mavi renkte gösterilmektedir

3.5.2 İmmünohistokimyasal yöntem

İmmünohistokimyasal yöntem yazılı olan protokollere uyularak yapıldı. %10'luk formolle fikse edilip rutin taktipten sonra parafin bloklara gömülen seçilmiş doku bloklarından poly-L lizin kaplı lamlara 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 56⁰C' lik etüvde 16 saat bekletilerek deparafinize edildi. 30 dakika ksilolde bekletildi. %100, %95 ve %90'luk alkollerde sırasıyla 5'er dakika bekletilerek rehidrate edildi. Daha sonra distile suda hidrate edildi. 5 dakika Mikrodalga fırında Monoclonal Anti-human Pro-BMP-2 Antibody, Goat anti r/m/h VEGF Antibody, Anti-human SPARC/Osteonectin ve Anti-human Osteocalcin, yeterli ısıda, EDTA tampon solüsyonu bulunan şale içinde 3 kez, 5 dakika bekletildi. Düdüklü 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 monoclonal), (rhVEGF165, clone AB-293-NA, Goats), (Mouse SPARC/Osteonectin clone: 124413, monoclonal antibody), (Human Osteocalcin MAb Clone: 190125) 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-VEGF, Anti-BMP-2, Anti-osteonectin, Anti-osteokalsin ile boyalı preparatlarda 0,4 mm² lik alanlar seçildi. Bu alanlar seçilirken aynı bölgelerin seçimine dikkat edildi ve Işık mikroskobuna bağlı Nikon Coolpix 5000 dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandırıldı. 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. (Şekil 3.12)

Anti-BMP-2, Anti-VEGF, Anti-osteonectin, Anti-osteokalsin ile immünohistokimyasal olarak boyanan preparatların fotoğraflarında aynı görüntü analizi sistemi ile 0,4mm²'lik alan seçilerek bu alanlardaki pozitif boyanan hücreler işaretlenerek otomatik olarak saydırıldı.

3.6 İstatiksel yöntem

Çalışmanın verileri SPSS (Ver;16.0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Verilerimiz tablolarda aritmetik ortalama \pm standart sapma şeklinde belirtilip yanılma düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

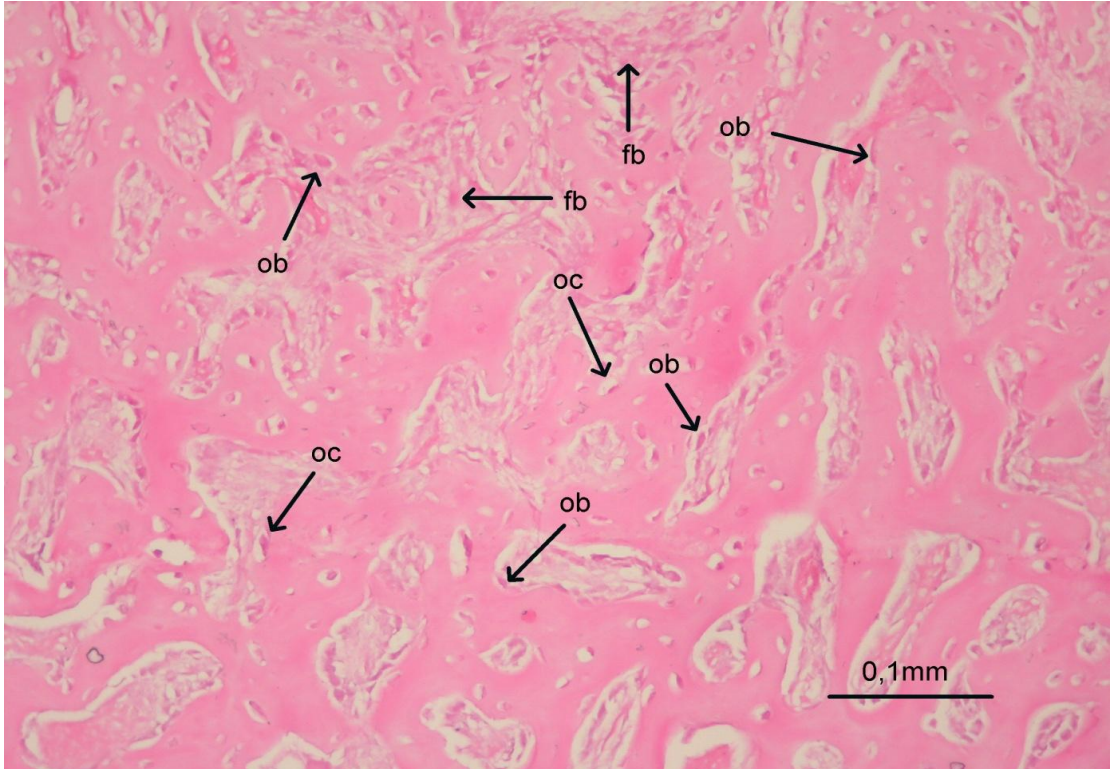
4 BULGULAR

4.1 Klinik bulgular

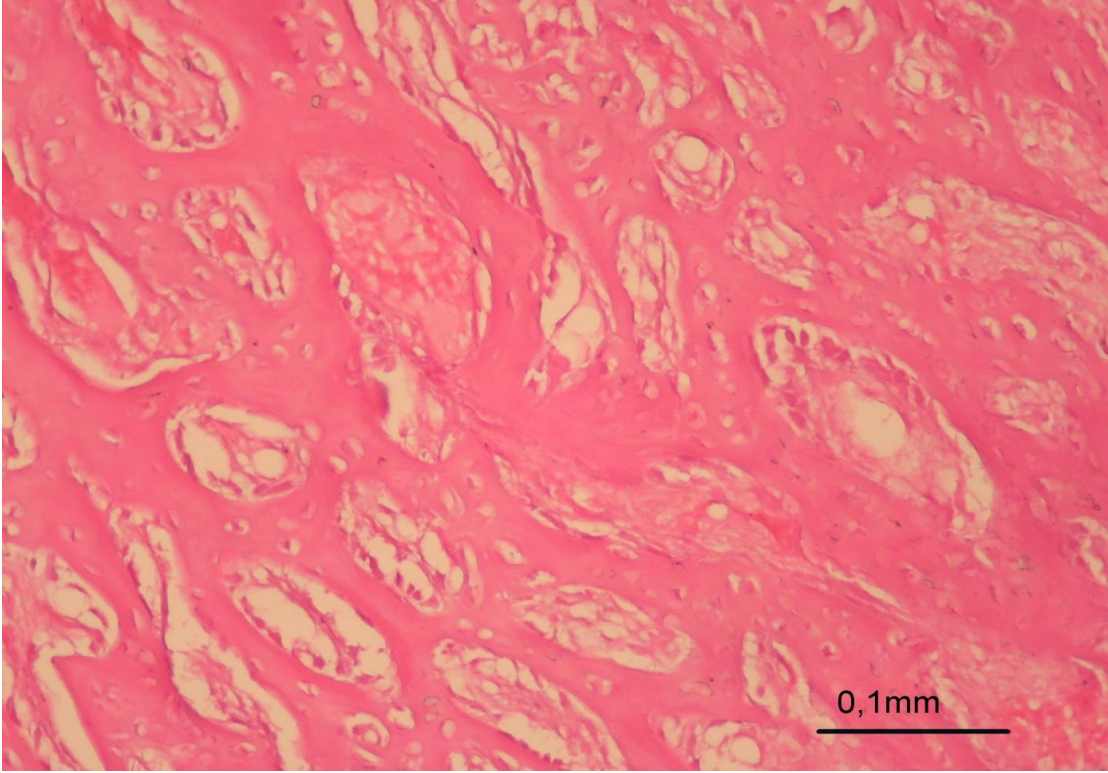
Deneysel çalışma süresince ratların uygulanan cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, operasyona bağlı herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlendi.

4.2 Histopatolojik bulgular

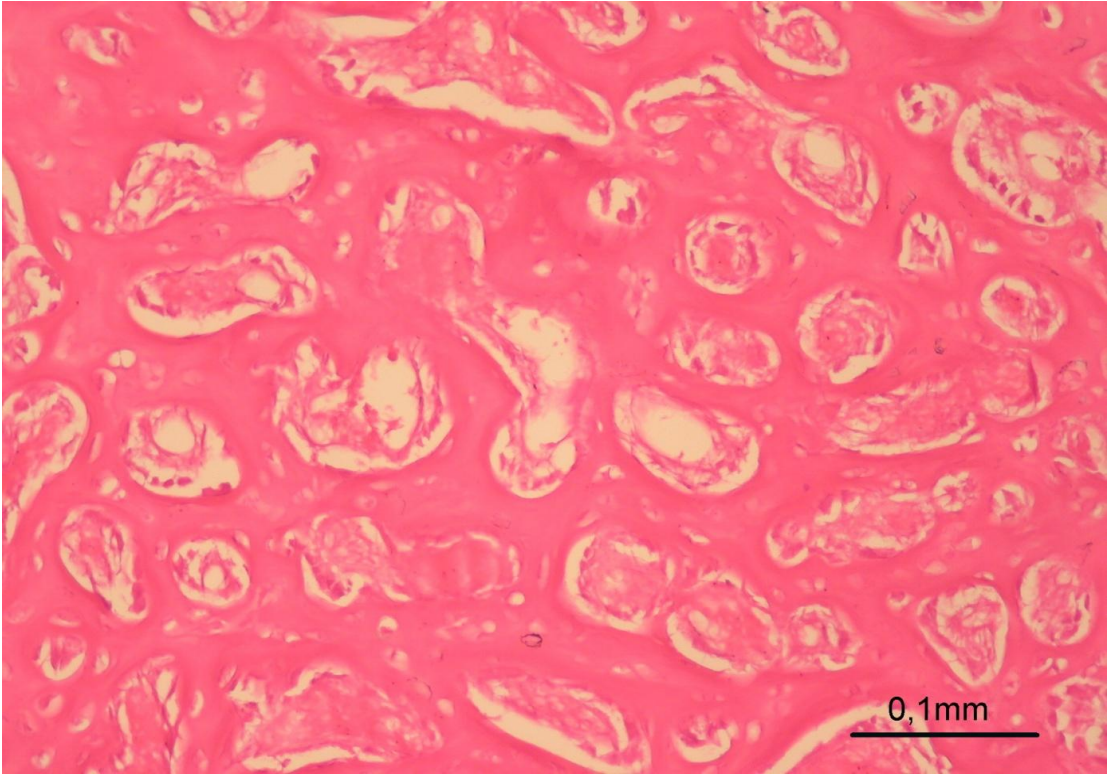
Histolojik olarak kesitlerde yeni oluşan kemik alanı, osteoblast, osteoklast ve fibroblast sayısına bakılmıştır. (Şekil 4.1)



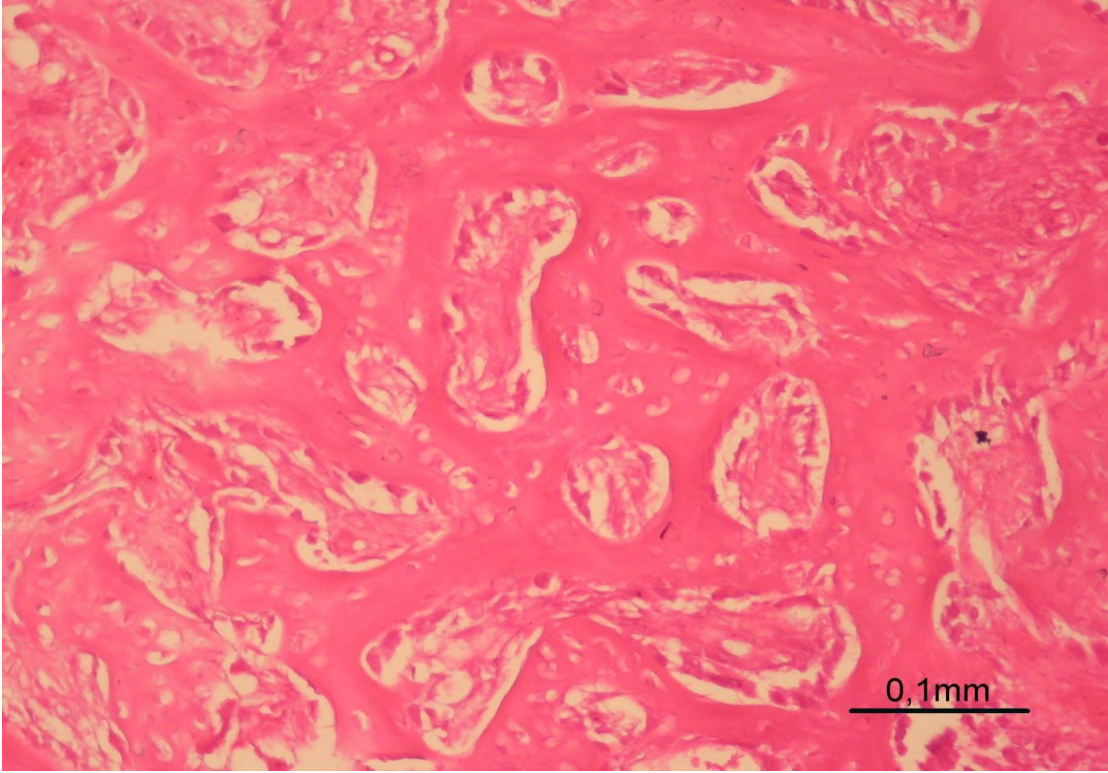
Şekil 4.1 Hematoksilen boyama ile hücrelerin gösterilmesi (ob: osteoblast, oc: osteoklast, fb: fibroblast, Boya: HE)



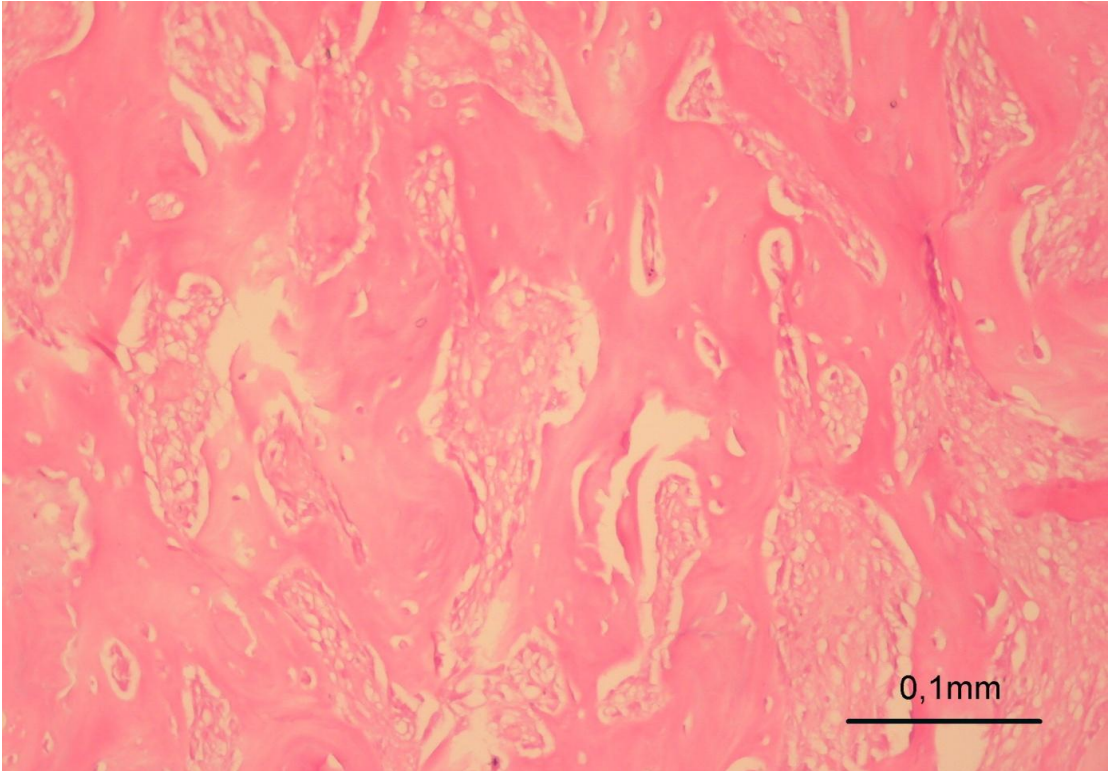
Şekil 4.2 K-7 (7. gün kontrol) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)



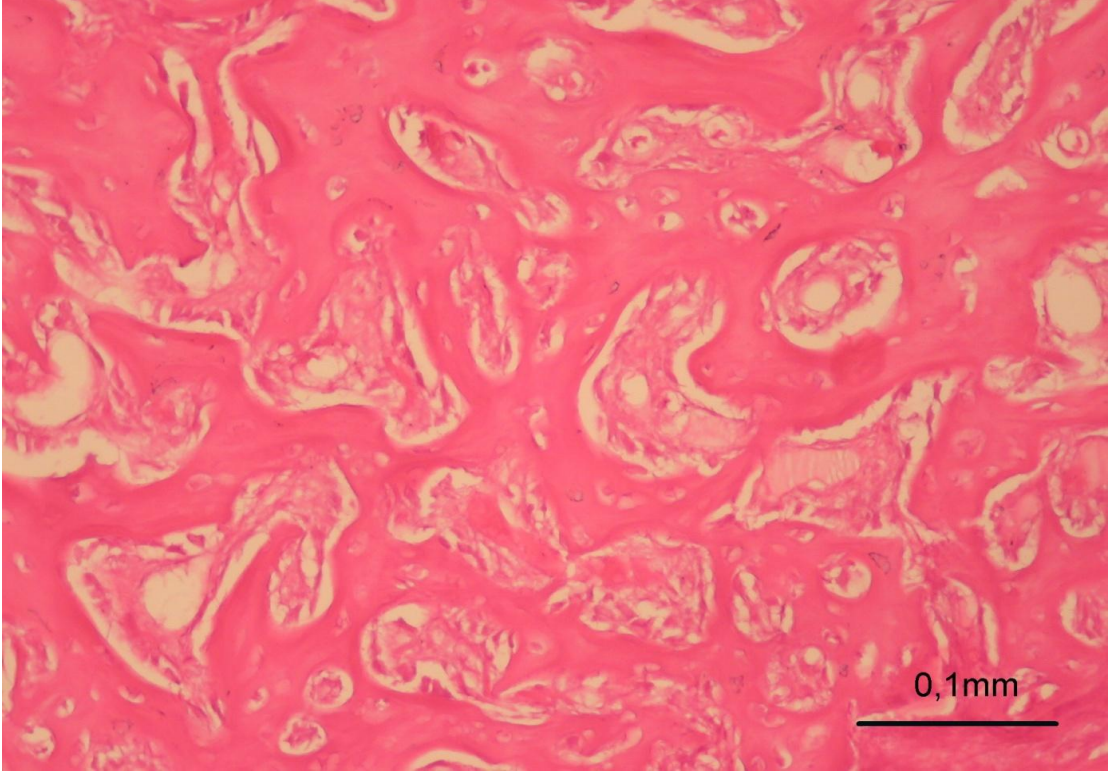
Şekil 4.3 CSE20-7 (7. gün 20mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)



