

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**GREFT MADDELERİNE MEKANİK STABİLİTE
SAĞLAMAK AMACIYLA ÜRETİLMİŞ, HETEROLOG
TİP I VE TİP III KOLLAJEN İÇEREN JELİN KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN RATLAR
ÜZERİNDE DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ**

Dt. Kamile DİLEK SEÇKİN

**Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

Bu çalışma; Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından
TDH-2019-6904 no'lu proje ile desteklenmiştir.

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ertunç DAYI**

**ERZURUM
2020**

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

GREFT MADDELERİNE MEKANİK STABİLİTE SAĞLAMAK
AMACIYLA ÜRETİLMİŞ, HETEROLOG TİP I VE TİP III
KOLLAJEN İÇEREN JELİN KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
OLAN ETKİSİNİN RATLAR ÜZERİNDE DENEYSEL OLARAK
İNCELENMESİ

Dt. Kamile DİLEK SEÇKİN

Tez Savunma Tarihi : 02.07.2020

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ertunç DAYI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ertunç DAYI

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ümit ERTAŞ

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ümit YOLCU

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Adnan KILINÇ

Jüri Üyesi : Dr. Öğr. Üyesi Zeynep BAYRAMOĞLU

ONAY

Bu Çalışma Yukarıdaki jüri tarafından **Uzmanlık Tezi** Olarak Kabul Edilmiştir.

Prof. Dr. Abdulvahit ERDEM
Fakülte Dekanı

Uzmanlık Tezi
ERZURUM-2020

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Doku ve Histolojisi	4
2.1.1. Kemik Dokusu Hücreleri	4
2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler	4
2.1.1.2. Osteoblastlar	5
2.1.1.3. Osteositler	6
2.1.1.4. Osteoklastlar	6
2.1.2. Kemik Matriksi	7
2.1.2.1. Organik Matriks	7
2.1.2.2. İnorganik Matriks	8
2.1.3. Kemik Zarları.....	8
2.1.4. Kemik Tipleri.....	9
2.1.4.1. Primer Kemik Dokusu	9
2.1.4.2. Sekonder Kemik Dokusu	9
2.1.4.2.1.Kortikal Kemik Dokusu.....	10
2.1.4.2.2.Trabeküler Kemik Dokusu.....	10

2.2. Kemik Oluşumunun Histogenezi.....	10
2.2.1. İntramembranöz Kemikleşme.....	11
2.2.2. Endrokondral Kemikleşme.....	11
2.3. Kemik İyileşmesi (Onarım).....	12
2.3.1. Kemik İyileşmesinin Evreleri.....	13
2.3.1.1. Primer Kemik İyileşmesi.....	13
2.3.1.1.1. Gap İyileşmesi.....	13
2.3.1.1.2. Kontakt İyileşmesi.....	14
2.3.1.2. Sekonder Kemik İyileşmesi.....	14
2.3.1.2.1. İnflamatuvar (Hematom, Yangı) Dönem.....	14
2.3.1.2.2. Onarım (Reperasyon Dönemi).....	15
2.3.1.2.3. Remodeling Dönemi.....	16
2.3.2. Deneysel Hayvan Modelleri.....	16
2.3.2.1. Kemik Modelleri.....	17
2.3.2.1.1. Kırık İyileşmesi Modelleri.....	17
2.3.2.1.2. Kafatası Defekt Modelleri.....	17
2.3.2.2. Diğer Modeller.....	18
2.3.3. Kritik Boyutlu Kemik Defektleri.....	18
2.4. Oral ve Maksillofasial Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri.....	18
2.4.1. Kemik Greftlerinin Özellikleri.....	19
2.4.2. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması.....	21
2.4.2.1. Otojen Greftler.....	21
2.4.2.2. Allogreftler.....	21
2.4.2.3. Ksenogreftler.....	22
2.4.2.4. Alloplastik Materyaller.....	23

2.4.3. Greft Materyalinin Alıcı Kemik ile Birleşme Mekanizması ve Rejenerasyonu...	23
2.4.4. Greft Materyalinin Mekanik Stabilitesi	25
2.5. Kemik Oluşum ve Yıkım Göstergeleri	26
2.5.1. TGF- β	26
2.5.2. BMP	30
2.5.3. IL	34
2.5.4. Diğer Gen Ekspresyonları.....	34
2.6. Kollajen.....	35
2.6.1. Kollajen Süperfamilyası	35
2.6.2. Kemik İyileşmesinde Kollajen.....	36
2.6.3. Kollajen Kullanım Sahaları	37
2.7. Aminotransferazlar	38
2.8. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	39
2.8.1. MDA ve GSH	39
3. MATERYAL VE METOD	41
3.1. Çalışma Gruplarının Tanımlanması	41
3.2. Kollajen Jel Materyalinin (TSV Jel) İçeriği, Hazırlanması ve Uygulaması	42
3.3. Cerrahi Teknik	43
3.4. Ratların Sakrifiye Edilmesi.....	48
3.5. Dekalsifikasyon Metodu ve Histopatolojik Metot	52
3.6. İmmünohistokimyasal Metot	53
3.7. Biyokimyasal Metot.....	54
3.8. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Klinik Bulgular	56

4.2. Histopatolojik bulgular	56
4.2.1. Hematoksilen-Eozin boyamalarda;	56
4.2.2. Masson trikrom boyamalarda.....	62
4.2.3. Congo Red Boyamalarda	67
4.3. İmmünohistokimyasal bulgular	71
4.3.1. BMP boyamalarda;	71
4.3.2. TGF Boyamalarda.....	76
4.3.3. IL-6 Boyamalarda	81
4.4. Biyokimyasal bulgular	87
4.4.1. Aminotransferaz Enzim Değerleri	87
4.4.2. Antioksidan enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyon bulgularının incelenmesi (GSH, MDA)	88
5. TARTIŞMA.....	89
6. SONUÇ	109
KAYNAKLAR	111
EKLER	139
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	139
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	140

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda bilgi ve deneyimlerini çekinmeden paylaşan, değerli hocam Prof. Dr. Ertunç DAYI'ya en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bizden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve yetişmemizde büyük emekleri olan değerli hocam Prof. Dr. Ümit ERTAŞ'a,

Eğitim sürecim boyunca bilgilerini ve yardımlarını paylaştan bölümümüzün değerli öğretim üyeleri; Dr. Öğr. Üyesi Gelengül URVASIZOĞLU'a, Dr. Öğr. Üyesi Ertan YALÇIN'a, Doç. Dr. Adnan KILINÇ'a, ve Dr. Öğr. Üyesi Zeynep BAYRAMOĞLU'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum bütün asistan arkadaşlarıma ve tüm anabilim dalı çalışanlarına,

Son olarak bugünlere gelmemde en büyük katkıya sahip, hayatımın her anında sevgilerini ve desteklerini yanımda hissettiğim aileme ve sevgili eşim Uzm. Dt. Fatih SEÇKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dt. Kamile DİLEK SEÇKİN

ÖZET

Greft Maddelerine Mekanik Stabilite Sağlamak Amacıyla Üretilmiş Heterolog tip I ve tip III Kollajen İçeren Jelin Kemik İyileşmesi Üzerine Olan Etkisinin Ratlar Üzerinde Deneysel Olarak İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, greft maddelerine mekanik stabilite sağlamak için sunulmuş eksojen tip I ve III kollajen içeren jel materyalinin, kemik iyileşmesi ve oksidan-antioksidan dengesi üzerine olan etkisi ve toksisitesini değerlendirmektir.

Materyal ve Metod: Sunulan çalışmada 36 adet erkek winstar albino cinsi rat kontrol ve deney olmak üzere iki ve kendi içlerinde de rasgele olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (n=6). Deneklerde 5 mm'lik unilateral kalvaryal defektler oluşturuldu. Kontrol grubundaki defektler ksenogreft ile, deney grubundakiler ise ksenogreft ile karıştırılan eksojen tip I ve III kollajen içeren jel materyaliyle dolduruldu. Denekler 2, 4 ve 8. haftalarda sakrifiye edilerek histopatolojik (hemotoksilen-eozin, masson-trikrom, congo red) immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak incelendi.

Bulgular: Histopatolojik incelemelerde, granülasyon dokusu ve anjiogenezis gelişimi erken dönemde deney grubunda, ilerleyen dönemlerde ise kontrol grubunda daha fazla gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubunda fibröz doku, deney grubunda ise osteoblastik aktivite ve örgü-lamaller kemik oluşumu daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). İmmünohistokimyasal incelemelerde BMP-2 ekspresyonu deney grubunda daha yüksekken ($p<0.05$), TGF- β 1 ve IL-6 ekspresyonu, erken dönemde deney grubunda, ilerleyen dönemlerde ise kontrol grubunda daha fazla bulunmuştur ($p<0.05$). Biyokimyasal incelemelerde AST ve ALT erken dönemde deney grubunda daha fazlayken ($p<0.05$) ilerleyen dönemlerde fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Kalsiyum ve fosfor değerleri deney grubunda daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). MDA ve GSH seviyeleri arasında ise gruplar arasında fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Sonuç: Eksojen tip I ve III kollajen içeren jelin, kemik rejenerasyonu ve remodelasyonunun hızlanmasında ve gelişmesinde görev yaptığı, rejenerasyonu olumlu yönde etkileyen BMP-2, TGF- β 1 ve IL-6'nın ekspresyonlarında artış sağladığı ve oksidan-antioksidan dengesini bozmayan, manipülasyonu kolaylaştıran bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kemik İyileşmesi, Tip I kollajen, Tip III Kollajen

ABSTRACT

Experimental Investigation of the Effect of Heterologous Type I and Type III Collagen Containing Gel Produced to Provide Mechanical Stability to Graft Materials on Bone Healing Process on Rats

Aim: In this study, it was aimed to investigate the effect to the gel, which includes tip I and tip III collagen substance and produced for providing mechanical stability of graft materials, on toxicity, bone healing and oxidant- antioxidant effect.

Material and Method: In this study, 36 male winstar albino rats were divided into two main groups as experiment and control, and these groups were randomly divided into 3 subgroups (n = 6). 5 mm calvarial defects were created unilaterally in the subjects. The defects in the control group were filled with xenograft and those in the experimental group were filled with gel material containing exogenous type I and III collagen mixed with xenograft. The subjects were sacrificed at 2nd, 4th and 8th weeks and examined histopathologically (hemotoxylin-eosin, masson-trichrome, congo red) immunohistochemically and biochemically.

Results: In histopathological examinations, the development of granulation tissue and angiogenesis was significantly higher in the early period in experimental group and in the following periods in control group ($p < 0.05$). Fibrous tissue formation was significant in control group, osteoblastic activity and mesh-lamellar bone formation were higher in experimental group ($p < 0.05$). Immunohistochemical analyses showed that BMP-2 expression was higher in experimental group ($p < 0.05$), while TGF- β and IL-6 expressions were higher in experimental group in the early period. These expressions were significant in control group in the following periods ($p < 0.05$). It was observed in the biochemical examinations that ALT and AST levels were higher in experimental group in the early period ($p < 0.05$) while, no difference was detected on these markers in the following periods ($p > 0.05$). Calcium and phosphorus assessment were higher in experimental group ($p < 0.05$). There was no difference between MDA and GSH levels between the groups ($p > 0.05$).

Conclusion: It was determined that the gel containing exogenous type I and III collagen was involved in the acceleration and development of bone regeneration and remodeling. It was also found that this gel provided an increase in the expressions of BMP-2, TGF- β and IL-6, which affect bone regeneration positively. On the other hand, it was concluded that this material has beneficial effects which are nondisruptive on oxidant-antioxidant balance and facilitating the manipulation.

Keywords: Bone Healing, Type I Collagen, Type III Collagen

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
Ca ⁺²	: Kalsiyum
COX	: Siklooksijenaz enzimleri
CR	: Congo Red
HE	: Hematoksilen-Eozin
GSH	: Glutasyon
IHC	: İmmünohistokimyasal
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-6	: İnterlökin-6
MDA	: Malondialdehit
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
MT	: Masson Trikrom
P	: Fosfor
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PRF	: Trombositten Zengin Fibrin
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktör Beta
TSV Jel	: Isıya duyarlı viskoziteye sahip jel

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 3.1. TSV Jel	42
Şekil 3.2. İntraperitoneal teknikle anestezi uygulanması	43
Şekil 3.3. Ratların Kafa Bölgelerinin Tıraş Edilmesi	44
Şekil 3.4. Operasyon sahasının antiseptik solüsyon ile boyanması.....	44
Şekil 3.5. Künt diseksiyonla tam kalınlıklı flebin kaldırılması	45
Şekil 3.6. Kemik defektinin oluşturulması	45
Şekil 3.7. Partiküler greft materyali.....	46
Şekil 3.8. Defektin greft ile doldurulması	46
Şekil 3.9. Defektin membran ile örtülmesi.....	47
Şekil 3.10. Dokuların suture edilmesi	47
Şekil 3.11. Greft ve kollajen jelin karışımıyla elde edilen materyal	48
Şekil 3.12. Defektin elde edilen karışım ile doldurulması	48
Şekil 3.13. İntrakardiyak kan alınması	49
Şekil 3.14. 2. hafta kontrol grubunun makroskopik görüntüsü	49
Şekil 3.15. 2. hafta deney grubunun makroskopik görüntüsü	50
Şekil 3.16: 4. hafta kontrol grubunun makroskopik görüntüsü	50
Şekil 3.17. 4. hafta deney grubunun makroskopik görüntüsü	51
Şekil 3.18. 8. hafta kontrol grubunun makroskopik görüntüsü	51
Şekil 3.19. 8. hafta deney grubunun makroskopik görüntüsü	52
Şekil 4.1. 2. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde anjiogenezis (ince oklar), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları(okbaşları), osteoblastlarda hafif düzeyde proliferasyon (kalın oklar), H&E, Bar:100µm.....	57

Şekil 4.2. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde anjiogenezis (ince oklar), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları (okbaşları), osteoblastlarda orta düzeyde proliferasyon (kalın oklar), H&E, Bar:100µm.	58
Şekil 4.3. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde anjiogenezis (ince oklar), osteoblastlarda hafif düzeyde proliferasyon (kalın oklar), şiddetli düzeyde granülasyon dokusu (yıldız) H&E, Bar:100µm.	59
Şekil 4.4. 4. Hafta deney grubu, hafif düzeyde anjiogenezis (ince oklar), osteoblastlarda şiddetli düzeyde proliferasyon (kalın oklar), orta düzeyde granülasyon dokusu (yıldız) H&E, Bar:100µm.	60
Şekil 4.5. 8. Hafta kontrol grubu, osteoblastlarda orta düzeyde proliferasyon (kalın oklar), orta düzeyde granülasyon dokusu (yıldız) H&E, Bar:100µm.	61
Şekil 4.6. 8. Hafta deney grubu, osteoblastlarda şiddetli düzeyde proliferasyon (kalın oklar) H&E, Bar:100µm.	62
Şekil 4.7. 2. Hafta kontrol grubu, sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), orta düzeyde gevşek bağ dokusu (yıldız) Masson Trikrom, Bar:100µm.	63
Şekil 4.8. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.	63
Şekil 4.9. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), çok hafif düzeyde gevşek bağ dokusu (yıldız) Masson Trikrom, Bar:100µm.	64
Şekil 4.10. 4. Hafta deney grubu, hafif düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.	65
Şekil 4.11. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.	66

Şekil 4.12. 8. Hafta deney grubu, çok hafif düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar) ,Masson Trikrom, Bar:100µm.	66
Şekil 4.13. 2. Hafta kontrol grubu, hafif düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.	67
Şekil 4.14. 2. Hafta deney grubu, orta düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.	68
Şekil 4.15. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.	69
Şekil 4.16. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar),Congo Red, Bar:100µm.....	69
Şekil 4.17. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.	70
Şekil 4.18. 8. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.	71
Şekil 4.19. 2. Hafta kontrol grubu, hafif düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.....	72
Şekil 4.20. 2. Hafta deney grubu, orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.	73
Şekil 4.21. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.....	74
Şekil 4.22. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P, Bar:100µm.....	74
Şekil 4.23. 8. Hafta kontrol grubu, ortadüzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.....	75

Şekil 4.24. 8. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları),	
IHC-P, Bar:100µm.....	76
Şekil 4.25. 2. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı), IHC-	
P, Bar:100µm.	77
Şekil 4.26. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı),	
IHC-P , Bar:100µm.....	78
Şekil 4.27. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı), IHC-	
P, Bar:100µm	79
Şekil 4.28. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı),	
IHC-P, Bar:100µm.....	79
Şekil 4.29. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı), IHC-	
P, Bar:100µm	80
Şekil 4.30. 8. Hafta deney grubu, hafif düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P	
, Bar:100µm	81
Şekil 4.31. 2. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-	
P,Bar:50µm.	82
Şekil 4.32. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P,	
Bar:50µm.	83
Şekil 4.33. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P,	
Bar:50µm.	84
Şekil 4.34. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P,	
Bar:50µm.	84
Şekil 4.35. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P,	
Bar:50µm.	85

Şekil 4.36. 8. Hafta deney grubu, hafif düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-

P,Bar:50µm. 86



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. BMP'lerin temel fizyolojik özellikleri.....	33
Tablo 3.1. Gruplandırmaların şematik gösterimi	42
Tablo 3.2. Histopatolojik skorlamada kullanılan kriterler	53
Tablo 4.1. Kalvaryal kemikte 2.haftadaki histopatolojik bulguların skorlanması	57
Tablo 4.2. Kalvaryal kemikte 4.haftadaki histopatolojik bulguların skorlanması	59
Tablo 4.3. Kalvaryal kemikte 8.haftadaki histopatolojik bulguların skorlanması	61
Tablo 4.4. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki CR incelemelerindeki osteoblastik aktivite bulgularının skorlanması.....	71
Tablo 4.5. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki BMP-2 ekspresyonu değerlerinin skorlanması	76
Tablo 4.6. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki TGF- β 1 ekspresyonu değerlerinin skorlanması	81
Tablo 4.7. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki IL-6 ekspresyonu değerlerinin skorlanması	86
Tablo 4.8. 2., 4. ve 8. Haftadaki kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar	87
Tablo 4.9. Deney ve kontrol gruplarında haftalar arasındaki farklılıklar	88
Tablo 4.10. MDA ve GSH seviyeleri arasındaki farklılıklar	88

1. GİRİŞ

Maksillofasial cerrahinin önemli ilgi alanlarından biri rezorpsiyonlar sonucu oluşabilen kemik yetersizliklerinin ogmentasyonu iken, bir diğeri ise konjenital olarak ya da travma, enfeksiyon, kırık, benign veya malign tümör rezeksiyonu gibi çeşitli durumlar sonucu meydana gelebilen kemik defektlerinin onarımıdır.^{1,2}

Kemik defektlerinin iyileşme miktarı, defektin genişliği ve derinliğine bağlıdır. Türlerle ve bölgeye göre farklılık gösterecek şekilde, hayat boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük kemik defekti kritik boyutlu defekt olarak adlandırılmaktadır ve osteojenik materyallerin değerlendirilmesinde standart olarak belirlenmiştir.^{1,2}

Kemik defektlerinin onarımı için geleneksel olarak uygulanan otojen kemik grefti işlemi altın standarttır. Ancak iyileşmesindeki yüksek başarısına rağmen sınırlı miktarda ulaşım, donör bölge problemi, ikinci bir cerrahi alanı gerektirmesi gibi dezavantajlarından dolayı araştırmacıları alternatif yöntemlere yönlendirmiştir. Günümüzde alternatif olarak kullanılabilen metaryaller; ksenogreftler, allogreftler ve alloplastik greft gibi materyalleri kapsamaktadır.³

Sığır, mercan, domuz, at gibi çeşitli hayvan türlerinden elde edilebilen ksenogreftler, immün reaksiyona neden olmaması, kolay uygulanabilmesi ve istenilen miktarda temin edilebilmesi sebebiyle tercih edilmektedir. İnsan kansellöz kemiğine yapısal olarak çok benzeyen sığır kaynaklı ksenogreftler, osteokondüksiyon ve biyoyumluluk özelliklerine sahip olmasından dolayı günümüzde çeşitli cerrahi operasyonlarda sıkça kullanılmaktadır.^{4,5}

Diğer taraftan, kullanılan greft metaryali kadar önemli olan bir konu uygulanan greft metaryalinin alıcı bölgedeki stabilizasyonudur. Greftin alıcı bölgedeki stabilizasyonu, defekt onarımı, kemik rejenerasyonu veya kemik ogmentasyonu için, kullanılan metaryalin kemikleşme potansiyeli veya yeni oluşacak kemik yapıya izin

vermesi açısından son derece mühimdir. Greftin alıcı bölge içindeki stabilitesini sağlamak için, kullanılan en önemli yöntemlerden biri greft fiksasyonu sağlanarak alıcı ve greft ara yüzünde artmış bir sıkışma kuvveti ile greftin stabilize edilmesidir.⁶ Greftin yetersiz stabilitesi, rekonstrüksiyonun çökmesine, psödotrozise, deformitenin rekürrensine yol açabilir.⁷ Kemiğin tek ya da kombine biyomateryallerle greftlenmesi, mekanik stabilite için yapısal açıdan büyük öneme sahiptir ve greft kullanımı kemik onarımındaki yanıtta, kemik stimülasyonunu ve güçlendirilmesini içerecek şekilde geliştirilmiştir.⁶ Bu konuyla ilgili araştırmalar hala devam etmektedir.

Kemik ogmentasyonu işlemlerinde kemik rejenerasyonunu destekleyen çeşitli ürünler hali hazırda bulunmaktadır. Bu güncel biyomateryallerden biri olan ve eksojen olarak uygulanabilen kollajen biyometaryalinin; çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu, immünoterapetik ve osteoindüktif faktörler için (kemik morfojenik protein (BMP), transforme edici büyüme faktörü (TGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) gibi) saklayıcı ajan olduğu, adezyonu, proliferasyonu, diferansiasyonu teşvik ettiği, osteokondüktif özellikte olduğu, TGF- β ve BMP'ler de dahil olmak üzere kemiği düzenleyici büyüme faktörlerine ve matriks proteinlerine bağlandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.⁸⁻¹⁰ Özellikle bu bağlanma osteoblastik diferansiasyonun gerçekleşmesini sağlayabilir. Aynı zamanda stabilizasyonun arttırılması amacıyla kollajen içerikli çeşitli ürünler hali hazırda kullanıma sunulmaktadır.

Ancak, eksojen olarak uygulanabilen kollajenin kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri yapılan araştırmalarda halen tam bir netliğe kavuşturulamamıştır. Aynı zamanda, mekanik stabilite sağlamak amacıyla sunulmuş eksojen tip I ve III kollajen içeren jel materyalinin etkinliğini değerlendiren bir çalışma izlenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada, eksojen kollajenin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini histopatolojik

olarak (hematoksilen-eozin (HE), masson trikrom (MT), congo red (CR) boyama), immünohistokimyasal (IHC) olarak (BMP-2, TGF- 1, interlökin-6 (IL-6)), bu metaryalin toksik etkilerini biyokimyasal olarak (aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), kalsiyum (Ca^{+2}), fosfor (P)) ve yine kullanılan bu metaryalin oksidan-antioksidan dengesine olan etkisini (glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA)) değerlendirmeyi hedefledik.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Doku ve Histolojisi

Kemik; hidroksiapatit kristalleri (%67), tip I kollajen (%28), bazı büyüme faktörleri ve serum proteinlerinden (%5) oluşan, mezanşimal hücre kökenli özel bir konnektif doku şeklindedir. Esneklik, sertlik ve gerilme direncini mineralize yapısı ve matriksinden alan kemik dokusu, rejenerasyon sırasında skar gelişmemesi yönüyle dinamik bir yapıya sahiptir.¹¹ Kemik; metabolik fonksiyonunu kalsiyum, fosfat gibi birçok iyon depolama görevi yaparak, mekanik fonksiyonunu kas kütlelerine iskelet fonksiyonunu görerek ve önemli organların koruyuculuğunu üstlenerek, hemopoetik fonksiyonunu ise barındırdığı kemik iliği sayesinde kan yapımında rol alarak göstermektedir.^{11, 12} Kemik dokusu, değişen mekanik streslere ve fonksiyonel ihtiyaçlara adapte olarak yapısal değişikliğe uğrayabilir. Transplante edilen dokular arasında sıklıkla tercih edilmektedir. Kemik büyümesi ve iyileşmesi, hücresel, patolojik, hormonal, biyomekanik ve biyokimyasal birçok olayın zincirleme reaksiyonuyla olur.¹¹

2.1.1. Kemik Dokusu Hücreleri

Kemik dokusu, hücreler ve kalsifiye olmuş ara maddeden oluşmaktadır. Bu hücreler; osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositlerden oluşmaktadır.

2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenşim hücrelerinden farklılaşan bu hücreler genellikle, periosteum ve endosteumda istirahat halinde bulunur ve kemik yapımı uyarıldığında sayısal olarak artarak kemik yapım yeteneğine sahip hücrelere diferansiye olurlar. Aktifleştiği dönemler genellikle büyüme dönemi ile kemik rejenerasyonu olduğu dönemlerdir. Osteoblast ve osteoklastlara diferansiye olma yeteneğine sahiptirler. Ek olarak yağ hücresi, fibroblast ve kemik iliğindeki kan yapıcı hücrelere dönüşebildikleri de

gösterilmiştir. İstirahat halinde yassı olan bu hücrelerin çekirdekleride yassı ve ovaldır.¹³

2.1.1.2. Osteoblastlar

Kemik oluşumundan sorumlu olan bu hücreler, kemik matriksinin organik kısmının sentezinden sorumludur ve matriks mineralizasyonunda görev alırlar. Epitelyum hücrelerine benzer şekilde yan yana dizilen bu hücreler kemiğin dış yüzeyinde konumlanmıştır.

Osteoblastların görevlerini sıralayacak olursak;

- ✓ Osteokalsin, tip I kollajen, minör proteoglikanlar gibi organik matriks bileşenlerini üretirler,
- ✓ Paratiroid hormon reseptörlerini içermesi sayesinde kemik rezorpsiyonunun hormonal regülasyonunu sağlarlar,
- ✓ Kemiğin depozisyon safhasında, osteoklast aktivitesinin inhibisyonu ve stimülasyonunu sağlarlar,
- ✓ Kemik rezorpsiyon döneminde osteoklast aktivasyonunu sağlayan mediatörleri salgırlarlar.

Osteoblastların ürettiği kemik matriks proteinleri genellikle kollajen tip I, proteoglikanlar ve glikoproteinler, kemik sialoprotein, osteopontin, osteokalsin, hormon reseptörleri (özellikle paratiroid hormon reseptörü)dir.¹⁴ Bunlara ek olarak kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, BMP, TGF- β , IGF-I, IGF-II, IL-1, Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) gibi sinyal proteinlerini salgırlarlar.

Osteoblastların göç etme ya da çoğalma fonksiyonlarının olmayışından, kemik oluşumunu gerektiren durumlarda osteoprogenitör hücrelerin bölgeye göç ederek osteoblastlara diferansiye olurlar.¹

Osteoblast farklılaşması gen ürünü olan core-binding faktör, indian hedgehog ile direkt veya indirekt etki ile kontrol altındadır. Ayrıca çok sayıda sitokin ve salınmış büyüme faktörleri (FGF, TGF- β süper ailesi, IGF) bu farklılaşmada etkilidir.¹⁵

2.1.1.3. Osteositler

Erişkin insan kemiğinde, en fazla bulunan hücre tipi olan osteositler, kemik matriks içerisinde laküna adı verilen küçük boşluklarda gömülü kalmış olgun osteoblastlardır. Her laküna tek bir osteosit barındırır. Her birinden çıkan sitoplazmik uzantılar sayesinde osteositler arasında ve haversiyan kanallarında gömülü hücrelerle oluşturdukları ağ sayesinde besin maddeleri ve atık ürün geçişi sağlanır. Osteositler, ekstraselüler matriksle iyon alışverişi yaparak kalsiyum ve fosfor konsantrasyonunun düzenlenmesinde görev alırlar. Lokal çevre faktörlerinden etkilenerek kemiğe etki eden kuvvetlerin varlığında siklik adenosin monofosfat, osteokalsin ve IGF salgırlar. Ve bunun akabinde, öncül osteoblastların sayısı artarak remodeling ve kemik apozisyonu başlar.

Osteositler mekanosensör özellikte hücrelerdir. Kemik osteosit, osteoblast ve osteoklast hücrelerin kombine hareketi ile iskelet büyümesi esnasında şekillenirken, erişkin hayatta mekanik yük yada travma gibi durumlarda yeniden oluşup şekillenerek remodelinge uğrar. Her ne kadar remodeling sürecinde osteoblastların gerçekleştirdiği kemik sentezi ve osteoklastlar tarafından sağlanan rezorpsiyon ön planda olsa da bu hücreler arası direkt ilişki gösterilememiştir. Birçok yazar bu dengede, osteositlerin aktif rol oynayarak kemik remodelinginde kritik öneme sahip olduğunu savunur.^{16, 17}

2.1.1.4. Osteoklastlar

Hemoepotik kökenli monositlerden oluşan, kemik rezorpsiyonunda görev alan çok çekirdekli dev hücrelerdir.¹⁷ “Howship lakünası” denilen kemik yüzeyinde oluşturdukları rezorpsiyon alanlarında bulunurlar. Barındırdıkları asit hidrolazı matrikse

boşaltarak rezorpsiyon yapan osteoklastlar, kalsiyum ve fosfat ve hidrolitik enzimleri plazmaya salgılayarak matriks yapısını, kollajenez enzimi ile de matriks kollajeninin yıkımını gerçekleştirirler.¹⁸ Kemik rezorpsiyonu esnasında sırasıyla, osteoklast migrasyonu ve tutunması, membran polarizasyonu, hidroksiapatitin çözünmesi, organik matriks yıkımı, ölü dokuların yok edilmesi, hücresel inaktivasyon ve son olarak ölüm gerçekleşir. Osteoklast migrasyonunda büyüme faktörlerinin salgılanmasının önemli rol oynadığı savunulmaktadır.¹⁷ Osteoklast kenarlarının bazı bölümlerinde mikrovillus denilen, zar yüzeyini oldukça genişleten çok sayıda sitoplazmik zar katlanmaları ve pinositik kesecikler vardır. Mekanik streslere bağlı olarak gerçekleşen kemiğin şekillenmesinde osteoblastlarla beraber görev alırlar. Kemikte depo halde bulunan kalsiyumun devinimini sağlarlar. Paratiroid ve tiroksin hormonlarının etkisiyle sayı ve etkileri artar, kalsitonin ve östrojen hormonlarının etkisiyle azalır.¹⁸

2.1.2. Kemik Matriksi

Kalsifiye kemiğin %5'ini su, %25'ini organik matriks ve %70'ini inorganik matriks oluşturmaktadır.¹⁹

2.1.2.1. Organik Matriks

Bu matriksin % 90'ı protein kökenli kollajen liflerinden (osteokollajen) oluşurken geri kalan kısmı proteoglikanlar, alkalin fosfataz, osteonektin gibi glikoproteinler ile osteokalsin gibi gamma karboksi glutamik asit içeren proteinler meydana getirir. Osein adı verilen bu yapılar matriksinin esnekliğini sağlarken aynı zamanda nonkollajen yapılar hücre adezyonunda, kemik yapım ve yıkım olaylarında ve hücre aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.^{19, 20} Kollajen lifler ve hidroksiapatit arasındaki bağlar, kemiğin dayanıklılığından ve karakteristik sertliğinden sorumludur. Örneğin dekalsifiye olan kemik normal şeklini korur ancak oldukça esnek haldeyken organik kısım uzaklaştırıldığında ise, kemik şeklini yine korur ancak bu kez

kırılğan hal alır.²¹ Bu matriksin kalsifikasyonu, Tip I kollajenlerin sonlanma bölgelerindendeki boşluklara mineral birikimiyle olmaktadır. Osteoblastların sentezlediği kemik glikoproteinleri (osteonektin, osteopontin ve osteokalsin) bu kalsifikasyonun başlatılmasıyla görevlidirler.²²

2.1.2.2. İnorganik Matriks

Bu matriks, başta kalsiyum ve fosfor olmak üzere; sodyum ,bikarbonat, magnezyum, potasyum ve sitrat gibi mineralleri barındırmaktadır. Kollajen fibrillerin arasında hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) kristalleri şeklinde bulunan bu mineraller Tip I kollajen lifleri boyunca uzanırlar. Hidrasyon kabuğu adı verilen ve hidroksiapatit kristallerin üzerinde su ve iyonlardan meydana gelen tabaka vücudun sıvı-iyon dengesini sağlamaktadır.^{21, 23}

2.1.3. Kemik Zarları

Kemiklerin dış yüzeyi periosteum, iç yüzeyi endosteum denilen tabakalarla örtülüdür.²³

Periosteum, eklem yüzeylerinde tüm kemik yüzeylerini dıştan çevreleyen vasküler, konnektif bir bağ dokusudur. Kemiğin beslenmesinde, onarımında, gelişiminde rol oynarken aynı zamanda kemik için destek görevi görmektedir. Yapısında kemiğe sıkıca bağlanmasını sağlayan sharpey lifleri denilen kollajen uzantılar vardır. Periosteumun dışında kollajen lifler ve fibroblastlardan oluşan fibröz tabaka, bölünüp farklılaşarak osteoblastları oluşturabilme potansiyelinde olan yassı hücrelerden zengin tabaka, iç kısmında ise osteojenik tabaka (kambiyum tabaka) bulunur.^{24, 25} Dış tabaka metabolizmada rol oynayan damarları ve lenfatikleri içerirken iç tabaka gevşek bağ doku yapısında olup, yeni kemik oluşumunu sağlayan hücreleri içerir.

Endosteum tabakası, kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemini çevreleyen ince retiküler bir bağ dokusudur. Endosteum, periosteum tabakasına göre

daha incedir ve içerdiği tek tabaka halindeki osteojenik hücreler sayesinde kemik yapımına katılmasının yanı sıra hematopoetik hücre sentezi özelliği de vardır.^{22, 23}

Periosteum ve endosteumun temel görevi, kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları devamlı olarak sağlamaktır.^{24, 25}

2.1.4. Kemik Tipleri

Kemik mikroskopik yapısına göre primer (olgunlaşmamış) ve sekonder (lameller) olarak ikiye ayrılmaktadır.

2.1.4.1. Primer Kemik Dokusu

Primer kemik (immatür-woven), kırık ve diğer sebeplerle ilişkili onarım olaylarında ve embriyolojik gelişim sürecinde ortaya çıkan ilk kemik türüdür. Geçici olan bu kemik türü yetişkinlerde, diş alveolleri, tendonların kemiğe tutunduğu bölgeler ve kafadaki yassı kemik eklemleri gibi bir kaç yapı haricinde yerini sekonder kemiğe bırakır. Primer kemiğin farklı yönlere ve rastgele dağılmış ince kollajen liflerinin aksine sekonder kemik, organize ve lameller halinde olan liflere sahiptir. Yaklaşık 4 kat daha fazla osteosit barındırması, matriks mineralizasyonunun düzensizliği ve bunun sonucu olarak su ve hücre miktarının fazlalığı sebebiyle daha çabuk deformasyona uğraması primer kemik dokusunu, sekonder kemikten farklı kılmaktadır.²⁶

2.1.4.2. Sekonder Kemik Dokusu

Sadece erişkinlerde bulunan bu kemik dokusu, lamelli yapıdadır ve bu lamellerin barındırdığı kollajen fibriller 3-7 mikrometre kalınlığında olup birbirlerine paralel iken komşu lamellerdeki fibrillere çapraz olup bu fibrillerle spiraller yaparlar. Bu sayede dayanıklı bir yapı kazanmaktadır. Dağınık yerleşimli osteositlere sahip primer kemiğe göre daha güçlü ve daha kalsifiye olan sekonder kemikte, osteositler komşu lamellerin arasında konumlanmıştır ve sayıları daha azdır. Bu kemik dokusundaki osteositler

lakünalar içindedir. Lakünalar, besleyici damarların barındıran haversiyan kanallarının çevresindedir. Bu kanallar, volkmann kanalları sayesinde periosttaki ve kemik iliğindeki damarlarla anastomoz yaparlar. Sekonder kemik dokusu, kortikal (kompakt) ve kansellöz (süngerimsi-trabeküler) kemik olmak üzere iki kısımda incelenmektedir.¹³

2.1.4.2.1.Kortikal Kemik Dokusu

Kemiklerin tümünde, düzenli, güçlü bir dış yüzey oluşturan bu kemik tipi özellikle uzun kemiklerin dış yüzeyi, yassı kemiklerin ise iç ve dış yüzeyini oluşturmaktadır. Bu kemik içindeki kavite kemik iliği ve kansellöz kemiği barındırmaktadır. Havers sistemi denilen osteonlar bu kemiğin ana yapısını oluşturmaktadır. Osteonlar, havers kanalını çevreleyen silindir şekilli vasküler kemikten oluşmaktadır. Havers kanallarının beslenme görevini üstlenen damarları barındıran ve bu kanalları komşu osteonları birleştirerek birbirine bağlayan Volkmann kanalları kemiğin uzun eksenine oblik ya da dik olarak uzanmaktadır. Kortikal kemik genel olarak yapısal bütünlüğü sağlamaktadır ve barındırdığı osteonların sıkı dizilimi ile kemiğin mekanik gücü bağlantılıdır.^{27, 28}

2.1.4.2.2.Trabeküler Kemik Dokusu

Kısa ve uzun kemiklerde epifiz ve metafizin iç kısmında, yassı kemiklerinse iç yüzeyinde konumlanmış olan ince kemik trabeküllerinden oluşan dokudur. Osteoblastik ve hematolojik prekürsörlerden zengin olup, trabeküllerin arasını kemik iliği doldurmaktadır. Bu kemiğin beslenmesi, kemik iliğindeki damarlara yaptıkları stoplazmik uzantıları aracılığıyla olmaktadır. Kortikal kemiği destekleyerek, kemik iliği yapılarına bir çatı oluşturur.²³

2.2. Kemik Oluşumunun Histogenezi

Kemiğin büyüme ve gelişimi embriyonik dönemde başlayıp, genç erişkin döneme kadar devam eder. Kemik oluşumu embriyonik gelişim şekillerine göre,

osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan mineralizasyonu ile intramembranöz veya önceden var olan kıkırdak matriks üzerine kemik matriksinin çökmesi ile endokondral gerçekleşmektedir. Her iki kemikleşmede de ilk ortaya çıkan doku primer (olgunlaşmamış) kemiktir.^{22, 23}

2.2.1. İntramembranöz Kemikleşme

Bu kemikleşme, bağ dokunun yardımıyla matriksin doğrudan kalsifikasyonu ile gerçekleşir ve geçici kıkırdak bir çatı mevcut değildir. Kemik yapım sahasına, farklılaşmamış mezenkimal hücreler tabakalar şeklinde birikir ve mezenkim doku kan damarlarından zenginleşerek bu doku içinde kapillerin bolca bulunduğu bir ağ oluşur. Mezenkim hücreleri, organik matriksi sentezler ve bu matriks fibroblast, osteoprojenitör hücreler ve damarlardan oluşmaktadır. Bu osteoprojenitör hücreler, sonrasında mineralize olacak olan organik kemik matriksini biriktiren osteoblastlara dönüşür. Zamanla osteoblastlar, bu matriksin üzerini kaplar ve hızla yeni kemik matriksini biriktirirler. Ve bu biriken matriks içinde osteoblastlar osteositlere dönüşürler. Bu matriks mineralize olarak olgun kemiği oluşturur.¹⁷

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

2.2.2. Endrokondral Kemikleşme

İntramembranöz kemikleşmenin aksine bu kemikleşmede, hyalin yapıda kıkırdak bir çatı mevcudiyetine ihtiyaç vardır. Bu kemikleşme türünde, prekürsör hücreler kondrositlere diferansiye olarak kıkırdak matriks sentezlemeye başlar. Bu matriks

mineralize olur ve kondrositler hipertrofiye ve harabiyete uğrar. Sonrasında kıkırdığa invaze olan damarlar aracılığıyla gelen hücreler merkezi rezorbe ederek medullar boşluğu meydana getirirler. Osteoprogenitör hücreler, osteoblastlara diferansiye olarak osteoid matriksi oluştururlar. Bölgeye ulaşan osteoklastlar bu yapıyı rezorbe eder ve akabinde osteoblastlar tarafından onun yerine olgun lameller kemik oluşturulur.²⁹

Kısa ve çoğunlukla uzun kemiklerin oluşumunda belirgin rol oynayan bu kemikleşme türü, doğumdan sonra rijit fiksasyon yapılamayan kırık iyileşmesinde görev alır.^{22, 23}

2.3. Kemik İyileşmesi (Onarım)

Onarım; yaralanma sonrası organize hümmoral, vasküler ve hüccresel olayların sonucunda, yapı ve fonksiyonu geri kazandıran bir doku cevabıdır. Kemığın yapısı göz önüne alındığında, defekt sahasında ve kırık hattındaki iyileşme birçok patolojik, biyomekanik, hüccresel, hormonal ve biyokimyasal sürecin etkisi altındadır. Yaralanmanın tipine göre kemikteki iyileşme, rejenerasyon veya tamir olaylarını kapsamaktadır. Esas olarak kemik iyileşmesi bir bağ dokusu iyileşmesidir.

Yumuşak dokuların iyileşmesi sırasında meydana gelen olaylar; enflamasyon, fibroplazi ve remodeling fazları, aynı zamanda kemik defekt onarımında da gerçekleşmektedir. Onları ayıran tek fark hasar gören ossifiye yapının remodelasyon ve rekonstrüksiyonunda osteoblast ve osteoklastların görev almasıdır.^{30, 31}

Kemik onarımı, tüm bu onarım süreci boyunca spesifik zamanlarda aktive ve inaktive olan çok farklı genlerin ekspresyonu ile bir orkestra gibidir. Önemli gen ekspresyonları; BMP, TGF- β , PDGF, FGF, IGF, osteonektin, osteopontin, osteokalsin, fibronektin, BMP Reseptörü, Smadlar , IL-1 , IL-6, granülosit monosit koloni stimüle edici faktör, monosit stimüle edici faktör ve çeşitli kollajen izotiplerini kapsamaktadır.

Bu genlerin ekspresyonunun iyi düzenlenmesi kemik morfolojisi ve fonksiyonundan sorumlu hücresel işlemlerin devamını sağlar.

