

**EDİP ÖZDEN**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**

**İSTANBUL-2021**

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ )**

**C VİTAMİNİ VE ANTIİNFLAMATUAR KULLANIMININ  
KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
İNCELENMESİ (DENEYSEL ÇALIŞMA)**

**EDİP ÖZDEN**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. R. DENİZ FIRAT**

**AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**AĞIZ, DIŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ  
PROGRAMI**

**İSTANBUL-2021**

## TEZ ONAYI



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, desteğini daima yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Refia Deniz Fırat'a,

Tezimin biyokimyasal çalışmaları aşamasında bilgisini ve zamanını esirgemeyen İ.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Pervin Vural'a,

Tezimin histopatolojik değerlendirmeleri aşamasında bilgi birikimlerinden yararlandığım İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü, Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Vakur Olgaç'a,

Desteğini her zaman yanımda hissettiğim sayın Prof. Dr. Mehmet Yaltırık'a,

Doktora eğitimim boyunca beni her yönden destekleyen, sonsuz yardımlarda bulunan Dr. Cevat Tuğrul Turgut, Dr. Reha Gür ve Dt. Begüm Genç'e,

Hayatım boyunca bana güvenen ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen annem Sündüs Özden'e, babam Ali Özden'e ve abim Enez Zeki Özden'e

teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                     |                                         |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| TEZ ONAYI .....                                     | İİ                                      |
| BEYAN.....                                          | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| İTHAF.....                                          | İİİ                                     |
| TEŞEKKÜR.....                                       | İV                                      |
| İÇİNDEKİLER .....                                   | V                                       |
| TABLolar LİSTESİ.....                               | İX                                      |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                              | X                                       |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....                | Xİİ                                     |
| ÖZET .....                                          | XV                                      |
| ABSTRACT.....                                       | XVİ                                     |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                               | 1                                       |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                             | 3                                       |
| 2.1. KEMİK DOKUSU.....                              | 3                                       |
| 2.1.1. Kemik Dokusunun Genel Özellikleri .....      | 3                                       |
| 2.1.2. Kemik Dokusunun Kimyasal Yapısı.....         | 4                                       |
| 2.1.2.1. İnorganik Yapı.....                        | 4                                       |
| 2.1.2.2. Organik Yapı.....                          | 5                                       |
| 2.1.3. Kemik Hücreleri .....                        | 5                                       |
| 2.1.3.1. Osteoprogenitör Hücreler .....             | 6                                       |
| 2.1.3.2. Osteoblastlar .....                        | 6                                       |
| 2.1.3.3. Osteositler.....                           | 7                                       |
| 2.1.3.4. Osteoklastlar .....                        | 8                                       |
| 2.1.4. Kemik Dokusunun Morfolojik Özellikleri ..... | 9                                       |
| 2.1.5. Periosteum .....                             | 9                                       |
| 2.1.6. Endosteum.....                               | 10                                      |
| 2.1.7. Kemik Dokusu Tipleri.....                    | 10                                      |
| 2.1.7.1. Kortikal ve Kansellöz Kemik .....          | 10                                      |
| 2.1.7.2. Woven ve Lameller Kemik .....              | 11                                      |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.8. Kemik Oluşumu ve Gelişiminin Evreleri.....                                | 11 |
| 2.1.8.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu (Doğrudan Kemikleşme) .....                | 12 |
| 2.1.8.2. Endokondral Kemik Oluşumu.....                                          | 13 |
| 2.1.9. Kemik Büyüme ve Gelişiminin Evreleri .....                                | 14 |
| 2.1.9.1. Modelling (Şekillendirme) .....                                         | 14 |
| 2.1.9.2. Remodeling (Yeniden şekillenme).....                                    | 14 |
| 2.1.10. Kemik Dokusunun İyileşmesi .....                                         | 15 |
| 2.1.10.1. İltihap Evresi .....                                                   | 15 |
| 2.1.10.2. Tamir Evresi .....                                                     | 17 |
| 2.1.10.3. Remodeling (Yeniden Şekillenme) Evresi .....                           | 19 |
| 2.2. Kemikte Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler .....                         | 19 |
| 2.3. C vitamini.....                                                             | 20 |
| 2.3.1. Vitamin C'nin Metabolizması .....                                         | 21 |
| 2.3.2. C vitaminin fonksiyonları.....                                            | 22 |
| 2.4. NSAİ .....                                                                  | 24 |
| 2.4.1. NSAİ İlaçların ve Analjezik Antipiretik İlaçların Sınıflandırılması ..... | 25 |
| 2.4.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre.....                                           | 25 |
| 2.4.1.2. Yarılanma Ömrüne Göre .....                                             | 26 |
| 2.5. NSAİ İlaçların Genel Etki Mekanizmaları.....                                | 26 |
| 2.5.1. Antiinflamatuvar Etki.....                                                | 26 |
| 2.5.2. Analjezik Etki.....                                                       | 27 |
| 2.5.3. Antipiretik Etki.....                                                     | 27 |
| 2.6. Prostaglandinler .....                                                      | 28 |
| 2.6.1. Prostaglandinlerin Biyosentezi ve Metabolizması .....                     | 28 |
| 2.6.2. Prostaglandinlerin Dokulardaki Dağılımı ve Görevleri .....                | 29 |
| 2.6.3. NSAİ İlaçlarla Prostaglandin Sentezinin İnhibisyonu .....                 | 30 |
| 2.7. Serbest Radikaller .....                                                    | 31 |
| 2.7.1. Serbest Oksijen Türevleri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) .....          | 32 |
| 2.7.2. Superoksit Radikali .....                                                 | 33 |
| 2.7.3. Hidrojen Peroksit.....                                                    | 33 |
| 2.7.4. Hidroksil Radikali .....                                                  | 34 |
| 2.7.5. Serbest Radikallerin Etkileri .....                                       | 34 |
| 2.7.5.1. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri.....            | 35 |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7.5.2. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri .....               | 35 |
| 2.7.5.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....                     | 35 |
| 2.7.5.4. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri.....                       | 36 |
| 2.8. Antioksidanlar .....                                                   | 36 |
| 2.8.1. Antioksidan Sistemin Enzimleri.....                                  | 37 |
| 2.8.1.1. Superoksit Dismutaz (SOD).....                                     | 37 |
| 2.8.1.2. Katalaz.....                                                       | 38 |
| 2.8.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....                                 | 38 |
| 2.8.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-R).....                                    | 38 |
| 2.8.1.5. Glutasyon Transferaz (GST).....                                    | 39 |
| 2.8.1.6. Glutasyon (GSH) .....                                              | 39 |
| 2.9. Oksidan/Antioksidan Dengeyi Belirleyen Biyokimyasal Parametreler ..... | 40 |
| 2.9.1. MDA.....                                                             | 40 |
| 2.9.2. Nitrik Oksit (NO) .....                                              | 40 |
| 2.9.3. FRAP.....                                                            | 41 |
| 2.9.4. Protein Karbonil (PK) .....                                          | 42 |
| 2.9.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS).....                                   | 42 |
| 2.9.6. Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ ).....                      | 42 |
| 2.9.7. ALP .....                                                            | 42 |
| 2.9.8. Osteokalsin .....                                                    | 43 |
| 2.9.9. Tiol .....                                                           | 43 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                     | 44 |
| 3.1. GEREÇ.....                                                             | 44 |
| 3.2. YÖNTEM.....                                                            | 45 |
| 3.2.1. Denek Seçimi .....                                                   | 45 |
| 3.2.2. Çalışma Planı.....                                                   | 46 |
| 3.2.3. Çalışma Grupları .....                                               | 46 |
| 3.2.3.1. Kontrol Grubu .....                                                | 46 |
| 3.2.3.2. Deney Grubu .....                                                  | 46 |
| 3.2.4. Cerrahi Yöntem.....                                                  | 47 |
| 3.3. Biyokimyasal Analizler.....                                            | 49 |
| 3.4. Histopatolojik Değerlendirme.....                                      | 50 |
| 3.5. İstatistiksel Değerlendirme .....                                      | 51 |

|                                   |                                         |
|-----------------------------------|-----------------------------------------|
| 4. BULGULAR.....                  | 53                                      |
| 4.1. Biyokimyasal Bulgular .....  | 53                                      |
| 4.2. Histopatolojik Bulgular..... | 63                                      |
| 5. TARTIŞMA .....                 | 73                                      |
| 6. SONUÇ .....                    | 87                                      |
| KAYNAKLAR .....                   | 88                                      |
| ETİK KURUL KARARI .....           | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....   | 105                                     |
| ÖZGEÇMİŞ.....                     | <b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b> |



## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2-1: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri.....                                              | 32 |
| Tablo 2-2: Organizmada antioksidan sistem elemanları.....                                        | 37 |
| Tablo 4-1: Biyokimyasal parametrelerin 7. gün sonuçlarının gruplar arası değerlendirilmesi.....  | 53 |
| Tablo 4-2: Biyokimyasal parametrelerin 21. gün sonuçlarının gruplar arası değerlendirilmesi..... | 54 |
| Tablo 4-3: Kontrol grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi.....                     | 56 |
| Tablo 4-4: C vitamini grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi.....                  | 56 |
| Tablo 4-5: Voltaren grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi.....                    | 57 |
| Tablo 4-6: C vitamini grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi.....                  | 57 |
| Tablo 4-7: Grupların bir arada gösterimi.....                                                    | 58 |
| Tablo 4-8: İltihap düzeylerine ilişkin değerlendirmeler.....                                     | 63 |
| Tablo 4-9: Fibrozis düzeylerine ilişkin değerlendirmeler.....                                    | 64 |
| Tablo 4-10: İyileşme düzeylerine ilişkin değerlendirmeler.....                                   | 65 |
| Tablo 4-11: Yeni kemik oluşumu düzeylerine ilişkin değerlendirmeler.....                         | 67 |
| Tablo 4-12: Nekroz varlığına ilişkin değerlendirmeler.....                                       | 68 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1: Kemik dokunun yapısı.....                                                                                                                                      | 4  |
| Şekil 2-2: Kemiğin hücresel elemanları.....                                                                                                                               | 6  |
| Şekil 2-3: Askorbik asit'in kimyasal yapısı.....                                                                                                                          | 20 |
| Şekil 2-4: Prostaglandinlerin biyosentezi.....                                                                                                                            | 29 |
| Şekil 3-1: Deneklerin traşlanarak sağ angulus bölgesinin antiseptik solüsyonla silinip hazırlanması.....                                                                  | 47 |
| Şekil 3-2: İnsizyon sonrası yumuşak dokuların disseksiyonu ve angulusun açığa çıkartılması ve defekt oluşturulması .....                                                  | 48 |
| Şekil 3-3: Defekt oluşturma işlemi sonrası yaranın dikişle kapatılması.....                                                                                               | 48 |
| Şekil 4-1: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki tiol seviyeleri.....                                                                                                | 59 |
| Şekil 4-2: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki MDA seviyeleri.....                                                                                                 | 59 |
| Şekil 4-3: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki FRAP seviyeleri.....                                                                                                | 60 |
| Şekil 4-4: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki ROS seviyeleri.....                                                                                                 | 60 |
| Şekil 4-5: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki PK seviyeleri.....                                                                                                  | 61 |
| Şekil 4-6: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki ALP aktiviteleri.....                                                                                               | 61 |
| Şekil 4-7: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki osteokalsin seviyeleri .....                                                                                        | 62 |
| Şekil 4-8: İltihabın tüm deney gruplarında 7. ve 14. günlerdeki değerlendirmesi.....                                                                                      | 63 |
| Şekil 4-9: Fibrozisin tüm deney gruplarında 7. ve 14. günlerdeki değerlendirmesi.....                                                                                     | 65 |
| Şekil 4-10: İyileşmenin tüm deney gruplarında 7. ve 14. günlerdeki değerlendirmesi.....                                                                                   | 66 |
| Şekil 4-11: Yeni kemik oluşumunun tüm deney gruplarında 7. ve 14. günlerdeki değerlendirmesi.....                                                                         | 67 |
| Şekil 4-12: 7. Gün kontrol grubunda Defekt bölgesinde nekrotik doku artıkları ( oklar) ve preparasyon sırasında oluşan küçük kemik fragmanları ( ok başı) (H&E X100)..... | 59 |

|                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-13: 7 gün C vitamini uygulanan grupta, defekt bölgesinde kısmen köprüleşme sağlayan yeni kemik dokusu (oklar) (H&E X100) .....                                                                                | 69 |
| Şekil 4-14: 7. Gün v grubunda defekt bölgesinde bir kenarda defekti 1/3 oranında kapatan yeni kemik dokusu (oklar) (H&E X100) .....                                                                                   | 70 |
| Şekil 4-15: 7. Gün CV grubunda defekt bölgesinde defekti yarıy yakın bölümünü dolduran yeni kemik yapımı (oklar) (H&E X100) .....                                                                                     | 70 |
| Şekil 4-16: 21 gün Kontrol grubunda defektin 1/3 oranında yeni kemik ile kapandığı görülmektedir (oklar) (H&E X100) .....                                                                                             | 71 |
| Şekil 4-17: 21 gün C grubunda defektin tümüyle yeni kemik dokusu ile dolduğu, yapılan fazla miktarda kemik dokusunun defekt dışına taşıdığı (oklar) ve henüz remodelling' e uğramadığı görülmektedir (H&E X100) ..... | 71 |
| Şekil 4-18: 21 gün V grubunda Defekt bölgesini 1/2 oranında dolduran yeni kemik yapımı (oklar) Bir kenar da konak kemik görülmektedir (ok başı) (H&E x200) .....                                                      | 72 |
| Şekil 4-19: 21 gün CV grubunda defekt bölgesini 2/3 den fazla dolduran yeni kemik dokusu (oklar) (H&E X100) .....                                                                                                     | 72 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

|                                                                    |   |                                       |
|--------------------------------------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <b>Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub></b> | : | Hidroksilapatit                       |
| <b>IGF</b>                                                         | : | İnsülin büyüme faktörü                |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>                                     | : | Tümör nekrozis faktör alfa            |
| <b>TNF-<math>\beta</math></b>                                      | : | Tümör nekrozis faktör beta            |
| <b>PDGF</b>                                                        | : | Trombosit kaynaklı büyüme faktörü     |
| <b>BMP</b>                                                         | : | Kemik morfojenik proteinleri          |
| <b>IL</b>                                                          | : | İnterlökin                            |
| <b>IL-1</b>                                                        | : | İnterlökin-1                          |
| <b>IL-6</b>                                                        | : | İnterlökin-6                          |
| <b>pH</b>                                                          | : | Hidrojen iyonunun gücü                |
| <b>PGE<sub>2</sub></b>                                             | : | Prostaglandin E <sub>2</sub>          |
| <b>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub></b>                     | : | Askorbik asit                         |
| <b>mRNA</b>                                                        | : | Mesajcı ribonükleik asit              |
| <b>K<sub>m</sub></b>                                               | : | Michaelis-Menten hız sabitesi         |
| <b>NSAİ</b>                                                        | : | Non-steroid antiinflamatuvar          |
| <b>PG</b>                                                          | : | Prostaglandin                         |
| <b>PGI<sub>2</sub></b>                                             | : | Prostasiklin                          |
| <b>TXA<sub>2</sub></b>                                             | : | Tromboksan A <sub>2</sub>             |
| <b>PGF<sub>2</sub><math>\alpha</math></b>                          | : | Prostaglandin F <sub>2</sub> $\alpha$ |
| <b>PGD<sub>2</sub></b>                                             | : | Prostaglandin D <sub>2</sub>          |
| <b>PGH<sub>2</sub></b>                                             | : | Prostaglandin H <sub>2</sub>          |
| <b>Cox-1</b>                                                       | : | Siklooksijenaz 1 enzimi               |
| <b>Cox-2</b>                                                       | : | Siklooksijenaz 2 enzimi               |
| <b>PGE<sub>1</sub></b>                                             | : | Prostaglandin E <sub>2</sub>          |
| <b>PGG<sub>2</sub></b>                                             | : | Prostaglandin G <sub>2</sub>          |

|                                     |   |                                       |
|-------------------------------------|---|---------------------------------------|
| <b>(O<sub>2</sub>·<sup>-</sup>)</b> | : | Süperoksit radikali                   |
| <b>OH<sup>-</sup></b>               | : | Hidroksil radikali                    |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>   | : | Hidrojen peroksit                     |
| <b>NO</b>                           | : | Nitrik oksit                          |
| <b>NO<sub>2</sub></b>               | : | Azot dioksit                          |
| <b>RO</b>                           | : | Alkoksil                              |
| <b>ROO</b>                          | : | Peroksil                              |
| <b>LOOH</b>                         | : | Lipit hidoperoksit                    |
| <b>ONOO-</b>                        | : | Peroksinitrit                         |
| <b>O<sub>2</sub></b>                | : | Singlet Oksijen                       |
| <b>O<sub>3</sub></b>                | : | Ozon                                  |
| <b>O<sub>2</sub>-</b>               | : | Süperoksit                            |
| <b>HOCl</b>                         | : | Hipoklorik asit                       |
| <b>Fe</b>                           | : | Demir                                 |
| <b>DNA</b>                          | : | Deoksiribonükleik asit                |
| <b>RNA</b>                          | : | Ribonükleik asit                      |
| <b>L</b>                            | : | Lipit serbest radikalleri             |
| <b>LOO</b>                          | : | Lipid peroksid radikali               |
| <b>SOD</b>                          | : | Süperoksit dismutaz                   |
| <b>GSH</b>                          | : | Glutasyon (İndirgenmiş şekli)         |
| <b>GST</b>                          | : | Glutasyon transferaz                  |
| <b>GSH-R</b>                        | : | Glutasyon redüktaz                    |
| <b>GSH-Px</b>                       | : | Glutasyon peroksidaz                  |
| <b>GSSG</b>                         | : | Glutasyon (Oksitlenmiş şekli)         |
| <b>NADPH</b>                        | : | Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat |
| <b>SH-</b>                          | : | Sülfidril                             |
| <b>MDA</b>                          | : | Malondialdehid                        |

|                             |   |                                        |
|-----------------------------|---|----------------------------------------|
| <b>PUFA</b>                 | : | Çoklu doymamış yağ asitleri            |
| <b>HNE</b>                  | : | 4-hidroksi-2-nonenal                   |
| <b>ROS</b>                  | : | Reaktif oksijen türleri                |
| <b>AOPP</b>                 | : | İleri oksidasyon protein ürünleri      |
| <b>ALP</b>                  | : | Alkalin fosfataz                       |
| <b>NOx</b>                  | : | Nitrik oksit ürünleri                  |
| <b>FRAP</b>                 | : | Demir indirgeyici antioksidan kapasite |
| <b>PK</b>                   | : | Protein Karbonil                       |
| <b>CTx</b>                  | : | C-Terminal telopeptid                  |
| <b>NaCl</b>                 | : | Sodyum klorür                          |
| <b>TGF-β</b>                | : | Dönüştürücü büyüme faktörü beta        |
| <b>i.p.</b>                 | : | İntraperitoneal                        |
| <b>DCFH-DA</b>              | : | Diklorodihidrofloresein diasetat       |
| <b>DCFH</b>                 | : | Diklorodihidrofloresein                |
| <b>DCF</b>                  | : | Diklorofloresein                       |
| <b>RFU</b>                  | : | Rölatif floresan ünite                 |
| <b>TBA</b>                  | : | Tiyobarbitürik asit                    |
| <b>DNPH</b>                 | : | Dinitrofenilhidrazin                   |
| <b>DTNB</b>                 | : | Dithiobis 2-nitrobenzoat               |
| <b>Fe<sup>3+</sup>-TPTZ</b> | : | Ferrik-tripiryidyltriazin              |
| <b>FeSO<sub>4</sub></b>     | : | Demir sülfat                           |

## ÖZET

Özden E. (2021). C vitamini ve Antiinflamatuvar Kullanımının Kemik İyileşme Üzerine Etkilerinin İncelenmesi (Deneysel çalışma). İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Dış Çene Hastalıkları ve Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

**Anahtar kelimeler:** C Vitamini, Kemik iyileşme, NSAİ, Oksidatif stres

Günümüzde sıkça kullanılmakta olan Non-steroid antiinflamatuvarlar (NSAİ) iyileşme döneminde yeni oluşan kemiğin özelliklerinde bozulmaya ve iyileşmede gecikmeye sebep olmaktadır. Doku hasarı sonrasında bölgede artış gösteren serbest oksijen radikallerinin kemik iyileşmesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir. Bir antioksidan olan C vitaminin bu serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu önleyerek kırık iyileşmesine olumlu etkilerde bulunmaktadır. Bu araştırmada C vitamininin NSAİ kullanılan hayvanlarda oluşturulan deneysel kemik defektinin iyileşmesi üzerindeki etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal metotlarla kıyaslanması amaçlanmıştır. Çalışmamızda beş gruba ayrılan 64 adet Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Gruplardaki hayvan sayısı 8 olarak belirlenmiştir. Daha sonra her grup kendi içinde sakrifikasyon günlerine göre eşit olarak iki alt gruba ayrılmıştır. Her hayvandan kan alınmıştır. Bütün deney hayvanlarının sağ mandibular anguluslarına standart kemik defektleri hazırlanmıştır. Kontrol gruplarında defekt oluşturulan alan herhangi bir işlem uygulanmadan kapatılmıştır. NSAİ grubundaki hayvanlara intraperitoneal (İ.P.) 5mg/kg/gün diklofenak sodyum, vitamin C grubundaki hayvanlara İ.P. 200 mg/kg/gün vitamin C, vitamin C + NSAİ grubundaki hayvanlara İ.P. 5mg/kg/gün diklofenak sodyum ve İ.P. 200 mg/kg/gün vitamin C enjeksiyonu yapılmıştır. Tüm gruplardaki hayvanlardan 7. ve 21. günlerde gerçekleştirilen sakrifikasyon işlemi sırasında biyokimyasal inceleme için intrakardiyak kan alınarak serum MDA, ROS, tiol, FRAP, PK, ALP, TGF- $\beta$  ve osteokalsin seviyelerine bakılmıştır. Defekt bölgeleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Sonuç olarak, NSAİ uygulanmış sıçanlarda biyokimyasal ve histopatolojik olarak kemik iyileşmesinin geciktiği saptanmıştır. Bununla birlikte, bir antioksidan olan vitamin C uygulamasının oksidatif zararı azalttığı ve kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

## ABSTRACT

Ozden E. (2021). The biochemical and histopatological effects of vitamin C and Diclofenac Sodium on the healing of bone defects in rats. (Experimental study) Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Oral and Maxillofacial Surgery. Ph.D. Thesis. İstanbul.

**Keywords:** Vitamin C, Bone healing, NSAID, Oxidative Stress

Non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) preparations, which are frequently used current days, cause deterioration in the properties of the newly formed bone and delay in the healing process. It is thought that the increased free oxygen radicals in the region after tissue injuries have negative effects on bone healing. Vitamin C, an antioxidant, has positive effects on fracture healing by preventing lipid peroxidation caused by these free radicals. The aim of the current study was to examine the histopathological and biochemical effects of vitamin C on the healing of experimental defects in NSAID (diclofenac sodium) treated rats. In our study, 64 Wistar Albino male rats divided into five groups were used. The number of animals in the groups was determined as 8. Then, each group was divided equally into two subgroups due to the days of sacrifice. Blood was drawn from each animal in the experimental group. Standard bone defects were prepared for the right angles of all experimental animals. In the control groups, the defect area was closed without any procedure. Animals in the NSAID group received an intraperitoneal (i.p.) injection of 5mg/kg/day diclofenac sodium. Animals in the vitamin C group received an i.p. injection of 200 mg/kg/day vitamin C. Animals in the vitamin C + NSAID group were injected with i.p. 5mg/kg/day diclofenac sodium and i.p. 200 mg/kg/day vitamin C. During the sacrifice process performed to the all animal groups on the 7th and 21st days, intracardiac blood was taken for biochemical examination and serum MDA, ROS, thiol, FRAP, PK, ALP, TGF- $\beta$  and osteocalcin levels were checked. Defect areas were examined under a light microscope.

As a result, the bone healing was delayed biochemically and histopathologically in NSAIDs applied rats. However, it has been observed that the application of vitamin C, an antioxidant, reduces oxidative damage and has positive effects on bone healing.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik iyileşmesi sonrası inflamasyon fazı ilk 48 saat içerisinde oluşur ve iyileşme alanına ulaşan ilk inflamasyon hücreleri makrofajlar, lökositler ve mast hücrelerdir. Bu hücrelerin aktivasyonu ile iyileşme alanında serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest radikaller oksidatif strese neden olarak yakınındaki yağ, protein, karbonhidrat, RNA ve DNA moleküllerine saldırarak yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olurlar (158, 61).

Oksidatif stresin kemik iyileşmesini geciktirdiği bilinmektedir (134). Normalde vücutta oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge mevcuttur. Kemik yaralanmaları gibi durumlarda bu denge bozulur. Bununla birlikte serbest radikallerin üretimi artar ve antioksidanlar yetersiz kalır.

Sonuç olarak oksidatif stres lipit peroksidasyonuna neden olur. Malondialdehit (MDA), dünya çapında kabul gören lipit peroksidasyonunun işaretleyicisidir. Superoksit dismutaz (SOD) substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. Aktif oksijen türleri (ROS) tayini, Serum total -SH düzeylerinin tayini, MDA, SOD ve GSH oksidan/antioksidan dengenin belirlenmesinde önemli parametrelerdir (16). Diklofenak bir fenilasetik asit türevi non-steroid anti-inflamatuvar (NSAİ) ilaçtır (161).

Diklofenak sodyumun kemik iyileşmesi üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda diklofenak sodyumun oksidatif stresi arttırdığı ve MDA seviyesini önemli derecede yükselttiği belirlenmiştir (74, 113). C vitamini ise antioksidan özelliğe sahip bir maddedir. Superoksit, peroksil, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi reaktif serbest oksijen radikalleri üzerine olumlu etkileri vardır. Bu şekilde lipit peroksidasyonunu en aza indirebilir (100, 128).

Kemik iyileşmesinin histopatolojik değerlendirmesi ise ışık mikroskobu altında iltihap, nekroz, fibrozis ve kemik yapımı göz önünde bulundurularak yeni kemik yapımının kapladığı alanlar hesaplanarak yapılır. C vitamini doku iyileşmesinin proliferasyon fazında bağ dokunun kollajen sentezi için önemlidir. Prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz için kofaktör

görevi görür. Yapılan çalışmalarda C vitaminin tip X kollajen yapımını arttırdığı ve böylece daha hızlı kemik onarımı ve mineralizasyonu sağladığı gözlemlenmiştir (74, 59).

Prostaglandinler kemikte yaygın olarak bulunurlar. NSAİ'ler siklooksijenaz sentezini inhibe ederek prostaglandin oluşumunu baskılar ve ağrıyı azaltırlar. Prostaglandinlerin bu inhibisyonu sonucu kemik iyileşme mekanizmasındaki etkilerini kaybederler ve kemik iyileşmesi gecikmiş olur (74). Bu çalışmamızda bir antioksidan olan C vitaminin ve diklofenak sodyumun uygulandığı sıçanlarda kemik iyileşmesine ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

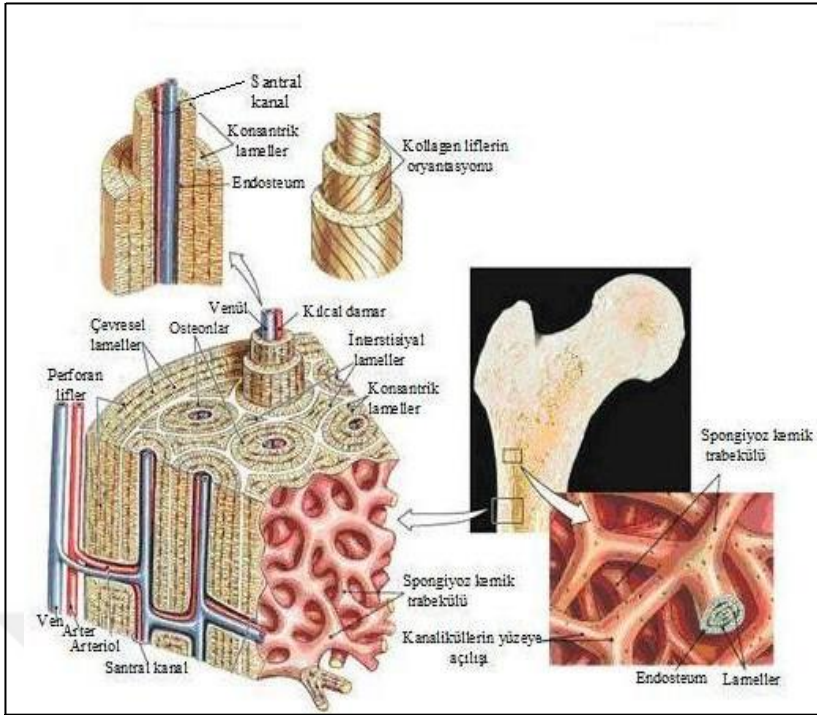
### 2.1. KEMİK DOKUSU

#### 2.1.1. Kemik Dokusunun Genel Özellikleri

İskelet sistemi kemikler ve kemikleri birbirine bağlayan bağ dokusundan oluşur. Sistemin çatısını oluşturan kemik dokusu, sertlik ve sağlamlık açısından bağ dokusundan farklılık gösterir. Kemik, yapısında bulunan hücrelerin ve ara maddenin üzerine organik ve inorganik tuzların çökeldiği; bu yüzden sağlamlık ve esneklik özellikleri olan bir bağ dokusu türüdür (113,148).

Kemik; vücut için yapısal önemi olan, kan hücrelerini oluşturan kemik iliğini içeren, vücuttaki birçok farklı işlem için gerekli olan sodyum, magnezyum, fosfor ve kalsiyumu depolayan sert bir dokudur. Kemik sağlam ve sert yapıdadır. Kranial ve toraks boşluklarındaki hayati organları korumaktadır. Üzerine yapışan kas ve tendonlar ile birlikte vücudun mobilitesini sağlamaktadır (19,76,162).

Kemik dokusu kendisini yapısal olarak rejenere edebilen bir dokudur. Şekli, hacmini ve içeriğini dış mekanik uyaranlar doğrultusunda yönlendirme yeteneğine sahiptir. Kemik bu fonksiyonu lokal olarak mekanik kuvvetler; sistemik olarak da hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve piezo elektriklenme ile kontrol edilmektedir (58, 76, 30, 65).



**Şekil 2-1: Kemik dokunun yapısı**

## 2.1.2. Kemik Dokusunun Kimyasal Yapısı

### 2.1.2.1. İnorganik Yapı

İnorganik matriksin kimyasal bileşiminin büyük oranı hidroksilapatitten  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  oluşmaktadır. Kemiğin mineral kısmı karbonat, sitrat, magnezyum, flor ve stansiyum kristallerinden oluşur (30, 65).

Hidroksilapatit kristalleri 25 nm ile 75 nm arası uzunluğa sahiptir. Hidroksilapatit kristallerinin boyutunun küçük olması ona çok fazla yüzey-hacim oranı sağlar. Hidroksilapatit kristallerinin yüzeyinde bulunan iyonlar su ile birlikte kristallerin etrafında su ve iyon tabakası oluştururlar. Bu tabaka, yani oluşan hidrasyon kabuğu, kristaller ile vücut sıvıları arasındaki iyonların değişimini kolaylaştırmaktadır (30, 83).

### 2.1.2.2. Organik Yapı

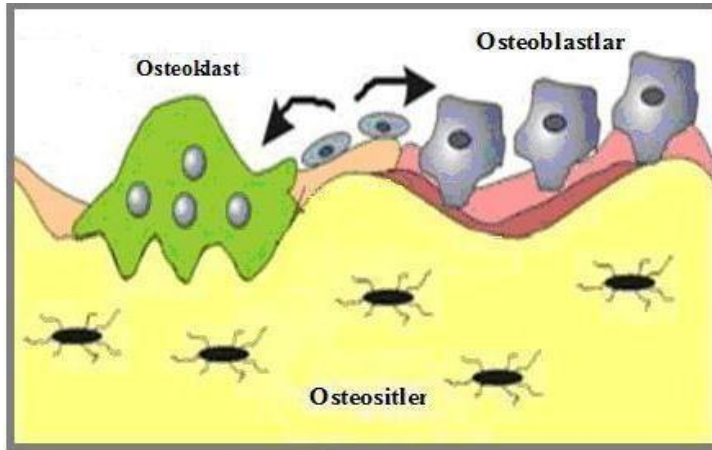
Kemiklerin yapısını, mekanik ve biyokimyasal özelliklerini oluşturan organik matriksin yaklaşık %90'ını Tip I kollajendir. Geriye kalanın kısmını ise kollajen harici diğer matriks proteinleri, lipitler, minör tip kollajenler ve diğer makroproteinler oluşturmaktadır. Kollajen, dokunun şeklini korumasını sağlayan ve kemiğin yapısını oluşturan fibröz bir proteindir. Kemik organik matriksinde Tip I kollajen haricinde 4 önemli protein grubu vardır. Bunlar, glikoproteinler (osteonektin, fibronektin, vitronektin, fibrinilin, osteopontin, kemik sialoproteini vb.), proteoglikanlar (kondroitin sülfat, keratin sülfat, hyalüronik asit), kemiğe özgü K vitamini bağımlı proteinler (osteokalsin, matriks gla-protein, protein S) ve büyüme faktörleri ve sitokinler ((İnsülin büyüme faktörü(IGF), tümör nekrozis faktör beta (TNF- $\beta$ ), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), kemik morfojenik proteinleri (BMP), interlökinler (IL-1, IL-6) gibi proteinlerdir (30, 60, 65, 101,158).