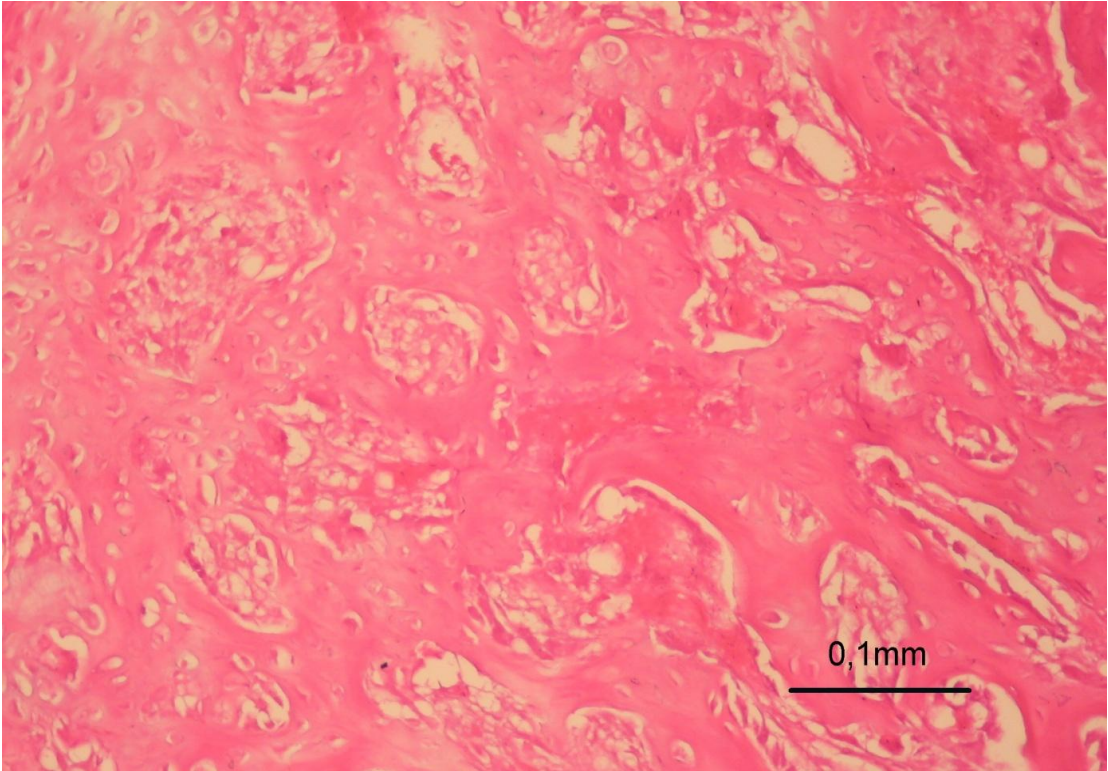
Şekil 4.4 CSE40-7 (7. gün 40mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)



Şekil 4.5 K-28 (28. gün kontrol) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)



Şekil 4.6 CSE20-28 (28. gün 20mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)

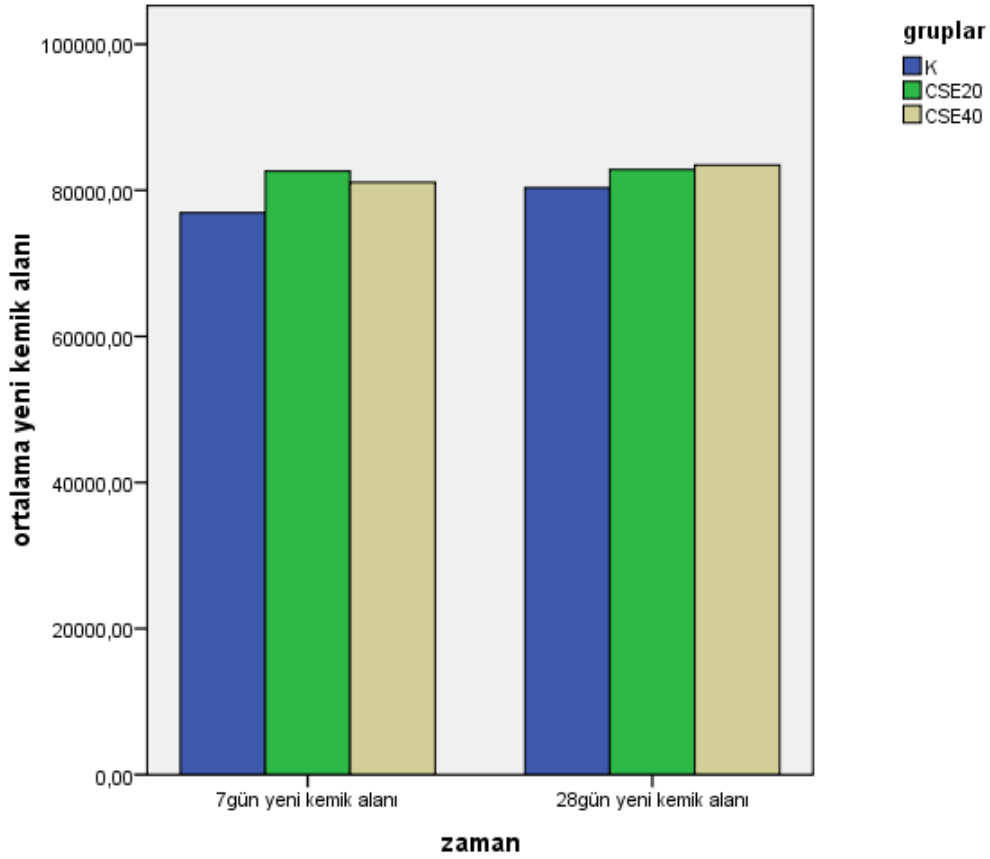


Şekil 4.7 CSE40-28 (28. gün 40mg/kg CSE) grubuna ait histolojik görüntü (Boya: HE)

4.2.1 Yeni kemik alanlarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki yeni kemik alanları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

Gruplara ait 28. gündeki yeni kemik alanları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

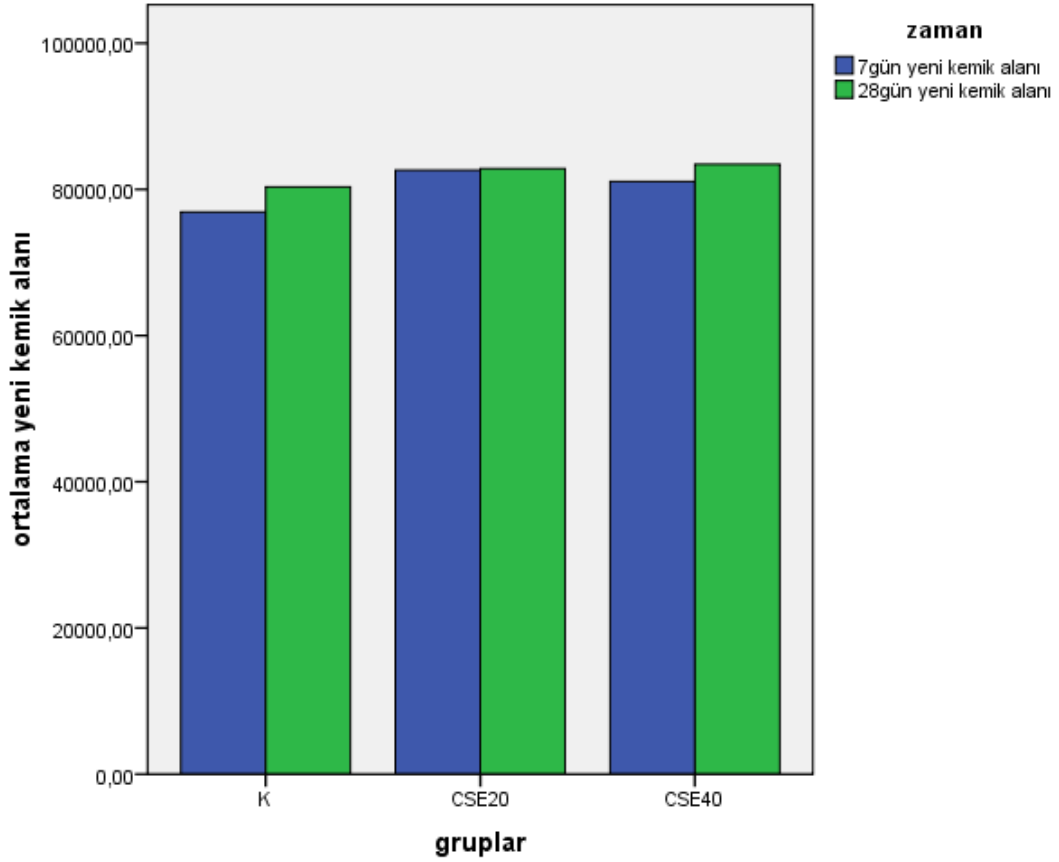


Şekil 4.8 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama yeni kemik alanı değerlerinin dağılımı

K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında yeni kemik alanı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında yeni kemik alanı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında yeni kemik alanı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)



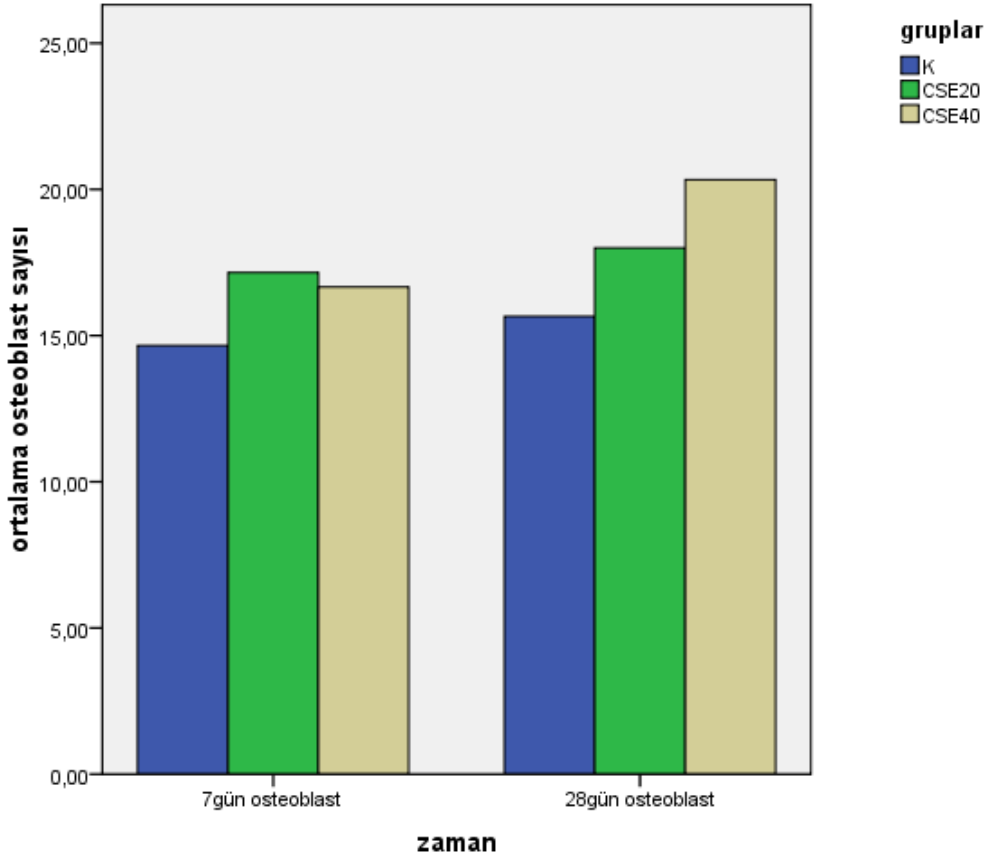
Şekil 4.9 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama yeni kemik alanı değerlerinin dağılımı

4.2.2 Osteoblast sayılarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki osteoblast sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

Gruplara ait 28. gündeki osteoblast sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$)

Buna göre gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K-28 ile CSE40-28 grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, ($p<0,05$) diğer gruplar arasındaki fark önemsizdir. ($p>0,05$) Elde edilen sonuca göre osteoblast hücre sayısında CSE40-28 grubunda K-28 grubuna göre artış olduğu görülmüştür.

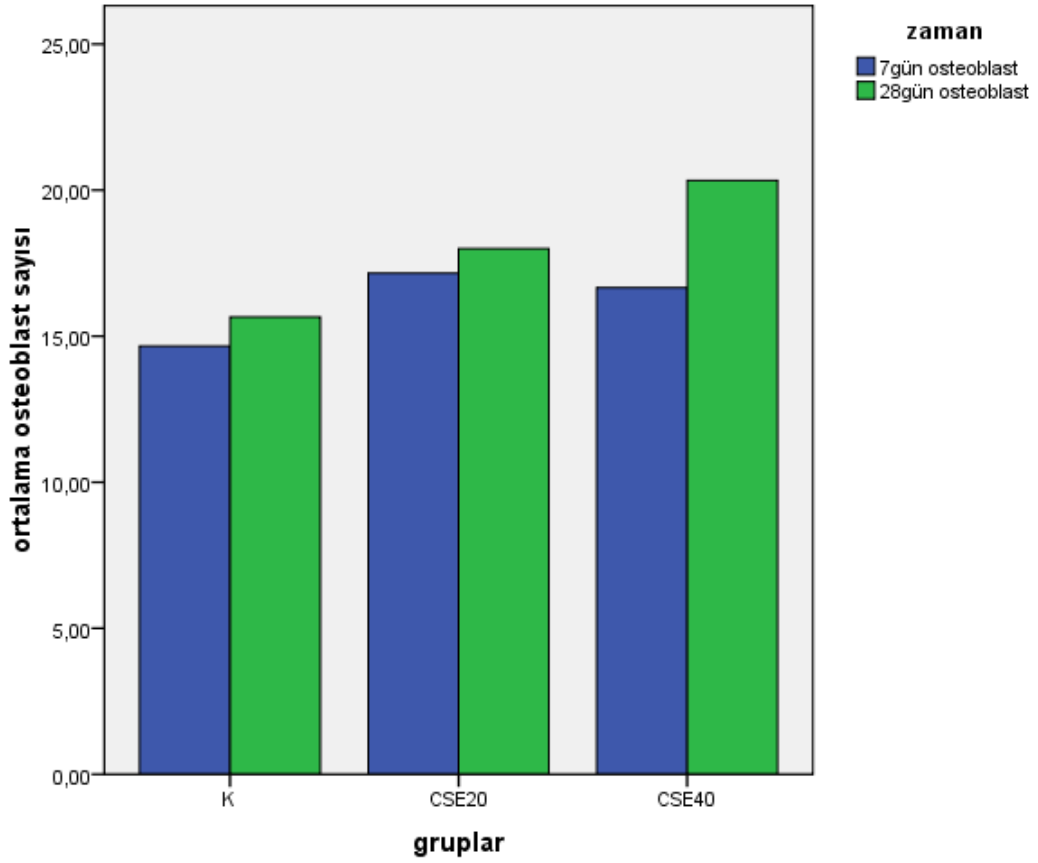


Şekil 4.10 gruplara ait 7. ve 28. günlerdeki osteoblast değerlerinin dağılımı

K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında osteoblast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında osteoblast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında osteoblast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0.05$) Buna göre osteoblast sayısının 28. günde 7. güne göre daha fazla arttığı görüldü.

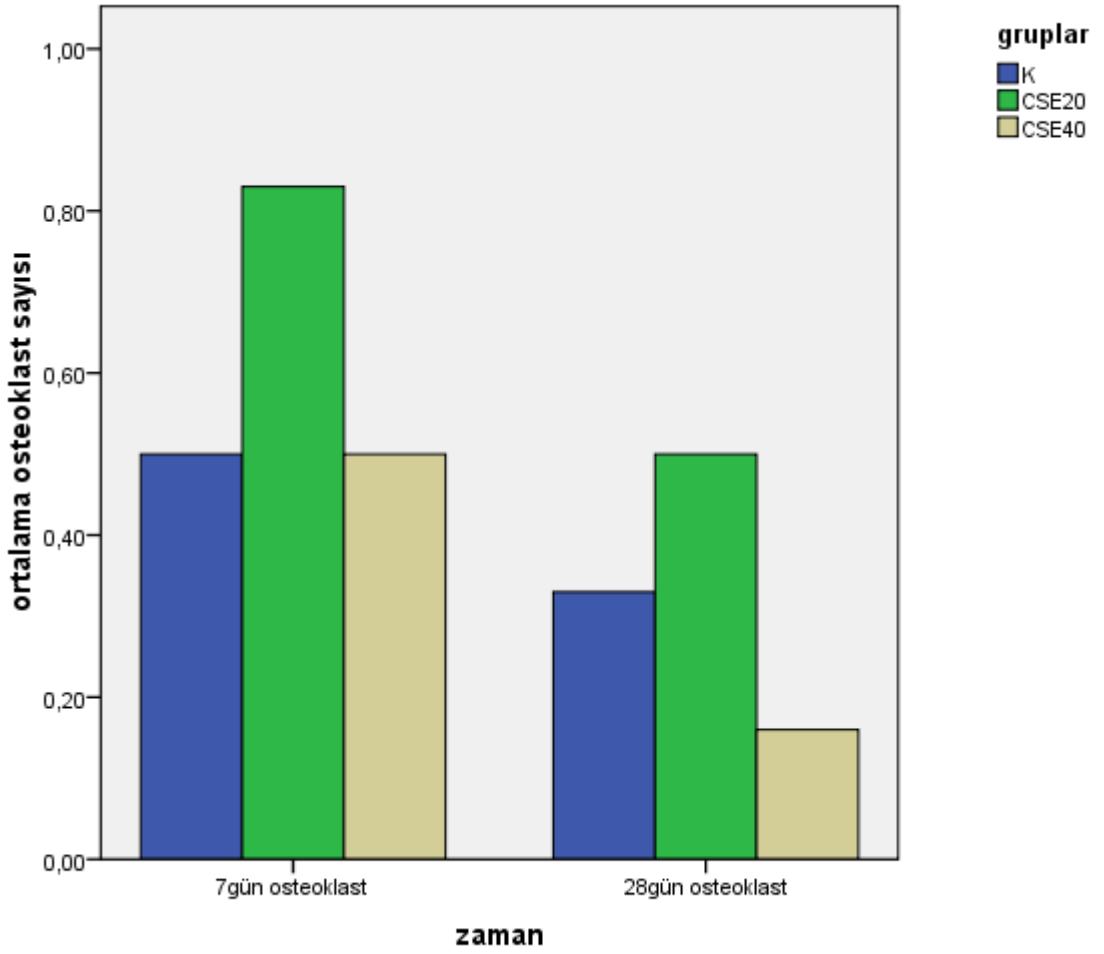


Şekil 4.11 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama osteoblast değerlerinin karşılaştırılması