2.3.1. Kemik İyileşmesinin Evreleri

Primer ve sekonder olmak üzere kemiğin iki tip iyileşme şekli vardır;

2.3.1.1. Primer Kemik İyileşmesi

Nadir rastlanan bu tipteki onarım, küçük çaptaki kemik defektlerinin iyileşmesinde (pin defektleri gibi) ya da sıklıkla kraniyofasiyal kırık veya osteotomize kemik segmentlerinin rijit fiksasyonu ve kompresyon plakları ile sıkıca biraraya getirildiği durumlarda oluşur. Bu rijid kontakt sayesinde sekonder kemik onarımından farklı olarak kallus oluşmaz. Kırıkdaki süreç olmadığından ötürü membranöz kemik oluşumuna benzetilen direkt kemik depozisyonu bu onarım tipinde gerçekleşmektedir.

Periostun bu onarımdaki önemi, barındırdığı prekürsör hücreler kaynaklanmaktadır. Primer kemik onarımını, yara boyutu, kontaminasyon ve çevre doku kalitesi etkilemektedir. Yara bölgesindeki minimal hareketler kemikleşmeyi olumlu yönde etkilerken, rijit fiksasyonun fazlalığı olumsuz şekilde etkilemektedir. Redüksiyonun uygun olmaması da iyileşmeyi bozup fibröz iyileşme yönünde yönelime sebebiyet verir. Fibröz iyileşmedeki mevcut fibröz doku, kemik depozisyonundan hızlı büyüdüğü için kan akımını bozar ve kırık iyileşmesini azaltır.³²

Primer kemik onarımı gap iyileşmesi ve kontakt iyileşmesi olmak üzere ikiye ayrılır.

2.3.1.1.1. Gap İyileşmesi

Bu iyileşme şekli iki safhada gerçekleşir. İlk safhada mevcut gap boşluğu direk kemikle dolar. Başlangıç yapıdaki ağsı kemik döşenir ve bunu takiben destekleyici olarak paralel fiber ve/veya lameller kemik yapımı gerçekleşir.^{33, 34} Bu iyileşme dokusunda konnektif doku ve fibrokartilaj yapı yoktur. Birkaç hafta sonraki ikinci

safhada, dikey haversiyen remodelingi ile kemik rekonstrükte olur ve bölgede daimi osteotonlar oluşur.³⁴

2.3.1.1.2. Kontakt İyileşmesi

Yumuşak doku ve kemik iliğinde, orta yoğunlukta inflamatuvar cevapla başlar. Hafif bir hemotam mevcuttur. Mevcut rijid kontakta, yaşayan ve ölü iskelet parçaları arasında aktif osteoklast formasyonu ile kemik iyileşmesi başlar. Bu formasyonla, kemik matriksi boş haversiyen kanalları boyunca koniler meydana getiricek şekilde rezorbe olur. Kırık bölgesine yeni oluşan osteotonlar yerleşir. İmmatür kemik örgüsü şeklindeki yeni kemikteki remodeling aylarca devam eder. Lameller kemik gap iyileşmesinden farklı olarak, kırık hattından direkt karşıya geçer ve kemiğin uzun aksı boyunca osteonlar ilerler. Bu işleme kontakt iyileşme denir.³² Bu tür iyileşmede transvers kemik oluşumu gerçekleşmez.³²

2.3.1.2. Sekonder Kemik İyileşmesi

Kallus oluşumunu içeren bu iyileşme endrokondral kemikleşmeye benzer onarım sergilemektedir. Genellikle fiksasyon uygulanmamış tübüler uzun kemiklerde meydana gelmektedir ve en sık görülen kemik onarım şeklidir. Sekonder kemik iyileşmesi 3 önemli aşamadan oluşur. Bunlar enflamatuvar, proliferatif ve maturasyon safhalarıdır.

Histolojik olarak onarım süresindeki safhalar birbirinden zaman açısından kesin sınırlarla ayrılamaz. Her safha daima kendinden bir önceki veya bir sonraki safha içinde yer alır. En uzun süren dönem, remodelizasyon dönemidir.

2.3.1.2.1. İnflamatuvar (Hematom, Yangı) Dönem

Onarım dönemlerinde ilk ortaya çıkan cevap “inflamasyon” yani “yangı”dır ve bu yanıt 48 saatte pik yapar. Bu dönem ilk 3–4 günlük zamanı kapsar ve onarımın başlangıcından 1 hafta sonrasına doğru hemen hemen tamamen yok olur. Bu safha, debrisin uzaklaştırılıp, vaskülarizasyon oluşturularak iskeletsel bir matriks inşa edildiği

hücreler olaylardan oluşmaktadır. Platelet agregasyonu gerçekleştiren enflamatuar elemanların (prostaglandin, adenosin difosfat, tromboksan A2, serotonin gibi) ortama salınmasıyla vazodilatasyon ve hiperemi ve bunu takiben hematoma oluşur. Bu trombosit degranülasyonu büyüme faktörlerini salıverir ve kemotaktik sinyalleri tetikler. Polimorfonükleer lökosit, lenfositler, kan monositleri ve doku makrofajları yara bölgesine yönelirler ve anjiyogenezi uyarmak için sitokinlerin salınımı için aktive olurlar.

Erken dönemde onarım bölgesi karakteristik olarak hipoksik ve asidik bir ortamdır, bu polimorfonükleer lökosit'lerin ve doku makrofajlarının aktivitesi için de idealdir. Hematom varlığı daha fazla kanamayı engellemek için hemostatik bir pıhtı ve aynı zamanda hücreler göç için yolak oluşumuna fibrin bir ağ ortamı sağlarlar.

Yapılan çalışmalarda hematoma formasyonunun yokluğunun iyileşmeyi yavaşlattığı ve bozduğu savunulmaktadır. Hemotamın ortama boşaldığı durumların varlığında yara iyileşmesi gecikir veya hiç olmaz. Özellikle son zamanlardaki çalışmalar hematoma temel olaylardaki hücreler cevapı başlatan sinyal moleküllerinin kaynağı olduğunu ve osteojenik uyarının büyük bir kısmını oluşturduğunu desteklemektedir. Ortamdaki hasarlı yapıların ve debrisin imhasından sorumlu olan ve fagositoz yapan nötrofiller, akut iyileşmenin bu hücreler enflamatuar cevapında öncül hücrelerdir. Yaralanmanın 3. ve 4. gününde nötrofiller pik yapsada bu süreç boyunca varlığını koruyan hücre olan makrofajlar 5. günde pik yapar. Makrofajlar, atık uzaklaştırmanın yanında mezenkimal hücrelerin diferansiyasyonu ve göçünü sağlayan sitokin ve büyüme faktörlerinin ortama salınımını sağlarlar.^{32, 35, 36}

2.3.1.2.2. Onarım (Reperasyon Dönemi)

Neovaskülarizasyon denen komşu kemikten bölgeye olan mikrovasküler büyüme bu safhada gerçekleşmektedir. Daha sonrasında remodele olacak olan immatür bir

matriks, hücresel farklılaşma, çoğalma ve aktivasyon mekanizmaları ile oluşturulur. Progenitör hücreler, fibroblastlar ve osteoblastlar çoğalarak dokuda kollajen oluşturmaya başlarlar. Böylece oluşan granülasyon dokusu kollajenden ve kapiller yapılardan zengin yapıya sahip olur. Bu süreçte anjiyogenezisi stimüle eden faktörler temel FGF ve PDGF'dir. Mezenkimal hücreler kondroblastlara, fibroblast ve osteoblastlara diferansiye olarak glikoprotein, glikozaminoglikan, glikolipid ve kollajenden oluşan bir ekstraselüler matriks oluştururlar. Baştaki yapı yerini fibrokartilaj kallusa bırakır. Böylece ilk oluşan kemiğe “örgü kemik” denir ve bu yapı iyileşmenin 4-6. haftasına kadar baskın haldedir.³⁶

2.3.1.2.3. Remodeling Dönemi

En uzun süren bu dönemde, oluşan immattür bağ dokusunu takiben osteogenez devam eder. Farklılaşan osteoblastlar matriks mineralizasyonuna katkı sağlar. Örgü kemik osteoklastik mekanizmayla yok edilmeye başlayıp, yerini lamellar kemik ve kemik iliğine bırakır. Bu sayede primer osteonlar ortadan kalkarak sekonder osteonlar oluşur. Primer kemik birkaç hafta gibi kısa bir zamanda oluşurken, lameller kemiğin primer kemiğin yerini alması ise aylar sürmektedir.³⁵

2.3.2. Deneysel Hayvan Modelleri

Günümüzde maksillofasial cerrahi, ortopedi ve travmatolojide kullanılan tedavi yöntemlerinin bir kısmı, ampirik bulguların birikmesi ile oluşan tecrübelerden ibarettir. Çözüm bekleyen medikal problemleri araştırmak amacıyla yapılan klinik çalışmaların genel sorunları (etik unsurlar, uygun ve homojen kontrol grubu oluşturulamaması gibi) sebebiyle araştırmacıları, araştırma çalışmaları için uygun model arayışlarında deneysel hayvan modellerine yönlendirmiştir.

2.3.2.1. Kemik Modelleri

Kullanılan Denekler: Fare, sıçan, tavşan, köpek, koyun (tibia, femur, radius, kalvaryum ve mandibula kemikleri)

2.3.2.1.1. Kırık İyileşmesi Modelleri

Literatüre göz atıldığında birçok hayvanın (memeli ve kuş türünün) kırık iyileşmesini ve çeşitli tedavi modalitelerinin (farmakolojik-biyolojik-fiziksel-cerrahi) kırık iyileşmesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla deneysel çalışmalarda kullanıldığı gözlemlenmektedir. Sıklıkla kullanılan denekler rat, köpek ve tavşandır. Sprague-Dawley tipi ratların femurları insan femurlarıyla morfolojik açıdan benzerlik göstermemektedir. Wistar tipi ratların femurları ise bunun aksine insan femuruyla yakın morfoloji göstermektedir. Bu sebeple bu tür çalışmalarda wistar tipi ratlar tercih edilmelidir. Açık (cerrahi) model, kapalı (künt travma) model olmak üzere iki başlık altında incelenmektedir.³⁷

2.3.2.1.2. Kafatası Defekt Modelleri

Çeşitli, genellikle çift ve simetrik olan kemiklerden oluşan kalvarya, diğer kemiklere kıyasla daha inert yapıdadır.^{38, 39} Deney hayvanlarındaki kalvaryal defektlerin rejenerasyon kapasitesi insanlarınkinden çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir.⁴⁰ Morfolojik ve embriyolojik olarak bir membran prosesünden gelişen kalvarya, membranöz yolla gelişen yüz kemikleriyle benzerlik göstermektedir. Kalvaryal kemik, anatomik olarak iki kortikal tabaka içermesinden ötürü mandibulayla benzerlik göstermektedir.⁴¹ Fizyolojik olarak ise kalvaryal kortikal kemik atrofik bir mandibulayla benzerlik gösterir. Bu nedenle, maksillofasiyal cerrahi uygulamaların deneysel basamağı için en önemli bölgelerden biri olarak görülmektedir.³⁹ Deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model tavşan ve sıçan kafatası defekti modelidir. Kafatası defekti modelinin kemiklerdeki boşlukların nasıl dolduğunu göstermesi, kolay yapılması, tespit gerektirmemesi gibi avantajları vardır. Gerek kafatası gerek uzun kemik defektleri çalışmalarında en önemli kriter defektin boyutudur. Hayvanlarda

kemik defektleri altı ay gibi bir sürede tedavi verilmeksizin kendiliğinden iyileşebilir. Kendiliğinden iyileşemeyen kritik boyutlu defekt yapmak modelin temel noktasıdır.⁴²

2.3.2.2. Diğer Modeller

Eklem, tendon, sinir ve infeksiyon modellerini kapsamaktadır.

2.3.3. Kritik Boyutlu Kemik Defektleri

Son yıllarda kemik kırıklarının veya defektlerinin iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu ve düşünülen kemik greftleri, kemik benzeri ürünler, hastadan elde edilen büyüme faktörü içeren kan ürünleri veya rekombinant büyüme faktörleri gibi pek çok materyal kullanılmaktadır. Her yeni maddenin etkinliğini diğeriyle karşılaştırabilmek için standart bir hayvan modeline ihtiyaç vardır. Literatürde bu amaçla, “kritik boyutta kemik defekti” olarak adlandırılan, dairesel, tam kat ve hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden kapanma şansı olmayan en küçük boyutta kemik defektleri tanımlanmıştır ve osteojenik materyalleri değerlendirilirken rutin olarak kullanılmaktadır.^{1, 43, 44} Graft veya implantın osteojenik potansiyelini değerlendirilmesi için bu hacimdeki bir defekt gereklidir.⁴⁵ Bu defektlerde iyileşme kemikleşmeden ziyade bağ dokusu dolumu ile gerçekleşmektedir.⁴⁶ Kemik defektlerinde iyileşme, defektin büyüklüğüne ve kullanılan deney hayvanının türüne göre farklılık göstermektedir. Mandibulada yapılan çalışmalarda ratlarda kritik boyutta kemik defektinin 5 mm olduğu bulunmuştur.^{47, 48 30}

30 18, 49

2.4. Oral ve Maksillofasial Cerrahide Kullanılan Kemik Graftleri

Oral ve maksillofasial cerrahinin en temel gayelerinden biri kemik rejenerasyonudur. Küçük defektler kendiliğinden iyileşirken, kritik boyutlu defektlerin iyileşmesi kendiliğinden olmadığından iyileşmeyi tetikleyici alternatif yöntemler kullanılır. En ideal yöntem, defektin; büyüklüğüne, şekline ve antijenik özelliklerine en uygun kemik dokusuyla doldurulmasıdır.^{50,}

Greft, kemik yapımını tetikleyen tüm metaryalleri kapsayan bir terimdir. Sert ve yumuşak doku ya da kombine defektlerin onarımındaki esas görevi, defektin olabildiğince hızlı, anatomik yapıya uygun ve yeni oluşan dokuya rehberlik edecek şekilde kapatılmasını sağlamaktır. İdeal greft metaryeli, osteokondüktif, osteoindüktif, osteogenetik özellikleri barındırmalı, enfeksiyon riskine kapalı olmalı, doku uyumlu olup yabancı cisim ve fibrotik cevaplara sebebiyet vermemelidir. Ek olarak ucuz ve eldesi kolay olmalıdır.⁵² Alıcı bölgenin durumu ve greftin tipine göre, greft maddesi osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon adı verilen üç farklı mekanizma ile kemik iyileşmesine katkıda bulunur.⁵³

2.4.1. Kemik Greftlerinin Özellikleri

Osteogenez, osteoblastların direk etkisiyle yeni kemik oluşturulmasıdır. Osteogenezis bölgedeki kemikte bulunan yada greftten kaynaklanan osteoprogenitör hücrelerin kemik oluşumunu sağlamasıdır. Osteogenezin meydana gelmesi için defektin içine konulan greft materyaline, canlı veya öncül osteoblastlar çekilerek kemik oluşum merkezleri meydana getirilmiş olur. Canlı kansellöz kemik, kemik iliği ve otogreftler barındırdıkları hücreler yapılar ile nakledildikleri bölgede doğrudan yeni kemik oluşumunu başlatırlar. Osteogenetik greftler çok etkili olup sonuçlar tatmin edicidir. Bununla birlikte, osteokondüktif ve osteoindüktif olma avantajlarında bulunmaktadır. Osteojenik özellikte olan en iyi greft maddesi otojen kemik greftir ve altın standart olarak kabul edilmektedir.⁵⁴

Osteoindüksiyon; diferansiye olmamış pluripotent kök hücrelerin kemik yapıcı hücrelere farklılaşmasının stimülasyonu sürecini içermektedir. Osteoindüksiyon, greft materyalindeki kemik indükleyici proteinlerin ya da kemik morfojenik proteinlerin etkisiyle mezenkimal hücrelerin osteoprogenitör hücrelere dönüşümünü sağlar. En çok bilinen örneği TGF- β üst ailesine ait glikoprotein olan kemik morfojenik proteinlerlerdir.⁵⁴ En etkili olanları BMP-2,6,7 ve 9'dur. Bu proteinlerin varlığında kemik formasyonunun endokondral

ossifikasyon yoluyla oluştuğu kabul görmektedir.⁵⁵ Buna  rnek olarak demineralize kemik grefti verilebilir.⁵⁶

Osteokondüksiyon, alıcı kemik bölgesindeki vasküler ve perivasküler yapıların ve osteoprojenitör hücrelerin grefte doğru yönlenmesi için greft maddesinin scaffold ( atı) görevi g r erek greft yüzeyinde yeni kemik oluşumunun desteklenmesidir. Bu materyaller biyouyumludur ve herhangi bir toksik reaksiyon gerçekleşmeksizin kemik yada yumuşak dokuda apozisyon sağlar. Greft sadece osteokondüktif özellikteyse kemik formasyonunu başlatamaz ve oluşturamaz.⁵⁴

Bu greft materyallerinin endike olduğu durumlar şunlardır;

- ✓ Cerrahi işlemler sonrası oluşan defektler (kist, gömülü diş, tümör rezeksiyonları sonrası),
- ✓ Travmatik defektler (maksillofasial kırıkla, travmatik diş çekimi, sinüs açıklık oluşması)
- ✓ Preprotetik ameliyatlar, kret augmentasyonu ve sinüs tabanı yükseltilmesi ameliyatları
- ✓ Estetik operasyonlar
- ✓ Dental implantları çevreleyen kemikteki defektler
- ✓ Ortognatik cerrahi operasyonlarda oluşan defektler
- ✓ Trafik kazaları, onkolojik operasyonlar gibi aşırı derecede doku kayıplarının oluştuğu vakalar
- ✓ Enfeksiyonel osteomyelitler
- ✓ Neoplazmlar, yumuşak doku tümörlerinin rezeksiyonu
- ✓ Mikrognati, retrognati, dudak-damak yarıkları gibibir çok konjenital maksillofasiyal defektler
- ✓ Temporamandibular eklem artroplastisi

✓ Periodontal ve endodontik defektler⁴³

2.4.2. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması

Kemik greft materyalleri, elde edildikleri dokulara veya üretildikleri maddelere göre; otojen greftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik materyaller olarak 4 ana gruba ayrılır.

2.4.2.1. Otojen Greftler

Bu greft türü, kişinin kendisinden alınan, aynı zamanda altın standart olarak kabul edilen bir materyaldir ve enfeksiyon riskleri yoktur. Alınan greft, bulunduğu sahadan uzak bir sahada (heterotopik) yada aynı bölgede (ortotopik) kullanılabilir. Otogreftler sıklıkla iliak kemikten, tibiadan, kostalardan ve kalvaryumdan, simfizden, ramustan, tüberden, ekzostozlardan, iyileşme durumundaki çekim soketinden ve interseptal alveol kemiğinden elde edilir.⁵⁷

Otogreftlerin avantajları, kemik iliğindeki osteoprogenitör hücreler ve canlı osteoblastlar ile direkt osteogenez, kollajen matriks ile osteokondüksiyon, BMP'ler ile osteoindüksiyon yapabilmeleridir.⁵⁸ Ayrıca bu greftler kısa zamanda mükemmel vaskülarizasyon gösterir, kişiye ait olmasından dolayı çapraz enfeksiyon ve immün reaksiyon riski bulunmamaktadır.

Avantajlarına rağmen, greft miktarının sınırlı olması, ikinci bir operasyon sahası oluşturulması ve operasyon süresinin uzaması, morbidite ve enfeksiyon riskinin bulunması gibi dezavantajlara sahiptir.^{50, 51}

2.4.2.2. Allogreftler

Allogreft materyali, aynı tür fakat farklı genotipteki bireylerden elde edilen osseöz, transplante dokulardır. Kadavralardan elde edilen allogreftler, işlenerek çeşitli şekil ve boyutlarda hazırlanır ve ileride kullanılmak üzere uygun koşullarda kemik bankalarında saklanır.^{59, 60} Hazırlanma şekillerine göre, dondurulmuş kemik (deep-

freezing), dondurulmuş kurutulmuş kemik (freeze-drying), demineralize kemik, deproteinize kemik, taze dondurulmuş ve solventlerle dehidrate edilmiş kemik olarak sınıflandırılabilir.^{53, 61}

Donör saha cerrahisi ve morbiditesinin olmayışı, geniş kemik defektindeki başarı oranının %60-90 arasında olması, intraoperatif kan kaybının ve postoperatif ağrının olmaması bu tür greftlerin avantajlarından.⁶²⁻⁶⁴ Buna karşılık, bakteriyel enfeksiyon, viral hastalıkların taşınması (hepatitler, insan immün yetmezlik virüsü), değişen kemik kalitesi, pahalı olması, yabancı cisim reaksiyon riski ve postoperatif süreçte allogreftte kırılma, kaynama olmaması ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar ise dezavantajlarındandır.⁶³

2.4.2.3. Ksenogreftler

Alıcı ve vericinin farklı türlerden olduğu bu tür greftler, çoğunlukla memeli hayvanlardan (at, sığır, domuz gibi) ya da mercanlardan elde edilir. En çok tercih edilen türü ise sığır kaynaklı greftlerdir.⁶⁵ 1960’larda popüler olan bu greftlerin kullanımı oluşan otoimmün hastalıklar sebebiyle azalmıştır. Daha sonrasında deproteinize yöntemlerin kullanımıyla antijenik özelliklerinin azalmasıyla tekrar kullanıma girmiştir. Bu yöntemlerde kemiğin organik kısmının bütünüyle uzaklaştırılması amaçlanmıştır ve bu sebeple bu kısım osteoindüktif yapısını kaybederek yalnızca osteokondüktif özellik göstermektedir. Sığır kemiğinin organik komponentlerinden ayrılmasıyla beraber kalsiyum matriks sterilize edilerek greft kullanıma hazır hale getirilir ve kullanıcıda herhangi bir immün yanıtı sebebiyet vermeyecek şekilde hazırlanır.⁶⁶

Yapılan deneysel incelemelerde bu greft türünün ideal bir yapı iskeleti olduğu gösterilmiştir. Alıcı sahadaki osteojenik hücrelerin rehberliğinde kemikte büyüme başlangıcı olmaktadır ve greft partiküllerini bir araya getiren örgü kemikten meydana gelen köprüler oluşmaktadır. Bu köprülerden ve ksenogreftten oluşan bu yapıya total

mineralize doku denir ve yer değiştirme periyotları ile lameller kemiğe dönüşür.^{67, 68} Ksenogreftlerin hızlı bir biçimde konakçı kemikle yer değiştirdiğini gösteren raporlara karşın çok yavaş bir şekilde rezorbe olduğu veya hiç rezorbe olmadan uzun süre varlığını sürdürebileceğini savunan çalışmalar daha baskındır.⁶⁹⁻⁷¹

Ksenogreftlerin blok formları, plastik ve rekonstrüktif cerrahi ile maksillofasiyal cerrahide onlay greftleme için kullanılırken, granül formları periodontal kemik defektlerinde, çekim soketlerinde ve küçük kist cerrahilerinde başarılı bir şekilde hem fonksiyonel hem de estetik kayıplarda kullanılmaktadır. Daha güçlü materyallerle kombine olarak da kullanılabilirler.^{57, 72}

2.4.2.4. Alloplastik Materyaller

Canlı dokulardan elde edilmeyen, sentetik olarak üretilen maddelerdir. Biyouyumlu yapıdaki bu materyaller belli miktarda osteokondüktif özelliğe sahiptirler.⁶⁵ Alloplastik materyaller, seramikler (sentetik hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat, biyoaktif cam), kalsiyum karbonat, kompozit polimerler (rezorbe olan ve olmayan), kalsiyum sülfat şeklinde 4 ana gruba ayrılır. Eldesi kolay olmasına rağmen immün reaksiyon ile antijeniteye sebep olma ve ek bir maliyete neden olmaları gibi dezavantajları vardır.⁷³

2.4.3. Greft Materyalinin Alıcı Kemik ile Birleşme Mekanizması ve Rejenerasyonu

Kemik grefti ile bağımsız bir vasküler kaynağın mevcudiyeti, revaskülarizasyonun hızını ve kalitesini optimize ederek, greftin uygun bir şekilde iyileşmesi ve daha hızlı bir şekilde birleşmesi ve kaynaşması ile sonuçlanabilir.⁷⁴ Nonvaskülerize yapıdaki greftteki vaskülarizasyon, alıcı kemikteki kan damarlarının greftin içine doğru ilerlemesiyle sağlanmaktadır. Bu süreç düşük hızda

gerçekleşmektedir ve bu nedenle nonvaskülerize greft, vaskülerize grefte oranla daha uzun bir iyileşme süresine sahiptir.

Yüksek bir rejenerasyon yeteneği olan kemik dokudaki defektlerde bazı durumlarda yeterli bir iyileşme görülmemektedir. Greftleme, osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon olmak üzere farklı biyolojik süreçlerden oluşmaktadır. Greft maddelerinin farklılığına göre bu evrelerin biri, ikisi ya da üçü birden gerçekleşmektedir.⁷⁵

Uygulanan greft maddesiyle kemik dokusunun kaynaşması, kırık iyileşmesine benzer özelliktedir. Birçok faktörün etkisinde olan kırık iyileşmesi, kemiğin eski fiziksel ve mekanik özelliklerini geri kazandıran, yangı, onarım ve remodelling safhalarını içeren bir süreçtir.⁷⁶

Hem kırıklarda hem de kemik greftinin transplantasyonunda, sırasıyla bölgesel damarlarda yarananma, kanama ve hematoma oluşumu ile gerçekleşir. Kanama sonucu pıhtılaşma aktiflenir ve fibrin-pıhtı aşaması başlar. Bunu takip eden 1 hafta içerisinde, enflamatuar yanıt oluşur ve makrofajlar, monositler, lenfositler ve çok çekirdekli hücreler ile fibroblastlar gibi inflammatuar hücreler prostoglandin salgılayarak kemiğe invaze olurlar. Böylelikle granülasyon dokusu formasyona uğrar, vasküler yapılar gelişir ve mezenşimal hücre göçü oluşur. Ana besin ve oksijen desteğinin kaynağı kansallöz kemik ve kas dokusudur. Onarım safhasında, fibroblastlar oluşturdukları stroma ile vasküler gelişime destek sağlarlar, periost ve endosteumdan hematoma içine kapiller ve mezenşimal hücreler girerek granülasyon dokusunu oluşturulmaya başlanır. Vasküler gelişim aşama kaydederken, kollajen matriks ile beraber osteoid doku da salgılanır ve mineralize olarak onarım yerinin çevresinde kollajen ve glikoproteinler içeren matriks içinde fibroblast, osteoblast, kondroblastlar ve gelişen kapiller damarlardan oluşan yumuşak kallus formasyonunun oluşumu sağlanır. İlk 4-6 haftada kuvvetsiz olan bu kallus, ossifiye olarak alıcı doku-greft arasında woven kemiğinden bir köprü oluşturur.⁷⁷

İyileşme başlangıcından 4-6 hafta sonra sert kallus oluşumu dolayısıyla rejenerasyon başlar. Yeniden şekillenme safhasında iyileşme tamamlanır. Rejenerasyonda, kallusun woven kemiğe dönüşümü aşama aşama olmaktadır ve böylelikle düzensiz kemik yapımı başlar. İlerleyen süreçlerle hücre sayısı artar ve revaskülarizasyon gelişir. Bu düzensiz olan kemiğin eksternal kallusu osteoklastlarca uzaklaştırılarak düzenli kemiğe geçiş başlar. İntermedial kallus ise, havers yapısını içeren lameller kemiğe dönüşür ve kansellöz kemik oluşur. Remodeling sürecinde vaskülarizasyon ve oksijenlenme normalleşir ve bu dönem yavaş bir hızda ilerleyerek aylar (3-6 ay) hatta yıllar sürebilir. Bu süreçteki kemik orijinal yapı ve mekanik dayanıklılığını geri kazanır.⁷⁷

Greft uygulamasından sonraki ilk 2 haftada, kortikal ve kansellöz greftlere karşı oluşan cevaplarda temel olarak vaskülarizasyon olmak üzere çok küçük farklılıklar oluşmaktadır. Kansellöz kemik tamamen ya da kısmen olacak şekilde transplantasyondan saatler sonra genellikle alıcı doku-greft arasındaki anastomozlar sayesinde ve ek olarak bu kemikteki kemik iliği boşlukları ile revaskülarize bir hal alır. Kansellöz kemikteki vaskülarizasyon iki hafta içinde tamamlanmasına rağmen kortikal kemikteki bu süreç daha yavaş seyretmektedir. Osteoklastlar, yeni vasküler kaynağın oluşumunu iki hafta içinde sağlarken oluşturduğu kanallarlarda kortikal greft delikli hale gelir ve bu süreç altı hafta içinde tamamlanır.⁷⁸

2.4.4. Greft Materyalinin Mekanik Stabilitesi

Mekanik stabilite, kemik rejenerasyonu ve onarımı için en önemli faktördür. Birçok çalışmada, kemik dokusunun mekanik duyarlılığının ve biyomateryaller ile kemik arasındaki etkileşimin önemi vurgulanmıştır.⁷⁹ Klinik durumlarına bağlı olarak, greftler sıkışma ve gerilme kuvvetlerine maruz kalır. Alıcı kemikle greftin kaynaşması, greftin alıcı kemiğe fiksasyonu ve stabilizasyonundan önemli oranda etkilenmektedir. Fiksasyon ve stabilizasyonun iyi olması, greft-alıcı ilişkisinin maksimum düzeyde

olmasını ve greft içerisine damarlanmanın sağlanması açısından oldukça önemlidir. Greftin alıcı bölge içindeki stabilitesini sağlamak için, greftin kendi içindeki sabitliği kullanılarak alıcı ve greft ara yüzünde artmış bir sıkıştırma kuvveti ile stabilize edilmesi gerekir.⁶ Kemik onarımındaki iskeleninin mekanik stabilitesi, kullanılan materyalin türü, makro veya mikro mimarisi, porozite tipi ile doğrudan ilişkilidir. Kemik greftlenmesi, mekanik stabilite için yapısal açıdan büyük öneme sahiptir ve greft kullanımı kemik onarımındaki yanıtta, kemik sitümlasyonunu ve güçlendirilmesini içerecek şekilde geliştirilmiştir.⁶

Bir kemik greftinin yetersiz stabilitesi, rekonstrüksiyonun çökmesine, psödotrozise, deformitenin rekürrensine yol açabilir.⁷ Greft stabilizasyonunu ve bu stabilizasyonu etkileyen muhtemel faktörler ile ilgili az sayıda yayın vardır. Bu faktörlerin bazıları hastayla ilişkilidir, örneğin kemik densitesi, vücut ağırlığı, yaş gibi faktörlerdir. Diğer faktörler ise cerrahi strateji ile kullanılan maddeye bağlıdır ve ayrıca değişkendir: yapısal bir kemik greftinin kemik kompozisyonu (süngerimsi, unikortikal, bikortikal) ve kullanılan materyalin türü, makro veya mikro mimarisi, porozite tipi biyomekanik stabiliteyi etkiler. Bununla birlikte, bireysel klinik durumlar için istenen minimum transplant stabilite değerleri kesin bilinmemektedir.⁸⁰

2.5. Kemik Oluşum ve Yıkım Göstergeleri

İyileşme süreci esnasında ortamdaki osteoblast ve osteoklastlar kemik oluşumu için yeterli yoğunlukta değildir. İyileşme bölgesinde, dolaşımdan sağlanan ya da lokal üretilen, kemik iyileşmesini regüle eden kenetleyici faktörler bulunmaktadır. İyileşme esnasında, büyüme faktörleri, sitokinler, reseptörler ve ara sinyal molekülleri gibi kenetleyici faktörler aracılığıyla hücreler arası etkileşimler oluşmaktadır.⁸¹ Bu düzenleyici faktörlerden bazıları aşağıdaki gibi sıralanabilir;

2.5.1. TGF- β

Genel Özellikleri

Genellikle ektoderm kökenli olan ve diğer büyüme faktörlerinden daha önce tanımlanan TGF- β , lökositlerin büyümesini geçici olarak inhibe ederken, fibroblast gibi mezoderm kökenli hücreler için zayıf da olsa mitojeniktir.⁸² İyileşme başlangıcında inaktif olan TGF- β , düşük pH ya da plazminin etkisiyle proteolize uğrayıp aktifleşerek makrofajlar için en etkili kemoatraktan madde halini alır. En önemli görevleri ise inflamatuvar hücre kemotaksisini uyarmak ve ekstraselüler matriks sentezini artırmaktır.⁸³

TGF- β ; iyileşme bölgesindeki trombositler, inflamatuvar hücreler (monositler, makrofajlar), osteoblastlar, osteoklastlar ve kondrositler tarafından üretilir.⁸⁴ Erken yanıt esnasında (ilk 24 saat), hematoma içerisinde ekstraselüler olarak bulunur. Enflamatuvar fazda, TGF- β 'nin mRNA'sı çoğalmakta olan mezenkimal ve endotel hücrelerinde zayıf şekilde eksprese olurken, intramembranöz kemikleşme sırasında çoğalan osteoblastlarda ve kondrogenез ve endokondral kemikleşme fazlarında çoğalan kondrositlerde kuvvetli bir şekilde eksprese olur.⁸⁵

Yapı ve Fonksiyonel Özellikleri

TGF- β sekresyonu, hücrenin durumuna ve tipine göre steroidler, retinoitler, lenfosit aktivatörleri, vitamin D3 ve IL-1 gibi farklı uyarıcılarla uyarılabilir. İnhibisyonu ise FGF, deksametazon, kalsiyum ve folikül stimule edici hormon aracılığıyla olmaktadır. Ek olarak TGF- β kendi gen yapısını da etkileyebilmektedir. TGF- β ; inaktif formda depo edilmesini sağlayan beta glikan ve dekorin kompleksi gibi ekstraselüler matriks ile birleşik haldedir.⁸³

Protein Özellikleri

TGF- β ; TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 ve TGF- β 5 olarak bilinen en az beş izoform şeklinde bulunur. Genel form olan TGF- β 1 hücre ve dokuların hemen hemen

hepsinde yaygın olarak bulunurken, diğer izoformlar daha sınırlı düzeyde bulunmaktadır. TGF- β 2 ve PDGF' nin ayrıntılı topolojilerinde benzerlik vardır.

Disulfid bağı homodimerler, bütün izoformların biyolojik olarak aktif formlarıdır ve heterodimer formunda mevcuttur. Monomerik alt birimler 112 aminoasit uzunluğundadır. TGF- β izoformları uzun öncülerinin proteolitik bölünmesiyle ortaya çıkar.

TGF- β 1: 390 aminoasit

TGF- β 2: 412 aminoasit

TGF- β 3: 412 aminoasit

TGF- β 4: 304 aminoasit

TGF- β 5: 382 aminoasit⁸³

TGF- β ' nin etki mekanizması

TGF- β , hücrelerin gelişmesini, çoğalmasını ve birçok farklı hücre tipinin gelişiminin bloke edilmesini regüle eder. TGF- β reseptörü Tip I ve Tip II alt birimlerinden oluşur. Bunlar SMAD protein ailesini uyaran, serin tirozin kinazlardır. TGF- β 'nin hücre yüzeyindeki Tip II reseptörüne bağlanması Tip I reseptörünün fosforlanmasına neden olur. Böylece Tip I reseptörü Smad 2 ve 3 proteinini fosforlayacak ve aktive edecek duruma gelir. Aktive olan Smad 2 ve Smad 3, Smad 4 ile heterodimerler oluşturur ve nükleusa giderler. Smad kompleksi, ko-aktivatorler, ko-represorler ve diğer transkripsiyon faktörleriyle birlikte gen ekspresyonunu regüle ederler.⁸⁶

TGF- β 'nin Tip II reseptörü birçok insanda gastrointestinal kanser ile mikrosatellit değişkenlikteki mutasyonda ve Smad 4 pankreatik karsinomların yaklaşık yarısında inaktiftir. Diğer birçok somatik ve kalıtsal hastalık TGF- β yolundaki mutasyon veya bozuklukların sonucudur.⁸⁶

TGF- β 'nin Görevleri

Proapoptotik etkisi; Bazı hücre tiplerinde TGF- β , henüz tam çözülememiş bir mekanizma ile apoptozu indüklemektedir.⁸⁷ TGF- β - Smad yolun etkisi ile apoptozu indükleyen ve proliferasyonu baskılayan bir transkripsiyon faktörü olan TGF- β 'tarafından indüklenebilen erken gen-1 genini indüklenir.^{87, 88}

Antiinflamatuvar etkisi; En güçlü immün-supresif moleküllerden biri olduğu bilinen TGF- β , immün sistemin efektör T ve sitostatik T hücrelerini baskılayarak, düzenleyici T-reg hücrelerini ise aktifleyerek immün ve inflamatuvar cevabı baskılamaktadır.⁸⁹

Yara iyileşmesinde TGF- β 'nın rolü

TGF- β 'nin yara iyileşmesindeki önemli görevlerinden bazıları hücre bölünmesi (proliferasyon), farklılaşması (diferansiasyon), adezyon, morfogenez, ekstrasellüler matriks oluşumu ve programlanmış hücre ölümü (apoptozis) gibi hücresel süreçlerde rol almaktır. TGF- β 1 hem osteoblast hem de osteoklast diferansiasyonunu kontrol eder ve bu nedenle kemik oluşumunu ve rezorpsiyonunu dengeler. TGF- β 1 kemik formasyonunu, osteoblast proliferasyonu, diferansiasyonu, kemotaksi ve ekstrasellüler matriks ve prekürsör kondrosit hücrelerinin proteoglikan sentezi yoluyla düzenler. TGF- β 1 osteoblast proliferasyonunu artırır, osteoblastların apoptozunu engeller ve ayrıca kemotaktik çekim yoluyla bölgeye osteoblastik prekürsörlerini veya matris üreten osteoblastları toplar. Ek olarak, TGF- β 1 osteoblast diferansiasyonunun erken evrelerinde (mezenşimal kök hücrelerinin progenitör osteoblast hücrelerine diferansiasyonu) osteoblastlar tarafından hücre dışı kemik matriks proteini üretimini artırır. Öte yandan TGF- β 1 osteoblast proliferasyonu ve mineralizasyonunun son evresini inhibe eder. Sonraki aşamalar TGF- β süper familyasının üyeleri olan BMP'ler tarafından pozitif olarak düzenlenir. Bu nedenle, TGF- β 1 osteoblastların diferansiasyonunu düzenlemek için BMP ile işbirliği yapar. TGF- β 1, olgun osteoblastlarda osteosit gelişimini destekleyebilir.

TGF- β 1'in osteoklastogenez ve kemik rezorpsiyonundaki rolü çok karmaşık ve tartışmalıdır. TGF- β 1'in osteoklastların olgunlaşması, apoptoz ve osteoklast öncüllerinin dalak veya kemik iliğinden alınması gibi fonksiyonlarına aracılık ettiği açıktır. Düşük TGF- β 1 konsantrasyonu osteoklast maturasyonunu desteklediği düşünülmektedir. Ek

olarak monositlerden FGF, PDGF, tümör nekrozis faktör-alfa ve IL-1 gibi diğer büyüme faktörlerinin sekresyonu uyarır, makrofajların kemotaksisini sağlar. Makrofajlar üzerindeki diğer önemli görevlerinden biride otokrin bir etkiyle kendi salınımını düzenler.⁸⁶

TGF- β 1'nin iyileşmenin temeli olan angiogenezi uyarması içerdiği pek çok farklı rollerden biridir.^{90, 91, 92} Hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla ekstrasellüler matriks bileşenlerinden olan kollajen, fibronectin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder^{93, 94, 95} ve aynı zamanda tip I, II, III, IV, VI, X kollajenler, fibronectin, osteopontin, osteonektin, trombospondin, proteoglikanlar ve alkalın fosfatazlar gibi kemik ve kıkırdak bileşenlerini arttırmaktır.^{48, 96, 97}

2.5.2. BMP

Düşük molekül ağırlıklı glikoproteinler olan BMP'lerden BMP-1 hariç diğerlerinin hepsi TGF- β ailesinin bir alt grubudur ve osteoindüktif aktivitesi olan nonkollejenaz ve suda eriyebilen maddeler olarak keşfedilmiş büyüme ve farklılaşma faktörleridir. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, kas içerisine yerleştirilen demineralize kemiğin osifikasyonunda önemli rol üstlendiği fark edilmiş ve bu sayede “kemik morfojenik proteini” adı verilmiştir.^{98, 99} Yetişkin memelilerde BMP osteoblastlar ve osteositler tarafından sentez edilmektedir. Hayat boyunca büyüme faktörlerinin hedefi diferansiye olmuş hücreler olmasına karşın, BMP'lerin hedef organı undiferansiye perivasküler bağ dokusu hücreleridir.¹⁰⁰ Yani yara iyileşmesinde osteojenik differansiasyonda regülatör rol oynar. Bu proteinlerin hedef hücreleri mezenşimal kök hücrelerdir ve mezenkimal kök hücreler BMP reseptörlerinin tümünü bulundururlar.^{101,}

BMP-1, TGF- β 'ya benzememesi nedeniyle diğer BMP'lerden farklıdır ve prokollajenin kollajen liflere dönüşümünü sağlayan prokollajen C-proteinazı ile özdeş olduğu gösterilmiştir.¹⁰³ BMP-1 diğer metalloproteinaz ailesi üyeleri gibi hücreler arası matriks olgunlaşması için öncü maddeleri, BMP-2 ve BMP-4, TGF- β gibi büyüme faktörlerini yönlendirerek morfogenezi düzenler.^{104 105}

Hücre üzerindeki biyolojik fonksiyonlarını transmembranöz heteromerik reseptör kompleksine bağlanarak gerçekleştirirler.^{106, 107} Her BMP türevi farklı Smad proteinini aktifleştirerek intraselüler fonksiyonunu gerçekleştirir. BMP'lerin transmembranöz reseptörü sayesinde Smad 1, Smad 5 ve Smad 8 proteinleri fosforilasyon ile aktif hale geçer. Aktifleşen Smad 1,5 veya 8 proteini Smad 4 ile agrege olup hücre çekirdeğinde hedef genetik kod üzerinde etki gösterir.⁵⁶ Smad 6 ve Smad 7 BMP'lerin ve TGF'lerin etkilerini inhibe ederler.

