

T. C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI
VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KEMİK DEFEKTLERİNDE KULLANILAN FARKLI GREFT
MATERYALLERİNİN TAVŞANLARDA LİPİT
PEROKSİDASYON OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Emrah GÖNÜLOL

Samsun
Ağustos-2010

T. C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI
VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KEMİK DEFEKTLERİNDE KULLANILAN FARKLI GREFT
MATERYALLERİNİN TAVŞANLARDA LİPİT
PEROKSİDASYON OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Emrah GÖNÜLÖL

Danışman: Doç. Dr. Nergiz YILMAZ

Samsun

Ağustos-2010

Bu araştırma projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı, Lisansüstü Tezleri Destekleme Programı tarafından DHF 067 numarasıyla desteklenmiştir.

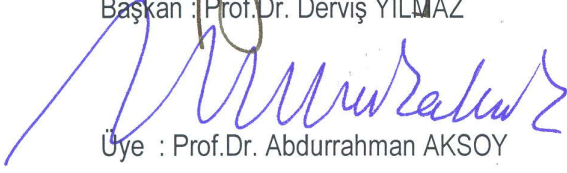
T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından **Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi** Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan : Prof.Dr. Derviş YILMAZ

Gazi Üniversitesi



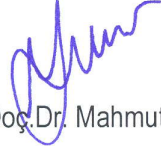
Üye : Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi



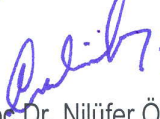
Üye : Doç.Dr. Nergiz YILMAZ

Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Doç.Dr. Mahmut SÜMER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Yrd.Doç.Dr. Nilüfer ÖZKAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tezin Adı : Kemik Defektlerinde Kullanılan Farklı Greft Materyallerinin
Tavşanlarda Lipit Peroksidasyon Oluşumu Üzerine Etkisi

Tezi Teslim Eden : Emrah GÖNÜLÖL
Tez Savunma Sınav Tarihi : 21.09.2010
Tez Danışmanı : Doç.Dr. Nergiz YILMAZ

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof.Dr. Süleyman KAPLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Nergiz YILMAZ'a,

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, tezimi gerçekleştirmemde büyük emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Abdurrahman AKSOY'a,

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle sabırla bana yol gösteren, yardımını benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz Kürşad DAŞ'a ve mesai arkadaşı Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan YAVUZ'a,

Doktora öğrenimim ve tez çalışmam boyunca gösterdikleri anlayış ve yardımları için başta Doç. Dr. Mahmut SÜMER olmak üzere Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma,

Çalışmamın istatistiksel sonuçlarını değerlendirmedeki yardımları için sayın Prof. Dr. Yüksel BEK'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Soner ÇANKAYA'ya,

Tez çalışmamın analizleri sırasında laboratuvarlarından faydalandığım Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalına ve Samsun Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü çalışanlarına,

Tez çalışmamda maddi destek sağlayan OMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Komisyonuna,

Tez çalışmam sırasında araştırma laboratuvarlarında bana çalışma imkanı tanıyan OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi Başkanı sayın Prof. Dr. Murat HÖKELEK'e ve veteriner teknisyen S. Sinan BERK başta olmak üzere tüm çalışanlarına,

Tez çalışmam süresince desteklerini benden esirgemeyen başta Dt. Burak BEKÇİOĞLU olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Beni bugünlere büyük özveri ve emekle getiren her zaman yanımda olan ve bilgi ve tecrübesiyle de tez çalışmam boyunca bana destek olan sevgili babam Prof. Dr. Arif GÖNÜLOL'a ve canım aileme,

Tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan, yardımını, sabrını ve sevgisini benden hiçbir zaman esirgemeyen canım eşim Dr. Dt. Nihan GÖNÜLOL'a

teşekkür ederim.

ÖZET**KEMİK DEFEKTLERİNDE KULLANILAN FARKLI GREFT
MATERYALLERİNİN TAVŞANLARDA LİPİT PEROKSİDASYON OLUŞUMU
ÜZERİNE ETKİSİ****Emrah GÖNÜLOL, Doktora Tezi****Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ağustos 2010**

Bu çalışmanın amacı, standart olarak kemik defekti oluşturulmuş tavşan tibiasında kullanılan farklı greft materyallerinin lipit peroksidasyon ve bazı antioksidan enzim sistemleri üzerine etkilerini incelemektir.

Çalışmamızda ortalama 2,5 kg ağırlığında 28 adet erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanılmıştır. Tavşan sağ tibiasının medial kısmında standart bir kemik defekti (5x15x3mm) oluşturulmuştur. Yedişer tavşandan oluşan 3 deney ve 1 kontrol grubu oluşturulmuştur. Kontrol grubunda kemik defektleri herhangi bir materyal konulmadan kapatılmıştır (1.Grup). 2. gruba insan demineralize kemik matriksi (Grafton DBM, Osteotech Inc., Eatontown, NJ, ABD), 3. gruba sığır kemiği (Bio-Oss , Geistlich Pharma AG., Wolhusen, İsviçre), 4. gruba da % 60 hidroksilapatit ve % 40 beta-trikalsiyum-fosfat (4BONE, MİS Implants Technologies Ltd., İsrail) içerikli kemik grefti kullanılarak kemik defektlerinin onarımı sağlanmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT) ve malondialdehit (MDA) analizleri için tavşanlardan operasyondan 1 gün önce ve operasyondan sonra 1, 3, 7, 14, 28 ve 56. günlerde kan örnekleri alınmış ve spektrofotometre ile analizleri yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 15.0 istatistik paket programı ile yapılmıştır.

Çalışmamız sonucunda antioksidan enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde CAT enzimi için en yüksek değer Bio-Oss greft grubunda elde edilmiştir. GPX ve SOD enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde ise greft materyalleri arasında fark bulunamamıştır. MDA ürünü değerlendirildiğinde ise en düşük değerler Bio-Oss greft grubunda elde edilirken en yüksek değerler kontrol grubunda elde edilmiştir. Ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT değeri ile GPx, MDA ve

SOD değerleri arasında ilişki düzeyi pozitif yönde olup sadece SOD ile olan ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Sonuç olarak; greft materyallerinin uygulandığı tüm gruplarda, kontrol grubuna kıyasla daha düşük lipit peroksidasyon tespit edilmiştir. Dolayısıyla kemik defektlerinde greft kullanımının lipit peroksidasyonu azalttığı anlaşılmıştır. Ayrıca tüm greft grupları değerlendirildiğinde lipit peroksidasyon açısından en düşük değeri vermesi ve CAT enzim aktivitesini arttırması nedeni ile Bio-Oss materyalinin bu çalışmada kullanılan diğer greftlerden daha uygun bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır.

ABSTRACT**THE EFFECT OF DIFFERENT GRAFT MATERIALS USED AT BONE DEFECTS ON RABBITS' LIPID PEROXIDATION FORMATION****Dt. Emrah GÖNÜLOL, Ph. D. Thesis****University of Ondokuz Mayıs, Samsun, August 2010**

The aim of this study was to investigate the effects of different graft materials on lipid peroxidation and some antioxidant enzyme systems in standardized bone defect created in rabbit tibia.

In this study, twenty-eight New Zealand male rabbits, weighting approximately 2,5 kg, were used. Standard bone defects (5x15x3mm) were created at the medial part of the right tibia. Three experimental and 1 control group including 7 rabbits were conducted. In control group, bone defects were closed without filling any graft material (1st group). In the second group human demineralized bone matrix (Grafton DBM, Osteotech Inc., Eatontown, NJ, USA), in the third group bovine bone (Bio-Oss , Geistlich Pharma AG., Wolhusen, Switzerland) and in the fourth group the mixture of 60% hidroxiapatite and 40% beta-tricalcium-phosphate (4BONE, MİS Implants Technologies Ltd., İsrail) grafts were used for the repair of the bone defects.

Blood samples were obtained 1 day before the operation and 1, 3, 7, 14, 28 and 56th days after the operation for the analyses of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA). The samples analysed with spectrophotometer. The results were evaluated by SPSS 15.0 statistical packet program.

In our study all the antioxidant enzyme activities were evaluated for each group. For CAT enzyme, the highest value was detected in Bio-Oss graft group. No differences were found between the graft groups for GPx and SOD enzyme activities. For the evaluation of MDA product while the lowest values were detected in Bio-Oss graft group, the highest values were found in control group. The relationships between measurement parameters were also evaluated. Although positive correlation was

detected between CAT and GPx, MDA, SOD values, only the correlation between CAT and SOD values were found to be statistically significant.

In conclusion, lipid peroxidation levels were found to be lower in all experimental groups when compared to the control group. Which means that grafting of bone defects causes lower lipid peroxidation. In addition, though the lowest levels of lipid peroxidation and increased levels of CAT enzyme activity were found in Bio-Oss group, we can concluded that Bio-Oss material is more suitable material for grafting than other materials used in this study.

SİMGELER VE KISALTMALAR

CT	Kalsitonin	HA	Hidroksilapatit
PTH	Paratiroid Hormon	TCP	Trikalsiyum fosfat
Ca	Kalsiyum	β-TCP	Beta trikalsiyum fosfat
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta	$^3\text{O}_2$	Triplet oksijen
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü	$^1\text{O}_2$	Singlet oksijen
IL	İnterlökin	O_2^-	Süperoksit radikali
BMP	Kemik morfojenik protein	O_3	Ozon
DNA	Deoksiribonükleik asit	O_2	Oksijen molekülü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü	OH^\cdot	Hidroksil radikali
RO^\cdot	Alkoksil radikali	R-S^\cdot	Kükürt merkezli radikal
ROO^\cdot	Peroksit radikali	H^\cdot	Hidrojen Atomu
L^\cdot	Lipit radikali	H_2O_2	Hidrojen peroksit
ROH	Alkol	LOOH^\cdot	Lipit hidroperoksit
HOCl	Hipokloroz asit	ROT	Reaktif oksijen türleri
R^1RNCI	Kloraminler	HO_2^\cdot	Perhidroksil radikali
ONOO^-	Peroksinitrit	Fe^{+3}	Ferri demir
e^-	Elektron	Fe^{+2}	Ferro demir
H^+	Proton	UV	Ultraviyole
PUFA	Çoklu doymamış yağ asiti	Zn	Çinko
LOO^\cdot	Lipit peroksit radikali	CO_2	Karbondioksit
TBA	Tiyobarbitirik asit	CoA	Koenzim A
MDA	Malondialdehit	α	Alfa
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit	SOD	Süperoksit dismutaz
GSH	Glutasyon	GSSG	Glutasyon disülfid
Mn-SOD	Mangan süperoksit dismutaz	NBT	Nitroblue tetrazolium
NADPH	Nikotin amid difosfat hidrojen	TNF	Tümör nekroz faktör
Se	Selenyum	TCA	Triklor asetik asit
GST	Glutasyon S transferaz	IM	Intramuskuler
PL-GPx	Fosfolipit glutasyon peroksidaz	GR	Glutasyon redüktaz
GPx	Glutasyon peroksidaz	NADP	Nikotin amid difosfat

U	Ünite	CAT	Katalaz
NaCl	Sodyum klorür	M	Molar
KCl	Potasyum klorür	mM	Milimolar
KH₂PO₄	Potasyum Dihidrojen Fosfat	µM	Mikromolar
XOD	Ksantin Oksidaz	nm	Nanometre
µl	Mikrolitre	β	Beta
ml	Mililitre	mm	Milimetre
H₂O	Su	nmol	Nanomol
kg	Kilogram	U/ml	Ünite/mililitre
mg	Miligram	S	Standart
g	Gram	S_x	Standart sapma
°C	Santigrat derece	KOH	Potasyum hidroksit
%	Yüzde	p	Önem değeri
DBM	Deminerale kemik matriksi	\bar{X}	Ortalama değeri
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskop	±	Yaklaşık
pH	Hidrojenin gücü	H₂O	Su
Cu	Bakır	cm	Santimetre
RNA	Ribonükleik asit	KBD	Kritik boyut defekti
rpm	Dakikadaki devir sayısı		
GC-MS	Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi		
DFDBA	Deminerale dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti		
FDBA	Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti		
TBARS	Tiyobarbitirik asitle reaksiyon veren maddeler		
Cu-Zn SOD	Bakır-Çinko süperoksit dismutaz		
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenylterazolium chloride		
Na₂HPO₄·2H₂O	Disodyum Hidrojen Fosfat 2 sulu		
C₁₀(PO₄)₆(OH)₂	Hidroksilapatit		
HPLC	Yüksek performans likit kromatografisi		

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	iii
Özet.....	iv
İngilizce Özet.....	vi
Simgeler ve Kısaltmalar.....	viii
İçindekiler.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2. 1. Kemik.....	2
2. 1. 1. Kemik Hücreleri.....	2
2. 1. 1. 1. Osteoblastlar.....	3
2. 1. 1. 2. Osteositler.....	3
2. 1. 1. 3. Osteoklastlar.....	3
2. 1. 1. 4. Osteoprogenitör hücreler.....	4
2. 1. 2. Kemiğin Makroskopik Yapısı.....	4
2. 1. 2. 1. Kompakt Kemik.....	5
2. 1. 2. 2. Spongiöz Kemik.....	6
2. 1. 2. 3. Periost ve Endosteum.....	6
2. 1. 3. Kemiğin Mikroskopik Yapısı.....	7
2. 1. 4. Kemiğin Moleküler Yapısı.....	7
2. 1. 4. 1. Organik Matriks.....	7
2. 1. 4. 2. İnorganik Matriks.....	8
2. 1. 5. Kemik Oluşumu.....	8
2. 1. 5. 1. İntramembranöz Kemikleşme.....	9
2. 1. 5. 2. Endokondral Kemikleşme.....	9
2. 1. 6. Kırık iyileşmesi.....	10
2. 1. 6. 1. Primer kemik iyileşmesi.....	10
2. 1. 6. 2. Sekonder Kemik İyileşmesi.....	11

2. 1. 7. Kemik Greftleri.....	12
2. 1. 7. 1. Otojen Greftler.....	13
2. 1. 7. 2. Allojen Greftler.....	14
2. 1. 7. 3. Ksenojen Greftler.....	15
2. 1. 7. 4. Alloplastik Greftler.....	15
2. 1. 7. 5. Beta Trikalsiyum Fosfat ve Hidroksilapatit.....	18
2. 1. 7. 6. Demineralize Kemik Matriksi.....	19
2. 1. 7. 7. Sığır Kaynaklı İnorganik Kemik Matriks Materyali.....	19
2. 2. Serbest Radikaller.....	19
2. 2. 1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	22
2. 2. 1. 1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	22
2. 2. 1. 2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	23
2. 2. 1. 3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot).....	24
2. 2. 1. 4. Singlet Oksijen (1O_2).....	24
2. 2. 2. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	25
2. 2. 3. Serbest Radikallerin Etkileri.....	25
2. 2. 3. 1. Membran Lipitlerine Etkisi (Lipit Peroksidasyonu).....	25
2. 2. 3. 2. Proteinlere Etkisi.....	29
2. 2. 3. 3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi.....	30
2. 2. 3. 4. Karbonhidratlara Etkisi.....	30
2. 3. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	31
2. 3. 1. Enzimatik Antioksidanlar.....	33
2. 3. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	33
2. 3. 1. 2. Katalaz (CAT).....	36
2. 3. 1. 3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	37
2. 3. 2. Oksidatif Stres.....	38
2. 3. 3. Enzimatik Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi.....	39
2. 3. 3. 1. SOD Tayini.....	39
2. 3. 3. 2. CAT Tayini.....	39
2. 3. 3. 3. GPx Tayini.....	40
2. 3. 4. Yara İyileşmesinin Fizyopatolojisi ve Serbest Radikallerin Rolü.....	40
2. 3. 5. Kırık İyileşmesi ve Serbest Radikallerin Rolü.....	42

3. MATERYAL VE METOD.....	44
3. 1. Deney Hayvanları.....	44
3. 2. Deney Grupları.....	44
3. 3. Greft Materyalleri.....	45
3. 3. 1. Grafton (Osteotech Inc., Eatontown, NJ, ABD).....	45
3. 3. 2. Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, İsviçre).....	46
3. 3. 3. 4BONE (MIS Implants Technologies Ltd., İsrail).....	46
3. 4. Cerrahi Uygulama.....	47
3. 5. Örneklerin Toplanması.....	50
3. 6. Plazma MDA Analizi.....	50
3. 6. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuar Malzemeleri.....	50
3. 6. 2. Kullanılan Kimyasallar.....	51
3. 6. 3. Kullanılan Çözeltiler.....	51
3. 6. 4. Analizin Prensibi.....	51
3. 6. 5. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması.....	51
3. 6. 6. Standartların Hazırlanması.....	52
3. 6. 7. Analizin Yöntemi.....	52
3. 6. 8. Hesaplama Yöntemi.....	53
3. 7. GPx Analizi.....	54
3. 7. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuar Malzemeleri.....	54
3. 7. 2. Kullanılan Çözeltiler.....	55
3. 7. 3. Analizin Prensibi.....	55
3. 7. 4. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması.....	55
3. 7. 5. Analizin Yöntemi.....	55
3. 7. 6. Hesaplama Yöntemi.....	56
3. 8. SOD Analizi.....	56
3. 8. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuar Malzemeleri.....	57
3. 8. 2. Kullanılan Kimyasallar.....	58
3. 8. 3. Kullanılan Çözeltiler.....	58
3. 8. 4. Analizin Prensibi.....	58
3. 8. 5. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması.....	58
3. 8. 6. Standartların Hazırlanması.....	59

3. 8. 7. Analizin Yöntemi.....	59
3. 8. 8. Hesaplama Yöntemi.....	60
3. 9. CAT Analizi.....	61
3. 9. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri.....	61
3. 9. 2. Kullanılan Çözeltiler.....	62
3. 9. 3. Analizin Prensibi.....	63
3. 9. 4. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması.....	63
3. 9. 5. Standartların Hazırlanması.....	63
3. 9. 6. Analizin Yöntemi.....	64
3. 9. 7. Hesaplama Yöntemi.....	66
3. 10. İstatistiksel Değerlendirme.....	67
4. BULGULAR.....	68
4. 1. Greft Gruplarının Zaman Dilimlerine Göre Birbirleriyle Karşılaştırılması...	68
4. 1. 1. CAT Enzimi İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	68
4. 1. 2. GPX Enzimi İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	71
4. 1. 3. SOD Enzimi İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	74
4. 1. 4. MDA İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması.....	77
4. 2. Gruplara Göre Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi.....	80
4. 2. 1. Kontrol Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi.....	80
4. 2. 2. 4BONE Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi.....	81
4. 2. 3. Bio-Oss Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi.....	81
4. 2. 4. Grafton Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi.....	82
4. 2. 5. Genel Olarak Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi.....	82

5. TARTIŞMA.....	84
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	97
7. KAYNAKLAR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	112

1. GİRİŞ

Ağız ve çeneler bölgesindeki kemik defektlerinin bir kısmı kemiğin kendini tamir edebilme yeteneği ile onarılırken büyük kemik defektlerinde ise kemik dokusunun onarılmasını desteklemek veya tamamen iyileşmesini sağlamak amacı ile greft materyalleri kullanılmaktadır (Schmitz ve Hollinger, 1986).

Kemik greft materyalleri esas olarak otojen, allojen, ksenojen ve alloplastik olarak sınıflandırılır. Otojen greftlerde aynı bireyin, allojen greftlerde aynı türün farklı bireylerinden alınan kemik dokusu kullanılır (Block ve ark., 2002; Aalam ve Nowzari, 2007). Ksenojen greftler; farklı genetik türe sahip canlılardan elde edilen greftler iken, alloplastik greftler sentetik bir maddeden elde edilirler (Thaller ve ark., 1993; Sanchez ve ark., 2005). Çok sayıda ve farklı kaynaklı ticari greft materyalleri bulunmasına rağmen çeşitli dezavantajlarından dolayı ideal greft materyali arayışları halen devam etmektedir (Bernard, 1991; Gazdag ve ark., 1995).

Serbest oksijen radikalleri, pek çok hastalığın patogenezinin sorumlu olan ve ortaklanmamış elektron içeren reaktif moleküllerdir. Bu radikaller organizmanın homeostaz sürecinde meydana gelebildiği gibi çeşitli dış etkenlerle de oluşabilir. Bu moleküllerin yarı ömürleri çok kısa olup normal fizyolojik şartlarda intrasellüler ve ekstrasellüler savunma mekanizmaları ile kontrol altında tutulurlar. Bu antioksidan savunma sistemlerinin en önemlileri SOD, GPx ve CAT enzimleridir. Serbest oksijen radikallerinin artması; membran çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına (lipit peroksidasyonuna) neden olabilmekle birlikte protein, karbonhidrat ve nükleik asitleri deoksidasyona uğratarak oksidatif strese yol açmakta ve çeşitli patolojilere neden olabilmektedir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan MDA, lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden birisidir (Halliwell, 2007; Berköz ve ark., 2008).

Çalışmamızın amacı, standart kemik defekti oluşturulmuş tavşanlarda farklı yapıdaki greft materyallerinin lipit peroksidasyon oluşumu üzerine etkilerini inceleyerek ideal greft materyali arayışına katkı sağlamaktır.

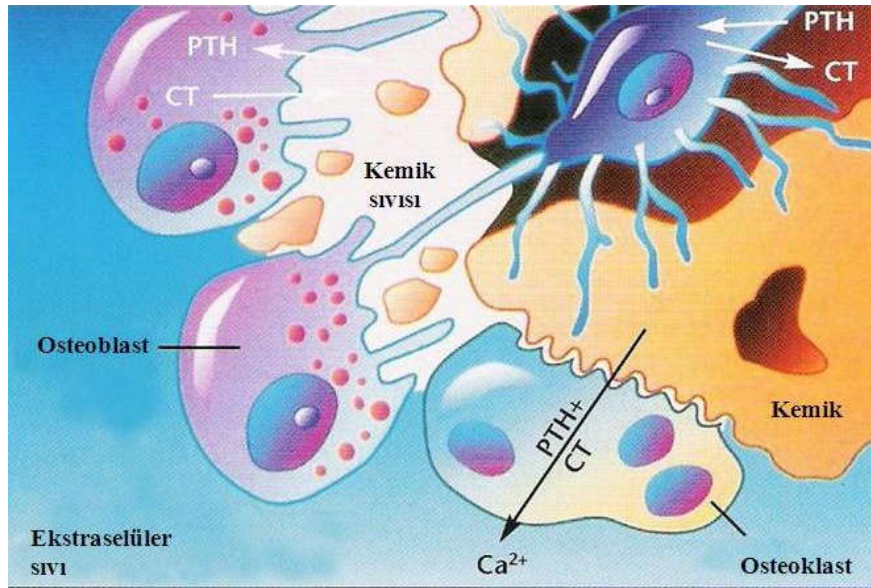
2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Kemik

Kemik birçok özel fonksiyonu içinde barındıran benzersiz bir dokudur. Kemik dokusu vücudun temel kalsiyum deposudur ve gerekli durumlarda kalsiyum ihtiyacını karşılar (Ward ve ark., 2005). Vücudun pH dengesinin sağlanabilmesi için ilave fosfat ve karbonat üretimi ile birlikte akciğer ve böbreklerle uyum içinde çalışır. Aynı zamanda sinir ve kas arasındaki elektriksel değişikliklerin iletimine yardımcı olur (Arun, 2004). İskelet sistemini oluşturan kemikler aynı zamanda canlı yumuşak doku yapılarını koruyan, kas sistemini destekleyen bir çatı görevi görürler. İnsandaki toplam kemik dokusu tüm vücut ağırlığının % 20'sini oluşturur. Kemik dokusu çok güçlüdür buna rağmen esnek ve elastik bir yapıdır. Kemik kıvrılabilir, deforme edici kuvvetler karşısında elastisite sınırı aşılmadığı sürece kuvvet ortadan kalktıktan sonra eski haline dönebilir. Kemik yapısının aksiyel kuvvetler karşısında direnci yüksek olmasına rağmen rotasyonel kuvvetlere direnci azdır (Ward ve ark., 2005).

2. 1. 1. Kemik Hücreleri

Kemikte osteoblast, osteosit, osteoklast ve osteoprogenitör hücreler olmak üzere dört tip hücre bulunmaktadır (Şekil 2. 1. 1).



Şekil 2. 1. 1. Kemik hücreleri (Arun'dan, 2004)
Paratiroid hormon (Parathyroid Hormone, PTH), Kalsitonin (Calcitonin, CT)

2. 1. 1. 1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik matriksini depolarlar ve endosteal osteoblastlar ve periosteal osteoblastlar olarak görev yaparlar. Periosteal osteoblastlar kemiğin dış yüzeyinde periostun altında bulunurken endosteal osteoblastlar kemik içerisinde vasküler kanallarda sıralanırlar. Olgun osteoblastlar kemik matriks proteinlerinin üretiminden sorumludurlar. Kemik birikimi birkaç ay boyunca aktif büyüme alanında dairesel olarak osteoblastların çökmesi ile devam eder. Yeni oluşan kemik matriksinin minerilizasyonuna ek olarak osteoblastlar aynı zamanda fosfolipid ve proteoglikanlar gibi diğer matriks bileşenlerini de üreterek minerilizasyon sürecinde önemli bir rol oynarlar (Arun, 2004). Kemik yapımının kontrolünü sağlamak üzere paratiroid hormon (aktif Vitamin D₃), glukokortikoid ve östrojen reseptörleri bulundurlar (Miller, 1996).

2. 1. 1. 2. Osteositler

Osteoblastlar kemik matriksini oluşturduktan sonra onun içerisine gömülerek osteosit hücrelerine dönüşürler. Osteositler matriks lamelleri arasında bulunan lakünler içerisinde yerleşmişlerdir. Her lakünde sadece bir osteosit bulunur. Komşu osteositler stoplazmik uzantılarının birbirleri arasında yaptıkları hücre bağlantıları ile temas oluşturup, besin maddelerinin bu yapılar aracılığıyla hücreden hücreye geçişini sağlarlar. Osteositler, osteoblastlara oranla yassı elips şeklindedir. Bu hücreler kemik matriksinin devamlılığında rol alırlar (Junqueira ve ark., 1998).

2. 1. 1. 3. Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik rezorbsiyonundan sorumlu olan hücrelerdir ve aktiviteleri paratroid hormon tarafından kontrol edilir. Osteoklastlar histolojik olarak geniş ve çok nükleuslu (50 çekirdekli) dev hücrelerdir (Arun, 2004). Bu hücreler kemik rezorbsiyonunun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış Howship lakünü adı verilen çukurcuklarda bulunurlar (Erdoğan ve ark., 1999). Hücre zarlarının özel bir bölgesi rezorbe olabilmesi için kemik yüzeyine bitişik bulunmaktadır. Bu bölge kıvrımlı kenar olarak bilinir ve osteoklastlardan kemiğe doğru uzanan villus benzeri görüntüden oluşmaktadır. Bu girinti ve çıkıntılar hücre membranı ile kemik yüzeyi arasında sıkı bir temas sağlamaktadır. Kemik rezorbsiyonu, organik kemik matriksini çözen veya sindiren proteolitik enzimleri ve kemik hücrelerini öldüren asitleri salgılayan bu

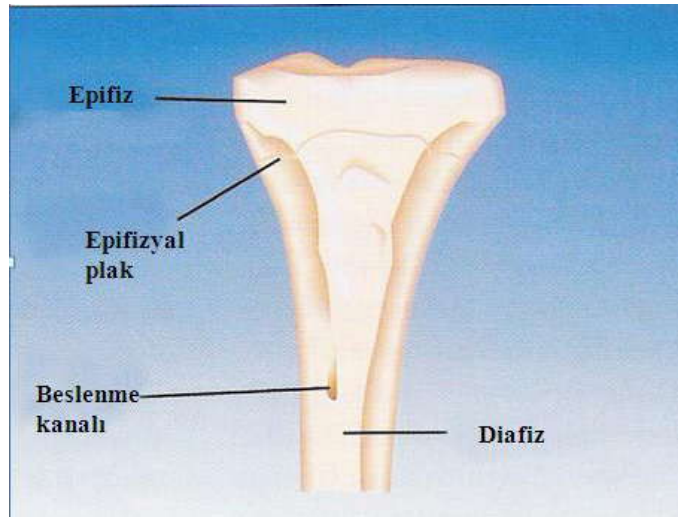
kıvrımlı bölgede meydana gelir. Osteoklastlar fagositoz yolu ile aynı zamanda kemik matriksinin minik partiküllerini ve kristallerini absorbe ederler ve sonuçta onları çözerler, ortaya çıkan ürünleri de kan dolaşımına bırakırlar (Arun, 2004).

2. 1. 1. 4. Osteoprogenitör hücreler

Osteoprogenitör hücreler periosteumun iç hücre katmanı, Havers kanalları ve endosteuma yerleşmişlerdir. Embriyonal olarak mezenkimden gelişirler. Mitozla çoğalarak osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoprogenitör hücreler iğ şeklinde ve oval çekirdekli dirler. Bu hücreler kemik büyümesi sırasında son derece aktif hale geçerler (Erdoğan ve ark., 1999).

2. 1. 2. Kemik'in Makroskobik Yapısı

Kemik dokusu tübüler ve yassı kemikler olmak üzere iki ana yapısal gruba ayrılır. Tübüler kemikler normal yük taşıma ve hareket fonksiyonunu sağlarlar. Kafatası gibi yassı kemikler ise canlı yumuşak dokuları korurlar. Anatomik olarak tübüler kemikler, merkezi (diafiz) ve uç kısım (epifiz) veya sekonder ossifikasyon merkezini içerirler. Diafiz ve epifizin birleşme noktasına epifizyal plak denir ve burası başlıca büyüme alanıdır. Bu bölge normal uzunlamasına büyümenin olduğu yerdir. Yassı kemiklerin epifizyal plakları yoktur (Şekil 2. 1. 2) (Ward ve ark., 2005).

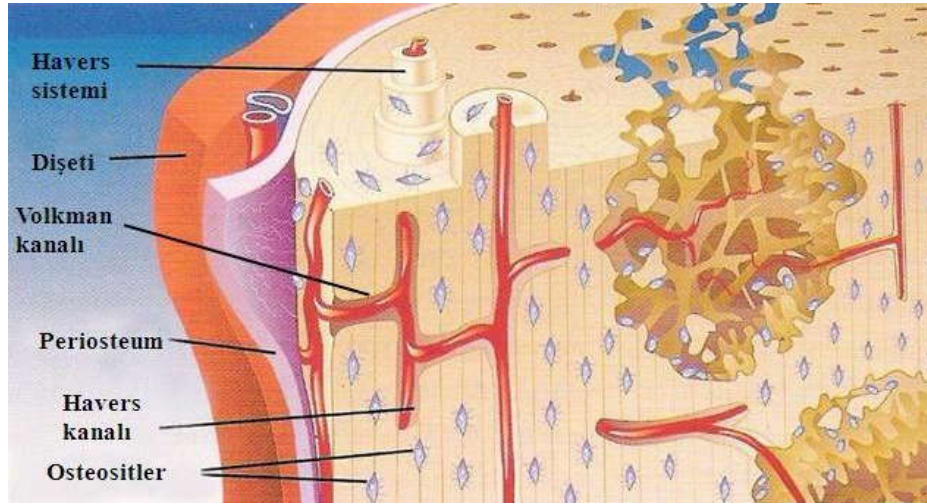


Şekil 2. 1. 2. Kemik'in makroskobik yapısı (Arun'dan, 2004)

İnsan iskeleti porozitesine bağı olarak iki farklı tür dokudan oluşmaktadır; bunlar yoğun kortikal doku ve spongiöz kansellöz dokudur. Temel olarak kemiğin porozitesi % 0-100 oranında devamlı olarak değişmekte; bununla birlikte birçok bölgede çok düşük veya çok yüksek porozite bulunabilmektedir. Çoğu vakada hem kortikal hem de kansellöz doku kemiğin her bölgesinde bulunmuştur; fakat miktarları ve dağılımları farklı olabilmektedir. Kemik içerisinde mineralize olmamış boşluklarda ilik bulunmaktadır ve bu doku kan damarları, sinirler ve çeşitli tipte hücreler içermektedir. İliğin esas fonksiyonu kandaki temel hücreleri üretmektir (Arun, 2004).