### 2.1.3. Kemik Hücreleri

Kemiğin mimari yapısının oluşmasında, rezorpsiyonunda ve bu yapının devamlılığının sağlanmasında farklı hücreler görev almaktadır. Kemikte her biri ayrı fonksiyonlara sahip iki farklı hücre vardır (30,60);

- Osteojenik hücreler
- Osteoklastik hücreler

Osteojenik hücreler kemiğin oluşturulmasından ve devamlılığının sağlanmasından sorumludur. Bunlar osteoblastlar, osteositler, osteoprogenitörler, preosteoblastlar ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelerdir (81, 101).



**Şekil 2-2: Kemik hücresel elemanları**

### 2.1.3.1. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenkimal kökenli ana hücreler, osteoprogenitör hücreler olarak adlandırılan bir alt grup verir. Mitoz bölünme kabiliyetine ve matür kemik hücrelerine diferensiasyon yeteneğine sahiptirler (30). Bu hücre tipi rezorbe olmayan tüm kemik yüzeylerinde bulunmaktadır. Periosteumun iç yüzeyindeki endosteumda, Haversian ve Volkmann kanallarında ve büyüyen kemiklerin metafizinde yer alan kıkırdak matrisinin trabeküllerinde bulunurlar. (56). Osteoprogenitör hücreler, elektron mikroskobu incelemesi sonucunda iki farklı tip olarak gözlenmiştir. İlki olgunlaşmamış endoplazmik retikulum, diğeri ise az gelişmiş Golgi cisimciği olarak bilinen preosteoblastlardır. Bu hücreler osteoblastları oluşturur. Diğerleri ayrıca belirgin mitokondrileri ve serbest ribozomları ile bilinir (60, 146). Bu hücreler ise osteoblastlara öncülük ederler. Özelleşmiş kemik hücreleri, kemik yapısının oluşumundan, rezorbsiyonundan ve korunmasından sorumludur (56).

### 2.1.3.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar kemik matriksinin organik kısmının üretilmesinde görev alan tek çekirdekli hücrelerdir. Osteoit adı verilen bu organik yapı kollajen fibriller, proteoglikan, glikoz aminoglikan ve glikoproteinlerden oluşur. Osteoblastlar kemik inorganik kısımlarının

çökmesini sağlarlar. Kaynaklarını iskelet sistemindeki mezenkimal hücrelerden alırlar. Mitotik bölünme yeteneğine sahip osteoblastlar, kemik yüzeyine yakın periosteum, endosteum ve komşu ilik stromasında bulunmaktadır. Osteoblastların morfolojik görünümü kemik sentezi yapıp yapmamalarına göre değişmektedir. . Aktif olarak matriks sentezide görevlidirler, osteoblastlar kübik şekilden prizmatikçe kadar değişik şekillere ve bazofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. Osteoblastların üretim işlevleri azalmaya başladığında ise yassı hale gelirler ve sitoplazmadaki bazofilik özellik azalmaya başlamaktadır. (20, 30).

Osteoblastlar regülatör sitokinler ve büyüme faktörleri gibi mediatörleri salgılayarak osteoklastların ve çeşitli hemopoetik hücrelerin farklılaşmasını sağlarlar. Osteoblastlar; prostaglandinler, paratiroid hormonu, adrenal ve gonadal steroidler, D vitamini metabolizmasının yan ürünleri, sitokinler ve lenfokinler gibi moleküller için spesifik reseptörler içerirler.

Osteoblastlar, kemik oluşturma görevi tamamlandıktan sonra osteositlere dönüşürler ve periosteum ve endosteumda varlıklarını sürdürürler. (60,162).

### **2.1.3.3. Osteositler**

Kemik yapımı esnasında osteoid madde içindeki osteoblastların organellerinin çoğunu kaybederek oluşan osteositler lakünalar içinde bulunmaktadır. Osteositler kemiğin esas hücreleridir ve olgun kemik hücresi olarak adlandırılırlar. Osteositler sitoplazmik uzantılara sahiptir. Kanalikuli adı verilen bu küçük kanalcıklar yardımıyla komşu osteositler osteoblastlar, kemik yüzeyini döşeyen hücreler, periost hücreleri ve kan damarları ile iletişimi sağlarlar. Bu olay; kalsifiye kemik matriksine gömülü hücrelerin kan yoluyla taşınan hormonlar tarafından nasıl uyarıldığını ve hücrelerin bunlara nasıl tepki verdiğini açıklar. (8,30).

Osteositlerin sayısı yaşlanmayla östrojen hormonunun azalması ve glukokortikoid yapıdaki hormonların artması sonucu sayıca azalır. Osteositlerin yaşam ömrü çok kısadır ve birkaç yıl ile sınırlıdır (60, 81).

Osteoblastlar ile karşılaştırıldıklarında, yassı badem şeklindeki osteositlere sahiptirler. Epeyce azalmış granüllü endoplazmik redikulları vardır. Golgi ise daha koyulaşmış kromatin sergilemektedir (162).

#### **2.1.3.4. Osteoklastlar**

Kemik iliği içerisinde bulunan granülosit-makrolaj ön hücreleri dolaşıma monosit olarak katılırlar. Bazı senkronize olmayan füzyonlar sonucunda osteoklastlar olarak bilinen, çapları 20-100 mm arasında değişen ve 5-50 çekirdeğe sahip dev hücrelere dönüşürler. Makrofajların aksine kavisli sınırlara ve kalsitonin reseptörlerine sahiptirler. Asit fosfataz üretirler (8,20,30). Osteoklastlar kemik rezorpsiyon kavitesi olarak bilinen “Howship lakünleri” nde bulunur.

Kemik rezorpsiyonu osteoklastların etrafında pH’ın yaklaşık olarak 3,5 olduğu asidik bir ortamda gerçekleşmektedir. Asidik ortamda inorganik kemik bileşenleri organik bileşenlerden ayrıldıktan sonra organik bileşenler “Katepsin K” olarak adlandırılan lizozomal enzimlerle yıkılır. Bu rezorpsiyon işlemi, tam anlamıyla açıklanamayan mekanizmalarla kontrol edilir. Ama hücrel aktivasyonun, faktör ekspresyonu, hücrel cevaplar, aktivitenin durması ve apoptozisin, osteoblastlar ve osteoklastlar arasında oluşan dinamik iletişim sayesinde meydana geldiğine dair kanıtlar vardır (52,65).

Osteoklastlar hormonal uyarılara oldukça duyarlıdır. Bifosfonatlar, kalsitonin ve östrojen hormonu osteoklastların etkinliğini azaltırken; tiroksin, paratiroid hormonları ve D vitamini bunun tam tersi etki gösterir (76, 81,158, 162).

#### 2.1.4. Kemik Dokusunun Morfolojik Özellikleri

Kemikler makroskopik yapısına göre uzun ve yassı kemikler şeklinde ikiye ayrılırlar. Uzun ve yassı kemiklerin yapısı dışarıdan farklı görünse dahi iç yapıları birbirine benzemektedir. Tüm kemiklerin dış kısmı kompakt tabaka ile sarılıdır. Orta kısımlarında medullar yapı bulunur. Medullar kavite, kan hücreleri tarafından oluşturulan kırmızı kemik iliği ve yağ hücreleri tarafından oluşturulan sarı kemik iliği ile doludur. Tipik bir eriskin uzun kemigi, ortasında silindirik diafiz kısmı ve bunun her iki ucunda yer alan yuvarlak görünümlü epifizden oluşur. Diafiz ve epifizin birleşme noktası majör büyüme alanıdır ve buraya epifizyal plak denir. Eriskin bireylerde epifiz ile diafiz arasında bütünleşme gerçekleştiğinde büyüme tabakası yerini kanselöz kemiğe bırakır. Yassı kemiklerin epifizleri yoktur. Diafiz her iki uç kısmının sonuna doğru kalınlaşıp epifizle birleşen kısmına metafiz adı verilir. Bu kısmın, kemiğin orta bölümüne göre daha kalın ve hacimli oluşu kıkırdak dokuya destek verir ve vücut ağırlığının taşınmasını sağlar. Epifizler ince kortikal kemik tabakasıyla kaplanan kanselöz kemikten oluşurlar. Diafiz neredeyse tamamen kompakt kemikten oluşur. Kemik iliği boşluğuna bakan yüzeyde çok az kanselöz kemik bulunur. (101, 137).

#### 2.1.5. Periosteum

Eklem yüzeyleri hariç kemiğin dış yüzeyini örten bağ dokusudur. Aralarında keskin sınırları olmayan iki tabakadan oluşmaktadır; iç tabaka (stratum cambium) ve dış tabaka (stratum fibrosum). Dış tabakanın yapısı kollajen lifler ve fibroblastlardan oluşur. Yoğun bağ dokusuna sahip olup, kan damarları ve lenfatiklere destek sağlamaktadır. Kollajen liflerin demet halini almasıyla oluşan sharpey lifleri, matriksin içine girer periostun kemiğe bağlanmasını sağlar. Hücreden zengin olan periostun iç tabakası bölünerek farklılaşır ve osteoblastları oluşturabilme yeteneğine sahip yassı hücrelerden zengindir (60, 101).

Periostta bulunan fibroblastların sayısı, fibröz tabakanın kalınlığıyla periostun etrafını döşeyen damarların sıklığı yaşlanmayla azalır. Damarsal içerik bakımından zengin bir yapıya sahip olan periostta çok sayıda endotelial perisit hücresi bulunmaktadır. (60, 137).

### 2.1.6. Endosteum

Endosteum, kemik içerisindeki tüm boşlukları kaplar ve tek katlı yassı osteoprogenitör hücre katmanından ve bağ dokusundan oluşur. Bu nedenle endosteum periosteumdan daha incedir. Hem osteojeniktir, hem de hemopoetiktir. Büyüme boyunca endost aktiftir. Osteoklastların kalsiyum ihtiyacına bağlı olarak aktivasyonu devam etmektedir (65).

Periosteum ve endosteumun temel görevleri; kemik dokusunun beslenmesi, büyümesi ve onarımı için ihtiyaç duyulan yeni osteoblastları sürekli olarak sağlamaktır (137).

### 2.1.7. Kemik Dokusu Tipleri

#### 2.1.7.1. Kortikal ve Kansellöz Kemik

Kortikal kemik, mikroskopik düzeyde kanalcıklar içerir. Erişkin bir bireyin iskeletinin %80'ini oluşturur. Kemiklerin dış yüzeyini örter. Destek ve koruyucu görevi olan bir sert dokudur. (Uzun kemiklerin yalnızca dış yüzeyini örter iken, yassı kemiklerin hem iç yüzlerini hem dış yüzeylerini örter.) Kortikal kemik iç içe geçen halkalar halinde, kemiğin uzun eksenine boyunca Havers kanallarının etrafında yer almış olan lamel olarak isimlendirilmiş mikroskobik matriks tabakaları ihtiva eder. Her lamelde çok sayıda paralel olarak sıralanmış kollajen lifler vardır. Komşu lamellar da, kollajen liften meydana gelmektedir. Komşu lamellerde, kollajen lifler değişik yönlerde sıralanırlar. Çok sayıda kanalcığın değişik yönlerde olan lifleri, kemiğe büyük bir kuvvet sağlamaktadır. Havers kanalları ve etrafını saran bu lamellerin bütününe “Havers Sistemi” ya da “osteon” adı verilmektedir (60).

Kemik yüzeyine dik olacak şekilde konumlanmış olan; içteki ve dıştaki yüzey arasındaki bağlantıyı kurabilen başka bir kanal yapısı ise Volkmann kanallarıdır. Bu iki sistem içerisindeki damar ağları birbiriyle bağlantılıdır (65).

Kansellöz kemik, vücudun hacimce %20'sini oluşturan kemik trabeküllerinin birbirleriyle anastomoz yaparak oluşturdukları süngerimsi bir yapıdır. Trabeküller arasında birbiriyle ilişkili çeşitli büyüklüklerde boşluklar ve bu boşluklar arasında kemik iliği bulunur. Kansellöz kemikte osteon yoktur (101).

Epifiz ve metafiz; etrafında ince bir kortikal kemik bulunduran geniş bir kansellöz kemikten meydana gelir. Diafiz ise temelde sadece kortikal kemikten meydana gelir. Farklı kemiklerde kansellöz ve kortikal kemik oranları farklılık göstermektedir. Ayrıca kortikal ve kansellöz kemik oranları kemiklerin gelişimi, yapısı, işlevi, kemik iliğine yakınlık, vasküler turnover süreleri, yaşa bağlı meydana gelen değişimlerin büyüklüğü ve kırık oluşumu gibi faktörlerde farklılık gösterirler (148).

#### **2.1.7.2. Woven ve Lameller Kemik**

Ağsı kemik, embriyonel kemik ya da primer kemik olarak isimlendirilebilen woven kemik dokusu geçicidir. Yetişkinlerde diş alveolleri, kafatasında bulunan yassı kemik eklemleri ve bazı tendonların kemiğe yapıştığı bölgeler gibi birkaç alan dışında 3 yaşından sonra yerini lameller kemiğe bırakır. Kollajen liflerinin düzensiz şekilde sıralanışı, lameller kemiğe göre daha fazla osteosit ve daha az mineral ihtiva etmesi, birincil kemik dokusunun özellikleri arasındadır (31,60, 65).

Lamellar kemik, yapısındaki kollajen liflerinin bir damar kanalı etrafında birbirine dairesel veya birbirine paralel biçimde sıralanan, her katmanı 3-7 mm kalınlığında olan bir kemiktir. Lameller kemik yetişkin kemiğinde bulunan kortikal ve kansellöz kemik şeklinde iki farklı yapıda bulunur (148).

#### **2.1.8. Kemik Oluşumu ve Gelişiminin Evreleri**

Kemik oluşumu (osteogenez); intramembranöz ve endokondral olarak iki biçimde olur (65).

### 2.1.8.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu (Doğrudan Kemikleşme)

İntramembranöz kemikleşme, mezenkimin ya da bağ dokusunun içerisinde direkt olarak kemik oluşmasıdır. Osteogenezin en primitif olan formudur. Embriyonik dönemde, mezenkimal dokunun yoğunlaşmış olduğu alanların içerisinde kemik trabeküllerinin meydana gelişi ile oluşur ve her zaman kan damarlarının yakınında oluşur. Frontal ve pariyetal kemiklerin tümü, maksilla ve mandibulanın bazı bölümleri, oksipital ve temporal kemikler intramembranöz kemikleşmeyle ortaya çıkar. İntramembranöz kemikleşme uzun kemiklerin kalınlaşmasında ve kısa kemiklerin büyümesinde etkilidir (27,65,175).

İntramembranöz kemik dokusuna dönüşecek olan mezenkim bölgesindeki osteogenezin ilk belirtisi, dokunun kan damarları açısından zengin bir hale dönüşümüdür. Böylelikle, mezenkim dokusunun içerisinde çok sayıda kapiller görülür. Bunların birbirleriyle anastomozlaşması sık kapiller ağlarını meydana getirir. Daha sonra kan kapillerinin etrafında bulunan mezenkim hücreleri osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar, kollajen lifleri ve kemik hücreleri arasında bulunan esas maddenin salgılanmasını sağlar. Bu şekilde ortaya çıkan ve henüz mineralizasyonu olmamış dokuya “osteoid doku” denir. Osteoid dokunun mineralizasyonu oldukça lakünalar içerisindeki osteoblastlar osteositlere dönüşür. Sitoplazmik uzantıları ile bağlantı kurarlar. Osteoblastlar osteositlere dönüşmeye devam ettikçe bunların yerine, çoğalması devam eden ve çevre mezenkim hücrelerden farklılaşan yenileri gelir. Böylelikle kan damarlarının etrafındaki kemik trabekülleri zamanla büyür. Trabeküler yapı organize olarak spongiöz kemiği oluşturur. Bu süreçte kemik trabeküllerinin arasında kavitelerin içerisini dolduran mezenkim doku primer kemik iliğini yapar. Spongiöz kemik yeterli büyüklüğe ulaştığında, mezenkim membranın periferik kısmı spongiöz kemiği dış kısımdan sarar ve periostu meydana getirir. Periostun derin katlarında bulunan genç bağ doku hücreleri spongiöz kemiğin etrafında bir dizi oluşturur ve osteoblastları yaparlar. Sonuçta spongiöz kemiğin etrafında periost tarafından tabaka tabaka birbirinin üzerine yığılmış olarak kompakt kemik kabuğu oluşur (175).

### 2.1.8.2. Endokondral Kemik Oluşumu

Klavikula dışındaki uzun kemikler, kalça kemikleri, omurga ve kafa tabanının kemikleşmesi endokondrial kemikleşmenin olduğu bölgelerdir. Uzun kemiklerin gelişmesinde, önce bu kemiğin mezenkim doku kaynaklı olan hyalin kıkırdığı yapısındada küçük bir taslağı meydana gelir. Daha sonra kıkırdak taslak apozisyonel büyümeyle daha uzun bir şekle bürünür. Kıkırdak modelin ortasında bulunan kondrositler büyürler ve kendilerini çevrelemiş olan kıkırdığın rezorbsiyonuna sebep olurlar. Geride kalan trabeküllü matrikste ise kalsifikasyon oluşur. Kıkırdak taslağın üstünde, periost ince bir katman şeklinde yeni kemik dokusunu meydana getirir. Kıkırdak taslakta kan damarları ve ilkel mezenkim dokusu çoğalır. Mezenkim dokusu daha sonra kemik iliği hücrelerine ve osteoblastlara farklılaşır. Osteoblastlar kıkırdak matriksin yüzeyinde bir hücre tabakası meydana getirerek ağsı kemik oluşturmaya başlar (35).

Bu olaylar neticesinde ilk kıkırdak taslağın uçtaki kısmı ortadaki kısımdan primer kemikleşme merkezi denilen geniş bir bölgeyle ayrılır. Fakat kıkırdığın her iki ucu da büyümeyi sürdürür. Bu arada ortadaki kısmın uç bölümlerindeki kıkırdak değişikliğe uğrar ve kemikleşmeye başlar. Bu aşamada, gelişimi devam eden kemik uzun bir diyafiz ve bunun her iki ucunda bulunan bir yarım ay şeklinde kıkırdak dokusundan oluşan epifizlerden meydana gelir. Diyafizle her iki epifizin arasındaki alanlara büyüme plağı ya da epifiz plağı denir. Genel iskelet sisteminin olgunlaşması ile birlikte hormonların etkisiyle daha fazla kıkırdak oluşmasını engeller ve büyüme plaklarının kemikleşmesini ve diyafizle epifizlerin birleşimine neden olur. Gelişimini deam ettiren epifizlerin içerisindeki kıkırdak dokunun merkez bölgesinde diyafize benzeyen yeni kemik oluşur. Bunun meydana geldiği alana sekonder kemikleşme merkezi denir. Daha sonradan eklem kıkırdığına dönüşen ince bir hyalin kıkırdak dokunun epifizlerin yüzeyini örtüşü devam eder. Fonksiyonel streslerin etkisiyle beraber, kalsifiye olmuş kıkırdak dokusu ve bunun çevresinde düzensiz bir ağsı kemik tekrardan şekillenir ve kemiğin kompakt bir yapıda bir dış tabaka ve ortasında da boşluk bulunan kansellöz yapıda olan bir iç tabakadan oluşmasını ortam hazırlar. Yaşlanma ile beraber ortadaki kısımda rezorbsiyon olur ve kemik iliği ile dolu genişçe bir boşluk halini alır (65,151,181).

## 2.1.9. Kemik Büyüme ve Gelişiminin Evreleri

### 2.1.9.1. Modelling (Şekillendirme)

Şekillendirme, geniş kemiklerin yüzeylerinde kemik yapımını ya da yıkımını kapsar. Büyüme esnasında periostal kemik yapımı, endostal kemik yıkımından daha belirgin bir şekilde olur. Şekillendirme kemiklerin ve eklemlerin büyüklüğünü şeklini, hacimini, anatomisini ve büyümesini kontrol etmektedir. Korteks ve ilik kavimleri genişler. Şekillendirme işlemi sonucunda uzun kemiklerin uç kısımlarının şekillenir. Trabeküllerin kayar ve kraniyal boşluklar genişler. Kemikte mevcut olan kuvvet (bükülme) çizgileri, olağan şekillendirme seviyesinin ve/veya sınırının dışına çıktığı zaman, yapım işlevi mekanizması devreye girer ve kemiğin kütlesinde ve direncinde artışa sebebiyet vererek kırık meydana gelmesini engeller. Bükülme kuvvetleri, şekillendirme sınırlarının aşmadığı sürece mekanik bir şekilde kontrol edilen yapım plakaları pasif halde kalmaya devam ederler. Doğumdan olgunlaşma dönemine kadar kemikleri etkileyen kuvvetler 20 kat artar. Şekillendirme ile kemikler daima güçlenir ve küçük ve büyük her türlü hasardan korunur (60, 101).

### 2.1.9.2. Remodeling (Yeniden şekillenme)

Kemiğin yeniden şekillenmesiyle biyomekanik ve metabolik şekilde çevre şartlarında varlığına devam edebilen kemik elde edilir. Ağsı kemiğin ya da yaşla beraber kalitesinde azalma meydana gelen kemiğin önce rezorbsiyona uğraması ve sonra ilgili alanda lameller yapıda yeni kemik oluşumuna yeniden şekillenme denir. Kemiğin yeniden şekillendirme işleminin ürünleri; katlanmış sement çizgileri, sekonder osteonlar, trabeküler katmanlar ve dokuların arasındaki yapraklardır. Yeniden şekillendirme yaşam boyu sürer. Erişkin bir bireyde kortikal kemiğin kendini yenileme (turnover) hızı 20 yıldır. Kansellöz kemikte ise bu süre 1-4 yıldır. Kemiğin belirli zaman aralığında tamamen kendisini yenilemesine, kuvvetlere karşı direnç göstermesine ve hayat boyu yapısal hasarların tamiri için gerekli olan kalsiyum dengesinin iskelet sisteminde düzenlenip karşılanmasına imkân tanır (101, 114, 137).

### 2.1.10. Kemik Dokusunun İyileşmesi

Organizmada hasar gören doku belirli bir oranda kendisini yenileyebilmektedir. Bu onarım işini en iyi yapan dokulardan birisi kemik dokusudur. Kemik defektlerinin iyileşme sürecinde birçok fizyolojik olay gerçekleşmektedir. Bu karmaşık sürecin en önemli özelliklerinden biri, yumuşak dokunun iyileşmesinde görülen skar dokusunun olmayışdır. Kemik dokusundaki hasarlar iki şekilde iyileşmektedir (68):

1) Birincil (Primer) İyileşme: Kırık parçalar temas halinde bulunur. İntramembranöz kemikleşmeyle beraber kortikal tabakalar direkt olarak yeniden şekillenir. Klinik uygulamalarda kırık bölgenin kompresyon plakları, miniplaklar v.b gibi farklı mekanizmalarla tespit edilirse primer kemik iyileşmesi meydana gelir (101, 90, 184).

2) İkincil (Sekonder) İyileşme: Endokondral kemikleşme görülür. Değişik özelliklerdeki hücre toplulukları çoğalır, farklılaşır ve matriksi oluşturarak birlikte işlev görmeleri gerekir. İltihap, onarım ve yeniden şekillenme şeklinde 3 evreden oluşur (35,150,184).

#### 2.1.10.1. İltihap Evresi

Kemik kırığı, matriks hasarına, hücre ölümüne, periosteum ve endosteumun yırtılmasına ve kırık kemik kısımlarının yer değiştirmesine sebep olur. Bütün doku travmalarında ve bu nedenle kırıklarda ilk tepki 'enflamasyon' yani 'iltihap'tır. Travmanın dozajına göre kırık uçlarına komşu periost ve çevresindeki yumuşak dokular yırtılabilir ve damarlar yaralanabilir. Kırık kısımları karşılıklı bir şekilde çaprazlayan kan ve lenf damarları yaralanırsa bu uçların arasında bulunan kemik iliğinde ve çevresinde kan ve lenf sıvıları toplanır. Bu sıvı birikir ve periostun kalkmasına sebebiyet verir. Kanamanın durdurulması ve pıhtılaşmanın sağlanması için trombosit ve trombosit faktörlerinin toplanması ile birlikte yaralı bölgeye moleküler araçlar salınır. Hrmatom oluşumu, pıhtı oluşumu ile kırık uçları

arasında, periosteumun altında ve periosteum yırtılırsa çevresinde gözlenir. Hematom da sağlıklı yumuşak doku tarafından sarılır (21, 49)

Kırık hematomu, kırık iyileşmesinde büyük bir rol oynar. Kırık uçları hematoma basıncı ile bir arada tutulur. Açık kırıklarda, hematoma dışarıya boşaldıkça kırık iyileşmesi yavaşlar veya gerçekleşmez. Deneysel bir şekilde hematoma düzenlenip çıkarıldığında osteojenik stimulusun çoğunun kaybolduğu belirtilmiştir. Kırık hematomu, onarımdan sorumlu hücrelerin göçünü kolaylaştıran fibröz bir iskelet oluşturur. Ayrıca kırık hematoma ortamında bulunan trombosit ve hücrelerden büyüme faktörlerinin ve diğer proteinlerin salınımı gerçekleşir. Bunlar kırık onarımı, periostal hücre proliferasyonu ve onarım doku matriksinin sentezinde yer alan hücre göçüne aracılık ederler. (51, 114, 147).

Kırık oluşumundan sonra geçici bir arterioller daralma meydana gelir. Mast hücrelerinin salgıladığı histaminden ötürü arterioller, kılcıl damarlar ve venüller genişler. Kılcıl damarların zar permabilesesi de artar. Vazodilatasyon ve plazma eksüstasyonu ile birlikte ilk 24 saat içinde kırık bölgesinde ödem oluşur. Lenfositler, monositler ve polimorfik çekirdekli lökositler dahil olmak üzere akut inflamatuvar hücreler ödemli alana göç eder. (148,149,184).

Komşu Havers sistemleri arasında çok anastomoz olmadığından ötürü kırık uçlar arasında belirli bir noktaya kadar dolaşımın olmadığı görülmektedir. Buradaki osteositler piknotiktir. Lizise giderek boş lakunlar bırakır. Sonuç olarak, kırık uçlarında kemik dokusunda daha büyük olacak nekrotik alanlar oluşur. Prostaglandinler kırık ve çevre dokulardan salgılanır. Akut inflamasyonun başlamasında nekrotik materyalin varlığı önemli rol oynamıştır. (61,114).

Hematoma 48 saatte organize olarak kırık bölgesinde fibröz bir yapı oluşturur. Fibrinojen, gamaglobin, eklenen fenilalanin, lizin ve albümin ile fibrine dönüştürülür. Fibrin matriksi, makrofajların ve polimorf çekirdekli lökositlerin diapedezi sonucu oluşur. Makrofajlar, histiyositler ve fibroblastlar tarafından üretilen kolajen, fibrin matriks üretiminde etkilidir. Kemik oluşturmak amacıyla fibrin ağından hücre çoğalması oluşmaya başlar. Bu

süreçte fibrin matriksindeki öncü hücreler lokal biyolojik etkilerle değişime uğrayarak farklı dokular meydana getirmek için hazırdır. Kırık alanının pH'ı başlangıçta asidiktir, ardından yavaşça nötralize olur ve sonunda orta düzeyde alkalen seviyesinde kalır (178).

Büyük bir kırık varlığında, makrofaj monositleri, tüm vücutta etkili olan bir sitokini IL-1'i salgırlar. IL-1, yaralanan bölgede lenfositlerin göç etmesine neden olarak kemik erimesine (rezorbsiyon) neden olur ve orta beyin sayesinde ateş oluşur. IL-1 ayrıca kaslardan prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) oluşmasını arttıran bir sitokindir (161).

#### **2.1.10.2. Tamir Evresi**

Organize olan hematoma dokusunun çevresindeki kılcal damarların genişlemesiyle hiperemik ve hızlı bir şekilde bölünen hücreleri içeren granülasyon dokusu meydana gelir ve onun yerini alır. Lokal aracı mekanizmalar tarafından duyarlı hale getirilen öncü hücreler, hücreler arası madde, yeni damarlar, fibroblastlar, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturabilmek için değişmeye ve örgütlenmeye başlar. İlk 16 saatte kırık bölgesinde mezenkimal hücre çoğalması görülür. Bu çoğalma, kırılmadan 32 saat sonra zirve yapar. Onarım evresi kırıktan sonraki ilk saatlerde başlamasına rağmen yapısal olarak tipik bir şekilde dönüşmesi 7-12 gün sürmektedir (60).

Periost ve endosteumun osteojenik hücreleriyle fibrin matriksin içerisindeki fibroblastların, granülasyon dokusu oluşumunda önemli görevleri vardır. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlarsa osteoidin salgılanmasını sağlar. Kallus adı verilen bu yapı, fibröz dokudan, kırıkta ve olgunlaşmamış kemik dokudan meydana gelir, damarlanması fazladır. Yaranın olduğu bölgeyi bir kılıf gibi saran bu oluşumun, kırık hatlarının hareket etmesini engelleyerek iyileşmeye yardımcı olduğu ifade edilmektedir (30).

Tamir evresinde bölgedeki damarlanma ve buna bağlı olarak oksijen alımı büyük önem taşır. İyileşmenin erken evrelerinde periostal damar, geç evrelerde ise besleyici

damarlar kılcal tomurcuklanmaya yardım eder. Ancak kılcal damarların gelişimi, osteojenik hücrelerin çoğalması kadar hızlı değildir. Yeterli seviyede beslenen kemiğe yakın seviyede bulunan hücreler osteoblastlara farklılaşır. Kırığın ortasında, kemikten uzaktaki hücreler dolaşım açısından fakirdirler. Bu bölgede bulunan kılcal damarlardaki gelişme hızı, hücre çoğalma hızı ile uyumlu değildir. Hücreler kondrosit ve kondroblastta farklılaşır ve kırık dokü oluşumuna yardımcı olur. Osteoblast oluşturan ve kanlanması iyi olan seviyelerdeki hücreler trabekül oluşturur. Böylelikle en dış tabakada kırık doküyü saran periosteumun derin tabakasından çoğalmış olan osteojenik hücreler, orta tabakada ise kırık doküsü ve daha derin tabakada da kemik trabekülleri bulunur. Bir süre sonra her bir kırık parçasının sonunda oluşan yaka benzeri kütle birleşir. Böylece kırığa bütünlük sağlayan dış kallus oluşur. Dış kallusun oluşumu ve gelişimi kemik hücrelerindeki çoğalmaya ve kırık dokünün (orta tabakada) interstisyel büyümesine bağlıdır. Benzer olarak ilik boşluğunda da benzer süreçler birbirini takip etmektedir. Endosteum ve kemik iliğinin osteojenik hücrelerinden gelişen trabeküller ile kemik iliği köprülenir ve iç kallus oluşur. İyileşmenin erken evrelerinde periostal damar ve geç evrede besleyici damarlar kılcal damarın tomurcuklanmasına yardım eder. Ancak kılcal damarların gelişimi osteojenik hücrelerin çoğalmasından hızlı olmadığı için beslenmesi daha iyi olan kemiğe yakın hücreler osteoblastlara farklılaşır. Kırığın ortasında, kemikten uzaktaki hücreler dolaşımda zayıftır. Bu alandaki kılcal damarların gelişim hızı hücre çoğalma hızı ile uyumlu olmadığı için hücreler kondroblast ve kondrosite farklılaşıp kırık doküsünü oluştururlar. Osteoblasta dönüşen ve kanlanmanın yeterli olduğu alanlardaki hücreler trabekül oluşturur. Sonuç olarak en dışta kırık dokünün üstü kısmını örten periosteumun derin tabakasından çoğalmış osteojenik hücreler, orta tabakada ise kırık dokü, daha derinde de kemik trabekülleri bulunur. Belirli bir süre sonra her bir parçanın uç kısmında oluşan yaka benzeri kitleler birleşerek kırığın bütünlüğünü sağlayan dış kallusu meydana getirir. Dış kallusun gelişiminin devam etmesi, esasen kemik hücrelerinin çoğalmasına ve kırık dokünün (orta tabaka) interstisyel büyümesine bağlıdır. Benzer olarak ilik boşluğundaki olaylar da birbirini takip etmektedir. Kemik iliğinin endosteum ve osteojenik hücrelerinden gelişen trabeküller ile iliğin köprülenmesi ve iç kallus oluşur. Mineralizasyon (kalsifikasyon) olayında ortak teori; osteoidde matriks vezikülleri aracılığıyla meydana gelen ve hücresel düzeyde osteoblast ve kondrositlerden kaynaklanan matriks vezikülleri ile başlayan ve devam eden mineralizasyondur (30, 65).

Tamir evresinin ortalarında, kallusun etkisiz ve fazla kısımlarının reabsorbsiyon ve trabeküler kemiğin stres çizgisi boyunca uzamasıyla yeniden şekillenme(remodeling) evresi başlamış olur (60).

### **2.1.10.3. Remodeling (Yeniden Şekillenme) Evresi**

En uzun süren kemik iyileşme evresidir. Tamir evresinde meydana gelen, mekanik olarak güçlü ama mikroskopik olarak düzensiz olan kallusun, normal kemiğin lameller içeriğiyle farklılaşması bu evrede olur. Kalsifiye kıkırdak doku, osteoklastların rezorbe olması sonucu trabeküller kemik dokuya dönüşür. Daha sonra lameller kemik oluşur. Kas kuvvetleriyle mekanik etkenlere paralel bir şekilde dizilmiş olan osteonlar içerir. Kallus dokusunun normal görünümünü alması kemik iliğinin bulunduğu bölgelerdeki osteoklastlar tarafından rezorbe edilmesi ile gerçekleşir. Remodeling, tamir evresinin ortalarında başlar, 4-16 hafta sürer ve hatta yıllarca devam edebilir (8, 30, 54).