4.2.3 Osteoklast sayılarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki osteoklast sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

Gruplara ait 28. gündeki osteoklast sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

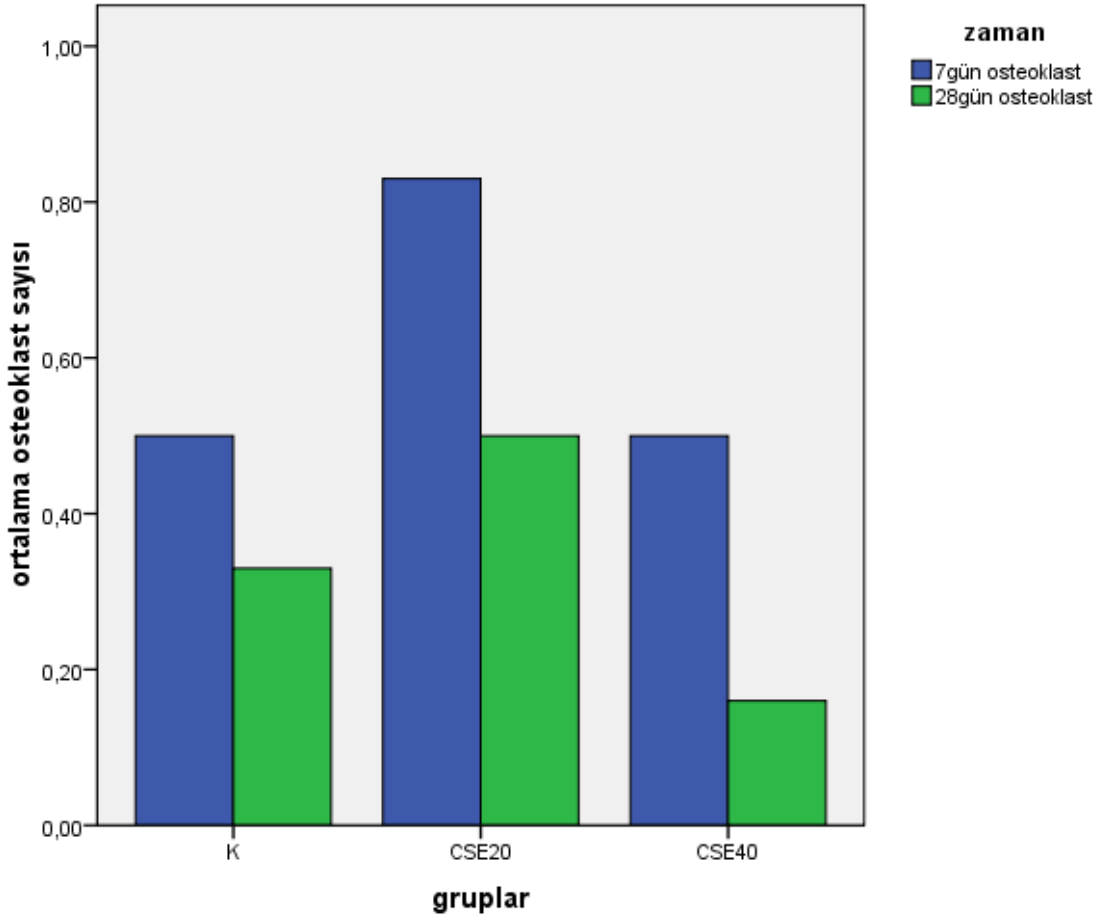


Şekil 4.12 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama osteoklast değerlerinin dağılımı

K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında osteoklast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında osteoklast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında osteoklast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

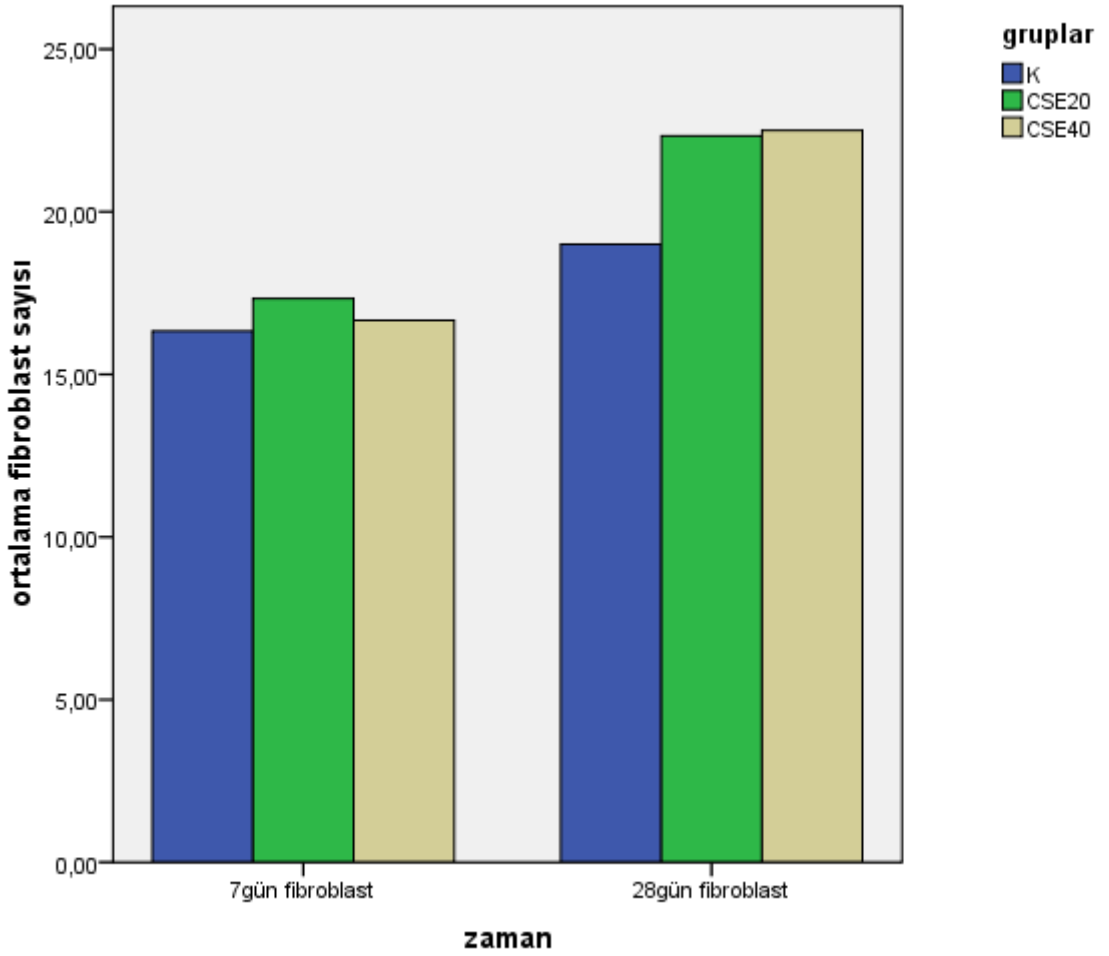


Şekil 4.13 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama osteoklast değerlerinin karşılaştırılması

4.2.4 Fibroblast sayılarının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki fibroblast sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

Gruplara ait 28. gündeki fibroblast sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p>0,05$)

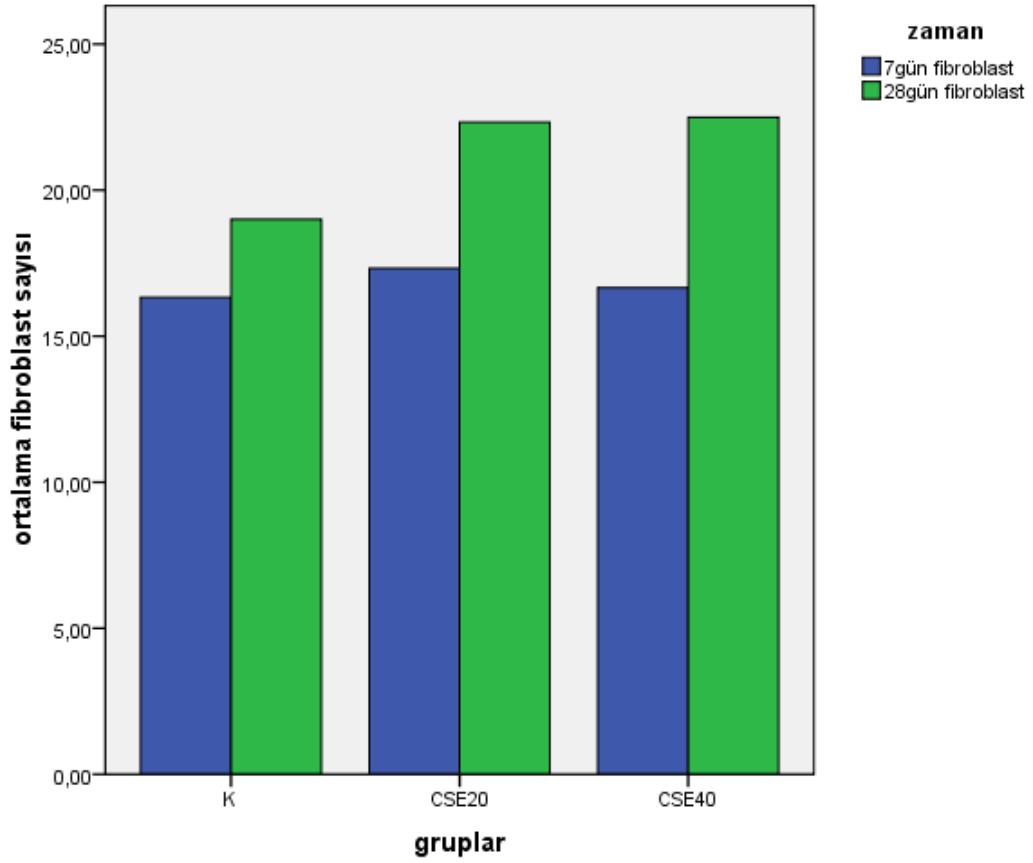


Şekil 4.14 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama fibroblast değerlerinin dağılımı

K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında fibroblast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında fibroblast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0.05$) Buna göre fibroblast sayısının 28. günde 7. güne göre daha fazla arttığı görüldü.

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında fibroblast sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. ($p<0.05$) Görüldüğü gibi bu değerinde 28. günde bir artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.15 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama fibroblast değerlerinin karşılaştırılması

Çizelge 4.1 Üç grupta 7. güne ait ölçümlerin karşılaştırılması

| Gruplar | Yeni kemik alanı (μm^2) 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Osteoblast sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Osteoklast sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Fibroblast sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ |
|---------|---|--|--|--|
| K | 76923,74 \pm 5116,35 | 14,66 \pm 2,25 | 0,50 \pm 0,54 | 16,33 \pm 1,86 |
| CSE20 | 82634,83 \pm 3643,30 | 17,16 \pm 2,31 | 0,83 \pm 0,40 | 17,33 \pm 2,80 |
| CSE40 | 81079,01 \pm 5268,43 | 16,66 \pm 2,16 | 0,50 \pm 0,54 | 16,66 \pm 1,86 |
| Sonuç | KW:3,66 P:0,160 | KW:3,40 P:0,183 | KW:1,76 P:0,413 | KW:0,30 P:0,861 |

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

Çizelge 4.2 Üç grupta 28. güne ait ölçümlerin karşılaştırılması

| Gruplar | Yeni kemik alanı (μm^2) 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Osteoblast sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Osteoklast sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Fibroblast sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ |
|---------|--|---|---|---|
| K | 80331,96 \pm 6889,57 | 15,66 \pm 2,25 | 0,33 \pm 0,51 | 19,00 \pm 4,00 |
| CSE20 | 82836,96 \pm 3337,83 | 18,00 \pm 3,84 | 0,50 \pm 0,54 | 22,33 \pm 3,93 |
| CSE40 | 83442,78 \pm 4861,55 | 20,33 \pm 3,14 | 0,16 \pm 0,40 | 22,50 \pm 2,66 |
| Sonuç | KW:0,88 P:0,643 | KW:6,14 P:0,046* | KW:1,41 P:0,492 | KW:2,73 P:0,255 |

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

Çizelge 4.3 Kontrol grubuna ait histolojik ölçümlerin karşılaştırılması

| | 7.gün | 28.gün | Sonuç |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------|---------|
| Yeni kemik alanı (μm^2) | 76923,74 \pm 5116,35 | 80331,96 \pm 6889,57 | P:0,522 |
| Osteoblast sayısı | 14,66 \pm 2,25 | 15,66 \pm 2,25 | P:0,622 |
| Osteoklast sayısı | 0,50 \pm 0,54 | 0,33 \pm 0,51 | P:0,575 |
| Fibroblast sayısı | 16,33 \pm 1,86 | 19,00 \pm 4,00 | P:0,224 |

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

Çizelge 4.4 20 mg/kg oranında *Capparis spinosa* Ekstresi verilen gruplara ait histolojik ölçümlerin karşılaştırılması

| | 7.gün | 28.gün | Sonuç |
|--------------------------------------|------------------------|------------------------|----------|
| Yeni kemik alanı (μm^2) | 82634,83 \pm 3643,30 | 82836,96 \pm 3337,83 | P:0,631 |
| Osteoblast sayısı | 17,16 \pm 2,31 | 18,00 \pm 3,84 | P:0,809 |
| Osteoklast sayısı | 0,83 \pm 0,40 | 0,50 \pm 0,54 | P:0,241 |
| Fibroblast sayısı | 17,33 \pm 2,80 | 22,33 \pm 3,93 | P:0,042* |

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

Çizelge 4.5 40 mg/kg oranında *Capparis spinosa* Ekstresi verilen gruplara ait histolojik ölçümlerin karşılaştırılması

| | 7.gün | 28.gün | Sonuç |
|--------------------------------------|------------------|------------------|----------|
| Yeni kemik alanı (μm^2) | 81079,01±5268,43 | 83442,78±4861,55 | P:0,200 |
| Osteoblast sayısı | 16,66±2,16 | 20,33±3,14 | P:0,043* |
| Osteoklast sayısı | 0,50±0,54 | 0,16±0,40 | P:0,241 |
| Fibroblast sayısı | 16,66±1,86 | 22,50±2,66 | P:0,005* |

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

4.3 İmmunohistokimyasal bulgular

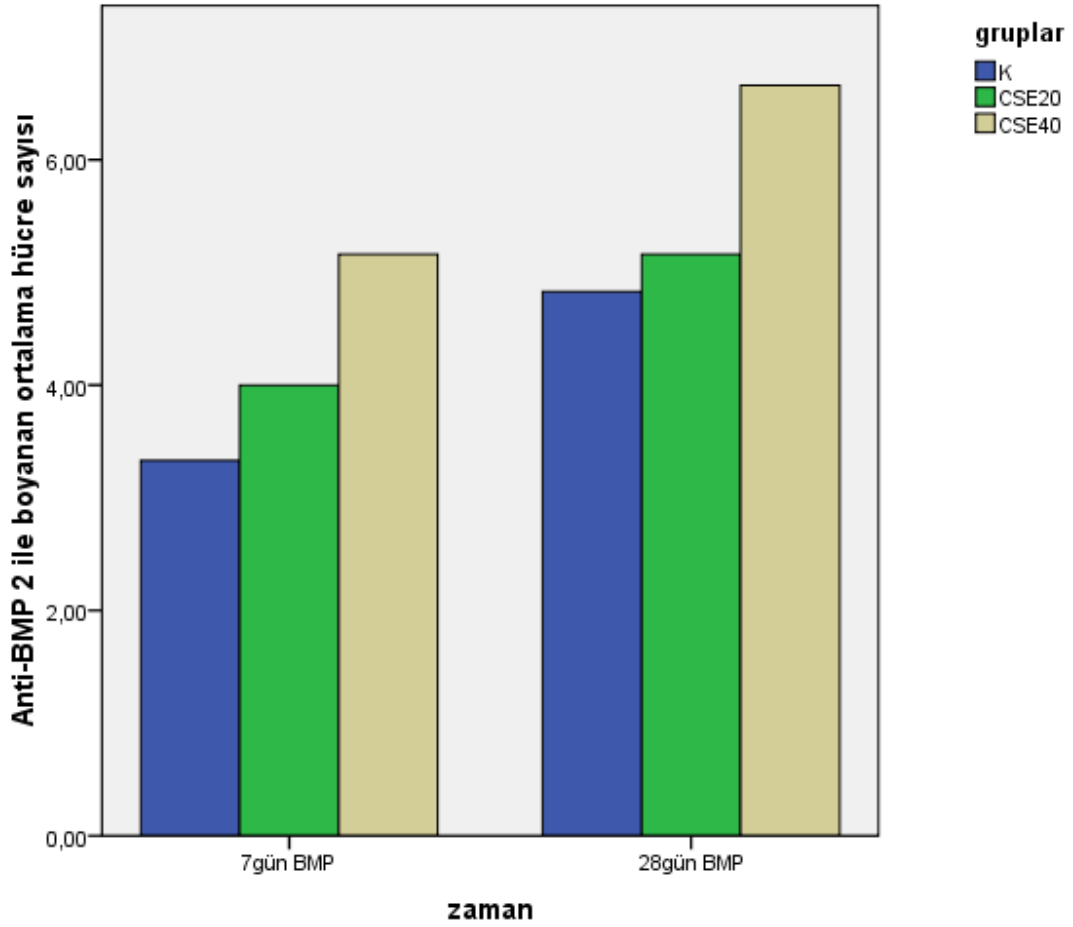
İmmunohistokimyasal olarak kesitlerde BMP-2, VEGF, Osteonektin ve Osteokalsin antikoru ile boyanan hücre sayısı 0,4 mm² lik alanda immünohistokimyasal olarak pozitif ekspresyon gösteren hücreler işaretlenerek görüntü analizi programı ile otomatik olarak saydırılmıştır.

4.3.1 Anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki BMP-2 antikoru ile pozitif boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Buna göre gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K-7 ile CSE40-7 grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, (p<0,05) diğer gruplar arasındaki fark önemsizdir. (p>0,05) Elde edilen sonuca göre anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısı CSE40-7 grubunda K-7 grubuna göre artış göstermiştir.