2. 1. 2. 1. Kompakt Kemik

Tüm vücuttaki kemiğin % 85'ini oluşturan kortikal veya kompakt kemik, uzun kemiklerin aksında bulunur ve diğer spongiöz kemiklerin etrafında bir kabuk oluşturur. Bu doku kemik silindirlere içinde olan ve havers sistemi olarak adlandırılan merkezi bir kan damarı ile birleştirilmiştir. Havers kanalları birbirlerine bağı kapiller kanalları ve sinirleri kapsarken kemiğin dış yüzeyine kısa ve transvers yönde Volkman kanallarıyla bağlantılıdır (Şekil 2. 1. 3) (Arun, 2004).



Şekil 2. 1. 3. Havers kanallar sistemi (Arun'dan, 2004)

Kompakt kemik lameller düzenlenişine göre üç çeşittir:

- **Havers Lamelleri:** Havers kanallarının çevresinde iç içe yerleşmiş halkalar şeklindedirler. Ortadaki Havers kanalı ile bunu çevreleyen özel lameller bir sistem olarak kabul edilir. Bu sisteme Havers Lameller Sistemi veya osteon

denir. Kompakt kemikte dokunun çoğunluğunu osteonlar oluşturur. Osteonlar homojen yapıda ve sement çizgisi denilen ince bir madde ile çevrilmiştir.

- **Ara Lameller:** Osteonların aralarında kalan alanları dolduran değişik çapta, düzensiz üçgen biçimli lamellerdir.
- **Sirkumferansiyel Lameller:** Kompakt kemiklerin dış yüzeyinde, periostun altında iç yüzeyde, endosteuma yakın üst üste daireler şeklinde bulunan lamellerdir (Junqueira ve ark., 1998; Erdoğan ve ark., 1999).

2. 1. 2. 2. Spongiöz Kemik

Spongiöz kansellöz kemik tüm vücuttaki kemiklerin yaklaşık % 15'ini oluşturur, uzun kemiklerin sonunda, kübik ve düz kemiklerde bulunur. Bu kemiklerin boşlukları kemik iliği ile doludur. Kemik matriksi trabekül adı verilen tabakalardan oluşmuştur ve kimi zaman dik açılı bir dizilim gösterse de genelde rastgele dizilmişlerdir. Medullar kaviteleri kemik iliği ile doludur (Arun, 2004).

2. 1. 2. 3. Periost ve Endosteum

Eklem yüzeyleri dışındaki kemiklerin dış yüzeyleri periost adı verilen fibröz bir kılıf ile örtülüdür. Bu tabaka dış fibröz tabaka ve kambiyum denilen iç fibröz tabaka olarak ikiye ayrılır (Nishimura ve ark., 1997). Dıştaki tabaka az miktarda fibroblast içeren düzensiz sıkı bağ dokusundan yapılmıştır. İçteki tabaka ise hücrelerden zengindir. Bu hücrelerin çoğu osteoprogenitör hücrelerdir. Gelişmekte olan kemik dokusunun yüzeyindeki hücreler, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasıyla oluşmuş osteoblastlardır. Kemik yapımı ve onarımı sırasında iç tabaka aktif olarak görev yapar. Olgunlaşan kemiklerde çok ince olan periosteum, alttaki kemik dokusuna Sharpey lifleri ile sıkıca yapışık şekildedir. Bu lifler dış tabakadan ayrılan kalın kollajen demetlerdir. Kemik dokusuna girerek yüzeye yakın ara lamellerin derinliklerine kadar iner ve böylece periosteumu kemiğe bağlarlar.

Kompakt kemiklerin iç yüzeyleri ve spongiöz kemik trabekülleri endosteumla örtülüdür ve retiküler bağ dokusundan yapılmıştır. Endosteumun kemik dokusuna bakan yüzeyinde tek sıra halinde osteoprogenitör hücreler bulunur. Kemik onarımında bu hücreler bölünerek osteoblastlara dönüşürler (Erdoğan ve ark., 1999; Fawcett ve Bloom, 1994).

2. 1. 3. Kemiğin Mikroskopik Yapısı

Mikroskopik seviyede kemiğin örgü kemik, kompozit kemik, lameller kemik ve işsi kemik olmak üzere 4 tipi vardır.

Örgü kemik çok çabuk oluşması nedeni ile (yaklaşık 30-60 mm/gün) iyileşmede temel bir rol oynar, ancak düzensiz bir yapıdadır ve lameller yapı ile Havers sistemine sahip değildir. Dolayısıyla yumuşaktır, biyomekanik gücü çok azdır ve uzun süre dayanıklı değildir. İyileşme sırasında örgü kemik, faz 1 kemik olarak nitelendirilir. Çok çabuk rezorbe olarak yerini faz 2 kemik olarak nitelendirilen olgun lameller kemiğe bırakır.

Kompozit kemik, örgü kemik (faz1) ve lameller kemik (faz2) arasındaki geçiş aşamasıdır.

Lameller kemik vücuttaki en bol, olgun, dirençli ve güçlü kemiktir. Bu tipteki kemik yavaş oluşur (0.6-1mm/gün) ve iyi yapılanmış kollajen protein ve mineralize yapıya sahip olup çok tabakalı bir yapı gösterir.

İşsi kemik; ligamentler ve eklemler etrafında bulunur. Ligamentler arasında çizgisel bağlantılar oluşturmaktadır (Arun, 2004).

2. 1. 4. Kemiğin Moleküler Yapısı

Kemik dokusu, matriks adı verilen hücreler arası madde ile hücrelerden meydana gelir. Matriks hücrelere göre daha geniş bir alanı kaplar ve organik matriks ve inorganik matriks olmak üzere iki bölümde incelenir (Soydan, 1992).

2. 1. 4. 1. Organik Matriks

Organik matriks kemiğin formunu verir ve inorganik tuzların şekillenmesini sağlar. Organik matriks erişkinlerde kemik ağırlığının % 25'ini, hacim olarak da % 38'ini meydana getirir (Soydan, 1992; Ward ve ark., 2005). Organik kemik matriksini oluşturan maddeler şunlardır:

- **Kollajen:** Organik matriksin % 90'ını oluşturur. Temel olarak tip I kollajen kemikte bulunan esas kollajendir. Kollajen, kemiğe gerilme kuvveti ve esneklik sağlar. Kollajenin üçlü heliks yapısında bulunan mikroporlardan içeri sızan kalsiyum bileşikleri kemiğin minerilizasyonunu sağlar.

- **Proteoglikanlar:** Glikozaminoglikan-protein komplekslerinden oluşur ve kemiğin sıkıştırma kuvvetine katkıda bulunur.
- **Kollajen dışı matriks proteinleri:** Bu grupta bulunan proteinlerin başlıcaları osteokalsin, osteonektin ve osteopontindir. Osteoblastlar tarafından salgılanan osteokalsin, osteoklastları aktive eder ve kemik yoğunluğunun kontrolünden sorumludur. Kollajenden sonra matrikste en çok bulunan proteindir (% 10-20). Osteonektin, trombositler ve osteoblastlar tarafından salgılanan bir proteindir. Görevinin kalsiyum regülasyonu ve matriks minerilizasyonunun organizasyonu olduğu öne sürülmektedir. Osteopontin ise hücrelerin birbirlerine tutunmasını sağlayan integrin benzeri bir proteindir.
- **Büyüme faktörleri ve sitokinler:** Kemikte az miktarda bulunan bu maddeler hücre farklılaşması ve aktivasyonundan, büyüme ve kemik döngüsünden sorumludurlar. Kemikte bulunan bu maddelerin başlıcaları; dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor beta, TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like Growth Factor, IGF), interlökinler (Interleukin, IL) ve kemik morfojenik proteinleri (Bone Morphogenic Protein, BMP) olarak sıralanabilir (Turner, 2006).

2. 1. 4. 2. İnorganik Matriks

İnorganik matriks kemiğin kuru ağırlığının % 65'ini oluşturur (Soydan, 1992). İçeriğinde özellikle kalsiyum ve fosfor fazla miktarda bulunur. Ayrıca bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum bulunmaktadır (Junqueira ve ark., 1998). En sık karşılaşılan inorganik tuz kristali hidroksilapatittir. Mineral kristaller 25-75 nm çapında ve yaklaşık 200 nm uzunluğunda oldukça küçük boyutlardadırlar. Bu özellik çok büyük bir yüzey-hacim oranı sağlar. Kristallerin yüzeyini bir su tabakası çevreler bu tabakaya hidrasyon kabuğu adı verilir. İyonlar hidrasyon kabuğu ile kristal yüzey arasında serbestçe hareket edebilirler. Bu da kemik kristallerinin kollajen içerisinde özel bir model olduğunu gösterir (Ward ve ark., 2005).

2. 1. 5. Kemik Oluşumu

Kemik, intramembranöz ve endokondral kemikleşme olmak üzere iki yolla meydana gelir.

2. 1. 5. 1. İntramembranöz Kemikleşme

Mezenkimal doku yoğunlaşmaları içinde olduğu için bu adı almıştır. Kafatasının yassı kemikleri, mandibula ve maksillanın bazı kısımları, kısa ve uzun kemiklerin kompakt bölümleri bu tür kemikleşme ile oluşur. İntramembranöz kemik oluşacak alanlarda mezenkim hücreleri hızla bölünerek osteoprogenitör hücreleri yaparlar. Bu hücreler de bölünerek osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar kollajen lifleri ve kendilerinin de içinde bulunduğu temel maddeyi sentezlerler. Kapiller damarlardan çıkıp osteoid dokuya giren kalsiyum ve fosfor iyonları buradaki osteoblastların salgıladığı alkali fosfatazın aracılığı ile kalsiyum fosfat moleküllerini oluştururlar. Böylece osteoid doku mineralize olup primer kemik dokusu halini alır.

Değişik şekil ve büyüklükteki bu kemik parçacıklarına kemik trabekülü denir. Trabeküller içindeki osteoblastlar ara maddeyi salgılayarak osteoid haline gelirler. Şekillenen trabeküllerin yüzeylerinde yeniden oluşan osteoblastlar tek sıra dizilerek kemik lamellerini yapmaya başlarlar ve primer kemik trabeküllerinin yüzeyinde sekonder kemik yapısında katmanlar oluşur. Böylece spongiöz kemik dokusu biçimlenir. Osteoklastlar da bu kemikleri iç yüzeyden rezorbe ederler. Spongiöz kemikler son şekillerini aldıklarında primer kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar. Geriye sadece sekonder kemik trabekülleri kalır. Daha sonra bu kemiklerin iç ve dış yüzeylerine intramembranöz yolla bir miktar kompakt kemik eklenir ve kemikleşme sona erer. Trabeküllerin arasındaki mezenkim dokusundan da kırmızı kemik iliği şekillenir (Erdoğan ve ark., 1999).

2. 1. 5. 2. Endokondral Kemikleşme

Meydana getirilecek kemiğin şekline benzeyen hyalin kıkırdaktan oluşmuş küçük bir model içerisinde meydana gelir. Uzun ve kısa kemikler bu yolla oluşurlar. Temel olarak endokondral kemikleşme iki aşamada gerçekleşir. İlk aşama, kemik modelindeki kondrositlerin hipertrofisi ve dejenerasyonudur. Bundan sonra geriye kalsifiye kıkırdak matriksi septalarının birbirinden ayırdığı genişlemiş lakünler kalır. İkinci aşamada, osteoprogenitör hücreler ve kan kapillerlerinden oluşan osteojenik tomurcuk, dejenere olmuş kıkırdak hücrelerinden geriye kalan alanlara girer. Osteoprogenitör hücreler, kıkırdağımsı septumun üstünü kemik matriksi ile kaplayan osteoblastlara dönüşür. Böylece kalsifiye kıkırdak dokusu septumları, kemikleşmenin

başlamasına yardımcı olur. Yeni meydana gelen kemik yapısının içinde kalan kondrositler dejenere olur, kırıkta matriksinin devamlılığını sağlama yetenekleri de ortadan kalkar. Kalsiyum çökmeye başlar ve kırıkta matriksi kalsifiye olur.

Her iki yolla da ilk ortaya çıkan kemik dokusu primer veya olgunlaşmamış kemik dokusudur. Kısa bir süre sonra bu dokunun yerini sekonder kemik dokusu alır. Kemiğin sentezi ve ortadan kaldırılışı sadece büyüyen kemiklerde olmayıp yetişkinlerde de hızını oldukça azaltarak hayat boyu devam eder (Junqueira ve ark., 1998).

2. 1. 6. Kırık iyileşmesi

Kırık onarımı, kemik defektlerinin onarımı için bir model olarak ele alınabilir (Cotran ve ark., 1996). Kırık iyileşmesi normalde 6-8 hafta içinde tamamlanan bir olaydır. Kemik defektlerinin onarımı mekanik faktörlerden ve kanlanma bozukluğundan kırık iyileşmesine göre daha az oranda etkilenmektedir.

Kırık kemik iyileşmesi iki farklı yöntemle oluşur. Bunlar primer kemik iyileşmesi ve sekonder kemik iyileşmesidir (Frost, 1989).

2. 1. 6. 1. Primer kemik iyileşmesi

Genellikle hareketin olmadığı mekanik stabilizasyona gerek olmadan meydana gelir. Primer iyileşmenin ana özelliği olarak ve sekonder iyileşmeden farklı olarak ne kortikal kemikte, ne de kansellöz kemikte eksternal kallus oluşumu gözlenmez (Allgower ve Spiegel, 1979). Primer kemik iyileşmesi kırık uçlarında mutlak temasın bulunduğu temas iyileşmesi ve kırık uçlarında dar bir boşluğun bulunduğu aralıklı iyileşme olarak ikiye ayrılır.

Aralıklı iyileşmenin ilk aşamasında boşlukta doğrudan örgü kemik yapımı gerçekleşir. Bu örgü kemik yerini kemiğin uzun aksına dik oryantasyonlu lameller kemiğe bırakır. Birkaç hafta sonra başlayan haversian remodelling fazı boşluktaki uyum sağlamayan kemikle birlikte kırık uçlarındaki nekrotik kemiği düzgün oryantasyonlu lameller kemikle yeniler. Aralıklı iyileşmenin sonunda kemik kırıktan önceki formuna kavuşmuş olur.

Temas iyileşmesinde ise kırık uçlarındaki mutlak temas, osteonların bir kırık ucundan diğerine kemiğin uzun aksına paralel doğrultuda direkt olarak atlayabilmesine olanak tanır (Lane, 1987). Osteonların bir uçtan diğerine devamlılığını osteoklast

aktivitesi sağlar ve bu işleme tünelleme denir. Oluşan bu tüneller içine büyüyen yeni damarlar ve onlarla gelen osteoblastlar sayesinde kırık hattında yeni haversian sistemler oluşur. Temas iyileşmenin sonunda da kemik kırıktan önceki formuna dönüşür (Thomas, 1998).

2. 1. 6. 2. Sekonder Kemik İyileşmesi

Kemik defektlerinde kullanılan tedavi yöntemlerinin çoğunda kemik iyileşmesi sekonder iyileşme şeklindedir. Sekonder iyileşmenin birbirini takip eden dört evresi vardır. Bunlar; hematoma oluşumu fazı, kırıkta kallus oluşumu fazı, kemik kallus oluşumu fazı ve yeniden yapılanma (remodeling) fazıdır (Ward ve ark., 2005).

- **Hematoma oluşumu fazı;** kemik defektleri meydana geldiğinde kan damarları ve etrafındaki dokulardaki hasar sonucunda kan miktarında azalma olur. Buna bağlı olarak defekt yüzeyinde hipoksi ve hücre ölümü meydana gelir. Hücre ölümü sonucunda kemik uçlarında nekroz ve bu aseptik nekroz sonucunda enflamasyon ve ödem oluşur (Buser ve ark., 1994; Ward ve ark., 2005). Enflamasyon 48. saatte pik yapar ve kırık sonrası birinci haftanın sonunda hemen hemen sona erer. Damar ve dokulardaki hasar sonucu oluşan kanama ile de hematoma meydana gelir. Yara yüzeyinde oluşan kan pıhtısı iyileşmeye katkıda bulunan kan kaynaklı elementler içerir. Hematom içerisinde vaskularize olan kemik ve kas parçaları fibrözleşirler. Küçük kemik parçaları periosttan ilerleyen hücreler için yüzeysel depozisyona uygun ortam yaratırlarken ölü kemik iliği yağlı dejenerasyona uğrar (Ham ve Cormack, 1979; Paul, 1968; Ward ve ark., 2005). Enflamatuvar yanıt ve hematoma oluşumu hücresel çoğalmanın başlangıcını oluşturur. 8-12 saat içerisinde periostum kambiyum tabakasındaki hücrelerde DNA sentezi ve çoğalma başlar. Bu süreçte farklılaşan hücrelerin osteoblastlara, fibroblastlara ve kondrojenik potansiyeli olan hücrelere farklılaşma kabiliyetleri vardır. Kapiller oluşum başlar ve takiben fibroblastlar kollajen salgırlar. Kollajen oluşumu ve zengin kapiller ağ granülasyon dokusunu meydana getirir (Fonseca ve Davis, 1995; Ward ve ark., 2005).
- **Kırıkta kallus oluşumu fazı;** kırıkta kallus oluşumu iki yolla olur. Eksternal yol; kırıkta kalsifiye olması ile kondroblastlar kondrositlere

dönüşürler. Osteoblastların sayısı artar ve osteoklastlar görülür (Buser ve ark., 1994). İnternal yol; kallus endosteum kaynaklı osteoblastlar tarafından eksternal kallus ile aynı zamanda, kırık uçları arasında oluşur. Bu bölgede fibrokartilaj yoktur ve kanlanma daha fazla olduğu için nekroz azdır (Paul, 1968).

- **Kemik kallus oluşumu fazı;** kırıkta kallus içerisinde artan damarlanma sonucu bölgeye daha fazla oksijen ve besin taşınır. Bu da ortamda osteoblastların oluşmasını sağlar. Oluşan osteoblastların osteoid madde salgılaması ile periferden merkeze doğru kalsifikasyon sonucu kemik oluşur. Kemik kallus fazında oluşan kemik primer kemiktir (Paul, 1968; Buser ve ark., 1994).
- **Yeniden yapılanma fazı;** primer kemik yapısı düzensizdir ve lameller kemik değildir. Primer kemik uzun bir süreç olan yeniden yapılanma fazı sonucunda düzgün lameller kemiğe dönüşür. Yeniden yapılanma döneminde salgılanan BMP gibi faktörler olayları yönlendirir. Osteoklastlar ise kemiği rezorbe ederek bu sürece katılırlar (Ham ve Cormack, 1979; Buser ve ark., 1994).

2. 1. 7. Kemik Greftleri

Kraniomaksillofasiyal uygulamalarda; tümör cerrahisi sonrası defektlerin onarımında, ileri cerrahi işlemler sırasında, mandibulanın konjenital anomalilerinde, gelişimsel mikrognatide, atrofik çene kemiklerinin yükseltilmesinde, ağır maksiller uyumsuzlukların ve orta yüz yetersizliklerinin giderilmesinde, travma sonrası gelişen kemik defektlerinde ve konvansiyonel olarak ortognatik cerrahide çeşitli kemik greftleri veya kemik yerine geçen biyomateryaller kullanılmaktadır (Hollinger ve ark., 1996)

Kemiğin içinde veya kenarında bulunan ve yeni kemikle dolması gereken bölgeler olarak tanımlanan kemik defektleri kemik dokusunun kendisini yeniden şekillendirme özelliğiyle iyileşmekle birlikte, bu mekanizmanın yetersiz kaldığı durumlarda yeni kontür sağlanması ve kemik iyileşmesinin desteklenmesi amacıyla kemik greftlerinin kullanımı gerekmektedir (Aaobe ve ark., 1995; Bernard, 1991).

Greftler, uygulandıkları bölgede üç şekilde yeni kemik oluşumunu sağlamaktadırlar. Bunlar osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osteogenez olarak sıralanır. İdeal greft materyali bu özelliklerin hepsini içermelidir (Archer, 1975).

Osteoindüksiyon, greft içindeki büyüme faktörlerinin (başlıca BMP), alıcı dokudaki mezenkimal kök hücrelerini kemik veya kıkırdak sentezi yapacak şekilde farklılaştırma yeteneğidir.

Osteokondüksiyon, orijinal kemik dokusunun porozitesinin stimülasyonu yoluyla greftin kapiller damarların, perivasküler dokuların ve osteojenik hücrelerin greft içine infiltrasyonuna izin vermesi olarak açıklanabilir. Bu özellikleri sağlayacak matriksin canlı olması gerekli değildir, ancak biyouyumlu olması ve gerçek kemiğin porozite özelliklerini mümkün oldukça sergilemesi gerekmektedir (Burchardt, 1983).

Osteojenik özellik ise greftin osteoblastik farklılaşma kapasitesine sahip mezenkimal kök hücrelerini barındırmasıdır. Bu hücreler greft yerleştirildikten sonra stimüle olarak osteoblastik dönüşüm gösterirler ve yeni kemik oluşturmaya başlarlar (Burchardt, 1983; Finkemeier, 2002).

Kemik greft materyallerini dört ayrı grupta inceleyebiliriz. Bunlar otojen, allojen, ksenojen ve alloplastik greftler olarak isimlendirilir.

2. 1. 7. 1. Otojen Greftler

Bir bireyin vücudunun bir bölgesinden alınıp diğer bir bölgesine uygulanan greftlere otojen greftler denir (Klokkevold ve Jovanovic, 2002). Greft olarak seçilen kemiğe göre kansellöz, kortikal veya kortikokansellöz; vasküler kaynağın nakledilişine göre vaskularize ve vaskulerize olmayan kemik grefti gibi alt gruplara ayrılabilir (Stevenson, 1998).

Otojen kemik grefti, iliak krest, kalvarium, temporal kemik, maksilla, nasal septum, skapula, kaburga ve uzun kemikler gibi birçok yerden elde edilebilir (Kornblut ve ark., 1982). İliak krest, kemik kalitesi ve elde edilen kemik miktarı açısından en sık seçilen bölgedir (Giannoudis ve ark., 2005).

Otojen greftler değişik oranlarda osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osteogenez özelliklerine sahiptir. Günümüzde en fazla tercih edilen greft materyali olan otojen greft bu özelliklerin hepsini taşıması ile greft kullanımında altın standart olarak kabul edilmiştir (Cypher ve Grossman, 1996).

Otojen greftlerin avantajları;

- Osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, osteogenez özelliklerine sahiptir.
- İmmün cevaba neden olmazlar.

- Erken revaskularize olurlar.
- Düşük enfeksiyon oranına sahiptirler.

Otojen greftlerin dezavantajları;

- İkinci bir operasyon gerektirirler.
- Alınan parçanın büyüklüğü sınırlıdır.
- Hastane şartları gerektirir.
- Donör sahada post-operatif ağrı, kanama, sinir zedelenmesi, enfeksiyon ve estetik sorunlar gibi komplikasyonlar oluşabilmektedir (Lane ve Sandhu, 1987).

2. 1. 7. 2. Allojen Greftler

Aynı cins canlıdan alınıp, dokuları arasında benzerlik olmayan başka bir canlıya uygulanan greftlere allojen greftler denir (Mankin ve ark., 1996). Allojen greftler taze dondurulmuş, dondurulmuş ve kurutulmuş, kortikal veya kansellöz kemik olmak üzere alt gruplara ayrılabilir.

Taze dondurulmuş kemik hazırlanışı esnasında osteoindüktif proteinleri zarar görmez fakat immün cevaba ve bulaşıcı hastalıklara neden olabileceğinden dolayı kullanımı nadirdir (Friedlaender ve ark., 1999). Doku bankalarında muhafaza edilen allogreftler soğutma, dondurma, dondurarak kurutma, kaynatma, otoklavlama, deproteinizasyon, demineralizasyon gibi aşamalardan geçirilmektedir. Günümüzde en fazla tercih edilen yöntem dondurularak kurutmadır (Akal, 1995). Dondurulup kurutularak kan ve hücrel içeriğinin uzaklaştırılmasıyla immün cevap azaltılırken diğer bir yönden osteojenik özellik kaybolmaktadır (Giannouidis ve ark., 2005). Dondurularak kurutulmuş allogreftlerin demineralize ve demineralize olmayan iki tipi mevcuttur (Grimes, 1994). Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik, asit uygulaması ve liyofilizasyondan dolayı BMP içerir ve osteoindüksiyon özelliğini kaybetmez (Perrott ve ark., 1992).

Allojen greftlerin avantajları;

- İstenilen miktarda elde edilirler.
- Donör bölge ihtiyacı yoktur ve buna bağlı olarak ikincil cerrahi gereksinimi ortadan kalkar.

Allojen greftlerin dezavantajları;

- Osteogenez için canlı hücre barındırmazlar.
- İmmün cevaba neden olabilirler.
- Bulaşıcı hastalıkları (HIV, HBV, HCV) taşıma riski vardır.
- Pahalıdırlar (Peterson ve ark., 1998; Boyce ve ark., 1999).

2. 1. 7. 3. Ksenojen Greftler

Bir türden başka bir tür canlıya nakledilen greftlere ksenojen greftler denir. Osteokondüktif özelliklere sahiptir (Ward ve ark., 2005). Bu greftin antijen özellikleri allojen greftlere oranla daha fazladır. Ksenojen greftin organik matriksi insan kemiğinden farklıdır. Bu nedenlerden dolayı etkili bir şekilde kimyasal işlemlerden geçer (Kornblut ve ark., 1982). Ksenojen greftlerde allojen greftler gibi dondurma, liyofilizasyon, deproteinizasyon ve irradyasyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra kullanılır (Mulliken ve ark., 1981). En genel kullanılan ksenojen greft inorganik sığır kemiğidir (Kökden ve Türker, 1999).

Ksenojen greftlerin avantajları;

- Geniş miktarda elde etmek mümkündür.
- İkincil bir cerrahi gerektirmemektedir.

Ksenojen greftlerin dezavantajları;

- İmmün cevaba neden olabilirler.
- Pahalıdırlar (Peterson ve ark., 1998).

2. 1. 7. 4. Alloplastik Greftler

Sentetik olarak elde edilen ve uygulandığı doku ile genetik benzerlik durumu bulunan greftlere aloplastik greftler denir (Akal, 1995). İdeal sentetik kemik grefti biyouyumlu olmalı, minimal fibrotik reaksiyon göstermeli, remodelinge maruz kalmalı ve yeni kemik oluşumunu desteklemelidir. Sentetik kemik greftleri mekanik açıdan yerine konulduğu kortikal veya kansellöz kemiğe benzer güce sahip olmalıdır. Bununla birlikte kemiğin sahip olduğu elastisite modülüne benzer bir yapıya sahip olup kemiğe gelen streslere karşı yeterli dirençleri gösterebilmelidir (Moore ve ark., 2001).

Alloplastik greft materyallerine trikalsiyum fosfat, hidroksilapatit, doğal mercandan elde edilmiş koral, poliortoester, poroz hidroksilapatit, rezorbe olmayan hidroksilapatit ve siman örnek olarak verilebilir (Akal, 1995).

Alloplastik greft materyalleri istenilen boyut ve şekilde üretilebilmektedir. Bu greft türleri biyouyumlu olup osteokondüktif özelliğe sahiptirler ve kolaylıkla steril edilebilirler (Behairy ve Jasty, 1999).

Alloplastik greftlerin avantajları;

- Elde edilebilirliği kolaydır.
- Donör bölgenin morbiditesi söz konusu değildir.
- Çeşitli boyutlarda ve miktarlarda elde edilebilir.
- Operasyon süresi daha kısadır.

Alloplastik greftlerin dezavantajları;

- İmmün cevap oluşabilir.
- Enkapsülasyon görülebilir.
- Enfeksiyon riski vardır.
- Kemik rezorpsiyonu oranı yüksektir (Moore ve ark., 2001).

Günümüzde greft materyaline osteoindüktif özellik kazandıracak kemik iliği aspiratı, hücre kültürü ve büyüme faktörleri gibi teknolojilerden faydalanılabilmektedir.

Kemik iliği aspiratı donör saha morbiditesi oluşturmaması ve kan kaybına yol açmaması nedeniyle hastalar tarafından tolere edilebilen bir işlemdir (Connolly ve ark., 1989). Kemik iliği aspiratının demineralize kemik matriksi, mercan kaynaklı hidroksilapatit, trikalsiyum fosfat veya hidroksilapatit kaynaklı sentetik greft materyalleri ile kullanımının olumlu etkiler meydana getirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Burwell, 1985; Morrison ve ark., 1995).

Hücre kültürleri osteoprogenitör hücre konsantrasyonunu arttırmak için tercih edilen teknolojilerdendir. Bu işlemin in vitro ortamda yaklaşık bir ayı bulması ve pahalı olması bazı dezavantajlarıdır.

Büyüme faktörleri ise özellikle osteoindüktif özelliği olmayan greft materyallerine osteoindüktif özellik potansiyel kazandırmak için kullanılabilmektedir. Bu faktörlerden BMP, TGF- β ve fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor,

FGF) kadavradan özütlenebileceği gibi rekombinant olarak da sentezlenebilmektedir. Maliyet açısından tüm greftlere ve greft alternatiflerine göre pahalı olması dezavantajdır (Bruder ve ark., 1994).

Günümüzde en çok kullanılan greft tipleri ve bazı ticari isimleri Tablo 2. 1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2. 1. Kemik ve kemik benzeri materyallerin kaynakları, örnekler ve bazı ticari isimleri

Greft Tipi	Kaynağı	Örnekler ve Bazı Ticari İsimleri
Otogreft (Otojen)	Bireyin kendisinden	İliak kemik Mandibula simfiz ve ramus Torus Kaburga ve tibial alan Kalvaryum
Allogreft (Allojen)	Aynı türden	DFDBA → Grafton [®] , Allogro [®] , OrthoBlast [®] FDBA Taze dondurulmuş kemik Işınlanmış kansellöz kemik
Ksenogreft (Ksenojen)	Farklı türden	Kollojen Kemik HA → Bio-Oss [®] , Osteograf N [®] , PepGen P-15 [®]
Alloplastik Greft	Kimyasal bir madde	TCP → Cerasorb [®] , Poresorb [®] Kalsiyum karbonat → Biocoral [®] Seramik HA → Osteograf D [®] , Interpore [®] , Osteogen [®] HA ve β-TCP → 4BONE [®] Biyoaktif Camlar → Bioglass [®] , Periogalss [®] Polimerler

Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (Demineralized Freeze Dried Bone Allograft, DFDBA), Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (Freeze Dried Bone Allograft, FDBA), Hidroksilapatit (Hydroxyapatite, HA), Trikalsiyum fosfat (Tricalcium Phosphate, TCP)

2. 1. 7. 5. Beta Trikalsiyum Fosfat ve Hidroksilapatit

Beta trikalsiyum fosfat (β -TCP) kemik grefti olarak kullanılan ilk kalsiyum fosfat bileşenlerindedir. Albee ve Morrison (1920) segmental kemik defektine β -TCP enjekte edildiği takdirde kemik birleşim hızının arttığını bildirmişlerdir. β -TCP gözenekli veya katı formda olabildiği gibi granüllü veya blok şeklinde de bulunabilmektedir. Yapısal olarak gözenekli β -TCP'nin sıkıştırma direnci ve gerilme direnci kansellöz kemiğe benzemektedir (Jarcho, 1981). Diğer kalsiyum fosfat preparatları gibi çekme ve makaslamaya karşı kırılğan ve zayıf olup sıkıştırmaya karşı dirençlidir (Geesink ve De Groot, 1988). Genellikle granüler gözenekli formu kullanılmaktadır. Gözenekli granüller, fibrovasküler büyüme nedeniyle daha erken fikse olduklarından katı granüllere oranla ayrılmaya daha az eğilimlidirler (Byrd ve ark., 1993). β -TCP 6-18 aylık periyot boyunca çözünme ve parçalanma yoluyla reabsorpsiyona maruz kalırlar. Ancak β -TCP'nin kemik ile yer değiştirmesi eş zamanlı meydana gelmez. Bu nedenle reabsorbe olan β -TCP hacmine oranla daha az miktarda kemik üretilir. Bundan dolayı β -TCP klinik olarak diğer daha az reabsorbe olan kemik greftleriyle birlikte kullanılmaktadır (Hollinger ve ark., 1996).