## **2.2. Kemikte Yara İyileşmesini Etkileyen Faktörler**

Kemik yaralarının iyileşmesinde etkili olan faktörler genel ve yerel olarak ikiye ayrılır.

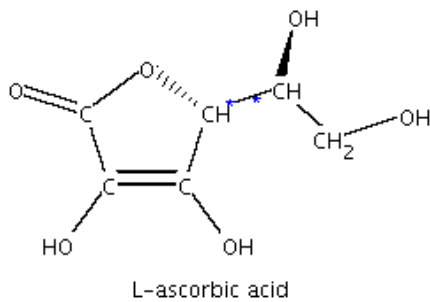
Yaş, paratiroid hormonu, büyüme hormonu, insülin, kalsitonin gibi hormonlar, diyabet, tüberküloz, anemi gibi sistemik hastalıklar, kondroitin sülfat, hiyaluronidaz etken maddeli ilaçlar, A, C ve D vitaminler genel faktörlerdir.

Yerel faktörler ise, travma derecesi ve etkisi, yara uçlarının konumu, yara bölgelerinin damarlanması, kemiğin türü, kemik yarasına ek deri ve yumuşak doku yaralanmaları, yerel bir enfeksiyon, bölgedeki patolojik oluşumlar ve sinirde meydana gelen hasarlardır (30, 65).

### 2.3. C vitamini

C vitamini (askorbik asit;  $C_6H_8O_6$ ) altı karbona sahip bir bir laktondur. İnsan haricindeki memelilerde çoğunlukla bu vitamin karaciğer ve böbrekte (kuşlar ve sürüngenler) glukozdan sentezlenir. Portakal, kivi, limon, domates, kırmızı biber, yeşil biber, çilek ve patates iyi birer C vitamini deposudur. C vitamini bir elektron donörüdür. C vitamini antioksidan veya indirgeyici ajan olarak C3-C4 bağının iki tane elektronunu vererek serbest askorbat radikalini oluşturur. Oluşan radikal kararsızdır ve diğer bileşiklerle reaksiyona girmez. Bu özellik C vitamininin ideal bir elektron donörü olmasına olanak tanır. Askorbik asit memeli canlılarda sekiz tane değişik enzimde, mayada ise üç tane değişik enzim de kofaktör görevi görür. İntraselüler gen ekspresyonunun düzenler. İntraselüler proteinleri oksidatif hasarlara karşı koruma gibi antioksidatif özellikleri mevcuttur. Düşük yoğunluğa sahip lipoprotein oksidasyonuna *in vitro* koşullarda engel olur. Lipit peroksidasyon ürünlerini uzaklaştırmak ve plazmada sulu fazda bulunan peroksil radikalının süpürülmesi için birincil antioksidandır (118).

C vitamini'nin biyokimyasal isimlendirmesi Askorbik asit (L-askorbik asit, L-treoheks-2-enoik asit- $\gamma$ -lakton, L-ksilo askorbik asit) dir (103).



**Şekil 2-3: Askorbik asit'in kimyasal yapısı**

L-askorbik asitin dehidro-L-askorbik asite oksitlenir. L-askorbik asit ısıya duyarlıdır. Oksijen ve ısı altında sıcaklığın artmasına bağlı olarak yükseltgenir. Dehidro-L-askorbikasit, 2,3-diokso-L-gulonikaside hidroliz yapar, ardından da L-treonik asite ve okzalik asite dönüşür (95).

L-askorbik asitin sulu çözeltideki bozunması, pH, sıcaklık değişimi, oksijen miktarıyla, metal varlığı gibi faktörlere bağlıdır. pH 4-6'da stabildir. Özellikle bakır L-askorbik asit oksidasyonunun hızlanmasını sağlar (11, 95).

### 2.3.1. Vitamin C'nin Metabolizması

Askorbik asitin metabolizması, alış yolu, alınan doz ve beslenme gibi birtakım etkenlere bağlıdır. İnsan vücudunda, askorbik asit gastrointestinal sistem içerisinde enerji gerektiren sodyuma bağımlı aktif transport mekanizmasıyla emilimi gerçekleşir. Aynı Km değerine sahip olan, insan ve kobay bağırsağında bulunan C vitamini transportu, iki türün de benzer transport mekanizmasına sahip olduğunu gösterir. İnsanlarda bu transport sistemi jejunumda, kobaylarda ise ileumda en yüksek aktiviteye sahiptir. Ayrıca ince bağırsağın duodenal ve proksimal jejunum duvarları da kobaylarda absorpsiyonun olduğu alan olarak ifade edilir (100, 103).

Askorbat iyonu ufaktır ve renal glomerular filtre porlarından geçişi kolay gerçekleşir. Serum konsantrasyonu 1.6 mg/dl'ye ulaştığında tubuler geri emilim doyuma ulaşmıştır ve bu değer bireysel olarak değişiklikler göstermekle beraber 2.5 mg/dl'ye ulaştığı zaman askorbik asit idrar ile atılır. Lökosit ve dokulardaki mevcut vitamin C konsantrasyonu serum konsantrasyonuna bağlı bir artış göstermektedir (72, 103).

Askorbik asit, vücudun belli dokularında yüksek miktarlarda mevcudiyet göstermektedir. Örneğin adrenal bezler, hipofiz, timus, korpus luteum ve retina konsantrasyonları plazmadan 100 kat yüksek, beyin testis, tiroid, ince barsak mukozası, lenf bezleri, akciğer, karaciğer, dalak, akyuvarlar, pankreas ve tükrük bezleri ise 10–100 kat fazla olduğu belirlenmiştir (64).

### 2.3.2. C vitaminin fonksiyonları

Diyette L-askorbik asit eksik olduğunda, insan, kobay gibi kendi vücutlarında askorbik asitin sentezlenmediği canlılarda skorbüt belirtileri meydana gelir. Bunların dışında kollajenin oluşmasında, yağ asidi metabolizmasında, beyin fonksiyonlarında bazı bozukluklar, enfeksiyonlara karşı duyarlılık ve yorgunluk hissiyatı gibi etkiler de görülmektedir (10). Askorbik asit moleküler oksijenin gerekli olduğu karmaşık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarında ciddi rol oynar. Hidroksilasyon yapan enzimlerin aktif olan yerlerinde klasik kofaktör gibi rol oynar. Metal iyonlarının geçişiyle ilişkisi, indirgendir ve oksijenin serbest radikal türevleriyle reaksiyonu, biyolojik fonksiyonlarının temelini oluşturmaktadır (51).

L-askorbik asit uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye doğru taşınmasında gerekli olan karnitinin lizinden sentezlenişinde veya g-butiro betainin hidroksilasyonu sonunda oluşumunda etkili olan vitamindir. L-askorbik asit eksikliğinde karnitinin sentezi düşer ve kanda trigliserid birikimi, fiziksel yorgunluk, halsizlik ve skorbüt belirtileri gözlenebilir (78).

Ketakolaminin biyosentezi, dopaminin norepinefrine olan maksimum hidroksilasyonunun sağlanması ve tirozin metabolizması için askorbik asite ihtiyaç duyulur. Aynı zamanda askorbik asit ve kolesterol metabolizmasının ilişkili olduğu, kobaylarda kronik askorbik asit yetersizliğinin kolesterolün safra asitlerine katabolizmasında azalmaya sebebiyet verdiği ve kolesterolün hidroksilasyonu ile safra asitlerine dönüşümünde de askorbik asite ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir (75). Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda kolesterolden steroid hormonlarının biyosentezinde de C vitamini varlığının etkinliği ifade edilmiştir (67, 75, 143).

L-askorbik asit eksik olduğunda dalaktan demirin mobilizasyonu zarar görür ve demir yükleme tedavisinde ilave L-askorbik asit demirin vücuttaki deposundan mobilizasyonunun artmasını sağlar. Bu sebeple askorbik demir eksikliği tedavisi için önemlidir. Ayrıca gıdalardaki demirin emilimi için c vitamini gereklidir (10).

Lökositlerin sahip olduğu yüksek askorbat konsantrasyonu ve bu durumun enfeksiyon ve fagositoz sırasında hızlı bir şekilde harcanması, vitaminin immun sistemin içinde de etkili olduğunu gösterir. Soğuk algınlığının belirtisinde lökosit ve plazma askorbik asit düzeylerinin ciddi biçimde azaldığı ifade edilmektedir. Askorbik asitin düşük dozları soğuk algınlığını önleme yetkinliği mevcuttur ancak yüksek miktarlarda önemi fazladır. Alınan askorbik asitin seviyesi arttıkça etkisi de artış gösterir. Kollajen, kemik, deri, kapillar duvar, proteoglikanlar, diğer bağ dokularının hücre içi matriksinin organik bileşenlerinin sentezinde etkilidir. Vitamin-C, demir ve oksijen ile kollajen sentezinde, lizin ve prolinin hidrolizasyonunda gereklidir. C vitamini eksikliği anormal kollajen ipliklerinin meydana gelmesine sebebiyet verir ve kollajen demetler de kolay degrade oldukları için derinin gerginliği ve kapiller frajilite azalır. Klinik olarak dişeti kanamaları, immun yetmezlik, kırık ve yaraların iyileşmesinde gecikme görülür. A vitamini gibi, C vitamini de yangısal cevabın oluşmasında görev alır. Eksikliği konağın enfeksiyonlara olan direncini düşürür. Ayrıca kollajen üretiminin askorbik asit nötrofillerin işlevini anjiyogenezisi arttırmasıyla beraber güçlü bir antioksidandır. Vitamin eksikliğinin olmadığı hastalarda bu vitaminin ek olarak verildiğinde yara iyileşmesinde hızlanma meydana gelmez, fakat özellikle ağır yanık yaralarında günde 1-2gr.'lık C vitamini takviyesi yaygın olan bir pratik uygulamadır (7, 10, 108, 115, 119, 121, 166).

L-askorbik asitin önemli fonksiyonlarından birisi de oksijen türevi olan hidroksil, singlet oksijen, süperoksit gibi serbest radikallerin harap olmasındaki etkinliğidir. Askorbik asit fizyolojik strese karşı olan yanıtta da etkin olduğu için işlem sırasında ve postoperatif olarak ihtiyaç duyulur (123). Travmalar ve cerrahi yaralanmalarda düşük olan plazma askorbik asit seviyelerinin bile fizyolojik anti-stresör olarak etkinlik gösterdiği ifade edilmiştir (98). Aşırı egzersiz sonucunda oluşan fizyolojik stresin antioksidan savunma mekanizmasını harekete geçirdiğini ve benzer sonuçların yaralarda da görüldüğünü, bu sebeple yara iyileşmesinde doku antioksidan seviyesindeki artışın faydalı olabileceği bildirilmiştir (64,141).

## 2.4. NSAİ

NSAİ ilaçların kimyasal yapıları farklı olmakla beraber, klinikteki kullanım alanları, etki mekanizmaları ve yan etkileri benzerlik gösterir. Sahip oldukları kimyasal yapıya göre sınıflandırılırlar. Etki güçleri ve farmakokinetik özellikleri bakımından farklılıklara sahiptir. Periferik etkili analjezikler de denir (45, 168). Çoğunluğu farklı şekillerde antipiretik ve antiinflamatuvar etkileri vardır. Antitrombotik etkileri mevcuttur. Para-aminofenol türevi olan asetaminofen, antiinflamatuvar ve antitrombotik etkinlikleri yoktur bu nedenle de NSAİ ilaçların sınıflandırılmasının dışında ele alınmaktadır.

NSAİ ilaçların antiinflamatuvar etkisi, glukokortikoidlerden daha düşüktür. Glukokortikoidlerden daha iyi bir biçimde tolere edilmekle beraber analjezik ve antipiretik özellikleri daha iyidir. Glukokortikoidler gibi antiinflamatuvar özellik gösterdiklerinden dolayı yapısal farklılıkları belirtmek için NSAİ olarak isimlendirilir. Periferik etkili olduklarından dolayı analjezik etkileri, santral etkili olan opioidlerden azdır. Ancak opioid gibi tolerans ve bağımlılık özellikleri yoktur. Narkoz hali yapmazlar ve solunum depresyonuna sebebiyet vermezler. Ağızdan alınabilmeleri ve opioidlerden farklı olarak antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı yaygın kullanılırlar. Analjezik etkileri sınırlıdır. Doz yükseltilmesi etkisini arttırmaz (45).

İndometazin, Diklofenak dışında, çoğu lipooksijenaz enzimine etki etmezler. Yeni NSAİ türevleri haricinde kimyasal yapısı zayıf asitlerdir. Yağda çözünürler, gastrointestinal kanaldan iyi emilirler. Plazma proteinlerine bağlanırlar. Sinoviyal sıvıya penetrasyonları iyidir ve burada birikebilirler.

Farmakokinetik özellik bakımından inflamasyon dokusunun asitli ortamında daha çok bulunurlar ve antiinflamatuvar etkileri artar. Karaciğerde metabolize olurlar. Böbreklerden uzaklaştırılırlar. Bu ilaçların yarı ömürleri 1-2 saatten 70-80 saate kadar çıkabilir. Bu genel özellikler dikkate alındığında NSAİ ilaçların arasında en doğrusunun seçilebilmesi için hekimin, ilaçların kullanımına endikasyonlarını, farmakokinetik özelliklerini, yan etkilerini ve

uygun dozlarına ilişkin bilgileri bilmeleri gerekmektedir. Tecrübe ve hastanın genel sağlık durumu tercihte önemlidir (168).

#### **2.4.1. NSAİ İlaçların ve Analjezik Antipiretik İlaçların Sınıflandırılması**

##### **2.4.1.1. Kimyasal Yapılarına Göre**

###### **A) Asidik türevler**

###### **Salisilik asit türevleri:**

-Nonasetil salisilatlar: Sodyum salisilat, Diflunisal, Benarilat, Magnezyum trisalisilat, Salsalat.

-Asetil salisilat: Aspirin

###### **Asetik asit türevleri:**

-Fenilasetik asitler (Aril asetik asitler): Alklofenak, Diklofenak, Fenklofenak.

-Paranokarboksilik asitler: Etodolak.

-İndolasetik asitler: Tolmetin, Sulindak, Asemetazin, Indometazin.

**Heteroaril asetik türevleri:** Ketorolak.

**Fenamik asit türevleri:** Meklofenamik asit, Flufenamik asit, Niflumik asit, Mefenamik asit.

**Propiyonik asit türevleri:** Oxaprozin, Naproksen, Tiaprofenik, Flurbiprofen, asit, İbuprofen, Ketoprofen.

###### **Enolik asit türevleri:**

-Prazolon türevleri: Azapropazon, Fenilbutazon, Oksifenbutazon.

-Oksikam türevleri (Enolik asitler): Proksikam, Sudoksikam, Oksikam, Tenoksikam.

**B) Nonasidik türevler:** Fluprokuazon, Prokuazon, Nabumeton, Tinoridin.

###### **C) Analjezik antipiretikler**

### 2.4.1.2. Yarılanma Ömrüne Göre

A) Kısa yarı ömürlüler:

İbuprofen, Aspirin, Flufenamik asit, İndometazin, Mefenamik asit, Ketoprofen, Diklofenak, Etodolak, Tolmetin.

B) Uzun yarı ömürlüler:

Diflinusal, Tenoksikam, Naproksen, Azapropazon, Proksikam, Sulindak, Tenidap, Nabumeton, Fenilbutazon. (48).

## 2.5. NSAİ İlaçların Genel Etki Mekanizmaları

### 2.5.1. Antiinflatuar Etki

Farklı uyaranlara cevap olarak akut inflamasyon başlar ve organizmayı korumak amaçlanır. Kronik inflamasyonda ise aksine organizmaya zararlı etki vardır. Akut inflamasyonun başlamasına sebep olan etkenler arasında enfeksiyon ajanları, antijen-antikor reaksiyonları, otoimmün reaksiyonlar ve temel uyaranlar, radyasyon, travma gibi fiziksel vardır. Akut inflamasyonun ana belirtileri calor, rubor, tümör ve dolor (ateş, kızarıklık, ödem, ağrı) dur. Diş hekimliğinde de cerrahi travmayla başlamış olan inflamasyon ve bunun sonucu gelişen ödem, ağrı, trismus meydana gelebilecek en önemli sorunlardır. Diş çekimi nedeniyle meydana gelen travma doku hasarına sebebiyet verir. Kan damarlarının dilatasyonu ile beraber hasar görmüş alana kan akımı artar. Trombosit ve lökosit adezyonu, inflamasyonun olduğu bölgeye lökosit göçünü başlatır. Kapiller permeabilite artışıyla ödem oluşur. Sinir uçlarına bağlı olarak ağrı algılanmaya başlar. İnflamasyonun gerçekleştiği alanda bu değişimlerin olduğu dönemde çeşitli kimyasal mediyatörlerin (histamin, serotonin, PG, bradikinin) sentezi gerçekleşir. Akut inflamatuvar reaksiyonlarda PG'ler özellikle PGE2 diğer mediyatörlerden sonra (hasardan 6-12 saat sonra) sıvıda ve eksudada da izlenir. Lökositler inflamasyonda önemli görevler alırlar. Kemotaksis, migrasyon, fagositoza ek olarak kimyasal mediyatörlerin de meydana gelmesini sağlarlar. Lökositten serbestlenen lizozomal enzimler

hücre membranında bulunan fosfolipitlerden araşidonic asidin ayrışmasına sebep olurlar. Araşidonic asitten PGI<sub>2</sub>, PG, tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) meydana gelir (20).

İnflamasyon akut fazında iken, monositer makrofajlar ve epitel hücrelerinden serbestlenen sitokinler de etkindir. Özellikle IL-1 ve tümör nekrozis faktör (TNF- $\alpha$ ) inflamasyon sırasında bu etkinliği gösteren önemli sitokinlerdir. Sitokinlerle indüklenmiş olan lökosit proteinleri kemotaksis ve migrasyonda görev alırlar. Sitokinler proinflamatuvar belirtilerin çoğunluğunu meydana getirirler (48).

### 2.5.2. Analjezik Etki

Ağrı rahatsız edici özelliği olan bir uyaran olarak doku hasarı ile ortaya çıkan inflamasyon sonucunda indüklenir. Ağrı reseptörlerinin uyarılmasıyla da ağrı algılanır. Nositseptörler farklı ağırlı uyaranlara göre özelleşmiş olan reseptörlerdir. Sinir liflerinin serbest uçlarında yer alırlar ve ağırlı uyaranlara cevap verirler.

Ağrı yapıcı kimyasal ve mekanik etkenler periferde PG sentezini artırır. Örneğin operasyon sonrası ilk 3-8 saat arasında ağrı çok şiddetlidir. PG'ler, bradikinin ve öteki aljezik mediyatörlere nosiseptörlerin duyarlılığını artıran hiperalezik ağrı mediyatörlerdir.

NSAİ ilaçlar periferde PG oluşumunu baskılayarak nosiseptörlerin ağrı mediyatörlerine duyarlılığını kaldırır. Ağrının algılanmasını azaltırlar (48, 70).

### 2.5.3. Antipiretik Etki

Ateş; infeksiyon, inflamasyon, malignite, çeşitli hastalıklar ve doku hasarını takiben meydana gelebilir. Ateşe sebep olacak maddeler pirojen madde olarak isimlendirilir. Bakteri, virüs, polipeptidler, ekzojen pirojenler, makrofajlardan endojen pirojenlerin serbestlenmesine sebebiyet sağlar. IL-1, interferonlar, TNF- $\alpha$  endojen pirojenlerdir. Bunlar hipotalamusta

termoregulator merkezin uyarılmasını sağlarlar. Bu bölgede bulunan PGE sentezini artırır ve onların aracılığıyla ısı üretiminde artış, ısı kaybında azalma meydana gelir. Termoregulator merkez uyarıldığında vakit daha yüksek ısı değerine ayarlanmış olur ve böylece ateş yükselir. NSAİ ilaçlar PGE2 sentezini baskılar, ısı kaybını arttırır ve ateşin düşmesini sağlarlar. Ciltte ise vazodilatasyon ve terlemeyle beraber ısı kaybı artar. NSAİ ilaçlar yükselmiş olan vücut ısısına etkilidirler. Normal vücut ısısını ya da egzersiz, sıcak çarpması gibi nedenlerle artmış olan ısıyı (hipertermi) etkilemezler (33).

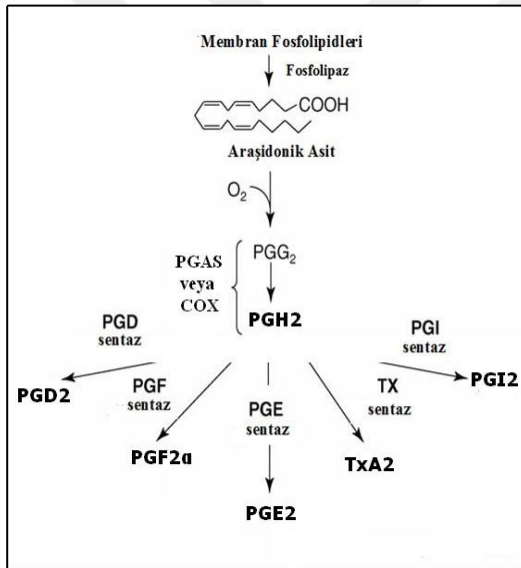
## 2.6. Prostaglandinler

PG'ler 80 senedir bilim adamlarının ilgisini çekmiş olan aktif maddelerdir. Kurzrok Lieb ve arkadaşları 1930 yılında, insan seminal sıvısından hazırlanmış olan ekstraktlarda değişik bir aktif maddenin olduğunu ve bu maddenin izole insan uterus şeritleri üzerinde bazen kasılma, bazen de gevşetici özellik gösterebildiğini bildirmişlerdir (36). 1935 yılında Von Euler bu aktif maddenin diğerlerinden farklı olarak yağda eriyebilen, çift bağ kapsayan farklı bir yağ asidi olduğunu ifade etmiştir (10). En çok prostat bezinde bulunduğundan dolayı da "Prostaglandin" adını almıştır. Daha sonra ise tüm memeli dokularında mevcut olduğu ve lokal hormon şeklinde etki gösterdikleri anlaşılmıştır. 1960 yılında Bergstrom ve Samuelsson tarafından PG'nin sadece bir madde olmadığı ve çeşitlilikler içerdiği bildirilmiştir (17). PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGH<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  gibi tipleri vardır. Her tipin alt grupları da tanımlanmıştır. PG sembolündeki D, E, F, G, H, I büyük harfler, moleküldeki mevcut olan halka tipini ifade etmektedir. PG sembolünde büyük harfin arkasında ve altındaki küçük rakam ise, molekülün içindeki doymamış bağın sayısını ifade eder (33).

### 2.6.1. Prostaglandinlerin Biyosentezi ve Metabolizması

PG'lerin sentezlenmesinde görev alan maddeler hücrelerin sitoplazma zarlarında bulunan fosfolipitler veya kolesterol esterleri içindeki çoklu doymamış yağ asitleridir (30, 96). Bu yağ asitleri besinlerle dışarıdan alınmaktadır ve vücutta üretilmedikleri için "esansiyel" olarak isimlendirilir. PG sentezinin başlamasında, hücre membranlarında yer alan fosfolipaz A ve kolesterol esteraz enzimleri etkindir. Fosfolipaz ve kolesterol esteraz enzimleri bu

esterleri hidrolize eder ve araşidonik asitin serbest duruma gelmesine yardımcı olurlar (21). Bundan sonra çift fonksiyonlu bir enzim olarak bilinen siklooksijenaz (Cox), oksidasyon reaksiyonu ile serbestleşen araşidonik asitin  $PGG_2$  'ye dönüşmesini sağlar. Peroksidaz reaksiyonu ile  $PGG_2$   $PGH_2$  'ye indirgenir (21, 77, 174). Meydana gelen bu ara ürünler prostaglandin sentaz enzimleri yardımıyla  $PGE_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_2$ ,  $PGI_2$ ,  $TXA_2$  gibi değişik PG'lere dönerler (13, 175). Bunlar arasında  $PGE_2$ 'nin, kemik metabolizmasında anabolik ve katabolik reaksiyonlarda rol aldığı ifade edilmiştir (20, 96, 106, 175).  $PGE_2$  büyüme plağı kondrositleri, mezenkimal kök hücreleri ve osteoblastlardan sentezlenip, salgılanmaktadır. Aynı zamanda  $PGE_2$  'nin osteoblastların farklılaşmasında rol aldığı ifade edilmiştir (106).  $PGE_1$  ve  $PGE_2$ 'nin kemikten kalsiyum hareketini belirgin bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir. Bu etki paratiroid hormondan bağımsız olup, osteoklast stimülasyonuna dayanır.



**Şekil 2-4: Prostaglandinlerin biyosentezi**

### 2.6.2. Prostaglandinlerin Dokulardaki Dağılımı ve Görevleri

Oluşan PG'ler dokuda depolanmadan çıkarlar. Metabolik olaylarda görevlerini yaptıktan sonra veya bu görevleri gerçekleştirmeden, sentez edildikleri dokulardaki enzimler tarafından hızlı bir şekilde inaktivasyonları sağlanır. Bu inaktivasyon her zaman PG'lerin sentez olduğu dokuda olmak zorunda değildir. Dolaşıma karışan PG'lerin bir bölümü

akciğerlerden, karaciğerden, böbreklerden geçerken, bu yerlerde mevcut olan enzimlerle inaktive olurlar. Hücre düzeyinde, fibroblastlar, polimorf nüveli lökositler, makrofajlar, lenfositler, trombositlerde de PG sentezi, yani var oldukları bildirilmiştir. Organizmada bulunan en zengin PG kaynağı insan semenidir (300µ g/ml). Ayrıca kalp, böbrek, karaciğer, beyin, mide, uterus, göz, deri, kan damarları, sürrenal bezler, pankreas, seminal veziküller, tiroid bezi, kemik, tükürük bezi, dişeti, diş pulpası, diş germelerinde bulunabildikleri de ifade edilmiştir. Semenden başka, menstruel sıvı, amniyotik sıvı, süt, tükürük gibi vücut sıvılarında da mevcudiyetleri görülmüştür. Ayrıca karayipler yosunu diya adlandırılan bir bitkinin kuru ağırlığının %2'si kadar PG içermesi buradan saf kristalize PG'lerin üretilmesini sağlamıştır (48).

### 2.6.3. NSAİ İlaçlarla Prostaglandin Sentezinin İnhibisyonu

NSAİ ilaçların Cox enzimini baskılar ve PG oluşumunu engeller. Terapötik etkileri çok büyük bir oranda bu mekanizma ile gerçekleşir. Fakat, 1990'lı yılların başında PG oluşmasında bir aracı olan Cox enziminin iki izoformunun (Cox-1 ve Cox-2) olduğu bulunmuştur (139). Bu iki izoform şekli Cox-1 ve Cox-2 olarak isimlendirilmiştir (13). Farklı dokular ve organlarda Cox-1 ve Cox-2'nin farklı seviyede bulunduğu bildirilmiştir.

Normal fizyolojik durumda gastrointestinal sistemde, böbrek, trombositlerde ve endotelial hücrelerde çok sayıda Cox-1 bulunmaktadır. TXA<sub>2</sub> ve PG'nin oluşumuna aracılırlar. Cox-1, midede PGE<sub>2</sub> ve PGI<sub>2</sub>'nin sentezlenmesini katalize etmektedir. Normal hücresel olayların düzenlenmesini sağlayan bu PG'ler mide mukozasının bütünlüğünü korur. Trombosit fonksiyonunu düzenler. Vasküler hemostaza aracılık yaparlar. Böbrek kan akımını ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde görevlidirler (21, 52, 53, 77, 105, 124, 139, 150,172).

Cox-2 izoformu indüklenebilir özelliklerdedir. Proinflamatuvar maddeler olan IL-1, lipopolisakaridler, TNF-α, büyüme faktörleriyle indüklenir ve etkileri artar (18, 121). Fizyolojik durumlarda yalnızca az sayıda özel dokuda düşük sayıda bulunurlar. Böbrek gelişiminde, ovülasyonda, doğumda, birçok beyin fonksiyonlarında PG oluşumuna

etkilidirler. Fakat daha çok inflamasyon, ağrı ve ateşle ilişkili PG sentezine aracılık etitkleri söylenmektedir (21, 51, 53, 77, 105, 106, 124, 139, 152, 161, 173).

Araşidonik asitin  $PGG_2$  ve/veya  $PGH_2$ 'ya dönüşmesini gerçekleştiren Cox-1 ve/veya Cox-2 enzimlerinin inhibisyonu; NSAİ grubunda var olan ilaçların ana etki mekanizmasını oluşturmaktadır (150). NSAİ ilaçlar her iki Cox izoformunu da baskılar ve PG sentezini önler (138). Cox enzimleri antiinflamatuvar ilaçlara çeşitli duyarlılıklar gösterirler. Cox-2 enziminin inhibisyonu sonucu NSAİ ilaçlar analjezik ve antiinflamatuvar etkilerini gösterebilirler. Cox-1 enzimin inhibisyonuyla ise NSAİ ilaçların gastrointestinal kanama ve renal hasar gibi yan etkileri görülebilir.

## 2.7. Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış yörüngesinde bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektron taşıyan, elektrik yüklü ya da yüksüz atom veya moleküldür. Oldukça kararsız ve reaktif yapılardır. Bu nedenle yarılanma ömürleri çok kısadır. Çevreleride bulunan atom veya moleküllere hücum eder ve onlardan elektron almak için çalışırlar ve çabuk bir şekilde kararlı hale gelmek isterler. Serbest radikaller organizmada metabolik olay esnasında meydana geldikleri gibi, radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasal maddeler gibi farklı dış etkenler sebebiyle de oluşurlar (31, 49, 88, 161).

Serbest radikaller mitokondride ve hücrenin diğer fraksiyonlarında membrana bağlı olarak veya serbest halde mevcut olan çok sayıda enzimin katalizlediği reaksiyonlar esnasında meydana gelir. Aerobik organizmalarda serbest radikallerin çoğu oksijen ve azottan kaynağını alır. Bunlardan bazıları radikal niteliklidir, bazıları ise reaksiyonlara katıldıktan sonra radikallere dönüşürler (88).

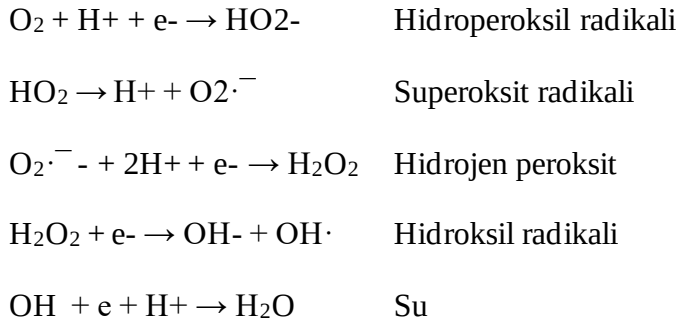
### 2.7.1. Serbest Oksijen Türevleri ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

En önemli serbest radikaller, oksijenden oluşmuş radikallerdir. Hücrelerin çoğu kendileri için gerekli olan enerjiyi sağlamak amacıyla adenosin trifosfat oluşumu sırasında, sitokrom sisteminde oksijenin suya olan tam redüksiyonunu kullanırlar. Fakat oksijenin %1-3'ü tam olarak suya dönüşmez ve bu yolla bazı reaktif türler meydana gelir. Stabil olmayan bu araçlar reaktif oksijen serbest radikalleri olarak isimlendirilirler. Bunlar hidrojen peroksit, superoksit ve hidroksil radikali ve singlet oksijendir (145).

**Tablo 2-1: Reaktif oksijen ve nitrojen türleri**

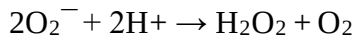
| Radikaller   | Radikal olmayanlar          |                    |                               |
|--------------|-----------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Hidroksil    | OH·                         | Hidrojen peroksit  | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| Alkoksil     | RO·                         | Singlet oksijen    | *O <sub>2</sub>               |
| Peroksil     | ROO·                        | Ozon               | O <sub>3</sub>                |
| Superoksit   | O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Hipoklorik asit    | HOCl                          |
| Nitrik oksit | NO·                         | Lipit hidoperoksit | LOOH                          |
| Azot dioksit | NO <sub>2</sub> ·           | Peroksinitrit      | ONOO-                         |

Aerobik organizmaların yaşamlarını devam ettirebilmeleri için mutlaka oksijene gereksinim vardır. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçer ve suya dönüşür. Bu şekilde hücre kendisi için ihtiyaç duyduğu enerjiyi elde etmiş olur. Ancak bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmez ve oksijenden kaynağını alan radikaller meydana gelir (88, 160). Oksijenin bir tane elektronu alarak indirgenmesiyle superoksit radikali, iki elektron alarak indirgenmesiyle ise hidrojen peroksit meydana gelmektedir. Üçüncü elektronun eklenmesiyle ise yüksek seviyede reaktif hidroksil radikali, dördüncü elektron eklenirse de su oluşmaktadır.



### 2.7.2. Superoksit Radikali

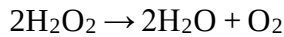
Aerobik hücrelerde oksijen bir elektron alıp indirgendiğinde, serbest  $O_2^{\cdot-}$  meydana gelmektedir (88). Orta derecede bir oksidan olan superoksit radikali direkt asıl zarardan sorumlu değildir ve zincirleme reaksiyonları başlatma özelliğine sahiptir. Asıl etkisi, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kaynaklık etmek ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmaktır. İki süperoksit radikali birbiriyle etkileşime girerek biri oksitlenir diğeri indirgenir ve sonuçta  $H_2O_2$  ve  $O_2$  ortaya çıkar.