Bilinen yaklaşık 30 kadar BMP türevi, başta kemik olmak üzere neredeyse organ sistemlerinin gelişiminde ve embriyogenezinde rol oynamaktadır.^{108, 109} Bu proteinler iyileşmenin ilk 2 haftasında en yoğun gözlenen türevlerdir.^{110 110}

In-vitro koşullarda mezenkimal hücelere BMP uygulanan çalışmalarda, matriks üretiminde, alkalen fosfataz düzeyinde ve tip I kollajen sentezinde artış gözlenmiştir.¹¹¹ Ancak mezenkimal hücrelerde sayıca artış olmamıştır. Bu nedenle BMP'lerin daha çok morfojen ajan olduğu, mitojen olarak görev yapmadığı savunulmaktadır.

Kemik iyileşmesinde BMP'ler pluripotent kök hücrelerinin osteoblastik dönüşümünde rol alırlar. Bu sayede diferansiye olmamış mezenkimal hücreler osteojenik hücelere dönüşerek yeni oluşan kemiğin ekstraselüler matriksinin sentezlenmesinde ve kalsifikasyonunda görev alırlar.⁵⁶ Ayrıca BMP'ler, matür osteoblast ve kemik iliği osteoprogenitör hücreleri üzerinde kemotaktik özelliğe sahiptir. Kemiğin yaralanmasının mezenkimal hücreleri (kemik iliği, periost vs.)

etkilediği ve bu hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmelerini sağlayacak mekanizmayı tetiklediği düşünülmektedir. Literatürde kemik yaralanması sonrasında yapısı bozulan kemikten veya rezorbe olan matriksten ortama salınan kemik morfojenik proteinlerinin bu mezenkimal hücre göçünde rol oynadıkları savunulmaktadır.¹¹² Mezenkimal hücreler yaralanma bölgesinde proliferasyon olup diferansiyasyonlarını tamamlayarak osteoblastik hücrelere dönüşürler. Yeni gelişen osteoblastik hücrelerden üretilen BMP'ler bu döngüyü kuvvetlendirerek kemik iyileşmesini hızlandırır. BMP'lerin monositler için kemotaktik etki göstermesi, pikomolar düzeydeki konsantrasyonlarda mezenkimal hücreler için mitotik etkiye sahip olması ve nanomolar düzeydeki dozlarda dahi hücre differansiyasyonuna olanak sağlaması bu hipotezi destekler bulgulardır.^{113, 114}

Kemik üzerindeki etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve osteoprojenitor hücrelerin çoğalmasını ve osteoblastlara farklılaşmalarını sağlarlar.
- 2- Osteoblast hücrelerinin alkalen fosfataz ekspresyonunu artırır.
- 3- Mezenşimal hücreler için kemoatraktandır ve bu hücrelerin tip 4 kollajene bağlanmalarını artırır.

BMP'ler, kemik oluşumu üzerinde kendilerinin etkilerini kolaylaştırmak için fonksiyon gören diğer büyüme faktörlerinin ekspresyonunu etkilerler.¹¹⁵ BMP-2, rat osteoblastlarında IGF-1 ve 2, TGF- β ve IL-6 ekspresyonunu artırır. BMP'ler arasında osteoindüktif özelliği en fazla olan BMP-2'dir.¹¹⁴ Membranöz kemik iyileşmesinde ilk iki hafta BMP-2 en yoğun gözlenen türevlerden biridir. Özellikle osteotomi hattına yakın periosteal hücrelerde ve osteotomi nedeni ile oluşan defektteki mezenkimal hücrelerde zamanla defektin kapanma aşamasında yeni oluşan kemik adacıklarındaki aktif osteoblastlarda BMP-2 ekspresyonuna rastlanmaktadır.^{116 117} BMP-2'nin, kemik büyümesini ve oluşumunu indükleyebildiği, arttırdığı osteoindüktif özellikte olduğu

düşünülmektedir ve aynı zamanda hücre kemotaksisini, proliferasyonunu ve osteojenik yola doğru farklılaşmayı teşvik etmektedir.^{117, 118 119} Sonuç olarak çok sayıda bulgu BMP-2'nin kırık iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunu uyardığını açıklamıştır.^{63,120}

BMP'lerin temel fizyolojik özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.⁷¹

Tablo 2.1. BMP'lerin temel fizyolojik özellikleri

BMP-2;	Kemik ve kırık morfogenez ve kalp oluşumu
BMP-3;	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar
BMP-3b ;	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar
BMP-4 ;	Kemik ve kırık morfogenez ve böbrek oluşumu
BMP-5 ;	Kemik morfogenez ve ekstremiteler oluşumu
BMP-6 ;	Kemik ve kırık morfogenezinde hipertrofi
BMP-7 ;	Kırık ve kemik morfogenez ve böbrek formasyonu
BMP-8 ;	Kemik morfogenez/spermatogenez
BMP-8b;	Spermatogenez
BMP-9 ;	Kemik morfogenez ve kolinerjik nöronların oluşumu
BMP-10 ;	Kalp morfogenez
BMP-11;	Aksiyal iskelet, göz, böbrek ve pankreas gelişimi
BMP-12;	Tendon, ligament ve duyu nöronlarının gelişimi
BMP-13;	Kırık gelişimi ve hipertrofi
BMP-14;	Kondrogenez ve anjiyogenez
BMP-15;	Yumurta fizyolojisi
BMP-16 ;	Embriyonik gelişim
BMP-17 ;	Embriyonik gelişim
BMP-18 ;	Embriyonik gelişim

Kırık onarımı boyunca BMP'lerin üretimine bakacak olursak mezenşimal hücrelerde BMP mevcudiyeti en erken kırık sonrası 3. günde görülür. BMP içeren osteoblastlar, iki hafta sonra kemik dokusunda osteoblastik dizilim gösterir. BMP kırıktan 21-30 gün sonra azalır ve iyileşen kırıkta mezenşimal hücre sayısı azalır.¹¹²

2.5.3. IL

Hücreler arası ilişkileri ve hücresel fonksiyonları düzenleyen, antijenlere karşı vücudu savunan enflamatuar olaylarda rol oynayan, immun sistemin düzenlenmesinde görev yapan küçük yapıda protein moleküller sitokin olarak adlandırılmaktadır^{121, 122} ve immün sistemden başlıca salınan sitokinler 1'den 18'e kadar numaralandırılmış olan interlökinlerdir.

IL-6, kas-iskelet sisteminde hücresel iletişimde önemli bir sitokindir. Kemik doku, IL-6 üretimini sağlayan osteoblast, mononükleer fagositler, endotel hücreleri, kondrositler, fibroblastlar ve keratinositleri içermektedir. IL-6'nın salınımının, mezenkimal progenitör hücrelerin osteoblasta farklılaşmasını uyardığı bulunmuştur ve reseptörüne bağlanan IL6, periferel kan monositlerinin osteoklastlara farklılaşmasını indükleyebilir. IL-6 reseptörleri, osteoklast hücre membranında lokalizedir ve IL-6'nın reseptörüne bağlanması, in vitro olarak matür osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyon aktivitesini stimüle edebilir. IL-6'nın ayrıca VEGF ekspresyonunu uyarak anjiyogenezde rol oynadığı öne sürülmektedir. Anjiyogenez ile beraber osteoklastların ve osteoblastların farklılaşması ve aktivitesi kemik onarımında önemli rol oynadığından, IL-6 bu sürecin önemli bir regülatörü olabilir.¹²³ IL-6, IL-1'in tarafından uyarılmaya çok hassastır ve erken dönemde iyileşme sürecinde yüksek aktivite gösterir.⁸⁰ Çeşitli kanıtlar bunun kemik rezorpsiyonun bir stimülatörü olduğunu işaret eder.

2.5.4. Diğer Gen Ekspresyonları

Siklooksijenaz enzimleri ,^{124, 125} osteokalsin,^{92, 126} osteonektin,¹²⁷ osteopontin,¹²⁸ 33, 129, 130 fibronektin,³³ PDGF,⁹⁰ IGF,^{48, 97} BMPs,^{131 85} SMAD'lar.^{132, 133}

2.6. Kollajen

İnsanlarda, en fazla bulunan ve 20 farklı tipe sahip ekstrasellüler proteinlerdir.¹³⁴ Kollajenler, yüzlerce aminoasitten oluşmuştur ve tekrarlayan üçlü aminoasit parçaları kollajenin en küçük yapısı olan tek bir α zincirini meydana getirir. Bu üçlü dizide glisin aminoasidi ağırlıklı olarak (% 35) bulunurken, buna ek olarak alanin (%11) yer almaktadır. Kollajen diğer proteinlerden farklı olarak % 11 oranında prolin ve % 9 oranında hidroksiprolin içermektedir. α zincirlerinin 3 tanesi biraraya gelerek heliks bir kollajen monomeri oluşturur ve bu monomerlerde kollajen demetlerini ve ağlarını meydana getirerek doku içerisinde organize bir yapıya dönüşürler.¹³⁴ Yapılarının kovalent üçlü heliks bağlantılarına sahip olması ve fibriller yapıda olması nedeniyle proteolizise dayanıklıdır.¹³⁵ Kollajen demetleri ve lifleri, epitel ve bağ dokuda düzenli, kıkırdakta esnek, kemik ve dişte ise kristalize yapıdadır ve ekstrasellüler matriks içindedir.^{136, 137} Kollajenin öncül yapısı olan prokollajenler üretilip hücre dışına gönderildikten sonra, tropokollajenlere ve sonrasında kollajene dönüşür.^{138, 139}

Kollajenin esas görevlerinden biri dokuların yapısal bütünlüğünü devam ettirmek ve dokulara gerilime karşı direnç ve mekanik destek sağlamaktır.¹⁴⁰ Kollajenin, trombosit stimülasyonunda ve yara iyileşmesinde damar duvarlarına penetre olduklarına dair kanıtlar ilk 1953'te ortaya konulmuştur.¹⁴¹ Kollajen, birçok inflamatuvar hücre ve fibroblastlar için kemotaktiktir.

2.6.1. Kollajen Süperfamilyası

Günümüzde, 24 farklı kollajen molekülü olduğu bilinmektedir. İnsan ve diğer omurgalıların vücudunda en az 20 farklı kollajen tipi mevcuttur ve keşfedilme tarihlerine göre adlandırılmaktadır (I,II, III, IV, V, ... vb).¹⁴² Kollajen fibrillerinin farklı düzeni nedeniyle kollajenin değişik dokularda göstereceği işlevde de farklılık oluşmaktadır.

Konnektif doku matriksinin ana kollajenleri Tip I-II-III'tür. Tip I kollajen tendonlarda, ligamanlarda, kemikte, organ kapsüllerinde, deride, fibröz kıkırdakta ve fasiyada bulunabilir. Tip II, sıklıkla hyalin ve elastik kıkırdakta bulunur ve kondrositler için marker olarak kullanılır. Tip III arterleri, karaciğer, dalak ve granülasyon dokusunu içeren pek çok dokuda bulunur. İyileşme işleminde tip III kollajen en erken ortaya çıkan kollajendir.¹⁴³ Kollajen tip IV, VI-X ve XII-XIX nonfibriler kollajenlerdir. Tip IX, XII, XIV, XVI ve XIX kendi üzerlerinde supramoleküler yapılar oluşturmazlar fakat sıklıkla diğer sınıflardaki kollajenler ile fibriller içerisine integre olarak bulunurlar.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Diğer kollajen tipleri yapraklar (tip IV, VIII ve X), mikroflamanlar (tip VI) ve bağlayıcı fibriller gibi bazal membrana (tip VII) tutunmasını sağlayan nonfibril birlikler oluştururlar.^{143, 146} Tip XV ve XVIII; normal kollajen triple heliks dizisinde geniş kesilmeler ile karakterizedir.^{143, 145} Tip XIII ve XVII tek zincirden oluşurlar.¹⁴³

2.6.2. Kemik İyileşmesinde Kollajen

Tip I kollajen, en yaygın görülen kollajen olup hyalin kıkırdak dışında hemen hemen tüm bağ dokuda bulunmaktadır ve kemiğin ana kollajenidir. Çapraz bağlanmaların gelişmesine yardımcıdır. Bu bağlanmalar sayesinde, kemik iyileşmesinin başlangıcından ortalama 10 gün sonrasında kollajen fibrillerinde hidroksiapatit kristallerinin çökeceği ve bu fibrillerin büyümesine olanak sağlayan bölgeler oluşur.¹⁴⁷

Tip II kollajen iyileşmenin ana yapısal proteinidir. Tip II mRNA, iyileşme başlangıcının erken döneminde yani 5. günde tesbit edilebilir. Sıçan ve farelerde iyileşme başlangıcından yaklaşık 9 gün sonra en yüksek seviyede ekspresyona ulaşır. Çoğalan kondrositlerde pro-alfa 2 kollajen mRNA'sı gözlenir. İyileşme başlangıcından 14 gün sonra tip II kollajen mRNA'sı yok olur. Nerdeyse tüm kondrositler hipertrofiye olur ve tip II prokollajen zincirinin ekspresyonu durur.^{33, 126, 148}

Tip III kollajene ait mesajcı ribonükleik asit (mRNA) özellikle kemikte yara iyileşmesinin ilk haftasında hızlı bir şekilde artar ve üretimindeki aksaklıklar gecikmiş kaynama veya hiç kaynama olmamasına neden olabilir. Granulasyon dokusunun oluşumunun başlangıcında biriken kollajen tip III kollajendir.

Tip I, tip IV ve tip X kollajen mezenkimal hücrelerinin osteoblastlara dönüşümüne yardımcı olabilir.¹⁴⁹ Tip V ve XI kollajen yakından ilişkili yapılardır. Kıkırdak ve kıkırdak dışı dokularda Tip I ve II kollajenin büyüme ve oryantasyonu düzenlediği söylenir.¹⁵⁰ Tip V kollajenin; iyileşme boyunca yumuşak ve sert kallusta ekspresyonu gerçekleşmektedir. Tip V kollajen en çok intramembranöz kemikleşmenin olduğu subperiostal kallusda birikmektedir ve aynı zamanda granülasyon dokusundaki kan damarları ile birlikte.¹²⁹ Tip V kollajen, fibronektinlerin sağladığı hücre adezyonunu engelleyerek epitelyal hücre migrasyonunu etkilemektedir. Tip XI kollajen kıkırdakta yer alır ve kollajen fibrillerin küçük bir bileşenidir fakat bu kollajenin ekspresyonu sadece kıkırdak değildir.⁹² Tip IX kollajenin ekspresyonu ve toplanması tip II'nin ekspresyonu ile aynı zamandadır. Tip IX kollajen kıkırdakta bulunur ve kollajen fibrilleri ile proteoglikanlar arasındaki ilişkilerde rol alır.^{92, 151} Endokondral safhasında hipertrofik kondrositlerin markerı olan Tip X kollajenin ekspresyonu kıkırdağın diğer spesifik genlerinden sonra ortaya çıkar ve kıkırdağın mineralizasyonunda rol oynayabilirler.⁹²

Kırık iyileşmesinde ise, kırık stabilse tip II ve V yanında baskın olarak tip I kollajen üretilir, unstabil kırıkta ise başlangıçta tip III ve V kollajen üretimi vardır ve tip II ve IX kollajen ile ve çok az miktarda tip I kollajen yer değiştirir.¹⁵²

2.6.3. Kollajen Kullanım Sahaları

Farklı fiziksel özelliklere ve yapılar sahip kollajenler bir çok özel alanda kullanılmaktadır. Tabaka formu ince yapıda olanlar hemostatik ajan olarak, lif yapısında

olanlar suture olarak kullanımdadır. Buna ek olarak valvuler protez olarakta kullanılmaktadır. Jel formunun kozmetikte kullanımı bulunmaktadır.

Tedavi alanında kollajenin kullanımı bir çok dalı kapsamaktadır. Bunlar; kronik bacak ülserleri, bası yaraları, yanıklar, ürolojik ve jinekolojik cerrahi, maksillofasial ve dental cerrahi, rekonstrüktif, abdominal ve vasküler cerrahi, hemostaz ve ortopedi alanlarını kapsamaktadır.¹⁵³

Kollajenin diş hekimliğindeki kullanım alanı oldukça geniştir. Bunlar; kemik defekt onarımı, hemostatik ajan, oroparanazal komplikasyonların giderilmesi, çekim yaralarının iyileşmesi, sinir rejenerasyonu, augmentasyon, kist ve garnülo tedavi, periodontal cerrahi, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ve apikal rezeksiyon gibi birçok alanı kapsamaktadır.

Yapısal dayanıklılığını, hidroksiprolin ve disülfid arasındaki çapraz bağlar sayesinde sağlayan kollajen molekülü, asit çıkarma yöntemlerine, proteolitik enzimlere ve ısısal değişikliklere hassastır. Kollajen eldesinde genellikle, asetik ve proprionik asit, hidroklorik asit gibi asitler yada pepsin ,tripsin, kemotripsin ile beraber nötral sodyum klorid tercih edilmektedir. Kollajen bu yöntemlerle denatüre edilerek direnci azaltılır. Sonrasında, orjinal yapının eldesi için formaldehit, gluteraldehit yada hidroklorik asitle muamele edilip çapraz bağlar kuvvetlendirilir.¹⁵⁴

2.7. Aminotransferazlar

Birçok organ ve dokuda yaygın şekilde bulunan hücre içi enzimler olan aminotransferazların diğer ismi transaminazlardır. Karbonhidrat ve nitrojen metabolizmasında amino ve ketoasitlerin dönüşümlerinde rol oynarlar. Amino gruplarının bir karbon iskeletinden diğerine geçişini kataliz ederler.

Alanin aminotransferaz (ALT) sitozolik yapıda bir enzimdir ve aspartat aminotransferaz (AST) ile karşılaştırıldığında karaciğere daha spesifik özellik

göstermektedir. AST ise hem sitozolik yapıda hem de mitokondriyal bir izoenzimdir. Aminotransferazlar karaciğer hücre hasarının hassas bir göstergesidir. Serum aminotransferaz düzeyindeki yükselme hepatosellüler nekroz sonucu hücre içindeki enzimin seruma geçmesi yoluyla olabildiği gibi nekrozla sonuçlanmayacak düzeydeki bir hücre hasarında membran geçirgenliğinin artmasından da kaynaklanabilir.¹⁵⁵

2.8. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

2.8.1. MDA ve GSH

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller olarak bilinen elektron alıcı moleküllerin aktif oksijen türevlerine oksidan ismi verilir. Bu oksidanlar, hedefi olan moleküllerden elektron alma yeteneğine sahiptirler ve dolayısıyla bu molekülün yapı ve fonksiyonlarında değişikliğe neden olarak hücre zarını, genetik materyali ve çeşitli enzimatik reaksiyonları etkileyerek hücre hasarlarına sebep olduğu bilinmektedir.

Membranların yapısında bulunan fosfolipitlerdeki doymamış yağ asitleri sebebiyle hem kendileri hemde sakladıkları hücre içi organeller oksidan saldırılarına duyarlıdırlar. Lipid peroksidasyonun en temel ve önemli ürünlerinden biri olan MDA, hücre membranları üzerinde iyon alış-verişini etkileyerek membranda bulunan bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olur ve iyon geçirgenliği, enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara yol açar. MDA, DNA'da bulunan nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve bu sebeple mutajenik, hücre kültürleri için genotoksik ve karsinojeniktir.¹⁵⁶

Hücrenin majör sistein kaynaklı tüm tiyol (SH) gruplarında kapsayan antioksidan ve redoks tamponu, tripeptit yapıdaki GSH'tır.¹⁵⁷ GSH, sitozol, çekirdek ve mitokondrilerde yüksek oranda bulunur ve bu hücre komponentlerindeki çözülmüş majör antioksidandır. Glutatyonun antioksidan bir molekül olarak hücre, doku ve organ sistemlerinin bütünlüğünün yapısal ve fonksiyonel olarak korunmasında önemi

büyüktür. Aynı zamanda oksidatif stres ya da antioksidan potansiyelin yetersizliğinde gözlenen oksidatif hasar sonucu, GSH düzeyi azalmakta ve serbest radikal harabiyetine bağlı olarak, patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır.¹⁵⁸

Oksidatif stresin, prooksidan-antioksidan dengesinin prooksidan yönüne doğru bozulması sonucu potansiyel hücrel hasarlar ortaya çıkar.¹⁵⁹ Bununla beraber, oksidatif stresin ölçümü, düzeltme ve onarımı sağlayan kompleks endojen savunma sistemlerin varlığından dolayı kolay olmayabilir. Oksidatif stres, serbest radikal üretiminin artışı ve antioksidan savunmanın azalması sonucu olabilir. Bu sebeple, oksidatif stres biyobelirteci olarak antioksidan tüketiminin araştırılması antioksidan miktarlarındaki azalış veya onların metabolitlerindeki artışın değerlendirilmesi ile olabilir.¹⁶⁰

3. MATERYAL VE METHOD

Bu çalışmanın deneysel bölümü, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezindeki Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş olup, histopatolojik, IHC ve biyokimyasal incelemeler Atatürk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce 21.09.2018 tarihli ve 25330273-929-E.1800268084 sayılı Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alınmış ve çalışma sırasında Atatürk Üniversitesi Etik Kurulu yönergesinde belirtilen “Etik kurallara uygunluk esası” kararına uyulmuştur.

Bu çalışmada kullanılacak ratlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Çalışma veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu tespit edilen, ağırlıkları ortalama 200-250 gram olan, yaklaşık 10-12 haftalık olan yetişkin 36 adet erkek winstar albino rat üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları, oda sıcaklığının 22 ± 2 °C’de sabit tutulduğu ve nispi nem oranının %30-45 arasında olduğu bir ortamda, günün yarısı aydınlık, diğer yarısı karanlık siklusu sağlayacak şekilde tutularak, serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenmiştir. Ratlar kafeslerde 3'er adet olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırılmıştır.

3.1. Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Toplamda 36 adet ratın kullanıldığı bu deneyde hayvanlar randomize bir şekilde kontrol ve deney olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. Bu iki grupta kendi içlerinde 2. haftada, 4. haftada ve 8. haftada kurban edilecek şekilde 3 gruba ayrılmıştır ve her grup 6'şar rat içermektedir (n=6) (Tablo 3.1) .

Tablo 3.1. Gruplandırmaların şematik gösterimi

	2. haftada sacrifiye edilecek grup	4. haftada sacrifiye edilecek grup	8. haftada sacrifiye edilecek grup	Grup başına rat adedi
Kontrol grubu	6	6	6	18
Deney grubu	6	6	6	18
Toplam	12	12	12	36

3.2. Kollajen Jel Materyalinin (TSV Jel) İçeriği, Hazırlanması ve Uygulaması

Doğal heterolog kökenli, çoklu doymamış yağ asitleri ve tip I ve III kollajen içeren jel materyali, TSV, termojelifikan ve ısıl ternisindir şekillerinde bulunur; biyolojik uyumludur ve radyotransparan yapıdadır (Şekil 3.1). Kemığın yerini tutan materyal (scaffold) ve/veya kemik doku rejenerasyon girişimlerindeki ilaçlar gibi diğer tıbbi cihazlara mekanik destek sağlamak amacıyla geliştirilmiştir. Kollajen jel ortam sıcaklığında yaklaşık 10 dakika kadar düşük viskozitede uygulanabilir halde kalırken, uygulama yapılan klinik sahaya ulaştığında, beden sıcaklığıyla viskozitesi artar.

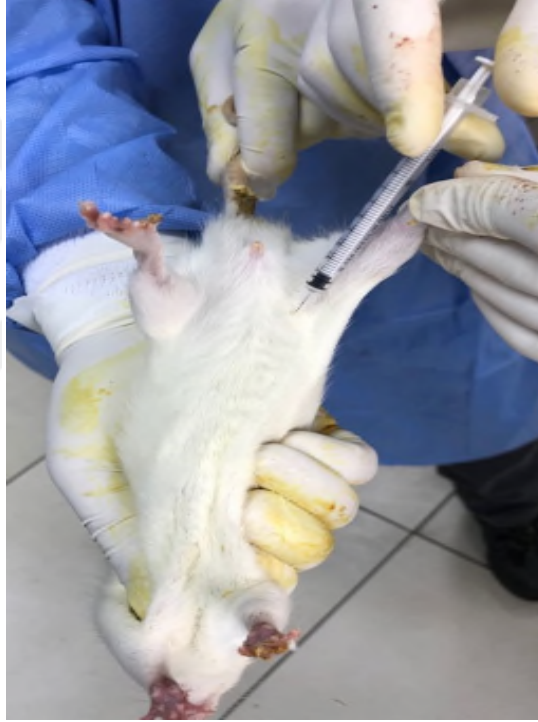
Kollajen jel kullanılmadan önce buzdolabında +4°C sıcaklıkta en az 20 dakika tutulmuştur. Ardından partiküler kemik greft materyali ile kollajen jel karıştırılmış, elde edilen karışımı enjektöre çekilmiş ve defekt bölgesine uygulanmıştır.



Şekil 3.1. TSV Jel

3.3. Cerrahi Teknik

Gerekli takipleri yapılan ratlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezindeki Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda ameliyat için hazırlandı. Her bir ratın ağırlığı elektronik tartı ile tartılarak anestezi ilaç dozu hesaplandı. Anestezi ilaç olarak %10'luk Ketamin HCl (10 mg/kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, ABD) ve %2'lik Ksilazin (10 mg/kg) (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) kombine edilerek kullanıldı. Anestezi, sol yada sağ kasık bölgesine intraperitoneal teknikle uygulandı (Şekil 3.2).



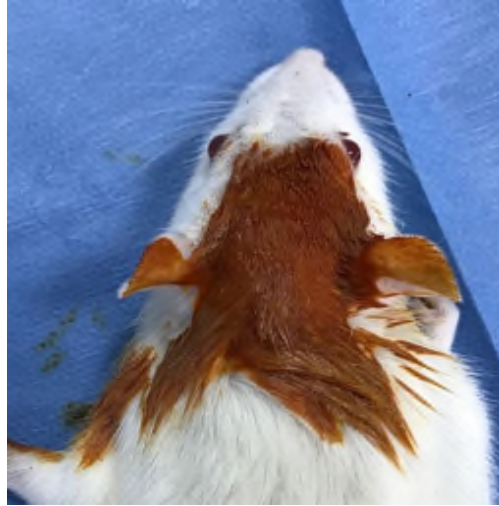
Şekil 3.2. İntraperitoneal teknikle anestezi uygulanması

Anestezi yeterliliğini tespit için göz kapağı refleksinin kaybı takip edilmiştir. Kontrol ve deney gruplarındaki tüm ratların kafa bölgesi tıraş edildikten sonra operasyon sahası antiseptik solüsyon olan povidon iyodür (Batticon®, ADEKA, Türkiye) ile boyandı (Şekil 3.3 ve 3.4). Kullanılacak olan el aletleri dahil olmak üzere bütün malzemeler otoklavda sterilize edilmiştir. Operasyonda asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edilerek steril çalışılmıştır. Kafa bölgesinde frontal bölgeden başlayan deri ve

periostu içeren bir insizyon atılarak künt diseksiyon ile kemik yüzeyi açığa çıkacak şekilde tam kalınlık flep kaldırıldı (Şekil 3.5). Kalvaryal bölgedeki sagittal sütür alanının sol tarafında kalan parietal kemiğe bir adet 5 mm çapında kritik boyutlu kemik defekti, operasyon alanına ısınmaması için steril salin solüsyonu ile sürekli irrigasyon ile 5-6 mm'lik trepan frez (Mega-Gen, Seoul, Kore) kullanılarak oluşturuldu (Şekil 3.6). Defekt bölgesindeki kemik duramatere zarar verilmemeye özen gösterilerek çıkarıldı.



Şekil 3.3. Ratların Kafa Bölgelerinin Tıraş Edilmesi



Şekil 3.4. Operasyon sahasının antiseptik solüsyon ile boyanması



Şekil 3.5. Künt diseksiyonla tam kalınlıklı flebin kaldırılması



Şekil 3.6. Kemik defektinin oluşturulması

Kontrol grubundaki ratların kritik boyutlu kemik defektleri, sıgır kaynaklı kortikokansallöz yapıdaki partiküler heterolog kemik grefti (Osteobiol- GenOss®, Tecnooss Dental, Turin, Italy) ile doldurulmuştur (Şekil 3.7 ve 3.8). Defektlerin üzeri kollajen membran (Osteobiol Evolution; OsteoBiol, Tecnooss Dental, Turin, Italy) ile kaplanarak bölgedeki kemik greftleri koruma altına alınmış ve bu greftin stabilizasyonu sağlanmıştır (Şekil 3.9). Daha sonra sırasıyla periost ve deri flebi, uygulanmış greft materyaline dikkat edilerek rezorbe olabilen sentetik poliglaktin esaslı 4/0 suture (Glikolak, Boz, Turkey) ile orijinal pozisyonuna suture edilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.7. Partiküler greft materyali



Şekil 3.8. Defektin greft ile doldurulması



Şekil 3.9. Defektin membran ile örtülmesi



Şekil 3.10. Dokuların suture edilmesi

Deney grubunda ise, sığır kaynaklı kortikokansallöz yapıdaki partiküler heterolog kemik grefti (Osteobiol- GenOss®, Tecnooss Dental, Turin, Italy) (Şekil 3.1) ile doğal heterolog kökenli, çoklu doymamış yağ asitleri ile tip I ve III kollajen içeren jel, (TSV jel, Osteobiol, Tecnooss Dental, Turin, Italy) 1/1 oranında karıştırılarak manipülasyonu kolay olan ve rahatça şekil alabilen bir metaryal meydana getirilmiştir (Şekil 3.11). Ve bu sayede bu karışım kolayca kaviteye yerleştirilmiş (Şekil 3.12) ve kontrol grubundaki gibi aynı membranla örtülmüş ve aynı şekilde süturlanmıştır.



Şekil 3.11. Greft ve kollajen jelin karışımıyla elde edilen materyal



Şekil 3.12. Defektin elde edilen karışım ile doldurulması

Postoperatif enfeksiyonu önlemek için 7 gün boyunca oksitetrasiklin içerikli toz halindeki antibiyotik (Tetramezatin, Ceva, Turkey) günde 1kez olucak şekilde ratların içme sularına karıştırılmıştır.

3.4. Ratların Sakrifiye Edilmesi

Deney hayvanları 2.hafta, 4.hafta ve 8. hafta olucak şekilde 3 farklı periyotta sakrifiye edilmişlerdir. Her periyotta kontrol ve deney gruplarından 6'şar adet rata sevofluran kullanılarak inhaler şekilde anestezi uygulanmıştır. Ratlar anestezi

altındayken, her rattan enjektör yardımıyla intrakardiyak kan alınmıştır (Şekil 3.13). Alınan kanlar biyokimyasal incelemelerde kullanılmak amacıyla santrifüj edilmiştir. Kan alma işlemi tamamlanan ratlar dekapitasyon tekniği ile sakrifiye edilmiştir. Rat kalvaryumları üzerindeki cilt, diseksiyon yardımıyla tamamen kaldırılarak defekt alanı ortaya çıkarılmıştır. Kafatası önce gövdeden ayrılmıştır. Daha sonrasında bu kafatasından mandibula ayrılmış ve geriye kalan parça patolojik ve IHC olarak incelenme için saklanmıştır (Şekil 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19).



Şekil 3.13. İntrakardiyak kan alınması



Şekil 3.14. 2. hafta kontrol grubunun makroskobik görüntüsü



Şekil 3.15. 2. hafta deney grubunun makroskopik görüntüsü



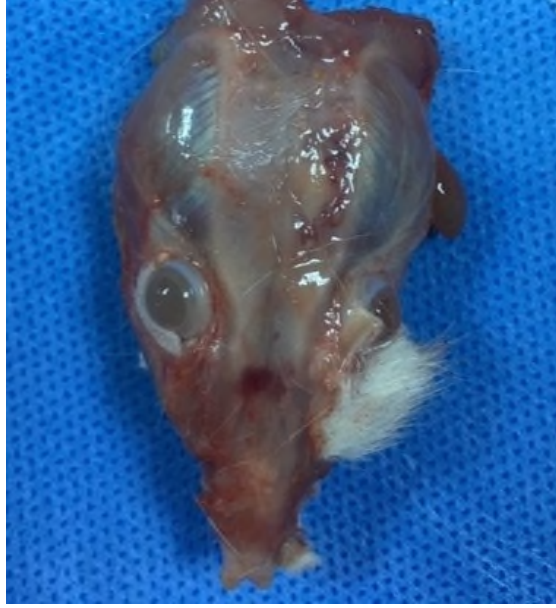
Şekil 3.16: 4. hafta kontrol grubunun makroskopik görüntüsü



Şekil 3.17. 4. hafta deney grubunun makroskopik görüntüsü



Şekil 3.18. 8. hafta kontrol grubunun makroskopik görüntüsü



Şekil 3.19. 8. hafta deney grubunun makroskopik görüntüsü

3.5. Dekalsifikasyon Metodu ve Histopatolojik Metot

Nekropsi uygulaması sonucu histopatolojik inceleme yapmak amacıyla alınan kemik dokuları %10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat tespit edildikten sonra, dekalsifikasyon amacıyla kullanılan solüsyon olan osteosot (Merc, HC313331, made in Germany) içerisinde 96-120 saat bekletililerek dokuların yumuşaması sağlandı. Daha sonra akan çeşme suyunda 24 saat yıkanması yapıldı. Doku takibinde sırasıyla % 80'lik alkol (12 saat x 2 defa), % 90'lik alkol (12 saat x 2 defa), % 96'lik alkol (12 saat x 2 defa), % 100'lik alkol (12 saat x 2 defa), kloroform (5 saat x 3 defa), sıvı parafin (12 saat) işlemlerinden geçtikten sonra parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 mm kalınlığında olacak şekilde kesitler alınıp lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik değerlendirme için hazırlanan bu preparatlar HE, MT ve CR ile boyanıp ışık mikroskobu altında incelendi.^{161, 162} Histopatolojik olarak gruplara ait kesitlerin mikroskopik değerlendirilmesinde (Tablo 3.2), anjiyogenez, nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, granülasyon dokusu, fibrozis ve osteoblastik aktivite durumları incelenerek yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olacak şekilde skorlanarak değerlendirilip resimler çekildi.¹⁶³

Tablo 3.2. Histopatolojik skorlamada kullanılan kriterler

Skor	Nekroz	Mononükleer hücre infiltrasyonu	Granülasyon dokusu	Anjiogenezis	Osteoblastik aktivite	Fibrozis
-	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
+	Bir mikroskop sahasında 1-2 adet fokal nekroz alanı	Bir mikroskop sahasında 0- 5 hücreden oluşan fokal hücre infiltrasyonu	Granülasyon dokusunun sıkı ve genişliğine göre sınıflandırıldı. Geniş ve gevşek bağ doku	Bir mikroskop sahasında 1-3 adet kapillar	Bir mikroskop sahasında 1-8 arası osteblast	Fibrosit sayısı fibroblast sayısına oranla daha az
++	Bir mikroskop sahasında üçten fazla adet fokal nekroz alanı	Bir mikroskop Sahasında 5- 10 arası fokal hücre infiltrasyonu	Geniş ve sıkı bağ doku	Bir mikroskop sahasında 3-6 adet kapillar	Bir mikroskop sahasında 9-16 arası osteblast	Fibrosit sayısı fibroblast sayısına oranla daha fazla
+++	Mikroskop sahasında yaygın nekroz alanları	Mikroskop sahasında 10 dan fazla hücreden oluşan, yaygın yangısal fokal hücre infiltrasyonu	Dar ve sıkı bağ doku	Bir mikroskop sahasında 6 adetten fazla kapillar	Bir mikroskop sahasında 16'dan fazla osteblast	Yoğun fibrosit ve kollajen doku oluşumu

3.6. İmmünohistokimyasal Metot

İmmunperoksidaz değerlendirme amacıyla adhezivli (poly-L-Lysin) lamlara alınan tüm kesitler, ksilol ve alkol serilerinden sırasıyla geçirilerek, deparafinize ve dehidre edildi. Sonrasında distile suda 5 dk yıkandı. Fosfat buffer solüsyonu (PBS, pH 7.2) ile 5dk yıkanıp, sonrasında % 3'lük H₂O₂'de 10 dk tutularak endojen peroksidaz inaktive edildi. PBS'de 5-10 dk yıkanmasının ardından, nonspesifik zemin boyanmasını önlemek amacıyla tüm primer ve sekonder antikorlarla uyumlu olan Protein blok ile 5 dk inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda doku kesitleri üzerinde kalan blok solusyonunun fazlası döküldü ve sonra yıkanma yapılmadan primer antikorlar olan TGF-β1 antikor (SC-130348), BMP-2 antikor (SC-137087) ve IL-6 Antikoru (SRB-

T-83168) damlatıldı ve PBS ile yıkandı. Primer antikora uygun olacak şekilde 1 saat oda sıcaklığında ve 1 gece +4°C’de bekletildi. PBS ile 2 kez 5’er dk olacak şekilde yıkanıp, biotinize sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10-30 dk. inkube edildi. PBS ile tekrar yıkanan kesitler, streptavidin-peroksidaz içinde 10-30 dk. bekletildikten sonra PBS ile aynı şekilde yıkandı. Yıkama işleminin ardından kesitlere 3-3 Diaminobenzidine (DAB) kromojen damlatılarak kromojeni almasına göre 5-10 dk. bekletildi. Zemin boyanması için Mayer’s hematoksilende 1-2 dk. tutulduktan sonra musluk suyunda yıkandı. Ardından alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek lamelle kapatıldı ve ışık mikroskobu (Leica DM 1000) ile incelendi. Kesitler immun pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.^{164, 165}

3.7. Biyokimyasal Metot

Her rattan sakrifikasyon anında biyokimyasal değerlendirmeler için intrakardiak teknik ile enjektör yardımıyla alındı. Tek bir rat için enjektörde bulunan kan biyokimyasal incelemeler için iki ayrı ependorf tüplerine alındı.

İlk ependorf tüpüne konulan kanlar, ALT, AST, Ca ve P düzeylerini tespit etmek için santrifüj cihazına yerleştirilerek santrifüj edilmiştir (2000 rpm, 15 dk). Elde edilen serumlar analiz edilmeden önce -80 ° C dondurucuda saklandı. Serumlar bu biyokimyasal parametreler için incelendi.^{166, 167}

Diğer ependorf tüpüne konulan kanlar ise, Malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviyelerinin test etmek için, 4 ° C’de 15 dakika boyunca 1000 g’de santrifüj edildi. Kanların MDA seviyeleri Placer ve ark.¹⁶⁸ tarafından tanımlanan tiyobarbitürik asit reaksiyonu yöntemi baz alınarak ölçüldü ve değerler nmol/ml olarak hesaplandı. Yine kanların GSH seviyeleri, Sedlak ve Lindsay¹⁶⁹ tarafından tanımlanan metot

referans alınarak 412 nm'de belirlenmiştir ve GSH seviyeleri, nmol /ml olarak hesaplandı.^{166, 170, 171}

3.8. İstatiksel Analiz

Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı. Çalışma kör olarak farklı patolojiler tarafında değerlendirildi her bir rata ait dokularda 5 farklı bölgeden incelemeler ve sayımlar yapılarak histopatolojik bulgular skorlandı. İmmunhistokimyasal bulgular ZEISS Microscope ZEN imaging Software programında analiz edilerek skorlanmıştır.

Biyokimyasal bulgular olan AST, ALT, Ca, P belirteçleri için; farklı zaman dilimlerindeki gruplar arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde parametrelerin doğrusal olarak yayılmamasından dolayı Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Deney gruplarının 3 farklı zaman dilimindeki biyokimyasal değerleri arasındaki farklılığın değerlendirilmesinde ise Kruskal-Wallis testi kullanılmış, anlamlı farklılık bulunan değerlerde ise ikili karşılaştırma sonucu farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlenmiştir.

Biyokimyasal bulgular olan MDA ve GSH için tüm analizler SPSS (sürüm 13.0; IBM SPSS Co) yazılım programında yapılmıştır. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Tek yönlü ANOVA kullanılarak anlamlılık düzeyleri ve istatistiksel farklar belirlendi ve gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Duncan'ın post hoc testi kullanıldı. Farklılıklar, $p < 0.05$ olduğunda anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Deneysel çalışma boyunca ratların uygulanan cerrahiyi iyi tolere ettiği, beslenmeleri bakımından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, operasyonun neden olacağı herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve ratların genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlenmiştir.

4.2. Histopatolojik bulgular

Histopatolojik olarak gruplara ait kesitlerin mikroskopik değerlendirilmesinde (Tablo 3.2), ossifikasyon, anjiyogenez, nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, granülasyon dokusu, anjiogenezis, osteoblastik aktivite ve fibrozis durumları incelenerek ‘ -, +, ++, +++ ‘ olarak skorlanmıştır.