Sentetik Hidroksilapatit (HA) 1970'lerde kullanıma sunulmuştur. Hidroksilapatit [$C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] kemiğin temel mineral bileşenini oluşturur. Sentetik HA seramik veya seramik olmayan formda gözenekli veya katı, blok veya granüler şekillerde bulunabilmektedir. HA kristalleri 700-1300°C'de ısıtılarak yüksek kristalin yapısı oluşturmaktadır. Seramik HA preparatları in-vivo olarak reabsorpsiyona dirençlidir (yılıda %1-2). Buna karşılık seramik olmayan HA in-vivo olarak daha çabuk reabsorbe olur ve aynı zamanda kendiliğinden semente edilebilen formları da mevcuttur. Sentetik HA'nın sıkıştırma direnci iyidir, ancak çekme ve makaslamaya karşı zayıftır. Kırılğandır ve yüklemelerde kırılmaya eğilimlidir. Katı blok formdaki sentetik HA'nın şekillendirilmesi zordur, fibro-osseoz büyümeye müsaade etmez ve kemiğe göre daha yüksek elastisite modülüne sahiptir. Gözenekli granüler formu ise tek başına kullanılabilirdiği gibi, boşlukları doldurmak için kemik grefti ile birlikte de kullanılabilirler. Sentetik hidroksilapatit, trikalsiyum fosfat ve bu ikisinin kombinasyonu en sık kullanılan greft materyalleridir (Moore ve ark., 2001).

2. 1. 7. 6. Demineralize Kemik Matriksi

Demineralize kemik matriksi (Demineralized Bone Matrix, DBM) kortikal kemiğin dekalsifikasyonundan üretilir. Bu işlemde potansiyel enfeksiyon ve immün cevabın önlenmesi amaçlanır. Üretilen materyal orijinal dokunun trabeküler kollajen yapısını sürdürür ve biyolojik osteokondüktif yapı olarak görev yapar. Kemik demineralizasyonu bütün kemik büyüme faktörlerini elimine etmez ve bu nedenle DBM, standart demineralize allogreftten daha osteoindüktiftir. DBM jel, biçimlendirilebilen macun, esnek stripler, kemik çipsleri içeren pat veya enjekte edilebilen kemik patları şeklinde tedarik edilebilir (Giannoudis ve ark., 2005).

2. 1. 7. 7. Sığır Kaynaklı İnorganik Kemik Matriks Materyali

Organik bileşenleri kimyasal olarak uzaklaştırılmış inorganik sığır kemiğidir (Arun, 2004). Bu kemik etilen diaminde 24 saat bekletilip organik komponentlerinden ayrıldıktan sonra kalsiyum matriks sterilize edilerek greft kullanıma hazır hale gelir (Kökden ve Türker, 1999). Materyal sterilize edildikten sonra immün cevaba sebep olmaksızın greft olarak kullanılabilir. Osteokondüktif yapıdadır ve zamanla fizyolojik remodelinge maruz kalır ve etrafını saran kemikle birleşir. İnorganik kemik yalnız kullanılacağı gibi periodontal defektler, implant etrafındaki dehisensler ve fenestrasyonlar gibi izole edilmiş lezyonlarda bariyer membranlarıyla birlikte kullanılabilir. Geniş alvaoler kret yetersizliklerinde başarılı ogmentasyon için inorganik kemik, otojen kemikle birlikte kullanılabilir. İnorganik kemik; kemik içi defektler, maksiller sinüs ogmentasyonu, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ve implant etrafı gibi çeşitli tedavilerde de kullanılmaktadır (Arun, 2004).

2. 2. Serbest Radikaller

Atomlardaki elektronlar orbital diye bilinen boşluklarda bulunurlar. Her orbital en fazla iki elektron tutabilmektedir. Serbest radikal bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip bağımsız bulunma yeteneğindeki herhangi bir atom ya da moleküldür (Halliwell ve Chrigo, 1993). Başka bir ifadeyle serbest radikaller, negatif yüklü elektron sayısının pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküllerdir.

Serbest radikaller ortak kullanılmayan elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler (Akkuş, 1995). Radikal oluştuğunda ya diğer radikallerle ya da radikal

olmayan moleküllerle reaksiyona girer. Eğer iki radikal karşılaşırsa eşlenmemiş elektronlarını paylaşırlar ve kovalent bağ oluştururlar. Bununla birlikte biyolojik moleküllerin çoğu radikal değildir. Bir radikal bir elektron verdiğinde elektronu alan radikal olmayan molekül radikal olur. Serbest radikallerin radikal olmayanlarla zincir reaksiyonu sonucu, bir radikal diğer bir radikalın oluşumuna sebep olur (Halliwell ve Chirico, 1993).

Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türlerinin yaşayan organizmalarda sürekli üretildiği kanıtlanmıştır. Radikaller aerobik hücrelerin tüm fonksiyonlarında, metabolizma sırasında veya patolojik durumlarda birer yan ürün olarak meydana gelirler ve hücrelerde geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz değişikliklere neden olabilirler. Bu değişiklikler oksidasyon, fragmentasyon, köprüleşme ve protein zincirinde kesilme şeklinde olur. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve organ hasarı meydana gelir (Ames ve ark., 1993; Halliwell ve Chirico, 1993).

Serbest radikaller üç yolla şekillenirler;

- Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin alarak homolitik bölünmesi,
- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi,
- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesidir (Akkuş, 1995).

Serbest radikaller; oksijen merkezli serbest radikaller, oksijen merkezli olmayan serbest radikaller ve radikal olmayan toksik metabolitler olmak üzere üç ana grupta incelenirler (Tablo 2. 2).

Tablo 2. 2. Serbest radikaller ve benzer şekilde etki eden metabolitleri (Akkuş'dan, 1995)

<p>A. Oksijen merkezli serbest radikaller</p> <p>Moleküler oksijen</p> <ul style="list-style-type: none"> -Triplet ($^3\text{O}_2$) - Singlet ($^1\text{O}_2$) <p>Süperoksit radikali (O_2^-)</p> <p>Hidroksil radikali (OH^\cdot)</p> <p>Alkoksi radikali (RO^\cdot)</p> <p>Peroksi radikali (ROO^\cdot)</p>
<p>B. Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller</p> <p>Karbon merkezli olanlar</p> <ul style="list-style-type: none"> -Lipit radikalleri (L^\cdot) -Alkoksi radikalleri (R^\cdot) <p>Kükürt merkezli olanlar (R-S^\cdot)</p> <p>Hidrojen merkezli olanlar</p> <ul style="list-style-type: none"> -Hidrojen atomu (H^\cdot) <p>Demir merkezli olanlar</p> <ul style="list-style-type: none"> -Perferril radikal $\text{Fe}^{+++} \rightarrow \text{O}_2^- + \text{Fe}^{++}$
<p>C. Radikal olmayan toksik meabolitler</p> <p>Ozon (O_3)</p> <p>Hidroperoksitler</p> <ul style="list-style-type: none"> -Hidrojen peroksit (H_2O_2) -Lipit hidroperoksit (LOOH) <p>Hipokloroz asit (HOCl)</p> <p>Kloraminler (R^1RNCl)</p>

2. 2. 1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

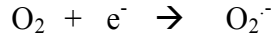
Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir (Akkuş, 1995). Çünkü oksijen ortamda sürekli bulunan ve elektrofilik ataklara en müsait olan moleküldür (Aydın, 2003).

Oksijenin elektronları o şekilde dağılmışlardır ki, bu elektronlardan iki tanesi eşleşmemiştir. Bu yüzden oksijen bazen bir ‘diradikal’ olarak da değerlendirilir (Akkuş, 1995). Oksijen bu kararsız yapısını giderebilmek için başka bir oksijen atomunun dış yörüngesinin iki elektronunu ortaklaşa kullanarak oksijen radikallerini oluşturur (Aydın, 2003). Oksijen, radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girer. Oksijen en son suya indirgenir. Bu arada kısmi redüksiyonla çok sayıda reaktif ürünler de oluşabilir.

Serbest oksijen radikalleri biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler; oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (Akkuş, 1995).

2. 2. 1. 1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

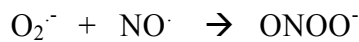
Tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucunda serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^-) meydana gelir.



Bir organizmada en kolay oluşan radikal süperoksit radikalidir (Aydın, 2003). Yalnız süperoksit bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır (Akkuş, 1995).

Ortamdaki süperoksit radikalinin girebileceği başlıca tepkimeler şunlardır:

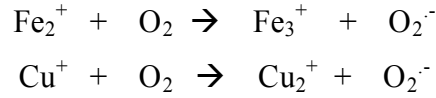
- Süperoksit radikali asidik ortamda kendiliğinden dismutasyona uğrayabilir.
- Süperoksit düşük pH değerlerinde daha reaktif olup oksidan perhidroksil radikali (HO_2^-) oluşturmak üzere protonlanır.
- Süperoksitin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^\cdot) ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir.



- Süperoksit ile perhidroksil radikali birbirleri ile reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



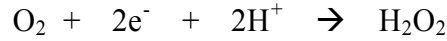
- H_2O_2 ile tepkimeye girerek hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) ve singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşturabilir.
- İndirgenmiş geçiş metallere otoksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir.



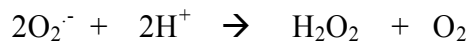
Biyolojik sistemlerde süperoksit daima anyon radikali halindedir. Toksik etkisi zayıf olan $\text{O}_2\cdot^-$; asıl etkisini daha güçlü oksijen metabolitlerinin oluşumuna yol açarak gösterir. Bu nedenle $\text{O}_2\cdot^-$ radikali daha olduğu anda uzaklaştırılmaz ise diğer radikallerin oluşumu kaçınılmaz olur (Halliwell, 1987; Akkuş, 1995).

2. 2. 1. 2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksiti (H_2O_2) meydana getirir.



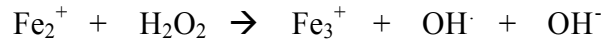
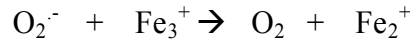
Ancak biyolojik sistemlerde H_2O_2 asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Reaksiyon sonucu radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden bu bir dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir.



Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest radikali olan hidroksil radikali ($\text{OH}\cdot$) oluşturmak üzere kolaylıkla yıkımlanabilir.



Bu reaksiyona ‘Haber-Weiss’ reaksiyonu adı verilir. Bu reaksiyon katalizörle ya da katalizörsüz oluşabilir. Katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerlerken demirle katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır. Bu reaksiyonda önce ferri demir (Fe_3^+) süperoksit tarafından ferro demire (Fe_2^+) indirgenir. Sonra bu ferro demir kullanılarak ‘Fenton reaksiyonu’ ile hidrojen peroksitten OH^\cdot ve OH^- üretilir (Akkuş, 1995).



Potansiyel oksitleyici özelliği nedeni ile biyolojik sistemlerde bulunan hidrojen peroksitin derhal ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler, katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Çebi, 2002; Halliwell, 1984)

2. 2. 1. 3. Hidroksil Radikali (OH^\cdot)

Doğadaki en reaktif radikal hidroksil radikalidir. Hidroksil radikalini oluşturmanın en basit yolu su molekülünü yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz bırakmaktır (Halliwell, 1987).

Hidroksil radikali şeker, aminoasit, fosfolipid, nükleik asit ve organik asitler gibi hücredeki her makromoleküle atak yapabilen çok aktif bir radikaldir. DNA’da zincir kırıklarına neden olur; pürin ve pirimidin bazlarını hidrokstile eder ve membran lipit ve proteinlere saldırır (Akşimşek, 2005).

Normalde hücrede hidroksil radikalinin meydana gelmesi oldukça zordur. İn vivo hidroksil radikali oluşturan en önemli tepkime Haber-Weiss tepkimesidir. Bunlar da hücrede süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz sistemi ile uzaklaştırılır. Bu üç enzim hücre içi en önemli antioksidanlardır (Ames ve ark., 1993; Frei, 1994).

2. 2. 1. 4. Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonların başlamasına da sebep olur (Akkuş, 1995).

Moleküler oksijenin iki ayrı dış orbitalinde ortaklanmamış iki elektron vardır ve bunların spinleri aynı yöndedir. Singlet oksijende ise ortaklanmamış iki elektron aynı orbitaldedir ve yörüngeleri birbirine zıttır. Singlet oksijen bu özelliğinden dolayı kimyasal maddelerle çoğunlukla çift bağ oluşturarak etkileşir (Aydın, 2003).

Singlet oksijeninin delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Singlet oksijen uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesi ile ışık yayar (Akkuş, 1995).

2. 2. 2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller biyolojik sistemlerde radyoliz, fotoliz, organik materyalin termal yıkımı ve metal iyonlarının ve enzimlerin katalize ettiği redoks reaksiyonu gibi çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşur (Basaga, 1990). Serbest oksijen radikallerini oluşturan çeşitli endojen ve eksojen faktörler Tablo 2. 2. 2'de gösterilmiştir (Şimşek, 1999).

Tablo 2. 2. 2. Serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olan faktörler (Şimşek'den, 1999)

Endojen Faktörler	Eksojen Faktörler
Elektron transport zinciri	İlaç metabolitleri
Oksidan enzimler	Radyasyon, güneş ışığı, X ışını, UV ışını
Fagositik hücreler	Glutasyonu okside eden maddeler
Oto-oksidasyon reaksiyonları	Hava kirliliği

2. 2. 3. Serbest Radikallerin Etkileri

Birçok fizyolojik reaksiyonda rol oynayan serbest radikaller, aşırı miktarda üretildiğinde veya antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında biyomoleküller ve doku komponentlerine zarar verirler. Serbest radikaller, hücrenin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (Akkuş, 1995).

2. 2. 3. 1. Membran Lipitlerine Etkisi (Lipit Peroksidasyonu)

Oksijen türevi serbest radikallerin hücre hasarına neden olduğu temel yollardan biri lipit peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonunun

uyarılmasıdır (Horenstein ve ark., 2000). Tüm biyolojik zarlar çoklu doymamış yağ asitleri (Poly Unsaturated Fatty Acid, PUFA) ile amfipatik lipitler ve zar proteinlerinin birleşmesinden oluşur. Lipit peroksidasyonu PUFA'nın radikallerle oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları sonucu uzayan; lipit peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanan bir süreçtir (İnan, 1998).

Lipit peroksidasyon, başlangıç, ilerleme ve bitiş olmak üzere üç aşamada meydana gelir.

- **Başlangıç safhası;** Lipit peroksidasyonu serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan PUFA zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması sonucunda lipit peroksit radikali oluşumu ile başlar (Cheeseman, 1993; Akkuş, 1995). Serbest radikal etkisiyle yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, yağ asidi zincirinin radikal haline dönüşmesine neden olmaktadır. Oluşan bu lipit radikali (L) dayanıksız bir bileşik olup, molekül içi çift bağ aktarılması sonucunda dien konjugatlarına dönüşmektedir. Daha sonra moleküler oksijenin katılması ile lipit peroksit radikali (LOO \cdot) oluşmaktadır (Cheeseman, 1993).
- **İlerleme safhası;** Bu peroksit radikali, diğer bir peroksit radikali ile birleşebilir ya da membran proteini ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksit radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece yan zincirden hidrojen atomunun çıkarılması ile her defasında lipit hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni bir lipit radikali oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak devam etmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (Cheeseman ve Slater, 1993). Lipit hidroperoksitler demir veya bakır gibi geçiş metallerinin varlığında stabil değildirler ve lipit alkoksil radikallerine ve lipit peroksit radikallerine parçalanırlar (Cheeseman, 1993).
- **Bitiş safhası;** Otokatalitik reaksiyonlar lipit hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etan, pentan gibi uçucu gazla dönüşmesi şeklinde sonlanabilmektedir. Bu ürünler içerisinde en zararlı olanı aldehitlerdir (Aydın,

2003). Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiyobarbütirikasit (TBA) ile ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metot lipit peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır (Akkuş, 1995).

Lipitlerden, araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine 'enzimatik lipit peroksidasyonu' diğer radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna ise 'nonenzimatik lipit peroksidasyonu' adı verilir. Lipit peroksitleri ve lipit peroksi radikalleri, serbest oksijen radikalleri gibi, hücrenin birçok komponentiyle reaksiyona girerek membran permabilitesini ve mikrovizikositesini etkilemekte; hücrenel ve metabolik fonksiyonlar üzerinde toksik etkiler göstermektedir (Köse ve Doğan, 1992).

Lipit peroksidasyonu hücreler için son derece yıkıcı bir reaksiyondur. Direkt olarak hücre membranı yapılarına saldırarak, indirekt olarak da reaktif ürünler salgılayarak hücre yapısına zarar vermektedir (Cheeseman, 1993).

Malondialdehit (MDA)

MDA çeşitli doku bileşikleri ile birlikte veya serbest bir formda bulunabilir. Bazı makromoleküllerin oksidatif indirgenmesi sırasında oluşur. İn vivo olarak iyonize radyasyon ile serbest radikal oluşumunun ve prostoglandin biosentezinin ürünüdür. Bununla birlikte ana kaynak doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonudur. MDA; çoklu doymamış yağ asitlerinin yapısında, moleküller arası yeniden düzenlenmesi sırasında endoperoksitlerin yıkımının son aşamasında meydana gelir. Bu yeniden düzenlemeler yağ asitlerinin alifatik zincirinde oluşan serbest radikalleri stabilize etmek için önemlidir. Bu durumda yağ asitleri iki çift bağ içermesine rağmen (linoleik asit gibi) biyolojik örneklerde MDA'nın esas kaynağı üç veya daha fazla çift bağ taşıyan yağ asitleridir (Ohkawa ve ark., 1978).

MDA aynı zamanda hücre hasarında ve yağ pigmentleri lipofuscinlerin oluşumunda rol oynamaktadır. Doku homojenatlarında MDA içeren proteinlerin varlığı da bildirilmiştir. Bununla birlikte MDA'nın mutajenik özelliklerinin olduğu ve kimyasal bir karsinojen gibi davrandığı bildirilmiştir (Shamberger ve ark., 1974).

Gıda maddeleriyle ve normal biyolojik süreçle (örneğin oksijenin kullanımı) insanların MDA'ya büyük ölçüde maruz kalması bilinen bir gerçek iken; memeli dokularındaki MDA'nın atılımı hakkındaki çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Dokudaki MDA'nın düşüşü ise aldehit dehidrogenaz ile CO₂ açığa çıkarmak için asetaldehit sağlanması ve daha az derecede asetil ve malonil-koenzim A (CoA) sağlanması şeklindedir. Bir takım farklı aldehit dehidrogenazlar MDA'yı ve bazı diğer lipid peroksidasyonun aldehit ürünlerini azaltmada etkindirler ki; bu enzimlerin sitotoksik aldehitleri detoksifiye etmede potansiyel fizyolojik rol oynadıkları öne sürülmektedir. Hem kemirgenlerde hem de insanlardaki MDA'nın major üriner metabolitleri protein, fosfolipit ve nükleik asitler gibi amino grupları yoluyla MDA ile etkileşime girebilen maddelerin parçalanması ile ortaya çıkmaktadır. Bu MDA metabolitleri ve çok küçük serbest MDA'nın idrar ile atıldığı bilinmektedir (Janero, 1990).

Lipit Peroksidasyon Ürünlerinin Ölçülmesi

Lipit peroksidasyonu, membran fosfolipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin oksijen ile reaksiyona girerek, lipid hidroperoksitlerini oluşturmaları şeklindeki olaylar zincirinde oluşmaktadır. Bir dizi reaksiyon sonucunda MDA, diğer bazı aldehitler, konjuge dienler, uçucu hidrokarbonlar gibi ürünler ortaya çıkar. Açığa çıkan bu ara ürünlerden birinin tayin edilmesiyle lipid peroksidasyonu ve dolaylı olarak da serbest radikal ölçümü yapılabilmektedir (Clarkson, 1995; Thomas, 1995).

- **Lipit hidroperoksitlerinin (LOOH) ölçümü:** Çeşitli tekniklerle plazmada yapılır. Bu tekniklerden biri, hassas olmakla birlikte pahalı bir teknik olan gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) tekniğidir. Plazma lipid hidroperoksitlerinin ölçümü ticari olarak mevcut kitlerle de yapılabilir. Ancak bu ölçümlerin sonuçları diğer metotların sonuçları ile iyi bir korelasyon göstermemektedir (Draper ve Hadley, 1990).
- **Konjuge dienlerin ölçümü:** Biyolojik materyallerde Hem proteinleri gibi bazı maddelerin varlığından dolayı zordur. Ayrıca normalde insan plazmasında mevcut olan düşük düzeydeki konjuge dienler de ölçümü zorlaştırırlar (Draper ve Hadley, 1990; Cheeseman ve Slater, 1993).
- **MDA dışındaki aldehitlerin ölçümü:** Genellikle zaman alıcı, pahalı ve rutin olarak kullanılmaya uygun olmayan metotları gerektirir.

- **Uçucu hidrokarbonların ölçümü:** Flame iyonizasyon dedektörlü gaz kromatografisi yöntemiyle, dışarıya verilen solunum havasında yapılır. Yöntem oldukça hassastır ve olgulardan tekrar tekrar numune alınabilme avantajı vardır, fakat zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca sigara dumanı ve egzoz gazı gibi eksojen kaynaklardan hidrokarbon kontaminasyonu riski vardır (Akkuş, 1995).
- **Lipit peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ölçümü:** Peroksidasyonun geç aşamasını yansıtır ve her laboratuarda uygulanması zordur (Slater, 1984; Akkuş, 1995).
- **Tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyon veren maddelerin ölçümü (MDA'nın ölçümü):** Lipit peroksidasyonun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan yöntemdir. MDA ölçümü en yaygın olarak TBA yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından TBA ile reaksiyon veren maddelerin (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipitlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipit peroksidasyonu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli problemler vardır. Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü interfere edebilirler. Ayrıca MDA dışındaki aldehitlerde, TBA ile renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler.

TBARS ile lipit peroksidasyon ölçümü prensibine dayanan yöntemlerde okuma ya yüksek performans likit kromatografi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ile ya da spektrofotometre ile kolorimetrik olarak yapılmaktadır (Draper ve Hadley, 1990; Akkuş, 1995).

2. 2. 3. 2. Proteinlere Etkisi

Proteinler serbest radikal etkisine karşı, PUFA'dan daha az hassastırlar ve başlayan zarar verici zincir reaksiyonlarının hızla ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri aminoasit

kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir (Akkuş, 1995). Bu reaksiyonlar sonucu proteinlerin üç boyutlu yapıları bozular. Proteinlerde kırılmalar, çapraz bağlar ve agregasyonlar oluşabilir. Sonuç olarak normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (Tappel ve Dillard, 1981).

2. 2. 3. 3. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkisi

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Radikaller DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozomal mutasyonlar ve sitotoksosite ile sonuçlanır (Ames ve ark., 1993).

Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membrandan kolayca geçip, hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden DNA serbest radikallerden kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir (Akkuş, 1995).

2. 2. 3. 4. Karbonhidratlara Etkisi

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar diabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik durumlarda önemli rol oynarlar.

Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

Bağ dokusunun önemli bir mukopolisakkariti olan hyalüranik asit sinoviyal sıvıda da bol bulunur. Enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvıya çok sayıda polimorf hücre geçer ve muhtemelen immün komplekslerle aktivasyonları sonucu ekstraselüler sıvıya H_2O_2 ve O_2^- salgırlar. Bu radikallerin in vitro hyalüranik asiti parçaladıkları gösterilmiştir. Hyalüranik asit parçalanması enflamatuvar eklem hastalıklarında sinoviyal sıvının karakteristik bir özelliğidir (Halliwell, 1987; Akkuş, 1995).

2. 3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve reaksiyonları inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça hızlı reaksiyonlara girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler 'antioksidan' olarak tanımlanır. Herhangi bir radikal ürünün reaktif karakterine bağlı olarak biyomoleküllere ve hücresel yapılara saldırmalarının önlenmesi antioksidan savunma sisteminin görevidir (Aslan ve ark., 1995).

Hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma altı prensip içerisinde gerçekleşmektedir:

- Oksijen ile reaksiyona girerek yada onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler.
- O_2^- , HO^{\cdot} gibi anahtar reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak yolu ile zincir reaksiyonunun başlamasını engellerler.
- Peroksitleri parçalayarak onların zincir reaksiyon oluşturan radikallere dönüşümünü engellerler.
- Katalitik metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşumunun başlamasını engellerler.
- Başlamış olan bir radikal zincir reaksiyonunu kırarlar.
- Membran lipidlerini etkileyerek peroksit oluşturabilen tekil oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler.

Bu mekanizmalardan ilk ikisi ile işlev gören antioksidanlar birincil savunma hattını oluşturmaktadır. Enzim olmaları nedeni ile normal koşullarda antioksidan görevleri bitince değişmeden ortamda kalırlar. Diğer mekanizmalarla işlev gören antioksidanlar ise ikincil savunma hattını oluştururlar (Özen, 2003).

Antioksidanlar endojen kaynaklı (doğal) ve eksojen kaynaklı antioksidanlar olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdiği gibi serbest radikalın meydana gelişini önleyenler ve mevcut olanları etkisiz hale getirenler şeklinde de gruplandırılabilirler. Ayrıca enzim ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısımlarında bulunabilirler (Akkuş, 1995) (Tablo 2. 3. 1 ve Tablo 2. 3. 2).

Tablo 2. 3. 1. Biyolojik sistemlerde endojen antioksidan savunma (Akkuş'dan, 1995)

Endojen Antioksidanlar	
A. Enzimatik Antioksidanlar	
Süperoksit dismutaz	
Katalaz	
Glutasyon peroksidaz	
Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi	
Glutasyon S transferaz	
Hidroperoksidaz	
B. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	
Sıvı fazda bulunanlar	
Askorbik asit	Hemoglobin
Melatonin	Ferritin
Ürat	Metionin
Sistein	Albumin
Seruloplazmin	Bilirubin
Transferrin	Glutasyon
Laktoferrin	Lipit fazda bulunanlar
Myoglobin	α - tokoferol (vitamin E)
	β - karoten

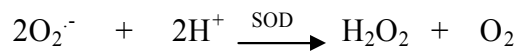
Tablo 2. 3. 2. Biyolojik sistemlerde eksojen antioksidan savunma (Akkuş'dan, 1995)

Eksojen Antioksidanlar	
Ksantin Oksidaz İnhibitörleri	Rekombinant süperoksit dismutaz
Tungstein	Trolox-C
Allopürinol	Glutatyon peroksidaz aktivitesini arttıranlar
Oksipürinol	Ebselen, Asetilsistein
Folik asit	Diğer non-enzimatik serbest radikal toplayıcıları
Pterin aldehid	Mannitol, Albumin
NADPH Oksidaz İnhibitörleri	Demir redoks döngüsünün inhibitörleri
Adenozin	Desferroksamin, Seruloplazmin
Lokal anestezikler	Nötrofil adezyon inhibitörleri
Kalsiyum kanal blokerleri	Sitokinler
Non-steroid antienflamatuar ilaçlar	TNF, interlökin-1
Cetiedil	Barbitüratlar
Diphenylene iodonium	Demir şelatörleri

2. 3. 1. Enzimatik Antioksidanlar

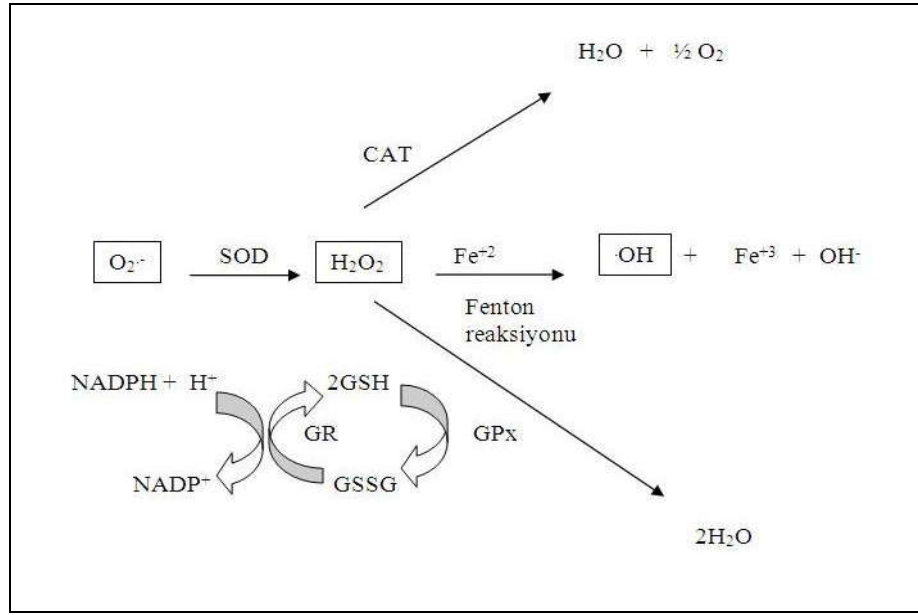
2. 3. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk olarak McCord ve Fridovich (1968) tarafından tanımlanan süperoksit dismutaz enzimi süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hüresel bölmelerdeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (Akkuş, 1995).



Serbest radikallere karşı organizmadaki ilk savunma SOD enzimiyle gerçekleşir. SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazdan farklı olarak serbest radikali

substrat olarak kullanır (Barber ve Horris, 1994). Süperoksit dismutaz enzimin canlılardaki dağılımı katalaz enzimi ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile katalizlenen tepkime sonucunda oluşan ürün, oksijenin toksik türlerinden biri olan hidrojen peroksittir. Katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından birikimi önlenmelidir (Aydın, 2003).



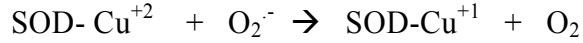
Şekil 2. 3. 1. Antioksidan defans mekanizması (Armstrong'dan, 1998)

SOD fagosite edilmiş bakterilerin hücre içi öldürülmesinde de rol oynar. Bu yüzden SOD, granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır.

SOD'un katalize ettiği reaksiyonun hızı spontan reaksiyonun yaklaşık 4000 katıdır. SOD, esas olarak hücre içi bir enzimdir. Çok küçük miktarda plazma, sinoviyal ve omurilik sıvısı gibi hücre dışı sıvılarda da bulunur (Halliwell, 1987). İnsanda SOD'un iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerdir (Mn SOD). Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD'dir. Cu-Zn SOD, 21 nolu kromozomda, Mn SOD, 6 nolu kromozomda bulunmaktadır. Sitosolik Cu-Zn SOD siyanidile inhibe edilirken, mitokondrial Mn SOD inhibe olmaz. Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı

korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku oksijen basıncı artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit seviyeleri düşük tutulur. SOD'un hücre dışı aktivitesi çok düşüktür.

Süperoksit dismutazın, süperoksit anyonuna (O_2^-) olan etkisi şu şekildedir. Süperoksit anyonu, Cu^{+2} ve bir arginin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda süperoksitten bir elektron Cu^{+2} 'a transfer olurken Cu^{+1} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu Cu^{+1} 'dan bir elektron bağlanma ortağından da iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu^{+2} formuna dönmüş olur (Akkuş, 1995; Aydın, 2003).



SOD enziminin aerobik hücrelerin tümünde bulunduğu ancak anerobik hücrelerin çoğunda bulunmadığı bilinmektedir. Organizmada oksidatif stresin arttığı durumlarda SOD enzim aktivitesini yükselterek koruyucu etkinliğini devam ettirir. Özellikle antioksidan etkili diğer enzimlerin aktivitelerinde azalmanın söz konusu olduğu klinik durumlarda SOD enziminin aktivitesinin arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Fridovich, 1986; Bannister ve ark., 1987).

- **Bakır ve Çinko İçeren Dismutazlar (Cu-Zn SOD);** Maya, bitki ve hayvan gibi bütün ökaryotlarda bulunur. Fakat bakteri ve mavi-yeşil alg gibi prokaryotlarda bulunmaz. Cu-Zn SOD'un büyük çoğunluğu sitozolde ayrıca lizozom, çekirdek ve mitokondri membranlar arası boşlukta bulunur.