Superoksit radikallerinin ortamdan uzaklaştırıldığı bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi adı verilir. Farklı kimyasal bileşikler ve özellikle yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar gibi fiziksel etkenler oksijenli ortamlarda süperoksit radikalini meydana getirirler (49).

### 2.7.3. Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden 2 elektronu alması veya süperoksitin bir elektronu alması dolayısıyla ortaya çıkan peroksitin 2 hidrojen molekülüyle birleşiminden  $H_2O_2$  meydana gelir. Elektron yapısından dolayı serbest bir radikal olmayan  $H_2O_2$  güçlü bir oksidan ajan olmakla beraber, süperoksit veya demirle reaksiyona girerse hidroksil radikalini meydana getirir (161).

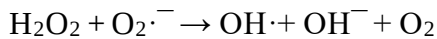
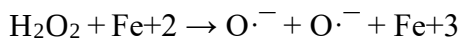
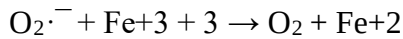


$\text{H}_2\text{O}_2$ , glutatyon peroksidaz ve katalaz'la su ve oksijene indirgenir.

Aerobik organizmalar oksijen kaynaklı oksidan serbest radikallerini oluşturmaya nazaran, eş zamanlı olarak bu oksidan serbest radikallerin oluşumunu en az seviyeye indirecek ya da meydana geldikleri anda hızla parçalayacak, enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemini geliştirmiştir (160).

#### 2.7.4. Hidroksil Radikali

Canlı dokuda oluşan en reaktif radikal türleri birisi hidroksil radikalidir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  'nin Fe gibi geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle ortaya çıkarlar.



Hidroksil radikalinin yarı ömrü kısadır. Difüzyonu da sınırlı olduğundan çok düşük miktarlarda hücresel elemanlara büyük zararlar verebilirler (49).

#### 2.7.5. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin zararlı etkilerine organizma güçlü bir cevap verme yeteğine sahiptir ancak, bazı durumlarda savunma sistemi yetersiz kalır ve makromoleküller hasar görür. Bunun sonucunda hasar alan yere bağlı olarak farklı organ ve sistemler etkilenebilir.

### **2.7.5.1. Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri**

İyonize eden radyasyonla oluşmuş olan serbest radikaller DNA'yı etkiler ve mutasyona hatta hücre nekrozuna sebep olabilirler (29, 69, 88, 104, 160, 178).

### **2.7.5.2. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu peroksitler, oksoaldehitler ve hidrojen peroksit oluşur. Oksoaldehitler proteinlere, RNA ve DNA'ya bağlanma ve aralarında çapraz bağlar yaratma kabiliyetlerinden dolayı antimitotik etki gösterir ve yaşlanmada rol oynar (2, 88, 178).

### **2.7.5.3. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri**

Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az duyarlıdır. Proteinlerin serbest radikal zararından etkilenme seviyesi aminoasitlerin kompozisyonlarına bağlı olarak değişiklik gösterir. Doymamış bağ ve kükürt ihtiva eden histidin, sistein, tirozin, fenilalanin, triptofan, metiyonin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden rahatlıkla etkilenebilirler. Bu etkilenme sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller meydana gelir. Serbest radikallerden etkilenmiş olan proteinlerin üç boyutlu yapılarında bozulmalar ortaya çıkar. Proteinlerde kırılmalar, çapraz bağlanmalar ve agregasyonlar meydana gelebilir. Serbest radikallerin proteinler üzerine olan etkileri çok güçlü olmazsa, hasar yapabilme aktiviteleri de düşüktür (2, 88, 160, 178).

#### 2.7.5.4. Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Lipitler serbest radikallerin etkilerine en duyarlı biyomoleküllerdir. Hücre membranlarında bulunan kolesterolün ve yağ asitlerinin doymamış bağları; serbest radikaller ile rahatlıkla reaksiyona girer ve peroksidasyon ürünleri meydana getirirler (81, 122, 175).

Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımları lipit peroksidasyonu diye adlandırılır. Lipit peroksidasyonu kendisini devam ettiren zincir reaksiyonu halinde ilerler ve çok tehlikelidir. Hücre zarlarında lipit serbest radikallerinin (L) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO) meydana gelmesi, ROS'un sebebiyet verdiği hücre harabiyeti ciddi bir özelliği olarak bilinir. Serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Hücre zarlarında lipit peroksidasyonuna uğrayan yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir (88). Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerinde bulunan eşlenik çift bağlardan bir elektronu içeren hidrojen atomlarının çıkartılması ile yağ asidi zincirinin lipit radikali özelliği kazanımıyla başlar.

L dayanıksız bir bileşik olarak ifade edilir ve bir sıra değişikliğe uğrar. L moleküler O<sub>2</sub> ile etkileşmesiyle LOO meydana gelir (86, 144, 176). LOO, zar yapısında bulunan başka çoklu doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni lipit radikallerinin meydana gelmesini sağlarken kendileri de açığa çıkmış olan hidrojen atomlarını alır ve lipit peroksitlerine (LOOH) dönüşür. Bu şekilde olay kendini katalizleyerek süre gelir. Lipit peroksitler yıkıldığında ise biyolojik olarak aktif diye adlandırılan aldehitler oluşturmaktadır. Bu bileşikler hücre seviyesinde metabolize olarak veya başlangıçtaki etki alanlarından geçerek hücrenin öbür kısımlarına hasarı yayarlar.

#### 2.8. Antioksidanlar

Organizmanın sağlıklı bir yaşam sürebilmesi için oksidan/antioksidan denge çok önemlidir (35). Oksijenle sürekli temas halinde olduğunda serbest radikaller oluşur. Serbest radikal oluşmasındaki artmaya veya antioksidan sistemindeki yetersizlikten organizmada

oksidatif stres başlar ve serbest radikallerinin zararlı olan etkileri oluşur; hasarın yerine bağlı olarak farklı organ ve sistemler olumsuz şekilde etkilenirler (40,122, 158, 178).

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandırmada, oluşmuş olan radikalleri ortadan kaldırmada ve hasar görmüş molekülleri tamir etmede ve temizlemede rol oynayabilirler (35). Antioksidan sistem; enzimlerden, suda ve yağda çözünen radikal tutucularından ve metal iyonları bağlayan proteinlerden oluşur (23,47, 88, 134).

**Tablo 2-2: Organizmada antioksidan sistemin elemanları**

| <b>Enzimler</b>      | <b>Suda çözünen radikal tutucuları</b> | <b>Yağda çözünen radikal tutucuları</b> | <b>Metal iyonlarını bağlayan proteinler</b> |
|----------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|
| Glutatyon redüktaz   | C vitamini                             | Flavonoidler                            | Albumin                                     |
| Superoksit dismutaz  | Ürik asit                              | Ubikinol                                | Haptoglobin                                 |
| Glutatyon transferaz | Glutatyon                              | $\beta$ -Karoten                        | Seruloplazmin                               |
| Glutatyon peroksidaz |                                        | Bilirubin                               | Transferrin                                 |
| Katalaz              |                                        | E vitamini                              | Ferritin                                    |

### 2.8.1. Antioksidan Sistemin Enzimleri

#### 2.8.1.1. Superoksit Dismutaz (SOD)

SOD enzimi superoksit radikalini dismutasyona uğratır; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijene dönüştürür. Yalnızca SOD, organizmada substrat olarak serbest radikal kullanır.



İnsanlarda SOD'un Cu-Zn-SOD ve Mn-SOD şeklinde iki izoenzimi vardır. Bakır ve çinko içeren tipi sitozoldedir, mangan içeren tiyise mitokondridedir. Oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda SOD aktivitesi fazlayken, ekstrasellüler sıvıda SOD aktivitesi çok düşüktür (134, 156, 163).

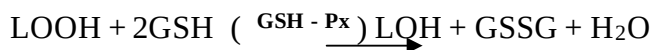
#### 2.8.1.2. Katalaz

Katalaz enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i oksijene ve suya ayrıştıran reaksiyonu katalizler. Enzim, peroksizomlarda bulunur (163).



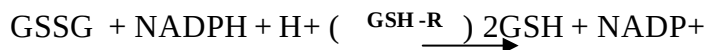
#### 2.8.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipit hidroperoksitleri (LOOH) üzerine etkilidir. GSH-Px'in iki değişik tipi vardır. Aktivitesi için selenyuma ihtiyaç duyan formu hem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hem de LOOH'leri, seleniyum gerektirmeyen formu ise yalnızca LOOH'leri metabolize etmektedir. Bu reaksiyonlarda glutasyon (GSH) hidrojen vericisidir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve LOOH'ler indirgenir. GSH ise oksitlenmiş haline (GSSG) dönüşür.



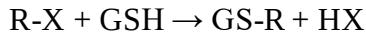
#### 2.8.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-R)

GSSG ise NADPH'a bağımlı glutasyon redüktaz (GSH-R) yardımıyla tekrar GSH'a indirgenmektedir (94).



### 2.8.1.5. Glutasyon Transferaz (GST)

GST dimerik bir yapıdadır. Sitozolde bulunur. Yüksek sayılarda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli göreve sahip GST'ler birtakım endojen ve ekzojen bileşiklerin GSH 'la birleşmesini kataliz ederler.



GST'lerin birtakım izoenzimleri GSH-Px aktivitesi ile LOOH'ların metabolizmasını oluşturur.



### 2.8.1.6. Glutasyon (GSH)

GSH, hücre için en mühim antioksidanlarından biridir. GSH'lar, serbest radikaller ve peroksitler ile reaksiyona girerler. Bu sayede hücreleri oksidan zararına karşı korumaktadır. GSH intoksikasyon reaksiyonlarına direkt olarak katılabildiği gibi, birtakım enzimlerin substratı ya da kofaktörü olacak şekilde de görülebilir. En çok karaciğerde olmak üzere, dokuların genelinde yüksek sayılarda bulunmaktadır. Glutamat, sistein ve glisinden üretilen bir tripeptittir ve sülfidril grupları içermesi bakımından çok zengindir. GSH-Px, GSH-R ve GST gibi enzimlerin işlev göstermesi adına gereklidir. Aynı zamanda hücrenin sülfidril (-SH) gruplarını indirgenmiş şekilde tutar ve çoğu proteinin ve enzimin inaktivasyonunu önler. GSH amino asitlerin zardan geçmesinde görevlidir (69, 134, 165).

## 2.9. Oksidan/Antioksidan Dengeyi Belirleyen Biyokimyasal Parametreler

### 2.9.1. MDA

Süperoksit radikal anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve peroksit radikal olmayan dianyon ( $O_2^{2-}$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROS), hem enzimler aracılığıyla hem de moleküler oksijenin ( $O_2$ ) enzimatik olmayan kimyasal indirgenmesiyle üretilir. ROS oldukça reaktiftir ve proteinler, DNA ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) gibi lipitler dahil olmak üzere çeşitli biyomolekül sınıflarına yakın çevrelerine saldırır. Bu fenomen genellikle “oksidatif stres” veya “oksidan stres” olarak bilinir. PUFA araşidonik asit, sonunda MDA, 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve F2-izoprostanlar gibi diğer reaksiyon ürünlerini oluşturmak üzere peroksitlenir. ROS'un lipitlerle özel reaksiyonu genellikle "lipit peroksidasyonu" olarak bilinir. MDA, HNE ve F2-izoprostanlar, oksidatif stresin, yani lipit peroksidasyonunun yaygın olarak kabul edilen biyobelirteçleridir.

Üç veya daha çok çift bağı olan yağ asitlerinin peroksidasyonundan MDA ortaya çıkar. MDA yağ asidi oksidasyonun spesifik göstergesi olmakla beraber, lipit peroksidasyonunun seviyesiyle de korelasyon gösterir. Bu sebeple biyolojik sıvılarda lipit peroksit seviyelerini tespiti için MDA tayini yapılır (31, 69, 122, 134, 145, 160, 178).

### 2.9.2. Nitrik Oksit (NO)

NO organizmada sık olarak bulunmaktadır. Hücrelerde ve dokularda doğal olarak sentezlenmektedir. NO normal fizyolojik vakaların düzenlenmesinde ve birtakım patolojik süreçlerin gelişiminde ciddi görevler almaktadır. Hızlıca nitrat ve nitrite okside edildiğinden yarılanma ömrü saniyelerle belirtilir. Serbest radikal özelliğine sahip bir gazdır. Son derece labildir. Oksijen ve su aracılığıyla nitratlara ( $NO_3^-$ ) ve nitritlere ( $NO_2^-$ ) parçalanmaktadır. Bu türevlerin hepsin birden  $NO_x$  sembolünü kullanarak ifade edilir (6, 43,44, 109, 104, 122, 126, 163).

NO bölünmeyi durdurabilir dokularda baskılayıcı etkisi vardır. Güçlü bir vazodilatör etkisi olan NO, aynı zamanda önemli bir hücre içi ve hücre dışı sinyalizasyon ajanıdır, vasküler tonusun düzenlemesinde görev alır. İnflamasyon, vazodilatasyon, apoptoz ve karsinogenz'de görev yapar. Yağda çözünebilen ve biyolojik membranlardan rahatlıkla geçen NO'nun basit bir kimyasal yapıya sahip olmasına karşın organizmaya olan etkileri karmaşıktır (159). NO, nitrik oksit sentetaz (NOS) adı verilen bir grup enzim tarafından L-argininin substrat gibi kullanılmasıyla meydana gelir. NOS enziminin 3 izoformu mevcuttur. Bunlar endotelyal NOS (eNOS veya tip III) olarak, indüklenbilir NOS (iNOS veya tip II), nöronal NOS (nNOS veya tip I), olarak tanımlanabilmektedir. Bunlardan eNOS ve nNOS kalsiyum bağımlı çalışır. iNOS ise kalsiyuma duyarlı değildir. Endotoksin ve sitokinlerce indüklenebilirler. nNOS ve eNOS başlıca nöronlar, endotelyal hücrelerden ve diğer hücrelerden salgılanabilir. iNOS'un salınımı bakteriyel polisakkaritlerin ya da birçok hücreyi özellikle de makrofajları ilgilendiren inflamasyon bağlantılı sitokinlerin indüksiyonuyla etkilenir (38, 43, 44, 109, 126, 116, 183, 184).

### 2.9.3. FRAP

Plazmanın *in vitro* demiri indükleyebilme yeteneğini ölçen FRAP testleriyle, ürik asit, askorbik asit (vitamin C), vitamin E, bilirubin ve protein gibi antioksidanların miktarı ölçülebilir (14, 39, 122).

FRAP testi ucuzdur, reaktiflerin hazırlanması kolaydır, sonuçlar yüksek oranda tekrarlanabilir ve prosedür basit ve hızlıdır. FRAP tahlili, oksidatif stres ve etkileri ile ilgilenen her laboratuvar ve araştırmacının teknolojik erişimi dahilinde biyolojik sıvıların olası bir antioksidan veya azaltma potansiyeli indeksi sunar (15).

#### 2.9.4. Protein Karbonil (PK)

Dokuların protein karbonil düzeylerinin ölçümü, Reznick ve Packer tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik protein yapısında bulunan karbonil grupları ile 2,4-dinitrofenilhidrazin oluşturduğu dinitrofenilhidrazonların renk şiddetinin 370 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır (130, 170).

#### 2.9.5. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Hücre metabolizma sırasında, oksijen mitokondride suya ve redükte olarak reaktif oksijen türlerine dönüşür. Oksijenin bir elektron alıp redükte olmasıyla  $O_2^-$ , iki elektron redükte olmasıyla  $H_2O_2$  oluşur. Reaktivliği yüksek olan hidroksil radikali ise üçüncü elektronun eklenmesi ile oluşur (24, 26, 171)

#### 2.9.6. Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ )

TGF- $\beta$ , çok yönlü bir şekilde gelişimi kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. Çok sayıda benzer polipeptid büyüme faktörleri içeren TGF- $\beta$ ; hücre çoğalması, diferensiyasyonu, adhezyonu, motilitesi ve nekrozu gibi hücre metabolizma süreçleri düzenleme kabiliyetine sahiptir. TGF- $\beta$ 'nın organizmanın tüm dokularının gelişimi, homeostazisi ve onarımı üzerinde büyük bir rolü vardır (99, 153)

#### 2.9.7. ALP

ALP tip 1 (karaciğer, kemik, böbrek kaynaklı), tip 2 (plasenta kaynaklı), tip 3 (germ hücre veya plasenta benzeri kaynağı olan), tip 4 (intestinal kaynaklı) olmak üzere 4 adet izoenzimi olan çinko içerikli bir glikopeptittir. Serum ALP seviyeleri yaşa ve sağlığa göre değişiklik gösterir. Hayatın ilk üç ayında orta seviyede bir artış gözlenirken, pubertede

normal değerlerin 2-3 katına kadar çıkar ve ardından 1-2 sene içinde normal yetişkin seviyelere geriler. Gebelikte ALP seviyeleri normalin 2-3 katına çıkar. ALP seviyelerinin düzenli kontrolü ile birtakım hastalıkların erken tanısı yapılabilmektedir (28, 116)

#### **2.9.8. Osteokalsin**

Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde spesifik bir belirleyicidir. Puberte dönemi gibi yüksek kemik oluşumu gözlenen durumlarda serum osteokalsin seviyeleri artar. Pubertede büyüme atağı olduğundan ötürü, osteokalsin düzeyleri de osteoblast aktivitesiyle beraber artış gösterir. Puberte sonrası ise epifiz matürasyonunun tamamlanması ile osteokalsin seviyeleri azalır. Serum osteokalsin düzeyleri kemik metabolizması ile ilgili bilgi verir (22, 57, 66, 102, 114, 161).

#### **2.9.9. Tiol**

Tiol; sülfhidril grubunu içeren, oksidatif stresi önleyici önemli bir role sahip olan organik bir bileşiktir. Vücuttaki defansif protein mekanizmalarından olan sistein içerdiği tiol grupları ile oksidatif stresi önler. Sistein ve düşük moleküllü tiol depoları; peroredoksin, tiyoredoksin ve diğer proteinlerin aktif alanlarında bulunur. Sistein ve düşük ağırlıklı tiyol depoları ile hücre oksidatif hasara karşı korunmaktadır (33, 127, 166).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

Çalışmada kullanılan gereçler şunlardır:

- 64 adet Wistar Albino cinsi ortalama 250g±50g ağırlığında yetişkin erkek sıçan
- Ketanest flakon (Ketamin hidroklorür, Parke Davis, Berlin, Almanya)
- Rhompun flakon (Xylazine hydrochloride, Bayer Türk Kimya Sanayi Limited Şirketi, İstanbul, Türkiye)
- Diklofenak sodyum (Voltaren)
- Vitamin C (Redoxon)
- 2 mm çapında çelik frez
- Tasınabilir motor ve piyasemen
- Ameliyat seti (bisturi sapı, bisturi ucu, cerrahi dişli doku pensi, periost elevatörü, presel, kıvrık uçlu hemostat, portegü, cerrahi makas)
- 4,0 ipek dikiş (Doğsan, İstanbul, Türkiye)
- İnsülin enjektörleri
- Formaldehit (%10'luk formol)
- Dietil eter
- %0.9 serum fizyolojik (NaCl solüsyonu)

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Denek Seçimi

Çalışmamızda 64 adet ( $250\pm 50$ ) gram ağırlığında 6 aylık erkek Wistar Albino sıçanlar kullanılmıştır.

Araştırmamızı İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvarı, İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Tümör Patolojisi ve Onkolojik Sitoloji Anabilim Dalı ve İ.Ü Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Deney hayvanları İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Deney Hayvanı Bakım ve Barındırma Ünitesinde barındırılmıştır ve tüm deneyler burada gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı Deney Hayvanı Bakım ve Barındırma Ünitesinde  $22\pm 1$  °C sıcaklığında 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamı yaratacak şekilde otomatize edilmiş odalarda ve standart kafeslerde tutulmuştur. Hayvalar deney süresince standart laboratuvar yemi (İstanbul Yem Sanayi tarafından hazırlanan %21 oranında protein içeren yemler) ve çeşme suyu ile beslenmiştir. Deney hayvanları operasyondan sonra her kafeste 2 sıçan olacak şekilde tutulmuştur. Yem ve su ad libitum olarak verilmiştir.

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Komitesi'nin 06/06/2018 tarih ve 202399 sayılı kararı ile onaylandı.

### 3.2.2. Çalışma Planı

Çalışmamızda kullanılan 64 adet denekte, deneklerin sağ angulus mandibulasının dış yüzeyinde 2x2x1mm ölçülerinde defekt alanı açılmıştır. Toplam 64 adet deney alanı oluşturulmuştur. Bu deney alanları; kullanılan ilaçlar, kontrol grupları ve farklı inceleme günleri (7.gün, 21.gün) 'ne göre toplam 8 gruba ayrılmıştır.

### 3.2.3. Çalışma Grupları

#### 3.2.3.1. Kontrol Grubu

Defekt oluşturularak alan herhangi bir işlem uygulanmadan kapatıldı.

I. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 7 gün süre ile 5ml/kg i.p. %0.9 NaCl izotonik uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

II. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 21 gün süre ile 5ml/kg i.p. %0.9 NaCl izotonik uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

#### 3.2.3.2. Deney Grubu

I. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 7 gün süre ile 5mgr/kg i.p. diklofenak sodyum (voltaren) uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

II. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 21 gün süre ile 5mgr/kg i.p. diklofenak sodyum (voltaren) uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

III. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 7 gün süre ile 200 mgr/kg i.p. C vitamini uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

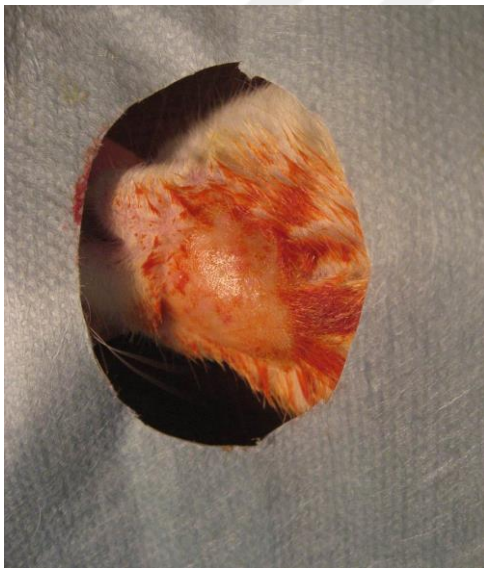
IV. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 21 gün süre ile 200 mgr/kg i.p. C vitamini uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

V. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 7 gün süre ile 5mgr/kg İ.P. diklofenak sodyum (voltaren) ve 200 mgr/kg İ.P. C vitamini uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

VI. Grup: Defekt oluşturularak alan kapatıldı. İşlemden itibaren 21 gün süre ile 5mgr/kg İ.P. diklofenak sodyum (voltaren) ve 200 mgr/kg İ.P. C vitamini uygulandı ve sakrifikasyon gerçekleştirildi.

### 3.2.4. Cerrahi Yöntem

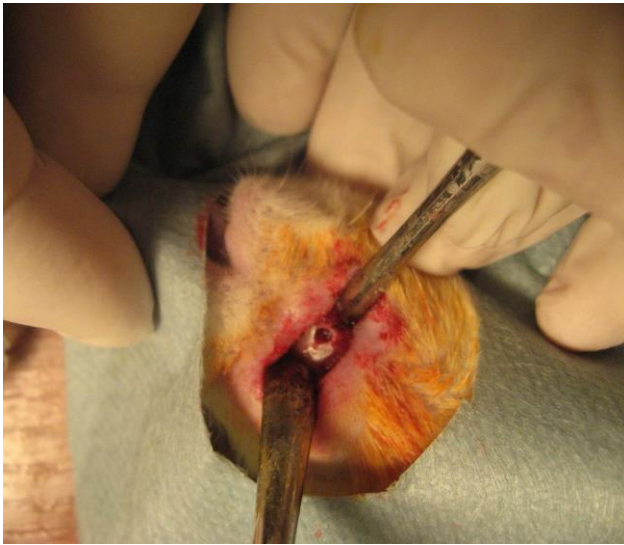
Deney hayvanlarına veteriner hekimin denetiminde anestezi olarak 100mg/kg dozajında ketamin ve hem analjezik hem de anestezi etkili 10mg/kg ksilazin intraperitoneal enjekte edilerek anestezi sağlanmıştır. Hayvanlar deney tablasında standart postüre getirilmiştir. Sıçanların sağ angulus mandibulasının dış yüzeyi traşlanıp iyod solüsyonu ile dezenfekte edilmiştir.



**Şekil 3.1: Deneklerin traşlanarak alt çene sağ angulus bölgesinin antiseptik solüsyonla silinip hazırlanması**

Lokal anestezi ve kanama kontrolü yapmak için operasyon esnasında Lidokain (2mg/kg) uygulanarak lokal anestezi oluşturulmuştur. Deneklerin angulus mandibulasının distal yüzeyine ulaşmak için 10-15 mm boyutta uzunlamasına öncelikle cilt, daha sonra cilt altı ve en son periost kesileri yapılmıştır. Künt diseksiyonla angulus mandibulanın dış yüzeyi

açığa çıkartılıp yumuşak dokular ekarte edilmiştir. İşlem esnasında çevre yumuşak dokulara frezin zarar vermesini engellemek için mandibulanın lingual yüzeyine periost elevatörü yerleştirilmiştir. Piyasemene paslanmaz çelik rond frez (2 mm çaplı) takılmıştır. Çalışılan alan steril serum fizyolojik solüsyonu (izotonik NaCl) ile irige edilerek kemiğin korteks ve medulla tabakalarını içine alan 2 mm uzunluğunda ve 2 mm genişliğinde kemik defektleri oluşturulmuştur. Oluşturulan dairesel kemik defektleri çevre dokulara zarar vermeden hazırlanmıştır. 2 dakika boyunca steril tamponla kompres yapılarak beklendikten sonra cilt 4/0 ipek dikişler ile kapatılmıştır. Deney hayvanları ikişerli gruplar halinde metal kafeslerde uyanma odasına alınmıştır.



**Şekil 3.2: İnsizyon sonrası yumuşak dokuların disseksiyonu ve angulusun açığa çıkartılması ve defekt oluşturulması**

**Şekil 3.3: Defekt oluşturma işlemi sonrası yaranın dikişle kapatılması**



Cerrahi işlemlerden sonra 7. Ve 21. günlerde yüksek doz ketamin verilerek deneklerde fetal etki görüldükten sonra kontrol ve deney gruplarının sakrifikasyon işlemleri tamamlanmıştır. Sıçanların alt çene sağ angulus bölgeleri çıkarılarak histopatolojik değerlendirmeler için %10'luk formaldehite konulmuştur. Ayrıca biyokimyasal değerlendirmeler için sakrifikasyon sırasında tüm sıçanlardan intrakardiak olarak kan alınmıştır. Kandan elde edilen plazmalar -80° C'de analiz gününe kadar saklanmıştır. Bu plazma örneklerinde aktif oksijen türleri (ROS) tayini, malondialdehit (MDA) düzeylerinin tayini, proteink (PK) düzeyleri tayini, serum total -SH düzeylerinin tayini, total antioksidan aktivite tayini, TGF- $\beta$ 1, osteokalsin ve alkali fosfataz ölçümü yapılmıştır.

### 3.3. Biyokimyasal Analizler

Aktif oksijen türleri (ROS) tayini: Bu metod 2,7-diklorodihidrofloresin diasetat (DCFH-DA)'ın doku esterazları ile 2,7-diklorodihidrofloresin (DCFH)'e dönüşmesi ve oluşan ürünün ortamdaki ROS tarafından floresans veren 2,7-diklorofloresin (DCF)'e oksitlenmesine dayanır. Plazma örneklerinin DCFH-DA ile inkube edildikten sonra floresans 538 nm'de "mikroplate"lerde okundu. Sonuçlar rölatif floresan ünite (RFU) olarak verildi (165).

Malondialdehit (MDA) seviyelerinin tayini: Lipit peroksidasyonu son ürünlerinden olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile yarattığı kompleks spektrofotometrik olarak 535 nm'de absorbansı okunarak ölçüldü. Örneklerin MDA konsantrasyonunu hesaplamak için MDA'nın ekstinsiyon katsayısı ( $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) kullanıldı. MDA konsantrasyonları nmol MDA/ml plazma (nmol/ml) olarak ifade edildi (15).

Protein kabonil (PK) düzeyleri tayini: Oksidatif protein hasarı göstergesi olan PK gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile protein hidrazonlar oluşturmaya dayanan spektrofotometrik yöntemle tayin edildi. Serum örneklerinin DNPH ve triklorasetik asit ayıraçlarının karıştırılmasıyla oluşan çökelti halindeki hidrazonlar guanidin-HCl ile çözüldü ve 360 nm'de spektrofotometrede okundu. Sonuçlar PC'nin ekstinsiyon katsayısı ( $\epsilon=22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) uygulanarak hesaplandı ve nmol PC/mg protein şeklinde verildi. Tüplerdeki protein

konsantrasyonları ise ultraviyole spektrofotometrede absorbanslar 280 nm’de okunarak belirlendi (130).

Serum total -SH düzeylerinin tayini: Ellman ayıracının (5,5-dithiobis 2-nitrobenzoat, DTNB) serumda sülfidril (-SH) grupları aracılığıyla redükte olması ile, 1 mol –SH’den 1 mol 2-nitro-5 tiyobenzoik asit meydana gelmektedir. Oluşan renkli ürün 412 nm’de spektrofotometrede ölçüldü. Sonuçlar ekstinsiyon katsayısı ( $\epsilon = 13.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) ve standart uygulanarak hesaplandı. Sonuçlar ( $\mu\text{mol/mL}$ ) olarak ifade edildi (138).

Total antioksidan aktivite tayini: FRAP antioksidanların indirgeyici özelliklerine dayanan bir metoddur. Düşük pH’da, ferrik-tripirydyltriazin ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) kompleksi antioksidanlar tarafından indirgenerek mavi renkli ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) haline gelir. Oluşan mavi rengin absorbansı 593 nm dalga boyunda okunur. Absorbans değişikliği ve serumda bulunan elektron verici antioksidanlar arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. 500 $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  çözeltisi standart olarak kullanıldı. Örneklerin FRAP aktivitesi ( $\mu\text{mol/L}$ ) olarak ifade edildi (14).

TGF- $\beta$ 1, Nitrik oksit, osteokalsin, alkali fosfataz ve CTX ölçümü için Abbkine ELISA kitleri kullanıldı. Kitlerin çalışma aralığı ve duyarlılığı sırasıyla TGF- $\beta$ 1 (15.6- 1000 ve 8 pg/mL), nitrik oksit (2.5- 40 ve <0.1  $\mu\text{mol/L}$ ), osteokalsin (50- 800 ve <5 ng/L), alkali fosfataz (15-240 ve <1 ng/L) ve CTX (10-160 ve <1 nmol/L)’dir (169).

### 3.4. Histopatolojik Değerlendirme

Gönderilen materyal %10 luk tamponlanmış formalinde 1 hafta fikse edildi. Fiksasyonun arkasından, 1’er ölçek %20’lik sodyum sitrat ve %50’lik formik asit çözeltileri ile bir solüsyon hazırlandı. Tüm materyal bu solüsyonda dekalsifiye edildi. Dekalsifiye parçaların rutin doku takibinden geçirilmesinin ardından, parafin bloklardan 5-7 mikron kalınlığında kesitler çıkarıldı ve hematoksilin-eozin methoduyla boyanıp ışık mikroskopunda incelendi.

Kesitler iltihap, nekroz, fibrozis, iyileşme ve yeni kemik yapımı kriter alınarak incelendi. Bu bulgulara bir büyük büyütme alanında kapladıkları bölgenin yüzdesine göre %1-30 (+), %30-60 (++) ve <%60 (+++) olmak üzere değer verildi. Yüzde alanları 10/100 lük kamaralı objektifle ölçülüp 5 büyük büyütme alanının ortalaması alınarak saptandı.

Histolojik değerlendirmelerde iltihap, nekroz, fibrosis, iyileşme ve yeni kemik oluşum skoru incelendi.

- İltihap: 0'dan 3'e kadar skorlandı. İltihap miktarı arttıkça, skor büyümektedir.
- Nekroz: 0: yok 1: var anlamı taşımaktadır.
- Fibrosis: 0'dan 3'e kadar skorlandı. Fibrosis miktarı arttıkça, skor büyümektedir.
- Kemik iyileşme skoru: 0'dan 6'ya kadar belirlenmiştir.

0: defekt iyileşmesi yok

1: tamamlanmamış kırıkta iyileşmesi

2: tamamlanmış kırıkta iyileşmesi

3: ilk safhasındaki tamamlanmamış kemik iyileşmesi

4: orta seviyedeki tamamlanmamış kemik iyileşmesi

5: geç seviyedeki tamamlanmamış kemik iyileşmesi 6: tamamlanmış kemik iyileşmesi.