4.2.1. Hematoksilen-Eozin boyamalarda;

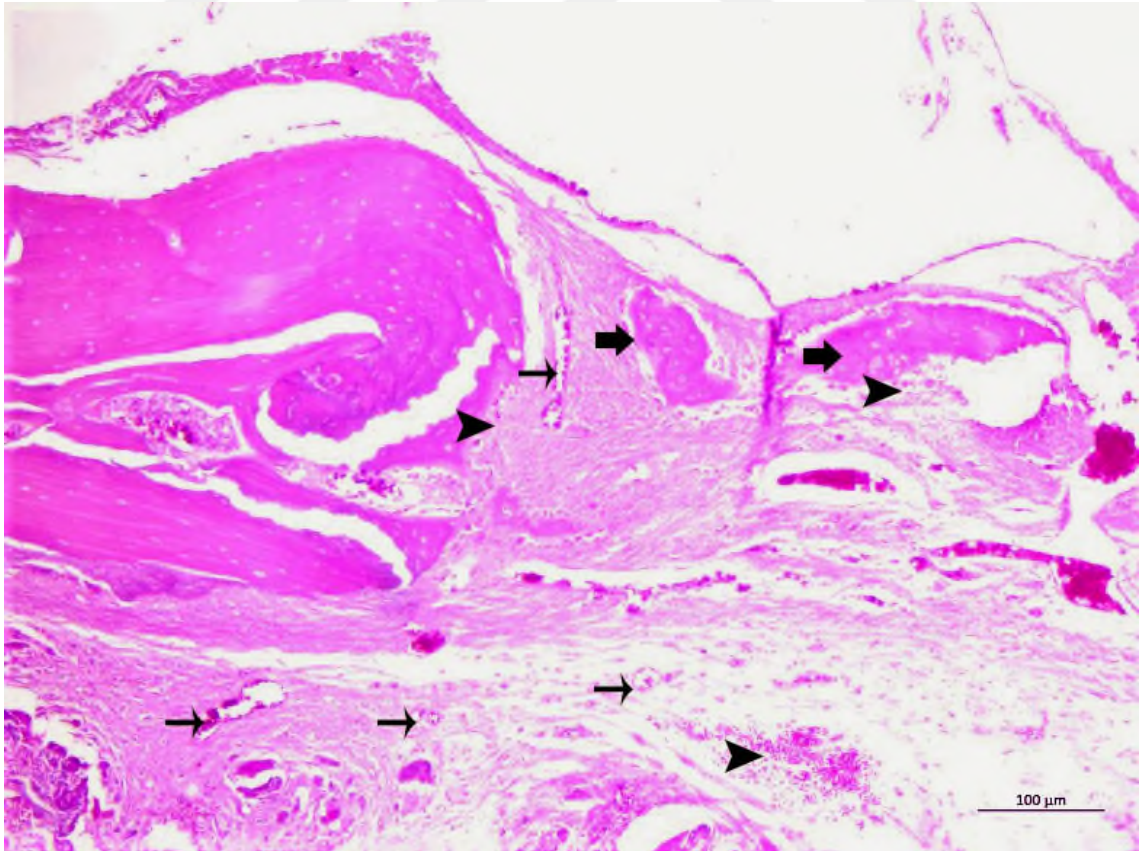
2. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, defektin oluşturulduğu bölgede nekrotik bir kitle ve bu kitlenin etrafında şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları ve bölgede hafif düzeyde ödem gözlemlendi. Granülasyon dokusunun oluşumunun başladığı ve orta düzeyde anjiogenez olduğu gözlemlendi. Defektin kemik dokuya yakın kısmındaki osteoblastlarda proliferasyon görüldü. Hafif düzeyde örgü kemik oluşumu görüldü (Şekil 4.1) (Tablo 4.1).

2. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, defektin oluşturulduğu bölgede çok hafif düzeyde nekrotik bir kitleye rastlandı. Bu kitlenin etrafında şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Şiddetli düzeyde granülasyon dokusunun şekillendiği gözlemlendi ve şiddetli düzeyde anjiogenez olduğu gözlemlendi. Defektin kemik dokuya yakın kısmındaki

osteoblastlarda orta düzeyde proliferasyon görüldü. Orta düzeyde örgü kemik oluşumu görüldü (Şekil 4.2) (Tablo 4.1). Kontrol grubuyla kıyaslandığında, iyileşmenin ilk haftalarında mononükleer hücre infiltrasyonu, granülasyon dokusunun gelişimi, anjiogenezis oluşumu, osteoblastik aktivite bakımından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark gözlemlendi ($p<0,05$).

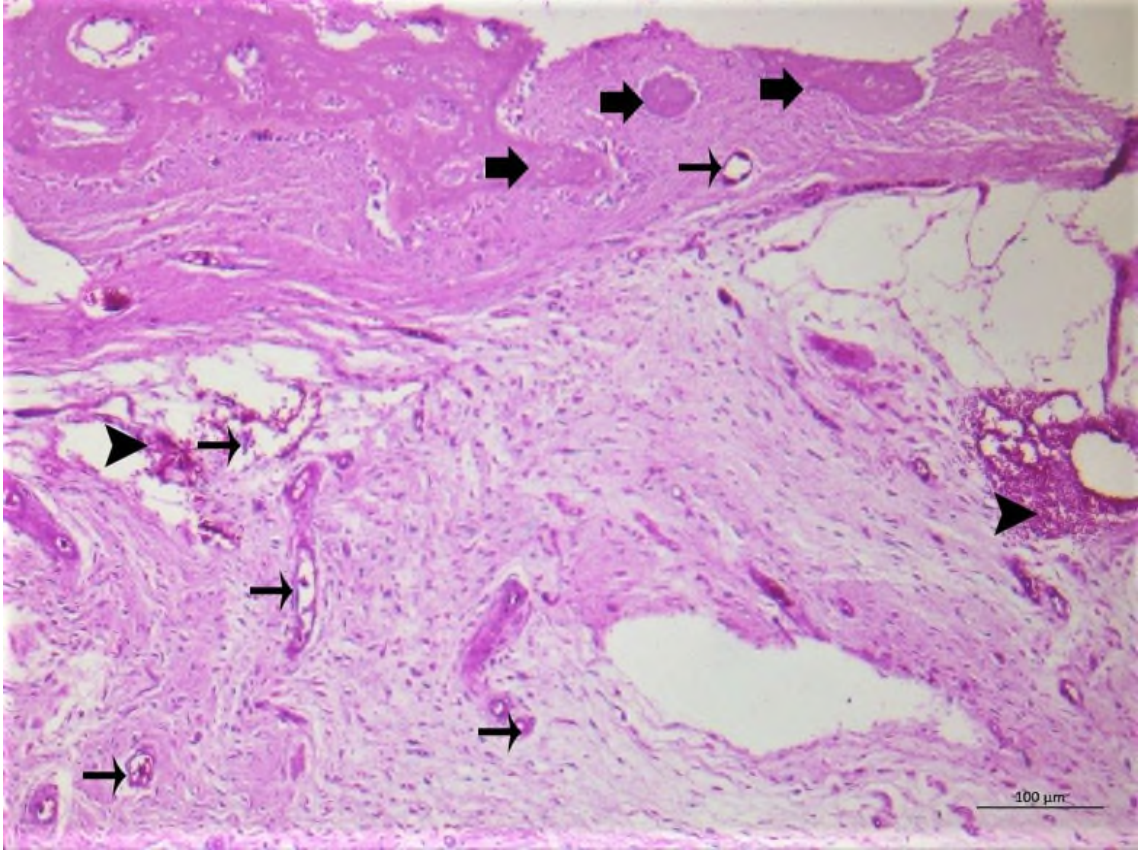
Tablo 4.1. Kalvaryal kemikte 2.haftadaki histopatolojik bulguların skorlanması

	Kontrol grubu	Deney grubu
Nekrozis	+++	+
Mononükleer hücre infiltrasyonu	+++	+++
Granülasyon dokusu	++	+++
Vaskülarizasyon	++	+++
Osteoblastik aktivite	+	++



Şekil 4.1. 2. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde anjiogenezis (ince oklar), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları(okbaşları), osteoblastlarda hafif düzeyde

proliferasyon (kalın oklar), H&E, Bar:100µm.



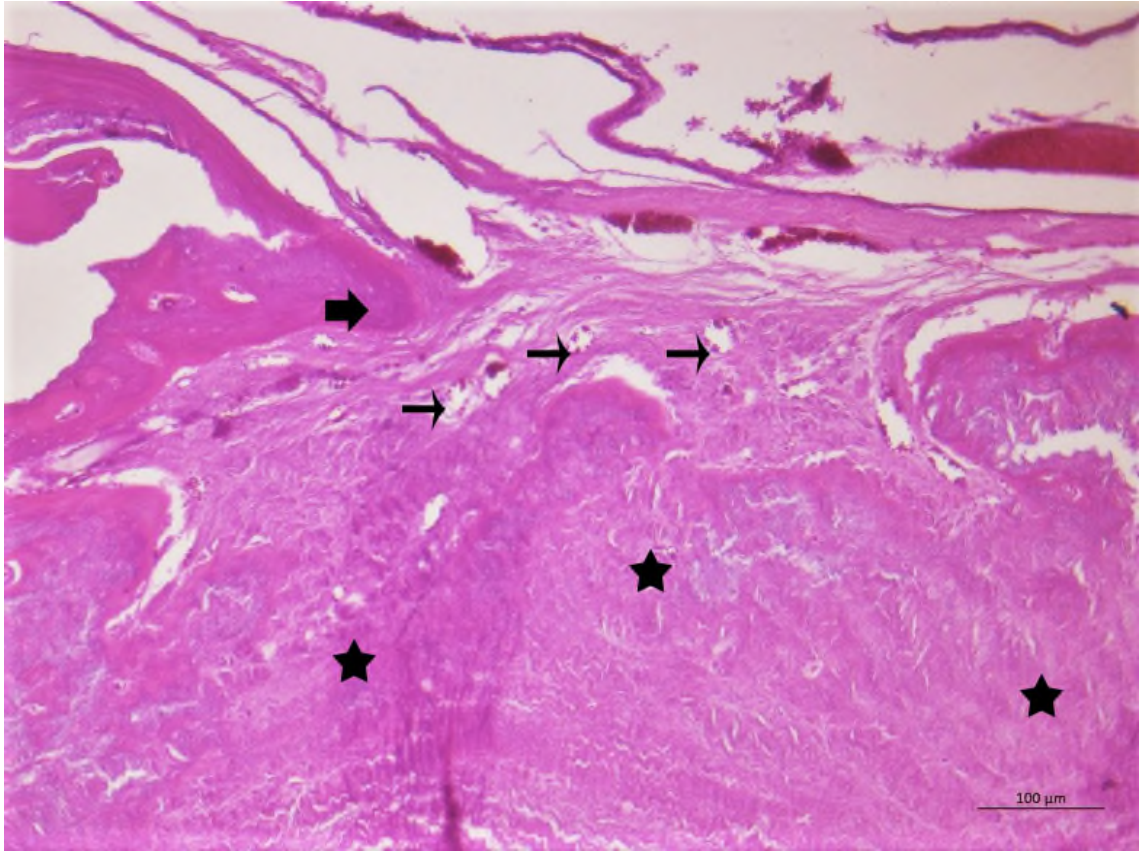
Şekil 4.2. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde anjiogenezis (ince oklar), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları (okbaşları), osteoblastlarda orta düzeyde proliferasyon (kalın oklar), H&E, Bar:100µm.

4. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, çok hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları, orta düzeyde anjiogenezis, şiddetli düzeyde granülasyon dokusu, hafif düzeyde osteoblastlarda proliferasyon ve şiddetli düzeyde fibrotik doku gözlemlendi (Şekil 4.3) (Tablo 4.2).

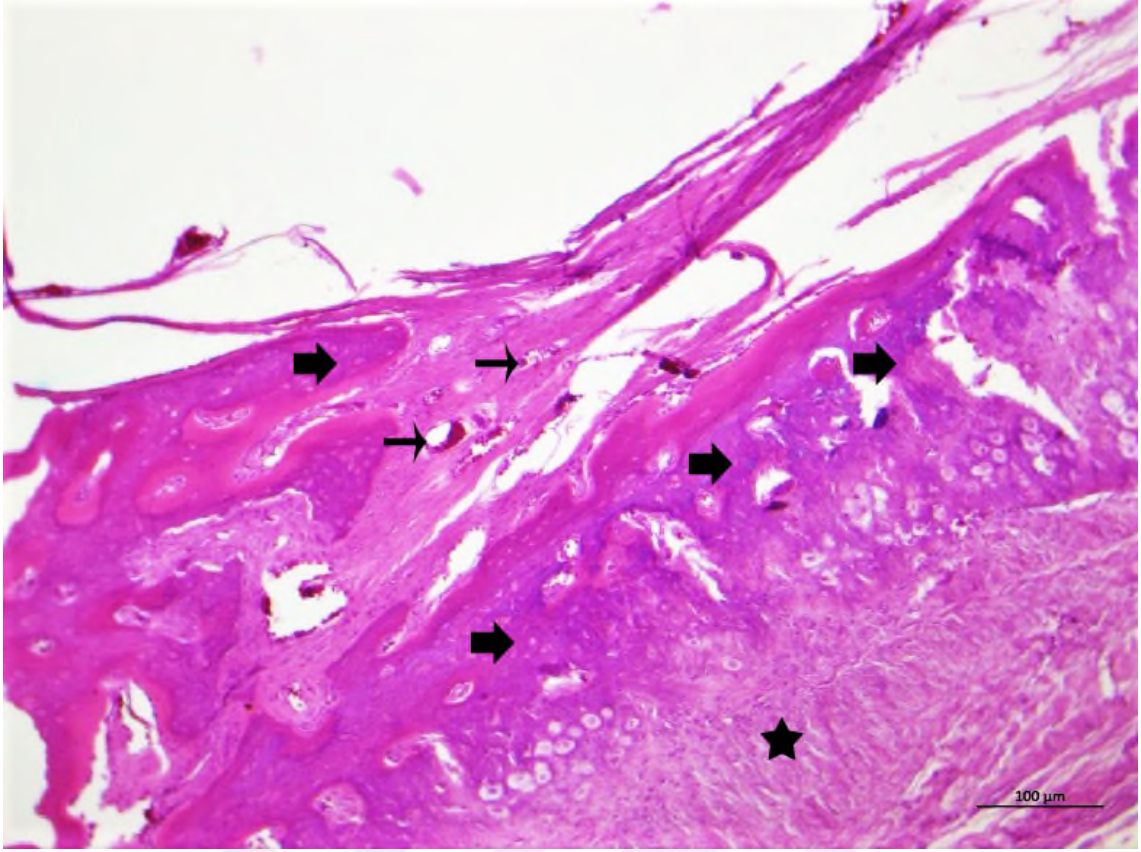
4. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, çok hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu, hafif düzeyde anjiogenezis, orta düzeyde granülasyon dokusu, şiddetli düzeyde osteoblast proliferasyonu ve orta düzeyde fibrotik doku gözlemlendi. (Şekil 4.4) (Tablo 4.2). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark belirlendi ($p<0,05$).

Tablo 4.2. Kalvaryal kemikte 4.haftadaki histopatolojik bulguların skorlanması

	Kontrol grubu	Deney grubu
İnflamasyon	az	Az
Granülasyon dokusu	+++	++
Anjiogenezis	++	+
Osteoblastik aktivite	++	+++
Fibröz doku oluşumu	+++	++



Şekil 4.3. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde anjiogenezis (ince oklar), osteoblastlarda hafif düzeyde proliferasyon (kalın oklar), şiddetli düzeyde granülasyon dokusu (yıldız) H&E, Bar:100µm.



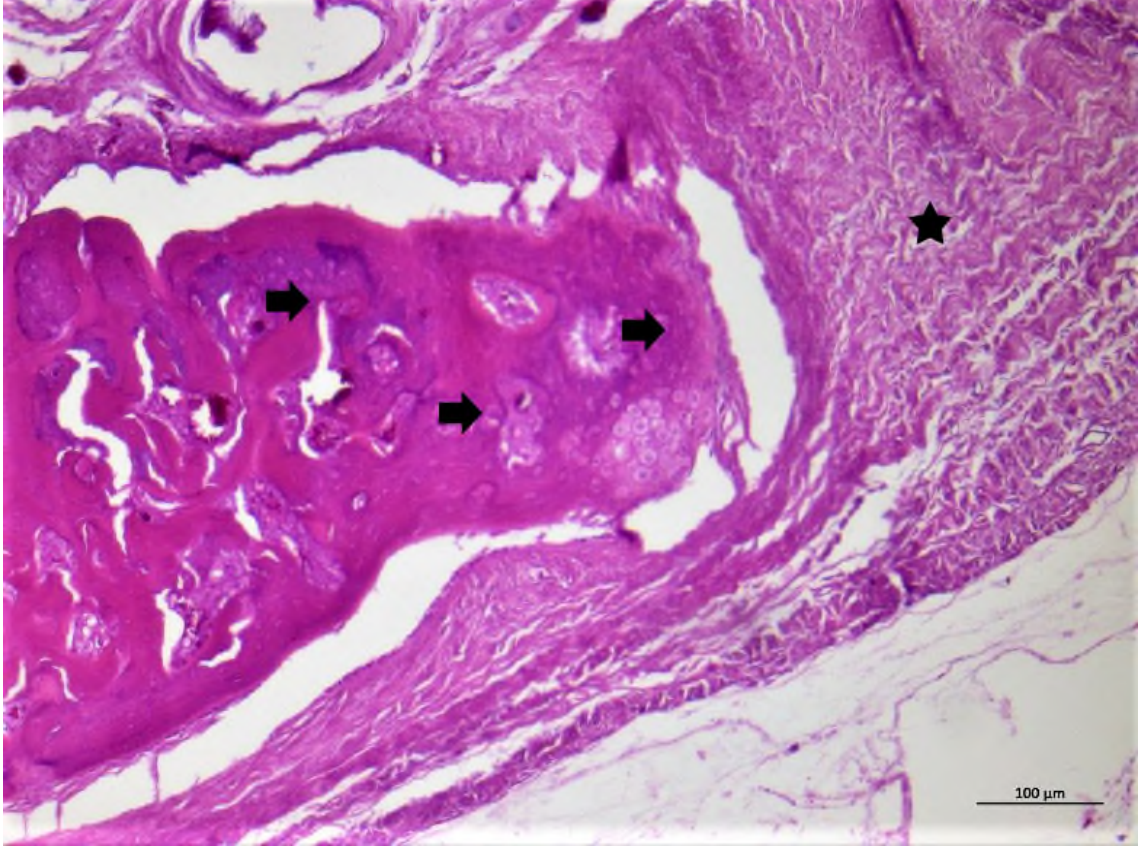
Şekil 4.4. 4. Hafta deney grubu, hafif düzeyde anjiogenezis (ince oklar), osteoblastlarda şiddetli düzeyde proliferasyon (kalın oklar), orta düzeyde granülasyon dokusu (yıldız) H&E, Bar:100μm.

8. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, orta düzeyde granülasyon dokusu ve osteoblastlarda orta düzeyde proliferasyon gözlemlendi. Orta düzeyde lameller kemik oluşumu görüldü (Şekil 4.5) (Tablo 4.3).

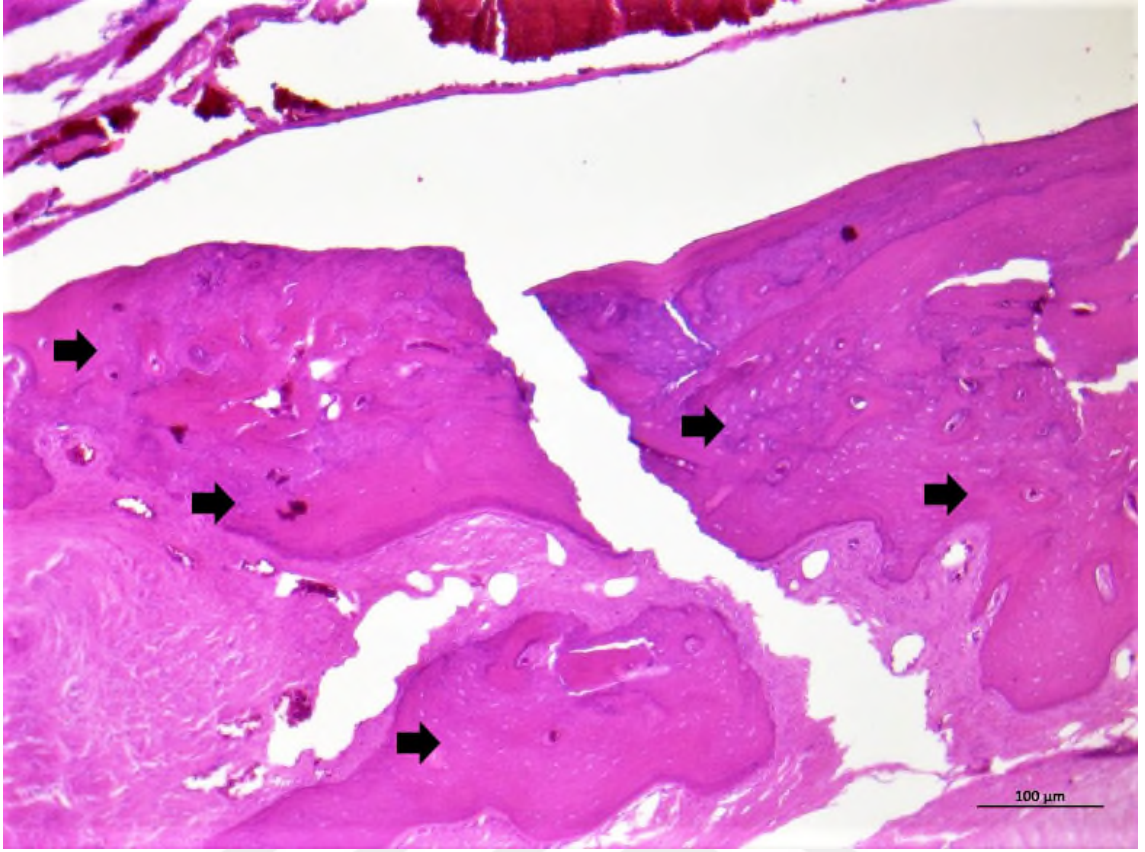
8. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, çok hafif düzeyde sıkı bir granülasyon dokusu gözlemlendi. Osteoblastlarda şiddetli düzeyde proliferasyon ve buna bağlı olarak kalvaryal defektin neredeyse kapanmış olduğu gözlemlendi. Ayrıca yoğun lamaller kemik oluşumu görüldü (Şekil 4.6) (Tablo 4.3). Kontrol grubuyla kıyaslandığında, osteoblastik aktivite bakımından istatistiksel olarak önemli ölçüde fark gözlemlendi ($p<0,05$).

Tablo 4.3. Kalvaryal kemikte 8.haftadaki histopatolojik bulguların skorlanması

	Kontrol grubu	Deney grubu
Granülasyon dokusu	++	+
Osteoblastik aktivite	++	+++



Şekil 4.5. 8. Hafta kontrol grubu, osteoblastlarda orta düzeyde proliferasyon (kalın oklar), orta düzeyde granülasyon dokusu (yıldız) H&E, Bar:100µm.

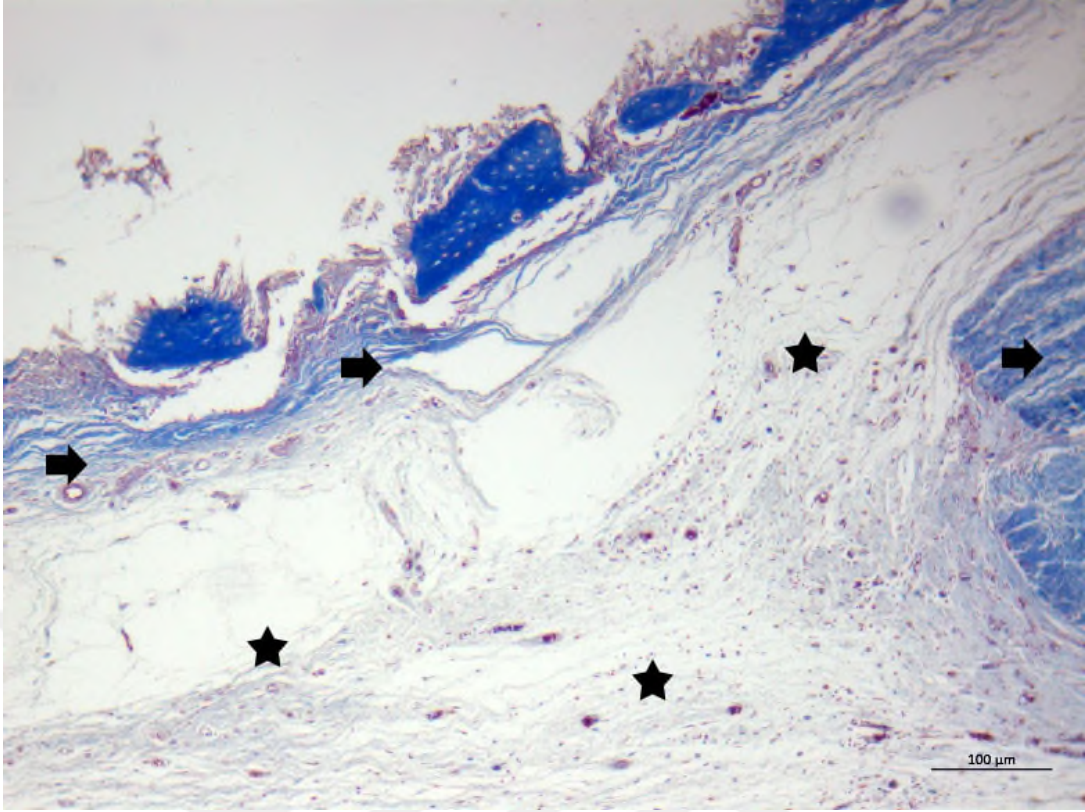


Şekil 4.6. 8. Hafta deney grubu, osteoblastlarda şiddetli düzeyde proliferasyon (kalın oklar) H&E, Bar:100µm.

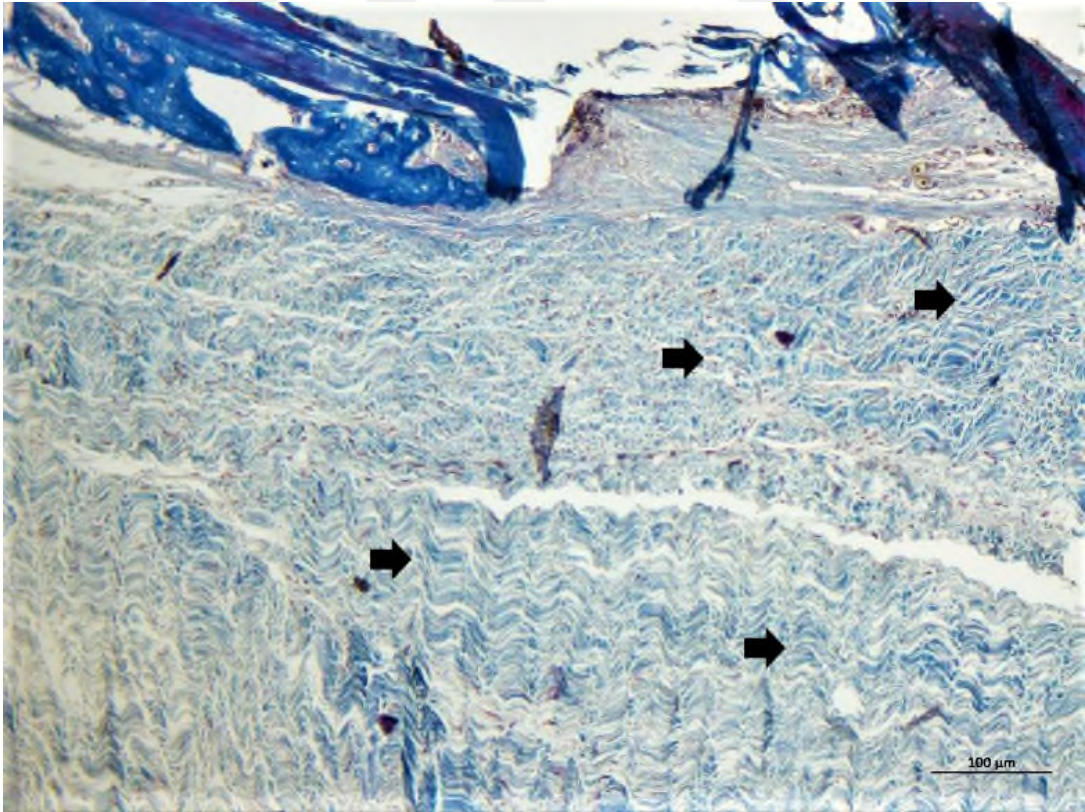
4.2.2. Masson trikrom boyamalarda;

2. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, orta düzeyde olan granülasyon dokusunun gevşek bağ dokudan oluştuğu gözlemlendi (Şekil 4.7).

2. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, sıkı granülasyon dokusunun şiddetli düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 4.8). Kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi($p<0,05$).



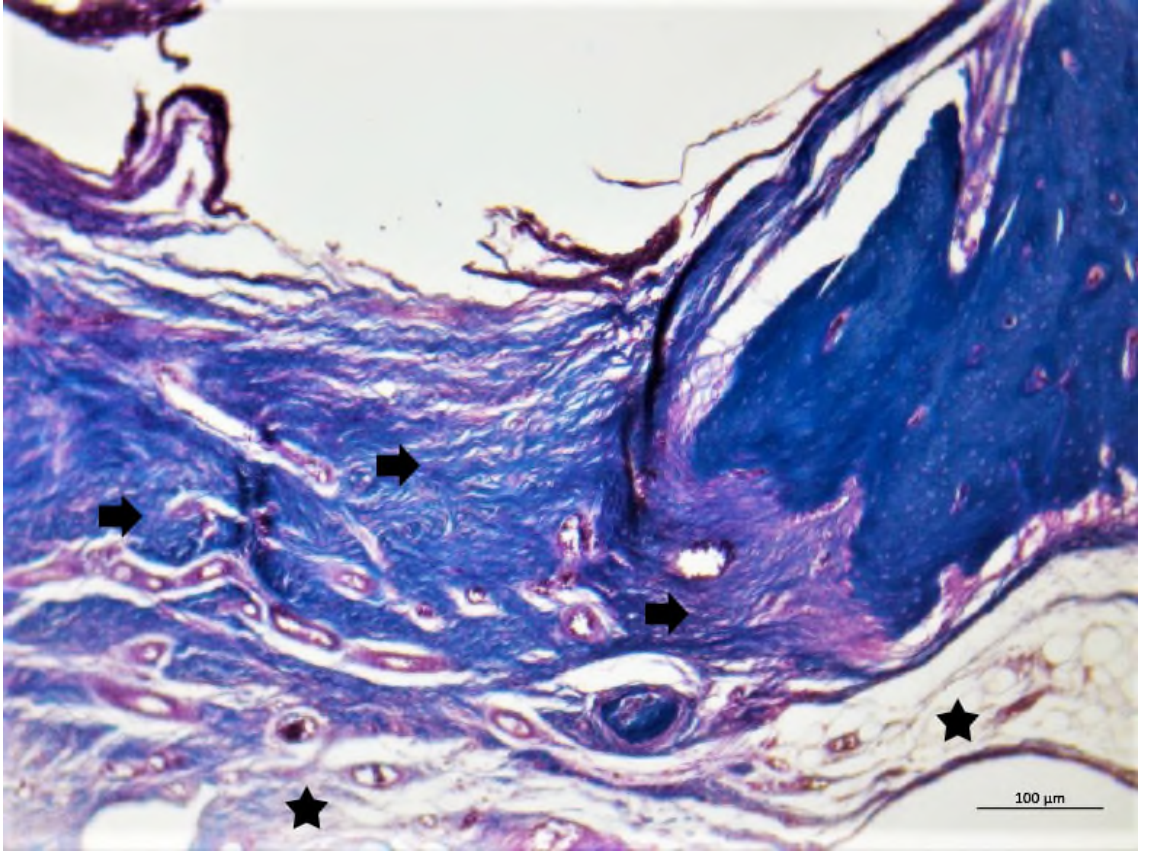
Şekil 4.7. 2. Hafta kontrol grubu, sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), orta düzeyde gevşek bağ dokusu (yıldız) Masson Trikrom, Bar:100µm.



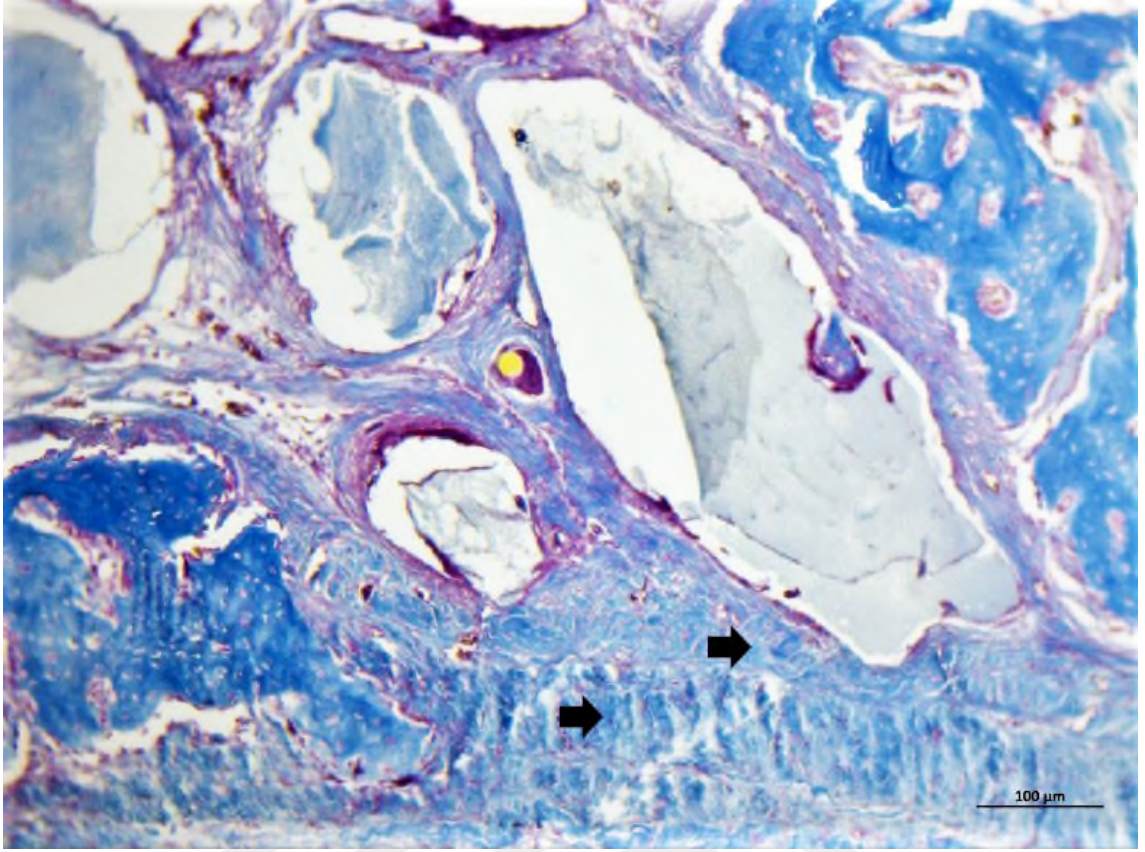
Şekil 4.8. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.

4. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, şiddetli düzeyde sıkı granülasyon dokusu ve çok hafif düzeyde gevşek bağ dokusu belirlendi(Şekil 4.9).

4. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, orta düzeyde sıkı granülasyon dokusu belirlendi(Şekil 4.10). Kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi($p<0,05$).



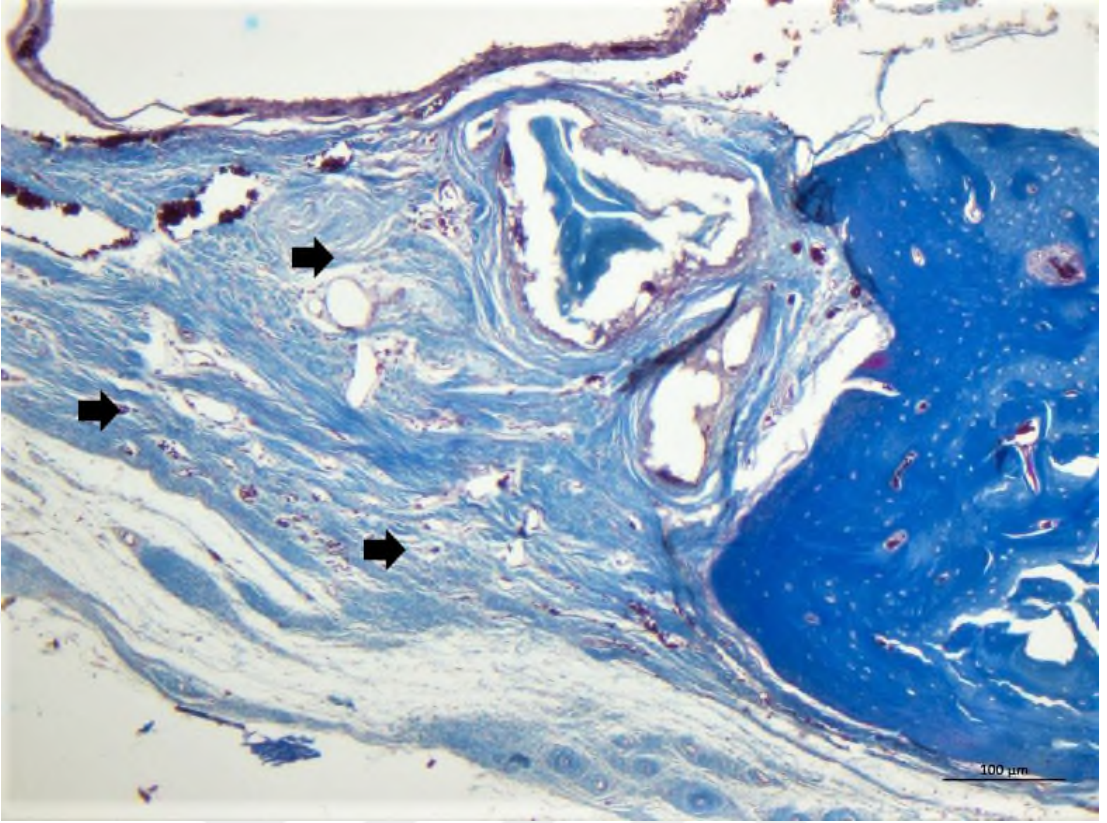
Şekil 4.9. 4. Hafta kontrol grubu, şiddetli düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), çok hafif düzeyde gevşek bağ dokusu (yıldız) Masson Trikrom, Bar:100µm.



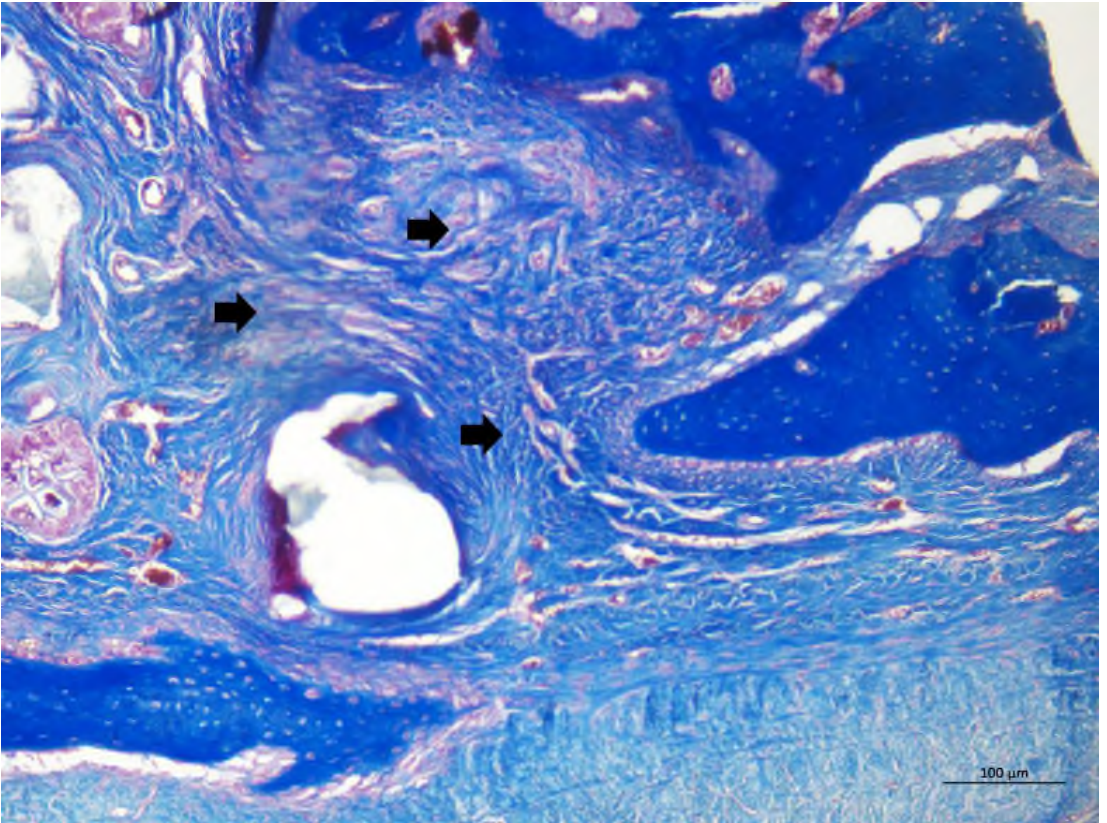
Şekil 4.10. 4. Hafta deney grubu, orta düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.

8. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, orta düzeyde sıkı granülasyon dokusu belirlendi (Şekil 4.11).

8. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, hafif düzeyde sıkı granülasyon dokusu görüldü (Şekil 4.12). Kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi($p<0,05$).



Şekil 4.11. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.

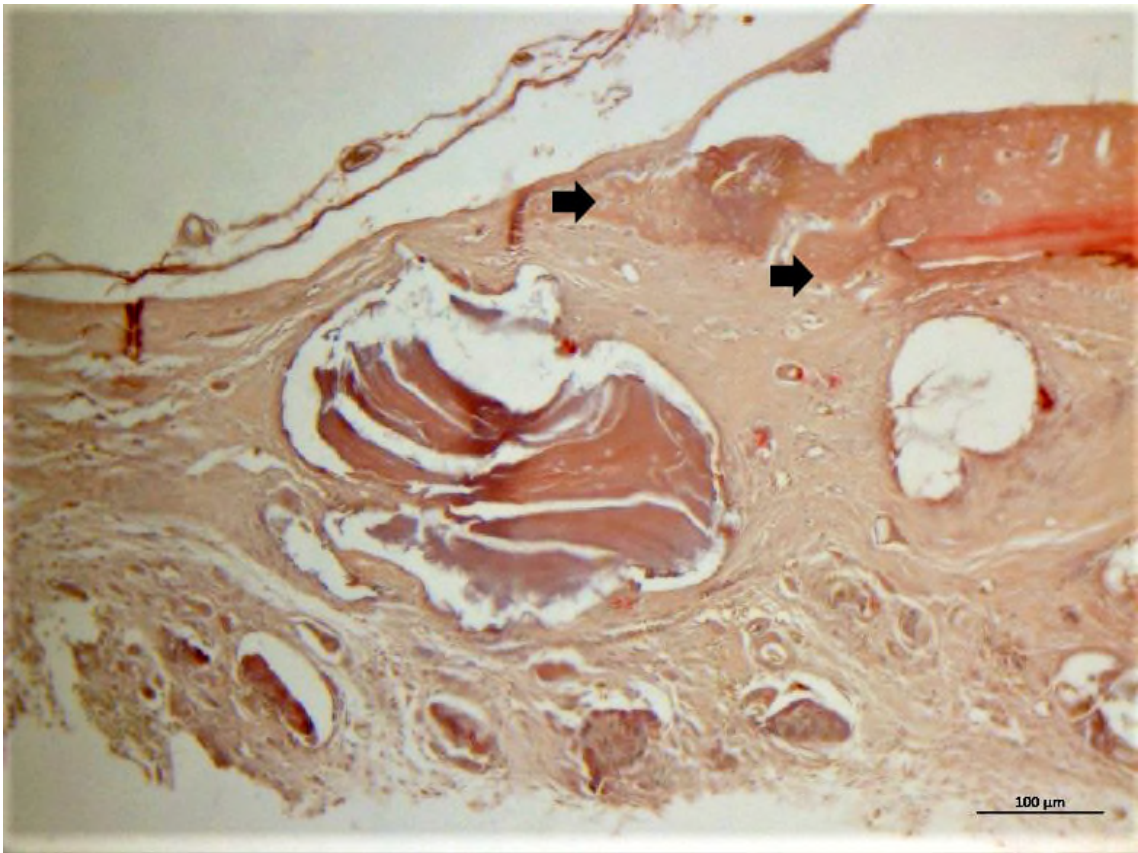


Şekil 4.12. 8. Hafta deney grubu, hafif düzeyde sıkı granülasyon dokusu(kalın oklar), Masson Trikrom, Bar:100µm.