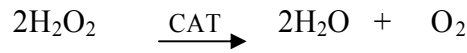
Bütün ökaryotik hücrelerden elde edilen Cu-Zn SOD'ların molekül ağırlığı 32000 dalton civarındadır ve iki protein alt biriminden oluşur. Her bir alt ünite, bir bakır iyonu ve bir de çinko iyonu içeren aktif bölge taşır. Bakır iyonları birbiri ardına oksidasyon ve redüksiyona uğrayarak dismutasyon reaksiyonunda fonksiyon gösterir. Zn^{+2} katalitik döngüde fonksiyon göstermez fakat enzimi stabilize ettiği görülür.

Cu-Zn SOD son derece kararlı bir enzimdir. Isıya, proteazların saldırısına ve guanidyum klorid ve üre gibi ajanların denatürasyonuna oldukça dirençlidir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

- **Mangan Süperoksit Dismutaz (Mn SOD);** Mn SOD, çekirdek tarafından kodlanan mitokondrial matriks enzimidir. Mn SOD molekül ağırlığı 40 000 Daltondur. Mn, diğer geçiş metalleri ile yer değiştirmez. Aynı tepkimeyi katalizlemesi dışında Mn SOD ile Cu-Zn SOD arasında hiçbir ortak yapısal özellik yoktur. Mn SOD'lar ısıya, kimyasallara ve deterjanlara Cu-Zn SOD'da olduğu gibi dayanıklılık göstermezler (Halliwell ve Gutteridge, 1989; Aydın, 2003).

2. 3. 1. 2. Katalaz (CAT)

Katalaz tetramerik bir yapıya sahip, molekül ağırlığı 240 000 dalton olan ve aktif merkezinde dört tane 'ferri hem' grubu içeren bir enzimdir. Her bir alt birim genellikle enzimin stabilizasyonunu sağlayan bir molekül nikotin amid difosfat hidrojen (NADPH) içerir (Aydın, 2003). Bu enzim azid ve siyanid tarafından inhibe edilir. En fazla kullanılan katalaz inhibitörü aminonitrozoldur. Hemen hemen bütün bitki ve hayvan hücrelerinde bulunur (Halliwell ve Gutteridge, 1989). CAT tüm enzimler içerisinde yüksek dönüşüm oranına sahip olan bir enzimdir. CAT'ın bir molekülü hidrojen peroksitin milyonlarca molekülünü su ve oksijene çevirebilir (Johansson ve Borg, 1988).



CAT hidrojen peroksit oluşum hızının düşük olduğu veya elektron vericisinin yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu durumlarda peroksidatik reaksiyonla etki eder;



Hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik reaksiyonla etki eder (Seven ve Candan, 1996).



Bütün hayvan hücrelerinde CAT'ın özellikle lokalize olduğu organlar karaciğer ve eritrositlerdir. Bitki ve hayvan hücrelerinde CAT'ın hemen hemen tamamı peroksizomlarda bulunur (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

2. 3. 1. 3. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz (GPx), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GPx'in molekül ağırlığı yaklaşık 85 000 daltondur. Lipit peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyici özelliktedir (Akkuş, 1995). Selenyuma (Se) bağlı ve bağlı olmayan iki farklı tipi vardır. Se bağlı olan GPx hem hidrojen peroksiti hem de lipit hidroperoksitleri metabolize etmektedir. Hücrenin mitokondri (%30) ve sitozol (%70) fraksiyonlarında lokalize olan selenyumdan bağımsız GPx ise sadece lipit hidroperoksitlerini metabolize etmektedir. (Guemouri ve ark., 1991; McElroy ve ark., 1992). Aktivitesi selenyuma bağlı olmayan GPx enzimler, G-S-transferazlar (GST) olarak adlandırılır. Bu enzimler biyotransformasyon yolu ile oluşan çeşitli elektrofili bileşiklerle glutasyon (GSH) arasındaki konjugasyonu sağlarlar (McLennan ve ark., 1991).

Bütün organik hidroperoksitler hem Se bağlı hem de Se bağımsız peroksidazlar için substrattırlar. Se bağlı GPx daha çok sitozolik ve mitokondri matriksindeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonunda rol oynar. Buna karşın mikrozomal lipit peroksidasyonunun önlenmesinde ve bu organik peroksitlerin uzaklaştırılmasında daha çok GST rol oynar.

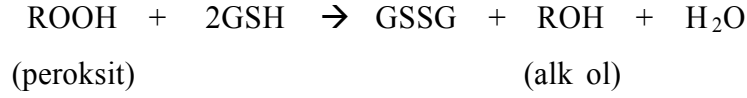
Katalaz da hidrojen peroksiti detoksifiye eder. Fakat hepatositlerde katalaz öncelikle peroksizomlarda lokalize olmuştur. Se bağımlı GPx ise, sitozol ve mitokondri matriksinde bulunur. Sonuç olarak katalaz ve Se bağımlı GPx farklı hücre içi bölgelerde bulunarak işlevsel olarak birbirlerini tamamlarlar (Mannervik, 1985).

Se bağlı GPx'lerin tepkimeleri genel olarak aşağıdaki tepkimeyi katalizler:



Hidrojen peroksit ve çeşitli organik hidroperoksitlerin GPx ile indirgenmesi reaksiyonunda indirgenmiş GSH kosubstrat olarak görev yapar. Katalitik reaksiyon sonucu H₂O ve oksitlenmiş glutasyon disülfid (GSSG) oluşur.

GST'lerin tepkimeleri ise:



Peroksitlerin GSH ile indirgenme reaksiyonu sonucu GSSG, alkol ve su oluşur (Akkuş, 1995).

Membrandaki fosfolipitlerin peroksidasyonunu önleyen ve özgül bir enzim olan fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PL-GPx) da yapısında Se atomu bulundurur ve membran fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirger (Gonzales ve ark., 1984).



2. 3. 2. Oksidatif Stres

Organizmada ani ve aşırı miktarda oksijen girişinin artması; epinefrin ve diğer katekolaminlerin artışı; laktik asit, laktat dehidrogenaz, kreatin fosfokinaz gibi litik enzim aktivitelerinin yükselmesi; egzersiz, gebelik, yaşlılık gibi fizyolojik haller; kimyasal çevre kirliliğinin yoğun olduğu ortamlarda uzun süre kalma; yoğun stres, sigara ve alkol kullanımı; diyetle doymamış ve kolay peroksillenebilen yağların fazla miktarda bulunması; antioksidan savunma sistemi yetmezlikleri veya savunma duvarının aşılması gibi durumlarda hassas olan oksidan-antioksidan denge oksidanlar lehine bozulabilir. Bu durum 'oksidatif stres' olarak tanımlanır. Oksidatif stres serbest radikallerin oluşumunun artışından ya da antioksidan aktivitesinin yetersizliğinden ileri gelebilir (Augustin ve ark., 1997).

Birçok hastalık ve patolojik olgularda oksidan-antioksidan denge olumsuz etkilenmektedir. Ancak tüm araştırmacıların birleştikleri konu herhangi bir nedenle oksidan-antioksidan dengenin bozulmasıyla oluşan radikallerin öncelikle zar lipitleri olmak üzere proteinler ve DNA gibi tüm biyomoleküller için bir risk faktörü oluşturduğudur (Freeman ve ark., 1982; Thomas, 1995).

2. 3. 3. Enzimatik Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi

Oksidatif stres çalışmalarında, organizmada antioksidan savunma sistemlerini araştırmak için biyolojik materyallerde farklı antioksidanların aktiviteleri veya konsantrasyonları çeşitli metodlarla ölçülmektedir (Akkuş, 1995).

2. 3. 3. 1. SOD Tayini

Ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikali 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenylterazolium chloride (INT) ile muamele edildiğinde ise kırmızı renkli formazan bileşiği oluşturur. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür (Flohe ve Otting, 1984).

SOD için doğrudan ve dolaylı tayin yöntemleri vardır. Pulse radiolizis ve stopped flow teknikleri direkt ölçüm yöntemleri olarak mevcut tekniklerin en iyisi kabul edilmekte, ancak bu metodlar için gerekli donanım her zaman bulunamamaktadır (Akkuş, 1995).

SOD tayini için kullanılan diğer metodlar indirektir ve süperoksitin başlattığı reaksiyonu inhibe eden SOD'un, enzimatik aktivitesinin ölçülmesine dayanmaktadır. İndirekt metodlarda süperoksit kaynağı olarak genellikle ksantin oksidaz kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri Nitroblue tetrazolium (NBT) diğeri sitokrom-c metodudur. Bu ölçümlerde kolorimetrik, luminometrik ve polarografik değerlendirmeler yapılabilmektedir (Flohe ve Otting, 1984).

2. 3. 3. 2. CAT Tayini

Katalaz aktivitesinin kantitatif değerlendirilmesinde kullanılan güncel metodlar bu enzimin katalitik fonksiyonuna bağlıdır. Bu yöntemler titrimetri veya spektrofotometre ile H₂O₂'nin tüketimini ölçen metodları veya monometrik tekniklerle ve oksijene duyarlı elektrotlarla oksijen üretimini ölçen metodları içermektedir. Bu yöntemlerden ikincisi oldukça hassas olmasına rağmen, işlemlerin zor olması ve ileri ekipman gerektirmesi dezavantaj oluşturmaktadır.

Güncel bir yaklaşım olarak katalazın peroksidatik fonksiyonunun, küçük doku örneklerinde enzim aktivitesinin değerlendirilmesinde yararlanılabileceği düşünülmüştür. Bu analizde metanol hidrojen alıcı olarak kullanılmıştır ve formaldehit

üretimi spektrofotometrik olarak 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole kromojen (Purpald) ile ölçülmüştür. Yapılan araştırmalara göre testin prensibi purpaldin aldehitlerle çift döngülü heterosiklik form oluşturarak oksidasyon sonucu renksiz durumdan mor-pembe veya mor renge dönmesine dayanır (Johansson ve Borg, 1988).

2.3.3.3. GPx Tayini

Glutasyon peroksit ölçümlerinden biri hidrojen peroksit tüketiminin saptanması prensibine dayanmaktadır. GPx reaksiyonu birim zaman aralıklarında asidifikasyon ile durdurulmakta, metabolize edilmemiş GSH, civa tuzları ile parçalanarak solüsyon nötralize edilmekte, kalan H₂O₂ skopoletin boyası ile reaksiyona sokularak ölçüm yapılmaktadır. Metod oldukça güvenilir olmasına karşın rutin ölçümler için komplike kabul edilmektedir (Flohe ve Günzler, 1984).

Bir başka yöntem, birim sürede tüketilen GSH'ı ölçme prensibine dayanır. Bu metod da H₂O₂ ile GSH'ın enzimce katalizlenen ya da spontan oluşan reaksiyonları güçlü bir asit ilavesi ile birim sürede durdurulur ve polarograf ile GSH içeriği ölçülür. Metod kolay olmakla birlikte birçok organik ve inorganik bileşik interferans oluşturabilmektedir (Novak ve ark., 1990; Guemouri ve ark., 1991).

Oldukça duyarlı olan bir başka metod GPx'in kümen hidroperoksit aracılığı ile GSH oksidasyonunu katalizlemesi prensibine göre spektrofotometrik okuma ile çalışılmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Flohe ve Günzler, 1984; Guemouri ve ark., 1991).

2.3.4. Yara İyileşmesinin Fizyopatolojisi ve Serbest Radikallerin Rolü

Yaralanmaya karşı dokular normal bir tepki olarak enflamasyon fenomenini oluştururlar. Enflamatuvar cevapla birlikte hasar gören dokuya lökosit göçü başlar. Doku hasarını artırıcı etkiye sahip polimorf nükleer lökosit, makrofaj ve lenfositler, akut faz proteinleri, interlökinler ve sitokinlerden oluşan çözünebilir mediatörler yaralanmış doku tablosunda yer alan makromoleküllerdir. Nötrofillerden salınan kemotaktik faktörler ile süperoksit ve hidrojen peroksit gibi oksijen radikalleri; ayrıca lökotrienler, interlökin-1 ve bazı sitotoksik maddeler ise plazma ekstrasvazasyonuna neden olmaktadır (Rangan ve Bulkley, 1993; Winrow ve ark., 1993).

Oksidan-antioksidan denge açısından bakıldığında travmaya maruz kalmış hücrelerde membran bütünlüğünün zedelenmesi ve ortama süperoksit, hidrojen peroksit gibi radikallerin salınımının artmasına bağlı olarak yaralı dokuda oksidatif stres tablosunun oluştuğu görülür (Braquet ve Hosford, 1991). Hücrede artan bu radikal metabolitlerin kaynakları; oksidaz katalizörlüğünde süperoksit oluşumu, peroksi ve hidroksi radikallerinin oluştuğu araşidonik asit yolu olup, hem oksidaz hem de araşidonik asit yolunun iskemi-reperfüzyon ve diğer doku yaralanmalarında anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir. Diğer bir yol ise reaktivitesi ve toksitesi çok yüksek olan hidroksil radikalının artışı sağlayan Haber-Weis veya Fenton reaksiyonudur. Doku yaralanması modellerinin çoğunda hidroksil üreten bu sekonder salınım yolu sorumlu görülmektedir (Kılınç, 1986; Lelli ve ark., 1993).

Yaralanmanın oluştuğu dokuda artan radikal metabolitler ve bunların oluşturduğu lipit peroksidasyonu ile protein ve DNA oksidasyonu sonucu hücre membranında kontrol kaybolur; geçirgenlik artışı ve hücre ölüm gelişir (Freeman ve ark., 1982). Gerçekte bir doku yaralanmış olsun yada olmasın, serbest radikaller ve reaktif moleküller ile bunların reaksiyonları ve ürünlerindeki artışın hücre yaşama tehdit ve tahrip ettiği, genetik mutasyonlara yol açtığı gösterilmiştir (Bulkley, 1983).

Yaralanma bölgelerinde genellikle karşımıza iskemi ve enflamatuvar fenomen çıkmaktadır. Travma sonucu trombositlerden ve sempatik sinir uçlarından lokal olarak salınan vazokonstriktör maddeler ile oluşan vazospazm, iskeminin temelini oluştururken, organizmanın verdiği savunma amaçlı biyoyanıt ise enflamatuvar olguyu meydana getirmektedir. Uzun süre devam eden iskemi sırasında bölgenin yaşaması için yeterli oksijenin gelememesi dokuya zararlıdır. Yaralanmalarda iskemik sürecin uzaması, ortamda anareobik metabolizmanın gelişmesine yol açarken; diğer yandan hipoksik hale gelmiş endotel hücreleri deforme olup, şişerek vazoaktif ve trombojenik faktörler salgırlar; böylece başlıca etken olan reperfüzyon hasara neden olur. Bu haliyle plazma proteinleri için aşırı geçirgen hale gelen endotel nedeni ile ödem oluşumu ve hematokrit artışı gelişmektedir. Bu şekilde yoğun ekstrasvazyonun bölgesel doku basıncını artırması kan akımını daha da bozmaktadır. Reperfüzyon esnasında ise hasar ani ve yoğun oksijenlenmeye bağlı olarak dokudaki lezyonlardan kaynaklanan bol miktarda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali üretilmesi ile oluşmaktadır (Angel ve ark., 1987; Goddio, 1989).

Radikal metabolitlerin arttığı ortamlarda MDA gibi lipid peroksidasyon ürünleri de artmaktadır. Bu ürünler hücre membranı bileşenlerini polimerizasyon ve çapraz bağlanmalarla dejenere ederek; deformabilite, iyon taşınımı, enzim aktivitesi gibi hücresel karakteristikleri değiştirebildiklerinden, aynı etki altındaki hücre grupları da tahrip olmaktadır (Hochstein ve Jain, 1981).

2. 3. 5. Kırık İyileşmesi ve Serbest Radikallerin Rolü

Kemik kırığı oluştuğu zaman oldukça fazla miktarda radikal meydana gelir. Bu radikaller oksidatif olaylar zincirine sebep olan oksidatif stresi başlatır. Bir kırığı takiben, oksidatif-stres hasarına iskemi-perfüzyon mekanizması sebep olur (Prasad ve ark., 2003; Sheweita ve Khoshhal, 2007). Kırık iyileşmesinin ilk üç günü, hiçbir oksidatif stres hasarının oluşmaması iskemi periyodu ile açıklanabilir. Daha sonra kallus oluşum evresinde fibroblast ve kollajen hücrelerine ilaveten yeni kapiller damarlar, diğer enflamatuvar hücrelerle birlikte oksijen serbest radikallerinin üretimini arttırlar. Bu radikaller kırık kemikte diğer dokularda olduğu gibi oksidatif hasara neden olurlar (Cornell ve Lane, 1992).

İlk haftada oksidatif stres oluşmamasının sebebi, kırık oluştuğunda bölünmüş kemikte kan akımının kesilmesi ve plazma seviyesinin başlangıçta değişmemesidir. Bu bölgesel iskemi canlı hücreleri iskemi alanının periferal bölgesinde bırakır ve eğer bu durum düzeltilirse hücreler kurtarılabilir. Eğer kurtarılamazsa, bu hücreler geri dönüşümsüz hasara uğrar. İskeminin bu aşaması yaklaşık 1 hafta sürer. İyileşme sürecinin ilerlemesiyle kallus oluşmaya başlar ve yeni kapiller damarlar içeren yeni hücreler sıralanırlar. Bu durum bölgede damarlanmanın artmasına neden olur. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin üretimini arttıran enflamatuvar hücrelerde de artış olur. Bu radikaller daha sonra diğer dokularda da görüldüğü gibi oksidatif hasara neden olur (Prasad ve ark., 2003).

Bununla birlikte osteoklastik aktivitenin ve reaktif oksijen türleri üretiminin artması, antioksidan savunmayı yenebilir ve bireyde hiperoksidan strese sebep olur. Osteoklastlar karmaşık gelişimsel aşamalarla kalsifiye dokuyu yok ederler. Özellikle normal fonksiyon gören osteoklastlar tarafından, serbest radikallerin kontrollü üretimi kalsifiye dokunun yıkımını hızlandırır ve kemik remodelingine yardımcı olur. Kemik bozukluklarında görülen artmış osteoklastik aktivite reaktif oksijen türlerinin süperoksit

formunda üretiminin artmasından sorumlu olabilir ve bu da serumdaki MDA seviyesinin artışının kanıtıdır. Reaktif oksijen türlerinin en zarar verici etkilerinden biri lipit peroksidasyonu ve sonuç ürünü olan MDA'dır. MDA, bir lipit peroksidasyon göstergesi olarak görev yapmasının yanı sıra, aynı zamanda osteoklastik aktivitenin ölçümü için de hizmet eder. Antioksidan enzimler, SOD ve GPx'in aktiviteleri bir savunma mekanizmasını göstermektedir ve bu mekanizma, osteoklastların artmış süperoksit üretimini azaltarak galip gelmektedir (Sheweita ve Khoshhal, 2007).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.12.2006 tarihi ve 2006/41 numara ile onaylanmıştır. Laboratuvar çalışmalarında hayvanların kullanımı ve bakımında uluslararası etik kurallara uyulmuştur.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada ortalama 2.5 kg ağırlığında, 1 yaşında, toplam 28 adet erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanıldı. Hayvanlar 1 ay karantinada bekletildi, 22 ± 1 °C sıcaklık ve % 50 nem oranında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık bir ortamda standart tavşan yemi ile ad libitum olarak beslendi. Hayvanlar her bir grupta 7 tavşan olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı (Şekil 3. 1).



Şekil 3. 1. Çalışmada kullanılan bir ergin erkek tavşan

3.2. Deney Grupları

Tavşan sağ tibiasının medyal kısmında standart bir kemik defekti (5x15x3mm) oluşturuldu. Yedi adet tavşanda oluşturulan bu kemik defekti herhangi bir materyal konulmadan kapatıldı ve kontrol grubu (1. Grup) olarak belirlendi. Her biri 7 tavşandan

oluşan 3 deney grubu oluşturuldu. İkinci gruba allojenik kemik grefti Grafton, 3. gruba ksenojenik kemik grefti Bio-Oss, 4. gruba da sentetik greft materyali 4BONE kullanılarak oluşturulan kemik defektinin onarımı sağlandı.

Kontrol ve deney gruplarının listesi aşağıdaki gibidir:

1. Grup: Kemik defekti oluşturulan ve greft uygulanmayan 7 adet tavşan (Kontrol)
2. Grup: Kemik defekti oluşturulan ve Grafton uygulanan 7 adet tavşan
3. Grup: Kemik defekti oluşturulan ve Bio-Oss uygulanan 7 adet tavşan
4. Grup: Kemik defekti oluşturulan ve 4BONE uygulanan 7 adet tavşan

3. 3. Greft Materyalleri

3. 3. 1. Grafton (Osteotech Inc., Eatontown, NJ, ABD)

İçeriğini insan demineralize kemik matriksi oluşturmaktadır. Bu allojenik greft materyalinin Jel, Flex, A-Flex, Putty, Crunch, Orthoblend, Matrix PLF, Matrix strips, Paste formları mevcuttur. Çalışmada 1 cc'lik Putty formu kullanılmıştır (Grafton Kullanım Klavuzu, 2005) (Şekil 3. 3. 1).



Şekil 3. 3. 1. Allojenik kemik greftinin ticari şekli

3. 3. 2. Bio-Oss (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, İsviçre)

Sığır kemiğinden elde edilen doğal bir kemik mineralidir. Bio-Oss'un süngerimsi kemik granülesi ve süngerimsi kemik blok olarak formları mevcuttur. Çalışmada partikül boyutu 1-2 mm olan süngerimsi kemik granülesi kullanılmıştır (Şekil 3. 3. 2) (Bio-Oss Kullanım Klavuzu, 2006).



Şekil 3. 3. 2. Ksenojenik kemik greftinin ticari şekli

3. 3. 3. 4BONE (MİS Implants Technologies Ltd., İsrail)

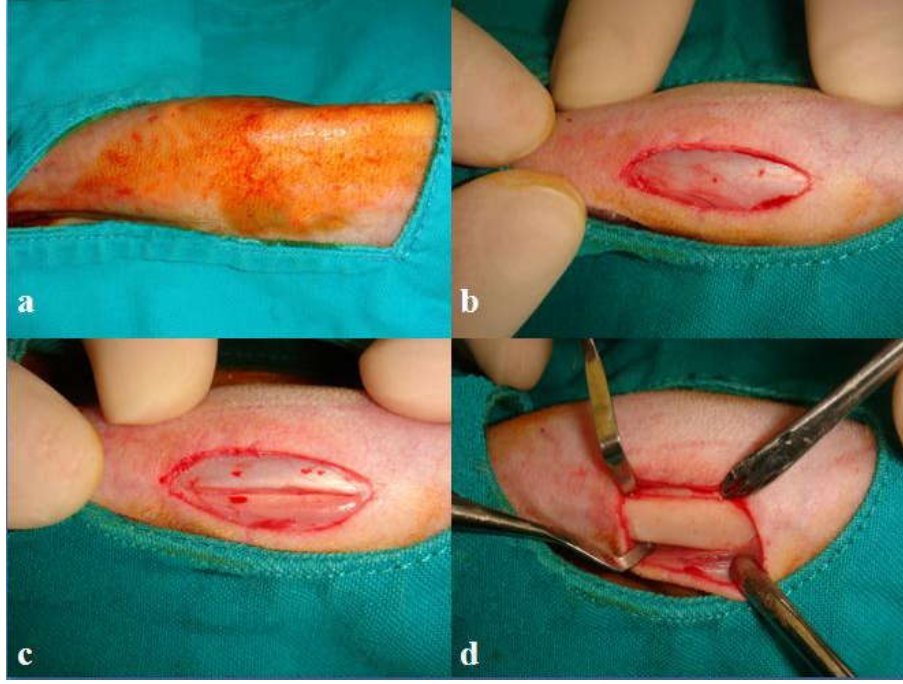
İçeriğini % 60 Hidroksiapatit ve % 40 beta-Trikalsiyum Fosfat içeren mikropöröz ve makropöröz bifazik kalsiyum fosfat seramik oluşturmaktadır. Çalışmada 0.5 cc'lik şırınga formu kullanılmıştır (Şekil 3. 3. 3) (4BONE Kullanım Klavuzu, 2007).



Şekil 3. 3. 3. Sentetik kemik greftinin ticari şekli

3. 4. Cerrahi Uygulama

Genel anestezi ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2 Enjectabl, Alfasan Int. BV, Hollanda) (10mg/kg), ketamin hidroklorid (Alfamine % 10 Enjectabl, Alfasan Int. BV, Hollanda) (50mg/kg) kombinasyonu ile intramüsküler yoldan yapıldı. Deney hayvanlarının operasyon bölgesi traş edilip, povidone-iodine (Batticon, Adeka, Türkiye) ile dezenfekte edildi. Tavşanlar ameliyat masasına kolları ve bacakları bağlanmak suretiyle sabitlendikten sonra steril yeşil örtü ile operasyon bölgesi izole edildi (Şekil 3. 4. 1. a). Tavşanın sağ tibiasının orta bölümünde medyal kısmına 3 cm'lik bir deri insizyonunu takiben cilt altı kas tabakası, periost geçilerek kemik dokusu açığa çıkarıldı. Tüm katmanlarda insizyonların üst üste gelmemesine dikkat edildi (Şekil 3. 4. 1. b, c, d).



Şekil 3. 4. 1. a. Deney hayvanın operasyon bölgesinin izole edilmesi
 Şekil 3. 4. 1. b. Operasyon bölgesine uygulanan insizyon
 Şekil 3. 4. 1. c. Tibia üzerindeki kas tabakasının geçilmesi
 Şekil 3. 4. 1. d. Tibianın açığa çıkarılması

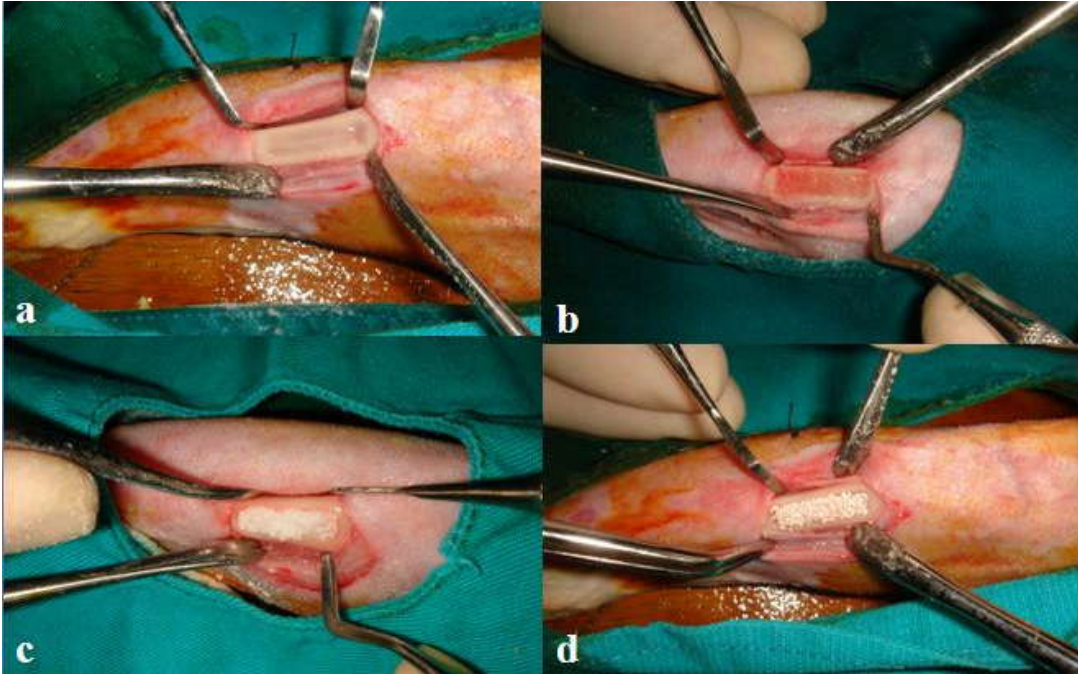
Açığa çıkan kemiğin üst kısmında kortikal kemikten 5x15 mm uzunluğunda ve 3 mm derinliğinde standart bir kemik defekti, çelik rond ve fissür frez yardımı ile serum fizyolojik soğutma altında oluşturuldu (Şekil 3. 4. 2).



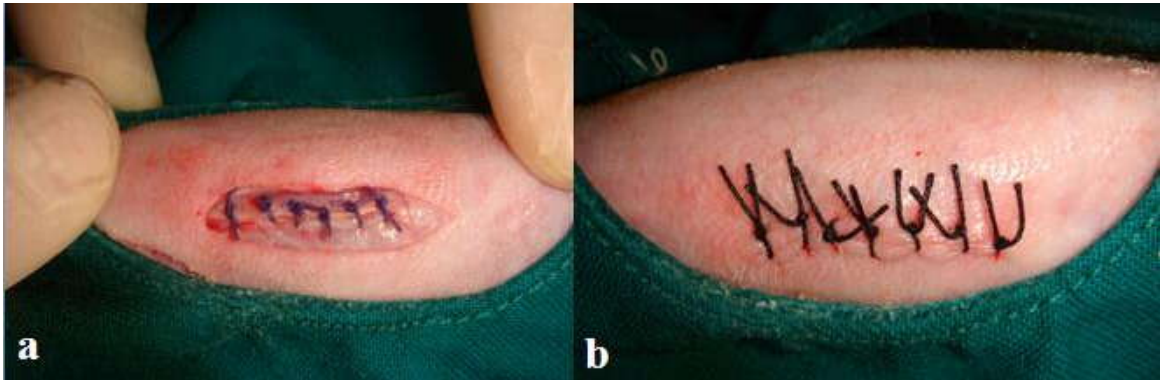
Şekil 3. 4. 2. Deney hayvanlarının tibialarında açılan defekt (5x15x3 mm)

Oluşturulan kemik defekti kontrol grubunda boş bırakılırken diğer gruplarda greft materyalleri serum fizyolojik ile ıslatılmış ve defekti dolduracak şekilde uygulandı

(Şekil 3. 4. 3. a, b, c, d). Bu işlemi takiben 3/0 rezorbe olabilen suture (Pegelak Rapid, Doğsan, Türkiye) ile kas tabakası dikildi (Şekil 3. 4. 4. a). Deri tabakası ise 3/0 ipek suture (Silk, Doğsan, Türkiye) ile dikildi (Şekil 3. 4. 4. b). İşlemi takiben hayvanlara 3 gün süreyle cefazolin sodium (Cefamezin IM Enjektabel Flakon, Eczacıbaşı, Türkiye) (50mg/kg) verildi. İşlem sonrası hayvanlarda enfeksiyon veya başka bir nedenle ölüm gerçekleşmezken tüm hayvanlar sorunsuz olarak iyileşti.



Şekil 3. 4. 3. a. Graft uygulanmayan kontrol grubu
 Şekil 3. 4. 3. b. Grafton grubundaki Graft uygulaması
 Şekil 3. 4. 3. c. Bio-Oss grubundaki Graft uygulaması
 Şekil 3. 4. 3. d. 4BONE grubundaki Graft uygulaması



Şekil 3. 4. 4. a. Kas dokusunun dikilmesi
 Şekil 3. 4. 4. b. Deri tabakasının dikilmesi

3. 5. Örneklerin Toplanması

Tavşanların marjinal kulak veninden (vena marginale) operasyondan 1 gün önce ve operasyondan sonra 1, 3, 7, 14, 28 ve 56. günlerde kan örneği alındı. Her defasında her bir deney hayvanından SOD, MDA, CAT analizleri için EDTA'lı tüpe 3ml ve GPx analizi için heparinli tüpe 1 ml olmak üzere toplam 4ml kan örneği alındı. MDA ölçümleri plazmada, CAT ve SOD ölçümleri eritrosit hemolizatında, GPx ölçümleri ise tam kanda yapıldı.

3. 6. Plazma MDA Analizi

Analizler ve analize ait hesaplamalar Yoshioka ve ark. (1979) ile Eraslan ve ark. (2007)'nin bildirdiği yöntemler esas alınarak yapıldı.