Gruplara ait 28. gündeki BMP-2 antikoru ile pozitif boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. (p>0,05)

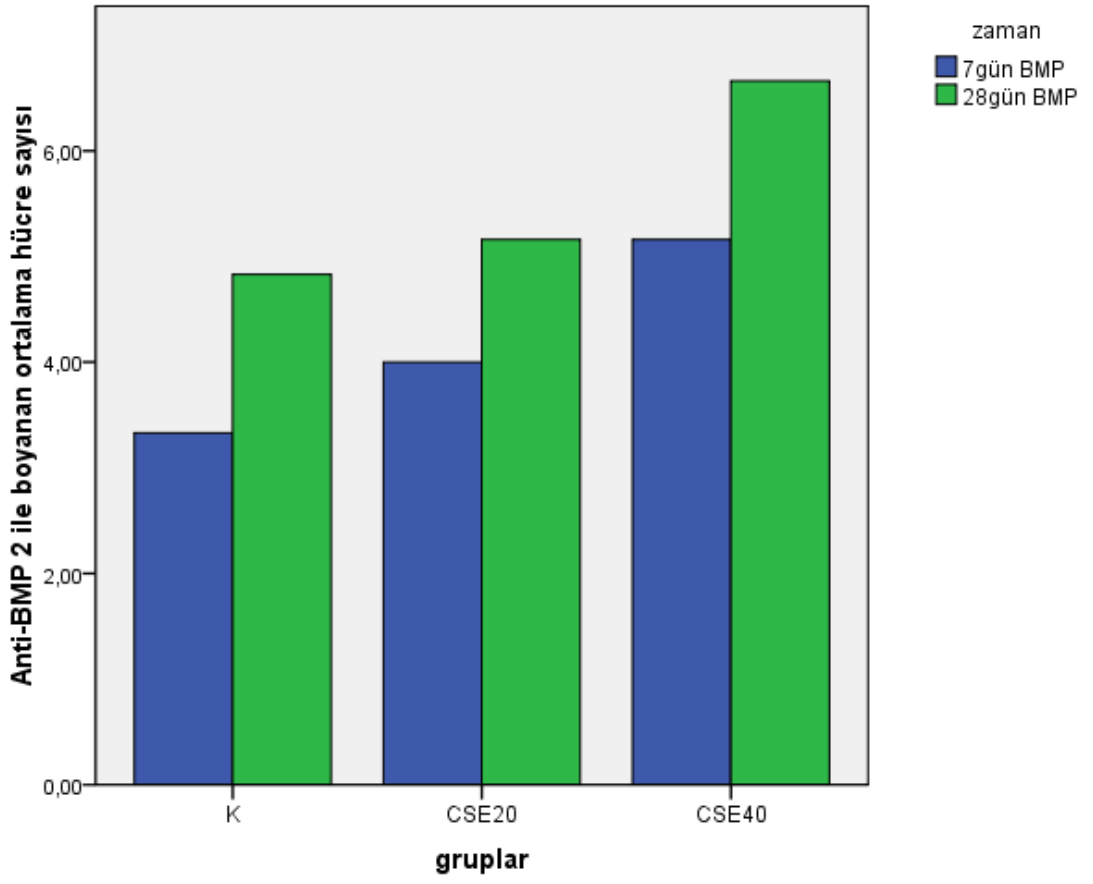


Şekil 4.16 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-BMP 2 ile boyanan hücre sayısının dağılımı

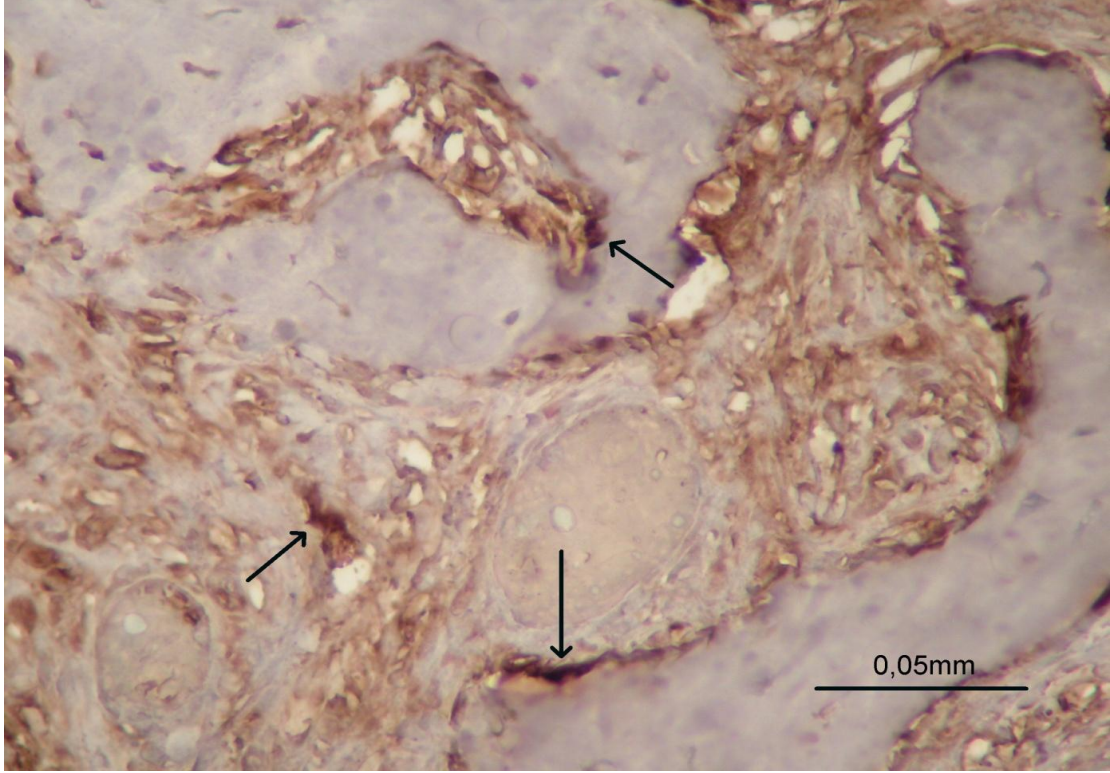
K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0.05$) Görüldüğü gibi bu değerde 28.günde bir artış olduğu saptanmıştır.

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p > 0.05$)

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-BMP-2 ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p > 0,05$)



Şekil 4.17 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-BMP 2 ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması



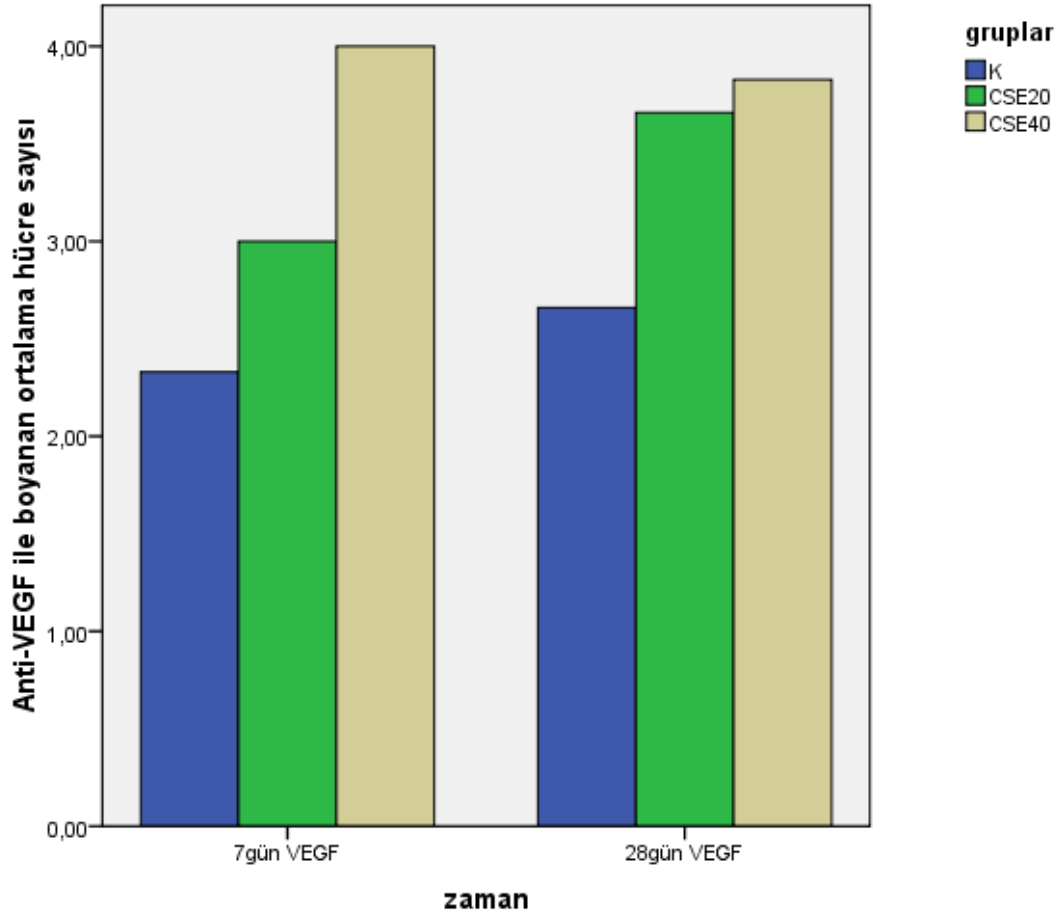
Şekil 4.18 Anti-BMP-2 boyama ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Monoklonal Antihuman Pro-BMP-2 Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler)

4.3.2 Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki VEGF antikoruna ile pozitif boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Buna göre gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K-7 ile CSE40-7 grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, ($p < 0,05$) diğer gruplar arasındaki fark önemsizdir. ($p > 0,05$) Elde edilen sonuca göre anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı CSE40-7 grubunda K-7 grubuna göre bir artış göstermiştir.

Gruplara ait 28. gündeki boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p > 0,05$)

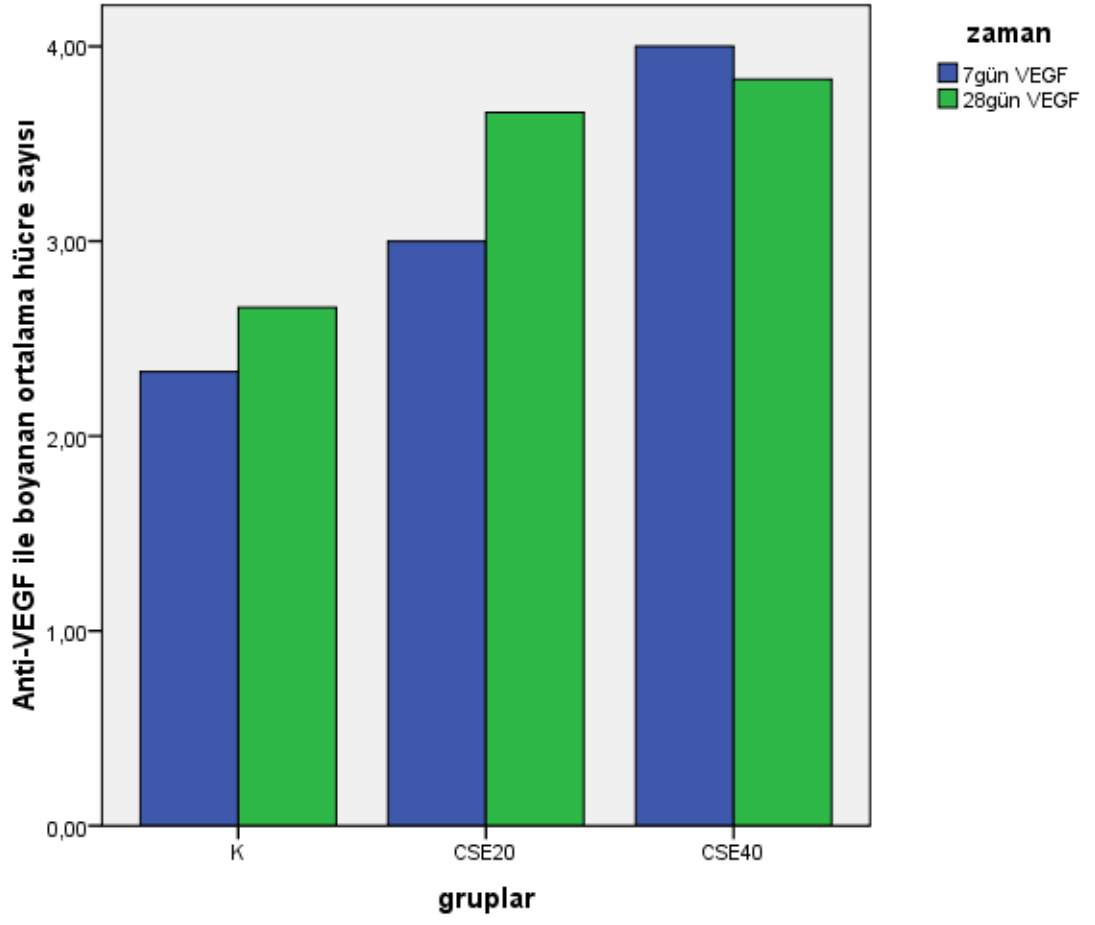


Şekil 4.19 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-VEGF ile boyanan hücre sayılarının dağılımı

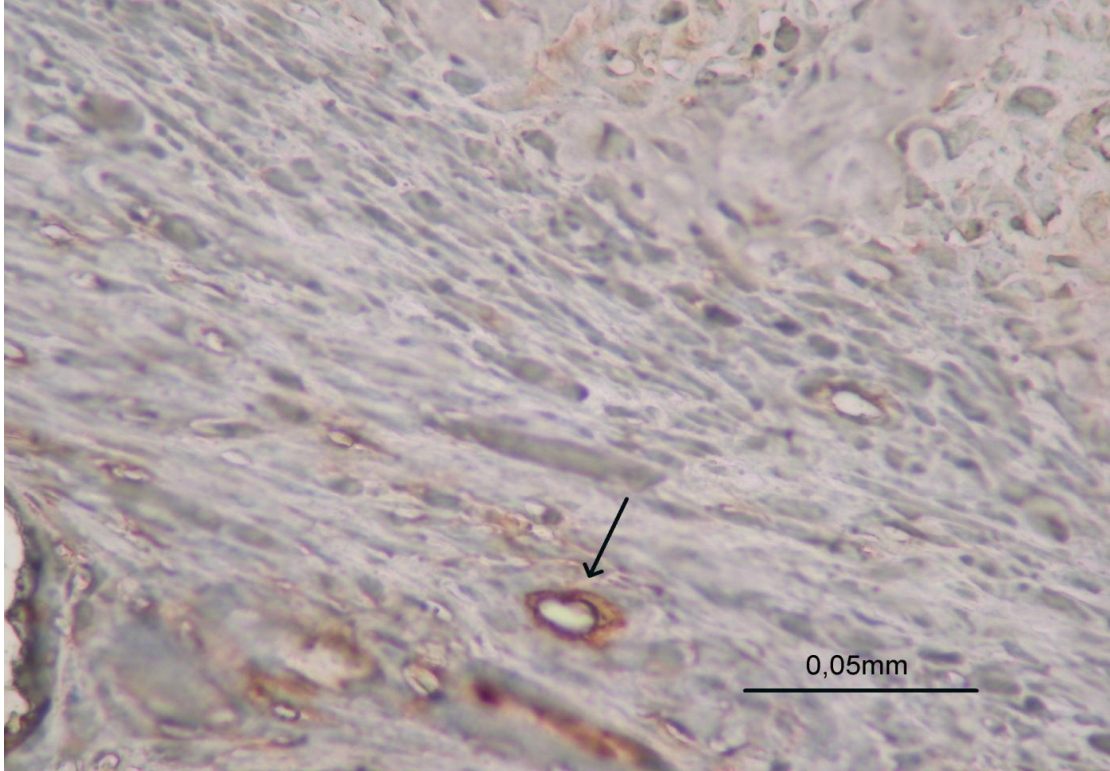
K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0,05$)



Şekil 4.20 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti- VEGF ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması



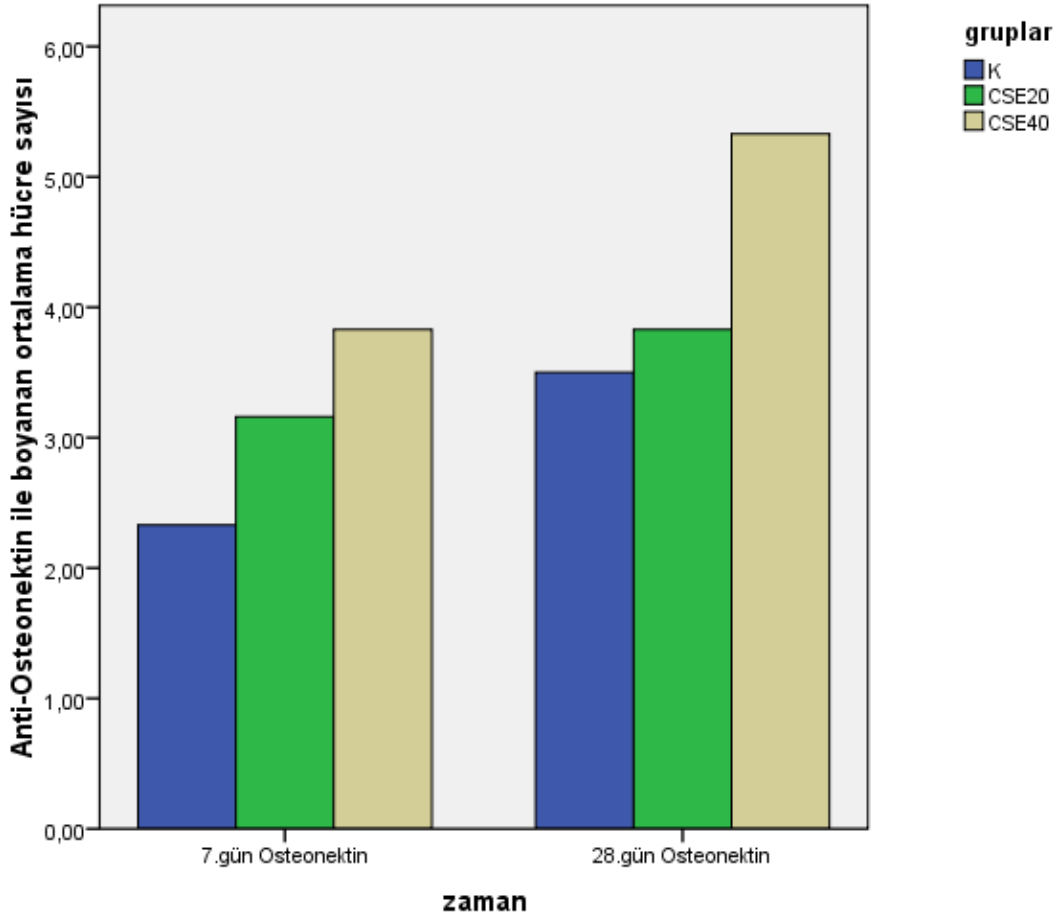
Şekil 4.21 Anti- VEGF ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Anti-human VEGF Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler)

4.3.3 Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi

Gruplara ait 7. gündeki Anti-Osteonektin ile pozitif boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Buna göre gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K-7 ile CSE40-7 grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, ($p < 0,05$) diğer gruplar arasındaki fark önemsizdir. ($p > 0,05$) Elde edilen sonuca göre Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısında CSE40-7 grubunda K-7 grubuna göre artış olduğu görülmüştür.