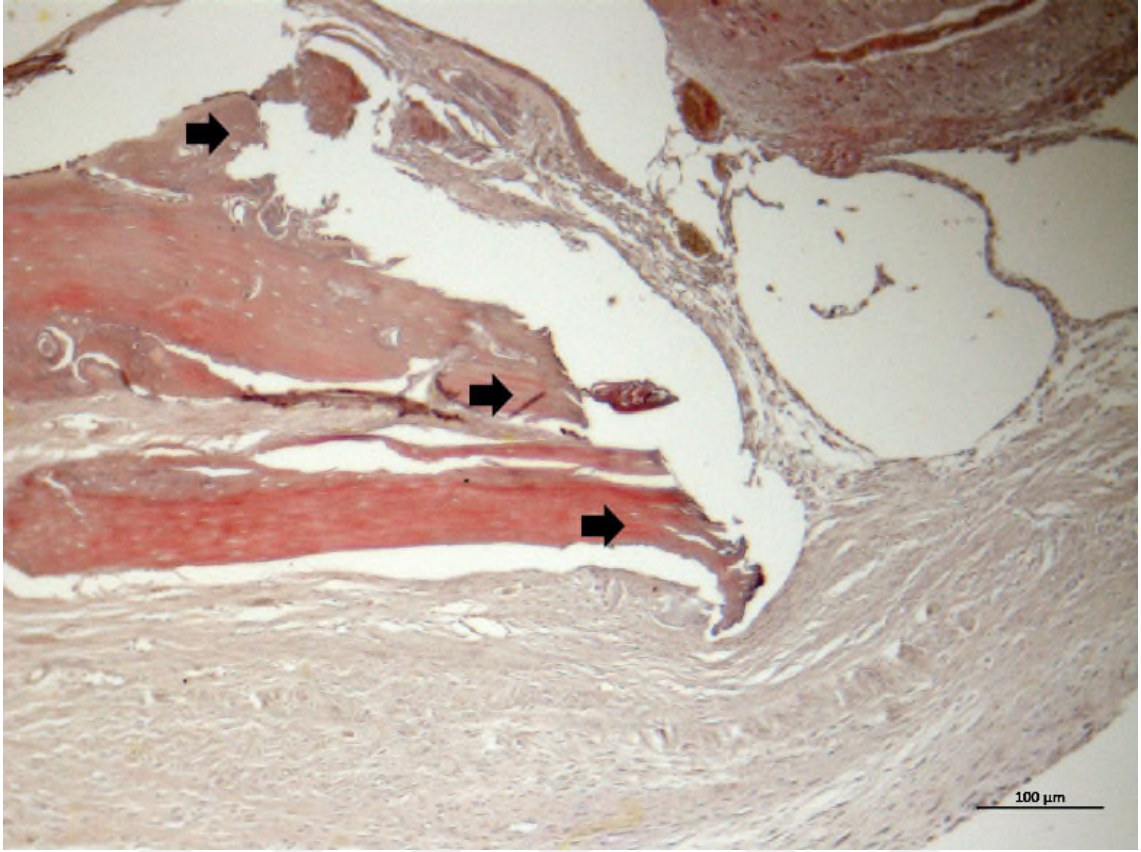
4.2.3. Congo Red Boyamalarda

2. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastik aktivite hafif düzeyde gözlemlendi (Şekil 4.13).

2. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastik aktivite orta düzeyde gözlemlendi (Şekil 4.14). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



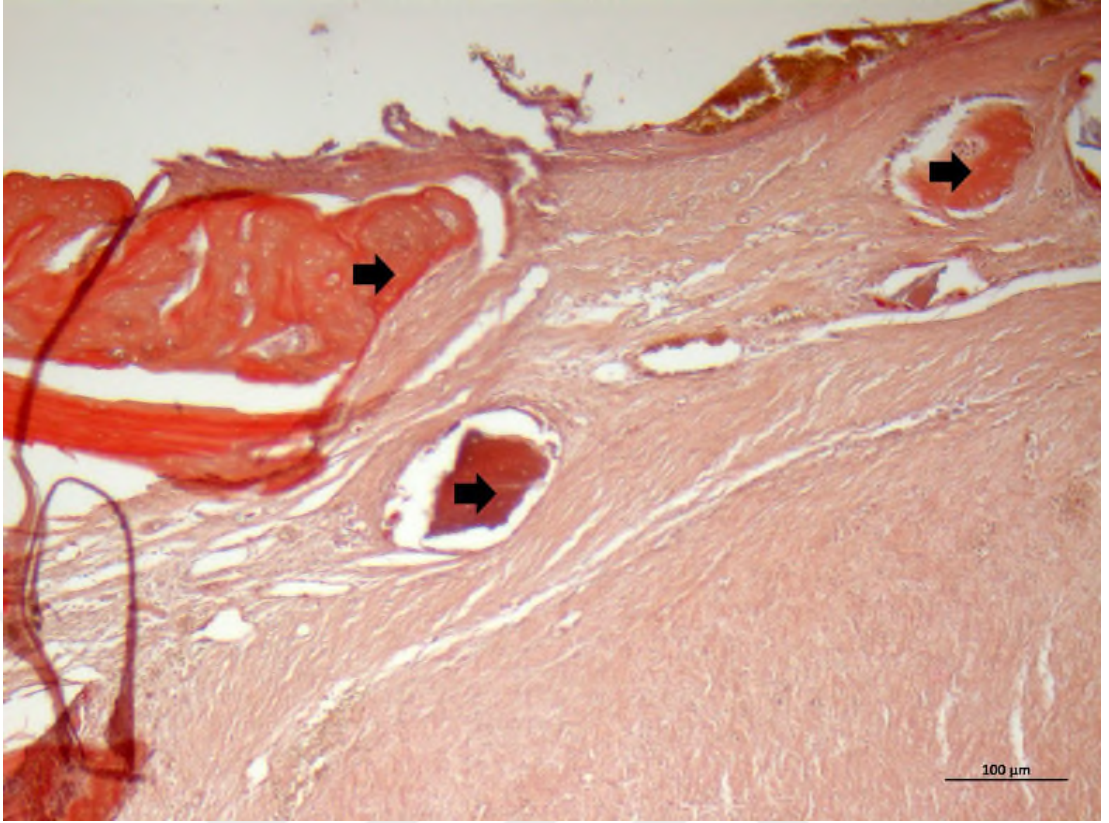
Şekil 4.13. 2. Hafta kontrol grubu, hafif düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.



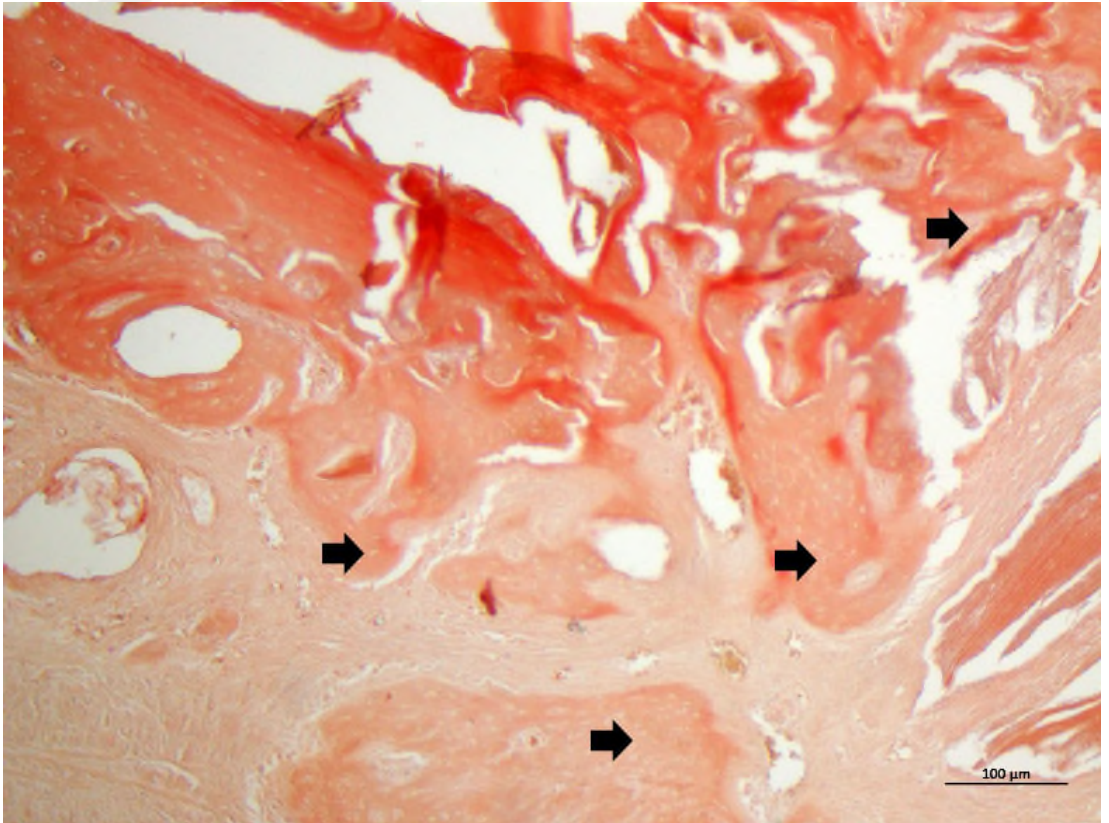
Şekil 4.14. 2. Hafta deney grubu, orta düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100μm.

4. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastik aktivitenin orta düzeyde olduğu görüldü (Şekil 4.15).

4. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastik aktivitenin şiddetli düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 4.16). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



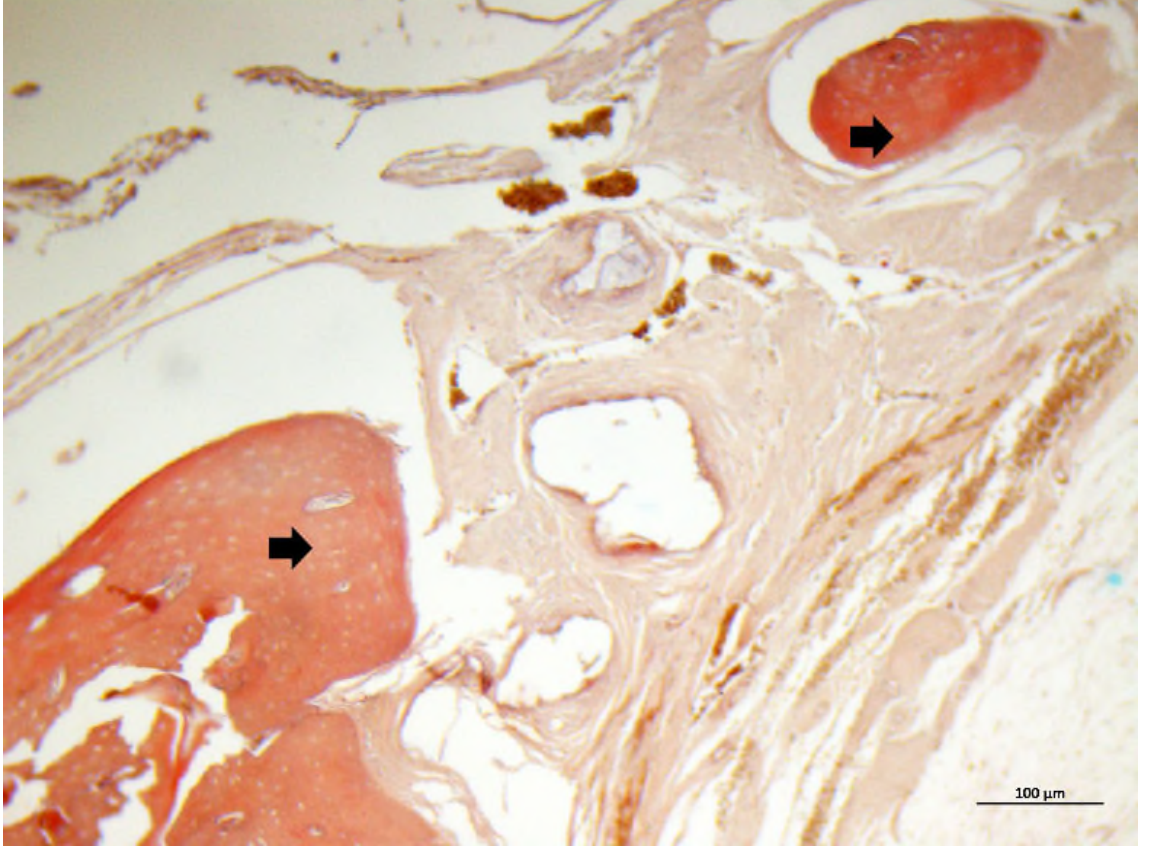
Şekil 4.15. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.



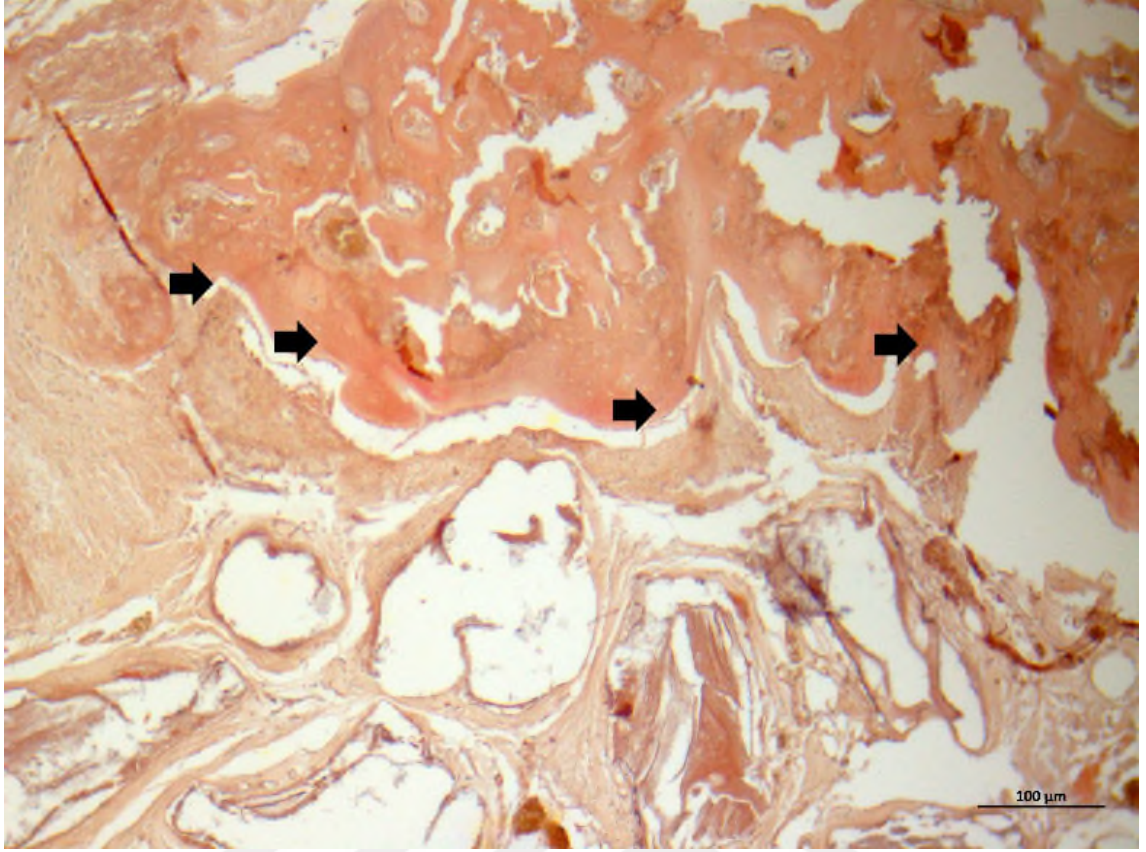
Şekil 4.16. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar),Congo Red, Bar:100µm.

8. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastik aktivitenin orta düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 4.17).

8. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastik aktivite şiddetli düzeyde gözlemlendi (Şekil 4.18). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



Şekil 4.17. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.



Şekil 4.18. 8. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde osteoblastik aktivite(kalın oklar), Congo Red, Bar:100µm.

Tablo 4.4. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki CR incelemelerindeki osteoblastik aktivite bulgularının skorlanması

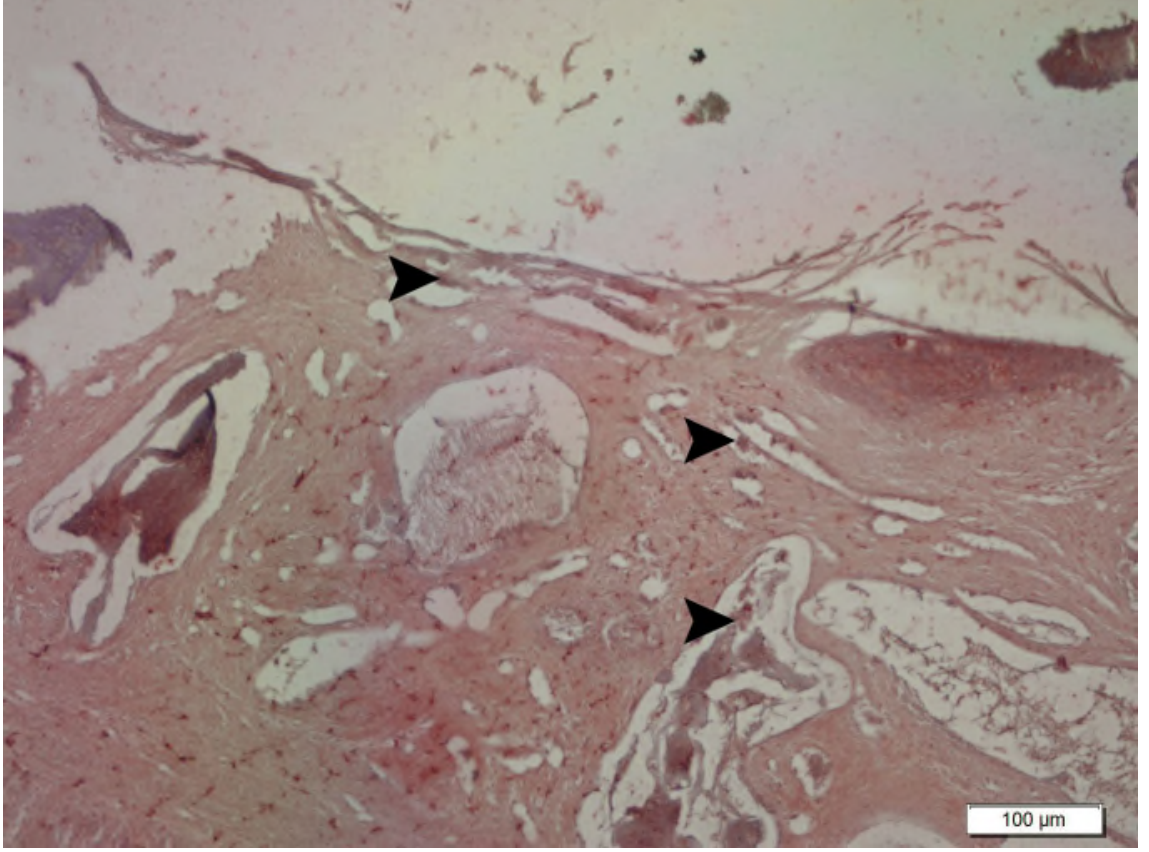
	Kontrol	Deney
2. hafta	+	++
4. hafta	++	+++
8. hafta	++	+++

4.3. İmmünohistokimyasal bulgular

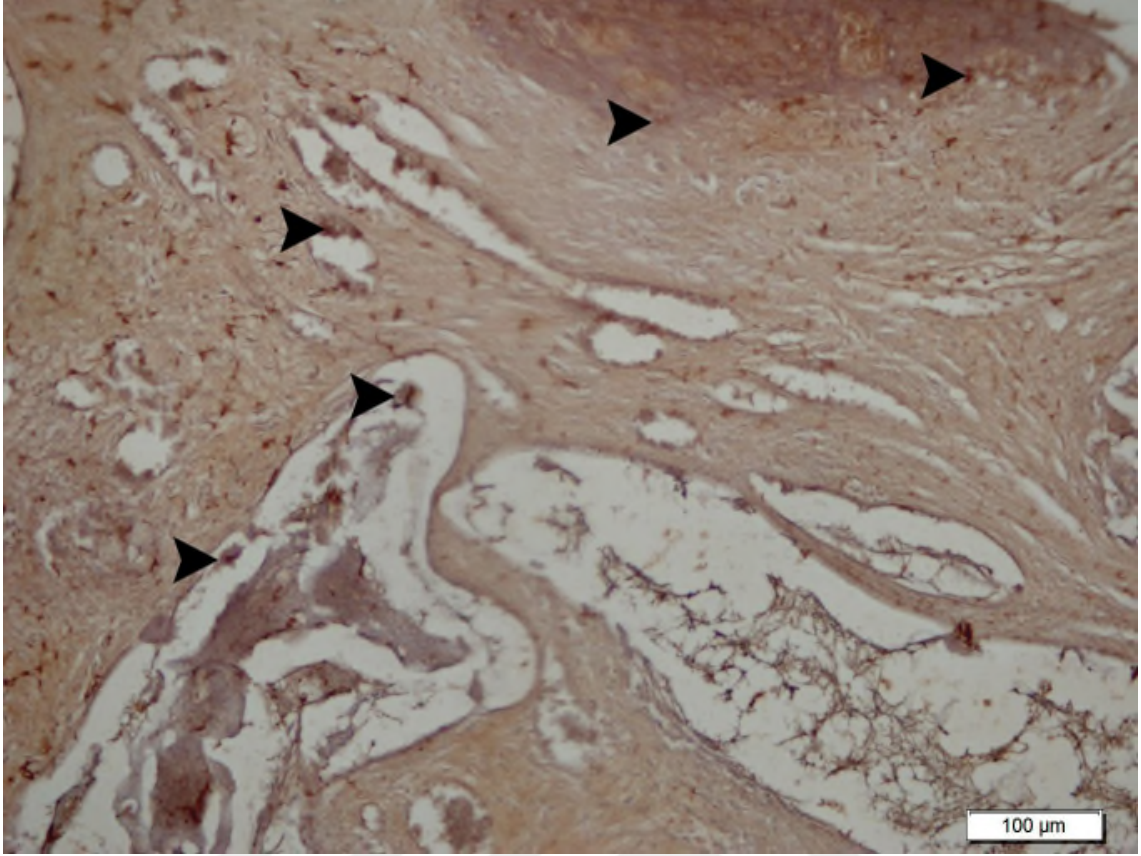
4.3.1. BMP boyamalarda;

2. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastlarda çok hafif düzeyde BMP-2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.19).

2. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastlarda orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.20). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



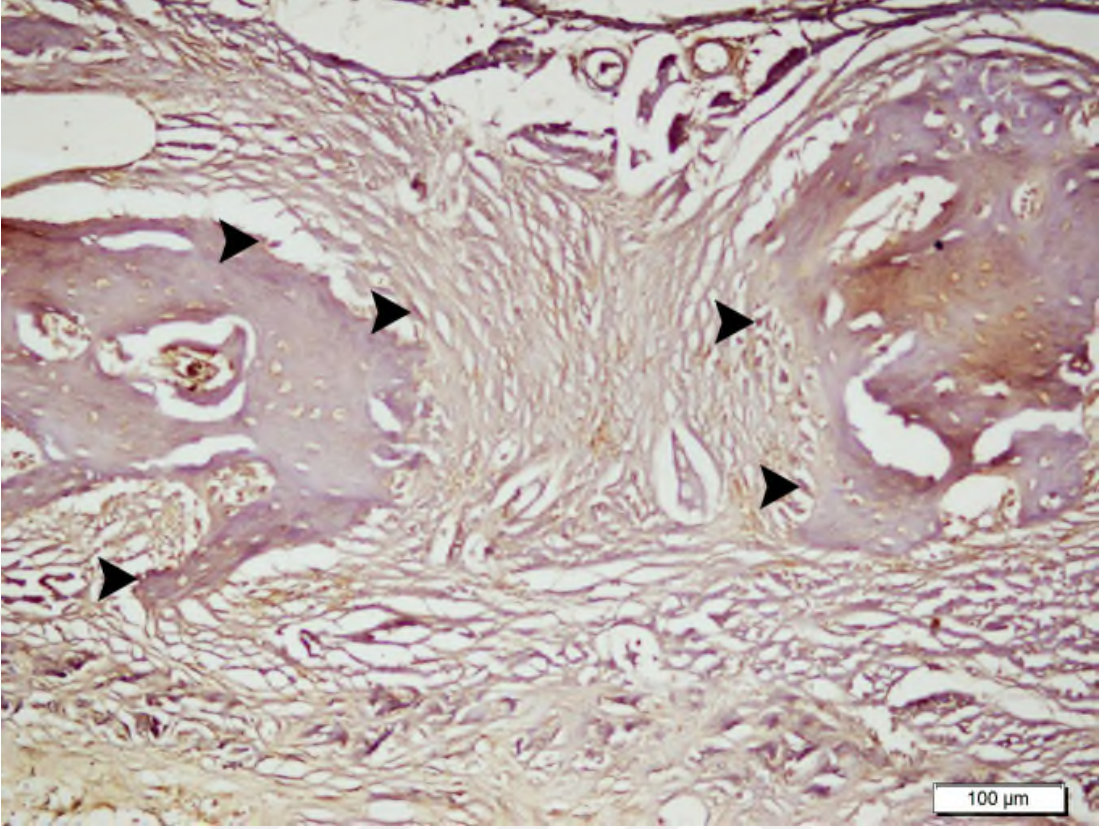
Şekil 4.19. 2. Hafta kontrol grubu, hafif düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.



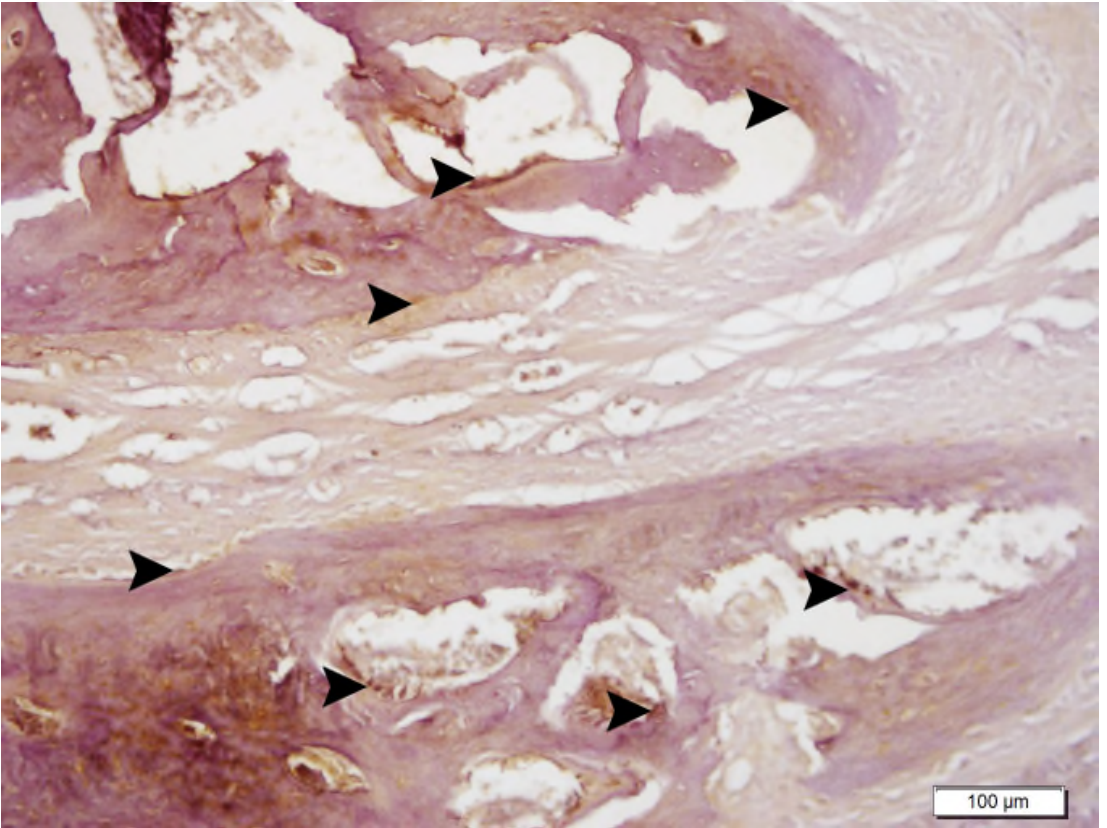
Şekil 4.20. 2. Hafta deney grubu, orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100μm.

4. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastlarda orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.21).

4. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastlarda şiddetli düzeyde BMP-2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.22). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



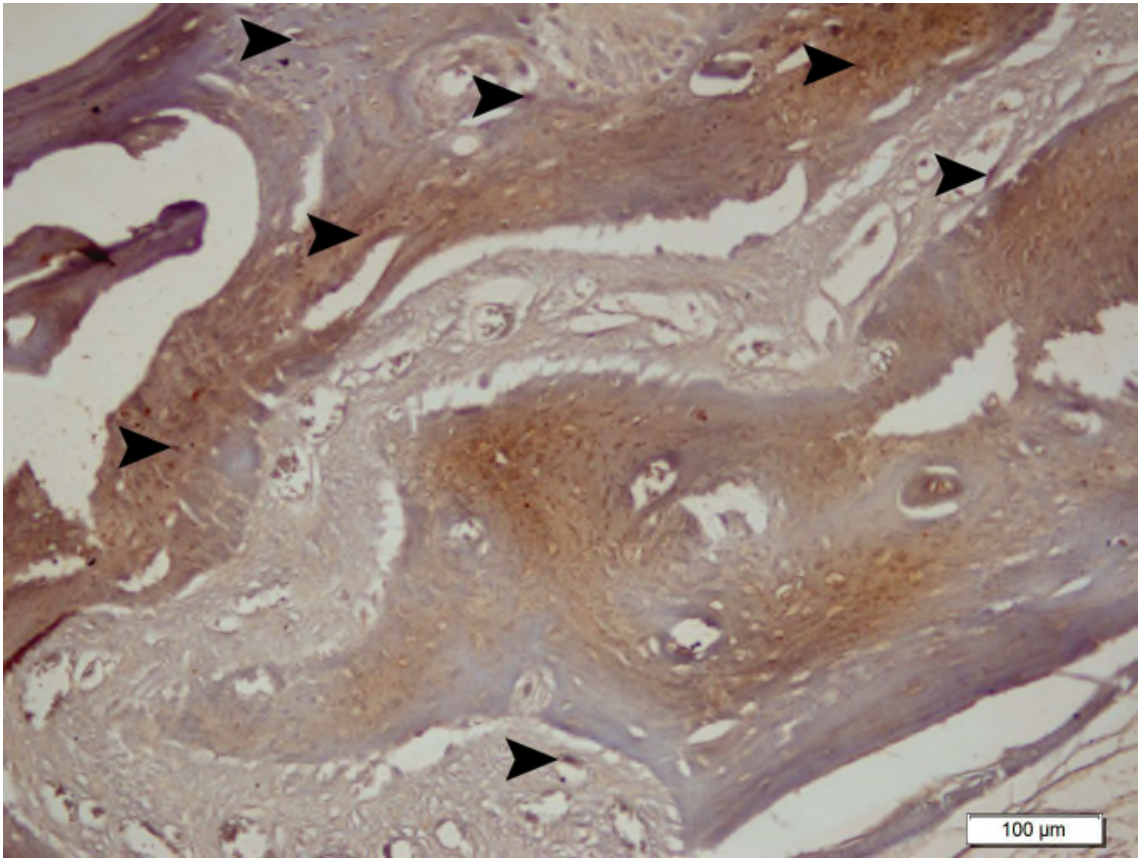
Şekil 4.21. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.



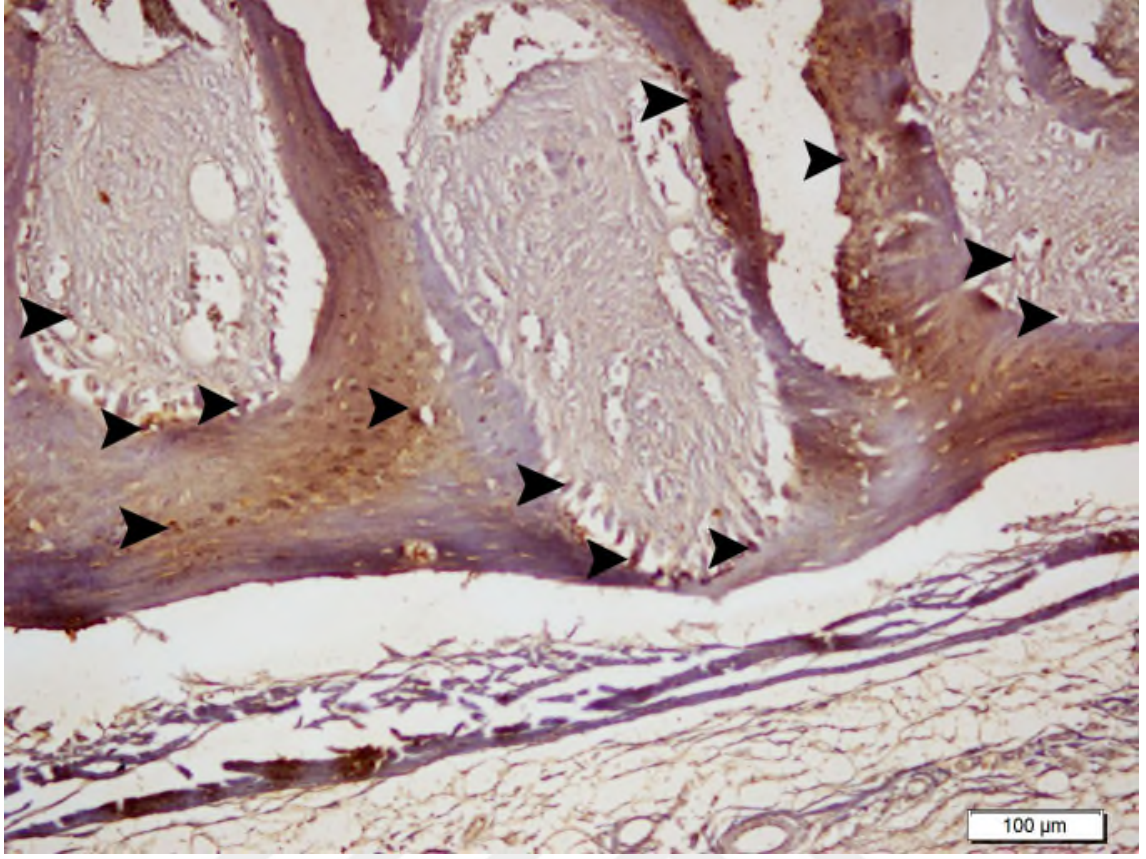
Şekil 4.22. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P, Bar:100µm

8. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastlarda orta düzeyde BMP-2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.23).

8. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, osteoblastlarda şiddetli düzeyde BMP-2 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.24). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



Şekil 4.23. 8. Hafta kontrol grubu, ortadüzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P , Bar:100µm.



Şekil 4.24. 8. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde BMP-2 ekspresyonu (ok başları), IHC-P, Bar:100μm

Tablo 4.5. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki BMP-2 ekspresyonu değerlerinin skorlanması

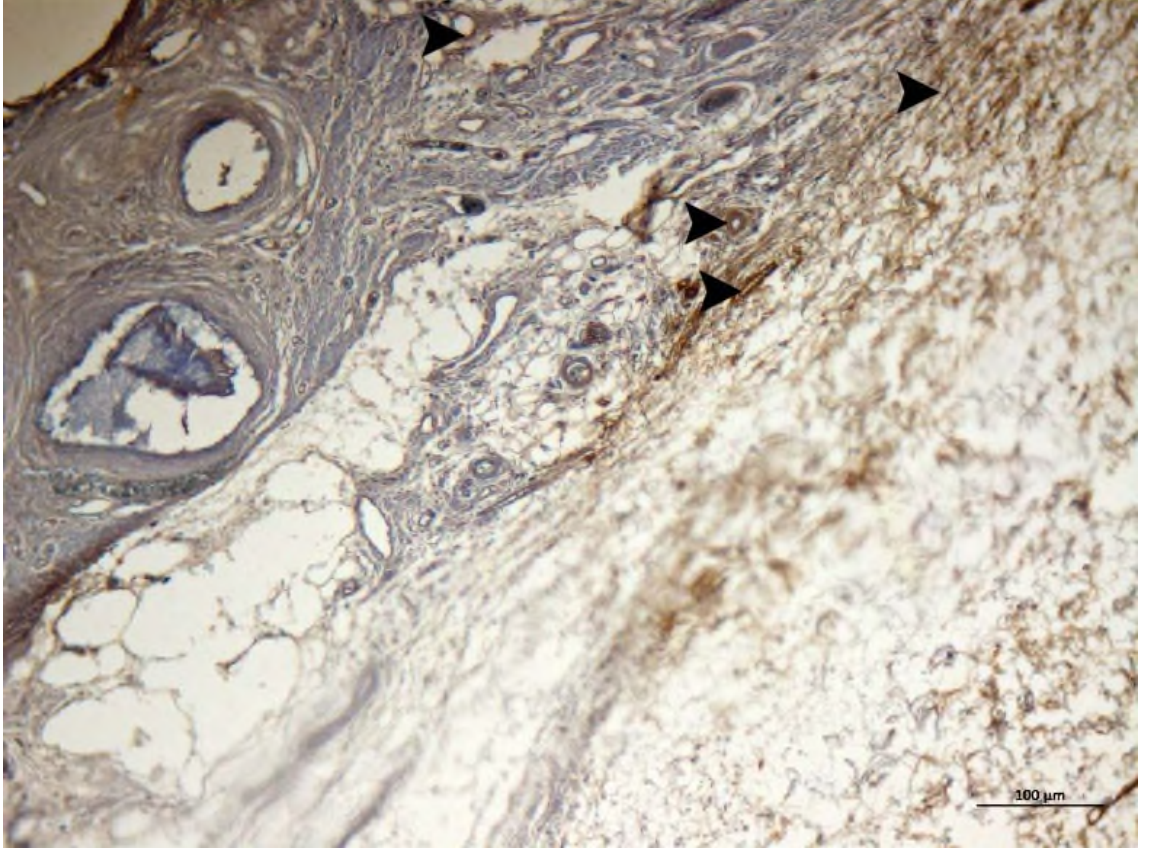
	Kontrol	Deney
2. hafta	+	++
4. hafta	++	+++
8. hafta	++	+++

4.3.2. TGF β1 Boyamalarda

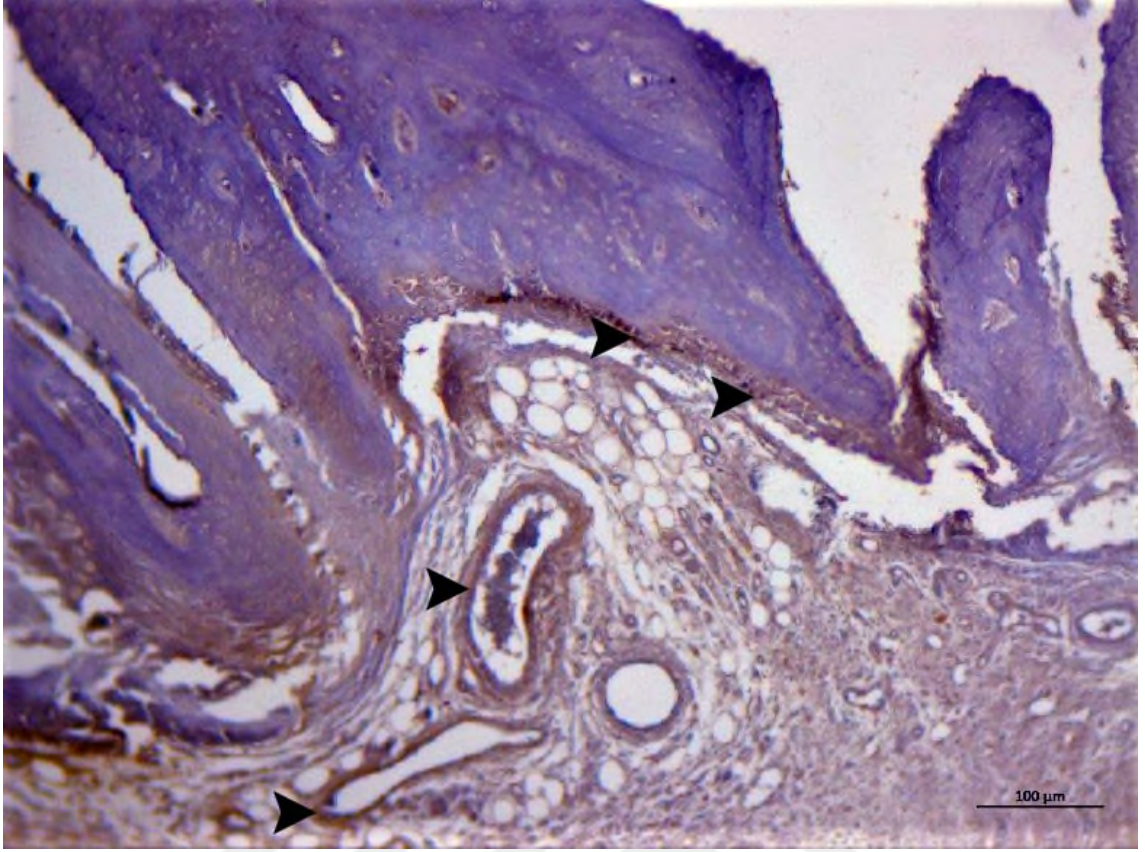
2. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, orta düzeyde TGF-β1 ekspresyonu damar endoteli hücrelerinden ve granülasyon doku hücrelerinde gözlemlendi (Şekil 4.25).

2. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, şiddetli düzeyde TGF-β1 ekspresyonu granülasyon dokusunda ve damar

edoteli hücrelerinde belirlendi (Şekil 4.26). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi ($p<0,05$).



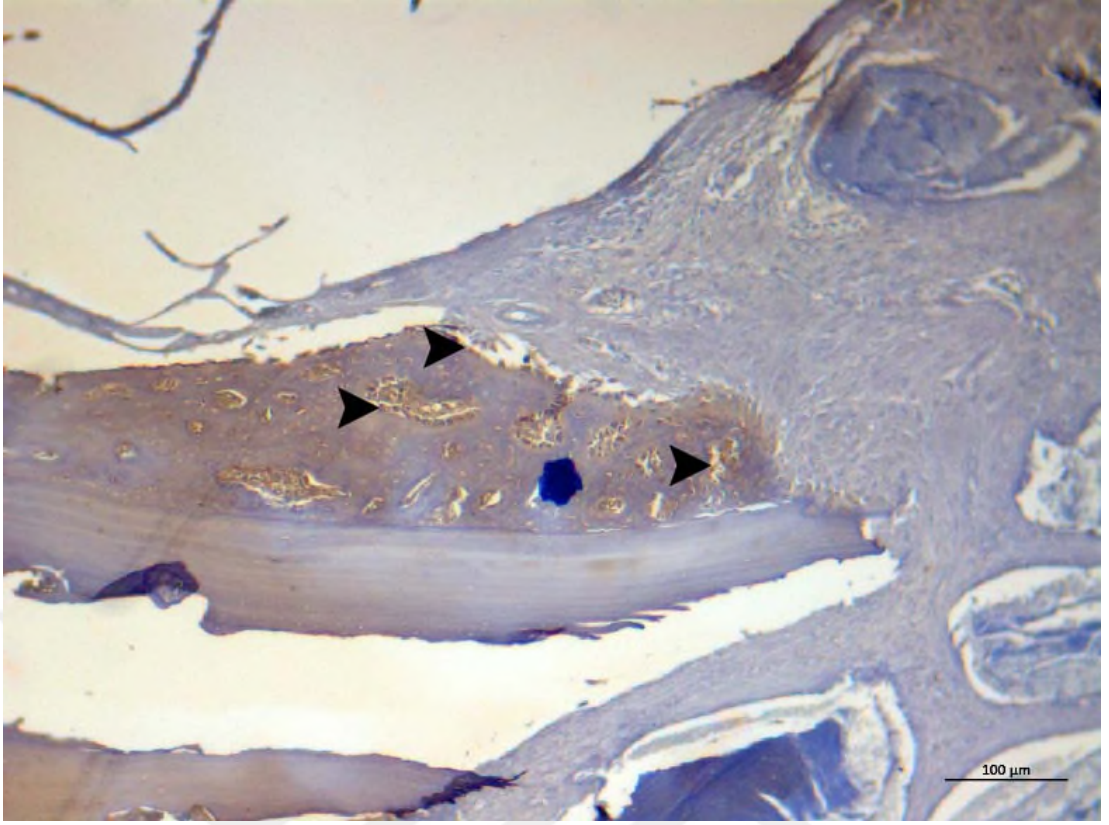
Şekil 4.25. 2. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P, Bar:100 μ m.



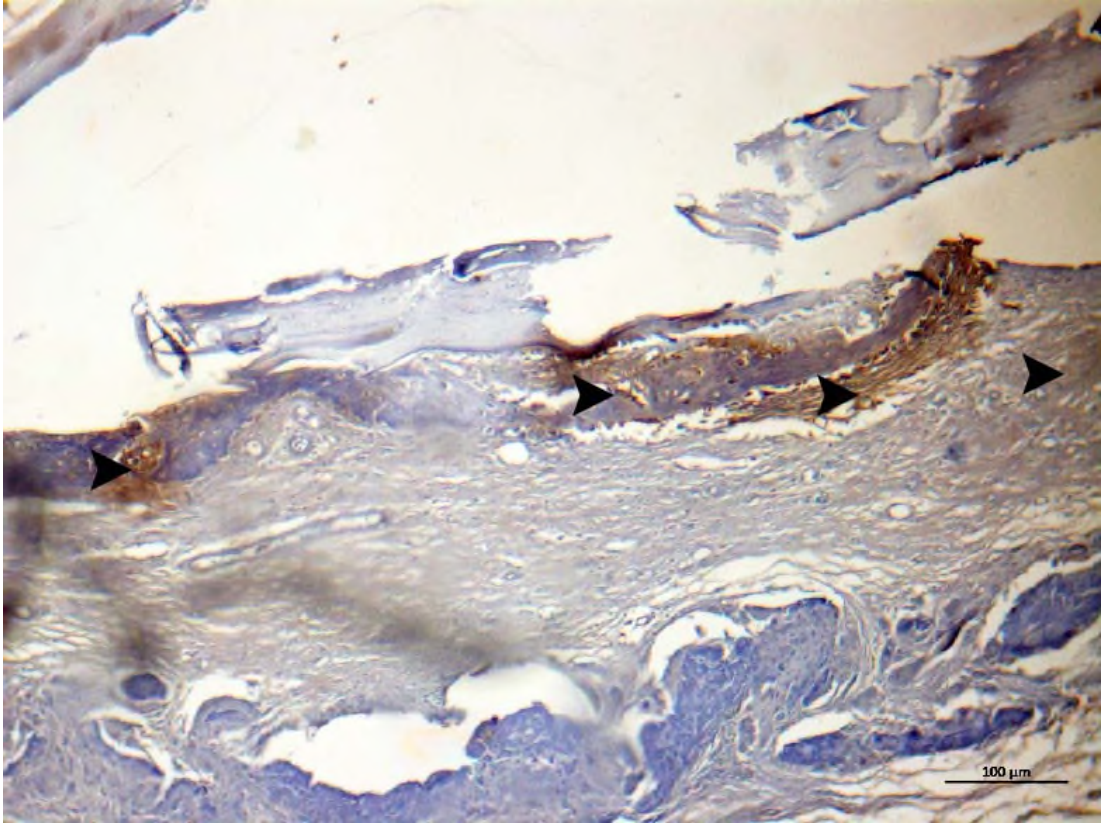
Şekil 4.26. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P , Bar:100 μ m.

4. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, granülasyon dokusu ve damar endotel hücrelerinde orta düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.27).

4. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, damar endotel hücrelerinde ve granülasyon dokusunda şiddetli düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.28). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



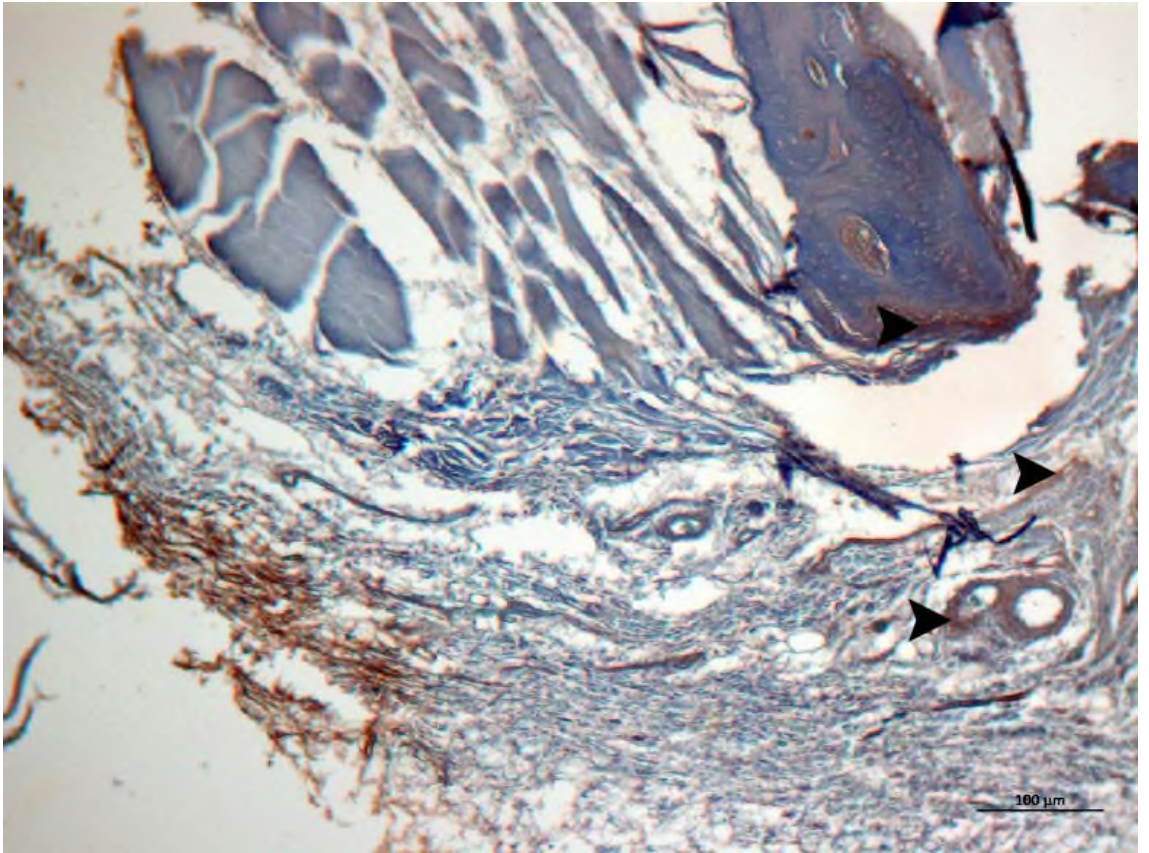
Şekil 4.27. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P, Bar:100μm



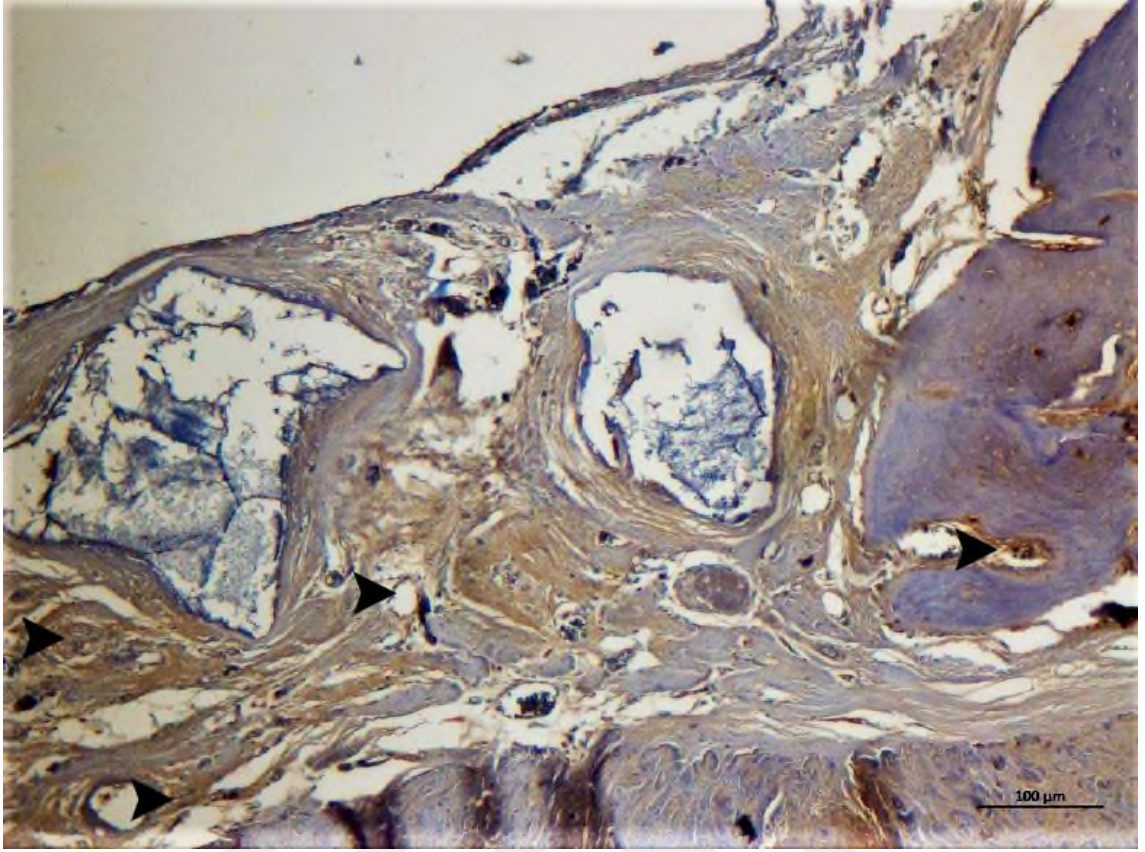
Şekil 4.28. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde TGF-β1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P, Bar:100μm

8. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, damar endotel hücrelerinde ve granülasyon dokusunda orta düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.29).

8. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, granülasyon dokusu ve damar endotel hücrelerinde hafif düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu belirlendi(Şekil 4.30). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



Şekil 4.29. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P, Bar:100 μ m



Şekil 4.30. 8. Hafta deney grubu, hafif düzeyde TGF- β 1 ekspresyonu (ok başı), IHC-P, Bar:100 μ m

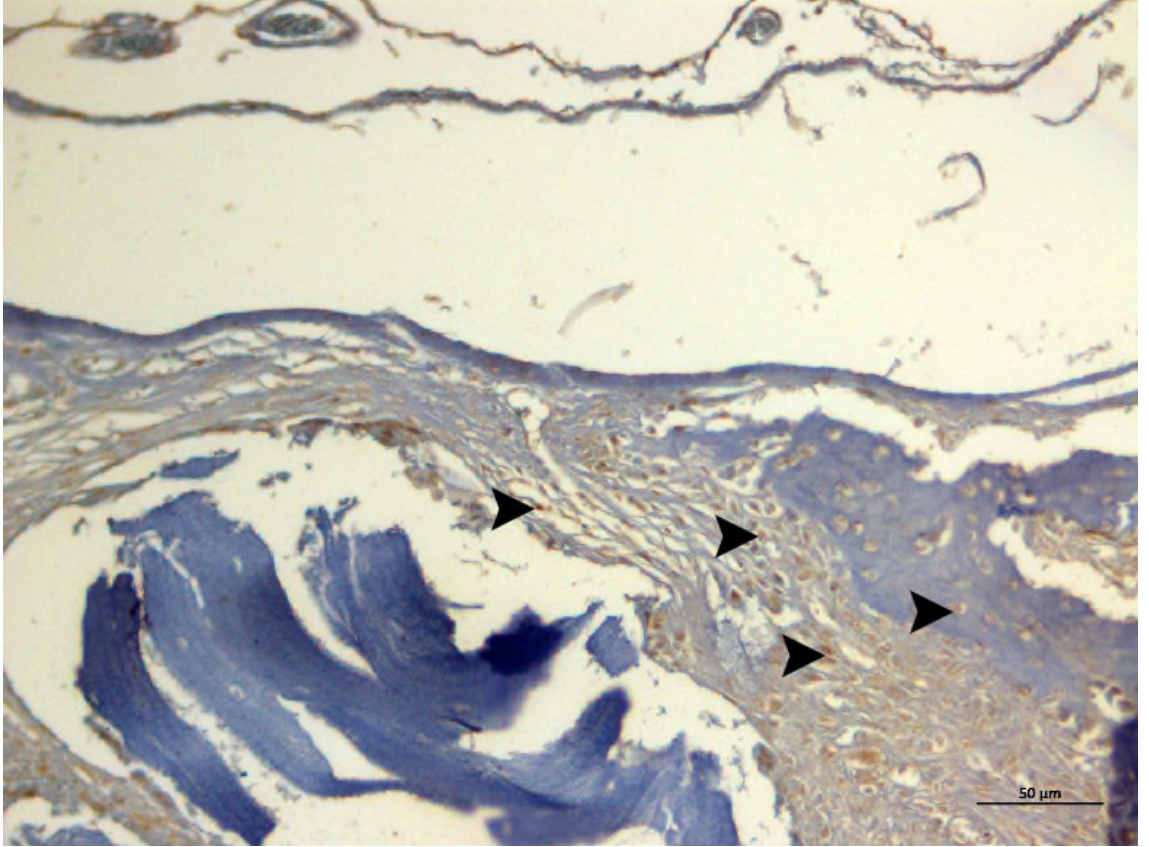
Tablo 4.6. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki TGF- β 1 ekspresyonu değerlerinin skorlanması

	Kontrol	Deney
2. hafta	++	+++
4. hafta	++	+++
8. hafta	++	+

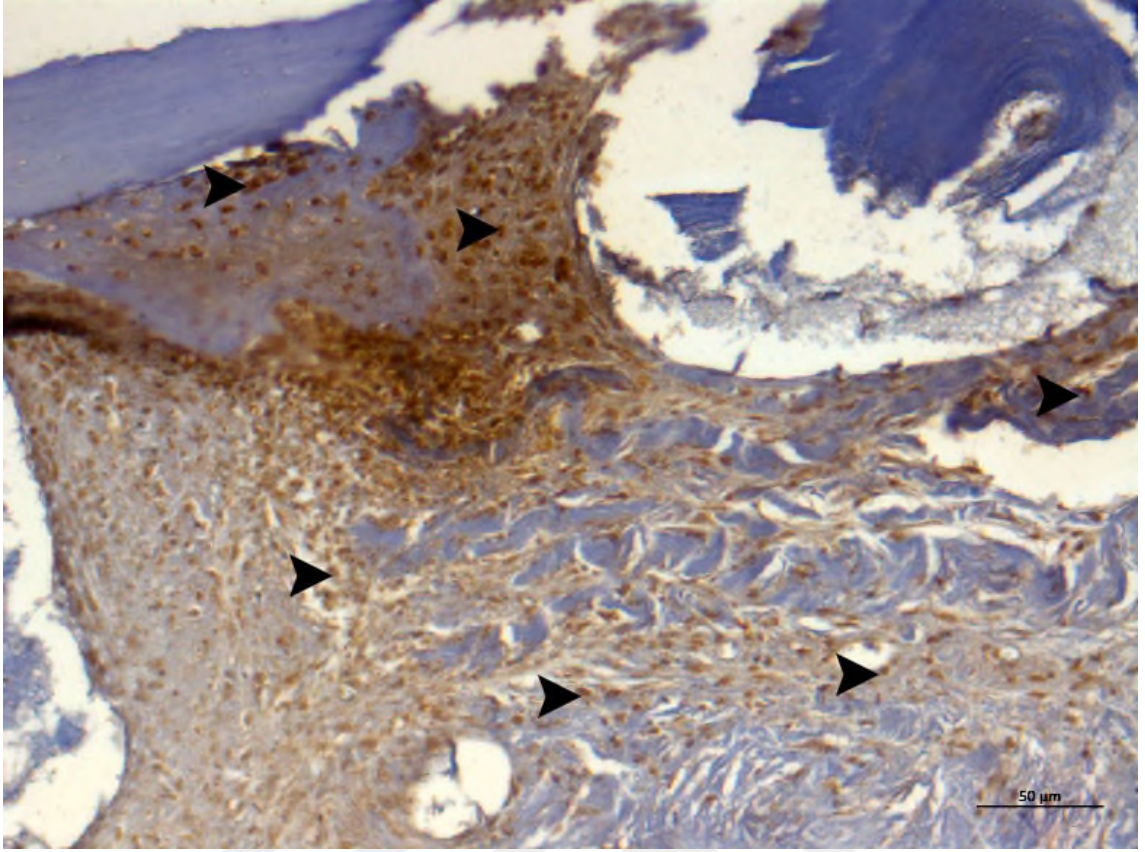
4.3.3. IL-6 Boyamalarda

2. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, yeni gelişmeye başlayan kemik dokudaki osteoblastlarda, damar endotellerinde, fibroblastlarda ve makrofajlarda orta düzeyde IL-6 ekspresyonu görülmüştür. (Şekil 4.31).

2. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, özellikle yangı (insizyon) hattında kemik iyileşmesinin aktif olduğu bölgede, osteoblastlarda ,granülasyon doku hücrelerinde, makrofajlarda ve damar endotellerinde şiddetli düzeyde pozitif IL-6 ekspresyonuna rastlandı (Şekil 4.32). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



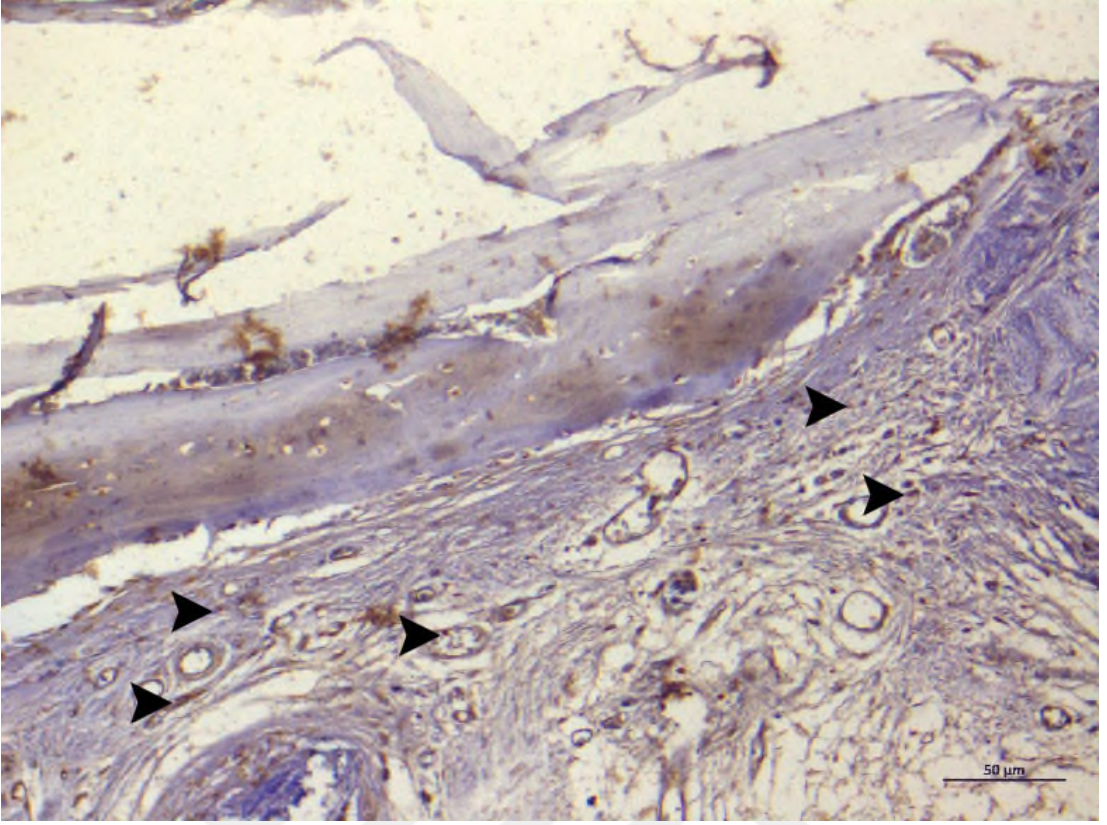
Şekil 4.31. 2. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P,Bar:50µm.



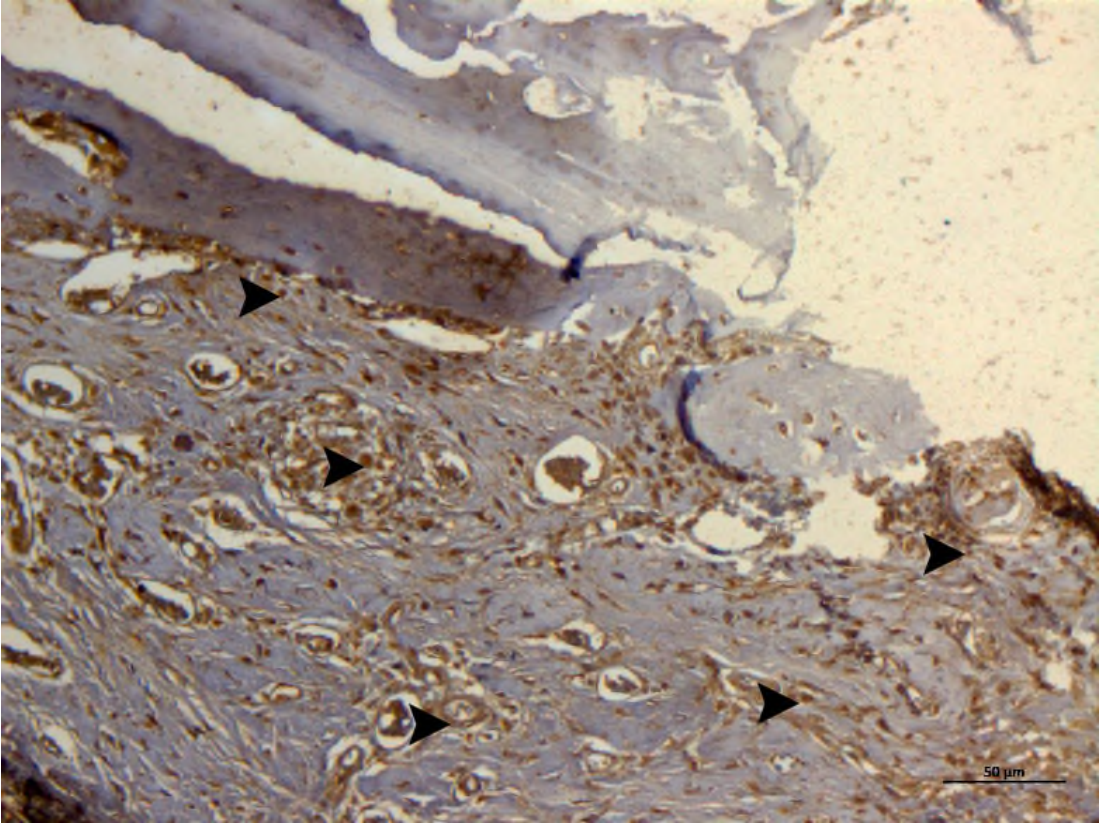
Şekil 4.32. 2. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P, Bar:50µm.

4. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, damar endotel hücrelerinde, osteoblastlarda, fibroblastlarda ve makrofazlarda orta düzeyde IL-6 ekspresyonları gözlemlendi (Şekil 4.33).

4. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, fibroblastlarda, osteoblastlarda, makrofajlarda ve damar endotel hücrelerinde şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu belirlendi(Şekil 4.34). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



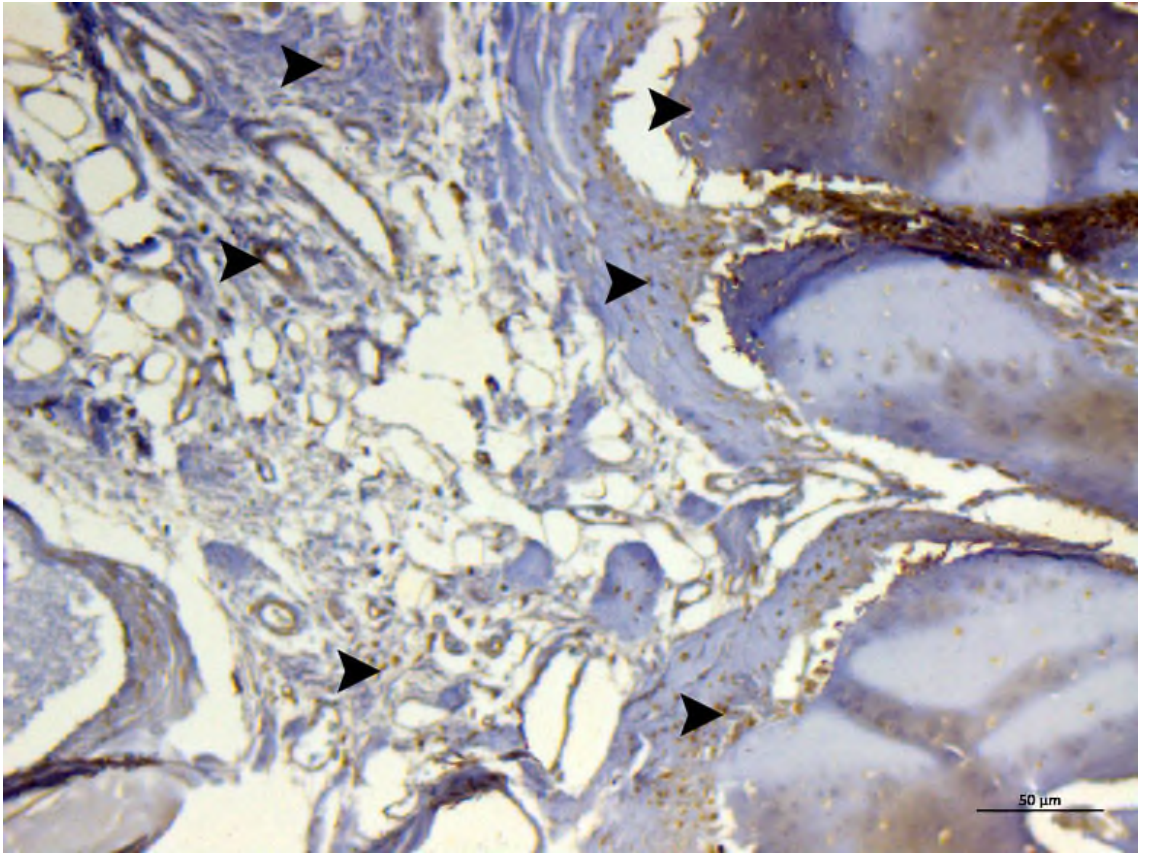
Şekil 4.33. 4. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P, Bar:50µm.



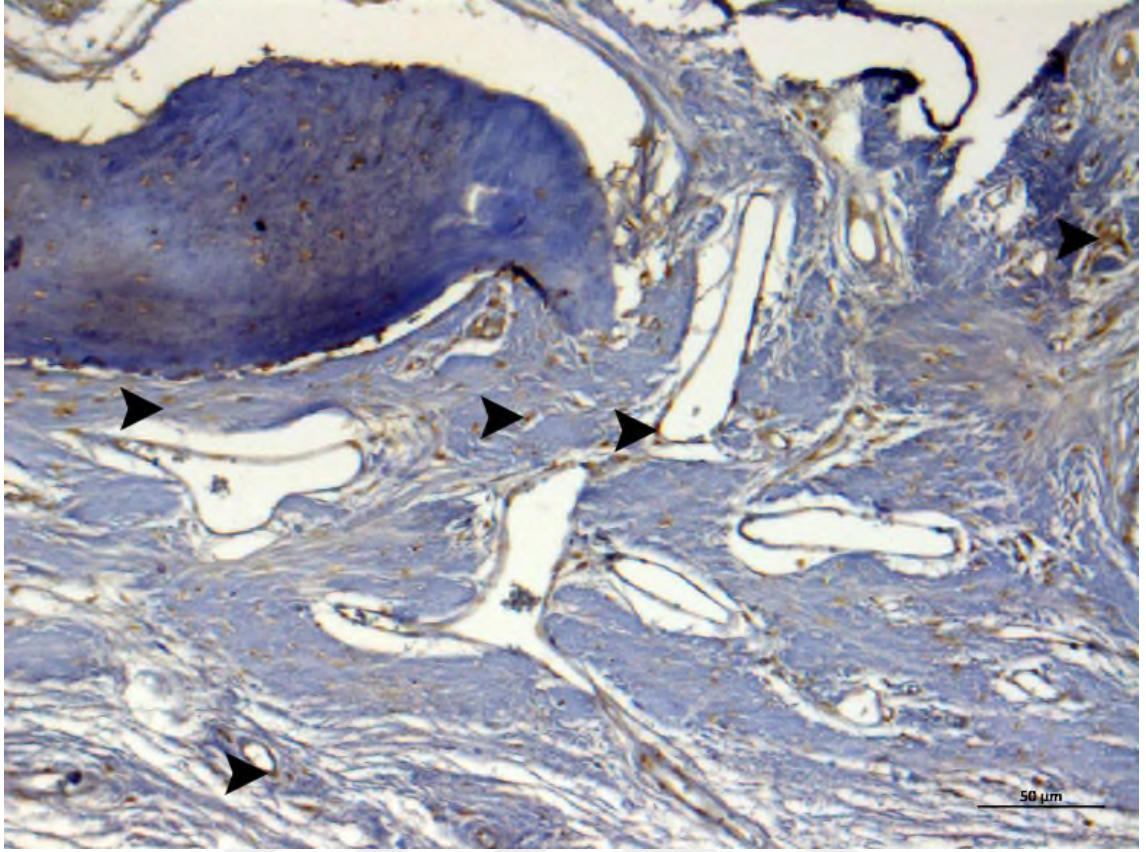
Şekil 4.34. 4. Hafta deney grubu, şiddetli düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P, Bar:50µm.

8. hafta kontrol grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, damar endotel hücrelerinde, makrofajlarda, osteoblastlarda ve fibroblastlarda orta düzeyde IL-6 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.35).

8. hafta deney grup: Bu grupta bulunan ratların kalvaryal kemik dokuları incelendiğinde, damar endotel hücrelerinde, makrofajlarda, osteoblastlarda ve fibroblastlarda hafif düzeyde IL-6 ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.36). Kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi($p<0,05$).



Şekil 4.35. 8. Hafta kontrol grubu, orta düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P, Bar:50µm.



Şekil 4.36. 8. Hafta deney grubu, hafif düzeyde IL-6 ekspresyonu (ok ucu),IHC-P,Bar:50µm.

Tablo 4.7. Kalvaryal kemikte tüm haftalardaki IL-6 ekspresyonu değerlerinin skorlanması

	Kontrol	Deney
2. hafta	++	+++
4. hafta	++	+++
8. hafta	++	+

4.4. Biyokimyasal bulgular

4.4.1. Aminotransferaz Enzim Değerleri

2. haftaki kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde, deney grubundaki AST ($p=0.041$) ve ALT ($p=0.026$) değer artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Mann-Whitney U testi) (Tablo 4.8).

4. haftada deney gruplarındaki Ca ($p=0.015$) ve P ($p=0.004$) değer artışı kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmuştur (Mann-Whitney U testi) (Tablo 4.8).

8 haftaki kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar değerlendirildiğinde, deney grubuna ait P değerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı farklılık sergilemiştir ($p=0.041$, Mann-Whitney U testi) (Tablo 4.8).

Deney gruplarının haftalar arasındaki farklılıkları değerlendirildiğinde, ALT istatistiksel olarak anlamlı farklılık sergilemiş ($p=0.011$, Kruskal-Wallis testi), bu farklılık 2. Haftadaki ALT değerlerinden kaynaklanmaktadır (Tablo 4.9).

Kontrol gruplarının haftalar arasındaki farklılıkları değerlendirildiğinde, Ca değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklılık sergilemiş ($p=0.006$, Kruskal-Wallis testi), ve bu durum 2. ve 4. haftalar arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır ($p=0.004$) (Tablo 4.9).

Tablo 4.8. Deney ve kontrol gruplarında haftalar arasındaki farklılıklar

Grup	Hafta	AST	p	ALT	p	Ca	p	P	p
Deney	2	223.83 ± 75.3		70.67 ± 9.18		12.08 ± 0.85		10.95 ± 1.14	
	4	156.67 ± 28.26	0.079	52 ± 5.66	0.011	11.02 ± 0.66	0.05	10.42 ± 0.95	0.473
	8	154.33 ± 30.01		51.67 ± 6.22		11.03 ± 0.58		10.4 ± 0.98	
Kontrol	2	142.33 ± 41.02		55.33 ± 8.87		11.53 ± 0.73		9.6 ± 0.77	
	4	134.33 ± 42.39	0.842	55.83 ± 10.46	0.86	10 ± 0.78	0.006	8.28 ± 1.12	0.119
	8	139.67 ± 43.07		58.5 ± 8.19		10.77 ± 0.43		8.8 ± 0.99	

Tablo 4.9. 2., 4. ve 8. Haftadaki kontrol ve deney grupları arasındaki farklılıklar

Hafta	Grup	AST	p	ALT	p	Ca	p	P	p
2	Deney	223.83 ± 75.3	0.041	70.67 ± 9.18	0.026	12.08 ± 0.85	0.31	10.95 ± 1.14	0.065
	Kontrol	142.33 ± 41.02		55.33 ± 8.87		11.53 ± 0.73		9.6 ± 0.77	
4	Deney	156.67 ± 28.26	0.394	52 ± 5.66	0.31	11.02 ± 0.66	0.015	10.42 ± 0.95	0.004
	Kontrol	134.33 ± 42.39		55.83 ± 10.46		10 ± 0.78		8.28 ± 1.12	
8	Deney	154.33 ± 30.01	0.31	51.67 ± 6.22	0.093	11.03 ± 0.58	0.394	10.4 ± 0.98	0.041
	Kontrol	139.67 ± 43.07		58.5 ± 8.19		10.77 ± 0.43		8.8 ± 0.99	

4.4.2. Antioksidan enzim aktivitelerinin ve lipid peroksidasyon bulgularının incelenmesi (GSH, MDA)

Tüm grupların kan dokusunun oksidatif stres parametreleri Tablo 4.10'te sunulmaktadır. Kontrol ve deney gruplarının tüm zamanlardaki (2.,4. ve 8. hafta) MDA ve GSH seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olmadığı saptanmıştır ($P > 0.05$) (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. MDA ve GSH seviyeleri arasındaki farklılıklar

Hafta	Grup	MDA	GSH
2.hafta	Kontrol	4.49±0.2	0.09±0.001
	Deney	4.38±0.29	0.1±0.004
4.hafta	Kontrol	4.33±0.19	0.09±0.005
	Deney	4.73±0.28	0.1±0.005
8.hafta	Kontrol	4.57±0.08	0.09±0.004
	Deney	4.42±0.14	0.09±0.005
p		0.779	0.825

5. TARTIŞMA

Kemik doku üzerinde inceleme yapan bir çok araştırmacı, onarımı hızlandırmak ya da rekonstrüksiyonu sağlamak amacıyla kullanılabilecek greft veya benzeri alloplastik materyallerin, çok daha hızlı ve çok daha düşük komplikasyon oranıyla kemikle bütünleşmesine olanak sağlayacak yöntemler üzerinde çalışmışlardır. Özellikle maksillofasiyal alan cerrahilerinde büyük kemik kayıplarının onarımı zor olmaktadır. Araştırmacılar, kemik onarımı ile ilgili problemleri gidermek amacıyla hayvansal deney modelleri oluşturarak bunlar üzerinde çalışmalar yapmaktadırlar.

Kemik defekt onarımını değerlendirmek amacıyla literatürde farklı defekt modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.^{172, 173} Deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan femur kemik defekt modeli, osteoindüktif veya osteokondüktif ya da daha farklı yapıdaki materyallerin salınım-perfüzyon özelliklerinin değerlendirilmesi için uygun bir kullanıma sahip uzun kemik modelidir.^{174, 175} İstenilen osteojenik ajanın yerleştirilebildiği radius kemik defekt modeli ise, distraksiyon ya da mekanik veya fonksiyonel testlerin uygulanabilirliği açısından avantajlıdır.¹⁷² Çok sık kullanılan bir model olmayan zigoma kemik defekti modeli, fasiyal bölgedeki defektlerin incelendiği çalışmalarda alternatif bir model olarak kullanılmaktadır.¹⁷³

Deneysel çalışmalarda en çok kullanılan model, tavşan ve sıçan kafatası defekti modelidir. Histing ve ark., rat ve farelerin kemik defekti modellerinde haversian kanal sistemine sahip olmamalarından dolayı eksik görülmelerine rağmen, küçük boyutlarda olmalarından, oda sıcaklığının, nemin ve yemin standardize edilebilmesinden ve düşük maliyetlerde olmalarından dolayı avantajlı olduklarını belirtmişlerdir. Tüm bu avantajlar düşünüldüğünde, sunulan çalışmada deney hayvanı olarak rat tercih edilmiştir.¹⁷⁶

Morfolojik ve embriyolojik olarak bir membran proçesinden gelişen kalvarya, membranöz yolla gelişen yüz kemikleriyle benzerlik göstermesinden, anatomik olarak iki

kortikal tabaka içermesinden ötürü mandibulayla benzer olmasından⁴¹, fizyolojik olarak atrofik bir mandibulayı andırmasından dolayı maksillofasiyal deneysel cerrahi uygulamalarının önemli bölgelerinden biri olarak görülülen bir kemik defekt modelidir.³⁹ Kalvaryal defekt modeli, standart defektlerin tek tip ve tekrar oluşturulabilmesi, ameliyat sırasında işlem yapılırken ve bu defektlerin histolojik, radyografik analizi sırasında kolaylık sağlaması, anatomik lokasyonunun kolay ulaşılabilir olması, duranın ve alttaki cilt yapısının biometaryaller için eksternal ve internal fiksasyon gerekmeden yeterli desteği sağlaması, greftlenmiş bölümlerin kontrolle karşılaştırabilmesinin mümkün olması gibi sebeplerden dolayı araştırmacılar arasında yaygın olarak kullanılmaktadır.¹⁷⁷⁻
¹⁷⁹ Parietal bölgede oluşturulan defektlerin tabanında bulunan dura materin ve periostun osteoprogenitör hücreleri içerdiği dolayısıyla da duranın kemikleşmede etkin rol oynadığı rapor edilmiştir.¹⁸⁰ Tüm bu avantajlar, sunulan çalışmada rat kalvaryal defekt modelinin tercih edilmesinde rol oynamıştır.