3. 6. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri

- Spektrofotometre cihazı: (Shimadzu-UVmini-1240, Japonya)
- Termo-elektrikli Sıcaklık Kontrollü Küvet Tutucusu: (Shimadzu-TCC-240A, Japonya)
- Kuvartz küvet
- Dijital otomatik pipetler- Ependorf 5-50 µl ve 100-1000 µl: (Socorex Acura 825, İsviçre)
- Santrifüj: (Hermle Z 300 K, Almanya)
- Derin dondurucu (-80 °C): (Jouvan VX 380 E, Fransa)
- Analitik terazi : (Shimadzu -AUW220D, Japonya)
- Laboratuvar terazisi: (Sartorius TE12000, Almanya)
- Ultra saf su cihazı: (Millipore-Milli-DI, Simplicity 185, ABD)
- Vorteks: (Velp Scincetifica Zx³, İtalya)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı: (Labart SH-5, Polonya)
- EDTA'lı tüp 4ml: (Aysset Tube, Türkiye)
- Ependorf (1 ml)
- Mezür (100 ml-250 ml)
- Cam pipet (10 ml)
- Vida kapaklı cam tüp (10 ml)
- Renkli laboratuvar şişesi (30 ve 200 ml)

- Balon joje (100 ml)
- Erlenmayer

3. 6. 2. Kullanılan Kimyasallar

- Triklor Asetik Asit (TCA): (Carlo Erba-411527, İtalya)
- Thiobarbutirik Asit (TBA): (Merck-L55063680 731, Almanya)
- N-Butanol: (Lab-Scan-G29C11X, Polonya)
- Absolu Etanol (%99.5): (Delta Kimya-Aso 55-L50, Türkiye)
- 1, 1, 3, 3 Tetraetoksipropan standardı: (Merck- 805797, Almanya)

3. 6. 3. Kullanılan Çözeltiler

- % 20'lik TCA: 20 g TCA tartılarak 100 ml'lik balon jöjeye alındı ve 100 ml ultra saf su içinde çözdürüldü.
- % 0.67'lik Thiobarbutirik Asit (TBA): 0.67 g TBA tartılarak 100 ml'lik balon jöjeye alındı ve 100 ml ultra saf su içinde çözdürüldü.

3. 6. 4. Analizin Prensibi

Lipit peroksidasyonu kantitatif olarak değerlendirmek için kullanılan yöntemlerden bir tanesi lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeyinin TBA testi ile ölçümüne dayanmaktadır. Basit ve ucuz olmasından dolayı kullanımı yaygındır. Bu testte örnek düşük pH'da TBA ile 95 °C'de inkübasyonu sonucu oluşan pembe bir kromojenin ([TBA]₂-malondialdehit boya bileşimi) 535 nm dalga boyunda emilimi ile ölçülür (Frankel, 1991).

3. 6. 5. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması

Deneme ve kontrol gruplarından EDTA içeren tüplerde alınan kan örnekleri 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstteki plazma 0.5 ml örnek oluşturacak şekilde pipet yardımı ile alınıp ependorf tüplere aktarıldı. -80 °C'de ölçüm yapılana kadar saklandı.

3. 6. 6. Standartların Hazırlanması

Standart olarak analizde 1, 1, 3, 3 Tetraetoksipropan, çözücü olarak da absole etanol kullanıldı. 0.494 ml standart alınarak etanol ile 100 ml'ye tamamlandı. Elde edilen solüsyondan 0.1 ml alınarak etanol ile 100 ml'ye tamamlandı ve 20 nmol/ml stok standart oluşturuldu. Tablo 3. 6. 6' da verilen şekilde stok standarttan etanol kullanılarak 8 farklı standart daha hazırlandı. Örneklerin ve standartların ölçümü sırasında kör olarak ultra saf sudan oluşan S0 kullanıldı. Ölçümler yapıldıktan sonra elde edilen absorbanslarla standart kalibrasyon eğrisi hazırlandı.

Tablo 3. 6. 6. Plazma MDA analizinde standartların konsantrasyonları

Hazırlanan Standartlar	Final konsantrasyon (nmol/ml)
S8 (Stok standart)	20
S7	15
S6	10
S5	7.5
S4	5
S3	2.5
S2	1
S1	0.5
S0	0

3. 6. 7. Analizin Yöntemi

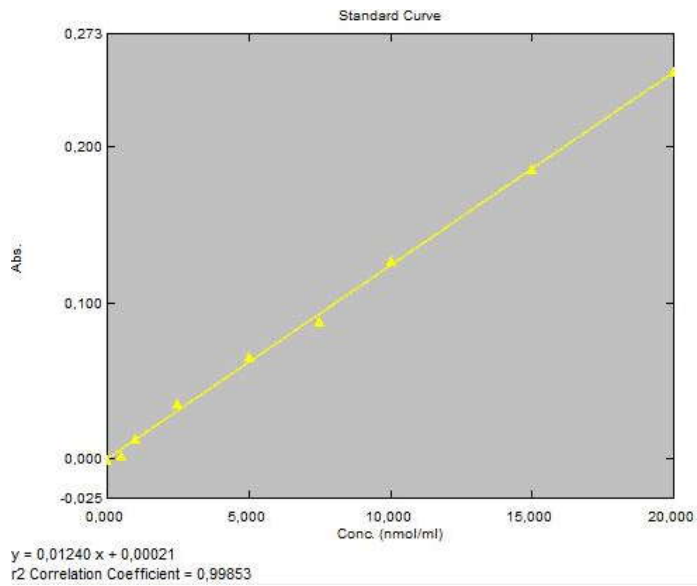
Her deney tüpüne 2.5ml % 20'lik TCA, üzerine de 0.5 ml plazma konuldu. Bu karışımın üzerine daha sonra 1ml % 0.67'lik TBA ilave edildi ve tüplerin ağzı kapatıldı. 95 °C'de kaynayan su banyosuna alınan tüpler 30 dakika bekletildikten sonra 15 dakika buz üzerinde oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Kapağı açılan tüplerin üzerine 4 ml N-Buthanol eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Karışım 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst faz elde edildi. Elde edilen üst faz spektrofotometre küvetine aktarıldıktan sonra 535 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü (Tablo 3. 6. 7).

Tablo 3. 6. 7. Plazma MDA analizinin yapılışı

	Kör (S0)	Örnek	Standart (S1-S8)
%20'lik TCA	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
% 0.67'lik TBA	1 ml	1 ml	1 ml
Plazma	-	0.5 ml	-
Ultra saf su	0.5 ml	-	-
Standart	-	-	0.5 ml
95 °C'de su banyosuna 30 dakika bekletildi.			
15 dakika buz içerisinde bekletildi.			
Karışıma 4ml N-Buthanol eklendi ve vorteksle karıştırıldı.			
3000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve elde edilen üst faz küvete aktarıldı.			
Üst faz 535 nm dalga boyunda absorbanısı okundu.			

3. 6. 8. Hesaplama Yöntemi

Standartların (S0-S8), 535 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbanıları ölçüldükten sonra UVProbe 2.00 programı ile fotometrik metotta standart kalibrasyon eğrisi çizildi. Bu standart kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak örneklerin absorbanlarının nmol/ml cinsinden değerleri hesaplandı (Şekil 3. 6. 8). 1ml plazmadaki MDA düzeyinin elde edilmesi için hesaplanan değerler 2 ile çarpıldı.

**Şekil 3. 6. 8.** MDA için standart kalibrasyon eğrisi

3. 7. GPx Analizi

GPx analizi, Paglia ve Valentine (1967) metoduna dayalı ticari kit (RANSEL Glutathione Peroxidase Manual, RS 505, RANDOX Laboratories Ltd., Antrim, İngiltere, 2007) kullanılarak yapıldı (Şekil 3. 7).



Şekil 3. 7. Glutasyon Peroksidaz analiz kitinin görünümü

3. 7. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri

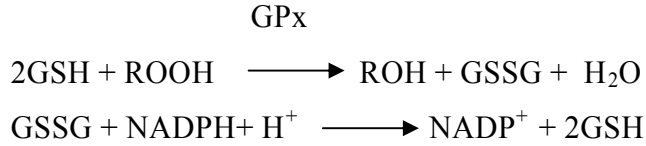
- Spektrofotometre cihazı: (Shimadzu-UVmini-1240, Japonya)
- Termo-elektrikli Sıcaklık Kontrollü Küvet Tutucusu: (Shimadzu-TCC-240A, Japonya)
- Kuvartz küvet
- Ultra saf su cihazı: (Millipore-Milli-DI, Simplicity 185, ABD)
- Vorteks: (Velp Scincetifica Zx³, İtalya)
- Heparinli tüp 4ml: (BD Vacutainer, BD Plymouth, İngiltere)
- Dijital otomatik pipetler-Ependorf 5-50 µl ve 100-1000 µl: (Socorex Acura 825, İsviçre)
- Renkli laboratuvar şişesi (200 ml)
- Ependorf tüpü (2 ml)

3. 7. 2. Kullanılan Çözeltiler

- Reagent (R1a): Glutasyon, Glutasyon redüktaz ve NADPH içeren reagent içerisine kitin, fosfat tampon ve EDTA içeren aynı hacimli özel tamponun (R1b) birleşimi ile hazırlandı.
- Kümen hidroperoksit (R2): 10 µl'si 10 ml ultra saf su ile seyreltildi. Kuvvetlice homojen oluncaya kadar vorteks ile karıştırıldı. Günlük taze olarak hazırlandı.
- Dilüsyon çözeltisi (R3): Kitin içerisinden çıkan özel dilüsyon çözeltisi içerisine 200 ml ultra saf su ilavesi ile hazırlandı.

3. 7. 3. Analizin Prensibi

GPx, Kümen hidroperoksit aracılığı ile glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında oksitlenmiş glutatyonda hemen indirgenmiş forma dönüşür ve buna NADPH'nin NADP'ye oksidasyonu eşlik eder. Bu reaksiyonun absorbanı 340 nm de ölçülür.



3. 7. 4. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması

Deneme ve kontrol gruplarından alınan heparinli tam kandan 50 µl alınıp üzerine 2 ml R3 konularak seyreltildi ve ölçüm için hazır hale getirildi.

3. 7. 5 Analizin Yöntemi

Ölçüm prosedürü 340 nm dalga boyunda, kuartz küvette, 37 °C'de termoelektirikli sıcaklık kontrollü spektrofotometrede yapıldı. Örnekler ve Reagent Tablo 3. 7. 5'de gösterilen şekilde hazırlandı.

Tablo 3. 7. 5. GPX analizinin yapılışı

	Kör	Örnek
Reagent (R1)	1 ml	1 ml
Ultra saf su	0.02 ml	
Dilüe edilmiş örnek	-	0.02 ml
İyice karıştırılır.		
Kümen hidroperoksit (R2)	0.04 ml	0.04 ml

Ölçüm işlemi yapılmaya başlamadan küvet havaya karşı sıfırlandı. 0.02 ml örnek üzerine 1 ml R1 eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırıldı. Sonra R2 eklendi ve ölçüm başlatıldı. Bir dakika sonra ilk absorbansları okundu. Daha sonra 1'er dakika arayla 2 okuma daha yapıldı. Aynı işlemler kör içinde tekrar edildi.

3. 7. 6. Hesaplama Yöntemi

UVProbe 2.00 programı ile kinetik modda örnek ve körün 2 dakika boyunca absorbans düşüşü (ΔA) hesaplandı ve bulunan bu değer kitte belirtilen aşağıdaki formülde yerine konuldu ve U/l cinsinden değer elde edildi. Bulunan bu değer dilüsyon faktörü 41 ile çarpılarak tam kandaki miktar belirlendi. Çalışmada hesaplamaların daha rahat yapılabilmesi için elde edilen değer U/ml'ye dönüştürülmüştür.

$$U/l \text{ hemozilat} = 8412 \times \Delta A_{(\text{örnek ve blank})}$$

3. 8. SOD Analizi

SOD analizi, Suttle (1986) metoduna dayalı ticari kit (RANSOD Superoxide dismutase Manual SD 125, RANDOX Laboratories Ltd., Antrim, İngiltere, 2007) kullanılarak yapıldı (Şekil 3. 8).



Şekil 3. 8. Süperoksit dismutaz analiz kitinin görünümü

3. 8. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuar Malzemeleri

- Spektrofotometre cihazı: (Shimadzu-UVmini-1240, Japonya)
- Termo-elektrikli Sıcaklık Kontrollü Küvet Tutucusu: (Shimadzu-TCC-240A, Japonya)
- Kuvartz Küvet
- Ultra saf su cihazı: (Millipore-Milli-DI, Simplicity 185, ABD)
- Vorteks: (Velp Scincetifica Zx³, İtalya)
- Dijital otomatik pipetler-Ependorf 5-50 µl ve 100-1000 µl: (Socorex Acura 825, İsviçre)
- Analitik terazi: (Shimadzu -AUW220D, Japonya)
- Mezür (100 ml-250 ml)
- Soğutmalı santrifüj: (Hermle Z 300K, Germany)
- PH metre: (Thermo Orion710A+, ABD)
- EDTA'lı tüp 4 ml: (Ayset Tube, Türkiye)
- Buzdolabı: (Profilo BD 1390, Türkiye)
- Balon joje (1000 ml)

3. 8. 2. Kullanılan Kimyasallar

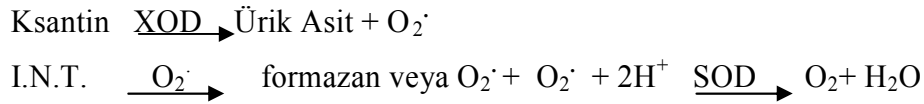
- Sodyum Klorür (NaCl): (Merck-K34042100 507, Almanya)
- Potasyum Klorür (KCl): (Merck-K34074635 502, Almanya)
- Disodyum Hidrojen Fosfat 2 sulu (Na₂HPO₄.2H₂O): (Merck-K33672780 441, Almanya)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (KH₂PO₄): (Carlo Erba-361507, İtalya)
- % 0.9 Sodyum Klorür (NaCl): (Eczacıbaşı-Baxter, Türkiye)

3. 8. 3. Kullanılan Çözeltiler

- Miks Substrat (R1a): Ksantin ve 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorit (I.N.T.) içeren miks substrat şişesine ticari kitin içerisinde bulunan özel tamponundan (R1 b) 20 ml konularak iyice karıştırıldı.
- Ksantin Oksidaz (R2): Ticari kitin içerisindeki ksantin oksidaz şişesine 10 ml ultra saf su eklenerek oluşturuldu.
- Fosfat tampon (pH 7.0): 4.03 g NaCl, 0.100 g KCl, 6.318 g Na₂HPO₄.2H₂O, 0.1 g KH₂PO₄ tartılarak 1 litrelik balon jojeye konuldu ve bir miktar ultra saf su ile çözdürüldükten sonra 500 ml'ye tamamlandı.

3. 8. 4. Analizin Prensibi

Süperoksit Dismutazın rolü oksidatif enerji sürecinde üretilen toksik süperoksit radikalının (O₂[·]) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırmaktır. Bu metot süperoksit radikallerini oluşturmak için ksantin ve ksantin oksidaz (XOD) enzimini kullanarak I.N.T. ile reaksiyona girmesini sağlar. Bunun sonucunda da kırmızı formazan oluşur. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür.



3. 8. 5. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması

EDTA'lı tüplerde toplanan 0.5 ml tam kan alınıp 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan plazma ayrıldı. Daha sonra eritrositler her

defasında 3ml olmak üzere %0.9'luk NaCl solüsyonu ile 4 kere yıkandı. Her yıkamadan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

Yıkanan ve santrifüjlenen eritrositler üzerine toplam hacim 2 ml olacak şekilde soğuk ultra saf su eklenerek oluşturulan lizatın iyice karışması sağlandı. 4 °C'de 15 dakika bekletildi. Oluşan lizat 0.01 mol/l fosfat tampon (pH 7.0) ile son dilüsyon faktörü 200 olacak şekilde 50 kat seyreltildi.

3. 8. 6. Standartların Hazırlanması

Standart şişesi (CAL) üzerine 10 ml ultra saf su eklendi ve stok standart (S6) elde edildi. Bu standardın sonraki dilüsyonlarının hazırlanması Tablo 3. 8. 6'dan yararlanılarak hazırlandı. Standartlar ve örneklerin ölçümü sırasında kör olarak sadece fosfat tampondan oluşan S1 kullanıldı. Kullanılan ticari kitin stok standartından hazırlanan konsantrasyonlarından faydalanılarak (4.84 U/ml), ölçümler yapıldıktan sonra ikinci dereceden standart kalibrasyon eğrisi hazırlandı.

Tablo 3. 8. 6. SOD analizinin standartlarının hazırlanışı

Standartlar	Standart Solüsyonun Hacmi	Fosfat tampon (pH 7.0)
S6	Stok standart	-
S5	5 ml S6	5 ml
S4	5 ml S5	5 ml
S3	5 ml S4	5 ml
S2	3 ml S3	6 ml

3. 8. 7. Analizin Yöntemi

Ölçüm prosedürü 505 nm dalga boyunda, kuartz küvette, 37 °C'de termoelektrikli sıcaklık kontrollü spektrofotometrede yapıldı. Örnekler ve Reagent Tablo 3. 8. 7'de gösterilen şekilde hazırlandı.

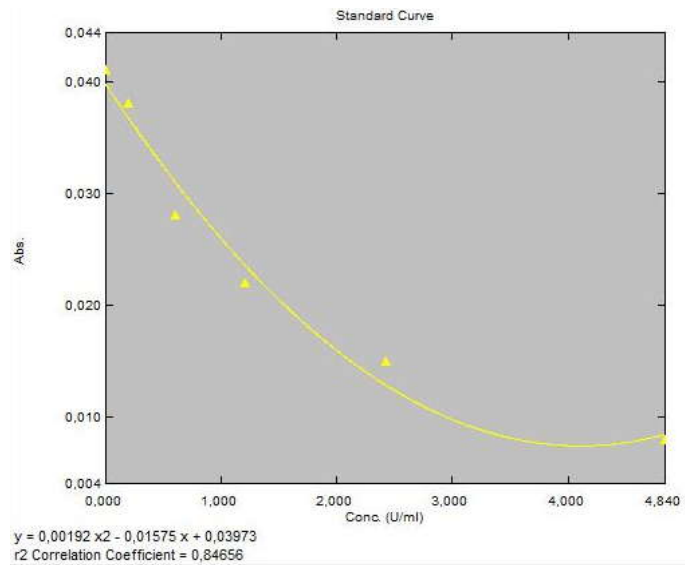
Tablo 3. 8. 7. SOD analizinin yapılışı

	Kör	Örnek	Standart(S2-S6)
Dillüe Edilmiş Eritrosit Hemozilatı	-	50 µl	-
Standart	-	-	50 µl
Fosfat Tampon	50 µl	-	
Miks Substrat	1.7 ml	1.7 ml	1.7 ml
İyice karıştırılır			
Ksantin Oksidaz	0.25 ml	0.25 ml	0.25.ml

Ölçüm işlemi yapılmaya başlamadan küvet havaya karşı sıfırlandı. 50 µl örneğin üzerine 1.7 ml miks substrat eklendi ve pipet ile karıştırıldı. Sonra 0.25 ml ksantin oksidaz eklenip hafifçe karıştırıldı ve ölçüm başlatıldı. 30 saniye sonra ilk absorbanları okundu. Daha sonra 3. dakikada final absorbanları okundu. Aynı işlemler kör içinde yapıldı.

3. 8. 8. Hesaplama Yöntemi

UVProbe 2.00 programı ile kinetik modda örnek ve körün 3 dakika boyunca absorban düşüşü hesaplandı. Elde edilen değerler oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden faydalanılarak U/ml cinsinden bulundu (Şekil 3. 8. 8). Bulunan bu değerler tüm kanda mililitredeki SOD oranını bulmak için dilüsyon faktörü 200 ile çarpıldı.

**Şekil 3. 8. 8.** SOD analizi için standart kalibrasyon eğrisi

3. 9. CAT Analizi

CAT analizi Johanson ve Borg (1988) metoduna dayalı ticari kit (Catalase Assay Kit-707002, CAYMAN Chemical Company Ann Arbor, MI, Amerika, 2007) kullanılarak yapıldı (Şekil 3. 9).



Şekil 3. 9. Katalaz analiz kiti

3. 9. 1. Kullanılan Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri

- Plate Reader: (Merck, SensIdent Scan-03482, Darmstadt, Almanya)
- Ultra saf su cihazı: (Millipore-Milli-DI, Simplicity 185, ABD)
- Vorteks: (Velp Scincetifica Zx³, İtalya)
- Dijital otomatik pipetler-Ependorf 5-50 µl ve 100-1000 µl: (Socorex Acura 825, İsviçre)
- Dijital otomatik pipet-8 kanal-5-100 µl: (Labopette electronic 9480802, Hirschmann Laborgerate, Almanya)
- Derin dondurucu (-80 °C): (Jouvan VX 380 E, Fransa)
- Shaker: (Heidolph Titramax 1000-090703277, Almanya)

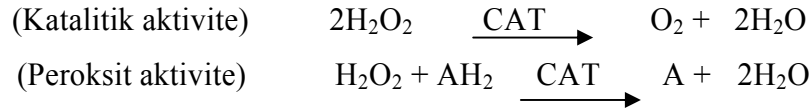
- Soğutmalı santrifüj: (Hermle Z 300K, Germany)
- EDTA'lı tüp 4 ml: (Ayset Tube, Türkiye)
- Cam tüp (10 ml)
- Ependorf tüpü (1 ml)

3.9.2. Kullanılan Çözeltiler

- Ölçüm tamponu: 2 ml konsantre ölçüm tamponu 18 ml ultra saf su ile seyreltildi. Final ölçüm tamponu (100 mM potasyum fosfat, pH 7.5) ölçüm için kullanıldı.
- Örnek tamponu: 5 ml konsantre örnek tampon 45 ml ultra saf su ile seyreltildi. Final örnek tampon (25 mM potasyum fosfat, pH 7.5, 1 mM EDTA, % 0.1 BSA) analiz öncesi formaldehit standartını ve CAT pozitif kontrol ve CAT örneklerini seyreltmek için kullanıldı.
- Formaldehit Standardı: 4.25 M formaldehit içermekte ve kitte kullanıma hazır bir şekilde bulunmaktadır.
- CAT kontrol: Liyofilize sığır karaciğer CAT tozunu içeren şişeye 2 ml örnek tampon eklendi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. Böylece CAT yeniden şekillendi. Yeniden şekillenen bu enzimden 100 µl alındı ve 1.9 ml örnek tampon ile seyreltildi. Seyreltilmiş enzim 30 dakika aktivitesini korumaktadır.
- Potasyum Hidroksit (KOH): KOH şişesi KOH peletleri içermektedir. KOH peletleri su ile çözüldüğünde ısı meydana geleceğinden buz üzerinde 4 ml soğuk ultra saf su eklendi ve vorteksle karıştırıldı. Böylece 10 M KOH solüsyonu elde edildi.
- Metanol: Kite kullanıma hazır bir şekilde bulunmaktadır.
- Hidrojen peroksit (H₂O₂): Kite bulunan şişe H₂O₂'nin 8.82 M solüsyonunu içermektedir. 40 µl H₂O₂ 9.96 ml ultra saf su ile seyreltildi.
- Kromojen (purpald): Kullanıma hazır bulunan bu şişe 0.5 M hidroklorik asit içerisinde 4-amino-3-hydrazino-5-marcapto-1,2,4 triazole solüsyonu içermektedir.
- Potasyum Periodat: Kullanıma hazır bulunan bu şişe 0.5 M KOH içerisinde potasyum periodat solüsyonu içermektedir.

3. 9. 3. Analizin Prensibi

CAT, hem normal aerobik metabolizmanın hem de patolojik reaktif oksijen türlerinin toksik ürünlerinin ve H₂O₂'nin detoksifikasyonunda rol oynar. CAT enzimi H₂O₂'yi bir molekül oksijen ve 2 molekül suya çevirir. CAT ayrıca düşük molekül ağırlıklı alkollerin elektron vermesini sağlayarak peroksidatik aktivite gösterir. Alifatik alkoller CAT için özel bir substrat olmasına rağmen diğer enzimler bu substratı peroksidatik aktivite için kullanamazlar.



Bu metot H₂O₂'nin optimum konsantrasyonunun oluşumunda metanol ile enzimin reaksiyonunu temel alır. Formaldehit üretimi bir kromojen olan 4-amino-3-hydrazino-5-marcapto-1,2,4 triazole ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Kromojen özellikle aldehitlerle çift döngülü heterosiklik form oluşturarak oksidasyon sonucu renksiz durumdan mor renge dönüşür. CAT aktivitesinin ölçümü belirtilen reaksiyona dayanmaktadır.

3. 9. 4. Örneklerin Analiz Öncesi Hazırlanması

EDTA'lı tüplerde toplanan tam kandan 0.5 ml alındı ve kapaklı tüpe konuldu. 4 °C soğutmalı santrifüjde 10 dakika 3000 rpm'de hızla santrifüj edildi. Plazma ve altındaki beyaz lenfosit tabakası uzaklaştırıldı. Eritrositlerin üzerine 4 katı soğuk ultra saf su eklendi ve lizat haline gelmesi sağlandı. 4 °C soğutmalı santrifüjde 15 dakika 10000xg'de santrifüj edildi. Toplanan üst faz aynı gün içinde ölçüm yapılacaksa buz üzerinde bekletildi. Aynı gün ölçüm yapılmayacaksa – 80 °C'de saklandı.

3. 9. 5. Standartların Hazırlanması

10 µl formaldehit standartı 9.99 ml örnek tampon ile seyreltildi ve 4.25 mM formaldehit stok solüsyonu elde edildi. A, B, C, D, E, F ve G olarak isimlendirilen 7 cam tüp alındı. Tablo 3. 9. 5'de gösterilen miktarda tüplere örnek tampon ve elde edilen stok solüsyon konularak standartlar oluşturuldu.

Tablo 3. 9. 5. CAT analizinin standartlarının hazırlanması

Standartlar	Formaldehit(μl)	Örnek tampon(μl)	Final konsantrasyon (μM formaldehit)
A	0	1000	0
B	10	990	5
C	30	970	15
D	60	940	30
E	90	910	45
F	120	880	60
G	150	850	75

3. 9. 6. Analizin Yöntemi

Aşırı ısınma CAT'ı inaktive edebileceği için enzim örnek hazırlığı ve analiz sırasında soğuk bir şekilde saklandı. Ölçüme başlamadan önce örnekler dışındaki tüm reagentlar oda sıcaklığına getirildi. CAT aktivitesinin standart değerlerin dışına çıkmaması için örnekler dilüsyon faktörü 2 olacak şekilde seyreltildi. Ölçümlerde ölçüm tamponu kullanıldı. Ölçüm prosedürü 540 nm dalga boyunda plate reader ile yapıldı (Tablo 3. 9. 6).

Tablo 3. 9. 6. CAT analizinin yapılışı

	Standart Kuyucukları(A-G)	CAT(Kontrol) Kuyucukları	Örnek Kuyucukları
Ölçüm tamponu	100 µl	100 µl	100 µl
Metahanol	30 µl	30 µl	30 µl
Standart (A-G)	20 µl	-	-
CAT(Kontrol)	-	20 µl	-
Lizat	-	-	20 µl
H₂O₂	20 µl	20 µl	20 µl
Tabaka örtücüsü ile örtülür ve karıştırıcıda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.			
KOH	30 µl	30 µl	30 µl
Kromojen	30 µl	30 µl	30 µl
Tabaka örtücüsü ile örtülür ve karıştırıcıda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.			
Potasyum Periodat	10 µl	10 µl	10 µl
Tabaka örtücüsü ile örtülür ve karıştırıcıda oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.			
Plate 540 nm dalga boyunda okundu.			

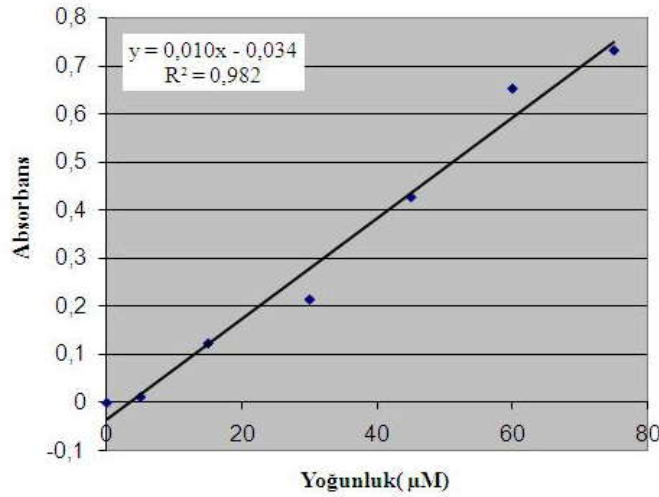
- a.** Formaldehit standart kuyucukları: Plakada dizayn edilen formaldehit standart kuyularına A'dan G ye kadar kuyu başına 100 µl ölçüm tamponu (seyreltilmiş), 30 µl metanol ve 20 µl standart eklendi.
- b.** Pozitif kontrol kuyuları CAT kontrol yazan kuyuya 100 µl ölçüm tamponu, 30 µl metanol ve 20 µl seyreltilmiş CAT (kontrol) eklendi.
- c.** Örnek kuyuları 100 µl ölçüm tamponu (seyreltilmiş), 30 µl metanol ve 20 µl örnek iki kuyuya eklendi.
- d.** Kuyuların hepsinde seyreltilmiş 20 µl H₂O₂ kullanılarak reaksiyonlar başlatıldı. Reaksiyon kesin başladığı zamandan emin olunarak ve olası en çabuk şekilde H₂O₂ eklendi.
- e.** Tabaka örtücüsü ile örtüldü ve bir karıştırıcıda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
- f.** Reaksiyonu bitirmek için tüm kuyulara 30 µl KOH eklendi ve sonra 30 µl Kromojen tüm kuyulara ilave edildi.

- g. Tabaka örtücü ile örtüldü ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
- h. Tüm kuyulara 10 µl potasyum periodat ilave edildi ve tabaka örtücü ile örtüldü. Karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- i. Plate Reader kullanılarak 540 nm'de absorbans okundu.

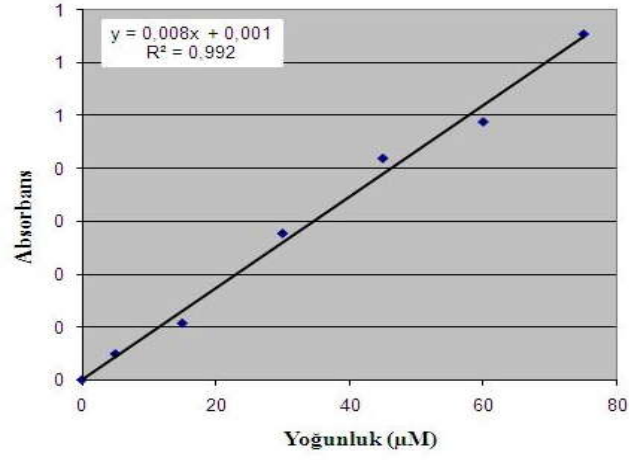
3. 9. 7. Hesaplama Yöntemi

CAT aktivitesinin doğru hesaplanabilmesi için CAT kontrol aktivitesinin 0.25-4 nmol/dakika/ml arasında olması gerekmektedir. Her bir standart ve örneğin absorbans değerleri hesaplandı. Standart A'nın absorbansı kendinden ve diğer tüm standart ve örneklerden çıkarıldı. Standartların düzeltilmiş absorbansları ile kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 3. 9. 7. 1, Şekil 3. 9. 7. 2). Örneklerden elde edilen değerlerin konsantrasyonu aşağıdaki formüle dayanarak hesaplandı. Dilüsyon faktörü 2 olarak hesaplandı.

$$\text{CAT aktivitesi} : \frac{\text{Örnek } (\mu\text{M})}{20 \text{ dakika}} \times \text{Örnek Dilüsyon} = \text{nmol/ dakika/ml}$$



Şekil 3. 9. 7. 1. CAT 1. plate için standart kalibrasyon eğrisi



Şekil 3. 9. 7. 2. CAT 2. plate için standart kalibrasyon eğrisi

3. 10. İstatistiksel Değerlendirme

Grupların zamana göre değişimi tek yönlü tekrarlanan ölçümlü deneme planına göre değerlendirildi. Grupların lipit peroksidasyon parametreleri için zaman dilimleri içerisindeki farklılıkları tek yönlü varyans analizine göre değerlendirildi. Gruplar ve zamanlar arasında farklılık olması durumunda farklılıkları ortaya koymak için Duncan çoklu karşılaştırma testi yapıldı. Gruplara göre lipit peroksidasyon ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler Pearson Korelasyon katsayısı ile tespit edildi. İstatistiksel analizler SPSS 15'te yapıldı.