### 3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen veriler değerlendirilirken, istatistiksel analizlerin yapılması için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Niceliksel verilerin karşılaştırılmasında çalışma parametreleri kesikli veri olduğundan nonparametrik testlerle çalışılmış ve parametrelerin gruplar arası kıyaslamalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa

neden çıkan grubun tespit edilmesinde Dunn's testi kullanıldı. 7.gün ve 21. gün kıyaslamalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin kıyaslanmasında ise Fisher's Exact Ki-Kare testi ve Fisher Freeman Halton Exact testi kullanıldı. Anlamlılık  $p<0.05$  seviyesinde değerlendirildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

**Tablo 4-1: Biyokimyasal parametrelerin 7. gün sonuçlarının gruplar arası değerlendirilmesi**

|              | <b>Kontrol</b> | <b>C Vit</b>  | <b>Voltaren</b> | <b>C vit+Voltaren</b> |          |
|--------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------------|----------|
| <b>7.gün</b> | <b>Ort±SS</b>  | <b>Ort±SS</b> | <b>Ort±SS</b>   | <b>Ort±SS</b>         | <b>p</b> |
| TİOL         | 193,12±26,04   | 221,51±42,98  | 183,19±22,46    | 255,05±63,32          | 0,021*   |
| MDA          | 8,19±0,59      | 8,49±0,58     | 9,27±2,51       | 7,7±1,25              | 0,452    |
| FRAP         | 273,81±67,41   | 293,2±58,82   | 282,45±75,71    | 321,47±64,87          | 0,725    |
| ROS          | 233,33±22,5    | 179,28±48,07  | 286,8±46,91     | 183,84±35,34          | 0,001*   |
| PK           | 0,9±0,68       | 0,84±0,24     | 1,01±0,43       | 0,52±0,32             | 0,159    |
| ALP          | 32,79±6,44     | 40±11,31      | 52,11±22,67     | 44,73±6,45            | 0,007*   |
| Osteokalsin  | 122,21±10,29   | 126,66±8,34   | 139±15,18       | 130,39±8,34           | 0,060    |
| TGF-β        | 474,35±71,72   | 718,5±80,71   | 636,15±168,67   | 696,13±262,18         | 0,006*   |

Kruskal Wallis Test

\*p<0.05

Gruplar arasında 7. gün tiol seviyeleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (p= 0.021). Anlamlılığın kaynağının tespiti adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini+Voltaren grubunun 7.gün tiol düzeyi, Voltaren grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (p= 0.025). C vitamini+Voltaren grubunun 7. gün Tiol (μmol) ortalamaları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p= 0.025).

Gruplar arasında 7.gün ROS seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p= 0.000). Voltaren grubunun 7.gün ROS düzeyi, C vitamini ve C vitamini+Voltaren gruplarından anlamlı şekilde yüksektir (p1:0.001; p2:0.001). C vitamini grubunun 7. gün ROS (μmol) ortalamaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde düşük bulunmuştur (p<0.05). C vitamini ve Voltaren grubunun 7. gün ROS (RFU) ortalamaları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşüktür (p<0.05).

Gruplar arasında 7.gün TGF-  $\beta$  seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0.006$ ). Kontrol grubunun 7.gün TGF-  $\beta$  düzeyi, C vitamini ve C vit+Voltaren gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ( $p_1:0.007$ ;  $p_2:0.032$ ). Anlamlılığın kaynağının tespit edilmesi sebebi ile yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamin+Voltaren grubunun 7. gün TGF-  $\beta$  (pg) ortalamaları Voltaren grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4-2: Biyokimyasal parametrelerin 21. gün sonuçlarının gruplar arası değerlendirilmesi**

|              | Kontrol             | C Vit               | Voltaren           | C vit+Voltaren      |        |
|--------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------|
| 21.gün       | Ort $\pm$ SS        | Ort $\pm$ SS        | Ort $\pm$ SS       | Ort $\pm$ SS        | p      |
| TİOL         | 193,39 $\pm$ 24,05  | 237,59 $\pm$ 79,7   | 193,85 $\pm$ 19,22 | 277,75 $\pm$ 71,41  | 0,012* |
| MDA          | 8,13 $\pm$ 0,65     | 7,89 $\pm$ 1,63     | 10,14 $\pm$ 4,3    | 6,96 $\pm$ 0,53     | 0,025* |
| FRAP         | 229,3 $\pm$ 48,83   | 305,82 $\pm$ 92,65  | 283,15 $\pm$ 60,58 | 392,49 $\pm$ 137,85 | 0,028* |
| ROS          | 271,29 $\pm$ 75,08  | 187,14 $\pm$ 29,95  | 300,06 $\pm$ 38,01 | 160,88 $\pm$ 38,23  | 0,001* |
| PK           | 0,91 $\pm$ 0,69     | 0,77 $\pm$ 0,55     | 1,75 $\pm$ 1,2     | 0,46 $\pm$ 0,35     | 0,027* |
| ALP          | 37,26 $\pm$ 6,81    | 37,14 $\pm$ 3,86    | 41,49 $\pm$ 3,91   | 53,69 $\pm$ 6,09    | 0,001* |
| Osteokalsin  | 134,02 $\pm$ 21,05  | 144,6 $\pm$ 10,39   | 127,28 $\pm$ 10,3  | 142,34 $\pm$ 7,48   | 0,039* |
| TGF- $\beta$ | 497,25 $\pm$ 130,35 | 718,75 $\pm$ 161,46 | 601,5 $\pm$ 106,97 | 807,57 $\pm$ 156,07 | 0,004* |

Kruskal Wallis Test

\* $p<0.05$

Gruplar arasında 21. gün tiol düzeylerinin değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0.012$ ). Anlamlılığı tespit eden Dunn's test sonucuna göre; C vitamini+Voltaren grubunun 21. gün tiol düzeyi, Kontrol ve Voltaren gruplarına kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p_1:0.037$ ;  $p_2:0.039$ ). C vitamini grubunun 21. gün Tiol ( $\mu$ mol) ortalamaları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksektir ( $p<0,05$ ).

Gruplar arasında 21. gün MDA düzeyleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ( $p= 0.025$ ). Voltaren grubunun 21. gün MDA düzeyi, C vitamini+Voltaren grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p= 0.020$ ). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti için yapılan Dunn's test sonucunda; C

vitamin+Voltaren grubunun 21. gün MDA (nmol) ortalamaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük bulunmuştur.

Gruplar arasında 21. gün FRAP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0.028$ ). C vit+Voltaren grubunun 21. gün FRAP düzeyi, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p= 0.018$ ). Anlamlılığın kaynaklandığı grubun tespiti adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini grubunun 21. gün FRAP ( $\mu\text{mol}$ ) ortalamaları kontrol grubun ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ( $p<0,05$ ).

Gruplar arasında 21. gün ROS seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0.001$ ). Voltaren grubunun 21. gün ROS düzeyi, C vitamini ve C vitamini+Voltaren gruplarına göre anlamlı şekilde yüksektir ( $p_1:0.010$ ;  $p_2:0.000$ ). Kontrol grubunun 21. gün ROS düzeyi, C vitamini+Voltaren grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p= 0.010$ ). Anlamlılığın kaynaklandığı grubun tespiti adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini ve C vitamini+Voltaren grubunun 21. gün ROS (RFU) ortalamaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşüktür ( $p<0,05$ ).

Gruplar arasında 21. gün PK seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0.027$ ). Voltaren grubunun 21. gün PK düzeyi, C vitamini+Voltaren grubundan anlamlı bir şekilde yüksektir ( $p= 0.016$ ).

Gruplar arasında 21. gün ALP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p= 0.001$ ). C vitamini+Voltaren grubunun 21. gün ALP düzeyi, Kontrol ve C vitamini gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ( $p_1:0.001$ ;  $p_2:0.004$ ).

Anlamlılığın kaynağının tespiti adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini ve Voltaren grubunun 21. gün ALP ortalamaları Voltaren grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksektir ( $p<0,05$ ).

Gruplar arasında 21. gün osteokalsin seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ( $p= 0.039$ ). Voltaren grubunun 21. gün osteokalsin düzeyi, C vitamini ve C vitamini+Voltaren gruplarına kıyasla anlamlı şekilde düşüktür ( $p_1:0.010$ ;  $p_2:0.017$ ).

Gruplar arasında 21. gün TGF- $\beta$  seviyeleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı farklılık yoktur ( $p= 0.004$ ). C vit+Voltaren grubunun 21. gün TGF- $\beta$  düzeyi, Kontrol grubuna

göre anlamlı şekilde yüksektir ( $p= 0.004$ ). Anlamlılığın kaynağının tespiti adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini grubunun 21. gün TGF- $\beta$  ortalamaları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir ( $p<0,05$ ). C vitamini ve Voltaren grubunun 21. gün TGF- $\beta$  ortalamaları Voltaren grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ( $p<0,05$ ).

**Tablo 4-3: Kontrol grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi**

|               | 7.gün              | 21.gün              |       |
|---------------|--------------------|---------------------|-------|
| Kontrol Grubu | Ort $\pm$ SS       | Ort $\pm$ SS        | p     |
| TİOL          | 193,12 $\pm$ 26,04 | 193,39 $\pm$ 24,05  | 0,793 |
| MDA           | 8,19 $\pm$ 0,59    | 8,13 $\pm$ 0,65     | 0,846 |
| FRAP          | 273,81 $\pm$ 67,41 | 229,3 $\pm$ 48,83   | 0,227 |
| ROS           | 233,33 $\pm$ 22,5  | 271,29 $\pm$ 75,08  | 0,248 |
| PK            | 0,9 $\pm$ 0,68     | 0,91 $\pm$ 0,69     | 1,000 |
| ALP           | 32,79 $\pm$ 6,44   | 37,26 $\pm$ 6,81    | 0,141 |
| Osteokalsin   | 122,21 $\pm$ 10,29 | 134,02 $\pm$ 21,05  | 0,126 |
| TGF- $\beta$  | 474,35 $\pm$ 71,72 | 497,25 $\pm$ 130,35 | 0,753 |

Mann Whitney U Test

**Tablo 4-4: C vitamini grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi**

|                  | 7.gün              | 21.gün              |        |
|------------------|--------------------|---------------------|--------|
| C vitamini Grubu | Ort $\pm$ SS       | Ort $\pm$ SS        | p      |
| TİOL             | 221,51 $\pm$ 42,98 | 237,59 $\pm$ 79,7   | 0,753  |
| MDA              | 8,49 $\pm$ 0,58    | 7,89 $\pm$ 1,63     | 0,063  |
| FRAP             | 293,2 $\pm$ 58,82  | 305,82 $\pm$ 92,65  | 0,916  |
| ROS              | 179,28 $\pm$ 48,07 | 187,14 $\pm$ 29,95  | 0,674  |
| PK               | 0,84 $\pm$ 0,24    | 0,77 $\pm$ 0,55     | 0,345  |
| ALP              | 40 $\pm$ 11,31     | 37,14 $\pm$ 3,86    | 0,834  |
| Osteokalsin      | 126,66 $\pm$ 8,34  | 144,6 $\pm$ 10,39   | 0,005* |
| TGF- $\beta$     | 718,5 $\pm$ 80,71  | 718,75 $\pm$ 161,46 | 0,753  |

Mann Whitney U Test

\* $p<0.05$

**Tablo 4-5: Voltaren grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi**

|                       | 7.gün         | 21.gün        |          |
|-----------------------|---------------|---------------|----------|
| <b>Voltaren Grubu</b> | <b>Ort±SS</b> | <b>Ort±SS</b> | <b>p</b> |
| TİOL                  | 183,19±22,46  | 193,85±19,22  | 0,492    |
| MDA                   | 9,27±2,51     | 10,14±4,3     | 0,674    |
| FRAP                  | 282,45±75,71  | 283,15±60,58  | 0,875    |
| ROS                   | 286,8±46,91   | 300,06±38,01  | 0,817    |
| PK                    | 1,01±0,43     | 1,75±1,2      | 0,294    |
| ALP                   | 52,11±22,67   | 41,49±3,91    | 0,208    |
| Osteokalsin           | 139±15,18     | 127,28±10,3   | 0,139    |
| TGF-β                 | 636,15±168,67 | 601,5±106,97  | 0,600    |

Mann Whitney U Test

**Tablo 4-6: C vitamini grubunun biyokimyasal sonuçlarının değerlendirilmesi**

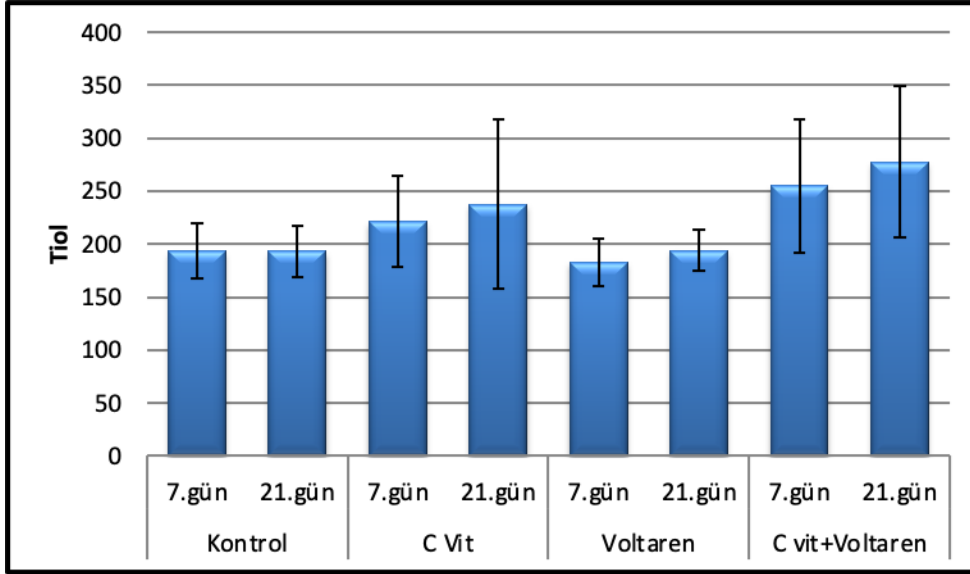
|                       | 7.gün         | 21.gün        |          |
|-----------------------|---------------|---------------|----------|
| <b>C vit+Voltaren</b> | <b>Ort±SS</b> | <b>Ort±SS</b> | <b>p</b> |
| TİOL                  | 255,05±63,32  | 277,75±71,41  | 0,529    |
| MDA                   | 7,7±1,25      | 6,96±0,53     | 0,316    |
| FRAP                  | 321,47±64,87  | 392,49±137,85 | 0,430    |
| ROS                   | 183,84±35,34  | 160,88±38,23  | 0,115    |
| PK                    | 0,52±0,32     | 0,46±0,35     | 0,834    |
| ALP                   | 44,73±6,45    | 53,69±6,09    | 0,021*   |
| Osteokalsin           | 130,39±8,34   | 142,34±7,48   | 0,011*   |
| TGF-β                 | 696,13±262,18 | 807,57±156,07 | 0,401    |

Mann Whitney U Test

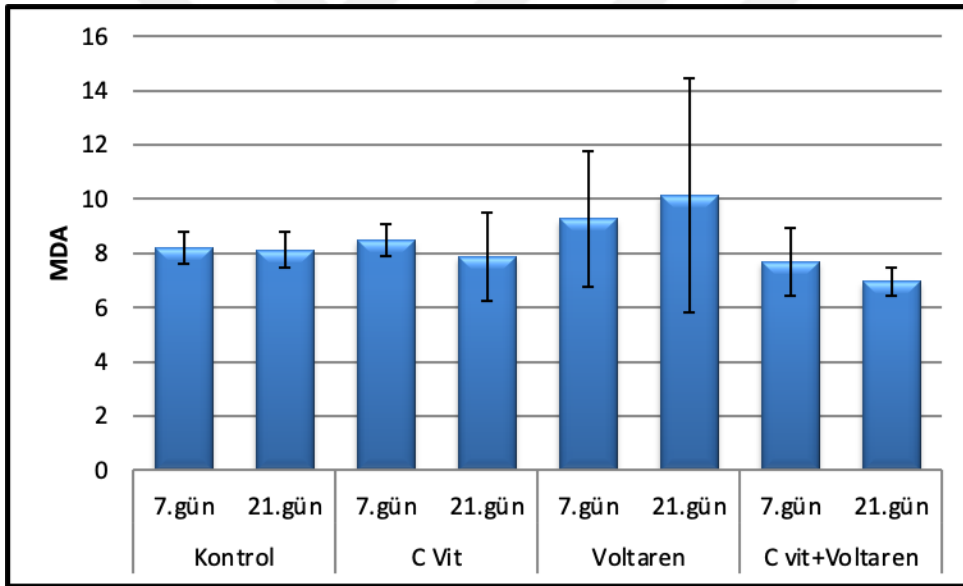
\*p<0.05

**Tablo 4-7: Grupların bir arada gösterimi**

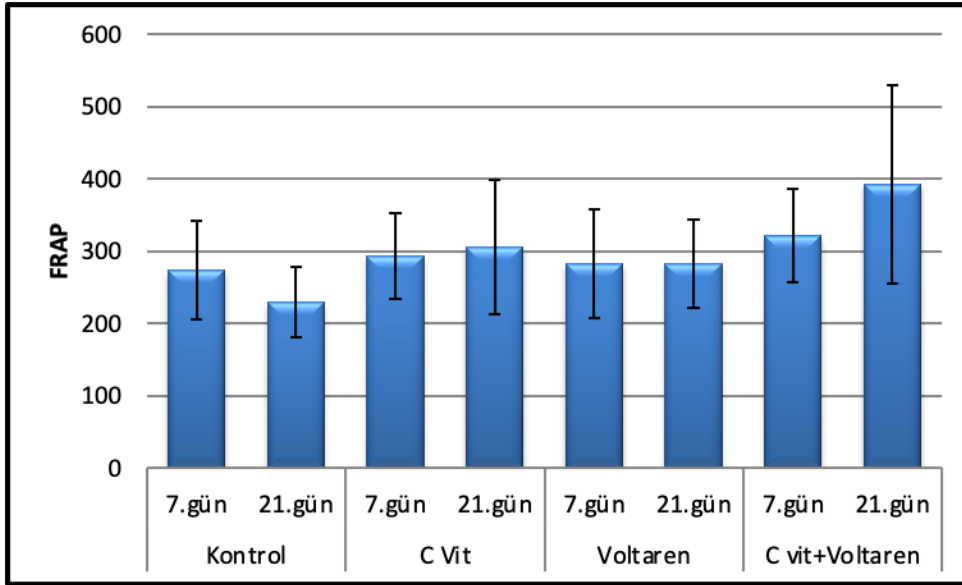
|                     | <b>Kontrol</b>   |                   | <b>C Vit</b>     |                   | <b>Voltaren</b>   |                  | <b>C vit+Voltaren</b> |                   |
|---------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------------|-------------------|
|                     | <b>7.gün</b>     | <b>21.gün</b>     | <b>7.gün</b>     | <b>21.gün</b>     | <b>7.gün</b>      | <b>21.gün</b>    | <b>7.gün</b>          | <b>21.gün</b>     |
| TiO<br>L            | 193,12±<br>26,04 | 193,39±<br>24,05  | 221,51±<br>42,98 | 237,59±<br>79,7   | 183,19±<br>22,46  | 193,85±<br>19,22 | 255,05±<br>63,32      | 277,75±<br>71,41  |
| MD<br>A             | 8,19±0,5<br>9    | 8,13±0,6<br>5     | 8,49±0,5<br>8    | 7,89±1,6<br>3     | 9,27±2,5<br>1     | 10,14±4,<br>3    | 7,7±1,25              | 6,96±0,5<br>3     |
| FRA<br>P            | 273,81±<br>67,41 | 229,3±4<br>8,83   | 293,2±5<br>8,82  | 305,82±<br>92,65  | 282,45±<br>75,71  | 283,15±<br>60,58 | 321,47±<br>64,87      | 392,49±<br>137,85 |
| ROS                 | 233,33±<br>22,5  | 271,29±<br>75,08  | 179,28±<br>48,07 | 187,14±<br>29,95  | 286,8±4<br>6,91   | 300,06±<br>38,01 | 183,84±<br>35,34      | 160,88±<br>38,23  |
| PK                  | 0,9±0,68<br>9    | 0,91±0,6<br>9     | 0,84±0,2<br>4    | 0,77±0,5<br>5     | 1,01±0,4<br>3     | 1,75±1,2         | 0,52±0,3<br>2         | 0,46±0,3<br>5     |
| ALP                 | 32,79±6,<br>44   | 37,26±6,<br>81    | 40±11,3<br>1     | 37,14±3,<br>86    | 52,11±2<br>2,67   | 41,49±3,<br>91   | 44,73±6,<br>45        | 53,69±6,<br>09    |
| Oste<br>okals<br>in | 122,21±<br>10,29 | 134,02±<br>21,05  | 126,66±<br>8,34  | 144,6±1<br>0,39   | 139±15,<br>18     | 127,28±<br>10,3  | 130,39±<br>8,34       | 142,34±<br>7,48   |
| TGF<br>- β          | 474,35±<br>71,72 | 497,25±<br>130,35 | 718,5±8<br>0,71  | 718,75±<br>161,46 | 636,15±<br>168,67 | 601,5±1<br>06,97 | 696,13±<br>262,18     | 807,57±<br>156,07 |



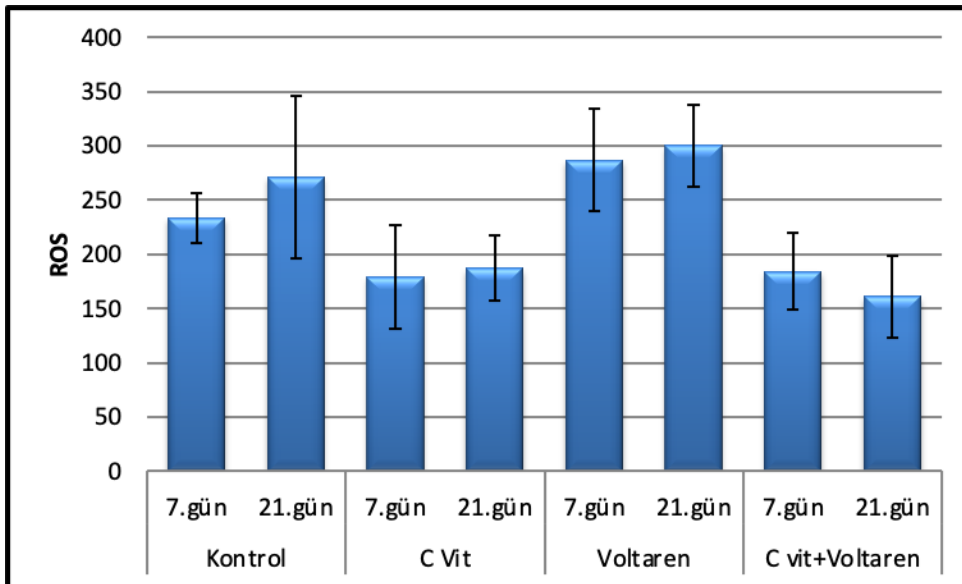
Şekil 4-1: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki tiol seviyeleri



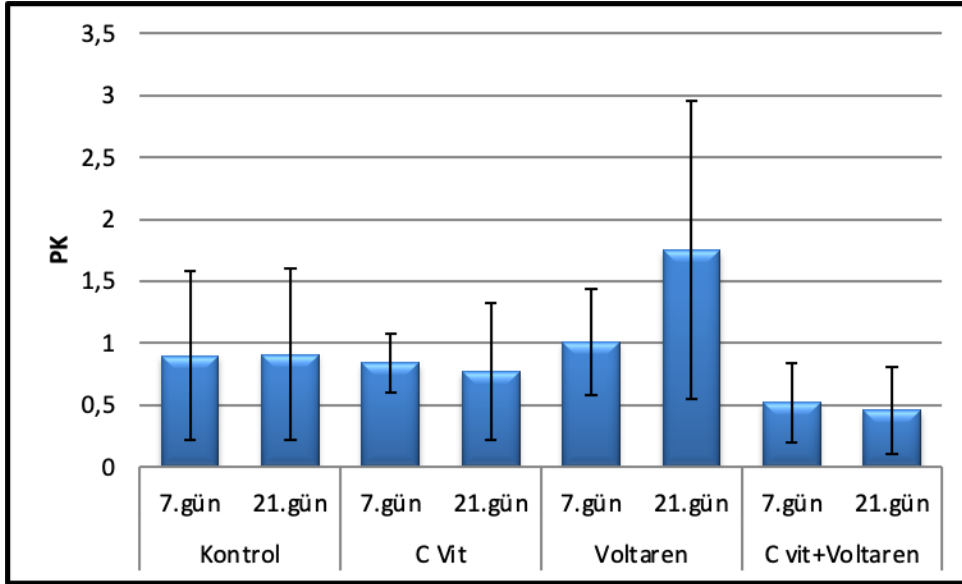
Şekil 4-2: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki MDA seviyeleri



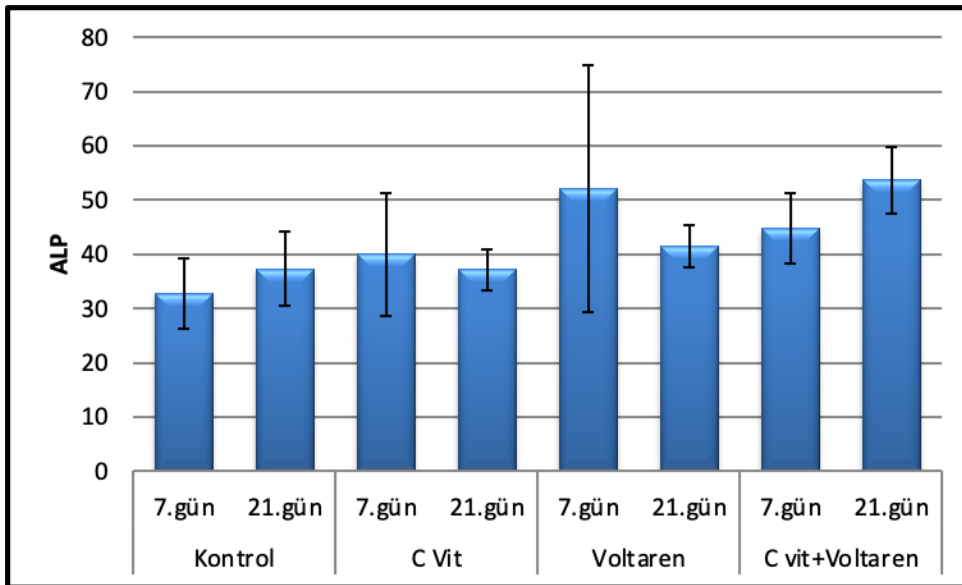
Şekil 4-3: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki FRAP seviyeleri



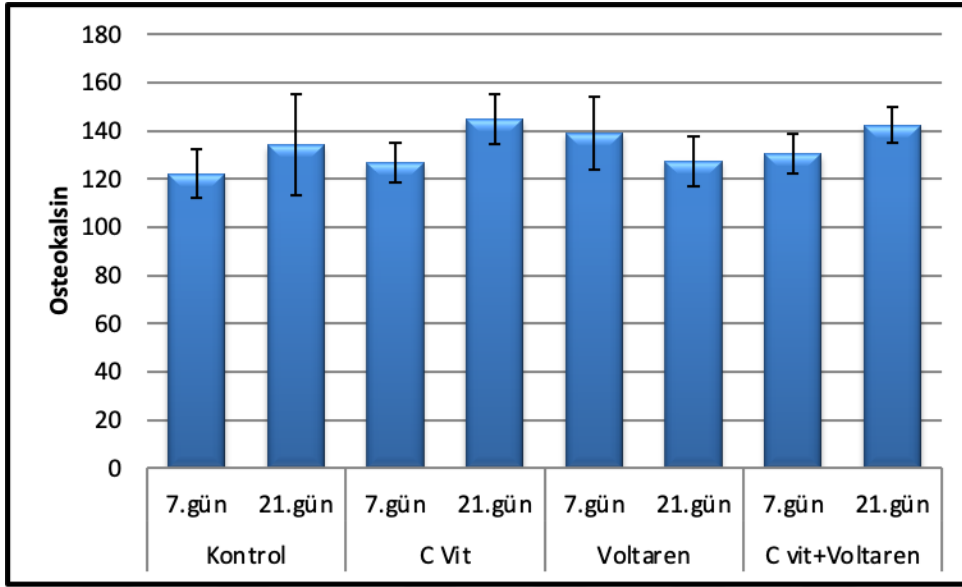
Şekil 4-4: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki ROS seviyeleri



Şekil 4-5: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki PK seviyeleri



Şekil 4-6: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki ALP aktiviteleri



**Tablo 4-7: Tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki osteokalsin seviyeleri**

#### 4.2. Histopatolojik Bulgular

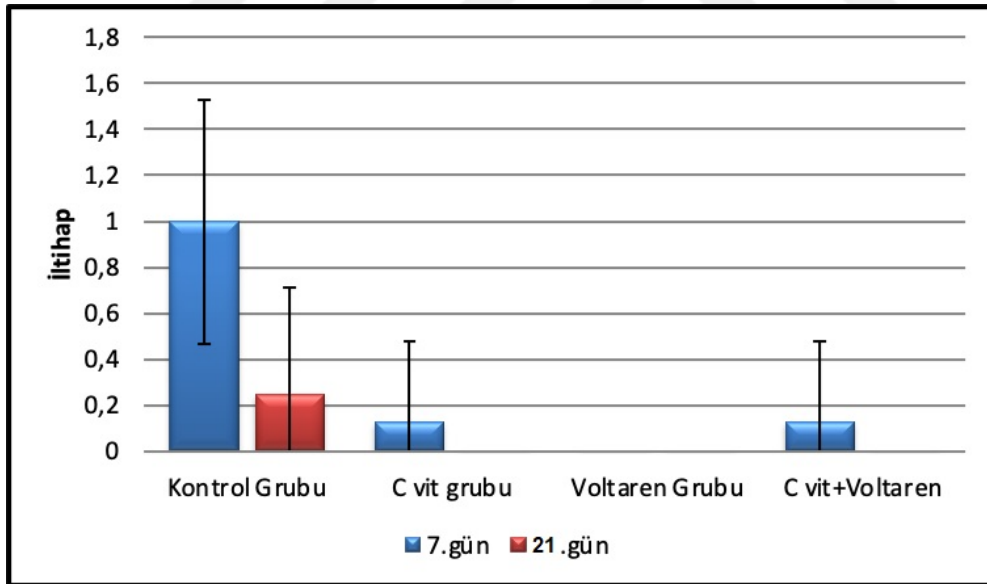
**Tablo 4-8: İltihap düzeylerine ilişkin değerlendirmeler**

|                | Kontrol Grubu |               | C vit grubu |              | Voltaren Grubu |              | C vit+Voltaren |              |                |
|----------------|---------------|---------------|-------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|
| İltihap        | Min-Max       | Ort±SS        | Min-Max     | Ort±SS       | Min-Max        | Ort±SS       | Min-Max        | Ort±SS       | <sup>1</sup> p |
| 7.gün          | 0-2           | 1±0,53        | 0-1         | 0,13±0,35    | 0-0            | 0±0          | 0-1            | 0,13±0,35    | <b>0,001*</b>  |
| 21.gün         | 0-1           | 0,25±0,46     | 0-0         | 0±0          | 0-0            | 0±0 (0)      | 0-0            | 0±0 (0)      | <b>0,102</b>   |
| <sup>2</sup> p |               | <b>0,013*</b> |             | <b>0,317</b> |                | <b>1,000</b> |                | <b>0,317</b> |                |

<sup>1</sup>Kruskal Wallis test

<sup>2</sup>Mann Whitney U Test

\*p<0.05



**Şekil 4-8: İltihabın tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki değerlendirmesi**

Gruplar arasında 7. gün iltihap düzeyleri açısından istatistiksel bir anlamlı farklılığa rastlanmamıştır (p= 0.001). Anlamlılığın kaynaklandığı grubun tespit edilmesi için yapılan Dunn's test sonucunda; Kontrol grubunun 7. gün iltihap düzeyi, C vitamini, Voltaren ve C vitamini+Voltaren gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p<sub>1</sub>:0.000; p<sub>2</sub>:0.000; p<sub>3</sub>:0.000).

Gruplar arasında 21. gün iltihap düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

**Kontrol grubunda;** 7. gün iltihap düzeyine göre 21. günde görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.013$ ).

**C vitamini+Voltaren grubunda;** 7. gün iltihap düzeyine göre 21. günde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ).

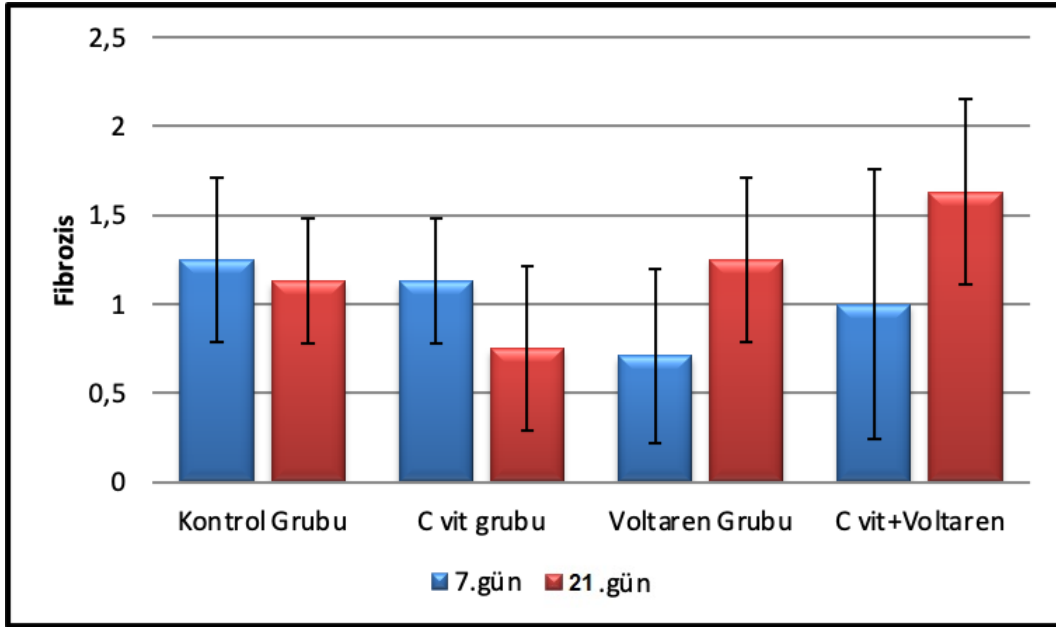
**Tablo 4-9: Fibrozis düzeylerine ilişkin değerlendirmeler**

|                      | <b>Kontrol Grubu</b> |                    | <b>C vit grubu</b>  |                    | <b>Voltaren Grubu</b> |               | <b>C vit+Voltaren</b> |               |                          |
|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|--------------------------|
| <b>Fibrozis</b>      | <b>Min-<br/>Max</b>  | <b>Ort±<br/>SS</b> | <b>Min-<br/>Max</b> | <b>Ort±S<br/>S</b> | <b>Min-<br/>Max</b>   | <b>Ort±SS</b> | <b>Min-<br/>Max</b>   | <b>Ort±SS</b> | <b><sup>1</sup>p</b>     |
| <b>7.gün</b>         | 1-2                  | 1,25±<br>0,46      | 1-2                 | 1,13±0<br>,35      | 0-1                   | 0,71±0,49     | 0-2                   | 1±0,76        | <b>0,278</b>             |
| <b>21.gün</b>        | 1-2                  | 1,13±<br>0,35      | 0-1                 | 0,75±0<br>,46      | 1-2                   | 1,25±0,46     | 1-2                   | 1,63±0,5<br>2 | <b>0,013</b><br><b>*</b> |
| <b><sup>2</sup>p</b> |                      | <b>0,535</b>       |                     | <b>0,090</b>       |                       | <b>0,053</b>  |                       | <b>0,084</b>  |                          |

<sup>1</sup>Kruskal Wallis test

<sup>2</sup>Mann Whitney U Test

\* $p<0.05$



**Şekil 4-9: Fibrozisin tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki değerlendirmesi**

Gruplar arasında 21. gün fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel bir şekilde anlamlı farklılık vardır ( $p < 0.05$ ). Anlamlılığın kaynaklandığı grubun tespiti için yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini+Voltaren grubunun 21. gün fibrozis düzeyi, C vitamini grubundan anlamlı olarak yüksektir ( $p < 0.05$ ).