Gruplara ait 28. gündeki boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. ($p > 0,05$)

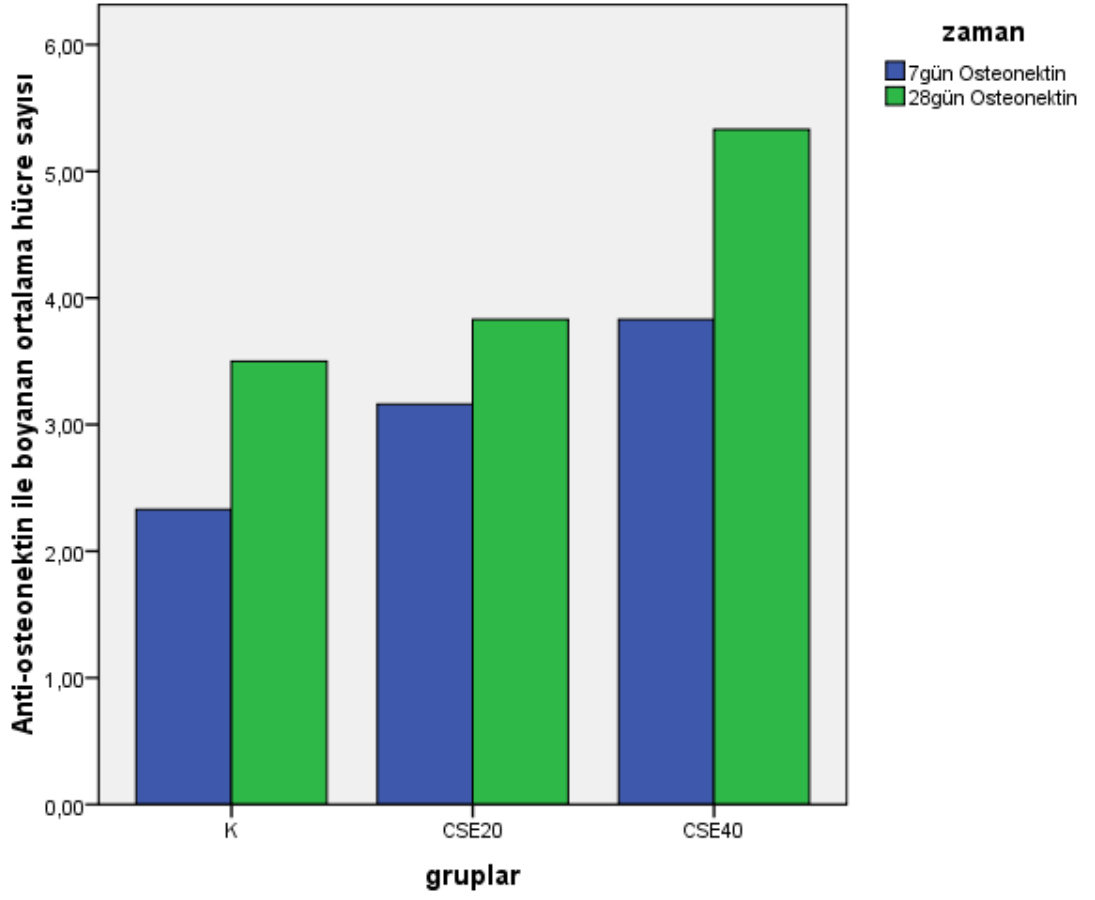


Şekil 4.22 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayılarının dağılımı

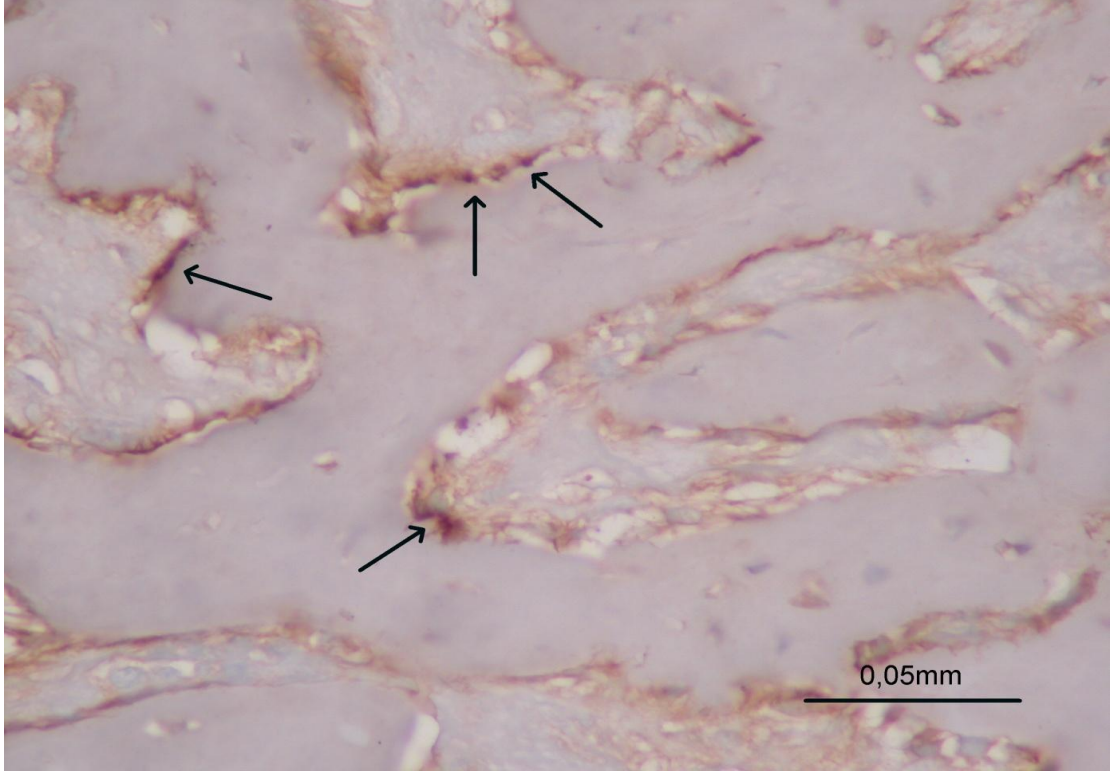
K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0.05$)

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı yönünden gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p<0.05$) Görüldüğü gibi bu değerde 28. günde bir artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.23 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.24 Anti-Osteonektin ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Anti-human Osteonectin Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler)

4.3.4 Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısının değerlendirilmesi

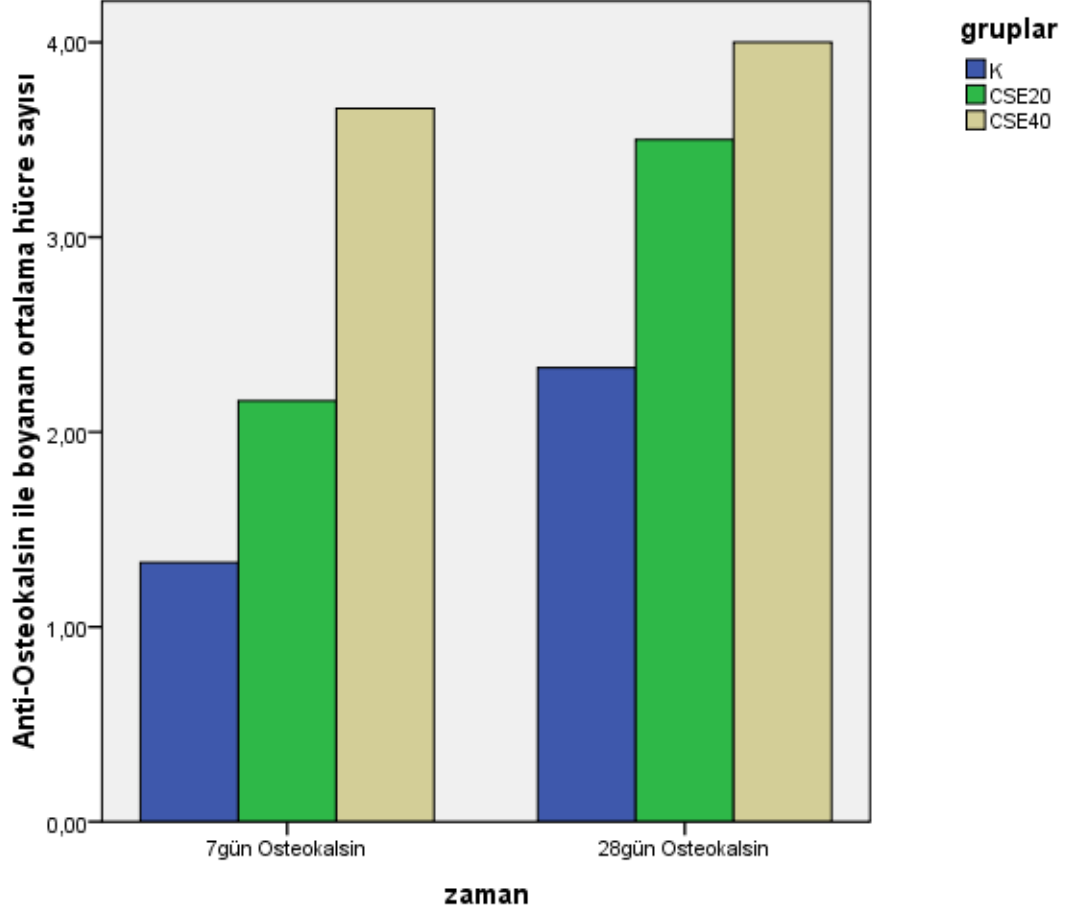
Gruplara ait 7. gündeki Anti-Osteokalsin ile pozitif boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Buna göre gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K-7 ile CSE40-7 arasında ve CSE20-7 ile CSE40-7 arasındaki farklılık önemli bulunurken, ($p < 0,05$) diğer gruplar arasındaki fark önemsizdir. ($p > 0,05$) Elde edilen sonuca göre Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı CSE40-7 grubunda diğer iki gruba (K-7, CSE20-7) göre artış görülmüştür.

Gruplara ait 28. gündeki Anti-Osteokalsin ile pozitif boyanan hücre sayıları, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$)

Buna göre gruplara ait değerler ikişerli olarak karşılaştırıldığında K-28 ile CSE40-28 grupları arasındaki farklılık önemli bulunurken, ($p < 0,05$) diğer gruplar

arasındaki fark önemsizdir. Elde edilen sonuca göre Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı CSE40-28 grubunda K-28'e göre artış olduğu görülmüştür.

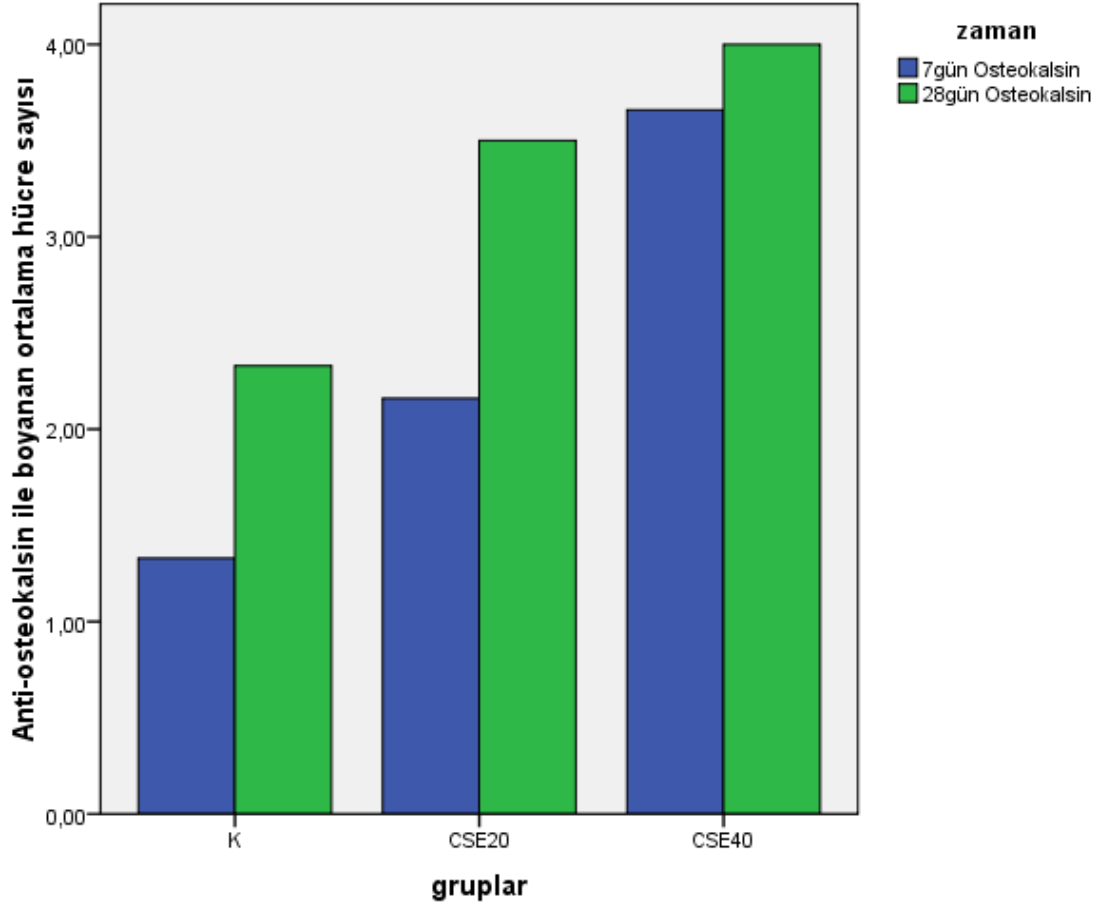


Şekil 4.25 Gruplara ait 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayılarının dağılımı

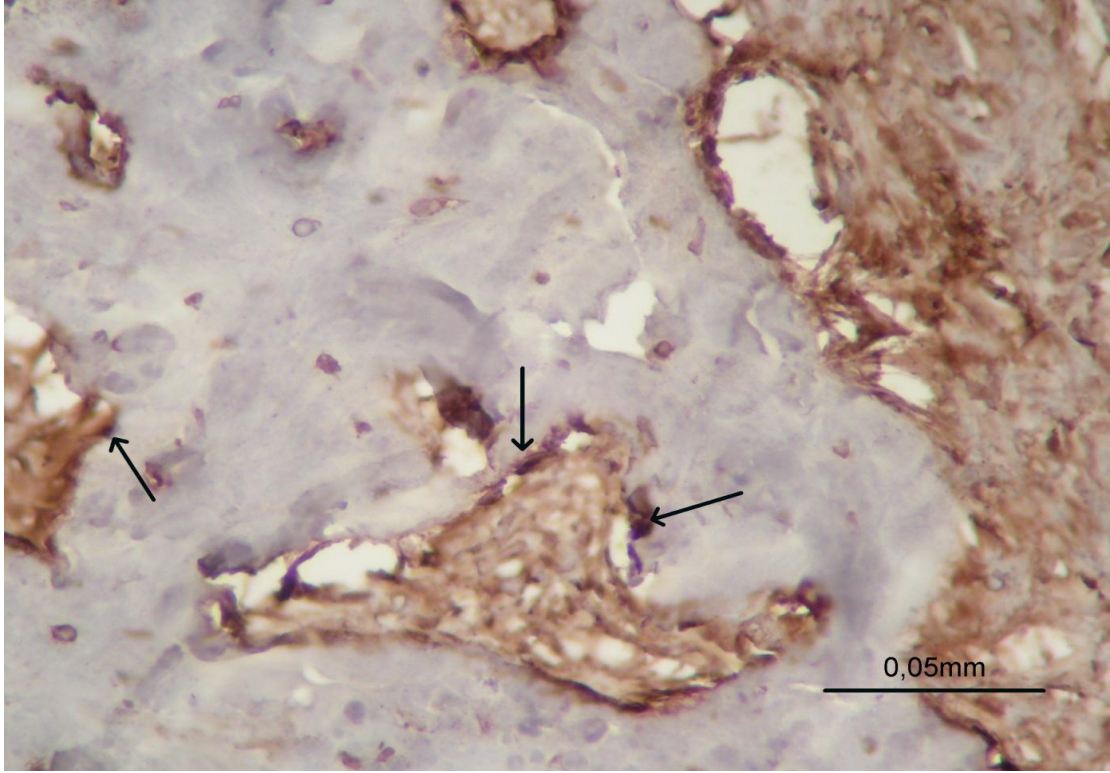
K grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0.05$) Görüldüğü gibi bu değerde 28. günde bir artış olduğu saptanmıştır.

CSE20 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. ($p < 0.05$) Görüldüğü gibi bu değerde 28. günde bir artış olduğu saptanmıştır.