4. BULGULAR

Lipit peroksidasyon parametrelerinin (CAT, GPx, SOD ve MDA) greft grupları ve zamana göre dağılımında elde edilen verilerin normallik kontrolü Shapiro-Wilk testi ile yapıldı ve tüm verilerin normal dağılıma uygun olduğu görüldü.

4. 1. Greft Gruplarının Zaman Dilimlerine Göre Birbirleriyle Karşılaştırılması

4. 1. 1. CAT Enzimi İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması

Genel olarak tüm greft grupları farklı zaman dilimlerinde CAT enzimi açısından incelenmiştir (Tablo 4. 1. 1, Şekil 4. 1. 1). Buna göre;

Operasyon sonrası 1. gün ölçümlerinde istatistiksel olarak en yüksek değer Bio-Oss grubunda (25.05) elde edilirken, en düşük değer 4BONE grubunda (18.67) elde edilmiştir ($p<0.05$).

Operasyon sonrası 3. gün ($p=0.053$) ve 7. gün ($p=0.247$) ölçümlerinde bütün greft grupları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir.

Operasyon sonrası 14. gün ölçümlerinde Bio-Oss grubu (23.74) ile fark olmamakla birlikte en yüksek değer Grafton grubunda (23.87) tespit edilirken en düşük değer 4BONE grubunda (19.84) elde edilmiştir ($p<0.05$).

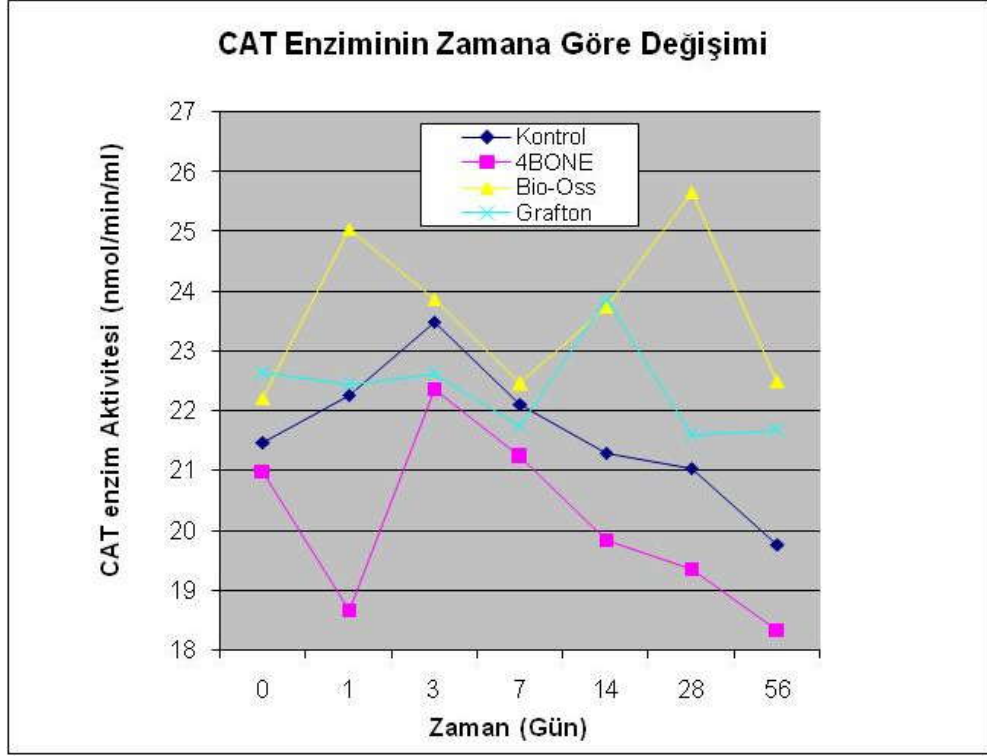
Operasyon sonrası 28. gün ölçümleri karşılaştırıldığında en yüksek değer Bio-Oss grubunda (25.65) elde edilirken en düşük değer 4BONE grubunda (19.36) elde edilmiştir ($p<0.05$).

Operasyon sonrası 56. gün ölçümleri karşılaştırıldığında en yüksek değer Grafton grubu (21.66) ile fark olmamakla birlikte Bio-Oss grubunda (22.50) elde edilmiştir ($p=0.352$). En düşük değer kontrol grubu (19.77) ile fark olmamakla birlikte 4BONE grubunda (18.33) tespit edilmiştir ($p=0.116$).

Tablo 4. 1. 1. Greft gruplarının CAT enzimi için zamana göre değişim değerleri (nmol/min/ml)

CAT	Uygulama Öncesi	Operasyon sonrası ölçüm zamanları (gün)					
		1.	3.	7.	14.	28.	56.
Gruplar	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
Kontrol	21.47±0.96	22.27 ± 0.56 b	23.48 ± 0.67	22.11 ± 1.60	21.29 ± 1.02 b	21.03 ± 0.88 b	19.77 ± 1.24 b
4BONE	20.99±1.17	18.67 ± 1.35 c	22.36 ± 0.81	21.23 ± 1.69	19.84 ± 0.95 c	19.36 ± 1.12 c	18.33 ± 1.31 b
Bio-Oss	22.21±1.05	25.05 ± 1.37 a	23.87 ± 0.99	22.45 ± 1.44	23.74 ± 0.93 a	25.65 ± 1.29 a	22.50 ± 2.06 a
Grafton	24.64±1.36	22.43± 2.56 b	22.61 ± 2.11	21.76 ± 2.20	23.87 ± 1.24 a	21.59 ± 1.10 b	21.66 ± 1.87 a

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p < 0.05$)



Şekil 4. 1. 1. Greft gruplarının CAT enzimi için zamana göre değişimleri

Kontrol grubunun, CAT enzim aktivitesi açısından zamana göre değişimi incelendiğinde operasyon sonrası 3. güne kadar artış devam etmekte ve 3. günde istatistiksel olarak en yüksek değerine ulaşmaktadır ($p < 0.05$). Daha sonra 7, 14 ve 28. günlerde değerlerin giderek düştüğü ve 56. günde istatistiksel olarak en düşük seviyeye ulaştığı görülmektedir ($p < 0.05$).

4BONE grubunun, CAT enzim aktivitesi açısından zamana göre değişimi incelendiğinde operasyon sonrası 1.gün değerinde düşüş gözlenmektedir. Daha sonra artış görülmekte ve 3. günde en yüksek seviyesine ulaşmaktadır, ancak bu değer ile uygulama öncesi ve 7. gün arasındaki değer istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p = 0.053$). Yedi, 14 ve 28. günlerde ise değerler giderek düşmekte, 56. günde en düşük seviyeye ulaşsa da bu değer ile 1 ve 28. günler arasında ölçülen değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p = 0.146$).

Bio-Oss grubunun, CAT enzim aktivitesi açısından zamana göre değişimi incelendiğinde operasyon sonrası 1. gün değerinde artış olmakla birlikte daha sonra 3 ve 7. günlerde düşüş göstermektedir. Ondört ve 28. günlerde artış görülürken 28. günde en yüksek seviyesine ulaşmaktadır, ancak 1 ve 28. gün arasında istatistiksel olarak fark

bulunmamaktadır ($p=0.417$). Yirmisekizinci günden sonra düşüş göstererek 56. günde operasyon öncesi değere yaklaşık bir değer elde edilmiştir.

Grafton grubunun, CAT enzim aktivitesi açısından zamana göre değişimi incelendiğinde 7. güne kadar elde edilen değerler birbirine oldukça yakın seyrederek azalmıştır ($p=0.363$). Yedinci günden sonra artmaya başlayan değerler 14. günde en yüksek seviyesine ulaşmıştır, ancak bu değer ile 1, 3, 7 ve 56. günler arasında ölçülen değerler istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0.054$). Daha sonra değerler düşerek 28 ve 56. günlerde operasyon öncesi değerlere yaklaşmıştır.

4. 1. 2. GPX Enzimi İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması

Genel olarak tüm greft grupları farklı zaman dilimlerinde GPx enzimi açısından incelenmiştir (Tablo 4. 1. 2, Şekil 4. 1. 2). Buna göre;

Operasyon sonrası 1. gün ($p=0.543$) ve 3. gün ($p=0.063$) ölçümlerinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir.

Operasyon sonrası 7. gün ölçümlerinde en yüksek değer istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte Grafton (12.18), Bio-Oss (12.17) ve 4BONE (11.62) gruplarında tespit edilmiştir ($p=0.668$). En düşük değer ise fark olmamakla birlikte kontrol grubu (9.13) ile 4BONE grubunda (11.62) elde edilmiştir ($p=0.054$).

Operasyon sonrası 14. gün ölçümlerinde en yüksek değer 4BONE grubunda (14.93) elde edilirken bu grup ile Grafton (14.85) ve Bio-Oss (14.50) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p=0.763$). En düşük değer ise kontrol grubunda (10.06) elde edilmiştir ($p<0.05$).

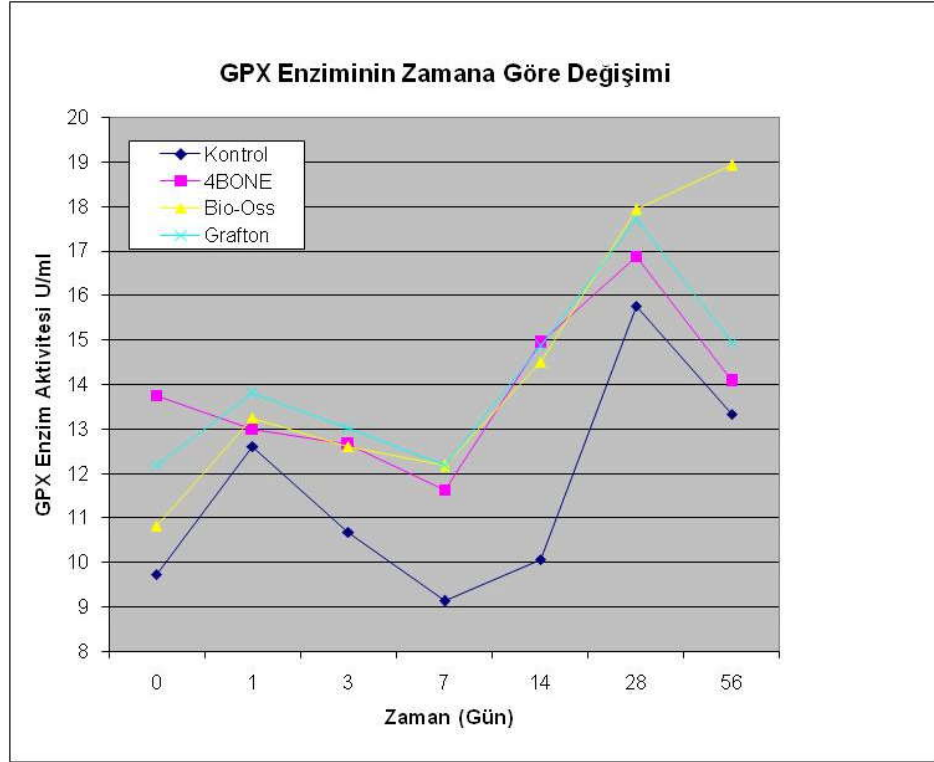
Operasyon sonrası 28. gün ölçümlerinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.358$).

Operasyon sonrası 56. gün ölçümlerinde Grafton grubu (14.95) ile fark olmamakla birlikte en yüksek değer Bio-Oss grubunda (18.92) elde edilmiştir ($p=0.075$). En düşük değer ise 4BONE (14.07) ve Grafton (14.95) grupları ile istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte kontrol grubunda (13.32) tespit edilmiştir ($p=0.480$).

Tablo 4. 1. 2. Greft gruplarının GPx enzimi için zamana göre değişim değerleri (U/ml)

GPx	Uygulama Öncesi	Operasyon sonrası ölçüm zamanları (gün)					
		1.	3.	7.	14.	28.	56.
Gruplar	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
Kontrol	9.73 ± 1.85	12.61 ± 3.94	10.68 ± 2.64	9.13 ± 2.37 b	10.06 ± 2.61 b	15.76 ± 4.72	13.32 ± 4.18 b
4BONE	13.74 ± 2.84	13.00 ± 2.07	12.64 ± 2.14	11.62 ± 2.77 a, b	14.93 ± 2.81 a	16.87 ± 1.73	14.07 ± 3.38 b
Bio-Oss	10.81 ± 2.06	13.24 ± 2.32	12.61 ± 2.24	12.17 ± 1.19 a	14.50 ± 0.92 a	17.92 ± 4.11	18.92 ± 4.09 a
Grafton	12.19 ± 3.85	13.79 ± 4.14	13.03 ± 0.91	12.18 ± 2.52 a	14.85 ± 3.08 a	17.71 ± 4.41	14.95 ± 4.23 a, b

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel olarak fark vardır (p < 0.05)



Şekil 4. 1. 2. Greft gruplarının GPx enzimi için zamana göre değişimleri

Kontrol grubunun GPx enzim aktivitesi açısından zamana göre değişimi incelendiğinde operasyon sonrası 1. gün değerinde artış olmakta ve daha sonra 3 ve 7. günlerde düşerek 7. günde en düşük değerine ulaşmaktadır, ancak bu değer ile uygulama öncesi, 1, 3 ve 14. günlerde ölçülen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p=0.088$). Daha sonra 14 ve 28. günlerde değerler artmış ve 28. günde en yüksek değerine ulaşmışsa da 1 ve 56. günler arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p=0.102$). Ellialtıncı günde değerler tekrar düşüş göstermekle beraber operasyon öncesi değere yaklaşmamıştır.

4BONE grubu GPx enzim aktivitesi açısından incelendiğinde değerler operasyon sonrasında 7. güne kadar birbirine oldukça yakın seyrederek azalmıştır ve 7. günde en düşük seviyeye ulaşmıştır ancak bu değer uygulama öncesi, 1, 3 ve 56. günlerde ölçülen değerlerden istatistiksel olarak farklılık göstermemektedir ($p=0.122$). Daha sonra 14 ve 28. günlerde artan değerler 28. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır, ancak bu değer 14 ve 56. günlerde ölçülen değerlerden istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık göstermemektedir ($p=0.061$). Elliialtıncı günde değerler tekrar düşüş göstermekle beraber operasyon öncesi değere yaklaşmıştır.

Bio-Oss grubu GPx enzim aktivitesi açısından incelendiğinde 1. gün değerinde artış olmakta, daha sonra 3 ve 7. günlerde düşmektedir, ancak bu değerler arasında istatistiksel önem bulunmamaktadır ($p=0.131$). Değerler 7. günden sonra giderek artmakta ve en yüksek değerine 28. gün ile istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte 56. günde ulaşmaktadır ($p=0.491$).

Grafton grubu GPx enzim aktivitesi açısından incelendiğinde 1. gün değerinde artış olmakta, daha sonra 3 ve 7 günlerde düşmekte ve 7. günde en düşük seviyesine ulaşmaktadır, ancak bu değerle uygulama öncesi, 1, 3, 14 ve 56. günler arasında istatistiksel olarak farklılık bulunmamaktadır ($p=0.204$). Daha sonra 14 ve 28. günlerde artan değerler 28. günde en yüksek seviyeye ulaşmıştır, ancak bu değer 1, 14 ve 56. günden istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p=0.061$). Elliialtıncı günde değerler tekrar düşüş göstermiştir.

4. 1. 3. SOD Enzimi İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması

Genel olarak tüm greft grupları farklı zaman dilimlerinde SOD enzimi açısından incelenmiştir (Tablo 4. 1. 3, Şekil 4. 1. 3). Buna göre;

Operasyon sonrası 1. gün ($p=0.458$), 3. gün ($p=0.286$) ve 7. gün ($p=0.270$) ölçümlerinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir.

Operasyon sonrası 14. gün ölçümlerinde tüm gruplar arasında en yüksek değer kontrol grubunda (399.69) olmakla birlikte bu grup ile Bio-Oss grubu (394.09) arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p=0.723$). En düşük değer ise Grafton grubunda (314.57) olmakla birlikte bu grup ile 4BONE grubu (329.77) arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p=0.340$).

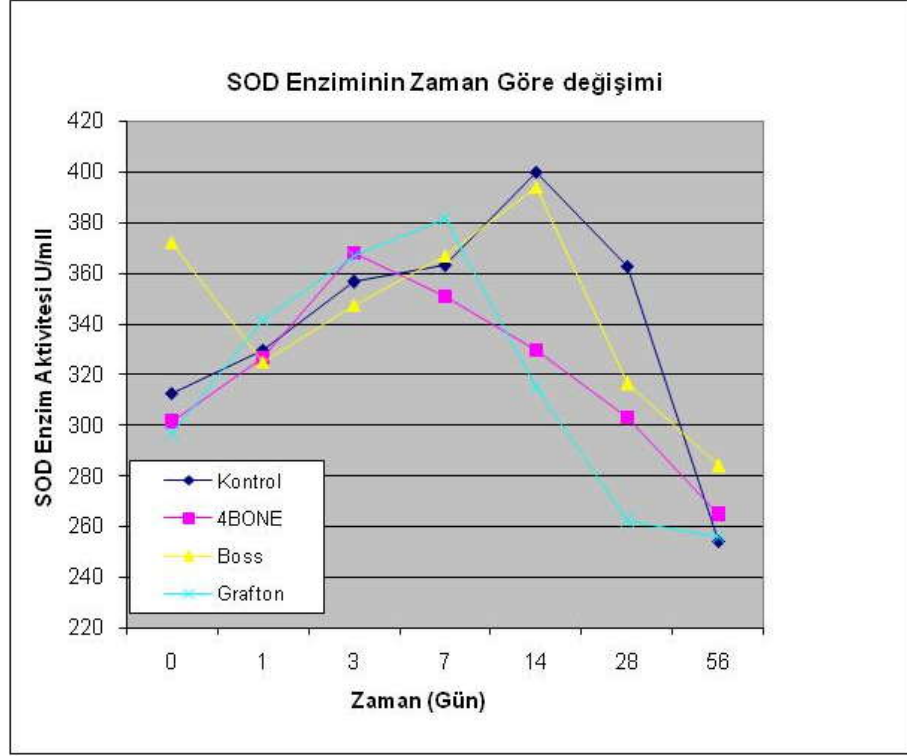
Operasyon sonrası 28. gün ölçümlerinde en yüksek değer kontrol grubunda (362.69) elde edilirken en düşük değer Grafton grubunda (262.00) elde edilmiştir ($p<0.05$).

Operasyon sonrası 56. gün ölçümlerinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.70$).

Tablo 4. 1. 3. Greft gruplarının SOD enzimi için zamana göre değişim değerleri (U/ml)

SOD	Uygulama Öncesi	Operasyon sonrası ölçüm zamanları (gün)					
		1.	3.	7.	14.	28.	56.
Gruplar	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
Kontrol	312.40 ± 36.11	329.54 ± 26.45	356.40 ± 34.46	362.94 ± 37.26	399.69 ± 37.71 a	362.69 ± 40.65 a	253.89 ± 29.41
4BONE	301.00 ± 37.67	326.60 ± 23.11	368.00 ± 21.84	350.71 ± 35.67	329.77 ± 27.76 b	302.89 ± 40.17 b	264.37 ± 26.18
Bio-Oss	372.00 ± 43.40	324.94 ± 45.84	347.29 ± 34.39	366.74 ± 34.96	394.09 ± 31.31 a	316.40 ± 25.84 b	283.77 ± 33.61
Grafton	296.34 ± 53.16	341.40 ± 46.94	366.74 ± 36.92	381.49 ± 69.15	314.57 ± 15.28 b	262.00 ± 18.51 c	255.69 ± 16.79

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p < 0.05$)



Şekil 4. 1. 3. Greft gruplarının SOD enzimi için zamana göre değişimleri

Kontrol grubu SOD enzim aktivitesi açısından incelendiğinde operasyon sonrası değerlerinde 14. güne kadar giderek artan değerler elde edilmiştir. Ondördüncü günde en yüksek değeri gösterirken bu değer ile 7 ve 28. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0.67$). Belirtilen değerler giderek azalmış ve 56. günde en düşük değere ulaşmıştır ($p<0.05$).

4BONE grubu SOD enzim aktivitesi açısından incelendiğinde operasyon sonrası değerlerde 3. güne kadar düzgün bir artış olmaktadır. Üç ile 7. gün arasında istatistiksel bir fark olmamakla birlikte 3. günde en yüksek değerine ulaşmıştır ($p=0.304$). Daha sonra zamanla azalarak 56. günde en düşük seviyeye gelmiştir ($p<0.05$).

Bio-Oss grubu SOD enzim aktivitesi açısından incelendiğinde operasyon sonrası 1.gün değerinde düşüş gözlenmekte ve daha sonra 14. güne kadar düzgün bir artış göstermektedir. Ondördüncü günde en yüksek değerine ulaşsa da uygulama öncesi ve 7 ile 14. gün arasında istatistiksel olarak bir fark tespit edilmemiştir ($p=0.190$). Ardından tekrar azalarak 56. günde en düşük değerine ulaşmış, ancak 28 ile 56. gün arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($p=0.099$).

Grafton grubu SOD enzim aktivitesi açısından incelendiğinde operasyon sonrası değerler 7. güne kadar kademeli bir artış göstermiş ve 7. günde en yüksek seviyeye ulaşmakla birlikte 1 ve 3. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.094$). Daha sonra değerler zamanla azalarak 56. günde en düşük seviyeye inmiştir. Uygulama öncesi ve 28 ile 56. gün arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0.089$).

4. 1. 4. MDA İçin Zaman Dilimlerine Göre Greft Gruplarının Birbirleriyle Karşılaştırılması

Genel olarak tüm greft grupları farklı zaman dilimlerinde MDA ürünü açısından incelenmiştir (Tablo 4. 1. 4, Şekil 4. 1. 4). Buna göre;

Operasyon sonrası 1. gün ölçümlerinde en yüksek değer kontrol grubunda (7.49) elde edilmiştir ($p<0.05$). En düşük değer ise Grafton grubunda (4.80) tespit edilirken bu grup ile 4BONE (4.99) ve Bio-Oss (5.73) grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p=0.127$).

Operasyon sonrası 3. gün ölçümlerinde en yüksek değer kontrol grubunda (9.97) elde edilirken bu grup ile 4BONE (8.35) ve Grafton (8.46) grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ($p=0.080$). En düşük değer ise Bio-Oss grubunda (6.06) tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Operasyon sonrası 7. gün ölçümlerinde en yüksek değer kontrol grubunda (10.95) tespit edilirken, en düşük değer Bio-Oss grubunda (6.09) tespit edilmiştir ($p<0.05$).

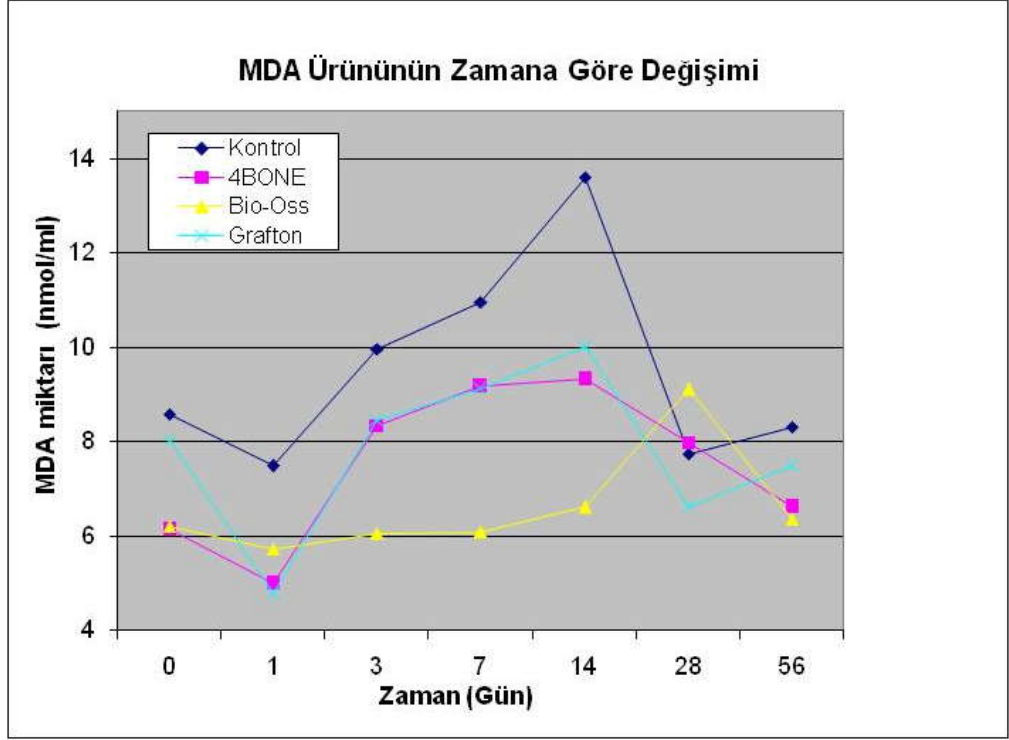
Operasyon sonrası 14. gün ölçümlerinde en yüksek değer kontrol grubunda (13.61) tespit edilirken, en düşük değer Bio-Oss grubunda (6.62) tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Operasyon sonrası 28. gün ölçümlerinde en yüksek değer Bio-Oss grubunda (9.11) olmakla birlikte bu grup ile kontrol (7.75) ve 4BONE (7.98) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0.089$). En düşük değer Grafton (6.64) grubunda elde edilirken bu grup ile kontrol (7.75) ve 4BONE (7.98) grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0.085$).

Tablo 4. 1. 4. Greft gruplarının MDA için zamana göre değişim değerleri (nmol/ml)

MDA	Uygulama Öncesi	Operasyon sonrası ölçüm zamanları (gün)					
		1.	3.	7.	14.	28.	56.
Gruplar	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$	$\bar{X} \pm S_x$
Kontrol	8.59 ± 1.46	7.49 ± 1.31 a	9.97 ± 1.25 a	10.95 ± 1.19 a	13.61 ± 1.36 a	7.75 ± 1.38 a,b	8.32 ± 1.99 a
4BONE	6.13 ± 1.90	4.99 ± 1.16 b	8.35 ± 1.22 a	9.17 ± 0.64 b	9.32 ± 1.53 b	7.98 ± 0.79 a,b	6.62 ± 1.14 b
Bio-Oss	6.21 ± 1.80	5.73 ± 0.89 b	6.06 ± 0.69 b	6.09 ± 1.55 c	6.62 ± 1.90 c	9.11 ± 1.45 a	6.36 ± 1.12 b
Grafton	8.05 ± 1.19	4.80 ± 0.71 b	8.46 ± 2.53 a	9.11 ± 1.03 b	10.03 ± 2.69 b	6.64 ± 1.59 b	7.50 ± 1.14 a,b

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p < 0.05$)



Şekil 4. 1. 4. Greft gruplarının MDA ürünü için zamana göre değişimleri

Operasyon sonrası 56. gün ölçümlerinde en yüksek değer fark olmamakla birlikte Grafton grubuyla (7.50) kontrol grubunda (8.32) tespit edilmiştir ($p=0.289$). En düşük değer ise 4BONE (6.62) ve Grafton (7.50) grupları ile istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte Bio-Oss grubunda (6.36) elde edilmiştir ($p=0.161$).

Kontrol grubu MDA ürünü açısından incelendiğinde operasyon sonrası 1. gün değerinde en düşük değerine ulaşmasına rağmen bu değer ile uygulama öncesi, 28 ve 56. günler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p=0.202$). Birinci günden sonra değerlerde giderek artma görülmüş ve 14. günde en yüksek değerine ulaşmıştır ($p<0.05$). Değerler daha sonra tekrar düşerek 56. günde operasyon öncesi değerlere yaklaşmıştır.

4BONE grubu MDA ürünü açısından incelendiğinde 1. gün değerinde en düşük değerine ulaşmasına rağmen bu değer ile uygulama öncesi değer arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p=0.099$). Ondördüncü günde en yüksek değerine ulaşsa da 3, 7 ve 28. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0.074$). Ondördüncü günden sonra değerler giderek düşerek 56. günde operasyon öncesi değere yaklaşmıştır.

Bio-Oss grubu MDA ürünü açısından incelendiğinde operasyon sonrası elde edilen değerlerde 28. güne kadar istatistiksel olarak herhangi bir farklılık görülmezken ($p=0.306$) 28. günde en yüksek değerine ulaşmıştır ($p<0.05$). Daha sonra tekrar düşerek 56. günde operasyon öncesi değere yaklaşmıştır.

Grafton grubu MDA ürünü açısından incelendiğinde operasyon sonrası 1. günde istatistiksel olarak en düşük değerine ulaşmıştır ($p<0.05$). Birinci günden sonra değerlerde giderek artma görülmüş ve 14. günde en yüksek değerine ulaşmıştır, ancak uygulama öncesi, 3 ve 7. günlerde ölçülen değerler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p=0.052$). Belirtilen değerler daha sonra tekrar düşerek 56. günde operasyon öncesi değerlere yaklaşmıştır.

4. 2. Gruplara Göre Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

4. 2. 1. Kontrol Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

Kontrol grubu için ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT değerlerinin SOD ve MDA değerleri ile arasında pozitif yönde, GPx değerleri ile arasında negatif yönde bir ilişki düzeyi bulunmuş olup, sadece SOD ile olan ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

GPx değerlerinin SOD ve MDA değerleri ile arasındaki ilişki düzeyi negatif yönde olup, sadece MDA ile olan ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

MDA ile SOD arasında ise pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki düzeyi bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4. 2. 1).

Tablo 4. 2. 1. Kontrol grubu için ölçüm parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırılması

	SOD	GPx	MDA
CAT	0.344*	-0.190 ($p=0.191$)	0.157 ($p=0.280$)
GPx	-0,195 ($p=0.180$)		-0.343*
MDA	0.564*		

*0.05 seviyesinde korelasyon önemlidir

4. 2. 2. 4BONE Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

4BONE grubu için ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT değerlerinin SOD ve MDA değerleri ile arasında pozitif yönde, GPx değerleri ile arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı ilişki düzeyleri bulunmuştur ($p<0.05$).

GPx değerleri ile SOD ve MDA değerleri arasındaki ilişki düzeyi negatif yönde olup, sadece SOD ile olan ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

MDA ile SOD değerleri arasında ilişki düzeyi pozitif yönde olup, bu düzey istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4. 2. 2).

Tablo 4. 2. 2. 4BONE grubu için ölçüm parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırılması

	SOD	GPx	MDA
CAT	0.402*	-0.293*	0.335*
GPx	-0,376*		-0.070 ($p=0.632$)
MDA	0.192 ($p=0.186$)		

*0.05 seviyesinde korelasyon önemlidir

4. 2. 3. Bio-Oss Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

Bio-Oss grubu için ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT değerlerinin GPx ve MDA değerleri ile arasında pozitif yönde, SOD değerleri ile arasında negatif yönde bir ilişki düzeyi olup ancak bu ilişki düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

GPx değerlerinin SOD değerleri ile arasında negatif yönde, MDA değerleri ile arasında pozitif yönde bir ilişki düzeyi olup bu ilişki düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

MDA ile SOD değerleri arasında ilişki düzeyi pozitif yönde olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4. 2. 3).

Tablo 4. 2. 3. Bio-Oss grubu için ölçüm parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırılması

	SOD	GPx	MDA
CAT	-0.107 (p=0.463)	0.134 (p=0.360)	0.234 (p=0.106)
GPx	-0,358*		0.448*
MDA	0.003 (p=0.984)		

*0.05 seviyesinde korelasyon önemlidir

4. 2. 4 Grafton Grubu İçin Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

Grafton grubu için ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT değerleri ile GPx, MDA ve SOD değerleri arasındaki ilişki düzeyi pozitif yönde olup sadece SOD değerleri ile olan ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

GPx değerleri ile SOD değerleri arasında pozitif yönde, MDA değerleri ile arasında negatif yönde ilişki düzeyi olup ancak bu ilişki düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

MDA ile SOD değerleri arasında ilişki düzeyi pozitif yönde olup bu ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4. 2. 4).