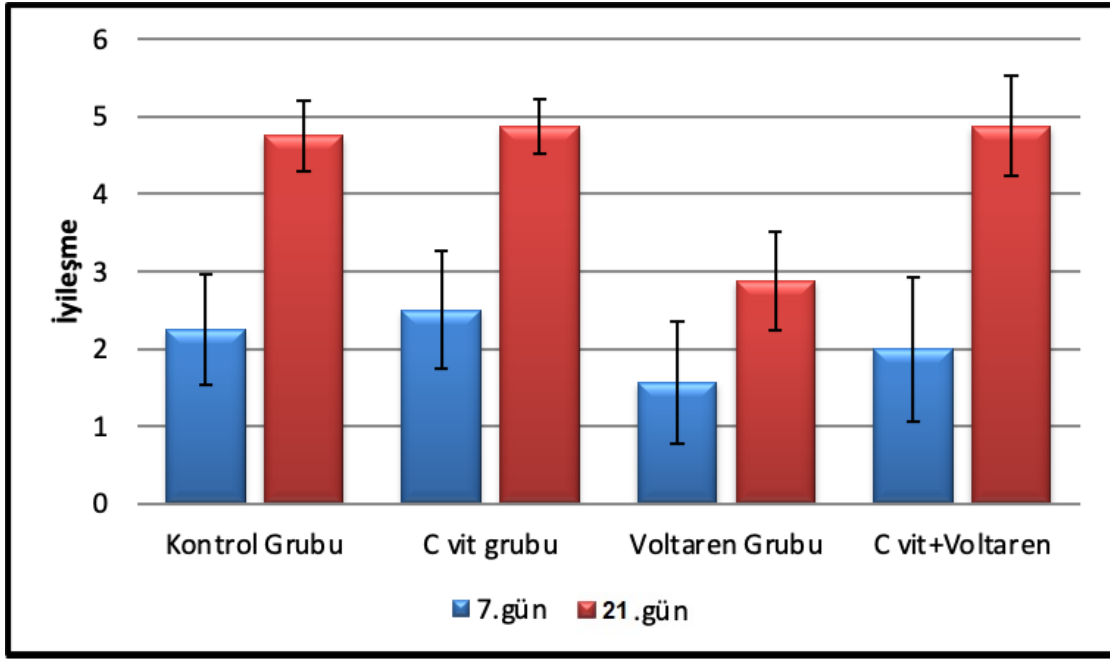
**Tablo 4-10: İyileşme düzeylerine ilişkin değerlendirmeler**

|                | Kontrol Grubu |               | C vit grubu |               | Voltaren Grubu |               | C vit+Voltaren |               |                |
|----------------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| İyileşme       | Min-<br>Max   | Ort±S<br>S    | Min-<br>Max | Ort±S<br>S    | Min-<br>Max    | Ort±SS        | Min-<br>Max    | Ort±SS        | <sup>1</sup> p |
| 7.gün          | 1-3           | 2,25±<br>0,71 | 1-3         | 2,5±<br>0,76  | 1-3            | 1,57±<br>0,79 | 1-3            | 2,0±<br>0,93  | <b>0,173</b>   |
| 21.gün         | 4-5           | 4,75±<br>0,46 | 4-5         | 4,88±<br>0,35 | 2-4            | 2,88±<br>0,64 | 4-6            | 4,88±<br>0,64 | <b>0,001*</b>  |
| <sup>2</sup> p |               | <b>0,001*</b> |             | <b>0,001*</b> |                | <b>0,009*</b> |                | <b>0,001*</b> |                |

<sup>1</sup>Kruskal Wallis test

<sup>2</sup>Mann Whitney U Test

\* $p < 0.05$



Şekil 4-10: İyileşmenin tüm deney gruplarında 7. ve 21. günlerdeki değerlendirmesi

Gruplar arasında 21. gün iyileşme düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ( $p= 0.001$ ). Anlamlılığın kaynaklandığı grubun tespiti adına yapılan Dunn's test sonucunda; Voltaren grubunun 21. gün iyileşme düzeyi, Kontrol, C vitamini, C vitamini+Voltaren gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

**Kontrol grubunda;** 7. gün iyileşme düzeyine göre 21. günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.001$ ).

**C vitamini grubunda;** 7. gün iyileşme düzeyine göre 21. günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.001$ ).

**Voltaren grubunda;** 7. gün iyileşme düzeyine göre 21. günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.001$ ).

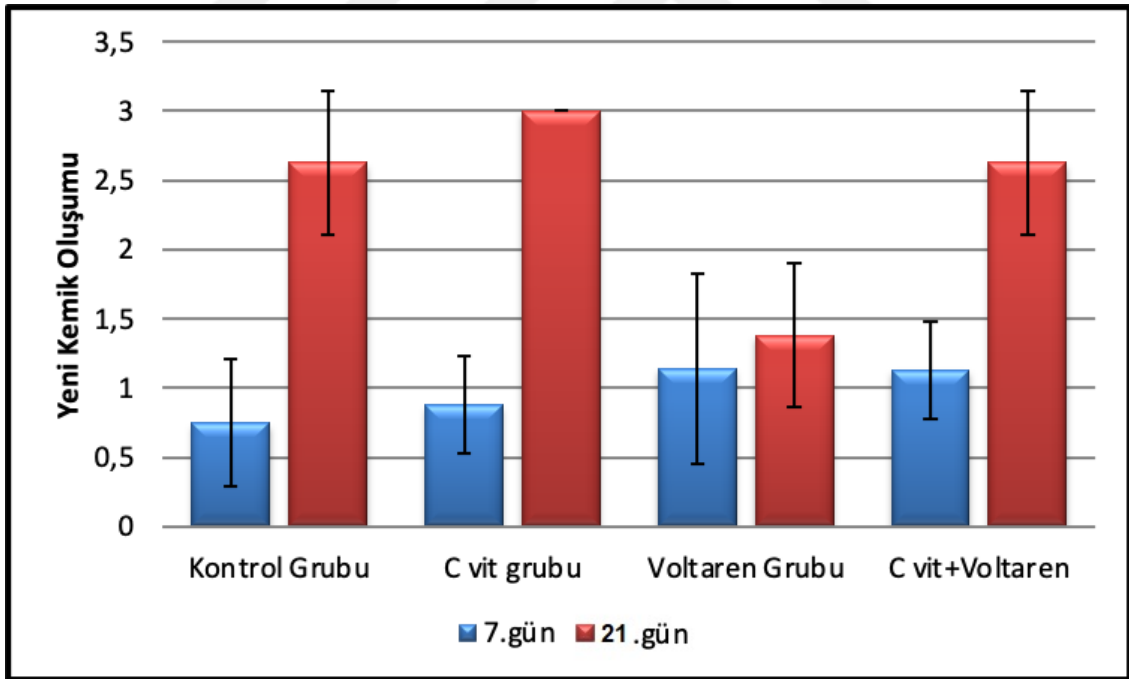
**C vitamini+Voltaren grubunda;** 7. gün iyileşme düzeyine göre 21. günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.001$ ).

Tablo 4-11: Yeni kemik oluşumu düzeylerine ilişkin değerlendirmeler

| Yeni Kemik Oluşumu | Kontrol Grubu |               | C vit grubu |               | Voltaren Grubu |              | C vit+Voltaren |               | <sup>1</sup> p |
|--------------------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
|                    | Min-Max       | Ort±SS        | Min-Max     | Ort±SS        | Min-Max        | Ort±SS       | Min-Max        | Ort±SS        |                |
| 7.gün              | 0-1           | 0,75±0,46     | 0-1         | 0,88±0,35     | 0-2            | 1,14±0,69    | 1-2            | 1,13±0,35     | <b>0,300</b>   |
| 21.gün             | 2-3           | 2,63±0,52     | 3-3         | 3,0±0         | 1-2            | 1,38±0,52    | 2-3            | 2,63±0,52     | <b>0,001*</b>  |
| <sup>2</sup> p     |               | <b>0,001*</b> |             | <b>0,001*</b> |                | <b>0,504</b> |                | <b>0,001*</b> |                |

<sup>1</sup>Kruskal Wallis test<sup>2</sup>Mann Whitney U Test

\*p&lt;0.05



Şekil 4-11: Yeni kemik oluşumunun tüm deney gruplarında 7. Ve 21. günlerdeki değerlendirilmesi

Gruplar arasında 21. gün yeni kemik oluşumu düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ( $p= 0.001$ ). Anlamlılığın kaynaklandığı grubun tespit edilmesi adına yapılan Dunn's test sonucunda; Voltaren grubunun 21. gün

yeni kemik oluşumu düzeyi, Kontrol, C vitamini, C vitamini+Voltaren gruplarından anlamlı bir şekilde düşüktür ( $p_1:0.013$ ;  $p_2:0.000$ ;  $p_3:0.013$ ).

**Kontrol grubunda;** 7. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 21. günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.001$ ).

**C vitamini grubunda;** 7. gün iyileşme düzeyine göre 21. günde gözlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p= 0.001$ ).

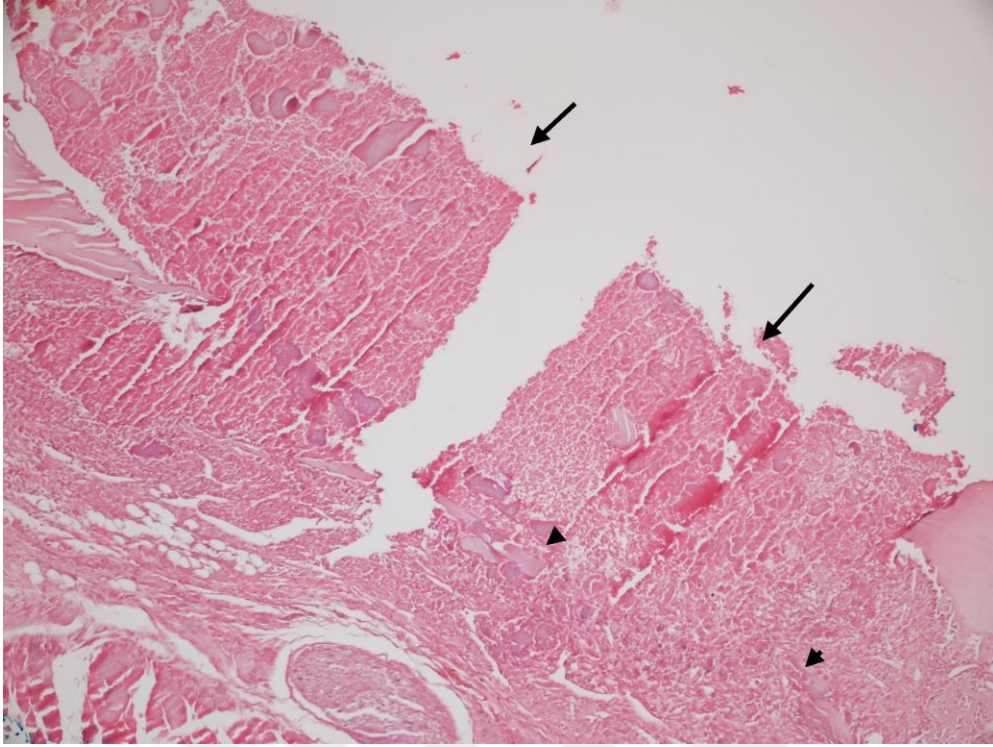
**Voltaren grubunda;** 7. gün yeni kemik oluşumu düzeyine göre 21. günde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime rastlanmamıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4-12: Nekroz varlığına ilişkin değerlendirmeler**

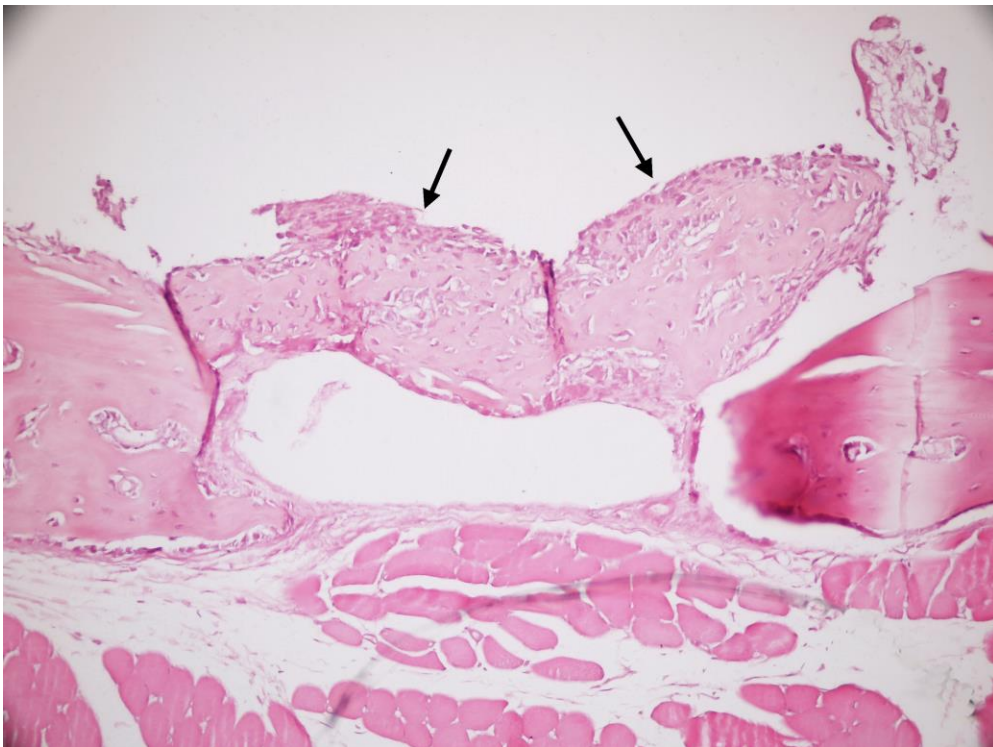
|                      | <b>Kontrol Grubu</b> |              | <b>C vit grubu</b> |          | <b>Voltaren Grubu</b> |          | <b>C vit+Voltaren</b> |              |                      |
|----------------------|----------------------|--------------|--------------------|----------|-----------------------|----------|-----------------------|--------------|----------------------|
| <b>Nekroz</b>        | <b>n</b>             | <b>%</b>     | <b>n</b>           | <b>%</b> | <b>n</b>              | <b>%</b> | <b>n</b>              | <b>%</b>     | <b><sup>1</sup>p</b> |
| <b>7.gün</b>         | 1                    | 12,5         | 0                  | 0        | 0                     | 0        | 1                     | 12,5         | <b>1,000</b>         |
| <b>21.gün</b>        | 0                    | 0            | 0                  | 0        | 0                     | 0        | 0                     | 0            | -                    |
| <b><sup>2</sup>p</b> |                      | <b>1,000</b> |                    | -        |                       | -        |                       | <b>1,000</b> |                      |

<sup>1</sup>Fisher Freeman Halton Exact test

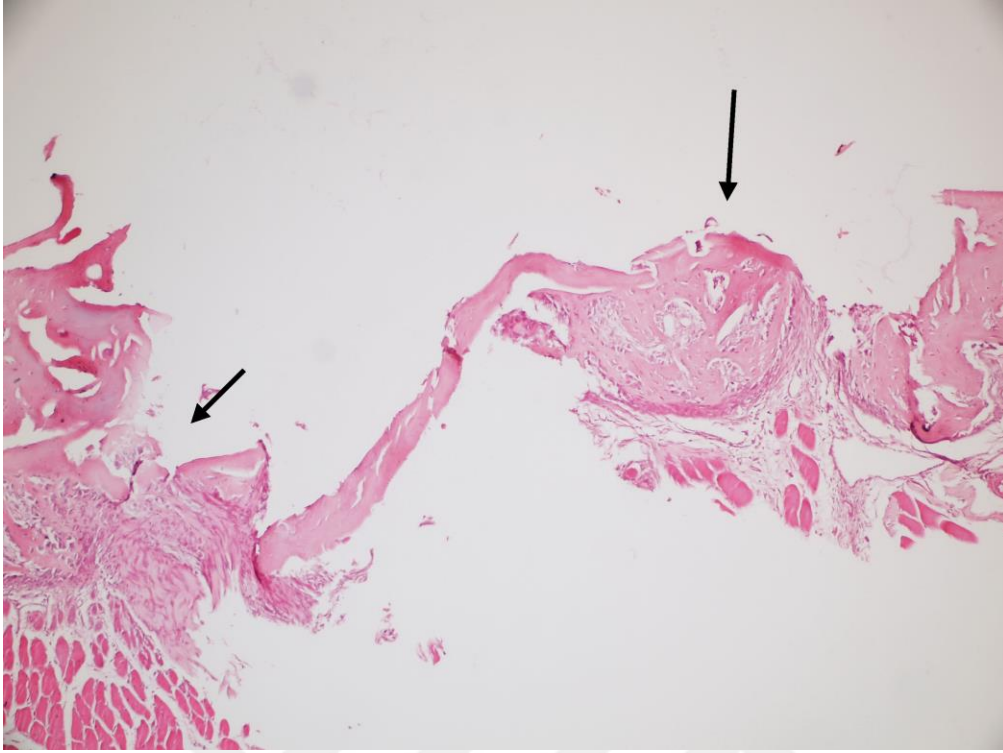
<sup>2</sup>Fisher's Exact test



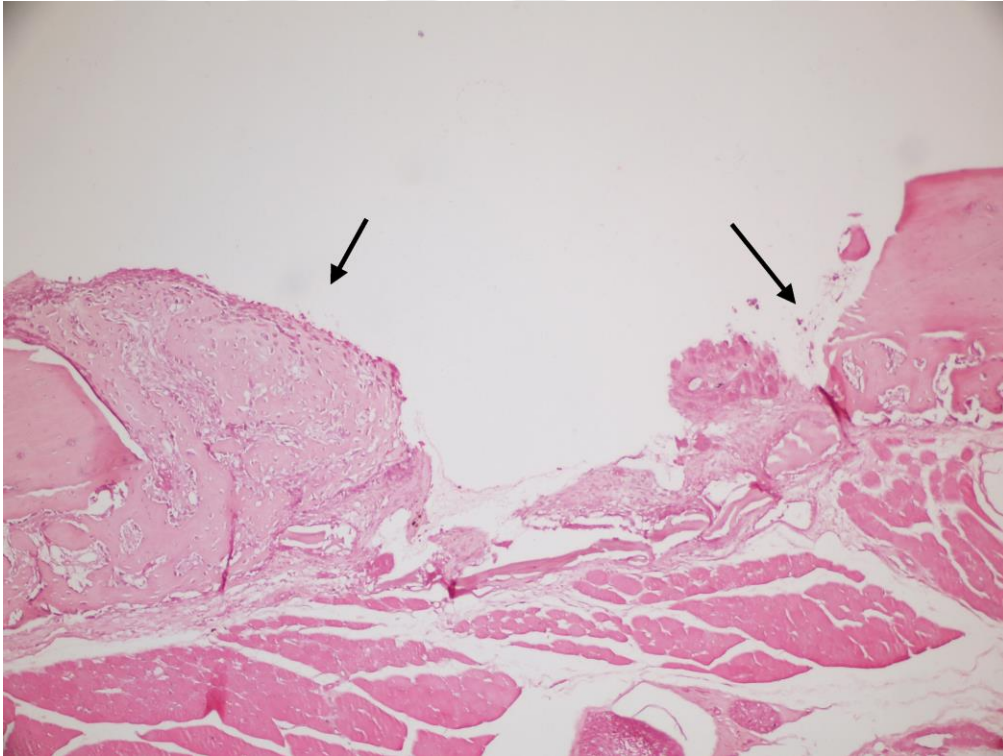
**Şekil 4-12: 7. Gün kontrol grubunda Defekt bölgesinde nekrotik doku artıkları (oklar) ve preparasyon sırasında oluşan küçük kemik fragmanları (ok başı) (H&E X100).**



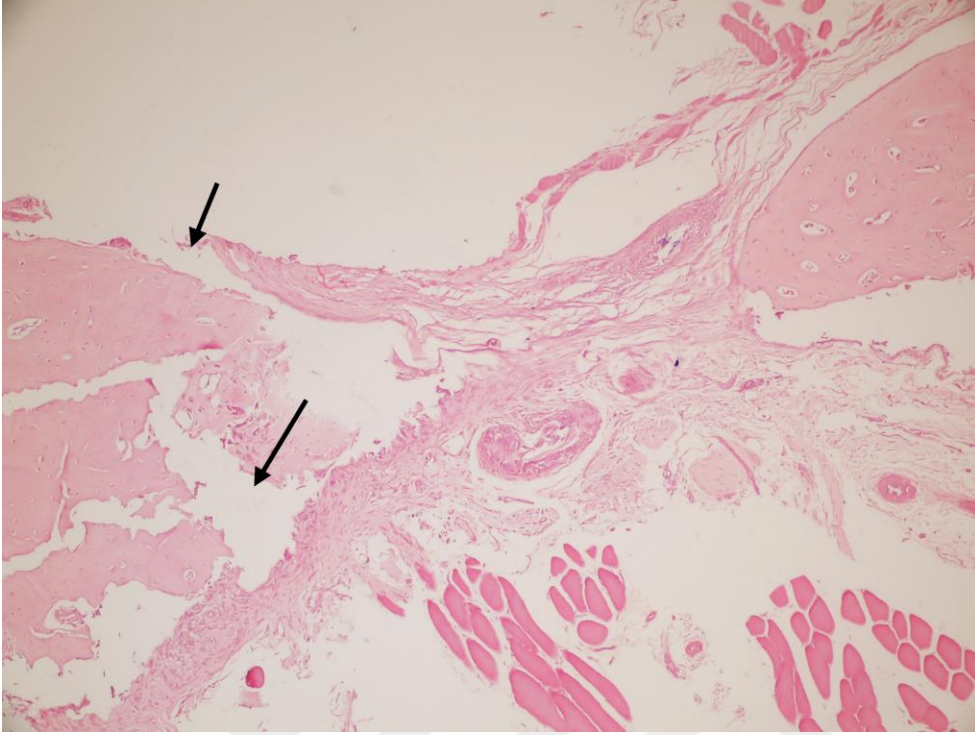
**Şekil 4-13: 7 gün C vitamini uygulanan grupta, defekt bölgesinde kısmen köprüleşme sağlayan yeni kemik dokusu (oklar) (H&E X100).**



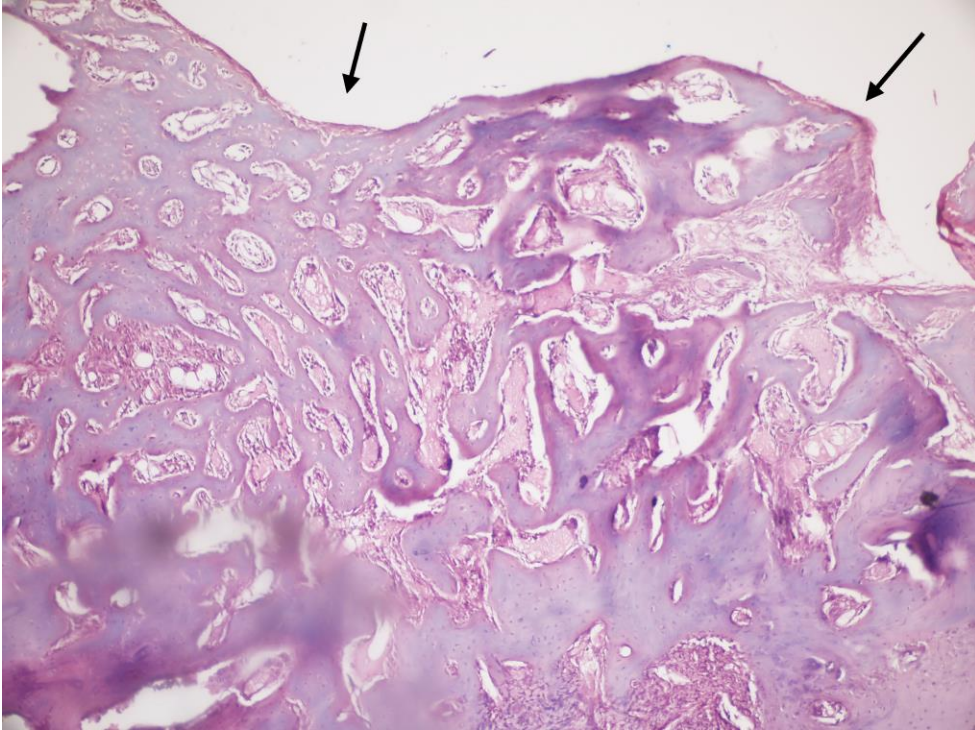
**Şekil 4-14: 7. Gün v grubunda defekt bölgesinde bir kenarda defekti 1/3 oranında kapatan yeni kemik dokusu (oklar) (H&E X100).**



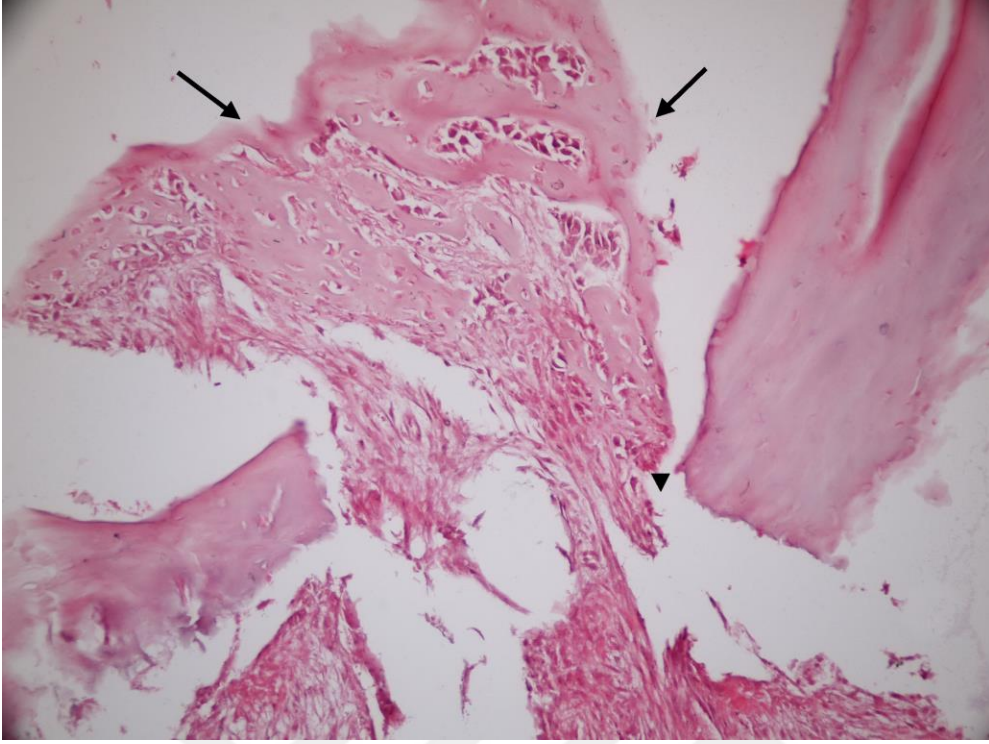
**Şekil 4-15: 7. Gün CV grubunda defekt bölgesinde defekti yarıy yakın bölümünü dolduran yeni kemik yapımı (oklar) (H&E X100).**



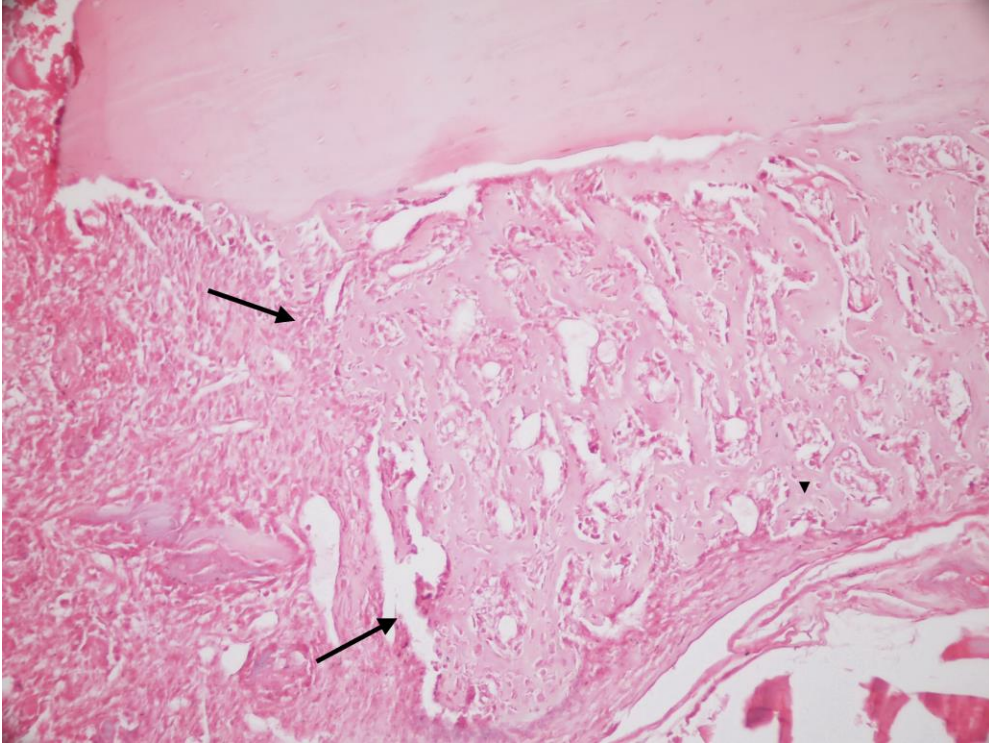
**Şekil 4-16: 21 gün Kontrol grubunda defektin 1/3 oranında yeni kemik ile kapandığı görülmektedir (oklar) (H&E X100).**



**Şekil 4-17: 21 gün C grubunda defektin tümüyle yeni kemik dokusu ile dolduğu, yapılan fazla miktarda kemik dokusunun defekt dışına taşıdığı (oklar) ve henüz remodelling' e uğramadığı görülmektedir (H&E X100).**



**Şekil 4-18: 21 gün V grubunda Defekt bölgesini 1/2 oranında dolduran yeni kemik yapımı (oklar) Bir kenar da konak kemik görülmektedir (ok başı) (H&E x200).**



**Şekil 4-19: 21 gün CV grubunda defekt bölgesini 2/3'den fazla dolduran yeni kemik dokusu (oklar) (H&E X100).**

## 5. TARTIŞMA

Kemik iyileşmesi sonrası inflamasyon fazı ilk 48 saat içerisinde oluşur ve iyileşme alanına ulaşan ilk inflamasyon hücreleri makrofajlar, lökositler ve mast hücrelerdir. Bu hücrelerin aktivasyonu ile iyileşme alanında serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest radikaller oksidatif strese neden olarak yakınındaki yağ, protein, karbonhidrat, RNA ve DNA moleküllerine saldırarak yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olurlar (159, 61).

Oksidatif stresin kemik iyileşmesini geciktirdiği bilinmektedir (31, 84, 107, 122, 134, 158, 178, 182). Normalde oksidanlar ve antioksidanlar vücutta dengelidir. Kemik yaralanmaları gibi durumlarda bu denge bozulur. Bununla birlikte serbest radikallerin üretimi artar ve antioksidanlar yetersiz kalır (154, 155, 164, 171, 179).

Sonuç olarak oksidatif stres lipid peroksidasyonuna neden olur. Malondialdehit (MDA), dünya çapında kabul gören lipid peroksidasyonunun parametresidir. Superoksit Dismutaz (SOD) substrat olarak serbest radikal kullanan tek enzimdir. Aktif oksijen türleri (ROS), serum total -SH, MDA, SOD ve GSH oksidan/antioksidan dengenin belirlenmesinde önemli parametrelerdir (16).