Kafatası defekti çalışmalarında önemli kriterlerden biri defektin boyutudur. Hayvanlarda kemik defektleri altı ay gibi bir sürede tedavi verilmeksizin kendiliğinden iyileşebilir. Kendiliğinden iyileşemeyen kritik boyutlu defekt yapmak modelin temel noktasıdır.⁴² Defekt boyutunun belirlenmesi üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Schmitz ve ark. 3, 4 ve 8 mm'lik defektler oluşturarak gerçekleştirdikleri çalışmada ideal defektin 8 mm olduğunu savunurken¹⁸¹, Takagi ve ark. 8 mm'lik defektlerin 6 aylık süreçte 5 mm'ye düştüğünü bildirmişlerdir. Üzerinde tam olarak fikir birliği olmamasına rağmen yapılan başka bir çalışmalarda kritik defekt boyutu ratlar için yaklaşık olarak 5 mm olarak bildirilmiştir.⁴³ Defekt boyutuyla ilgili olarak ortak bir görüş olmaması ve literatür çalışmalarının çoğunluğunda kullanılması gibi nedenlerden dolayı sunulan çalışmada literatürle uyumlu olarak 5 mm'lik defektler tercih edilmiştir.

Deneysel hayvan modeli olarak seçilen ratların, insandakinin iki katı hızda kemik onarımına sahip olmalarından dolayı çalışma süresi kısaltmaktadır.¹⁸² Ratlardaki kemik dikkate alındığında 8 haftalık bir süre, ölçülebilir kemik onarımının yapılabilmesi için yeterli bir zaman olarak gösterilmiştir.^{183, 184} Erken dönem yeni kemik oluşumunun, osteoblastik proliferasyon ve kollajen yapımı dikkate alınarak incelendiği birçok çalışmada genellikle ratlar ilk olarak ikinci haftada sakrifiye edilmişlerdir.¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ Yeni oluşan kemiğin artışı ve kalsifiye olmaya başlamasını görmek amacıyla birçok çalışmada 4. hafta ara değerlendirme, 8. hafta ise son değerlendirme dönemi olarak seçilmiştir.¹⁸⁸⁻¹⁹⁰ Tüm bu nedenlerden dolayı sunulan çalışmada, literatürle uyumlu olarak değerlendirme zamanlamaları 2., 4. ve 8. hafta olarak seçilmiştir.

Kemik dokuda onarım potansiyeli güçlü olmasına rağmen, bazı durumlarda defekt boyutunun büyüklüğünden kaynaklanan rejenerasyon yetersizliği meydana gelmektedir. Bunun sebebi ise, defektin etrafındaki bağ dokudaki hücre proliferasyonu ve migrasyonunun kemik dokusundan daha hızlı gerçekleşerek bağ dokunun defekt bölgesini işgal etmesidir. Bundan dolayı, defekt bölgesinde iskelet görevi üstlenen kemik greftlerinin kullanımı üzerine çalışmalar yapılmaktadır.¹⁹¹

Kemik defektlerinin onarımı için geleneksel olarak uygulanan otojen kemik grefti altın standarttır. Ancak iyileşmesindeki yüksek başarısına rağmen sınırlı miktarda ulaşım, donör bölge problemi, ikinci bir cerrahi alanı gerektirmesi gibi dezavantajlarından dolayı araştırmacıları alternatif yöntemlere yönlendirmiştir. Günümüzde alternatif olarak kullanılabilen metaryaller; ksenogreft, allogreft ve alloplastik greft gibi materyalleri kapsamaktadır.^{3, 192}

Alıcı ve vericinin farklı türlerden olduğu ksenogreftler, çoğunlukla memeli hayvanlardan (at, sığır, domuz gibi) ya da mercanlardan elde edilir. En çok tercih edilen türü ise sığır kaynaklı greftlerdir.⁶⁵ Yapılan deneysel incelemelerde bu greft türünün

ideal bir yapı iskeleti olduğu gösterilmiştir. Alıcı sahadaki osteojenik hücrelerin rehberliğinde kemikte büyüme başlangıcı olmaktadır ve greft partiküllerini bir araya getiren daha sonrasında lameller kemiğe dönüşecek olan örgü kemikten meydana gelen köprüler oluşmaktadır.^{67, 68} İnsan kansellöz kemiğine yapısal olarak çok benzeyen sığır kaynaklı ksenogreftler, osteokondüksiyon ve biyouyumluluk özelliklerine sahip olmasından dolayı günümüzde çeşitli cerrahi operasyonlarda sıkça kullanılmaktadır.^{4, 5} Ksenogreftlerin hızlı bir biçimde konakçı kemikle yer değiştirdiğini gösteren raporlara karşın çok yavaş bir şekilde rezorbe olduğu veya hiç rezorbe olmadan uzun süre varlığını sürdürebileceğini savunan çalışmalar daha baskındır.⁶⁹⁻⁷¹ Ksenogreftlerin blok formları, plastik ve rekonstrüktif cerrahi ile maksillofasiyal cerrahide onlay greftleme için kullanılırken, granül formları periodontal kemik defektlerinde, çekim soketlerinde ve küçük kist cerrahilerinde başarılı bir şekilde hem fonksiyonel hem de estetik kayıplarda kullanılmaktadır. Daha güçlü materyallerle kombine olarak da kullanılabilirler.^{57, 72} Tüm bu avantajlarıyla beraber maksillofasial cerrahide en çok kullanılan greft materyali olması göz önüne alınarak sunulan çalışmada ksenogreft, greft materyali olarak seçilmiştir.

Diğer taraftan, kullanılan greft materyali kadar önemli olan bir konu uygulanan greft materyalinin alıcı bölgedeki stabilizasyonudur. Greftin alıcı bölgedeki stabilizasyonu, defekt onarımı, kemik rejenerasyonu veya kemik augmentasyonu için, kullanılan materyalin kemikleşme potansiyeli veya yeni oluşacak kemik yapıya izin vermesi açısından son derece önemlidir. Greftin alıcı bölge içindeki stabilitesini sağlamak için, kullanılan en önemli yöntemlerden biri greft fiksasyonu sağlanarak alıcı ve greft ara yüzünde artmış bir sıkışma kuvveti ile greftin stabilize edilmesidir.⁶ Greftin yetersiz stabilitesi, rekonstrüksiyonun çökmesine, psödotrozise, deformitenin rekürrensine yol açabilir.⁷ Kemiğin tek ya da kombine biyomateryallerle greftlenmesi,

mekanik stabilite için yapısal açıdan büyük öneme sahiptir ve greft kullanımı kemik onarımındaki yanıtta, kemik stimülasyonunu ve güçlendirilmesini içerecek şekilde geliştirilmiştir.⁶ Bu konuyla ilgili araştırmalar hala devam etmektedir.

Otolog kemik greftlerinin hastaya yüklediği morbidite ve allogreftlerin maliyetinin yüksek olması nedeniyle elde edilebilirliği kolay ve immünolojik yanıtı az olan biyoaktif materyallere yönelim artmıştır. Polietersülfon nano lifleri, polikaprolakton, hidroksiapatit / trikalsiyum fosfat , gelfoam cerrahi süngerleri, hücresizleştirilmiş kemik iskeleleri, kalsiyum fosfat çimentosu , tip I kollajen, hidroksiapatit / kollajen / kitosan, kalsiyum sülfat, büyüme faktörleri (BMP, TGF,... vs.), mezenşimal stromal hücreler¹⁹³, rekombinant biyosentetik büyüme hormonları¹⁹⁴ ve trombosit zengin fibrin (PRF)¹⁹⁵ gibi geçmişten günümüze araştırılan veya güncel birçok biyometaryal üzerinde çalışılmaktadır.

Bu güncel biyomateryallerden biri olan ve eksojen olarak uygulanabilen kollajen biyometaryalinin; çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu, immünoterapetik ve osteoindüktif faktörler için (BMP, TGF, IGF ve FGF gibi) saklayıcı ajan olduğu, adezyonu, proliferasyonu, diferansiasyonu teşvik ettiği, osteokondüktif özellikte olduğu, TGF- β ve BMP'ler de dahil olmak üzere kemiği düzenleyici büyüme faktörlerine ve matriks proteinlerine bağlandığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.⁸⁻¹⁰ Özellikle bu bağlanma osteoblastik diferansiasyonun gerçekleşmesini sağlayabilir. Kollajenin sahip olduğu bu gibi özelliklerden dolayı, kemik defekti iyileşmesi üzerine olan etkilerini değerlendirmek için çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Bazı araştırmacılar kollajenin osteogenezi arttırdığına ait herhangi bir kanıt bulamamışlardır.⁶⁸ Buna rağmen bazı araştırmacılar tarafından ise lokal uygulanan kollajenlerin, doku onarımında etkili olduğu bildirilmiştir. Yine birçok araştırmacı, kollajenin vücut tarafından tolere edilebildiği ve nontoksik bir materyal olduğunu, ayrıca çok güçlü hemostatik etkilerinin olduğunu

belirtmişlerdir.^{196, 197} Aynı zamanda stabilizasyonun artırılması amacıyla kollajen içerikli çeşitli ürünler hali hazırda kullanıma sunulmaktadır.

Eksojen olarak uygulanabilen kollajenin kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri yapılan araştırmalarda halen tam bir netliğe kavuşturulamamıştır. Aynı zamanda, mekanik stabilite sağlamak amacıyla sunulmuş eksojen tip I ve III kollajen materyali içeren jelin etkinliğini değerlendiren bir çalışma izlenmemiştir. Bu nedenle bu çalışmada, eksojen kollajenin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini histopatolojik olarak (HE, MT, CR boyama), IHC olarak (BMP-2, TGF- β 1, IL-6), bu materyalin toksik etkilerini biyokimyasal olarak (AST, ALT, Ca, P) ve yine kullanılan bu materyalin oksidan-antioksidan dengesine olan etkisini (GSH, MDA) değerlendirilmiştir.

Sunulan çalışmadaki histopataolojik incelemelerde, dokulara HE, MT ve CR boyamalar yapılarak, bu dokular anjiogenezis, nekroz, granülasyon dokusu, fibrotik doku, yabancı cisim reaksiyonu, örgü ve lameller kemik ile osteoblast hücrelerinin varlığı ve miktarı açısından literatürle uyumlu olacak şekilde değerlendirilmiştir.

Shimoji ve ark. rat femurlarında oluşturdukları perforasyonlara kollajen sünger yerleştirerek yaptıkları bir çalışmada, kemik fraktürlerinde ve artiküler kartilaj doku defektlerinde periost ve medullar kavite yakınlarında gelişen vasküler ağın içindeki membranöz ossifikasyonla kemik rejenerasyonunun meydana geldiğini savunmuşlardır.¹⁹⁸ Kemik onarımı başladıktan sonra yaklaşık 3. günde greftin içine doğru kapiller damarlar invaze olmaya başlar ve greftin kapiller ağı 2 ila 3'üncü hafta başında oluşmuş olur. Bu sayede bölgedeki mevcut hücreler için gerekli enerji besin sağlanmış olur.¹⁹⁹ Sunulan çalışmanın 2. haftasında kollajen modellerinde gözlenen yüksek seviyedeki anjiogenezis mevcut hücre ve aktiviteleri için gerekli besin ve oksijen ihtiyacının fazlalığının ve dolayısıyla yüksek bir iyileşme performansının kanıtı

olabilir. Kemik onarımında kanlanmanın iyi olduğu bölgelerdeki hücreler osteoblastlara dönüşerek yavaş yavaş trabekülasyonu başlatırlar.²⁰⁰ Kontrol grubuna kıyasla 4. haftada, kollajen modellerinde çok daha az seviyelerde gözlenen anjiogenezinin sebebinin, deney grubunda vaskülarizasyonun gerçekleştiği iyileşmenin erken aşamalarının çoktan aşıldığının ve vasküler ağ içerisindeki membranöz ossifikasyonun gittikçe büyümesinin olduğu kanaatindeyiz.

Sunulan çalışmada ayrıca, kontrol grubunda deney grubundan fazla olacak şekilde sadece 2. haftada gözlenen bir nekroz varlığı gözlenmiştir. Kemik onarımında, yaralı bölgedeki kan akışındaki ani artışa rağmen, normal bir iyileşme parçası olan nekroz ve hipoksi dönemi gerçekleşir. Onarım bölgesindeki mekanik yaralanma dokusunun yanı sıra çevredeki kan damarlarına verilen hasardan dolayı beslenme desteğinin kaybolmasıyla oksijenlenme azalır ve osteositler canlılığını kaybederek nekroz oluşur.²⁰¹ Tüm bu verilerin ışığında deney grubunda gözlenen anlamlı derecedeki düşük nekrozun sebebinin, yüksek anjiyogenezisle bağlantılı olduğu düşüncesine varılmıştır.

Rammelt ve ark.'nın rat tibialarına tip I kollajen ile kaplı implantları yerleştirdikleri bir çalışmada, ilk haftalarda kaplanmış implantlarda, kaplanmayanlara kıyasla anlamlı derecede yüksek granülasyon dokusunun varlığına dikkat çekmişlerdir.²⁰² Yiğiter ve ark. tip I kollajen yerleştirdikleri defektlerdeki granülasyon doku miktarının iyileşmenin erken ve ara dönemlerinde anlamlı derecede yüksek olduğunu, iyileşmenin tamamlandığı dönemlerde ise miktar açısından bir fark yaratmadığını gözlemlemişlerdir.²⁰³ Sunulan çalışmada ise granülasyon dokusunun, 2. haftada kontrol grubuna göre deney grubunda belirgin şekilde fazla ve daha sıkı bir yapıya sahip olduğu, 4. ve 8. haftada ise deney grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu gözlemlenmiştir. İyileşmenin ilk

evrelerinde bu bölgede yoğun olarak görülen, onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler olan mezanşimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücreler bulunur. Bu hücreler yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Ayrıca granülasyon dokusunun oluşumunun başlangıcında biriken kollajen tip III kollajendir.²⁰⁴ Sunulan çalışmadaki kollajen modelinin erken evrelerindeki yüksek granülasyon dokusunun ve dolayısıyla yüksek seviyedeki mezanşimal kökenli hücrelerin onarımında olumlu yönde rol oynadığı düşünülmektedir.

Rammelt ve ark.'nın rat tibialarına tip I kollajen ile kaplı implantları yerleştirdikleri bir çalışmada, 4. haftada hem kaplanmış hemde kaplanmamış grupların her ikisindeki implantların çevresindeki neredeyse tamamen yeni oluşmuş lameller kemiğin, yoğun fibrotik doku ile sarılı olduğu gözlemlenmiştir.²⁰² Saadeh ve ark. ise rat mandibulalarına tip I kollajen yerleştirerek yaptıkları çalışmada, tip I kollajenin fibröz dokunun büyümesini önlediğini savunmuşlardır.²⁰⁵ Sunulan çalışmada ise, 4. haftada kontrol grubunda, deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bir fibrotik doku tespit edilmiştir. Genç granülasyon dokusu oluşuktan bir hafta sonra, bu dokuya osteoblast ve kondroblastların gelmesiyle yumuşak fibröz kallus oluşur. Daha sonra, osteoblastlardan osteoid üretilir ve yavaş yavaş ortama kalsiyum tuzlarının (hidroksiapatit) çökmesi sonucu ön kallus şekillenmiş olur. Bu işlemin yapılan çalışmalarda 2-3 hafta kadar sürdüğü görülmüştür.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Tip I kollajen, yeni oluşan osteoblastların büyümesini kolaylaştırır ve aynı zamanda proteinlerin defekt boyunca difüzyonuna izin verir.^{9, 209-211} Bu bilgilerin ışığında sunulan çalışmada, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde daha az fibröz doku gözlemlenen deney grubunun barındırdığı tip I kollajenin, osteoblast büyümesini hızlandırarak fibröz kallusun ön kallusa geçişini kolaylaştırıp kemik onarımını hızlandırıcı yönde etki gösterdiği düşünülmektedir .

Yine Rammelt ve ark.nın yaptığı çalışmada, her iki implantta da yabancı cisim reaksiyonu veya implantların enkapsülasyonunun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir.²⁰² Yapılan başka bir çalışmada, rat kalvaryalarındaki 5 mm'lik defektler üzerine kollajen sünger uygulanmış ve hiçbir defektin yabancı cisim reaksiyonu sergilemediği gösterilmiştir.¹⁹⁰ Sweeney ve ark., laminin içeren jellerin implante edildiği ratlarda laminine karşı antikorların indüklendiğini fakat tip I kollajene karşı bu indükasyonun gerçekleşmediğini bildirmişlerdir.⁹ Sunulan çalışmada, literatüre uygun olarak hiçbir defekte yabancı cisim reaksiyonu gözlenmemiştir. Yabancı cisimler kronik enflamasyona neden olabilir ve bu enflamasyon sonucu ortaya çıkan reaksiyonel durum, yabancı cismin ortadan kaldırılması için gelişen bir mekanizmadır. Kemik onarımında, biyomekanik faktörler ile yabancı materyali sınırlayan bir kapsüllenme gelişebilir.²¹² Sunulan çalışmada kullanılan eksojen kollajenin uygulandığı doku tarafından yabancı cisim olarak algılanmadığı ve reaksiyona sebebiyet vermediği ve alıcı dokunun bu materyale karşı herhangi bir red cevabı geliştirmedeği kanaatine varılmıştır.

Pelaez ve ark.'nın rat kalvaryasına yerleştirdikleri absorbe kollajen sünger (ACS)'in kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, 4 haftalık örneklerde, defektin büyük miktarlarda kalıntı ACS içeren örgü ve lameller kemikle neredeyse kapandığını gözlemlemişlerdir.²¹³ Liu ve ark.'nın resorbe olabilen kollajen bir tıkaçın (RCP- sığır aşil tendonundan elde edilen yüksek oranda saflaştırılmış tip I kollajenden üretilmiş yumuşak emilebilir kollajen matris) kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini değerlendirdikleri çalışmada RCP içeren grupta, 2. haftada örgü kemik, 8. haftada ise lameller kemik oluşumu gözlemlenmiştir.¹⁸⁵ Fuerst ve ark., domuz mandibularına kollajen uygulayarak gerçekleştirdikleri çalışmanın 8. haftasında, örgü kemiğin çoğunlukla lameller kemiğe remodele olduğunu saptamışlardır.¹⁸⁹ Sunulan çalışmada literatürdeki çalışmalara benzer şekilde, deney grubunda kontrol grubuna

kıyasla 2. haftada istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek örgü kemik gözlenirken, 8. haftada ise istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek lameller kemik gözlenmiştir. En yüksek oluşum hızına 14. günde ulaşan sert kallus miktarı arttıkça, mineralize kıkırdak, örgü kemik ile yer değiştirir ve iyileşme dokusu mekanik olarak daha rijid hale gelir. Kemik onarımının 3.–4. haftalarından itibaren başlayan yeniden şekillenme sürecinde, örgü kemik, lamellar kemikle yer değiştirmeye başlar.³³ Bu bilgilerin ışığında sunulan çalışmada, kollajen modelindeki örgü ve lameller kemik oluşum hızının ve miktarının deney grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmasının sebebinin, deney grubunda bulunan eksojen tip I kollajenin hızlı ilerleyen mineralizasyon ve şekillenme sürecinde rol oynamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Liu ve ark. yaptıkları çalışmada, oluşturdukları kritik boyutlu rat kalvaryal defektlerine eksojen olarak üretilmiş resorbe olabilen kollajen bir matriks yerleştirilmiş ve bu matriksin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisi histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Kollajen modelleri 1., 2., 4. ve 8. haftaların her birinde değerlendirilmeye alınmış ve bu modellerde bütün haftalarda yeni oluşan doku içerisinde osteoblast hücreleri gözlemlenmiştir.¹⁸⁵ Santos ve ark.'nın rat kalvaryalarındaki 5 mm'lik defektler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, kollajen sünger yerleştirilmiş modeller 8. haftada histopatolojik açıdan incelenmiş ve homojen olarak dağılmış osteositli ve kısmen aktif osteoblastlarla kaplı yeni bir kemik dokusu gözlemlenmiştir.¹⁹⁰ Sunulan çalışmada ise, başlangıçtan 8. haftaya kadar olan tüm süreçlerde, özellikle kollajen parçaçıklarının etrafında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olacak şekilde osteoblastik aktivite belirlenmiştir. In vitro çalışmalar, yeni bir kollajen iskenenin insan osteoblast hücrelerinin bağlanmasını, infiltrasyonunu ve canlılığını desteklediğini göstermiştir.²¹⁴ Dolayısıyla, eksojen

kollajen materyalinin osteoblast hücreleri üzerindeki olası etkisi aracılığıyla kemik iyileşmesini hızlandırabileceği düşüncesine varılmıştır.

Güngörmüş ve ark. yaptıkları çalışmada Tip I kollajenin enflamatuvar cevapta özellikle de lökosit ve makrofaj sayısında bir artışa neden olduğunu savunmuşlardır.²⁰² Shimoji ve ark. kullandıkları eksojen kollajenin kemik augmentasyonunda etkili olduğunu ve daha büyük kemik alanları oluşturduğunu göstermişlerdir.¹⁹⁸ Deporter ve ark. çalışmalarında, fibriller kollajenin temelde kemik oluşturucu hücreler için açıkca osteokondüktif substrat olarak işlev gördüğü kanısına ulaşmışlardır.²¹⁵ Saadeh ve ark. tip I kollajenin başka yolla iyileşmeyecek bir membranöz kemik defektinin iyileşmesini destekleme yeteneğini ve tip I kollajenin taşıyıcı matriks olarak uygunluğunu göstermişlerdir.²⁰⁵ Hwan Kim ve ark. ise yaptıkları çalışmada, kemik greft materyali olarak kullanılan birçok materyalin inorganik yapısına eklenen tip I kollajenin organik yapısı sayesinde kemik rejenerasyonunu geliştirdiği sonucuna ulaşmıştır.²¹⁶ Sunulan çalışmada, tüm histopatolojik incelemelere dayanarak uygulanan eksojen kollajenin, kemik rejenerasyonunun gelişmesi ve desteklenmesi yönünde olumlu etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu etkide, eksojen kollajen ile ksenogreftin kombinasyonu ile organik ve inorganik yapıların harmanınında payı olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu çalışmaların aksine Maciel ve ark. kollajen materyalinin tam bir osteokondüktif etkiye sahip olmadığını, özellikle biyomateryal parçacıklarının arasında yeni kemik oluşmadığını gözlemlemişler ve bu biyomalzemenin kemik oluşumunda yetersiz kaldığını savunmuşlardır.¹⁸⁸ Bu çalışma ile sunulan çalışma arasındaki bu çelişkinin, kullanılan materyalinin formunun veya içerdiği eksojen kollajen yüzdesinin farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, Maciel ve ark.'nın çalışmasında kollajenin blok formu kullanırken sunulan çalışmada kollajenin jel

formunun kullanılmasının metaryal adaptasyonunda da farklılıklara yol açabileceği düşünülmektedir.

Sıvı, jel yada sünger formlarında olabilen tip I kollajen, kemik dokuda baskındır ve major ekstrasellüler bir bileşendir.²⁰⁵ Osteoblastların proliferasyonunu ve kemik iliği hücrelerinin osteojenik diferansiasyonunu stimüle eden Tip I kollajen^{189, 217}, osteoblastlar, endotel hücreleri ve fibroblastlar için kemotaktiktir.^{218, 219} Yapılan bir çok çalışmada, tip I kollajen jellerinin kraniofasial iskeletteki kritik boyutlu defektlerde ve ratlardaki nasal defektlerin onarımında etkili oldukları^{9, 205, 210, 220} ve kollajenin osteogenezin etkili bir stimülatörü olduğu sonucuna varılmıştır. Sunulan çalışmada ise literatür bilgiyi destekler şekilde, eksojen kollajenin jel formunun uygulamasının osteoblastların diferansiasyonunu kontrol grubuna kıyasla arttırdığı gözlenmiştir.

Sunulan çalışmadaki IHC incelemelerde, dokular BMP-2, TGF- β 1 ve IL-6 ekspresyonu açısından değerlendirilmiştir.

Kemik iyileşmesinde BMP'ler diferansiye olmamış mezenkimal hücreler osteojenik hücrelere dönüşerek yeni oluşan kemiğin ekstraselüler matriksinin sentezlenmesinde ve kalsifikasyonunda görev alırlar.⁵⁶ Ayrıca BMP'ler, matür osteoblast ve kemik iliği osteoprogenitör hücreleri üzerinde kemotaktik özelliğe sahiptir.¹¹³

Yiğiter ve ark., BMP-2 ekspresyonunda kollajen modellerinde 1. saatte kontrol grubuna kıyasla anlamlı değişiklik saptarken, 1., 3. ve 6. haftalarda kontrol grubu ile deney grubu arasında anlamlı düzeyde farklılık saptamamışlardır. Fakat 3. haftada 1. haftaya göre kollajen modellerinde BMP-2 ekspresyonunun, 2,5 kat azalma gösterdiğini ve 3. haftadaki ekspresyon seviyesinin 6. haftaya kadar devam ettiğini tespit etmişlerdir. Kontrol grubunda bu değişikliğe rastlamamışlardır. Yiğiter ve ark., tip I kollajenin kemik defekt onarımının erken döneminde BMP gen ekspresyonlarında artış sağlarken,

uzun dönemde kemik defektlerinin onarımı üzerine etkisinin gruplar arasında farklı olmadığını belirtmişlerdir.²⁰³

Thorwarth ve ark., domuz kalvaryalarındaki kemik defektlerinde oluşturdukları kollajen, otolog kemik grefti ve kontrol modellerinin BMP-2 ekspresyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, 2. haftada en yüksek BMP-2 ekspresyonu kollajen modelinde gözlenirken, 4. ve 12. haftalarda otolog kemik grefti modelinde BMP-2 ekspresyonunun daha fazla artış gösterdiğini bildirdilmişlerdir. Thorwarth ve ark. bu çalışmada, kollajenin kemik onarımında altının çizilmesi gereken osteokondüktif özelliğe sahip olduğu kanısına varmışlardır.²²¹ Meyer ve ark. çalışmalarında, kırıktan sonraki 1. haftada BMP-2 gen ekspresyonlarının pik yaptığını ve 6. haftada tespit edilemez düzeylere gerilediğini bildirmişlerdir.²²² Niikura ve ark. yaptıkları çalışmada, Spontan ve nonunion iyileşen kırıklarda BMP-2 gen ekspresyonunu kıyasladıklarında nonunionlarda kontrol zamanları süresince belirgin olarak düşük tespit etmişler ve en belirgin değişiklik 10. günde saptamışlardır. Bu çalışmada, BMP'nin optimal kırık iyileşmesi için kritik öneme sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.²²³

Sunulan çalışmada, deney sürecinin tüm periyodu boyunca kollajen grubunda osteoblastlardaki BMP-2 ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla her daim istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve kuvvetli bir artış göstermiştir. BMP-2, kemik büyümesini ve oluşumunu indükleyebilen ve arttırabilen osteoindüktif olarak tanımlanmaktadır ve aynı zamanda hücre kemotaksisini, proliferasyonunu ve osteojenik yola doğru farklılaşmayı teşvik etmektedir.²²⁴ BMP türevlerinden en etkin osteoindüktif yeteneğe sahip olanının BMP-2 olduğu tespit edilmiştir.^{224, 225} Kollajen liflerinin ise, yapısında bir çok osteoindüktif faktörü (BMP, TGF, IGF ve FGF gibi) saklayabilir ve kemik defektleri oluştuğu zaman bu faktörler kemik matriksinden kolay bir şekilde salgılanabilir.^{10, 226} Bu bilgilerin ışığında sunulan çalışmada deney grubundaki anlamlı

düzeydeki yüksek BMP-2 ekspresyonunun, uygulanan eksojen kollajenle ve dolayısıyla da artmış BMP-2 ekspresyonunda istatistiksel anlamda yüksek düzeyde tespit edilen osteoblastik aktiviteyle bir bir ilişkisi olabileceği ve dolayısıyla kullanılan bu eksojen kollajenin kemik rejenerasyonu üzerinde pozitif yönde etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Sunulan çalışmayla, Thorwarth ve ark., Yiğiter ve ark. ile Meyer ve ark. yaptıkları çalışmadaki son dönemdeki BMP-2 ekspresyon oranı arasındaki farkların sunulan çalışmada kullanılan kollajen jel materyalinin içeriğindeki farklılıkla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

TGF- β 1, iyileşmenin temeli olan anjiogenezi uyarmayı içeren pek çok farklı role sahiptir⁹⁰; TGF- β 1 osteoblast proliferasyonunu artırır, osteoblastların apoptozunu engeller ve ayrıca kemoatraktan yolla bölgeye osteoblastik prekürsörlerini veya matris üreten osteoblastları toplar. Öte yandan TGF- β 1 osteoblast proliferasyonu ve mineralizasyonunun son evresini inhibe eder. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar.^{91, 92 93, 94 95}

Keogh ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, hücre kültürlerine eklenen kollajen yapı iskelesine değişik dozlarda TGF- β 1 uygulamışlardır. 35 ve 49 günlük kültürlerde, yüksek doz TGF- β 1 tedavisi uygulanan kültürlerde, düşük doz TGF- β 1 tedavisi uygulanan kültüre göre mineralizasyonun ve geç dönem osteojenik marker gen ekspresyonu seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.²¹⁴

Ueda ve ark.'nın tavşan kalvaryalarındaki defektlere TGF- β 1 ile kombine edilen kolajen süngerini yerleştirdikleri çalışmasında, kontrol grubuna kıyasla kollajen modellerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek mineralizasyon ve kemik rejenerasyonu saptanmıştır. Ueda ve ark. kolajen süngerin TGF- β 1'in serbest salımını sağlayan ve osteojenik aktivitenin korunmasına yardımcı olan bir taşıyıcı matris olarak

görev yaptığını ve TGF- β 1'in kemik rejenerasyonunu geliştirdiği sonucuna ulaşmışlardır.²²⁷

Yiğiter ve ark.'nın rat femurları üzerinde yaptıkları çalışmada, 1. saatte hem kontrol hem de kollajen modellerinde TGF- β 1 ekspresyonları minimal düzeyde saptanmış ve kollajen modellerinde 1. haftada pik yaptığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda Yiğiter ve ark., TGF- β 1 geninin osteoblastik aktiviteyi, hücre göçünü ve kondrogenezisi düzenlediğini ve Tip I kollajenin de bu genleri bir miktar indüklediğini savunmuşlardır.²⁰³

Sunulan çalışmada, kollajen modellerinde kontrol modellerine oranla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olacak şekilde damar endoteli ve granülasyon dokusunda 2. ve 4. haftada şiddetli düzeyde bir TGF- β 1 ekspresyonu gözlenirken, 8. haftada ise kontrol modellerinde daha yüksek seviyede bir ekspresyon gözlemlenmiştir. TGF- β 1'nin kemik üzerindeki etkileri, anjiogenezis, undiferansiye mezenşimal hücrelerin proliferasyonu, prekürsor osteoblastların proliferasyonu, osteoblast ve kemik matriksinin oluşumunu sağladığı^{228 229} göz önüne alındığında sunulan çalışmada, deney grubunda 2. ve 4. haftadaki TGF- β 1 ekspresyonu yüksekliğinin osteoblastik aktivitedeki fazlalık ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Geç dönemde gözlenen ekspresyon düşüklüğünün sebebinin ise, remodasyonun çoğunluğunun gerçekleşmiş olmasıyla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

IL-6'nın salınımının, kemik onarımında önemli rol oynadığı ve bu sürecin önemli bir regülatörü olduğu düşünülmektedir.¹²³ IL-6, osteoblastlar, osteoklastlar ve anjiogenezis üzerinde birçok etkiye sahiptir. IL-6, IL-1'in tarafından uyarılmaya çok hassastır ve erken dönemde iyileşme sürecinde yüksek aktivite gösterir.⁸⁰

Cho ve ark. fraktür iyileşmesini inceledikleri çalışmalarında, ilk 24 saat içerisinde IL-6 ekspresyonunun pik yaptığını ve 3. günde tespit edilemeyecek seviyelere kadar hızlı bir şekilde azaldığını gözlemlemişlerdir.²³⁰

Yiğiter ve ark. çalışmalarında, kollajen modellerindeki 1. saatte saptanan IL-6 ekspresyon pik seviyesini, kontrol modelinde 3. haftada gözlemlemiştir ve bu durumun sebebinin kollajen modellerindeki yüksek osteoblastik aktiviteyle ilgili olduğunu savunmuşlardır. Yine kollajen modelindeki 3. haftada belirlenen IL-6 ekspresyonundaki azalmayı takiben 6. haftada tekrar arttığını ve bu artışın sebebinin ise lameller kemiğin remodelasyona uğramasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir.²⁰³

Xu Yang ve ark. yaptıkları çalışmada, IL-6'nın yokluğunda ağsı kemiğin osteoklastik rezorbsiyonunun, kallusun remodelizasyonu ve olgunlaşmasının geciktiğini ve muhtemelen osteoklastların sayısındaki düşüşün bu bulgularla ilişkili olduğunu savunmuşlardır.¹²³ Yapılan başka bir çalışmada ise, IL-6'nın kemik rezorpsiyonunu indüklediği ileri sürülmüştür.²³¹

Sunulan çalışmada, 2. ve 4. haftada kontrol grubuna kıyasla deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek IL-6 ekspresyonu gözlemlenirken, 8. haftada ise, tam tersi olacak şekilde kontrol grubunda daha yüksek seviyelerde bir ekspresyon tespit edilmiştir. IL-6'nın salınımının, mezenkimal progenitör hücrelerin osteoblasta farklılaşmasını uyardığı ve matür osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyon aktivitesini stimüle edebildiği düşünülmektedir. Ayrıca vasküler endotelyal büyüme faktörü ekspresyonunu uyararak anjiyogenezde rol oynadığı öne sürülmektedir.¹²³ Bu verilere dayanarak sunulan çalışmada, deney grubunda 2. haftadaki IL-6 ekspresyonu yüksekliğinin osteoblastik aktivitedeki fazlalık ile ilişkili olabileceği düşünülürken, 4. haftadaki ekspresyon yüksekliğinin sebebinin ise lameller kemik oluşumunun görülmeye başlamasıyla, ağsı kemiğin osteoklastik rezorbsiyonuyla, kallusun

remodelizasyonu ve olgunlaşması olabileceği düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında, deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek gözlenen osteoblastik aktivitenin ve remodelasyonun ve dolayısıyla yüksek seviyedeki IL-6 ekspresyonunun eksojen kollajenle ilişkili olabileceği varsayılmaktadır. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla geç dönemde gözlenen düşük IL-6 ekspresyonunun sebebinin ise, eksojen kollajen içeren deney grubunda iyileşmenin çok daha hızlı bir şekilde tamamlanmaya başlaması olduğu düşünülmektedir.

Kemik onarımının başlamasıyla beraber bölgede yangı da başlar ve yaklaşık olarak 2-3 hafta devam eder. Yangı; kallus şekillenmesini teşvik etmede önemli rol oynar ve kırıkta ya da kemik formu oluşuncaya kadar devam eder.^{207, 208, 232} Bu bilgilerin ışığında sunulan çalışmada, yerleştirilen eksojen kollajen jel materyalinin BMP, TGF ve IL-6 gibi yangı markerlarını arttırarak kemik formasyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada, kullanılan eksojen kollajen materyalinin toksisitesini değerlendirmek amacıyla AST ve ALT değerleri incelenmiştir.

Genel olarak karaciğer toksisitesi, karaciğer metabolizmasıyla ilişkili bazı enzimlerin konsantrasyonundaki değişikliğe bağlı olarak belirlenir. Bu enzimlerden ALT ve AST, karaciğer hücreleri çeşitli faktörler sebebiyle parçalandığında kana salınır. Bu nedenle genellikle, bu iki enzimin seviyesindeki değişiklik, karaciğer sağlığındaki değişikliğin belirteci olarak kullanılır. Ayrıca, ALT en fazla miktarda karaciğer ve böbreklerde bulunmasına rağmen serumda ve çeşitli dokularda da bulunur.²³³ ALP konsantrasyonun, kemiğin genişlediği ve deforme olduğu Paget hastalığı sırasında veya belirli kanserlerde arttığı gözlenmiştir.²³⁴

Zhang ve ark. rat fraktürlerine yerleştirdikleri simvastatinin toksisitesini değerlendirmek amaçlı yaptıkları çalışmada, belli dozdaki simvastatin değerlerinin

toksisitesinin kontrol grubuna göre yüksek olan ALT miktarıyla ilişkilendirmişlerdir.²³⁵ Sun ve ark.'nın rat radiuslarına hidroksiapatit/kitosan iskelesi yerleştirerek yaptıkları çalışmada, hidroksiapatit/kitosan yerleştirilen grupta kontrol grubuna kıyasla ALT seviyesi istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur. Elde ettikleri sonuçlarda, kullandıkları kemik materyal tedavisinin, tavşanlarda böbrek ve karaciğer dokusunda spesifik toksik etkiler yaratmadığını bulgusuna ulaşmışlardır.²³⁶ Sazanova ve ark. yaptıkları çalışmada, modifiye kalsiyum fosfat çimentoları kalvarial defektlere implante edilmiş ve bu ratlarda biyokimyasal belirteçler değerlendirilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasında AST ve ALT düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış ve kullanılan materyalin hepatotoksik etkilere sahip olmadığı kanısına varılmıştır.²³⁷

Sunulan çalışmada ise, kontrol grubuyla kıyaslandığında deney grubunda 2. haftada anlamlı derecede daha yüksek seviyelerde tespit edilen AST ve ALT değerlerinin sebebinin, karaciğerin eksojen bir madde olarak yerleştirilen ve vücut için yabancı bir cisim niteliği taşıyan kollajene verdiği ilk cevap olmasından kaynaklı olduğunu düşünülmektedir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, deney grubunda 4. haftadaki Ca ve P değerleri ile 8 haftaki P değerinin anlamlı derecede daha yüksek seviyelerde olmasının sebebinin ise, yüksek osteoblastik aktivitenin bir sonucu olarak kemik remodelasyonunun deney grubunda daha fazla olmasından kaynaklı olduğunu düşünülmektedir. Özellikle 4. ve 8. Haftalar değerlendirildiğinde, deney grubuyla kontrol grubu karşılaştırıldığında, serum biyomarkerları olan AST ve ALT istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı görülmüştür. Bu durum kullanılan kollajen jelin karaciğer hücrelerinde toksisite oluşturmadığının, hasar göstergesi olan karaciğer enzim yükselişine sebebiyet vermediğinin ve karaciğer harabiyetine yol açmadığının kanıtı olabileceği varsayılmaktadır.

Sunulan çalışmada, oksidatif stresi ölçmek için lipid peroksidasyon son ürünü olan MDA'yı, antioksidan biyobelirteci olarak da GSH kullanılmıştır.

Kemik onarımı, onarım sahasının büyüklüğü, sahanın beslenme derecesi ve hipovolemik koşullar gibi lokal faktörlerle ilişkilidir.²³⁸ Onarım sürecinde ortaya çıkabilecek hipoksi durumları doku onarımı geciktirir. Fagositik hücrelerce mikroorganizmaları öldürmek için üretilen reaktif oksijen bileşikleri doku hasarının artışına sebebiyet verebilir hatta orjinal yaralanmadan daha fazla hasar oluşturduklarında gözlenebilir.²³⁹ Buna karşın hücreler bu oksidatif hasarı önleyen ya da onaran koruyucu mekanizmalara da sahiptir. Bu koruyucu mekanizmaların miktarı hasarın az ya da çok olmasında etkilidir.²⁴⁰

Zhang ve ark., tavuk kemiğinden elde edilen hidrolize kollajenin D-galaktoz ile indüklenmiş yaşlı ratlarda oluşturduğu antioksidan durumunu değerlendirdikleri çalışmalarında, serum ve karaciğerde glutatyon peroksidaz aktivitesinin önemli ölçüde arttığını, MDA değerlerinin yüksek oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Kullanılan kollajen metaryalinin, rat antioksidan sistemini harekete geçirdiği sonucuna ulaşmışlardır.²⁴¹

Sunulan çalışmada, tüm grupların oksidatif stres parametreleri incelendiğinde, kontrol ve deney gruplarının tüm zamanlardaki MDA ve GSH seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olmadığı saptanmıştır.

Hücrel hasarın ilk basamağı, membran bileşenlerinin ve bilhassa membran lipidlerinin peroksidasyonudur.^{242, 243} Lipid peroksidasyonun en temel ürünü ve oksidatif stresin en önemli parametresi MDA'dır.^{244, 245} GSH, H₂O₂ miktarını azaltan glutatyon peroksidaz için substrattır. Glutatyon peroksidaz ve GSH, lipid peroksidasyonunu direk veya dolaylı şekilde inhibe ederler.^{246, 247}

Sunulan çalışmada, hem kontrol grubunda hem de deney grubunda tüm haftalarda istatistiksel olarak fark oluşturmeyan değerlerin bulunmasının, oksidan-antioksidan sistemindeki dengenin bozulmadığının göstergesi olduğu düşünülmektedir. Bu dengenin stabil kalması sayesinde oksidanlar yönünde artışın gerçekleşmesini engellediği ve dolayısıyla gerçekleşecek olan hücresel harabiyetin önüne geçildiği kanaatine varılmıştır. Bu sonuçlar ışığında, kullandığımız kollajen içerikli jelin herhangi bir toksik etki yaratmadığı, vücudun tolere edebildiği bir yapıya sahip olduğu ve en önemlisi oksidan sistemi harekete geçirmede ve reaktif oksijen radikallerine karşı antioksidan sistemi ayakta tuttuğu düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada, kontrol gruplarında kullanılan partiküler grefti tek başına kalvaryal defektlere uyguladığımız süreçte, greft partiküllerinin dağılma eğiliminde olduğunu, greftin defekte taşınması esnasında zorluklar oluştuğunu, kaviteye adaptasyonda problemler yaşandığını ve yerleştirildiği kaviteyi homojen bir şekilde kaplamadığı deneyimlenmiştir. Deney grubunda ise, partiküler greft ile kollajen jel karıştırılarak elde edilen visköz karışımın yerleştirilmesi esnasında, özellikle kontrol grubundaki prosedürle karşılaştırıldığında her yönden daha pratik ve verimli bir süreç ile karşılaşmıştır. Graft partiküllerinin kullanılan jel sayesinde bir arada kalma kapasitesinin oldukça yükseldiği, defekte taşınma esnasında bütünlüğünün bozulmadığı, kavite adaptasyonunun güçlü olduğu ve kaviteyi homojen bir şekilde kapladığı tecrübe edilmiştir. Bu gözlemler ve tecrübelerimiz ışığında, greft uygulamalarında kullanılan kollajen jelin uygulama esnasında manipulasyonu kolaylaştırdığı ve mekanik stabiliteyi oldukça arttırdığı düşünülmektedir. Graft manipülasyonu ve mekanik stabilitesi ile alakalı literatür bilgisi izlenememiştir.