CSE40 grubunda 7. ve 28. günlere ait ölçümler karşılaştırıldığında Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulundu. ($p>0,05$)



Şekil 4.26 Her grubun 7. ve 28. gündeki ortalama Anti-osteokalsin ile boyanan hücre sayılarının karşılaştırılması



Şekil 4.27 Anti-Osteokalsin ile boyanan hücrelerin gösterilmesi (Anti-human Osteocalcin Antibody ile pozitif ekspresyon gösteren hücreler)

Çizelge 4.6 Her üç grupta 7. güne ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması

| Gruplar | Anti-BMP2 ile boyanan hücre sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı 7.gün $\bar{X} \pm Ss$ |
|---------|--|--|---|---|
| K | 3,33±0,51 | 2,33±0,51 | 2,33±0,51 | 1,33±0,51 |
| CSE20 | 4,00±0,89 | 3,00±0,89 | 3,16±1,16 | 2,16±0,75 |
| CSE40 | 5,16±1,16 | 4,00±0,89 | 3,83±1,16 | 3,66±1,21 |
| Sonuç | KW:7,12 P:0,028* | KW:8,01 P:0,018* | KW:6,31 P:0,043* | KW:10,39 P:0,006* |

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

Çizelge 4.7 Her üç grupta 28. güne ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması

| Gruplar | Anti-BMP2 ile boyanan hücre sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ | Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı 28.gün $\bar{X} \pm Ss$ |
|---------|--|--|--|---|
| K | 4,83±1,16 | 2,66±0,51 | 3,50±1,37 | 2,33±0,51 |
| CSE20 | 5,16±1,47 | 3,66±1,21 | 3,83±1,60 | 3,50±1,04 |
| CSE40 | 6,66±1,86 | 3,83±0,98 | 5,33±1,36 | 4,00±0,89 |
| Sonuç | KW:3,65 P:0,161 | KW:4,61 P:0,099 | KW:4,64 P:0,098 | KW:8,02 P:0,018* |

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

Çizelge 4.8 Kontrol grubuna ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması

| | 7.gün | 28.gün | Sonuç |
|---|-----------|-----------|----------|
| Anti-BMP2 ile boyanan hücre sayısı | 3,33±0,51 | 4,83±1,16 | P:0,011* |
| Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı | 2,33±0,51 | 2,66±0,51 | P:0,269 |
| Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı | 2,33±0,51 | 3,50±1,37 | P:0,058 |
| Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı | 1,33±0,51 | 2,33±0,51 | P:0,014* |

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

Çizelge 4.9 20 mg/kg oranında *Capparis spinosa* Ekstresi verilen gruplara ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması

| | 7.gün | 28.gün | Sonuç |
|---|-----------|-----------|----------|
| Anti-BMP2 ile boyanan hücre sayısı | 4,00±0,89 | 5,16±1,47 | P:0,140 |
| Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı | 3,00±0,89 | 3,66±1,21 | P:0,320 |
| Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı | 3,16±1,16 | 3,83±1,60 | P:0,458 |
| Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı | 2,16±0,75 | 3,50±1,04 | P:0,038* |

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

Çizelge 4.10 40 mg/kg oranında *Capparis spinosa* Ekstresi verilen gruplara ait immünohistokimyasal ölçümlerin karşılaştırılması

| | 7.gün | 28.gün | Sonuç |
|---|-----------|-----------|----------|
| Anti-BMP2 ile boyanan hücre sayısı | 5,16±1,16 | 6,66±1,86 | P:0,143 |
| Anti-VEGF ile boyanan hücre sayısı | 4,00±0,89 | 3,83±0,98 | P:0,733 |
| Anti-Osteonektin ile boyanan hücre sayısı | 3,83±1,16 | 5,33±1,36 | P:0,048* |
| Anti-Osteokalsin ile boyanan hücre sayısı | 3,66±1,21 | 4,00±0,89 | P:0,616 |

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

5 TARTIŞMA

Kemik, yetişkin iskeletin en önemli yapı taşını oluşturmaktadır. Vücutta yumuşak dokuları destekler, kafatası ve göğüs boşluklarında yer alan yaşamsal organları korur; kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğine de yataklık eder. Ayrıca kalsiyum, fosfat ve diğer iyonların vücut sıvılarındaki konsantrasyonlarını sabit düzeyde tutabilmek için, bu önemli iyonların kontrollü olarak salıverilmelerini ya da depolanabilmelerini sağlamaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kemik dokusu, mineralize yapısı olan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemiğin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde gözenekli yapısı, mineral içeriği ve kollajen dokusu önemli yer tutar. Oldukça sert ve dayanıklı bir yapıya sahip olan kemik dokusunun % 70'i inorganik, % 30'u organik yapıdadır. Organik kısım çoğunlukla Tip I kollajenden (%90) ve non-kollajenden (%10) oluşmaktadır. Non kollajen kısımda osteonektin, osteokalsin, osteopontin, kemik sialoproteini, büyüme faktörleri, sitokinler, proteoglikanlar, fosfoproteinler ve fosfolipidler yer alır. İnorganik kısmının çoğunluğunu kalsiyum ve fosfat oluşturmakla birlikte, bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulunmaktadır (Erdoğan ve ark., 1999; Junqueira ve Carneiro, 2006; Motyckova ve ark., 2002).

Kemik dokusu temel olarak kortikal ve spongios olmak üzere iki tabakadan oluşur. Kortikal kemik çok serttir ve dış kuvvetlere dayanıklıdır. Spongios kemik ise daha yumuşaktır, gelen streslere dayanıklıdır ve kemik iliğini içerisinde barındırır (Junqueira ve Carneiro, 2006; Tekelioğlu, 1993). Kemiğin mikroskopik incelemesinde ise iki farklı kemik tipi olduğu görülmüştür. Primer, olgunlaşmamış veya kaba lifli kemik (woven bone) ve sekonder olgun veya lameller kemiktir. Primer kemik, embriyolojik gelişim sürecinde, kırık ve diğer onarımlarda ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Sekonder kemik, lameller halinde organize olmuş kollajen lif dağılımı gösterirken primer kemik ise rastgele ve değişik yönlere dağılmış ince kollajen lifleri ile bilinmektedir. Bütün kemikler iç yüzeylerde endosteum ve dış yüzeylerde de periosteum adı verilen osteojenik hücrelere sahip zarlar ile örtülüdür (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Kemik hücreleri; osteoblast, osteoklast, osteosit ve osteoprogenitör hücrelerden oluşmaktadır. Osteoblastlar, kemik iliğinin mezenkimal kök hücrelerinden orijin alır ve ekstrasellüler organik matriksin sentezini yapmaktadırlar (Strewler, 2001). Osteoklastlar, kalsifiye kemik matriksinin rezorbsiyonundan ve yeniden şekillenmesinden sorumlu olan, çok çekirdekli ve dev hücrelerdir. Osteoblastlar ve osteoklastlar sürekli etkileşim halindedir. Kemikte osteoklastların yıkıma uğrattığı bölgelere, çeşitli uyaranlar aracılığıyla osteoblastlar gelir ve yeniden kemik oluştururlar (Junqueira ve Carneiro, 2006; Manolagas, 2000). Mevcut çalışmada, osteoblast ve osteoklastların yoğunluğu ve kemik iyileşmesindeki etkinlikleri, rat mandibulasında oluşturulan kemik defekt bölgelerinden 1. ve 4. hafta sonunda alınan doku örnekleri incelenerek değerlendirilmiştir.

Travma, enfeksiyon, malformasyon, kist ve tümör operasyonları veya başka bir nedenle yapılan rezeksiyon sonrası oluşan oral ve maksillofasiyal bölgedeki kemik defektlerinin yapısal ve fonksiyonel rekonstrüksiyon problemleri günümüzde modern cerrahinin üzerinde durduğu en önemli uğraşlardan biridir. Açığa çıkan kemik defektlerinin iyileşmesi amacıyla çeşitli kemik greftleri veya kemik yerine geçen biyomateryallerin kullanımı gerekmektedir.

Kritik boyutta kemik defekti, bir canlıya osteoindüktif veya osteokondüktif bir materyal uygulanmadan yaşam boyu spontan olarak kemik dolumu ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik defekti olarak tanımlanmaktadır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibröz bağ dokusu dolumu ile iyileşme eğilimi gösterir (Develioğlu, 2003; Proyor ve ark., 2006). Bu kemik defektlerinin düzgün bir şekilde kemik dolumu sağlayarak iyileşmesi amacıyla defekt bölgesine kemik greftleri ya da bunun yerini alabilecek biyomateryaller kullanılmaktadır. Kritik boyuttaki kemik defektinin kendiliğinden iyileşme potansiyelinin olmamasından dolayı maksillofasiyal cerrahi alanında meydana gelen büyük çaptaki kemik defektlerini taklit etme özelliğine sahiptir. Bu benzerlik nedeniyle araştırmacılar greft çalışmalarında genellikle kritik boyuttaki kemik defekt modelini tercih etmektedir. (Develioğlu, 2003; Proyor ve ark., 2006; Güner 2011). Bu nedenle biz de çalışmamızda 5 mm kritik boyutlu defekt modelini tercih ettik.

Maksillofasiyal cerrahide çeşitli kemik greftleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında otogreftler, allogreftler, alloplastik greftler ve ksenogreftler bulunmaktadır (Yukna, 2002). Otogreftler, tek başlarına osteoindüktif, osteokondüktif olmaları ve

osteogenezis yapabilmeleri, antijenik özellik göstermemeleri nedeniyle altın standart olarak kabul edilmektedirler (Peterson ve Ellis, 1998; Alfaro, 2006; Schlegel ve ark., 2006). Buna karşın otojen greft alınmasının postoperatif enfeksiyon riskinin artması, operasyon süresinin uzaması, istenildiği kadar elde edilememesi, ikinci bir yara oluşması gibi dezavantajları mevcuttur (Raghoobar ve ark., 2001; Marchena ve ark., 2002). Ksenogreftler ise memeli hayvanların kemiklerinden veya mercan kabuklarından elde edilirler. Ksenogreftlerin hazırlanmasında at, domuz, sığır ve sığangillere ait kemiklerin de uygun olmasına karşın, sığır kemikleri daha çok kullanılmaktadır (Revell, 1986). Fakat sığır kaynaklı ksenogreftlerden insanlara DDH bulaşma riskinden dolayı klinik olarak uygulanması konusu hala tartışmalıdır. Bu gibi enfeksiyonlardan korunmak için son zamanlarda at kaynaklı ksenogreftler üretilmiştir (Bio-gen®-BGS, Bio-gen®-BGM, Colloss E®). Günümüze kadar atlardan bulaşan DDH bildirilmemiştir (Nienhuijsa ve ark., 2006). Ksenogreftler genelde sığır kemiklerinin tam olarak deproteinize edilmesi ile elde edilirler. Doğal sığır kemiğinin organik bileşenleri tümüyle elimine edilir. Geri kalan inorganik bölüm, poröz hidroksiapatit partikülleridir ve yapısal olarak insan kansellöz kemiğine benzemektedir. Alıcı doku tarafından iyi tolere edilirler ve iyileşmeye osteokondüktif katkı göstermesine karşın osteoindüktif özelliği bulunmamaktadır (Adem, 2007). Ksenogreftlerle yapılan çalışmalar, ksenogreftlerin hastalarda çok iyi fiziksel rezistans göstererek rezorbe olduğunu, yerini başarılı bir şekilde yeni oluşan kemiğe bıraktığını göstermiştir (Ouhayoun ve ark., 1989). Mevcut çalışmada, kemik defektlerinin doldurulması amacıyla otogreftlerin yukarıda bahsettiğimiz dezavantajlarından ötürü daha kolay temin edilen ve istenildiği kadar elde edilebilen, deantijenize edilmiş, at kaynaklı bir ksenogreft olan Bio-gen®-BGM kullanılmıştır.

Deney hayvanlarından domuz, köpek ve ratların immünitesi ile insan immünitesi çok benzerlik göstermektedir. Etik olarak ülkemizde köpekler üzerinde son 7 yıldır çalışma yapılmamaktadır. Domuzların hem bakımı hem de opere edilmesi zordur. Bu çalışmada ise kolay bulunmasının yanı sıra barındırılmasının ve beslenmesinin kolaylığı ve ucuz olmasından dolayı deneyin ratlar üzerinde yapılmasına karar verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda histopatolojik değerlendirme günlerinin farklılıklar gösterdiği görülmektedir (Block ve Kent, 1986). Erken dönem kemik iyileşmesinin histopatolojik incelenmesinde genellikle 3. gün, 7. gün, 14. gün, 21. gün, 28. gün, 2. ay ve 3. ay gibi süreler esas alınarak doku örnekleri elde edilmektedir. Kemikleşme

sürecinin genel olarak birinci haftanın sonunda başladığı ve altıncı hafta sonunda büyük ölçüde tamamlandığı bilgisi kabul görmektedir (Guglielmotti ve ark., 1990; Alberius ve Johnell, 1991). Yine yapılan başka çalışmalarda ilk haftadan itibaren 4 haftalık sürenin ratlarda yeni kemik oluşumu ve anjiyogenezi gözlemlemek için yeterli bir süre olduğu gösterilmiştir (Schmid ve ark., 1997; Boo ve ark., 2002; Herron ve ark. 2003). Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda bizde çalışmamızda 7 ve 28 günlük süreleri seçtik.

Yapılan araştırmalarda, kırık iyileşmesini hızlandırmak ve büyük defektlerde rekonstrüksiyon sağlamak için kullanılan kemik grefti veya kemik benzeri alloplastik maddelerin, daha hızlı ve daha az komplikasyonla kemikle bütünleşmesine yardımcı olması amacıyla çeşitli uygulamalar üzerinde durulmaktadır. Bu uygulamalarda, kemik greftleriyle birlikte ya da tek başına uygulanan çeşitli büyüme faktörleri (BMP, VEGF, FGF-2, PDGF, TGF- β ve IGF) veya antioksidan özelliği gösteren maddelerin (propolis, borik asit) sistemik ya da lokal kullanımı sonucunda yeni kemik oluşumun stimüle edilmesi amaçlanmaktadır.

Inui ve ark. (1998), tavşan femurunda oluşturulmuş 10 mm'lik defekte bir taşıyıcı ile beraber fibroblast büyüme faktörü (FGF) yerleştirmişler. Yapılan çalışmaya göre doku örnekleri 2., 3. ve 6. haftalarda alınmış ve FGF uygulanan defekte yeni kemik ve kartilaj oluştuğunu gözlemlemişler. Bu çalışmada sonuç olarak FGF'nin oluşan kallus miktarını arttırdığı bildirilmiştir.

Nakamura ve ark. (1998), Thoren ve ark. (1993), FGF-2'nin kemik greftlerine ilave edilmesinin, inflamatuvar cevabı düzenlediğini, iyileşme aşamalarını erkenden uyararak osteoblast aktivitesini uyardığı ve kemik gelişimini artırdığını bildirmişlerdir.

Gürer (2011), ratlarda yaptığı çalışmada her bir ratın sağ mandibulasında 5 mm'lik defekt oluşturduktan sonra, gruplardan birincisinde sadece defekt açık boş bırakılmış, ikincisinde defekt kemik grefti ile doldurulmuş ve üçüncü grupta ise kemik grefti + (FGF) uygulamıştır. Bu gruplar da kendi aralarında 7. gün ve 28. gün olmak üzere iki alt gruba ayrılmıştır. Deney sonrasında yapılan histomorfometrik değerlendirme sonucuna göre FGF-2'nin kemik dokusunun erken iyileşme safhalarına katkıda bulunduğu, geç dönemde greft materyali ile bir fark olmadığı ve damar sayısının artışında önemli bir görevi olduğu sonucuna varılmıştır.

Edwards ve ark. (2004) ratların femur kemiklerinde oluşturulan kırık hattına perkutanöz rh-BMP uygulamışlar. Histolojik incelemeleri için ratları 1., 2., 3. ve 4. haftalarda sakrifiye etmişler. Bu çalışmanın histolojik bulguları incelendiğinde kırık

hattındaki kallusun deney grubunda daha büyük olduğu, kırık hattının her iki tarafında periosteal kemik oluştuğu ve oluşan kemik alanındaki vaskülarizasyonun iyi olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmaya göre perkutanöz uygulanan rh-BMP'nin kırık iyileşmesini hızlandırdığı bildirilmiştir.

Özeç (2003) koyunlar üzerinde distraksiyon osteogenezisi uyguladığı çalışmada mandibula bilateral olarak uzatılmıştır. Deney grubunda operasyon sırasında 3 µg rhBMP-2 kollagen sponge taşıyıcı kullanılarak osteotomi bölgesine fragmanlar arasına yerleştirilirken, kontrol grubuna yerleştirilmemiştir ve distraksiyon perioduna 10 gün devam edilmiştir. Histolojik ve radyolojik değerlendirme sonuçlarına göre rhBMP-2'nin distraksiyon osteogenezisinde erken dönem konsolidasyon üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermektedir.

Mevcut çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerine kemik grefti doldurularak bir antioksidan olan CSE oral gavaj yoluyla verilmiştir. 7. ve 28. günlerde gruplardan alınan doku örnekleri incelendiğinde erken dönemde BMP-2 değerlerinde anlamlı bir artış görülmüş, buna bağlı olarak da yeni kemik formasyonun artması beklenirken bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Geiger ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada VEGF salınımının yeni olgunlaşmamış kemikte osteoblastların yanında gözlemlendiği ve anjiyogenezin osteogenezden önce indüklendiği gösterilmiştir. Çalışmamızda 7. ve 28. günde gruplar arasındaki VEGF değerleri karşılaştırıldığında CSE verilen deney gruplarında bir artış görüldüğü ama bu artış sadece 7. gündeki gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bu sonuca göre VEGF'nin erken dönemde artış göstermesi literatürle uyumludur.

Nielsen ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada ratlarda oluşturdukları tibial kırık hattının çevresine TGF-β enjeksiyonu yapmışlar. Çalışma sonucunda kırık hattında kallus-kemik oluşumunun arttığını bulmuşlardır.

Stojko ve ark. (1978) oluşturdukları kemik defekti bölgesine antioksidan özellik gösteren propolisin etanolik ekstraktını uygulamışlar ve deney grubunda, kontrol grubuna göre ossifikasyonun daha hızlı olduğunu tespit etmişlerdir.

Canlı organizmada fizyolojik ve patolojik tüm metabolik işlemlerin yürütülmesi, yüzlerce enzim ve substratın katıldığı reaksiyonların düzenli ve hızlı bir şekilde sürdürülmesi ile mümkündür. Bu reaksiyonlar sırasında yararlı birçok ürünün yanında özellikle fazla miktarda oluştuklarında organizma için zararlı etkiler yapabilecek

bileşikler de oluşmaktadır. Bunlardan en önemlileri serbest radikallerdir. Organizma, serbest radikallerin yaptığı etkilerden korunmak için antioksidatif korunma sistemine sahiptir. Bazı durumlarda antioksidatif koruyucu sistemin iyi çalışmamasından dolayı serbest radikallerin vücutta fazlalaştığı görülür. Bu artış vücutta bazı hasarlara sebep olabilir. Serbest radikallerin miktarı arttığı zaman önce yaşlanma hızlanır, hücre ölümü görülür ve sonra doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşur (Bilaloğlu ve Harmandar, 1999). Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı, hücre ve dokularda gelişmiş olan antioksidan moleküllerin çeşitliliği ve yaygın bir dağılım göstermesiyle oldukça etkili koruma sağlanabilmektedir. Buna karşın bazı durumlarda ise savunma sistemi yetersiz kalır ve makromoleküler hasar görülmektedir. Endojen antioksidanların yetersiz kaldığı, serbest radikallerin fazlaca üretildiği enfeksiyon, enflamasyon, travma gibi durumlarda antioksidan savunmayı güçlendirici, patolojik duruma uygun olarak seçilebilecek bir antioksidanın, yeterli doz ve sürede uygulanmasının yararlı ve gerekli olduğu düşünülmektedir (Kumazawa ve ark., 2004; Cardile ve ark., 2003; Russo ve ark., 2004). Mevcut çalışmada oluşturulan kemik defeklerinde antioksidanların iyileşmeye olan pozitif etkisinden faydalanılması amaçlanmıştır.

Demirer ve ark. (2012), periodontal enflamasyon ve alveoler kemik kaybının değerlendirilmesi amacıyla ratlarda bir çalışma yapmışlar. Bu çalışmada 1. grupta dikişsiz, 2. gruba birinci büyük azı dişinin çevresindeki dişetine bir dikiş ve 3. gruba ise aynı yere bir dikiş atılıp bu gruba 11 gün boyunca 3 mg/kg dozunda borik asidi sistemik olarak vermişler. Çalışmanın sonucuna göre antioksidan özelliği olan borik asidin periodontal enflamasyon ve alveoler kemik yıkımını azalttığı gösterilmiştir.

Özan (2006), propolisin ratlarda kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmasında ratlar iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubu olarak, diğer grup propolis grubu olarak belirlenmiştir. Her bir grup kendi arasında 7., 14., 21. ve 28. günler olmak üzere dört alt gruba ayrılmıştır. Deney grubuna %2,5 konsantrasyonda propolis 0,5 cc miktarında, kırık oluşturulduktan hemen sonra sadece bir kere olmak üzere uygulamıştır. Bu çalışmadan elde edilen radyolojik ve histopatolojik veriler propolisin kırık iyileşmesini hızlandırdığını ve kemik kalitesini arttırdığını göstermiştir.