Diklofenak bir fenilasetik asit türevi non-steroid anti-inflamatuar (NSAİ) ilaçtır (162). Diklofenak sodyumun kemik iyileşmesi üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda diklofenak sodyumun oksidatif stresi arttırdığı ve MDA seviyesini önemli derecede yükselttiği belirlenmiştir (74, 114). C vitamini ise antioksidan özelliğe sahip bir maddedir. Superoksit, peroksil, hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi reaktif serbest oksijen radikalleri üzerine olumlu etkileri vardır. Bu şekilde lipid peroksidasyonunu en aza indirilebilir (100, 129).

Kemik iyileşmesinin histopatolojik değerlendirmesi ise ışık mikroskobu altında iltihap, nekroz, fibrozis ve kemik yapımı göz önünde bulundurularak yeni kemik yapımının kapladığı alanlar hesaplanarak yapılır. C vitamini doku iyileşmesinin

proliferasyon fazında bağ dokunun kollajen sentezi için önemlidir. Prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz için kofaktör görevi görür. Yapılan çalışmalarda C vitaminin tip X kollajen yapımını arttırdığı ve böylece daha hızlı kemik onarımı ve mineralizasyonu sağladığı gözlemlenmiştir (74, 59).

Prostaglandinler kemikte yaygın olarak bulunurlar. NSAİ'ler siklooksijenaz sentezini inhibe ederek prostaglandin oluşumunu baskılar ve ağrıyı azaltırlar. Prostaglandinlerin bu inhibisyonu sonucu kemik iyileşme mekanizmasındaki etkilerini kaybederler ve kemik iyileşmesi gecikmiş olur (74, 167).

İncelenen kaynaklarda cerrahi girişim sonrası NSAİ ve C vitaminin birlikte kullanımının kemik iyileşmesi sırasında antioksidan seviyelerine etkilerini inceleyen bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmamızda bir antioksidan olan C vitaminin ve diklofenak sodyumun uygulandığı sıçanlarda kemik iyileşmesine ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkisinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Sıçanlarda kemik defektlerinde iyileşme süreci insanlardaki kemik iyileşmesine benzerlik gösterdiği için kemik iyileşmesini incelemek için yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmış ve kabul edilen bir modeldir. Sıçanların tercih edilmesinin nedeni, mekanik etkilere karşı verilen tepki, ilaçlar, hormonlar ve diğer ajanlara karşı verilen yanıtların sıçanlarda ve insanlarda benzerlik göstermesidir. Çalışmamızda erkek sıçanların seçilme nedeni dişilere nazaran üreme hormonlarının metabolizmalarını daha az etkilemesi ve aylık periyotlarının olmamasıdır (41).

Ayrıca yeterli sayıda ve deney koşullarına uygun nitelikte hayvan elde edilebilmesi, çalışılacak bölgede yaşamsal önem taşıyan damar ve sinir yapılarının bulunmaması, deney alanına cerrahi erişim kolaylığı olması ve değerlendirme yöntemlerinin basit, çabuk ve hassas şekilde uygulanabilmesi sıçan modelini seçmemizin nedenleridir. Geçmişte yapılmış mandibular angulus defekt modellerinde wistar soyu başarı ile kullanılmıştır. Wistar sıçanlarda angulus kemik defekti oluşumu ve çeşitli biyomateryal uygulamalarının bu defektlerdeki iyileşme etkinliğinin belirlenmesini mümkün kılmıştır. Bu sebeple oluşturduğumuz kritik boyuttaki kemik

defektlerinin incelenmesi için bu soy sıçanlar kullanılmıştır.

Da Silva ve arkadaşlarının sıçan mandibulası üzerinde yaptıkları çalışmaya göre kendi kendine iyileşmeyen defekti kritik boyuttaki defekt olarak tanımlamışlardır. Ve minimum 2 mm çapında oluşturulacak defektin herhangi bir biyomateryal kullanılmadan 12 haftada iyileşeceğini belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda 2 mm çapında angulus defekt oluşturduk (41).

Non-Steroid Antiinflamatuvar İlaçlar, iskelet, kas ve sinir sistemlerini ilgilendiren ağrılarda yaygın olarak kullanılırlar. Çene cerrahisinde ise, dental implant uygulamaları, çene eklemi ve yüz ağrıları, kazalar ve tümörlere bağlı doku kayıplarının düzeltilmesi, gömük dişler, çene kırıkları ve yaralanmaları, ağız kanserleri gibi alanlarda NSAİ'ler sıklıkla reçete edilen ilaçlar arasındadır. Ancak, bu ilaçların kemik iyileşmesini bozdukları, iyileşme süresini uzattıkları ve yeni oluşan kemik kalitesinde bozulmaya neden olduklarını gösteren pek çok araştırma vardır. (3, 6, 12, 21, 32, 50, 55, 82, 85, 87, 91, 92, 93, 117, 124, 126, 133, 136, 139, 141, 157, 168, 180).

Biz de çalışmamızda oral cerrahi operasyonlar sonrasında sıkça kullanılan bir NSAİ ilaç olan diklofenak sodyumun sıçanlarda oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine etkilerini araştırdık.

Krischak ve arkadaşları 2007 yılında 40 adet Wistar sıçan modelinde osteotomi iyileşmesinde periostal callus olgunlaşması üzerine diklofenak sodyumun etkisini incelemişlerdir. 7. ve 21. günlerde yapılan histomorfometrik incelemelerde, uzun dönem diklofenak sodyum ile tedavi olan hayvanlarda, özellikle periostal kallusun dış tabakasında fazla miktarda kıkırdak ve daha az miktarda kemik ile birlikte önemli ölçüde gecikmiş kallus olgunlaşmasını saptamışlardır. Kısa dönem diklofenak uygulamasının kallus farklılaşmasında önemli ölçüde değişiklik göstermediğini gözlemlemişlerdir (91).

Tiseo ve arkadaşları 2006 yılında 44 sıçanın sağ femurlarına uyguladıkları osteotomi defekti üzerine diklofenak sodyumun 3mg/kg ve selektif COX-2 inhibitör olan rofekoksib'sin 1 mg/kg dozunda postoperatif 14 ve 28 gün boyunca oral yolla

uygulamışlardır. Cerrahi işleminden 2 ve 4 hafta sonra kemik örneklerini radyolojik ve histomorfometrik olarak incelemişlerdir. İnceleme sonucu diklofenak sodyumun her kırık iyileşmesini geciktirdiğini saptamışlardır (156).

Chang ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada NSAİ ilaçların klinik uygulama dozunda kullandıklarında, kondrositlerde proliferasyonun baskılanmasına sebep olduklarını bulmuşlardır. Bu da NSAİ ilaçların kemik onarımı sürecinde enkondral kemikleşmede gecikmeye neden olabileceğini göstermektedir (32).

Seidenberg ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, NSAİ ilaçların kemik oluşumunu baskıladıklarını ve demineralize kemik matriks greftlerin mineralizasyonunda azalmaya neden olduklarını ileri sürmüşlerdir (139).

Sassioto ve arkadaşları 2006 yılında 48 sıçanda meydana getirdikleri 96 femoral defekt üzerinde kalsitonin ve diklofenak sodyumun 7., 14. ve 21. günlerde kemik iyileşmesine olan etkisini histolojik olarak incelemişlerdir. Çalışma sonucunda diklofenak sodyum grubunda daha az trabekülasyon oluşumu gözlenirken, kalsitonin grubunda trabekülasyonun daha fazla olduğunu saptamışlardır (136).

Beck ve arkadaşları 2003 yılında 40 adet Wistar sıçanda meydana getirdikleri 40 tibial transvers osteotomi defekti üzerine diklofenak sodyumu 7 ve 21 gün süre ile uygulamışlardır. 21. günde yapılan sakrifikasyondan sonra alınan kemik örneklerinde diklofenak sodyum kırık iyileşmesine etkisini histolojik olarak incelemişlerdir. İnceleme sonucu diklofenak sodyumun her iki dönemde (kısa ve uzun dönem kullanımı) kırık iyileşmesini geciktirdiğini saptamışlardır (12).

Yogashi ve arkadaşları 2002 yılında 42 adet sıçanda diş çekimi sonrası uygulanan diklofenak sodyumun çekim boşluğu iyileşmesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Diklofenak ile tedavi olan grupta kan pıhtısının azalmasından, ya da organizasyonun bozulmasından dolayı yeni kemik oluşumunda önemli derecede gecikmeye neden olduğunu saptamışlardır (183).

Da Silva ve arkadaşları 240 adet sıçan femuru üzerinde meydana getirdikleri 2mm çapındaki defektlere otojen kemik greftin ve devitalize sıgır kemik matriksin entegrasyonuna antiinflamatuvar ilaçların etkilerini araştırmışlardır. Değerlendirme; 7, 14 ve 30. günlerde yapılmıştır. Diklofenak sodyum grubundaki hayvanlarda, greft uygulanmış kemik defektlerinde iyileşmenin geciktiğini görmüşlerdir (41).

Akman ve arkadaşları 2001 yılında 54 adet sıçan üzerinde meydana getirdikleri tibia kırıkları sonrası uygulanan diklofenak sodyumun 2., 4. ve 6. haftalardaki kırık iyileşmesi üzerine klinik, radyolojik ve histolojik olarak etkilerini araştırmışlardır. Kırık sonrası diklofenak sodyum uygulanan gruplar ile kontrol grubu arasında ikinci hafta sonunda klinik muayene ile subjektif olarak fark olduğu, kontrol grubunda kallus dokusunun diğer iki gruba göre daha stabil olduğu görülmüştür. Histolojik olarak kallus dokusunun değerlendirilmesinde, her üç grup arasında 2., 4. ve 6. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. Klinik uygulamada yaygın kullanımı olan diklofenak sodyumun, kırık sonrası on günlük dönemde iyileşmeyi etkilemediği sonucuna varılmıştır (3).

Biz de çalışmamızda sıçanlarda etkinlik ve farmakoloji açısından diklofenak sodyum (voltaren) için 5 mg/kg ve C vitamini için 200mg/kg vücut ağırlığı dozunu kullanmaya uygun gördük.

Çalışmamızın 7.gününde kontrol grubunun defekt bölgesinde C vitamini ve Cvitamini+Voltaren grubuna göre anlamlı derecede artmış iltihabi hücre infiltrasyonu izlenmektedir. Voltaren gruplarında iltihabi görünüm izlenmemektedir.

Çalışmamızın 21. gününde ise C vitamini+Voltaren grubunun defekt bölgesinde C vitamini grubuna kıyasla daha yoğun damardan zengin fibroz doku, fibrosit ve fibroblastlar izlendi. Aynı zaman diliminde Voltaren grubunun defekt bölgesinde iyileşme ve yeni kemik oluşumu düzeyi Kontrol, C vitamini, C vitamini+Voltaren grubuna kıyasla düşük bulunmuştur. Bu bulgular, NSAİ ilaç kullanımının iltihabı baskılayarak kronik proliferatif iltihaba yol açarak fibrozise sebep olduğunu ve iyileşme ve yeni kemik oluşumunu geciktirdiğini düşündürmektedir.

Günümüzde, kanser ve yaşlanma gibi birçok patolojik olayda serbest radikallerin etkileri hakkında bulgular vardır. Serbest oksijen radikalleri; inflamasyon, şoka bağlı dolaşım bozukluğu, radyasyon, solunum sıkıntısı, stres, ilaçlara bağlı mide mukoza yaralanmalarında ve farklı dokulardaki iskemi/reperfüzyon gibi olaylarda patolojik doku hasarının tetikleyicileri olarak rol oynamaktadırlar. Bunların yanı sıra, serbest radikallerin granülasyon dokusu oluşumunda, kollajen ve kıkırdak dokuların iyileşmeleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (46, 49, 61, 80, 88, 145). Kemik dokusunda kırık sonrası meydana gelen oksidatif stres, serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu ürünler kıkırdak ve ekstraselüler matrise zarar verirler. Ayrıca, serbest radikaller kollajen ve proteoglikan sentezini baskılar, osteoklastların etkisini arttırıp osteoblastik farklılaşmayı azaltarak kemik remodeling sürecini etkiler (29, 49, 69, 73, 79, 88, 110, 132, 134).

Kemik kırığı meydana geldiğinde monosit, makrofaj, nötrofil ve fagositler tarafından üretilen yüksek miktarda serbest oksijen radikalleri akut inflamatuvar cevabın oluşumunda etkilidirler. İnflamatuvar dönemde fagositik hücrelerin mikroorganizmaları yıkmak için ürettiği bu radikaller, enfeksiyona bağlı doku hasarında önemli rol oynarlar. İnflamasyonda bu serbest radikal ürünleri yaralanma bölgesinde fazla salınırlar ve sıklıkla esas yaralanmanın sebep olduğundan fazla hasar meydana getirirler. Oksijen kaynaklı serbest radikaller membran lipidlerinin peroksidasyonu ile çeşitli hücresel komponentlerde hasar oluştururlar ve bir zincir reaksiyonu başlatarak hücre ölümüne neden olurlar (31, 88, 94). Ayrıca lipid peroksidasyonunun osteoklastları direkt olarak aktive ederek kemik rezorpsiyonunu arttırdığı da bilinmektedir (58, 89, 111).

Hasar görmüş dokuda serbest oksijen radikallerinin üretimi, iyileşmedeki rolleri ve antioksidan uygulanmasının yara iyileşmesine etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir (46, 61, 88, 131, 140, 159). Bu konuda yapılan çalışmalarda, oksidatif stresin artışıyla kemik dansitesindeki azalma arasında ilişki bulunduğunu bildirilmiştir (9, 37, 94). Serbest oksijen radikallerinin hücre içi ya da plazma seviyelerindeki artışının osteoblastların büyümesini ve farklılaşmasını baskıladığı gösterilmiştir (97, 112).

Duygulu ve arkadaşları kırık oluşumu sonrası serbest oksijen radikallerinin ve çeşitli antioksidanların kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. 50 erkek sıçan kullanılan çalışmada sıçanlar 5 gruba ayrılmıştır. Sıçanların sağ ön ayakları bimanuel kompresyon yöntemi ile kırılmıştır. Bu işlemde bir saat önce kontrol Grup 1'e 5 ml/kg intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik verilmiştir. Deney Grupları 2, 3, 4 ve 5'teki 40 sıçanın tamamına i.p. 100 mg/kg dozunda Zymosan verilerek Polimorfonükleer lökositlerde NADPH oksidasyonunu uyararak serbest radikallerin üretimini indüklemeyi amaçlamışlardır. Zymosan indüksiyonu, kırık sonrası ikinci günde durdurulmuştur. Zymosan'a ek olarak, Grup 3'teki hayvanlara i.p. 1 gr/kg/gün dimetil sülfoksit, Grup 4'teki hayvanlara 50 mg/kg/gün Ginko biloba Ekstresi (mabet ağacı) (Egb 761) ve Grup 5'teki hayvanlara 500 mg/kg/gün C vitamini verilmiştir. İncelenen radyografilerin sonucunda; serbest oksijen radikallerinin, kırık iyileşmesi üzerinde olumsuz bir etki gösterdiği ve C vitaminin, zimosanın kırık iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisini kısmen önlediği gözlenmiştir (49).

Göktürk ve arkadaşları, 30 adet erkek sıçana 100 mg/kg zimosan uygulayarak polimorfonükleer hücrelerde NADPH oksidazın stimülasyonu yoluyla serbest radikal oluşturarak kırık iyileşmesini inceledikleri çalışmada, 22 gün sonra yapılan histopatolojik incelenmede, kırık iyileşmesinin geciktiği gözlemlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak Göktürk ve arkadaşları serbest oksijen radikallerinin kırık iyileşmesinde önemli rollerinin bulunduğu ve kırık iyileşmesini bozduğunu bildirmişlerdir (61).

Garret ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmalarında, serbest oksijen radikallerinin ve özellikle superoksid'in, osteoklast oluşumunda ve aktivasyonunda önemli rol oynadıklarını bildirmişlerdir (58).

Cetinus ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kırık iyileşmesi sürecinde meydana gelen serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak amacıyla, iyileşme döneminde antioksidan uygulamasının yapılmasının serbest radikallerin negatif etkilerini yok edebileceğini öne sürmüşlerdir (31). Benzer şekilde Yeler ve arkadaşları serbest radikallerin kırık iyileşmesi sırasında meydana getirdikleri negatif etkileri ortadan kaldırmak amacıyla antioksidan tedavisini önermişlerdir (181).

Biz de çalışmamızda, histopatolojik incelemenin yanı sıra NSAİ ilaç verilen sıçanlarda aseptik şartlar altında oluşturulan kemik dokusu defektinin iyileşmesi sırasında serbest radikal oluşumunu ve bunun üzerine C vitaminin antioksidan etkisini inceledik. Yapılan deneysel çalışmalar incelendiğinde, araştırmacılar arasında C vitamini uygulanmasındaki en uygun doz hakkında fikir birliği olmadığını gördük. Biz de çalışmamızda sıçanlarda etkinlik ve farmakoloji açısından diklofenak sodyum (voltaren) için 5 mg/kg ve C vitamini için 200mg/kg vücut ağırlığı dozunu kullanmaya uygun gördük. Kullandığımız dozda herhangi bir toksik veya yan etki görmedik.

Yılmaz ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada çeşitli mineral ve vitaminlerin kırık iyileşmesi üzerindeki faydaları hayvan modellerinde gösterilmiştir. On altı sıçan rastgele kontrol ve C vitamini verilen gruplara ayrılmıştır. Tüm sıçanların sağ tibiaları dijital manipülasyon ile kırılmıştır. Bir grup kas içine tek yüksek doz C vitamini almıştır. 5., 10., 15. ve 20. günlerde her gruptan iki sıçan öldürülmüştür ve tibialar ışık mikroskopunda incelenmiştir. C vitamini verilen grubun kontrol grubuna göre kırık iyileşme evrelerini daha hızlı geçirdiği görülmüştür (177).

Alcantara- Martos ve arkadaşları, yaşlılarda C vitamininin kırık iyileşmesi üzerindeki etkisini incelemiştir. Toplam 80 yaşlı Osteojenik Bozukluğu bulunan Shionogi sıçanı, farklı C vitamini alım oranlarına sahip dört gruba ayrılmıştır. Her sıçanın femurunun orta üçte birlik kısmında kapalı bilateral kırık yapılmıştır. Kırıktan beş hafta sonra femur mekanik ve histolojik testlerle analiz edilmiştir. Daha düşük C vitamini alımına sahip gruplar, iyileşme kallusunda daha düşük bir mekanik direnç ve daha düşük bir histolojik derece göstermiştir. İyileşme sırasında kandaki C vitamini seviyeleri, oluşan kallusun tork direnci ile bağlantılıdır. Bu nedenle, ek C vitamini, yaşlı sıçanlarda kırık kallusunun mekanik direncini geliştirmiştir. İnsanlarda kırık iyileşmesi sırasında C vitamini takviyesi önerilmiştir (4).

Sarısozen ve arkadaşları E ve C vitamininin ayrı ayrı veya beraber kullanımının, sıçanlardaki kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla Sprague-Dawley cinsi sıçanları 4 gruba ayırarak A grubunda bulunan sıçanlara 40 mg/kg/gün E vitamini, B grubundaki sıçanlara 200 mg/kg/gün C vitamini, C grubundaki

sıçanlara ise E ve C vitaminini beraber uygulamışlardır. Uygulamalar i.p. yoluyla yapılmıştır. Vitaminler ilk 3 gün her gün, 4'üncü günden itibaren haftada 3 kez uygulanmıştır. 4'üncü günde sıçanların sağ tibialarında kırık oluşturulmuş ve sıçanların bir bölümü 14. günde, kalanları ise 21. günde sakrifiye edilmişlerdir. C vitamini tek başına ya da E vitaminiyle beraber kullanıldığı gruplarda, kırık alanındaki kıkırdak matriksin oluşumu ve mineralizasyonunun, diğer gruplara göre önemli derecede hızlı olduğu tespit edilmiştir (135).

Choi ve arkadaşları çalışmalarında, yumurtalıkları alınmış Wistar sıçanlarında C vitamininin osteojenik farklılaşma ve osteoklast oluşumu üzerindeki etkileri ve C vitamini konsantrasyonunun kemik mikro yapısı üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Mikro-bilgisayarlı tomografi analizi, C vitamini ile tedavi edilen sıçanlarda kemik mineral yoğunluğunun ve iyileşmenin daha iyi olduğu ortaya konmuştur. Sonuç olarak, C vitamininin kemik rejenerasyonunu iyileştirdiğini göstermişlerdir (34).

Sandukji ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada antioksidan olan A, C, E vitaminleri ve selenyum oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisini ve uzun kemiklerin fiksatif cerrahisini takiben erkek hastaların plazmasındaki kemik iyileşme belirteçlerinin seviyelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Gruplarda 10'ar hasta olmak üzere sırasıyla 1 ve 2 hafta süreyle antioksidan tabletler 300 mg'lık vitamin A, 10 mg'lık vitamin E, 60 mg'lık vitamin C ve 75 mg'lık selenyum uygulanmıştır. Plazmada osteokalsin düzeyi ve alkalın fosfataz aktivitesinin yanı sıra antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), ayrıca oksidatif stres indeksleri olarak glutatyon (GSH) ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) belirlenmiştir. 2 hafta boyunca antioksidan alan hastaların plazmasında osteokalsin seviyesinin ve alkalın fosfataz aktivitesinin belirgin şekilde arttığı belirtilmiştir. Ek olarak, 1 ve 2 hafta boyunca antioksidanlarla tedavi edilen hastalarda, antioksidan almayanlara kıyasla TBARS seviyeleri önemli ölçüde daha düşük görülmüştür. Öte yandan, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında antioksidan alan hastaların plazmasında SOD, GSH ve GR aktiviteleri belirgin şekilde yükselmiştir. Uzun kemiklerin fiksatif cerrahisi sonrası selenyuma ek olarak A, E ve C vitaminlerinin verilmesinin kemik iyileşmesini hızlandırabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, ameliyat sonrası kemik

cerrahisinde terapötik protokoller tasarlanırken antioksidanların dikkate alınması gerektiğini belirtmişlerdir. Osteokalsin düzeylerinin yükselmesi, kemik kırık iyileşmesini üzerine olumlu etki yapmaktadır. (134).

Biz de çalışmamızda Yılmaz, Sandukji, Choi, Sarisözen, Alcantara- Martos ve arkadaşlarına benzer şekilde C vitaminin, NSAİ uygulanan sıçanlarda kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu gözlemledik.

Kırık iyileşmesi sırasında oksidatif stres değerlerindeki artışlar birçok çalışmada gösterilmiştir (31, 122, 158, 181).

Plazmadaki lipid peroksidasyon ürünü olan MDA; artmış serbest radikal oluşumunun ve oksidatif zarara uğrayan proteinlerin iyi bir belirtecidir. (31, 69, 122, 134, 145, 159, 181).

Yeler ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada, sıçanların fibulasında kırık oluşturulduktan 5, 10, 20 ve 30 gün sonra serum MDA seviyelerini ölçmüşlerdir. Tüm zamanlarda MDA seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunurken, en fazla artış inflamasyon fazında görülmüştür. Yeler ve arkadaşları, serum MDA seviyesindeki artışların, kırık alanına ulaşan ilk inflamatuvar hücreler olan polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve mast hücrelerinin serbest radikal oluşumunu artırmasından kaynaklanabileceğini bildirilmişlerdir (181).

Turgut ve arkadaşları 50 adet erkek sıçanda kırık iyileşmesi sırasında oksidatif stres seviyesinin artışını inceledikleri çalışmalarında, sağ tibiasında kırık oluşturulan sıçanlar, kırık sonrası 1, 3, 7, 14 ve 28. günlerde sakrifiye edildikten sonra kemik dokusunda MDA seviyesi incelenmiştir. Kemik MDA seviyeleri kırık sonrası 1. ve 2. haftada anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kallus oluşumu sırasında, fibroblast ve kollajen hücrelerine ilaveten yeni kapiller damarlarla birlikte inflamatuvar hücrelerin ortaya çıkması sonucu, serbest oksijen radikallerinin arttığı ve kemik dokusunda oksidatif zarara yol açtıkları sonucuna varmışlardır (158).

Petrovich ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları deneysel çalışmada, sıçanlarda mandibula kırığı oluşturarak, serum MDA seviyelerini incelemişlerdir. Mandibula

kırğından 1- 2 hafta sonra kan MDA seviyeleri artış gösterirken, 4. haftada yani primer kemik kallusu fazında azalarak, kontrol grubu seviyelerine geldiğini tespit etmişlerdir (120).

Bizim çalışmamız da, Yeler, Turgut ve Pertovich'in çalışmaları ile uyumludur. Voltaren grubunun 21. gün MDA düzeyi, C vitamini+Voltaren grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur C vitamin+Voltaren grubunun 21. gün MDA ortalamaları ise istatistiksel olarak kontrol grubundan anlamlı seviyede düşüktür. Bu da bize kırık iyileşmesi sırasında oksidatif stresin arttığını aynı zaman da C vitamini'nin oksidatif stresi azaltarak ve NSAİ'ların kırık iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisini bertaraf ederek, kırık iyileşmesi sürecini olumlu etkilediğini göstermektedir. 7. günde ise MDA değerlerinde herhangi farklılık görmedik.

Tiol; sülfidril (-SH) grubu içeren ve hücrelerde oksidatif stres durumunun oluşmasını önlemek konusunda kritik bir rolü olan bir organik bileşiktir (33). Abraham ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, parasetamolün neden olduğu böbrek hasarının tedavisinde yüksek dozlarda C vitamininin yararlı olup olmadığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Sıçanlarda 1 g/kg vücut ağırlığı parasetamol intraperitoneal olarak uygulanarak böbrek hasarı oluşturulmuştur. Bazı sıçanlara parasetamol uygulamasından 1.5 saat, 6 saat, 9 saat veya 16 saat sonra intraperitoneal C vitamini verilmiştir. Parasetamol ile tedavi edilen sıçanlara C vitamini verilmesi, böbrek hasarını tamamen veya kısmen önlemiştir. C vitamini bu etkisini tiol düzeyini artırarak göstermiştir (1).

Bizim çalışmamız da, Abraham ve arkadaşları'nın çalışması ile uyumludur. C vitamini+Voltaren grubunun 7. gün ve 21. gün tiyol düzeyi, Voltaren ve Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. C vitamini grubunun 21. gün Tiol ( $\mu\text{mol}$ ) ortalamaları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. Bu bize bir antioksidan olan C vitamininin yalnız veya NSAİ'ler ile beraber verildiğinde NSAİ'ların olumsuz etkisini bertaraf ederek serbest radikal oluşumunu engelleyip oksidatif stresi baskıladığını ve doku iyileşmesindeki hasarın tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir.

Rahmouni ve arkadaşlarının çalışmasında, sıçanlarda karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile indüklenen hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye karşı Teucrium polium ve C vitamininin koruyucu etkileri antioksidan kapasite ölçülerek (FRAP) araştırılmıştır. T. polium ve C vitamini (250 mg/kg) CCl<sub>4</sub> tarafından indüklenen oksidatif hasara ve biyokimyasal değişikliklere karşı koruma yeteneklerini sergilediğini bulmuşlardır (125).

Prasad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada amaç FRAP değeri incelemesi ile kırık sonrası ortaya çıkan oksidatif stresi incelemektir. Yapılan araştırmalar sonucunda kırıktan 2 hafta sonra FRAP değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı ve 4. Haftanın sonunda normal seviyelere indiği gösterilmiştir (122).

Bizim çalışmamız da Rahmouni, Prasad ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar ile uyumludur. Araştırmamızın 21. gününde, total antioksidan kapasiteyi belirleyen plazma FRAP düzeylerinde vitamin C uygulanması sonucu C vitamini ve C vitamini+Voltaren grubuplarında anlamlı artışa neden olduğunu görmekteyiz. Bu sonuçlar, C vitaminin vücudun antioksidan savunmasını güçlendirerek kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Gruplar arasında 7. gün FRAP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Bu da bize Prasad ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmaya benzer olarak erken dönemde total antioksidan kapasitede değişiklik olmadığını göstermektedir.

Güney ve arkadaşları, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini teşvik eden Florür kaynaklı oksidatif stresi incelemek ve sıçanlarda olası Florür kaynaklı endometriyal bozulmaya karşı C ve E vitaminlerinin rolünü araştırmıştır. C vitamininin, florürün neden olduğu endometriyal hasara karşı histopatolojik ve biyokimyasal bir koruma sağlayarak reaktif oksijen türlerinin üretimini azalttığını tespit etmişlerdir. (63).

Bizim çalışmamızda da Güney ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya benzer olarak 7. ve 21. Gün ROS düzeyi Voltaren grubunda C vitamini ve C vitamini+Voltaren gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde Kontrol grubunun da 7. Gün ve 21. gün ROS düzeyi C vitamini ve C vitamini+Voltaren gruplarına göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bize C vitamininin tek başına veya voltaren ile

beraber verildiğinde voltarene rağmen reaktif oksijen türlerinin üretimini baskılayarak iyileşmeye yardımcı olduğunu göstermektedir.

Protein karbonil (PK) oksidatif protein hasarının göstergesidir. Bizim çalışmamız da Voltaren grubunun 21. gün PK düzeyi, C vitamini+Voltaren grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu da bize C vitamininin NSAİ ilaçların oluşturduğu oksidatif protein hasarını azaltarak iyileşmeye yardımcı olduğunu göstermektedir.

Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), çok yönlü bir şekilde gelişimi kontrol eden ekstrasellüler büyüme faktörlerinin büyük bir grubudur. TGF- $\beta$ 'nın organizmanın tüm dokularının gelişimi, homeostazisi ve onarımı üzerinde büyük bir rolü vardır.

C vitamini ve C vit+Voltaren grubunun 7.gün TGF- $\beta$  (pg) düzeyi, Kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Anlamlılığın kaynaklandığı grubu tespit etmek adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamin+Voltaren grubunun 7. gün TGF- $\beta$  ortalamaları Voltaren grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızın 21. Gün sonuçlarına bakıldığında C vit+Voltaren grubunun 21. gün TGF- $\beta$  düzeyi, Kontrol ve Voltaren grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Anlamlılığın kaynaklandığı grubu tespit etmek adına yapılan Dunn's test sonucunda; C vitamini grubunun 21. gün TGF- $\beta$  (pg) ortalamaları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. Bu sonuçlar bize C vitamininin tek başına veya voltaren ile beraber verildiğinde dokularının gelişimini, homeostazisi ve onarımı arttıran TGF- $\beta$  düzeylerini yükselttiğini göstermiştir.

Osteokalsin kemik gama-karboksiglutamik asit içeren protein (BGLAP) dir. Kemik ve dentinde bulunan ve kalsiyum bağlayıcı protein olarak tanımlanan kollajenöz olmayan proteindir. (%5) Osteokalsin, osteoblastlar tarafından sentezlenir ve kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde spesifik bir belirleyicidir. Kemiklere kalsiyum sağlar, kemiklerin oluşumuna ve iyileşmesine yardımcı olmaktadır.

Sandukji ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada bir antioksidan karışımının (A, C, E vitaminleri ve selenyum) oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisini ve uzun kemiklerin fiksatif cerrahisini takiben erkek hastaların plazmasındaki kemik iyileşme belirteçlerinin seviyelerini araştırmayı amaçlamışlardır. Plazmada osteokalsin düzeyi ve alkalen fosfataz aktivitesinin yanı sıra antioksidan enzimler ölçülmüştür. 2 hafta boyunca antioksidan alan hastaların plazmasında osteokalsin seviyesinin ve alkalen fosfataz aktivitesinin belirgin şekilde arttığı belirtilmiştir.

Sandukji ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya benzer olarak bizim çalışmamızda da C vitamini+Voltaren gruplarının 21. gün osteokalsin ve alp düzeyleri Voltaren grubundan anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bize C vitamininin kemiklere iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak NSAİ ilaçlar kırık iyileşme döneminde antioksidan kapasiteyi (FRAP) baskılayarak oksidatif stresi arttırmaktadır. C vitamini uygulaması oksidatif stres parametrelerinde (MDA, ROS ve PK) azalmaya neden olup, antioksidan savunma kapasitesini (FRAP) artırır ve oksidatif stresi (Tiol) engeller. Ayrıca çalışmamızda, C vitamininin, NSAİ uygulanan sıçanlarda kemik iyileşmesi üzerine (TGF- $\beta$ , ALP, Osteokalsin) olumlu etkilerinin olduğunu gözlemledik. C vitamininin etki mekanizmalarını açıklığa kavuşturabilmek için, farklı doz ve sürelerde klinik ve hayvan çalışması yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ

- 1) Çalışmamızın histopatolojik bulgularına göre 21. günde Voltaren grubunun kemik iyileşmesi, yeni kemik oluşumu ve iltihap düzeyleri; kontrol, C vitamini, C vitamini+Voltaren gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Araştırmamızın sonuçlarına göre NSAİ ilaç kullanımının iltihabı baskılayarak kronik proliferatif iltihaba yol açarak fibrozise sebep olduğunu aynı zamanda iyileşme ve yeni kemik oluşumunu geciktirdiğini düşündürmektedir.
- 2) Çalışmamızın 7. ve 21. Gün sonuçlarına göre C vitamininin tek başına ya da Voltaren ile beraber uygulandığı gruplarda FRAP ve Tiol ortalamaları diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Biyokimyasal bulgular NSAİ ilaçların antioksidan kapasiteyi azalttığını, C vitamininin ise antioksidan kapasiteyi artırarak doku iyileşmesindeki hasarın tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir.
- 3) Kırık iyileşmesi sırasında MDA, ROS ve PK seviyelerinin yüksek gözlenmesi oksidatif stresin arttığını göstermektedir. NSAİ uygulanan gruplarda MDA, ROS ve PK düzeyleri artarken, C vitamini uygulanan grupta iste anlamlı bir azalma gözlenmektedir. Bu durum bize C vitamini'nin oksidatif stresi azaltarak ve NSAİ'lerin kırık iyileşmesi üzerindeki olumsuz etkisini bertaraf ederek, kırık iyileşmesi sürecini olumlu etkilediğini göstermektedir.
- 4) C vitamini ve C vit+Voltaren gruplarında osteokalsin, ALP ve TGF- $\beta$  seviyeleri diğer gruplarla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar bize C vitamininin tek başına veya voltaren ile birlikte verildiğinde C vitamininin kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir.
- 5) Sonuç olarak, kırık iyileşmesinde NSAİ kullanımının C vitamini ile desteklenmesi; oluşacak olan oksidatif stresleri azaltıp, kemik iyileşmesini ve kemik oluşum düzeylerini arttıracaktır.