6. SONUÇ

Greft maddelerine mekanik stabilite sağlamak amacıyla sunulmuş eksojen tip I ve III kollajen içeren jel materyalinin kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini, toksisitesini ve oksidan-antioksidan dengesine olan etkisini değerlendirmeyi amaçlayan sunulan çalışmanın sonucunda bu eksojen kollajen jel materyalinin;

1. Granülasyon dokusunun proliferasyonunu, organizasyonunu ve gelişimini hızlandırarak, fibrotik doku oluşumunun azalmasını ve erken dönemde anjiogenezisin artmasını sağlayarak kemik iyileşme ve rejenerasyonun gelişmesine zemin hazırlayabileceği,
2. Örgü ve lameller kemik oluşum hızını ve miktarını arttırarak hızlı ilerleyen mineralizasyon ve şekillenme sürecine katkı sağlayabileceği,
3. Tüm iyileşme periyodu boyunca, kemik gelişim ve onarımında büyük role sahip olan osteoblastik hücrelerde artış sağlayarak iyileşme safhalarının hızlanmasında, osteoid dokunun daha hızlı oluşmasında ve kalsifikasyonun çok daha erken ortaya çıkmasında rol oynayabileceği,
4. Osteoindüktif bir faktör olan, osteoblastik aktivenin hızlanmasında ve kemik rejenerasyonun gelişmesinde rol alan BMP-2'nin ekspresyonunu arttırdığı,
5. Osteoblastik aktivitenin hızlanmasında, hücre göçü ve kondrogenezisin düzenlenmesinde, kemik remodelasyonunun gelişmesine katkı sağlayan TGF- β 1'in ekspresyonunu iyileşmenin erken dönemlerinde arttırdığı, geç dönemlerinde ise azalttığı,
6. Osteoblastik aktiviteyi, lamaller kemik oluşumunu, kallusun remodelizasyonu ve olgunlaşmasını hızlandırdığı düşünülen IL-6'nın ekspresyonunu erken dönemde arttırdığı, geç dönemlerinde ise azalttığı,

7. Yabancı cisim reaksiyonuna sebep olmayan, oksidan ve antioksidan sistemindeki dengeyi bozmayan bir madde olabileceği,
8. Partiküler greft uygulamaları esnasında manipölasyonu kolaylaştırarak daha kısa sürede ve pratik bir uygulama sağlayabileceği,
9. Deneysel olarak gerçekleştirilen bu çalışmanın klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

1. Raghoobar G, Meijer G, Smeele L. Reconstruction of defects in the oral and maxillofacial region. A review of the various options for treatment. *Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde*, 2007, 114: 47-53.
2. Hollinger JO, Surgery R. Osteogenesis in Cranial Defects: Reassessment of the Concept of Critical Size and the Expression of TGF- β Isoforms *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2000, 106: 372.
3. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dentistry*, 1993, 2: 158-167.
4. Boyne PJ, Peetz M. Osseous reconstruction of the maxilla and the mandible: surgical techniques using titanium mesh and bone mineral. Baski. *Quintessence Publishing (IL)*, 1997.
5. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine- derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, 2010, 21: 688-698.
6. Martinez SA, Walker. Bone grafts. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 1999, 29: 1207-1219
7. Farey I, McAfee P, Davis R, Long DM. Pseudarthrosis of the cervical spine after anterior arthrodesis. Treatment by posterior nerve-root decompression, stabilization, and arthrodesis. *The Journal of Bone and Joint surgery*, 1990, 72: 1171-1177.
8. Tsuruoka N, Yamato R, Sakai Y, Yoshitake Y, Yonekura HJ. Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells

- and fracture healing of rat femur. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 2007, 71: 2680-2687.
9. Sweeney TM, Opperman LA, Persing JA, Ogle RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *Journal of neurosurgery*, 1995, 83: 710-715.
 10. Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*, 2005, 26: 6158-6166.
 11. Habal MB, Reddi AH. Bone grafts and bone induction substitutes. *Clinics in Plastic Surgery*, 1994, 21: 525-542
 12. Garant PR, Garant P. Oral cells and tissues. Baskı. *Quintessence Publishing Company Chicago*, 2003.
 13. Pelker RR, Friedlaender GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *The Orthopedic Clinics of North America*, 1987, 18: 235-239.
 14. Aubin JE, Biology C. Advances in the osteoblast lineage. *Biochemistry and Cell Biology*, 1998, 76: 899-910.
 15. Gergen JP, Wieschaus E. Dosage requirements for runt in the segmentation of *Drosophila* embryos. *Cell*, 1986, 45: 289-299.
 16. Wilkins BJ. Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. *Journal Of Clinical Pathology*, 1992, 45: 645.
 17. Teitelbaum SL, metabolism m. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *Journal Of Bone And Mineral Metabolism*, 2000, 18: 344-349.
 18. Soydan N. Genel Histoloji. *ISBN 975-404-276-4.*, 1992.
 19. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*, 2001, 10: S86-S95.

20. Akın G, Gültekin TJYSAD. Yaşlanma ve Osteoporoz. *Yaşlı Sorunları Araştırma Dergisi*, 2001, 1: 102-114.
21. Gartner LP. Color Textbook of Histology. *books.google.com*, 2001: 134-154.
22. Kierszenbaum AL, Histoloji ve hücre biyolojisi. *Palme Yayıncılık*, 2006.
23. LC Junqueira - Temel Histoloji. İstanbul: *Nobel matbaacılık*, 2006: 299-307.
24. Safadi FF, Barbe MF, Abdelmagid SM, Rico MC, Aswad RA, Litvin J, Popoff SN. Bone structure, development and bone biology. *Bone Pathology*, 2009: 1-50.
25. Phieffer LS, Meyer Jr RA, Gruber HE, Easley M, Wattenbarger J. Effect of interposed periosteum in an animal physeal fracture model. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2000, 376: 15-25.
26. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. *Totbid Dergisi*, 2004, 3: 1-11.
27. Bostrom MP, Yang X, Koutras I. Biologics in bone healing. *Current Opinion in Orthopaedics*, 2000, 11: 403-412.
28. Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone*, 1992.
29. Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG, Browner BD. Skeletal trauma: basic science, management, and reconstruction. Baskı. *WB Saunders*, 2003.
30. Cotran RS. Robbins Pathologic Basis of Disease, *Pathologic Basis of Disease*, 1994, 1267.
31. LJ Peterson, E Ellis, JR Hupp, MR Tucker. Surgical Reconstruction of Defects of the Jaws. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*., 1998,USA, chapter 28.
32. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & development*, 1999, 13: 1055-1066.

33. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related*, 1998, 355: S7-S21.
34. DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. *Otolaryngologic clinics of North America*, 1994, 27: 859-874.
35. Lindhe Ö, Brandt I, Christiansen JS, Ingebrigtsen K. Irreversible binding of o, p'-DDD in interrenal cells of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, 2003, 50: 1249-1253.
36. Miloro M, Ghali G, Larsen P, Peterson LJ, Waite P. Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery. Bask1. *PMPH-USA*, 2004.
37. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): Implant evolution and surgical technique on a rat's femur/Der kritische Knochendefekt am Kleintier zur Untersuchung der Knochenheilung (II): Implantatentwicklung und Operationstechnik am Rattenfemur. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 2005, 50: 137-142.
38. Sirola K In Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study. *Annales Medicinae Experimentalis Et Biologiae*, 1960: 1.
39. Prolo DJ, Gutierrez RV, DeVine JS, Oklund SA. Clinical utility of allogeneic skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery*, 1984, 14: 183-186.
40. Hollingshead WH, The head and neck. *Anatomy for surgeons*. 1982, 1: 497-498.
41. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of oral surgery*, 1980, 38: 176-180.
42. An YH, Freidman RJ. Animal models in orthopaedic research. Bask1. *CRC press, books.google.com*, 1998.

43. Aybar AO, Territoriale E, Missana L. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontologica Latinoamericana*, 2005, 18: 63-67.
44. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 1998, 9: 310-316.
45. Schmitz JP, Hollinger JO, research r. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1986: 299-308.
46. Develioğlu H. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek. Fak. Derg*, 2003, 6: 60-63.
47. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). *Plast Reconstr Surg*, 2010, 125: 1685.
48. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Archives of Oral Biology*, 2003, 48: 155-160.
49. AC G. textbook of medical physiology. *H. Istanbul Nobel Tıp Kitabevi*, 1986: 73-84.
50. Basarir K, Selek H, Yildiz Y, Saglik Y. Nonvascularized fibular grafts in the reconstruction of bone defects in orthopedic oncology. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 2005, 39: 300-306.
51. Tomin E, Beksaç B, Lane MJ, Surgery A. Amerika Birleşik Devletlerinde ortopedik girişimlerinde otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. *Journal of arthroplasty & arthroscopic surgery*, 2002, 13: 114-129.

52. Van der Stok J, Van Lieshout EM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands—a systematic literature review. *Acta biomaterialia*, 2011, 7: 739-750.
53. Güven O, Keskin A. Preprotetik Cerrahi Çağdaş yayınları II. *Baskı Ankara*, 2001.
54. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*, 2001, 10: S96-S101.
55. Keating J, McQueen MM, volume jsB. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 2001, 83: 3-8.
56. Tuskan C, Yaltırık M, İstanbul. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan biyomateriyaller. *İÜ Basım ve Yayınevi Müdürlüğü*, 2002: 19-26.
57. Kökden A, Türker M. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri ve Biyomateriyaller. *CÜ DisHek Fak Derg*, 1999, 2: 135-137.
58. Wolfe M, Salkeld S, Cook S. Bone morphogenetic proteins in the treatment of non-unions and bone defects: historical perspective and current knowledge. *U Penn Orthopaedic J*, 1999, 12: 1-6.
59. Buck B, Malinin TI. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clinical orthopaedics and related research*, 1994: 8-17.
60. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz ZJ. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *Journal of Periodontology*, 2006, 77: 1555-1563.
61. Khan A. Lead Poisoning. Emedicine instant access to the minds of medicine. 2005.
62. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery*, 2001, 71: 354-361.

63. Betz RRJO. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. 2002, 25: S561-S570.
64. Franco M, Rigo L, Viscione A, De Santis B, Tropina E, Brunelli G, Guidi R, Avantaggiato A, Carinci FJ. CaPO₄ blasted implants inserted into iliac crest homologue frozen grafts. *J Oral Implantol*, 2009, 35: 176-180.
65. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurgical focus*, 2001, 10: 1-4.
66. Basle M, Grizon F, Pascaretti C, Lesourd M, Chappard D. Shape and orientation of osteoblast- like cells (Saos- 2) are influenced by collagen fibers in xenogenic bone biomaterial. *Journal Of Biomedical Materials Research*, 1998, 40: 350-357.
67. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson JJ. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, 1992, 50: 241-249.
68. Abushahba F, Renvert S, Polyzois I, Claffey N. Effect of grafting materials on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implant Research*, 2008, 19: 329-334.
69. Wheeler SL, Holmes RE, Calhoun CJ, Implants M. Six-year clinical and histologic study of sinus-lift grafts. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1996, 11.
70. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Jakob AJCOIR. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clinical Oral Implant Research*, 2000, 11: 230-241.
71. Avera SP, Stampely WA, McAllister BS, Implants M. Histologic and clinical observations of resorbable and nonresorbable barrier membranes used in

- maxillary sinus graft containment. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 1997, 12.
72. Tofe A, Watson B, Bowerman MJ. Solution and cell mediated resorption of grafting materials. *J Oral Implantol*, 1991, 17: 345.
73. Timoçin N, Kaynar A, Öztürk S, Sungur A, Demiryont MJ. Biocoral Uygulanan Kemik Defektlerinde İyileşmenin Radyonüklit Ve Histopatolojik Yöntemlerle İncelenmesi-Healing Effect Of Biocoral In Experimentally Prepared Bone Cavities: Radionuclide and Histopathologic Study. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 1993, 27: 173-178.
74. Stevenson S. Biology of bone grafts. *Orthopedic Clinics*, 1999, 30: 543-552.
75. Soost F, Koch S, Stoll C, Amthauer H, Große-Siestrup C, Zorn PJC, banking t. Validation of bone conversion in osteoconductive and osteoinductive bone substitutes. *Cell and Tissue Banking*, 2001, 2: 77-86.
76. Garg AK. Bone biology, harvesting, and grafting for dental implants: rationale and clinical applications. *Quintessence Publishing Company*, 2004.
77. Roden JR, America mscoN. Principles of bone grafting. *Oral And Maxillofacial Surgery Clinics Of North America*, 2010, 22: 295-300.
78. Kahnberg K-E, Rasmusson L, Zellin G. Bone grafting techniques for maxillary implants. *Baski. Wiley Online Library*, 2005.
79. Babis GC, Soucacos PN. Bone scaffolds: the role of mechanical stability and instrumentation. *Injury*, 2005, 36: S38-S44.
80. An HS, Xu R, Lim TH, McGrady L, Wilson C. Prediction of bone graft strength using dual-energy radiographic absorptiometry. 1994, 19: 2358-2362; discussion 2362-2353.

81. Ozaki A. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *Journal of orthopaedic science*, 2000, 5: 64-70.
82. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annual Review Of Cell Biology*, 1990, 6: 597-641.
83. Amento EP, Beck, L. S. TGF-beta and wound healing. *Ciba Found Symp*, 1991: 115-123.
84. Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992, 200: 165-170.
85. Liu Z, Luyten F, Lammens J, Dequeker J, histopathology. Molecular signaling in bone fracture healing and distraction osteogenesis. *Histology and Histopathology*, 1999, 14: 587-595.
86. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113: 685-700.
87. Jang C-W, Chen C-H, Chen C-C, Chen J-y, Su Y-H, Chen R-H. TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nature Cell Biology*, 2002, 4: 51.
88. Siegel PM, Massagué J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2003, 3: 807.
89. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 2006, 24: 99-146.
90. Bolander ME, Medicine. Regulation of fracture repair by growth factors. *Experimental Biology and Medicine*, 1992, 200: 165-170.

91. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander MEJTJob. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. 1990, 110: 2195-2207.
92. Sandberg M, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1993: 292-312.
93. Talley-Ronsholdt DJ, Lajiness E, Nagodawithana K, Biology-Animal D. Transforming growth factor-beta inhibition of mineralization by neonatal rat osteoblasts in monolayer and collagen gel culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* ,1995, 31: 274-282.
94. Cheifetz S, Li I, McCulloch C, Sampath K, Sodek J. Influence of Osteogenic Protein-1 (OP-1; BMP-7) and Transforming Growth Factor- β 1 on Bone Formation In Vitro. *Journal Connective Tissue Research*, 1996, 35: 71-78.
95. Kasagi S, Chen W. Tgf-Beta1 On Osteoimmunology And The Bone Component Cells. *Cell & Bioscience*, 2013, 4:1-3.
96. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology*, 1990, 6: 597-641.
97. Prisell PT, Edwall D, Lindblad J, Levinovitz A, Norstedt G. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcified Tissue International* ,1993, 53: 201-205.
98. Van De Putte Ka, Urist Mr. Osteogenesis in the Interior of Intramuscular Implants of Decalcified Bone Matrix. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1965, 43: 257-270.
99. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150: 893-899.
100. Suzuki T, Bessho K, Segami N, Iizuka T, Nojima T, Surgery M. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-2 in the oral

- and maxillofacial area of the human embryo. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2001, 39: 289-293.
101. Braig S, Mueller DW, Rothhammer T, Bosserhoff A. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67: 3535-3548.
 102. Yıldırım A, Tunik S, Çetin Ç, Akkuş MJJoIUMF. Osteogenezde Fibroblast Büyüme Faktörleri (FBF) ve Kemik Morfogenetik Proteinlerin (KMP) Rolü. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2009, 16: 135-140.
 103. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cellular signalling*, 2011, 23: 609-620.
 104. Grgurevic L, Macek B, Mercep M, Jelic M, Smoljanovic T, Erjavec I, Dumic-Cule I, Prgomet S, Durdevic D, Vnuk DJB, communications br. Bone morphogenetic protein (BMP) 1-3 enhances bone repair. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 408: 25-31.
 105. Li S-W, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prockop D. The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Cell Biology* 1996, 93: 5127-5130.
 106. Schliephake H, surgery m. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal Of Oral And Maxillofacial Surgery*, 2002, 31: 469-484.
 107. Wozney JMJS. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, 2002, 27: S2-S8.
 108. Niswander L, Martin GR. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature*, 1993, 361: 68.

109. Zou H, Choe K-M, Lu Y, Massague J, Niswander L. BMP signaling and vertebrate limb development. *Cold Spring Harbor Symposia On Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1997; 269-272.
110. Spector JA, Luchs JS, Mehrara BJ, Greenwald JA, Smith LP, Longaker MT, et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2001, 107: 124-134.
111. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *Journal of Cell Biology*, 1991, 113: 681-687.
112. Yang L, Jin Y. Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clinical Orthopaedics And Related Research*, 1990: 249-256.
113. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 1997, 8: 11-20.
114. Wozney, John M. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, 2002, 16: 2-8.
115. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF β and BMP. *Bone*, 1996, 19: S1-S12.
116. Sun J, You-cheng YU. Effect of BMP-2 on osteogenesis of bone mesenchymal stem cells in rats. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2011, 20:4.
117. Song I, Kim BS, Kim, CS. Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2011, 1: 126-131.

118. B Poon, T Kha, S Tran, CR Dass. Bone morphogenetic protein-2 and bone therapy: successes and pitfalls. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, 68: 139-147.
119. FO Ribeiro, MJ Gómez-Benito, J Folgado. In silico mechano-chemical model of bone healing for the regeneration of critical defects: the effect of BMP-2. *PloS one*, 2015, 10:6.
120. Reddi AH. Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Current Opinion In Cell Biology*, 1992, 4: 850-855.
121. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin- 1 α and tumor necrosis factor- α expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *The European Journal of Oral Sciences*, 2006, 114: 423-429.
122. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2020*, 2006, 41: 48-72.
123. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Camacho NP, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, 2007, 41: 928-936.
124. Marks F, Arachidonic acid and companions: an abundant source of biological signals. *Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids*, 1999.
125. Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69: 145-182.
126. Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1992, 7: 1045-1055.
127. Bolander ME, Young MF, Fisher LW, Yamada Y, Termine JD. Osteonectin cDNA sequence reveals potential binding regions for calcium and hydroxyapatite

- and shows homologies with both a basement membrane protein (SPARC) and a serine proteinase inhibitor (ovomucoid). *PNAS*, 1988, 85: 2919-2923.
128. Nakamura H, Kenmotsu S-i, Sakai H, Ozawa H. Localization of CD44, the hyaluronate receptor; on the plasma membrane of osteocytes and osteoclasts in rat tibiae. *Cell And Tissue Research*, 1995, 280: 225-233.
 129. Yamazaki M, Majeska RJ, Yoshioka H, Moriya H, Einhorn TA. Spatial and temporal expression of fibril- forming minor collagen genes (types V and XI) during fracture healing. *Journal of Orthopateic Research*, 1997, 15: 757-764.
 130. Hirakawa K, Hirota S, Ikeda T, Yamaguchi A, Takemura T, Nagoshi J, Yoshiki S, Suda T, Kitamura Y, Nomura SJ. Localization of the mRNA for bone matrix proteins during fracture healing as determined by in situ hybridization. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1994, 9: 1551-1557.
 131. Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, Yamada N, Ten Duke P, Miyazono K, Sakou TJ. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1995, 10: 1651-1659.
 132. Baker JC, Harland RM. From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Current Opinion In Genetics & Development*, 1997, 7: 467-473.
 133. Heldin C-H, Miyazono K, Ten D. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997, 390: 465.
 134. Persikov AV, Brodsky B. Unstable molecules form stable tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, 99: 1101-1103.
 135. Welgus HG, Jeffrey JJ, Eisen AZ. The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256: 9511-9515.

136. Dibiase M, Rhodes C. The design of analytical methods for use in topical epidermal growth factor product development. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 1991, 43: 553-558.
137. Carpenter G. Epidermal Growth Factor Handbook Ex. *Pharmac*, 1981, 57: 89-123.
138. Erbaş D, Oygür T, Afitap A. Submandibuler Bez Ekstresinin Yara İyileşmesine Olan Etkisi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 1988, 5: 139-147.
139. Bhora F, Dunkin B, Batzri S, Aly H, Bass BL, Sidawy A, Harmon JJ. Effect of growth factors on cell proliferation and epithelialization in human skin. *Journal of Surgical Research*, 1995, 59: 236-244.
140. Mechanic GL, Kuboki Y, Shimokawa H, Nakamoto K, Sasaki S, Kawanishi Y. Collagen crosslinks: direct quantitative determination of stable structural crosslinks in bone and dentin collagens. *Biochemical and biophysical research communications*, 1974, 60: 756-763.
141. Kronick P, Jimenez SA. The size of collagen fibrils that stimulate platelet aggregation in human plasma. *Biochemical Journal*, 1980, 186: 5-12.
142. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. 1995, 64: 403-434.
143. Liu SH, Yang R-S, Al-Shaikh R, Lane JM. Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Annual review of biochemistry*, 1995: 265-278.
144. Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. *Current opinion in cell biology*, 1993, 5: 883-890.
145. Rehn M, Pihlajaniemi T. Alpha 1 (XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and

- homology with type XV collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91: 4234-4238.
146. Van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *The FASEB journal*, 1991, 5: 2814-2823.
 147. Hollinger J, Wong ME. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontology*, 1996, 82: 594-606.
 148. Hiltunen A, Aro HT, Vuorio E. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in mice. *Clinical orthopaedics and related research*, 1993: 23-27.
 149. Paralkar VM, Vukicevic S, Reddi AH. Transforming growth factor β type 1 binds to collagen IV of basement membrane matrix: implications for development. *Developmental biology*, 1991, 143: 303-308.
 150. Birk DE, Fitch J, Babiarz J, Doane K, Linsenmayer T. Collagen fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *Journal of cell science*, 1990, 95: 649-657.
 151. Shimokomaki M, Wright DW, Irwin MH, van der Rest M, Mayne R. The Structure and Macromolecular Organization of Type IX Collagen in Cartilage a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990, 580: 1-7.
 152. Hayda RA, Brighton CT, Esterhai J. Pathophysiology of delayed healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 1998, 355: S31-S40.
 153. Mian M, Beghe F, Mian E. Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *International journal of tissue reactions*, 1992, 14: 1-9.
 154. Beghe F, Menicagli C, Neggiani P, Zampieri A, Trallori L, Teta E, Rosini S. Lyophilized non-denatured type-I collagen (Condress) extracted from bovine Achilles' tendon and suitable for clinical use. 1992, 14: 11-19.

155. Lott J, Wolf P. Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST). *Clinical enzymology: a case-oriented approach*, 1986: 111-138.
156. Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2004, 15: 91-96.
157. Masella R, Di Benedetto R, Varì R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2005, 16: 577-586.
158. AKSOY Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2002, 22: 442-448.
159. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. 2007, 39: 44-84.
160. Blumberg J. Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2004, 134: 3188S-3189S.
161. Yildirim S, Oto G, Comba B, Ekin S, Cinar DA. An Investigation Of The Protective Effects Of Resveratrol On Some Biochemical Parameters And Histopathological Findings In Experimentally-Induced Chronic Fluorosis In Rats. *Fluoride*, 2017, 50: 365-373.
162. Yildirim S, Ekin S, Huyut Z, Oto G, Comba A, Uyar H, Sengul E, Cinarf A. Effect Of Chronic Exposure To Sodium Fluoride And 7, 12-Dimethylbenz [A] Anthracene On Some Blood Parameters And Hepatic, Renal, And Cardiac Histopathology In Rats. *Fluoride*, 2018, 51.
163. Turkecul R, Arihan SK, Yildirim S, Arihan O, Oto G, Ekin S, Yildize D. Effect Of Acute And Chronic Fluoride Administration On Bone Histopathology, Bone

- Fluoride Accumulation, And Locomotor Activity In An Animal Model Of Paleopathological Fluorosis,. *Flouride*, 2019, 192: 214-221.
164. Geyikoglu F, Koc K, Colak S, Erol HS, Cerig S, Yardimci BK, Cakmak O, Dortbudak MB, Eser G, Aysin F. Propolis and its combination with boric acid protect against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury by inhibiting oxidative stress, inflammation, DNA damage, and apoptosis in rats. *Biological trace element research*, 2019, 192: 214-221.
 165. Gozeler MS, Akdemir FNE, Yildirim S, Sahin A, Eser G, Askin S. Levosimendan ameliorates cisplatin-induced ototoxicity: Rat model. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2019, 122: 70-75.
 166. Turk E, Kandemir FM, Yildirim S, Caglayan C, Kucukler S, Kuzu M. Protective effect of hesperidin on sodium arsenite-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Biological trace element research*, 2019, 189: 95-108.
 167. Bülbül G, Mİs L, Şengül E, Yıldırım S, Çelebİ F, Çınar A. Protective effects of Naringin on liver enzymes (AST, ALT, ALP) and histopathology in Cyclophosphamide-induced rats. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2018, 13: 182-190.
 168. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 1966, 16: 359-364.
 169. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Nalytical Biochemistry*, 1968, 25: 192-205.

170. Kandemir FM, Yildirim S, Caglayan C, Kucukler S, Eser G. Protective effects of zingerone on cisplatin-induced nephrotoxicity in female rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26: 22562-22574.
171. Sengul E, Gelen V, Yildirim S, Tekin S, Dag Y. The Effects of Selenium in Acrylamide-Induced Nephrotoxicity in Rats: Roles of Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and DNA Damage. *Biological trace element research*, 2020: 1-12.
172. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2008, 85: 206-217.
173. Kim MG, Shin DM, Lee SW. The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 2010, 63: 459-466.
174. Kondo N, Ogose A, Tokunaga K, Ito T, Arai K, Kudo N, Inoue H, Irie H, Endo N. Bone formation and resorption of highly purified β -tricalcium phosphate in the rat femoral condyle. *Biomaterials*, 2005, 26: 5600-5608.
175. Hutchens SA, Champion C, Assad M, Chagnon M, Hing KA. Efficacy of silicate-substituted calcium phosphate with enhanced strut porosity as a standalone bone graft substitute and autograft extender in an ovine distal femoral critical defect model. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2016, 27: 20.
176. Histing T, Garcia P, Holstein J, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke M, Wehner T, Bindl R. Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, 2011, 49: 591-599.

177. An Y, Friedman R. Animal models of bone defect repair. *Animal models in orthopaedic research*, 1999: 241-260.
178. Asutay F, Polat S, Gül M, Subaşı C, Kahraman SA, Karaöz E. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis. 2015, 60: 1729-1735.
179. Ozdemir H, Toker H, Balcı H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. *Archives of oral biology*, 2013, 48: 722-726.
180. Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Chin GS, Steinbrech DS, Saadeh PB, Luchs JS, Paccione MF, Gittes GK, Longaker MT. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: immature versus mature dura mater. *Plastic and reconstructive surgery*, 2000, 105: 1382-1392.
181. Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Cells Tissues Organs*, 1990, 138: 185-192.
182. Phillips A. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, 2005, 36: S5-S7.
183. Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA. The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plastic and reconstructive surgery*, 1993, 92: 405-410.
184. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*, 1998, 66: 1272-1278.
185. Liu W, Kang N, Dong Y, Guo Y, Zhao D, Zhang S, Zhou L, Seriwatanachai D, Liang X, Yuan Q Effect of resorbable collagen plug on bone regeneration in rat critical-size defect model. *Implant dentistry*, 2016, 25: 163-170.

186. Shimoji S, Miyaji H, Sugaya T, Tsuji H, Hongo T, Nakatsuka M, Uz Zaman K, Kawanami MJ. Bone perforation and placement of collagen sponge facilitate bone augmentation. *Journal of periodontology*, 2009, 80: 505-511.
187. Nannmark U, Azarmehr I. Collagenated Cortico- Cancellous Porcine Bone Grafts. A study in rabbit maxillary defects. *Clinical Implant Dentistry And Related Research*, 2010, 12: 161-163.
188. Maciel J, Momesso GAC, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, Perri de Carvalho PS, Faverani LP, Farnezi Bassi AP. Bone Healing Evaluation in Critical-Size Defects Treated With Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen. *Implant Dentistry*, 2017, 26: 296-302.
189. Fuerst G, Tangl S, Mittlböck M, Sanroman F, Watzek G. Effect of platelet- released growth factors and collagen type I on osseous regeneration of mandibular defects: A pilot study in minipigs. *Journal Of Clinical Periodontology*, 2004, 31: 784-790.
190. Santos T, Abuna R, Almedia A, Beloti M, Rosa A. Effect Of Collagen Sponge And Fibrin Glue On Bone Repair. *Journal of Applied Oral Science*, 2015, 23: 623-628.
191. Trotta DR, Gorny Jr C, Zielak JC, Gonzaga CC, Giovanini AF, Deliberador TM. Bone repair of critical size defects treated with mussel powder associated or not with bovine bone graft: Histologic and histomorphometric study in rat calvaria. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 2014, 42: 738-743.
192. Saruhan N, Ertas Ü. Atrofik Alveolar Kretlerin Ogmentasyonunda Ekstraoral Otojen Kemik Grefti Uygulamaları. *Turkiye Klinikleri Journal Of Dental Sciences Special Topics*, 2012, 3: 18-28.

193. Winkler T, Sass F, Duda G, Schmidt-Bleek K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone & joint research*, 2018, 7: 232-243.
194. Ertaş Ü, Ömer K, İlhami K, Erdoğan F, Akçay G. Experimental Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Rekombinant Biyosentetik Growth Hormon Tedavisinin Ve Ektreotid Asetatin Rolü. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2004, 2004.
195. Acar AH, Yolcu Ü, Gül M, Keleş A, Erdem NF, Kahraman SA. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Archives of oral biology*, 2015, 60: 606-614.
196. Palmieri B. Heterologous collagen in wound healing: a clinical study. *International journal of tissue reactions*, 1992, 14: 21-25.
197. Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the $\alpha 2$ -integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 32988-32994.
198. Shimoji S, Miyaji H, Sugaya T, Tsuji H, Hongo T, Nakatsuka M, Uz Zaman K, Kawanami M. Bone perforation and placement of collagen sponge facilitate bone augmentation. *Journal of periodontology*, 2009, 80: 505-511.
199. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, Endodontology*. 1998, 85: 638-646.
200. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology e-book. Baskı. *Elsevier Health Sciences*, 2006.

201. Wray D, Stenhouse D, Lee D, Clark AJ. *Textbook of general and oral surgery*. Baskı. Elsevier Health Sciences, 2003.
202. Güngörmüş M, Kaya Ö, Gündoğdu C, Gürbüz, G. Tip I Kollajen Uygulanan Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Esnasında Ortaya Çıkan Enflamatuvar Cevabin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2000, 1.
203. Yiğiter Ö, Yorukoglu AC, Şentürk N, Dodurga Y, Demirkan AF. The effects of type I collagen on bone defects and gene expression changes for osteogenesis: In a rat model. *Journal of cellular biochemistry*, 2019, 120: 11525-11530.
204. Kiliçoğlu SS. Mikroskopi Düzeyinde Kırık İyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 2002
205. Saadeh PB, Khosla RK, Mehrara BJ, Steinbrech DS, McCormick SA, DeVore DP, Longaker MT. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2001, 12: 573-579.
206. Noyan A. Yaşamda Ve Hekimlikte Fizyoloji, 10. Baskı. *Meteksan Ankara*, 1993: 1019-1032.
207. Hulse D, Hyman B. Fracture biology and biomechanics. *Textbook of small animal surgery*, 1993, 2: 1785-1792.
208. Remedios A. Bone and bone healing. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*, 1999, 29: 1029-1044.
209. Sweeney TJOT. Transplanted osteoblasts in type I collagen gels repair critical size rat calvarial defects. *Orthopaedic Transactions*, 1993, 17: 785.
210. Brunel G, Piantoni P, Elharar F, Benqué E, Marin P, Zahedi S. Regeneration of rat calvarial defects using a bioabsorbable membrane technique: influence of collagen cross- linking. *Journal of Periodontology*, 1996, 67: 1342-1348.

211. Zahedi S, Legrand R, Brunel G, Albert A, Dewé W, Coumans B, Bernard J. Evaluation of a diphenylphosphorylazide- crosslinked collagen membrane for guided bone regeneration in mandibular defects in rats. *Journal of periodontology*, 1998, 69: 1238-1246.
212. Donath K, Laaß M, Günzl H. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Archiv A*, 1992, 420: 131-137.
213. Pelaez M, Susin C, Lee J, Fiorini T, Bisch FC, Dixon DR, McPherson III JC, Buxton AN, Wikesjö UM. Effect of rh BMP- 2 dose on bone formation/maturation in a rat critical- size calvarial defect model. *Journal of clinical periodontology*, 2014, 41: 827-836.
214. Keogh MB, O'Brien FJ, Daly JS. A novel collagen scaffold supports human osteogenesis—applications for bone tissue engineering. *Cell and tissue research*, 2010, 340: 169-177.
215. Deporter DA, Komori N, Howley TP, Shiga A, Ghent A, Hansel P, Parisien K. Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria. *Calcified tissue international*, 1988, 42: 321-325.
216. Kim JH, Kim SM, Kim JH, Kwon KJ, Park Y. Effect of type I collagen on hydroxyapatite and tricalcium phosphate mixtures in rat calvarial bony defects. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2008, 34: 36-48.
217. Masi L, Franchi A, Santucci M, Danielli D, Arganini L, Giannone V, Formigli L, Benvenuti S, Tanini A, Beghe F. Adhesion, growth, and matrix production by osteoblasts on collagen substrata. *Calcified tissue international*, 1992, 51: 202-212.

218. Kinoshita S, Finnegan M, Bucholz RW, Mizuno K. Three-dimensional collagen gel culture promotes osteoblastic phenotype in bone marrow derived cells. *The Kobe journal of medical sciences*, 1999, 45: 201-211.
219. Palmieri D, Camardella L, Ulivi V, Guasco G, Manduca P. Trimer carboxyl propeptide of collagen I produced by mature osteoblasts is chemotactic for endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 32658-32663.
220. Chimal- Monroy J, Bravo- Ruiz T, Furuzawa- Carballeda G, De La Cruz J, Almazan A, Krötzsch- Gómez F, Arrellín G, Díaz De León Ljaotnyaos. Collagen- PVP Accelerates New Bone Formation Of Experimentally Induced Bone Defects In Rat Skull And Promotes The Expression Of Osteopontin And SPARC During Bone Repair Of Rat Femora Fractures A. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 857: 232-236.
221. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel K. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)—an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*, 2005, 26: 2575-2584.
222. Meyer RA, Meyer MH, Phieffer LS, Banks DM. Delayed union of femoral fractures in older rats: decreased gene expression. 2001, 2: 2.
223. Niikura T, Hak DJ, Reddi AH. Global gene profiling reveals a downregulation of BMP gene expression in experimental atrophic nonunions compared to standard healing fractures. *BMC musculoskeletal disorders*, 2006, 24: 1463-1471.
224. Ripamonti U, Duneas N. Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plastic and reconstructive surgery*, 1998, 101: 227-239.
225. Groeneveld E, Burger E. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European journal of endocrinology*, 2000, 142: 9-21.

226. Koda JE, Rapraeger A, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260: 8157-8162.
227. Ueda H, Hong L, Yamamoto M, Shigeno K, Inoue M, Toba T, Yoshitani M, Nakamura T, Tabata Y, Shimizu Y. Use of collagen sponge incorporating transforming growth factor- β 1 to promote bone repair in skull defects in rabbits. *Biomaterials*, 2002, 23: 1003-1010.
228. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E. Growth factors in bone repair. *La Chirurgia degli organi di movimento*, 2008, 92: 161-168.
229. Chin D, Boyle GM, Parsons PG, Coman WB. What is transforming growth factor-beta (TGF- β). *British journal of plastic surgery*, 2004, 57: 215-221.
230. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *Journal of bone and mineral research*, 2002, 17: 513-520.
231. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *The Journal of Immunology*, 1990, 145: 3297-3303.
232. Brown S, Kramers P. Indirect (secondary) bone healing. *Disease Mechanisms in Small Animal Surgery. 2nd ed. Philadelphia*, 1993: 671-677.
233. You A-S, Jeong M-H, Park K-H, Kim B-S, Lee J-B, Choi J-H, Kwon O-K, Kim J. Effect on antioxidant function of onion to reduce pesticides toxicity. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 2007, 11: 222-229.
234. Cundy T, Reid IR. Paget's disease of bone. *Clinical biochemistry*, 2012, 45: 970-975.

235. Zhang Y, Jia Z, Yuan H, Dusad A, Ren K, Wei X, Fehringer EV, Purdue PE, Daluiski A, Goldring SR. The evaluation of therapeutic efficacy and safety profile of simvastatin prodrug micelles in a closed fracture mouse model. *Pharmaceutical research*, 2016, 33: 1959-1971.
236. Sun F, Kang HG, Ryu S-C, Kim JE, Park EY, Hwang DY, Lee J. Guided bone regeneration using a flexible hydroxyapatite patch. *Journal of biomedical nanotechnology*, 2013, 9: 1914-1920.
237. Sazanova K, Alexandrov M, Nanev V, Tsocheva-Gaytandzhieva N, Vladov I, Dimitrov P, Gabrashanska M. Rat Blood Biochemical Markers Tested After Calvaria Implantation With Ion-Modified Calcium Phosphate Biomaterials.
238. Kühne H, Ullmann U, Kühne F. New aspects on the pathophysiology of wound infection and wound healing—the problem of lowered oxygen pressure in the tissue. *Infection*, 1985, 13: 52-56.
239. Barber DA, Harris SR. Oxygen Free Radicals and Antioxidants: A Review: The use of antioxidant vitamin supplements to scavenge free radicals could decrease the risk of disease. *American pharmacy*, 1994, 34: 26-35.
240. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 2002, 22: 442-448.
241. Zhang G-S, Fu Q, Yue X. Study On Antioxidation Of D-Galactose Induced Aged Rat By Hydrolyzed Collagen From Chicken Bone. *Molecules*, 2010: 103.
242. Kwiecien S, Konturek P, Sliwowski Z, Mitis-Musiol M, Pawlik M, Brzozowski B, Jasnos K, Magierowski M, Konturek S, Brzozowski T. Interaction between selective cyclooxygenase inhibitors and capsaicin-sensitive afferent sensory nerves in pathogenesis of stress-induced gastric lesions. Role of oxidative stress. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2012, 63: 143.

243. Matsuda T, Tao H, Goto M, Yamada H, Suzuki M, Wu Y, Xiao N, He Q, Guo W, Cai Z. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. *Carcinogenesis*, 2012, 34: 121-127.
244. Getzoff ED, Tainer JA, Weiner PK, Kollman PA, Richardson JS, Richardson DC. Electrostatic recognition between superoxide and copper, zinc superoxide dismutase. *Nature*, 1983, 306: 287.
245. Farkas R, Selmei L, Tulassay Z, Pronai L. Superoxide-dismutase activity of the gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Anticancer research*, 2003, 23: 4309-4312.
246. Kwiecień S, Brzozowski T, Konturek P, Konturek S. The Role Of Reactive Oxygen Species In Action Of Nitric. *Journal of physiology and pharmacology*, 2002, 53: 761-773.
247. Kwiecien S, Pawlik M, Brzozowski T, Pawlik W, Konturek S. Reactive oxygen metabolite action in experimental, stress model of gastric mucosa damage. *Gastroenterol Pol*, 2010, 17: 234-243.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Kamile DİLEK SEÇKİN
Doğum Tarihi: 22/07/1991
Doğum Yeri: Bucak/Burdur
Medeni Hali: Evli
Uyruğu: TC
Adres: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Yakutiye/Erzurum
Tel: 0442 231 1801
Faks: 0442 236 1375
E-mail: dddilekdilekkk@hotmail.com
Eğitim
Lise: Burdur Bucak Mehmet Cadıl Anadolu Öğretmen Lisesi
Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi-2014
Uzmanlık: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: YDS 2013 Eylül: 52,5
Almanca:
Rusça:
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800311448
Konu : HADYEK Kararı.

30.10.2018

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 21.09.2018 tarihli ve 25330273-929-E.1800268084 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.10.2018 tarih ve 11 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 193 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi>

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=5262DDA>

TOPLANTI TARİHİ : 25.10.2018

TOPLANTI SAYISI : 11

KARAR NO 193: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı, Klinik Diş Hekimliği Bölümü, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Ertunç DAYI'nın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **"Graft Maddelerine Mekanik Stabilité Sağlamak Amacıyla Üretilmiş, Heterolog Tip 1 ve Tip III Kollajen İçeren Jelin Kemik İyileşmesi Üzerine Olan Etkisinin Ratlar Üzerinde Deneysel Olarak İncelenmesi"** isimli araştırma çalışması ile ilgili Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığının 21.09.2018 tarih ve 25330273-929-E.1800268084 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; **(Yönetmeliğin 8.maddesinin 8/h bendi gereğince, Prof.Dr.Ertunç DAYI, görüşmeye katılmadı ve oy kullanmadı).** karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.





ATAÜRK
ÜNİVERSİTESİ

Republic of Turkey

Atatürk University

ii ATASEM
ATASEM
ATASEM

LOCAL ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL STUDIES

CERTIFICATE FOR USE OF ANIMALS IN EXPERIMENTAL STUDIES

GELENGÜL VURVAŞOĞLU

is awarded to participate 40 hours teaching and 40 hours practice (Category B) certificate use of animals in experimental studies course organized according to "Working Rules and Conditions for Ethical Committees in Charge of Animal Studies" (2007/11) regulations of the Ministry of Forestry and Water Affairs.

Certificate Number: 332
Date: 22/09/2017

Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ
President of the Local Ethical
Committee for Animal Studies

Prof. Dr. Ömer ÇOMAKLI
Rector