Tablo 4. 2. 4. Grafton grubu için ölçüm parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırılması

	SOD	GPx	MDA
CAT	0.328*	0.151 (p=0.299)	0.216 (p=0.137)
GPx	0,016 (p=0.913)		-0.134 (p=0.360)
MDA	0.127 (p=0.384)		

*0.05 seviyesinde korelasyon önemlidir

4. 2. 5. Genel Olarak Ölçüm Parametreleri Arasındaki İlişkilerin Değerlendirilmesi

Genel olarak ölçüm parametreleri arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT değeri ile GPx, MDA ve SOD değerleri arasında ilişki düzeyi pozitif yönde olup sadece SOD ile olan ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

GPX değeri ile MDA ve SOD değerleri arasında ilişki düzeyi negatif yönde olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

MDA ile SOD değerleri arasında ilişki düzeyi pozitif yönde olup bu ilişki düzeyi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 4. 2. 5).

Tablo 4. 2. 5. Genel olarak ölçüm parametrelerinin birbirleriyle karşılaştırılması

	GPX	MDA	SOD
CAT	0.192 (p=0.222)	0.188 (p=0.232)	0.337*
GPX		-0.121 (p=0.447)	-0.111 (p=0.483)
MDA			0.116 (p=0.464)

*0.05 seviyesinde korelasyon önemlidir

5. TARTIŞMA

Organizmadaki reaksiyonlar sırasında fizyolojik olarak yararlı birçok ürünün oluşumunun yanı sıra fazla miktarda bulduklarında metabolizmayı olumsuz yönde etkileyebilecek çeşitli bileşikler de bulunmaktadır. Bunlardan en önemlilerinin serbest oksijen radikalleri olduğu ifade edilmektedir (Angel ve ark., 1987; Aldemir, 1993). Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip, bağımsız bulunma yeteneğindeki herhangi bir atom veya moleküldür (Halliwell, 1984; 1987; Horenstein ve ark., 2000). Serbest radikaller hem organik hem inorganik halde bulunurlar ve oldukça reaktif özellik gösterirler. Bu radikallerin oksijenin toksik etkilerinin tamamından sorumlu oldukları ve oksijeni metabolize eden tüm canlılarda oluştukları bildirilmiştir (Aldemir, 1993; Cheeseman ve Slater, 1993).

Belirli bir düzeye kadar oksijen radikallerinin artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Yani sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge içindedir. Oksidanlar belirli bir düzeyi aştıklarında veya antioksidanlar yetersiz kaldıklarında yani denge bozulduğunda söz konusu serbest radikaller organizmanın yapı elemanları olan lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki gösterirler (Cross ve ark., 1987; Southorn ve Powis, 1988). Serbest oksijen radikallerinin membran lipitlerini etkilemesi sonucu membranda geri dönüşümsüz olarak hasar meydana getiren lipit peroksidasyonu şekillenir (Akkuş, 1995; Şimşek, 1999). Lipit peroksidasyonu PUFA'nın oksidatif yıkımı olarak tanımlanmaktadır. Bunun sonucunda hücre membranının akışkanlığı azalır, spesifik olmayan iyon permabilitesi artar, membran sızıntısına ve yıkımına neden olarak hücre ölümü meydana geldiği bildirilmiştir (Halliwell, 1987; 1994).

Serbest oksijen radikalleri, farklı organ sistemlerinde doku hasarına neden olmalarından dolayı son yirmi yıldır üzerinde sıkça durulmuş ve çok sayıda hastalığa bu radikallerin eşlik ettiği kanıtlanmıştır (Prasad ve ark., 2003; Tulunoğlu, 1999). Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu ve doku yıkımı ile ilişkili olduğu bilinen patolojik durumlar arasında yaşlanma, ateroskleroz, kanser, enfarktüs, diabet, enflamatuar

hastalıklar, romatoid artrit, Parkinson ve karaciğer hastalıkları bulunmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1984; Akkuş, 1995; Şimşek, 1999; Tulunoğlu, 1999).

Serbest oksijen radikallerinin kemik metabolizması üzerine fizyolojik ve patolojik olmak üzere iki yönlü rol oynadığı bildirilmiştir. Fizyolojik şartlarda osteoklastlar tarafından reaktif oksijen radikallerinin üretimi sağlanır ve kemiğin remodelingi sırasında kalsifiye dokunun yıkımına yardımcı olurlar. Kemik kırığı gibi patolojik durumlarda ise radikal üretiminin oldukça yüksek olduğu ve bu durumun kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği ifade edilmektedir (Banfi ve ark., 2008).

Serbest oksijen radikallerinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (Göktürk ve ark., 1995; Turgut ve ark., 1999; Prasad ve ark., 2003; Cetinus ve ark., 2005; Yeler ve ark., 2005; Sheweita ve Khoshhal, 2007). Garret ve ark. (1990) serbest oksijen radikallerinin osteoklastların oluşumu ve aktivasyonunda rol oynadıklarını bildirmişlerdir.

Ağız ve çeneler bölgesinde çeşitli nedenlerle oluşan defektlerin eski anatomik formuna kavuşturulması ve yitirilen fonksiyonların yeniden kazandırılması oral ve maksillofasiyal cerrahinin temel hedeflerinden biridir. Bu defektlerin bir kısmı kemiğin kendini tamir edebilme yeteneği ile onarılırken bir kısım büyük kemik defektlerinde kemik dokusunun onarılmasını desteklemek veya tamamen iyileşmesini sağlamak amacı ile otojen, homojen, heterojen ve alloplastik kaynaklı greft materyalleri kullanılmaktadır (Schmitz ve Hollinger, 1986; Bosch ve ark., 1998). Çok sayıda ve farklı kaynaklı ticari greft materyalleri bulunmasına rağmen, çeşitli dezavantajlarından dolayı ideal greft materyali arayışları halen devam etmektedir (Bernard, 1991; Gazdag ve ark., 1995).

Çalışmamızda standart kemik defekti oluşturulmuş tavşanlarda farklı yapıdaki greft materyallerinin lipid peroksidasyon oluşumu üzerine etkileri incelenerek ideal greft materyali arayışına katkı sunulması amaçlanmıştır.

Hayvan modelleri arasında tavşan modelinin; deney koşullarının standardizasyonu, tekrarlanabilirliği, pahalı olmaması ve yüksek kemik turnover nedeni gibi avantajları bulunmaktadır (Cacchioli ve ark., 2006). Tavşanlarda kemik rejenarasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda madibula, femur, kalvaryaya ve tibia gibi farklı anatomik bölgeler kullanılmıştır (Najjar ve Kahn, 1977; Kahnberg, 1979; Frame, 1980; Aobe ve ark., 1993; 1994; Wheeler ve ark., 2000; Clokie ve ark., 2002). Tibianın

medyal yüzeyinde proksimal epifiz kısmının geniş, konveks yüzeyinin az ve kas yapışıklıklarından yoksun olması nedeni ile kemik defekti için uygun bir bölge olduğunu bildirmişlerdir (Schmitz ve Hollinger, 1986). Bizim çalışmamızda hayvan modeli bu nedenlerden dolayı tavşan tibiasının medyal kısmı olarak seçilmiştir.

Kemik iyileşmesi ve kemik greftlerinin değerlendirildiği çalışmalarda iyileşmeyi etkileyen en önemli kriterlerinden birinin oluşturulan kemik defektinin boyutu olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bir kemik greftinin değerlendirilmesi için oluşturulan deneysel kemik yarasının kendiliğinden iyileşemeyecek kadar büyük olması gerektiği bildirilmiştir. Bu özelliklere sahip deneysel kemik yarası kritik boyut defekti (KBD) olarak adlandırılmaktadır (Schmitz ve Hollinger, 1986; Hollinger ve Kleinschmidt, 1990). KBD, türlere ve ilgili bölgeye bağlı olmak üzere hayat boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük kemik içi yara olarak tanımlanabilir. Bununla birlikte pek çok çalışmada sürenin sınırlı olması ve hayvanın tüm hayatı boyunca takip edilememesinden dolayı hayvan araştırmalarında KBD, çalışma süresi boyunca iyileşemeyen defektleri ifade etmektedir. KBD çalışmalarının yapıldığı anatomik bölgeler incelendiğinde kalvaryaya, mandibula ve tibia gibi uzun kemikler olduğu tespit edilmiştir (Schmitz ve Hollinger, 1986; Hollinger ve Kleinschmidt, 1990; Bosch ve ark., 1998).

Aobe ve ark. (1993) tavşan tibiasında yaptıkları çalışmada bütün kontrol ve deney gruplarında 8 mm boyutunda kemik defektleri oluşturmuşlardır ve sonuç olarak tavşan tibiasında KBD'nin 8 mm'den fazla olması gerektiğini çünkü kontrol grubundaki defektlerin kendiliğinden iyileştiğini bildirmişlerdir. Walsh ve ark. (2003) tavşan tibiasının medyal korteksinde 5x15x3 mm boyutunda kemik defekti oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonucunda boş bırakılan defektlerin 24 hafta süresince iyileşmediğini ve bu durumun defektin KBD'sini desteklediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde yapılan diğer çalışmalarda da tibianın anterior-medyal korteksine 5x15x3 mm boyutunda kemik defekti oluşturulduğu tespit edilmiştir (Jamali ve ark., 2002; Stubbs ve ark., 2004; Walsh ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da tavşan tibia kemik defekti modeli için bu boyutlar seçilmiştir. Ayrıca oluşturulan kemik defektlerinin tüm gruplarda unikortikal olmasına, kemik defektlerinin hazırlanması sırasında periostun korunmasına ve deneysel olarak oluşturulan defektlerin stabil olmasına özen gösterilerek standardizasyon sağlanmıştır. Bununla birlikte deney hayvanlarının çevre koşulları, yaş,

beslenme ve ilaç kullanımı gibi faktörleri standardize edilmiştir. Dolayısıyla bu faktörlerden doğacak kemik oluşumu üzerindeki farklılıklar engellenmiştir.

Kemikte bir hasar meydana geldiğinde aynı zamanda onun tamiri de başlamaktadır. Bu süre içinde birçok faktör iyileşmeyi etkilemektedir. Ancak kemik iyileşmesi bozuklukları sık görülen olaylardır ve iyileşmeyi bozan veya geciktiren faktörler şu şekilde sıralanabilir; kırık uçlarının birbirinden uzak olması, kemikte parçalanma, ağır yumuşak doku yaralanmaları, yetersiz beslenme, hasar gören kemikte dolaşımın bozulması ve buna bağlı olarak alanın beslenememesi ve enfeksiyondur. Bu faktörlerin sonucunda psödoartroz, ankiloz, osteomyelit gibi bozukluklar meydana gelebilir (Çetingül, 2002). Çalışmamız sırasında tüm gruplarda kemik iyileşmesi sırasında makroskobik olarak herhangi bir patolojik durum izlenmemiştir.

Oral ve maksillofasiyal bölgedeki kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda; osteoindüktif, osteokondüktif potansiyele ve osteojenik hücrelere sahip olan otojen kemik greftleri öncelikli olarak tercih edilmektedir ve altın standart olarak bildirilmiştir (Bernard, 1991; Jamali ve ark., 2002; Jensen ve ark., 2006). Bununla birlikte bu greftlerin ikinci bir cerrahi işleme ihtiyaç göstermesi, donör bölgede morbidite oluşturması ve istenilen miktarda elde edilememesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Gazdag ve ark., 1995). Bizim çalışmamızda da, aynı deney hayvanında ikincil bir cerrahi işlem gerektirmesi ve bu durumun kan değerlerindeki sonuçları etkileyebilmesi sebebiyle otojen kemik grefti tercih edilmemiştir. Otojen kemik greftlerinin bu dezavantajlarından dolayı allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik materyallerin kullanımı gündeme gelmiştir. Bu greft materyallerinden her birinin sterilizasyon ve işlenme yöntemine bağlı olarak bir takım avantajları ve dezavantajları vardır (Gazdag ve ark., 1995). Çalışmamızda klinikte en fazla tercih edilen ve literatürde en çok bildirilen greft materyalleri kullanılmıştır (Çılbır ve ark., 1999; Moore ve ark., 2001; Atay ve Yılmaz, 2005; Giannoudis ve ark., 2005; Jensen ve ark., 2006; Walsh ve ark., 2008). Bunlar allojenik bir materyal olan demineralize kemik matriksi, ksenojenik kaynaklı sığır kemiği ve alloplastik kaynaklı β -trikalsiyum fosfat-hidroksilapatittir.

Kemik iyileşmesi sırasında iskemi/perfüzyon mekanizması nedeni ile oksidatif stres meydana geldiği bildirilmiştir (Prasad ve ark., 2003). Araştırmacılar, oksidatif strese neden olan serbest oksijen radikallerinin artışının kemik iyileşmesine zarar

verdiğini bildirmişlerdir (Göktürk ve ark., 1995). Serbest radikal ataklarının hücrelerdeki hedefi, membranlardaki lipit içeriğidir ve bu da lipit peroksidasyonla sonuçlanır (Sugino ve ark., 1987). Lipit peroksidasyonu, membranların geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne yol açabilen olayları başlatır. Membran PUFA'nın oksidasyonu sonucu oluşan MDA, lipit peroksidasyonun en önemli göstergelerinden biridir (Halliwell, 2007). Bununla birlikte SOD, GPx ve CAT gibi vücudun doğal savunma mekanizmaları olan antioksidan enzimler bulunmaktadır ve bunlar reaktif oksijen radikalleri aracılığı ile oluşabilecek hücresel ve moleküler hasara karşı koruyucu rol oynamaktadırlar (Janero, 1990; Cheeseman ve Slater, 1993; Gul ve ark., 2000).

Kemik iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde lipit peroksidasyon miktarının analizinde genellikle MDA ölçümü yapıldığı tespit edilmiştir (Turgut ve ark., 1999; Prasad ve ark., 2003; Cetinus ve ark., 2005; Yeler ve ark., 2005). Bizim çalışmamızda ise lipit peroksidasyonun değerlendirilmesinde MDA ürünü ile birlikte SOD, GPx, CAT antioksidan enzim aktiviteleri ölçülerek daha detaylı bilgilerin elde edilmesi sağlanmıştır.

Antioksidan enzimlerin analizinde çeşitli araştırmacılar tarafından birçok metod bildirilmiştir. SOD enziminin analizi için bilinen en yaygın metodlar Suttle (1986), Sun ve ark. (1988) ve McCord ve Fridovich (1988) tarafından geliştirilmiştir. Bizim çalışmamızda SOD analizi RANSOD ticari kiti kullanılarak Suttle (1986) metoduna dayalı olarak yapılmıştır. Kiti çalışma prensibi süperoksitin INT ile reaksiyona girerek kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmasıdır. Ksantin oksidazın süperoksit kaynağı olarak kullanıldığı reaksiyonun inhibisyon derecesi ile SOD aktivitesi ölçülmektedir. GPx enziminin analizindeki en yaygın metodlar Paglia ve Valentine (1967) ve Flohe ve Günzler (1984) tarafından geliştirilmiş olup bizim çalışmamızda GPx analizi RANSEL ticari kiti kullanılarak Paglia ve Valentine (1967) metoduna dayalı olarak spektrofotometrik okuma ile yapılmıştır. Oldukça duyarlı olan metod GPx kümen hidroperoksit aracılığı ile GSH oksidasyonunu katalizlemesi prensibine göre çalışmakta ve yaygın olarak kullanılmaktadır. CAT enzimin analizi için Aebi (1984) ve Johansson ve Borg (1988) tarafından geliştirilen metodlar bulunmaktadır. Çalışmamızda ise CAT analizi CAYMAN ticari kiti kullanılarak Johansson ve Borg (1988) metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. MDA ürününün analizinde ise Yoshioka ve ark. (1979), Ohkawa ve ark. (1979) ve Jain (1988)

metodları mevcut olup çalışmamızda basit ve hızlı olmasından dolayı Yoshioka ve ark. (1979) metodu kullanılmıştır.

Kemik iyileşmesi ile ilgili yapılan lipit peroksidasyon çalışmaları incelendiğinde Turgut ve ark. (1999) ratlarda kırık iyileşmesi sırasında 1, 3, 7, 14 ve 28. günlerde kemik dokusundaki MDA düzeylerini incelemişlerdir. Prasad ve ark. (2003) insanlarda kırık sonrası oluşan oksidatif stresi 1, 7, 14 ve 28. günlerde kan örneklerinde değerlendirmişlerdir. Cetinus ve ark. (2005) ratlarda kırık iyileşmesi sırasında MDA düzeylerini operasyon öncesinde ve operasyon sonrasında 3, 7, 14 ve 28. günlerde kemik dokusunda incelemişlerdir. Yeler ve ark. (2005) ratlarda kırık iyileşmesi sırasında oluşan oksidatif stresi operasyon öncesinde ve operasyon sonrasında 5, 10, 20 ve 30. günlerde kan örneklerinde değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar kırık sonrası ilk ayda oksidatif stresin belirgin şekilde arttığını ve endojen antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalabileceğini ve 4 hafta sonunda MDA seviyelerinin düşmeye başladığını bildirmişlerdir (Cetinus ve ark., 2005; Yeler ve ark., 2005). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda oluşturulan kemik defektlerine yerleştirilen greft materyallerinin lipit peroksidasyon üzerine etkilerini ölçmek amacı ile operasyon öncesi ve operasyondan sonra 1, 3, 7, 14, 28 ve 56. günlerde deney hayvanlardan kan alınmıştır. Böylece çalışmamızda kemik iyileşmesinin erken ve geç dönemlerindeki lipit peroksidasyon oluşumunun kıyaslanması amaçlanmıştır.

Serbest radikaller ve detoksifikasyonlarından sorumlu antioksidan enzim sistemleri üzerine çeşitli çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalarda antioksidan enzim aktivitesinin yetersiz kaldığı ve MDA değerinin yüksek olduğu durumların lipit peroksidasyona neden olduğu bildirilmektedir;

Panjamurthy ve ark. (2005) kronik periodontitisli hastalardan aldıkları kan örneklerinde SOD, CAT, GPx, MDA ve enzimatik olmayan antioksidanları (Vitamin E, C ve GSH) değerlendirmişler ve sonuç olarak kronik periodontitisli hastalarda antioksidan defans sisteminin yetersiz kaldığını, lipit peroksidasyonun arttığını ve buna bağlı olarak oksidatif stresin oluştuğunu bildirmişlerdir.

Sobaniec ve ark. (2000) periodontitis oluşturulmuş ratlardan alınan kan örneklerinde lipit peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitesini CAT, SOD, GPx, GR ve MDA ürününü analiz ederek değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak temel antioksidan

enzim aktivitesinin azaldığı ve eş zamanlı olarak MDA düzeyinin arttığını bildirilmişlerdir.

Düzgüner (2005) diabetli tavşanlardan aldıkları kan örneklerinde çinko ilavesinin lipid peroksidasyon ve antioksidan sistem üzerine etkisini MDA, GPx, CAT, SOD, GSH ve seruloplazmin seviyelerini inceleyerek değerlendirmiştir. Sonuç olarak çinko ilave edilen grupta MDA'nın azaldığını, antioksidan enzim seviyelerinin arttığını ve dolayısıyla lipid peroksidasyon seviyesinin azaldığını tespit etmiştir.

Bowles ve Thompson (1986) insan diş pulpasında CAT ve GPx aktivitesi üzerine çalışmışlardır. Bu araştırmacılara göre dişlerin karbamit peroksit ile beyazlatılması sırasında hidrojen peroksitin birçok antioksidan enzim aktivitesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Kemik dokusu üzerinde ise Özmen ve ark. (2006) tavşanlarda implant çevresindeki dokularda antioksidan enzimleri karşılaştırarak değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak seramik ve titanyum implantları çevreleyen kemik dokusunda GPx, CAT ve SOD seviyeleri düşerken lipid peroksidasyon seviyesinin yükseldiğini bildirmişlerdir.

Yeler ve ark. (2005) rat fibulasında kırık iyileşmesi sırasında oluşan oksidatif stresi, kan örneklerinde MDA düzeylerini inceleyerek değerlendirmişlerdir ve oksidatif stresin ilk 4 haftada arttığını bildirmişlerdir.

Turgut ve ark. (1999) ratların tibiasında kırık iyileşmesi sırasında oksidatif stresi MDA düzeylerini kemik dokusunda incelemişlerdir. Sonuç olarak oksidatif stres hasarını vaskülarizasyonun artması ile meydana geldiğini ve kallus oluşumu ile sonlandığını bildirmişlerdir.

Cetinus ve ark. (2005) ise rat tibiasında kırık iyileşmesi sırasında oluşan oksidatif stresi kemik dokusunda MDA ürününü analiz ederek değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak kırık iyileşmesinin oksidatif bir süreç olduğunu ve akut geçici iskeminin sonlanması ile birlikte şiddetli bir oksidatif aktivitenin başladığını bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde maksillofasiyal cerrahi alanında greft materyallerinin lipid peroksidasyonu üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır ve dolayısıyla araştırmamızın bu açıdan bir ilk oluşturduğu düşünülmektedir.

Çalışmamız sonucunda CAT enzimi için greft gruplarının her bir zaman dilimindeki değerleri incelendiğinde 1 ve 28. günlerde Bio-Oss grubu değerlerinin kontrol ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde

yüksek olduğu görülmüştür. 14 ve 56. günlerde Bio-Oss ve Grafton grupları arasında istatistiksel olarak fark olmamakla birlikte kontrol ve 4BONE grubundan daha yüksek değerler elde edilmiştir. Üçüncü ve 7. günlerde ise en yüksek değer Bio-Oss grubunda görülmesine rağmen diğer gruplarla arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır.

CAT enzimi için greft gruplarının 1 ile 56. günler arasındaki değerleri kıyaslandığında Bio-Oss grubu değerlerinin kontrol grubu değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Grafton grubunda ise 3 ile 7. gün dışındaki değerlerin kontrol grubu değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. 4BONE grubunda ise 1 ile 56. gün arasındaki tüm değerler kontrol grubundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bu değerler göz önüne alındığında Bio-Oss greft materyalinin diğer gruplara göre CAT enzimi aktivitesini daha fazla arttırdığı anlaşılmaktadır. Ayrıca Grafton grubunda elde edilen değerler incelendiğinde 14 ve 56. günlerde Bio-Oss grubu ile istatistiksel olarak fark bulunamazken 1 ve 28. günlerde Bio-oss grubundan sonra en yüksek değerler bu grupta elde edilmiştir. Dolayısıyla CAT enzim aktivitesini Bio-Oss grubundan sonra en fazla Grafton grubunun arttırdığı tespit edilmiştir. Greft grupları arasında en düşük CAT enzim aktivitesinin ise 4BONE grubuna ait olduğu görülmektedir.

GPx enzimi için greft gruplarının her bir zaman dilimindeki değerleri incelendiğinde 1, 3 ve 28. günlerde kontrol ve diğer grupların değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Yedinci günde greft grupları arasında istatistiksel olarak fark bulunamazken Bio-Oss ve Grafton grupları değerleri kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksektir. Ondördüncü günde ise greft grupları arasında anlamlı bir fark olmamakla birlikte istatistiksel olarak kontrol grubundan yüksek değerler göstermişlerdir. Ellialtıncı günde en yüksek değer Bio-Oss grubunda olmakla birlikte Grafton grubu ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

GPx enzim aktivitesi için greft gruplarının 1 ile 56. günler arasındaki değerleri kıyaslandığında Bio-Oss, Grafton ve 4BONE grupları arasında anlamlı bir fark olmamakla birlikte tüm değerlerin kontrol grubu değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir.

SOD enzimi için greft gruplarının her bir zaman dilimindeki değerleri incelendiğinde 1, 3, 7 ve 56. günlerde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Ondördüncü günde Bio-Oss ve kontrol grupları arasında istatistiksel

olarak fark bulunamamakla birlikte en yüksek değer kontrol grubunda elde edilmiştir. Yirmisekizinci günde de en yüksek değer istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde kontrol grubuna aittir.

SOD enzim aktivitesi için greft gruplarının 1 ile 56. günler arasındaki değerleri kıyaslandığında Bio-Oss, Grafton, 4BONE ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

MDA ürünü için greft gruplarının her bir zaman dilimindeki değerleri incelendiğinde 1. günde greft grupları arasında fark bulunamazken kontrol grubu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Üçüncü günde istatistiksel olarak en düşük değer Bio-Oss grubunda elde edilirken diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Yedinci ve 14. günlerde istatistiksel olarak en düşük değer Bio-Oss grubunda elde edilirken en yüksek değerler kontrol grubunda tespit edilmiştir. Yirmisekizinci günde en düşük değer Grafton grubunda olmakla birlikte bu grup ile kontrol ve 4BONE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ellialtıncı günde ise en düşük değer Bio-Oss grubunda olmakla birlikte bu grup ile 4BONE ve Grafton grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır, en yüksek değer ise kontrol grubuna aittir.

MDA ürünü için greft gruplarının 1 ile 56. günler arasındaki değerleri kıyaslandığında 28. gün haricinde en yüksek değerler kontrol grubunda elde edilmiştir. Bio-Oss grubu diğer greft gruplarına göre daha düşük MDA değerleri göstermiştir. 4BONE ve Grafton grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda antioksidan enzim aktiviteleri değerlendirildiğinde CAT enzimi için en yüksek değer Bio-Oss greft grubunda elde edilirken GPx ve SOD enzim aktivitelerinin değerlendirildiği grupta greft materyalleri arasında fark bulunamamıştır. MDA ürünü değerlendirildiğinde ise en düşük değerler Bio-Oss greft grubunda elde edilirken en yüksek değerler kontrol grubunda elde edilmiştir.

MDA parametresinin lipit peroksidasyon seviyesinin ölçülmesinde en güvenilir parametre olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Sugino ve ark., 1987; Draper ve Hadley, 1990; Cornell ve Lane, 1992; Göktürk ve ark., 1995; Halliwell, 2007). Çalışmamızda en düşük MDA seviyesi göstermesi ve CAT aktivitesi açısından en yüksek enzim değerine sebep olması nedeniyle Bio-Oss grubunun diğer greft

materyallerine göre daha düşük lipit peroksidasyona neden olduğu anlaşılmaktadır ve bu açıdan daha uygun bir materyal olduğu düşünülmektedir.

Kemiğin tamamen deproteinize edilmesi ile elde edilen Bio-Oss, karbonat apatit içeren inorganik sığır kemiğinden oluşan doğal bir greft materyalidir (Spector, 1994; Tadjodin ve ark., 2003). İnorganik sığır kemiği ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde Bio-Oss materyalinin oldukça biyouyumlu olduğu, insan ve hayvan oral sert dokularında osteokondüktif özelliğe sahip olduğu ve hiçbir yan etkiye sebep olmadığı bildirilmiştir (Wheeler ve ark., 1996; Valentini ve ark., 2000). Richardson ve ark. (1999) Bio-Oss'un defekt bölgesine kolay taşınabilmesi, defekte kolayca doldurulabilmesi, kanamanın olduğu defektlerde bile defekte yerleştirilen materyalin adezyon gösterebilmesi ve yumuşak dokunun kapatılmasından sonra yumuşak dokunun defekt bölgesine dolmasına engel olarak defekti koruduğunu bildirmişlerdir.

İnorganik sığır kemiği materyalinin yapısının oldukça geniş ve birbiri ile bağlantılı gözenek sistemine sahip olduğu ve bu durumun osteojenik hücreler için bir iskelet görevi görerek bu hücrelerin migrasyonunu ve bağlantısını arttırdığı rapor edilmiştir (Tapety ve ark., 2004). Thorwarth ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada bu materyalin yeni kemik dokusu tarafından oldukça iyi infiltre olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalarda bu materyalin yüksek stabilite gösterdiği ve rezorbsiyon hızının geç olduğu bildirilmiştir (Pinholt ve ark., 1991; Berglundh ve Lindhe, 1997; Hammerle ve ark., 1998). Jensen ve ark. (2006) domuz mandibulasında yaptıkları histolojik ve histomorfometrik çalışmalarında otogreft, inorganik sığır kemiği ve β -TCP greftlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak 8 hafta sonunda yeni kemik oluşumu açısından inorganik sığır kemiği kullanılan gruplarda en düşük değer elde edildiğini ancak toplam mineralize doku bileşimi açısından (greft+kemik) en yüksek değer inorganik sığır kemiğinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmalarında otogreft ve β -TCP'nin yerini tamamen yeni oluşan kemiğe bıraktığını ancak inorganik sığır kemiğinin stabil kaldığını bildirmişlerdir.

Mekanik özellikleri doğal kemikten önemli derecede farklı olan ve uzun süre kalması çevresindeki dokunun fonksiyonunu tehlikeye atacak materyallerde, greft materyalinin rezorbe olabilmesi bir avantajdır. Bununla birlikte rezorpsiyonun, kemik ile greft materyalinin birleşmesinin gerçekleşmesinden önce olması istenmemektedir (Spector, 1994). Bu nedenle greft materyallerinin yavaş rezorbe olması kemik

maturasyonu için gerekli zamanı sağlaması açısından olumlu bir özellik olarak bildirilmektedir (Zitzmann ve Scharer, 1998).

Rosen ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada Bio-Oss'un mineral kristalitlerinin yapısının ultrastrüktürel olarak tam kemiğe benzediğini transmisyon elektron mikroskop (Transmission Electron Microscope, TEM) analizi yaparak bildirmişlerdir. Ayrıca inorganik kemik materyalinin kemik minerali ile aynı tipte karbonlanmış apatite sahip olduğu bildirilmiştir (Wilson ve ark., 1995). Fukuta ve ark. (1992) Bio-Oss'un uygulandığı kemik doku ile iyi birleşme gösterdiği, enflamatuar reaksiyona neden olmadığı aynı zamanda greft partiküllerinin yüzeyi ile yeni oluşan kemik arasında oldukça fazla direkt temas sağladığını bildirmişlerdir. Dolayısıyla Bio-Oss'un normal kemik yapısına olan benzerliği ve biyouyumluluğu nedeniyle daha az lipit peroksidasyona sebep olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda MDA ürününün oluşumu açısından en yüksek değerlerin kontrol grubunda olduğu tespit edilmiştir. Defekt bölgelerine yerleştirilen kemik greftlerinin bölgenin onarılması ve yeniden şekillendirmesine yardımcı olarak iyileşmeyi desteklediği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Aaboe ve ark., 1995; Bernard, 1991). Dolayısıyla greft kullanılan gruplarda kemik iyileşmesinin indüklenmesi ile defekt bölgesinin boş bırakıldığı kontrol grubuna göre daha az lipit peroksidasyon meydana geldiği ve daha düşük MDA oluştuğu sonucuna varılmıştır.

Prasad ve ark. (2003) femural kırığı olan insanlarda plazma MDA seviyelerini ölçmüşler ve 14. günde belirgin bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Turgut ve ark. (1999) ratlarda kemik iyileşmesi sırasında MDA seviyelerini oksidatif stresin bir göstergesi olarak değerlendirmişler ve kırık iyileşmesinin 7 ve 14. günlerinde MDA seviyesinin belirgin şekilde arttığını tespit etmişlerdir. Bunun nedeni olarak kırık iyileşmesinin enflamasyon ve kallus oluşumu evrelerinde oksidatif stres hasarının belirgin olabileceğini bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalarda kallus oluşum evresinde fibroblast ve kollojen hücrelerine ilave olarak enflamatuar hücrelerle birlikte yeni kapiller damarların serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırarak kırık kemikte oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir (Cornell ve Lane, 1992). Bizim çalışmamızda da genel olarak tüm gruplarda MDA seviyeleri 2. haftadaki kallus oluşum evresinde en yüksek seviyesine ulaşmıştır ve bu yükselmenin damarlanma ve oksijenizasyon sebebi ile meydana geldiği düşünülmektedir.