Bu bilgiler ışığında, yeni kemik formasyonunu artırmasını amaçlayarak çalışmamızda antioksidan özellik gösteren CSE'yi kullandık.

Nadaroğlu ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada Akdeniz ve ege bölgesinde yaygın olarak yetişen Capparidaceae familyasından *C.spinosa*'nın antioksidan özelliği gösterdiği bildirilmiştir.

Akdeniz ülkelerinde ilk zamanlardan bu yana gıda ve tedavi amaçlı kullanılan *C.spinosa*, halk arasında analjezik, diüretik, yara iyileştirici ve hücre yenileyici olarak kullanılmaktadır. *C.spinosa* bitkisinin tomurcuk ve yaprakları da ilaç ve kozmetik sanayide kullanılmaktadır (Bağcı ve Şimşek, 1999). İspanyollar bu bitkinin köklerinden yaptıkları ilaçları, hemoroitin tedavisinden kalça rahatsızlıklarının giderilmesine, kadınların regl dönemlerinin düzenlenmesinden sancuların giderilmesinde ve *C.spinosa* sirkesinden diş ağrılarının giderilmesinde faydalanmışlardır. Avrupa'da meyveleri ve çiçek tomurcukları, müshil (kabızlık giderici) ve diüretik (idrar söktürücü) olarak kabul edilmekte, uyarıcı ve iskorbüt hastalığını önleyici, gut hastalığının tedavisinde ve kan bozuklarının giderilmesinde yine *C.spinosa*'dan faydalanılmıştır (Tesoriere ve ark., 2007).

Antioksidanların yeni kemik oluşumunu artırıcı etkisi bilinmektedir. Çalışmamızda kullandığımız antioksidan ailesinden olan *C.spinosa* farklı aktif kimyasal bileşenlerden oluşmuştur. Tomurcuklarında lipid, alkaloid, glucocapperin gibi glukozinatlar, polifenoller ile birlikte antioksidan özelliği olan flavanoidlere sahiptir. Bunlardan en önemlisi flavonoidlerdir. Bitkide mevcut diğer bileşenlere göre daha yüksek oranda bulunmaktadır. Flavonoidlerin çok farklı biyolojik etkileri vardır. Bunlardan bazıları antienflamatuar, antialerjik, antiviral ve antikanserojenik etkilerdir. Flavonoidler antioksidan ve metal bağlayıcı özelliğe sahiptirler (Pratt, 1965). Flavonoidlerin antioksidan etkisi yaklaşık kırk yıl önce gösterilmiştir (Cavallini ve ark., 1978). Flavonoidler polifenoldürler, antioksidan özelliğini hidroksil süstituentlerinden hidrojen atomunu ayırmasıyla kazanır. CS'nin içerdiği flavonoidlerden birisi olan *quarctin*'in kemik yapımını artırdığı gösterilmiştir (Wong ve Rabie, 2008).

Germano ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada *C.spinosa*'nın antioksidan özelliğinin içerdiği fenollere bağlı olduğu ve glukozinolatların dışlanması ile antioksidan etkinin devam ettiği sonucuna varmışlardır.

Günümüze kadar yayınlanan literatürün taranması sonucunda *C.spinosa*'nın kemik iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirildiği deneysel veya klinik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle uygulama programı ilk defa bu çalışmada denenmiştir. Uygulanacak doz ile ilgili de yine literatürde çok sınırlı sayıda çalışma vardır.

Eddauks ve ark. (2004) Streptozosin ile diyabet oluşturulan ratlara CS'nin hipoglisemik etkileri ile ilgili olarak yaptıkları çalışmada 14 gün süre ile oral yolla 20 mg/kg dozunda CSE verilerek, bazal insülin değerleri değişmeden kan şekerinin normale döndüğünü görmüşlerdir.

Feng ve ark. (2011) CS'nin yapraklarından elde edilen ekstreyi kullanarak ratlarda yaptıkları bir çalışmada CS'nin 240 mg/kg ve 600 mg/kg'lık dozlarının toksik bir etkisi olmadığını rapor etmişlerdir.

Literatürde CSE'nin dozu hakkında oral yolla verilen 20 mg/kg'lık dozun diyabette etkili olduğu görülmüştür. Biz de çalışmamızda 20 mg/kg ve 40 mg/kg'lık dozları seçerek bu dozlar arasında yeni kemik alanı oluşumu ve bunu stimüle edecek parametreler açısından 7. ve 28. günlerde bir farklılık olup olmadığını karşılaştırmalı olarak değerlendirdik.

Yadav ve ark. (1997) aloksan ile indüklenerek diyabet oluşturulan ratların bir bölümüne insülin, diğer bölümüne *Capparis decidua* ekstreleri verilerek yaptıkları bir çalışmada *Capparis decidua* verilen grubun kan şekerinde anlamlı bir düşüş olmuştur. Bununla birlikte kronik diyabet durumunda gelişen oksidatif stresin de azaldığı gösterilmiştir.

Purohit ve Vyas (2005), tavşanlarda yaptıkları bir çalışmada *Capparis decidua* ekstreleri kullanımı sonucunda serum total kolesterol, LDL, trigliserid ve fosfolipid seviyelerinde azalma olduğunu gözlemlemişler.

Wong ve Rabie (2008), yaptıkları çalışmada tavşanların parietal kemiklerinde defekt oluşturmuşlar. Bir gruptaki kemik defektlerine kollajen bir matriks ile birlikte *quercetin* solüsyonu diğer gruptaki defektler sadece kollajen matriks ile greftlenmiş (aktif kontrol grubu), son gruptaki defektleri ise boş bırakmışlardır (pasif kontrol). 14. günde sakrifiye edilen hayvanlardan alınan histolojik kesitlerin incelemesi sonucunda; kollajen matriksle birlikte *quercetin* verilen grupta yeni kemik oluşumu *quercetin* verilmeyen gruba göre daha fazla olduğunu görmüşlerdir. Boş bırakılan defekte ise kemik oluşmadığını farketmişlerdir. Buna göre kollajen matriks ile birlikte *quercetin*'in lokal olarak yeni kemik oluşumunu artırdığı ve kemik greft materyali olarak kullanılabilceği sonucuna varmışlardır.

CS'nin kimyasal bileşiminde var olan *quercetin*'in daha önce kemik yapımına olumlu etkisi tespit edildiğinden bu çalışmada da etkili olabileceği düşüncesiyle ratlara CSE verilerek yeni kemik oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre,

7. ve 28. günlük gruplardaki yeni oluşan kemik alanları değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre sayısal bir artış görülse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat çalışmanın immünohistokimyasal bulguları değerlendirildiğinde 7. günün sonunda CSE verilen gruplarda kontrol grubuna göre BMP-2, VEGF, osteonektin ve osteokalsin değerlerinde anlamlı bir artış olduğu, 28. günde ise sadece osteokalsin değerinde anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Buna göre CSE özellikle 40 mg/kg'lık dozunda ratlarda deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerinde, erken dönem kemik oluşumunda etkili olan parametrelerin bir artış göstermesine rağmen yeni kemik oluşumunda anlamlı bir artış görülmemiştir. CSE'nin kemik defeklerinde yeni kemik oluşumuna etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi ve kemik iyileşmesinde daha etkili dozun belirlenmesi için yeni çalışmalar yapılması gerektiği ve bu çalışmanın konuyla ilgili yapılacak olan araştırmalara yol göstereceği sonucuna varılmıştır.

6 SONUÇ ve ÖNERİLER

Sistemik olarak uygulanan CSE'nin ratlarda deneysel olarak oluşturulan kemik defektlerinde, 7. ve 28. günde yeni kemik oluşumuna etkisinin histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak incelendiği bu çalışmada bulguların değerlendirilmesinde şu sonuçlara varılmıştır:

1. Ratlar yapılan cerrahi işlemi iyi tolere etmiştir ve CSE canlı dokuda toksik bir etki oluşturmamıştır.
2. 28. günde 40 mg/kg dozunda CSE verilen grupta osteoblast sayısında anlamlı bir artış olduğu görülmüştür.
3. CSE'nin özellikle 40mg/kg'lık dozunun erken dönemde (7. gün) BMP-2, VEGF, Osteonektin, Osteokalsin değerlerinde anlamlı bir artışa neden olduğu görülmüştür.
4. CSE verilen deney gruplarında genel olarak 40 mg/kg CSE dozunun 20 mg/kg CSE verilen dozlara göre daha etkili olduğu görülmüştür.
5. CSE verilen tüm gruplarda yeni kemik formasyonunda artış istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlenmiştir.
6. Elde edilen sonuçlara göre CSE'nin kemik üzerine etkileri konusunda yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

7 KAYNAKLAR

- Aalam A. A, Nowzari H. (2007). Mandibular cortical bone grafts part 1: anatomy, healing process, and influencing factors. *Compend Contin Educ Dent.* 28(4):206-212.
- Adem, A., (2007). Yağlı kalsiyum hidroksit süspansiyonun ve ksenogreft + trombosit zengin plazma (tzp) karışımının deneysel olarak kemik defektlerinde uygulanmasının kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak histolojik değerlendirilmesi, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Agel, M. et al. (1986) Anti-inflammatory activity of some Saudi Arabian medicinal plants. *J Inflammation Res* 383–384.
- Akay M.C. (1998). Çeneler Bölgesinde Meydana Gelen Kemik Defektlerinin Solvent Dehidrate Allojen Spongios Kemik Greftleri İle Tedavisi. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A.D. Bornova, İzmir, s. 3-33
- Al Said, M., Abdelsattar, E., Khalifa, S. & El Feralı, F. (1988). Isolation and Identification of an anti-inflammatory principle from *Capparis spinosa*. *Pharmazie* 640–641.
- Alberius P, Johnell O (1991): Repair of membranous bone fractures and defects in rats. *J Cranio Maxillofac Surg*;19:15-20.
- Alfaro, F.H. (2006). Bone Grafting in Oral Implantology Techniques and Clinical Applications, Quintessence Publishing Co Ltd, UK.
- Altunatmaz, K. (2004). Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 30 (1), 141-147.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Freeradical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.*, 84: 551-562.
- Angelini, G., Vena, G., Filotico, R., Foti, C. & Grandolfo, M. (1991). Allergic contact dermatitis from *Capparis spinosa* L. applied as wet compresses. *Contact dermatitis* 382–383.
- Anonim (1991) Freedman,R.Faminefoods-Capparidaceae. www.hort.purdue.edu/newcrop/Faminefoods/ff_indices/ff_family_cd.html-7k_cappariciadeae.html
- Appel, T.R., Pötzsch, B., Müller, J., von Lindern, J.J., Berge, S.J., Reich, R.H. (2002). Comparison of three different preparations of platelet concentrates for growth factor enrichment. *Clin Oral Implants Res*; 13(5):522–8.

- A. Russo, V. Cardile, F. Sanchez, N. Troncoso, A. Vanella, J.A. Garbarino. (2004). Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sciences*; 76:545–558.
- Arpacı, S.E. (2010). Sıçanlarda diş çekimi sonrasında uygulanan lokal hemostatik ajan ankaferd'in doku iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi, Doktora tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Artzi Z, Weinred M, Carmeli G, Lev-Dor R, Dard M, Nemcovsky C.E. (2008) Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. *Clin Oral Impl Res* 19: 686-692.
- 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.
- Augustin, G., Antabak, A. and Davila, S. (2007). The periosteum. Part 1: anatomy, histology and molecular biology, *Injury*, 38, 115–30.
- Ayan E., Çerçi A., Coşkun K. K., Silav G., Sarı R., Bozkurt S., Sav A., Işık N., Elmacı İ. (2007). SPARC (Osteonektin) Pozitif Menenjiomalarda Nüks ve Atipi İlişkisinin Araştırılması, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, Cilt: 17, Ek Sayı
- Aybar, B., Gümrü, O. (2000) Oral cerrahide kemik defektlerinin onarımı. *İst. Tıp Fak. Mecmuası*; 63: 3.
- Bağcı C, Şimşek S. (1999) Capparis ovata desf. Farelerde karaciğer enzimleri ile bazı kan parametreleri üzerine etkisi: *Genel Tıp Dergisi*; 9: 123-125.
- Ballı, B. (2004).Kemik iyileşmesi ve iyileşmeyi etkileyen faktörler. Bitirme tezi, İ.Ü Dişhekimliği fakültesi, İstanbul.
- Bancroft J.D., Stevens A. (1996). *Theory And Practice Of Histological Techniques*. Fourth edition, Churchill Livingstone, New York, Chapter 15, Bone, p.309-339.
- Banwart, J.C., Asher, M.A. and Hassanein, R.S. (1995). Iliac Crest Bone Graft Harvest Donor Site Morbidity: A Statistical Evaluation, *Spine.*, 20, 1055–1060.
- Barnes, G.L., Kostneuk, P.J., Gerstenfeld, L.C. and Einhorn, T.A. (1999) Perspective: growth factor regulation of fracture repair. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 185.
- Bastianetto, S., Quirion, R. (2002). Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol. Aging*, 23: 891-897.
- Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang HL. (2006) Vertical bone augmentation: where are we now? *Implant Dent*. 15(3):219-228.

- Bifano CA, Edgin WA, Colleton C, Bifano SL, Constantino PD. (1998). Preliminary evaluation of hydroxyapatite cement as an augmentation device in the edentulous atrophic canine mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 85(5):512-6.
- Bilaloğlu GV., Harmandar M. (1999): Flavonoitler, Bakanlar Matbaacılık Ltd. Şti. p.343–343, İstanbul.
- Block MS, Kent JN(1986): A comparison of particulate and solid forms of hydroxyapatite in dog extraction sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 44:289–293.
- Block,M.S., Kent,J.N., Ardom,R.C., Davenport,W. (1987). Mandibular Augmentation in Dogs with Hidroxyapatite Combined with Demineralized Bone. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 45: 414 – 420.
- Boden S.D. (1999): Bioactive factors for the bone tissue engineering. *Clin Orthop.* 367: 84-94
- 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.
- 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.
- Boyan B.D., Lohmann C.H., Romero J, Schwartz Z. (1999). Bone And Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 26:4;629-645
- Bozkaya, S., Karaca, İ., Oygür. T. ve Barış, E. (2008). Deproteinize Kemik Grefti (Bio–Oss®)’nin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin Deneysel Olarak İncelenmesi, *ADO Klinik Bilimler Derg.*, 2, 87–97.
- Breen, E.C. (2007). VEGF in biological control, *J Cell Biochem*, 6, 1358-67.
- Cardile, V., Panico, A., Gentile, B., Borrelli, F., Russo, A., (2003) Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sciences*; 73: 1027–1035.
- Cavallini, L., Bindolt, A. & Siliprandi, N. (1978). Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmacol Res Commun* 10, 133–36.
- 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.
- Cormack D.H. (1993). *Essential Histology.* J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Chapter 8, Dense Connective Tissue, Cartilage, Bone, and Joints, p.159-190.

- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidu, E. & Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytotherapy research* 2, 194–195.
- Currey, J.D. (1988). The Effect of Porosity and Mineral Content on the Young's Modulus of Elasticity of Compact Bone, *J. Biomech.*, 21, 131–139.
- Çetiner, D. ve Engel M.U. (2000) Periodontal Teşhiste Hastalığa Ait Potansiyel Markerlar, *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. Cilt:10, Sayı:2, Sayfa:66-72.*
- Çetnus, E., Akgümüş, M., Cever, İ., Atay, Ç.F., Bakars, S. (2000). Kırık iyileşmesi üzerine kalsitonin hormonunun etkisi. *Artoplast Artroskop Cerrah / Journal of Arthroplasty Arthroscopic Surgery*; vol. 11, no. 2, 179-183.
- Dayangaç, E. (2008). Mandibular onley greft uygulamalarında Kortikal perforasyonun kemik iyileşmesine olan etkisinin histolojik ve radyolojik olarak incelenmesi, *Doktora Tezi, Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.*
- Demirer S, Kara MI, Erciyas K, Ozdemir H, Ozer H, Ay S. (2012) Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol. Jan;57(1):60-5.*
- Develioğlu H. (2003) Kritik Boyutlu Ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler. *Cumhuriyet Üniv. Diş Hek Fak Derg; 6(1):60-3.*
- Dietz, G., Bartholmes, P. (1998) Calcium Hydroxide and Bone Regeneration. *Odontological Aspects of Induced Osteogenesis in Experiment and Clinical Practice. München: ISBN 3 924943-07-9.*
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food. Chem.*, 97: 654-660.
- Duman, H. (2009). Talasemi Major Hastalarında Kapari Ovatanın Antioksidan Etkisinin Araştırılması, *Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Isparta*
- Duthie R. B. (1989). Bone and Joint Tissues. In :Kyle J, Karey LC (eds). *Scientific Foundations of Surgery 4.ed.Heinemann Medikal Books,Londra, p. 150-166.*
- Eastell R. (1996) Assesment of Bone Density and Bone Loss. *Osteoporosis Int.;6 Suppl 2:3-5.*
- Eddauks, M., Lemhadri, A. & Mihel, J. (2004). Caraway and Capper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 143–148.
- Edwards RB 3rd, Seeherman HJ, Bogdanske JJ, Devitt J, Vanderby R Jr, Markel MD. (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.*

- Efeoğlu A. (2002). Periodontal tedavide kemik greftleri. Akademik Dental Dişhekimliği Dergisi; 4 (1):1- 13.
- Ellis III E.(1998). “Surgical reconstructions of defects of the jaws”, In Peterson LJ, eds. Contemporary oral and maxillofacial Surgery.St.Louis:CV Mosby,:680-684.
- Erdoğan, D., Hatipoğlu, M., Görgün M. ve Ilgaz, C. (1999). Genel Histoloji, Hatipoğlu Yayın Evi, Ankara, 107–117s.
- Fawcett D.W., 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
- Feng, Xiaolu., Lu, Jincai., Xin, Hailiang., Zhang, Lei., Wang, Yuliang and Tang, Kexuan. (2011) Anti-arthritic Active Fraction of Capparis Spinosa L. Fruits and Its Chemical Constituents. The Pharmaceutical Society of Japan 131(3) 423-429.
- Fenglin, H., Ruili, L., Huang, B., Liang, M. (2004). Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. Fitoterapia, 75: 14- 23.
- Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors, Nat Med, 9, 669-76.
- Fonseca R. J., Dawis W. H. Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery. Considerations of typical screw/cylinder systems (Lewis S., Gulbransen H. Sutter F., Weber H. P., Riley R., ed). Second edition. Pennsylvania, W. B. Saunders Company, 285- 288, 1995.
- Fonseca R. J., Dawis W. H. Reconstructive preprosthetic oral and maxillofacial surgery. Osseous reconstruction for screw/cylinder implants (Reitzik M., Dawis W. H., ed). Second edition. Pennsylvania, W. B. Saunders Company, 385-387, 1995.
- Garg A.K. Grafting Materials in Repair and Restoration. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics. Quintessence Publishing, Illinois 1999; 83-102
- Gartner L.P., Hiatt J.L. (2001). Color Textbook Of Histology. Second edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Chapter 7, Cartilage and Bone, p.129-153
- Geiger, F., Bertram, H. and Berger, I. (2005). Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects, J Bone Miner Res, 20, 2028–35
- Gellrich NC, Held U, Schoen R, Pailing T, Schramm A, Bormann KH. (2007) Alveolar zygomatic buttress: A new donor site for limited preimplant augmentation procedures. J Oral Maxillofac Surg. 65(2):275-280.