## KAYNAKLAR

1. Abraham P. Vitamin C may be beneficial in the prevention of paracetamol-induced renal damage. *Clin Exp Nephrol*. 2005; 9:24–30.
2. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. 1995
3. Akman S, Gögüs A, Sener N, Bilgiç B, Aksoy B, Seçkin F. Effect of diclofenac sodium on union of tibial fractures in rats. *Adv Ther*. 2002 May-Jun; 19(3): 119-25.
4. Alcantara- Martos T, Delgado- Martinez AD, Vega MV, Carrascal MT, Munuera- Martinez L. Effect of vitamin C on fracture healing in elderly Osteogenic Disorder Shionogi rats. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2007; 89:402-7.
5. Asman B, Wijkander P, Hjerpe A. Reduction of collagen degradation in experimental granulation tissue by vitamin E and selenium. *J Clin Periodontal*. 1994; 21(1):45-7.
6. Baltalarli A, Ozcan V, Ferda B, Aybek H, Sacar M, Onem G, Goksin I, Demir S, Zafer T. Ascorbic Acid (Vitamin C) and Iloprost Attenuate the Lung Injury Caused by Ischemia/Reperfusion of the Lower Extremities of Rats. *Ann Vasc Surg*. 2006; 20: 49-55.
7. Barbul A, Purtill WA. Nutrition in wound healing Clinics in Dermatology. 1994;12: 133-140.
8. Bartl R, Frisch B, von Tresckow E, Bartl C. Bisphosphonates in Medical Practice. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg: 2007.
9. Basu S, Michaelsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H. Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001; 288: 275-279.
10. Başpınar N, Kurtoglu F. Vitaminler. S.Ü. Veteriner Fak. Yayın Ünitesi. 2003.

11. Bates CJ, Counsell JN and Hornig DH. The function and metabolism of vitamin C in man. *Applied Science*. 1981;1: 1-22.
12. Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L, Claes L. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg* 2003; 123: 327–332.
13. Beharka AA, Wu D, Serafini M, Meydan SM. Mechanism of vitamin E inhibition of cyclooxygenase activity in macrophages from old mice: role of peroxynitrite. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 32(6): 503–511.
14. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol*. 1989; 299: 15-27.
15. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. 1996
16. Berger MM, Chioléro RL. Antioxidant supplementation in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Crit. Care Med*. 2007; 35: 59–584.
17. Bergström S, Samuelsson B. Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. *The Journal of Biological Chemistry*. 1962 September; 237.
18. Bergström S, Ryhage R, Samuelsson B, Sjövall J. Prostaglandins and related factors.15. The structures of prostaglandin E1, F1 $\alpha$  and F1 $\beta$ . *The Journal of Biological Chemistry*. 1963 November; 238(11): 3555-3564.
19. Bernard GW. Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am* 1991; 35: 469-477.
20. Blackwell KA, Raisz LG, Pilbeam CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(5):294-301.
21. Boursinos LA, Karachalios T, Poultides L, Malizos KN. Do steroids, conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective Cox-2

- inhibitors adversely affect fracture healing? Review Article. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2009; 9(1): 44-52.
22. Bowden SA, Akusoba CI, Hayes JR, Mahan JD. Biochemical markers of bone turnover in children with clinical bone fragility. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;29(6):715–22.
  23. Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 1999 Jul; 13(10): 1145-1155.
  24. Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life.* 2001;52(3-5):189-195.
  25. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52:302-310.
  26. Büyükuslu N, Yiğitbaşı T. Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres. 2015
  27. Calmar EA, Vinci RJ. The anatomy and physiology of bone fracture and healing. *Clin Ped Emerg Med.* 2002; 3: 85-93.
  28. Candemir M, Özdemir ÖMA, Ergin H. Bir Vaka Nedeniyle Selim Geçici Hiperfosfatazemi. *Fırat Tıp Dergisi.* 2008;13(1):74-76.
  29. Canter PH, Wider B, Ernst E. The antioxidant vitamins A, C, E and selenium in the treatment of arthritis: a systematic review of randomized clinical trials. *Rheumatology.* 2007; 46: 1223–1233
  30. Carranza F, Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR. Carranza's Clinical Periodontology. 10th ed. 2006; 80-83
  31. Cetinus E, Kılınç M, Uzel M, Inanç F, Kurutaş EB, Bilgic E, Karaoguz A. Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005 Jul; 125: 376-80.
  32. Chang JK, Wu SC, Wang GJ, Cho MH, Ho ML. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cell proliferation and death in cultured epiphyseal-articular chondrocytes of fetal rats. *Toxicology.* 2006 Aug; 228: 111-123.
  33. Chianeh YR, Prabhu K. Protein Thiols as an Indicator of Oxidative Stress. *Medical Review Journal.* 2014;23(3):443-456

34. Choi HK, Kim G, Yoo H, Song DH, Chung K, Lee K, Koo YT, An JH. Vitamin C Activates Osteoblastogenesis and Inhibits Osteoclastogenesis via Wnt/ $\beta$ -Catenin/ATF4 Signaling Pathways. *Nutrients*. 2019; 11: 506.
35. Clark CA, Li TF, Kim KO, Drissi H, Zuscik MJ, Zhang X, O'Keefe RJ. Prostaglandin E2 inhibits BMP signaling and delays chondrocyte maturation. *J Orthop Res*. 2009 Jun; 27: 785-792.
36. Cockrill JR, Miller EG, Kurzrok R. The substance in human seminal fluid affecting uterine muscle. *Am J Physiol*. 1935 Apr; 112: 577-580.
37. Cohen ME, Meyer DM. Effects of dietary vitamin E supplementation and rotational stress on alveolar bone loss in rice rats. *Arch Oral Biol*. 1993; 38: 601-606.
38. Corbett SA, Hukkanen M, Batten J, McCarthy ID, Polak JM, Hughes SP. Nitric oxide in fracture repair. Differential localisation, expression and activity of nitric oxide synthases. *J Bone Joint Surg Br*. 1999 May; 81(3): 531-537.
39. Craven PA, Derubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer RK. Effects of Supplementation with Vitamin C or E on Albuminuria Glomerular TGF- $\beta$  and Glomerular Size in Diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1997.
40. Custando A, Arana C, Gómez-Moreno G, Escames G, López A, Ferrera MJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Local application of melatonin into alveolar sockets of beagle dogs reduces tooth removal-induced oxidative stress. *J Periodontol*. 2007 Mar; 78(3): 576-583.
41. Da Silva RA, Fagundes DJ, Antonioli Silva AC, Sisti KE, Brochado de Carvalho TM, e Silva DN. Effect of anti-inflammatory agents on the integration of autogenous bone graft and bovine bone devitalized matrix in rats. *Acta Cir Bras*. 2008 Mar-Apr; 23(2): 140-148.
42. Dimar JR, Antea WA, Zhang YP, Glassman SD. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on posterior spinal fusions in the rat. *Spine* 1996; 21(16): 1870-1876.
43. Diwan AD, Wang MX, Jang D, Zhu W, Murrell GAC. Nitric oxide modulates fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2000; 15: 342–351.

44. Diwan AD, Khan SN, Cammisa Jr FP, Sandhu HS, Lane JM. Nitric oxide modulates recombinant human bone morphogenetic protein-2-induced corticocancellous autograft incorporation: a study in rat intertransverse fusion. *Eur Spine J.* 2010; 19: 931–939.
45. Duman EN. NSAİ ilaçların kronik ağrı tedavisinde yeri. *Klinik gelişim.* 2007; 141- 216: 145-149.
46. Durak K, Bilgen OF, Kaleli T, Tuncel P, Ozbek R, Turan K. Antioxidant effect of alpha-tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *J Int Med Res.* 1996 Sep-Oct; 24(5): 419-24.
47. Durak K, Sonmez G, Sariozen B, Ozkan S, Kaya M, Ozturk C. Histological assessment of the effect of alpha-tocopherol on fracture healing in rabbits. *The Journal of International Medical Research.* 2003; 31: 26–30.
48. Dural E. *Farmakoloji İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri; 3. Baskı.* 2002.
49. Duygulu F, Yakan B, Karaoglu S, Kutlubay R, Karahan OI, Ozturk A. The effect of zymosan and the protective effect of various antioxidants on fracture healing in rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2007; 127: 493–501.
50. Endo K, Sairyo K, Komatsubara S, Sasa T, Egawa H, Yonekura D, Adachi K, Ogawa T, Murakami R and Yasui N. Cyclooxygenase-2 inhibitor inhibits the fracture healing. *J Physiol Anthropol.* 2002; 21(5): 235–38.
51. Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev.* 1986; 6: 365-406.
52. Fleisch H. Bisphosphonates in Bone Diseases. From the Laboratory to the Patient. 3rd ed, Parthenon Publishing Group, New York, 1997, chap 1.
53. Fracon RN, Teofilo JM, Stain RB, Lamano T. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. *J Oral Sci.* 2008; 50(3): 247-252.

54. Frost HM. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec* 1990; 226: 414-22.
55. Gajraj NM. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on bone healing. *Reg Anesth Pain Med*. 2003 Sep-Oct; 28(5): 456-65.
56. Garant, PR. Oral Cells and Tissues. Quintessence Publishing Co. Inc. Illinois. 2003; Chaps 7-8.
57. Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Rać M, Krupa B, Czaja-Bulsa G, Walczak M, Sowińska-Przepiera E, Syrenicz A. Association between serum osteocalcin, adiposity and metabolic risk in obese children and adolescents. *Endokrynol Pol*. 2013;64(5):346–52.
58. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo ROC, Bonewald R, Poser J, Mundy GR. Oxygen- derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest*. 1990 Mar; 85: 632-639.
59. Giordano V, Albuquerque RP, Amaral NP, Chame CC, Souza F, Apfel MİR. Supplementary vitamin C does not accelerate bone healing in a rat tibia fracture model. *Acta Ortop Bras*. 2012;20(1): 10-2
60. Gorski JP. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of noncollagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev. Oral Biol Med* 1998; 9: 201-223.
61. Göktürk E, Turgut A, Bayp C, Gunall I, Seber S, Gulbas Z. Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acfa Orthop Scand*. 1995;66(5):473-475.
62. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol*. 1996; 268: 237-246.
63. Guney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N. Protective Effects of Vitamins C and E Against Endometrial Damage And Oxidative Stress In Flouride Intoxication. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2007;34: 467–474.
64. Gupta A, Singh RL, Raghubir R. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Mol Cell Biochem*. 2002; 241: 1-7.

65. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. 2006; 980-983.
66. Halil H, Kınık E. The potential role of osteocalcin levels in growth monitoring during growth sprut of adolescents. *J Contemp Med* 2018;8(4):333-338
67. Haliloğlu S, Başpınar N, Serpek B, Erdem H, Bulut Z. Vitamin A And B Carotene Levels In Plasma, Corpus Luteum And Follicular Fluid Of Cyclic And Pregnant Cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 2002; 37(2): 96 – 99.
68. Harris A, Devaraj S, Jialal I. Oxidative stress, alpha-tocopherol therapy, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2002 Sep; 4(5): 373-380.
69. Hermizi H, Faizah O, Ima-Nirwana S, Nazrun SA, Norazlina M. Beneficial effects of tocotrienol and tocopherol on bone histomorphometric parameters in Sprague–Dawley male rats after nicotine cessation. *Calcif Tissue Int.* 2009; 84: 65– 74.
70. Ho ML, Chang JK, Chuang LY, Hsu HK, Wang GJ. Effects of nonsteroidal anti- inflammatory drugs and prostaglandins on osteoblastic functions. *Biochem Pharmacol.* 1999; 58(6): 983–990.
71. Høgevold HE, Grøgaard B, Reikerås O. Effects of short-term treatment with corticosteroids and indomethacin on bone healing. *Acta Orthop Scand.* 1992; 63(6): 607-611.
72. Horio F, Ozaki K, Kohmura M, Yoshida A, Makino S, Hayashi Y. Ascorbic acid requirement for the induction of microsomal drug-metabolizing enzymes in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *J Nutr.* 1986; 116(11): 2278-2289.
73. Ima-Nirwana S, Kiftiah A, Sariza T, Gapor MT, Khalid BA. Palm vitamin E improves bone metabolism and survival rate in thyrotoxic rats. *General Pharmacology.* 1999; 32(5): 621-626.
74. Inal S, Kabay S, Cayci MK, Kuru HI, Altikat S, Akkas G, Deger A. Comparison of the effects of dexketoprofen trometamol, meloxicam and diclofenac sodium on fibular fracture healing, kidney and liver: An experimental rat model. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2014; 45: 494-500.
75. Jacob RA, Shils ME Olson JA, Shike M, Ross AC. Vitamin C. *Modern Nutrition in Health and Diseases.* 1999; 9.

76. Jee WSS. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. In: Cowin SC (ed). Bone Mechanics Handbook. 2. ed. CRC Press, Florida, 2001; 1- 68.
77. Jiang Q, Yin X, Lill MA, Danielson ML, Freisera H, Huang J. Long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E, are potent inhibitors of cyclooxygenases. PNAS. 2008 Dec; 105(51): 20464-20469.
78. Johnston CS, Corte C. Tissue carnitine fluxes in vitamin C depleted-repleted guinea pigs. J Nutr Biochem. 1999; 10(12): 696-699.
79. Jolitha AB, Subramanyam MV, Asha Devi S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. Exp Gerontol. 2006 Aug; 41(8): 753-763.
80. Jung JY, Lin AC, Ramos LM, Faddis BT, Chole RA. Nitric oxide synthase I mediates osteoclast activity in vitro and in vivo. Journal of Cellular Biochemistry. 2003; 89: 613–621.
81. Junguera LC, Carneiro J, Kelly RO. Temel Histoloji 9. Baskı İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Şti. 1998; 132-151.
82. Kabaca G. Diabetik sıçanlarda selenyumun kemik iyileşmesi üzerine etkileri.-Tez (Doktora). I.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. İstanbul; 2007.
83. Kalfas HI. Principles of Bone Healing. Neurosurg Focus. 2001; 10(4): 1-4.60
84. Kappus H. Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and redox cycling. Biochem. Pharmacol. 1986;35:1–6.
85. Karakawa A, Fukawa Y, Okazaki M, Takahashi K, Sano T, Amano H, Yamamoto M, Yamada S. Diclofenac sodium inhibits NFκB transcription in osteoclasts. J Dent Res. 2009; 88(11): 1042-1047.
86. Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. Sendrom. 1987; 9(7): 14-23.
87. Keller J, Büniger C, Andreassen TT, Bak B, Lucht U. Bone repair inhibited by indomethacin. Effects on bone metabolism and strength of rabbit osteotomies. Acta Orthop Scand 1987; 58: 379-383.

88. Keskin D, Karsan O, Ezirmik N, Çiftçioğlu A. Tavşanlarda kırık iyileşmesi üzerine alfa-tokoferolün etkisi (Deneyisel araştırma). Turkish journal of arthroplasty and arthroscopic surgery. 1999; 10(2): 207-210.
89. Key LL, Ries WL, Taylor RG, Hays BD, Pitzer BL. Oxygen-derived free radicals in osteoclasts: the specificity and location of the nitroblue tetrazolium reaction. Bone. 1990; 11: 115-119.
90. Kılıçoğlu, SS. Mikroskopik düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2002; 55: 143-150.
91. Krischak GD, Augat P, Sorg T, Blakytyn R, Kinzl L, Claes L, Beck A. Effects of diclofenac on periosteal callus maturation in osteotomy healing in an animal model. Arch Orthop Trauma Surg. 2007 Jan; 127(1): 3-9.
92. Krischak GD, Augat P, Blakytyn R, Claes L, Kinzl L, Beck A. The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac reduces appearance of osteoblasts in bone defect healing in rats. Arch Orthop Trauma Surg. 2007 Aug; 127(6): 453-458.
93. Leunig M, Yuan F, Gerweck LE, Berk DA, Jain, RK. Quantitative analysis of angiogenesis and growth of bone: effect of indomethacin exposure in a combined in vitro-in vivo approach. Res Exp Med. 1995; 195: 275–288.
94. Leveille SG, La Croix AZ, Koepsell TD, Beresford S, Belle GV, Buchner DM. Do dietary antioxidants prevent postmenopausal bone loss? Nutrition Research. 1997; 17(8): 1261-1269.
95. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. New Engl J Med. 1986; 314: 892–902.
96. Li M, Thompson DD, Paralkar VM. Prostaglandin E (2) receptors in bone formation. Int Orthop. 2007 Dec; 31(6): 767-772.
97. Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Lee MS, Wang CC, Lan WH, Hsiao M, Goldring SR, Hong CY. Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine- stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. J Bone Miner Res. 2003; 1(18): 39–46.
98. MacKay DJ and Miller AL. Nutritional support for wound healing. Altern Med Rev. (2003;8(4): 359-377.

99. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-91
100. McDowell LR. *Vitamins in Animal and Human Nutrition: Vitamin C*. Academic Press. 1989;10–52:93–131.
101. Mikami T, Ichiseki T, Kaneuji A, Ueda Y, Sugimori T, Fukui K, Matsumoto T. Prevention of steroid-induced osteonecrosis by intravenous administration of vitamin E in a rabbit model. *J Orthop Sci*. 2010 Sep; 15(5): 674-677.
102. Mills K, Baker D, Pacey V, Wollin M, Drew MK. What is the most accurate and reliable methodological approach for predicting peak height velocity in adolescents? A systematic review. *J Sci Med Sport*. 2017;20(6):572–577.
103. Moser UK. Physiology and metabolism of ascorbic acid (review). *Ascorbic Acid in Domes. Anim. C*. 1990;2: 3–16.
104. Morsy MD, Mostafa OA, Hassan WN. A potential protective effect of  $\alpha$ -tocopherol on vascular complication in spinal cord reperfusion injury in rats. *Journal of Biomedical Science* 2010; 17: 55.
105. Mullis BH, Copland ST, Weinhold PS, Miclau T, Lester GE, Bos GD. Effect of COX-2 inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs on a mouse fracture model. *J Injury* 2006 Sep; 37(9): 827-37.
106. Naik AA, Xie C, Zuscik MJ, Kingsley P, Schwarz EM, Awad H, Guldborg R, Drissi H, Puzas JE, Boyce B, Zhang X, O'Keefe RJ. Reduced COX-2 expression in aged mice is associated with impaired fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2009; 24: 251-264.
107. Navarro A, Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004; 287: 1244-1249.
108. Nicosia RF, Belser P, Bonanno E, Diven J. Regulation of angiogenesis in vitro by collagen metabolism. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1991;27(12): 961-966.
109. Nilsson OS, Bauer HC, Brosjo O, Tornkvist H. Influence of indomethacin on induced heterotopic bone formation in rats. Importance

- of length of treatment and of age. Clin. Orthop. Relat. Res. 1986; 207: 239-245.
110. Norazlina M, Ima-Nirwana S, Gapor MT, Khalid BAK. Palm vitamin E is comparable to  $\alpha$ -tocopherol in maintaining bone mineral density in ovariectomised female rats. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2000; 108: 305-310.
  111. Norazlina M, Ima-Nirwana S, Abul Gapor MT, Abdul Kadir Khalid B. Tocotrienols are needed for normal bone calcification in growing female rats. Asia Pac J Clin Nutr. 2002; 11(3): 194-199.
  112. Norazlina M, Chua CW, Ima-Nirwana S. Vitamin E deficiency reduced lumbar bone calcium content in female rats. Med J Malaysia. 2004 Dec; 59(5): 623-630.
  113. Norazlina M, Lee P L, Lukman H I, Nazrun A S, Ima-Nirwana S. Effects of vitamin E supplementation on bone metabolism in nicotinetreated rats. Singapore Med J 2007; 48(3): 195-199.
  114. Olmedillas H, Gonzalez-Agüero A, Rapún-López M, Gracia-Marco L, Gomez-Cabello A, Pradas de la Fuente F, Moreno LA, Casajús JA, Vicente-Rodríguez G. Bone metabolism markers and vitamin D in adolescent cyclists. Arch Osteoporos. 2018;13(1):11. doi: 10.1007/s11657-018-0415-y.
  115. Orgill D, Demling RH. Current concepts and approaches to wound healing. Crit Care Med. 1998; 16 (9): 899-908.
  116. Özkan EA, Hüsrevşahi H, Yaşar A, Geçit UA. Geçici Benign Hiperfosfatazemili İki Olgu. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi 2016; 56.
  117. Pablos AB, Ramalho SA, König B Jr, Furuse C, de Araújo VC, Cury PR. Effect of meloxicam and diclofenac sodium on peri-implant bone healing in rats. J Periodontol. 2008 Feb; 79(2): 300-306.
  118. Padayatty SJ, Daruwala R, Wang Y, Eck PK, Song J, Koh WS, Levine M. Vitamin C: From molecular actions to optimum intake. Handbook of Antioxidants. 2001;117-145.

119. Peterkofsky B. Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr.* 1991; 54(6): 1135-1140.
120. Petrovich YA, Podorozhnaya RP, Kichenko SM, Kozlova MV. Effects of selenium- containing compounds and their metabolism in intact rats and in animals with bone fractures. *Bull Exp Biol Med.* 2004 Jan; 137(1): 74-77.
121. Porto da Rocha, Lucio DP, Suoza Tde L. Effects of a vitamin pool (vitamins A, E, and C) on the tissue necrosis process: experimental study on rats. *Aesthetic Plast Surg.* 2002; 26: 197-202.
122. Prasad G, Dhillon MS, Khullar M, Nagi ON. Evaluation of oxidative stress after fractures. A preliminary study. *Acta Orthop Belg.* 2003 Dec; 69(6): 546-51.
123. Pugliese PT. The skin's antioxidant systems. *Dermatol Nurs.* 1998; 10: 401-416.
124. Radi ZA, Khan NK. Effects of cyclooxygenase inhibition on bone, tendon, and ligament healing. *Inflamm res.* 2005 Sep; 54(9): 358-66.
125. Rahmouni F, Badraoui R, Amri N, Elleuch A, El-Feki A, Rebai T, Saoudi M. Hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats induced by carbon tetrachloride and the protective effects of Teucrium polium and vitamin C. *Toxicology Mechanisms and Methods.* 2019.
126. Ralston SH. Nitric Oxide and bone: What a gas! *British Journal of Rheumatology.* 1997; 36: 831-838.
127. Reed DJ. Glutathione: toxicological implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990; 30: 603-31.
128. Reham A. El- Shafeia\*, Rasha M. Salehb. Pharmacological effects of Vitamin C & E on Diclofenac Sodium intoxicated Rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2016; 84: 314–322.
129. Reikeraas O, Engebretsen L. Effects of ketoralac tromethamine and indomethacin on primary and secondary bone healing. An experimental study in rats. *Acta OrthopTrauma Surg* 1998; 118: 50-52.
130. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233:357-63.

131. Ricciarelli R, Maroni P, Ozer N, Zingg JM, Azzi A. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27: 729–737.
132. Riggs BL, Parfitt AM. Drugs used to treat osteoporosis: The critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 2005 Feb; 20(2): 177-184.
133. Risto O, Wahlstriim O, Abdiu A. The effect of low dose diclofenac sodium administered locally on heterotopic bone formation in rats. *International Orthopaedics*. 1995; 19: 392-395.
134. Sandukji A, Al-Sawaf H, Mohamadin A, Alrashidi Y, Sheweita SA. Oxidative stress and bone markers in plasma of patients with long-bone fixative surgery: role of antioxidants. *Human and Experimental Toxicology*. 2010;30(6):435–442.
135. Sarisözen B, Durak K, Dinçer G, Bilgen OF. The effects of vitamins E and C on fracture healing in rats. *J Int Med Res*. 2002 May-Jun; 30(3): 309-313.
136. Sassioto MCP, Inouye CM, Aydos RD, Figueiredo AS. Bone repair in rats treated with sodic diclofenac and calcitonin. *Acta Cir Bras*. 2006; 21: 40-44.
137. Schenk RK. Histophysiology of Bone Remodeling and Bone Repair. In Lin OCC, Chao EVS (Eds) *Perspective on Biomaterials*. Amsterdam, Elsevier Science Publisher, 1994.
138. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein bound, and nonprotein bound sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochemistry* 1968; 25: 192-205.
139. Seidenberg AB, An YH. Is there an inhibitory effect of COX-2 inhibitors on bone healing? *Pharmacol Res*. 2004 Aug; 50(2): 151-156.
140. Seifert MF, Watkins BA. Role of dietary lipid and antioxidants in bone metabolism. *Nutrition Research*. 1997; 17(7): 1209-1228.
141. Sen C, Erdem M, Gunes T, Koseoglu D, Filiz NO. Effects of diclofenac and tenoxicam on distraction. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007; 127: 153–159.

142. Sergeev IN, Kha KP, Blazheevich NV, Spirichev VB. Effect of combined vitamin D and E deficiencies on calcium metabolism and bone tissue of the rat. *Vopr Pitan.* 1987 Jan-Feb; 1: 39-43.
143. Sergeev IN, Arkhapchev I.P., Spirichev VB. The role of vitamin E in metabolism and reception of vitamin D. *Biokhimia.* 1990 Nov; 55: 1989-1995.
144. Serpek B, Başpınar N, Haliloğlu S, Erdem H. The Relationship Between Ascorbic Acid, Oestradiol 17 $\beta$  And Progesterone In Plasma And In Ovaries During The Sexual Cycle In Cattle. *Revue Med Vet.* 2001; 152(3): 253 – 260.
145. Seven A, Candan G. Antioksidan savunma sistemleri. *Cerrahpaşa J Med.* 1986; 27:41-50.
146. Seyama A. The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal ischemia/reperfusion injury. *Jpn. J. Surg.* 1993; 23(12): 1060-1067.
147. Shetty V, Bertolami CN. Chapter 1, Part 1: Principles of Medicine, Surgery, and Anesthesia. Wound Healing.
148. Shuid AN, Mehat Z, Mohamed N, Soelaiman IN. Vitamin E exhibits bone anabolic actions in normal male rats. *J Bone Miner Metab.* 2010; 28: 149–156.
149. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials* 2001; 22: 2581-2593.
150. Silva YS, Zindel Deboni MC, Arana-Chaves VE, Naclério-Homem MG. Novel Model of Mono Cortical Bone Defect in Rat Mandible: An Interesting Tool for Osseous Investigations. *International Journal of Health Sciences.* 2016;4(2):47-54.
151. Simon AM, Manigrasso MB, O'connor JP. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002 Jun; 17(6): 963-976.
152. Smith BJ, Lucas EA, Turner RT, Evans GL, Lerner MR, Brackett DJ, Stoecker BJ, Arjmandi BH. Vitamin E provides protection for bone in mature hindlimb unloaded male rats. *Calcif Tissue Int.* 2005 Apr; 76(4):272-279.

153. Soyöz M, Özçelik N. TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) ve Sinyal İletimi TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) and Signal Transduction: *Medical Education*. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2007;27.
154. Şen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 957; 239-249.
155. Şenel O, Cetinkale O, Ozbay G, Ahcioglu F, Bulan R. Oxygen free radicals impair wound healing in ischemic rat skin. *Ann Plast Surg*. 1997; 39: 516-523.
156. Tiseo BC, Namur GN, de Paula EJL, Mattar Junior R, de Oliveira CRGCM. Experimental study of the action of COX-2 selective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and traditional anti-inflammatory drugs in bone regeneration. *Clinics*. 2006; 61(3): 223-230.
157. Toklu E, Akalın FA, Renda N. The effect of Ibuprofen treatment on superoxide dismutase activity in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 2006; 30(3): 91-101.
158. Turgut A, Göktürk E, Köse N, Kaçmaz M, Oztürk HS, Seber S, Acar S. Oxidant status increased during fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*. 1999 Oct; 70(5): 487-490. 113
159. Turk C, Halici M, Guney A, Akgun H, Sahin V, Muhtaroglu S. Promotion of fracture healing by vitamin E in rats. *J Int Med Res*. 2004;32(5):507-512.
160. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006 Mar 10; 160(1): 1-40.
161. Van Coeverden SC, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA. Bone metabolism markers and bone mass in health pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol*. 2002; 57: 107–116.
162. Vane J, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Rheumatol.Suppl*. 1996;102:9–21.

163. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. Review Article. *Immunology* 2001; 103: 255-261.
164. Varija D, Kumar KP, Reddy KP, Reddy VK. Prolonged constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors & antioxidant enzymes in rat. *Indian J Med Res.* 2009 May; 129(5): 587-592.
165. Waldorf H, Fewkes J. Wound Healing, *Adv Dermatol.* 1995; 10: 77-96.
166. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 612-6.
167. Wechter WJ. The effects of NSAIDs and E-prostaglandins on bone: a two signal hypothesis for the maintenance of skeletal bone. *Prog Drug Res.* 1992;39: 351–364.
168. Wheeler P, M E Batt. Do non-steroidal anti-inflammatory drugs adversely affect stress fracture healing? A short review. *Br J Sports Med.* 2005; 39: 65–69.
169. Winko- Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Druke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998 Sep; 161(5): 2524-2532.
170. Winterbourn C C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol.* 2008; 4: 278-86.
171. Wu D, Hayek MG, Meydani SN. Symposium: Molecular Mechanisms of Protective Effects of Vitamin E in Atherosclerosis. Vitamin E and Macrophage Cyclooxygenase Regulation in the Aged. *J. Nutr.* 2001; 131: 382–388.
172. Xie C, Liang B, Xue M, Lin AS, Loiselle A, Schwarz EM, Guldberg RE, O'Keefe RJ, Zhang X. Rescue of impaired fracture healing in COX-2-/- mice via activation of prostaglandin E2 receptor subtype 4. *Am J Pathol.* 2009 Aug; 175(2): 772-785.
173. Xu H, Watkins BA, Seifert MF. Vitamin E stimulates trabecular bone formation and alters epiphyseal cartilage morphometry. *Calcif Tissue Int.* 1995 Oct; 57(4): 293-300.

174. Yanardag R, Ozsoy-Sacan O, Ozdil S, Bolkent S. Combined Effects of Vitamin C, Vitamin E, and Sodium Selenate Supplementation on Absolute Ethanol-Induced Injury in Various Organs of Rats *International Journal of Toxicology*. 2007; 26: 513.
175. Yee JK, Ima-Nirwana S. Palm vitamin E protects against ferric-nitilotriacetate- induced impairment of bone calcification. *Asia Pacific J Pharmacol*. 1998; 13: 1-7.
176. Yeler H, Tahtabas F, Candan F. Investigation of oxidative stress during fracture healing in the rats. *Cell Biochem Funct*. 2005 Mar-Apr; 23(2): 137-139.
177. Yilmaz C, Erdemli E, Selek H, Kinik H, Arikan M, Erdemli B. The contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001; 121: 426–428.
178. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev* 2011; 111: 5944- 5972.
179. You H, Yang H, Zhu Q, Li M, Xue J, Gu Y, Lin S, Ding F. Advanced oxidation protein products induce vascular calcification by promoting osteoblastic trans- differentiation of smooth muscle cells via oxidative stress and ERK pathway. *Ren Fail*. 2009; 31(4): 313-9.
180. Yougoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J*. 2002; 13(2): 92-96.
181. Young B, Heath JW. Wheather's Functional Histology. 4.ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 2000: 142-151.
182. Zhong ZM, Bai L, Chen JT. Advanced oxidation protein products inhibit proliferation and differentiation of rat osteoblast-like cells via NF-kappaB pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2009; 24(1-2): 105-14.
183. Zhu W, Diwan AD, Lin JH, Murrel GAC. Nitric oxide synthase isoforms during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16(3): 535-540.
184. Zhu W, Murrel GAC, Lin JH, Gardiner EM, Diwan AD. Localization of nitric oxide synthases during fracture healing, *J Bone Miner Res*.2002; 17(8): 1470-1477.

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

## C VİTAMİNİ VE ANTİİNFLAMATUAR KULLANIMININ KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ (DENEYSEL ÇALIŞMA)

## ORJİNALLİK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>11</b>       | % <b>11</b>         | % <b>3</b> | %                |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                      |             |
|----------|------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>nek.istanbul.edu.tr:4444</b><br>İnternet Kaynağı  | % <b>3</b>  |
| <b>2</b> | <b>acikerisim.erbakan.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı | % <b>1</b>  |
| <b>3</b> | <b>angora.baskent.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı     | % <b>1</b>  |
| <b>4</b> | <b>webders.net</b><br>İnternet Kaynağı               | % <b>1</b>  |
| <b>5</b> | <b>metinyasul.blogspot.com</b><br>İnternet Kaynağı   | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>acikerisim.dicle.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı   | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>www.sporbilim.com</b><br>İnternet Kaynağı         | <% <b>1</b> |
| <b>8</b> | <b>acikerisim.aku.edu.tr</b><br>İnternet Kaynağı     | <% <b>1</b> |

acikerisim.kku.edu.tr