Turgut ve ark. (1999) kırık iyileşmesinin ilk 3 gününde iskemi periyodu olması nedeni ile oksidatif stres hasarın oluşmayacağını bildirmişlerdir. Ayrıca kırık iyileşmesinin 1. gününde kırık hematomunun hiyaluranik asit içermesi sebebi ile MDA seviyesinin artmadığını çünkü hiyaluranik asitin kırık iyileşmesinin erken evresinde antioksidan etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da operasyon sonrası 1. günde MDA seviyesinin tüm gruplarda azaldığı görülmektedir ve bunun açığa çıkan hiyaluranik asitin antioksidan etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yeler ve ark. (2005) kemik iyileşmesi sırasında fazla miktarda serbest oksijen radikali oluştuğunu ve bu radikallerin kırıktan sonraki ilk ay boyunca etkili olduğunu bildirmişlerdir. Turgut ve ark. (1999) kırıktan 3 hafta sonra kartilaj kallusun kemik kallusuna dönüşmeye başladığını ve kırık bölgesindeki hücresel oksidasyonun azaldığını ve bunu takiben MDA seviyesinin 4 hafta sonunda bazal seviyeye yaklaştığını bildirmişlerdir. Çalışmamız sonucunda da MDA seviyelerinin genel olarak tüm gruplarda 28. günde azaldığı ve 56. günde uygulama öncesi değerlere oldukça yaklaştığı görülmektedir.

Çalışmamızda CAT, SOD, GPx değerlerinin zaman içindeki değişimleri incelendiğinde grafiksel olarak inişli ve çıkışlı bir seyir izlediği görülmüştür. Bu değişimin farklı yapılardan oluşan greftlere karşı vücudun gösterdiği yanıtın farklı olmasından yani ortaya çıkan serbest radikallerin cinsinin, miktarının, ortaya çıkış sürelerinin, parçalanmaları sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinin farklılığından ve serbest radikallere etki eden antioksidan enzimlerin birbirlerini etkilemesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda antioksidan enzimler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT ve SOD enzimlerinin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı doğru orantı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar incelendiğinde McIntyre ve ark. (1999) antioksidan aktiviteleri açısından CAT ve SOD'un birbirleri ile denge halinde olması gerektiğini bildirmişlerdir. Breccia ve ark. (1984) SOD enziminin canlılardaki dağılımının CAT ile birlikte incelenmesi gerektiğini çünkü; SOD ile katalizlenen tepkime sonunda oluşan ürünün oksijenin toksik ürünlerinden biri olduğunu ve birikiminin CAT tarafından önlendiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamız sonucunda 4BONE ve Bio-Oss greft grupları için antioksidan enzimler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde GPx ile SOD enzimleri arasında

negatif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Seven ve Candan (1996) organizmada oksidan stresin arttığı klinik durumlarda SOD enziminin aktivitesinin artarak koruyucu etkinliği devam ettirdiğini bildirmişlerdir. Özellikle antioksidan etkili diğer enzimlerin aktivitelerinde azalmanın söz konusu olduğu klinik durumlarda SOD enziminin aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Bannister ve ark., 1987). Bu bilgiler ışığında antioksidan enzimler arasında bir etkileşim olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamız sonucunda farklı greft materyallerinin; kemik iyileşmesi sırasında meydana gelen lipit peroksidasyon düzeylerini farklı düzeylerde etkilediği tespit edilmiştir. Ayrıca oluşan antioksidan enzim mekanizmasının zaman içindeki seyrinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Tüm greft grupları değerlendirildiğinde lipit peroksidasyon açısından en düşük değeri vermesi ve CAT enzim aktivitesini anlamlı şekilde artırması nedeni ile Bio-Oss materyalinin daha uygun bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır.
2. Tüm greft grupları lipit peroksidasyon parametreleri açısından değerlendirildiğinde zaman içerisinde azalma ve artma göstermesine rağmen 56. günün sonunda normal seviyesine yaklaştığı görülmüştür.
3. Greft materyalinin uygulandığı tüm gruplarda, kontrol grubuna kıyasla daha düşük lipit peroksidasyon tespit edilmiştir dolayısıyla kemik iyileşmesi sırasında greft kullanımının lipit peroksidasyonu azalttığı anlaşılmıştır. Bu nedenle iyileşmenin teşvik edilmesi amacı ile kemik defektlerinde greft kullanılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.
4. İdeal greft materyallerinin tespitinde histopatolojik, histomorfometrik vb. incelemelerin yanı sıra lipit peroksidasyon açısından da değerlendirilmesinin önemli olduğu sonucuna varılmıştır.
5. Genel olarak kemik iyileşmesi sırasında antioksidan enzimler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde CAT ve SOD arasında doğru orantı olduğu tespit edilmiştir.
6. Antioksidan enzimlerin zaman içindeki seyri için daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Aaboe, M., Pinholt, E. M., Hjørting-Hansen, E., Solheim, E., Praetorius F. (1993). Guided tissue regeneration using degradable and nondegradable membranes in rabbit tibia. *Clinical Oral Implants Research*, **4** (4), 172-176.
- Aaboe, M., Pinholt, E. M., Hjørting-Hansen, E. (1994). Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **5** (1), 201-203.
- Aaboe, M., Pinholt, M. E., Hjørting-Hansen, E. (1995). Healing of experimentally created defects: a review. *The British Journal of Oral&Maxillofaical Surgery*, **33** (5), 312-318.
- Aalam, A. A., Nowzari, H. (2007). Mandibular cortical bone grafts part 1: anatomy, healing process, and influencing factors. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, **28** (4), 206-212.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, **105**, 121-126.
- Akal, Ü. K. (1995). Kistektomi, kronik enfeksiyon bölgelerinin küretajı ve apikal rezeksiyon operasyonları sonucunda oluşan kemik defektlerinde solventlerle dehidrate edilmiş spongiöz kemik çipslerinin kullanılması. *Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **22** (2), 103-108.
- Akkuş, İ. (1995). *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, **Birinci baskı**, Mimoza Yayınları, Konya.
- Akşimşek, G. (2005). Aspirin ve Doksorubisin'in farelerde programlanmış hücre ölümü (apoptozis) üzerine enzimatik düzeyde etkilerinin karşılaştırmalı olarak araştırılması, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Albee, F. H., Morrison, H. F. (1920). Studies in bone growth, triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. In: Moore, W. R., Graves, S. E., Bain, G. I. (2001). Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery*, **71** (6), 354-361.
- Aldemir, H. (1993). Hücre antioksidan savunma sistemindeki rolü açısından kanserde serum selenyum düzeylerinin spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Allgower, M., Spiegel, P. G. (1979). Internal fixation of fractures: evolution of concepts. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **138**, 26-29.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993). Oxidant, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA*, **90** (17), 7915-7922.

- Angel, M. F., Ramasastry, S. S., Swartz, W. M., Basford, R. E., Futrell, J. W. (1987). Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **79** (6), 990-997.
- Archer, W. H. (1975). *Oral and Maxillofacial Surgery*, **Fifth Ed.**, WB Saunders, Philadelphia.
- Armstrong, D. (1998). *Free radical and antioxidant protocols*, **First Ed.**, Vol. 108, Humana Press, New Jersey.
- Arun, K. G. (2004). *Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants*, **First Ed.**, Quintessence Publishing, China.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M. R., Bayiroğlu, F. (1995). Serbest radikal türlerinin membran lipit peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2**, 137-142.
- Atay, M. H., Yılmaz, F. R. (2005). İki farklı kemik greftinin histopatolojik olarak incelenmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, **32** (4), 172-178.
- Augustin, W., Wiswedel, I., Noack, H., Reinheckel, T., Reichelt, O. (1997). Role of endogeneous and exogeneous antioxidants in the defence against functional damage and lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **174** (1-2), 199-205.
- Aydın, B. K. (2003). Aspirin ve E vitamini verilmiş ratlarda karaciğerde yapılan iskemi/reperfüzyon sonrası kanda radikal süpürücü enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerin araştırılması, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Uzmanlık Tezi, Samsun.
- Banfi, G., Iorio, E. L., Corsi, M. M. (2008). Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **46** (11), 1550-1555.
- Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, **22** (2), 111-180.
- Barber, D. A., Horris, S. R. (1994). Oxygen free radicals and antioxidants: a review. *American Pharmacy*, **34** (9), 26-35.
- Basaga, H. S. (1990). Biochemical aspects of free radicals. *Biochemistry of Cell Biology*, **68** (7), 989-998.
- Behairy, Y., Jasty, M. (1999). Bone grafts and bone substitutes in hip and knee surgery. *The Orthopedic Clinics of North America*, **30** (4), 661-671.

- Berglundh, T., Lindhe, J. (1997). Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, **8** (2), 117-124.
- Berköz, M., Yalın, S., Güler, V. G., Yalçın, A. (2008). Akut lösemilerde lipit peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi. *Erciyes Tıp Dergisi*, **30** (3), 157-162.
- Bernard, G. W. (1991). Healing and repair of osseous defects. *Dental Clinics of North America*, **35** (3), 469-477.
- Bio-Oss Kullanım Klavuzu. (2006). Geistlich Pharma AG, Wolhusen, İsviçre.
- Block, M. S., Finger, I., Lytle, R. (2002). Human mineralized bone in extraction sites before implant placement: preliminary results. *Journal of the American Dental Association*, **133** (12), 1631-1638.
- 4BONE Kullanım Klavuzu. (2007). MİS Implants Technologies Ltd., İsrail.
- Bosch, C., Melsen, B., Vangervik, K. (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **9** (4), 310-316.
- Bowles, W. H., Thompson, L. R. (1986). Vital bleaching: the effects of heat and hydrogen peroxide on pulpal enzymes. *Journal of Endodontics*, **12** (3), 108-112.
- Boyce, T., Edwards, J., Scarborough, N. (1999). Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *The Orthopedic Clinics of North America*, **30** (4), 571-581.
- Braquet, P., Hosford, D. (1991). Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapeutic agents. *Journal of Ethnopharmacology*, **32** (1-3), 135-139.
- Breccia, A., Greenstock, C. L., Tamba, M. (1984). *Advances on oxygen radicals and radioprotectors*. **First Ed.**, Lo Scarabeo, Bologna.
- Bruder, S. P., Fink, D. J., Caplan, A. I. (1994). Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, **56** (3), 283-294.
- Bulkley, G. B. (1983). The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery*, **94** (3), 407-411.
- Burchardt, H. (1983). The biology of bone graft repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **174**, 28-42.

- Burwell, R. G. (1985). The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **200**, 125-141.
- Buser, D., Dahlin, C., Schenk, R. K. (1994). *Guided Tissue Regeneration in Implant Dentistry. First Ed.*, Quintessence Publishing, Chicago.
- Byrd, H. S., Hobar, P. C., Shewmake, K. (1993). Augmentation of craniofacial skeleton with porous hydroxyapatite granules. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **91 (1)**, 15-22.
- Cacchioli, A., Spaggiari, B., Ravanetti, F., Martini, F. M., Borghetti, P., Gabbi, C. (2006). The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Università degli Studi di Parma*, **16 (6)**, 97-110.
- Catalase Assay Kit-707002. (2007). CAYMAN Chemical Company Ann Arbor, MI, Amerika.
- Cetinus, E., Kiliç, M., Uzel, M., Inanç, F., Kurutaş, E. B., Bilgic, E., Karaoguz, A. (2005). Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, **125 (6)**, 376-380.
- Cheeseman, K. H. (1993). Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molecular Aspects of Medicine*, **14 (3)**, 191-197.
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, **49 (3)**, 481-493.
- Clarkson, P. M. (1995). Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35 (1-2)**, 131-141.
- Clokie, C. M., Moghadam, H., Jackson, M. T., Sandor, G. K. (2002). Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **13 (1)**, 111-121.
- Connolly, J., Guse, R., Lippiello, L., Dehne, R. (1989). Development of and osteogenic bone-marrow preparation. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **71 (5)**, 684-691.
- Cornell, C. N., Lane, J. M. (1992). Newest factors in fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **277**, 297-311.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Robbins, S. L. (1994). *Robbin's Pathologic Basis of Disease, Fifth Ed.*, WB Saunders Co, London.
- Cross, C. E., Halliwell, B., Borish, E. T., Pryor, W. A., Ames, B. N., Saul, R. L., McCord, J. M., Harman, D. (1987). Oxygen radicals and human disease. *Annals of Internal Medicine*, **107 (4)**, 526-545.

- Cypher, T. J., Grossman, J. P. (1996). Biological principles of the bone graft healing. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, **35 (5)**, 413-417.
- Çebi, A. (2002). Selenyum, E vitamini ve aspirin verilmiş farelerde karaciğer selenyum bağımlı glutatyon peroksidaz aktivitelerinin zamana bağlı değişimi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Çetingül, E. (2002). *Çene ve Yüz Travmatolojisi*, **Birinci Baskı**, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Çılıbr, H. Ö., Karaca, İ., Sabuncuoğlu, B., Akbay, C. (1999). Demineralize kemik tozunun kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **2 (2)**, 117-121.
- Draper, H. H., Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, **186**, 421-431.
- Düzgüner, V. (2005). Deneysel olarak diabet oluşturulan tavşanlarda çinkonun lipit peroksidasyonu ve antioksidan sistem üzerine etkisi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Yüksek Lisans Tezi, Hatay.
- Eraslan, G., Saygi, S., Essiz, D., Aksoy, A., Gul, H., Macit, E. (2007). Evaluation of aspect of some oxidative stress parameters using vitamin E, proanthocyanidin and N- acetylcysteine against exposure to cyfluthrin in mice. *Peptide Biochemistry and Physiology*, **88 (1)**, 43-49.
- Erdoğan, D., Hatipoğlu, M., Görgün, M., Ilgaz, C. (1999). *Genel Histoloji*, **İkinci baskı**, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Fawcett, D. W., Bloom, W. A. (1994). *A Text Book of Histology*, **Twelfth Ed.**, Chapman & Hall, New York.
- Finkemeier, C. G. (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **84 (3)**, 454-464.
- Flohe, L., Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, **105**, 114-121.
- Flohe, L., Otting, F. (1984). Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, **105**, 93-104.
- Fonseca, R. J., Davis, W. H. (1995). *Reconstructive Preprosthetic Oral And Maxillofacial Surgery*, **Second Ed.**, WB Saunders, Philadelphia.
- Frame, J. W. (1980). A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of Oral Surgery*, **38 (3)**, 176-180.

- Frankel, E. N. (1991). Recent advances in lipid oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54** (4), 495-511.
- Freeman, B. A., James, D., Crapo, M. D., (1982). Biology of disease: free radicals and tissue damage. *Laboratory Investigation*, **47** (5), 412-426.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, **97** (3), 5-28.
- Fridovich, I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **58**, 61-97.
- Friedlaender, G. E., Strong, D. M., Tomford, W., Mankin, H. J. (1999). Long-term follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome. *The Orthopedic Clinics of North America*, **30** (4), 583-588.
- Frost, H. M. (1989). The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **248**, 283-293.
- Fukuta, K., Har-Shai, Y., Collares, M. V., Lichten, J. B., Jackson, I. T. (1992). Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **3** (1), 25-29.
- Garret, I. R., Boyce, B. F., Oreffo, R. O. C., Bonewald, L., Poser, J., Mundy, G. R. (1990). Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in-vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, **85** (3), 632-639.
- Gazdag, A. R., Lane, J. M., Glaser, D., Forster, R. A. (1995). Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, **3** (1), 1-8.
- Geesink, R. G. T., De Groot, K. (1988). Bonding of bone to apatite-coated implants. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **70** (1), 17-22.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. *International Journal of the Care of the Injured*, **36** (3), 20-27.
- Goddio, A. S. (1989). Oxygen derived free radicals in plastic surgery: therapeutic interest of fighting free radicals: the superoxide dismutases. *European Journal of Plastic Surgery*, **25**, 21-25.
- Gonzales, R., Auclair, C., Voisin, E., Gautero, H., Dhermy, D., Boivin, P. (1984). Superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. *Cancer Research*, **44** (9), 4137-4139.

- Göktürk, E., Turgut, A., Bayçu, C., Günal, I., Seber S., Gülbas, Z. (1995). Oxygen – free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **66 (5)**, 473-475.
- Grafton Kullanma Klavuzu. (2005). Osteotech Inc., Eatontown, New Jersey, ABD.
- Grimes, E. W. (1994). A use of freeze-dried bone in endodontics. *Journal of Endodontics*, **20 (7)**, 355-356.
- Guemouri, L., Arthur, Y., Herbeth, B., Jeandel, C., Cuny, G., Siest, G. (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clinical Chemistry*, **37 (11)**, 1932-1937.
- Gul, M., Kutay, F. Z., Temocin, S., Hanninen, O. (2000). Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian Journal of Experimental Biology*, **38 (7)**, 625-634.
- Halliwell, B. (1984). Oxygen radicals: A commonsense look at their nature and medical importance. *Medical Biology*, **62 (2)**, 71-77.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet*, **23 (1)**, 1396-1397.
- Halliwell, B. (1987). Free radicals and metal ions in health and disease. *The Proceedings of the Nutrition Society*, **46 (1)**, 13-26.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, **Second Ed.**, Oxford University Press, New York.
- Halliwell, B., Chrigo, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **57 (5)**, 715-725.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet*, **344 (8924)**, 721-724.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transaction*, **35 (5)**, 1147-1150.
- Ham, A. W., Cormack, D. H. (1979). *Histophysiology of Cartilage, Bones and Joints*, **First Ed.**, JB Lippincott, Philadelphia.
- Hammerle, C. H., Chiantella, G. C., Karring, T., Lang, N. P. (1998). The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clinical Oral Implants Research*, **9 (3)**, 151-162.
- Hochstein, P., Jain, S. K. (1981). Association of lipid peroxidation and polymerization of membrane proteins with erythrocyte aging. *Federation Proceedings*, **40 (2)**, 183-188.

- Hollinger, J. O., Kleinschmidt, J. C. (1990). The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **1** (1), 60-68.
- Hollinger, J. O., Brekke, J., Gruskin, E., Lee, D. (1996). Role of bone substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **324**, 55-65.
- Horenstein, M. S., Vander Heide R. S., L'Ecuyer, T. J. (2000). Molecular basis of anthracycline-induced cardiotoxicity and its prevention. *Molecular Genetics and Metabolism*, **71** (1), 436-444.
- İnan, D. (1998). CuZnSOD, GSHPx ve TAS düzeylerinin, diabetik vakalara verilen antioksidan tedavi sonrası değişimi. *T.C. Sağlık Bakanlığı*, Ankara.
- Jain, S. K. (1988). Evidence for membrane lipid peroxidation during the in vivo aging of human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **937** (2), 205-210.
- Jamali, A., Hilpert, A., Debes, J., Afshar, P., Rahban, S., Holmes, R. (2002). Hydroxyapatite/calcium carbonate (HA/CC) vs. plaster of Paris: a histomorphometric and radiographic study in a rabbit tibial defect model. *Calcified Tissue International*, **71** (2), 172-178.
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, **9** (6), 515-540.
- Jarcho, M. (1981). Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **157**, 259-278.
- Jensen, S. S., Broggin, N., Hjørting-Hansen, E., Schenk, R., Buser, D. (2006). Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical Oral Implants Research*, **17** (3), 237-243.
- Johansson, L. H., Borg, L. A. (1988). Spectrofotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Analytical Biochemistry*, **174** (1), 331-336.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O. (1998). *Basic Histology*. Ninth Ed., Appleton & Lange, Stamford.
- Kahnberg, K. (1979). Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon® mantle leaf. *International Journal of Oral Surgery*, **8** (6), 449-456.
- Kılınç, K. (1986). Kanserde oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*, **10** (2), 60-89.

- Klokkevold, P. R., Jovanovic, S. A. (2002). Advanced implant surgery and bone grafting techniques. In: *Carranza's Clinical Periodontology*, **Ninth Ed.**, Eds, Newman, M. G., Takei, H., Carranza, F. A. WB Saunders, Philadelphia.
- Kornblut, A. D., Stark, T. W., Vap, J. G., deFries, H. O. (1982). The role of autografts, homografts, heterografts, and alloplastic implants in reconstructive head and neck surgery. *Otolaryngologic Clinics of North America*, **15 (1)**, 147-160.
- Kökden, A., Türker, M. (1999). Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *Cumhuriyet Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, **2 (2)**, 134-140.
- Köse, K., Doğan, P. (1992). Lipid Peroksidasyonu. *Erciyes Tıp Dergisi*, **(1)**, 340-350.
- Lane, J. M. (1987). *Fracture Healing*, **First Ed.**, Churchill Livingstone, New York.
- Lane, J. M., Sandhu, H. S. (1987). Current approaches to experimental bone grafting. *The Orthopedic Clinics of North America*, **18 (2)**, 213-225.
- Lelli, J. L., Pradhan, S., Cobb, L. M. (1993). Prevention of the postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *The Journal of Surgical Research*, **54 (1)**, 34-38.
- Mankin, H. J., Gebhardt, M. C., Jennings, L. C., Springfield, D. S., Tomford, W. W. (1996). Long term results of allograft replacement in the management of the bone tumors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **324**, 86-97.
- Mannervik, B. (1985). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, **113**, 490-495.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **243 (21)**, 5753-5760.
- McElroy, M. C., Postle, A. D., Kelly, F. J. (1992). Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1117 (2)**, 153-158.
- McInyre, M., Bohr, D. F., Dominiczak, A. F. (1999). Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Hypertension*, **34 (4)**, 539-545.
- McLennan, S. V., Heffernan, S., Wright, L., Rae, C., Fisher, E., Yue, D. K., Turtle, J. R. (1991). Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes*, **40 (3)**, 344-348.
- Miller, M. D. (1996). *Review of Orthopaedics*, **Second Ed.**, Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Moore, W. R., Graves, S. E., Bain, G. I. (2001). Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery*. **71 (6)**, 354-361.

- Morrison, S. J., Uchida, N., Weissman, I. L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **11**, 35-71.
- Mulliken, J. B., Glowacki, J., Kaban, L. B., Folkman, J., Murray, J. E. (1981). Use of demineralized allogeneic bone implants for the correction of maxillocraniofacial deformities. *Annals of Surgery*, **194 (3)**, 366-372.
- Najjar, T. A., Kahn, D. (1977). Comparative study of healing and remodeling in various bones. *Journal of Oral Surgery*, **35 (5)**, 375-379.
- Nishimura, T., Simmons D. J., Mainous, E. G. (1997). The origin of bone formed by heterotopic periosteal autografts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **55 (11)**, 1265-1268.
- Novak, Z., Varga, S. I., Pataki, L., Matkovics, B. (1990). Simple method for measurement of antioxidant. *Clinica Chimica Acta*, **194 (2-3)**, 115-119.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1978). Reaction of lineloik acid hydroperoxide with thiobarbituric acid. *Journal of Lipid Research*, **19 (8)**, 1053-1057.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, **95 (2)**, 351-358.
- Özen, T. (2003). Bazı bitkilerin antioksidan aktivitesinin in vitro ve in vivo araştırılması. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Doktora Tezi, Samsun.
- Özmen, I., Naziroğlu, M., Okutan, R. (2006). Comparative study of antioxidant enzymes in tissues surrounding implant in rabbits. *Cell Biochemistry and Function*, **24 (3)**, 275-281.
- Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **70 (1)**, 158-169.
- Panjamurthy, K., Manoharan, S., Ramachandran, C. R. (2005). Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **10 (2)**, 255-264.
- Paul, F. (1968). *Calcium Metabolism of Bone*, **Second Ed.**, Blackwell Scientific, Edinburgh.
- Perrott, D. H., Smith, R. A., Kaban, L. B. (1992). The use of fresh frozen allogenic bone for maxillary and mandibular reconstruction. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **21 (5)**, 260-265.

- Peterson, L. J., Hupp, J. R., Tucker, M. R., Ellis, E. (1998). *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*, **Third Ed.**, Mosby, St.Louis.
- Pinholt, E. M., Bang, G., Haanaes, H. R. (1991). Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scandinivian Journal of Dental Research*, **99 (2)**, 154-161.
- Prasad, G., Dhillon, M. S., Khullar, M., Nagi, O. N. (2003). Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthopaedica Belgica*, **69 (6)**, 546-551.
- Rangan, U., Bulkley, G. B. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British Medical Bulletin*, **49 (3)**, 700-718.
- Ransel Glutathione Peroxidase Manual. (2007). RS 505, RANDOX Laboratories Ltd., Antrim, İngiltere.
- Ransod Superoxide dismutase Manual. (2007). SD 125, RANDOX Laboratories Ltd., Antrim, İngiltere.
- Richardson, C. R., Mellonig, J. T., Brunsvold, M. A., McDonnell, H. T., Cochran, D. L. (1999). Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *Journal of Clinical Periodontology*, **26 (7)**, 421-428.
- Rosen, V. B., Hobbs, L. W., Spector, M. (2002). The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials. *Biomaterials*, **23 (3)**, 921-928.
- Sanchez, A. R., Eckert, S. E., Sheridan, P. J., Weaver, A. L. (2005). Influence of platelet-rich plasma added to xenogeneic bone grafts on bone mineral density associated with dental implants. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, **20 (4)**, 526-532.
- Schmitz, J. P., Hollinger, J. O. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **205**, 299-308.
- Seven, A., Candan, G. (1996). Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **27 (1)**, 41-50.
- Shamberger, D. S., Andreonne, T. L., Willis, L. E. (1974). Antioxidants and cancer. IV. Initiating activity of malonaldehyde as a carcinogen, *Journal of the National Cancer Institute*, **53 (6)**, 1771-1773.
- Sheweita, S. A., Khoshhal, K. I. (2007). Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Current Drug Metabolism*, **8 (5)**, 519-525.

- Slater, T. F. (1984). Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, **105**, 283-293.
- Sobaniec, H., Soboniec-Lotowska, M. E. (2000). Morphological examinations of hard tissues of periodontium and evaluation of selected processes of lipid peroxidation in blood serum of rats in the course of experimental periodontitis. *Medical Science Monitor*, **6 (5)**, 875-881.
- Southorn, P. A., Powis, G. (1988). Free radicals in medicine II. Involvement in human disease. *Mayo Clinic Proceedings*, **63 (4)**, 390-408.
- Soydan, N. (1992). *Genel Histoloji, Birinci Baskı*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- Spector, M. (1994). Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration. *Clinics in Plastic Surgery*, **21 (3)**, 437-444.
- Stevenson, S. (1998). Enhancement of fracture healing with autogeneous and allogeneic bone grafts. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **355**, 239-246.
- Stubbs, D., Deakin, M., Chapman-Sheath, P., Bruce, W., Debes, J., Gillies, R. M., Walsh, W. R. (2004). In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model. *Biomaterials*, **25 (20)**, 5037-5044.
- Sugino, K., Dohi, K., Yamada, K., Kawasaki, T. (1987). The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery*, **101 (6)**, 746-752.
- Sun, Y., Oberley, Y., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, **34 (3)**, 497-500.
- Suttle, N. F. (1986). Copper Deficiency in Ruminants. *The Veterinary Record*, **119 (21)**, 519-522.
- Şimşek, F. (1999). Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, **8 (1)**, 42-47.
- Tadjoedin, E. S., de Lange, G. L., Bronckers, A. L., Lyaruu, D. M., Burger, E. H. (2003). Deproteinized cancellous bovine bone (Bio-Oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *Journal of Clinical Periodontology*, **30 (3)**, 261-270.
- Tapety, F. I., Amizuka, N., Uoshima, K., Nomura, S., Maeda, T. A. (2004). A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clinical Oral Implants Research*, **15 (3)**, 315-324.

- Tappel, A. L., Dillard, C. J. (1981). In vivo lipid peroxidation: measurement via exhaled pentan and protection by vitamine E. *Federation Proceedings*, **40 (2)**, 174-178.
- Thaller, S. R., Hoyt, J., Borjeson, K., Dart, A., Tesluk, H. (1993). Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *The Journal of Craniofacial Surgery*, **4 (2)**, 79-84.
- Thomas, M. J. (1995). The role of free radicals and antioxidants: how do we know that they are working? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35 (1-2)**, 21-39.
- Thomas, A. E. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **355**, 7-21.
- Thorwarth, M., Wehrhan, F., Srour, S., Schultze-Mosgau, S., Felszeghy, E., Bader, R. D., Schlegel, K. A. (2007). Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **45 (1)**, 41-47.
- Tulunoğlu, Ö. (1999). Serbest radikaller- antioksidanlar ve dişhekimliğindeki rolleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **16 (1)**, 43-50.
- Turgut, A., Göktürk, E., Köse, N., Kaçmaz, M., Öztürk, H. S., Seber, S., Acar, S. (1999). Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, **70 (5)**, 487-490.
- Turner, C. H. (2006). Bone strenght: current concepts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1068**, 429-446.
- Valentini, P., Abensur, D., Wenz, B., Peetz, M., Schenk, R. (2000). Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, **20 (3)**, 245-253.
- Walsh, W. R., Chapman-Sheath, P. J., Cain, S., Debes, J., Bruce, W. J., Svehla, M. J., Gillies, R. M. (2003). A resorbable porous ceramic composite bone graft substitute in a rabbit metaphyseal defect model. *Journal of Orthopaedic Research*, **21 (4)**, 655-661.
- Walsh, W. R., Vizesi, F., Michael, D., Auld, J., Langdown, A., Oliver, R., Yu, Y., Irie, H., Bruce, W. (2008). Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. *Biomaterials*, **29 (3)**, 266-271.
- Ward, B. B., Edwards, S. P., Feinberg, S. E. (2005). Healing of traumatic injuries. In: *Oral and Maxillofacial Trauma*, **Third Ed.**, Eds, Fonseca, R. J., Walker, R. V., Betts, N. J., Barber, H. D., Powers, M. P. Elsevier Saunders, Philadelphia, 25-67.

- Wheeler, S. L., Holmes, R. E., Calhoun, C. J. (1996). Six-year clinical and histologic study of sinus lift grafts. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, **11 (1)**, 26-34.
- Wheeler, D. L., Eschbach, E. J., Hoellrich, R. G., Montfort, M. J., Chamberland, D. L. (2000). Assessment of resorbable bioactive material for grafting of critical-size cancellous defects. *Journal of Orthopaedic Research*, **18 (1)**, 140-148.
- Wilson, J., Hench, L. L., Greenspan, D. (1995). Bioceramics. In: *Comparative properties of bioactive bone graft materials*, **First Ed.**, Eds, LeGeros, R. Z., Bautista, C., Styner, D., LeGeros, J. P., Vijayaraghavan, T. V., Retino, M., Valdecanas, A. Elsevier Science, NewYork, 81-87.
- Winrow, V. R., Winyard, P. G., Morris, C. J., Blake, D. R. (1993). Free radical in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *British Medical Bulletin*, **49 (3)**, 506-522.
- Yeler, H., Tahtabas, F., Candan, F. (2005). Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochemistry and Function*, **23 (2)**, 137-139.
- Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., Mori, M. (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **135 (3)**, 372-376.
- Zitzmann, N. U., Scharer, P. (1998). Sinus elevation procedures in the resorbed posterior maxilla. Comparison of the crestal and lateral approaches. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, **85 (1)**, 8-17.

ÖZGEÇMİŞ

01.01.1981 yılında Mardin’de doğdum. İlkokulu Samsun Gülsüm Sami Kefeli İlköğretim Okulunda, ortaokulu Samsun Atatürk Ortaokulunda ve lise öğrenimimi Samsun 19 Mayıs Lisesinde tamamladım. 1998 yılında girdiğim Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2004 yılında mezun oldum.

2004 yılında Ondokuzmayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalında doktora programına başladım. 2005 yılından itibaren araştırma görevlisi olarak aynı kurumda çalışmaktayım.

Evliyim. Yabancı dilim İngilizcedir.



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HEK/ 200
Konu : Araştırma projeniz hk.

28/12/2006

Doç. Dr. Nergiz YILMAZ
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

2006/41 numaralı “Kemik defektlerinde kullanılan farklı greft materyallerinin tavşanlarda lipid peroksidasyon oluşumu üzerine etkisi.” konu başlıklı Projeniz; Hayvan Etik Kurulu’nun 27.12.2006 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Deney Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliğiyle karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılar a ait olmak kaydıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Muhlise ALVUR
Hayvan Etik Kurulu Başkanı