- Gençaslan, G., (2007) Türkiye’de Tıbbi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Antioksidan Etkilerinin Taranması. Yüksek lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Germanò, M.P., Rita De Pasquale, Valeria D'Angelo, Stefania Catania, Virginia Silvari, and Chiara Costa (2002). Evaluation of Extracts and Isolated Fraction from *Capparis spinosa* L. Buds as an Antioxidant Source. *Journal of agricultural and food chemistry* 1168–1171.
- Ghule, B., Murugananthan, G. & Yeole, P. (2007) Analgesic and antipyretic effects of *Capparis zeylanica* leaves. *Fitoterapia* 365–369.
- Giannoudis, P.V., Tzioupis, C.C. and Tsiridis, E. (2006). Gene therapy in orthopaedics, *Injury*, 37, 30–40.
- Göğüş, A., Şener, N., Akman, Ş. ve Bilgiç, B. (2001). Kemik Defektlerinin İyileştirilmesinde Kalsiyum Sülfat ve Kalsiyum Hidroksiapatitin Karşılaştırılması, *Hacettepe Ortopedi Derg.*, 11, 49–54.
- Groeneveld EH, Burger EH. (2000) Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*; 142: 9-21.
- Groeneveld, E.H. and Burger, E.H. (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration, *Eur J Endocrinol*, 142, 21-25.
- Guglielmotti MB et al (1990): Increased osteogenesis in alveolar wound healing elicited by demineralized bone powder. *J Oral Maxillofac Surg*; 48: 487–491.
- Gürer U. (2011). Deneysel olarak oluşturulan kemik defeklerine uygulanan sentetik kemik grefti ve bazik fibroblast büyüme faktörünün yeni kemik oluşumuna etkisinin deneysel olarak incelenmesi, Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Habibović, P., Yuan, H., Valk, C.M., Meijer, G., Blitterswijk, C.A and Groot, K. (2005) 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials *Biomaterials*. Vol 26, Issue 17, Junne, 3565-3575.
- Hadjipovlou, A.G., Simmons, J.W., Yang, J., Nicodemus, C.L., Esch, O. and Simmons, D.J. (2000). Plaster of Aris as an Osteoconductive Material for Interbody Vertebral Fusion in Mature Sheep, *Spine.*, 25, 10–16.
- Haspolat K, Söker M. (2002) Kemiğe ait biyokimyasal değerler ve onkoloji. *Dicle Tıp Dergisi*; 29(3): 83-90.
- Heary, R.F., Schlenk, R.P., Sacchieri, T.A., Barone, D. and Brotea, C. (2002). Persistent Iliac Crest Donor Site Pain: Independent Outcome Assessment, *Neurosurgery.*, 50, 510–516.
- 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.

- Hocaoğlu, T.P. (2009) Kriyocerrahi, Elektrocerrahi ve Normal Bistürü Uygulamalarının Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisinin Sağlıklı ve Diyabetik Ratlarda Histopatolojik ve Histomorfometrik Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, Ankara.
- Hsu C, Alto P, Chang J (2004): Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg* 29A(4): 551-563.
- Inui K, Maeda M, Sano A, Fujioka K, Yutani Y. (1998). Local applicaion fof basic fibroblast growth factor minipellet induces the healing of segmental bony defects in rabbits. *Calsif Tissue Int*; 63: 490–495.
- Jee WSS, Cowin SC editor. (2001) Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd ed. Florida: CRC press:1-68
- Junqueira, L.C., Carnerio, J. and Kelly, R.O. (1998). *Temel Histoloji* 8.Baskı İstanbul: Barış Kitabevi Ltd.Şti. 132-151.
- Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2006). *Temel Histoloji*, Nobel Tıp Kitabevleri (Çeviri: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.), İstanbul, 141–154s.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauuha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S. (1999). Antioxidant activity of plant extract containing phenolic compounds. *J. Agric. Food. Chem.*, 32: 661–667.
- Kahnberg, K.E. (2005). *Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 1–5p.
- Kalfas, I. (2001). Principles of Bone Healing, *Neurosurg. Focus*, 10, 1–5.
- Kartal, N. et al. (2007) Investigation og the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry* 584–589.
- Kekilli, E., Yağmur, C., Ertem, K., Türkbilen, B. (2005) Kemik greftlerinde nükleer tıp uygulamaları. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 25: 261-279.
- Keramarisa, N.C., Calorib, G.M., Nikolaoua, V.S., Schemitschc, E.H. and Giannoudisa, P.V. (2008). Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF Injury, *Int. J. Care Injured*, 39,45–S57.
- Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. (2000): Bone growth factors. *Orthop Clin North Am*. 31: 375-388.
- Kılıçoğlu, S.S. (2002) Mikroskobi düzeyde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*; cilt 55, sayı 2, 143-150.
- Kim, H.Y., Yokozawa, T., Cho, E.J., Cheigh, H.S., Choi, J.S., Chung, H.Y. (2003). In vitro and in vivo antioxidant effects of mustard leaf (*Brassica juncea*). *Phytother. Res.*, 17: 465-471.
- Kleinheinz, J., Stratmann, U. and Joos, U. (2005). VEGF activated angiogenesis during bone regeneration, *J Oral Maxillofac Surg*, 63, 1310–6.

- Kökden, A., Türker, M. (1999) Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi. Cilt 2, Sayı 2.
- 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.
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T (2004): Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*; 84: 329-339.
- 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.
- Larson, R. (1988). The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27, 969–978.
- Leach, J.K., Kaigler, D. and Wang, Z. (2006). Coating of VEGF releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration, *Biomaterials*, 27, 249–55.
- Leeson TS, Leeson RC. (1981) *Histology*. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders company; 145-163.
- Levin L, Nitzan D, Schwartz-Arad D. (2007) Success of dental implants placed in intraoral block bone grafts. *J Periodontol*. 78(1):18-21.
- Ljubuncic, P., Portnaya, I., Cogan, U., Azaizeh, H., Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity of *Crataegus aronia* extract used in traditional Arab medicine in Israel. *J. Ethnopharmacol.*, 101: 153-161.
- Lynch S.E., Genco R.J., Marx R.E. (1999). *Tissue Engineering, Applications In Maxillofacial Surgery And Periodontics*. Quintessence Publishing Co, Carol Stream, Illionis, Chapter 1, Basic Principles of Tissue Engineering, p.3-17
- Lynch S.E., Genco R.J., Marx R.E. (1999). *Tissue Engineering, Applications In Maxillofacial Surgery And Periodontics*. Quintessence Publishing Co, Carol Stream, Illionis, Chapter 2, Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy, p.17-55
- Maiga, A., Malterud, K.E., Diallo, D., Paulsen, B.S. (2006). Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Benth. (Rubiaceae) *J. Ethnopharmacol.*, Mar 8;104(1-2):132-7.
- Mannai C. (2006) Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet-rich plasma in 97 patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 64(9):1420-1426.

- Manolagas SC. (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 21: 115-37. Review.
- Manson PN. (1994) Facial bone healing and bone grafts. A review of clinical physiology. *Clin Plast Surg.* 21(3):331-348.
- 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.
- Martin, R.B. and Burr, D.B. (1989). Mechanical adaptation, in structure, Function and Adaption of compact bone, Raven Press, New York, ,chaps 2, 4, 7 and 8.
- Marx, R.E., Saunders, T.R. (1986) Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. in: Fonseca R.J., Davis, W.H. eds. *Reconstructive Preprosthetic Oral and Macsillofac. Surg.* Philadelphia: W.B. Saunders. 1986: 347-428
- Mathes SJ (2006): Repair and grafting of bone. In: *Plastic surgery.* 2nd ed. Saunders Elsevier Inc, Philadelphia, 639-718.
- Mayfield, L.J., Skoglund, A., Hising, P., Lang, N.P. and Attström, R. (2001). Evaluation Following Functional Loading of Titanium Fixtures Placed in Ridges Augmented by Deproteinized Bone Mineral: A human Case Study, *Clin. Oral Implants Res.*, 12, 508–514.
- Mohammad, G., Pandey, H.P. and Tripathi, K. (2008). Daibetic wound healing and its angiogenesis with special reference to nanoparticles, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4, 203-208.
- Motyckova G, Fisher DE. (2002) Pycnodysostosis; role and regulation of Catepsin K in osteoclast function and human disease. *Curr Mol Med*; 2: 407-421.
- Nadaroğlu, H., Demir, Y., Demir, N. (2008). Kapari (*Capparis spinosa*) Bitkisinin Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*; 21-23 Mayıs, Erzurum.
- Nagai, T., Myoda, T., Nagashima, T. (2005). Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food. Chem.*, 91: 389-394.
- 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.
- Nasr, H.F., Aichelmam-Reidy, M.E., Yukna, R.A. (2000) Bone and bone substitutes. *Periodontology*; 19: 74-86.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. and Poltorak, Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *Faseb J*, 13, 9-22.

- Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H. (1995) Local injection of TGF- β increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand*; 65:37–41.
- Nienhuijsa, M.E.L., Walboomersb, X.F., Merkxa, M.A.W., Stoelingaa, P.J.W., Jansenb, J.A. (2006) Bone-like tissue formation using an equine COLLOSSs E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials* 27 3109–3114.
- Okumuş, Z., Yıldırım, Ö.S. (2005). The Cuttlefish Backbone: A New Bone Xenograft Material? *Turk J Vet Anim Sci* 29, 1177-1184.
- Oral O. (2000). L-Dopa'nın (Allojenik greft uygulanan ve uygulanmayan) kemik defeklerinin iyileşmesi üzerine olan etkilerinin deneysel araştırılması. Doktora tezi. İstanbul.
- Ouhayoun, J.P., Issahakians, S. (1989). Influence of biomaterials on the healing pattern of bony defects in miniature pig mandible. *J Dent Res.*; 68: special issue, abstract. 1244.
- Özan (2006) Propolis'in kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi, Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Özeç, İ. ve Yeler, H. (2003). Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon, Cumhuriyet Üniv. Diş. Hek. Fak. Derg. 6,1.
- Özeç İ. (2003). Lokal olarak uygulanan recombinant human bone morphogenetic protein-2'nin distraksiyon osteogenezi üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi, Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Peleg M, Garg AK, Misch CM, 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.
- Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R, (2003): Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide Vascular Endothelial Growth Factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 123: 485-488.
- Pinheiro, A.L.B., Junior, F. A. L., Gerbi, M.E.M., Ramalho, L.M.P., Marzola, C., Ponzi, E.A.C. (2003) Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. *Braz. Dent. J.* vol.14 no.3 Ribeirão Preto.
- Pratt, D. (1965) Lipid Antioxidants in plant tissue. *J Food Sci* 30, 737–741.
- Proussaefs P, Lozada J. (2006). Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation: clinical and histologic-histomorphometric evaluation. *J Oral Implantol.* 32(5):237-247.

- Proyor ME, Susin C, Wikesjö UME. (2006) Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *J Clin Periodont* 33:455- 60.
- Purohit, A. & Vyas, K. (2005). Hypolipidaemic efficacy of Capparis decidua fruit and shoot extracts in cholesterol fed rabbits. *Indian J Exp Biol* 863–866.
- Raghoobar G. M., Louwrese C., Kalk W.W.I., Vissing A. (2001). Morbidity Of Chin Bone Harvesting. *Clin Oral Impl Res*, 12:503-507.
- Rathee, J.S., Hassarajani, S.A., Chattopadhyay, S. (2006). Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts. *Food Chem*. 99: 436-443.
- Rekow, D. (2003) Informatics challenges in tissue engineering and biomaterials. *Adv. Dent. Res.*; 17: 49- 54.
- Revell, P.A. (1986). *Pathology of bone*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 30, p.203-231.
- Satan, T., Sarban, S., Hersekli, M.A. (1998) *Osteoporoz*. Ankara.
- 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.
- Schlegel KA, Lang FJ, Donath K, Kulow JT, 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.
- Schwartz-Arad D, Levin L, Sigal L. (2005) Surgical success of intraoral autogenous block onlay bone grafting for alveolar ridge augmentation. *Implant Dent* (2):131-138.
- Seto, I., Asahina, I., Oda, M. and Enomoto, S. (2001). Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow, *J Oral Maxillofac Surg*, 59, 53-61.
- Shors, E.C. Coralline bone graft substitutes. *Orthopedic Clinics of North America* 1999; 30(4): 599-613.
- Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. (2001) Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*; 22: 2581-2593.
- Soydan, N. (1992) *Genel Histoloji. İ. Ü. Dişhekimliği Fakültesi. İstanbul: İ.Ü.Basımevi ve Film Merkezi; ISBN 975-404-276-4.*
- Stevenson S. (1999). *Biology of Bone Grafts*, *Orthop. Clin. North Am.*, 30, 543–552.
- Stojko A, Scheller S, Szwarnowiecka I, Tustanowski J, Ostach H, Obuszko Z. (1978) Biological properties and clinical application of propolis. VIII. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. *Arzneimittelforschung*. 28:35–37.

- 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 USA*, 15, 656– 61.
- Strewler GJ. (2001) Local and systemic control of the osteoblast. *J Clin Invest* 107:271-272.
- Suzuki T, Bessho K, Segami N, Lizuka T, Nojima T. (2001) Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein- 2 in the oral and maxillofacial area of the human embryo. *Br J Oral Maxillofac Surg*; 39: 289-93.
- Şencan, M., Güneşçakar, R., Cevit, Ö. ve Deveci, D. (2007). Aspirinin kandaki anjiyojenik vasküler endotelial büyüme faktörü ve anti-anjiyojenik endostatin seviyelerine etkisi, *C Ü Tıp Fak Derg*, 29, 56-61.
- Şimşek, N., (2012) Bağ dokunun iplikleri, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Ders Notları.
- 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.
- Tanakol R. (2004) Fizyopatolojik etmenler. Yeşim Gökçe Kutsal (ed). Osteoporozda kemik kalitesi. Güneş Kitabevi. Ankara: 3-62.
- Taşdemir U. (2011) Rifamisin ile Dekontamine Edilen Otojen Blok Kemiğin Onley Greft Olarak Kullanımının Deneysel Olarak İncelenmesi, Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
- Tekelioğlu M. (1993) Genel Tıp Histolojisi, Güneş Kitabevi, Ankara.138-147.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A. & Sokmen, A. (2006) Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry* 200– 204.
- Tesoriere, L., Butera, D. & Gentile, C. (2007) Bioactive components of caper (*Capparis spinosa* L.) from Sicily and antioxidant effects in a red meat simulated gastric digestion. *Journal of agricultural and food chemistry* 55, 8465–71.
- Thoren K, 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.
- Thorwarth, M., Rupprecht, S., Falk, S., Felszeghy, E., Wiltfang, J and Schlegel, K.A. (2005) Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)- an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. Volume 26, Issue 15, May, Pages 2575-2584.
- Tidwell, J.K., Blijdorp, P.A., Stoelinga, P.J.W., Brouns, J.B., Hinderks, F. (1992). Composite Grafting of the Maxillary Sinus for Placement of Endosteal

- Implants.a Preliminary Report of 48 Patients. *Int.J. Oral Maxillofac. Surg.* 21:204 – 209.
- 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.
- Tomak, Y., Dabak, N., Kökçü , C., Gülman , B., Karaismailoğlu , T.N., Andaç , A. (2000) Allogreft kullanımı ve kemik bankası üzerinde deneyimlerimiz. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*; 34: 139-146.
- Trombetta, D. et al. (2005) Antiallergic and antihistaminic effect of two extracts of *Capparis spinosa* L. flowering buds. *Phytother Res* 2005; 19: 29-33 29–33.
- Turgut, B., Güler, M., Demir, T., Türkçüoğlu, P. ve Çeliker, Ü. (2007) Oküler anjiyogenezde vasküler endotelial büyüme faktörünün rolü, *T Klin J Ophtalmol*, 16, 38-46.
- Urist, M., O'Connor, B.T. and Burwell, R.G. (1994). *Bone Grafts, Derivates and Substitutes*, Butterworth–Heinemann Comp., Oxford, 3–80p.
- Vaibhav, B., Nilesh, P. and Vikram, S. (2007). Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: a current concept update, *Injury*, 38, 1227–35.
- Yadav, P., Sarkar, S. & Bhatnagar, D. (1997). Action of *capparis decidua* against alloxan induced oxidative stress and diabetes in rat tissues; *Pharmacol Rese* 221–228.
- Yıldız M., (2006). Kemik İyileşmesinde Trombositten Zengin Plazmanın (platelet rich plasma–PRP) Etkisinin Deneysel Olarak Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yukna RA, Salinas TJ, Carr RF. (2002). Periodontal regeneration of following use of ABM/P 15:A case report. *İnt J Peodontics Restorative Dent.* 22:146-155.
- Wang, D.S., Miura, M., Demura, H. and Sato, K. (1997). Anabolic effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells, *Endocrinology*, 138, 2953-2962.
- Watts NB. (1999) Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clinical Chemistry* 45:8(B):1359–1368
- Wei, Q.Y., Chen, W.F., Zhou, B. Yang, L., Liu, Z.L. (2006). Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation in rat liver mitochondria by curcumin and its analogues. *Biochim. Biophys. Acta*, 1760: 70-77.
- Wiostko, B., Wong, T.Y. and Simo, R. (2008) Vascular endothelial growth factor and diabetic complications, *Prog Retin Eye Res*, 6, 608-21.
- Wolfe MW, Salkeld SL, Cook SD. (1999) Bone morphogenetic proteins in the treatment of non unions and bone defects: historical perspective and current

knowledge. The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal 1999; 12: 1-6.

Wong, R. & Rabie, A. (2008). Effect of quercetin on bone formation. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society 26, 1061–6.

8 ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

| | |
|----------------------|---|
| Adı Soyadı | Mustafa KIRTAY |
| Doğum Yeri ve Tarihi | Elazığ, 20/02/1984 |
| Medeni Hali | Evli |
| Yabancı Dil | İngilizce |
| İletişim Adresi | Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 58140–Sivas. |
| E–posta Adresi | mkirtay@hotmail.com |

Eğitim ve Akademik Durumu

| | |
|---------------|--|
| Lise | Elazığ Balakgazi Lisesi, 1997–2000 |
| Yüksek Lisans | Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, 2001–2008 |
| Doktora | Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, 2008–2012 |

İş Tecrübesi

| | |
|-------------------------|----------------------------|
| Cumhuriyet Üniversitesi | Araştırma görevlisi, 2011– |
|-------------------------|----------------------------|